

کلونینگ ژن GRA5 توکسوپلازما گوندای سویه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 و بیان آن در سلول CHO

راضی ناصری فر^۱، فاطمه غفاری فر^{۱*}، عبدالحسین دلیمی اصل^۱، زهره شریفی^۲

(۱) گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

(۲) گروه ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۷

چکیده

مقدمه: توکسوپلاسموز یکی از بیماری‌های زئونوز و دارای انتشار وسیع در جهان بوده که اثرات شدید بالینی و دام پزشکی عدیده‌ای را ایجاد می‌کند. این انگل داخل سلولی باعث عوارض عصبی و بیماری‌های چشمی در افراد دارای ضعف ایمنی و نوزادان متولد از مادران آلوده می‌شود. بروز موارد زیاد بیماری همراه با عوارض شدید و کشنده توکسوپلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری برای این بیماری را نشان می‌دهد. یکی از مهم‌ترین راه‌های کنترل بیماری واکسیناسیون است که تاکنون واکسنی مؤثر علیه این انگل پیدا نشده است. با عنایت به زئونوز بودن بیماری در جهان، یکی از مهم‌ترین راه‌های آلودگی انسان مصرف گوشت‌های خام یا نیم‌پز حاوی انگل است. بر همین اساس، استفاده از واکسن مناسب حیوانی نیز می‌تواند باعث تحریک ایمنی حیوان شده و از آن در مقابل تولید کیست در بدن محافظت نماید. با توجه به شیوع وسیع این انگل داخل سلولی در انسان و حیوانات و اثرات شدید و کشنده آن، تولید واکسن‌های جدید بر علیه این بیماری ضرورت می‌یابد. ایمن‌سازی با پلاسمید حاوی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های محافظت‌کننده، به عنوان روشی نسبتاً ابداعی و راهکاری امیدبخش از تکنیک‌های ساخت واکسن به شمار می‌آید. به همین دلیل پلاسمید کدکننده ژن GRA5 را تهیه تا بتوان از آن برای ساخت واکسن بر علیه این عفونت استفاده نمود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ژن GRA5 با استفاده از روش PCR در پلاسمید انتقالی pTZ57R کلون و پس از آن در باکتری اشرشیاکلی سوش TOP10 ترانسفورم شد. سپس پلاسمید نوترکیب از باکتری میزبان استخراج و ژن هدف با استفاده از آنزیم‌های Hind3 و EcoRI از پلاسمید pTZ57R جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA5 و انجام کلونینگ نیز با آنزیم‌های Hind3 و EcoRI برش داده شد و ژن GRA5 درون پلاسمید pcDNA3 ساب کلون شد. محصول واکنش اتصال در باکتری فوق ترانسفورم و در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. پلاسمیدهای نوترکیب pcGRA5 با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری تخلیص و در مرحله بعد در سلول یوکاریوتی CHO ترانس فکت گردید و در خاتمه بیان پلاسمید نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش: به منظور تایید مراحل مختلف کار از روش‌های PCR و برش آنزیمی استفاده شد. پس از الکتروفورز مشخص شد که قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 کلون شده است. قطعه مورد نظر بر روی ژل الکتروفورز در حدود 363 bp بود که هم‌اندازه ژن GRA5 توکسوپلازما گوندای است. به منظور تأیید نهایی، قطعه مورد نظر از تعیین توالی استفاده و با قطعه استاندارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه گردید. برای تایید بیان ژن مورد نظر در سلول CHO از روش وسترن بلات استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کلونینگ و ترانسفورم قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 با موفقیت انجام شده و با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی تایید گردید.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلازما گوندای، کلونینگ، GRA5، pcDNA3، بیان سلولی، وسترن بلات

*نویسنده مسئول: گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

Email: ghafarifi@modares.ac.ir

مقدمه

توکسوپلازموزیس توسط تک یاخته‌ای انگلی به نام توکسوپلازما گوندای (*Toxoplasma gondii*) ایجاد شده که گسترش جهانی دارد، (۹). این بیماری به علت عفونت مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دام پزشکی است، (۹). توکسوپلازموزیس اثرات متفاوتی در میزبان ایجاد می‌کند. در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز، گیرنده های پیوند عضو و بیماران سرطانی باعث بیماری های شدید و مرگ و میر می‌شود، (۱۰). این بیماری با کوریورتنیت، کوری، تورم غدد لنفاوی، آنسفالیت و یا مرگ همراه است، (۱۱). توکسوپلازموزیس مادرزادی، که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین، مرگ جنین در رحم یا نقص های شدید مادرزادی نظیر هیدروسفالی، و عقب ماندگی ذهنی یا کوریورتنیت گردد. (۱۲)

