جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ٤: از ۷۳-۸۰
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

کلونینگ و توالی‌یابی ژن GRA7 (Granular Antigen7) توکسوپلاسما گونده‌ای

فاطمه غفاری‌فر[۱*]، رحمه نوردین[۲]، زهره شریفی[۳]، عبدالحسین دلیمی[٤]، شهلا رودبارمحمدی[٥]، سکینه قاسمی‌نیکو[٦]

۱- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه USM، پنانگ، مالزی
۳- استادیار، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
۴- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۶- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۹/۱۱ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۲۱

چکیده

هدف: توکسوپلاسما گونده‌ای تک یاخته‌ای داخل سلولی و عامل ایجاد توکسوپلاسموزیس بوده و دارای انتشار جهانی است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه تهیه واکسن صورت گرفته که منجر به ایجاد پاسخ‌های محافظت‌کننده شده است. آنتی‌ژن GRA7 با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون یک آنتی‌ژن ترشحی گرانولی فشرده است که به وسیله سلول‌های آلوده میزبان آزاد می‌شود. در سلول‌های آلوده به تاکی‌زوئیت، پروتئین ۲۹ کیلو دالتونی در واکوئل پارازیتوفروز تجمع پیدا می‌کند. علاوه بر ایمونوژن بودن و کاندیدای تهیه واکسن در تشخیص نیز به‌کار می‌رود.

مواد و روش‌ها: برای این کار ابتدا DNA توکسوپلاسما گونده‌ای با روش فنل کلروفرم استخراج شده سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن GRA7 این قطعه با استفاده PCR تکثیر و در ناقل TOPO کلون شد. پلاسمید کلون شده در باکتری TOP10 ترانسفورم شد. با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی کلون مورد نظر تأیید شد.

نتایج: تعیین توالی ژن GRA7 کلون شده در پلاسمید TOPO نشان داد که قطعه‌ای ۷٤۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و با سویه RH موجود در بانک ژنی ازنظر توالی نوکلئوتیدی فقط در یک باز تفاوت داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کلون به‌دست آمده برای ساب‌کلون کردن در پلاسمیدهای بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی مناسب است.

کلیدواژگان: توکسوپلاسما گونده‌ای، ژن GRA7، کلونینگ، توالی‌یابی

۱- مقدمه

توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) توسط تک‌یاخته‌ای انگلی به نام توکسوپلاسما گونده‌ای (*Toxoplasma gondii*) ایجاد می‌شود و گسترش جهانی دارد. این بیماری به علت عفونت مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی است [۱، ۲]. توکسوپلاسموزیس آثار متفاوتی در میزبان ایجاد می‌کند. در افراد دچار

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱٥
Email: ghafarif@modares.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، گیرنده‌های پیوند عضو و بیماران سرطانی باعث بیماری‌های شدید و مرگ و میر می‌شود [۳]. درمان این بیماری به‌خاطر آثار سمی داروهای در دسترس مشکل است. تحت شرایط حاضر ایجاد و گسترش داروهای جدید ضد توکسوپلاسما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی خواهد بود [۳].

تاکنون در ایران در مورد تهیه واکسن بر علیه توکسوپلاسموزیس تحقیقاتی انجام شده است، در سال ۱۹۸۰ محمودی (Mahmoudi) و قربانی (Ghorbani) در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران اثر محافظت کنندگی توکسوپلاسما سویه جدا شده از انسان در ایران (سویه تهران) را در برابر سویه RH در موش سفید کوچک آزمایشگاهی بررسی کردند [٤].

در سال ۲۰۰۰ دریانی (Daryani) و همکاران پاسخ‌های ایمنی سلولی فراکشن‌های حاصل از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی تاکی‌زوئیت (Tachyzoite) توکسوپلاسما گونده‌ای را در مدل موشی مطالعه کردند [٥].

