Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.4, Jun-Jul 2015
Pages: 2083-2095

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۴، تیر ۱۳۹۴
صفحه: ۲۰۹۵-۲۰۸۳

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

بررسی کارایی عملکرد آنتی‌ژن‌نوترکیب ROP1 در تشخیص عفونت توکسوپلاسما گوندی

فاطمه کشاورزی[1*]

چکیده

مقدمه: توکسوپلاسما یک انگل داخل سلولی اجباری است که دارای دامنه میزبان وسیعی در میان پستانداران و پرندگان است، پروتئین‌های توکسوپلاسما آنتی‌ژن‌های قوی می‌باشند که قادرند واکنش‌های ایمنی قوی را شروع کنند. یکی از این نوع راپتری پروتئین ۱ توکسوپلاسما گوندیی(ROP1) است. ROP1 یکی از رقابت کننده‌های واکسن‌های نوترکیب بر علیه توکسوپلاسما می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان ROP1 در یک کلونینگ وکتور(PUET1) و ساخت این آنتی‌ژن نوترکیب برای استفاده‌های بعدی است.

روش بررسی: پس از استخراج DNA و تکثیر با روش PCR محصول در کلونینگ وکتور PUET1 در مکان آنزیم‌های محدودکننده BamH1 و EcoR1 کلون شد و به داخل سلول میزبان BL21plsS انتقال یافت. همچنین جهت ایجاد وکتور یوکاریوتی، pcROP1 در pcDNA3 در مکان‌های Hind111 و EcoR1 ساب کلون شد و نتایج با هضم آنزیمی و توالی یابی بررسی شد. حال این آنتی‌ژن نوترکیب با IgM و ELISA IgG پوشانده شد.

نتایج: یک قطعه ۷۵۷ جفت‌بازی جداسازی شد و آنالیز توالی یک همولوژی در حد ۹۶ درصد را با توالی ژن در سایت Gene Bank(.No. M71274) نشان داد. نتایج الایزا نشان داد ELISA ROP1 IgM با بیشترین تعداد نمونه‌های IgM مثبت واکنش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: آنتی‌ژن نوترکیب ROP1 در یک تست IgM Rec-ELISA می‌تواند جایگزین آنتی‌ژن تاکی زوئیت در تست‌های سرولوژیکی IgM و IgG شود.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسما گوندیی، آنتی‌ژن نوترکیب، ژن ROP1

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد سنندج ، دانشگاه آزاد اسلامی ،سنندج، ایران
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۸۳۷۰۴۹۱۸، پست الکترونیکی: gol.keshavarzi@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۲۰

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی، تک یاخته‌ای از شاخه اپی‌کمپلکسا، زیر شاخه اسپروزوآ، زیر رده کوکسیدیا و متعلق به جنس توکسوپلاسما می‌باشد. آلودگی به این تک یاخته، از سراسر دنیا گزارش شده است. تقریباً ۵۰۰ میلیون نفر دارای آنتی‌بادی بر علیه این ارگانیسم می‌باشند(۱،۲). در افرادی که از سیستم ایمنی سالمی برخوردارند، عفونت اولیه معمولاً عوارض خفیفی ایجاد می‌کند. در نوزادانی که عفونت را به طور مادرزادی دریافت کرده‌اند، ممکن است منجر به عوارض خطرناکی مثل عقب ماندگی ذهنی، کوری و یا حتی مرگ شوند. همچنین ابتلا به عفونت اولیه یا عود آن در افراد دارای نقص سیستم ایمنی مانند مبتلایان به ایدز و افراد دریافت‌کننده پیوند اعضاء، می‌تواند عوارضی چون آنسفالیت کشنده توکسوپلاسمایی ایجاد کند. بنابراین پیشگیری یا تشخیص صحیح و به موقع عفونت برای اقدامات درمانی اهمیت می‌یابد و می‌تواند از تعداد و شدت موارد عفونت بکاهد(۳). تشخیص توکسوپلاسموز معمولاً به روش‌های سرولوژیک به ویژه تست الایزا صورت می‌گیرد. در کیت‌های تجاری موجود برای الایزا عمدتاً از مجموعه آنتی‌ژن‌های تخلیص شده از انگل استفاده می‌شود. در این راستا انگل در محیط‌های کشت سلولی یا مایع صفاقی موش کشت داده می‌شود و در نتیجه امکان آلودگی آنتی‌ژن‌های انگلی به مواد غیرانگلی منشاء گرفته از کشت یا مایع صفاقی وجود دارد. به این ترتیب کیفیت آنتی‌ژن‌ها در سری‌های مختلف تولید یکسان نیست و همین امر سبب می‌شود استانداردسازی تست با مشکل مواجه شود. علاوه بر این، فرایند تهیه آنتی‌ژن‌های طبیعی انگل پر زحمت و هزینه‌بر است. واکسن‌های نوترکیب DNA و پروتئین، همراه با ادجوانت‌های مناسب با القاء پاسخ ایمنی سلولی قوی، امید زیادی در پیشگیری از عفونت‌های داخل سلولی از جمله توکسوپلاسما ایجاد کرده‌اند. مطالعات و تجربیات مختلف نشان داده است که احتمال تهیه واکسنی مناسب بر علیه توکسوپلاسموزیس وجود دارد. شیوع بالای توکسوپلاسموزیس در برخی نقاط دنیا و عدم وجود داروهای مؤثر با اثرات جانبی کم موجب شده است تهیه واکسن علیه عامل بیماری(توکسوپلاسما) مورد توجه قرار گیرد. Araujo و همکاران گزارش کردند که استفاده از اسیدهای نوکلئیک به عنوان واکسن می‌تواند ایمنی محافظت‌کننده‌ای علیه توکسوپلاسما ایجاد کند(۴). Rosenberg و همکاران گزارش کردند که موش‌های ایمن شده با تاکی‌زوئیت‌های اشعه دیده مدت طولانی‌تری پس از دریافت تاکی‌زوئیت‌های زنده توکسوپلاسما زنده می‌مانند و آسیب‌های مغزی کمتری بروز می‌دهند(۵). Peng و همکاران نیز نشان دادند که پروتئین میکرونم MIC3 یک ترکیب مناسب برای واکسیناسیون علیه توکسوپلاسما می‌باشد، به خصوص زمانی که با دیگر ترکیبات مجموعه راسی (Apical complex) بکار می‌رود(۶). مطالعات Altcheh و همکاران نشان داد که آنتی‌ژن‌های حاصل از لیز سلولی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما و ادجوانت (CPG ODN) ترکیبی مناسب برای مطالعات ایمن‌سازی علیه توکسوپلاسما می‌باشد(۷). Liu و همکاران گزارش کردند که آنتی‌ژن غشایی SAG1 توکسوپلاسما در موش‌های دریافت‌کننده این ترکیبات باعث افزایش عیار IgG، IgM، اینترفورن گاما و اینترلوکین ۲- و ۴ می‌شود، در حالی که اینترلوکین ۱۲-، اینترلوکین گاما و اینترفرون آلفا در سرم آنها قابل شناسایی نیست. بنابراین به نظر می‌رسد ب عنوان یک ترکیب مناسب برای مصون‌سازی علیه توکسوپلاسما در ایجاد این ایمنی سیستم هومورال و هم سلولار نقش دارند(۸). Li و همکاران نشان دادند که واکسیناسیون موش‌ها با آنتی‌ژن SAG1 توکسوپلاسما باعث افزایش معنی‌دار طول عمر و کاهش تعداد کیست‌ها در مغز آنها پس از مواجهه با تاکی‌زوئیت‌های انگل می‌شود(۹). Liesenfeld و همکاران گزارش کردند که واکسن‌های ترکیبی DNA یک روش بسیار مؤثر در ایجاد مصونیت علیه توکسوپلاسما هستند(۱۰). در همین حال Gatkowska و همکاران نشان دادند که پروتئین ROP4 مانند ROP2 کاندید مناسب برای تهیه واکسن‌های ترکیبی علیه توکسوپلاسما می‌باشد. این محققین همچنین نشان دادند که شکل نوترکیبی پروتئین‌های