توکسوپلازموز نوعی بیماری زئونوز بوده و داشتن واکنسی مؤثر می‌تواند اثرات مفیدی از نظر پزشکی و دام پزشکی در پی داشته باشد. واکنس مؤثر انسانی بایستی در مرحله اول علاوه بر کاهش موارد ابتلا و مرگ ناشی از بیماری بتواند نسبت به کاهش بار بیماری در موارد مزمن بیماری که نیاز به مراقبت طولانی دارند تأثیرگذار بوده و از نظر اقتصادی نیز به صرفه باشد. واکنس ایده‌آل حیوانی دارای منافع متعددی از جمله افزایش قدرت تولید مثل و کاهش خطرات بهداشتی برای مصرف کنندگان گوشت های مشکوک می باشد. برای مدت ۵۰ سال، آنتی ژن های خام به عنوان واکنس بر علیه توکسوپلازموز مورد آزمایش قرار گرفته اند که مطالعات روی کارایی زیر واحدهای خالص یا ترکیبی جدید حدود ۱۰ تا ۲۰ سال سابقه دارد. واکنس های sub-unit دارای این امتیاز هستند که با حضور آنتی ژن های ایمونوژنیک و بدون اضافه نمودن آنتی ژن های غیر مرتبط ایجادکننده پاسخ های تب‌زا همراه با پاسخ ایمنی، باعث تحریک سیستم ایمنی می شوند. آنتی ژن های دارای پاسخ های محدود ایمنی را می توان با مواد غیر طبیعی تقویت

نمود. این اجزاء به صورت ادجونت‌های (یاور) مناسب بوده و باعث ارتقای کارایی واکنس می‌شود.

معمولاً (SAG1) آنتی ژن های سطحی تاکی زوئیت به عنوان معمول ترین Ag مورد بررسی هستند که به صورت آنتی ژن نو ترکیب استفاده شده اند است. کاندیدهای جدید برای ساخت واکنس آنتی ژن های ROP1، ROP2، GRA1، GRA2، GRA4، GRA5، HSP70، SAG2، SAG3، SRS1، P54، P24 می باشند. گروه آنتی ژن های ترشحی یا GRA جزئی از ژن های هسته ای بوده و توسط DNA هسته ای کد می شوند. از بین آن ها GRA5 به عنوان یکی از آنتی ژن های مهم توکسوپلازما در مراحل مختلف سیکل زندگی انگل ترشح می شود. لازم به ذکر است که این ژن در تست تشخیصی الیزا نیز کاربرد فراوانی دارد و چنانچه با تهیه ژن کامل و استفاده از اجودنت های مختلف، خاصیت ایمنی زایی آن بررسی شود، می توان به تهیه واکنسی مؤثر بر علیه توکسوپلازموز امیدوار بود. (۱۳)

هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه GRA5 در پلاسمید یوکاریوت بی—انی pcDNA3 و ترانسفورم این پلاسمید نو ترکیب در باکتری *E. coli* سوش TOP10 بوده است. GRA5 از برادی زوئیت ها و تاکی زوئیت ها ترشح می‌شوند. جهت بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوت و استفاده آن در تهیه واکنس، کلون نمودن ژن GRA5 در یک پلاسمید یوکاریوتی اهمیت دارد. به این دلیل، در این مطالعه از پلاسمید pcDNA3 استفاده و در نهایت به منظور تایید بیان سلولی از سلول های CHO استفاده و با روش SDS-page تایید شد.

مواد و روش ها

تکثیر انگل توکسوپلازما: تاکی زوئیت های تازه و فعال انگل توکسوپلازما گوندای (۲×۱۰^۴) را به صورت داخل صفاقی به موش سوری تزریق نموده و بعد از گذشت ۴-۵ روز موش ها را کشته و با تزریق مقداری PBS استریل حاوی استرپتومایسین-پنی سیلین به داخل صفاق، انگل تکثیر یافته را به داخل سرنگ می کشیم. (۱۴، ۱۵)

استخراج DNA (DNA Extraction) جهت

استخراج از کیت استخراج DNA شرکت (Bioneer) استفاده شد. دستورالعمل کیت به طور خلاصه بدین ترتیب می باشد: ۱۰۰ میکرولیتر (در حدود ۵×۱۰۷) از سلول های جدا شده در بافر PBS را درون یک ویال ۱/۵cc ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TL و ۲۰ میکرولیتر از پروتئیناز k موجود در کیت را به آن اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در ۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه می شود. محصول لیز شده را به طور کامل به ستون های موجود در کیت منتقل نموده و در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ و به دنبال آن ستون را به یک تیوب ۱/۵ سی سی منتقل نموده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول EL را به ستون اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت انکوبه نموده و در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نموده و محصول در ۲۰- نگهداری می گردد.

طراحی پرایمر: براساس توالی استاندارد ژن کدکننده آنتی ژن کامل GRA5 با شماره دستیابی EU918733.1 پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید.
Forward: (aagcttatggcgtctgtataaacgcg)
Reverse: (gaattcttactcttctcggaacttc)
پرایمر Forward دارای جایگاه برش آنزیمی Hind3 و کدون شروع (ATG) و پرایمر Reverse دارای جایگاه برش آنزیمی EcoRI و کدون توقف (TAA) است. قطعه تکثیر یافته توسط پرایمرهای فوق حدود ۳۶۳ bp می باشد.
تکثیر ژن GRA5 با روش PCR: برای انجام این مرحله، DNA استخراج شده از تاکای زوئیت های توکسوپلازما گوندای به عنوان الگو استفاده گردید و واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. ترکیبات و برنامه استفاده شده در جدول های زیر آمده است.

