Construction of pEGFP-ChEgTrp as DNA model for multi-epitope vaccine against Echinococcus granulosus

M. Ahmadzadeh[*] M. Esmaelizad[**] SA. Angaji[***] M. Tahmaseb[****] S. Mohammadi[*] R. Mesri[*]

*M.Sc. Student of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
**Assistant Professor of Molecular Genetics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
***Assistant Professor of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
****Assistant Professor of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Infection with *Echinococcus granulosus* causes hydatidosis in human and ruminants. With regards to the high prevalence of hydatidosis in Iran, dealing with this disease is important in terms of public health.

Objective: The aim of this study was to construct pEGFP-ChEgTrp as DNA model for multi-epitope vaccine against *Echinococcus granulosus*

Methods: This experimental study was conducted in the Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj in 2013. Initially, epitopes stimulating the host immune response were predicted by IEDB Database and the coding sequences were made. The sequences were amplified by PCR. The PCR products were cloned into pEGFP-N_1 vector after digestion with *Xho*I restriction enzyme. The bacteria containing recombinant plasmid were evaluated using Colony PCR, agarose gel electrophoresis and sequencing methods.

Findings: Four peptides with 10 linear epitopes were predicted in EgTrp antigen. The nucleotide sequence coding ChEgTrp was amplified by PCR using specific primers and a 270 bp fragment was obtained. This fragment was cloned into pEGFP-N_1 vector and the recombinant plasmid was confirmed by Colony PCR and agarose gel electrophoresis. For final confirmation, the recombinant plasmid was sequenced and the pEGFP-ChEgTrp was constructed.

Conclusion: The ChEgTrp was successfully cloned into the pEGFP-N_1 vector and this plasmid can be used to design DNA vaccines.

Keywords: Echinococcosis, Tropomyosin, Molecular Cloning, DNA Vaccines

Citation: Ahmadzadeh M, EsmaelizadM, Angaji SA, TahmasebM, Mohammadi S, Mesri R. Construction of pEGFP-ChEgTrp as DNA model for multi-epitope vaccine against Echinococcus granulosus. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 19 (4): 4-11.

Corresponding Address: Mozhgan Ahmadzadeh, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Email: mahmadzadeh11@yahoo.com
Tel: +98-917-8399578
Received: 1 Feb 2015
Accepted: 27 Apr 2015

ساخت سازه pEGFP-ChEgTrp به عنوان مدل DNA واکسن چند اپیتوپی علیه اکینوکوکوس گرانولوزوس

مژگان احمدزاده* دکتر مجید اسمعیلی‌زاد** دکتر سید عبدالحمید انگجی*** دکتر محمد طهماسب**** سمیه محمدی* رقیه مصری*

* دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
** استادیار ژنتیک مولکولی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
*** استادیار بیوتکنولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
**** استادیار ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، تلفن ۰۹۱۷۸۳۹۹۵۷۸
Email: mahmadzadeh11@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۷

چکیده

زمینه: آلودگی با لارو انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* سبب بیماری هیداتیدوزیس در انسان و نشخوارکنندگان می‌شود. با توجه به شیوع بالای این آلودگی در ایران، مقابله با آن از لحاظ بهداشت جامعه اهمیت خاصی دارد.

هدف: مطالعه به منظور تولید و ساخت سازه pEGFP-ChEgTrp به عنوان مدل DNA واکسن چند اپیتوپی علیه انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد. ابتدا اپیتوپ‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی میزبان با استفاده از پایگاه اطلاعاتی IEDB پیش‌بینی و توالی کدکننده آن ساخته شد. سپس این توالی با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد. محصول PCR پس از هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده *Xho*I در وکتور pEGFP-N_1 کلون شد و باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب با روش‌های مختلف از قبیل Colony PCR، الکتروفورز آگارز ژل و توالی‌یابی بررسی گردید.

یافته‌ها: تعداد ۴ پپتید حاوی ۱۰ اپیتوپ خطی در آنتی‌ژن EgTrp پیش‌بینی شد. توالی نوکلئوتیدی کدکننده ChEgTrp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش PCR تکثیر و قطعه‌ای شامل ۲۷۰ جفت باز حاصل شد. قطعه مورد نظر وارد وکتور pEGFP-N_1 گردید و پلاسمید نوترکیب با روشColony PCR و الکتروفورز آگارز ژل تأیید شد. برای تأیید نهایی، پلاسمید نوترکیب توالی‌یابی و به این ترتیب سازه ژنتیکی pEGFP-ChEgTrp ساخته شد.

