کلونینگ و توالی‌یابی ژن کامل راپتری دو (ROP2) از توکسوپلاسماگوندی

کامی حسینیان خسرو شاهی[1]، فاطمه غفاری فر[2]، زهره شریفی[3]، ساشیلا دسوزا[4]، عبدالحسین دلیمی اصل[5]

1- دانشجوی *PhD* گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

2- دانشیار گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

3- استادیار مرکز تحقیقات ویروس شناسی ، سازمان انتقال خون ایران

4- استاد انستیتو پاستور بلژیک ،بروکسل ،مرکز تحقیقات توکسوپلاسما

5- استاد گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

یافته/ دوره دوازدهم/ شماره 3/ پاییز 89/ مسلسل 45

چکیده

دریافت مقاله: **89/1/25** ، پذیرش مقاله: **89/3/2**

★ **مقدمه:** توکسو پلاسما گوندی یک تک یاخته داخل سلولی می‌باشد که باعث بیماری توکسو پلاسموزیس در انسان و حیوانات می‌شود. بیمارانی که نقص سیستم ایمنی دارند، عفونت مزمن این بیماری می‌تواند دوباره فعال شده و باعث آنسفالیت شود که اغلب کشنده می‌باشد. پروتئین راپتری 2 توکسو پلاسما گوندی(ROP2) یکی از میانجی‌های مهم در آمیزش ارگانل PVM- می‌باشد. پروتئین ROP2 در بدن انسان توسط کلون Tcell شناسایی می‌شود . همچنین ROP2 برای Bcell دارای اپی توپ می‌باشد. همه این ویژگی های ROP2 باعث شده که از این پروتئین به عنوان کاندید برای تهیه واکسن های نوترکیبی و کوکتلی علیه توکسوپلاسموزیس استفاده شود.

★ **مواد و روش ها:** در این مقاله کلونینگ و توالی یابی ژن کد کننده پروتئین کامل ROP2 از توکسوپلاسما گوندی توصیف خواهد شد. در این تحقیق ، ابتدا DNA ژنومی توکسوپلاسما گوندی استخراج شده و از آن برای تکثیر ژن کامل ROP2 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده استفاده گردید،سپس محصول PCR در داخل وکتور pTZ57R/T کلون شده و متعاقبا پلاسمید کلون شده در باکتری *E.Coli* ترانس‌فورم شده و به دنبال آن پلاسمید حاوی ژن کامل ROP2 (pT-ROP2)که توسط هضم آنزیمی و PCR تایید شده بود، از باکتریهای ترانس‌فورم شده، استخراج گردید و از آن برای توالی‌یابی ژن کامل ROP2 استفاده گردید.

★ **یافته ها:** این پژوهش نشان داد که ژن کامل ROP2 در داخل پلاسمید pTZ57R/T کلون شده و پلاسمید نوترکیب (pT-ROP2)را تشکیل می‌دهد. توالی‌یابی ژن کامل ROP2 که در داخل وکتور pTZ57R/T کلون شده است، نشان دادکه توالی ژن کامل ROP2 از سوش بسیار بیماریزای توکسوپلاسما گوندی (معروف به سوش RH)شباهت زیاد 98 درصدی با سوش RH موجود در بانک ژنی دارد. (Gen bank Accession No.Z36906.1).

★ **بحث و نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که با موفقیت ژن کامل ROP2 در داخل پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است و از این پلاسمید نوترکیب (pT-ROP2) می توان برای ساختن DNA واکسن بر علیه توکسوپلاسموزیس استفاده کرد.

★ **واژه های کلیدی:** کلونینگ، توالی‌یابی، توکسوپلاسما گوندی، ژن کامل ROP2

آدرس مکاتبه: تهران ، دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده علوم پزشکی ، گروه انگل شناسی ، صندوق پستی: 331-14115

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

مقدمه

توکسو پلاسما گوندی تک یاخته ای داخل سلولی است که باعث توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات می‌گردد. در افراد سالم و دارای سیستم ایمنی نرمال، عفونت با این تک یاخته، معمولا فاقد علایم کلینیکی می‌باشد، اما در افرادی که نقص سیستم ایمنی دارند و همچنین زنان حامله باعث بیماریهای شدید می‌شود. (1).در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، عفونت مزمن با توکسو پلاسما گوندی می‌تواند مجددا فعال شده و باعث آنسفالیت و یا مرگ شود. (2).