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

rROP2, rROP4, rGRA4, rSAG1 کاندیدهای مناسب برای تهیه واکسن‌های زیر واحدی (Subunit) علیه توکسوپلاسما می‌باشند(۱۱). ژن (ROP1: Rhoptry Protein 1) یک ژن تک کپی با اندازه‌ای در حدود ۲/۱ kbp می‌باشد. پروتئین حاصل از این ژن، نقش مهمی در سوراخ کردن سلول میزبان ایفا می‌کند. ROP1 قابل حل هنگام ورود T.gondii به درون سلول‌های میزبان، قبل از ناپدید شدن سریع ترشح می‌شود، این ناپدید شدن سریع حاکی از آن است که ROP1 نقش مهمی را در حمله اولیه ایفا می‌کند. همچنین GRA2 و ROP1 اجازه ردیابی IgM مخصوص T.gondii را در افرادی با عفونت انگلی داده است. در مجموع این داده‌ها نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های GRA2 و ROP1 کاندیدهای مطمئن و نویدبخشی جهت شناسایی و ردیابی عفونت توکسوپلاسمایی در انسان هستند. مطالعات قبلی نشان داده است که آنتی‌ژن نوترکیب ROP1 قادر است در ELISA نوترکیب IgM، جایگزینی برای آنتی‌ژن‌های تاکی زوایت در یک تست سرولوژیک IgM و یا IgG باشد(۱۲). با توجه به آنچه بیان شد هدف از این مطالعه کلونینگ ژن ROP1 توکسوپلاسما گوندی از سویه RH و تعیین توالی و مقایسه آن با توالی موجود، همچنین تولید پروتئین نوترکیب ROP1 (rROP1) و بررسی آنتی‌ژنیسیته آن به منظور استفاده در تست‌های تشخیصی سرولوژیک و احتمال تمایز بین فاز حاد و مزمن عفونت توکسوپلاسموز می‌باشد.

روش بررسی

برای انجام این مطالعه ۶ عدد موش بالبسی ۸ هفته‌ای خریداری شد و در شرایط عاری از پاتوژن در آزمایشگاه دانشگاه آزاد سنندج نگهداری گردید. گام بعدی آماده‌سازی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما بود، برای این کار از نژاد ویرولانت RH استفاده شد. ابتدا تاکی‌زوایت‌های سویه ویرولانت RH در صفاق موش سوری تزریق شد و ۳ روز بعد، وقتی تکثیر بسیار زیاد انجام دادند، حدود $۵×۱۰^{۷}$ تاکی‌زوئیت از مایع صفاق با سانتریفیوژ (Beckman coulter) جمع‌آوری شد و با محلول نمک فسفات با خاصیت فسفری PBS: Phosphate Buffered Sadine) (مرک- آلمان) شستشو انجام گرفت و سپس در بافر تخریب‌کننده (مرک- آلمان)، لیز شد(M Tris-HCl pH 8.0 /۱ و با پروتئیناز K (۱۰۰µg/m) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. در ادامه حجم معادلی از کلروفرم با نسبت ۲۵:۲۵ به عصاره جهت حذف پروتئین‌ها اضافه شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد و سپس حجم معادلی از کلروفرم به سوپرنانت اضافه و مجدداً سانتریفیوژ شد. در ادامه به سوپرنانت، ۰/۱ حجم استات سدیم (مرک- آلمان) ۳ مولار و دو حجم اتانول (مرک- آلمان) ۱۰۰ اضافه شد و مجدداً در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شسته و در آب مقطر دو بار تقطیر حل شد و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده نگهداری شد. ۵ مایکرولیتر از DNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد قرار گرفت.

جهت استخراج DNA ژنومی از تاکی‌زوایت‌ها ۶ میلی‌لیتر Parcel به همراه ۱۴ میلی‌لیتر PBS را در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و مخلوط شد، سپس به آن ۲۰ میلی‌لیتر تاکی‌زوایت محلول به آرامی اضافه گردید. ۲ بار با دور ۴۵۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا پلت به دست آمد. در مرحله بعد روی پلت، ۸ میلی‌لیتر PBS اضافه و مخلوط شد و DNA استخراج شده به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

به منظور تکثیر ژن ROP1 از یک جفت پرایمر اختصاصی(Cinnagen) زیر، استفاده شد:

5'- GTG CCAGATCTAGCGTCGCATTCTCATTCG-3' (forward) and5'- CCAAAG CTTTTGCGATCCATCATCCTGCTCTG- 3' (reverse).