نتیجه‌گیری: قطعه ChEgTrp به طور موفقیت‌آمیزی در وکتور pEGFP-N_1 کلون شد و این پلاسمید می‌تواند جهت ساخت DNA واکسن استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: اکینوکوکوزیس، تروپومیوزین، کلونینگ مولکولی، واکسن‌های DNA

مقدمه:

کیست هیداتیک (هیداتیدوزیس) یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که عامل آن انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس(Echinocccus granulosus)* از خانواده *تنیائیده* (*Taeniidae*) است. میزبان اصلی این انگل، سگ و سگ‌سانان و میزبان حد واسط آن انسان و نشخوارکنندگان هستند.[۱] کیست هیداتیک در مناطق نیمه گرمسیری جهان به وفور دیده می‌شود و کشور ایران در کمربند شیوع این بیماری قرار دارد.[۲] این بیماری موجب پیامدهای اجتماعی و اقتصادی قابل ملاحظه‌ای در انسان و دام می‌شود. در حال حاضر متداول‌ترین راه درمان بیماری، خارج کردن کیست‌ها با عمل جراحی است که با خطر و محدودیت‌هایی همراه است. استفاده از دارو نیز به عنوان یکی از راه‌های تخفیف علایم بالینی و بازدارنده رشد کیست مطرح است.[۳] واکسیناسیون نیز در دهه‌های

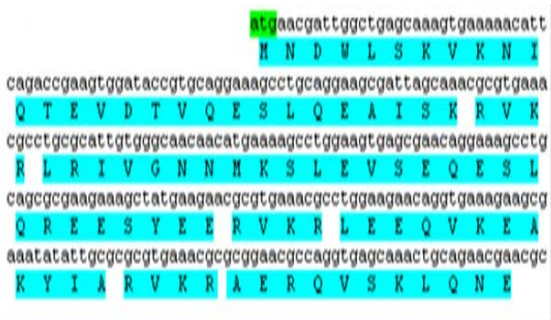
اخیر مورد توجه قرار گرفته و یک راهکار مهم برای توقف چرخه زندگی انگل است.[۴] در دهه ۱۹۹۰ کاربرد علمی استفاده از آنتی‌ژن‌های مراحل مختلف انگل به خصوص انکوسفر (شکل غیرفعال انگل به صورت تخم دفع شده از میزبان نهایی) و پروتواسکولکس (مرحله لاروی انگل) به صورت واکسیناسیون میزبان واسط تأیید شد. چندین آنتی‌ژن نوترکیب به عنوان کاندید بالقوه واکسن ارزیابی شده‌اند. این آنتی‌ژن‌ها که از کلون کردن انکوسفر و پروتواسکولکس *اکینوکوکوس گرانولوزوس* به دست آمده‌اند عبارتند از: Ag A، Ag B، EgA۳۱، Eg۹۵، rEgP۱۴-۳-۳، EgTrp و Eg۲۹.[۵]

این انگل ده نوع ژنوتیپ متفاوت دارد و سویه‌های G1 و G2 در گوسفند، G3 وG5 در گاو، G4 در اسب، G6 در شتر، G7 در خوک، G8 در آهو، G9 در گراز و G10 در گوزن ایجاد آلودگی می‌کنند.[۶]

یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌هایی که در مرحله جنینی و لاروی بیان می‌شود، EgTrp است. این پروتئین به صورت مارپیچ آلفا سازمان یافته است و در اندام مکنده و ناحیه زیر پوست انگل قرار دارد و می‌تواند به عنوان علامت ثانویه طی رشد و نمو انگل باشد. این آنتی‌ژن که ایمنی قابل توجهی را در سگ‌های واکسینه ایجاد کرده، یکی از آنتی‌ژن‌های کاندید برای مقابله با انگل است.[۸،۷] این پژوهش با هدف تولید و ساخت سازه pEGFP-ChEgTrp به عنوان مدل DNA واکسن چند اپیتوپی علیه انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* انجام شد.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد. جهت پیش‌بینی اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن EgTrp از پایگاه اطلاعاتی IEDB استفاده شد. این اپیتوپ‌ها شامل ۴ زنجیره پلی‌پپتیدی بودند که به وسیله ۳ اتصال دهنده فورینی (RVKR) به هم متصل شدند. سپس توالی اسید آمینه‌ای پپتیدهای انتخاب شده ترجمه معکوس و کدون‌های مناسب انتخاب شد. توالی نوکلئوتیدی مورد نظر (مجموع حاصل از اتصال چهار اپیتوپ به همراه اتصال دهنده‌ها را ChEgTrp گویند) توسط شرکت Genscript ساخته شد (شکل شماره ۱).



شکل ۱- توالی آمینواسیدی پپتیدهای پیش‌بینی شده آنتی‌ژن ChEgTrp (شامل ٤ زنجیره پپتیدی که به وسیله ۳ اتصال دهنده RVKR به هم متصل شده‌اند)

تکثیر قطعه ChEgTrp به وسیله واکنش PCR انجام شد. پرایمرهای مورد نیاز با استفاده از نرم‌افزار Oligo (نسخه ۵) به گونه‌ای طراحی شدند که حاوی جایگاه برش آنزیم *Xho*I باشند. هر واکنش PCR حاوی موارد زیر بود: ۱۰۰ نانوگرم DNA ساخته شده حاوی اپیتوپ‌های خطی، ۱۰ پیکوگرم پرایمر رفت 5'-TGCTCGAGATGAACGATTGGCTGAGCAAAG-3' و پرایمر برگشت 5'-TTCTCGAGTTCCGTTCTGCAGTTTGCTC-3'، ۰/۲ میلی مولار dNTP (شرکت فرمنتاز)، آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت فرمنتاز) ۱ واحد به ازای ۴۰ میکرولیتر واکنش و ۴ میکرولیتر بافر PCR۱۰X (شرکت فرمنتاز). حجم نهایی هر واکنش به وسیله آب دو بار تقطیر به ۴۰ میکرولیتر رسانده شد و واکنش PCR در ۳۵ چرخه طبق برنامه به شرح زیر انجام شد: مرحله واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله واسرشتگی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال پرایمرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله گسترش (Extension) به

مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در نهایت جهت تأیید فرایند PCR، ۵ میکرولیتر از محصول در کنار نشان‌گر ۱۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. محصولات حاصل از PCR توسط آنزیم *Xho*I (شرکت فرمنتاز) در میکروتیوپ استریل به حجم ۳۰ میکرولیتر هضم شدند. واکنش هضم شامل ۲۰ میکرولیتر محصولات PCR، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر آنزیم *Xho*I و در نهایت ۶ میکرولیتر آب بود و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت (overnight) انکوبه گردید. محصولات هضم شده با استفاده از کیت تخلیص محصولات PCR (شرکت فرمنتاز)، تخلیص شدند. وکتور pEGFP-N_1 (تهیه شده از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج در سال ۱۳۹۲) با استفاده از روش لیز قلیایی تخلیص[۹] و توسط آنزیم *Xho*I (شرکت فرمنتاز) در میکروتیوپ استریل به حجم ۳۰ میکرولیتر هضم شد. محلول واکنش هضم شامل موارد زیر بود: ۱۰ میکرولیتر DNA پلاسمیدی، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر آنزیم *Xho*I و ۱۶ میکرولیتر آب که به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. جهت تأیید صحت هضم، وکتورهای هضم شده در ژل ۱ درصد الکتروفورز شدند. به منظور جلوگیری از اتصال وکتور هضم شده به خودش، مقدار ۱ واحد آنزیم آلکالین فسفاتاز به ازای ۲۰ میکرولیتر واکنش به وکتور هضم شده اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