نوع ماده	مقدار بر حسب میکرولیتر (μl)
mamix ster	12 μl
Primer forward	1 μl (10 pmol / μl)
Primer reverse	1 μl (10 pmol / μl)
Template DNA	3 μl
ddH2o	18 μl

مرحله	درجه حرارت (سانتی گراد)	مدت
Initial Denaturation	۹۴°C	۵ دقیقه
۳۰ سیکل		
Denaturation	۹۴°C	۴۰ ثانیه
Annealing	۵۹°C	۳۰ ثانیه
Extension	۷۳°C	۴۵ ثانیه
Final Extension	۷۳°C	۷ دقیقه

کلونینگ ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R با استفاده از کیت کلونینگ T/A(Cloning Kit) شرکت Fermentas (#k1213) و دستورالعمل آن، ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R کلون گردید. به طور خلاصه پس از ریخته شدن مواد

مورد نظر، که در جدول زیر آمده، در یک میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتری، به طور شبانه در دمای ۲۲°C انکوبه شد و محصول واکنش اتصال تا مرحله بعد در ۲۰°C- نگهداری گردید.

ماده	مقدار
ligation buffer 10X	1μ6
T4DNA ligase	1μ1
pTZ57R/T	1μ3
PCR Production	1μ10
ddH2o	1μ10

انتقال پلاسمید کلون شده به باکتری مستعد
OP10 (Transformation): یک میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد نگهداری شده در 4°C را به مدت نیم ساعت درون یخ گذاشته تا به دمای صفر درجه سانتیگراد برسد. ۵ تا ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش اتصال به میکروتیوب اضافه و به آرامی با هم مخلوط و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شد. در مرحله بعد مخلوط فوق را به مدت ۹۰ ثانیه در دمای 42°C شوک حرارتی داده و بلافاصله به مدت ۲-۳ دقیقه بر روی یخ قرار دادیم. با این تکنیک، پلاسمید نو ترکیب وارد باکتری می شود. ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک را به مخلوط فوق اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در 37°C قرار دادیم. حدود ۳۰۰ میکرولیتر از مایع را دور ریخته و مابقی درون میکروتیوب را آن قدر مخلوط می کنیم تا رسوب کاملاً حل شود. (۲۲)

غربال کردن کلونی های باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب: برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعه مورد نظر، این باکتری ها در محیط کشت حاوی آمپی سیلین، سوبسترای X-gal (۵-برمو ۴-کلرو ۳-ایندولیل-β گالاکتوپیرانوزید) و IPTG به روش زیر کشت داده شدند. در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از محصول بالا (سلول های ترانسفورم شده) به یک پلیت حاوی آنتی بیوتیک، X-Gal و IPTG اضافه و به کمک میله شیشه ای در تمام نقاط پلیت پخش گردید. پلیت ها به طور شبانه (۱۸-۱۶ ساعت) در انکوباتور 37°C قرار داده شد. سپس به مدت چندین ساعت در دمای 4°C قرار داده شد تا کلنی های آبی (کلنی فاقد پلاسمید نو ترکیب) یا سفید (کلنی حاوی پلاسمید نو ترکیب) ظاهر شوند. در

این محیط کشت، کلنی های فاقد پلاسمید نو ترکیب به رنگ آبی و کلنی های حاوی پلاسمید نو ترکیب به رنگ سفید خواهند بود. (۲۲، ۱۷)
روش های تأیید کلونینگ:

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های آبی و سفید: پلاسمیدهای موجود در کلنی های سفید (به علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین تر از پلاسمیدهای موجود در کلنی های آبی هستند، (۱۶). برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمید کلنی های آبی و سفید بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد لود شده و مقایسه گردیدند.

تکنیک PCR: پلاسمیدهای نو ترکیب مورد نظر از سایر پلاسمیدها جدا شد. واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت ۴-۲ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلنی های سفید، به عنوان الگو صورت گرفت. (۲۲)

تعیین توالی DNA: قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R با استفاده از پرایمرهای عمومی پلاسمید، تعیین توالی و با سویه RH استاندارد توکسوپلازما گوندای در بانک ژنی مقایسه شد و در bankit با شماره دستیابی JF501522 ثبت گردید.

ساب کلون ژن GRA5 در پلاسمید بیانی
pcDNA3 در این روش وجود قطعه خارجی در ناقل پلاسمیدی بررسی می شود. بر اساس جایگاه های برش آنزیم که در روی ناقل پلاسمیدی (pTZ57R/T) وجود دارد، می توان قطعات حاصله از هضم آنزیمی را پیش بینی نمود. به همین منظور، پلاسمید نو ترکیب همزمان با ناقل پلاسمیدی (به عنوان شاهد) توسط یک یا دو آنزیم برش داده شد. سپس نمونه های آنزیم زده

حاوی پلاسمید قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین می باشند. (۱۶)

روش‌های تأییدکننده کلون‌شدن قطعه *GRA5*

در پلاسمید بیانی *pcDNA3*

مقایسه باند پلاسمیدهای *pcDNA3* و *pcGRA5*: محصول استخراج پلاسمیدهای *pcDNA3* و *pcGRA5* روی ژل آگاروز ۱ درصد لود و الکتروفورز شد.