در سال‌های اخیر، تکنولوژی پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن‌های چندظرفیتی ارائه کرده است [٦]. واکسیناسیون DNA بحث کاملاً جدیدی است و روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کنند [۳]. در سال ۲۰۰۷ صلح‌جو (Solhjoo) و همکاران واکسن DNA را با استفاده از ژن SAG1 برای ایمن‌سازی در موش علیه توکسوپلاسما گونده‌ای انجام دادند که میزان بقای موش‌های ایمن شده بیش از موش‌های گروه شاهد بود و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود [۷]. واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر و طولانی مدتی القاء می‌کنند. پروتئین‌های ترشحی اولین بار به‌عنوان آنتی‌ژن‌های مترشحه توصیف شدند زیرا وقتی انگل با سرم انکوبه می‌شود این مواد ترشح می‌شوند [۸]. آنتی‌ژن‌های گرانولی یا GRA (Granular antigen) از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی هستند که این آنتی‌ژن‌ها به‌وسیله تاکی‌زوئیت‌ها و برادی‌زوئیت‌ها (Bradyzoites) بیان می‌شوند [٦]. از اعضای آنتی‌ژن‌های گرانولی، GRA4 (٤٠ کیلودالتون) GRA1 (۲۳ کیلودالتون) GRA7 (۲۹ کیلودالتون) به‌عنوان گزینه‌های واکسن شناخته شده‌اند [۹].

آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسما گونده‌ای از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های به‌کار رفته هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص هستند. از میان آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی، آنتی‌ژن‌های گرانولی فشرده از اهمیت خاصی برخوردارند. در این میان آنتی‌ژن گرانولی شماره ۷ یا GRA7 از جمله آنتی‌ژن‌های مهمی محسوب می‌شوند که هم در زمینه تشخیص و هم ایمنی‌زایی به‌کار برده می‌شوند.

ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود. در سلول‌های آلوده به تاکی‌زوئیت‌ها تجمع این پروتئین در واکوئل پارازیتوفروز (Parasitophorous vacuole) صورت می‌گیرد. در سلول‌های آلوده به برادی‌زوئیت‌ها در سیتوپلاسم سلولی حضور دارد و به‌وسیله روش ایمونوفلورسانس قابل شناسایی است. به‌علاوه در محیط‌های کشت سلولی حاوی کیست که فاقد انگل خارج سلولی هستند، در محلول رویی این محیط‌های کشت سلولی پروتئین ۲۹ کیلودالتونی با استفاده از روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) قابل شناسایی است. از طرف دیگر این آنتی‌ژن با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون بسیار ایمونوژن بوده و یکی از کاندیداهای تهیه واکسن است.

هدف از این کار آماده‌سازی ژن GRA7 در پلاسمید ناقل برای ساب‌کلونینگ در پلاسمیدهای یوکاریوت و پروکاریوت است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسما گونده‌ای

تاکی‌زوئیت‌های این انگل با پاساژ (Passage) متوالی داخل صفاقی در موش‌های سوری نگهداری و تکثیر

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

می‌شوند. برای این منظور به هر موش ۰/۵ سی‌سی مایع صفاقی حاوی $۲×۱۰^{۵}$ تاکی‌زوئیت زنده به‌طور داخل صفاقی تلقیح شد و پس از گذشت ٤ الی ٥ روز، مایع صفاقی موش‌های آلوده به‌وسیله سرنگ‌های ٥ سی‌سی یا ۱۰ سی‌سی جمع‌آوری شد [۱۰].

۲-۲- استخراج DNA (DNA Extraction)

۱۰۰ میکرولیتر (در حدود $۵×۱۰^{۷}$) از تاکی‌زوئیت‌های تغلیظ شده و شستشو شده با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) درون یک ویال ۱/۵ سی‌سی ریخته شد و با روش فنل کلروفرم DNA آن استخراج شد. DNA استخراج شده تا مرحله بعد در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۱].

۲-۳- اندازه‌گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن

تعیین غلظت DNA به‌وسیله اسپکتروفتومتری با جذب نور ماوراء بنفش به‌طور دقیق انجام می‌شود. به‌طور معمول جذب در ۲٦۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود که در این طول موج جذب برابر با یک، معادل ٥۰ میکروگرم DNA دو رشته‌ای در یک میلی‌لیتر است [۱۱، ۱۲].

