مقاله پژوهشی

کلون کردن اپی توپ های خطی تحریک کننده ی لنفوسیت T آنتی ژن EG95 *اکینوکوکوس گرانولوزوس* در وکتور pGEX4t1 و بررسی بیان آن با روش SDS-PAGE

رقیه مصری[۱]، مجید اسمعیلی‌زاد[۲*]، مژگان احمدزاده[۱]، سمیه محمدی[۱]، سید عبدالحمید انگجی[۱]، زهرا یزدان‌پور[۲]، سیده فهیمه میرحقگوی جلالی[۲]

۱- گروه آموزشی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- بخش آزمایشگاه مرکزی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* عامل بیماری مشترک بین انسان و دام به نام کیست هیداتیک یا هیداتیدوزیس است؛ موفق‌ترین واکسن نوترکیب علیه این بیماری از کلون کردن ژن کد کننده آنتی‌ژن ۲۵ کیلو دالتونی آن یعنی EG95 در وکتور pGEX می‌باشد که ایمنی سلولی و همورال قابل‌توجهی را در گوسفندان ایجاد کرده است اما با توجه به نقش ایمنی سلولی TH1 در غلبه بر این بیماری و نقش اپی‌توپ‌های خطی در تحریک این نوع سیستم ایمنی جهت بهینه‌سازی شرایط واکسن موجود در مطالعه حاضر تنها توالی کد کننده اپی‌توپ‌های خطی تحریک‌کننده لنفوسیت T این آنتی‌ژن کلون و بیان شد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از نرم‌افزار IEDB توالی کد کننده‌ی اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن EG95 پیش‌بینی و سنتز شد. تکثیر قطعه موردنظر با PCR انجام و بعد از هضم آنزیمی آن و وکتور pGEX4T1 با آنزیم *xhoI* در وکتور با روش شوک حرارتی کلون گردید. کلونی‌های مثبت با روش colony PCR با استفاده از پرایمرهای مختلف انتخاب‌شده و بیان پروتئین نوترکیب در سلول BL21 با 10%SDS-PAGE موردبررسی قرار گرفت.

نتایج: تکثیر توالی کد کننده اپی‌توپ‌های EG95 با PCR انجام و قطعه موردنظر در وکتور pGEX4T1 کلون گردید. تأیید پلاسمید نوترکیب با colony PCR و اختلاف اندازه وکتور طبیعی و نوترکیب صورت گرفت. بیان پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن نیز به‌وضوح با SDS-PAGE مشخص شد.

نتیجه‌گیری: قطعه EG95 به‌طور موفقیت‌آمیزی در وکتور pGEX4T1 کلون و در سلول BL21 بیان شد.

کلمات کلیدی: واکسن‌های اپی‌توپی، لنفوسیت T، آنتی‌ژن EG95، کیست هیداتیک

مقدمه

کیست هیداتیک یا هیداتیدوزیس یکی از بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و دام است که توسط لارو مهم‌ترین کرم نواری کوچک در پزشکی به طول ۲ الی ۷ میلی‌متر به نام *اکینوکوکوس گرانولوزوس* ایجاد می‌شود (۱، ۲). تاکنون تعداد مبتلایان به این بیماری در جهان سه میلیون نفر گزارش‌شده که بیشتر آن‌ها در مناطق معتدل جهان مثل کشورهای شرق اروپا و شرق آسیا مثل چین و استرالیا که دام‌پروری رایج است و یا خانواده‌ها اقدام به نگهداری سگ در منزل می‌نمایند زندگی می‌کنند (۳) و سالانه خسارت‌های اقتصادی زیادی را در زمینه تولید محصولات دامی مانند کاهش شیر، پشم، چرم، کاهش کیفیت گوشت به همراه هزینه‌های تشخیص و درمان به این مناطق وارد می‌کند (۴)؛ دراین‌بین کشور ایران نیز طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی جز مناطق اندمیک محسوب می‌شود و استان‌های خراسان، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، همدان و اردبیل ازجمله استان‌های هایپر اندمیک به شمار می‌روند (۵).