در حقیقت، توکسوپلاسما گوندی یکی از فرصت طلب ترین پاتوژن‌ها در افراد مبتلا به ایدز می‌باشد. (2). توکسوپلاسموزیس مادرزادی که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین خودبخودی، مرگ جنین در رحم یا نقص‌های شدید مادرزادی مثل هیدروسفالی، عقب ماندگی ذهنی یاکوریورتینیت گردد (4و3). آلودگی طبیعی با توکسو پلاسما گوندی به طور کلی منجر به یک پاسخ ایمنی طولانی و غیرمحافظت کننده می‌شود (6و 5). این پاسخ ایمنی توسط سلولهای لنفوسیت T ایجاد می‌شود و شامل لنفوسیت‌های $CD4^+$,T و $CD8^+$ می‌باشد. (6و 5). بنابراین واکسن هایی که برعلیه توکسوپلاسموزیس تولید می‌شود باید بر اساس آنتی ژن هایی از این تک یاخته باشد که باعث تحریک تولید پاسخ های ایمنی توسط لنفوسیت های T گردند.

توکسو پلاسماگوندی مانند بقیه ارگانیسم های تک سلولی حاوی آنتی ژنهای مختلف و اجزای ساختاری و محصولات متابولیکی می‌باشد که خاصیت ایمونولوژنیک دارند.

از مهمترین آنتی‌ژن‌های توکسو پلاسما گوندی، آنتی‌ژن‌های سطحی تاکی‌زوئیت و آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی می‌باشند. (1). امروزه توجه به آنتی‌ژن‌های سوماتیک کاهش پیداکرده و بیشتر تمرکز محققین بر روی آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی معطوف می‌باشد، به دلیل این که این آنتی‌ژن‌ها در مقایسه با آنتی‌ژن توتال توکسوپلاسما سبب تحریک و تکثیر بیشتر لنفوسیت‌های T می‌شوند و در پاتوژنز و فرار انگل از سیستم ایمنی نقش دارند. به‌همین دلیل آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی به‌عنوان کاندید مناسب برای بررسی‌های ایمونیزاسیون پیشنهاد می‌گردند. این آنتی‌ژن‌ها بخش‌های مختلفی دارند، برخی از آنها نامگذاری شده‌اند. یکی از انواع مهم آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی، آنتی‌ژن ROP2 می‌باشد که از ارگانل راپتری ترشح می‌گردد. تاکنون 9 پروتئین راپتری شناسایی شده‌است. زمان آزاد شدن این مولکولها و جایگیری آنها در سطح سلول میزبان یا واکوئل پارازیتوفورس مبین نقش این مولکولها در هنگام حمله انگل به میزبان می‌باشد. (8و7).

آنتی‌ژن ROP2یکی از میانجی‌های مهم در آمیزش ارگانلPVM می‌باشد و باعث انتقال لیپیدها از جایگاه غشائی میتوکندری و شبکه آندوپلاسمیک (ER)سلول میزبان به PVM می‌شود. (8و7). دامین N-ترمینال ROP2 به سیتوزول سلول میزبان ارائه شده و باعث می‌شود که میتوکندری و ER میزبان در خدمت PVM انگل به کار گرفته شوند (8 و7).

پروتئین ROP2 در بدن انسان توسط کلون Tcell (Tcc32) شناسائی می‌شود. ROP2 همچنین برای Bcell دارای اپی‌توپ می‌باشد و باعث تولید IgG و IgM و IgA می‌شود (10و9). همه این ویژگی‌های ROP2 باعث شده که از این پروتئین به عنوان یک کاندید برای تهیه واکسن‌های نوترکیبی و کوکتلی علیه توکسوپلاسموزیس استفاده شود (11و9). ROP2 یک پروتئین 64 کیلودالتونی می‌باشد که توسط ژن کامل ROP2 کد می‌شود ژن آن در مراحل تاکی زوئیت و برادی زوئیت و اسپروزوئیت انگل توکسوپلاسما

گوندی بیان می‌شود (13و12)،تهیه Cleavage در پروتئین 64 کیلودالتونیROP2 در داخل PVM، تنوع زیادی در وزن مولکولی ROP2 ایجاد می‌کند (14و12). ژن کامل ROP2 یک پلی‌پپتید 561 آمینواسیدی را کد می‌کند. ژن کامل ROP2 حدود 2235bp می‌باشد ولی قسمت کدکننده آن در حدود 1686bp می‌باشد که در محدوده 440 تا 2125 از کل ژن قرار دارد (13). در این پژوهش کلونینگ ژن کامل ROP2 به داخل وکتور مناسب جهت ساخت پلاسمید نوترکیب توصیف شده است. از این پلاسمید نوترکیب(pT-ROP2) برای ساخت واکسن DNA برعلیه توکسوپلاسموزیس استفاده خواهد شد.

مواد و روش ها

در این تحقیق از تاکی زوئیتهای انگل توکسوپلاسما گوندی سویه RH جهت تخلیص DNA و جداسازی ژن ROP2 استفاده شد. تهیه تاکی‌زوئیت با پاساژ متوالی انگل به صورت تزریق داخل صفاقی به موش BALB/C انجام شد. سویه RH برای این موشها حدت بالایی دارد و طی 4 الی 5 روز موش را می‌کشد.