۲-٤- طراحی آغازگرها (Primers)

به‌منظور طراحی آغازگرهای جلویی (Forward) و برگشتی (Reverse)، ابتدا توالی DNA ژن کدکننده GRA7 از اطلاعات بانک ژنی از سایت اینترنتی http//www.ncbi.com به‌صورت 'Compelet cds: 839 bp, RH strain' با شماره Y13863 جمع‌آوری شد، سپس با استفاده از این اطلاعات و به کمک نرم‌افزار GenRuner، جفت آغازگرها به‌صورت زیر طراحی شدند:

F: 5'–gcc-**gga-tcc**- att-tcc-aaa-atg- gcc-cg–3' (۲٦ جفت‌باز) BamH1

R: 5'–ctt-**ggt-acc**-gcc-ccc-ata-tcc-tac-tgg-c–3' (۲۸ جفت‌باز) Kpn

آغازگر جلویی دارای ۲٦ نوکلئوتید و شامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی BamH1 است و آغازگر برگشتی دارای ۲۸ نوکلئوتید و شامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی Kpn1 است. آغازگر جلویی برابر با توالی نوکلئوتیدهای شماره ۷۰ تا ۸٦ ژن GRA7 و آغازگر برگشتی برابر با توالی نوکلئوتیدهای شماره ۷۸۲ تا ۸۰۰ ژن GRA7 است.

محصول واکنش PCR در ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که شامل ترکیبات زیر است: ۲ میکروگرم DNA استخراج شده، dNTP ۲/۵ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیوم، ۱ میکرولیتر DNA پلیمراز *Taq* (*Taq* DNA polymerase) (۰/۵ واحد)، ۱۱/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر).

مواد فوق درون ویال ریخته شد و پس از اسپین (Spin) در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و طبق برنامه زیر PCR انجام شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) ٤ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی ۱ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) ۳۰ ثانیه در دمای ٥۰ درجه سانتی‌گراد، بسط (Extension) ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ سه مرحله اخیر ٥ چرخه تکرار شد، سپس واسرشتگی ۱ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد، بسط ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. سه مرحله اخیر ۳۰ چرخه و در نهایت واکنش PCR با بسط نهایی ٥ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید.

۲-٥- کلونینگ ژن GRA7 در پلاسمید TOPO

در این تحقیق به‌منظور کلونینگ ژن GRA7 از کیت کلونینگ استفاده شد (شامل: پلاسمیدTOPO که به‌صورت بریده شده درون کیت موجود است (Invitrogen)، مخلوطی از ٥ میکرولیتر محصول PCR، ۰/٥ میکرولیتر محلول نمک (salt solution) و ۰/٥ میکرولیتر ناقل TOPO با هم مخلوط و در دمای اتاق انکوبه شد.

۲-٦- انتقال پلاسمید کلون شده به باکتری (Transformation) TOP10

باکتری مستعد را از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج کرده و به‌مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد تا به دمای صفر درجه سانتی‌گراد برسد و سپس کل محصول کلونینگ را به آن اضافه می‌کنیم، این مجموعه را بدون استفاده از ورتکس (Vortex) و به آرامی با هم مخلوط می‌کنیم و ۲۰ دقیقه در یخ انکوبه می‌کنیم. سپس به‌مدت ٤٠ ثانیه در بن‌ماری ٤٢ درجه قرار می‌دهیم سپس دوباره ۲ دقیقه در یخ قرار می‌دهیم. مقدار ۳۵۰ میکرولیتر از محیط LB (Luria Bertani) مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به‌مدت ٤٥ دقیقه در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

۲-۷- غربال کردن (Screening) کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

پس از انتقال DNA نوترکیب به درون سلول میزبان لازم است که کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب مناسب، غربال و انتخاب شوند.

اگر X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوید (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranoside: IPTG) و آمپی‌سیلین به آگار اضافه شود، کلونی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب که در آن‌ها بتاگالاکتوزیداز سنتز می‌شود و X-gal را تجزیه می‌کند و ایندولیل تولید می‌شود که رنگ آن آبی است و کلونی باکتری میزبان را آبی رنگ می‌کند. در حالی‌که کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب چون قادر به ساخت بتاگالاکتوزیداز نیستند نمی‌توانند X-gal را تجزیه کنند، بنابراین کلونی آن‌ها به رنگ سفید خواهند بود.

در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۱۰۰- ۲۰۰ میکرولیتر سلول‌های ترانسفورم شده به یک پلیت حاوی X-gal، IPTG اضافه و به کمک میله شیشه‌ای در تمام نقاط پلیت پخش شد. پلیت‌ها به‌صورت وارونه به‌مدت یک شب (١٦- ١٨ ساعت) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به‌مدت چند ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلونی‌های آبی یا سفید ظاهر شود [۱۱].