چرخه زندگی این انگل در دو میزبان اصلی و واسط سپری می‌شود که سگ و سگ‌سانان به‌عنوان میزبان اصلی و نشخوارکنندگان به‌عنوان میزبان واسط و انسان به‌عنوان میزبان واسط اتفاقی برای این انگل می‌باشند که انگل در میزبان اصلی بیماری خاصی را ایجاد نمی‌کند اما در میزبان واسط سبب بروز

* **نویسنده مسئول: مجید اسمعیلی زاد**، بخش آزمایشگاه مرکزی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
Email:m.esmaelizad@rvsri.ac.ir

مشکلاتی مثل تشکیل کیست در اندام‌های خاص مانند کبد و گاهی ریه، قلب، کلیه و مغز می‌شود (۱، ۶). این بیماری با جراحی و استفاده از داروهای شیمیایی مثل آلبندازول، مبندازول و پرازی کوانتل تا حدودی قابل‌درمان است که معمولاً هزینه‌های بالایی را به همراه داشته و از طرفی در مواردی مثل وجود کیست در اندام‌های حساسی مانند قلب و یا بارداری امکان جراحی و شیمی‌درمانی بسیار کم است که اهمیت پایه‌گذاری برنامه‌های کنترل، پیش‌گیری و تهیه واکسن مناسب برای مقابله با این عفونت انگلی و بسیاری از عفونت‌های انگلی دیگر که از بین ۶ بیماری مهم جهان ۵ مورد را به خود اختصاص داده‌اند مطرح می‌شود (۷-۹)؛ نقطه آغاز مطالعه‌های انجام‌شده در رابطه با این عفونت از سال ۱۹۹۶ با واکسن نوترکیب بر پایه یکی از آنتی‌ژن‌های مرحله انکوسفری انگل با عنوان EG95 بود که در واکسیناسیون گوسفندان در نیوزلند نتایج بسیار چشم‌گیری را نشان داد و در سال‌های بعد تحقیقات انجام‌شده در آرژانتین، ایتالیا، استرالیا و چین نیز حفاظت بالای ایجادشده توسط این واکسن علیه سروتیپ G1 را تأیید کردند (۱۰، ۱۱) اما مطالعه بیماران تحت جراحی قرارگرفته به‌منظور بررسی تشکیل مجدد کیست نه‌تنها در کبد بلکه در قسمت‌های دیگر بدن نشان از تأثیر مثبت پاسخ ایمنی سلولی Th1 جهت غلبه بر این بیماری در افراد مقاوم بوده که واکسن حاضر علاوه بر تحریک این نوع سیستم ایمنی، پاسخ ایمنی همورال را نیز تحریک می‌کند که ایمنی همورال با تولید ایمنوگلوبولین‌ها از طریق سمیت سلولی تعدیل‌شده وابسته به آنتی‌بادی که یک مکانیسم وابسته به Th2 است عمل کرده و اینترلوکین ۴ ترشح‌شده از Th2 مانع تمایز سلول‌های Th0 به Th1 می‌شود (۱۲، ۱۳)؛ لذا در پروژه‌ی حاضر با توجه به این مسئله و با در نظر گرفتن این نکته که مطالعه‌های انجام‌شده در رابطه با این آنتی‌ژن نشان‌دهنده‌ی سه ناحیه غالب متصل شونده به آنتی‌بادی روی پروتئین نوترکیب EG95 بوده که ایمنی‌زایی آن بیشتر ناشی از این اپی‌توپ‌های خطی می‌باشد (۱۴) به‌منظور بهینه‌سازی طراحی و تعدیل شرایط مطلوب واکسن موجود توالی کد کننده این اپی‌توپ‌های خطی (تحریک‌کننده لنفوسیت‌های T) آنتی‌ژن در وکتور بیانی pGEX4T1 کلون شده و بیان آن با روش SDS-PAGE بررسی گردید که پروتئین نوترکیب بیان بسیار مطلوبی را در سلول BL21 نشان داد.

مواد و روش‌ها

سنتز و تکثیر

ابتدا توالی کد کننده اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن EG95 به‌صورت متصل به توالی کد کننده چند پپتید دیگر انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس توسط نرم‌افزار ایمنوانفورماتیکی IEDB پیش‌بینی‌شده و توسط شرکت آلمانی سنتز و پس‌ازآن پرایمرهای متناسب دارای جایگاه برش آنزیم محدودکننده *XhoI* برای قسمتی از قطعه سنتتیک کد کننده اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن EG95 با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیکی (Oligo 5) طراحی و توسط شرکت کانادایی (canada) سنتز شد.

