

## Cloning and sequencing the plasmid encoding *Toxoplasma gondii*

### Microneme 3 protein

Jafari-Modrek M<sup>1</sup>, Ghaffarifar F<sup>1\*</sup>, Sharifi Z<sup>2</sup>, Dalimi-Asl A<sup>1</sup>

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:** *Toxoplasma* 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 میکروم ۳ (MIC3) توکسوپلازما گوندی

محمد جعفری مدرک<sup>۱</sup>، فاطمه غفاری فر<sup>۲\*</sup>، زهره شریفی<sup>۳</sup>، عبدالحسین دلیمی اصل<sup>۴</sup>

## خلاصه

**سابقه و هدف:** توکسوپلازما گوندی، انگل تک‌یاخته درون سلولی اجباری و عامل توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوانات بوده که در سراسر جهان انتشار دارد. پروتئین میکروم 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 ایمنوژن بودن و کاندید ساخت واکسن، در تشخیص نیز کاربرد دارد. هدف از این تحقیق، آماده سازی ژن MIC3 در پلاسمید ناقل جهت ساب کلونینگ در پلاسمیدهای یوکاریوت و پروکاریوت است.

**مواد و روش‌ها:** DNA ژنومی توکسوپلازما، 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 به کمک آنزیم T4DNA Ligase، به‌داخل یک وکتور کلونینگ کلون شد. در نهایت پلاسمید نو ترکیب به‌داخل E.coli سوش TOP10 ترانسفورم گردید. با روش‌های PCR و برش آنزیمی و توالی یابی، کلون مورد نظر تأیید شد.

**نتایج:** محصول PCR به‌صورت یک باند ۱۰۵۲ جفت باز در ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید. پلاسمیدهای نو ترکیب تحت برش آنزیمی دو آنزیم محدود کننده HindIII و EcoRV قرار گرفت و دو باند ۱۰۵۲ و ۲۸۸۶ 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:** توکسوپلازما گوندی، MIC3، کلونینگ، توالی یابی

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۲۰۶-۲۰۰

## مقدمه

بآلودگی به توکسوپلازما 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 محافظت‌کنندگی توکسوپلازما 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 توکسوپلازما 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 توکسوپلازما در موش‌هایی دیده می‌شود که فاصله زمانی بین تزریق ۲ سویه در آنها بیشتر باشد [۴]. دریانی و همکاران در یک

توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) تک-یاخته‌ای با انتشار جهانی است که طیف وسیعی از مهره داران خون گرم را آلوده می‌کند. توکسوپلازما در افراد با اختلال ایمنی (immunocompromised) به‌خصوص در مبتلایان به نقص ایمنی اکتسابی (ایدز)، فرصت طلب بوده و بیماری و خیمی ایجاد می‌کند که عمدتاً 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 کوریوریتیت می‌گردد [۱].

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری انگل شناسی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس  
<sup>۲</sup>دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس  
<sup>۳</sup> استادیار، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران  
<sup>۴</sup> 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

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 صفافی حاوی  $5 \times 10^6$  تاکی‌زوئیت انگل سوش RH توکسوپلازما گوندی به‌طور داخل صفافی به ۵ سر موش Balb/c ماده تلقیح گردید. ۴-۳ روز بعد، موش‌ها کشته شده و مایع صفافی موش‌های آلوده، به‌وسیله سرنگ‌های ۵ سی‌سی یا ۱۰ سی‌سی جمع‌آوری شد [۱۱]. استخراج DNA به‌روش فنل - کلروفرم انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر (حدود  $5 \times 10^7$ ) 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  $55^\circ\text{C}$  قرار داده شد. با استفاده از اسپکتروفتومتر و روش جذب نوری، غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. می‌توان DNA استخراج شده را تا مرحله بعدی در  $-20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد 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 ↓ AGCTTATGGCGCTCACCTTCATGGGG-3'  
 ↓ محل اثر آنزیم HindIII  
 R: 5'-ACAGAT ↓ ATCTCACGTACGGTGTGGGCATGGT-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  $10 \times$ ، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلیمرز (Taq DNA polymerase)، ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده (۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکو مول در میکرولیتر))، و ۱۵/۷۵ میکرولیتر ddH<sub>2</sub>O. 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

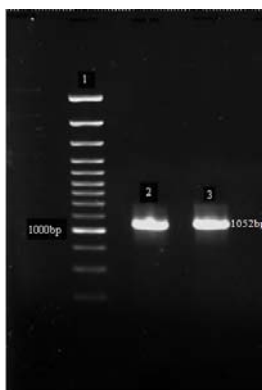
مطالعه، تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی را در محیط کشت غیر سلولی (RPMI 1640) کشت دادند، محیط رویی کشت جمع‌آوری شده و به ستون کروماتوگرافی تعویض یونی اضافه شد. در نهایت، دو فراکشن F1-ESA و F2-ESA به‌دست آمد. برای ایمن سازی موش‌ها، ۵۰ موش در ۵ گروه ۱۰ تایی بررسی شدند. گروه‌های یک تا چهار به ترتیب دوبار با آنتی ژن دفعی-ترشجی (ESA) تام، فراکشن ۱ (F1)، فراکشن ۲ (F2) و با آنتی‌ژن لیز شده توکسوپلازما ایمونیزه 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 موش‌هایی مشاهده شد که فراکشن F2 را دریافت کرده بودند [۵]. واکنش‌های زنده خطر عفونت تصادفی و موتانت‌های معکوس مضر غیرقابل پیش‌بینی برای انسان دارند. برای غلبه بر این مشکلات، تحقیقات اخیر بر روی واکنش‌های ساب‌یونیت، نوترکیب و واکنش‌های DNA انجام شده، که این نوع از واکنش‌ها آینده بسیار روشنی را برای پیشگیری از بیماری توکسوپلاسموزیس ارائه کرده است [۶]. صلح جو و همکاران واکنش DNA را با استفاده از ژن SAG1 برای ایمن‌سازی علیه توکسوپلازما گوندی انجام دادند که میزان بقای موش‌های ایمن شده بیش از موش‌های گروه شاهد بود [۷]. از جمله کاندیدهای مناسب برای تهیه واکنش، آنتی‌ژن‌های میکرونامایی هستند. میکرومها تعداد زیادی پروتئین‌های عبوری از عرض غشاء و محلول بنام MIC ترشح می‌کنند که در مراحل اولیه تهاجم نقش اساسی دارند. از پروتئین‌های اصلی میکروم آنتی‌ژن MIC3 (پروتئین شماره ۳ ترشح شده از اندامک میکروم توکسوپلازما گوندی می‌باشد) را می‌توان نام برد که با داشتن گیرنده‌های خارجی نقش مهمی را در شناسایی اولیه سلول‌های میزبان و آغاز تهاجم ایفا می‌کند [۸]. MIC3 با شناسایی سلول میزبان، شرایط را برای ورود، سر خوردن و تهاجم انگل فراهم می‌کند. MIC3 به‌عنوان یک آنتی‌ژن عمده توکسوپلازما گوندی شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندید موثر با پتانسیل قوی برای تهیه واکنش 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 کارایی 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

سانتی گراد انکوبه شد. سپس، به مدت چند ساعت در دمای ۴ 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 به علت 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 به وسیله شرکت ژن فناوری انجام گردید و به کمک سایت اینترنتی [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) از نظر تشابهات و تفاوت‌ها با سویه RH استاندارد توکسوپلازما گوندی در بانک ژنی مقایسه شد.

### نتایج

نتایج PCR به کمک DNA ژنومی

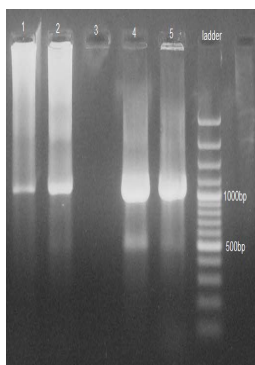
نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی فقط یک باند حدود ۱۰۵۲ جفت باز روی ژل آگارز نشان داد که هم‌اندازه ژن MIC3 توکسوپلازما گوندی است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده بود؛ بنابراین پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن MIC3 اختصاصی بودند (شکل شماره ۱).