۲-۸- استخراج پلاسمید از کلونی‌های آبی و سفید

استخراج پلاسمید از کلون‌های سفید و آبی مطابق دستورالعمل گفته در کیت استخراج پلاسمید شرکت بیونر (Bioneer) آلمان انجام شد.

۲-۹- مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی و سفید

پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های سفید (به‌علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های آبی هستند؛ برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمیدهای کلونی‌های آبی و سفید روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نمونه‌گذاری و مقایسه شدند [۱۱].

۲-۱۰- انجام روش PCR برای تأیید و انتخاب کلونی‌های مناسب

از ۲۰ کلونی سفید و ۲ کلونی آبی نمونه تهیه شد؛ بدین ترتیب که با سمپلر مقادیری از این کلونی‌ها در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد و ۲ دقیقه جوشانده شد. سپس از این جوشانده ۲ میکرولیتر به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد و از آغازگرهای FM13 و R نیز برای واکنش PCR استفاده شد.

۲-۱۱- تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing)

به‌منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید TOPO، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلونی سفید به‌منظور پیشگیری از هر گونه آلودگی، توسط کیت شرکت بیونر (Bioneer) آلمان مطابق با دستور کار شرکت سازنده کیت استخراج شد و برای تعیین توالی ارسال شد. سپس نتیجه تعیین

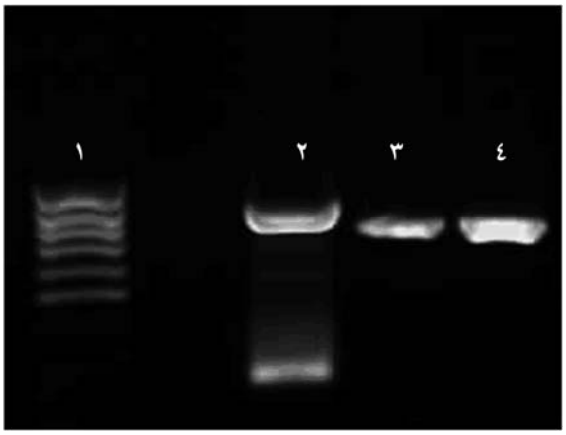
توالی ژن کلون شده به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و اختلافات با ژن GRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای مقایسه شد.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج PCR به کمک DNA ژنومی

شکل ۱ نشان داد که تحت شرایط مذکور واکنش PCR، فقط یک باند حدوداً ۷۴۹ جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز ایجاد شده است که هم اندازه ژن GRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده است. بنابراین شرایط تنظیم شده و آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن GRA7 اختصاصی هستند.

نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال (Universal) قطعه ۹۵۰ بازی را نشان می‌دهد.

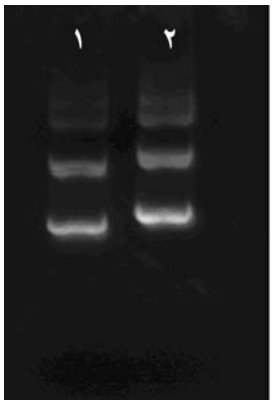


شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز؛ **ستون ۱:** نشانگر (Marker) ۱۰۰ جفت‌بازی؛ **ستون ۲:** محصول PCR به‌دست آمده از ژن SAG1 (به‌عنوان کنترل مثبت)؛ **ستون‌های ۳ و ٤:** محصول PCR ژن GRA7

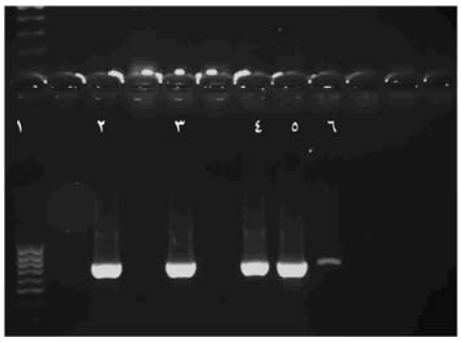
۳-۲- نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با محصول واکنش اتصال

ظهور کلونی‌های سفید و آبی روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و آغشته به X-gal و IPTG نشان‌دهنده ترانسفورماسیون موفق بود. به‌طوری‌که بیش از ۹۵ درصد کلونی‌ها را نوع سفید تشکیل می‌داد. وجود کلونی‌های سفید نشان داد که پلاسمیدهای TOPO قطعه ژنی حاصل از PCR را دریافت کرده‌اند و پلاسمیدهای نوترکیب TOPO-GRA7 تشکیل شده‌اند.