واکنش PCR

واکنش PCR در حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر که حاوی ۱۰ پیکومول از هریک از پرایمرهای رفت با توالی 5'-TGCTCGAGGAATTCATGGAAGCAGCAGC-3' برگشت با توالی 5'-CTCGAGGCTAAACACAAAGCCCGCAATC-3'، یک میلی مولار مخلوط dNTPs (شرکت فرمنتاز)، یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۴ میکرولیتر بافر 10x PCR و ۱/۵ میلی-مولار Mg (شرکت سیناژن) و آب دو بار تقطیر تحت شرایط: دمای واسرشته (denaturation) اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه ساتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و طویل شدن (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در دستگاه PCR (شرکت eppendorf) انجام‌شده و تائید آن با الکتروفورز شدن ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۶۵ صورت گرفت.

کلونینگ

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری با سه میکرولیتر بافر 10x، ۱ میکرولیتر آنزیم *XhoI* (۱۰ واحد شرکت فرمنتاز) و ۱۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر جهت هضم آنزیمی مخلوط شده و پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت، به‌منظور غیرفعال شدن آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. هضم آنزیمی وکتور

pGEX4T1 تخلیص شده با روش جدید سمبروک همراه با استفاده از $CaCl_2$ و PEG6000 جهت حذف RNAهای با وزن-های مولکولی متفاوت است (۱۵، ۱۶) نیز طبق شرایط هضم محصول PCR انجام و جهت تائید در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (ولتاژ ۸۰)؛ پس از تائید هضم کامل وکتور ۱۵ میکرولیتر از آن با ۱۰ میکرولیتر محصول PCR در یک واکنش ۳۰ میکرولیتری با ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase(۵واحد شرکت فرمنتاز) جهت اتصال مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، درنهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول اتصال (لیگاسیون) با روش شوک حرارتی (دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه) به سویه HB101 سلول‌های E.coli منتقل و در محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

انتخاب کلونی مثبت و توالی یابی

جهت انتخاب کلونی‌های مثبت ابتدا با پرایمرهای رفت‌وبرگشت قطعه موردنظر و سپس پرایمر رفت قطعه موردنظر و برگشت T7 بر روی کلنی‌های رشد کرده به روش مستقیم PCR انجام شد و پس از تائید اولیه کلنی مثبت، از کلونی موردنظر کشت مایع تهیه‌شده و پس از تخلیص وکتور نوترکیب با روش جدید سمبروک و تکرار واکنش PCR روی وکتور نوترکیب تخلیص شده، در پایان تائید نهایی کلونینگ با توالی یابی توسط شرکت کره‌ای ماکروژن انجام گردید.

بیان پروتئین نوترکیب

به‌منظور بیان پروتئین نوترکیب ابتدا ۵۰ نانوگرم از وکتور نوترکیب و وکتور طبیعی به روش شوک حرارتی هرکدام جداگانه به ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد BL21 که با روش $CaCl_2$ آماده‌شده انتقال داده و پس از رشد در محیط LB آگار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، یک کلونی تک از هرکدام انتخاب و کشت اولیه آن در ۵ میلی‌لیتر محیط 2YT حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰g/mlμ) به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد به ۵۰ میلی‌لیتر محیط 2YT حاوی آمپی‌سیلین منتقل و پس از کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار زمانی که OD600 آن به ۰/۹ رسید به هر دو نمونه IPTG (غلظت نهایی ۰/۴ mM) اضافه‌شده و در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ و یک over night از کشت‌ها نمونه‌برداری انجام و پس از رسوب‌گیری با میکروسانتریفوژ، رسوب نمونه‌ها در ۵۰ میکرولیتر بافر PBS1% و ۸۰ میکرولیتر sampel بافر (SDS٪۲، گلیسرول ٪۳۰، tris 0.05 M pH=6.8 ٪۱۰، بروموفنول آبی) و ۷/۵ میکرولیتر بتا- مرکاپتواتانول حل‌شده و پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس میکروسانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه، در ژل SDS-PAGE 10% با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۶ ساعت الکتروفورز شد.

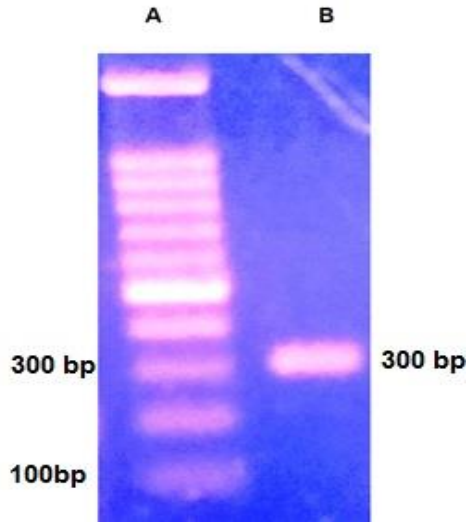


شکل۱- توالی DNA و پروتئینی کد کننده اپی توپ‌های خطی پیش‌بینی‌شده آنتی ژن EG95 اکینوکوکوس گرانولوزوس

