دستیابی به تهیه پروتئین نوترکیب تیلریا آنولاتا از بیوپسی عقده لنفاوی گوساله آلوده

پرویز شایان

خلاصه

تیلریا آنولاتا عامل تیلریوز در گاو از طریق کنه از حیوان آلوده به حیوان دیگر منتقل شده و سالانه خسارات اقتصادی زیادی را در صنعت دامداری وارد می‌سازد. در حال حاضر تنها راه پیشگیری این بیماری استفاده از واکسن تخفیف حدت یافته سلول‌های آلوده به ماکروشیزونت می‌باشد. بسیاری از محققین بدنبال دستیابی به واکسن نوترکیب می‌باشند که به علت سهولت در کاربرد و عدم ایجاد آلودگی، از مزیت بالاتری نسبت به واکسن تخفیف حدت یافته برخوردار می‌باشد(۱). در مطالعه حاظر سعی شد که از مقدار کم نمونه اخذ شده از عقده لنفاوی گوساله آلوده به تیلریا آنولاتا ژن‌های کاندید برای واکسن نوترکیب شناسایی و کلون گردند.

مواد و روش کار: SMART-DS-cDNA از عقده لنفاوی گوساله آلوده به تیلریا آنولاتا تهیه گردید. سپس این cDNA توسط آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های غشاء تیلریا TaSp و TaD و نیز hsp70 با روش PCR تکثیر داده شد. ژن هایTaSp و TaD پس از کلون شدن در *pTZ57R/T* تعیین توالی و با توالی‌های مربوطه در بانک ژنتیک مقایسه شدند. ژن TaSp در وکتور pQE32 کلون و پروتئین نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱. مرکز کنه و بیماری‌های منتقله از آن، گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. مؤسسه گروه پژوهشی انتقال سامانه‌های زیست مولکولی

*نویسنده مسؤول: **pshayan@ut.ac.ir**

نتیجه و بحث: برای کلون کردن ژن‌های اختصاصی انگل تیلریا نیاز به مقدار کافی از سلول آلوده به آن انگل می‌باشد. تجزیه و تحلیل بیان ژن در مقدار کم ماده بیولوژیک آلوده به انگل یکی از مشکلات بزرگ محققین است. روش استاندارد northern blot جهت مطالعات بیان ژنی نیاز به ۱۰ تا ۱۵ میکروگرم RNA و یا ۱ تا ۴ میکروگرم mRNA دارد. روش RNAse protection assay نیاز به حداقل ۱ میکروگرم جهت تأیید بیان ژن تفریقی دارد. روش RT-PCR به‌عنوان روشی مناسب جهت تهیه cDNA و آنالیز آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. متأسفانه در این روش مخصوصاً برای ژن‌های کد کننده برای پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا تبدیل mRNA به cDNA می‌تواند به صورت ناکامل صورت گیرد. در روش سنتز SMART cDNA تمام mRNAها به صورت کامل زه cDNA تبدیل می‌گردند (۲). در این روش از آغازگر اولیگو (dT) اختصاصی جهت هیبردیزاسیون کل mRNA ها و آنزیم Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase MMLV-RT جهت واکنش RT استفاده می‌شود. زمانی که cDNA در حال سنتز به ناحیه پایانه ۵` mRNA مربوطه رسید، این آنزیم یک تعداد نوکلئوتید dC به cDNA اضافه می‌کند. یک اولیگونوکلئوتید اختصاصی که دارای چند نوکلئوتید dG در ناحیه پایانه ۳` خود دارد، با اولیگو dC از cDNA هیبرید شده و به عنوان الگو عمل کرده و آنزیم توالی مکمل آنرا به cDNA اضافه می کند. بدین صورت تمام cDNA های سنتز شده دارای توالی مشخص و تعیین شده‌ای در هر دو پایانه خود می‌باشند که به عنوان الگو برای آغازگر عمل کرده و تمام cDNAها را با روش PCR قابل تکثیر می‌کند. بدین‌صورت می‌توان cDNA نسخه‌برداری شده از mRNA را به هر اندازه‌ای که مورد نیاز باشد، تکثیر نمود. در مطالع حاضر بیوپسی به دو قسمت تقسیم شد. یک قسمت برای تأیید آلودگی بیوپسی به تلیریا آتولاتا مورد استفاده قرار گرفت. پس از تأیید آلودگی بیوپسی به تیلریا آنولاتا با استفاده از روش PCR، از قسمت دیگر RNA تهیه و برای سنتز SMART-cDNA دو رشته‌ای مورد استفاده قرار گرفت. دو میکرولیتر از SMART-cDNA دو رشته‌ای بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت و آنالیز ژل آگارز نشان داد که cDNA از mRNA تولید شده است. سپس ژن hsp70 به‌عنوان نمونه جهت کنترل سنتز کامل cDNA از mRNA مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور آغازگرهای متعددی طراحی و ۶ ناحیه مختلف این ژن با ناحیه‌های همپوشان با روش PCR تکثیر داده شد. نتایج نشان داد که cDNA مربوط به ژن hsp70 به‌طور کامل سنتز شده است. باندهای تکثیر داده شده ۱۴۰۱ جفت باز، ۷۳۴ جفت باز، ۶۴۱ جفت باز، ۵۴ جفت باز و ۵۰ جفت باز بودند. سپس با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های TaSp و TaD که پروتئین‌های غشاء شیزونت را کد می‌کنند، با روش PCR مورد تکثیر قرار گرفتند. محصولات PCR مربوطه ۹۴۱ جفت باز برای ژنTaSp و ۵۳۳ جفت باز برای ژن TaD بود که تولید شدند. سپس با طراحی آغازگرهای مناسب محصولات PCR به بزرگی ۷۰۴ جفت باز برای ژن TaSp و ۵۳۳ جفت باز برای ژن TaD در وکتور غیر بیانی pTZ57R/T کلون و تعیین توالی نوکلئوتیدی گردیدند. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کلون شده با توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مربوطه در بانک ژنتیک نشان داد که ژن TaSp ۹۴ درصد هومولوژی با ژن TaSp تیلریا آنولاتا ثبت شده در بانک ژنتیک تحت AJ۳۱۶۲۴۹,۱ (۳) و نتایج مربوط به توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن TaD در دست انجام می‌باشد. پس از آن محصول PCR مربوط به ژن TaSp در وکتور بیانی pQE-32 کلون گردید و پروتئین نوترکیب تهیه شد. آزمایش western blot نشان داد که سرم حیوان آلوده به تیلریا آنولاتا قابلیت شناسایی پروتئین نوترکیب را دارا می‌باشد. با توجه به مطالعات حاظر به نظر می‌رسد که ژن‌های مورد مطالعه می‌توانند به عنوان کاندید برای واکسن نوترکیب مورد استفاده قرار گیرند.

References:

Shayan, P., Biermann, R., Schein, E., Gerdes, J., Ahmed, J.S. 1998. Detection and differentiation of Theileria annulata and Theileria parve using macroschizont-drived DNA probes. Annals of the New York Academy of Sciences **849**: 87-95.

Chenchik, A., Zhu, Y. Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J., Siebert, P. D. 1998. Generation of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR, p. 305-319. In P. D. Siebert and J. W. Larrick (eds.), Gene cloning and analysis by RT-PCR. Eaton Publishing, Natick, MA.

Sadr-Shirazi, N., Shayan, P., Eckert, B., Ebrahimzadeh, E., Amininia, N. 2012. Cloning and Molecular Characterization of Polymorphic Iranian Isolate Theileria annulata Surface Protein (Tasp). IJP. **7(2)**: 29-39.