

کلونینگ ژن p4 لیثمانیا ماژور

چکیده

زمینه و هدف: ژن p4 لیثمانیا ماژور، در مرحله آماستیگوت انگل بیان می‌شود که احتمالاً ترکیب مناسب جهت تهیه واکسن بر علیه لیثمانیوز است. هدف از انجام این پژوهش، کلون این ژن در یک وکتور (ناقل) مناسب برای مطالعات بیشتر در زمینه واکسن‌سازی بود.

روش بررسی: این بررسی به صورت تجربی انجام گرفته است. در مرحله پروماستیگوت، لیثمانیا ماژور در محیط N.N.N و سپس در محیط RPMI1640 به صورت انبوه کشت داده شد. در ادامه DNA ژنومی انگل با روش جوشان استخراج شد. سپس PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن p4 انجام شد. محصول PCR از روی ژل آگاروز خالص سازی شد و در پلاسمید نو ترکیب غربالگری شد و تحت تأثیر آنزیم‌های برش دهنده قرار گرفت. **یافته‌ها:** واکنش PCR و سپس کلون قطعه p4 در T-Vector به درستی انجام شد. پلاسمید حاوی قطعه استخراج و ژن کلون شده در آن با آنزیم‌های برش دهنده، جدا شد و پلاسمید بیان PQE-30 با موفقیت ساب کلون شد و سپس توسط آنزیم‌های برش دهنده و انجام PCR روی پلاسمید بیان، تأیید شد. **نتیجه‌گیری:** این ترکیب ماده بیان، ژن p4 در آزمایشگاه است. تولید آنتی ژن نو ترکیب P4 می‌تواند، به خصوص در زمینه تهیه واکسن، به کار آید و علاوه بر آن در زمینه‌های هدف دارویی و تست‌های تشخیصی نیز قابل استفاده است.

کلیدواژه‌ها: ۱- ژن P4، ۲- کلونینگ، ۳- لیثمانیا ماژور، ۴- واکسن

*دکتر مینو شاددل I

دکتر هرمزد اورمزدی II

دکتر لامع اخلاقی III

دکتر بهرام کاظمی IV

مژگان بنده‌پور V

مقدمه

لیثمانیا، یک انگل داخل سلولی اجباری از خانواده تریپانوزومیده است. در سیکل زندگی آن دو مرحله وجود دارد: مرحله تاژکدار پروماستیگوت که درون بدن پشه خاکی به عنوان ناقل بیولوژیکی است و مرحله آماستیگوت که درون ماکروفاژهای میزبانان مهره‌دار است.^(۱) گونه‌های مختلف لیثمانیا، طیف وسیعی از بیماری‌ها را از بیماری پوستی خود محدود شونده تا فرم منتشره شدید یا بیماری احشایی سبب می‌شوند. به دلیل عدم درمان موفقیت‌آمیز، عوارض جانبی داروها و مقاومت دارویی، تهیه یک واکسن مناسب مورد توجه بیشتر قرار گرفته است.^(۲) از آنجایی که فرم آماستیگوت انگل سبب بیماری در انسان می‌شود، بنابراین آنتی‌ژن‌های اختصاصی این مرحله جهت تهیه واکسن بیشتر مورد توجه هستند^(۳-۵). تجربیات قبلی، تولید ۸ منوکلونال آنتی بادی اختصاصی را برای مرحله آماستیگوت انگل لیثمانیا پیفانوی گزارش دادند (p1 تا p8). منوکلونال آنتی بادی‌های p2، p4 و p8 با مرحله آماستیگوت لیثمانیا آمازو ننسیس نیز واکنش نشان دادند.^(۴) منوکلونال آنتی بادی‌های p4 و p7 دارای باند پروتئینی با وزن حدود ۳۴ کیلو دالتون هستند.^(۵) آنتی‌ژن‌های اختصاصی مرحله آماستیگوت نیز توسط همین منوکلونال آنتی بادی‌ها شناسایی می‌شوند. هر کدام از این آنتی‌ژن‌ها یک پتانسیل بالقوه به عنوان کاندید تهیه واکسن در جهت پیشگیری و کنترل انگل به شمار می‌آیند.^(۶) آنتی‌ژن‌های p4 و p8 از کشت آگزینیک مرحله آماستیگوت

