کلونینگ ژن بیان کننده آنتی‌ژن سطحی ۱(SAG1) توکسوپلاسما گوندی و ترانسفورماسیون آن در دو سویه DH5a و TG1 اشرشیاکلی

کامی حسینیان خسروشاهی I
*دکتر فاطمه غفاری‌فر II
دکتر زهره شریفی III
دکتر عبدالحسین دلیمی‌اصل IV
کاوس صلح‌جو V

چکیده

زمینه و هدف: بیماری توکسوپلاسموزیس توسط تک یاخته انگلی به نام توکسوپلاسماگوندی(Toxoplasma gondii) ایجاد می‌شود.SAG1(Surface Antigen 1)، آنتی‌ژن اختصاصی ـ مرحله‌ای است که فقط در مرحله تاکی زوئیت وجود دارد و در مراحل اسپوروزئیت و برادی زوئیت وجود ندارد و به مقدار فراوان و به طور یکنواخت بر روی سطح داخل و خارج سلولی تاکی‌زوئیت‌ها توزیع شده است. این آنتی‌ژن دارای دو گلیکوفرم است و آنتی‌ژن، کاملاً conformational است. ژن کد کننده SAG1، به صورت Single copy بوده و هیچ اینترونی ندارد. SAG1، ایمونوژنیک‌ترین ساختار تاکی‌زوئیت T.gondii است و به همین خاطر در چندین روش تشخیصی و برای تهیه واکسن نوترکیب و زیر واحدی علیه بیماری توکسوپلاسموزیس، استفاده شده و مورد توجه بوده است. هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه SAG1 در پلاسمید PTZ57R و ترانسفورم کردن پلاسمید نوترکیب در سویه‌های DH5α و TG1 باکتری‌های E.coli می‌باشد.

روش بررسی: این تحقیق یک مطالعه تجربی می‌باشد. برای این کار، ابتدا انگل توکسوپلاسما در صفاق موش سوری تکثیر داده و آنگاه انگل با PBS(Phosphate buffered saline) شستشو داده شد. جهت تهیه و نگهداری انگل، از موش سوری ماده استفاده شد. DNA(Deoxyribonucleic acid) ژنومی توکسوپلاسما، با روش فنل ـ کلر فرم، استخراج شده، سپس با کمک پرایمرهای اختصاصی ویژه ژن SAG1، ژن مورد نظر با روش PCR(Polymrase chain reaction) تکثیر شد و با استفاده از ژل آگاروز، محصول PCR، الکتروفورز شده و اندازه ژن تکثیر شده با استفاده از مارکر تعیین شد. محصول PCR با استفاده از کیت تجارتی، خالص شده و سپس به کمک آنزیم T4DNA Ligase، محصول PCR به داخل یک کلونینگ وکتور کلون شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب به داخل سلولهای مستعد E.coli دو سوش TG1 و DH5α ترانسفورم شد.

یافته‌ها: نمونه DNA خالص سازی شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن SAG1، PCR گردید. محصول PCR به صورت یک باند ۹۶۰bp(۹۶۰ جفت باز) در ژل آگاروز ۱٪ مشاهده گردید. محصول PCR درون پلاسمید PTZ57R، کلون گردید، سپس پلاسمید نوترکیب درون باکتری اشرشیاکلی سوش‌های TG1، DH5α ترانسفورم گردید. برای شناسایی پلاسمید نوترکیب، ابتدا به کمک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب روی محیط LB جامد حاوی XGAL(5- bromo-4 chloro-3 indolyl beta diGalactopyranosid)، IPTG(Isopropyl-beta-dithio Galactopyranosid) و آمپی‌سیلین جداسازی گردیدند، سپس پلاسمید نوترکیب استخراج شد و با روش PCR، ژن مورد نظر تایید گردید. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SAG1 تحت تاثیر برش آنزیمی قرار گرفت که قطعات ۲۹۸۲bp و ۸۶٤bp بدست آمده نیز نشانه تایید کار می‌باشد. کلونی‌های TG1 و DH5α که در محیط LB رشد کرده بودند، شمارش گردیدند و میانگین و انحراف معیار برای این دو سویه در هر پلیت براساس آزمون آماری Mannwhitny مقایسه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پلاسمید PTZ57R و استرین TG1 اشرشیاکلی بکار رفته در این تحقیق، برای نگهداری ژن SAG1 مناسب می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: ۱ – توکسوپلاسما گوندی ۲ – آنتی‌ژن سطحی اصلی ۱(SAG1)
۳ – اشرشیاکلی(DH5α, TG1) ۴ – پلاسمید PTZ57R

تاریخ دریافت: ۸٤/٦/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۱۳

I) کارشناس ارشد انگل‌شناسی.
II) استادیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).
III) استادیار سازمان انتقال خون، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی، بزرگراه همت، سازمان انتقال خون، تهران، ایران.
IV) استاد گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
V) دانشجوی دکترای انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

مقدمه

توکسوپلاسماگوندی، تک یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکس‌ها، زیر شاخه اسپروزوآ، زیر رده کوکسیدیا و متعلق به جنس توکسوپلاسما می‌باشد.