برای هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابتدا یک Master mix حاوی بافر ۱۰X، MgCl2، dNTP و آب مقطر دو بار تقطیر ساخته شد و سپس به آن در هر واکنش پرایمرها، DNA ژنومی و آنزیم Taq polymerase (Cinnagen) اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر(Eppendorf) و لوله‌های ۰/۲ میلی‌لیتری صورت گرفت. برای انجام PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، واکنش به ترتیب زیر انجام شد: دمای نخستین ۹۵

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه، سی و دو چرخه واسرشتی شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، آنلینگ ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه شامل : ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

استخراج قطعات تکثیر یافته از محصول PCR با استفاده از کیت BiONEER بر اساس دستورالعمل کارخانه انجام شد. همچنین قرار دادن اتصال ژن ROP1 در ناقل کلونینگ pUET1 با استفاده از کیت(PCR: Product Cloning Kit, Fermentas ®) طبق دستورالعمل کارخانه انجام شد. محصولات خالص شده PCR با کلونینگ وکتور PUET1 لیگیت شد. پلاسمید بیانی pUET1 با دو آنزیم HindIII ,BglII هضم آنزیمی شد. جهت تسهیل کلونینگ سایت برش دو آنزیم BamH1 و SalI در انتهای ۵' پرایمر Forward و Reverse قرار داده شد. پلاسمید pUET1 دو دنباله 6X Histidine در دو انتهای پروتئین بیان شده قرار می‌دهد و از پرموتور قوی T7 برای بیان پروتئین استفاده می‌کند. همچنین فقط چند اسید امینه به ابتدای پروتئین اضافه می‌شود. در نتیجه معایب فیوژن پارتنر (Fusion partner) بزرگ را هم ندارد. جایگاه چندگانه کلونینگpUET1 در میان ژن کدکننده یکی از زیر واحدهای آنزیم بتا گالاکتوزیداز، یعنی' LacZ تعبیه شده است، در این صورت اگر ماده شیمیایی X-gal که یکی از سوبستراهای آنزیم است در محیط وجود داشته باشد، آنزیم آن را تجزیه کرده و رنگ آبی تولید می‌کند اما اگر در نتیجه لیگاسیون ژن خارجی در جایگاه چندگانه کلونینگ قرار گیرد، ژن 'LacZ یکپارچگی خود را از دست داده و کلونی‌های ناشی از رشد باکتری سفید خواهند بود.

جهت ترانسفورم محصول لیگاسیون به باکتری اشرشیاکلی از روش Sambrook (2001) استفاده شد(۱۳).

از pT-ROP1 به عنوان الگو برای تکثیر ROP1 استفاده شد. Master Mix PCR طبق دستورالعمل تهیه شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر طبق دستورالعمل انجام شد و محصول بر روی ژل الکتروفورز ۱ درصد آنالیز شد و اندازه محصولات با استفاده از لدر ۱ کیلو بازی بررسی شد. به طور همزمان در پلیت حاوی LB آگار و آمپی‌سیلین کشت داده شد تا برای مراحل بعدی کار به کلونی نوترکیب تأیید شده دسترسی داشته باشیم. عدم تکثیر دال بر عدم حضور آن در پلاسمید است.

خالص‌سازی DNA پلاسمید از کلونی‌های سفید نوترکیب با استفاده از کیت (Accuprep Plasmid Extraction (Roche® Kit انجام شد.

pUET1 (negative control) و pT-ROP1 به وسیله آنزیم‌های EcoR1 و BamH1 هضم آنزیمی شدند. این واکنش به طور مجزا برای هر آنزیم در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. پلاسمیدهای تخلیص شده از کلون‌هایی بود که ظاهراً محتوی پلاسمید نوترکیب بودند، مواد فوق با هم مخلوط شدند و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا عمل هضم صورت گیرد. پس از هضم آنزیمی قطعات به دست آمده، جهت تأیید پلاسمید نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد ران شد و با پلاسمید هضم نشده مورد مقایسه قرار گرفت. محصول PCR با استفاده از کیت استخراج DNA (Roche®) از ژل آگارز خالص شد. سپس واکنش با آنزیم ثانوی و محصول استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

جهت توالی یابی مستقیم، پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید سکانس شد.

به منظور بیان ژن ROP1 تکثیر شده، این ژن در ناقل بیانی pET28b کلون شد.

ژن و وکتور با نسبت های مولی ۱:۳ با سایر مواد ذکر شده در بالا مخلوط، با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر، در لوله اپندورف استریل، به صورت Overnight در یخچال نگهداری شد تا عمل لیگاسیون صورت پذیرد و جهت ترانسفورماسیون مورد استفاده قرار گیرد.

انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری مطابق روش (sambrook 2001) انجام گرفت(۱۳).

جهت بیان پروتئین ROP1 از پلاسمید نوترکیب ROP1 pUET1، سلول‌های صلاحیت‌دار E. coli از سویه BL21plysS(DE3) با پلاسمید مذکور ترانسفورم شدند و در

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

محیط LB broth کشت داده شد و در OD 600≈0.5 القاء با IPTG انجام شد و به مدت ۵-۴ ساعت دیگر کشت ادامه پیدا کرد. سپس بیان پروتئین ROP1 به وسیله آنالیز SDS-PAGE بررسی شد. زمان‌های مختلف بعد از القاء و نیز مقادیر مختلف IPTG مورد بررسی قرار گرفت تا شرایط با بیشترین میزان بیان پروتئین مشخص شود. میزان بیان پروتئین به وسیله تغییر پارامترهای موثر بر آن از جمله زمان القاء، غلظت IPTG و OD کشت قبل از القاء بهینه شد.

جهت بهینه‌سازی تخلیص پروتئین ابتدا غلظت‌های مختلف ایمیدازول در بافر لیزکننده و pHهای مختلف بافرهای تخلیص بررسی گردید و بهترین شرایط برای به دست آوردن بیشترین میزان پروتئین نوترکیب محلول انتخاب شد.

پروتئین نوترکیب ROP1 با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA و ژل فیلتراسیون تخلیص شد. این پروتئین برای کاربرد تشخیصی و استفاده آن در روش الایزا و وسترن بلاتینگ پروتئین فوق باید خلوص بالای ۹۵٪ داشته باشد. به منظور تهیه مقدار زیادی پروتئین خالص، در یک لیتر محیط کشت، باکتری کشت داده شد و پس از القاء با IPTG رسوب باکتریایی آن جمع‌آوری شد. سپس پروتئین‌ها با بافر لیزکننده از سلول‌ها خارج شدند. پروتئین ROP1 که دارای دنباله هیستیدینی است با روش کروماتوگرافی تمایلی توسط رزین Ni2+-NTA تخلیص شد.