لیثمانیا، یک انگل داخل سلولی اجباری از خانواده تریپانوزومیده است. در سیکل زندگی آن دو مرحله وجود دارد: مرحله تاژکدار پروماستیگوت که درون بدن پشه خاکی به عنوان ناقل بیولوژیکی است و مرحله آماستیگوت که درون ماکروفاژهای میزبانان مهره‌دار است.^(۱) گونه‌های مختلف لیثمانیا، طیف وسیعی از بیماری‌ها را از بیماری پوستی خود محدود شونده تا فرم منتشره شدید یا بیماری احشایی سبب می‌شوند.

به دلیل عدم درمان موفقیت‌آمیز، عوارض جانبی داروها و مقاومت دارویی، تهیه یک واکسن مناسب مورد توجه بیشتر قرار گرفته است.^(۲) از آنجایی که فرم آماستیگوت انگل سبب بیماری در انسان می‌شود، بنابراین آنتی‌ژن‌های

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه دکتر مینو شاددل جهت دریافت درجه دکترای انگل‌شناسی به راهنمایی دکتر هرمزد اورمزدی و دکتر لامع اخلاقی و مشاوره دکتر بهرام کاظمی.

I استادیار انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، خیابان شهید فاطمی، خیابان شهید اعتمادزاده، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول)

II استاد انگل‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی - ایران، تهران، ایران

III دانشیار انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران

IV استاد انگل‌شناسی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

V فوق لیسانس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

extention دمای 72°C به مدت ۶۰ ثانیه است، و در پایان دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت^(۷). محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. باند DNA مورد نظر زیر نور ماوراء بنفش (Ultraviolet- UV)، مشاهده گردید^(۸). محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ Low Melting Point الکتروفورز شد و زیر نور UV باند DNA مورد نظر از ژل جدا و خالص سازی شد^(۹). DNA خالص شده طی روش T/A Cloning درون پلاسمید pBluescript کلون شد. به صورت خلاصه، پلاسمید pBluescript که با آنزیم EcoRV برش داده شد، با آنزیم نوکلئوتیدیل ترانسفرم به انتهای ۳' آن dTTP اضافه شد^(۱۰).

محصول واکنش Ligation (پیوند) در سلول پذیرای E.coli سوش - XL1 blue ترانسفورم شد^(۱۱) و در پلیت آگار LB که حاوی $50 \mu\text{g/ml}$ (میکروگرم در میلی لیتر) IPTG, X-gal، کلنی ها توسط IPTG, X-gal غربالگری شدند و کلنی های سفید دارای پلاسمید نو ترکیب، انتخاب شدند^(۱۲). پلاسمید نو ترکیب با روش الکلین، استخراج شد^(۱۳) و با آنزیم BamHI هضم گردید. باند DNA آزاد شده خالص سازی شد و درون پلاسمید بیان pQE-30 که با آنزیم BamHI برش داده شده بود، ساب کلون گردید. محصول واکنش، ترانسفورم شد. کلنی های حاوی پلاسمید نو ترکیب در محیط LB، کشت انبوه داده شد و سپس پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شد و با تجزیه و تحلیل توسط آنزیم های برش دهنده تأیید شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمر forward Universal و reverse اختصاصی ژن p4 جهت تأیید orientation (جهت) مناسب ژن کلون شده، انجام گرفت.