PCR ژن *GRA5* با استفاده از پلاسمید نوترکیب *pcGRA5*
به‌عنوان الگو: واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت ۲-۴ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و پلاسمید *pcGRA5*، که با خلال دندان استریل برداشت شد، به‌عنوان الگو انجام گردید.

برش پلاسمید نوترکیب *pcGRA5* با آنزیم‌های *EcoRI* و *indH3*: برش آنزیمی شامل ۲۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب *pcGRA5*، ۱ میکرولیتر آنزیم *EcoRI*، ۱ میکرولیتر آنزیم *indH3*، ۸ میکرولیتر بافر تانگو و ۵ میکرولیتر آب مقطر مطابق با شرایط فوق‌الذکر انجام و با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۱/۷ درصد تایید گردید. (۲۲)

انتقال پلاسمید نوترکیب *pcGRA5* به درون سلول یوکاریوتیک (Transfection): قبل از استفاده از محیط کشت، به‌ازاء هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط DMEM، مقدار ۱۰-۵ میلی لیتر FCS استریل و یک میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین به محیط اضافه شد. سلول یوکاریوتیک در این محیط در دمای ۳۷°C و ۵ درصد CO₂ در فلاسک‌های ۷۵ میلی لیتری کشت داده شد. پس از هر ۲۴-۴۸ ساعت محیط کشت آن‌ها تخلیه و با محیط جدید جایگزین گردید. (۱۷)

در این مطالعه برای ترانسفکت سلول یوکاریوتیک از کیت *Fugene 6 transfection reagent* از شرکت Roche استفاده شد. طبق دستور شرکت سازنده روش استفاده از کیت ترانسفکت به این ترتیب است: یک روز قبل از ترانسفکت، تعداد ۱۰۶×۳-۱ سلول یوکاریوت در هر چاهک ۳۵ میلی متری از پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد و به طور شبانه در ۳۷°C و ۵

همراه با یک نشانگر وزن مولکولی (مارکر) الکتروفورز گردید و مورد بررسی قرار گرفت. (۱۷)

برش آنزیمی پلاسمید *pTGRA5* و جدا کردن قطعه *GRA5*: براساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas واکنش آنزیمی شامل ۲۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب *pTGRA5*، ۱ میکرولیتر آنزیم *EcoRI*، ۱ میکرولیتر آنزیم *Hind3*، ۸ میکرولیتر بافر تانگو و ۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه و پس از ورتکس و spin، مخلوط فوق به طور شبانه در بن‌ماری ۳۷°C قرار داده شد. هم‌چنین پلاسمید *pcDNA3* برای پذیرش قطعه *GRA5* و انجام کلونینگ با آنزیم‌های فوق‌الذکر برش داده شد و نتایج برش آنزیمی هر کدام روی ژل ۱/۷ درصد آگاروز مشاهده گردید.

کلونینگ ژن *GRA5* در پلاسمید *pcDNA3*:
برای این منظور، واکنش اتصال براساس دستورالعمل کیت (Fermentas) به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر پلاسمید *pcDNA3* آنزیم خورده، ۴ میکرولیتر ژن *GRA5*، ۱ میکرولیتر آنزیم *T4DNA ligase*، ۴ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه و برای یک ساعت در ترموسیکلر ۲۲°C و بعد به طور شبانه در یخچال نگهداری شد.

انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده داخل ناقل *TOP10*: انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده *pcGRA5* داخل ناقل *TOP10* بدین نحو صورت گرفت که ۱۰ میکرولیتر از محصول اتصال به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مستعد اضافه و مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه انکوبه و در دور ۵ هزار به مدت ۲ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی را دور ریخته و بقیه آن نگهداری شد.

غربال کردن کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب *pcGRA5*: مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های ترانسفورم شده را به پلیت LB حاوی آنتی بیوتیک (آمپی‌سیلین) اضافه کرده و با میله شیشه‌ای روی محیط جامد پخش و به طور شبانه در ۳۷°C انکوبه نمودیم. تنها باکتری‌های

بار از سمپلر گذرانده تا سلول ها جدا شوند و سپس محتویات هر چاهک در یک میکروتیوب ۱/۵cc جمع آوری گردید. سلول های مذکور تا زمان استفاده در 20°C - نگه داری شد.

