مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۳ و ٤: از ۱۹-۳۰
پاییز و زمستان ۱۳۸۷

کلونینگ و توالی‌یابی ژن
Leishmania homologue of receptors for activated C kinase
(LACK) لیشمانیا ماژور سویه استاندارد ایرانی

اوغل‌نیاز جرجانی[1]، فاطمه غفاری‌فر[2*]، زهره شریفی[3]، عبدالحسین دلیمی[4]، زهیرمحمد حسن[5]

۱- دانشجوی دکتری، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
٤- استاد، گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۶ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۵

چکیده

هدف: لیشمانیوزیس جزء بیماری‌های عفونی- انگلی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا ایجاد می‌شود. ژن LACK یک پروتئین ۳٦ کیلودالتونی است که در فرم‌های پروماستیگوت و آماستیگوت انگل، در گونه‌های مختلف لیشمانیا به مقدار بالایی وجود دارد. LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند؛ بنابراین این ژن برای تهیه آنتی‌ژن نوترکیب مناسب بوده و انتخاب خوبی به‌عنوان واکسن DNA علیه لیشمانیا ماژور است، این مطالعه با هدف کلون نمودن ژن LACK لیشمانیا ماژور ایران برای تولید پروتئین نوترکیب برای ساخت واکسن انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق DNA از سویه استاندارد ایرانی لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) استخراج و ژن LACK با استفاده از روش PCR تکثیر شد. سپس قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی تکثیر شده در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد. پلاسمید نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی سویه TG1 ترانسفورم و توالی‌یابی شد.

نتایج: آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا ماژور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T مشخص کرد که قطعه‌ای ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانیا ماژور است. این سویه ایرانی ۸۹ درصد با سویه موجود در بانک ژنی با کد LmjF28.2740 شباهت دارد. این کلونینگ با روش‌های PCR و برش آنزیمی تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان داد که این ژن با موفقیت تکثیر و کلون شده و از این کلون می‌توان کلون‌هایی در پلاسمید بیانی پروکاریوتی برای تهیه آنتی‌ژن نوترکیب و پلاسمید یوکاریوتی برای تهیه واکسن DNA استفاده کرد. این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب برای مطالعات آینده است.

کلیدواژگان: کلونینگ، توالی‌یابی، لیشمانیا ماژور، LACK

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱۵
Email: ghafarif@modares.ac.ir

۱- مقدمه

لیشمانیوزیس (Leishmaniosis) جزء بیماری‌های عفونی- انگلی مهم دنیاست که توسط تک یاخته‌های نسجی خونی داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا (*Leishmania*) از راسته کینتوپلاست‌داران ایجاد می‌شود.

این انگل از طریق نیش پشه خاکی ماده آلوده به میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود. لیشمانیوزیس جلدی شایع در ایران معمولاً موجب مرگ نمی‌شود ولی آسیب‌های روحی، اجتماعی، اقتصادی را به دلایل مختلف مثل مزمن بودن دوره زخم، منظره جوشگاه ناپسند پوستی، به‌جای ماندن آثار زخم، احتمال عفونت ثانویه، بار سنگین اقتصادی درمان برای جامعه، طولانی بودن دوره درمان و عوارض ناشی از درمان را سبب می‌شود که می‌توان آن را از معضلات مهم مناطق بومی ایران به‌حساب آورد.

لیشمانیوزیس یک مشکل بهداشت عمومی برای اکثر مناطق جهان به‌خصوص کشورهای جهان سوم و افراد مبتلا به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و سایر بیماری‌های ناتوان کننده سیستم ایمنی در کشورهای پیشرفته است و این انگیزه قوی مطالعات تجربی در راستای بنیان روشی کامل برای کنترل آن بوده که بیش از صد سال از تاریخ این تلاش‌ها می‌گذرد [۱- ۵].

در استفاده از روش‌های درمانی مختلف به‌علت مواجهه شدن با مشکلاتی مانند عود بیماری، مقاومت به داروها، عوارض جانبی داروها، ایجاد عفونت ثانویه باکتریایی، هزینه بالا، گزارش چندین مورد اپیدمی بیماری به‌خصوص در افراد با نقص ایمنی، تحقیقات را در ایجاد و گسترش داروهای جدید ضد لیشمانیا یا یک واکسن مناسب پیش می‌برد.

مطالعات و تجربیات مختلف نشان داده است که احتمال تهیه واکسنی مناسب علیه لیشمانیوزیس انسانی وجود دارد. مشاهدات و تلاش‌ها نشان داده است که تقویت سیستم ایمنی، اساس درمان لیشمانیوزیس است.