یافته ها

پروماستیگوت لیثمانیا در محیط N.N.N رشد یافته و در محیط RPMI 1640 1640 RPMI به صورت انبوه کشت داده شد و DNA ژنومی آن استخراج شده و با روش PCR تکثیر یافت. DNA استخراج شده در شکل شماره ۱ نشان داده

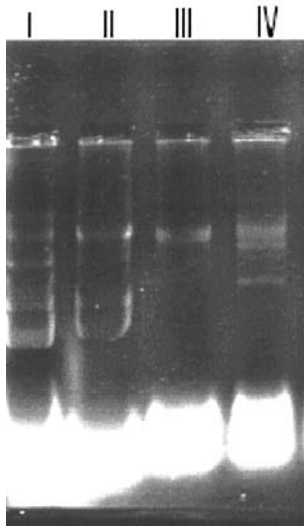
لیثمانیا پیفانوی خالص می شوند و حفاظت بخش قابل ملاحظه ای را القاء می کند^(۳ و ۵). بنابراین یکی از آنتی ژن های سطحی فرم آماستیگوت، p4 است که در زمینه پیشرفت واکسن سازی می تواند مؤثر باشد^(۳- ۵). ژن کد کننده آنتی ژن p4 در لیثمانیا پیفانوی کلون و سکانس گردید و شباهت ژن p4 با سایر گونه های جنس لیثمانیا، بررسی شد. این آنتی ژن درون شبکه آندوپلاسمیک آماستیگوت قرار دارد و دارای فعالیت نوکلئازی است که نقش احتمالی آن در ثبات RNA (بیان ژن) و ترمیم DNA مورد بحث است^(۳). در این بررسی قصد بر این است که ژن p4 لیثمانیا ماژور سویه ایران به عنوان پروتئین نو ترکیب، کلون شود.

روش بررسی

این بررسی به صورت تجربی انجام گرفته است. پروماستیگوت های لیثمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در محیط N.N.N رشد داده شدند و سپس در محیط RPMI 1640 به کشت انبوه رسیدند^(۱). پروماستیگوت ها با سانتریفوژ کردن جمع آوری شدند و توسط بافر مخصوص (گلوکز ۰/۳۳ مول (M)، تریس 10 mM ، 5 mM MgCl_2 ، تریتون- $100 \times 0.2\%$ لیز شدند و با روش جوشاندن، DNA ژنومی آن ها استخراج شد^(۲). براساس سکانس ژن p4 یک جفت پرایمر طراحی شد، به طوری که در سمت ۵ پرایمرها forward و reverse جایگاه برش آنزیم BamHI باشد. واکنش PCR شامل: ۱ میکروگرم (μg) DNA، ۲۰ picomol از هر یک از پرایمرهای forward، ۱/۲۵ 0.4 mM dNTPs بافر 1x PCR، 4mM MgCl_2 واحد DNA Taq Polymerase (Cina Gen, Iran) که حجم آن با dH_2O به ۳۰ میکرولیتر رسانده شده بود، (برنامه دستگاه PCR: به صورت دما 94°C درجه سانتی گراد ($^{\circ}\text{C}$) به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل که هر یک شامل: مرحله denaturation دمای در 94°C به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله annealing دمای $62/5^{\circ}\text{C}$ به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله

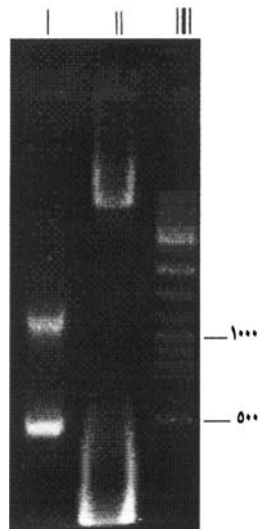
که جایگاه برش اختصاصی در ژن p4 را دارد و پلاسمید غیر نوترکیب را برش نمی‌دهد، تأیید شد.

شکل شماره ۳ پلاسمید نوترکیب را که با آنزیم pmacl برش شده و خطی شده است، نشان می‌دهد.