تایید بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوتیک: برای تایید بیان ژن در محیط کشت سلولی از چند روش استفاده می شود که مهم ترین آن ها روش وسترن بلات است. در این روش باندهای پروتئینی که در روی ژل آکریل آمید الکتروفورز شده اند به یک غشاء (مانند نیتروسولوز)، که قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین را داشته، منتقل می شوند. در این روش ملکول های پروتئین از ژل خارج شده و در سطح غشاء در همان موقعیت قرار می گیرند. برای تشخیص پروتئین های منتقل شده به غشاء باید از لیگاندهای اختصاصی یا سوبسترای مربوطه استفاده شود. آنتی بادی ها از متداول ترین موادی هستند که در تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشاء به کار می روند. (۱۸،۱۹)

یافته های پژوهشی

نتایج PCR به کمک DNA ژنومی: نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی وجود باند اختصاصی حدود ۳۶۳ جفت باز روی ژل آگاروز را نشان داد که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلازما گوندای است. بنابراین، پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر این ژن اختصاصی بودند. (شکل ۱)

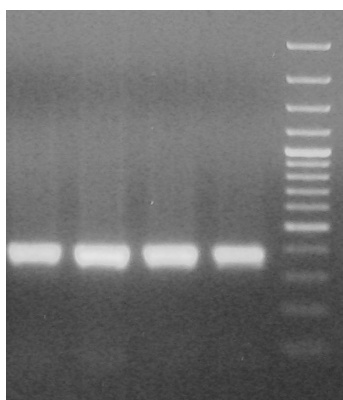
درصد CO2 انکوبه گردید. قبل از ترانسفکت می بایست سلول ها ۵۰-۸۰ درصد از پلیت را پر کرده باشند.

۱- برای ترانسفکت هر چاهک مقدار ۹۷ میکرولیتر محیط DMEM فاقد FCS درون یک ویال استریل ریخته و ۳ میکرولیتر معرف Eugene به آن اضافه شد و پس از آن ۱ ثانیه ورتکس و به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نسبت مورد استفاده برای ترانسفکت ۳:۱ بود.

۲- برای هر چاهک ۳۵ میلی متری مقدار ۱ میکروگرم پلاسمید به مخلوط فوق اضافه شد و به آرامی با پیپت مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید.

۳- چاهک حاوی سلول یوکاریوتیک را توسط پیپت تخلیه نموده و ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM (فاقد FCS) به چاهک اضافه و سپس محتویات ویال فوق را به آرامی در تمام سطح چاهک پخش و پلیت را به آرامی حرکت داده تا مخلوط در همه جای پلیت توزیع گردد. آن گاه پلیت در 37°C و ۵ درصد CO2 به مدت ۲۴-۷۲ ساعت انکوبه گردید.

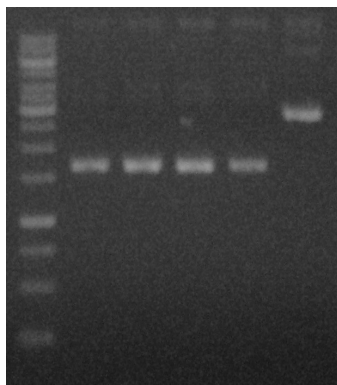
۴- پس از طی این مدت، سلول های ترانسفکت شده و سلول های ترانسفکت نشده در شرایط کاملاً استریل جمع آوری گردید. برای این منظور، ابتدا سلول ها با PBS شستشو شده و با اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر PBS به هر چاهک، با نوک سمپلر سلول ها را از کف پلیت جدا کردیم. محتویات هر چاهک را چند



شکل شماره ۱. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، ستون شماره ۲، ۳، ۴، ۵ قطعه GRA5 اندازه ۳۶۳ جفت باز، ستون ۱ مارکر ۱۰۰ جفت باز

پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های سفید به دلیل سنگینی در ژل آگاروز مقداری بالاتر از کلونی های آبی قرار گرفتند. (شکل ۲)

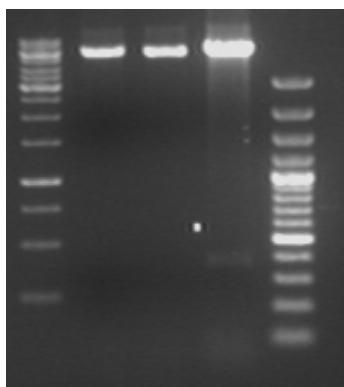
۳-۲. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های سفید و آبی: کلنی های سفید و آبی روی محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین و آغشته به X-gal و IPTG نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق است.



شکل شماره ۲. نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی ها روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد، ستون ۶ مارکر دارای ۱۰۰۰ جفت باز، ستون ۲، ۳، ۴، ۵ پلاسمید pTZ57R، ستون ۱ پلاسمید نو ترکیب pTGRA5

pTZ57R بود. بنابراین، نتایج برش آنزیمی روی ژل آگاروز، کلون ژن GRA5 درون پلاسمید pTZ57R را تایید می نماید. (شکل ۳)

برش آنزیمی پلاسمیدهای pTGRA5 دو باند نشان داد یک باند ۳۶۳ bp که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلازما گوندای و باند دیگر تقریباً هم اندازه



شکل شماره ۳. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pTGRA5 روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد، ستون ۱ مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۲، ۳، ۴، ۵ مونو دایجست پلاسمید pcGRA5، ستون ۶ پلاسمید pcGRA5 آنزیم خورده و ستون ۷ مربوط به مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی

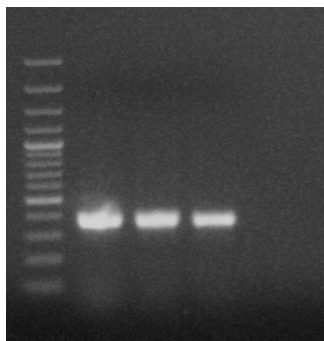
توالی ژن GRA5 کلون شده توکسوپلازما گوندای در این مطالعه در بانک ژنی با شماره دستیابی JF501522 ثبت شد.