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی (TOPO) و کلونی‌های سفید (TOPO-GRA7) بعد از واکنش اتصال نشان داد که هر دو پلاسمید روی ژل آگارز سه باند دارند که به‌ترتیب از بالا به پایین عبارتند از حلقوی باز (Open Circular)، خطی (Linear) و سوپرکویل (Super coil) به‌طوری‌که در آن باندهای پلاسمید TOPO-GRA7 در مقایسه با باندهای استخراج شده از کلونی‌های آبی (TOPO) روی ژل آگارز بالاتر قرار داشتند. بنابراین پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی سفید از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی سنگین‌تر هستند (شکل ۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قطعه GRA7 در پلاسمید TOPO کلون شده است. پس از تأیید کلون نوترکیب، از کلونی مربوط کشت داده شد و پلاسمیدها استخراج شد (شکل ۳).



شکل ۲ مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید (سمت راست) و کلونی‌های آبی (سمت چپ)



شکل ۳ الکتروفورز محصول coloni PCR روی ژل آگارز؛ **ستون۱:** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی؛ **ستون‌های ۲-٦:** محصول PCR به‌دست آمده از کلونی‌های شماره ٦، ۱۲، ١٤، ١٦ و ۱۷ حاوی پلاسمید نوترکیب

۳-۳- نتایج PCR قطعه GRA7 با استفاده از پلاسمید نوترکیب TOPO-GRA7 به‌عنوان الگو

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR با پلاسمید نوترکیب TOPO-GRA7 با استفاده از آغازگرهای یونیورسال در شکل ٤ نشان داده شده است و گویای این است که ژن GRA7 در پلاسمید TOPO کلون شده است.

شکل ٤ نتایج به‌دست آمده از PCR پلاسمید حاوی ژن GRA7؛ از طرف چپ **ستون ۱**: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی؛ **ستون‌های ۲ و ۳**: محصول PCR ژن GRA7 به‌دست آمده از محصول PCR با استفاده از آغازگرهای یونیورسال است که با استفاده از این آغازگر قطعه تکثیر شده ۹۵۰ جفت‌بازی است.

۳-٤- نتایج تعیین توالی

پس از بررسی و مقایسه نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده در پلاسمید TOPO با ژن GRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast مشخص شد که قطعه‌ای ۷٤۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن GRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای است (شکل ۱)؛ به‌طوری‌که با سویه RH (AY21778401.1) از نظر توالی نوکلئوتیدی فقط در یک باز تفاوت دارد و باز a تبدیل به باز g شده است.

Tgatgattgaagtaccctatattggggcttgctaacgttttgtattaaaaggga
ttactgcggcgtctcatttccaaaatggcccgaca(g)cgcaatttttccgcg
ctttgtgttttaggcctggtggcggcggctttgccccagttcgctaccgcggc
caccgcgtcagatgacgaactgatgagtcgaatccgaaattctgacttttcg
atggtcaagcacccgttgacagtctcagaccgacgaacgccggtgtcgact
cgaaagggaccgacgatcacctcaccaccagcatggataaggcatctgta
gagagtcagcttccgagaagagagccattggagacggagccagatgaac
aagaagaagttcatttcaggaagcgaggcgtccgttccgacgctgaagtga
ctgacgacaacatctacgaggagcacactgatcgtaaggtggttccgagga
agtcggagggcaagcgaagcttcaaagacttgctgaagaagctcgcgctg
ccggctgttggtatgggtgcatcgtattttgccgctgatagacttgtgccgga
actaacagaggagcaacagagaggcgacgaacccctaaccaccggcca
gaatgtgggcactgtgttaggcttcgcagcgcttgctgctgccgcagcgttc
cttggcatgggtctcacgaggacgtaccgacatttttccccacgcaaaaaca
gatcacggcagcctgcactcgagcaagaggtgcctgaatcaggcgaagat
ggggaggatgcccgccagtaggatatgggggctaataaaagtgagtagg
agctcgaggacagtgtcccgaa

شکل ٥ نتیجه توالی به‌دست آمده از تعیین توالی ژن GRA7 که تنها در یک جایگاه باز a تبدیل به g شده است، یعنی توالی سه تایی cga تبدیل به cgg شده که هر دو توالی اسیدآمینه آرژینین را کد می‌کنند. جایگاه آغازگرها روی ژن مشخص شده است.

