Original Article

Cloning and sequencing the plasmid encoding *Toxoplasma gondii* Microneme 3 protein

Jafari-Modrek M[1], Ghaffarifar F[1*], Sharifi Z[2], Dalimi-Asl A[1]

1- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
2- Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, I.R. Iran

Received May 15, 2011; Accepted July 31, 2011

Abstract:

Background: *Toxoplasma gondii*, an obligatory intracellular protozoan parasite, causing toxoplasmosis in human and animal with worldwide spread. Microneme 3 (MIC3) protein, a 90 kDa parasite factor attaching to the host cells in the beginning of the invasion, is secreted in all stages of parasite development (e.g. sporozoite, tachyzoite and bradyzoite) and also is considered as a potent antigen. Therefore, besides the immunogenicity and the candidacy for vaccine design, the protein is used for diagnostic purposes, as well. The aim of the present study was to transfer MIC3 gene into plasmid vector (PTZ57R/T) for subcloning in eukaryotic and prokaryotic plasmids.
Materials and Methods: Toxoplasmia genomic DNA extracted using phenol-chloroform method and MIC3 gene was then amplified by PCR with specific primers. Electrophoresis was performed by using agarose gel and PCR product was purified by T4 DNA ligase enzyme into a cloning vector. Finally, recombinant plasmid was transformed into E.coli (Top10 strain). The extracted clone was verified with PCR, digestion enzymes and sequencing.
Results: The PCR product was seen as a 1052bp band in agarose gel (1%). The recombinant plasmids was restricted by HindIII and EcoRV enzymes and two obtained 2886 and 1052bp bands showed that the MIC3 gene was cloned in PTZ57R/T plasmid.
Conclusion: The results revealed that the cloning and transformation of MIC3 gene in pTZ57R/T was done successfully.

Keywords: Toxoplasma gondii, MIC3, Cloning, Sequencing

* **Corresponding Author.**
Email:ghafarif@ modares.ac.ir
Tel: 0098 21 828 845 53
Fax: 0098 21 455 582 88

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Autumn, 2011; Vol. 15, No 3, Pages 200-206

Please cite this article as: Jafari-Modrek M, Ghaffarifar F, Sharifi Z, Dalimi-Asl A. Cloning and sequencing the plasmid encoding *Toxoplasma gondii* Microneme 3 protein. ***Feyz*** 2011; 15(3): 200-6.

کلونینگ و توالی یابی پلاسمید کد کننده پروتئین میکرونم ۳ (MIC3) توکسوپلاسما گوندی

محمد جعفری مدرک[۱]، فاطمه غفاری فر[۲*]، زهره شریفی[۳]، عبدالحسین دلیمی اصل[٤]

خلاصه

سابقه و هدف: توکسوپلاسما گوندی، انگل تک‌یاخته درون سلولی اجباری و عامل توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات بوده که در سراسر جهان انتشار دارد. پروتئین میکرونم ۳ (MIC3) با وزن ملکولی ۹۰ کیلو دالتون، عامل چسبیدن انگل به سلول‌های میزبان در آغاز تهاجم است و در تمام مراحل تکاملی از انگل ترشح شده و یک آنتی ژن قوی محسوب می‌شود؛ از این نظر علاوه بر ایمونوژن بودن و کاندید ساخت واکسن، در تشخیص نیز کاربرد دارد. هدف از این تحقیق، آماده سازی ژن MIC3 در پلاسمید ناقل جهت ساب‌کلونینگ در پلاسمیدهای یوکاریوت و پروکاریوت است.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی توکسوپلاسما، با روش فنل-کلروفرم استخراج شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن MIC3، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر شده و با استفاده از ژل آگارز، الکتروفورز گردید. محصول PCR، خالص شده و به‌کمک آنزیم T4DNA Ligase، به‌داخل یک وکتور کلونینگ کلون شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب به‌داخل E.coli سوش TOP10 ترانسفورم گردید. با روش‌های PCR و برش آنزیمی و توالی یابی، کلون مورد نظرتائید شد.