حدود $5x10^7$ تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی(100µL) به وسیله سانتریفیوژ کردن تغلیظ شده و با سالین بافرفسفات (PBS) شستشو شد، سپس در 900 میکرولیتر بافرلایزیز(0/1M Tris-HCL pH 8Containg 1% SDS, 0/1M NaCl and 10mM EDTA) لیز شد و سپس به آن 10 میکرولیتر پروتئاز K(100?g/mL) اضافه شده و در 55 درجه برای دو ساعت انکوبه شد (15). سپس محصول حاصل از لیز با حجم مساوی از فنل و کلروفرم مخلوط شده تا پروتئینها حذف شود. این مخلوط در دور 13000rpm برای 15 دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی با حجم مساوی با کلروفرم مخلوط شده و مجددا سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با استفاده از استات سدیم 3 مولار و اتانول 100 درصد مخلوط شده و در دور 13000rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA رسوب کند. رسوب DNA با اتانول 70 درصد شستشو داده شده و در آب مقطر استریل حل شده و تا زمان استفاده در فریزر 20- درجه نگهداری شد (16).

محصول استخراج DNA به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 0/8% تایید شد.

DNA ژنومی حاصل شده از تاکی زوئیت‌ها به عنوان نمونه برای تکثیر ژن ROP2 به وسیله PCR استفاده شد. PCR ژن مورد نظر به شرح زیر انجام می‌شود:

نمونهءDNA	←	3?L
dNTP	←	0/5?L
Taq DNA polymerase	←	0/5?L
10X PCR Buffer	←	2/5?L
کلرید منیزیم(MgCL2)	←	0/75?L
آب مقطر	←	15/75?L
پرایمر Forward	←	1?L
پرایمر Reverse	←	1?L

فرایند PCR در داخل ترموسایکلر به شرح ذیل صورت گرفت:

بعد از انجام Denaturation اولیه به مدت 5 دقیقه در دمای 94?C درجه ، سیکل دمائی شامل 60 ثانیه در 94?C درجه (Denaturation)، 30 ثانیه در 62 درجه (Annelling)، 60 ثانیه در ?72 درجه (extention) 32 بار تکرار شد و درنهایت یک extention نهایی در 72?C درجه برای 10 دقیقه صورت گرفته و PCR خاتمه پذیرفت.

برای ژن ROP2 از جفت پرایمر زیر استفاده شد:

[Forward primer, 32nt 5' ATT AAG CTT ATG
Hind III
GAA AAC TGT GCG TCG GTC AG 3'
Reverse primer 29 nt; 5' ATT GAA TTC TCA
EcoR I
TGC CGG TTG TCC ATC AG 3']

پرایمر Up stream برای ژن ROP2 دارای یک جایگاه آنزیمی HindIII و کدون شروع ATG است . پرایمر Down stream نیز یک جایگاه آنزیمی EcoRI و کدون توقفTGA دارد.

محصول PCR باید حدود 1700bp باشد . به وسیله الکتروفوریس بر روی ژل آگاروز 1% شناسایی و تایید شود. اندازه مارکر استفاده شده برای تخمین اندازه محصول PCR 1kbp Ladder می‌باشد (Fermentas). توالی DNA ژن کد کننده ROP2 توکسوپلاسما گوندی از اطلاعات Gen bank با شماره accession NO:Z36906 به دست آمد. پرایمرهای Forward و Reverse برطبق توالی نوکلئوتیدی در Gen Bank data base وGen Runer software طراحی شد.

محصول PCR با استفاده از کیت استخراجDNA (Fermentas) از ژل آگاروز طبق پروتکل موجود در Kit، استخراج و خالص سازی شد.

محصول PCR استخراج و خالص سازی شده توسط InsT/Aclone PCR product Cloning Kit, (Fermentas) و طبق پروتکل موجود در آن به درون وکتور pTZ57R/T کلون گردید.

Iigation Reaetion به شرح زیر تهیه شد:

pTZ57 R/T Plasmid	←	5?L
Purified/PCR product	←	15?L
T4 DNA Iigase	←	1?L
10X Buffer	←	3?L
PEG	←	3?L
Nuclease free D.W.	←	3?L

بعد از تهیه (Ligation reaction)مخلوط واکنش، به طور شبانه در انکوباتور 22 درجه قرار داده شد سپس در فریزر C?20– درجه تا مرحله استفاده نگهداری شد.

تهیه سلولهای مستعد از باکتری اشرشیاکلی (TG1 Strain) به وسیله روش کلریدکلسیم صورت پذیرفت (16).

برای انجام ترانسفرماسیون L?10 از مخلوط واکنش (Ligation) با L?150 سلولهای مستعد مخلوط شده و سپس این مخلوط در 42 درجه سانتی گراد برای 90 ثانیه انکوبه شده و فورا بر روی یخ به مدت 2 الی 3 دقیقه قرار داده شد.

