

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

Jafari-Modrek M¹, Ghaffarifar F^{1*}, Sharifi Z², Dalimi-Asl A¹

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 کنده پروتئین میکرونم ۳ (MIC3) توکسوبلاسمای گوندی

محمد جعفری مدرک^۱، فاطمه غفاری فر^{۲*}، زهرا شریفی^۳، عبدالحسین دلیمی اصل^۴

خلاصه

سابقه و هدف: توکسوبلاسمای گوندی، انگل تک یاخته درون سلولی اجباری و عامل توکسوبلاسموزیس در انسان و حیوانات بوده که در سراسر جهان انتشار دارد. پروتئین میکرونم ۳ (MIC3) با وزن مولکولی 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 ساخت کلونینگ در پلاسمیدهای یوکاربیوت و پروکاربیوت است.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی توکسوبلاسمای، با روش فتل-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، به داخل یک وکتور کلونینگ کلون شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب به داخل E.coli سوش TOP10 ترانسفورم گردید. با روش‌های PCR و برش آنزیمی و توالی یابی، کلون مورد نظر تائید شد.

نتایج: محصول PCR به صورت یک باند ۱۰۵۲ جفت باز در ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید. پلاسمیدهای نوترکیب تحت برش آنزیمی دو آنزیم محدود کننده EcoRV و HindIII قرار گرفت و دو باند ۱۰۵۲ و ۲۸۸۶ جفت باز بدست آمد که نشان داد قطعه MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است.

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

وازگان کلیدی: توکسوبلاسمای گوندی، MIC3، کلونینگ، توالی یابی

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

مقدمه

بالاودگی به توکسوبلاسمای شایع‌ترین عفونت‌های انگلی بشر در جهان می‌باشد [۱]. توکسوبلاسموزیس به شکل بدون علامت و مزمن در ۵۰۰ میلیون تا یک میلیارد نفر از جمعیت انسانی در جهان وجود دارد [۲]. از آنجا که انتشار این انگل بسیار وسیع بوده و انتقال آن به راحتی توسط تمام میزبان‌های واسط صورت می‌گیرد، به نظر 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 توکسوبلاسموزیس تحقیقات محدودی شده است. محمودی و همکاران اثر محافظت کنندگی توکسوبلاسمای 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 توکسوبلاسمای سویه تهران به طور داخل صفاقی آلوه 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 آلوهگی با توکسوبلاسمای در موش‌های دیده می‌شود که فاصله زمانی بین تزریق ۲ سویه در آنها بیشتر باشد [۳]. دریانی و همکاران در یک

توکسوبلاسمای گوندی (*Toxoplasma gondii*) تک-یاخته‌ای با انتشار جهانی است که طیف وسیعی از مهربان داران خون گرم را آلوه می‌کند. توکسوبلاسمای در افراد با اختلال ایمنی (immunocompromised) به خصوص 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 نظاهرات خفیف تا شدیدی دارد که در فرم شدید سبب هیدروسفالی یا میکروسفالی، کلیسیفیکاسیون مغزی و کوریورتینیت می‌گردد [۴].

^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 مسؤول:

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

تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۳، دورنیش: ۰۲۱ ۴۵۵۵۸۲۸۸

پست الکترونیک: ghafarif@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۰۵/۹

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 صفاتی حاوی $10^5 \times 10^6$ تاکی‌زوئیت انگل سوش RH توکسوبلاسما گوندی به‌طور داخل صفاتی به ۵ سر موش Balb/c ماده تلقیح گردید. ۳-۴ روز بعد، موش‌ها کشته شده و مایع صفاتی موش‌های آلوده، به‌وسیله سرنگ‌های ۵ سی‌سی یا ۱۰ سی‌سی جمع‌آوری شد [۱۱]. استخراج DNA به‌روش فل -کلروفرم انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر (حدود 5×10^7) از تاکی‌زوئیت‌های تغیل‌شده 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 بین‌ماری 55°C قرار داده شد. با استفاده از اسپکتروفوتومتر و روش جذب نوری، غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. می-توان استخراج شده را تا مرحله بعدی در ۲۰- درجه سانتی Forward (جلویی) و Reverse (برگشتی)، ابتدا توالی DNA ژن کدکننده MIC3 از اطلاعات بانک ژنی از سایت ایترنتی SAG1 با شماره AJ132530 http://www.ncbi.com به‌دست آمد. سپس، با استفاده از این اطلاعات و به کمک نرم افزار GenRunner، جفت پرایمرها به صورت 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 X، ۱۰۰ میکرولیتر کلرید منزیوم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر ۱۰dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلیمراز *Taq* (*Taq DNA polymerase*) میکرولیتر 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 هم‌زندن در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. ژن MIC3 به‌وسیله PCR طی ۳۵ سیکل طبق برنامه Initial Denaturation به مدت ۵ دقیقه در