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 ۱۰۵۲ 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 و IPTG نشان دهنده

دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Denaturation به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، Extention به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و Final Extention به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکثیر گردید. در نهایت جهت بررسی محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۱ درصد همراه با مارکر ۱۰۰bp الکتروفورز شد. در این مطالعه به منظور کلونینگ ژن MIC3 از کیت کلونینگ InsT/A clone™ PCR product clonin Kit شرکت Fermentas ساخت لیتوانی استفاده گردید. واکنش اتصال با استفاده از ۳ میکرولیتر از بافر Ligation 10X، ۱-۵ واحد از T4 DNALigase، ۳ میکرولیتر از Vector (PTZ57R/T)، ۱۵ میکرولیتر از Insert (DNA) و حدود ۳۰ میکرولیتر ddH2O انجام شد. مواد فوق در یک لوله میکروفیوژ ۰/۵ میکرولیتری ریخته شده و به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ترانسفورم پلاسمید به داخل باکتری به کمک روش شوک حرارتی انجام شد که به طور خلاصه بیان می‌شود: باکتری در مرحله اول به کمک روش کلرید کلسیم مستعد شده و سپس کل محصول حاصل از واکنش اتصال به آن اضافه گردید. مخلوط فوق به آرامی و بدون استفاده از Vortex ترکیب شده و به مدت ۲۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. پس از آن، به مدت ۹۰ ثانیه در بن ماری ۴۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی داده شد، سپس مخلوط به مدت ۲ دقیقه در یخ قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB (Luria Bertani) مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط اضافه شده و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی این مدت می‌توان باکتری‌ها را در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین کشت داد. برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعه مورد نظر، این باکتری‌ها در محیط کشت حاوی آمپی سیلین، سوبسترای X-Gal همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی (-D1-β-Isopropyl) همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی IPTG (thiogalactopyranoside) 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 به صورت وارونه و به مدت یک شب (۱۸-۱۶ ساعت) در ۳۷ درجه

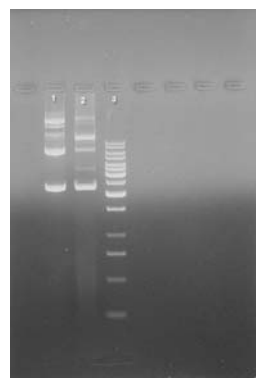


شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول Coloni PCR روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵؛ محصول PCR به دست آمده از کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (۱۰۵۲ جفت باز)، ستون ۳: محصول PCR به دست آمده از کلونی‌های آبی، ستون آخر: مارکر ۱۰۰ جفت باز

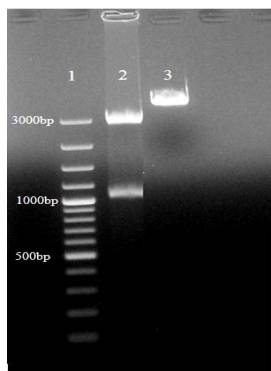
ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری‌ها بود. بیش از ۹۵ درصد کلونی‌ها، کلونی‌های سفید بود که نشان داد قطعه ژنی حاصل از PCR توسط پلاسمید pTTZ57R دریافت گردیده و پلاسمیدهای نوترکیب pTMIC3 تشکیل شده‌اند. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید و کلونی‌های آبی بعد از PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که هر دو پلاسمید سه باند تشکیل داده‌اند. باندها به ترتیب 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).

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTMIC3

نتایج برش آنزیمی pTMIC3 با آنزیم‌های HindIII و EcoRV دو باند نشان داد که یکی حدود ۲۸۸۶ جفت باز بود و باند دیگر حدود ۱۰۵۲bp که هم اندازه قطعه MIC3 است و کلونینگ تایید شد (شکل شماره ۴).



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



شکل شماره ۴- برش آنزیمی پلاسمید، ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت باز، ستون ۲: Double Digest، ستون ۳: Mono Digest