نتایج ترانسفورماسیون باکتری ها با محصول واکنش اتصال: مرحله ظهور کلنی باکتری ها روی

نتایج تعیین توالی: نتایج حاصل از تعیین توالی ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R نشان داد که این ژن دارای ۳۶۳ جفت باز بوده که با ژن GRA5 توکسوپلازما گوندای با شماره دستیابی EU918733.1 در بانک ژنی ۱۰۰ درصد تشابه داشت.

باکتری های ترانسفورم شده روی ژل آگاروز باندی را نشان دادند که تأییدکننده کلون قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 بود. (شکل ۴)

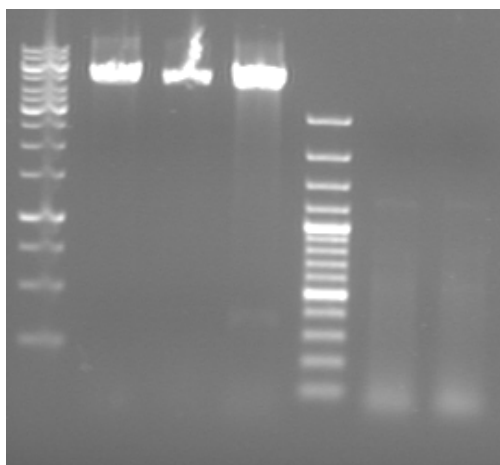
محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری مستعد بود. پلاسمید pcGRA5 استخراج شده از



شکل شماره ۴. نتایج الکتروفورز باند pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱ درصد ستون ۱، ۲ و ۳

بود و باند دیگر حدود ۳۶۳ bp که برابر با قطعه GRA5 است. بدین ترتیب ساب کلون قطعه GRA5 درون pcDNA3 نیز تأیید گردید. (شکل ۵)

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pcGRA5*: نتایج برش آنزیمی *pcGRA5* با آنزیم های EcoRI و Hind3 دو باند را نشان داد که یکی حدود ۵۴۰۰ bp



شکل شماره ۵: ستون ۱ و ۲ مربوط به مونو دایجست pcDNA3 و ستون ۳ لادر ۱۰۰۰ جفت بازی و ستون های ۴ و ۵ و ۶ مربوط به دابل دایجست pcDNA3 و ستون ۷ لادر ۱۰۰ جفت بازی

بحث و نتیجه گیری

توکسوپلاسموز نوعی بیماری زئونوزاست و داشتن واکسنی مؤثر می تواند اثرات مفیدی در جنبه های پزشکی و دام پزشکی داشته باشد. واکسن مؤثر انسانی بایستی در مرحله اول علاوه بر کاهش موارد ابتلا و مرگ ناشی از بیماری بتواند نسبت به کاهش بار بیماری در موارد مزمن که نیاز به مراقبت

نتایج وسترن بلات: به دنبال انجام SDS-PAGE با انجام تست وسترن بلات کاغذ رنگ گرفته نیتروسولوز باندهای قهوه ای رنگ را نشان می دهد، نوارها به داخل آب مقطر منتقل شده و بین دو کاغذ صافی خشک می شوند. کاغذ رنگ گرفته نیتروسولوز در تاریکی نگهداری شد تا رنگ ایجاد شده از بین نرود.

طولانی دارند تأثیرگذار بوده و از نظر اقتصادی به صرفه باشد.