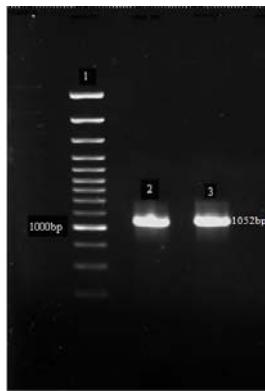
مطالعه، تاکی‌زوئیت‌های توکسوبلاسما گوندی را در محیط کشت غیر سلولی (RPMI 1640) کشت دادند. محیط رویی کشت جمع‌آوری شده و به ستون کروماتوگرافی تعویض یونی اضافه شد. در نهایت، دو فراکشن F1 و ESA-F2 به‌دست آمد. برای ایمن سازی موش‌ها، ۵۰ موش در ۵ گروه ۱۰ تاکی‌برسی شدند. گروه‌های یک تا چهار به ترتیب دوبار با آنتی‌زن دفعی-ترشحی (ESA) (F1)، فراکشن ۱ (F2) و با آنتی‌زن لیز شده توکسوبلاسما ایمیونیزه شدند. یک گروه نیز به‌عنوان گروه شاهد قرار گرفت. نتایج نشان داد که آنتی‌زن ESA تام، F1 و F2 در موش‌های ایمن شده منجر به واکنش DTH (افرايش حساسیت تاخیری) و پاسخ‌های تکثیر و تمایز لفوویت گردید. تمام موش‌ها شاهد ظرف مدت ۱۰ روز مردند، در حالی که موش‌ها ایمن شده برای مدت طولانی تری زنده ماندند. بیشترین میزان بقا در موش‌هایی 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 روشی را برای پیشگیری از بیماری توکسوبلاسموزیس ارائه کرده است [۶]. صلح جو و همکاران واکسن DNA را با استفاده از ژن SAG1 برای ایمن‌سازی علیه توکسوبلاسما گوندی انجام دادند که میزان بقای موش‌های ایمن شده بیش از موش‌های گروه شاهد بود [۷]. از جمله کاندیدهای مناسب برای تهیه واکسن، آنتی‌زن‌های میکرونیمی 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 آنتی‌زن MIC3 (پروتئین شماره ۳ ترشح شده از اندامک میکرونم توکسوبلاسما گوندی می‌باشد) را می‌توان نام برد که با داشتن گیرنده‌های خارجی نقش مهمی را در شناسایی اولیه سلول‌های میزان و آغاز تهاجم ایفا می‌کند [۸]. MIC3 با شناسایی سلول میزان، شرایط را برای ورود، سُر خوردن و تهاجم انگل فراهم می‌کند. MIC3 به‌عنوان یک آنتی‌زن عمده توکسوبلاسما گوندی شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندید موثر با پتانسیل قوی برای تهیه واکسن در نظر گرفته شده است [۹]. از MIC3 اسپروزو佐ئیت‌ها، برادی‌زوئیت‌ها و تاکی‌زوئیت‌ها ترشح می‌شوند و در تمام مراحل زندگی انگل بیان می‌شوند؛ از این‌رو به‌عنوان یک آنتی‌زن با کارآیی بالا، می‌توان در ارزیابی آنتی‌بادی‌های بدن افراد مبتلا و تست‌های تشخیصی کاربرد داشته باشد [۹]. ژن کدکننده MIC3 به صورت تکنسخه و قادر ایترون است [۱۰]. هدف از این

سانتي گراد انکوبه شد. سپس، به مدت چند ساعت در دمای ۴ درجه سانتي گراد قرار داده شد تا کلوني هاي سفيد يا آبي ظاهر شوند [۱۲]. پلاسميدها بر اساس دستورالعمل کيت شركت سازنده (Fermentas) از کلوني هاي سفيد و آبي استخراج شد. سپس، روی ژل آگارز با يكديگر مقايسه شدند. پلاسميدهاي موجود در کلوني هاي سفيد به علت وجود قطعه کلون شده در آن، سنگين تر از کلوني هاي آبي هستند [۱۲]. برای تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسميد PTZ57R/T، ابتدا پلاسميدهاي موجود در کلوني هاي سفيد با استفاده از کيت شركت Fermentas مطابق دستورالعمل شركت سازنده کيت استخراج شده و برای تعیین توالی ارسال گردیدند. تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسميد PTZ57R/T به وسیله شركت ژن فناوران انجام گردید و به کمک سایت اينترنتي www.ncbi.nlm.nih.gov/blast شاهد و تفاوتها با سویه RH استاندارد توكسوپلاسما گوندي در بانک ژني مقايسه شد.

