کلونینگ و بیان مناطق بالقوه آنتی ژنیک واختصاصی پروتئین ۳-۳-۱٤ *فاسیولا ژیگانتیکا*

لیلا دانه چین[1*]، محمد حسین راضی جلالی[2]، مسعود رضا صیفی آباد شاپوری[2]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[*]نویسنده مسئول: danehchin90@yahoo.com

چکیده

فاسیولا ژیگانتیکا ترماتود کبدی است که می تواند طیف وسیعی از میزبان‌های مهره دار را آلوده کند. اغلب در نشخوارکنندگان اهلی مانند گاو، بز و گوسفند یافت شده است. تشخیص عفونت های *فاسیولا* بر پایه آزمایش مدفوع و شمارش تخم یا آزمایش های سرولوژیکی که بعضی از آنها بر مبنی شناسایی آنتی‌ژن است صورت می گیرد. در صورت جستجوی برخی ازآنتی‌ژن‌های خاص انگل تشخیص زود هنگام بیماری امکان پذیر می‌گردد. پروتئین ۳-۳-۱٤ *فاسیولا* به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های تشخیصی برای استفاده در آزمایشات تشخیصی و مطالعات مرتبط با واکسن می باشد. هدف از این تحقیق کلون کردن ژن ۳-۳- ۱٤انگل *فاسیولا ژیگانتیکا* در وکتور pMal-c2x و بررسی بیان آن در *اشرشیا کلی* سویه TG1 بود. بدین منظور ابتدا توالی نوکلئوتیدی ۳-۳-۱٤ *فاسیولا ژیگانتیکا* از منابع اطلاعاتی بانک ژن استخراج و مورد بررسی قرار گرفت تا پرایمرهای مناسب برای تکثیر این ژن در آزمایش RT-PCR طراحی گردد. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ژن ۱٤-۳-۳ با روش RT-PCR تکثیر گشت. عمل برش وکتور و ژن مورد نظر توسط آنزیم های تعیین حدود BamH I و HinIII و EcoRI و SalI الحاق آنها به همدیگر با استفاده از آنزیم T4 لیگاز صورت گرفت. این ساختار سرانجام به باکتری E. coli سویه TGI منتقل شد و بیان پروتئین ۳-۳-۱٤ با استفاده از روش SDS- Page بررسی گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که پلاسمید نوترکیب تهیه شده به خوبی موجب بیان این ژن می شود.

کلمات کلیدی: *فاسیولا ژیگانتیکا*، پروتئین ۳-۳-۱٤، بیان، pMal-c2x , *E. coli.*

مقدمه

فاسیولا یکی از عوامل مهم ایجاد عفونت در انسان وحیوانات می باشد و در قرن نوزدهم تخمین زده شد که *فاسیولا* عامل از بین رفتن یک میلیون رأس گوسفند در سال است. فاسیولوزیس به عنوان یکی ازمشکلات عمده بهداشتی کشور است که سالهاست به صورت یک معضل، بخشی از منابع انسانی و مالی کشور را به خود اختصاص داده است و در مناطق مختلف به صورت بیماری‌های نوپدید و باز پدید مطرح شده است. این بیماری مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد که براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت از میان ۱۷۰۹ عامل بیماری زا، ۸۳۲ عامل، از حیوانات به انسان منتقل می‌شود و همچنین از میان ۱٥٦ بیماری نوپدید شناخته شده در انسان، ۱۱٤ مورد آن از حیوانات به انسان منتقل می‌گردند (Hosseini et al., 2004; Nickakhtar, 2009).

آلودگی کبد حیوانات اهلی به *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* انتشار جهانی دارد و باعث بیماری فاسیولوزیس می‌گردد که خسارات اقتصادی فراوانی به صورت مستقیم و غیرمستقیم به صنعت دامپروری کشور وارد می‌کند. ابتلا به

فاسیولا موجب تلفات، ضبط لاشه‌ها، ضبط کبدهای آلوده، کاهش وزن، کاهش پشم، کاهش باروری، مرگ زود رس جنین، کاهش شیر و غیره می‌شود (Paz-Silva et al., 2004; Molina Elizabeth and Skerratt Lee, 2005; Eslami, 1999).

خانواده پروتئین‌های ۳-۳-۱٤ شامل گروهی از پروتئین-های دارای فعالیت تنظیمی می‌باشد که در تمام سلول‌های یوکاریوتی بشکل ثابت بیان میشوند. این پروتئین ها به انواعی از پروتئین‌های انتقال دهنده پیام مانند کینازها، فسفاتازها و گیرنده‌های داخل غشایی متصل می شوند. اطلاق نام ۳-۳-۱٤ به دلیل الگوی خالص سازی و حرکت این پروتئین‌ها در کروماتوکرافی و الکتروفورز بوده است. با توجه به تعدد پروتئین‌های انتفال دهنده پیام که تعداد آنها نزدیک به ۱۰۰ نوع می باشد، در هر گونه حیوانی ممکن است چند ایزوفرم از این پروتئین بیان شود. در مطالعه حاضر در تحقیق بر روی پروتئین های تگومنت *فاسیولا ژیگانتیکا*، ژن کد کننده یکی از پروتئین‌های این گروه در *فاسیولا ژیگانتیکا* مورد شناسایی قرار می‌گیرد. پروتئین ۳-۳-۱٤ شناسایی شده از ایمنی زایی نسبتا بالایی برخوردار است و ممکن است دارای قابلیت استفاده در آزمایشات تشخیص سرمی باشد. در واقع مقایسه توالی اسید آمینه ای این پروتئین با پرونئین های شاخته شده در سایر موجودات وجود مناطق کاملا مشابه را تایید کرده و واکنش متقاطع آنتی ژنی با پروتئین های موش، انسان و برخی شیستوزوماها نشان داده شده است. علیرغم این نتایج، وجود مناطق کاملا متفاوت در توالی اسید آمینه‌ای این پروتئین که احتمالا خاص گونه *فاسیولا* می‌باشد مشاهده شده است (Chaithirayanon et al., 2006). با توجه به اینکه روش‌های تشخیص متداول آلودگی به *فاسیولا* آزمایش مدفوع و دیدن تخم ویا کالبدگشایی ومشاهده کرم بالغ در مجاری صفراوی است، توسعه روش‌هایی جهت تشخیص سریع و درمان به موقع ضروری به نظر می‌رسد. لذا بعنوان اولین گام در این زمینه هدف از مطالعه حاضر تکثیر و بیان آنتی ژن *فاسیولا ژیگانتیکا* با روش کلونینگ، به عنوان آنتی ژن تشخیصی که بعدا"جهت تست های سرولوژیکی برای تشخیص به موقع *فاسیولا* مورد استفاده قرار بگیرد (Hosseini et al., 2004).

مواد و روش کار

استخراج توالی ژن ۳-۳-۱٤ از بانک ژن و طراحی پرایمر

در این مطالعه علاوه بر طراحی پرایمرهای لازم برای تکثیر توالی ژن ۳-۳-۱٤ بطور کامل دو زوج پرایمر برای تکثیر دو قطعه کوتاه‌تر این ژن (قطعه شماره ۱ کد کننده اسید های آمینه ۷۲ تا ۹۹ و قطعه شماره ۲ کد کننده اسیدهای آمینه ۱٤۲ تا ۱۷٤) نیز طراحی شدند. انتخاب این مناطق از ژن ۳-۳-۱٤ با توجه به نتایج مطالعات هم‌ترازی و فیلوژنتیک توالی اسید آمینه‌ای پروتئین ۳-۳-۱٤ *فاسیولا ژیگانتیکا* با توالی های مشابه این پروتئین در سایر موجودات و نیز الگوی آنتی ژنیسیتی این پروتئین صورت پذیرفت.

توالی نوکلئوتیدی ژن ۳-۳-۱٤با شماره دسترسی AY878648.1 از بانک ژن استخراج و با استفاده از نرم افزار Bioedit، مکان‌های برش آنزیم‌های محدودالاثر بر روی آن مشخص شد. بر اساس این اطلاعات و نیز با توجه

به ردیف نوکلئوتیدی MCS ناقل پلاسمیدی pMAL-C2X پرایمرهای لازم برای تکثیر و کلون توالی کامل ژن ۳-۳-۱٤ طراحی گردید. این پرایمرها و نیز دو زوج پرایمر دیگر که برای تکثیر نواحی نوکلئوتیدی ۳٥٤-۲۷۱ (قطعه شماره ۱) و ٥۷۹-٤۸۱ (قطعه شماره ۲) طراحی و سفارش ساخت داده شدند در جداول زیر نشان داده شده اند. پرایمر F,R مربوط به پروتئین ۳-۳-۱٤ وپرایمر R1 وF1 مربوط به قطعه شماره(۱) و پرایمر F2,R2 مربوط به قطعه (۲) می باشد. محل برش آنزیم های محدودگر در توالی پرایمرها با زیر خط مشخص شده اند. از آنزیم های HinIII,BamHI برای ژن اصلی و قطعه دوم وآنزیم های EcoRIو SalI برای قطعه اول استفاده گردید.

جهت استخراج RNA انگل در آزمایشگاه چندین نمونه ٥۰ میلی گرمی از بافت پیکر انگل های زنده تهیه و بلافاصله در داخل میکروتیوب های حاوی ٥۰۰ میکرولیتر محلول RNAlatter قرار داده شدند .بعد از اسخراج RNA از پرایمر R برای تهیه RTاستفاه شد. استخراج RNA با ستفاده از محلول تجاری Tripure و بشرح زیر انجام شد.

تکثیر و خالص سازی وکتور

در این تحقیق به منظور کلون و بیان ژن ۳-۳-۱٤ از وکتور pMal-c2X محصول شرکت New England Biolabs استفاده شد. این پلاسمید قادر به ساخت پروتئینی بنام Maltose binding protein (MBP) می باشد. پس از قرار گرفتن یک ژن خارجی در کنار ژن سازنده MBP پلاسمید نوترکیب حاصله یک پروتئین فیوژن را خواهد ساخت که بخشی از آن MBP و بخش دیگر پروتئین حاصل از ژن خارجی خواهد بود. از پروتئین MBP جهت خالص کردن پروتئین فیوژن در ستون کروماتوگرافی استفاده می شود. (Ausubel et al., 1992)

ترانسفورماسیون

در این تحقیق به منظور تکثیر و ازدیاد وکتورpMAL-C2X ، این وکتور با روش ترانسفورماسیون یک مرحله ای Chung معروف به روش یک مرحله ای پلی اتیلن گلیکول به باکتری انتقال داده شد (Ausubel et al., 1992).

هضم آنزیمی

برای هضم آنزیمی از آنزیم‌های محدودالاثر BamHI وHinIII برای ژن ۳-۳-۱٤ و(۲) ۳-۳-۱٤استفاده شد. واز آنزیم‌های محدودالاثر EcoR1 وSalI برای ژن (۱)۳-۳-۱٤استفاده شد. از بافرB2 برای ژن اصلی و شماره(۲) و از بافر B4 برای ژن شماره(۱) در یک واکنش هضم مضاعف برای هر دو آنزیم استفاده شد (Ausubel et al., 1992).

اتصال

برای انجام عمل اتصال ابتدا باید DNA و پلاسمید هضم شده خالص می شدند. به این منظور هر دو محصول هضم شده (محصول PCR و پلاسمید) ابتدا در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و سپس با استفاده از کیت استخراج از روی ژل شرکت QIAGEN خالص شدند. پس از این مرحله میزان پلاسمید و DNA تخمین زده شد و عمل اتصال با استفاده از آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل آنزیم صورت گرفت. سپس محصول اتصال با فرض تشکیل

پلاسمید های حلقوی حاوی ژن ۳-۳-۱٤ برای ترانسفورماسیون بکار رفت (Ausubel et al., 1992).

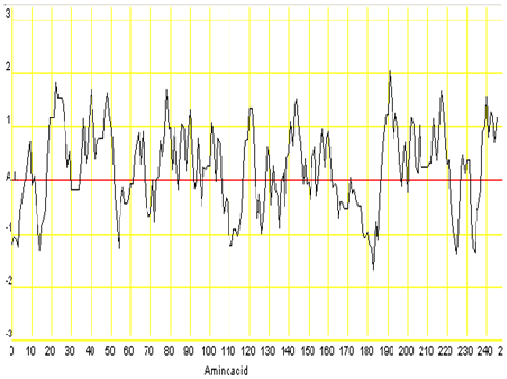
القا بیان پروتئین با IPTG

پس از انجام مراحل غربالگری و تعیین توالی، بیان پروتئین توسط یک کلونی دارای پلاسمید حاوی ژن ۳-۳-۱٤ و یک کلونی دارای پلاسمید حاوی قطعه شماره (۱) بررسی گردید. بدین منظور این کلنی ها بصورت شبانه در محیط LB مایع کشت داده شدند. این کشت ها سپس به نسبت ۱/۱۰۰ در یک محیط LB مایع جدید رقیق شده و مجددا در شرایط کشت قرار داده شدند. پس از گذشت ۳-۲ ساعت، برای القاء بیان پروتئین به این کشت ها به میزان۰/۳ میلی مولار IPTG اضافه شد. کشت باکتری ها در حضور IPTG تا ۲ ساعت ادامه داده شد. سپس دو نمونه از هر باکتری کشت یافته (یک نمونه که پیش از افزودن IPTG تهیه شده بود و یک نمونه که بعد از ۲ ساعت کشت در حضور IPTG گرفته شده بود) در آزمایش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (Ausubel et al., 1992).

نتایج

تعیین الگوی آنتی ژنیسیتی پروتئین ۳-۳-۱٤ *فاسیولا ژیگانتیکا*

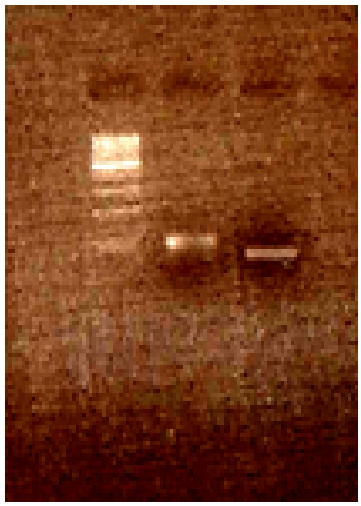
جهت پی بردن به خصوصیات آنتی‌ژنیک احتمالی مناطق مختلف پروتئین ۳-۳-۱٤ *فاسیولا ژیگانتیکا* از برنامه bioinformatics که با استفاده از روش Hopp and Woods (1981) خصوصیات آنتی‌ژنیک احتمالی یک پروتئین را محاسبه می کند، استفاده گردید. بر اساس آنالیز بعمل آمده الگوی آنتی‌ژنیک پروتئین ۳-۳-۱٤ (شکل٤-٤) محاسبه و ترسیم گردید. همانگونه که ملاحظه می گردد. نواحی پپتیدی کد شونده توسط قطعات شماره ۱و ۲ انتخاب شده از شاخص آنتی ژنیکی بالایی برخوردار می باشند .براساس توالی اسید آمینه ۹۱ تا ۱۱۸ قطعه (۱) واسید آمینه ۱٦۳تا ۱۹۳ قطعه شماره (۲) در نمودار عدد بیشتری را نشان می دهد که نشان دهنده آنتی ژنیسیته قوی-تر می باشد.



شکل ۱- تعیین الگوی آنتی ژنیسیتی پروتئین ۳-۳-۱٤ *فاسیولا ژیگانتیکا*

نتایج RT-PCR برای تکثیر ژن ۳-۳-۱٤

پس از انجام آزمایش RT-PCR محصول آزمایش قطعه کامل ژن ۳-۳-۱٤ در ژل آگارز ۱ درصد و در کنار یک نردبان ژنی 1 Kb (Ladder) و قطعات ژن (۱)۳-۳-۱٤و (۲)۳-۳-۱٤ در کنار مارکر ملکولی از bp100 (Ladder) بعنوان استاندارد الکتروفورز شد. بر اساس نتایج الکتروفورز مشخص گردید که آزمایش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده منجر به ساخت یکه قطعه DNA bp760و دوقطعه bp 100 و bp 90 شده بود که با نتایج قابل انتظار هم‌خوانی داشت. بنابراین ژن سازنده ۳-۳-۱٤ و(۲)(۱)۳-۳-۱٤ با موفقیت تکثیر داده شده بود.



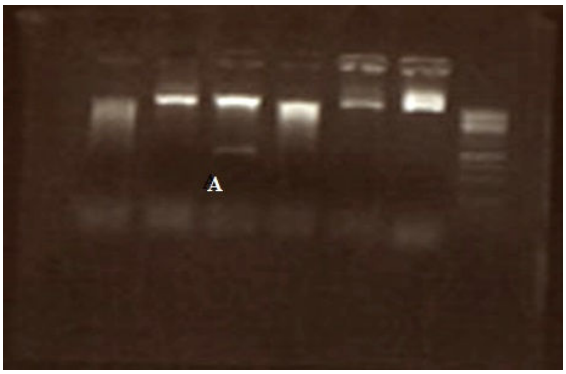
شکل۲- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR ژن (۱)۳-۳-۱٤ و(۲)۳ -۳- ۱٤ به‌ترتیب در ستون هایA و B نشان داده شده است و ستون (C) Ladder 100 bp را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از وارد کردن ژن‌ها در پلاسمید pMAL-c2X

پس از تکثیر موفق ژن ۳-۳-۱٤و (۱)۳-۳-۱٤در RT-PCRاین ژن و نیز پلاسمید pMAL-c2X که پیش از این در باکتری *E. coli* سویهTG1 و DH5a تکثیر یافته و خالص شده بود با آنزیم‌های تعیین حدود برش داده شدند. ژن ۳-۳-۱٤بوسیله آنزیمهای HinIII و BamHI شکل(۳) و ژن (۱)۳-۳-۱٤ بوسیله آنزیمهای SalIو EcoRI شکل (٤) برش داده شده و توسط الکتروفورز و کیت تجاری از روی ژل آگارز خالص شدند.

در مرحله بعد پلاسمید و ژن برش یافته با استفاده از آنزیم لیگاز به یکدیگر پیوند داده شدند و محصول این واکنش به باکتریTG1 و DH5a پذیرا انتقال داده شد. باکتری‌های پذیرا که به این ترتیب با محصول واکنش لیگاسیون ترانسفورمه شده بودند بر روی محیط LB حاوی آمپی سیلین تکثیر داده شدند. ظهور کلونی‌های باکتریایی بر روی این محیط نشان دهنده ورود موفق پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین در این باکتری‌ها بود .

در مرحله بعد برای اطمینان از حضور ژن ۳-۳-۱٤ و(۱)(۲) ۳-۳-۱٤ در این پلاسمید موجود در باکتری‌ها تعدادی از کلونی‌های باکتری برداشت و بر روی محیط حاوی Xgal و IPTGرشد داده شدند. همانگونه که انتظارمی‌رفت اکثر کلونی‌های برداشت شده بر روی این محیط کلونی های سفید ایجاد کردند که این نشان دهنده وجود ژن ۳-۳- ۱٤ و(۱)(۲) ۳-۳-۱٤در آنها بود. درمرحله بعد بطور کلی وجود پلاسمید و ژن ۳-۳-۱٤و(۱)۳-۳-۱٤داخل آن با استخراج پلاسمید از کلونی‌های سفید و طی مراحل هضم آنزیمی تایید شد. اما ژن(۲) ۳-۳-۱٤ طی مراحل هضم آنزیمی جدا نگردید و کلون نشد.