واکسیناسیون DNA بحث کاملاً جدیدی است و روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کنند. واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر و طولانی مدتی القاء می‌کنند که از طریق سیستم MHC-I (Major Histocompatibility Complex)، MHC-II فراوری می‌شوند و خاطره ایمونولوژیکی را تحریک می‌کنند [٦- ۱۰]. در دهه گذشته، پیشرفت چشمگیری در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که می‌تواند پاسخ ایمنی محافظتی القاء کنند، صورت گرفته است. بیشتر این کارها روی آنتی‌ژن‌های PSA2، Leif، LmSTI1، P20، Ribosomal like Protein، GP63، GP64، CP (A,B)، A2، P4، P8، Histon H1، M2 متمرکز شده است که به‌عنوان گزینه‌های واکسن شناسایی شده‌اند ولی هیچ‌کدام ایجاد پاسخ‌های ایمنی کاملی نمی‌کنند اما در این میان LACK (Leishmania homologue of receptors for actived C kinase) یکی از کاندیداهای اصلی واکسن است که بیان قوی دارد [۱۱- ١٤].

LACK لیشمانیا ماژور (*L. major*)، پروتئین ۳٦ کیلودالتونی بوده و در فرم‌های پروماستیگوت (Promastigote) و آماستیگوت (Amastigote) و در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود دارد. همچنین همولوژی و شباهت زیادی با پروتئین RACK-I پستانداران دارد [۱۵- ۱۷]. ژن کد کننده آنتی‌ژن LACK دارای ۹۳۹ جفت‌باز و فاقد اینترون است. ژن LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند [۱۸].

سلول‌های T علیه LACK، اینترلوکین ٤ (Interleukin 4: IL-4) تولید می‌کنند، بنابراین تحملی علیه LACK ایجاد می‌شود که نتیجه بیان ترانس‌ژنیک LACK در تیموس است. در نتیجه باعث مقاومت علیه عفونت لیشمانیوزیس می‌شود.

اگر در ایمنی‌زایی علیه لیشمانیوزیس، همراه با DNA LACK، IL-12 استفاده شود باعث تولید اینترفرون گاما (Interferon gamma: IFN-γ) و حفظ و اثربخشی پاسخ Th1 (T helper 1) می‌شود [۱۹].

هدف از این تحقیق، کلون کردن ژن LACK لیشمانیا ماژور داخل ناقل PTZ57R/T برای تهیه پلاسمید نوترکیب ژن LACK بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- انگل لیشمانیا ماژور

در این تحقیق از سویه استاندارد ایرانی لیشمانیا ماژور تهیه شده از انستیتو پاستور که دارای کد بین‌المللی MRHO/IR/75/ER است، استفاده شد.

برای تولید انبوه انگل و تهیه آنتی‌ژن، پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا ماژور در محیط RPMI-1640 که حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاو غیرفعال شده و ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین (Penicillin) در میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (Streptomycin) در میلی‌لیتر است، در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود تا زمانی‌که تعداد انگل به میزان زیادی برسد و انگل در مرحله ایستا جمع‌آوری شود.

۲-۲- استخراج DNA

۱۰۰ میکرولیتر (در حدود ۵×۱۰^{۷}) از پروماستیگوت‌های تغلیظ شده و شستشو شده با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) درون یک ویال ۱/۵ سی‌سی ریخته شد و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط شد. به‌منظور لیز شدن پروماستیگوت‌ها، ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K به ویال اضافه شد و به‌مدت ۲ ساعت در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۲۰، ۲۱]. استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد [۲۲، ۲۳].

۲-۳- تکثیر DNA با روش PCR

محصول DNA استخراج شده از پروماستیگوت‌ها به‌عنوان الگو برای تکثیر قطعه ژن LACK به‌وسیله روش PCR استفاده می‌شوند. محصول واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ترکیبات زیر است: ۲/۵ میکرولیتر محصول DNA استخراج شده، ۱۲/۵ میکرولیتر Mix Taq، ۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (Primers) (۱۰ پیکومول در میکرولیتر).

از جفت آغازگرهای زیر برای تکثیر قطعه ژن LACK به روش PCR استفاده شد:

آغازگر جلویی: 5'-ATT AAG CTT ATG AAC TAC GAG GGT CAC CTG AAG GG-3'

آغازگر برگشتی: 5'-TTA GAA TTC TTA CTC GGC GTC GGA GAT-3'

آغازگر جلویی (Forward primer) دارای ۳۵ نوکلئوتید با جایگاه شناسایی برش آنزیمی *Hind*III و کدون شروع ATG است و آغازگر برگشتی (Reverse primer) دارای ۲۷ نوکلئوتید با جایگاه شناسایی برش آنزیم *Eco*RI و کدون خاتمه TAA است.