نتایج

نتایج PCR به کمک DNA ژنومي

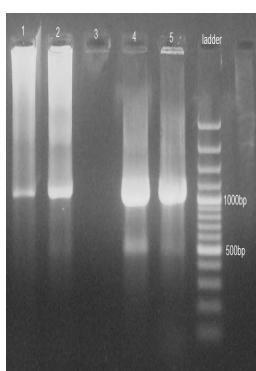
نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومي فقط يك باند حدود ۱۰۵۲ جفت باز روی ژل آگارز نشان داد که هماندازه ژن MIC3 توكسوپلاسما گوندي است و هيج ژن ديگري غير از آن تکثير نشده بود؛ بنابراین پرايمرهای طراحی شده تکثير ژن MIC3 اختصاصی بودند (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR استخراج DNA ژنومي روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، ستون شماره ۱ مارکر ۱۰۰ جفت باز ستون شماره ۲ و ۳ قطعه MIC3 اندازه ۱۰۵۲ جفت باز

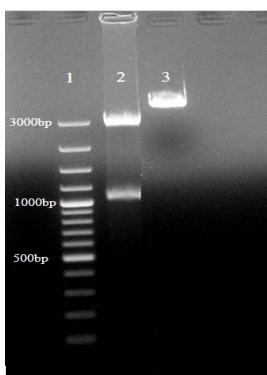
نتایج ترانسفورماسيون باكتري ها با محصول واکنش اتصال ظهرور کلوني باكتري ها (کلوني هاي سفيد و آبي) روی محيط LB حاوي آنتي بيويتك آمپي سيلين و آغشته به X-Gal و IPTG نشان دهنده

دمای ۹۴ درجه سانتي گراد، به مدت يك دقيقه در دمای ۹۴ درجه سانتي گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانية در دمای ۵۶ درجه سانتي گراد، Extention به مدت يك دقيقه در دمای ۷۲ درجه سانتي گراد و Final Extention به مدت ۵ دقيقه در دمای ۱۰۰ bp PCR بر روي ژل آگارز ۱ درصد همراه با مارکر MIC3 از InsT/A cloneTM PCR product clonin Kit شركت کلونينگ Fermentas ساخت ليتواني استفاده گردید. واکنش اتصال با استفاده از ۳ ميكروليتر از بافر 10X Ligation ۱-۵ واحد از ۱۵ T4 DNALigase ميكروليتر از Insert (DNA) و حدود ۳۰ ميكروليتر ddH2O انجام شد. مواد فوق در يك لوله ميكروفيوژ ۰/۵ ميكروليتری ريخته شده و به مدت يك ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتي گراد و پس از آن به مدت يك شب در دمای ۴ درجه سانتي گراد انکوبه گردید. ترانسفورم پلاسميد به داخل باكتري به کمک روش شوك حرارتی انجام شد که به طور خلاصه بيان می شود: باكتري در مرحله اول به کمک روش كلرید كلسيم مستعد شده و سپس کل محصول حاصل از واکنش اتصال به آن اضافه گردید. مخلوط فوق به آرامي و بدون استفاده از Vortex ترکيب شده و به مدت ۲۰ دقيقه در بخش آنکوبه گردید. پس از آن، به مدت ۹۰ ثانية در بن ماري ۴۲ درجه سانتي گراد شوك حرارتی داده شد، سپس مخلوط به مدت ۲ دقيقه در بخش قرار گرفت. ۵۰۰ ميكروليتر محيط LB (Luria Bertani) مایع بدون آنتي بيويتك به مخلوط اضافه شده و به مدت ۶۰ دقيقه در انکوباتور شيكدار در ۳۷ درجه سانتي گراد قرار داده شد. پس از طي اين مدت می توان باكتري ها را در محيط حاوي آنتي بيويتك آمپي سيلين كشت داد. برای بررسی وجود يا عدم وجود قطعه موردنظر، اين باكتري ها در محيط كشت حاوي آمپي سيلين، سوبستراي Isopropyl β -D1-X-Gal همراه با يك القاء كننده آنزيم يعني (-) IPTG (thiogalactopyranoside) كشت داده شدند. کلوني هاي فاقد پلاسميد نوترکيب که در آنها بتاگالاكتوزيداز سنتز شده، -Gal را تجزيه کرده و سبب توليد ايندوليل شده که رنگ آن آبي است و کلوني ها را آبي می کنند. اما، کلوني هاي پلاسميد نوترکيب چون فاقد آنزيم بتاگالاكتوزيداز هستند، نمی توانند -Gal را تجزيه کنند، بنابراین کلوني آنها سفيد می باشنند. در زير هود و در شرایط استريل، مقدار ۱۰۰-۲۰۰ ميكروليتر سلول هاي ترانسفورم شده به يك پليت حاوي IPTG و X-Gal اضافه شده و به کمک ميله شيشه اي در تمام نقاط پليت پخش شد. پليت ها به صورت وارونه و به مدت يك شب (۱۶-۱۸ ساعت) در ۳۷ درجه



