# کلونینگ ژن p4 لیشمانیا ماژور


## چکیده

**زمینه و هدف:** ژن p4 لیشمانیا ماژور، در مرحله آماستیگوت انگل بیان می‌شود که احتمالاً ترکیب مناسب جهت تهیه واکسن بر علیه لیشمانیوز 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، لیشمانیا 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 وژن 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 زمینهٔ تهیهٔ واکسن، به کار آید و علاوه بر آن در زمینه‌های هدف دارویی و تست‌های تشخیصی نیز قابل استفاده است.



**کلیدواژه‌ها:** ۱ـ ژن P4، ۲ـ کلونینگ، ۳ـ لیشمانیا ماژور، ٤ـ واکسن



***دکتر مینو شاددل**I

**دکتر هرمزد اورمزدی**II

**دکتر لامع اخلاقی**III

**دکتر بهرام کاظمی**IV

**مژگان بنده‌پور**V


## مقدمه

لیشمانیا، 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 لیشمانیا، 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 لیشمانیا پیفانوی گزارش دادند (p1 تا p8). منوکلونال آنتی بادی‌های p2 ,p4 و p8 با مرحلهٔ آماستیگوت لیشمانیا آمازو ننسیس نیز واکنش نشان دادند[٤]. منوکلونال آنتی بادی‌های p4 و p7 دارای باند پروتئینی با وزن حدود ۳٤ کیلو دالتون هستند.[٤و٥] آنتی‌ژن‌های اختصاصی مرحلهٔ آماستیگوت نیز توسط همین منوکلونال آنتی‌بادی‌ها شناسایی می‌شوند. هر کدام از این آنتی‌ژن‌ها یک پتانسیل بالقوه به عنوان کاندید تهیه واکسن در جهت پیشگیری و کنترل انگل به شمار می‌آیند.[۵] آنتی‌ژن‌های p4 و p8 از کشت آگزنیک مرحلهٔ آماستیگوت

---

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





[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-21 ]

لیشمانیا پیفانوی خالص می‌شوند و حفاظت بخش قابل ملاحظه‌ای را القاء می‌کند [۳و ۵]. بنابراین یکی از آنتی‌ژن‌های سطحی فرم آماستیگوت، p4 است که در زمینه پیشرفت واکسن‌سازی می‌تواند مؤثر باشد[۵ -۳]. ژن کد کنندهٔ آنتی ژن p4 در لیشمانیا پیفانوی کلون و سکانس گردید و شباهت ژن p4 با سایر گونه‌های جنس لیشمانیا، بررسی شد. این آنتی‌ژن 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 لیشمانیا ماژور سویهٔ ایران به عنوان پروتئین نو ترکیب، کلون شود.

## روش بررسی

این بررسی به صورت تجربی انجام گرفته است. پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در محیط N.N.N رشد داده شدند و سپس در محیط RPMI 1640 به کشت انبوه رسیدند[۱]. پروماستیگوت‌ها با سانتریفوژ کردن جمع‌آوری شدند و توسط بافر مخصوص (گلوکز ۰/۳۳ مول (M)، تریس ۱۰ mM، MgCl2 ۵mM، تریتون- x۱۰۰ ۲٪) لیز شدند و با روش جوشاندن، DNA ژنومی آن‌ها استخراج شد[۶]. 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، ۲۰picomol از هر یک از پرایمرهای forward، 0.4mM dNTPs, 4mM MgC12 بافر PCR 1x، ۱/۲۵ واحدDNA Taq Polymerase (Cina Gen, Iran) که حجم آن با dH20 به ۳۰ میکرولیتر رسانده شده بود، (برنامه دستگاه PCR؛ به صورت دما ۹۴ درجه سانتی‌گراد (°C) به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ سیکل که هر یک شامل: مرحله denaturation دمای در °C ۹۴ به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله annealing دمای °C ۶۲/۵ به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله extention دمای °C۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه است، و در پایان دمای °C۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت)[۷]. محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد وبا 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 خالص‌سازی شد[۹]. DNA خالص شده طی روش T/A Cloning درون پلاسمید pBluescript کلون شد.

به صورت خلاصه، پلاسمید pBluscript که با آنزیم EcoRV برش داده شد، با آنزیم نوکلوئوتیدیل ترانسفرم به انتهای '۳ آن dTTp اضافه شد[۱۰].

محصول واکنش Ligation (پیوند) در سلول پذیرای E.coli سوش ـ XL1 blue ترانسفورم شد[۱۱] و در پلیت آگار LB که حاوی µg/ml ۵۰ (میکروگرم در میلی‌لیتر) آمپی‌سیلین بود، پخش شد. کلنی‌ها توسط IPTG, X-gal غربالگری شدند و کلنی‌های سفید دارای پلاسمید نو ترکیب، انتخاب شدند[۱۲]. پلاسمید نوترکیب با روش الکالین، 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. کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB، کشت انبوه داده شد و سپس پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شد و با تجزیه و تحلیل توسط آنزیم‌های 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.

## یافته‌ها

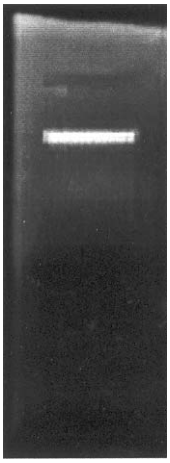
پروماستیگوت لیشمانیا در محیط N.N.N رشد یافته و در محیط RPMI 1640 ۱٦٤۰ به صورت انبوه کشت داده شد و DNA ژنومی آن استخراج شده و با روش PCR تکثیر یافت.