طبق برنامه زیر PCR انجام شد: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد و بسط (Extension) ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ سه مرحله اخیر ۳۰ چرخه تکرار شد و در نهایت واکنش PCR با بسط نهایی ۵ دقیقه در ۷۲دمای درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و از طریق رنگ‌آمیزی با رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) قابل مشاهده است. محصول DNA را می‌توان تحت تابش نور ماورای بنفش (Ultra Violet: UV) مشاهده کرد. نشانگر (Marker) ۱ کیلوجفت‌بازی برای تعیین کردن محصول PCR استفاده شد. محصول PCR، باند ۹۵۷ جفت‌بازی روی ژل توسط کیت استخراج DNA از ژل شرکت Fermentas از قطعات DNA کوچک‌تر، آغازگرها، نمک‌ها، نوکلئوتیدها و پروتئین‌ها از قبیل آنزیم *Taq* خالص می‌شود.

۲-۴- کلونینگ ژن LACK در پلاسمید pTZ57R/T

برش دادن و متصل کردن اساس کلون‌سازی است. برای کلون کردن ژن موردنظر، DNA پلاسمیدی خالص شده با آنزیم برش‌دهنده مناسب بریده شد. سپس به DNA هدف با انتهای مشابه متصل شد و یک پلاسمید نوترکیب (Recombinant Plasmid) به‌وجود آمد [۲۲، ۲۳].

در این تحقیق به‌منظور کلونینگ ژن LACK از کیت کلونینگ T/A Cloning Kit شرکت Fermentas استفاده شد. محصول PCR خالص شده مطابق با دستورالعمل کیت در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد.

۲-۵- انتقال DNA به باکتری (Transformation)

باکتری مستعد (Competent Cell) از سویه TG1 باکتری اشرشیاکلی به روش کلرید کلسیم تهیه شد [۲۲].

برای انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری به روش زیر عمل شد:

۱- یک لوله میکروفیوژ (Microfuge) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد از فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد در آورده و به‌مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد تا به دمای صفر درجه سانتی‌گراد برسد. ۵- ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش اتصال به آن اضافه شد و به آرامی با هم مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شد.

۲- مخلوط فوق در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ منتقل شد.

۳- ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB (Lysogeny Broth) مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به‌مدت ٦۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از دریافت DNA خارجی توسط سلول‌ها می‌توان آن‌ها را به‌طور مستقیم کشت داد.

۲-٦- غربال کردن (Screening) کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

پس از انتقال DNA نوترکیب به درون سلول میزبان کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب مناسب، غربال و انتخاب شدند. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) همراه با یک القاءکننده آنزیم یعنی ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوید (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranoside: IPTG) و آمپی‌سیلین (Ampicillin) به آگار اضافه شد، کلونی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب که در آن‌ها بتاگالاکتوزیداز سنتز می‌شود به رنگ آبی درآمدند؛ در حالی‌که کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، چون قادر به ساخت بتاگالاکتوزیداز نیستند به رنگ سفید بود.

۲-۷- استخراج پلاسمید از کلونی‌های آبی و سفید

استخراج پلاسمید از کلونی‌های سفید و آبی مطابق دستورالعمل ذکر شده در کیت استخراج پلاسمید شرکت Bionner آلمان انجام شد.

۲-۸- مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی و سفید

پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های سفید (به‌علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلونی‌های آبی هستند برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمیدهای کلونی‌های آبی و سفید روی ژل آگارز ۰/۸ درصد لود (Load) و مقایسه شدند.

۲-۹- PCR قطعه LACK با استفاده از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK

با استفاده از روش PCR وجود قطعه DNA خارجی را در حامل پلاسمیدی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تعیین شد و پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر از سایر پلاسمیدها جدا و انتخاب شد. به این منظور واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط ایجاد شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های سفید (۵۰-۱۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) به‌عنوان الگو انجام شد.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی (Fermentas) برای تعیین کردن محصول PCR استفاده شد.

۲-۱۰- برش آنزیمی DNA پلاسمیدی (Restriction mapping)

این روش برای بررسی وجود قطعه DNA خارجی در پلاسمید به‌کار می‌رود. براساس جایگاه‌های برش آنزیم روی DNA حامل، قطعات حاصل از هضم آنزیمی پیش‌بینی شد. به‌همین منظور DNA پلاسمیدی نوترکیب همزمان با DNA پلاسمید حامل (به‌عنوان شاهد) توسط دو آنزیم برش داده شد. سپس نمونه‌های برش‌یافته همراه با یک نشانگر وزن مولکولی الکتروفورز بررسی شد [۲۲].