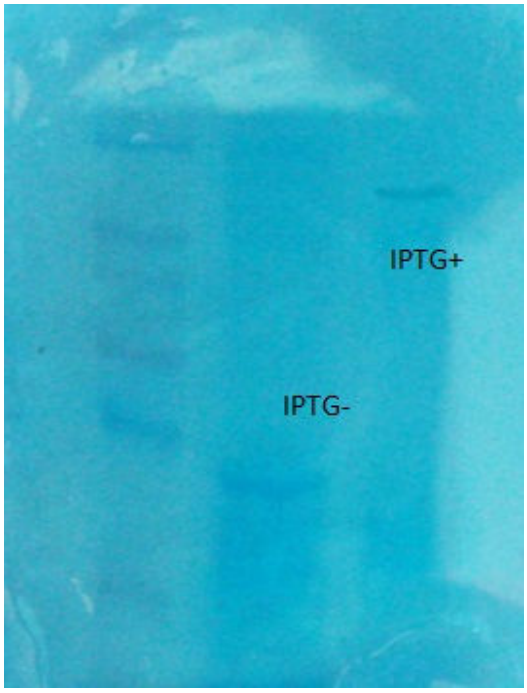


شکل ۳ - پلاسمید خالص شده (A)، (۱)Ladder 1 Kb

بررسی بیان پروتئین ۳-۳-۱٤

پس از اطمینان از کلونینگ موفق ژن ۳-۳-۱٤(کامل) و (۱)۳-۳-۱٤ در پلاسمید pMAL-c2X و در باکتری *E. coli* سویهTG1 تعدادی از کلونی های حاوی پلاسمید جهت بیان پروتئین کامل ۳-۳-۱٤ با آزمایشات SDS-PAGEمورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی بر روی

یکی از کلونی های مورد آزمایش در شکل (٤) نشان داده شده است. همانگونه که در شکل مشخص شده است، باکتری مجاور شده با IPTG در مقایسه با زمان پیش از افزودن IPTG حاوی یک پروتئین حدود kD 7/28 است که با وزن ملکولی قابل انتظار برای پروتئین بیانی همخوانی دارد. پروتئین بیانی برای ۳-۳-۱٤ و با احتساب وزن ٤۲ برای پروتئینی که پلاسمید می سازد (MBP) باید دارای وزنی حدود kD ۷۲ باشد.



شکل ٥- القای بیان پروتئین ۳-۳-۱٤ در *E. coli* ترانسفورمه شده با ساختار pMAL-c2X-3-3-14. ستون های نمایش داده شده سه کلونی باکتری قبل از افزودن IPTG وبعد از مجاور شدن با IPTG را نشان می دهند.

بحث

فاسیولوزیس، یک بیماری انگلی که توسط ترماتود کبدی از جنس *فاسیولا* ایجاد می شود. فاسیولوزیس از نظر توزیع جغرافیایی و خسارت اقتصادی تاثیر بسیار زیادی بر حیوانات آلوده دارد (Muino et al., 2011) و خسارات اقتصادی فراوانی به‌صورت مستقیم و غیر مستقیم به صنعت دامپروری وارد می کند. خسارات اقتصادی مستقیم باعث تلف شدن حیوانات وضبط موضعی کبد و در آلودگی شدید باعث ضبط لاشه لاغر می‌شود که با توجه به ارزش ریالی کبد و گوشت باعث می‌شود هر ساله خسارات زیادی به صنعت اقتصاد کشور وارد شود. علاوه بر آن به طور غیر مستقیم نیز باعث کم خونی، کاهش وزن، کاهش پشم، کاهش شیر، کاهش باروریی و کاهش فراورده‌های دامی شود (Soulsby, 1982; Eslami, 1999; Dalton, 1998). گزارش شده که آلودگی گاوها به فاسیولا باعث شده میزان شیر به صورت روزانه بالای دو کیلوگرم کاهش پیدا کند (Muino et al., 2011). فاسیولوزیس همچنین به عنوان یک بیماری زئونوز که از طریق غذا منتقل می شود برای انسان مطرح می باشد. تشخیص قطعی *فاسیولا* بر اساس مشاهده تخم انگل در مدفوع و کالبدگشایی ومشاهده کرم بالغ در مجاری صفراوی است. با توجه به اهمیت بیماری، به منظورتشخیص سریع و به موقع از روش های مربوط به ایمنی برای تشخیص فاسیولیدوزیس استفاده می-شود. جهت انجام آزمون های سرولوژیک، از آنتی ژن‌های دفعی وترشحی در ابتدا مرحله حاد آلودگی یعنی زمانی که *فاسیولا* نابالغ است و قبل ازحضور تخم انگل در مدفوع استفاده شده است (Molina Elizabeth and Skerratt Lee, 2005; Muino et al., 2011;Eslami, 1999).