DNA استخراج شده در شکل شماره ۱ نشان داده

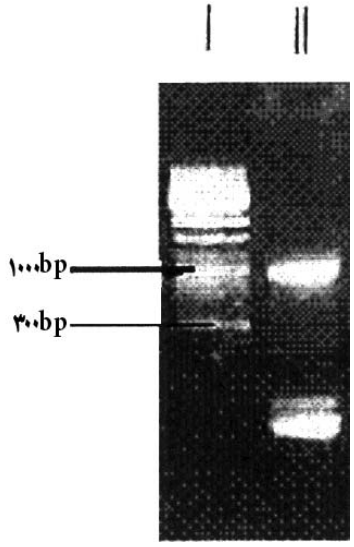


[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-21 ]

شده است. در شکل شماره ۲ محصول PCR ژن p4 با وزن ۹۶۵ bp نشان داده شده است.



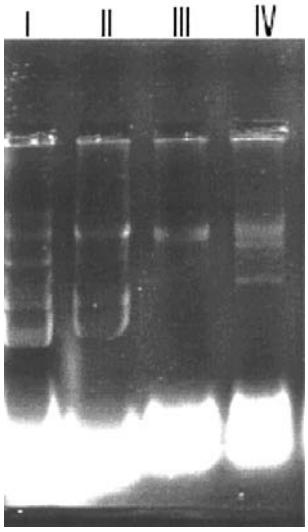
**شکل شماره ۱**- الکتروفورز DNA ژنومی لیشمانیا در ژل آگارز ۱٪



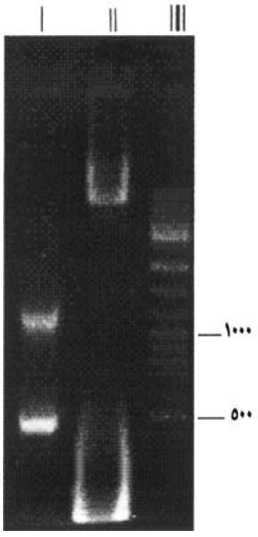

**شکل شماره ۲**- الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪
ستون I: مارکر 100bp DNA
ستون II: محصول PCR ژن p4 با وزن ۹۶۵bp

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 داده شده بود، ساب کلون شد. واکنش Ligation (پیوند) در سلول پذیرای باکتریایی ترانسفورم شد ودر پلیت آگار LB حاوی ۵۰ µg/mL آمپی‌سیلین پخش شد. پلاسمید نوترکیب، توسط تجریه و تحلیل با آنزیم برش‌دهنده pmacl 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**- تائید 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 (۱۰۵۰ bp) با استفاده از پرایمر universal forward و specific p4 reverse
ستون II: پلاسمید pQE-30-4 ستون III: مارکر (bp) ۱۰۰ DNA



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-21 ]

انجام PCR با استفاده از پرایمر forward Universal و reverse اختصاصی ژن p4 برای تعیین جهت (orientation) مناسب ژن کلون شده در پلاسمید بیان pQE-30 به کار گرفته شد که در شکل شماره ٤ نمایش یافته است.

## بحث

لیشمانیا، 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 دارویی، مورد توجه بیشتری قرار گرفته است.[۲و۳]

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 می‌توانند مؤثر باشد[۵-۲].

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

جهت بررسی پتانسیل DNA واکسن‌ها، Cambell و همکارانش ژن کدکنندهٔ نوکلئاز p4 در لیشمانیا آمازونسیس را همراه با ادجوانت‌های مختلف IL-12 و HSP70 ارزیابی کرده وموش 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 لیشمانیا آمازونسیس و ماژور قرار داد. آن‌ها نشان دادند که ژن p4 همراه با IL-12 در مقابل لیشمانیا آمازونسیس حفاظت بخشی داشته ولی p4 همراه با HSP70 در مقابل لیشمانیا ماژور حفاظت بخشی داشته است و در نهایت p4 همراه با HSP70 را یک کاندید مناسب جهت تهیه واکسن برای گونه‌های لیشمانیا دنیای قدیم و جدید، معرفی کرد[۲].

در این بررسی، ژن p4 لیشمانیا ماژور سویهٔ ایران کلون شد. با این هدف که استفاده از سویهٔ ایرانی جهت تهیهٔ واکسن بر علیه لیشمانیا ماژور برای جامعه ایرانی، مفیدتر و کاربردی‌تر است. ضمن اینکه نتیجهٔ این بررسی با بررسی فرج‌نیا و همکاران که گزارش داده‌اند «پروتئین نوکلئاز کلاس ۱مرحلهٔ آماستیگوت لیشمانیا ماژور (Lma CIN) شباهت بسیار زیادی (۸۷٪) به پروتئین p4 لیشمانیا پیفانوی دارد»[۱٤و۱۵] قابل مقایسه خواهد بود.

در این بررسی از آنجایی که DNA لیشمانیا فاقد اینترون است[۱٦]، جهت دسترسی به ژن p4 از DNA پروماستیگوت لیشمانیا 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 مرحلهٔ 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



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-21 ]

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 نوترکیب p4 می‌تواند به خصوص در زمینهٔ تهیهٔ واکسن به کار آید و علاوه بر آن، در زمینه‌های هدف دارویی و تست‌های تشخیصی نیز قابل استفاده است.

## 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.

## 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, Jiaxiang J, Soong L. DNA Immunization with the Gene Encoding p4 Nuclease of Leishmaina amazonensis protects Mice against Cutaneous leishmaniasis. Infect Imuun 2003; 71(11):6270-8

3. Sujata K, Soong L, Colmenares M, Gold smith 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 Immun 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 electroiphoresis 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) (Vo1.2). 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, Yancopulos 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 form 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 Thl-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 1 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.

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-21 ]

# *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 agaros 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*



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-21 ]