نتایج: محصول PCR به‌صورت یک باند ۱۰۵۲ جفت باز در ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید. پلاسمیدهای نوترکیب تحت برش آنزیمی دو آنزیم محدود کننده HindIII و EcoRV قرار گرفت و دو باند ۱۰۵۲ و ۲۸۸٦ جفت باز به‌دست آمد که نشان داد قطعه MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است.

نتیجه گیری: نتایج به‌دست آمده نشان داد، کلونینگ و ترانسفورم ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T با موفقیت انجام شده است.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، MIC3، کلونینگ، توالی یابی

فصلنامه علمی – پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۲۰٦-۲۰۰

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*) تک-یاخته‌ای با انتشار جهانی است که طیف وسیعی از مهره داران خون گرم را آلوده می‌کند. توکسوپلاسما در افراد با اختلال ایمنی (immunocompromised) به‌خصوص در مبتلایان به نقص ایمنی اکتسابی (ایدز)، فرصت طلب بوده و بیماری وخیمی ایجاد می‌کند که عمدتا مغزی بوده و تهدید کننده حیات است. بیماری مادرزادی آن تظاهرات خفیف تا شدیدی دارد که در فرم شدید سبب هیدروسفالی یا میکروسفالی، کلسیفیکاسیون مغزی و کوریورتینیت می‌گردد [۱].

[۱] دانشجوی دکتری انگل شناسی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] استادیار، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران

[۴] استاد، گروه انگل شناسی و حشره شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

* **نشانی نویسنده مسوول:**

تهران ، بزرگراه جلال آل احمد،پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، گروه انگل شناسی

تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۳ **دورنویس:** ۰۲۱ ۴۵۵۵۸۲۸۸

پست الکترونیک: ghafarif@ modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۵ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۰/۵/۹

بآلودگی به توکسوپلاسما از شایع‌ترین عفونت‌های انگلی بشر در جهان می‌باشد [۲]. توکسوپلاسموزیس به‌شکل بدون علامت و مزمن در ۵۰۰ میلیون تا یک میلیارد نفر از جمعیت انسانی در جهان وجود دارد [۳]. از آنجا که انتشار این انگل بسیار وسیع بوده و انتقال آن به‌راحتی توسط تمام میزبان‌های واسط صورت می‌گیرد، به‌نظر می‌رسد بهترین راه کاهش زیان‌های ناشی از این بیماری، پیشگیری از ابتلای انسان و دام به انگل، از طریق تهیه داروهای جدید و یا تهیه واکسن مناسب بر علیه بیماری است. در ایران در مورد تهیه واکسن علیه توکسوپلاسموزیس تحقیقات محدودی شده است. محمودی و همکاران اثر محافظت کنندگی توکسوپلاسما گوندی سویه جدا شده از انسان در ایران (سویه تهران) را در برابر سویه RH در موش سفید آزمایشگاهی بررسی کردند. برای این منظور موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی با سوسپانسیون مغز حاوی کیست‌های توکسوپلاسما سویه تهران به‌طور داخل صفاقی آلوده شدند، سپس این موش‌ها با تعداد مختلف از تاکی‌زوئیت‌های سویه RH در یکی از روزهای چهارم تا دهم بعد از تزریق با سویه تهران چالش شدند. نتایج نشان داد، مقاومت به آلودگی با توکسوپلاسما در موش‌هایی دیده می‌شود که فاصله زمانی بین تزریق ۲ سویه در آنها بیشتر باشد [٤]. دریانی و همکاران در یک