سلولهای ترانسفورم شده در L?300 محیط LB مایع فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شده ودر انکوباتور 37 درجه شیکردار برای 1 الی 2 ساعت قرار داده شد .

برای جداسازی کلونی های آبی و سفید، از پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین، (Fermentas) IPTG و (Fermentas) X-Gal استفاده گردید. از سلولهای مستعد تقویت شده بر روی محیط فوق کشت داده و در دمای ?37 درجه به مدت 18 ساعت انکوبه شد.

در نهایت چندین کلونی سفید و آبی که به صورت تصادفی از هر پلیت آگار انتخاب شده در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت داده و در دمای ?37 به مدت 18 ساعت انکوبه شد.

عمل استخراج پلاسمید از کلونی های باکتریایی سفید و آبی به وسیله کیت Accuprep plasmid (Bio NEER) کیت استخراج و طبق پروتکل موجود در آن صورت‌گرفت.

بعد از استخراج پلاسمید آزمایش های زیر برای تایید صحت کلونینگ ROP2 به داخل وکتور pTZ57R/T انجام

پذیرفت. برای مقایسه پلاسمید های استخراج شده بر روی ژل آگاروز 0/8 درصد:

3?L از پلاسمیدهای استخراج شده از هر کدام از کلونیهای باکتریایی سفید (pT-ROP2) و آبی (pTZ57R/T) بر روی ژل آگاروز 0%/8 بارگزاری شده و الکتروفورز صورت پذیرفت. در نهایت باندهای پلاسمیدی ظاهر شده بر روی ژل آگاروز با هم مقایسه شد.

DNA پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های سفید(pT-ROP2) به‌عنوان نمونه جهت انجام تکثیر ژن ROP2 به وسیله PCR مورد استفاده قرار گرفت. سپس محصول PCR به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شد. اندازه مارکر استفاده شده برای تخمین محصول PCR 1kbp ladder (Fermentas) بود.

با توجه به طراحی جایگاه‌های آنزیمی محدود کننده EcoR1 و HindIII بر روی پرایمرهای Forward و Reverse و حضور آنها در پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده از کلونی‌های سفید (pT-ROP2)، این پلاسمیدها توسط آنزیم‌های HindIII و EcoR1 برش داده شد. برای این منظور هر واکنش برش آنزیمی به شرح زیر انجام پذیرفت:

پلاسمید نوترکیب	←	10?L
آنزیم محدودکننده	←	1?L
10X Buffer	←	2?L
آب مقطر	←	7?L

سپس مواد فوق به طور شبانه در دمای 37 درجه انکوبه شد. به خاطر تفاوت بافرهای آنزیمی مورد استفاده، هر واکنش برش آنزیمی بایستی به صورت مجزا صورت پذیرفت.

کل محصول برش آنزیمی به‌وسیله EcoR1 بر روی ژل آگاروز 1 درصد بارگذاری شده و باندهای حاصل از آن که حاوی قطعه ROP2 بود از روی ژل به وسیله DNA Extraction Kit (Fermentas) استخراج شده و دومین برش آنزیمی به وسیله HindIII بر روی آن انجام پذیرفت. محصول حاصل از برش آنزیمی به وسیله HindIII بر روی ژل آگاروز 1 درصد لود شده و باند حاصل از برش هر دو آنزیم به وسیله الکتروفورز بررسی شد.

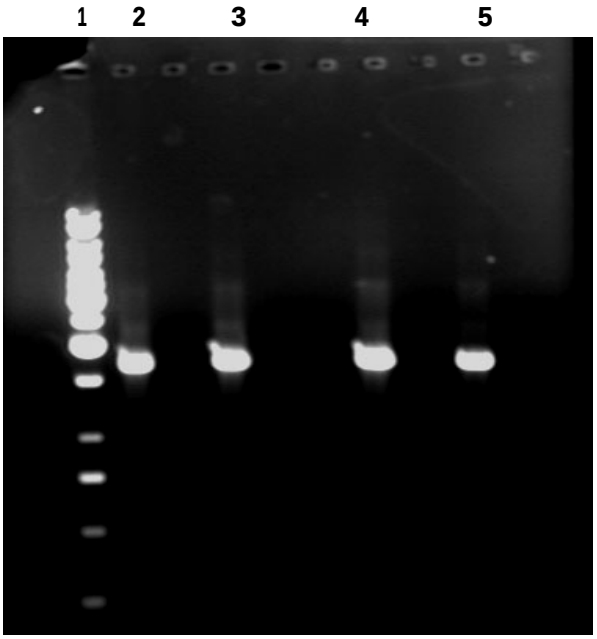
پلاسمیدهای استخراج شده از کلونیهای سفید باکتریایی(pT-ROP2) به وسیله شرکت ژن فن آوران تعیین توالی گردید.