برای مدت ۵۰ سال، آنتی ژن های خام به عنوان واکسن علیه توکسوپلاسموز مورد آزمایش قرار گرفته اند که مطالعات بر روی کارایی زیر واحدهای خالص یا ترکیبی جدید حدود ۱۰ تا ۲۰ سال سابقه دارد. واکسن های زیر واحدهای خالص دارای این مزیتند که حاوی آنتی ژن های ایمونژنیک بوده، بدون این که آنتی ژن های غیر مرتبط ایجاد کننده تب در آن ها وجود داشته باشد. آنتی ژن هایی که پاسخ ایمنی محدودی می دهند با استفاده از مواد غیر طبیعی تقویت می شوند. این مواد به صورت ادجونت ها باعث ارتقای کارایی واکسن می شوند. در حال حاضر، تکنولوژی پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن های چند ظرفیتی پیشنهاد می کند، به طوری که این واکسن ها پاسخ های ایمنی همورال و سلولی پایدار و قوی ای را ایجاد می کنند (۲۰). یکی از راه های مهم دست یابی به واکسن های چند ظرفیتی در مبارزه با توکسوپلاسموزیس استفاده از واکسن های DNA کوکتل می باشد که باعث ایجاد پاسخ های ایمنی-محافظتی طولانی مدت و مؤثر می شوند (۲۱). به علت این که انگل های داخل سلولی نظیر توکسوپلاسمای گوندای تعداد زیادی از اپی توپ های آنتی ژنیک را عرضه کرده و توانایی آن ها در عرضه آنتی ژن در میان افراد مختلف، بسیار متنوع می باشد، ایمونیزاسیون با واکسنی که پاسخ ایمنی را در مقابل طیف وسیعی از آنتی ژن ها تحریک کند بسیار مؤثرتر از واکسنی می باشد که فقط از یک آنتی ژن تشکیل شده و پاسخ ایمنی را بر ضد این آنتی ژن تحریک می نماید (۲۱). از مزیت های دیگر واکسن DNA کوکتل این است که باعث تولید مقدار زیادی اینترفرون گاما شده و هم چنین باعث القای تولید آنتی بادی می گردد. این واکسن ها عمدتاً باعث تولید سایتوکین های Th1 می شوند و البته در مقدار کمتر سایتوکین های Th2 را هم تولید می نمایند. از مزیت های دیگر واکسن DNA کوکتل جلوگیری از انتشار سیستماتیک انگل در بدن و افزایش بقاء و طول

عمر می باشد (۲۱). واکسن DNA کوکتل در مقدار کم باعث تحریک پاسخ های ایمنی همورال و سلولی می شود در حالی که واکسن های تک ژنی با مقدار و دوز کم قادر به تحریک پاسخ های ایمنی نمی باشند و نیاز به دوز بالا دارند (۲۱). با توجه به این واقعیات، واکسن DNA کوکتل یکی از امید بخش ترین استراتژی ها برای دستیابی به واکسن های مؤثر در مقابله با انگل های داخل سلولی (مانند توکسوپلاسمای گوندای) می باشد. بر همین اساس، شناسائی ژن های انگل از اهمیتی خاص برخوردار است. با توجه به آنالیز تعیین توالی ژن GRA5 توکسوپلاسمای گوندای در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از ژن استاندارد، مشخص شد که قطعه ۳۶۳ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است. هم چنین این ژن با سویه RH توکسوپلاسمای گوندای با شماره دستیابی EU918733.1 در بانک ژنی دارای ۱۰۰ درصد تشابه بوده و این شباهت نشان دهنده حفظ توالی ژن در سویه های مختلف توکسوپلاسمای گوندای می باشد. در برش آنزیمی قطعه ۳۶۳ bp جدا شد که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلاسمای گوندای بوده و در حقیقت ساب کلون این ژن را در پلاسمید pcDNA3 تأیید می نماید. نتایج حاصل از PCR پلاسمید pTGRA5 و pcGRA5 نشان داد، تنها ژن GRA5 تکثیر شده و هیچ ژن دیگری تکثیر نیافته است. نتایج این تحقیق بیانگر آن است که کلون این ژن در پلاسمیدها با موفقیت انجام شده است و با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی تأیید شد. بنابراین، می توان با استفاده از پلاسمیدهای نو ترکیب برای تهیه واکسن علیه بیماری های انگلی در آینده امیدوار بود.

در مجموع، در این پژوهش ژن GRA5 توکسوپلاسمای گوندای برای اولین بار به طور موفقیت آمیز در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد که این پلاسمید می تواند برای مطالعات بعدی در جهت ساختن واکسن DNA مورد استفاده قرار گیرد.

سپاس گذاری

این طرح در قالب پایان نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

پیرستانی و سروی و هم چنین کارکنان محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس ابراز دارند.

نویسندگان مقاله بر خود واجب می دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای دکتر صدرایی، آقایان

