

کلون کردن اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 در وکتور pEGFP-N1 به عنوان یک مدل واکسن DNA جهت القا ایمنی علیه کیست هیداتیک و بیان آن در رده سلولی CHO

رقیه مصری^۱، مجید اسمعیلی زاده^۲، سید عبدالحمید انگجی^۱، محمد طهماسب^۱، مژگان احمدزاده^۱، سمیه محمدی^۱

^۱ گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، ^۲ آزمایشگاه مرکزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، البرز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۹

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۳/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: کیست هیداتیک در اثر آلودگی با لارو انگل اکیونوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. در مرحله لاروی این انگل آنتی‌ژن‌های متعددی تولید می‌شود که یکی از این آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌ژن P14-3-3 از خانواده پروتئین‌های p14-3-3 می‌باشد و واکسن نوترکیب آن ایمنی‌زایی قابل توجهی را در موش القا کرده است. با توجه به ایمونوژن‌تر بودن نواحی اپی‌توپی آنتی‌ژن‌ها و تولید پاسخ ایمنی Th1 مطلوب هدف از این مطالعه کلون کردن اپی‌توپ‌های خطی این آنتی‌ژن شناسایی شده در وکتور pEGFP-N1 بود که در ساخت یک مدل DNA واکسن مؤثر بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از شناسایی اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، توالی کدکننده آن به صورت سنتتیک فراهم شد، پس از تکثیر با واکنش PCR و هضم توسط آنزیم محدود کننده *XhoI*، در وکتور pEGFP-N1 تخلیص شده با روش سمبروک تغییر یافته که همراه با استفاده از CaCl₂ و PEG6000 می‌باشد کلون شده و کلونی‌های مثبت حاوی وکتور نوترکیب ابتدا به روش colony PCR و سپس توالی‌یابی تأیید شد. برای بررسی بیان در سلول‌های یوکاریوت با روش الکتروپوریشن به رده سلولی CHO منتقل شدند.

یافته‌ها: توالی کدکننده اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 انگل اکیونوکوکوس گرانولوزوس پس از شناسایی، سنتز و تکثیر در وکتور pEGFP-N1 که تخلیص آن با روش جدید به خوبی با حداکثر غلظت پلاسمید و حداقل مقدار RNA همراه است، کلون شده و پس از تأیید کلونینگ، بیان آن نیز در رده سلولی CHO به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت به صورت موفقیت‌آمیز با میکروسکوپ فلورسنت انجام شد و استفاده از سازه حاصل در قالب واکسن ژنی برای بررسی پاسخ ایمنی در مدل‌های موشی در مراحل بعدی پژوهش انجام خواهد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از توالی‌یابی، تأیید کننده کلونینگ صحیح توالی کدکننده اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 انگل اکیونوکوکوس گرانولوزوس در وکتور pEGFP-N1 بوده و نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسانس نشانگر بیان موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب در سلول یوکاریوتی CHO می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکیونوکوکوس گرانولوزوس، کلونینگ، DNA واکسن، P14-3-3

* نویسنده مسئول: مجید اسمعیلی‌زاده، البرز، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، آزمایشگاه مرکزی

Email: m.esmaelizad@rvsri.ac.ir

مقدمه

کیست هیداتیک یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با لارو انگل اکیونوکوکوس گرانولوزوس (*Echinococcus granulosus*) ایجاد می‌شود و علی‌رغم تلاش‌های بسیار در زمینه تشخیص‌های کلینیکی، کنترل و درمان، همچنان در اکثر کشورهای نواحی معتدله جهان و مخصوصاً ایران که صنعت دامپروری رایج است در حال افزایش است. این بیماری سالانه خسارات اقتصادی زیادی را به این مناطق تحمیل می‌کند به طوری که این خسارت در ایران بالغ بر ۲۳۶ میلیون دلار در سال می‌باشد (۱-۳).