برای این منظور دو برش آنزیمی متوالی، هریک به حجم ۲۰ میکرولیتر در یک لوله میکروفیوژ استریل شامل مواد زیر انجام شد و پس از ورتکس (Vortex) کردن، به‌مدت ۱-۲ ساعت یا شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

DNA پلاسمیدی (۱-۳ میکروگرم)	۵ میکرولیتر
بافر ۱۰x	۲ میکرولیتر
آنزیم برش‌دهنده *Eco*RI (۱۰ واحد)	۱ میکرولیتر
آب مقطر	۱۲ میکرولیتر

برش آنزیمی دوم با یک میکرولیتر *Hind*III به‌همین روش و روی ۱۰ میکرولیتر محصول برش‌خورده با آنزیم *Eco*RI، ۷ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر بافر آنزیم انجام شد.

همه محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد و توسط کیت استخراج پلاسمید از ژل شرکت Fermentas استخراج شد [۲۲، ۲٤، ۲۵].

۲-۱۱- تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing)

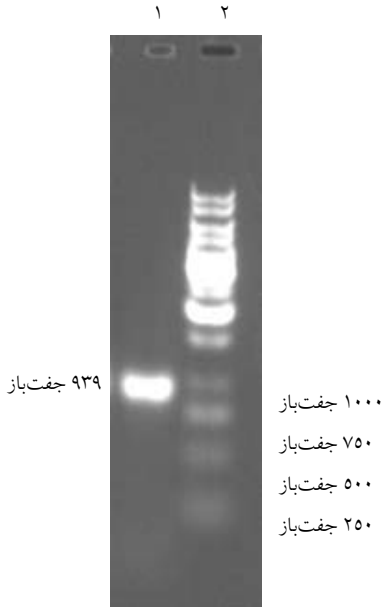
در این تحقیق به‌منظور تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T، ابتدا پلاسمیدهای موجود در باکتری‌های کلونی سفید، به‌منظور پیشگیری از هر گونه آلودگی، توسط کیت شرکت Bioneer آلمان مطابق با دستور کار شرکت سازنده کیت و یا به روش Alkaline lysis استخراج شد و برای تعیین توالی به شرکت Gene Fanavaran ارسال شد. سپس نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و اختلافات با ژن TSA لیشمانیا ماژور مقایسه شد.

۳- نتایج

پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور توسط بافر لیز و پروتئیناز K به‌خوبی لیز شده‌اند و DNA ژنومی با فنل-کلروفرم استخراج شده است.

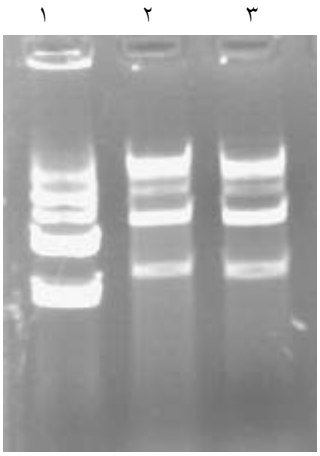
نسبت جذب DNA استخراج شده در طول موج ۲٦۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) برابر ۱/۹ است و DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد، نتایج نشان داد که غلظت DNA استخراج شده بالا است.

تحت شرایط ایجاد شده برای انجام واکنش PCR فقط یک باند حدوداً ۹۳۹ جفت‌بازی روی ژل الکتروفورز ایجاد شده است که هم اندازه ژن LACK لیشمانیا ماژور است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده است. پس شرایط تنظیم شده و آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن LACK اختصاصی هستند (شکل ۱).



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن LACK لیشمانیا ماژور با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد؛ **ستون ۱:** محصول PCR (قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی ژن LACK)، **ستون ۲:** نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی آبی pTZ57R/T و کلونی سفید pTZ57R/T–LACK بعد از اتصال نشان داد باندهای پلاسمید PT-LACK در مقایسه با باندهای استخراج شده از کلونی‌های آبی pTZ57R/T روی ژل آگارز بالاتر قرار داشتند پس پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی سفید از پلاسمیدهای آبی سنگین‌تر هستند (شکل ۲)؛ پس می‌توان نتیجه گرفت که قطعه LACK در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است.