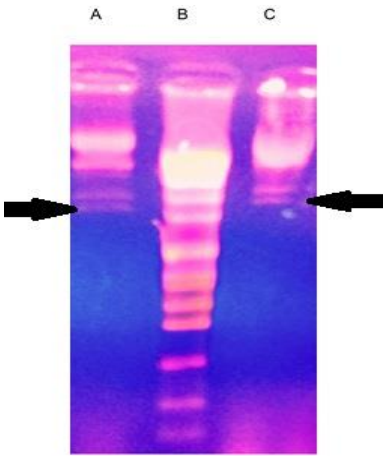
نتایج

PCR

توالی DNA ویژه کد کننده‌ی اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن EG95 انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* همراه با توالی پرایمرها و جایگاه برش آنزیم *XhoI* و توالی پروتئینی آن در شکل ۱ و تکثیر کامل و اختصاصی این توالی از روی توالی سنتتیک که با روش PCR انجام‌شده در شکل ۲ با وزن مولکولی ۳۰۰ جفت باز نشان داده‌شده است.



شکل ۲- محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد
A سایز مارکر DNA 100bp (شرکت سیناژن)
B محصول PCR با سایز ۳۰۰ bp



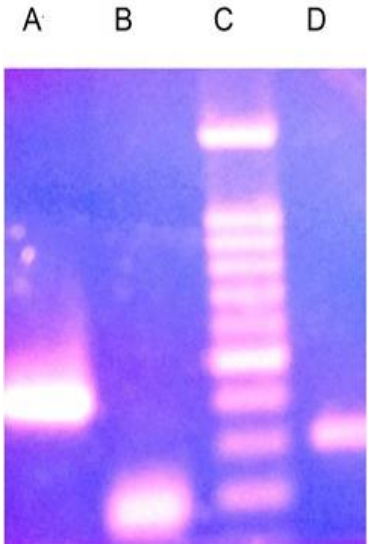
شکل ۳- مقایسه سوپرکویل وکتور نوترکیب و طبیعی
A: وکتور طبیعی-pGEX4T1 (بدون قطعه ورودی)
B: سایز مارکر 500bp DNA (شماره ۷ شرکت فرمنتاز)
C: وکتور pGEX4T1- نوترکیب

تائید کلونینگ و ساخت وکتور نوترکیب pGEX4T1-ChEg95

محصول PCR در ناقل بیانی pGEX4T1 کلون شده و پس از تائید اولیه با روش کلونی PCR، پلاسمید نوترکیب با روش جدید لیز قلیایی که همراه با استفاده از $CaCl_2$ و PEG6000 است تخلیص و به‌منظور تائید مجدد به همراه وکتور طبیعی در ژل آگارز ۱ درصد همراه با سایز مارکر ران شد که اختلاف اندازه بین سوپرکویل آن و وکتور طبیعی نشانگر تائید صحت کلونینگ بوده که در شکل ۳ نشان داده‌شده است و همان‌طور که در باند C مشخص است وکتور نوترکیب کمی سنگین‌تر از وکتور طبیعی است.

تأیید جهت قطعه ورودی

PCR انجام‌شده با وکتور نوترکیب تخلیص شده همراه با پرایمر رفت EG95 و برگشت T7 و PCR انجام‌شده روی وکتور طبیعی همراه با پرایمر رفت‌وبرگشت T7 به‌خوبی نشانگر تائید صحت قطعه ورودی بوده و همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است PCRبا پرایمرهای عمومی T7 قطعه‌ای به طول ۱۰۰ جفت باز و PCR با پرایمر رفت EG95 و برگشت T7 قطعه‌ای به طول ۴۰۰ جفت باز را نشان می‌دهند که اختلاف اندازه محصولات گواه دیگری بر صحت جهت قطعه ورودی است.