آلودگی به این تک یاخته، از سراسر دنیا گزارش شده است. تقریباً ۵۰۰ میلیون نفر دارای آنتی‌بادی بر علیه این ارگانیسم می‌باشند. در افرادی که نقص ایمنی ندارند، معمولاً این عفونت فاقد علایم می‌باشد و خودبخود در بدن کنترل می‌شود.[۱و ۲] عفونت در طی دوره بارداری می‌تواند منجر به توکسوپلاسموزیس مادرزادی شود که ممکن است عوارض خطرناکی دربرداشته باشد.[۳]

این انگل علاوه بر انسان، تعداد زیادی از حیوانات پستاندار و همچنین گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده می‌سازد.

درمان این بیماری به خاطر اثرات سمی داروهای در دسترس، مشکل است و عفونت مجدد بسرعت اتفاق می‌افتد. تحت شرایط حاضر، ایجاد گسترش داروهای جدید ضد توکسوپلاسما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی خواهد بود.[٤]

مطالعات و تجربیات مختلف نشان داده است که احتمال تهیه واکسنی مناسب علیه توکسوپلاسموزیس وجود دارد.[٤]

در سالهای اخیر پیشرفت چشمگیری در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که می‌توانند پاسخ ایمنی محافظتی القاء کنند، صورت گرفته است، بیش‌تر این کارها بر روی آنتی‌ژن‌های سطحی تاکی‌زوئیت متمرکز شده است. از مهم‌ترین این آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌ژن سطحی اصلی ۱ یا SAG1 می‌باشد. SAG1($۳۰KD_a$)، پروتئین سطحی اصلی تاکی‌زوئیت است و ۵-۳٪ از کل پروتئین تاکی‌زوئیت را تشکیل می‌دهد.[۵و ٦] SAG1، آنتی‌ژن اختصاصی ـ مرحله‌ای است که فقط در مرحله تاکی‌زوئیت وجود دارد و در مراحل اسپوروزوئیت و برادی‌زوئیت وجود ندارد.[۷-۹] SAG1، ایمونوژنیک‌ترین ساختار تاکی‌زوئیت T.gondii است[۵، ۹و ۱۰] و به همین خاطر در چندین روش تشخیصی و برای تهیه واکسن نوترکیب و زیر واحدی علیه بیماری توکسوپلاسموزیس استفاده شده و مورد توجه بوده است.[٤و ۱۱-۱٦] این آنتی‌ژن، پاسخ ایمونولوژیکی بسیار سریعی ایجاد می‌کند و تیتر بالایی از IgG، IgM و IgA تولید می‌شود. به علت فقدان مقدار زیاد و کافی ژن SAG1، اطمینان از این موضوع که آیا از این ژن می‌توان برای تهیه واکسن و به عنوان یک عامل تشخیصی استفاده نمود، با مشکل مواجه است.[۷] هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه SAG1 در پلاسمید PTZ57R و ترانسفورم کردن پلاسمید نوترکیب در سویه‌های DH5α و TG1 باکتری‌های E.coli می‌باشد تا با تولید انبوه پلاسمید نوترکیب بتوان از آن، جهت واکسن DNA و سایر مطالعات بعدی استفاده نمود.

در این تحقیق پس از استخراج ژنوم انگل، قطعه ژنی SAG1 به روش PCR تکثیر شد و جهت کلونینگ، قطعه ژنی حاصل از PCR، در پلاسمید PTZ57R قرار داده شد و در نهایت به داخل باکتری E-Coli ترانسفورم گردید. با توجه به اهمیت SAG1، با کلونینگ این قطعه ژنی و نگهداری آن، می‌توان در موارد مختلف از جمله تهیه واکسن و استفاده در روش تشخیصی الایزا و سایر مطالعات، از آن استفاده نمود.

روش بررسی

این تحقیق یک مطالعه تجربی می‌باشد. برای انجام آن ابتدا مایع صفاقی حاوی ۳۰-۲۰ تاکی‌زوئیت(در هر میدان با بزرگنمایی ×٤۰ میکروسکوپ نوری) سوش RH توکسوپلاسماگوندی به طور داخل صفاقی به ۳ سر موش ماده Balb/c جوان(٦ هفته) تزریق گردید. ۳ روز بعد، موشها کشته شدند و مایع صفاقی آنها با سرنگ، از حفره صفاقی، کشیده و تاکی‌زوئیت‌ها در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.[۱۷]

به ۱×۱۰^٦ سلول تاکی‌زوئیت توکسوپلاسماگوندی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده حاوی ۱٪SDS(Sodium dodecyl sulphate)، EDTA(Ethylenediaminetetra-acetic acid)، Nacl(Sodium chloride) وTris-Hclو ۵ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه گردید. پس از مخلوط کردن، به مدت ۲ ساعت در دمای ٥٦-٥٥ درجه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

سانتی‌گراد انکوبه شد. استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد. DNA استخراج شده با استات سدیم ۳ مولار و اتانل ۱۰۰٪ رسوب داده شد، سپس رسوب حاصله با الکل ۷۰٪ شستشو داده شد و در نهایت در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.[۱۸و ۱۹] برای مشاهده محصول تخلیص، بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شد.