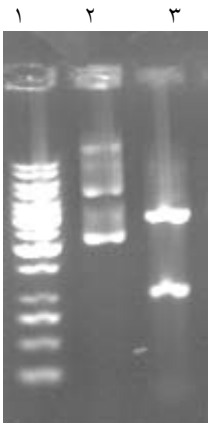


شکل ۲ مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید و آبی؛ **ستون ۱:** پلاسمید pTZ57R/T، **ستون‌های ۲ و ۳:** پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK

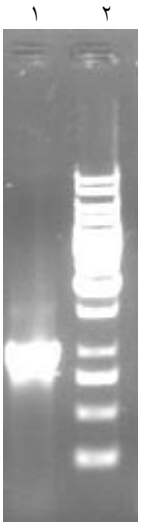
به‌طور کلی نتایج حاصل از برش‌های آنزیمی نشان داد که اگر پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌های کلونی سفید pTZ57R/T–LACK به‌وسیله آنزیم‌های *Eco*RI و *Hind*III بریده شوند، یک باند ۹۳۹ جفت‌بازی بریده و جدا می‌شود که هم اندازه ژن LACK لیشمانیا ماژور است. بنابراین ژن LACK درون پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل ۳).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR با پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T–LACK به‌همراه آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و شرایط ایجاد شده نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی ژن LACK از روی پلاسمید نوترکیب، تکثیر شده است. پس ژن LACK در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است (شکل ٤).

آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا ماژور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast مشخص شد که قطعه‌ای ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانیا ماژور است. این سویه ایرانی MRHO/IR/75/ER، ۸۹ درصد با بانک ژنی شباهت دارد (شکل ۵).



شکل ۳ الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK روی ژل آگارز؛ **ستون ۱:** نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی، **ستون ۲:** pT-LACK که در معرض آنزیم قرار نگرفته است، **ستون ۳:** pTZ57R/T–LACK که با آنزیم‌های *Hind*III، *Eco*RI بریده شده است.



شکل ٤ الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T–LACK روی ژل آگارز ۱ درصد؛ **ستون ۱:** محصول PCR (۹۳۹ جفت‌باز) با استفاده از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T–LACK؛ **ستون ۲:** نشانگر ۱ کیلوجفت‌بازی

MRHO/IR/75/ER
MNYEGHLKGHGGWVTSLACPQQAGSYIKVV
STSRDGTAISWKANPDRHSAEDNYGIPDHR
Friedlin
MNYEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVV
STSRDGTAISWKANPDRHSVDSDYGLPNHR

MEGHSGFVSCVSLAHATDYALTASWDHAIR
MWDLRTGQSQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDR
LEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRM
WDLRNGQCQRKFLKHTKDVLAVAFSPDDR

LIASAGRDSVIRVWNVAGECMHEFLRDGHED
WVSSICFSPSLDLPIVASGSWDNTIKVWN
LIVSAGRDNVIRVWNVAGECMHEFLRDGHED
WVSSICFSPSLEHPIVVSGSWDNTIKVWN

VNEGKCVHTLRGHKNYVSTVTVSPDGSLCAS
GGKDGSALLWDLSNGEQLFSIPVESPINQ
VNGGKCERTLKGHSNYVSTVTVSPDGSLCAS
GGKDGAALLWDLSTGEQLFKINVESPINQ

IAFSPNRFWMCVATEKSL
IAFSPNRFWMCVATERSL

شکل ۵ نتایج Blast اسیدآمینه‌های LACK لیشمانیا ماژور (MRHO/IR/75/ER) در مقایسه با اسیدآمینه LACK با شماره دسترسی LmjF28.2740 در بانک ژنی

٤- بحث

لیشمانیوزیس بیماری وسیع‌الطیف انگلی است که کم و بیش از سراسر جهان گزارش می‌شود. تاکنون واکسن یا داروی مناسب برای کنترل انگل و نیز روش شیمیایی مناسب برای مبارزه قاطع با ناقل آن ارائه نشده است.

بیماری لیشمانیوزیس به‌علت ناتوانی در درمان کامل آن با روش‌های درمانی موجود و عود مجدد بیماری و عفونت‌های ثانویه باکتریایی زخم و عوارض جانبی، مقاومت، هزینه بالای آن‌ها در درمان بیماری، همچنین عفونت فرصت‌طلب بودن بیماری در افراد با نقص ایمنی و شیوع فراوان، انتشار و پراکندگی بیماری در نقاط مختلف کشور (نوع جلدی) و مرگ و میر بالای بیماری در صورت عدم درمان به موقع (نوع احشائی) دارای اهمیت فراوان است. بیماری‌های ناتوان کننده دستگاه ایمنی مانند AIDS سبب بازگشت و عود بیماری در فرد مبتلا می‌شود [٢٦- ٢٩].

از سال ١٩٦٠ تا ١٩٨٠ تحقیقات برای تولید واکسن بر علیه لیشمانیوزیس در کشورهای مختلف با ایجاد لیشمانیزاسیون (Leishmanization) (استفاده از انگل‌های زنده) شروع شد [٣٠، ٣١].