یکی از مراحل اساسی در کنترل و پیشگیری از شیوع این بیماری، طراحی و ساخت واکسنی مؤثر علیه آن می‌باشد. برای این منظور از سال ۱۹۹۵ طراحی و ساخت واکسن‌هایی بر مبنای آنتی‌ژن‌های نوترکیب این انگل مثل: EgTrp، Eg101، EgA3T و Eg95 آغاز شد، اما با توجه به این که این انگل دارای ده نوع سروتیپ متفاوت (G1-G10) می‌باشد که هر کدام میزبان‌های واسط خاصی را آلوده می‌کنند (G2، G1، گوسفند، G6 شتر، G4 اسب و...) واکسنی مانند Eg95 توانسته تنها در گونه‌های گوسفندی که با G1 آلوده شده‌اند، ایمنی در حد ۹۵ درصد را ایجاد کند و هنوز واکسن مناسبی که بتواند در میزبان‌های مختلف علیه سروتیپ‌های متفاوت این انگل ایمنی ایجاد کند طراحی نشده است (۴-۷). با توجه به این که این انگل دارای مراحل زندگی مختلفی است (مرحله تخم و بلوغ در

میزبان نهایی یعنی سگ‌سانان مرحله لاروی یا متاستتود و پروتواسکولکس در میزبانان واسط) واضح است که یافتن آنتی‌ژنی که بتواند در اکثر مراحل زندگی انگل وجود داشته و در عین حال دارای ساختار محافظت شده بوده و در بین اکثر گونه‌ها نیز وجود داشته باشد، نسبت به آنتی‌ژن‌های دیگر مزایای بیشتری خواهد داشت. یکی از این آنتی‌ژن‌ها که در اکثر مراحل زندگی انگل و به ویژه در مرحله لاروی آن وجود دارد آنتی‌ژن P14-3-3 است. این آنتی‌ژن از خانواده پروتئین‌هایی است که تقریباً در همه یوکاریوت‌ها با ایزوفورم‌های متفاوت و به صورت حفظ شده وجود دارد (۹ و ۸). حضور این پروتئین‌ها با توجه به نقش آن‌ها به عنوان مولکول‌های تنظیمی اصلی در رشد و تکامل انگل‌ها، آنها را به عنوان یکی از کاندیدهای هدف برای طراحی دارو و واکسن قرار داده است به طوری که واکسن نوترکیب rEg14-3-3 ساخته شده توانست پاسخ ایمنی سلولی و همورال قابل توجهی را علیه کیست هیداتیک در موش‌های آلوده ایجاد کند (۱۰). با توجه به نقش عمده ایمنی سلولی، سلول T کمکی ۱ (Th1) در مقابله با عفونت‌های انگلی و مشکلات موجود در زمینه ساخت و عرضه پروتئین‌های نوترکیب و با توجه به اینکه آنها بیشتر ایمنی همورال را تحریک می‌کنند طراحی و ساخت واکسن‌هایی با توانایی تحریک و تولید پاسخ ایمنی سلولی بالا با کمترین هزینه و قابل دسترس برای عموم ضروری به نظر می‌رسد. در حال حاضر واکسن‌های نسل سوم یعنی واکسن‌های بر پایه

شامل 5' TGCTCGAGATGGCGAAAACAG3' و معکوس شامل 3' GCCTCGAGCTGCACTTCCGCTATAG5' که دارای جایگاه برش برای آنزیم *XhoI* می‌باشند، با نرم افزار بیوانفورماتیکی Oligo طراحی و سنتز شد.

واکنش PCR در حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر، حاوی ۰/۲۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، MgCl₂ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱ واحد آنزیم پلیمراز Taq (شرکت سیناژن)، ۵۰ نانوگرم DNA الگوی سنتتیک و ۴ میکرولیتر بافر ۱۰X می‌باشد. پارامترهای PCR شامل دمای واسرشته (denaturation) اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر (Annealing) آغازگر در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بوده است. محصول PCR پس از الکتروفورز ۵ میکرولیتر از آن روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور ماورابنفش (UV) مشاهده شد.^(۱)

در بررسی حاصل جهت خالص‌سازی وکتور از جدیدترین روش تغییر یافته سمبروک که شامل؛ استفاده از محلول ۴ مولار CaCl₂ و PEG8000^(۳) جهت حذف RNA های سبک و سنگین می‌باشد، استفاده شد،