مواد لازم برای انجام آزمایش PCR بدین ترتیب می‌باشد: ۵ میکرولیتر از بافر PCR×۱۰(۱۰ برابر غلیظ)، ۱/۵ میکرولیتر از کلرید منیزیوم($Mgcl_2$) ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از dNTP(diethyl-nitrophenyl thiophosphate) ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت[Primer(Forward)] ۱۰ پیکومول در میکرولیتر با توالی:

Forward:5'ATTAAGCTTATGTTTCCGAAGGCAGTG3'

و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت [Primer(Reverse)] ۱۰ پیکومول در میکرولیتر با توالی:

Reverse:5'ATTGAATTCTCACGCGACACAAGCTG3'

و ۰/۵-۰/۳ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase، ۵ میکرولیتر از DNA خالص شده و ۳۶ میکرولیتر از dd H_2O. مواد فوق پس از مخلوط کردن، در ترموسایکلر قرار داده شدند و ژن SAG1 به وسیله PCR طی ۳۰ سیکل طبق برنامه initial Denaturation به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Denaturation به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، Extention به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و Final Extention به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکثیر گردید.[۱۸، ۲۰و ۲۱]

در نهایت برای بررسی محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۱٪ همراه با مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp الکتروفورز شد. (پرایمر up stream، دارای کدون شروع ATG و یک جایگاه برش آنزیمی Hind III و پرایمر down stream، شامل یک کدون پایان و یک جایگاه آنزیمی EcoR I است).

برای کلونینگ، محصول PCR با استفاده از(Fermentes) Agarose gel DNA extraction kit از روی ژن، خالص سازی شد. واکنش اتصال با استفاده از ۳ میکرولیتر از بافر ligation ×۱۰(۱۰ برابر غلیظ)، ۵-۱ واحد از T4 DNA Ligase، ۳ میکرولیتر از Vector(DNA)، ۱۵ میکرولیتر از Insert(DNA) و حدود ۳۰ میکرولیتر از ddH_2O انجام شد. سپس مخلوط فوق، یک شب در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.[۲۲و ۲۳]

بعد از انجام کلونینگ، محصول اتصال، با روش کلرورکلسیم به داخل باکتری E-coli سوشهای TG1 و DH5α انتقال داده شد(Transformation). هر بار، قبل از استفاده از باکتری‌های competent، یک نمونه بر روی محیط کشت باکتری بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده می‌شد و چنانچه باکتری‌ها در این محیط رشد می‌کردند، برای بقیه مراحل کار از آنها استفاده می‌شد و برای بررسی میزان رشد سویه‌های باکتری، میزان جذب(OD) آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شد.

سلولهای مستعد و پلاسمید نوترکیب مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند، سپس مخلوط واکنش به مدت ۱/۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بعد به مدت ۳ دقیقه بر روی یخ گذاشته شد و در نهایت باکتری‌ها بر روی پلیت LB.Agar حاوی X-Gal و IPTG کشت داده شدند.[۲۲] کلونی‌های سفید و آبی با استفاده از روش کلونی کانت و با استفاده از دستگاه کلونی کانتر، شمارش شدند و برای ارزیابی، از تست آماری Mannwhitny استفاده شد.

برای غربال کردن کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از کلونی‌های سفید که بر روی پلیت LB Agar حاوی X-Gal و IPTG رشد کرده بودند، استفاده شد.[۲۱و ۲۲] سپس پلاسمید نوترکیب باکتری‌ها با استفاده از روش لیز قلیایی استخراج گردید.[۲۱و ۲۲]

برای تأیید وجود ژن SAG1 در پلاسمید نوترکیب، بر روی پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از کلونی‌های سفید، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، PCR انجام شد و پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر از سایر پلاسمیدها، جدا و انتخاب گردیدند. همچنین برای تأیید کلونینگ ژن SAG1، از روش برش آنزیمی بر روی DNA پلاسمیدی استفاده شد. برای انجام واکنش، مقدار ۳ میکرولیتر از بافر ×۱۰(۱۰ برابر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

غلیظ)، ۳-۱ میکروگرم از پلاسمید [(Plasmid(DNA] و ۱ واحد از آنزیم Bam HI مخلوط گردیدند و با آب مقطر به حجم ۳۰ میکرولیتر رسانده شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۲-۱ ساعت یا یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.[۲۱و ۲۲] تکنیک برش آنزیمی جهت بررسی وجود قطعه DNA خارجی در پلاسمید، بکار گرفته شد. برای برش آنزیمی، در این مطالعه، از آنزیم برش دهنده Bam HI استفاده شد که براساس جایگاه‌های برش آنزیم بر روی DNA حامل، می‌توان قطعات حاصله از هضم آنزیمی را پیش‌بینی نمود. DNA پلاسمیدی نوترکیب همزمان با DNA حامل(به عنوان شاهد)، توسط آنزیم برش داده شد، سپس نمونه‌های برش یافته همراه با یک نشانگر وزن مولکولی الکتروفورز گردیدند و مورد بررسی قرار داده شدند.