٤- بحث

توکسوپلاسموزیس از عفونت‌های شایع انسان است. عفونت طی دوره بارداری می‌تواند منجر به توکسوپلاسموزیس مادرزادی شود که میزان عفونت و ابتلای جنین بستگی به دوره بارداری دارد که مادر در آن دوره به این عفونت مبتلا می‌شود. عفونت در سه ماه اول منجر به عوارض خطیر می‌شود [۲].

اخیراً مشاهده شده است که توکسوپلاسموزیس در افرادی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند مثل افراد مبتلا به AIDS یا بیماران نئوپلاستیک (Neoplastic) یا افرادی که پیوند قلب یا مغز استخوان داشته‌اند کشنده است [۲] بنابراین تشخیص به‌موقع بیماری در این افراد می‌تواند حیاتی باشد.

پروتئین‌های GRA اولین بار به‌عنوان آنتی‌ژن‌های مترشحه توصیف شدند زیرا وقتی انگل با سرم انکوبه می‌شود این مواد ترشح می‌شوند [۵، ۸]. این آنتی‌ژن‌ها به‌وسیله تاکی‌زوئیت‌ها و برادی‌زوئیت‌ها بیان می‌شوند [٦]. از اعضای آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی مولکول‌های GRA هستند. GRA4 (٤۰ کیلودالتون) GRA1 (۲۳ کیلودالتون) GRA7 (۲۹ کیلودالتون) به‌عنوان گزینه‌های واکسن شناخته شده‌اند [٦، ۱۳، ۱٤].

آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسما گونده‌ای از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های به‌کار رفته هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص

هستند. از میان آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی آنتی‌ژن‌های گرانولی فشرده از اهمیت خاصی برخوردارند. در این میان آنتی‌ژن گرانولی شماره ۷ یا GRA7 از جمله آنتی‌ژن‌های مهمی محسوب می‌شوند که مخصوصاً در زمینه تشخیص به‌کار برده می‌شوند. ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود [۱٤].

پروتئین ۲۹ کیلودالتونی (GRA7) وقتی همراه با پروتئین‌های ۳۰ و ۳۵ کیلودالتونی به‌کار رود برای شناسایی موارد IgG مثبت به‌کار می‌رود و این پروتئین وقتی به همراه پروتئین‌های ۳۵ و ٦٦ به‌کار برده می‌شود برای تشخیص موارد IgM مثبت به‌کار می‌رود [۱۵، ۱٦].

ژن GRA7 برای تهیه آنتی‌ژن نوترکیب برای تشخیص از کاندیداهای اصلی در تشخیص توکسوپلاسموزیس به‌کار می رود. استفاده از این آنتی‌ژن برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس به‌خصوص در موارد خطرناک کشنده در بیماران ایدزی و توکسوپلاسموزیس مادرزادی بسیار اهمیت دارد [۱۵].

همچنین به‌کارگیری این ژن برای تهیه واکسن نیز از موارد مهم برای تحریک سیستم ایمنی میزبان برای مقابله با بیماری توکسوپلاسموزیس است.

در سال ۲۰۰۸ ژانگرت (Jongert) و همکاران نیز با انجام واکسیناسیون با پلاسمید حاوی ژن GRA7 در موش آن را در کاهش تولید کیست در مغز مؤثر دانست و تا ۲٤ درصد باعث کاهش کیست‌ها شده بود [۱۷].

در این تحقیق ژن کلون شده تمامی توالی بازهای ژن GRA7 را به جز در یک باز دارد که باز a تبدیل به باز g شده است. در توالی سه تایی CGA تبدیل به CGG شده که این تفاوت باز روی نوع اسیدآمینه کد شونده تأثیر ندارد و هر دو توالی اسیدآمینه آرژینین را کد می‌کنند، بنابراین کلون انجام شده قادر است دقیقاً همان ژن GRA7 با همان اسیدهای آمینه را در پلاسمیدهای مناسب بیان کند.