پروتئین ROP1 تخلیص شده مطابق دستور کار بر روی ژل SDS-PAGE برده شد و تأیید پروتئین مورد نظر از روی تطابق باندها با شاخص وزن ملکولی صورت گرفت.

برای تایید آنتی‌ژنسیته پروتئین ROP1، این پروتئین مورد آنالیز وسترن بلاتینگ قرار گرفت. برای این منظور ابتدا آنتی‌ژن نوترکیب روی ژل SDS-PAGE برده شد و بعد از انتقال روی کاغذ وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم پول شده (Pooled sera) خانم‌های باردار دارای عفونت حاد یا مزمن یا سرم خانم‌های باردار بدون عفونت توکسوپلاسما(جهت کنترل) پروب شد. در انتها آنتی‌بادی‌های کونژوگه با (HRP: Horse Radish Peroxidase) مورد شناسایی قرار گرفت. عمل رنگ‌آمیزی هم با استفاده از قرص DAB (3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) انجام شد.

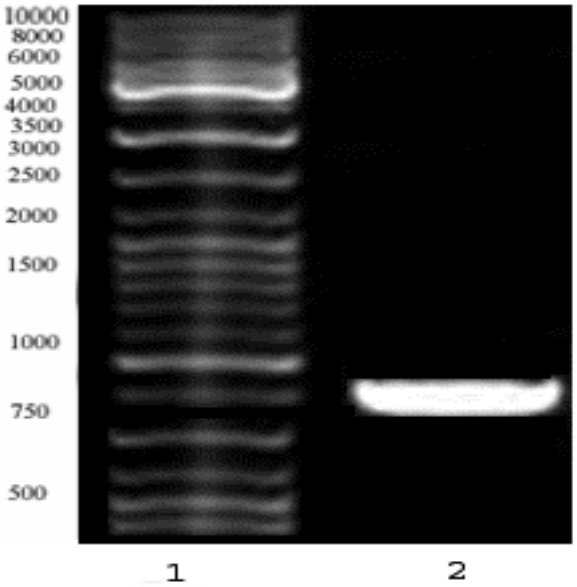
ایمنی سلولی با اندازه‌گیری IgG و IgM در شرایط لوله آزمایش و با استفاده از کیت ELISA(Roche) بر اساس دستورالعمل انجام شد. آنتی‌ژن نوترکیب خالص شده در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS رقیق شد و ۰/۱ میلی‌لیتر آن به پلیت‌های ۹۶ چاهکی اضافه شد. چاهک‌های کنترل برای هر سرمی با غلظت ۵ میکروگرم عصاره E. coli پوشیده شدند. پلیت‌های کوت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ ساعت انکوبه شده و برای ۱۶ ساعت در این دما حفظ شدند. بعد از آن سه بار با PBS-Tween۲۰ و سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شسته شدند و برای دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلولی شامل (۳٪ fish gelatin, 10% fetal calf serum in PBS) بلوکه شدند و سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر قبل از انکوباسیون با سرم‌ها شسته شدند. نمونه‌های سرم دوپلیکیت با نسبت ۱ به ۲۰۰ در بافری شامل ۲ درصد عصاره E. coli رقیق شد. بعد از اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه رقیق شده به هر چاهک پلیت‌ها برای یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس سه بار با PBS-Tween۲۰ و سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شسته شدند. اتصال IgG و IgM انسانی به ترتیب با استفاده از goat anti-human IgG and IgM horseradish peroxidase labeled Conjugates شناسایی شد. بعد از اضافه کردن کانجوگبت مناسب پلیت‌ها برای یک ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس سه بار با PBS-Tween۲۰ و سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شسته شدند. معرف رنگی o-phenylenediamine dihydrochloride color طبق نظر کارخانه آماده شد و به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۳ دقیقه، توسعه رنگ با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال متوقف شد و در طول موج ۴۹۰ نانومتر لوله قرائت شد.

نتایج

فرم تاکی‌زوایت سویه RH انگل توکسوپلاسما گوندی ۳ روز پس از تزریق به موش و تکثیر در مایع صفاقی موش توسط سانتریفوژ جمع‌آوری شد. ناخالصی‌های آن از طریق شستشو با

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

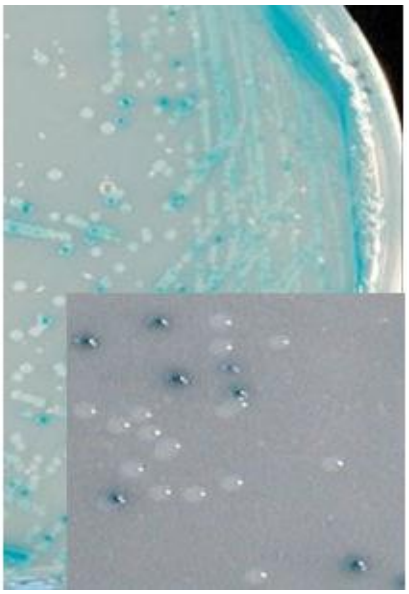
بافر و به کمک پروتئیناز حذف گردید و در نهایت 10^7 سلول انگل برای تخلیص DNA ژنومی به وسیله کیت مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. از DNA ژنومی تخلیص شده به عنوان الگو برای تکثیر ROP1 به روش PCR استفاده شد. اندازه قطعات تکثیر یافته در حد ۷۵۷ جفت باز بود(شکل ۱).



شکل ۱: تکثیر ژنROP1 و بررسی محصول PCR به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪

ستون ۱: شاخص اندازه ملکولی Kb ۱ ستون ۲: ژن ROP1 تکثیر یافته توسطPCR (۷۵۷ جفت نوکلئوتید)

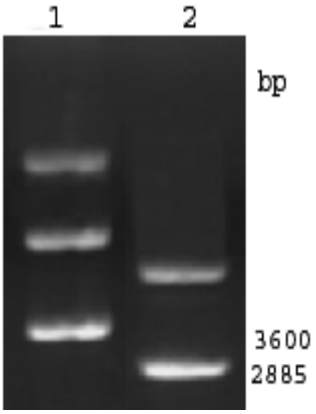
در مرحله بعد محصول PCR در داخل پلاسمید pUET1 لیگیت شد. با توجه به سیستم انتخابی موجود در پلاسمید، یعنی lac selection، دو دسته کلونی آبی و سفید در پلیت LB آگار حاوی X-gal و IPTG مشاهده شد. کلونی‌های سفید به دلیل وارد شدن DNA خارجی یعنی قطعه ROP1 به ژن lac Z' و به هم خوردن چهارچوب بیان، قادر به سنتز زیر واحد مربوطه از آنزیم β-گالاکتوزیدار و در نتیجه تجزیه X-gal و تولید رنگ آبی در حضور القاء کننده IPTG نیستند(شکل ۲).