به‌دنبال تحقیقات کار روی واکسن‌های پروتئینی و سپس غیرپروتئینی (Lipophosphoglycan: LPG) ادامه یافت که باز هم به‌علت عدم دستیابی به ایمنی کامل بحث جدید واکسن DNA (DNA Vaccine) آغاز شد که روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال اختصاصی است. با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کند [٣٠- ٣٢]. تحقیقات نشان داده است که واکسن DNA به‌صورت مخلوطی از چند ژن حتی بدون ادجوانت (Adjuvant) به‌عنوان جایگزینی مناسب برای واکسن‌های پروتئینی به‌علت ایجاد حفاظت طولانی مدت بر علیه لیشمانیوزیس پوستی قلمداد می‌شود. LACK لیشمانیا ماژور پروتئین ٣٦ کیلودالتونی بوده و در فرم‌های پروماستیگوت و آماستیگوت و در گونه‌های مختلف لیشمانیا وجود دارد، همچنین همولوژی و شباهت زیادی با پروتئین RACK-I (activated protein kinase C receptor) پستانداران دارد [١٥- ١٧].

واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی مؤثر، قوی و طولانی مدت را القاء می‌کند زیرا آنتی‌ژن‌های ایمونولوژیک را مهیا می‌کنند و از طریق MHC-I و MHC-II عرضه می‌شوند و خاطره ایمونولوژیکی را تحریک می‌کنند. یک واکسن ایده‌ال و مناسب واکسنی است که علاوه بر بی‌خطر بودن و ایجاد مصونیت، ارزان و دارای خاصیت ایمنی بالا و طولانی مدت و ساخت و تولید راحت و آسان باشد. همچنین در داخل ژنوم سلولی قرارنگیرد (Non-integrating) و جزئی از آن نشود، همچنین آنتی‌بادی علیه ناقل واکسن نباشد (توسط ایمنی که از قبل در بیمار ایجاد شده است). این واکسن‌ها شامل ناقل‌های پلاسمیدی است که ژن‌های هترولوگوس قرار داده شده تحت کنترل پروموتور یوکاریوتی هستند و باعث القای پاسخ‌های

CD_4^+، CD_8^+ می‌شوند. واکسیناسیون ژنی مکانیسمی را برای دستیابی به سنتز آنتی‌ژن به شکل درون سلولی مهیا می‌کند و سیستم ایمنی را شبیه به عفونت ویروسی تحریک می‌کند. این در حالی است که آنتی‌ژن‌های محلول مثل پروتئین‌های نوترکیب معمولاً فقط پاسخ هومورال را القاء می‌کنند. واکسن‌های پروتئینی نوترکیب به‌علت هزینه زیاد طی فرآیند تولید، دشوار بودن خالص‌سازی تاخوردگی ناصحیح و القای ضعیف سلول‌های T CD_8^+ چندان مورد توجه نیستند [۳۰-۳۲]. واکسن‌های DNA در مقایسه با واکسن‌های رایج نوترکیب پروتئینی یا ویروسی و باکتریایی بنا به دلایل زیر مزیت دارند: ۱- ساخت و تولید آن‌ها راحت‌تر بوده و بی‌خطر و امن‌تر هستند؛ ۲- بیان طولانی مدت آنتی‌ژن توسط این واکسن‌ها باعث تحریک مداوم سیستم ایمنی می‌شود؛ ۳- این واکسن‌ها پاسخ ایمنی متفاوت و با کیفیتی ایجاد می‌کنند؛ ٤- نیاز به تخلیص و تولید پروتئین نیست؛ ٥- وقتی این واکسن‌ها با پلاسمیدهای کد کننده سیتوکین‌ها (Cytokines) (اگزوژن (Exogenous) مانند IL-12، IL-7) یا کموکاین‌ها (Chemokines) به‌عنوان تنظیم کننده پاسخ‌های ایمنی یا مولکول‌های محرک ایمنی یا ادجوانت‌های ساختگی مانند MPL (Monophosphoryl Lipid) همراه باشند یا این‌که از چند ژن با هم استفاده شود، احتمال افزایش یا تبدیل پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن کد شونده توسط DNA وجود دارد و کلاً واکسن‌های فوق که بر پایه خودتکثیری هستند به عبارتی Self Replicate هستند، نسبت به واکسن‌های روتین و معمولی (واکسن‌های که از پروتئین‌های نوترکیب، ویروس‌ها یا باکتری‌ها استفاده می‌شوند) اثر بیشتر و طولانی مدتی دارند. همچنین مقاوم به گرما بوده و یکنواخت (Homogenized) هستند [۲۹، ۳۳- ۳۵].