پلاسمید نوترکب TOPO-GRA7 می‌تواند چندین کاربرد داشته باشد؛ اولاً این‌که با سایت‌های آنزیمی طراحی شده در آغازگرها این ژن مناسب کلون شدن در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pcDNA3 بوده بنابراین با ساب‌کلون کردن آن در این پلاسمید برای تهیه واکسن DNA مناسب می‌شود و همچنین با توجه به موقعیت کدون شروع کننده ATG در پلاسمید نوترکیب TOPO-GRA7 مناسب برای ساب‌کلون کردن این ژن در پلاسمید پروکاریوتی pROXT(b) برای تولید آنتی‌ژن نوترکیب در باکتری است و آنتی‌ژن تهیه شده برای تشخیص این بیماری مناسب خواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

در این تحقیق جا دارد که از کلیه کسانی که اینجانب را یاری نموده‌اند کمال تشکر و تقدیر را به عمل آورم، به خصوص از آقای دکتر فتح اللهی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که زمینه را برای مأموریت تحقیقاتی اینجانب فراهم نمودند و همچنین آقای دکتر صدرایی مدیر محترم گروه انگل‌شناسی، خانم دکتر اسماء اسماعیل ریاست محترم انستیتو تحقیقاتی پزشکی ملکولی مالزی و خانم گیتا سعادت‌نیا دانشجوی دکتری انستیتو تحقیقاتی پزشکی ملکولی مالزی.

٦ـ منابع

[1] Darde ML, Ajzenberg D, smith J. Papulation Structure and Epidemiology of Toxoplasma gondii. In: Weiss M, Kim K, (Eds). Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 1st ed. Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2007; p: 49-80.

[2] Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1988; p: 220.

[3] Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. Microbes Infect 2003; 5(5): 457-62.

[4] Mahmoudi Majid. Evaluation the effect of Toxoplasma isolated from human in Iran

Second Edition, Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[12] Nucleic acid isolation and purification manual Roch. Molecular Biochemicals. 1998.

[13] Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E. Vaccination with Toxoplasma gondii SAG-1 Protein Is Protective against congenital Toxoplasmosis in BALB/c Mice but Not in CBA/J Mice. Infec Immun 2003; 71(11): 6615-9.

[14] Lebrun M, Carruthers VB, Cesbron-Delaue MF. Toxoplasma secretory proteins and their roles in cell invasion and intra cellular survival. In: Weiss M, Kim K (Eds). Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 1st Ed, Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2007; p: 265-316.

[15] Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. Recombinant Antigens To Detect Toxoplasma gondii-Specific Immunoglobulin G and Immunoglobulin M in Human Sera by Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1144-50.

[16] Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, Acosta A, Amendoeira RR, Lannes-Vieira J. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal Toxoplasmosis in mice. Vaccine 2003; 21(13-14): 1327-35.

[17] Jongert E, Verhelst D, Abady M, Petersen E, Gargano N. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein–protein vaccine combination but not by its DNA–protein counterpart. Vaccine 2008; 26: 5289–95.

against RH strain in mice. Presented for the M.Sc., Tehran, Tehran Medical Sciences University, 1980. (Persian)

[5] Daryani Ahmad. Immune cellular responses to fractionate excretory secretory antigens of tachyzoites of Toxoplasma gondii in mice.Presented for the Ph D., Tehran, Tarbiat Modares University, 2000. (Persian)

[6] Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. Vet Parasitol 2001; 100(1-2): 3-12.

[7] Solhjoo K, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A, Sharifi Z. Enhancement of Antibody immune response to a Toxoplasma gondii SAG1 encoded DNA vaccine by formulation with Aluminium Phosphate. J Med Sci 2006; 7(3): 361-7.

[8] Nigro M, Gutierrez A, Hoffer AM, Clemente M, Kaufer F, Carral L, Martin V, Guarnera EA, Angel SO. Evaluation of Toxoplasma gondii recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired Toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. Diagn Microbiol Infec Dis 2003; 47(4): 609-13.

[9] Schaap D, Vermeulen AN, Roberts CW, Alexander J. Vaccination against Toxoplasmosis: current status and future prospects. In: Weiss M, Kim K, (Eds). Toxoplasma gondii. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 1st Ed, Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 2007; p: 721-62.

[10] Johnson JD, Holliman RE. Toxoplasmosis. In: Gillespie SH, Hawkey PM. Medical Parasitology: A practical Approach. IRL Press at Oxford University Press, 1995; p:33-60.

[11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual.