تهیه یک ریبوپروب وکاربرد مقدماتی آن در هیبریدیزاسیون بعضی گونه‌های لیشمانیا در ایران

بهرام کاظمی Ph.D.☆★♦، حمید مبتکر M.Sc.★، فریدون مهبودی Ph.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

★ دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی

★ تهران، شهرک اکباتان، شرکت سینازن

★ تهران،انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه انگل شناسی

چکیده

* **هدف:** تهیه یک ریبوپروب و کاربردهای آن در هیبریدیزاسیون بعضی گونه‌های لیشمانیا در ایران

* **مواد وروشها:** Kinetoplasm DNA (KDNADNA) لیشمانیا ماژور استخراج و با آنزیم BamHI هضم شد. قطعات به دست آمده در پلاسمید Bluescript کلون شد و با روش Run off نسخه برداری از روی inserted DNA با rNTP نشاندار انجام گرفت. ریبوپروب تهیه شده با kDNA لیشمانیاها هیبرید شد.

* **یافته‌ها:** ریبوپروب (IRI-m2) با روش ساترن بلات با kDNA شکسته شده سه گونه لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم مجاور شد. بدیهی است IRI-m2 به عنوان نشانگر اختصاصی برای لیشمانیا ماژور و اینفانتوم عمل می‌کند. لازم به ذکر است که پروب مذکور با لیشمانیا ماژور به طور اختصاصی و با لیشمانیا اینفانتوم با درجه کمتری هیبرید می‌شود.

* **نتیجه‌گیری:** هیبرید شدن ریبوپروب تهیه شده از kDNA لیشمانیا ماژور با kDNA لیشمانیا اینفانتوم نشانه شباهت ترادف kDNA لیشمانیاها است.

گل واژگان: ریبوپروب، هیبریدیزاسیون، مینی سیرکل، لیشمانیا، ایران

مقدمه

لیشمانیا تک‌یاخته‌ای است که توسط پشه خاکی به انسان منتقل می‌شود. این انگل در چرخه زندگی خود به دو شکل دیده می‌شود. در انسان (مهره‌داران خونگرم) به شکل آماستیگوت (بدون تاژک) در سلولهای سیستم رتیکولواندوتلیال زندگی می‌کند و در محیط کشت مصنوعی و دستگاه هاضمه حشره ناقل به شکل پروماستیگوت (تاژک دار) مشاهده می‌شود (۱). گونه‌ها و سویه‌های متفاوتی از آن شناخته شده (۲) و طیف وسیعی از بیماریهای جلدی و احشایی را ایجاد می‌کند؛ به همین علت تعیین هویت انگل دارای اهمیت خاصی است.

تعیین هویت انگل با روشهای ایزوآنزیم (۳)، مونوکلونال آنتی بادی، فاکتور ترشحی (۴)، جنبه‌های بالینی بیماری در انسان، مرفولوژی و انتشار جغرافیایی انگل (۲) انجام می‌شود. هر کدام از این روشها دارای معایبی هستند (۴). استفاده از روشهای مولکولی در انگل شناسی از دهه ۱۹۸۰ شروع شد و فعلاً در مراکز آزمایشگاهی متعددی روشهای مولکولی برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌های مختلف این انگل به کار گرفته می‌شوند (۲). عده‌ای روشهای مولکولی را برای تمایز ارگانیسمها حساس‌تر و مطمئن‌تر می‌دانند (۴). یکی از روشهای مولکولی استفاده از پروبهای شناخته شده اسید نوکلئیک است. برای تعیین هویت انگل لیشمانیا از DNA میتوکندری انگل به نام kDNA استفاده می‌شود (۵). kDNA انگلهای خانواده تریپانوزومائیده توپولوژی خاصی دارد و از دو نوع مولکول DNA تشکیل شده است. مولکولهای بزرگ به نام دایره‌های بزرگ (ماکسی‌سیرکل) (30-50kb) تعداد کم در حدود ۲۰-۵ عدد داشته و رمز کردن آنزیمهای میتوکندریال را بر عهده دارند (۵). مولکولهای کوچک به نام دایره‌های کوچک (مینی سیرکل) قطعات DNA حلقوی با تعداد 0.5-2.9kb هستند (۶). تعداد آنها در حدود دهزار عدد در هر انگل تخمین زده می‌شود که مانند زنجیر به هم حلقه شده و یک شبکه را تشکیل داده‌اند (۷). تنها وظیفه بیولوژیک شناخته شده برای آنها رمز کردن چند gRNA[1] است که در پدیده ویرایش[2] میتوکندری نقش دارند (۶).

ردیف اسیدهای نوکلئیک این مولکولها در دوره زندگی انگل ثابت است (۸). اعتقاد بر این است که در این مولکولها جهش کمتری رخ می‌دهد (۹). ترادف DNA دایره‌های کوچک کینتوپلاست انگلهای مختلف با یکدیگر تفاوت داشته و حتی ترادف DNA دایره‌های کوچک انگل نیز با هم اختلاف دارند (۸). بنابراین دایره کوچک کینتوپلاست هدف خوبی برای هیبریدیزاسیون به منظور تمایز گونه‌ها از یکدیگر است (۱۰).

مواد و روشها

از لیشمانیا ماژور (MRHO/ IR/ 64/ Nadim-1)، لیشمانیا تروپیکا (MHOM/ SO/ 58/ strain OD) و لیشمانیا اینفانتوم (MHOM/IR/74/ Edrissian) استفاده شد. برای نگهداری انگل محیط کشت N.N.N[3] و برای کشت انبوه آن محیط کشت RPM ۱۶۴۰[4] همراه با FCS[5] ده درصد استفاده شد (۹). برای استخراج kDNA انگل از روش Barker استفاده شد (۱۱). محلول حاوی پروماستیگوت انگل پس از شمارش به مدت سه دقیقه با ۸۵۰۰ گرم سانتریفوژ شد؛ مایع رویی حذف و هر صد میلیون انگل دو مرتبه با یک سی‌سی بافر NET100 (0.1M NACl, 0.1M EDTA, 0,01M Tris pH=8) شسته شد. سپس هر یک میلیارد انگل با ۷۰۰ میکرولیتر بافر NET ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر سارکوزیل ۱۰ درصد سوسپانسیون شد. کافیته (Lysate) به‌دست آمده به مدت یک ساعت در حرارت ۶۰° سانتی‌گراد انکوبه و سپس تا موقع استخراج kDNA در سرمای ۲۰°- سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج kDNA مقدار ۱۰۰mg/ml پروتئیناز k (حجم نهایی) به کافیته اضافه و یک ساعت در ۵۰° سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن یک ساعت با سرعت ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ شد تا شبکه kDNA رسوب کند.

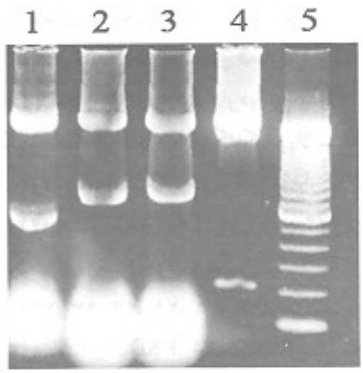
مایع رویی با پیپت تخلیه و رسوب با آب سوسپانسیون شد. سپس یک مرتبه با فنل ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل و یک‌بار نیز با کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل خالص سازی شد. DNA با اتانل رسوب داده شد و خلوص آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد. مقدار ۱۰ میکروگرم از kDNA و پلاسمید با آنزیم BamHI شکسته شد (چون جایگاه کلونینگ پلاسمید Bluescript درون ژن lacZ تعبیه شده است (۱۲) برای قالبگیری کلونیهای نوترکیب انتخاب شد) و اتصال قطعه DNA به پلاسمید (Cloing) به‌کمک آنزیم T4 DNA Ligase انجام گرفت (۱۳). از باکتری E.coli سویه XLI Blue با ژنوتیپ (F' (+ proAB lacZΔM15 T5 (tert)) (۱۴) به روش Hanahan (۱۵) سلول پذیرا[6] تهیه و محصول ترانسفورماسیون روی آگار پلیت حاوی X-gal و IPTG[7] پخش شد. روی آگار کلونیهای آبی (حاوی پلاسمید معمولی) و بیرنگ (حاوی پلاسمید نوترکیب) رشد کردند.

استخراج پلاسمید DNA به روش آلکالین انجام شد (۱۲). ریبوپروب به روش Run off (۱۶) و به کمک pBluescript که دو طرف جایگاه کلونینگ آن پروموتورهای فاژ T3 و فاژ T7 قرار دارند، سنتز شد. هیبریدیزاسیون با دو روش دات بلات و سادرن بلات روی غشای نایلونی انجام شد. در روش دات بلات از kDNA سه گونه لیشمانیا ماژور، اینفانتوم و تروپیکا رقت سریال تهیه و پس از لکه گذاری، DNA توسط دستگاه UVcrosslinker (مقدار 1200J اشعه) روی غشای نایلونی ثابت شد (۱۷).

یافته‌ها

شکل ۱ پلاسمید نوترکیب مورد نظر را پس از هضم شدن با آنزیم BamHI نشان می‌دهد و قطعه DNA کلون شده در آن مشاهده می‌شود. ستونهای ۱، ۲، ۴ پلاسمیدهای نوترکیب، ستون ۳ پلاسمید حاوی (۱۱) قطعه مورد نظر (IRI-m2) و ستون ۵ bp ladder marker ۱۰۰ است.

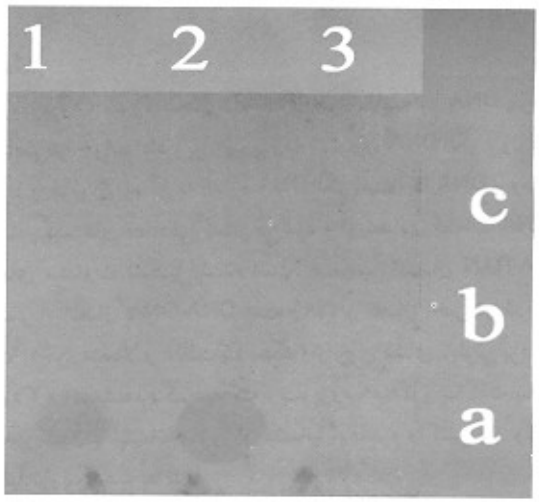
1. guide RNA
2. Editing
3. Novy MacNeal Nicolle
4. Roswell Park Memorial Institute
5. Fetal Calf Serum
6. Competent cell
7. Isopropyl Thiogalactose



شکل ۱: استخراج پلاسمید: ستونهای ۱، ۲، ۴ پلاسمیدهای نوترکیب. ستون ۳ پلاسمید حاوی پروب (کاوشگر) IRI-M2 و ستون ۵ 100bp ladder marker.

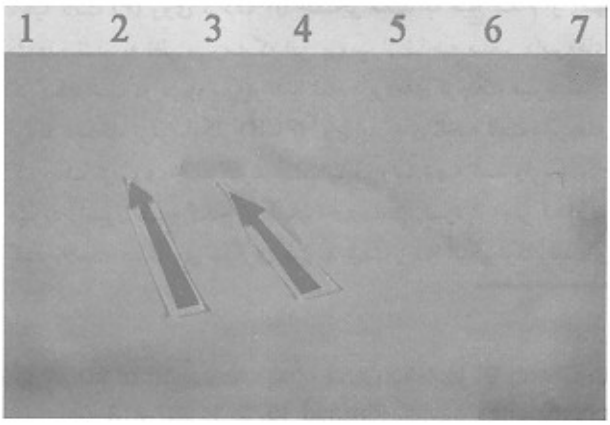
شکل ۲ دات بلات هیبریدیزاسیون را نشان می‌دهد. ستون ۱ kDNA لیشمانیاینفانتوم، ستون ۲ kDNA لیشمانیاماژور و ستون ۳ kDNA لیشمانیاتروپیکا است. مقدار DNA ردیف a معادل ۲۰ نانوگرم، مقدار DNA ردیف b معادل ۲ نانوگرم و مقدار DNA ردیف c معادل ۰/۲ نانوگرم است. درجه هیبریدیزاسیون در گونه ماژور و اینفانتوم متفاوت است. این پروب با لیشمانیا ماژور اختصاصی‌تر عمل کرده ولی با لیشمانیا تروپیکا واکنش نداده است.