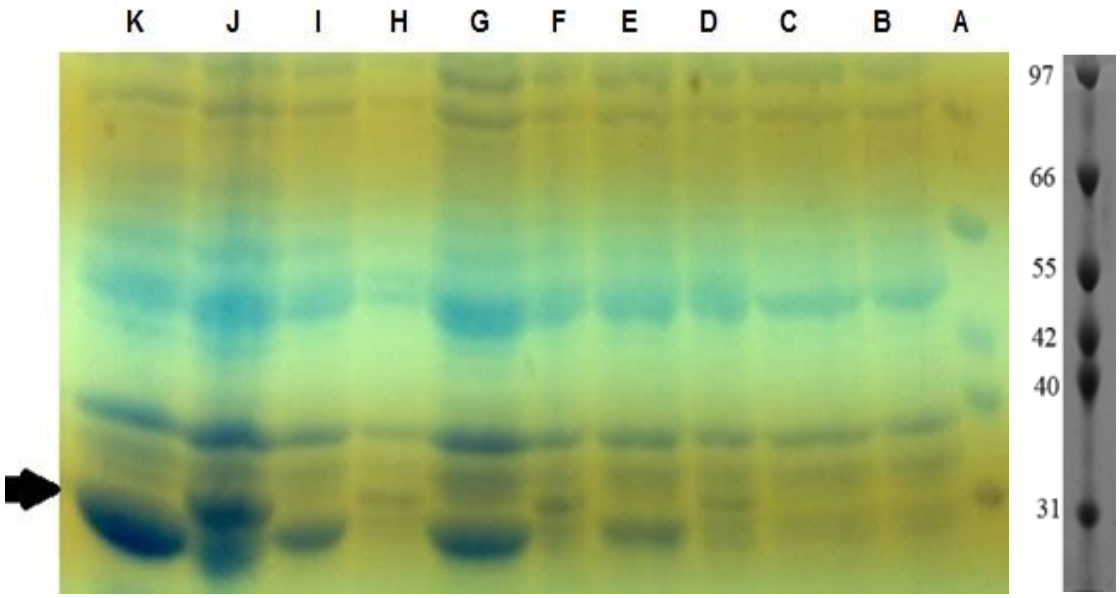


شکل ۴: محصول PCR در وکتور نوترکیب
A: محصول PCR با پرایمر برگشت T7 و پرایمر رفت EG95 با سایز ۴۰۰ bp، B: محصول PCR با پرایمر رفت‌وبرگشت T7 با سایز ۲۰۰bp (در وکتور طبیعی)، C: سایز مارکر ۱۰۰bp شرکت سینا ژن
D: محصول PCR با پرایمر رفت‌وبرگشت EG95

بیان پروتئین نوترکیب

بیان پروتئین نوترکیب در سلول BL21 درصورتی‌که کلونینگ صحیح انجام‌شده یعنی جهت قطعه ورودی و درنتیجه قالب خواندن آن صحیح باشد به‌صورت متصل به پروتئین GST انجام خواهد شد که نتایج حاصل از ژل SDS-PAGE به‌وضوح نشانگر تائید صحت کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب موردنظر است که اختلاف اندازه بین پروتئین نوترکیب متصل به GST-Tag و خود پروتئین GST به تنهایی در تمام زمان‌ها نشانگر صحت سنتز پروتئین نوترکیب و حداکثر غلظت آن در زمان Over night است.

روش یعنی واکسن معطوف داشته که Heath و همکاران در سال ۱۹۹۶ با انجام مطالعاتی در رابطه با پپتیدهای آنتی‌ژنیک انکوسفر انگل، نشان دادند که آنتی‌ژن‌های ۲۳، ۲۵، ۳۴، ۳۰ و ۴۰ کیلو دالتونی پاسخ حفاظتی خوبی ایجاد می‌کنند. سریع-ترین پاسخ آنتی‌بادی در برابر آنتی‌ژن‌های ۱۳ و ۲۵ کیلو دالتونی است و به دنبال آن مؤثرترین واکسنی که امروزه نیز بسیار مطرح است توسط Lightowlers و همکاران بر اساس آنتی‌ژن ۲۵ کیلو دالتونی مرحله انکوسفری این انگل یعنی آنتی‌ژن EG95 طراحی و ساخته شد (۱۰، ۱۷). تأثیر این واکسن در گوسفندان آلوده چندین کشور دیگر همراه با



شکل۵: محصولات بیان پروتئین نوترکیب در SDS-PAGE. A: سایز مارکر Mid range پروتئین (شرکت Promega)، B: محصولات پروتئین حاصل از تخلیص کشت سلول Bl21 حاوی وکتور pGEX4T1 طبیعی در زمان. C: محصولات پروتئین حاصل از تخلیص کشت سلول bl21 حاوی وکتور pGEX4T1 نوترکیب در زمان. باندهای D، F و H محصولات پروتئینی کشت حاوی وکتور نوترکیب به ترتیب در زمان ۳، ۲ و ۴ (پس از اضافه کردن IPTG). باندهای E، G و I محصولات پروتئینی کشت حاوی وکتور طبیعی به ترتیب در زمان ۳، ۲ و۴. J: محصولات پروتئینی حاصل از کشت Over night سلول BL21 حاوی وکتور نوترکیب. K: محصولات پروتئینی حاصل از کشت Over night سلول BL21 حاوی وکتور طبیعی

بحث و نتیجه‌گیری

هیداتیدوزیس یکی از بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و دام است که موجب خسارات بهداشتی و اقتصادی فراوان در نواحی اندمیک می‌شود؛ لذا مقابله با آن امری مهم و ضروری است. تاکنون از روش‌های متنوعی در مقابله با این بیماری استفاده‌شده اما محدودیت‌های روش‌های درمانی موجود توجه دانشمندان و محققین را به مناسب‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین

مطالعات انجام‌شده توسط Chow و همکاران در رابطه با ژنوم انگل نشان داد ژن کد کننده آنتی‌ژن EG95 مربوط به یک خانواده ژنی، دارای هفت ژن است که از نظر توالی و ساختار تا حدود زیادی بین اکثر سروتیپ‌های این انگل حفاظت‌شده و در نتیجه این احتمال وجود دارد که بتواند پاسخ ایمنی چشم‌گیری را علیه سروتیپ‌های متفاوت این انگل ایجاد نماید (۱۸، ۱۹)؛ لذا بیشتر مطالعات در رابطه با طراحی و ساخت واکسن علیه

کیست هیداتیک را غالباً بر پایه این آنتی‌ژن و توسعه این واکسن نوترکیب سوق دادند. پیچیده بودن سیر تکاملی انگل‌ها، داشتن چندین فرم و استراتژی‌های زیرکانه به‌منظور فرار از سیستم ایمنی میزبان، انتخاب آنتی‌ژن‌های مطلوب به‌عنوان کاندید برای طراحی و تهیه واکسن علیه این انگل و بسیاری از انگل‌های دیگر را با مشکلاتی همراه ساخته است. تحقیقات در مورد بسیاری از بیماری‌های انگلی مثل مالاریا، شیستوزوما و لیشمانیا مبنی بر مؤثر بودن استفاده ترکیبی از آنتی‌ژن‌های مختلف مراحل زندگی انگل، مطالعه محققین فعال درزمینهٔ کیست هیداتیک را نیز به سمت طراحی واکسن بر اساس آنتی‌ژن‌های مختلف انگل مثل EgTrp-EgA31 و Eg95-EgA31 جهت داد که در سطح حیوانات مدل آزمایشگاهی نتایج مطلوبی را نیز نشان دادند (۲۰-۲۳)، اما با پیشرفت مطالعات درزمینهٔ درمان بیماری‌های انگلی مشخص شد که غلبه بر این بیماری‌ها مستلزم تحریک پاسخ ایمنی Th1 است که با تولید سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN-α) به‌عنوان تحریک‌کننده ماکروفاژی و لنفوتوکسین α (TNF-α) و IL-2 عمل می‌کند (۱۲، ۲۴)؛ لذا ادامه مطالعات همراه با پیشرفت‌های حاصل در علوم ایمنی‌شناسی، سلولی و مولکولی و بیوتکنولوژی و نیز شناسایی و درک کامل از پاسخ ایمنی ایجادشده در پی واکسیناسیون مطالعه محققین جهت تهیه واکسن علیه بیماری‌های انگلی را به سمت طراحی و ساخت واکسن‌هایی بر اساس نواحی اپی‌توپی تحریک‌کننده پاسخ Th1 معطوف ساخت که در رابطه با مالاریا به‌عنوان کشنده‌ترین بیماری انگلی نتایج بسیار مطلوبی را نشان داده است؛ لذا با توجه به این مطالب و مطالعات Woollardو همکاران مبنی بر ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های خطی واکسن نوترکیب EG95 (۱۴، ۲۵)، Xiumin MA و همکاران در سال ۲۰۱۳ ترکیب نواحی اپی‌توپی سلول‌های B و T آنتی‌ژن EG95 را پیشنهاد کرده و اسمعیلی‌زاد و همکاران نیز با ترکیب نواحی اپی‌توپی این آنتی‌ژن همراه با چند آنتی‌ژن دیگر انگل توانستند ایمنی مطلوبی را در حیوانات مدل آزمایشگاهی القا نمایند (۲۶، ۲۷). بنابراین با توجه به پیشینه مطالعات و آزمایش‌های صورت گرفته، برای بهینه‌سازی کارآمدترین و پر-مصرف‌ترین واکسن علیه کیست هیداتیک در تحقیق حاضر فقط اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن Eg95 با هدف تحریک پاسخ ایمنی Th1 در وکتور $pGEX4T_1$ کلون گردید و بیان مطلوب آن نیز با روشSDS-PAGE تأیید شد که در مراحل بعدی آزمایش پاسخ ایمنی القاشده با این سازه نوترکیب موردبررسی و با پاسخ ایمنی حاصل از DNA واکسن طراحی و ساخته‌شده بر اساس همین آنتی‌ژن توسط همین گروه در این آزمایشگاه بر حیوانات مدل آزمایشگاهی با هدف انتخاب مناسب‌ترین گزینه، مورد مقایسه قرار خواهد گرفت و در صورت امکان القا پاسخ ایمنی در نشخوارکنندگان نیز موردبررسی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پروژه‌ی تحقیقاتی بخش آزمایشگاه مرکزی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج است؛ بدین‌وسیله نویسنده از تمامی همکاران و کارکنان بخش به‌پاس همکاری، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام ننموده اند.