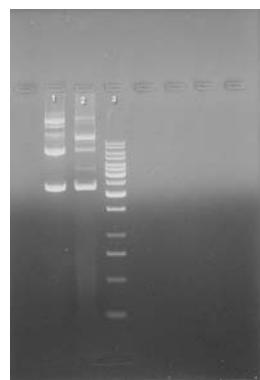
شکل شماره ۳- الکتروفورز محصول Coloni PCR روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون های ۱، ۲، ۴ و ۵: محصول PCR به دست آمده از کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیب ۱۰۵۲ (جفت باز)، ستون ۳: محصول PCR به دست آمده از کلونی های آبی، ستون آخر: مارکر ۱۰۰ جفت باز

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



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

ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری ها بود.
بیش از ۹۵ درصد کلونی ها، کلونی های سفید بود که نشان داد قطعه ژنی حاصل از PCR توسط پلاسمید p TTZ57R/ p TMIC3 تشکیل شده اند.
مقایسه پلاسمیدهای نوترکیب pTMIC3 گردیده و پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های سفید و کلونی های آبی بعد از PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که هر دو پلاسمید سه باند تشکیل داده اند. باندها به ترتیب از بالا به پایین عبارتند: حلقوی باز (Linear)، خطی (OpenCircular) و سوپرکویل (Supercoil). باندهای پلاسمید pTMIC3 در مقایسه با پلاسمید کلونی های آبی بر روی ژل آگارز بالاتر قرار داشتند.
می توان استنباط کرد که پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های سفید از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های آبی سنگین تر هستند، بنابراین می توان نتیجه گرفت که قطعه MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل شماره ۲).



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

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

```

1  acaaggettat ggccgctacc ttcatggggg ccgtgtggat gtgcacccca gggaggcgt tgccgattca aaagtctgtg cagctggca gcttgacaa
101 agttgtcccg agccgcgaag tcgtctcta gactctgtc cggctttcg cggtgactga gactcactcg tctgtcaat cccccagcaa ggaggagacg
201 cagctctgtc ctatctcgag tgaaggcaag ccatgtcgaa accgtcgttgc acgactgtac aacgggtact tcatcgcccc cagttggccc aagagcgttc
301 gctcagccaa gaccatgtc gcgcgcgcgc gctgcggaga attctgtcc agcaactgga tttttgcag cagttcgctc atctaccatc ctgacaaaag
401 ctatggagga gaccgcagct gtgaaaagca gggccatcgf tgccacaatc acgcagaatg cgtcgaaac ttggacgcg gtgggggtgt
501 gactcgacg gttcgctgg cactgggtt acttgtcccg aggatcttg tcaaaaaga gggAACGCGA agtgcggacc caacggacg tgcategtcg
601 tcgatccgtt cagctacaca tgcacccgtcg gcgacggcga gactcttagt accctcccg aagggggaca aggatgcag aggactggat gtcatgttcc
701 caggggaaac tgcagccct ttagatgtat ttagatgcgc tcgcatgaga atggctacac ctgcgatgc cccacagggt actcacgtga ggtgacttcc
801 aaggccgagg agtcgtgtt ggaaggagtc gaagtcacgc tggctgagaa atgcgagaag gagttcgca tcagcgcgc atccgtcaaa
tgcgataacg
901 gataactccg atctgcttc gcaacccccc accatggaa aggagaatcg ggatccgagg ggagctttag tgaaaaaatg aatattgtct tcaagtgcc
1001 ctagggctac catccaatcc accatgcaca cacgtgacg tgagatatct gt

```

شکل شماره ۵- نتایج تعیین توالی ژن پروتئین میکرونی (MIC3) (توکسوپلاسمای میکرونی سویه RH