شکل شماره ۳- تأیید پلاسمید نوترکیب

ستون I: پلاسمید سالم pQE-30 قبل از تأثیر آنزیم
ستون II: پلاسمید سالم pQE-30 بعد از تأثیر آنزیم
ستون III: پلاسمید قطعه دار pQE-30-4 بعد از تأثیر آنزیم
ستون IV: پلاسمید قطعه دار pQE-30-4 قبل از تأثیر آنزیم

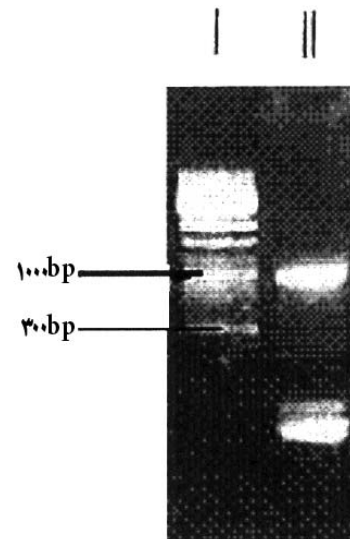


شکل شماره ۴- محصول PCR برای تعیین جهت (orientation) مناسب ژن p4 کلون شده در پلاسمید
ستون I: محصول PCR ژن P4 (1050 bp) با استفاده از پرایمر universal forward و specific p4 reverse
ستون II: پلاسمید pQE-30-4
ستون III: مارکر DNA 1000 (bp)

شده است. در شکل شماره ۲ محصول PCR ژن p4 با وزن 965 bp نشان داده شده است.



شکل شماره ۱- الکتروفورز DNA ژنومی لیثمانیا در ژل آگارز ۱٪



شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪

ستون I: مارکر DNA 100bp

ستون II: محصول PCR ژن p4 با وزن 965bp

محصول PCR در پلاسمید ناقل pBluescript با روش کلونینگ T/A کلون شد. پلاسمید نوترکیب، توسط آنزیم برش دهنده BamHI برش داده شد و باند DNA ژن p4 جدا شد و در پلاسمید بیان pQE-30 که قبلاً با آنزیم BamHI برش شده بود، ساب کلون شد. واکنش Ligation (پیوند) در سلول پذیرای باکتریایی ترانسفورم شد و در پلیت آگار LB حاوی 50 µg/mL آمپی سیلین پخش شد. پلاسمید نوترکیب، توسط تجزیه و تحلیل با آنزیم برش دهنده pmacl

آمازوننسیس و ماژور قرار داد. آن‌ها نشان دادند که ژن p4 همراه با IL-12 در مقابل لیثمانیا آمازوننسیس حفاظت بخشی داشته ولی p4 همراه با HSP70 در مقابل لیثمانیا ماژور حفاظت بخشی داشته است و در نهایت p4 همراه با HSP70 را یک کاندید مناسب جهت تهیه واکسن برای گونه‌های لیثمانیا دنیای قدیم و جدید، معرفی کرد^(۲).

در این بررسی، ژن p4 لیثمانیا ماژور سویه ایران کلون شد. با این هدف که استفاده از سویه ایرانی جهت تهیه واکسن بر علیه لیثمانیا ماژور برای جامعه ایرانی، مفیدتر و کاربردی‌تر است. ضمن اینکه نتیجه این بررسی با بررسی فرج‌نیا و همکاران که گزارش داده‌اند «پروتئین نوکلئاز کلاس ۱ مرحله آماستیگوت لیثمانیا ماژور (Lma CIN) شباهت بسیار زیادی (۸۷٪) به پروتئین p4 لیثمانیا پیفانوی دارد»^(۱۵ و ۱۴) قابل مقایسه خواهد بود.

در این بررسی از آنجایی که DNA لیثمانیا فاقد اینترون است^(۱۶)، جهت دسترسی به ژن p4 از DNA پروماستیگوت لیثمانیا ماژور استفاده شد و به نظر می‌رسد که این روش نسبت به روش ایجاد زخم در حیوان آزمایشگاهی و یا استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و حساس آماستیگوت جهت دسترسی به ژن‌هایی که در مرحله آماستیگوت بیان می‌شوند، سریع‌تر و ساده‌تر باشد^(۱۵).

وجود محدودیت در انجام مطالعات سلولی و مولکولی به ویژه در شرایطی که مراحل پژوهش ابتدا باید تنظیم، سازماندهی و مرتب و سپس انجام شوند، یکی از مشکلات جدی است که تحقیق حاضر نیز در گیر این مشکل بود.