References

1. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis. IJID. 2009; 13(2): p. 125-133.
2. Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis old problems and new perspectives. IPID. 2009; p 1-7.
3. Grosso G, Marventano S, Mistretta A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. WJG. 2012; 18(13): p. 1425-37.
4. Harandi MF, Budke CM, Rostami S. The monetary burden of cystic echinococcosis in Iran. PNTD. 2012; 6(11): p. 1915.
5. Tavakoli H, Bayat M, Kousha A. Hydatidosis infection study in human and livestock populations during 2002-2007. AEAES. 2008;4(4): p. 473.7
6. Lafci H. Unusual localizations of hydatid disease. AMA. 2003; 30(2): p. 61-64.

7. Falagas ME, Bliziotis IA. Albendazole for the treatment of human echinococcosis: a review of comparative clinical trials. AJMS. 2007; 334(3): p. 171-179.
8. Buttenschoen K, Buttenschoen DC. Echinococcus granulosus infection: the challenge of surgical treatment. LAS. 2003; 388(4): p. 218-230.
9. Rozanes I, Guven K, Acunas B, Emre A. Cystic echinococcal liver disease new insights into an old disease and an algorithm for therapy planning. CAIR. 2007; 30(6): p. 1112-1116.
10. Lightowlers M, Lawrence S, Gaucci C, Young J, Ralston M, Mass D, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. PI. 1996; 18(9): p. 457-462.
11. Heath D, Jensen O, Lightowlers M. Progress in control of hydatidosis using vaccination a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. AT. 2003; 85(2): p. 133-143.
12. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, Donald P, Manus Mc. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. CADI. 2012; p. 1-10.
13. Al-Qaoud KM, Abdel-Hafez SK. The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis. PR. 2008; 102(6): p. 1151-1155.
14. Woollard D, Gauci C, Heath D, Lightowlers M. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. PI. 1998; 20(11): p. 535-540.
15. Sauer ML, Kollars B, Geraets R, Sutton F. Sequential CaCl $_2$, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. AB. 2008; 380(2): p. 310-314.
16. Mesri R, Esmaelizad M, Angaji SA, Tahmaseb M, Ahmadzadeh M, Mohammadi S. Prediction and cloning linear Tcell epitopes of P14-3-3 antigen into pEGFP–N1 as a DNA vaccine model to induse immuno response against hydatidosis and it's expression in CHO cell line. Armaghan danesh. 2015. 20(8).666-676. [In persian]
17. Heath DD, Lawrence SB. Antigenic polypeptides of Echinococcus granulosus oncospheres and definition of protective molecules. PI. 1996;18(7): p. 347-357.
18. Chow C, Gauci CG, Cowman A, Lightowlers M. A gene family expressing a host-protective antigen of Echinococcus granulosus. MABP.2001; 118(1):p. 83-88.
19. Chow C, Gauci GC, Vural G, Jenkins DJ, Heath DD, Rosenzvit MC, et al. Echinococcus granulosus variability of the host-protective EG95 vaccine antigen in G6 and G7 genotypic variants. Ep. 2008; 119(4): p. 499-505.
20. Rogers WO, Baird JK, Kumar A, Tine J, Weiss W, Aguiar JC, et al. Multi stage Multi antigen Heterologous Prime Boost Vaccine for Plasmodium know lesi Malaria Provides Partial Protection in Rhesus Macaques. IAI. 2001; 69(9): p. 5565-5572.
21. Zhang Y, Taylor MG, Johansen MV, Bickle QD. Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against Schistosoma japonicum infection. Vaccine, 2001; 20(5): p. 724-730.
22. Fraize M, Sarciron ME, Azzouz S, Issaadi N, Bosquet G, Petavy AF. Immunogenicity of two Echinococcus granulosus antigens EgA31 and EgTrp in mice. PR. 2005; 96(2): p. 113-120.
23. Zhou BY, Chen YT, Wen-gui L, Yang M. Construction and identification of the recombinant fusion gene vaccine Bb-Eg95-EgA31 of Echinococcus granulosus. CJOZ. 2009; 6: p. 004.
24. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Th1 and Th2 inducing cytokines in Cystic echinococcosis. TPDl. 2005; 29(3): p. 167-170.
25. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. MJ. 2012; 11(1): p. 1.
26. Ma X, Zhou X, Zhu Y, Li Y, Wang H, Mamuti W, et al. The prediction of T-and B-combined epitope and tertiary structure of the Eg95 antigen of Echinococcus granulosus. ETM. 2013; 6(3): p. 657-662.
27. Esmaelizad M, Ahmadian Gh, Aghaiypour Kh, Shamsara M, Paykari H, Tebianian M. Induction of protective T-helper 1 immune responses against Echinococcus granulosus in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. MIOC. 2013; 108(4): p. 408-413.
16. Mitsuhata H, Shimizu R, Yokoyama MM. Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. Int J Immunopharmacol. 1995;17(6):529–534.
17. Helmy SA, Al-Ayah RJ. The immunomodulatory effects of prolongedintravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. Anesthesia. 2001;56(1):4-8.
18. Hu Y, Liang D, Li X, Liu HH, Zhang X, Zheng M, et al. The role of interleukin-1 in wound biology. Part I: Murine in silico and in vitro experimental analysis. Anesth Analg. 2010;111(6):1525-33.
19. González-Correa JA, Cruz-Andreotti E, Arrebola MM, López-Villodres JA, Jódar M, De La Cruz JP. Effects of propofol on the leukocyte nitric oxide pathway: in vitro and ex vivo studies in surgical patients. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2008;376(5):331-339.
20. Chin GA, Diegelmann RF, Schultz GS. Cellular and molecular regulation of wound healing. Basic. Clinical Dermatol.2005;33(3):17-39.