شکل۲: کشت باکتری روی پلیت حاوی X-gal و IPTG کلونی‌های سفید (نوترکیب) و کلونی‌های آبی در کنار هم روی پلیت

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

بنابراین چند کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب برای colony PCR و استخراج پلاسمید به منظور هضم آنزیمی انتخاب شدند. پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های سفید در ستون در بالای کلونی‌های آبی قرار داشت و این نشان‌دهنده این بود که ژن ROP1 به داخل پلاسمیدpUET1 کلون شده است(شکل ۳).

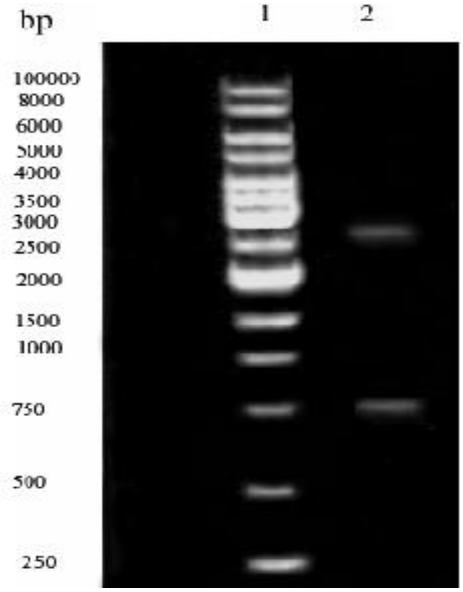


شکل ۳: مقایسه pUET1 و pT-ROP1 به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪

ستون ۱: پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفیدرنگ(pT-ROP1) و ستون ۲: پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی رنگ(pUET1)

با استفاده از روش‌های غربالگری، کلون‌های نوترکیب حاوی ژن پلاسمیدهای استخراج شده با آنزیم‌های محدودکننده EcoR1 و BamH1 هضم شد. پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید، بعد از هضم دو باند را نشان دادند در حالی که قطعات ROP1 بر روی ردیف ۷۵۷ جفت باز بود همین طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، اما پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی آبی رنگ فقط یک باند را نشان دادند. از این رو ژن ROP1 در پلاسمید کلون شده بود.

پلاسمید کلون شده توالی یابی گردید و سکانس ژن ROP1 در GenBank مقایسه شد. نتایج نشان می دهد یک هومولوژی تا حد ۹۶٪ با mRNA پروتیین ROP1 توکسوپلاسما گوندی با Accession number M71274، و تا ۹۵٪ با خود ژن ROP1 و ۹۶ ٪ با mRNA ژن ROP1 وجود دارد(CDS Accession number AY661790)(شکل ۴).

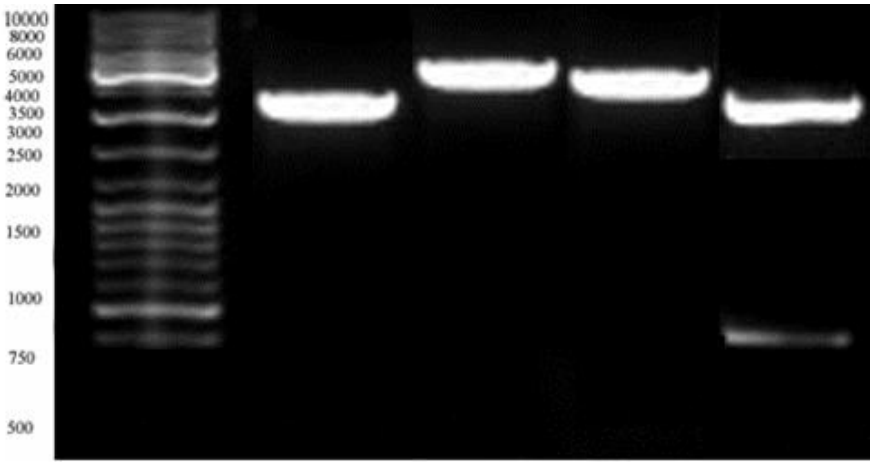


شکل ۴: مقایسه pUET1 و pT-ROP1، به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪

ستون ۱: پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفیدرنگ(pT-ROP1) و ستون۲: پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های آبی رنگ(pUET1).

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

pT-ROP1 هضم شده به داخل پلاسمید pcDNA3 لیگیت شد در الکتروفورز پلاسمید استخراج شده از این کلونی‌ها در بالای pcDNA3 قرار گرفت و این نشان داد که لیگاسیون انجام شده است(شکل ۵).

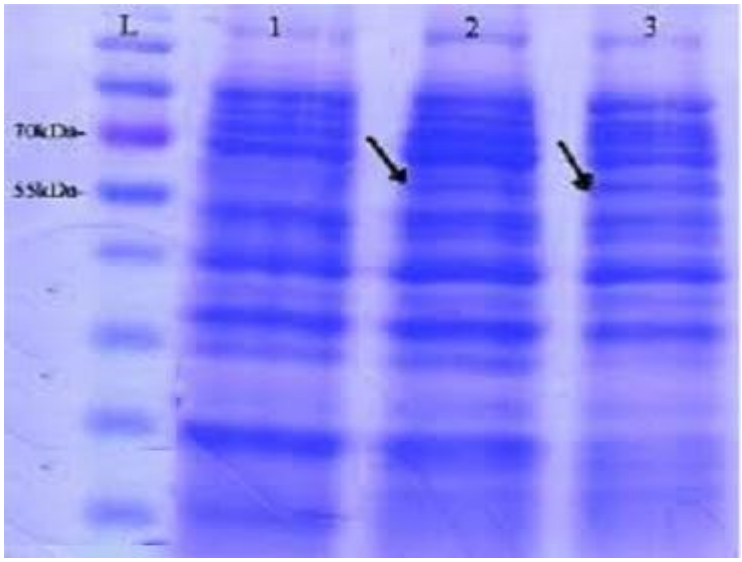


شکل ۵: الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ جهت تشخیص pcDNA3-ROP1 بعد از هضم آنزیمی

ستون ۱: مارکر، ستون۲: pcROP1 و ستون های ۳ و۴: بعد از هضم با یک آنزیم و ستون ۵: بعد از هضم با ۲ آنزیم

و سپس محصول نهایی به داخل سلول‌های رده BL21 pLysS (DE3) از باکتری Ecoli انتقال یافت. پس از رسیدن کشت تک کلون از سلول‌های ترانسفورم به OD_{600}=۰/۶، بیان پروتئین با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG القاء شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون، رسوب حاصل از کشت با SDS-PAGE بررسی شد(شکل ۶).

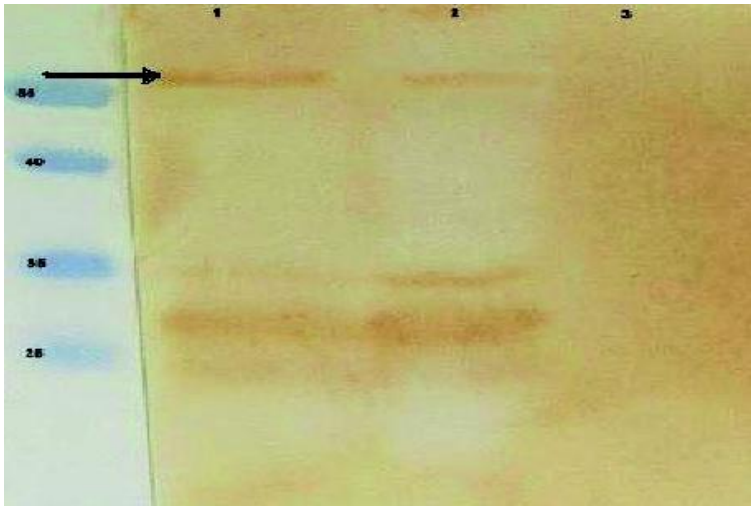
به منظور بررسی آنتی‌ژنیسیته ROP1 علیه سرم انسان از روش وسترن بلات استفاده شد. وسترن بلات با نمونه‌های قبل و بعد از القاء باکتری‌های نوترکیب و مخلوط (pool) سرم افراد مبتلا به فاز حاد توکسوپلاسما انجام شد، چرا که آنتی‌ژن ROP1 به عنوان یکی از شاخص‌های فاز حاد عفونت شناخته شده است(شکل ۷).



شکل ۶: بررسی بیان پروتئین نوترکیب بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪

ستونL: سایز مارکر پروتئین. ستون ۱: نمونه کشت قبل از القاء با IPTG. ستون ۳،۲: نمونه کشت بعد از القاء با IPTG .

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017



شکل ۷: بررسی بر هم کنش ROP1 تخلیص شده با دو گروه مخلوط (پول) سرم انسانی توسط وسترن بلاتینگ. وسترن بلات با استفاده از مخلوط سرم افراد مبتلا به فاز حاد توکسوپلاسما

ROP1 کلون و بیان شد که شامل اپی‌توپ‌های فعال‌کننده با IgM و IgG ویژه توکسوپلاسما است. حال این آنتی‌ژن نوترکیب با IgM و IgG ELISA پوشانده شد و ۲۷ نمونه سرم منفی برای این آنتی‌بادی‌ها ست شد.

سپس هر IgM و IgG ELISA با ۱۴ نمونه IgG مثبت و ۱۷ IgM مثبت تست شد. در نتیجه ELISA ROP1 IgM با بیشترین تعداد نمونه‌های IgM مثبت واکنش داد.

بحث

DNA واکسن‌ها که قادر به بیان یک یا چند ایمونیزاسیون با ژن تعبیه شده در آن می‌باشند، قادر به حفاظت از حیوانات و انسان در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و به ویژه انگل‌های داخل سلولی هستند. امروزه DNA واکسن‌ها بسیار مورد توجه محققین هستند که از دلایل مهم آن ساخت آسان، قیمت ارزان و توانایی آنها در تولید پاسخ ایمنی طولانی مدت است، آنها باعث القای پاسخ‌های اختصاصی ایمنی سلولی و هومورال شده(۱۴) و به طور ویژه در فعال کردن سیتوتوکسیک از طریق مکانیسم وابسته به لنفوسیت‌های T عمل می‌کنند. تشخیص عفونت توکسوپلاسما گوندی غالباً به وسیله اندازه‌گیری آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه توکسوپلاسما در تست‌های سرولوژیک انجام می‌گیرد و از روش‌های مولکولی نظیر PCR برای تأیید تشخیص استفاده می‌شود(۱۹-۱۵). در راستای تحقق اهداف این مطالعه که کلون، بیان، تخلیص و بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین ROP1 بود، توالی کد کننده پروتئین ROP1 با حذف قسمت اینترون به روش PCR و با استفاده از DNA ژنومی سویه RH ایرانی انگل توکسوپلاسما گوندی به عنوان الگو تکثیر شد. محصول PCR که اندازه مورد انتظار را در الکتروفورز ژل آگاروز نشان داد به واسطه پلیمریزه شدن توسط Taq پلیمراز دارای انتهای '3 آدنیله بود، در نتیجه به سهولت در ناقل کلونینگ جاسازی شد. سپس از طریق جایگاه‌های آنزیم محدود کننده در انتهای '5 پرایمرهای forward و reverse قرار داده شده بودند در ناقل بیانی کلون شد. پلاسمید بیانی نوترکیب تأیید شده توسط هضم آنزیمی و تعیین توالی ژن کلون شده (مقایسه توالی کلون شده با ۷ توالی موجود در GENE BANK که از تیپ مختلف انگل توکسوپلاسما گوندی بود) انجام شد که ۹۶ درصد مشابهت داشتند. در ادامه محصول نهایی به داخل سلول‌های رده BL21 pLysS (DE3) از باکتری Ecoli انتقال یافت. پس از رسیدن کشت تک کلون از سلول‌های ترانسفورم به OD_{600}=۰/۶، بیان پروتئین با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG القاء شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون، رسوب حاصل از کشت با SDS-PAGE بررسی شد. به منظور بررسی آنتی‌ژنیسیته ROP1 علیه سرم انسان از روش وسترن بلات استفاده شد. وسترن بلات با

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

نمونه‌های قبل و بعد از القاء باکتری‌های نوترکیب و مخلوط (pool) سرم افراد مبتلا به فاز حاد توکسوپلاسما انجام شد، چرا که آنتی‌ژن ROP1 به عنوان یکی از شاخص‌های فاز حاد عفونت شناخته شده است. در ادامه این آنتی‌ژن‌نوترکیب با IgM و IgG ELISA پوشانده شد و ۲۷ نمونه سرم منفی برای این آنتی‌بادی‌ها ست شد. هر IgM و IgG ELISA با ۱۴ نمونه IgG مثبت و ۱۷ IgM مثبت تست شد. در نتیجه IgM ELISA ROP1 با بیشترین تعداد نمونه‌های IgM مثبت واکنش داد. برای اولین بار مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۴ میلادی نشان داد که برخی از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسما و آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنها تنها در زمان خاصی از دوره بیماری قابل شناسایی می‌باشند، همچنین نوع و زمان قابل شناسایی بودن ایمنوگلبولین‌های IgE، IgM تولید شده علیه این آنتی‌ژن‌ها در سرم IgG و IgA موش‌های آلوده به سویه‌های مختلف توکسوپلاسما متفاوت می‌باشد(۲۰). در بعضی موارد تشخیص فقط با تست‌های سرولوژیکی امکان‌پذیر است مانند زمانی که کیست‌های پایدار توکسوپلاسمایی (به ویژه در مغز) به وجود می‌آید که در این صورت امکان تشخیص مستقیم انگل به وسیله تکنیک‌های مولکولی نظیر PCR وجود ندارد و تشخیص منحصراً توسط روش‌های سرولوژیک انجام می‌گیرد(۲۱). آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی که در هر دو فاز تاکی‌زوایت و برادی زوایت بیان می‌شوند، نشان داده شده است که آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل ایمونوژنیک هستند و قادر به القاء ایمنی هومورال و سلولی می‌باشند. مهمترین اجزاء آنها ملکول‌های گرانول متراکم هستند که داخل گرانول‌های متراکم توکسوپلاسما ذخیره می‌شوند و بعد از تهاجم انگل به داخل واکوئل پارازیتوفوروس ترشح می‌شوند. آنها به فراوانی ترشح می‌شوند و مهمترین جزء واکوئل احاطه‌کننده تاکی زوایت و دیواره کیست احاطه‌کننده برادی زوایت‌ها هستند(۲۲). آنتی‌ژن‌های گرانول‌های متراکم جزء اولین آنتی‌ژن‌های انگل هستند که تنها چند روز پس از عفونت در خون ظاهر می‌شوند و پاسخ آنتی‌بادی قوی القاء می‌کنند(۲۳). تاکنون ۱۲ پروتئین GRA شناسایی شده‌اند که بسیاری از آنها مانند GRA2، GRA3، GRA4، GRA6، GRA7 و GRA8 طی فاز حاد در سطح بالایی بیان می‌شوند، همچنین در چندین مطالعه کارایی آنتی‌ژن‌های گرانول متراکم برای تمایز عفونت حاد و مزمن مشخص شده است(۱۹-۱۵). ترکیب دفعی- ترشحی ۹۷ کیلودالتونی از تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما، در مرحله فاز حاد، توکسوپلاسموزیس IgM و IgG را شناسایی می‌کند، بنابراین به عنوان یک IgG مزمن تنها نشانگر مناسب برای استفاده در تست‌های تشخیصی قابل بررسی می‌باشد(۲۲،۲۳)، نتایج مطالعه حاضر هم با این نتایج هماهنگی دارد. در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تعیین آنتی‌بادی ضدتوکسوپلاسما در سرم با به کارگیری آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی، روش الایزا با توجه به سادگی روش اجرا، قابل دسترس بودن مواد و وسایل انجام آن به صورت تجاری در قالب کیت‌های آماده، عدم نیاز به دستگاه‌های گران قیمت و حساسیت نسبتاً بالا مناسب‌تر به نظر می‌رسد. گرچه روش‌هایی مانند ایمونوبلاتینگ و رادیوایمونواسی از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می‌باشند اما به علت پیچیدگی روش اجرا، به کارگیری آنها در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی‌باشد. باتوجه به پایین بودن مقدار آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی در واحد حجم، ترکیب حاوی این آنتی‌ژن‌ها در تست‌هایی مانند لاتکس اگلوتیناسیون، عمل ثابت شدن آنتی‌ژن، IHA بر روی گلبول قرمز یا ذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد، همچنین حساسیت الایزا نسبتاً ۱ نانوگرم از آنتی‌ژن نیز بالاست به طوری که با ۵ واکنش صورت می‌گیرد، این موضوع در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی با توجه به کم بودن میزان نسبی آنها در ترکیب کامل نمونه‌های آنها اهمیت بیشتر دارد. با توجه به خصوصیات گزارش شده از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی توکسوپلاسما، به نظر می‌رسد این آنتی‌ژن‌ها نشانگرهای مناسبی جهت استفاده در تست‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس باشند.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

References:

1- Assmar M, Amirkhani A, Piazak N, Hovanesian A, Kooloobandi A, Etessami R. ***Toxoplasmosis in Iran. Results of a seroepidemiological study.*** Bull Soc Pathol Exot 1997; 90(1): 19-21.

2- Eslamirad Z, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sharifi Z. ***Cloning rhoptry protein 1 (ROP1) gene of Toxoplasma gondii (RH) in Expression vector.*** Arch Razi Instit 2009; 63(2): 11-17.

3- Eslamirad Z, Dalimi A, Ghaffarifar F, Sharifi Z. ***Evaluation of two aluminum adjuvant on DNA vaccine containing ROP1 gene of Toxoplasma gondii (RH strain) for immunity and survival assay in animal model***. MJMS: Pathobiology 2011; 14(1): 17-27. [Persian]

4- Araujo PR, Ferreira AW. ***High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from T. gondii ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis.*** Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2010; 52(2): 63-8.

5- Rosenberg C, De Craeye S, Jongert E, Gargano N, Beghetto E, Del Porto P, et al. ***Induction of partial protection against infection with toxoplasma gondii genotype II by DNA vaccination with recombinant chimeric tachyzoite antigens.*** Vaccine 2009; 27(18): 2489-98.

6- Peng GH, Yuan ZG, Zhou DH, He XH, Liu MM, Yan C, et al. ***Toxoplasma gondii microneme protein 6 (MIC6) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis in mice.*** Vaccine 2009; 27(4-7): 6570-74.

7- Altcheh J, Diaz NS, Pepe CM, Martin V, Nigro M, Freilija H, et al. ***Kinetic analysis of the humoral immune response against Toxoplasma gondii-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis.*** Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56(2): 161-65.

8- Liu S, Shi L, Cheng YB, Fan GX, Ren HX, Yuan YK. ***Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of Toxoplasma gondii in mice.*** Parasitol Res 2009: 105(1): 267-74.

9- Li B, Oledzka G, McFarlane RG, Spellerberg MB, Smith SM, Gelder FB, et al**. *Immunological response of sheep to injections of plasmids encoding Toxoplasma gondii SAG1 and ROP1 genes.*** J Parasite Immunol 2010: 32(9-10); 671-83.

10- Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. ***Toxoplasmosis in the setting of AIDS.*** In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, editors. Textbook of AIDS medicine. 2nd edn. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.p. 225-59.

11- Gatkowska J, Hiszczynska-Sawicka E, Kur J, Holec L, Dlugonska. ***Toxoplasma gondii: an evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model.*** Exp Parasitol 2006; 114(3): 220-27.

12- Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Stankiewicz M, et al. ***Usefulness of toxoplasma gondii-Specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis.*** J Clin Microbiol 2004; 42(4): 1779-81.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

13- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. ***Molecular cloning: an laboratory manual***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

14- Golkar M, Rafati S, Abdel-Latif MS, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, Sima BK. ***The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute toxoplasma infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women.*** J Diagnostic Microbiol Infect Dis 2007; 58(4): 419-26.

15- Golkar M, Azadmanesh K, Khalili G, Khoshkhdgh-Sima B, Babaie J, Mercier C, et al. ***Serodiagnosis of recently acquired toxoplasma gondii infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein.*** J Diagn Microbiol Infect Dis 2008; 61(1): 31-39.

16- Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Sadaie MR, Assmar M. ***Construction, expression and preliminary immunological evaluation of a DNA plasmid encoding the GRA2 protein of Toxoplasma gondii.*** I B J 2004; 9(1): 1-8.

17- Gras L, Gilbert RE, Wallon F, Peyron F, Cortina-Borja M. ***Duration of the IgM response in women acquiring Toxoplasma gondii during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies.*** Epidemiol Infect 2004; 132(3): 541-48.

18- McAuley J, Boyer KM, Patel D, Mets M, Swisher C, Roizen N, et al. ***Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial.*** Clin Infect Dis 1994; 18(1): 38-72.

19- Eaton MS, Weiss LM, Kim K. ***Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in Toxoplasma gondii.*** Int J Parasitol 2006; 36(1): 107-14.

20- Cha DY, Song IK, Lee GS, Hwang OS, Noh HJ, Yeo SD, et al. ***Effects of specific monoclonal antibodies to dense granule proteins on the invasion of Toxoplasma gondii in vitro and in vivo.*** Korean J Parasitol 2001; 39(3): 233-40.

21- Fatoohi AF, Cozon GJ, Gonzalo P, Mayencon M, Greenland T, Picot S, et al. ***Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against Toxoplasma gondii antigen in humans.*** Clin Exp Immunol 2004; 136(3): 535-41.

22- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. ***Identification of the moving junction complexof toxoplasma gondii: a collaborationbetween distinct secretory organelles.*** PLoSpathog 2005; 1(2): e17.

23- Velmurugan GV, Tewari AK, Rao JR, Baidya S, Kumar MU, Mishra AK, et al. ***High-level expression of SAG1 and GRA7 gene of Toxoplasma gondii (Izatnagar isolate) and their application in serodiagnosis of goat toxoplasmosis.*** Vet Parasitol 2008; 157(3-4): 185-92.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 20:39 IRDT on Wednesday September 20th 2017

Evaluating Recombinant Antigen ROP1 Efficacy in Diagnosis of Toxoplasma Gondii Infection

Keshavarzi F(PhD)*[1]

[1]*Department of Biology, College of Science, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran*

Received: 25 Oct 2014 ***Accepted:*** 9 Apr 2015

Abstract

Introduction: Toxoplasma gondii is a ubiquitous obligate intracellular parasite with a relatively broad host range infecting both mammals and birds. Toxoplasma proteins are strong antigens that can begin strong immune reactions, among which Rhoptry protein 1 (ROP1) can be named discharging from rhoptry cell-organ. ROP1 is regarded as a competitor for recombinant vaccines against toxoplasmosis. Therefore, the main objective of the current study was to evaluate the cloning and expression of ROP1 Toxoplasma gondii in a cloning vector as well as to create this recombinant antigen in order to be applied for later uses.

Methods: Genomic DNA of Toxoplasma gondii was removed and reproduced by PCR, then the PCR product was cloned into the EcoR1 and BamH1 sites of cloning vector, pUET1, and transformed into Escherichia coli BL21 plysS strain. Moreover, pcROP1 was sub-cloned into the HindIII and EcoRI sites of the pcDNA3 in order to produce recombining eukaryotic declaration vector. The cloned ROP1 was verified by PCR, limitation enzymes (HindIII and BglI) digestion and nucleotide sequencing. Then , this recombinant antigen was covered applying IgM and ELISA IgG.

Results: The study results demonstrated that a fragment of 757 bp was separated. In addition, nucleotide sequence analysis of the ROP1 cloned in pUET1vector revealed high homology (96%) with RH strain Gene Bank Accession (No. M71274).

Conclusion: The recombinant ROP1 antigen in an IgM Rec-ELISA test can be replaced with the tachyzoite antigen in IgG and IgM serologic tests.

Keywords: Recombinant antigen; ROP1; Toxoplasma gondii

This paper should be cited as:

Keshavarzi F. ***Evaluating recombinant antigen rop1 efficacy in diagnosis of toxoplasma gondii infection***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(4): 2083-95.

****Corresponding author: Tel: +98 9183704918, Email: gol.keshavarzi@gmail.com***