بدلیل اهمیت این بیماری در گاو در سال های اخیر محققین متعددی تلاش کرده‌اند تا با استفاده از فن آوری مولکولار بیولوژی امکان تشخیص و کنترل این بیماری را بشکل

بهتری فراهم آورند. در این رابطه برخی از ژن‌های *فاسیولا* که بعنوان گزینه‌ای برای ساخت آنتی‌ژن‌های تشخیصی و یا واکسن‌های نسل جدید شناخته شده‌اند در سیستم‌های مختلف بیان و مورد ارزیابی قرار گرفته اند. برخی از مطالعات انجام شده در این زمینه بشرح زیر می باشند:

ریانا و همکاران (۲۰۰٦) ژن پروتئیناز سیستئین کاتپسین L1*فاسیولا ژیگانتیکا* وکاتپسین L1D نوترکیب را در میزان بالایی بیان کردند و برای تشخیص ایمنولوژیک *فاسیولا ژیگانتیکا* در بوفالو استفاده کردند و نشان دادند که حساسیت الایزا در سرم بوفالو بر پایه این دو آنتی ژن نوترکیب ، صددرصد بوده است وسریع‌ترین زمان برای تشخیص عفونت چهار هفته پس از ایجاد آلودگی است، همچنین واکنش متقاطع آن با کرم های *شیستوزوما* و *گاستروتیلاکس* و *پارامفیستوم* ارزیابی شد و نشان دادند که کاتپسین L1 و کاتپسین L1D نوترکیب هیچگونه واکنش متقاطعی با کرم‌های پهن نداشتند و در کل نتیجه گرفتند که پروتئین‌های نوترکیب باکتریایی خصوصیات ایمونولوژیک مشابهی با پروتئین طبیعی *فاسیولا* داشته و می توانند ابزار تشخیصی مفیدی محسوب شوند (Raina et al., 2006). Silva و همکاران (۲۰۰٤) ژن ۲/۹ کیلو دالتونی مربوط به *فاسیولا هپاتیکا* را جداسازی، شناسایی و روی باکتری PGEX-2T بیان نمودند که از هفته دوم پس از آلودگی تشحیص فاسیولوزیس را مقدور می سازد (Paz-Silva et al., 2004).

Jan و همکاران (۲۰۰۱) ژن کاتپسین پروتئاز L1 نوترکیب مربوط به *فاسیولا* را بعنوان آنتی‌ژن نو ترکیب جداسازی کردند و در باکتری *E. coli* بیان نمودند. حساسیت الایزا با ژن کاتپسین پروتئاز L1 نوترکیب، در گوسفند و گاو به ترتیب ۹۱/۱ و ۹۸/۵ درصد مورد قبول بوده است. نتایج این محقق نشان داد که در عفونت تجربی با ژن کاتپسین پروتئاز L1 حساسیت الایزا ۹۸/۵ درصد در گاو ۹٦/۵ درصد در سرم گوسفندان مشاهده شد و آنتی بادی ۷-۵ هفته پس از عفونت بسته به دوز عفونت در سرم مشاهده شده است (Cornelissen et al., 2001).

مونیو و همکاران (۲۰۱۱) کاتپسن L1 به عنوان آنتی ژن ترشحی *فاسیولا* به روش ایمنولوژیکی با استفاده از مونوکلونال آنتی بادی MM3 شناسایی کردند و در باکتری *E. Coli* بیان نمودند. نتایج نشان داد که در عفونت اولیه گوسفندان، پاسخ مونوکلونال آنتی بادی MM3 در ارتباط با اپی‌توپ‌های فضایی تولید شده، در حالی‌که در عفونت مجدد پاسخ آنتی بادی در ارتباط با اپی توپ خطی که که درکاتپسن ذاتی وکاتپسین L1 نوترکیب دناتوره شده مخفی شده گسترش یافته است که اندازه آنتی‌ژن‌های دفعی–ترشحی ۲۸-۲٦ به ترتیب برای کاتپسین L1,L2 بوده است و به عنوان هدف در تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت (Muino et al., 2011).

گرام و همکاران (۲۰۰٦) پروتیین ۳-۳-۱٤ را کلون کردند و در باکتری *E.coli* بیان نمودند.که آنتی بادی ضد این پروتیین از ۲ هفته پس از آلودگی قابل تشخیص بود (Chaithirayanon et al., 2006). هدف از مطالعه حاضر این بود که با کلون کردن ژن سازنده ۳-۳-۱٤و بیان آن در *E. coli* امکان انجام مطالعات بعدی در خصوص طراحی آزمایش الایزا و تهیه واکسن فراهم گردد، لذا در این تحقیق با استفاده از *فاسیولا ژیگانتیکا* جدا شده از

مجاری صفراوی، ژن کدکننده ۱٤-۳-۳ در RT-PCR تکثیر داده شد و سپس در وکتور بیانی پروکاریوتی pMAL-c2X کلون گردید. پس از القا بیان این پروتئین در *E. coli* با استفاده از IPTG و آنالیز پروتئین ها در SDS-PAGE حضور پروتئین نوترکیب ۳-۳-۱٤MBP با وزن ملکولی حدود 72 kD نشان داده شد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از کارشناسان محترم بخش ویروس شناسی، بخش میکروب شناسی، بخش انگل شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز و کلیه دوستانی که در انجام این طرح با من همکاری نمودند.

References

1. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. Second edition, John Wiley and Sons, New York. p: 1-15.
2. Chaithirayanon, K., Grams, R., Vichasri-Gram, S., Hfamann, A., korge, G., Viyanant, V., Upatham, E.S., and Sobhon, P. 2006. Molecular and immunological characterization of encoding gene and 14-3-3 protein 1 in *Fasciola gigantica*. Parasitology 133: 763-775.
3. Cornelissen,J.B., Gaasenbeek,C.P., Borgstee de, F.H., Holland, W.G., Harmsen, M.M., Boersma, W.J. 2001. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant Fasciola hepatica cathepsin L-like, Int. J. Parasitol. 31: 728-737.
4. Dalton, J.P. 1998. Fasciolosis. British Library, London, UK. P: 17-46.
5. Eslami, A. 1999. Veterinary Helminthology. Volume.1 (Termatoda), Tehran University Press, Tehran, 395 P.
6. Hosseini, H., Haddadzadeh, H.R., Meshgi, B., Nabian, S., and Razavi Dianian, M. 2004. Parasiticinfections of Domestic Animals.Johannes Kaufmann .Volume.1, university of Tehran press, Tehran, 90-92 p.
7. Molina Elizabeth, C., and Skerratt Lee, F. 2005. Cellular and buffaloes infected with a single dose of *Fasciola gigantica*. Vet. Parasitol. 131: 157-163.
8. Muino, L., Perteguer, M.J., Garate, T., Martinez-sernandez, V., Beltran Mezo, M., Gonzalez-warleta, M., and Uberia, F.M. 2011. Molecular and immunological characterization of Fasciola antigens recognized by the MM3 monoclonal antibody. Mol. Biochem. Parasitol. 179: 80-90.
9. Paz-Silva, A., Hillyer, G.V., Sanchez-Andrade, R., Rodriguez-Medina, J.R., Arias, M., Morrondo, P., and Die-Banos, P. 2004. Isolation, identification and expression of a Fasciola hepatica cDNA encoding a 2/9 KDa recombinant protein for the diagnosis of bovine fasciolosis. Parasitol. Res. 95: 129-135.

10. Raina, O.K., Yadav, S.C., Sriveny, D., and Gupta, S.C. 2006. Immuno-diagnosis of bubaline fasciolosis with Fasciola gigantica cathepsin-L and recombinant cathepsin L 1-D proteases. Acta Trop. 98: 145-15.
11. Soulsby, E.J.L. 1982. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7th ed. Bailliere Tindall. London, p: 40-53.