Original Article

Characterization and expression of GRA7 gene of *Toxoplasma gondii* RH strain in eukaryotic pcDNA3 plasmid

Vazini H[1], Ghaffarifar F[1*], Sharifi Z[2], Dalimi-Asl A[1]

1- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.
2- Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

Received January 18, 2012; Accepted June 13, 2012

Abstract:

Background: Toxoplasmosis, as a widespread and important disease, can cause severe complications in the congenital and HIV cases. Vaccination is one of the preventive approaches in humans and domestic animals. The GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by the infected host cells, has been considered as a candidate to produce a vaccine.

Materials and Methods: In this experimental study, the inserted plasmid containing GRA7 gene was extracted from TOP10 bacteria and digested with the BamH1 and EcoR1 enzymes. The isolated gene was inserted into the pcDNA3 plasmid. The cloning was confirmed by the PCR and sequencing. The protein expression was confirmed by the SDS-PAGE and Western blotting.

Results: The results showed that the GRA7 gene was cloned into the pcDNA3 plasmid. The isolated gene cloned in pcDNA3 was confirmed by PCR and showed the 733bp band. The pcGRA7 plasmid expressed in the CHO cells showed the 29 kDa band using the SDS-PAGE and Western blotting.

Conclusion: Considering that cloning of GRA7 gene has been done in the pcDNA3 plasmid and transformed in the eukaryotic cells, it can be used for the DNA vaccine researches.

Keywords: *Toxoplasma gondii* RH strain, Cloning, pc-GRA7, Eukaryotic pcDNA3 plasmid

* **Corresponding Author.**
Email: ghafarif@modares.ac.ir
Tel: 0098 21 828 84553
Fax: 0098 21 828 84555

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences March, 2013; Vol. 17, No 1, Pages 8-13

Please cite this article as: Vazini H, Ghaffarifar F, Sharifi Z, Dalimi-Asl A. Characterization and expression of GRA7 gene of *Toxoplasma gondii* RH strain in eukaryotic pcDNA3 plasmid. ***Feyz*** 2013; 17(1): 8-13.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-28]

شناسایی و بیان ژن GRA7 توکسوپلاسما گوندهای سویه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3

حسین وزینی [۱]، فاطمه غفاری‌فر [۲*]، زهره شریفی [۳]، عبدالحسین دلیمی‌اصل [٤]

خلاصه:

سابقه و هدف: توکسوپلاسموزیس از بیماری‌های شایع جهان است و بیشتر به‌علت عوارض وخیمی که در موارد مادرزادی و بیماران مبتلا به ایدز ایجاد می‌کند، اهمیت دارد. یکی از راه‌های پیشگیری از این انگل در انسان و دام استفاده از واکسن می‌باشد. آنتی‌ژن گرانولی ۷ (GRA7) یک آنتی‌ژن فشرده ترشحی ۲۹ کیلودالتونی توکسوپلاسما گونه‌ای می‌باشد که در واکوئل پارازیتوفروس تولید شده، توسط سلول‌های آلوده میزبان آزاد می‌شود و به‌عنوان کاندیدای تهیه واکسن مطرح می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی پلاسمید حاوی ژن GRA7 از باکتری TOPO استخراج شد. سپس این پلاسمید با آنزیم‌های BamH1 و EcoR1 برش داده شد. ژن جدا شده وارد پلاسمید pcDNA3 گردید. این کلونینگ با روش‌های PCR و تعیین توالی تایید شد. بیان پروتئین نیز با روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات تایید شد.

نتایج: نتایج نشان داد که ژن GRA7 در پلاسمید pcDNA3 کلون شده است و نتایج PCR پلاسمید pcDNA3 حاوی ژن GRA7 قطعه bp ۷۳۳ را نشان داد. بیان pcGRA7 در سلول‌های CHO با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات باند ۲۹ کیلودالتونی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان داد که کلونینگ ژن GRA7 در پلاسمید pcDNA3 انجام شده و پلاسمید نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتیک بیان گردیده است لذا، قابلیت آن را دارد که برای تحقیقات تهیه واکسن DNA استفاده شود.