موش‌های Balb/c مستعدی که از طریق زیرجلدی با DNA LACK ایمن شده‌اند، با پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور مبارزه می‌کنند. اثر حفاظتی که DNA LACK ایجاد می‌کند، مشابه اثر حفاظتی بود که پروتئین rIL-12+LACK ایجاد می‌کند ولی اثر حفاظتی که DNA LACK ایجاد می‌کند بهتر از اثر حفاظتی بود که پروتئین LACK به تنهایی (بدون rIL-12) ایجاد می‌کند. در موش‌های ایمن شده با DNA LACK، کنترل پیشرفت بیماری‌ها و تعداد انگل با افزایش تولیدات IFN-γ اختصاصی علیه آنتی‌ژن در ارتباط است [۱۸]. LACK پاسخ ایمنی سریعی علیه انگل ایجاد می‌کند [۱۸].

سلول‌های T علیه LACK، IL-4 تولید می‌کنند، بنابراین تحملی (Tolerance) علیه LACK ایجاد می‌شود که نتیجه بیان ترانس‌ژنیک LACK در تیموس است. در نتیجه باعث مقاومت علیه عفونت لیشمانیوزیس می‌شود. فعال شدن سریع سلول‌های T علیه LACK، به ترشح سیتوکین‌های اصلی کمک می‌کند که در تبدیل شدن سلول T به فنوتیپ نوع Th2 لازم است.

اگر در ایمنی‌زایی علیه لیشمانیوزیس، همراه با DNA LACK، IL-12 استفاده شود باعث تولید IFN-γ و حفظ و اثربخشی پاسخ Th1 می‌شود. ایمنی‌زایی با DNA LACK از راه زیرجلدی پاسخ ایمنی حفاظتی خوبی علیه لیشمانیوزیس ایجاد می‌کند [۳٦- ۳۸].

در این تحقیق، آنالیز تعیین توالی ژن LACK لیشمانیا ماژور کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت‌بازی در این پلاسمید کلون شده است و هیچ اینترونی در ژن مورد نظر وجود ندارد و این ژن دارای یک اگزون است. همچنین ژن کلون شده، ژن LACK لیشمانیا ماژور است و ژن LACK این سویه ایرانی MRHO/IR/75/ER با ژن LACK سویه‌های دیگر با شماره‌های دسترسی AF363975_1، LmjF28.2740 در بانک ژنی از نظر توالی ۸۹ درصد شباهت و در ۲۸ اسیدآمینه تفاوت دارد. این شباهت نشانگر این است که توالی ژن LACK در سویه‌های مختلف لیشمانیا ماژور به‌طور کامل حفظ شده است. نتایج حاصل از PCR ژن LACK نشان داد که هیچ ژن دیگری غیر از LACK تکثیر نشده است، پس آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن LACK اختصاصی هستند. پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی باکتری‌ها (پلاسمید

نوترکیب) تعیین توالی شد.

کلونینگ قطعه LACK در پلاسمید pTZ57R/T (برای تکثیر ژن) با روش‌های PCR و برش آنزیمی تأیید شد و همه روش‌ها بیانگر کلون شدن قطعه فوق در پلاسمیدهای ذکر شده، بودند.

این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب و تهیه واکسن DNA علیه لیشمانیا ماژور برای مطالعات آینده است.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان به این وسیله از پرسنل محترم بخش تحقیقات ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از آقای دکتر صدرایی مدیر گروه محترم گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و خانم قاسمی‌نیکو کارشناس محترم گروه انگل‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری می‌گردد.

۶- منابع

[1] Ardehali S. Leishmania parasit and leishmaniasis. University publication center, 1985; p: 50-100. (Persian)

[2] Garsialin S, Brookes D, Translation: Fallah M. Medical parasitology and diagnose methods in parasitology. Hamedan Medical University Publication 1992; p: 123-30. (Persian)

[3] Nadim A. Cutaneous leishmaniasis in Tehran sides. General Med J 1966; 272-274. (Persian)

[4] Asilian A. Cutaneous leishmaniasis and cure methods and prevention. Esfehan Med Univ 1992, p: 40-52. (Persian)

[5] Momeni A, Javaheri A. Cure effects study and side charges of Glukantin in cutaneous leishmaniasis. 1992; p: 16-7. (Persian)

[6] Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, Coler RN, Skeiky YA, Reed SG. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion protein confers protection against Leishmania major infection in susceptible Balb/c mice. J Infect Immun 2002; 70(6): 2828-36.

[7] Monnerat S, Martinez-Calvillo S, Worthey E, Myler PJ, Stuart KD, Fasel N. Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of Leishmania major. Mol Biochem Parasitol 2004; 134(2): 233-43.

[8] Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of Leishmania major that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. J Immunol 1996; 157(11): 5034-41.