مطالعه، تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی را در محیط کشت غیر سلولی (RPMI 1640) کشت دادند، محیط رویی کشت جمع‌آوری شده و به ستون کروماتوگرافی تعویض یونی اضافه شد. در نهایت، دو فراکشن ESA-F1 و ESA-F2 به‌دست آمد. برای ایمن سازی موش‌ها، ۵۰ موش در ۵ گروه ۱۰ تایی بررسی شدند. گروه‌های یک تا چهار به ترتیب دوبار با آنتی ژن دفعی–ترشحی (ESA) تام، فراکشن ۱ (F1)، فراکشن ۲ (F2) و با آنتی‌ژن لیز شده توکسوپلاسما ایمیونیزه شدند. یک گروه نیز به‌عنوان گروه شاهد قرار گرفت. نتایج نشان داد که آنتی ژن ESA تام، F1 و F2 در موش‌های ایمن شده منجر به واکنش DTH (افزایش حساسیت تاخیری) و پاسخ‌های تکثیر و تمایز لنفوسیت گردید. تمام موش‌ها شاهد ظرف مدت ۱۰ روز مردند، درحالی‌که موش‌ها ایمن شده برای مدت طولانی‌تری زنده ماندند. بیشترین میزان بقا در موش-هایی مشاهده شد که فراکشن F2 را دریافت کرده بودند [۵]. واکسن‌های زنده خطر عفونت تصادفی و موتانت‌های معکوس مضر غیرقابل پیش‌بینی برای انسان دارند. برای غلبه بر این مشکلات، تحقیقات اخیر بر روی واکسن‌های ساب‌یونیت، نوترکیب و واکسن‌های DNA انجام شده، که این نوع از واکسن‌ها آینده بسیار روشنی را برای پیشگیری از بیماری توکسوپلاسموزیس ارائه کرده است [٦]. صلح جو و همکاران واکسن DNA را با استفاده از ژن SAG1 برای ایمن‌سازی علیه توکسوپلاسما گوندی انجام دادند که میزان بقای موش‌های ایمن شده بیش از موش‌های گروه شاهد بود [۷]. از جمله کاندیدهای مناسب برای تهیه واکسن، آنتی‌ژن‌های میکرونمایی هستند. میکرونم‌ها تعداد زیادی پروتئین‌های عبوری از عرض غشاء و محلول بنام MIC ترشح می‌کنند که در مراحل اولیه تهاجم نقش اساسی دارند. از پروتئین‌های اصلی میکرونم آنتی ژن MIC3 (پروتئین شماره ۳ ترشح شده از اندامک میکرونم توکسوپلاسما گوندی می‌باشد) را می‌توان نام برد که با داشتن گیرنده‌های خارجی نقش مهمی را در شناسایی اولیه سلول‌های میزبان وآغاز تهاجم ایفا می‌کند [۸]. MIC3 با شناسایی سلول میزبان، شرایط را برای ورود، سُر خوردن و تهاجم انگل فراهم می-کند.MIC3 به‌عنوان یک آنتی‌ژن عمده توکسوپلاسما گوندی شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندید موثر با پتانسیل قوی برای تهیه واکسن در نظر گرفته شده است [۹]. MIC3 از اسپروزوئیت‌ها، برادی‌زوئیت‌ها و تاکی‌زوئیت‌ها ترشح می‌شوند و در تمام مراحل زندگی انگل بیان می‌شوند؛ از این‌رو به‌عنوان یک آنتی‌ژن با کارآیی بالا، می‌توان در ارزیابی آنتی‌بادی‌های بدن افراد مبتلا و تست‌های تشخیصی کاربرد داشته باشد [۹]. ژن کدکننده MIC3 به‌صورت تک‌نسخه و فاقد اینترون است [۱۰]. هدف از این کار آماده سازی ژن MIC3 در پلاسمید ناقل برای ساب کلونینگ در پلاسمیدهای یوکاریوتیک و پروکاریوتیک است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا مایع صفاقی حاوی ۵×۱۰^{٦} تاکی‌زوئیت انگل سوش RH توکسوپلاسما گوندی به‌طور داخل صفاقی به ۵ سر موش Balb/c ماده تلقیح گردید. ٤-۳ روز بعد، موش‌ها کشته شده و مایع صفاقی موش‌های آلوده، به‌وسیله سرنگ‌های ۵ سی‌سی یا ۱۰ سی سی جمع‌آوری شد [۱۱]. استخراج DNA به‌روش فنل - کلروفرم انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر (حدود ۵×۱۰^{۷}) از تاکی‌زوئیت‌های تغلیظ‌شده و شست و شو شده با بافر PBS درون یک ویال ۱/۵ سی‌سی ریخته شده و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط شد. به‌منظور لیز شدن تاکی‌زوئیت‌ها، ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K به ویال اضافه شده و به-مدت دو ساعت در بن‌ماری ۵۵ °C قرار داده شد. با استفاده از اسپکتروفتومتر و روش جذب نوری، غلظت DNA در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. می-توان DNA استخراج شده را تا مرحله بعدی در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد [۱۲]. به‌منظور طراحی پرایمرهای Forward (جلویی) و Reverse (برگشتی)، ابتدا توالی DNA ژن کدکننده MIC3 از اطلاعات بانک ژنی از سایت اینترنتی http//www.ncbi.com با شماره AJ132530 به‌دست آمد. سپس، با استفاده از این اطلاعات و به کمک نرم افزار GenRuner، جفت پرایمرها به‌صورت زیر طراحی شدند:

F: 5'-CACA↓AGCTTATGGCGCTCACCTTCATGGGGG-3'

↓محل اثر آنزیم HindIII

R: 5'-ACAGAT↓ATCTCACGTCACGGTGTGGGCATGGT-3'

↓محل اثر آنزیم EcoRV

پرایمر جلویی دارای ۳۱ نوکلئوتید و شامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی HindIII بوده و پرایمر برگشتی دارای ۳۲ نوکلئوتید و شامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی EcoRV می‌باشد.

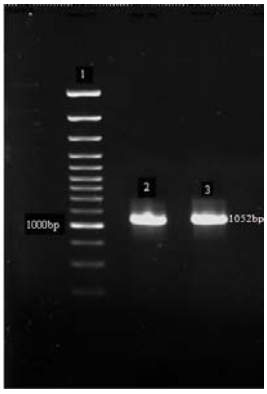
محصول واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ترکیبات زیر بود: ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر ۱۰dNTP میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلیمراز *Taq (Taq DNA polymerase)*، ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده) ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکو مول در میکرولیتر)، و ۱۵/۷۵ میکرولیتر ddH2O. مواد فوق درون ویال ریخته شد و پس از هم‌زدن در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. ژن MIC3 به‌وسیله PCR طی ۳۵ سیکل طبق برنامه Initial Denaturation به‌مدت ۵ دقیقه در

دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، Denaturation به‌مدت یک دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد، Annealing به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد، Extention به‌مدت یک دقیقه در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد و Final Extention به‌مدت ٥ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکثیرگردید. در نهایت جهت بررسی محصول PCR، برروی ژل آگارز ۱ درصد همراه با مارکر ۱۰۰bp الکتروفورز شد. در این مطالعه به‌منظور کلونینگ ژن MIC3 از کیت کلونینگ InsT/A cloneTM PCR product clonin Kit شرکت Fermentas ساخت لیتوانی استفاده گردید. واکنش اتصال با استفاده از ۳ میکرولیتر از بافر Ligation 10X، ٥-۱ واحد از T4 DNALigase، ۳ میکرولیتراز Vector(PTZ57R/T)، ۱٥ میکرولیتر از (DNA) Insert و حدود ۳۰ میکرولیتر ddH2O انجام شد. مواد فوق در یک لوله میکروفیوژ ۰/٥ میکرولیتری ریخته شده و به‌مدت یک‌ساعت در دمای۲۲ درجه سانتی‌گراد و پس از آن به‌مدت یک‌شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ترانسفورم پلاسمید به‌داخل باکتری به‌کمک روش شوک حرارتی انجام شد که به‌طور خلاصه بیان می‌شود: باکتری در مرحله اول به‌کمک روش کلرید کلسیم مستعد شده و سپس کل محصول حاصل از واکنش اتصال به آن اضافه گردید. مخلوط فوق به‌آرامی و بدون استفاده از Vortex ترکیب شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. پس از آن، به‌مدت ۹۰ ثانیه در بن ماری٤۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی داده شد، سپس مخلوط به‌مدت ۲ دقیقه در یخ قرار گرفت.٥۰۰ میکرولیتر محیط(Luria Bertani) LB مایع بدون آنتی بیوتیک به مخلوط اضافه شده و به‌مدت ٦۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی این مدت می‌توان باکتری‌ها را در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داد. برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعه مورد نظر، این باکتری‌ها در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، سوبسترای X-Gal همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی (Isopropylβ-D1-thiogalactopyranoside) IPTG کشت داده شدند. کلونی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب که در آن‌ها بتاگالاکتوزیداز سنتز شده، X-Gal را تجزیه کرده و سبب تولید ایندولیل شده که رنگ آن آبی است و کلونی‌ها را آبی می‌کند. اما، کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب چون فاقد آنزیم بتاگالاکتوزیداز هستند، نمی‌توانند X-Gal را تجزیه کنند، بنابراین کلونی آن‌ها سفید می‌باشند. در زیر هود و در شرایط استریل، مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر سلول‌های ترانسفورم شده به یک پلیت حاوی X-Gal و IPTG، اضافه شده و به کمک میله شیشه‌ای در تمام نقاط پلیت پخش شد. پلیت‌ها به‌صورت وارونه و به‌مدت یک شب (۱۸-۱٦ ساعت) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، به‌مدت چند ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کلونی‌های سفید یا آبی ظاهر شوند [۱۲]. پلاسمیدها بر اساس دستورالعمل کیت شرکت سازنده (Fermentas) از کلونی‌های سفید و آبی استخراج شد. سپس، روی ژل آگارز با یکدیگر مقایسه شدند. پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های سفید به‌علت وجود قطعه کلون شده در آن، سنگین‌تر از کلونی‌های آبی هستند [۱۲]. برای تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید PTZ57R/T، ابتدا پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های سفید با استفاده از کیت شرکت Fermentas مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت استخراج شده و برای تعیین توالی ارسال گردیدند. تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید PTZ57R/T به‌وسیله شرکت ژن فناوران انجام گردید و به‌کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و تفاوت‌ها با سویه RH استاندارد توکسوپلاسما گوندی در بانک ژنی مقایسه شد.