واژگان کلیدی: سویه RH توکسوپلاسما گونه‌ای، کلونینگ، ژن GRA7، پلاسمید یوکاریوتی pcDNA3

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۲، صفحات ۱۳-۸

مقدمه

توکسوپلاسموزیس به‌وسیله انگل تک یاخته داخل سلولی به نام توکسوپلاسما گونه‌ای ایجاد می‌شود که در سراسر جهان انتشار دارد. از لحاظ پزشکی و دامپزشکی این بیماری دارای اهمیت بوده و عامل بیماری مادرزادی در انسان و حیوانات اهلی است [۱]. علاوه بر این، به‌تازگی به‌دلیل بروز آنسفالیت در افراد ایدزی به اهمیت آن افزوده شده است [۱]. این انگل علاوه بر انسان، تعداد زیادی از حیوانات پستاندار و هم‌چنین گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده می‌سازد.

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

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

[۳] دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات موسسه عالی آموزشی پژوهشی طب انتقال خون

[۴] استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

***نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، تقاطع بزرگراه آل احمد و چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی

تلفن: ۸۲۸۸۴۵۵۳ ۰۲۱ **دورنویس:** ۸۲۸۸۴۵۵۵ ۰۲۱

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۱/۳/۲۴

در اکثر افراد سالم، این بیماری فاقد علائم بالینی است، اما در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند مانند افراد مبتلا به ایدز [۱]، گیرنده‌های پیوند عضو و بیماران سرطانی حائز اهمیت می‌باشد و مسبب عوارض شدید و گاه کشنده می‌شود. در خانم‌های باردار این انگل می‌تواند باعث عوارض شدید عصبی یا چشمی در جنین شده و حتی می‌تواند سقط جنین را سبب شود [۲]. از آنجایی که این انگل دارای میزبانان متعددی است و باعث سقط جنین در دام‌های اهلی نیز می‌گردد، بنابراین در صنعت دامپروری نیز حائز اهمیت بوده و باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی می‌شود. به‌دلایل اهمیت پزشکی و دامپزشکی این بیماری تهیه واکسن مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است [۲]. مطالعات و تجربیات مختلف نشان داده است که احتمال تهیه واکسنی مناسب علیه توکسوپلاسموزیس انسانی وجود دارد [۳]. در سال‌های گذشته، پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در جهت ایجاد و گسترش واکسنی مؤثر برای بیماری توکسوپلاسموزیس به‌وجود آمده است و واکسنی با استرین زنده ضعیف شده S48 برای مصارف دامپزشکی تهیه شده است. در عین حال این واکسن ممکن است به‌حالت بیماری‌زا برگردد؛ از این‌رو برای مصرف انسانی مناسب نیست [٤]. آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌های توکسوپلاسما

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-28]

گونه‌ای می‌باشند که هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص کاربرد دارند. 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 [۵]. 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 Innumosorbent 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 [۷،٦]. هدف از این مطالعه کلون کردن قطعه ژن GRA7 در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 و ترانسفورم این پلاسمید نوترکیب، در باکتری E.coli سوش TOP10 و بیان آن در سلول‌های یوکاریوت به‌منظور تهیه واکسن DNA می‌باشد. این تحقیق در سال ۱۳۹۰ و در دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه در این تحقیق از نوع تجربی می‌باشد.