نتیجه‌گیری

نتیجه کلی حاصل از انجام این پژوهش، کلون و

انجام PCR با استفاده از پرایمر forward Universal و reverse اختصاصی ژن p4 برای تعیین جهت (orientation) مناسب ژن کلون شده در پلاسמיד بیان pQE-30 به کار گرفته شد که در شکل شماره ۴ نمایش یافته است.

بحث

لیثمانیا، یک انگل داخل سلولی اجباری است که مرحله پروماستیگوت تأثیرگذار آن، در بدن پشه خاکی ناقل و مرحله آماستیگوت در بدن میزبان (مهره‌دار) وجود دارد^(۱).

تهیه یک واکسن مناسب به دلیل عدم موفقیت در درمان اساسی و انتخابی، عوارض جانبی داروها و مقاومت داروئی، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است.^(۲ و ۳)

محصول ژن p4 که در شبکه آندوپلاسمیک مرحله آماستیگوت قرار دارد، در امر پیشرفت واکسن‌سازی مناسب است^(۳). برخی مطالعات نشان داده است که آنتی‌ژن p4 اختصاص به مرحله آماستیگوت دارد و پروتئین تخلیص شده آن در زمینه رده بندی، اپیدمولوژی و ایمونولوژی می‌تواند مؤثر باشد^(۳-۵).

در مطالعات Sujata و همکارانش ذکر شده است که آنتی ژن خالص p4 در موش BALB/c در مقابل عفونت ناشی از لیثمانیا پیفانوی و آمازوننسیس، حفاظت بخشی نسبی تا کامل و همچنین القاء پاسخ ایمنی از نوع Th1 را در بیماران مبتلا به لیثمانیوزیس جلدی آمریکایی باعث شده بود^(۳).

جهت بررسی پتانسیل DNA واکسن‌ها، Cambell و همکارانش ژن کدکننده نوکلئاز p4 در لیثمانیا آمازوننسیس را همراه با ادجوانت‌های مختلف IL-12 و HSP70 ارزیابی کرده و موش حساس BALB/c را توسط p4 به تنهایی، p4 همراه با IL-12 و p4 همراه با HSP70 ایمن کرده و سپس در معرض عفونت با لیثمانیا

تقدیر و تشکر

این بررسی با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی ایران و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، انجام شد و بدین وسیله نویسندگان مقاله از مسؤولین محترم کمال سپاسگزاری را دارند.

آماده‌سازی ژن p4 در پلاسمید بیان است. این ترکیب آماده بیان در آزمایشگاه و ساختن پروتئین نو ترکیب است. قابل ذکر است که تولید پروتئین نو ترکیب p4 می‌تواند به خصوص در زمینه تهیه واکسن به کار آید و علاوه بر آن، در زمینه‌های هدف دارویی و تست‌های تشخیصی نیز قابل استفاده است.