Original Article

Cloning of Linear T-cell Epitopes of EG95 Antigen of *Echinococcus Granulosus* into pGEX4t1 Vector and Expression Analysis by SDS-PAGE

Mesri R[1], Esmaelizad M[2*], Ahmadzadeh M[1], Mohammadi S[1], Angaji SA[1], Yazdanpour Z[2], Mirhaghgo Jalali F[2]

1- Department of Cellular & Molecular, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Central lab, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

Received: 09 Feb 2015 Accepted: 14 Jun 2016

Abstract

Background & Objectives: *Echinococcus granulosus* causes a common disease between humans and animals that called hydatid cyst or hydatidosis. The recombinant EG95 vaccine based on cloning of the 25 KD oncospheral antigen-Eg95- in pGEX stimulated significant humoral and cellular immunity in sheep, but regarding the effect of TH1cell immunity against this parasite and the influence of the linear T-cell epitopes in stimulating this immunity, only the coding sequence of linear T Cell epitopes of EG95 was cloned in pGEX and analyzed its expression to optimize the qualification of this available vaccine in this study.

Materials & Methods: The coding sequence of EG95 linear epitopes by IEDB software were predicted and synthesized. After PCR, the amplicon and pGEX4T1 were digested by *xhoI* restriction enzyme, the fragment was cloned into pGEX4T1 by heat shock method, and Positive colonies were selected by direct PCR with specific primers. The recombinant protein expression was evaluated in BL21 cells by 10% SDS-PAGE.

Results: The coding sequence of EG95 linear T-cell epitopes was amplified by PCR and cloned into pGEX4T1 vector. The recombinant plasmid was selected with Colony PCR and size difference between intact and recombinant purificated vectors. Recombinant protein expression with high significant concentration was recognized by SDS-PAGE.

Conclusion: The EG95 linear T-cell epitopes coding sequence has been successfully cloned into pGEX4T1 vector and expressed into BL21 cells.

Keywords: EG95 antigen, Epitope vaccine, Hydatid cyst, T lymphocyte

***Corresponding author: Majid Esmaeilizad,** Central lab, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.
Email: m.esmaelizad@rvsri.ac.ir,

Journal of Fasa University of Medical Sciences 6 (2016): 311-318