نتایج

نتایج PCR به کمک DNA ژنومی

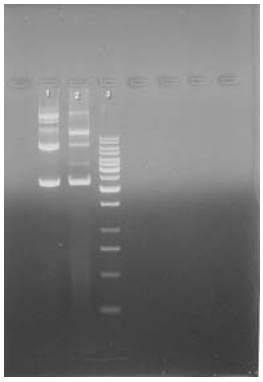
نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی فقط یک باند حدود ۱۰٥۲ جفت باز روی ژل آگارز نشان داد که هم‌اندازه ژن MIC3 توکسوپلاسما گوندی است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده بود؛ بنابراین پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن MIC3 اختصاصی بودند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR استخراج DNA ژنومی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، ستون شماره ۱ مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون شماره ۲ و ۳ قطعه MIC3 اندازه ۱۰٥۲ جفت باز

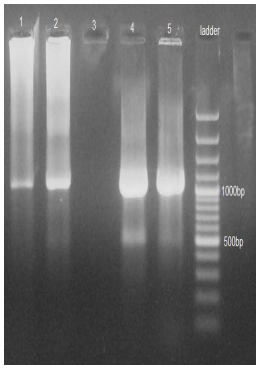
نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با محصول واکنش اتصال ظهور کلونی باکتری‌ها (کلونی‌های سفید و آبی) روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین و آغشته به X-Gal وIPTG نشان دهنده

ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری‌ها بود. بیش از ۹۵ درصد کلونی‌ها، کلونی‌های سفید بود که نشان داد قطعه ژنی حاصل از PCR توسط پلاسمید p TTZ57R/ دریافت گردیده و پلاسمیدهای نوترکیب pTMIC3 تشکیل شده‌اند. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید و کلونی-های آبی بعد از PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که هر دو پلاسمید سه باند تشکیل داده‌اند. باندها به‌ترتیب از بالا به پایین عبارتند: حلقوی باز (OpenCircular)، خطی (Linear) و سوپرکویل (Supercoil). باندهای پلاسمید pTMIC3 در مقایسه با پلاسمید کلونی‌های آبی بر روی ژل آگارز بالاتر قرار داشتند. می‌توان استنباط کرد که پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی سنگین‌تر هستند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قطعه MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید روی ژل آگارز ۱ درصد، ستون های ۱ و ۲: پلاسمید نوترکیب pTMIC3، ستون ۳: مارکر ۱۰۰جفت باز