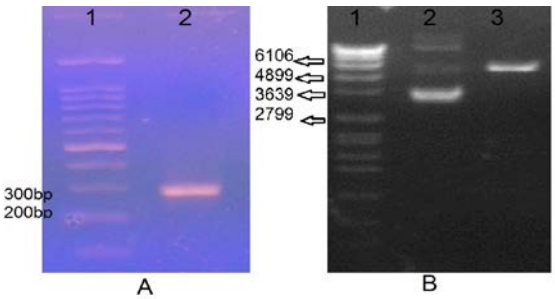
قطعه مورد نظر توسط آنزیم T4 DNA Ligase (شرکت فرمنتاز) به وکتور pEGFP-N_1 متصل شد. واکنش اتصال با نسبت مولی ۱ به ۳ (وکتور به محصول PCR) انجام شد و شامل موارد زیر بود: ۸ میکرولیتر محصول PCR، ۱۲ میکرولیتر وکتور هضم شده با آنزیم *Xho*I، ۳ میکرولیتر بافر ۱۰X لایگیشن، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase و ۶ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز. سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر (پلاسمید نوترکیب) به باکتری اشرشیاکولای سویه *DH5α* منتقل گردید. برای این منظور ۳۰ میکرولیتر از محلول حاوی پلاسمید نوترکیب به باکتری مستعد شده با کلرید کلسیم اضافه شد. انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری تحت تأثیر شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از انجام شوک حرارتی، باکتری‌ها به محیط LB مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت منتقل و سپس در محیط LB آگار حاوی کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ساعت کشت داده شدند. کلونی‌های مقاوم به کانامایسین که حاوی وکتور نوترکیب بودند بر روی محیط کشت ظاهر شدند و کلونی‌های مثبت به صورت تک کلونی برداشته و روی محیط جدید LB آگار حاوی کانامایسین کشت داده شدند. در مرحله بعد، PCR با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت قطعه مورد نظر به طور مستقیم بر روی کلونی‌ها انجام و کلونی‌های مثبت حاوی وکتور نوترکیب انتخاب شدند.

برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای قطعه ChEgTrp کلون شده در وکتور pEGFP-N_1، وکتورهای نوترکیب مثبت با روش لیز قلیایی تخلیص و توالی‌یابی آن‌ها توسط شرکت کره‌ای ماکرو ژن با روش سنگر با دو پرایمر اختصاصی انجام شد. در این پژوهش فرایند کلونینگ با استفاده از روش‌های Colony PCR، الکتروفورز آگارز ژل و توالی‌یابی بررسی شد.

❋یافته‌ها:

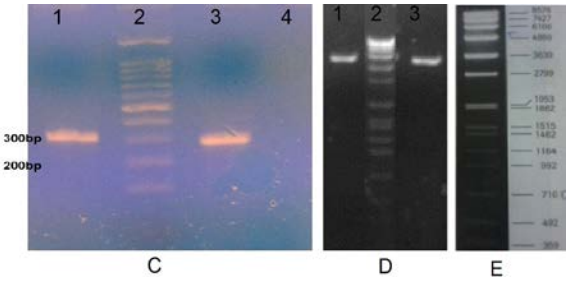
اپیتوپ‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی، پیش‌بینی شد و متناسب با توالی نوکلئوتیدی کدکننده این اپیتوپ‌ها، پرایمرهای رفت و برگشت حاوی جایگاه برشی آنزیم *Xho*I به دست آمد. محصول واکنش PCR باندی با اندازه ۲۷۰ جفت باز بود که به همراه نشان‌گر ۱۰۰ جفت بازی بر روی ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شد و این یافته دلیل بر صحت انجام واکنش PCR بود (شکل شماره ۲-

A). نتایج حاصل از الکتروفورز وکتور $pEGFP-N_1$ هضم شده با آنزیم *XhoI* همراه با نشان‌گر شماره VII شرکت Roch بر روی ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باندی در محدوده‌ی ۴۷۰۰ جفت باز، درستی فرایند هضم را نشان داد (شکل شماره ۲-B).