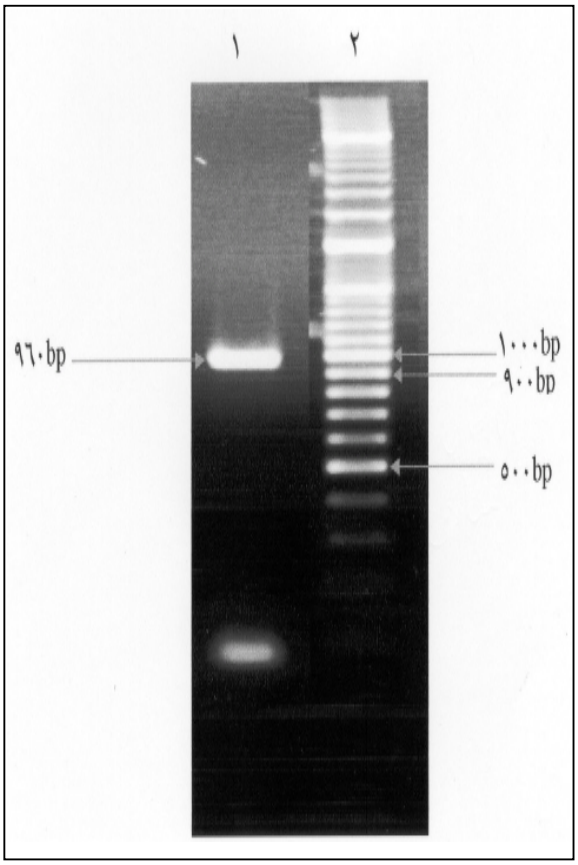
در یک لوله میکروفیوژ استریل، ۳ میکرولیتر بافر ×۱۰(۱۰ برابر غلیظ)، ۳-۱ میکروگرم DNA پلاسمیدی و یک واحد آنزیم برش دهنده Bam HI اضافه شد. مخلوط واکنش، با آب مقطر به حجم ۳۰ میکرولیتر رسانده شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۲-۱ ساعت یا یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

یافته‌ها

بعد از ٤-۳ روز از تزریق مایع صفاقی حاوی ۳۰-۲۰ تاکی‌زوئیت سوش RH توکسوپلاسما به موشها، از مایع صفاقی موشها برای بدست آوردن انگل استفاده شد.

در این مرحله، DNA انگلی با استفاده از روش فنل کلروفرم استخراج شد و روی ژل مشاهده شد و برای اطمینان، در اسپکتروفتومتری در دو طول موج ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که نسبت جذب در طول موج ۲٦۰ نانومتر به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر، ۱/۹ بود. این نسبت نشان داد که از این DNA تلخیص شده می‌توان برای ادامه مراحل تحقیق استفاده کرد.

نمونه DNA که خالص‌سازی شده بود، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن SAG1، بافر واکنش PCR، dNTP، $Mgcl_2$ و Taq DNA Polymerase، PCR شد و محصول PCR به همراه مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید تا محصول PCR بررسی گردد. همان‌طوری که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌گردد، محصول PCR به صورت یک باند ۹٦۰bp ظاهر شد که با قطعه SAG1 مورد نظر مطابقت دارد.



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن SAG1 توکسوپلاسماگوندی سویه RH بر روی ژل آگارز ۱٪. (ستون شماره یک). محصول PCR بر روی DNA تخلیص شده توکسوپلاسما گوندی با پرایمرهای اختصاصی ژن می‌باشد که ۹٦۰bp طول دارد.(ستون شماره دو) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp(فرمنتاس)

برای کلونینگ، ابتدا محصول PCR از روی ژل با استفاده از Agarose gel DNA extraction kit استخراج گردید. سپس محصول PCR خالص شده، درون پلاسمید PTZ57R کلون گردید. محصول Ligation تهیه شده به داخل باکتری مستعد، ترانسفورم گردید و یک شب در روی محیط LB آگار حاوی IPTG، Xgal و آمپی‌سیلین کشت داده شد، که نتیجه این

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

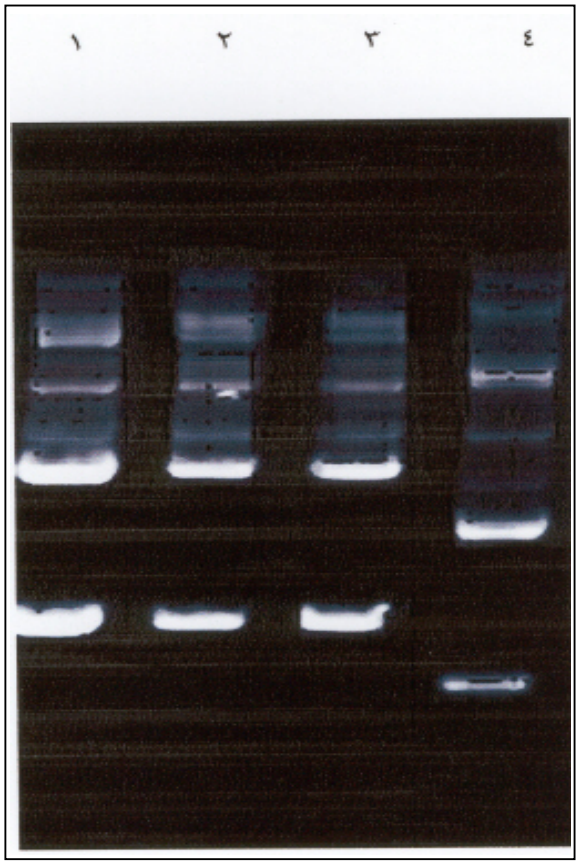
مرحله، رشد کلونی‌های سفید و آبی در محیط مذکور بود و تعداد کلونی‌های سفید سویه TG1 بیش‌تر از تعداد کلونی‌های سویه DH5α بود که طبق مطالعات انجام شده و تست آماری Mannwhitny، مشخص گردید که سویه TG1 پذیرندگی بیش‌تری از سوش DH5α دارد. تفاوت رشد کلونی‌های حاصله از سوشهای TG1 و DH5α با استفاده از محاسبه میانگین و انحراف معیار بدین ترتیب می‌باشد:

برای سوش TG1، میانگین کلونی‌های سفید، ۲۰۲/۵، انحراف معیار، ۳۷/٤۷ و میانگین کلونی‌های آبی ۲ می‌باشد و برای سوش DH5α، میانگین کلونی‌های سفید، ۵۳، انحراف معیار، ٤/۲٤ و میانگین کلونی‌های آبی، صفر می‌باشد. طبق نتایج آماری Mannwhitny و با $p<۰/۰۵$، تفاوت معنی‌داری بین این دو سوش از نظر پذیرندگی برای پلاسمید نوترکیب وجود دارد.

برای تخلیص پلاسمید نوترکیب از کلونی‌های سفید، از روش لیز قلیایی استفاده شد. برای بررسی محصول تخلیص شده، DNA حاصل از استخراج پلاسمید بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ الکتروفورز شد. همان طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌گردد، پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید که حاوی قطعه SAG1 بودند، وزن مولکولی بالاتری از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی که قطعه SAG1 در آنها کلون نشده بود، داشتند.

با توجه به اینکه هدف اصلی این تحقیق، کلونینگ و نگهداری ژن SAG1 است، در این مرحله از باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، پاساژهای مکرر داده شد و در هر مرحله، پلاسمید نوترکیب تخلیص گردید. پس از ۷-٦ بار پاساژ مکرر از باکتری‌های هر دو سوش TG1 و DH5α، هنوز باکتری‌ها حاوی پلاسمید نوترکیب بودند که نشان دهنده پایداری ژن SAG1 در پلاسمید PTZ57R می‌باشد.

در این مرحله، پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از کلونی‌های سفید، با کمک پرایمرهای اختصاصی قطعه SAG1، PCR گردید، سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز همراه با مارکر وزن مولکولی ۱kbp(۱ کیلو جفت‌باز) الکتروفورز گردید. محصول PCR بر روی پلاسمید نوترکیب تخلیص شده از کلونی‌های سفید با توجه به مارکر وزن مولکولی، دارای وزن مولکولی حدود ۹٦۰bp بود که نشان‌دهنده کلونینگ قطعه SAG1 در پلاسمید PTZ57R بود.

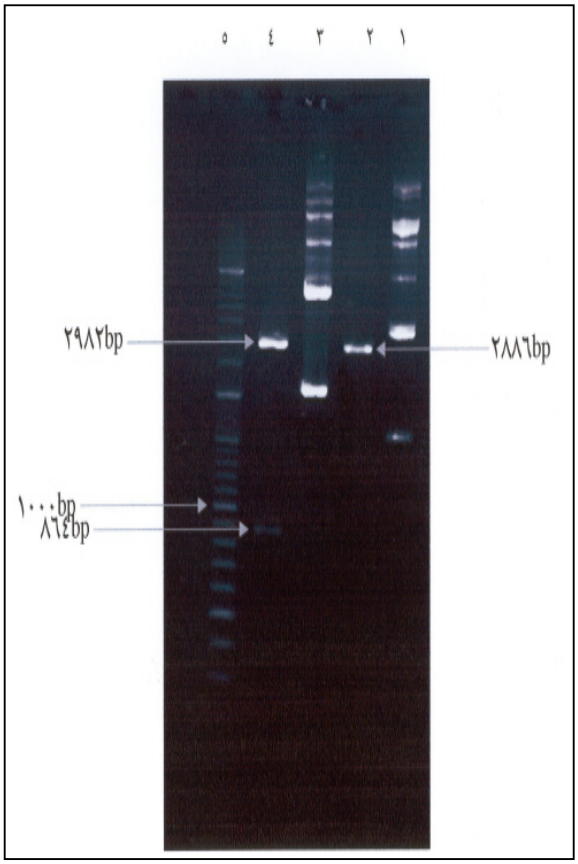


شکل شماره ۲- الکتروفورز DNA پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SAG1 بر روی ژل آگارز ۰/۸٪.(ستونهای شماره ۳-۱) پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SGA1(کلونی سفید رنگ).(ستون شماره ٤) DNA پلاسمید بدون قطعه SAG1(کلونی آبی رنگ)

برای تأیید کلونینگ SAG1، از روش برش آنزیمی نیز استفاده گردید. همان طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌گردد، نتیجه حاصل از تأثیر آنزیم بر پلاسمید تخلیص شده از کلونی آبی، قطعه‌ای به وزن مولکولی ۲۸۸٦bp بود. در حالی که نتیجه حاصل از تأثیر آنزیم بر پلاسمید تخلیص شده از کلونی سفید، دو قطعه بود: یکی به وزن مولکولی ۲۹۸۲bp و دیگری به وزن مولکولی ۸٦٤bp، که براساس نقشه آنزیمی و جایگاه‌های برش آنزیمی بر روی DNA پلاسمیدی و ژن SAG1، نتایج حاصله، وجود ژن SAG1 را

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

در پلاسمید نوترکیب تایید می‌کند.



شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول برش آنزیمی DNA پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SAG1 بر روی ژل آگارز ۱٪.(ستون شماره ۱) DNA پلاسمید PTZ57R بریده نشده.(ستون شماره ۲) DNA پلاسمید PTZ57R که با آنزیم Bam HI بریده شده است و ۲۸۸٦bp طول دارد.(ستون شماره ۳) DNA پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SAG1 بریده نشده.(ستون شماره ٤) DNA پلاسمید نوترکیب که با آنزیم Bam HI بریده شده و شامل دو قطعه ۲۹۸۲bp و ۸٦٤bp می‌باشد.(ستون شماره ۵) مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp(فرمنتاس)

بحث

توکسوپلاسماگوندی عامل بیماری توکسوپلاسموزیس می‌باشد که گسترش جهانی دارد و از شایع‌ترین عفونت‌های انگلی بشر در جهان می‌باشد و تخمین زده می‌شود که توکسوپلاسموزیس به شکل بدون علامت و مزمن در ۵۰۰ میلیون تا یک بیلیون نفر از جمعیت انسانی در جهان وجود داشته باشد.[۱۵]

توکسوپلاسموزیس اثرات متفاوتی در میزبان ایجاد می‌کند، در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز، گیرنده‌های پیوند عضو و بیماران سرطانی، باعث بیماری‌های شدید و مرگ و میر می‌شود. بیماری، با کوریورتینیت، کوری، تورم غدد لنفاوی، آنسفالیت و یا مرگ همراه است.[۱٤]

درمان این بیماری به خاطر اثرات سمی داروهای در دسترس، مشکل است و عفونت مجدد بسرعت اتفاق می‌افتد. تحت شرایط حاضر، ایجاد و گسترش داروهای جدید ضد توکسوپلاسما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی خواهد بود.[٤]

در سالهای اخیر پیشرفت چشمگیری در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که می‌توانند پاسخ ایمنی محافظتی القا کنند، صورت گرفته است. بیش‌تر این کارها بر روی آنتی‌ژن‌های سطحی تاکی‌زوئیت متمرکز شده است.

SAG1، یک نقش مهم بیولوژیکی دارد، به این دلیل که SAG1، ایمونوژنیک‌ترین ساختار تاکی‌زوئیت T.gondii است.[۵، ۹و ۱۰] پاسخ به این آنتی‌ژن در سرم افراد آلوده در حالت‌های مختلف عفونت‌های مادرزادی، حاد و مزمن دیده می‌شود[۷] و SAG1 یکی از اولین آنتی‌ژن‌هایی است که به وسیله IgM در مرحله حاد عفونت شناسایی می‌شود.[۲٤] بنابراین از SAG1 به عنوان یک عامل تشخیص و برای تهیه واکسن نوترکیب و زیر واحدی علیه بیماری توکسوپلاسموزیس استفاده شده و مورد توجه بوده است.[٤و ۱٦-۱۱]

به همین علت در این تحقیق پس از استخراج ژنوم انگل، قطعه ژنی SAG1 به روش PCR تکثیر شده و جهت کلونینگ، قطعه ژنی حاصل از PCR در پلاسمید PTZ57R قرار داده شد و در نهایت به داخل باکتری E-coli ترانسفورم گردید.

اولین بار، Burg و همکاران در سال ۱۹۹۸ ژن کد کننده SAG1 توکسوپلاسماگوندی را از نظر مولکولی بررسی کردند. این محققین برای اولین بار توالی کامل ژن کد کننده SAG1 را کلون کردند و کلون CDNA آن را بیان کرد.[۷]

Petersen و همکاران نیز در سال ۱۹۹۸ پروتئین SAG1 نوترکیب تولید شده در E-coli به همراه آلوم به عنوان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

ادجونت جهت ایمنی‌زدایی در موش NMRI استفاده کردند.[۲۵] در همین راستا انگل توکسوپلاسماگوندی در موش ماده تکثیر داده شد. برای تخلیص DNA، براساس مطالعات انجام شده از پروتئیناز K با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مقدار ۱۰ میکرولیتر استفاده شد که با نتیجه پژوهش Nishikawa، Makal و همکاران که در سال ۲۰۰۲ انجام شد، مطابقت داشت.[۱۹]

در مرحله کلونینگ از پلاسمید PTZ57R استفاده شد.[۲۶] از این پلاسمید تا به حال برای کلون کردن قطعه SAG1 استفاده نشده بود. طبق نتایج حاصل از این تحقیق مشخص گردید که این پلاسمید برای کلون کردن قطعه SAG1 بسیار مناسب می‌باشد.

مولک و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از ژنهای کد کننده SAG1 و GRA4 توانستند تا ۷۵٪ در موشهای حساس C57BL/6، محافظت ایجاد کنند.[۲۷]

کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب چندین بار پاساژ داده شدند و مشاهده گردید که هنوز پلاسمید، حاوی قطعه مورد نظر می‌باشد که نشان می‌دهد این پلاسمید قدرت نگهداری بالایی دارد و ژن SAG1 را به خوبی حفظ می‌کند.

برای تایید وجود قطعه ژن SAG1 در پلاسمید نوترکیب از روش برش آنزیمی استفاده شد. در این مرحله از آنزیم Bam HI استفاده گردید. آنزیم Bam HI دارای دو جایگاه آنزیمی یکی بر روی پلاسمید و دیگری بر روی قطعه ژن SAG1 می‌باشد.[۲۳و ۲۶]

از آنجایی که ژن SAG1 بدون برش با آنزیم برشگر اختصاصی، در پلاسمید کلون شده بود، بنابراین این ژن به دو صورت ممکن است وارد پلاسمید شود:

در حالت اول، ژن SAG1 به گونه‌ای درون پلاسمید قرار گیرد که جایگاه برش آنزیمی موجود در SAG1، در مجاورت جایگاه آنزیمی موجود بر روی پلاسمید قرار گیرد.

در حالت دوم، ژن SAG1 به گونه‌ای درون پلاسمید قرار گیرد که جایگاه برش آنزیمی موجود در SAG1، دور از جایگاه آنزیمی موجود بر روی پلاسمید قرار گیرد.

نتیجه حاصله از هر کدام از حالت‌های فوق متفاوت است: در حالت اول، بعد از اثر کردن آنزیم Bam HI، دو قطعه حاصل خواهد شد: یک قطعه به وزن مولکولی ۹۶bp و قطعه دیگر با وزن مولکولی ۳۷۵۰bp.[۲۲و ۲۶]

در حالت دوم، بعد از اثر کردن آنزیم Bam HI، دو قطعه حاصل خواهد شد: یک قطعه با وزن مولکولی ۲۹۸۲bp و قطعه دیگر با وزن مولکولی ۸۶۴bp.[۲۳و ۲۶]

نتیجه این تحقیق تأییدی بود بر حالت دوم و پس از استفاده کردن از آنزیم، نتیجه کار روی ژل برده شد و با توجه به DNA استاندارد، وزن مولکولی قطعات ۲۹۸۲bp و ۸۶۴bp مشاهده گردید. نتیجه این پژوهش با نتیجه پژوهش Filisetti، Darde و Candolfi که در سال ۲۰۰۳ انجام شده و توالی کامل ژن SAG1 و جایگاه برش آنزیم Bam HI را تعیین کرده بودند، مطابقت دارد.

محدودیت پژوهش در این تحقیق به تهیه مواد لازم برای آزمایشات مولکولی مربوط می‌شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پلاسمید PTZ57R و باکتری اشرشیاکلی سویه TG1 جهت کلونینگ و نگهداری ژن SAG1 مناسب می‌باشند.

فهرست منابع

1- Dubay JP. Toxoplasmosis. In: L Collier, A balows, M Sussman, editors. Toply and wilson's microbiology and Microbial infections. Vol 5. 9th ed. New York: Oxford University Press; 1998. P. 303-18.

2- Obata K. Phylum apicomplexa. In: Schnidt G, Roberts L. Foundations of parasitology. 7th ed. Boston: Mc Graw Hill; 2005. p. 135-8.

3- Kean BH. Clinical Toxoplasmosis: 50 years. Trans Royal Soc Med Hyg 1972; 66: 549-71.

4- Bhopale GM. Development of a vaccine for tosoplasmosis: current status. Micro Infec 2003; 5: 457-62.

5- Zinecker CF, Striepen B, Geyer H, Geyer R, Dubremetz J-F, Schwartz RT. Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen1(P30) of Toxoplasma gondii. Mole Bioch Parasitol 2001; 116: 127-35.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

6- Wichroski MJ, Melton JA, Donahue CG, Tweten RK, Ward GE. Clostridium septicum Alpha-toxin is active against the parasitic protozoa Toxoplasma gondii and targets membrane of the SAG family of glocosylphosphatidylinositolanchored surface poteins. Infec Immun 2002; 70(8): 4353-61.

7- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Bothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii. J Immunol 1988; 141(10): 3584-91.

8- Kimbita EN, Xuan X, Huang X, Miyazawa T, Fukumoto S, Mishima M, et al. Serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in cat by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. Vet Parasitol 2001; 102: 35-44.

9- Hunter S, Ashbaugh L, Hiar P, Bozic CM, Milhausen M. Baculovirus-directed expression and secrtion on a truncated version of Toxoplasma SAG1. Mol Bioch Parasitol 1999; 103: 267-72.

10- Rodriguez C, Afchain D, Capron A, Dissous C, Santoro F. Major surface protein of Toxoplasma gondii(P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. European J Immunol 1985; 15(7): 747-9.

11- Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Vilard 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. Infec Immune 2003; 71(11): 6616-9.

12- Chen XG, Gong Y, Hua-Li Lun Z-R, Fung M-C. High-level expression and purification of immunogenic recombinant SAG1(p30) of Toxoplasma gondii in Escherichia coli. Protein Expression and Purification 2001; 23: 33-7.