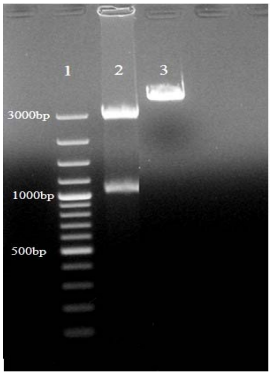
با تایید کلون نوترکیب، کلونی‌های مذکور کشت داده شد. سپس پلاسمیدها استخراج شدند (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول Coloni PCR روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون‌های ۱،۲،٤و٥: محصول PCR به دست آمده از کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (۱۰۵۲ جفت باز)، ستون ۳: محصول PCR به‌دست آمده از کلونی‌های آبی، ستون آخر: مارکر ۱۰۰ جفت باز

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTMIC3

نتایج برش آنزیمی pTMIC3 با آنزیم‌های HindIII و EcoRV دو باند نشان داد که یکی حدود ۲۸۸٦ جفت باز بود و باند دیگر حدود ۱۰۵۲bp که هم اندازه قطعه MIC3 است و کلونینگ تایید شد (شکل شماره ٤).



شکل شماره ٤- برش آنزیمی پلاسمید، ستون: ۱ مارکر ۱۰۰جفت باز، ستون ۲: Double Digest، ستون ۳: Mono Digest

```
1     acaagcttat ggcgctcacc ttcatggggg ccgtgtggat gtgcacccca gcggaggctt tgccgattca aaagtctgtg cagctgggca gctttgacaa
101   agttgtgccg agccgcgaag tcgtctctga gagtcttgct ccgtctttcg cggtgactga gactcactcg tctgtgcaat cccccagcaa ggaggagacg
201   cagctctgtg ctatctcgag tgaaggcaag ccatgtcgaa accgtcagtt gcacactgac aacgggtact tcatcggggc cagttgcccc aagagcgctc
301   gctgcagcaa gaccatgtgc ggccccggcg gctgcggaga attctgctcc agcaactgga ttttttgcag cagttcgctc atctaccatc ctgacaaaag
401   ctatggagga gaccgcagct gtgaaaagca gggccatcgg tgcgacaaaa acgcagaatg cgtcgaaaac ttggacgcg gtgggggtgt
gcactgcaag
501 tgcaaagacg gcttcgtcgg cactgggttg acttgctccg aggatccttg ttcaaaaaga gggaacgcga agtgcggacc caacgggacg tgcatcgtcg
601 tcgattcagt cagctacaca tgcacctgcg gcgacggcga gactctagtg accctcccgg aagggggaca aggatgcaag aggactggat gtcatgcctt
701 cagggagaac tgcagccct gtagatgtat tgatgacgcc tcgcatgaga atggctacac ctgcgagtgc cccacagggt actcacgtga ggtgacttcc
801   aaggcggagg agtcgtgtgt ggaaggagtc gaagtcacgc tggctgagaa atgcgagaag gagttcggca tcagcgcgtc atcctgcaaa
tgcgataacg
901 gatactccgg atctgcttcc gcaacctccc accatgggaa aggagaatcg ggatccgagg ggagcttgag tgaaaaaatg aatattgtct tcaagtgccc
1001 cagtggctac catccaagat accatgccca caccgtgacg tgagatatct gt
```

شکل شماره ٥- نتایج تعیین توالی ژن پروتئین میکرونم ۳ (MIC3) توکسوپلاسما گوندی سویه RH