[9] Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. J Infect Immun 1998; 66(7): 3279-89.

[10] Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchettin G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De

[14] Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to Leishmania major. Annu Rev Immunol 1995; 13: 151-77.

[15] Kemp M, Hey AS, Bendtzen K, Kharazmi A, Theander TG. Th1-like human T cell clones recognizing Leishmania gp63 inhibit Leishmania major in human macrophages. Scand J Immunol 1994; 40(6): 629-35.

[16] Coelho EF, Tavares CA, Lima Kde M, Silva CL, Rodrigues JM jr, Fernandes AP. Mycobacterium hsp65 DNA entrapped into TDM-loaded PLGA microspheres induces protection in mice against Leishmania (Leishmania) major infection. Parasitol Res 2006; 98(6): 568-75.

[17] Pérez-Jiménez E, Kochan G, Gherardi MM, Esteban M. MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. Microbes Infect 2006; 8(3): 810-22.

[18] Maillard I, Launois P, Himmelrich H, Acha-Orbea H, Diggelmann H, Locksley RM, Louis JA. Functional plasticity of the LACK-reactive Vbeta4-Valpha8 CD4(+) T cells normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to Leishmania major in BALB/ c mice. Eur J Immunol 2001; 31(4): 1288-96.

[19] Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memry/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. Proc Natl Acad Sci 2000; 97(15): 8427-32.

[20] Skeiky YA, Ovendale PJ, Jen S, Alderson Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science 2005; 309(5733): 436-42.

[11] Mauël J. Vaccination against leishmania infections. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2002; 2(3): 201-26.

[12] Kenney RT, Sacks DL, Sypek JP, Vilela L, Gam AA, Evans-Davis K. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. J Immunol 1999; 163(8): 4481-8.

[13] Wang S, Liu X, Fisher K, Smith JG, Chen F, Tobery TW, Ulmer JB, Evans RK, Caulfield MJ. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium-or aluminum phosphate. Vaccine 2000; 18(13): 1227-35.

2003; 2(5): 705-17.

[28] Reed SG. Leishmaniasis vaccination: targeting the source of infection. J Exp Med 2001; 194(3): 331-42.

[29] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Ascadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 1990; 247(4949 Pt 1): 1465-8.

[30] Tighe H, Corr M, Roman M, Raz E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. Immunol Today 1998; 19(2): 89-97.

[31] Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heteroliogous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine 2003; 21(19-20): 2474-84.

[32] Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infection: advantages and disadvantages. Vet Parasitol 2001, 100(1-2): 3-12.

[33] Gafurov IM. Experience in controlling and preventing zoonotic cutaneous leishmaniasis in Uzbekistan. Med Parazitol (Mosk) 1999; (1): 58-9.

[34] Bray RS, Modabber F. The history of leishmaniasis. In:Gilles HM, editor. Protozoal Diseases. New York & London: Hodder Arnold Publisher 2000; p: 414-9.

[35] Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. Curr Opin Microbiol 2004; 7(4): 375-81.

[36] Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, MR, Dillon DC, Smith S, Wilson CB, Orme IM, Reed SG, Campos-Neto A. T cell expression cloning of a Mycobacterium tuberculosis gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. J Immunol 2000; 165(12): 7140-9.

[21] Kahl LP, Scott CA, Lelchuk R, Gregoriadis G, Liew FY. Vaccination against murine cutaneous leishmaniasis by using Leishmanias major antigen/liposome. Optimization and assessment of the requirement for intravenous immunization. J Immunol 1989; 142(12): 4441-9.

[22] Sambrook J, Fritsch EF Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition, Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989; p: 1659.

[23] Cobb BD, Clarkson JM. A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. Nucleic Acids Res 1994; 22(18): 3801-5.

[24] Gassra W, Hansen K. Ligation of DNA with T4 DNA ligase. In: Walkar JM, editor. Methods in Molecular Biology Vol.2 Nucleic Acids. Humana press, 1984; Chapter 32, p: 225-30.

[25] Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. Anal Biochem 1993;212(2): 394-401.

[26] Dumonteil E, McMahon-Pratt D, Price VL. Report on the fourth TDR/IDRI meeting on second generation vaccine against leishmaniasis. Merida, Yucatan, Mexico, May 1-3, 2001. Rev Biomed 2002; 13(1): 53-8.

[27] Brodskyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. Expert Rev Vaccines

186(7): 1137-47.

[38] Tapia E, Pérez-Jiménez E, López-Fuertes L, Gonzalo R, Gherardi MM, Esteban M. The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. Microbes Infect 2003; 5(2): 73-84.

Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to L. major. Vaccine 2004; 22(13-14): 1631-9.

[37] Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major. J Exp Med 1997;