یافته ها

استخراج DNA ژنومی با استفاده از بافر لیز کننده و پروتیناز K طبق روش فنل/کلروفورم انجام گردید.

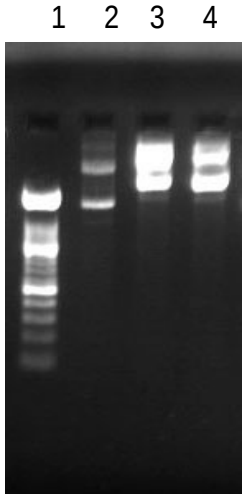
قطعه DNA تکثیر یافته به وسیله PCR در حدود bp 1686 بوده و مشابه اندازه ژن ROP2 توکسوپلاسما می‌باشد. هیچ ژنی به غیر از ژن ROP2 تکثیر نیافت ، بنابراین پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن ROP2 اختصاصی می‌باشد. نتایج ناشی از الکتروفورزیس PCR محصولات استخراج شده از پلاسمیدهای pT-ROP2 که با همان پرایمرهای اختصاصی و شرایط مشابه انجام پذیرفت، نشان می‌دهد که ژن ROP2 به اندازه bp 1686 تکثیر یافته و این ژن درون پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است.(شکل 3)

انتقال محصول استخراج و خالص شده PCR به داخل وکتور پلاسمیدی pTZ57R/T (Ins T/A clone PCR product cloning kit) طبق پروتکل صورت می‌پذیرد.

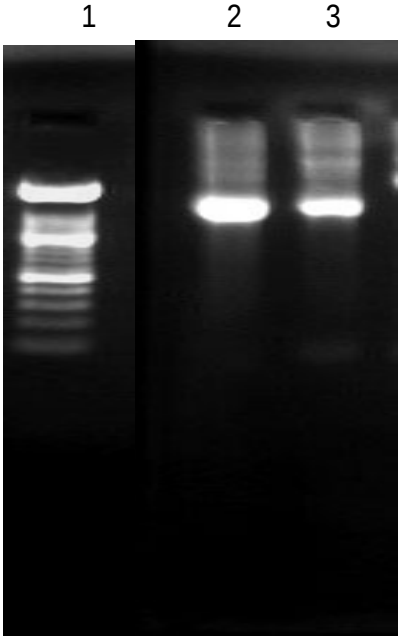


شکل 1- الکتروفورز محصول PCR ژن ROP2 توکسوپلاسماگوندی با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز 1 درصد؛ ستون 2 و 3 و 4 و 5: محصول PCR (قطعه 1686 جفت بازی ژن ROP2)، ستون 1: نشانگر 1 کیلوجفت بازی

الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده نشان داد که باندهای پلاسمید حاوی ژن ROP2 (pT- ROP2) در مقایسه با باندهای پلاسمید pTZ57R/T روی ژل آگاروز بالاتر قرار دارند. (شکل 2). مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های آبی و سفید نشان داد که باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های سفید در مقایسه با باندهای استخراج شده از کلنی های آبی روی ژل آگاروز بالاتر هستند پس پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های سفید از پلاسمیدهای آبی سنگین تر هستند و می‌توان نتیجه گرفت که قطعه ROP2 در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل 3).

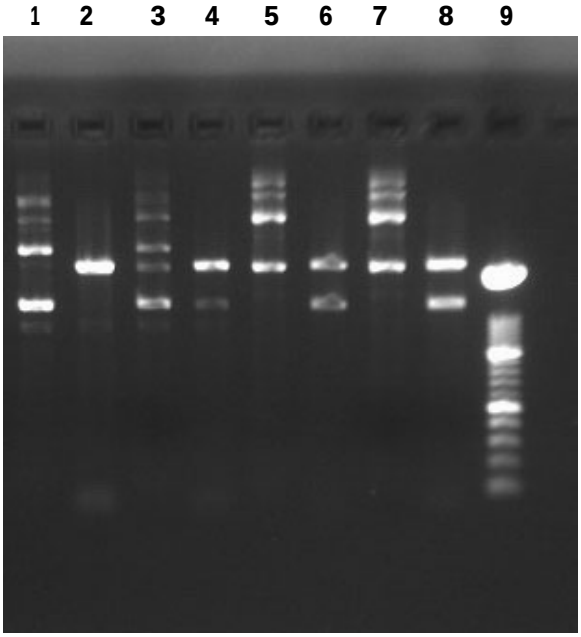


شکل 2 – مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده بر روی ژل آگاروز 0%/8 نشان می‌دهد که باندهای پلاسمید pT-ROP2 در مقایسه با باندهای پلاسمید pTZ57RT روی ژل آگاروز بالاتر قرار داشتند. ستون 1: نشانگر 100 جفت بازی، ستون 2: پلاسمید pTZ57RT ، ستون 3 و 4: پلاسمید حاوی ژن ROP2(pTROP2).