در این مطالعه از باکتری TOP10 حاوی پلاسمید نوترکیب pT-GRA 7 که قبلا در گروه انگل شناسی تهیه شده بود، استفاده شد [۸]. به‌منظور تعین توالی پلاسمیدهای نوترکیب از کلونی‌های سفید استخراج گردیدند (اگر X-gal همراه با یک القاء کننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و آمپی‌سیلین به آگار اضافه شود، کلونی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب که در آنها بتا گالاکتوزیداز سنتز می‌شود به رنگ آبی در می‌آیند، در حالی که کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب چون قادر به ساخت بتاگالاکتوزیداز نمی‌باشند، به رنگ سفید خواهند بود) و به شرکت ژن فن آوران فرستاده شد. سپس نتایج تعیین توالی بلاست شد. از نظر تشابهات و اختلاف با ژن GRA7 سویه RH استاندارد توکسوپلاسما گونده‌ای در بانک ژنی مقایسه شد. جهت ساب کلونینگ با استفاده از برش آنزیمی قطعه *GRA7* از پلاسمید pT-GRA7 جدا شد. برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTGRA7 و پلاسمید pcDNA3 با استفاده از آنزیم‌های BamH1 و EcoR1 انجام شد. سپس نتایج برش آنزیمی روی ژن آگاروز ۰/۸ درصد مشاهده گردید. کلونینگ ژن *GRA7* در پلاسمید pcDNA3 بر اساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas انجام گردید. انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده داخل ناقل TOP10 بر اساس دستورالعمل گفته شده در قسمت بالا انجام گردید [۹]. برای غربال کردن کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pcGRA7 مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های ترانسفورم شده را روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ریخته و با کمک میله شیشه‌ای روی محیط پخش گردید؛ به‌نحوی‌که تمام مایع روی سطح محیط را فرا گرفت. سپس پلیت‌ها یک شب درون انکوباتور ۳۷° C قرار داده شدند. باکتری‌هایی قادر به رشد روی محیط حاوی آمپی‌سیلین هستند که پلاسمید نوترکیب را دریافت کرده باشند [۹]. یکی از راه‌های تأیید کردن کلون‌شدن قطعه GRA7 در پلاسمید بیانی pcDNA3، استخراج پلاسمیدهای pcDNA3 و pcGRA7 از باکتری‌های ترانسفورم شده می‌باشد. پلاسمیدهای استخراج شده روی ژن آگاروز ۰/۸ درصد الکتروفورز شدند. پلاسمیدهای pcGRA7 چون حاوی قطعه مورد نظر هستند، سنگین‌تر می‌باشند (شکل شماره ۱). هم‌چنین، ژن GRA7 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pcGRA7 به‌عنوان الگو با استفاده از پرایمرهای اختصاصی روی پلاسمید نوترکیب PCR گردید. پرایمرهای به‌کار رفته (تهیه شده توسط شرکت سیناژن) در این PCR عبارتند از:

F: GCG GGATCC TTT GCC CCA GTT CGC TAC CG
(29nt, underlined sequence contains BamHI restrictin site)
R: CGC GAATTC CCT GGC GGG CAT CCT CCC CAT C
(31nt, underlined sequencecontains EcoR1 restrictin site).

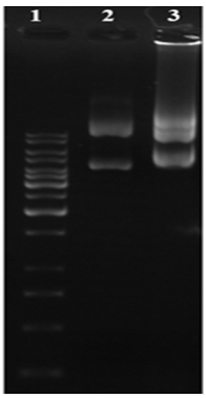
روش کار PCR طبق برنامه انجام شده با دستگاه ترموسایکلر اپندورف و برنامه در تحقیقات قبلی می‌باشد [۸]. به‌طور خلاصه این برنامه بدین ترتیب می‌باشد، زمان دناتوره اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه (Denaturation در ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، Annealing ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، Extension در ۹۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) ۵ سیکل (Denaturation در ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، Annealing ٥٤ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، Extension در ۹۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و Final Extension ۵ دقیقه ۷۲ °C می‌باشد. برای بیان ژن GRA7 در محیط کشت سلولی در این تحقیق از سلول

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-28]

(Chine 's Hamester Ovary) CHO جهت بیان ژن در سلول یوکاریوتیک به‌کار گرفته شد و به‌عنوان میزبان پلاسمید کد کننده ژن GRA7 استفاده گردید. در این مطالعه تجربی از دو نوع پلاسمید استفاده شد؛ در یک گروه از پلاسمید pcGRA7 به‌عنوان گروه مورد و از پلاسمید pcDNA3 به‌عنوان گروه شاهد برای ترانسفکت کردن در سلول‌های CHO استفاده شد. پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 که حامل ژن GRA7 می‌باشد، چنانچه در محیط کشت سلولی قرار گیرد می‌تواند از امکانات رونوشت برداری و ترجمه سلول یوکاریوتیک استفاده نماید و پروتئین GRA7 بیان شود. برای این منظور از کیت ترانسفکت genejuice شرکت Novagen استفاده گردید و مطابق با روش کار شرکت سازنده انجام شد. برای بررسی بیان پروتئین GRA7 در محیط کشت سلول از روش یافتن پروتئین در محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده است که این امر از طریق استخراج پروتئین و روش‌های SDS-PAGE و Western blot انجام شد [۱۱،۱۰].