فهرست منابع

1. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Medical Parasitology. 8th ed. Philadelphia: Saunders WB; 1999. P.184-59
2. Campbell K, Diao H, Jiexiang J, Soong L. DNA Immunization with the Gene Encoding p4 Nuclease of *Leishmania amazonensis* protects Mice against Cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2003; 71(11):6270-8
3. Sujata K, Soong L, Colmenares M, Goldsmith K, Mc Mahon-pratt K. The Immunologically protective p-4 Antigen of leishmania Amastigotes. *J Biol Chem* 2000; 275:37789-97
4. Pan AA, Mc Mahon-pratt D. Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of leishmania pifanoi. *J Immunol* 1998; 140(7): 2406-14.
5. Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, Mc Mahon-pratt D. *Leishmania amazonensis*: Cultivation and Characterization of Axenic Amastigote-like Organisms. *Exp Parasit* 1996; 83:94-105.
6. Brown TA. An Introduction to gene cloning. 3rded. UK: International Thomson Publishing Services; 1995. P.32-41
7. Pherson Mc, Moller MJ PCR. The Basics from Background to Bench. Understanding PCR. 1st ed. Oxford, UK: Bios Scientific publishers; 2000. P.9-21.
8. Boffey SA. Agarose gel electrophoresis of DNA. Walker JM. *Nucleic acids (Methods in Molecular Biology)* Vol.2. 1st ed. USA: Humana Press; 1984. P.43-50.
9. Gaastra W, Jorgensen PL. The extraction and isolation of DNA from gels. Walker JM. *Nucleic acids (Methods in Molecular Biology)* (Vol.2). 1st ed. USA: Humana Press; 1984. P.67-76.
10. Gaastra W, Hansen K. Ligation of DNA with T4 DNA ligase. Walker JM. *Nucleic acids (Methods in Molecular Biology)* (Vol.2). 1st ed. USA: Humana Press; 1984. P.225-30.
11. Hunahan D. Studies on transformation on *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166(4):557-80
12. Bothwell AL, Yancopoulos GD, Alt FW. Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes. 1st ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 1990. P. 247-60.
13. Feliciecello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *E. coli*. *Anal Biochem* 1993; 212(2):394-401
14. Farajnia S, Mahboudi F, Ajdari S, Reiner NE, Kariminia A, Alimohammadian MH. Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to leishmania major amastigote class I nuclease with a predominant Th1-like response. *Clin Exp Immunol* 2005; 139:498-505.
15. Farajnia S, Alimohammadian MH, Reiner NE, Karimi M, Ajdari S, Mahboudi F. Molecular characterization of a novel amastigote stage specific Class I nuclease from *Leishmania major*. *Int J Parasitol* 2004; 34(8):899-908.
16. Fooladvand MA. Cloning and expression *Leishmania major* p36/Lack gene and evaluation the immunity of Lack Recombinant Protein. Thesis. Esfahan: Esfahan University of Medical Sciences and Health Services; 2006. P.7.

Evaluating the Cloning of Leishmania Major p4 Gene in Production of Vaccine

*M. Shaddel, PhD^I H. Ormazdi, PhD^{II} L. Akhlaghi, PhD^{III}
 B. Kazemi, PhD^{IV} M. Bandepour, MSc^V

Abstract

Background and Aim: Leishmania major p4 gene is normally expressed during amastigote form of the parasite and can be a good candidate for producing an effective vaccine. The aim of this study is to clone p4 gene in a suitable vector for further vaccine production studies .

Materials and Methods: This is an experimental study. Leishmania promastigote was grown in N.N.N. medium and later in the form of mass culture in RPMI 1640 cell culture medium. Total leishmania genomic DNA was extracted by centrifugation of promastigote and lysed by lysis buffer followed by boiling method. PCR was carried out using p4 gene specific primers. PCR product was detected by agarose gel electrophoresis and cloned into Bluescript plasmid via T/A cloning method. After transformation, the recombinant plasmid was screened and digested by restriction enzyme

Results: PCR reaction and cloning p4 gene in T-vector was done successfully. Recombinant plasmid was extracted and cloned gene was released by restriction enzyme and subcloned into pPQE-30 expression vector and confirmed by restriction analysis and PCR.

Conclusion: This newly expressed combination is p4 gene invitro. Production of p4 recombinant antigen is very much useful especially in the field of vaccine production, drug target and immunological studies.

Key words: 1) p4 gene 2) Cloning 3) Leishmania major 4) Vaccine

This article is a Summary of the thesis by M. Shaddel for the degree of Ph.D. in Parasitology under supervision of H. Ormazdi, Ph.D. and L. Akhlaghi, Ph.D. and consultation with B. Kazemi, Ph.D.

I) Assistant Professor of Parasitology, Mycology and Parasitology Department, Faculty of Medicine, Shaheed Fatemi st., Shaheed Etemad Zadeh St., Army University of Medical sciences, Tehran, Iran (*Corresponding Author)

II) Professor of Medical Parasitology, Mycology and Parasitology Department, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services Tehran, Iran

III) Associate Professor of Parasitology, Mycology and Parasitology Department, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services Tehran, Iran

IV) Professor of Parasitology, Faculty of Medicine, Research Institute for Cellular and Molecular Biology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

V) MSc in Microbiology, Research Institute for Cellular and Molecular Biology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran