CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Research Repository Portal of Medilam



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

راضی ناصری فر[1]، فاطمه غفاری فر[*1]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[1]، زهره شریفی[2]

1) گروه انگل‌شناسي، دانشکده علوم پزشکي، دانشگاه تربیت مدرس تهران
2) گروه ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون

تاریخ دریافت: 90/1/27 تاریخ پذیرش: 90/9/27

## چکیده

***مقدمه:*** توکسوپلاسموز یکی از بیماری های زئونوز و دارای انتشار وسیع در جهان بوده که اثرات شدید بالینی و دام پزشکی عدیده ای را ایجاد می‌کند. این انگل داخل سلولی باعث عوارض عصبی و بیماری های چشمی در افراد دارای ضعف ایمنی و نوزادان متولد از مادران آلوده می شود. بروز موارد زیاد بیماری همراه با عوارض شدید و کشنده توکسوپلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری برای این بیماری را نشان می دهد. یکی از مهم ترین راه های کنترل بیماری واکسیناسیون است که تاکنون واکسنی مؤثر علیه این انگل پیدا نشده است. با عنایت به زئونوز بودن بیماری در جهان، یکی از مهم ترین راه های آلودگی انسان مصرف گوشت های خام یا نیم پز 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 واکسن های جدید بر علیه این بیماری ضرورت می‌یابد. ایمن سازی با پلاسمید حاوی ژن های کدکننده پروتئین های محافظت کننده، به عنوان روشی نسبتاً ابداعی و راهکاری امید بخش 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 روش ها:*** 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 حاوی ژن GRA5 با 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

**واژه‌های کلیدی:** باکتری اشرشیاکلی، ژن GRA5، pcDNA3، پلاسمید

بیان از آنزیم، هاضم، پلاسمید

روش PCR در پلاسمید انتقالی pTZ57R کلون و پس از آن در باکتری اشرشیاکلی سوش TOP10 ترانسفورم شد. سپس پلاسمید حاوی ژن GRA5 با 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 آنزیم های Hind3 و EcoRI از پلاسمید pTZ57R جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA5 و انجام کلونینگ نیز با آنزیم های 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

***نویسنده مسئول:** گروه انگل‌شناسي، دانشکده علوم پزشکي، دانشگاه تربیت‌مدرس تهران
***Email:*** ghafarif@modares.ac.ir



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

**مقدمه**

توکسوپلاسموزیس توسط تك ياخته‌اي انگلي به نام توکسوپلاسما گونداي (Toxoplasma gondii) ایجاد شده که گسترش جهاني دارد، (9). این بیماری به علت عفونت مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دام پزشکی است، (9). توکسوپلاسموزیس اثرات متفاوتي در میزبان ایجاد مي‌کند. در افراد دچار ضعف سیستم ایمني مثل افراد مبتلا به ایدز، گیرنده هاي پیوند عضو و بیماران سرطاني باعث بیماري هاي شدید و مرگ و میر مي‌شود، (10). این بیماري با کوریورتینیت، کوري، تورم غدد لنفاوي، آنسفالیت و یا مرگ همراه است، (11). توکسوپلاسموزیس مادرزادي، که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگي اولیه مادري است، مي‌تواند باعث سقط جنین، مرگ جنین در رحم یا نقص هاي شدید مادرزادي نظیر هیدروسفالي، و عقب‌ماندگي ذهني یا کوریورتینیت گردد. (12)

توکسوپلاسموز نوعی بیماری زئونوز بوده و داشتن واکسنی مؤثر می‌تواند اثرات مفیدی از نظر پزشکی و دام پزشکی در پی 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 بیماری که نیاز به مراقبت طولانی دارند تأثیرگذار بوده و از نظر اقتصادی نیز به صرفه باشد. واکسن ایده ال حیوانی دارای منافع متعددی از جمله افزایش قدرت تولید مثل و کاهش خطرات بهداشتی برای مصرف کنندگان گوشت های مشکوک می باشد. برای مدت 50 سال، آنتی ژن های خام به عنوان واکسن بر علیه توکسوپلاسموز مورد آزمایش قرار گرفته اند که مطالعات روی کارایی زیر واحدهای خالص یا ترکیبی جدید حدود 10 تا 20 سال سابقه دارد. واکسن‌های sub-unit دارای این امتیاز هستند که با حضور آنتی ژن های ایمنوژنیک 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 واکسن می‌شود.

معمولا (SAG1) آنتی‌ژن های سطحی تاکی زوئیت به عنوان معمول ترین Ag مورد بررسی هستند که به صورت آنتی ژن نوترکیب استفاده شده اند است. کاندیدهای جدید برای ساخت واکسن 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



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

به عنوان یکی از آنتی ژن های مهم توکسوپلاسما در مراحل مختلف سیکل زندگی انگل ترشح می شود. لازم به ذکر است که این ژن در تست تشخیصی الایزا 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 واکسنی موثر بر علیه توکسو پلاسموز امیدوار بود. (13)

هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه GRA5 در پلاسمیدیوکاریوت بیانی pcDNA3 و ترانسفورم این پلاسمید نوترکیب در باکتري Ecoli سوش TOP10 بوده است. GRA5 از برادي زوئیت ها و تاکي زوئیت ها ترشح مي‌شوند. جهت بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوت و استفاده آن در تهیه واکسن، کلون نمودن ژن GRA5 در یک پلاسمیدیوکاریوتی 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 توکسوپلاسما:* تاکی زوئیت های تازه و فعال انگل توکسوپلاسما گوندای ($2\times10^4$) را به صورت داخل صفاقی به موش سوری تزریق نموده و بعد از گذشت 5-4 روز موش ها را کشته و با تزریق مقداری PBS استریل حاوی استرپتومایسین-پنی‌سیلین به داخل صفاق، انگل تکثیر یافته را به داخل سرنگ می کشیم. (14،15)

*استخراج DNA (DNA Extraction):* جهت استخراج از کیت استخراج DNA شرکت(Bioneer) استفاده شد. دستورالعمل کیت به طور خلاصه بدین ترتیب می باشد: 100 میکرولیتر(در حدود $5\times10^7$) از سلول هاي جدا شده در بافر PBS را درون یك ویال 1/5cc ریخته و 200 میکرولیتر از بافر TL و 20 میکرولیتر از پروتئیناز k موجود در کیت را به آن اضافه کرده و به مدت 1 ساعت در 60 درجه سانتیگراد انکوبه می شود. محصول لیز شده را به طور کامل به ستون هاي موجود در کیت منتقل نموده و در دور rpm 8000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ و به دنبال آن ستون را به یک تیوب 1/5 سي سي منتقل نموده و 100 میکرولیتر از محلول EL را به ستون اضافه کرده و به مدت 5 دقیقه در حرارت انکوبه نموده و در دور 8000 به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ نموده و محصول در 20- نگهداری می گردد.

*طراحي پرایمرها:* براساس توالی استاندارد ژن کدکننده آنتي‌ژن کامل GRA5 با شماره دستیابی EU918733.1 پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید.

Forward: (aagcttatggcgtctgtaaaacgcg)
Reverse: (gaattcttactcttcctcggcaacttc)

پرایمر Forward دارای جایگاه برش آنزیمی Hind3 و کدون شروع (ATG) و پرایمر Reverse دارای جایگاه برش آنزیمی EcoRI و



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

کدون توقف(TAA) است. قطعه تکثیر یافته توسط پرایمرهای فوق حدود 363 bp می باشد.

*تکثیر ژن GRA5 با روشPCR:* برای انجام این مرحله، DNA استخراج شده از تاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندای به عنوان الگو استفاده گردید و واکنشی به حجم 25 میکرولیتر تهیه شد. ترکیبات و برنامه استفاده شده در جدول های زیر آمده است.

| نوع ماده | مقدار بر حسب میکرولیتر (µl) |
|---|---|
| master mix | l2 µl |
| Primer forward | (10 pmol / µl ) 1µl |
| Primer reverse | (10 pmol / µl ) 1µl |
| Template DNA | 3 µl |
| ddH2o | 18 µl |

| مرحله | درجه حرارت (سانتی گراد) | مدت |
|---|---|---|
| Initial Denaturation | 94°C | 5 دقیقه |
| Denaturation | 94°C | 40 ثانیه |
| Annealing | 59°C | 30 ثانیه |
| Extension | 72°C | 45 ثانیه |
| 30 سیکل | | |
| Final Extension | 72°C | 7 دقیقه |

*کلونینگ ژنGRA5 در پلاسمید pTZ57R :* با استفاده از کیت کلونینگ T/A(Cloning Kit) شرکتFermentas (#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 0/5 میکرولیتری، به طور شبانه در دمای 22°C انکوبه شد و محصول واکنش اتصال تا مرحله بعد در 20°C- نگهداری گردید.

| ماده | مقدار |
|---|---|
| ligation buffer 10X | lµ6 |
| T4DNA ligase | lµ1 |
| pTZ57R/T | lµ3 |
| PCR Production | lµ10 |



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

lμ10 ddH2o

*انتقال پلاسمید کلون شده به باکتري مستعد (Transformation) TOP10:* يك ميكروتيوب حاوي 100 ميكروليتر سلول مستعد نگهداری شده در 70ºC- را به مدت نيم ساعت درون يخ گذاشته تا به دماي صفر درجه سانتيگراد برسد. 5 تا 10 ميكروليتر محصول واكنش اتصال به ميكروتيوب اضافه و به آرامي با هم مخلوط و سپس به مدت 30 دقيقه در يخ گذاشته شد. در مرحله بعد مخلوط فوق را به مدت 90 ثانيه در دماي 42ºC شوك حرارتي داده و بلافاصله به مدت 2-3 دقيقه بر روي يخ قرار داديم. با اين تكنيک، پلاسميد نوتركيب وارد باكتری می شود. 500 ميكروليتر محيط LB مايع بدون آنتي بيوتيك را به مخلوط فوق اضافه كرده و به مدت 60 دقيقه در انكوباتور شيكردار در 37ºC قرار داديم. حدود 300 ميكروليتر از مايع را دور ريخته و مابقی درون ميكروتيوپ را آن قدر مخلوط می كنيم تا رسوب كاملاً حل شود. (22)

*غربال كردن كلوني هاي باكتري حاوي پلاسميد نوتركيب:* براي بررسي وجود يا عدم وجود قطعه مورد نظر، اين باكتري ها در محيط كشت حاوی آمپي‌سيلين، سوبسترای X-gal (5-برمو 4-كلرو 3-ايندوليلD-β گالاكتوپيرانوزيد) و IPTG به روش زير كشت داده شدند. در زير هود و شرايط استريل، مقدار 100-200 ميكروليتر از محصول بالا (سلول هاي ترانسفورم شده) به يک پليت حاوی آنتی بيوتيک، X-Gal و IPTG اضافه و به كمك ميله شيشه‌اي در تمام نقاط پليت پخش گرديد. پليت ها به طور شبانه (16-18 ساعت) در انكوباتور 37ºC قرار داده شد. سپس به مدت چندين ساعت در دماي 4ºC قرار داده شد تا كلني‌هاي آبي (كلنی فاقد پلاسميد نوتركيب) يا

سفيد (كلنی حاوی پلاسميد نوتركيب) ظاهر شوند. در اين محيط كشت، كلني هاي فاقد پلاسميد نوتركيب به رنگ آبي و كلني هاي حاوي پلاسميد نوتركيب به رنگ سفيد خواهند بود. (17، 22)

*روش‌هاي تأييد كلونينگ:*

*مقايسه پلاسميدهاي استخراج شده از كلني هاي آبي و سفيد:* پلاسميدهاي موجود در كلني هاي سفيد (به علت وجود قطعه كلون شده در آن) سنگين تر از پلاسميدهاي موجود در كلني هاي آبي هستند، (16). براي اين منظور پلاسميدهاي استخراج شده از پلاسميد كلني هاي آبي و سفيد بر روي ژل آگاروز 1/5 درصد لود شده و مقايسه گرديدند.

*تكنيك Colony PCR:* پلاسميدهاي نوتركيب مورد نظر از ساير پلاسميدها جدا شد. واكنش PCR به حجم 25 ميكروليتر مطابق با شرايط



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

مذکور در قسمت قبلی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و 3 میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلنی های سفید، به عنوان الگو صورت گرفت. (22)

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

*سابکلون ژن GRA5 در پلاسمید بیانی pcDNA3:* در این روش وجود قطعه خارجی در ناقل پلاسمیدی بررسی می شود. براساس 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 نوترکیب همزمان با ناقل پلاسمیدی (به عنوان شاهد) توسط یک یا دو آنزیم برش داده شد. سپس نمونه های آنزیم زده همراه با یک نشانگر وزن مولکولی (مارکر) الکتروفورز گردید و مورد بررسی قرار گرفت. (17)

*برش آنزیمی پلاسمید pTGRA5 و جدا کردن قطعه GRA5:* براساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas واکنش آنزیمی شامل 25 میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pTGRA5، 1 میکرولیتر آنزیم EcoRI، 1 میکرولیتر آنزیم Hind3، 8 میکرولیتر بافر تانگو و 5 میکرولیتر آب مقطر تهیه و پس از ورتکس و spin، مخلوط فوق به طور شبانه در بن ماری 37°C قرار داده شد. هم چنین پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA5 و انجام کلونینگ با آنزیم های فوق برش داده شد و نتایج برش آنزیمی هر کدام روی ژل 1/7 درصد آگاروز مشاهده گردید.

*کلونینگ ژن GRA5 در پلاسمید pcDNA3:* برای این منظور، واکنش اتصال براساس دستورالعمل کیت (Fermentas) به حجم 20 میکرولیتر شامل 1 میکرولیتر پلاسمید pcDNA3 آنزیم خورده، 4 میکرولیتر ژن GRA5، 1 میکرولیتر آنزیم T4DNA ligase، 4 میکرولیتر بافر و 10 میکرولیتر آب مقطر تهیه و برای یک ساعت در ترموسیکلر 22°C و بعد به طور شبانه در یخچال نگهداری شد.

*انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده داخل ناقل TOP10:* انتقال پلاسمیدهای کلون شده pcGRA5 داخل ناقل TOP10 بدین نحو صورت گرفت که 10 میکرولیتر از محصول اتصال به 100 میکرولیتر باکتری مستعد اضافه و مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار 37 درجه انکوبه و در دور 5 هزار به مدت 2 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس 300 میکرولیتر از مایع رویی را دور ریخته و بقیه آن نگهداری شد.



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

*غربال کردن کلونی های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pcGRA5 :* مقدار 200 میکرولیتر از باکتری های 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 37°C انکوبه نمودیم. تنها باکتری های حاوی پلاسمید قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین می باشند. (16)

## روش‌های تأییدکننده کلون‌شدن قطعه GRA5 در پلاسمید بیانی pcDNA3

*مقایسه باند پلاسمیدهای pcDNA3 و pcGRA5:* محصول استخراج پلاسمیدهای pcDNA3 و pcGRA5 روی ژل آگاروز 1 درصد لود و الکتروفورز شد.

*PCR ژن GRA5 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به‌عنوان الگو:* واکنش PCR به حجم 25 میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت قبلی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و پلاسمید pcGRA5، که با خلال دندان استریل برداشت شد، به‌عنوان الگو انجام گردید.

*برش پلاسمید نوترکیب pcGRA5 با آنزیم های EcoRI و HindH3:* برش آنزیمی شامل 25 میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pcGRA5، 1 میکرولیتر آنزیم EcoRI، 1 میکرولیتر آنزیم HindH3، 8 میکرولیتر بافر تانگو و 5 میکرولیتر آب مقطر مطابق با شرایط فوق الذکر انجام و با استفاده از الکتروفورز روی ژل 1/7 درصد تایید گردید. (22)

*انتقال پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به درون سلول یوکاریوتیک (Transfection) :* قبل از استفاده از محیط کشت، به‌ازاء هر 100 میلی لیتر محیط DMEM، مقدار 10-5 میلی لیتر FCS استریل و یک میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین به محیط اضافه شد. سلول یوکاریوتیک در این محیط در دمای 37°C و 5 درصد CO2 در فلاسک های 75 میلی لیتری کشت داده شد. پس از هر 24-48 ساعت محیط کشت آن ها تخلیه و با محیط جدید جایگزین گردید. (17)

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 $1-3\times10^6$ سلول یوکاریوت در هر چاهک 35 میلی متری از پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد و به طور شبانه در 37°C و 5 درصد CO2 انکوبه گردید. قبل از ترانسفکت می بایست سلول ها 80-50 درصد از پلیت را پر کرده باشند.

1- برای ترانسفکت هر چاهک مقدار 97 میکرولیتر محیط DMEM فاقد FCS درون یک ویال استریل ریخته و 3



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

میکرولیتر معرف Fugene به آن اضافه شد و پس از آن 1 ثانیه ورتکس و به مدت 5-15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نسبت مورد استفاده برای ترانسفکت 3:1 بود.

2-براي هر چاهك 35 میلی متری مقدار 1 میکروگرم پلاسمید به مخلوط فوق اضافه شد و به آرامي با پیپت مخلوط گردید. این مخلوط به مدت 5-15 دقیقه در دماي اتاق انکوبه گردید.

3-چاهک حاوی سلول یوکاریوتیک را توسط پیپت تخلیه نموده و 1 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 آرامي حرکت داده تا مخلوط در همه جاي پلیت توزیع گردد. آن گاه پلیت در 37°C و 5 درصد CO2 به مدت 72-24 ساعت انکوبه گردید.

4-پس از طی این مدت، سلول هاي ترانسفکت شده و سلول های ترانسفکت نشده در شرایط کاملاً استریل جمع آوري گردید. برای این منظور، ابتدا سلول ها با PBS شستشو شده و با اضافه کردن 400 میکرولیتر PBS به هر چاهک، با نوک سمپلر سلول ها را از کف پلیت جدا کردیم. محتویات هر چاهک را چند بار از سمپلر گذرانده تا سلول ها جدا شوند و سپس محتویات هر چاهک در یک میکروتیوب 1/5cc 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 نیتروسلولز)، 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. (18،19)

## یافته های پژوهش

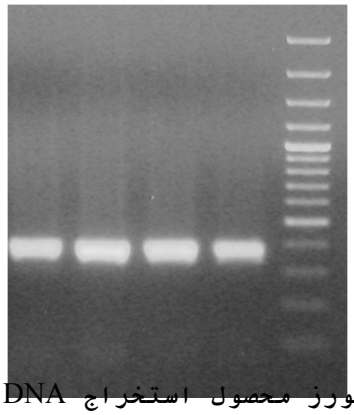
*نتایج PCR به کمک DNA ژنومي:* نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی وجود باند اختصاصی حدود 363 جفت باز روي ژل آگاروز را نشان داد که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای است.

بنابراین، پرایمرهاي طراحي شده براي تکثیر این ژن



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

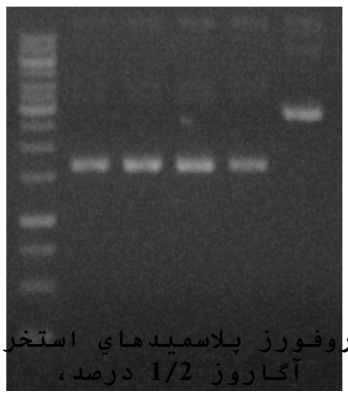
اختصاصي بودند. (شكل 1)



**شكل شماره 1. الكتروفورز محصول استخراج DNA ژنومي روی ژل آگاروز 1/5درصد، ستون شماره 2,3,4,5 قطعه GRA5 اندازه 363 جفت باز، ستون 1 ماركر 100 جفت باز**

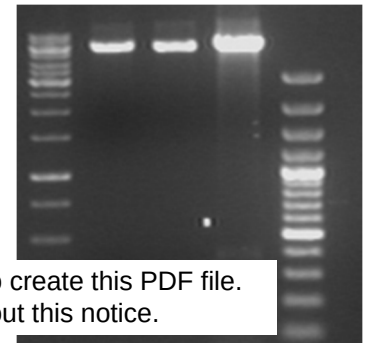
*2-3. مقايسه پلاسميدهاي استخراج شده از كلنی های سفيد و آبی:* كلني هاي سفيد و آبي روي محيط LB مايع حاوي آمپي‌سيلين و آغشته به X-gal و IPTG نشان‌دهنده ترانسفورماسيون موفق است.

پلاسميدهاي استخراج شده از كلونی های سفيد به دليل سنگينی در ژل آگاروز مقداری بالاتر از كلونی های آبی قرار گرفتند. (شكل 2)



**شكل شماره 2. نتايج الكتروفورز پلاسميدهاي استخراج شده از كلني ها روی ژل آگاروز 1/2 درصد،**
**ستون 6 ماركر داراي 1000جفت باز، ستون 2,3,4,5 پلاسميد pTZ57R،**
**ستون 1 پلاسميد نوتركيب pTGRA5**

برش آنزيمي پلاسميدهاي pTGRA5 دو باند نشان داد يك باند 363 bp كه هم اندازه ژن GRA5 توكسوپلاسما گونداي و باند ديگر تقريباً هم اندازه pTZ57R بود. بنابراين، نتايج برش آنزيمی روی ژل آگاروز، كلون ژن GRA5 درون پلاسميد pTZ57R را تاييد می نمايد. (شكل 3)

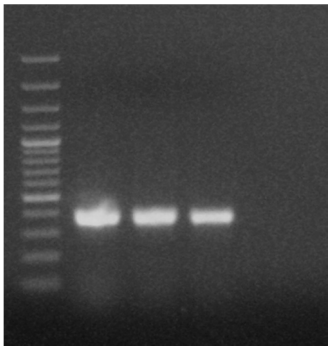


An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

**شکل شماره 3. نتایج برش آنزیمي پلاسمید نوترکیب pTGRA5 روی ژل آگاروز 1/7 درصد،**
**ستون 1 مارکر100 جفت بازی، ستون 4,3 مونو دایجست پلاسمیدpcGRA5،**
**ستون 2 پلاسمیدpcGRA5 آنزیم خورده و ستون 5**
**مربوط به مارکر 1000 جفت بازی**

*نتایج تعیین توالی:* نتایج حاصل از تعیین توالی ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R نشان داد که این ژن دارای 363 جفت باز بوده که با ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای با شماره دستیابی EU918733.1 در بانک ژنی 100 درصد تشابه داشت. توالی ژن GRA5 کلون شده توکسوپلاسما گوندای در این مطالعه در بانک ژنی با شماره دستیابیJF501522 ثبت شد.

*نتایج ترانسفورماسیون باکتري ها با محصول واکنش اتصال:* مرحله ظهور کلني باکتري ها روي محیط LB حاوي آنتي بیوتیك آمپي سیلین، نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتري مستعد بود. پلاسمید pcGRA5 استخراج شده از باکتري هاي ترانسفورم شده روي ژل آگاروز باندی را نشان دادند که تأییدکننده کلون قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 بود. (شکل 4)

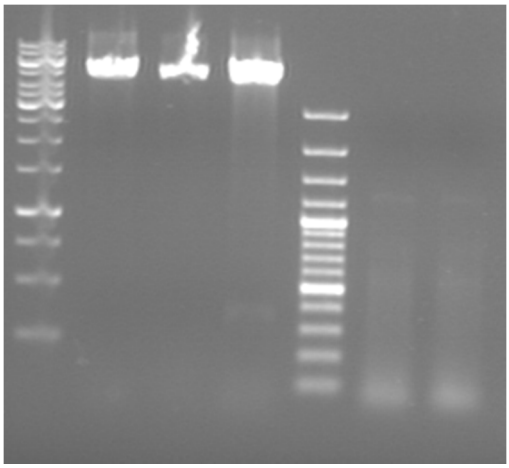


**شکل شماره 4. نتایج الکتروفورز باند pcGRA5 روی ژل آگاروز 1 درصد ستون 1, 2و3**

*نتایج برش آنزیمي پلاسمید نوترکیب pcGRA5 :* نتایج برش آنزیمیpcGRA5 با آنزیم هاي EcoRI و Hind3 دو باند را نشان داد که یکي حدود 5400 bp بود و باند دیگر حدود 363 bp که برابر با قطعه GRA5 است. بدین ترتیب ساب کلون قطعه GRA5 درون pcDNA3 نیز تأیید گردید. (شکل 5)



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.



**شکل شماره 5 : ستون 1و2 مربوط به مونو دایجست pcDNA3 و ستون 3 لادر 1000 جفت بازی و**
**ستون های 4و 5و 6 مربوط به دابل دایجست pcDNA3 و ستون 7 لادر 100 جفت بازی**

*نتایج وسترن بلات:* به دنبال انجام SDS-PAGE با انجام تست وسترن بلات کاغذ رنگ گرفته نیتروسلولز باندهاي قهوه اي رنگ را نشان می دهد، نوارها به داخل آب مقطر منتقل شده و بین دو کاغذ صافي خشك می شوند. کاغذ رنگ گرفته نیتروسلولز در تاریکي نگهداري شد تا رنگ ایجاد شده از بین نرود.

## بحث و نتیجه گیری

توکسوپلاسموز نوعی بیماری زئونوزاست و داشتن واکسنی مؤثر می‌تواند 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 طولانی دارند تأثیرگذار بوده و از نظر اقتصادی به صرفه باشد.

برای مدت 50 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 10 تا 20 سال سابقه دارد. واکسن‌های زیر واحدهای خالص دارای این مزیتند که حاوی آنتی ژن های ایمنوژنیک 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 می‌شوند. در حال حاضر، تکنولوژي پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبي را براي توسعه و ایجاد واکسن هاي چند ظرفیتي پیشنهاد مي‌کند، به طوري که این واکسن ها پاسخ هاي ایمني هومورال و



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

سلولي پايدار و قوي اي را ايجاد مي‌كنند، (20). يكي از راه هاي مهم دست يابي به واكسن هاي چند ظرفيتي در مبارزه با توكسوپلاسموزيس استفاده از واكسن هاي DNA كوكتل مي‌باشد كه باعث ايجاد پاسخ هاي ايمني- محافظتي طولاني مدت و مؤثر مي‌شوند، (21). به علت اين كه انگل هاي داخل سلولي نظير توكسوپلاسما گوندای تعداد زيادي از اپي توپ هاي آنتي ژنيک را عرضه كرده و توانايي آن ها در عرضه آنتي ژن در ميان افراد مختلف، بسيار متنوع مي‌باشد، ايمونيزاسيون با واكسني كه پاسخ ايمني را در مقابل طيف وسيعي از آنتي ژن ها تحريک كند بسيار مؤثرتر از واكسني مي باشد كه فقط از يک آنتي ژن تشكيل شده و پاسخ ايمني را بر ضد اين آنتي ژن تحريک مي‌نمايد، (21). از مزيت هاي ديگر واكسن DNA كوكتل اين است كه باعث توليد مقدار زيادي اينترفرون گاما شده و هم چنين باعث القاي توليد آنتي بادي مي‌گردد. اين واكسن ها عمدتاً باعث توليد سايتوكين هاي Th1 مي‌شوند و البته در مقدار كمتر سايتوكاين هاي Th2 را هم توليد مي نمايند. از مزيت هاي ديگر واكسن DNA كوكتل جلوگيري از انتشار سيستماتيک انگل در بدن و افزايش بقاء و طول عمر مي باشد، (21). واكسن DNA كوكتل در مقدار كم باعث تحريک پاسخ هاي ايمني هومورال و سلولي مي‌شود در حالي كه واكسن هاي تک ژني با مقدار و دوز كم قادر به تحريک پاسخ هاي ايمني نمي باشند و نياز به دوز بالا دارند، (21). با توجه به اين واقعيات، واكسن DNA كوكتل يكي از اميد بخش ترين استراتژي ها براي دستيابي به واكسن هاي مؤثر در مقابله با انگل هاي داخل سلولي (مانند توكسوپلاسما گوندای) مي‌باشد. بر همين اساس، شناسائی ژن های انگل از اهميتی خاص برخودار است. با توجه به آناليز تعيين توالي ژن GRA5 توكسوپلاسما گوندای در پلاسميد pTZ57R/T با استفاده از ژن استاندارد، مشخص شد كه قطعه 363 جفت بازي در اين پلاسميد كلون شده است. هم چنين اين ژن با سويه RH توكسوپلاسما گوندای با شماره دستيابی EU918733.1 در بانك ژني داراي 100 درصد تشابه بوده و اين شباهت نشان دهنده حفظ توالي ژن در سويه هاي مختلف توكسوپلاسما گوندای می باشد. در برش آنزيمي قطعه 363 bp جدا شد كه هم اندازه ژن GRA5 توكسوپلاسما گوندای بوده و در حقيقت ساب كلون اين ژن را در پلاسميد pcDNA3 تأييد مي‌نمايد. نتايج حاصل از PCR پلاسميد pTGRA5 و pcGRA5 نشان داد، تنها ژن GRA5 تكثير شده و هيچ ژن ديگري تكثير نيافته است. نتايج اين تحقيق بيانگر آن است كه كلون اين ژن در پلاسميدها با موفقيت انجام



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

شده است و با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین 13 کیلو دالتونی تایید شد. بنابراین، مي‌توان با استفاده از پلاسميدهاي نوترکيب براي تهيه واکسن عليه بيماري هاي انگلي در آينده اميدوار بود.

در مجموع، در این پژوهش ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی 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 گزاری**

این تحقیق در قالب بخشی از رساله دکتری تخصصی رشته انگل شناسی پزشکی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان مقاله بر خود واجب می دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای دکتر صدرایی، آقایان پیرستانی و سروی و هم چنین کارکنان محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس ابراز دارند.

*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, Bellete 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.



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

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. Appelton 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)



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

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

*Naserifar R[1], Ghaffarifar F[1*], Dalimi Asl A[1], Sharifi Z[2]*

**(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, GRA5was cloned in pTZ57R; afterwards, it was transformed into TOP10 strain of E.coli Bacteria. The recombined 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

*1.Dept of Parasitology, Tarbiat Modares University of medical Science, Tehran, Iran*
*2.Dept of Virology, Blood Transfusion Center, Tehran, Iran*
**(corresponding author)*

***Scientific Journal of Ilam University of Med***



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.

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 gondaii, expression cell, DNA vaccine



An evaluation version of novaPDF was used to create this PDF file.
Purchase a license to generate PDF files without this notice.