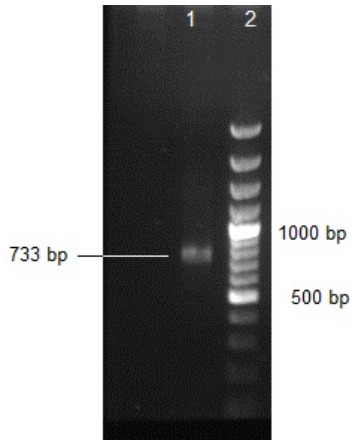
نتایج

برای تایید کلون مورد نظر، باند پلاسمیدهای pcDNA3 و پلاسمید نوترکیب pcGRA7 استخراج شده روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد الکتروفورز شدند (شکل شماره ۱).



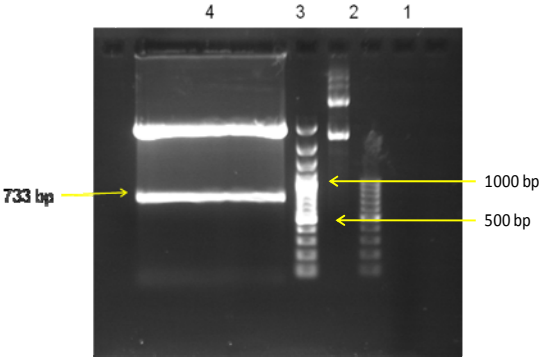
شکل شماره ۱- مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده pcDNA3 و pcGRA7 ، ستون ۱: DNA مارکر ۱۰۰ جفت باز ، ستون ۲: پلاسمید pcDNA3 ، ستون ۳: پلاسمید pcGRA7

نتایج PCR به کمک DNA ژنومی بدین ترتیب است که محصول PCR به‌صورت یک باند ۷۳۳ جفت بازی می‌باشد که با قطعه GRA7 مورد نظر مطابقت دارد (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون شماره ۱ قطعه GRA7 اندازه ۷۳۳ جفت باز، ستون ۲ DNA مارکر ۱۰۰ جفت باز

برش آنزیمی پلاسمید pTGRA7 با آنزیم‌های EcoRI و BamHI باعث جدا شدن قطعه مورد نظر به اندازه ۷۳۳ جفت بازی می‌باشد که هم‌اندازه ژن GRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای و باند دیگر تقریبا هم‌اندازه pTZ57R بود. بنابراین نتایج برش آنزیمی روی ژل آگاروز، کلون ژن GRA7 درون پلاسمید pTZ57R را نشان داد (شکل شماره ۳).

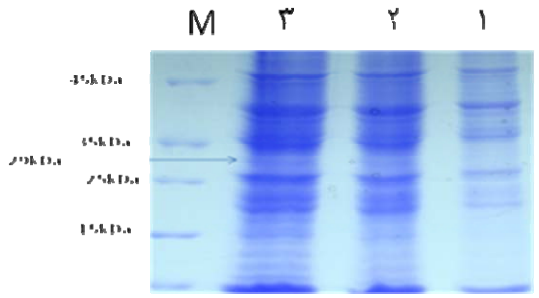


شکل شماره ۳- نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب PTZ-*GRA7* روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد، ستون ۱ و ۳ مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۲ پلاسمید pcGRA7 آنزیم نخورده، ستون ٤ پلاسمید PT-GRA7 آنزیم خورده و قطعه ۷۳۳ جفت بازی از قطعه ۲۸۸٦ bp جدا شده است.

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن GRA7 در پلاسمید pTZ57R نشان داد که این ژن با ژنGRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای دارای شماره Y-13863 در بانک ژنی حدود ۹۹ درصد تشابه دارد. در این مطالعه نتایج SDS-PAGE نشان داد که پروتئین‌های بارگذاری شده براساس وزن مولکولی جدا شده‌اند و باندهایی با وزن‌های مولکولی در محدوده ۲۹ کیلودالتون دیده می‌شود؛ به-

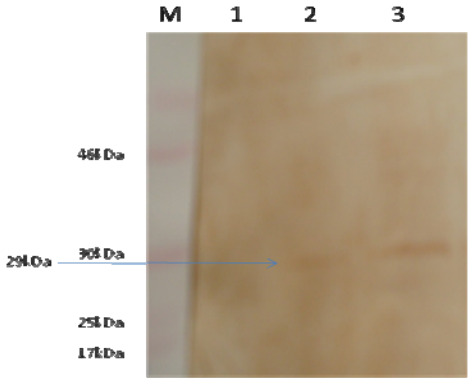
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-28]

طوری‌که در ستون مربوط به چاهک‌های سلولی که با پلاسمید ترانسکفت شده بودند، در این ناحیه باند اضافی وجود دارد که در ستون‌های کنترل وجود ندارد.



