کلونینگ ژن بیان کننده آنتی‌ژن سطحی ۱(SAG1) توکسوپلاسما گوندی و ترانسفورماسیون آن در دو سویه DH5a و TG1 اشرشیاکلی

کامی حسینیان خسروشاهی I

***دکتر فاطمه غفاری‌فر** II

دکتر زهره شریفی III

دکتر عبدالحسین دلیمی‌اصل IV

کاوس صلح‌جو V

چکیده

زمینه و هدف: بیماری توکسوپلاسموزیس توسط تک یاخته انگلی به نام توکسوپلاسماگوندی(Toxoplasma gondii) ایجاد می‌شود.SAG1(Surface Antigen 1)، آنتی‌ژن اختصاصی ـ مرحله‌ای است که فقط در مرحله تاکی زوئیت وجود دارد و در مراحل اسپوروزئیت و برادی زوئیت وجود ندارد و به مقدار فراوان و به طور یکنواخت بر روی سطح داخل و خارج سلولی تاکی‌زوئیت‌ها توزیع شده است. این آنتی‌ژن دارای دو گلیکوفرم است و آنتی‌ژن، کاملاً conformational است. ژن کد کننده SAG1، به صورت Single copy بوده و هیچ اینترونی ندارد. SAG1، ایمونوژنیک‌ترین ساختار تاکی‌زوئیت T.gondii است و به همین خاطر در چندین روش تشخیصی و برای تهیه واکسن نوترکیب و زیر واحدی علیه بیماری توکسوپلاسموزیس، استفاده شده و مورد توجه بوده است. هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه SAG1 در پلاسمید PTZ57R و ترانسفورم کردن پلاسمید نوترکیب در سویه‌های DH5α و TG1 باکتری‌های E.coli می‌باشد.

روش بررسی: این تحقیق یک مطالعه تجربی می‌باشد. برای این کار، ابتدا انگل توکسوپلاسما در صفاق موش سوری تکثیر داده و آنگاه انگل با PBS(Phosphate buffered saline) شستشو داده شد. جهت تهیه و نگهداری انگل، از موش سوری ماده استفاده شد. DNA(Deoxyribonucleic acid) ژنومی توکسوپلاسما، با روش فنل ـ کلر فرم، استخراج شده، سپس با کمک پرایمرهای اختصاصی ویژه ژن SAG1، ژن مورد نظر با روش PCR(Polymrase chain reaction) تکثیر شد و با استفاده از ژل آگاروز، محصول PCR، الکتروفورز شده و اندازه ژن تکثیر شده با استفاده از مارکر تعیین شد. محصول PCR با استفاده از کیت تجارتی، خالص شده و سپس به کمک آنزیم T4DNA Ligase، محصول PCR به داخل یک کلونینگ وکتور کلون شد. در نهایت پلاسمید نوترکیب به داخل سلولهای مستعد E.coli دو سوش TG1 و DH5α ترانسفورم شد.

یافته‌ها: نمونه DNA خالص سازی شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن SAG1، PCR گردید. محصول PCR به صورت یک باند ۹۶۰bp(۹۶۰ جفت باز) در ژل آگاروز ۱٪ مشاهده گردید. محصول PCR درون پلاسمید PTZ57R، کلون گردید، سپس پلاسمید نوترکیب درون باکتری اشرشیاکلی سوش‌های TG1، DH5α ترانسفورم گردید. برای شناسایی پلاسمید نوترکیب، ابتدا به کمک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب روی محیط LB جامد حاوی XGAL(5- bromo-4 chloro-3 indolyl beta diGalactopyranosid)، IPTG(Isopropyl-beta-dithio Galactopyranosid) و آمپی‌سیلین جداسازی گردیدند، سپس پلاسمید نوترکیب استخراج شد و با روش PCR، ژن مورد نظر تایید گردید. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن SAG1 تحت تاثیر برش آنزیمی قرار گرفت که قطعات ۲۹۸۲bp و ۸٦٤bp بدست آمده نیز نشانه تایید کار می‌باشد. کلونی‌های TG1 و DH5α که در محیط LB رشد کرده بودند، شمارش گردیدند و میانگین و انحراف معیار برای این دو سویه در هر پلیت براساس آزمون آماری Mannwhitny مقایسه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که پلاسمید PTZ57R و استرین TG1 اشرشیاکلی بکار رفته در این تحقیق، برای نگهداری ژن SAG1 مناسب می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: ۱ – توکسوپلاسما گوندی ۲ – آنتی‌ژن سطحی اصلی ۱(SAG1) ۳ – اشرشیاکلی(DH5α, TG1) ۴ – پلاسمید PTZ57R

تاریخ دریافت: ۸٤/٦/۲۸، تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۱۳

I) کارشناس ارشد انگل‌شناسی.

II) استادیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

III) استادیار سازمان انتقال خون، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی، بزرگراه همت، سازمان انتقال خون، تهران، ایران.

IV) استاد گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

V) دانشجوی دکترای انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.