شکل 3- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-ROP2 روی ژل آگاروز 1 درصد؛ ستون 1: نشانگر 100 جفت بازی؛ ستون 2 و 3: محصول PCR (1686 جفت باز) با استفاده از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-ROP2

به طور کلی نتایج حاصل از برش های آنزیمی نشان داد که اگر پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری های کلنی سفید (pT-ROP2) به وسیله آنزیم های EcoR I و Hind III بریده شوند، یک باند 1686 جفت بازی به دست آمده و جدا می شود که همان ژن ROP2 توکسوپلاسما گوندی است، همچنین یک باند 2886 جفت بازی بریده و جدا می‌شود که همان پلاسمید pTZ57R/T می‌باشد (شکل 4). بنابراین ژن ROP2 درون پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است.



شکل 4- الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-ROP2 روی ژل آگاروز؛ ستون 1: پلاسمید pTZ57R/T ، ستون 2: پلاسیمید pTZ57R/T که با آنزیمی های EcoRI , HindIII بریده شده است. (بدون ژن ROP2) ، ستون 3، 5 و 7: پلاسمید pT-ROP2 ، ستون 4، 6 و 8: پلاسمید pT-ROP2 که با آنزیمهای EcoRI , Hind III بریده شده است، ستون 9: نشانگر 100 جفت بازی.

آنالیز تعیین توالی ژن ROP2 توکسوپلاسما گونده ای کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast مشخص کرد که قطعه 1686 جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن ROP2 توکسوپلاسما گوندی است. این سویه ایرانی با سویه RH بانک ژنی با شماره دسترسی Z36906.1 و شماره دسترسی S54994.1 ، 98% درصد شباهت داشت (شکل 5).

ATGGAAAACTGTGCGTCGGTCAGATCATCG
TCGTGTCTTATCTGGCTAGCTGCCGCATTC
TTTGTTTCGGCACTTGGCCACGTACAGCAA
GGCGCTGGCGTTGTGCGGCCTCGCCACTGG
CAGAACTCGGAAGCCGCTGTTAGTGTCCGG
CCGCCGGGAGGCGCGTCCCCTAGACATTTC
CACAGCCCAATTGAGCCAGTAGCATTTATTG
ATGGGGAGCACGTTGAAGACAAGCATGGA
GGCTCATGGCTGGAGCAGGAAGCGGCCGAG
GAAGTGACCCCCTTACTGAACAGCCACACA
GAGACCCCGACACAGTCCCCCAGTGCTTTT
AGAAGGTTACTCAGGCGTTTGCGTTTTTGG
CGACGTGGGAGGACAGGCGGATCAGATGGC
GGAGGAGAACCACCGCAGACGCCTCGCCCT
TCCCTACCGACCCGACTGTTTCAGCATTTGC
GGCGTGCGGCAGCAGCAATTCCCGCGGCG
GCATCTAGATTCTTTAGGAGATTTCGACGAG
TCCAAGAACCTGTATTCCCTCCCGACGAG
TTTCCGGAGGATGTCGACACGAACCCTATG
TATTTCCGCGGTACGGATCCTGGAGACGTC
GTCATTGAGGAGCTGTTCAATCGTATACCG
GAAACAAGCGTATGGAATGAGAACGAACGC
GTCCTGTCGAACGCCAACCATCTAGTGTCC
ACAGCATTGTGGCGTAATGAGCAGAGCTTC
CGCGTGGAGTCNGANCTGGGCGAGCGTCCA
AGGACGCTAGTCAGANGCCCAGT

شکل شماره 5- نمائی از آنالیز تعیین توالی 733 جفت باز ازابتدای ژن ، (پرایمر فوروارد در ابتدای ژن مشخص می باشد)

بحث و نتیجه گیری

روش های تشخیص ژنتیکی سوشهای توکسوپلاسما گوندی در سالهای اخیر بسیار کامل شده است. از دیدگاه فنی،

بسیاری از وسایل کاربردی برای مطالعات ژنتیکی بر روی loci (Single copy) به کار برده شده است می توان :

PCR – RFLP , RFLP ، تعیین توالی، آنالیزهای ایزو آنزیمی و RAPD-PCR (پلی مورفیک تصادفی از DNA PCR)را نام برد (18 و 17).

در این پژوهش، کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کامل ROP2 توکسوپلاسما گوندی بررسی شده. نتایج نشان داده که: ROP2 هیچ انترونی ندارد و یک کپی از ان وجود دارد و از DNA ژنومی انگل در سه مرحله قابل جدا سازی است. ژن کامل ROP2 در حدود 2235 جفت باز دارد همچنین قسمت کد کننده حدود 1686 جفت باز می‌باشد که بین 440 الی 2125 از کل ژن واقع شده است.