نتایج تعیین توالی

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T نشان داد که این ژن با ژن MIC3 توکسوپلاسما گوندی سویه RH دارای شماره AJ1325301 در بانک ژنی حدود ۹۸ درصد تشابه دارد (شکل شماره ۵).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد پلاسمید pTZ57R/T برای کلون کردن ژن MIC3 مناسب است. در این تحقیق، آنالیز توالی ژن MIC3 توکسوپلاسما گوندی در پلاسمید pTZ57R/T نشان داد قطعه ۱۰۵۲ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده و هیچ اینترونی در ژن مذکور دیده نشد. این ژن با سویه RH توکسوپلاسما گوندی با شماره AJ132530.1 در بانک ژنی دارای ۹۸ درصد تشابه بود، همچنین با دو سویه دیگر توکسوپلاسما گوندی با شماره‌های EU572718.1 و AF509564.1 نیز حدود ۹۸ درصد شباهت داشت که این شباهت‌ها حاکی از حفظ توالی ژن در سویه‌های گوناگون توکسوپلاسما گوندی است. در این تحقیق، از پروتئین کد کننده ژن MIC3 استفاده گردید. این ژن به‌دلیل داشتن گیرنده‌هایی که هم به سلول میزبان و هم به انگل می‌چسبد، در شناسایی اولیه سلول‌های میزبان در آغاز تهاجم انگل نقش مهمی دارد [۱۰]، از این‌رو جهت طراحی ساخت واکسن، امید محققین به این ژن می باشد، زیرا معتقدند که جهت مصون بودن از آثار زیان‌بار انگل توکسوپلاسما گوندی، بایستی در مرحله اولیه تهاجم انگل، میزبان را به‌وسیله ایمنی زایی با پروتئین‌هایی نظیر پروتئین میکرونمی و القای پاسخ‌های ایمنی تجهیز کرد. از این جهت، مطالعه ما نیز مانند سایر مطالعات محققین که در جهان انجام می‌گیرد، روی ژن MIC3 متمرکز بود. در بخش کلونینگ مطالعه ما که اولین قدم مطالعه محققان در سراسر جهان می‌باشد، نتایج به‌دست آمده حاکی از شباهت‌هایی است که سایر محققان انجام دادند. تفاوت از نظر نوع پلاسمید و سویه باکتری E.coli می‌باشد که در مطالعه‌های مختلف، متفاوت است. در مطالعه ما از پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T استفاده شد که در سال ۱۹۹۲ میلادی Kaluz و همکاران جهت کلونینگ معرفی کردند [۱۳]. از این پلاسمید در کلونینگ ژن‌های متعددی استفاده شده، ولی برای اولین بار است که جهت ژن MIC3 استفاده می‌شود. نتایج آزمایش کلونینگ برای این ژن نشان می‌دهد که این پلاسمید نیز جهت کلون کردن ژن MIC3 مناسب می‌باشد. در مورد ترانسفورم سویه باکتری نیز از سویه TOP10 باکتری E.coli استفاده گردید و پیشنهاد می‌شود که TOP10 سویه مناسبی جهت ترانسفورم است. Ismael و همکاران در سال ۲۰۰۳ در تحقیقات‌شان از پلاسمید *p*GM-CSF و ژن MIC3 استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که در مرحله حاد عفونت توکسوپلاسموزیس این پلاسمید نوترکیب به‌خوبی عمل می‌کند ولی در مرحله مزمن باید ژن MIC3 با سایر ژن‌های توکسوپلاسما گوندی فیوژن گردد [۹]. Jiang و همکاران توانستند، پروتئین شماره ۳ میکرونم (MIC3) را در پلاسمید pMD18-T کلون کنند، آنها سپس این ژن را در یک وکتور بیانیpcDNA3 ساب‌کلون کردند. و در نهایت توانستند با استفاده از هضم آنزیمی و PCR پلاسمید نوترکیب تولید شده را وارد سلول‌های IBRS -2 ترانسفکت نمایند [۱٤]. Jiang و همکاران با استفاده از پلاسمید نوترکیب rMIC3 تست لاتکس آگلوتیناسیون سریع را ابداع کردند. این تست در سرودیاگنوزیس عفونت توکسوپلاسمایی در خوک‌ها کاربرد دارد [۱۵]. Fang و همکاران پاسخ ایمنی ناشی از پلاسمید نوترکیب با استفاده از ژن MIC3 را در موش‌های Balb/c بررسی نمودند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ایمنی ایجاد شده در اثر تلقیح پلاسمید نوترکیب *p* SCA/MIC3 محافظت کننده است، از این‌رو پیشنهاد دادند که ژن MIC3 جهت ساخت *DNA* واکسن، کاندید موثر و امیدبخش می‌باشد [۱٦]. Artama و همکاران پروتئین شماره ۳ میکرونم (MIC3) را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها ژن کد کننده MIC3 تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی را با روش PCR و پرایمرهای اختصاصی تکثیر کردند. سپس، قطعه DNA تکثیر شده را در پلاسمید pGEM-T کلون نموده و داخل E.coli سویه XL-1Blue ترانسفورم کردند. نتایج نشان داد که ترانسفورم در باکتری مذکور با پلاسمید pGEM-T تولید یک کلون کرد که حاوی ژن کد کننده پروتئین MIC3 بود، ولی نتیجه هضم آنزیمیDouble Enzymes تولید قطعات کوچک ٤۰۰-۳۰۰ جفت باز کرد که ناشی از وجود سایت‌های برش زیاد بر روی آنزیم محدود کننده است [۱۷]. نتایج کلونینگ مطالعه ما با مطالعات محققان مذکوردر بخش‌های اولیه کلونینگ مشابهت زیادی دارد اما بر خلاف مطالعه Artama در قسمت هضم آنزیمی (برش به‌وسیله دو آنزیم Double Enzymes) تولید قطعات کوچک باند دیده نشد که به‌نظر می‌رسد Artama در انتخاب نوع آنزیم، انتخاب ایده‌آلی نکرده است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد کلونینگ و