شکل شماره ٤- باندهای به‌دست آمده از SDS-PAGE (ژل ۱۲/۵ درصد) برای پروتئین های استخراج شده از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcGRA7 وسلول‌های کنترل. ستون ۱: سلول CHO ترانسفکت شده با pcDNA3، ستون ۲: سلول CHO ترانسفکت شده با pcGRA7 پس از ٤٨ ساعت، ستون ۳: سلول CHO ترانسفکت شده با pcGRA7 پس از ۷۲ ساعت و M پروتئین مارکر.

در شکل شماره ۵ نتایج وسترن بلات نشان داد بین پروتئین‌های استخراج شده از چاهک‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcGRA7 (ستون ۲ و ۳) باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۲۹ کیلودالتون وجود دارد که درچاهک کنترل (ستون ۱) وجود ندارد. تشکیل این باند در روی کاغذ نیتروسلولز نشان دهنده شناسایی پروتئین GRA7 به‌وسیله سرم انسانی ضد توکسو-پلاسمایی می‌باشد.



شکل شماره ۵- کاغذ نیتروسلولزی که پروتئین‌های تفکیک شده در مرحله SDS-PAGE به آن منتقل شده نشان داده شده است. M پروتئین مارکر، ستون ۱: سلول CHO ترانسفکت شده با pcDNA3، ستون ۲: سلول CHO ترانسفکت شده با pcGRA7 پس از ٤٨ ساعت، ستون ۳: سلول CHO ترانسفکت شده با pcGRA7 پس از ۷۲ ساعت.

بحث

در این تحقیق توالی ژن GRA7 توکسوپلاسما گونده‌ای در پلاسمید pTZ57R با BLAST کردن در پایگاه اینترنتی NCBI مورد آنالیز قرار گرفت و نشان داد که قطعه ۷۳۳ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است. این ژن با سویه RH توکسوپلاسما گونده‌ای دارای شماره DQ459443.2 در بانک ژنی ۹۹ درصد متشابه است که این شباهت نشان‌دهنده حفظ توالی ژن در سویه‌های مختلف انگل است. در برش آنزیمی پلاسمید pcGRA7 قطعه ۷۳۳ جفت بازی جدا گردید که نشان‌دهنده کلون شدن این ژن در این پلاسمید بیانی می‌باشد. نتایج PCR روی pT*GRA7* و pc*GRA7* نشان داد که ژن *GRA7* در این پلاسمیدها وجود دارد. از این پلاسمید می‌توان جهت تهیه واکسن-های نوترکیب علیه بیماری‌های انگلی استفاده نمود. آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسو پلاسما گونده‌ای از مهمترین آنتی‌ژن‌های به-کار رفته هم در زمینه واکسن و هم در زمینه تشخیص می‌باشند. از میان آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی آنتی‌ژن‌های گرانولی فشرده از اهمیت ویژه‌ایی برخوردارند. در این میان آنتی‌ژن گرانولی شماره ۷ یا GRA7 از جمله آنتی‌ژن‌های مهمی محسوب می‌شوند که مخصوصا در زمینه تشخیص به‌کار برده می‌شوند. ژن GRA7 پروتئین ۲۹ کیلودالتونی را کد می‌کند که این پروتئین توسط سلول‌های میزبان این انگل ترشح می‌شود [۱۲]. پروتئین ۲۹ کیلودالتونی GRA7 هنگامی‌که همراه با پروتئین‌های ۳۰ و ۳۵ کیلو دالتونی استفاده شود، برای تشخیص موارد IgG مثبت به‌کار می‌رود و زمانی که با پروتئین‌های ۳۵ و ٦٦ به‌کار برده می‌شود برای تشخیص موارد IgM مثبت به‌کار می‌رود [۱۲]. به‌کارگیری ژن GRA7 برای تهیه آنتی ژن نوترکیب جهت تشخیص از کاندیداهای اصلی برای تشخیص توکسوپلاسموز می‌باشد. استفاده از این آنتی‌ژن برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس به-خصوص در موارد خطرناک کشنده در بیماران مبتلا به ایدز و توکسوپلاسموزیس مادرزادی بسیار اهمیت دارد [۱۳]. هم‌چنین، به‌کارگیری این ژن برای تهیه واکسن نیز از موارد مهم برای تحریک سیستم ایمنی میزبان برای مقابله با بیماری توکسوپلا-سموزیس می‌باشد. Jacobs و همکاران در سال ۱۹۹۹ به ارزیابی آنتی‌ژن نوترکیب GRA7 جهت شناسی IgG پرداختند. آنها این ژن را وارد و وکتور بیانی PmTNFMPH کردند. آنتی‌ژن پروتئینی بیان شده دارای ۲۷۲ اسیدآمینه و وزن ملکولی ۲۹/۸٤٦ کیلودالتون بود. کاربرد این پروتئین نوترکیب برای تشخیص توکسوپلاسموزیس با روش الایزای غیر مستقیم دارای ۸۱ درصد حساسیت و ۹۸ درصد اختصاصیت بود، یعنی این آنتی‌ژن قادر به تحریک سیستم ایمنی می‌باشد و برای تشخیص مناسب می‌باشد [١٤]. برخی مطالعات مشابه نیز از این ژن به‌عنوان DNA واکسن