1-Chinese hamster ovary
2-Polymerase chain reaction
3-Polyethylene glycol

DNA (DNA vaccine) که در آن توالی DNA کدکننده آنتی‌ژن مورد نظر در یک وکتور بیانی کلون شده و جهت بیان و تحریک پاسخ ایمنی به سلول میزبان انتقال داده می‌شود، بهترین گزینه‌ی مطرح می‌باشد (۱۱-۱۴). هدف از مطالعه حاضر طراحی و ساخت واکسن ژنی مؤثر علیه کیست هیداتیک بر مبنای کلونینگ توالی کدکننده اپیتوپ‌های خطی آنتی-ژن *P14-3-3ζ* که ایمونوژن‌تر می‌باشد در وکتور بیانی pEGFP-N1 (که دارای پروتئین سبز فلورسنت بوده و در نتیجه امکان ردیابی بیان آن در سلول‌های یوکاریوت وجود دارد) می‌باشد که به منظور بررسی بیان آن در سلول‌های یوکاریوت نیز از رده سلولی CHO^(۱) استفاده شد.

روش بررسی

برای شناسایی نواحی اپی‌توپی آنتی‌ژن *p14-3-3ζ* ابتدا توالی پروتئینی آنتی‌ژن *p14-3-3ζ* انگل اکینو کوکوس گرانولوزوس از پایگاه بیوانفورماتیکی NCBI دریافت و سپس اپی‌توپ‌های خطی آن به وسیله نرم‌افزار بیوانفورماتیکی موجود در سایت IEDB شناسایی و بهینه‌سازی کدون‌های آن (codon optimization) انجام شد. پس از این مرحله توالی کدکننده این اپی‌توپ‌ها پیش‌بینی شده و به وسیله شرکت Genscript سنتز شد.

برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، جهت تکثیر قطعه مورد نظر با واکنش PCR^(۲) آغازگرهای (Primers) پیش‌رو

(SIGMA) انجام شد و پس از پاساژ، کلونی‌های مثبت به روش PCR مستقیم انتخاب شده و در نهایت به منظور تأیید همسانه‌سازی کلنی‌های مثبت در ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار کشت داده شده و تخلیص پلاسمید با روش جدید سمبروک انجام شد سپس با انجام واکنش PCR روی پلاسمیدهای تخلیص شده و هضم آنزیمی توسط آنزیم *XhoI* قرار گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و صحت نهایی همسانه‌ها با تعیین توالی به وسیله شرکت کره‌ای (Macrogen) انجام شد.

برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب، سلول‌های رده‌ی CHO از بخش بانک ژن و سلول مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده و در محیط کشت RPMI1640 (حاوی 10% FBS، استرپتومایسین و پنی‌سیلین ۱ درصد) در انکوباتور حاوی ۵% CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. پس از رسیدن این سلول‌ها به تعداد ۸ میلیون سلول در هر میلی‌لیتر، با محلول PBS شست و شو داده شدند و پلاک سلولی حاصل در کووت مخصوص الکتروپوریشن با ۲۵ میکرولیتر وکتور نوترکیب (با غلظت ۸۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۸۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم مخلوط شده و ترانسفورماسیون آن با دستگاه (BIO RAD) آمریکا Gene pulser به روش شوک الکتریکی انجام شد. و پس از آن سلول‌های ترانسفورم شده مجدداً به مدت

با این تفاوت که به علت موجود نبودن PEG8000 و در نتیجه عدم امکان تهیه محلول PEG8000، ۲۰ درصد از محلول (SIGMA) PEG6000 با غلظت ۴۰ درصد استفاده شد و با کم‌ترین حجم کشت (۵ میلی‌لیتر) بیشترین مقدار وکتور با حداقل مقدار RNA و هزینه ممکن بدون استفاده از کیت فراهم شد (۱۵).