از روش ساترن (۱۸) برای ساترن بلات هیبریدیزاسیون استفاده شد که در شکل ۳ مشاهده می‌شود. ستون ۱، 1kb ladder marker، ستون ۲، kDNA لیشمانیا اینفانتوم هضم شده با (EcoRI)، ستون ۳ kDNA لیشمانیاماژور (هضم شده با BamHI)، ستون ۴ kDNA لیشمانیا اینفانتوم (هضم شده با EcoRI) و ستونهای ۵، ۶ و ۷ کنترل منفی هستند. در ساترن بلات نیز همانند دات بلات پروب با لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم هیبرید شده است. ترادف[1] آن (693bp) با روش سانگر[2] (۱۴) تعیین (شکل ۴) و درصد GC آن (۵۲/۳ درصد) با نرم‌افزار DNAsis محاسبه شد. این ترادف فاقد ORF[3] است و تعدادی کدون پایان دارد.



شکل ۲: هیبریدیزاسیون به روش لکه‌گذاری نقطه‌ای

ستون ۱: kDNA لیشمانیا اینفانتوم، ستون ۲: kDNA لیشمانیا ماژور، ستون ۳: kDNA لیشمانیا تروپیکا. مقدار DNA ردیفهای a، b و c به ترتیب معادل ۲۰، ۲ و ۰/۲ نانوگرم است.



شکل ۳: هیبریدیزاسیون به روش لکه‌گذاری ساترن

ستون ۱: 1kb ladder marker، ستون ۲: kDNA لیشمانیا اینفانتوم (هضم شده با EcoRI)، ستون ۳: kDNA لیشمانیا ماژور (هضم شده با BamHI)، ستون ۴: kDNA لیشمانیا تروپیکا (هضم شده با EcoRI) و ستونهای ۵، ۶، ۷ کنترل منفی است.

001	GATCCAATAA	GTCCTATGCA	TAAGAGCCTA	GGCGCAACAG	ACTAGGTATA
051	CATCAAGCTC	AGACGCCAGT	CAAAGACCCT	AGAACTCGAG	AGCCTAGAGC
101	CTACCNNCCC	GGGGATAAGT	CCAGTAACTA	AGAGCCAAGG	TCCGCACAAC
151	AAAGACTAGG	TATAACTCCA	ACCTAAGCCT	ACAGAGCCA	GTCAAAAGAC
201	CGCTAGACCA	TGCGAGCCTC	ACCAGAGTAC	AGACGCCTAG	CAGACACGGA
251	AGCACGAAGA	CGTGACTGAC	GACCGCATAC	TGTTAGTCCC	ATCATGACGT
301	AACCGAAGCC	TGAACGGCCC	GACAACAAGA	AGCATAGGTA	AACCGAAGCC
351	AGGCCTCCAG	CAGCCAGTCC	TAGAAAGCCA	CCTAGACCCA	TCGAGCCAGC
401	CTCAACCCAG	AGTCAGCCAC	AAGCTCAGAG	TCACCAGAGA	CCGCACAGCA
451	GCAGCCAGTC	CAAAAAGCCA	CGCTAGACCC	AAGTTCCCCT	GAGTCCAGCG
501	CTCGAAACCC	AGAGTCAAGC	CCAAAAAGAC	CTCAGAAGTC	CCACCAAGAG
551	CCAGCAACCC	GGTTCCAGAC	TGGTCCCAGA	TGGAACCAGT	TCTAGGCAGA
601	GCCCACGGAGA	TCCGATCAGG	ACACCCATAT	TCCACCGTTG	AGCTGGCATG
651	TTGAGATTAG	GTTGTAGTAT	GAGTTGTATG	ATCATGATTC	TAG

شکل شماره ۴: ترادف پروب (کاوشگر) IRI-M2

1. Sequence
2. Dideoxy Chain Termination
3. Open Reading Frame

بحث

ریبوپروب مورد بحث (IRI-m2) در مقایسه با DNA پروب اختصاصی‌تر جواب داد زیرا ریبوپروب از روی DNA الگو رونویسی می‌شود و طول اندازه آن به اندازه DNA الگو است؛ اما DNA پروب به صورت پرایمرهای تصادفی[1] سنتز می‌شود و از تعدادی قطعات DNA با طولهای متفاوت تشکیل شده است. همچنین اتصال DNA-RAN محکمتر از اتصال DNA-DNA است (۱۹) و اتصال اخیر در شرایط سخت[2] (حرارت بالا و غلظت کم نمک) از روی غشای نایلونی برداشته می‌شود (۲۰). مشاهده گردید که ریبوپروب مذکور با دات بلات هیبریدیزاسیون با لیشمانیا ماژور و لیشمانیا اینفانتوم واکنش داد ولی با لیشمانیا ترویپکا هیبرید نشد.