References

- 1-Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. Toxoplasma gondii: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2009 Sep;123(1):81-9.
- 2-Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, et al. Identification of T. gondii epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 May 21;28(23):3977-89.
- 3-Qu D, Wang S, Cai W, Du A. Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated Salmonella typhimurium against Toxoplasma gondii infection in mice. *Vaccine* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Aug 18;26(35):4541-8.
- 4-Zhang J, He S, Jiang H, Yang T, Cong H, Zhou H, et al. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of Toxoplasma gondii and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Parasitol Res*. 2007 Jul; 101(2):331-8.
- 5-Hiszczynska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Oledzka G, Kur J, Bickerstaffe R, et al. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding Toxoplasma gondii GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp Parasitol* 2010 Apr;124(4):365-72.
- 6-Flori P, Tardy L, Jacquet A, Belleste B, Hafid J, Raberin H, et al. Effect of rSAG-1(P30) immunisation on the circulating and tissue parasites in guinea pigs as determined by quantitative PCR. *Parasitol Res* 2006 May;98(6):511-8.
- 7-Jongert E, Melkebeek V, De Craeye S, Dewit J, Verhelst D, Cox E. An enhanced GRA1-GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-Toxoplasma immune responses in pigs. *Vaccine* 2008 Feb 20;26(8):1025-31.
- 8-Wang H, He S, Yao Y, Cong H, Zhao H, Li T, et al. Toxoplasma gondii: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol* 2009 Jul;122(3):226-32.
- 9-Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect* 2003 Apr;5(5):457-62.
- 10-Saito S, Aosai F, Rikihisa N, Mun HS, Norose K, Chen M, et al. Establishment of gene-vaccinated skin grafting against Toxoplasma gondii infection in mice. *Vaccine* 2001 Feb 28;19(15-16):2172-80.
- 11-Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. *Int J Parasitol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Mar 9;34(3):285-96.
- 12-Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, et al. Vaccination with Toxoplasma gondii SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infect Immun* 2003 Nov;71(11):6615-9.
- 13-Louis M. Weiss and Kami Kim. "Toxoplasma gondii The Model Apicomplexan Perspectives and Methods". 1st ed. Elsevier Ltd, 2007.
- 14-Brown HW, Nevia F. Toxoplasma gondii. Basic and Clinical Parasitology. 6th ed. Appleton centary- Crofts, Nerwalk Conection 1995.P.45-7.
- 15-Xue M, He S, Zhang J, Cui Y, Yao Y, Wang H. Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of Toxoplasma multi-antigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. *Exp Parasitol* 2008 Jul;119(3):352-7.
- 16-Sambrook J, Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; chapter 1.pp.32, 123.
- 17-Solhjou K. Preparation and evaluation of DIG-ELISA for serodiagnosis of toxoplasmosis. Thesis for MSc. Tarbiat Modares University, October 2000. (Persian)

- 18-Mostafaei A. Theoretical and practical guide to protein gel electrophoresis. Yadavaran Publication, Tehran 2003. (Persian)
- 19-Dunbar BS. Protein blotting: a practical approach. Oxford University Press 1994.pp. 569-88.
- 20-Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. Vet Parasitol [Research Support, Non-U.S. Gov't Review] 2001 Sep 12;100(1-2):3-12.
- 21-Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, Acosta A, et al. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. Vaccine [Research Support, Non-U.S. Gov't] 2003 Mar 28;21(13-14):1327-35.
- 22-Masbi N, Ghafarifar F, Sharifi Z, Dalimi A, Vazini H. Cloning and characterization of GRA4 gene of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in expression eukaryotic vector pcDNA3, Daneshvar. 2010;17(85):1-8. (Persian)

Cloning of Toxoplasma Gondii Granular Antigen 5(GRA5) in Expression Eukaryotic Plasmid pcDNA3 and its Expression on CHO Cell

Naserifar R¹, Ghaffarifar F^{1*}, Dalimi Asl A¹, Sharifi Z²

(Received: 16 Apr. 2011

Accepted: 18 Dec. 2011)

Abstract

Introduction: Toxoplasmosis is a one of the most world-wide spread zoonosis representing a very serious clinical and veterinary problem. Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that causes severe neurologic and ocular disease in immune compromised and congenitally infected individuals. The heavy incidence and severe or lethal damages of toxoplasmosis clearly indicate the need for the development of a more effective vaccine human vaccines are not available and current anti-toxoplasma treatment is disappointing. Immunization with plasmid DNA, a relatively novel technique, is a promising vaccination technique. To improve the immune response by DNA vaccination various is one of the key for the success of the vaccine in the field. One of the most efficient ways to control this disease is immunization. However, so far, there is no effective vaccine available against this pathogen. An important source of human contamination with T. gondii is the consumption of raw or undercooked meat products. Toxoplasma gondii are widely prevalent in humans and other animals which can cause severe or lethal toxoplasmosis. So, the development of a more effective vaccine is needed urgently. Therefore, we prepare gra5 plasmid to use as a vaccine.

Materials & Methods: In this study, GRA5 was cloned in pTZ57R; afterwards, it was transformed into TOP10 strain of E.coli Bacteria. The recombinant plasmid extracted from E.coli bacteria and amplified through PCR technique. Besides, pcDNA3 Plasmid for receiving and cloning of GRA5 segment was digested by Hind3 & EcoRI enzymes. GRA5 was sub-cloned into pcDNA3 and the reaction ligation product was transformed for the above bacteria. The bacteria grew in LB culture with ampicillin. Recombined pcGRA5 plasmids were purified from E.coli by Plasmid extraction kit. Finally, recombinant plasmid using cell culture method was expressed in Cho cell.

Findings: The accuracy of the results was confirmed by using restriction enzymes and PCR methods. GRA5 was cloned into expression eukaryotic plasmid pcDNA3. After sequencing pcGRA5 plasmid for cell expression Western blot method was used.

Discussion & Conclusion: The results showed that cloning and transformation of fragment GRA5 in pcDNA3 was done properly.

Keywords: Immunization, GRA5, toxoplasma gondii, n expressio cell, DNA

1.Dept of Parasitology, Tarbiat Modares University of medical Science, Tehran, Iran

2.Dept of Virology, Blood Transfusion Center, Tehran, Iran

*(corresponding author)