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

```

1  acaagcttat ggcgctcacc ttatggggg ccgtgtggat gtgcaccca gcgaggctt tgccgattca aaagtctgtg cagctgggca gctttgacaa
101 agttgtgccg agccgcgaag tcgtctctga gactcttctc cgtctttcg cgtgactga gactcactcg tctgtgcaat cccccagca gaggagacg
201 cagctctgtg ctatctcgag tgaaggcaag ccatgtcgaa accgtcagt gcacactgac aacgggtact tcatcgggcg cagttgcccc aagagcgctc
301 gctgcagcaa gaccatgtgc ggccccggcg gctgcgaga attctgctc agcaactgga tttttgcag cagttcgctc atctaccatc ctgacaaaag
401 ctatggagga gaccgcagct gtgaaaagca gggccatcgg tgcgacaaa acgcagaatg cgtcgaaaac ttggacgcg gtgggggtgt
gactgcaag
501 tgcaagacg gcttcgtcgg cactgggtg actgtctcgg aggatcctg tcaaaaaga gggaacgca agtgcggacc caacgggacg tgcacgtcgc
601 tcgattcagt cagctacaca tgcacctcgc gcgacggcga gactctagt accctcccgg aagggggaca aggatgcaag aggactggat gtcacgctt
701 cagggagaac tgcagccct gtagatgat tgatgacgcc tcgcatgaga atggtctcac ctgagagtc cccacaggt actcactgga ggtgactcc
801 aagggggagg agtctgtgtt ggaaggagtc gaagtacgc tggctgagaa atgagagaag gagttcgca tcagcgcgctc atctgcaaa
tgcgataacg
901 gatactcgg atctgcttc gcaacctccc accatgggaa aggagaatcg ggatccgagg ggagcttgag tgaaaaaatg aatattgtct tcaagtgcc
1001 cagtggctac catccaagat accatgcca caccgtgacg tgagatatct gt
    
```

شکل شماره ۵- نتایج تعیین توالی ژن پروتئین میکرونم ۳ (MIC3) توکسوپلازما گوندی سویه RH

پیشنهاد می‌شود که TOP10 سویه مناسبی جهت ترانسفورم است. Ismael و همکاران در سال ۲۰۰۳ در تحقیقاتشان از پلاسمید pGM-CSF و ژن MIC3 استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که در مرحله حاد عفونت توکسوپلازموزیس این پلاسمید نوترکیب به‌خوبی عمل می‌کند ولی در مرحله مزمن باید ژن MIC3 با سایر ژن‌های توکسوپلازما گوندی فیوژن گردد [۹]. Jiang و همکاران توانستند، پروتئین شماره ۳ میکروم (MIC3) را در پلاسمید pMD18-T کلون کنند. آنها سپس این ژن را در یک وکتور بیانی pcDNA3 ساب‌کلون کردند. و در نهایت توانستند با استفاده از هضم آنزیمی و PCR پلاسمید نوترکیب تولید شده را وارد سلول‌های 2-IBRS ترانسفکت نمایند [۱۴]. Jiang و همکاران با استفاده از پلاسمید نوترکیب rMIC3 تست لاتکس آگلوتیناسیون سریع را ابداع کردند. این تست در سرودیآگنوزیس عفونت توکسوپلازمایی 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 [۱۶]. Artama و همکاران پروتئین شماره ۳ میکروم (MIC3) را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها ژن کد کننده MIC3 تاکی‌ژن‌های توکسوپلازما 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 آنزیمی Double Enzymes تولید قطعات کوچک ۴۰۰-۳۰۰ جفت باز کرد که ناشی از وجود سایت‌های برش زیاد بر روی آنزیم محدود کننده است [۱۷]. نتایج کلونینگ مطالعه ما با مطالعات محققان مذکور در 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.

#### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد کلونینگ و

#### نتایج تعیین توالی

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T نشان داد که این ژن با ژن MIC3 توکسوپلازما 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 توکسوپلازما گوندی در پلاسمید pTZ57R/T نشان داد قطعه ۱۰۵۲ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده و هیچ ایترونی در ژن مذکور دیده نشد. این ژن با سویه RH توکسوپلازما گوندی با شماره AJ132530.1 در بانک ژنی دارای ۹۸ درصد تشابه بود، همچنین با دو سویه دیگر توکسوپلازما 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 توکسوپلازما گوندی است. در این تحقیق، از پروتئین کد کننده ژن MIC3 استفاده گردید. این ژن به دلیل 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 می‌باشد، زیرا معتقدند که جهت مصون بودن از آثار زیان‌بار انگل توکسوپلازما گوندی، بایستی در مرحله اولیه تهاجم انگل، میزبان را به‌وسیله ایمنی زایی با پروتئین‌هایی نظیر پروتئین میکرومی 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 به دست 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

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 به-عمل می‌آید.

ترانسفورم ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/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

### 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. 3<sup>rd</sup> 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.