با ساترن بلات هیبریدیزاسیون نیز مشاهده شد که پروب با 1kb ladder marker و لیشمانیا ترویپکا هیبرید نمی‌شود. این پروب فاقد ناحیه ثابت سازمان دایره‌های کوچک است و الیگونوکلوئیدهای ناحیه ثابت (۴) روی ترادف آن جستجو شدند که هیچ کدام از آنها مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که این پروب از ناحیه متغیر دایره‌های کوچک است در نتیجه نمی‌تواند با تمام دایره‌های کوچک هیبرید شود. توسط دستگاه ترموسایکلر (PCR)[3] و پرایمرهای ناحیه ثابت دایره‌های کوچک از روی چند گونه لیشمانیا پروب تهیه شد ولی هنگام هیبریدیزاسیون هیچ کدام از آنان اختصاصی نبودند (هر کدام با کینتوپلاست لیشمانیای دیگری هیبرید شد)، زیرا الیگونوکلئوتیدهای ثابت در همه دایره‌های کوچک ترادف یکسان دارند می‌توانند در عمل هیبریدیزاسیون شرکت کنند (اطلاعات در دسترس نیست). روی ترادف این پروب تعدادی کدون پایان وجود دارد. این پدیده ثابت می‌کند که قطعه DNA مذکور حتماً از دایره کوچک کینتوپلاست انگل است زیرا دایره‌های بزرگ اولاً دارای ORF بوده و ثانیاً مقدار GC آنها در حدود ۲۵/۵ در صد (۲۲) است. مقدار GC این پروب ۵۳/۲ درصد است.

محققان دیگر برای تعیین هویت انگل لیشمانیا از DNA پروب استفاده کرده‌اند (۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷).

Guita (۲۸) برای PKDL[4] لیشمانیازیس جلدی پس از کالا آزار و Howard (۲۹) برای لیشمانیا اینفانتوم پروب اختصاصی تهیه کرده‌اند. پروب اخیر انگل را در پشه خاکی تشخیص می‌دهد. John (۳۰) با DNA پروب، لیشمانیاهای دنیای جدید را مطالعه نمود و حتی Neil از ژن بتاتوبولین و gp63 به عنوان پروب استفاده کرد (۲۲). این پروب (IRI-m2) نیز دو انگل لیشمانیا دونوانی و لیشمانیا اینفانتوم (سویه‌های ایران) را از لیشمانیا ترویپکا (سویه سودان) تفکیک می‌کند.

بیشترین شباهت[5] این پروب (693 bp) به کمک نرم‌افزار DNAsis با ترادفهای دیگر مشخص شد. با ترادف دایره کوچک لیشمانیا ترویپکا (۳۱) ۵۱ درصد، با ترادف دیگری از همان سویه لیشمانیا ماژور ۵۵ درصد (بیشترین تشابه) و با ترادف یک مینی‌سیرکل دیگر لیشمانیا ماژور (۳۲) ۳۱ درصد مشابهت دارد و کمترین تشابه آن با مینی‌سیرکل کینتوپلاست لیشمانیا تارنتوله است.

References

1. Read CP, Chandler AC: A introduction to parasitology, toppn company, 1961, pp 111-130
2. WHO: Control of leishmaniasic technical report series, 1990, NO 719
3. Elsa Cupolillo, Gebriel G, Moomen H: A general classification of new world leishmania using numeral zymotaxonomy. Amer J Trop Med Hyg 1994; 50(3): 206-231
4. Barker DC: Molecular approaches to DNA diagnosis. Paresitology 1989; 99 supple: 125-140
5. Simpson L: The KDNA of hemoflagellated protozoa. Amer J Tro Med Hyg 1980; 29(5) supple: 1053-1063
6. Simpson L: The mithocondrial genome of kinetoplastid protozoa, genomic organization, transcription, replication and evolution. Ann Rev Microbiol 1987; 41: 363-382
7. Simpson L: RNA editing in mitochondria. In RNA processing. Higgin, Hame (ed). 1996, pp 69-105
8. Cheng D: Isolation and characterization of kDNA of phytomonas davidi. Plasmid 1978; 1: 297-313
9. Jaffe C: The cultivation and cloning of leishmania. In Genes and antigens of parasites. Morel CM (ed) 1989, pp 47-90
10. Robert H: DNA diagnosis of parasitic infection. Exp Parasit 1990; 79: 494-499
11. Barker DC: Characterization of leishmania by DNA hibridization probs. A laboratory mannual 1985, WHO/TDR
12. Sambrook J, Fritch T, Maniatis T: Molecular cloning. A labilatory manual, 2ed, Cold Spring Harbor 1989
13. Sturm NR, Hansen K: Ligation of DNA with T4 DNA ligase. In methods in molecular biology Vol 2, Nucleic acids. John M Walker (ed). 1984, pp 225-230
14. Brown TA: DNA sequencing, IRL Press, 1994, pp 53-76
15. Hanahan D, Studies on transformationm on E. coli with plasmids. J.of Molecular Biology: 166, 557-580
16. Sturzl M, Kurt Rothman: Run off synthesis and application of defined singie-stranded DNA hybridization probe. Ann Biochem 1990; 185: 164-169

1. Random Primer
2. Steringency
3. Polymerase Chain Reaction
4. Post Kala Dermal Leshmaniasis
5. DNA maximum homology

17. Darling DC, Briekell PM: Nucleic Acid Blotting, the basics, IRL press, 1994; pp 37-38
18. Southern E: Detection of specific sequences among DNA fragment by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503-517
19. Bozza M, Fernandes O, Degone WM, Lopes GU: Characterization of old world leishmania species. Using ampilified minicircle variable regions as molecular probe. Tran Roy Soc Trop Med Hyg 1995; 89: 1
20. Kessler C: Non radioactive labeling methods for nucleic acids. In non isotopic DNA probe techniques. Krieka LJ (ed). 1992, pp 30-92
21. Van Eys GJJM: A nuclear DNA probe for the identification of strains within the leishmania donovani complex. Exp Parasitol 1991; 72: 459-463
22. Neil R, Rayned LO, Alganper H: Genetic heterogeneity in Pruvian leishmania isolate. Ann J Trop Med Hyg 1983; 41(4): 416-621
23. Barker DC, Butcher J: The use of DNA probe in the identification of leishmaniasis indiscrimination between isolate of the lishmania mexicana and lishmania braziliansis complexes. Tras Sac Trop Med Hyg 1983; 77(3): 285-297
24. Shaw J, Campbell D, Simpson L: Internal frame shift within the mitochondrial genes for cytochrome oxidase subunit II and maxicircle unidentified reading frame 3 of leishmania tarentula are corrected by RNA editing. Proc Natl Acade Sci USA, 1989; 86: 6220-6224
25. Sheng Yih Lee, Sku-tong Lee, Kwang Poo Cheng: Transkinetoplastidy-A novel phenomenon involving bulk alteration of mitochondria-kinetoplast DNA of trypanosomatid protozoan. Parasitology 1992; 39(1): 190-196
26. Gibson WC, Dukes PI, Ghosh JK: Species specific DNA probe for identification of African trypanosomes in tse tse fleis. Parasitology 1988; 97: 63-73
27. Rogers WO, Wirth DT: kDNA minicircle region of extensive sequence divergent. Proc Natl Acad Scinence USA 1984; 84: 565-569
28. Guta TP, Ghosh DK, Junder HKM: A cloned kDNA minicircle fragment for leishmania spp. Specific for post kala azar dermal leishmaniasis. Parasitology 1991; 102: 187-191
29. Howard MO: A sensitive repetitive DNA probe that is specific to leishmania donovani complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent. Mol Biochem Parastiol 1991; 44: 63-72
30. John PJ: Restriction endonuclease analysis of lishmania kDNA characterized parasites responsible for visceral and cutaneous leishmaniasis. Amer J Trop Med Hyg 1984; 33(5): 808-819
31. Kazemi B, Mahboudi F, Mobtaker H, Ghadiri A: Species specific DNA probe for different of L. major and L. tropica. First congress in Leishmaniasis, Istanbul, Turkey, 1997
32. Smith DF: A kDNA probe diagnostic for leishmania major: Sequence homology between regions of leishmania minicircle. Mol Biochem Parasitol 1989; 37: 213-221