پیشنهاد می شود که TOP10 سویه مناسبی جهت ترانسفورم است. Ismael و همکاران در سال ۲۰۰۳ در تحقیقات شان از پلاسمید pGM-CSF و ژن MIC3 استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که در مرحله حاد عفونت توکسoplasmozis این پلاسمید نوترکیب به خوبی عمل می کند ولی در مرحله مزمن باید ژن MIC3 با سایر ژن های توکسoplasma 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 بیانی pcDNA3 ساپ کلون کردند. و در نهایت توانستند با استفاده از هضم آنزیمی و PCR پلاسمید نوترکیب تولید شده را وارد سلول های -2 IBRS ترانسفکت نمایند [۱۴]. Jiang و همکاران با استفاده از پلاسمید نوترکیب rMIC3 تست لاتکس آگلوتیناسیون سریع را ابداع کردند. این تست در سرو دیاگنوزیس عفونت توکسoplasmایی در خوک ها کاربرد دارد [۱۵]. Fang و همکاران پاسخ ایمنی ناشی از پلاسمید نوترکیب با استفاده از ژن MIC3 را در موش های Balb/c بررسی نمودند. آن ها به این نتیجه رسیدند که ایمنی ایجاد شده در اثر تلقیح پلاسمید نوترکیب p SCA/MIC3 محافظت کننده است، از این رو پیشنهاد دادند که ژن MIC3 جهت ساخت DNA واکسن، کاندید موثر و امیدبخش می باشد [۱۶]. Artama و همکاران پروتئین شماره ۳ میکرونم (MIC3) را مورد مطالعه قرار دادند. آن ها ژن کد کننده MIC3 تاکیزوئیت های توکسoplasma گوندی را با روش PCR و پرایمر های 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 سایت های برش زیاد بر روی آنزیم محدود کننده است [۱۷]. نتایج کلونینگ مطالعه ما با مطالعات محققان مذکور در بخش های اولیه کلونینگ مشابهت زیادی دارد اما برخلاف مطالعه Artama در قسمت هضم آنزیمی (برش به وسیله دو آنزیم Double Enzymes) تولید قطعات کوچک باند دیده نشد که به نظر می رسد Artama در انتخاب نوع آنزیم، انتخاب ایده آلی نکرده است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد کلونینگ و

نتایج تعیین توالی

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T نشان داد که این ژن با ژن MIC3 توکسoplasma 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 توکسoplasma گوندی در پلاسمید pTZ57R/T نشان داد قطعه ۱۰۵۲ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده و هیچ ایترونونی در ژن مذکور دیده نشد. این ژن با سویه RH توکسoplasma گوندی با شماره AJ132530.1 در بانک ژنی دارای ۹۸ درصد تشابه بود، همچنین با دو سویه دیگر توکسoplasma گوندی با شماره های AF509564.1 و EU572718.1 نیز حدود ۹۸ درصد شباهت داشت که این شباهت ها حاکی از حفظ توالی ژن در سویه های گوناگون توکسoplasma گوندی است. در این تحقیق، از پروتئین کد کننده ژن MIC3 استفاده گردید. این ژن به دلیل داشتن گیرنده هایی که هم به سلول میزان و هم به انگل می چسبد، در شناسایی اولیه سلول های میزان در آغاز تهاجم انگل نقش مهمی دارد [۱۰]. از این رو جهت طراحی ساخت واکسن، امید محققین به این ژن می باشد، زیرا معتقدند که جهت مصون بودن از آثار زیان بار انگل توکسoplasma گوندی، بایستی در مرحله اولیه تهاجم انگل، میزان را به وسیله ایمنی زایی با پروتئین هایی نظیر پروتئین میکرونمی و القای پاسخ های ایمنی تجهیز کرد. از این جهت، مطالعه ما نیز مانند سایر مطالعات محققین که در جهان انجام می گیرد، روی ژن MIC3 تمرکز بود. در بخش کلونینگ مطالعه ما که اولین قدم مطالعه محققان در سراسر جهان می باشد، نتایج به دست آمده حاکی از شباهت هایی است که سایر محققان انجام دادند. تفاوت از نظر نوع پلاسمید و سویه باکتری E.coli می باشد که در مطالعه های 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 ژن های متعددی استفاده شده، ولی برای اولین بار است که جهت ژن MIC3 استفاده می شود. نتایج آزمایش کلونینگ برای این ژن نشان می دهد که این پلاسمید نیز جهت کلون کردن ژن MIC3 مناسب می باشد. 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 پژوهشی، معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

ترانسفورم ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T با موفقیت انجام شده است. بنابراین پلاسمید pTZ57R/T و نیز باکتری اشريشياکلي سوبه TOP10 جهت کلونينگ و ترانسفورم ژن MIC3 مناسب می باشد.

تشکر و قدردانی

مطلوب 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, Zavarani 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 micronemal 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.