این مطالعه نشان داد که ژن ROP2 به داخل پلاسمید pTZ57R/T کلون شده و پلاسمید نو ترکیب pT-ROp2 را تشکیل می‌دهد.

ساداک و همکاران ، ساوادرا و همکاران و هریون و همکاران نشان دادند که آنتی ژن ROP2 یک جزء پروتئینی از راپتری ها می‌باشد که در سه مرحله از سیکل زندگی انگل بیان می‌شود. ROP2 یکی از مهمترین اعضای خانواده پروتئینی ROP می‌باشد و این آنتی ژن به طور انحصاری در توکسو پلاسما مشاهده می شود و در دیگر اپی کمپلکس ها دیده نمی شود. (19 و 12 و 9).

پرکین و سافر و همکاران ، سینای و همکاران و بیکر و همکاران نتیجه گیری کردند که قسمتهای کد کننده ژن ROP2 حدود 1686 جفت باز بوده و هیچ اینترونی ندارند.

این ژن یکی از مهمترین واسطه های مداخله گر در آمیزش PVM و ارگانل بوده و باعث انتقال لیپید از میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی سلول میزبان به PVM انگل می‌شود. (20 و 13 و 8 و 7).

وو و همکاران ، قطعه ژن برش خورده ROP2 را از روی DNA ژنومی توکسوپلاسماگوندی (سویه RH) به کمک PCR تکثیر کرده و در داخل پلاسمید pGEX-UT-1 کلون کردند (21). وو نشان داد که قطعه DNA تکثیر یافته در حدود 1043 جفت باز بوده و نقشه نوکلئوتیدی آن با نقشه نوکلئوتیدی ROP2 که در بانک ژنی موجود است همخوانی دارد. وی آی و همکاران و همچنین لی وآ و همکاران از ژن کامل ROP2 استفاده کرده و آن را به کمک PCR تکثیر کردند. آنها برای کلون کردن به ترتیب از پلاسمیدهای pUCm-T و pBluescript KS(+) استفاده کردند. آنها نتیجه گیری کردند که ژن تکثیر یافته ROP2 در حدود 1/7 جفت باز می‌باشند. (23 و 22).

بکرو همکاران در سال 1994، ساداک و همکاران ،همچنین لریچ و دوبرمتز نشان دادند که ژن کد کننده ROP2 یک پروتئین 64 کیلو دالتونی را بیان می‌کند. آنها همچنین نتیجه گیری کردند که در درون شبکه آندوپلاسمی انگل، طی یک سری فرایند های مختلف تغییراتی بر روی این پروتئین 64 کیلو دالتونی صورت می‌گیرد . به طوری که پروتئین های جدید با وزن مولکولی در حدود 55 کیلو دالتون ایجاد می‌شود. (14 و 13 و 12).

فاچادو و همکاران و مارتین و همکاران از ژن ناقص ROP2 برای ساختن DNA واکسن کوکتلی بر علیه توکسوپلاسموزیس در موشها استفاده کردند. آنها نشان دادند که ژن ناقص تکثیر یافته ROP2 مشابه ژن کامل ROP2 نبوده و پروتئین بیان شده توسط این ژن ناقص در حدود 54 کیلو دالتون می‌باشد. (25 و 24).

تفاوت بسیار مهم بین پژوهش ما و تحقیقاتی که فاچادو ، مارتین و همکاران انجام دادند، این است که ما ژن کامل ROP2 را داخل پلاسمید pTZ57R/T کلون کردیم . در

این حالت پروتئین ROP2 به صورت طبیعی با سیگنال پپتیدهای اختصاصی خودش می تواند بیان شود. در حالی که در دیگر مطالعات توالی های کد کننده سیگنال پپتیدهای ژن را حذف کرده و ژن ناقص ROP2 را داخل یک پلاسمید با سیگنال پپتید tPA که قادر به ترشح پروتئین ROP2 باشد، کلون کرده بودند. دستکاری ژن و کلون کردن آن در داخل پلاسمیدهایی که منجر به ترشح پروتئین می‌شود می‌تواند باعث تغییر نوع و قدرت پاسخ های ایمنی شود. بنابراین پلاسمید نوترکیبی تولید شده در این تحقیقات که حاوی ژن کامل ROP2 می‌باشد می‌تواند برای تهیه واکسن علیه توکسوپلاسموزیس مفید واقع شود.

در این پژوهش آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن ROP2 که در داخل پلاسمیدpTZ57R/T کلون شده بود ، نشان داد که توالی آن 98 درصد با سویه RH موجود در بانک ژنی با شماره دسترسی Z 36906.1 و شماره دسترسی S 54994.1 و 95 درصد با شماره دسترسی DQ 923323.1 در بانک ژنی شباهت دارد.