برای کلونینگ محصول PCR در وکتور pEGFP-N1، ۱۰ میکرولیتر از ناقل pEGFP-N1 تخلیص شده (با غلظت ۱۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) به همراه ۱۰ میکرولیتر محصول PCR (با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با ۱ میکرولیتر آنزیم محدودکننده *XhoI* (شرکت فرمنتاز) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت به صورت جداگانه هضم شدند، سپس ۵ میکرولیتر از محصول هضم آنزیمی وکتور جهت تأیید هضم، در ژل آگارز (SIGMA) ۱ درصد الکتروفورز شده و پس از تأیید در واکنش الحاق استفاده شد. واکنش الحاق با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر حاوی ۹۰۰ نانوگرم از قطعه مورد نظر و ۶۰۰ نانوگرم از پلاسمید هضم شده و ۵ واحد آنزیم DNA لیگاز T4 (شرکت فرمنتاز)، ۱ میکرولیتر ۴۰۰۰ PEG و ۳ میکرولیتر بافر X10 بود که در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاق به باکتری اشریشیاکلی زیر گونه *DH5α* که به روش کلرید کلسیم مستعد شده بودند با روش شوک حرارتی منتقل شد. غربال‌گری همسانه‌های حاصل روی محیط LB (Luria Bertani) آگار حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین

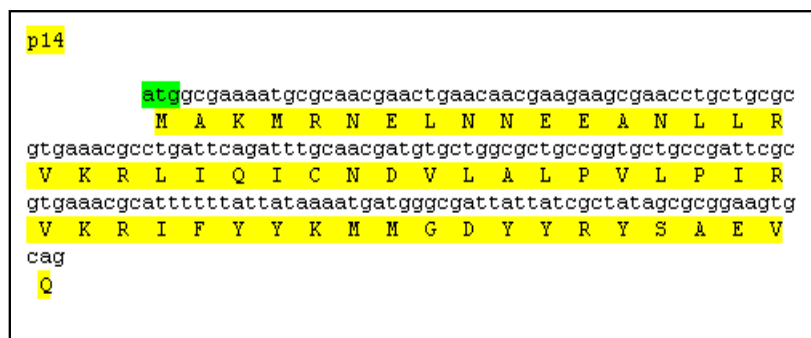
کدکننده اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده P14-3-3 از آن جدا شد که به همراه اختلاف اندازه ناقل قبل و بعد از همسان‌سازی نشانگر تأیید صحت کلونینگ بوده که در شکل ۳ نشان داده شده است و همان‌طور که در باند E شکل مشخص است مقدار RNA به طور قابل توجهی کاهش یافته است.

بیان پروتئین نوترکیب در سلول یوکاریوت در صورتی که جهت قطعه ورودی و در نتیجه قالب خواندن آن صحیح باشد، به صورت متصل به پروتئین سبز فلورسنت انجام خواهد شد که تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلورسنت به وضوح نشانگر تأیید صحت کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب در رده سلولی CHO به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت می‌باشد.

۷۲ ساعت در محیط RPMI1640 با شرایط ذکر شده کشت داده شد و پس از تهیه لام از سلول‌های حاصل، بررسی بیان پروتئین نوترکیب با میکروسکوپ فلورسنت انجام شد.

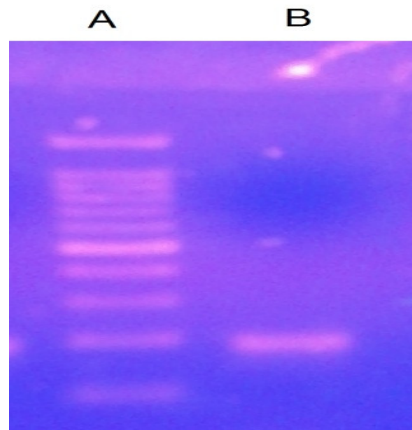
یافته‌ها

توالی کدکننده اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 3ζ اکی نوکوکوس گرانولوزوس سنتز شده و با روش PCR تکثیر یافت. در شکل ۱ توالی پروتئینی کدکننده و در شکل ۲ محصول PCR توالی کدکننده اپیتوپ‌های P14-3-3 با وزن مولکولی ۱۷۵ bp نشان داده شده است. محصول PCR در ناقل pEGFP-N1 کلون شد. پلاسمید نوترکیب به روش لیز سلولی تخلیص شده و پس از هضم به وسیله آنزیم *XhoI*، باند DNA ژن