13- Bonenfant C, Dimier-Poisson I, Velge-Roussel F, Buzoni Gantel D, Giudice GD, Rappuoli R, et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against Toxoplasma gondii. Infect Immune 2001; 69(3): 1605-12.

14- Saito S, Aosai F, Rikihisa N, Mun H, Norose K, Chen M, et al. Establishment of gene-vaccinated skin grafting against Toxoplasma gondii infection in mice. Vaccine 2001; 19: 2172-80.

15- Nigro M, Gutierrez A, Hoffer AM, Clemente M, Kaufer F, Carral L, et al. Evaluation of Toxoplasma gondii recombinant protein for the diagnosis of recently acquired Toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. Diagn Microbiol Infec Disease 2003; 47: 609-13.

16- Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. Vet Parasitol 2001; 100: 3-12.

17- Chal JY, Lin A, Shin EH, Donoh M. Laboratory passage and characterization of anisolate of Toxoplasma gondii from an ocular patient in Korea. Korean parasitology 2003 sep; 41(3): 137-54.

18- Old RW, Primorse SB. Priniciple of gene manipulation. 4th ed. Oxford: Black well scientific publication; 1995. p. 1-100.

19- Nishikawa Y, Makala L, Otsuka H, Mikami T. Mechanism of opoptosis in murine fibro blasts by two intracellular protozoan parasites, T. Gondii and Neospora caninum. Parasite Immunology 2002; 24(7): 347-54.

20- Pomp D, Medrano JF. Organic solventsare facilitators of polymerase chain reaction. Bio Techniques 1991; 10: 58-9.

21- Sambrook J, Fritsch D, Maniatis EJ. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold spring Harber Laboratory Press; 1989. p. 1-32.

22- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 1-32.

23- Brown TA. Molecular biology labFax. 1st ed. Kanzas: Bioscientific publishers Academic press; 1991. p. 1-120.

24- Meek B, Diepersloot R, Gool TV, Speijer D, Peek R. IgM recognition of recombinant Toxoplasma gondii antigens by sera acutely or latently infected humans. Diag Microbiol Infec Disease 2003; 45: 45-52.

25- Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J. Immunization with E.coli produced recombinant T.gondii SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with Toxoplasma gondii. Vaccine 1998; 16(13): 1283-9.

26- Kaluz S, Kolble K, Raid KBM. Directional cloning of PCR products using exonuclease III. Nucl Acids Res 1992; 20: 4369-70.

27- Mevelec MN, Bout D, Desolme B, Marchand H, Magne R, Bruneel O, et al. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice. Vaccine 2005; 23(36): 4489-99.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]

Cloning and Transformation of Toxoplasma Gondii Surface Antigen 1 (SAG1) in Eschershia Coli(TG1 & DH5a)

K. Hosseinian Khosroshahi, MS [I] ****F. Ghaffarifar, PhD*** [II] ***Z. Sharifi, PhD*** [III]
A.H. Dalimi Asl, PhD [IV] ***K. Solhjo, MS*** [V]

Abstract

Background & Aim: Toxoplasmosis is caused by a protozoan parasite called toxoplasma gondii. SAG1 is an antigen which only exists in tachyzoite stage. This antigen which has two glycoforms is a conformational antigen. The aim of this research is to study cloning of SAG1 gene in PTZ57R and transformation of recombinant plasmid in E.coli(TG1 & DH5a).

Material & Method: Tachyzoites of T.gondii are able to multiplicate in mouse macrophages. SAG1(30 KD_a) is one of the three surface antigens and a main candidate for DNA vaccine. Also, SAG1 is the most immunogenic antigen of toxoplasmosis and a major surface antigen of the proliferative tachyzoite form of T.gondii. SAG1 genome with a 960 bp band is single copy. In this study, the DNA of toxoplasma gondii was extracted and SAG1 genome was amplified. Then PCR(Polymrase Chain Reaction) product was purified and cloned in PTZ57R and finally transformed into two strains of E.coli(TG1 & DH5α).

Results: The DNA of toxoplasma gondii was extracted and SAG1 gene was amplified. The PCR product was seen as a 960 bp band in 1% agarose gel. After cloning and transformation, to recognize the E.coli recombinant plasmid, the bacteria were cultured in LB with ampicilin, X-Gal and IPTG. The mean and standard deviation of colonies that grew in LB were measured. To confirm the data, the plasmids were extracted and the DNA of SAG1 was amplified and digested by BamH I enzyme. The recombinant plasmid was restricted by enzyme and two 2982 and 864 bp bands were obtained.

Conclusion: It was noticed that as for transformation of plasmid with the DNA of SAG1, TG1 is more suitable than DH5α. This method is useful for cloning and storing the important genome of toxoplasma gondii, SAG1.

Key Words: 1) Toxoplasma Gondii 2) SAG1 3) E.coli(TG1 & DH5a)
4) PTZ57R(plasmid)

***I*)** *MS in Parasitology.*
***II*)** *Assistant Professor of Parasitology. Faculty of Medicine. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
***III*)** *Assistant Professor of Virology. Blood Transfusion Organization. Research Center of Virology. Tehran, Iran.*
***IV*)** *Professor of Parasitology. Faculty of Medicine. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.*
***V*)** *PhD Student of Parasitology. Faculty of Medicine. Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-11-26]