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-28]

استفاده کرده‌اند که هم به‌صورت مجزا و هم کوکتل در برابر بیماری توکسوپلاسموزیس محافظت نسبی ایجاد کرده است [۵،۱۵،۱۶].

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کلونینگ ژن GRA7 در پلاسمید pcDNA3 انجام شده است و پلاسمید نوترکیب در سلول‌های یوکاریوتیک بیان شده و پروتئین ۲۹ کیلودالتونی تولید شده است. نتایج وسترن بلات نیز نشان می دهد که این آنتی ژن ایمونوژن می‌باشد، لذا قابلیت آن را دارد که برای تحقیقات تهیه واکسن DNA استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب بخشی از رساله دکتری تخصصی رشته انگل شناسی پزشکی در دانشگاه تربیت مدرس و با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور انجام شده است.

References:

[1] Daryani A, Sharif M, Meigouni M. Seroprevalence of IgG and IgM anti—*Toxoplasma* antibodies in HIV/AIDS patients, northern Iran. ***Asian Pacific J Tropical Med*** 2011; 4(4): 271-4.
[2] Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC press, Inc Boca Raton, 1988; FL, p 220.
[3] Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. ***Microbiol Infec*** 2003; 5: 457-62.
[4] Saito S, Aosai F, Rikihisa N, Mun H, Norose K, et al. Establishment of gene-vaccinated skin grafting against *Toxoplasma gondii* infction in mice. ***Vaccine*** 2001; 19: 2172-80.
[5] Jongert E. Melkebeekd V. De CraeyeS. Dewitc, J. Verhelst D, Coxd E. An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-Toxoplasma immune responses in pigs. ***Vaccine*** 2008; 26: 1025-31.
[6] Bonhomme A, Maine GT, Beorchia A, Burlet H, Aubert D, et al. Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. ***J Histochem Cytochem*** 1998; 46: 1411–22.
[7] Fischer HG Stachelhaus S Sahm M Meyer HE Reichmann G. GRA7, an excretory 29 kDa Toxoplasma gondii dense granule antigen released by infected host cells. ***Mol Biochem Parasitol*** 1998; 91(2): 251-62.
[8] Ghaffarifar F, Rahmah N, Sharifi Z, Dalimi A, Roudbar Mohammadi Sh, Ghasemi S. Cloning and sequencing of Granular antigen 7 of Toxoplasma gondii. ***Modarres J Med Sci*** 2008; 11(3): 73-80.
[9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*, ،Third Edition. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
[10] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature*** 1970; 227: 680–5.
[11] Dunbar BS. Protein blotting: A practical approach. Ed. Oxford University Press; 1994.
[12] Nigro M, Gutierrez A, Hoffer AM, Clemente M, Kaufer F, et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired Toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. ***Diagn Microbiol Infec Disease*** 2003; 47: 609-13.
[13] Cursons, R.T. DIG-ELISA for the serologic diagnosis of Toxoplasmosis. ***Am J Clin Path*** 1982; 77(4): 459-61.
[14] Jacobs D, Vercammen M, Saman E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. ***Clin Diagn Lab Immunol*** 1999; 6: 24–9.
[15] Jongert E, de Craeye S, Dewit J, Huygen, K, 2007. GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against Toxoplasma gondii.
[16] 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: 1327-35.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-28]