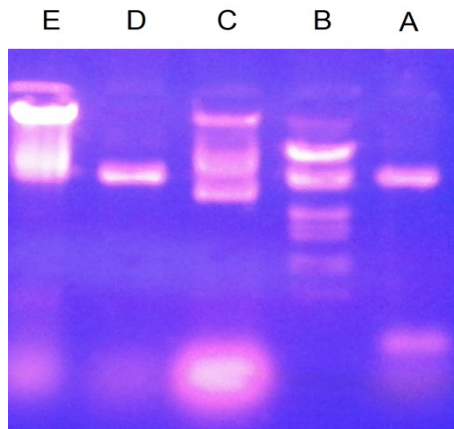


شکل ۱: توالی پروتئینی کدکننده اپیتوپ‌های خطی پیش‌بینی شده آنتی‌ژن P14-3-3 3ζ

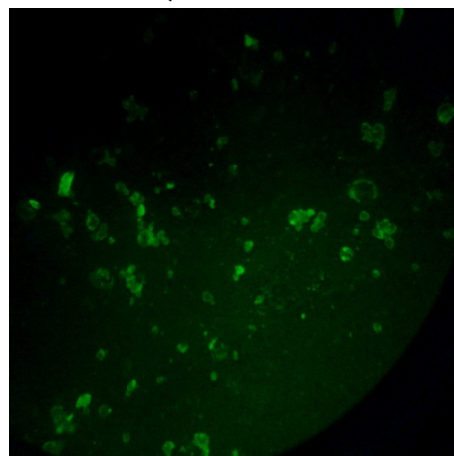
کلون کردن اپیتوپ‌های آنتی ژن P14-3-3 بعنوان واکسن DNA علیه کیست هیداتیک



شکل ۲: محصول PCR توالی کد کننده اپی توپ P14-3-3 بر روی ژل آگارز ۲ درصد، A: سایز مارکر DNA، ۱۰۰ جفت باز، B: محصول PCR با وزن مولکولی ۱۷۵ جفت باز



شکل ۳: ناقل pEGFP-N1 در ژل آگارز ۱ درصد. A: هضم ناقل پس از کلونینگ که باند پایینی مربوط به قطعه کلون شده و بالایی وکتور می‌باشد، B: سایز مارکر DNA از ۵۰۰-۸۰۰۰ bp، C: پلاسمید ۴۹۴۰ bp تخلیص شده قبل از کلونینگ، D: pEGFP-N1 هضم شده توسط XhoI و E: pEGFP-N1 تخلیص شده پس از کلونینگ



شکل ۴: تصویر پروتئین نوترکیب با پروتئین سبز فلورسنت با میکروسکوپ فلورسنت X۲۰

بحث

کیست هیداتیک به عنوان یک بیماری انگلی شایع بین انسان و دام است که درمان آن نیازمند پاسخ ایمنی قوی به وسیله میزبانان واسط یعنی انسان و نشخوارکنندگان می‌باشد (۱). در دنیای امروزی با توجه به افزایش بیماری‌های تضعیف‌کننده سیستم ایمنی مثل HIV و افزایش مصرف داروهای تضعیف‌کننده این سیستم بنا به دلایلی مثل دریافت عضو یا بیماری‌های آلرژیک پیشگیری از این عفونت انگلی و کنترل آن امری ضروری می‌باشد. یکی از بهترین راه‌های پیشگیری همانند بسیاری از بیماری‌های دیگر طراحی و ساخت واکسن مناسب علیه آن می‌باشد (۱۰). هر چند واکسن‌های نوترکیب ساخته شده مثل *Eg95* در مقابله با این عفونت پاسخ ایمنی قابل توجهی را نشان داده‌اند (۱۶ و ۴)، اما یکی از بخش‌های مهم در بهینه‌سازی طراحی و ساخت این واکسن‌ها شناسایی و درک کامل از پاسخ ایمنی القا شده به دنبال واکسیناسیون می‌باشد. مطالعه‌های متعدد در رابطه با کیست هیداتیک، نشانگر نقش ایمنی سلولی Th1 در تضعیف و غیر فعال کردن این انگل و بسیاری از انگل‌های دیگر می‌باشد به طوری که در پی شیمی درمانی افرادی با پاسخ ایمنی Th1 قوی‌تر، نسبت به افراد دارای پاسخ Th1 ضعیف‌تر زودتر و بهتر بهبودی خود را به دست آورده‌اند (۱۳ و ۱۱). با توجه به این که واکسن‌های نوترکیب هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هم‌مورال را تحریک می‌کنند و اینترلوکین‌های ترشح شده از Th2 سبب تضعیف

Th1 و کاهش اینترفرون گاما می‌شود (۱۸ و ۱۷)، لذا درمان با مشکل مواجه خواهد شد. از طرفی در واکسن‌های قدیمی نیز فقط آنتی‌بادی خاصی در بدن تولید می‌شود که توانایی کنترل پاتوژن مشابه را ندارد (۱۹)، لذا با پیشرفت بیوتکنولوژی طراحی و ساخت واکسن‌هایی با هزینه مناسب یعنی واکسن‌های ژنی یا DNA vaccine که کارایی بالایی در تحریک ایمنی سلولی دارند آغاز شد (۱۲) در این نوع واکسن‌ها با توجه به اینکه آنتی‌ژن مورد نظر به وسیله سیستم بیانی میزبان بیان می‌شود، پس امکان تغییر آنتی‌ژن کدشونده وجود دارد و اگر طراحی واکسن بر اساس نواحی به شدت حفظ شده در آن خانواده باشد منجر به تولید آنتی‌بادی‌های وسیعی علیه پاتوژن مورد نظر خواهد شد (۱۹). همچنین با توجه به این که این نوع واکسن‌ها بیشتر ایمنی سلولی Th1 را تحریک می‌کنند (۲۳-۲۰)، لذا برای مقابله با این عفونت انگلی، کارایی بالایی خواهند داشت. بر این اساس و با توجه به تحقیقات انجام شده در رابطه با تأثیر اپی‌توپ‌های خطی در القا پاسخ ایمنی مطلوب علیه این عفونت انگلی و تأکید محققین مبنی بر لزوم بررسی‌های بیشتر با اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌های مختلف، در این پروژه اپی‌توپ‌های خطی ایزوفورم آنتی‌ژن p14-3-3 را که به شدت بین اکثر گونه‌ها حفظ شده می‌باشد، انتخاب شد، اما فقط اپی‌توپ‌های خطی آن که ایمن‌ترین است کلون گردید (۲۵ و ۲۴). چون پروتئین نوترکیب این آنتی‌ژن ایمنی قابل توجهی را درموش‌های آلوده به کیست هیداتیک ایجاد کرده (۱۰) و DNA واکسن طراحی

شده بر حسب آنتی‌ژن P14-3-3 انگل شیسستوزوما جاپونیکم (*Schistosoma japonicum*) موجب پاسخ ایمنی مطلوبی علیه این عفونت انگلی شده است (۲۶). و با توجه به تعدد سروتیپ‌های انگل اکینوкокوس گرانولوزوس و با در نظر گرفتن این که پروتئین نو ترکیب آنتی‌ژن P14-3-3 انگل *Schistosoma bovis* علیه انگل *Schistosoma mansoni* نیز ایمنی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد کرده است (۲۷) و با توجه به این که سازه حاصل در رده سلولی CHO به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت بیان بسیار مطلوبی را نشان می‌دهد امید است که در مراحل بعدی آزمایش بتواند پس از بررسی در حیوانات مدل آزمایشگاهی و میزبانان واسط، پاسخ ایمنی Th1 را که ایمنی مطلوب علیه این عفونت انگلی می‌باشد القا نماید.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه مصری کارشناس ارشد رشته ژنتیک از دانشگاه خوارزمی می‌باشد که با حمایت مالی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی که بخشی از طرح‌های تحقیقاتی این مؤسسه می‌باشد انجام شد که نویسنده ضمن تشکر ویژه از مسئولین این مؤسسه از تمامی همکاران عزیز بخش بیوتکنولوژی که صمیمانه ما را در اجرای این پروژه همراهی کردند، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اپی توپ‌های خطی ایزوفورم آنتی‌ژن P14-3-3 که یکی از آنتی‌ژن‌های مهم و با ساختار حفظ شده انگل اکینوкокوس گرانولوزوس در بین اکثر گونه‌های آن می‌باشد، جهت القا پاسخ ایمنی علیه کیست هیداتیک در قالب یک مدل DNA واکسن در وکتور pEGFP-N1 کلون گردید. بررسی اولیه بیان آن در رده سلولی CHO، به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت نتایج موفقیت‌آمیزی را نشان داده و بررسی‌های بیشتر در رابطه با القا پاسخ ایمنی در حیوانات مدل آزمایشگاهی در مراحل بعدی آزمایش انجام خواهد شد.