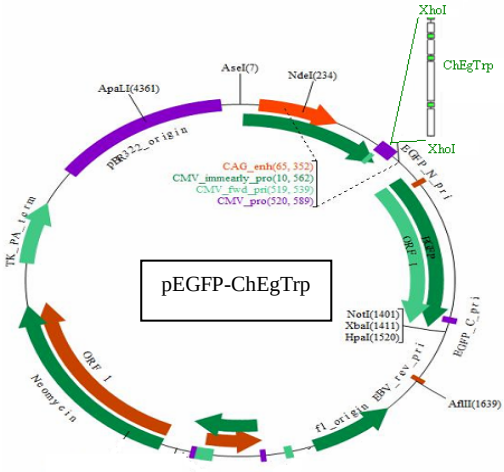
شکل ۲- A: الکتروفورز محصول PCR قطعه ChEgTrp بر روی ژل آگارز ۱ درصد، ستون ۱: نشان‌گر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، ستون ۲: قطعه ۲۷۰ جفت بازی قطعه ژنی ChEgTrp
B: الکتروفورز محصولات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱ درصد، ستون ۱: نشان‌گر VII شرکت Roch، ستون ۲: پلاسمید هضم نشده $pEGFP-N_1$، ستون ۳: پلاسمید هضم شده $pEGFP-N_1$

پلاسمیدهای نوترکیب با روش Colony PCR و با پرایمرهای اختصاصی تأیید شدند که مشاهده باند دلیل بر وجود قطعه ChEgTrp در کلونی مربوطه و عدم مشاهده باند دلیل بر عدم وجود ChEgTrp بود. قدم دیگر برای تأیید کلونینگ، الکتروفورز وکتور نوترکیب استخراج شده در ژل ۱ درصد و مقایسه آن با وکتور $pEGFP-N_1$ بود که اختلاف اندازه در حدود ۲۷۰ جفت باز مربوط به قطعه ChEgTrp بین این دو مشاهده گردید (شکل شماره ۳-C و D).



شکل ۳-C: الکتروفورز محصول Colony PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، ستون ۱و۳ محصول Colony PCR حاصل از کلونی‌های مثبت حاوی قطعه ۲۷۰جفت بازی ChEgTrp، ستون ۲: نشان‌گر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز، ستون ٤: عدم وجود باند در کلونی‌های منفی
D: الکتروفورز وکتور نوترکیب و وکتور بدون قطعه ورودی در ژل ۱ درصد، ستون ۱: وکتور نوترکیب pEGFP-ChEgTrp، ستون ۲ نشان‌گر VII شرکت Roch، ستون ۳: وکتور $pEGFP-N_1$ هضم شده با آنزیم *XhoI* و E: نشان‌گر VII شرکت Roch

در نهایت توالی‌یابی وکتور نوترکیب با پرایمرهای Trp، وجود قطعه مولتی‌اپیتوپ تروپومیوزین را در وکتور $pEGFP-N_1$ تأیید کرد (شکل شماره ۴).



شکل ٤- طرح کلی وکتور نوترکیب pEGFP-ChEgTrp به عنوان یک سازه چند اپیتوپی

❋بحث و نتیجه‌گیری:

این سازه ژنتیکی با موفقیت در وکتور $pEGFP-N_1$ کلون شد که کارآمدی آن (پاسخ ایمنی در میزبان ایمن شده با این سازه ژنتیکی) در آینده بررسی خواهد شد.

استفاده از اپیتوپ‌ها برای ایجاد ایمنی علیه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* اولین بار در سال ۱۹۹۸ و توسط ولارد و همکاران برای بررسی پاسخ آنتی‌بادی واکسن EG۹۵ انجام و از توالی EG۹۵ تعداد ۱۸ پپتید به صورت اپیتوپ‌های خطی ساخته شد. نتایج این تحقیق مفید بودن پپتیدهای ایمنوژن جهت تولید واکسن علیه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* را نشان داد.[۱۰] آنتی‌ژن‌های *اکینوکوکوس گرانولوزوس* هر دو الگوی ترشحی سایتوکین Th_1 و Th_2 را القا می‌کنند. Th_1 با سایتوکین‌های IL-۲ ، IFNγ و لنفوتوکسین و Th_2 با تولید IL-۴ و IL-۵،۶،۱۰ القا می‌شود.[۱۱] تولید میزان بالای IL-۴ و IL-۱۰ در بیماران هیداتیدی با میزان بالای IgE و IgG۴ متناسب است. دو سایتوکین دیگر Th_2 یعنی ۶ و IL-۵ نیز به میزان زیادی توسط بیماران مبتلا به هیداتیدوز تولید می‌شوند. مقایسه

پاسخ بیماران تحت درمان با آلبندازول که سایتوکین‌های Th_1 در آن‌ها غالب است نسبت به پاسخ بیمارانی که سایتوکین‌های Th_2 در آن‌ها غالب است نشان داده است که پاسخ Th_2 در کشتن انگل و از بین بردن بیماری نقش کم‌تری دارد.[۱۲] تغییر در پاسخ سایتوکین‌ها به سمت الگوی بیان Th_1 در انسان و موش رشد انگل را کاهش می‌دهد؛ از این رو سرکوب کردن آنتی‌ژن‌هایی که در القای پاسخ سلولی Th_2 میزبان نقش دارند و واکسیناسیون با آنتی‌ژن‌های القاکننده پاسخ وابسته به Th_1 می‌تواند قدم مهمی برای طراحی واکسن در آینده باشد.[۱۳]

در حال حاضر مطالعه‌های انجام شده در زمینه تولید واکسن علیه *اکینوکوکوس گرانولوزوس* براساس پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن‌هایی مانند EG۱۰۱، EgA۳۱، EG۱۱۹ و Eg۹۵ بوده است که با توجه به متنوع بودن سروتیپ‌ها، این واکسن‌ها نتوانسته‌اند علیه همه سروتیپ‌ها ایمنی ایجاد کنند.[۱۴] آنتی‌ژن مورد استفاده در این پژوهش برای ساخت واکسن، تروپومیوزین بود. پتاوی و همکاران در سال ۲۰۰۸ از پروتئین نوترکیب تروپومیوزین به عنوان واکسن استفاده کردند که حدود ۸۰ درصد در سگ‌ها ایمنی ایجاد کرد و سبب کاهش رشد کرم‌های باقی‌مانده شد.[۱۵] فریز و همکاران در سال ۲۰۰۵ آنتی‌ژن Trp را در وکتور pQE80L کلون و پروتئین نوترکیب آن را تخلیص کردند و سپس موش‌های نژاد BALB/C را با آن ایمن کردند و دریافتند که سایتوکین‌های IL-۱۲، IL-۱۰ و γ IFN به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد.[۱۶] یکی از مهم‌ترین تفاوت‌های این پژوهش با مطالعه‌های انجام شده، پیش‌بینی اپیتوپ‌های تحریک‌کننده لنفوسیت نوع T آنتی‌ژن تروپومیوزین و اتصال این اپیتوپ‌ها با استفاده از اتصال دهنده‌های فورینی به هم به منظور ایجاد پاسخ ایمنی قوی‌تر علیه انگل *اکینوکوکوس گرانولوزوس* بود. تمامی پژوهش‌هایی که در زمینه آنتی‌ژن تروپومیوزین انجام شده‌اند براساس واکسن‌های نوترکیب بوده‌اند. از محدودیت‌های واکسن‌های نوترکیب می‌توان به مواردی مثل پیچیدگی مراحل تولید اشاره کرد. همچنین تخلیص و نگه‌داری آن‌ها مستلزم پرداخت هزینه‌های زیاد و دانش فنی و ابزار اختصاصی است. نکته قابل تأمل دیگر این است که این واکسن‌ها به دلیل عدم انجام واکنش‌های گلیکوزیلاسیون، ساختار طبیعی نخواهند داشت و از آنجا که واکنش ایمنی علیه بخش قندی است، لذا هرگونه اشکال در فرآیند شکل‌پذیری ساختمان فضایی پروتئین در مراحل مختلف تخلیص سبب کاهش ایمنی‌زایی می‌شود.

با پیشرفت زیست فناوری توجه به سمت طراحی واکسن‌های DNA معطوف شده است که نسل سوم واکسن‌ها هستند و نسبت به واکسن‌های نوترکیب مزایای زیر را دارند: عدم ایجاد عفونت، توانایی ایمنی علیه چندین سویه مختلف، ایمنی پایدار و طولانی مدت، سهولت و سرعت در تولید انبوه و مشابه بودن مراحل تولید واکسن‌های مختلف، پایداری در دما، تحریک سیستم ایمنی هومورال، سلولی و مخاطی، نیاز به مقدار کم‌تر واکسن و تحریک بیش‌تر پاسخ ایمنی سلولی Th_1.[۱۷] بررسی پاسخ ایمنی سلولی و ترشح سایتوکین‌ها در مدل‌های حیوانی مختلف بعد از تزریق واکسن DNA نشان‌دهنده فعالیت پاسخ Th_1 بوده که مشخصه آن ترشح سایتوکین‌های INFγ و IL-۲ است و این همان پاسخ مطلوبیست که در مقابله با انگل نقش بسزایی دارد.[۱۸]

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و محدودیت‌های واکسن نوترکیب و همچنین اهمیت واکسن‌های ژنی در رابطه با پاسخ ایمنی مطلوب علیه انگل مورد نظر، انتظار می‌رود سازه ژنتیکی pEGFP-ChEgTrp به عنوان یک مدل DNA واکسن بتواند پاسخ ایمنی مناسبی در مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد کند.

❋سپاس‌گزاری:

مطالعه انجام شده بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج است که

بدین وسیله از تمامی همکاران محترم بخش زیست فناوری این مؤسسه قدردانی می‌شود.

❋مراجع:

1. Jabbar A, Narankhajid M, Nolan MJ, Jex AR, Campbell BE, Gasser RB. A first insight into the genotypes of Echinococcus granulosus from humans in Mongolia. Mol Cell Probes 2011 Feb; 25 (1): 49-54.

2. Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebali M, Eshraghian M, et al. Echinococcus granulosus genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. Exp Parasitol 2010 Apr; 124 (4): 373-9.

3. Sarvi S, Dalimi A, Ghafarifar F. Molecular Cloning and Expression of EG95 Gene of Iranian Isolates of Echinococcus granulosus. Iran J Parasitol 2012; 7 (2): 1-7.

4. Esmaelizad M, Ahmadian G, Aghaiypour K, Shamsara M, Paykari H, Tebianian M. Induction of protective T-helper 1 immune responses against Echinococcus granulosus in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013 Jun; 108 (4): 408-13.

5. González G, Spinelli P, Lorenzo C, Hellman U, Nieto A, Willis A, et al. Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of Echinococcus granulosus which is immunologically related to, but distinct from, antigen. Mol Biochem Parasitol 2000 Feb 5; 105 (2): 177-84.

6. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. Clin Dev Immunol 2011; 2012: 639362.

7. Heath DD, Robinson C, Shakes T, Huang Y, Gulnur T, Shi B, et al. Vaccination of bovines against Echinococcus granulosus

8. Esteves A, Senorale M, Ehrlich R. A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of Echinococcus granulosus. Parasitol Res 2003 Apr; 89 (6): 501-2.

9. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry 1966 Feb; 5 (2): 467-77.

10. Woollard DJ, Gauci CG, Heath DD, Lightowlers MW. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. Parasite Immunol 1998 Nov; 20 (11): 535-40.

11. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. Clin Dev Immunol 2011; 2012: 101895.

12. Mourglia-Ettlin G, Marqués JM, Chabalgoity JA, Dematteis S. Early peritoneal immune response during Echinococcus granulosus establishment displays a biphasic behavior. PLoS Negl Trop Dis 2011 Aug; 5 (8): e1293.

13. Zhang W, Ross AG, McManus DP. Mechanisms of immunity in hydatid disease: implications for vaccine development. J Immunol 2008 Nov 15; 181 (10): 6679-85.

14. Carmena D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection: An update. Acta Trop 2006 Apr; 98 (1): 74-86.

15. Petavy AF, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T, et al. An oral recombinant vaccine in dogs against Echinococcus granulosus, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. PLoS Negl Trop Dis 2008 Jan 16; 2 (1): e125.

16. Fraize M, Sarciron M, Azzouz S, Issaadi

(cystic echinococcosis). Vaccine 2012 Apr 26; 30 (20): 3076-81.

N, Bosquet G, Petavy A. Immunogenicity of two Echinococcus granulosus antigens EgA31 and EgTrp in mice. Parasitol Res 2005 May; 96 (2): 113-20.

17. Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. Germs 2013 Mar 1; 3 (1): 26-35.

18. Tabatabaie F, Mahdavi M, Faezi S, Dalimi A, Sharifi Z, Akhlaghi L, et al. Th1 platform immune responses against Leishmania major induced by Thiol-specific antioxidant-based DNA vaccines. Jundishapur J Microbiology. 2014 Feb; 7 (2): e8974.