ترانسفورم ژن MIC3 در پلاسمیدpTZ57R/T با موفقیت انجام شده است. بنابراین پلاسمید pTZ57R/T و نیز باکتری اشریشیاکلی سویه TOP10 جهت کلونینگ و ترانسفورم ژن MIC3 مناسب می‌باشند.

تشکر و قدر دانی

مطالب این مقاله مربوط به بخشی از رساله دوره دکتری دانشگاه تربیت مدرس است و تمامی اعتبارات آن‌را دانشگاه مذکور تأمین کرده است. از تمامی اعضای محترم گروه انگل‌شناسی پزشکی، معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References:

[1] Montaya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. ***Lancet*** 2004; 363(9425):1965-76.

[2] Satio 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; 19(15-16): 2172-80.

[3] Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. ***Int J Parasitol*** 2004; 34(3): 285-95.

[4] Mahmudi M. Evaluation the effect of Toxoplasma isolated from human in Iran against RH strain in mice. Presented for the [Dissertation]. Tehran. Tehran Medical Sciences University, 1980. [in Persian]

[5] Daryani A, Zavaran Hosseini A, Dalimi A. Immune response against excreted/ secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. ***Vet Parasitol*** 2003; 113(2): 123-34. [in Persian]

[6] Bout DT, Mevelec MN, Velge–Roussel F, Dimier –Poisson I, Lebrun M. Prospect for a human *Toxoplasma* vaccine. ***Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*** 2002; 2(3): 227-34.

[7] Solhjoo K, Ghaffari far 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. [in Persian]

[8] Cerede O, Dubremetz JF, Soete M, Deslee D, Vial H, Bout D, et al. Synergistic role of micrinemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. ***J Exp Med*** 2005; 201(3): 453-63.

[9] Ismael AB, Sekkai D, Colli C, Bout D, Mevelec MN. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. ***Infect Immune*** 2003; 71(11): 6222-8.

[10] Garcia-Reguet N, Lebrun M, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Mann T, Beckers CJM, et al. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. ***Cell Microbiol*** 2000; 2(4): 353-64.

[11] Chai JY, Lin A, Shin EH, Oh MD, Han ET, Nan HW, et al. Laboratory passage and characterization of an isolate of Toxoplasma gondii from an ocular patient in Korea. ***Korean J parasitol*** 2003; 41(3): 137-54.

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

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

[14] Jiang T, Gong D, Ma LA, Nie H, Zhou Y, Yao B, et al. Evaluation of a recombinant MIC3 based Latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in swines. ***Vet Parasitol*** 2008; 158: 51-6.

[15] Jiang T, Zhang D, Nie H, Yao B, Zhao J. Construction and expression of the eukaryotic expressed plasmid of MIC3 gene from Toxoplasma gondii in IBRS-2 cells. ***Front Agric China*** 2008; 2(4): 498-501.

[16] Fang R, Nie H, Wang Zh, Tu P, Zhou D, Wang L, et al. Protective immune response in BALB/c mice induced by a suicidal DNA vaccine of the MIC3 gene of *Toxoplasma gondii*. ***Vet Parasitol*** 2009; 164: 134-40.

[17] Artama WT, Dewi NNA, Subekti DT. Cloning gene encoding Micronema3 (MIC3) Protein of Tachyzoite *Toxoplasma gondii* local Isolate. ***Indonesian Journal of Biotechnology*** 2005; 10(1): 789-800.