REFERENCES

1. Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009; 12p.
2. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 2009; **13**(2):125-33.
3. Harandi MF, Budke CM, Rostami S. The monetary burden of cystic echinococcosis in Iran. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012; **6**(11): e1915.
4. Lightowlers M, Lawrence S, Gaucci C, Young J, Ralston M, Mass D & Heath D. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology* 1996; **18**(9): 457-62.
5. Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, et al. Echinococcus granulosus strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. *Parasitology* 2004; **128**(05): 569-75.
6. 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. *Acta Tropica* 2003; **85**(2): 133-43.
7. Zhou B, Chen Y, Li W, Yang M. Construction and identification of the recombinant fusion gene vaccine Bb-Eg95-EgA31 of Echinococcus granulosus. *Chinese Journal of Zoonoses* 2009; **6**:004.
8. Siles-Lucas M, Merli M, Gottstein B. 14-3-3 Proteins in Echinococcus: Their role and potential as protective antigens. *Experimental Parasitology* 2008; **119**(4): 516-23.
9. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. in *Seminars in Cancer Biology* 2006. Elsevier.
10. Li ZJ, Wang YN, Wang Q, Zhao W. Echinococcus granulosus 14-3-3 protein: A Potential vaccine candidate against challenge with echinococcus granulosus in mice. *Biomedical and Environmental Sciences* 2012; **25**(3): 352-8.
11. Yang Y, Ellis MK, McManus DP. Immunogenetics of human echinococcosis. *Trends in Parasitology* 2012; **28**(10): 447-54.
12. Maurya SH, Priya T, Hayat Khan K. Advanced in DNA vaccine against infection diseases international. *Journal of Science Innovations and Discoveries* 2013; **3**(1) 34-48.
13. Ivory C, Chadee K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy* 2004; **2**(1): 17.
14. Sakai T, Hisaeda H, Nakano Y, Zhang M, Takashima M, Ishii K, et al. Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal Plasmodium yoelii in A/J mice. *Vaccine* 2003; **21**(13): 1432-44.
15. Sauer ML, Kollars B, Geraets R, Sutton F. Sequential CaCl₂ polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. *Analytical Biochemistry* 2008; **380**(2): 310-4.
16. Woollard D, Gauci C, Heath D, Lightowlers M. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. *Parasite Immunology* 1998; **20**(11): 535-40.
17. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A & Ortona E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 12P.
18. Zhang W, Hao Wen,¹ Jun Li,^{1,2} Renyong Lin,¹ and Donald P. McManus² Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 10P.
19. Flingai S, Czerwonko M, Goodman J, Kudchodkar SB, Muthumani K, Weiner DB. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Frontiers in Immunology* 2013; **4**:354.
20. Kuhs K, Ginsberg AA, Yan J, Wiseman RW, Khan AS, Sardesai NY, et al. Hepatitis C virus NS3/NS4A DNA vaccine induces multi-epitope T cell responses in rhesus macaques mimicking human immune responses. *Molecular Therapy* 2011; **20**(3): 669-78.
21. Tabatabaie F, Mahdavi M, Faezi S, Dalimi A, Sharifi Z, Akhlaghi & Ghaffarifar F. Th1 Platform Immune Responses Against Leishmania major Induced by Thiol-Specific Antioxidant-Based DNA Vaccines. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; **7**: 2.
22. Campbell K, Diao H, Ji J & Soong L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of Leishmania amazonensis protects mice against cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2003; **71**(11): 6270-8.
23. Tapia E, Pérez E, Laura López L, Gonzalo R, Magdalena M, Esteban M, et al. The combination of DNA vectors expressing IL-12+ IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous

leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes and Infection* 2003; **5**(2): 73-84.

24. Esmaelizad M, Ahmadian Gh, Aghaiypour Kh, Shamsara M, Paykari H and Tebianian M. Induction of prominent Th1 response in C57Bl/6 mice immunized with an E. coli-expressed multi T-cell epitope EgA31 antigen against *Echinococcus granulosus*. *Folia Parasitol (Praha)* 2013; **60**: 28-34.

25. Ma X, Zhou X, Zhu Y, Li Y, Wang H, Mamuti W, Li Y, Wen H. The prediction of T- and B-combined epitope and tertiary structure of the Eg95 antigen of *Echinococcus granulosus*. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2013; **6**(3): 657-62.

26. Zhang Y, Taylor M, Johansen M, Bickle Q. 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): 724-30.

27. Siles-Lucas M, Uribe N, López-Abán J, Vicente B, Orfao A^c, Nogal-Ruiz JJ, et al, The schistosoma bovis sb14-3-3 recombinant protein cross-protects against schistosoma mansoni in BALB/c mice. *Vaccine* 2007; **25**:7217-23.

Cloning Linear Epitopes of P14-3-3 Antigen into pEGFP-N1 vector as a DNA Vaccine Model to Induce Immunity against Hydatidosis and its Expression in the CHO Cell Line

Mesri R¹, Esmailzadeh M^{2*}, Angaji SA¹, Tahmaseb M¹, Ahmadzadeh M¹, Mohammadi S¹

¹Department of Cell and Molecular Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran ²Department of Central Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran.

Received: 6 June 2015

Accepted: 31 Aug 2015

Abstract

Background & aim: Hydatidosis is a zoonotic disease caused by infection with the larvae of *Echinococcus granulosus*. Different antigens produced in larval stage of this parasite that recombinant vaccine base these antigens created significant immunity in infected animals. One of the important antigens is p14-3-3 that its recombinant antigen created considerable immunity in mouse models. In the present study, according to the high immunity of antigen epitopes region, the coding sequence of T-cell epitopes of P14-3-3 was cloned into pEGFP-N1 vector in order to produce an effective DNA vaccine model to stimulate high level of Th1 immune response.

Methods: In the current study, bioinformatics tools were used for the prediction of linear T-Cell epitopes of *Echinococcus granulosus* P14-3-3 antigen. The nucleotide coding sequence of these epitopes was synthesized by PCR. The amplicon was digested with XhoI restriction enzyme and cloned into pEGFP-N1 vector which had been purified by modified by the Sambrook method with CaCl₂ and PEG6000. Positive colony was selected by direct colony PCR and confirmed by the sequencing. The evaluation of its expression in Eukaryotic cells was done by transformed of CHO cell line with electroporation.

Results: Linear T-cell epitopes of *Echinococcus granulosus* P14-3-3 after prediction, synthesis and amplification were successfully cloned into pEGFP-N1 vector that purified by new method with maximum vector and minimum RNA concentration. The expression of new construct in CHO cell line as a eukaryotic cells achievement by fluorescent microscope will be used as a DNA vaccine model for the evaluation of immune response in mouse models.

Conclusion: Successfully cloning of the linear T-cell epitopes coding sequence of *Echinococcus granulosus* P14-3-3 antigen into pEGFP-N1 verified by sequencing and fluorescent microscope images demonstrated the expression of recombinant protein in CHO cell line.

Key words: *Echinococcus granulosus*, DNA vaccine, cloning, P14-3-3

Corresponding authors: Esmailzadeh M, Department of Central Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran.

Email: m.esmailzadeh@rvi.ac.ir

Please cite this article as follows:

Mesri R, Esmailzadeh M, Angaji SA, Tahmaseb M, Ahmadzadeh M, Mohammadi S. Cloning Linear Epitopes of P14-3-3 Antigen into pEGFP-N1 vector as a DNA Vaccine Model to Induce Immunity against Hydatidosis and its Expression in the CHO Cell Line. *Armaghane-danesh* 2015; 20 (8): 666-676.