این تحقیق نشان داد که ژن کامل ROP2 در داخل پلاسمید pTZ57R/T با موفقیت کلون شده است. از این پلاسمید نوترکیب (pT-ROP2) می توان برای ساختن DNA واکسن بر علیه توکسوپلاسموزیس استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان به این وسیله از پرسنل محترم بخش تحقیقات ویروس شناسی سازمان انتقال خون تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از آقای دکتر صدرایی مدیر محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس و خانم قاسمی نیکو کارشناس محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Bhopale GM. Development of a vaccine for Toxoplasmosis: current status. Micro Infec. 2003; 5: 457-462.
2. McCabe R, Remington JS. Toxoplasmosis: The time has come. Nat Eng J Med. 1988; 318: 313-315.
3. Remington JS, Krahenbuhl JL. Immunology of Toxoplasma gondii. In: Nahmias, A.J., O'Reilly, R.J. Immunol Human Infect, part 2. plenum, New York. 1982; 1: 327-371.
4. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. CID. 1994; 18: 853-862.
5. Suzuki Y, Remington JS. Dual regulation of resistance against Toxoplasma gondii infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4 + Tcell in mice. J Immunol. 1988; 140: 3943-3946.
6. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD 4+ and CD 8+ T Lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine. J Immunol. 1991; 146: 286-292.
7. Perkins ME. Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. Parasitol Today. 1992; 8: 28-32.
8. Saffer LDO, Mercereau-puijalon JF, Dubremetz and Schwartzman JD. Localization of a Toxoplasma gondii rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. J Protozool. 1992; 39: 526-530.
9. Saavedra R, DeMeuter F, Decourt JL, Herion P. Human T-Cell clone identifies a potentially protective 54 kDa protein antigen of Toxoplasma gondii cloned and expressed in Escherichia coli. J Immunol. 1991; 147: 1975-1982.
10. Martin V, Arcavi M, Santillan G, Armendoeira MR, DeSouza Neves E, Griemberg G, et al. Detection of human toxoplasma - specific imunoglobulins A, M and G with a recombinant Toxoplasma gondii ROP2 protein. Clinic and Diag Lab Immunol. 1998; 5: 627-631.
11. Saavedra R, Herion P. Human Tcell clones against Toxoplasma gondii: production of interferon-gamma, interleukin 2 and strain cross-reactivity. Parasitol Res. 1991;77: 379-385.
12. Sadak A, Taghy Z, Fortier B, Dubremetz JF. Characterization of a family of rhoptry proteins of Toxoplasma gondii. Mol Biochem Parasitol. 1998; 29: 203-211.
13. Beckers CJ, Dubremetz JF, Mercereau-puigalon O, Joiner KA. The Toxoplasma gondii rhoptry protein ROP2 is inserted into parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell. Cytoplasm J Cell Biol. 1994; 127: 947-961.
14. Leriche MA, Dubremetz JF. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of Toxoplasma gondii tachyzoites by sub-cellular fractionation and monoclonal antibodies. Mol Biochem Parasitol. 1991; 45: 249-260.

15. Kimbita EN, Xuan X, Huang X, Miyazawa T, Fukumoto S, et al. Serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in cate by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. Vet Parasitol. 2001; 102: 35-44.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, Second Edition. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
17. Ajzenberg D, Banuls A-L, Tibayrenc M. and Drade ML. Microsatellate analysis of Toxoplasma gondii shows considerable polymorphism structured into two main clonal group. Int J Parasitol. 2002a; 32: 27-38.
18. Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Tulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P. and Drade ML. Genotype of 86 Toxoplasma gondii Isolates associate with human congenital Toxoplasmosis, and correlation with clinical finding. J Infect Dis. 2006b;186: 684-689.
19. Herion P, Hernandez-Pando R, Dubremetz JF, Saavedra R. Sub-cellular localization of the 54 kDa antigen of Toxoplasma gondii. J Parasitol. 1993;79: 216-222.
20. Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: A high affinity interaction. J Cell Sci. 1997; 110: 2117-2128.
21. Wu K, Chen XG, Li H, Zhi GZ. In vitro amplification of Toxoplasma gondii rhoptry protein 2 gene and construction of its eukaryotic expression plasmid. Di Yi Jun Yi Da Xue Bao. 2002; 22(7): 620-623.
22. Wei QK, Zhang DB, Li J, Li GP, Wang HF, Cui Y, et al. Cloning and identification of ROP2 gene of Toxoplasma gondii. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2006; 24(3): 208-211.
23. Leyva R, Herion P, Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of Toxoplasma gondii. Parasitol Res. 2001; 87: 70-79.
24. Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, et al. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal Toxoplasmosis in mice. Vaccine. 2003; 21: 1327-1335.
25. Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanis T, et al. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the GRA4 gene provides partial protection in chronic murine models of Toxoplasmosis. Clin and Diagn lab Immunol. 2004; 11(4): 704-710.