

شناسایی مولکولی ژن فسفوگلیسرات کیناز از مواد دفعی - ترشحي انگل توکسوکارا کنیس

عباس جلودار^{۱*}

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۰

چکیده

انگل توکسوکارا کنیس گسترش جهانی دارد و علت اصلی بیماری مشترکی بین انسان و دام است که توکسوکاریوز نامیده می‌شود. عفونت در انسان عمدتاً در اطفال متعاقب بلع تصادفی تخم انگل جنین‌دار که در خاک وجود دارد و یا از طریق غذا و دست‌های آلوده اتفاق می‌افتد. در این پژوهش، آغازگرهای اختصاصی برای ژن کد کننده فسفوگلیسرات کیناز از انگل توکسوکارا کنیس با استفاده از EST (Expressed sequence tag) موجود در بانک ژن (با شماره دسترسی HO348231)، طراحی گردید و سپس با استفاده از تکنیک Semi-Nested RT-PCR آن قطعات ژنی تکثیر گردیدند. قطعه‌ی ژن کد کننده‌ی فسفوگلیسرات کیناز با موفقیت تکثیر و به منظور شناسایی مولکولی در پلاسمید pMALc2x همسانه‌سازی گردید. مجموع کل RNA از نمونه‌ها استخراج و سپس به منظور ساخت cDNA، از آن به عنوان رونوشت و از الیگو (dT) به عنوان آغازگر استفاده گردید. در ادامه پس از بهینه‌سازی شرایط PCR، قطعه ژنی به طول ۳۰۴ نوکلئوتید تکثیر گردید و به منظور تسهیل در امر همسانه‌سازی محصول RT-PCR و وکتور pMAL، به وسیله‌ی آنزیم‌های محدودالانثر *BamHI* و *HindIII* هضم شده و سپس توسط آنزیم لیگاز به یکدیگر متصل شدند. پلاسمید نوترکیب به دست آمده جهت تکثیر به باکتری *E. coli* سوش BL21 منتقل و توالی آن بررسی گردید. توالی ۳۰۴ نوکلئوتیدی به دست آمده قطعه‌ی پروتئینی حاوی ۱۰۱ اسید آمینه با وزن مولکولی ۱۰/۴۹۷ کیلو دالتون و نقطه‌ی ایزو الکتریک ۵ را کد می‌کند. مقایسه‌ی این ژن با ژن‌های مشابه از دیگر نماتودها، دامینی به نام "Phosphoglycerate kinase superfamily" را نشان داد. هم‌ترازی توالی به دست آمده نشان داد که این ژن با ژن فسفوگلیسرات کیناز از انگل *Ascaris suum*، ۹۵ درصد مشابهت دارد. مشابه این ژن با نماتودی دیگر به نام *Brugia malayi* و هم‌چنین فیلاریایی به نام *loa loa* ۸۵ درصد همخوانی دارد.

کلمات کلیدی: cDNA، توکسوکارا کنیس، پروتئین دفعی - ترشحي، Semi-nested RT-PCR

مقدمه

هنگامی رخ می‌دهد که سیستم ایمنی توانایی کنترل کردن مهاجرت لارو را در کبد ندارد (Taira et al. 2004). با توجه به مهاجرت درونی لارو عفونی در بدن انسان، بیماری توکسوکاروز از نظر علائم کلینیکی به دو فرم عمده‌ی مهاجرت لارو چشمی و احشایی مشاهده می‌شود. فرم مهاجرت چشمی باعث بیماری‌های چشمی و در نهایت منجر به کوری می‌گردد، در حالی که فرم مهاجرت احشایی می‌تواند منجر به تورم ارگان‌های درونی بدن و سیستم اعصاب مرکزی و هم‌چنین باعث ائوزینوفیلی، آسم و درد ناحیه‌ی شکم شود (Behnke et al. 1992).

توکسوکاریوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که به وسیله‌ی نماتودی به نام توکسوکارا کنیس که فرم بالغ آن عمدتاً در روده‌ی سگ مشاهده می‌گردد، ایجاد می‌شود (Glickman et al. 1986). تخم این انگل از طریق مدفوع سگ به مقدار زیاد در محیط رها می‌شود که انسان به ویژه کودکان با بلعیدن آن آلوده می‌شوند. لارو عفونی متعاقب بلع تخم در ارگان‌هایی داخلی شروع به مهاجرت می‌کند و به دنبال آن مواد ایمنولوژیکی که به عنوان مواد ترشحي - دفعی شناخته می‌شوند، تولید می‌نماید. آلودگی انسان به این انگل اغلب بدون علامت است و

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: jolodara@scu.ac.ir

^{۱*} دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

novel transcripts از انگل توکسوکارا کنیس به نام‌های ۳-*ant*، ۵-*ant*، ۳۵-*ant* و ۳۴-*ant* جدا شده‌اند که توالی آن-ها همولوژی کمی با یکدیگر نشان می‌دهند (Tetteh et al. 1999). فعالیت آنتی‌بادی ضد محصولات این ژن‌ها (۳/۱-*ant* و ۳۴-*ant*) در سرم بیمار حضور دارد، احتمال داده می‌شود که این پروتئین‌ها دیرتر از بقیه در عفونت ساخته می‌شوند. تجزیه و تحلیل این پروتئین‌های جدید می‌تواند انتخاب مناسبی برای شناسایی مولکولی مکانیسم فرار انگل از سیستم ایمنی میزبان باشند. هدف از این مطالعه شناسایی مولکولی برخی قطعات ژنی و یافتن نواحی محافظت شده این ژن‌ها در دو فرم لاروی و بالغ انگل توکسوکارا کنیس می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

نمونه‌های انگل متعلق به گونه توکسوکارا کنیس از دام‌های کالبدگشایی شده در دانشکده‌ی دامپزشکی اهواز جمع‌آوری شد که پس از شناسایی جهت محافظت و جلوگیری از تخریب RNA موجود در آن‌ها در محلول RNALater (کیاژن، سیناژن، تهران، ایران) نگهداری شدند.

استخراج RNA کل

ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول RNXTM (سیناژن، تهران) به ازای هر ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های جدا شده از توکسوکارا کنیس افزوده شد و استخراج RNA مطابق روش استاندارد صورت گرفت. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

ساخت cDNA

سه میکروگرم RNA کل با استفاده از مواد جدول ۱ جهت ساختن cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از الیگو (dT) اصلاح شده که برای استفاده در این تحقیق طراحی گردیده بود، استفاده شد.

در محیط کشت، لاروها مجموعه‌ی پیچیده‌ای از گلیکو پروتئین‌ها به نام مواد دفعی - ترشحی توکسوکارا (TES) را ترشح می‌کنند که با به کارگیری آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، ارتباط نزدیک بین این ملکول‌ها و آنتی‌ژن‌های پوششی لاروها مشخص گردیده است.

یکی از اولین پروتئین‌های دفعی-ترشحی همسانه‌سازی شده‌ی توکسوکارا کنیس گلیکو پروتئینی ۲۶ کیلو دالتونی به نام TES-26 است که شامل قطعه‌ی انتهایی C همولوگ پروتئین فسفاتیدیل اتانول آمین پستانداران است (Gems et al. 1995, Loukas et al. 1999, Norhaida et al. 2008). در همین زمینه، Maizels و همکاران آنتی‌بادی‌های تولید شده در یک واکنش اختصاصی با TES-32 و TES-70 نو ترکیب را نشان داده‌اند. در این دسته از پروتئین‌ها شباهت‌هایی در توالی آن‌ها با خانواده‌ی لکتین نوع C که نقش محوری در شناسایی پاتوژن و فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی پستانداران را دارد، نشان داده‌اند (Maizels et al. 1993). در مطالعه‌ی دیگر، حضور ایزوآنزیم‌های متفاوت ژن سوپر اکسیداز دسموتاز در توکسوکارا کنیس به وسیله‌ی آنالیز بیوشیمیایی و توالی یابی قطعات ژنی شناسایی شده‌اند. این ژن‌ها شامل SOD-1، SOD-2، SOD-3، SOD-4 و SOD-5 می‌باشند که هر کدامشان ایزوآنزیم جداگانه‌ای را بر پایه‌ی تفاوت توالی‌شان کد می‌کنند. در تحقیقی دیگر، ژن کاملی به نام Tc-CPL-1 از توکسوکارا کنیس توالی‌یابی شد که بعداً مشخص گردید که محصول پروتئینی آن پروتئین‌های مشابه Cathepsin L را کد می‌کند. این پروتئین نوترکیب (rTc-CPL-1) در باکتری بیان شد و برای ایمنی‌زایی در موش از آن استفاده گردید. با استفاده از این پروتئین آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر ضد آن در موش‌های آلوده به توکسوکارا کنیس ایجاد شد (Loukas et al. 1998). آسپاراژینیل اندوپیتیداز پروتئین دیگری است که از لارو عفونی انگل توکسوکارا کنیس توالی‌یابی شد. در واقع، این اولین آسپاراژینیل اندوپیتیدازی است که از یک انگل نماتودی جداسازی شد. اخیر نیز ۴ ژن به نام‌های Abundantly (ant)

جدول ۱: اجزاء و مقادیر استفاده شده جهت تهیه cDNA ژن فسفولیسرات کیناز توکسوکارا کنیس

میزان مورد استفاده	مواد
۱ µl	(۰/۵ µg/µl) الیگو (ModT) (dT)
۲/۲ µl	DEPC H ₂ O
۴ µl	بافر 5x
۰/۸ µl	dNTP (۲۵ mM)
۰/۵ µl	Ribo lock (۴۰ u/µl)
۱ µl	آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (۲۰۰ u/µl)
۱۰/۵ µl (۳ میکروگرم)	RNA استخراج شده
۲۰ µl	حجم کل

پروتئین‌ها به صورت Expressed Sequence Tag (EST) در بانک ژن موجود است. با توجه به این که دسترسی به لارو انگل در محیط طبیعی مشکل است و کشت این لارو در محیط آزمایشگاه نیز با دشواری زیادی همراه است، ولی دسترسی به فرم بالغ انگل کماکان میسر است، این پژوهش بر آن شد که قسمت‌هایی از ژن هدف که اولاً در هر دو مرحله لاروی و بالغ ترشح می‌شوند و ثانیاً از نظر ساختمان ژنتیکی دارای بیش‌ترین همولوژی هستند را به منظور شناسایی انتخاب و همسانه‌سازی کند. ابتدا توالی قطعات ژنی جدا شده از لارو و انگل بالغ توکسوکارا کنیس انتخاب و سپس از بانک ژن NCBI استخراج گردیدند. پس از مقایسه‌ی توالی‌ها که به طور جداگانه برای هر ژن صورت گرفت، توالی‌های یکسان در این نواحی مشخص و جهت طراحی آغازگرها مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از توالی‌های محافظت شده توسط نرم‌افزار *PrimoPro* ۳/۴ طراحی شدند. به منظور تسهیل امر همسانه‌سازی جایگاه برش دو آنزیم *Bam*HI و *Hind*II به ترتیب در ابتدای پرایمرهای Tc-PGK-F و Tc-PGK-R تعبیه گردیدند. از آن جا که افزودن نوکلئوتیدهای G و C به انتهای 5' آغازگرهای دارای جایگاه برش، امکان هضم آنزیمی را افزایش می‌دهد، در این پژوهش نیز یک توالی سه نوکلئوتیدی CGC به انتهای 5' هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت افزوده شد. این توالی به منظور شناسایی محل برش و استقرار آنزیم محدودالثر بر روی رشته اسید نوکلئیک به کار گرفته شد. ساخت آغازگرها به شرکت سیناژن در ایران، تهران سفارش داده شد.

پس از افزودن الیگو (dT) اصلاح شده به RNA کل، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از ۲ دقیقه بر روی یخ منتقل گردیدند. سپس بافر 5x، dNTP، Ribolock (سیناژن، ایران، تهران) و آب اضافه شدند. پس از انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس (سیناژن، ایران، تهران) به نمونه افزوده گردید. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شدند.

طراحی و ساخت آغازگر

مواد دفعی - ترشچی لارو انگل توکسوکارا کنیس حاوی پروتئین‌های هدفی است که اطلاعات در مورد ژن کامل آن‌ها عموماً در بانک ژن NCBI موجود نیست. هرچند که قطعات ناکامل ژنی مربوط به این گونه

جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی ژن فسفوگلیسرات کیناز توکسوکارا کنیس

نام آغازگر	توالی آغازگر
ModT	5'-cgcTCTAGAGCTCGAGTCACTTTTTTTTTTTTTTTTTT <i>XbaI</i> <i>XhoI</i>
ModT-R	5'-CCCAGATCTCGAGCTCAGTG-3'
TcPGK -F	5'-cgcGGATCCGTCGGACCAGAAACAACGAA <i>BamHI</i>
TcPGK -R	5'-cgcAAGCTTCCGGAGACAGAGCGTCAA <i>HindIII</i>
MalE	5'-GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC

روش Semi-Nested RT-PCR

آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت هر ژن صورت گرفت. جدول ۳ مواد مورد استفاده در واکنش PCR اول و دوم را نشان می‌دهد. برنامه‌ی دمایی بهینه مورد استفاده جهت تکثیر ژن هدف مطابق با جدول ۴ اجرا گردید.

PCR اول توسط آغازگر ModT-R و آغازگر رفت اختصاصی انجام شد. به دنبال آن به منظور تکثیر یک قطعه نوکلئوتیدی اختصاصی‌تر، PCR دوم با استفاده از محصول رقیق شده PCR اول به عنوان الگو، در حضور

جدول ۳: مواد مصرفی برای انجام واکنش‌های PCR اول و دوم جهت تکثیر ژن فسفوگلیسرات کیناز توکسوکارا کنیس

غلظت در حجم نهایی	مقدار استفاده شده در هر واکنش	مواد مورد نیاز
1X	۲/۵ میکرولیتر	بافر PCR (10X)
۰/۲۵ mM	۰/۶۲۵ میکرولیتر	dNTP (10 mM)
۲ mM	۱ میکرولیتر	کلرید منیزیم (۵۰mM)
۰/۴ μM	۱ میکرولیتر	پرایمر ModT-R (10 μM)
۰/۴ μM	۱ میکرولیتر	TcPGK -F (10 μM)
۱ U	۰/۲ میکرولیتر	DNA پلی‌مراز Taq (۵u/μl)
۱۰۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر	الگو DNA
	تا حجم ۲۵ میکرولیتر	آب مقطر دیونیزه استریل

جدول ۴: برنامه‌ی دمایی بهینه مورد استفاده در واکنش‌های PCR اول و دوم جهت تکثیر ژن فسفوگلیسرات کیناز توکسوکارا کنیس

تعداد چرخه	نام مرحله	زمان اجرا	درجه‌ی حرارت (سانتی‌گراد)
۱ چرخه	واسرشت‌سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۵
۳۵ چرخه	واسرشت‌سازی	۴۰ ثانیه	۹۴
	اتصال	۹۰ ثانیه	۵۶
	گسترش	۹۰ ثانیه	۷۲
۱ چرخه	گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

شد و با ولتاژ ۷-۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر ژل به مدت ۴۵ دقیقه در کنار مارکر DNA الکتروفورز گردید. مراحل تخلیص محصول PCR از روی ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج از ژل (کیاژن آلمان) مطابق روش پیشنهاد شده توسط شرکت سازنده انجام گرفت.

الکتروفورز محصول PCR و خالص‌سازی آن به منظور بررسی محصول واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری ۶X مخلوط و به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد حاوی بافر TAE و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید (۱۰mg/ml)، اضافه

همسانه‌سازی ژن هدف در پلاسمید pMAL

محصول PCR دوم خالص شده و DNA پلاسمیدی pMALc2x با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر *BamHI* و *HindIII* (سیناژن، ایران، تهران)، به صورت واکنش‌های مجزا و به صورت هضم آنزیمی دوگانه در دمای ۳۷ درجه-ی سانتی‌گراد برش داده شدند. در ادامه، تخلیص محصول برش داده شده توسط روش فنل-کلروفرم صورت پذیرفت. پس از اتصال محصول PCR به پلاسمید برای انجام ترانسفورماسیون ۲۰۰ میکرولیتر از سلول‌های باکتریایی *E. coli* سوش TG1 مستعد شده که توسط محلول مستعدکننده (۸۵ درصد محیط کشت LB، ۱۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۳۳۵۰، ۵ درصد DMSO، ۱۰ میلی‌سولفات منیزیم و ۱۰ میلی‌مولار کلرور منیزیم) آماده‌سازی شده بودند، به درون میکروتیوب ریخته و سپس ۱۰ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب به آن افزوده شد و برای مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. به منظور انجام شوک حرارتی میکروتیوب دقیقاً به مدت ۳۰ ثانیه در حرارت ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در حمام بن‌ماری انکوبه شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB مایع گرم به تیوب اضافه شد. مخلوط به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. باکتری‌های ترانسفورم شده در پلیت‌های حاوی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ µg/ml)، Xgal و IPTG (۴۰ µg/ml) از هر کدام) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت شدند. پس از غربالگری کلنی‌های سفید به منظور ادامه‌ی مطالعه انتخاب و کلنی‌های آبی حذف گردیدند. کلنی‌های انتخاب شده با استفاده از یک لوپ استریل، به یک لوله‌ی آزمایش که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بود، منتقل گردید و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت گردش ۲۲۰ rpm، قرار گرفت. خالص‌سازی DNA پلاسمیدی با استفاده از روش فنل: کلروفرم صورت گرفت.

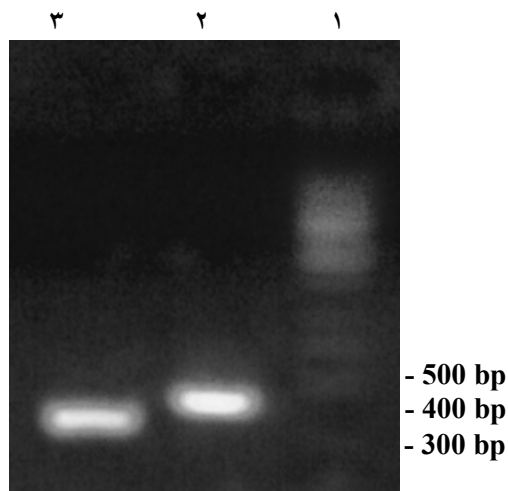
توالی‌یابی و آنالیز ژن

به منظور تعیین توالی قطعه‌ی ژن از دو سوی، پلاسمیدهای خالص شده به کمک آغازگرهای اختصاصی و MALE به شرکت ژن فناوران در تهران ارسال گردید. جهت ترجمه‌ی توالی نوکلئوتیدی به اسید آمینه‌های مربوطه، از نرم‌افزار ExPasy translate tool (<http://expasy.org/tools>) استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، مقایسه‌ی توالی به دست آمده با داده‌های موجود در بانک ژن انجام و با نرم‌افزار CDD-Search دامین‌های همولوگ تعیین گردید. با استفاده از برنامه‌ی CLUSTAL_W عمل هم‌ترازی انجام و با کمک برنامه BOXSHADE (ch.embnet.org/software/BOX_form.html) ویرایش گردید. جهت جستجوی موتیف از نرم‌افزار آنالین pfam.sanger.ac.uk/search/sequence استفاده شد. ساختمان ثانویه‌ی پروتئینی توسط برنامه‌ی PSIPRED Protein Analyser (Buchan et al. 2013)، تعیین شد. در پایان نیز ترسیم درخت فیلوژنی به روش neighbor-joining method انجام گردید (Dereper et al. 2008).

نتایج

طراحی آغازگرهای اختصاصی

از آنجایی که تاکنون توالی‌یابی ژن کامل فسفوگلیسرآت کیناز از توکسوکارا کنیس صورت نگرفته است، برای طراحی آغازگر می‌باید از توالی‌های ذخیره شده‌ای که به صورت EST در بانک ژن NCBI موجود است، استفاده کرد. از سوی دیگر، سعی گردید که نواحی از ژن فسفوگلیسرآت کیناز انتخاب گردد که دارای بیش‌ترین همولوژی در دو فرم مترشحه آن در مرحله‌ی لاروی و بالغ را نشان می‌دهد. بدین منظور EST‌هایی با شماره دسترسی BQ089398، BQ089361 و HO348231 از کرم بالغ و تنها EST موجود از مرحله‌ی لاروی با شماره دسترسی AA825118 از بانک ژن استخراج گردید و با انجام عمل هم‌ترازی، نقاطی را که بیش‌ترین



تصویر ۱: الکتروفورز محصول واکنش PCR اول و دوم برای تکثیر ژن فسفوگلیسرات کیناز توکسوکارا کنیس بر روی ژل آگارز

مارکر DNA در ستون ۱، ستون ۲ و ۳ به ترتیب محصول به دست آمده از PCR اول و دوم نشان داده شده است.

همسانه‌سازی و شناسایی مولکولی قطعه‌ی ژن PGK پس از هضم قطعه‌ی ژن مورد نظر با آنزیم‌های محدودالتر، این قطعه در وکتور pMALc2x که با همان آنزیم‌ها محدودالتر برش داده شده بودند، همسانه‌سازی گردید. با انتخاب این وکتور نه تنها امر توالی‌یابی قطعه‌ی ژن مورد نظر میسر گردید بلکه چون این وکتور قادر به تولید پروتئین محلولی به نام Maltose binding protein (MBP) است که ژن مذکور در اتصال به قسمت انتهایی C این پروتئین بیان می‌شود، از این سازه می‌توان در مطالعات آینده برای بیان پروتئین نوترکیب قطعه‌ی ژن مورد نظر استفاده کرد. به منظور تأیید وجود پلاسمید نوترکیب در سلول‌های باکتریایی، کلنی‌های انتخاب شده در ۱۲ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و پس از لیز سلولی در حمام بن ماری ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، از ۱ میکرولیتر محلولی رویی به عنوان رونوشت با آغازگرهای اختصاصی ژن مربوطه در واکنش PCR استفاده شد. به منظور اطمینان کامل و تشخیص قطعی ژن مورد، نظر توالی‌یابی شد که نتیجه‌ی توالی‌یابی در تصویر ۲ نشان داده شده است.

همولوژی را بین EST‌های جدا شده از کرم بالغ و لارو نشان می‌داد، تعیین گردید. برای طراحی آغازگرها از توالی‌های یکسان و محافظت شده در این نواحی که در ابتدا و انتها به ترتیب حاوی کدون (GTC) و کدون خاتمه (TAA) بودند، استفاده گردید (تصویر ۶).

تکثیر دو مرحله‌ای به روش Semi-Nested RT-PCR با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری، غلظت RNA استخراج شده از توکسوکارا کنیس به میزان ۱۴۴۰ نانوگرم در هر میکرولیتر محاسبه گردید. آزمایش‌های متعدد به منظور بهینه‌سازی غلظت cDNA مشخص کرد که میزان ۱۰۰ نانوگرم از cDNA ساخته شده در ترکیب واکنش PCR مناسب‌ترین غلظت است. در ادامه بهینه‌سازی غلظت‌های مختلف کلرید منیزیم و آغازگرها، غلظت بهینه برای کلرید منیزیم ۲ میلی‌مولار و برای هر کدام از آغازگرها ۰/۴ پیکومول در میکرولیتر به دست آمد. اجرای آزمایش‌های متعدد با دماهای اتصال متفاوت نشان داد که دمای اتصال ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و زمان اتصال ۱ دقیقه بهترین شرایط را برای انجام واکنش فراهم می‌کند. در انجام تکنیک Semi-nested RT-PCR، محصول PCR اول به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق شد و ۱ میکرولیتر از آن به عنوان الگو برای انجام واکنش PCR دوم مورد استفاده قرار گرفت. در واکنش PCR مرحله‌ی دوم غلظت‌های منیزیم و پرایمرها و زمان اتصال پرایمرها مشابه PCR اول تعیین شد. تنها فاکتور متغیر در افزایش دمای اتصال بود که به ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت. همان طور که در تصویر ۱ نشان داده شده است، طی PCR اول که با آغازگر اختصاصی رفت و آغازگر ModT-R صورت گرفت، قطعه‌ی ژنی با اندازه‌ی ۴۰۰ جفت باز تولید گردید. هنگامی که محصول PCR اول به عنوان الگو در واکنش PCR دوم مورد استفاده قرار گرفت، محصول نهایی با اندازه‌ی ۳۰۴ bp جفت باز تولید گردید (تصویر ۱).

داده‌ها، مشخص شد که این ژن در ناحیه‌ی بین اسید آمینه ۹۱-۱ حاوی دامینی به نام "Phosphoglycerate kinase (PGK)" است. این دامین با E-value به میزان $3.5e-33$ مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت. در قسمت الف و ب تصویر ۲ این ناحیه با خطی که زیر آن رسم گردیده است و همین طور به صورت شماتیک مشخص شده است.

به منظور شناسایی قطعی قطعه‌ی ژن مورد نظر، این قطعه‌ی ژنی توالی‌یابی شد که نتیجه‌ی آن در تصویر ۲ نشان داده شده است. با توجه به اطلاعات نوکلئوتیدی موجود در این تصویر، قطعه‌ی ژن مورد نظر از ۱۰۲ اسید آمینه با وزن مولکولی برابر ۱۰/۴۹۷ کیلودالتون و نقطه‌ی ایزوالکتریک برابر با ۵ تشکیل شده است. بر اساس این

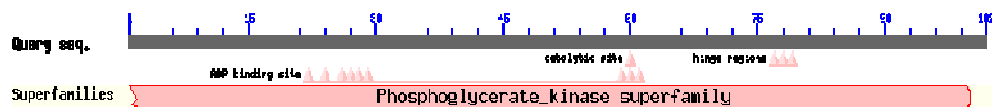
(الف)

```
gtcggaccagaaacaacgaagcagttcgcgtgaggtgggtggacgcgccaagacgattgtg
V G P E T T K Q F A E V V G R A K T I V
tggaatggaccggcaggtgttttcgaatgggacaacttcgcacatggcactaaaggactc
W N G P A G V F E W D N F A H G T K G L
atggatgcagtcgtaaggctacgcacgagcagttaccatcattgggtggcgggtgat
M D A V V K A T H D G A V T I I G G G D
acagcgacgtgctgcaagaagtgaacacggaggacgaggtcagccgcgtaagcactgga
T A T C C K K W N T E D E V S R V S T G
gggtggcgtagtccttgaattgcttgaaggcaagtgcttcctggcgttgacgctctgtct
G G A S L E L L E G K V L P G V D A L S
ccggca
P A
```

(ب)



(ج)



تصویر ۲: توالی ژن PGK انگل توکسوکارا کنیس. الف) توالی ژن مربوطه به همراه دامین Phosphoglycerate kinase (PGK) نشان داده شده است. زیردامین PGK خط کشیده شده است. ب) توالی نوکلئوتیدی ژن PGK برگرفته از فایل اصلی توالی‌یابی که به صورت reverse complement مشاهده می‌شود. ج) دامین PGK در توالی اسید آمینه‌ای به شکل گرافیکی نشان داده شده است.

هم‌ترازی اسید آمینه‌ای قطعه‌ی ژن PGK

نام *Brugia malayi* و هم‌چنین فیلاریایی به نام *loa loa* در ۱۰۰ درصد طول ۸۵ درصد یکسانی نشان می‌دهد. هم‌چنین با ژن فسفوگلیسرآت کیناز ۱ در انسان در ۹۷ درصد طول ۸۰ درصد مشابهت دارد. درخت فیلوژنیک

هم‌ترازی توالی به دست آمده نشان داد که قطعه‌ی ژن جدا شده از انگل توکسوکارا کنیس با ژن فسفوگلیسرآت کیناز جدا شده از انگل *Ascaris suum*، در ۱۰۰ درصد طول ۹۵ درصد تشابه دارد. مشابه این ژن از نماتودی به

کنیس با (*AsPGK*) *Brugia malayi* *Ascris suum* (*BmPGK*)، (*Caenorhabditis* *Loa loa* (*LIPGK*))، (*Caenorhabditis elegans briggsae* (*CbTGK*)) (*CePGK*) مربوط به نماتودها و (*SmPGK*) (*Schistosoma mansoni*) مربوط به ترماتود قرابت دارند و در یک دسته قرار می‌گیرند، در حالی که بقیه‌ی توالی‌ها دسته‌ی دوم را تشکیل می‌دهند.

انگل توکسوکارا کنیس بر اساس توالی ژن مورد نظر مطابق تصویر ۴ ترسیم گردید. برای این کار از هم‌ترازی توالی‌های مورد استفاده در تصویر ۳ استفاده شد. همان طور که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود، توالی‌های موجود علی‌رغم تشابه اولیه‌ی آن‌ها در سطح اسید آمینه، به دو دسته کاملاً مجزا قابل تقسیم هستند. توالی اسید آمینه‌های کد کننده‌ی قطعه‌ی ژن به دست آمده از انگل توکسوکارا

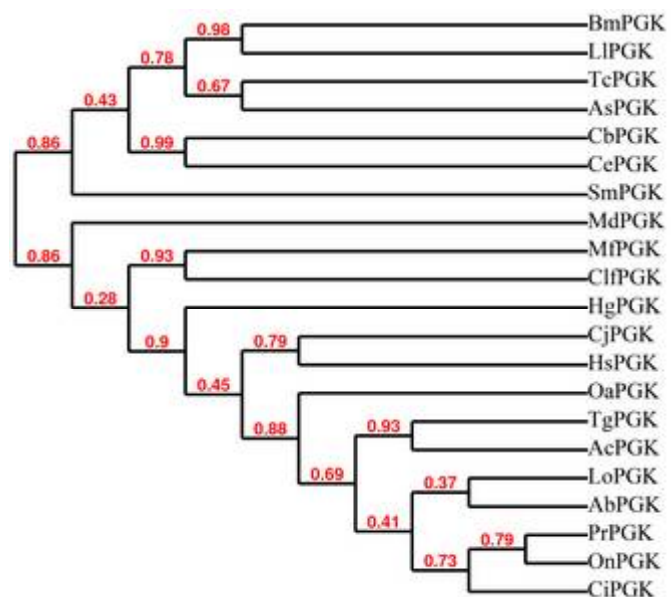
TcPGK	1	-----VGPEITTKQFAEIVVGRAKTIIVWNGPAGVFEWDNFAHGTKGLMD
AsPGK	296	HKSADIKSGIPDGWMLDVGPEITTKQFAEIVVRAKTIIVWNGPAGVFEWDNFAHGTKGLMD
BmPGK	296	FKTADIKSGIPDGWMLDIGPEITAKQFAEIVVGRAKTIIVWNGPAGVFEWENFSKGTKAVMD
LlPGK	296	FKTADIKSGIPDGWMLDIGPEITAKQFAEIVVGRAKTIIVWNGPAGVFEWENFSKGTKAVMD
CbPGK	297	ANVATAQEGVFDGMLDVGPESSKIFAAAIQRAKTIIVWNGPAGVFEEDKFATGTKSLMD
CePGK	297	SKTVTAEEGVFDGMLDVGPESSKIFAAAIQRAKTIIVWNGPAGVFEEDKFATGTKSLMD
CjPGK	6	-----NSAP---QGLDCGPESSKLYAEAVTRAKQIVWNGPVGVFEWFAFARGTKALMD
CiPGK	1	-----MGLDCGPESSKLYAEAVARAKQIVWNGPVGVFEWDNFSKGTKNLMD
TgPGK	123	TGEATVASGIPAGWMLDCCGPESVKKREVEVVGRAKQIVWNGPVGVFEWDKFSKGTKALMD
AcPGK	298	SGOATVASGIPAGWMLDCCGPESVKNFVAAVGRAKQIVWNGPVGVFEWEKFAHGTAKAVMD
HsPGK	123	TGQATVASGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVTRAKQIVWNGPVGVFEWEAFARGTKALMD
HgPGK	298	TGQATVASGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWEAFARGTKALMD
OaPGK	441	TGQATLASGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWEFFARGTKALMD
LoPGK	270	TGTATVEGGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWDKFAASGTKNLMD
AbPGK	270	TGTATVASGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWDKYANGTKNLMD
MfPGK	298	VGKATVASGIPAGWMLDCCGPESKRNHQAQVVAQARTIVWNGPLGVFEWDAFAKGTKALMD
ClfPGK	298	VGQATVASGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWDAFAKGTKALMD
PrPGK	111	TGSATVAAGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWENFARGTKSLMD
OnPGK	298	TGTATVAAGIPAGWMLDCCGPESKRYAEAVGRAKQIVWNGPVGVFEWENFAKGTKNLMD
MdPGK	338	SGOATVESGIPDGWMLDCCGPESKRYAEIVVRAKTIIVWNGPLGVFEWTFAQGTQKQLMN
SmPGK	123	TEIRTQSGIADGWMGLDIGPKTIEEESKVTISRAKTIIVWNGPMGVFEWDKFAATGTKALMD

TcPGK	43	AVVKATHDGAVTIIIGGGDTATCCKWNTEDEVSRVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSPA
AsPGK	356	AVVKATEACAVTIIIGGGDTATCCKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSPA
BmPGK	356	AVVDVTSKGAVTIIIGGGDTATCCKWKTDGDKVSHVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSPA
LlPGK	356	AVVDVTSKGAVTIIIGGGDTATCCKWKTDGDKVSHVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSPA
CbPGK	357	EVVKATSSCAITIIIGGGDTATAAKKNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSPA
CePGK	357	EVVKATAAGAITIIIGGGDTATAAKKNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSPA
CjPGK	56	EVVKATSRGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNIT
CiPGK	47	KVVEATKNGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNV
TgPGK	183	KVVEVTGKGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNV
AcPGK	358	KVVEVTGKGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNV
HsPGK	183	EVVKATSRGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNIT
HgPGK	358	EVVKATSRGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVEALSSV
OaPGK	501	KVVEATSKGCVTIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVAALSSV
LoPGK	330	KVVEATQKGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNV
AbPGK	330	RVVEATQKGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSNV
MfPGK	358	EVVKATSKGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVEALSNV
ClfPGK	358	EVVKATSRGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVEALSNV
PrPGK	171	KVVEVTRSGCVTIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSSA
OnPGK	358	KVVEVTKSGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVDALSSA
MdPGK	398	NVVEATSKGCITIIIGGGDTATCCAKWNTEDEKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVEALSNV
SmPGK	183	EVVKATKNGATIIIGGGDTATCCAKWNTEDKVS HVSTGGGASLELLEKVLPGVVALIDA

تصویر ۳: مقایسه‌ی توالی اسید آمینه‌های کد کننده‌ی قطعه‌ی ژن PGK به دست آمده از انگل توکسوکارا کنیس در مقایسه با ژن‌های همولوگ از ارگانسیم‌های دیگری که صورت گرفته است. بخش‌های تیره مربوط به توالی‌های یکسان و بخش‌های خاکستری مربوط به توالی‌های محافظت شده می‌باشند.

توالی‌ها اسید آمینه مربوط به اورگانسیم‌های دیگر به شرح زیر می‌باشد:

Ascaris suum (AsPGK)-ADY46755
Brugia malayi (BmPGK)-XP_001891892
Loa loa (LIPGK)-XP_003141782
Callithrix jacchus (CjPGK)-XP_002763075
Ctenopharyngodon idella (CiPGK)-AAN62921
Taeniopygia guttata (TgPGK)-XP_002199514
Homo sapiens (HsPGK)-BAG58187
Heterocephalus glaber (HgPGK)-EHA97866
Caenorhabditis briggsae (CbPGK)-XP_002646269
Caenorhabditis elegans (CePGK)-NP_491245
Schistosoma mansoni (SmPGK)-XP_002573337
Macaca fascicularis (MfPGK)-EHH53111
Ornithorhynchus anatinus (OaPGK)-XP_001507304
Monodelphis domestica (MdPGK)-XP_001377109
Anolis carolinensis (AcPGK)-XP_003227256
Canis lupus familiaris (ClfPGK)-XP_532167
Poecilia reticulata (PrPGK)-ABN80444
Lepisosteus osseus (LoPGK)-BAD17907
Acipenser baerii (AbPGK)-BAD17922
Oreochromis niloticus (OnPGK)-XP_003451499



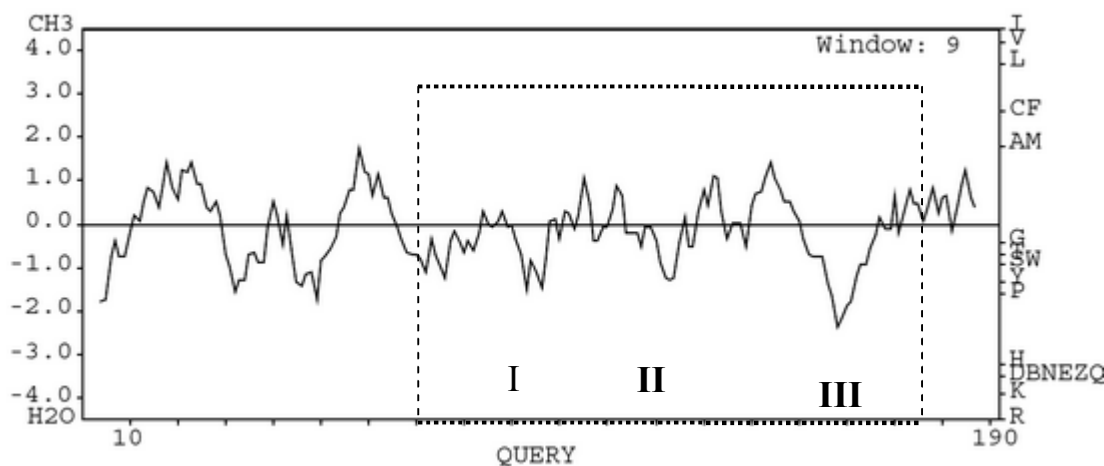
تصویر ۴: درخت فیلوژنیک انگل توکسوکارا کنیس بر اساس توالی قطعه‌ی ژن PGK و توالی‌های مشابه از دیگر ارگانسیم‌ها. فیلوژنی بر اساس هم‌ترازی توالی‌هایی که قبلاً در تصویر ۴ آورده شده است، رسم شده است. اعداد در بالای خط‌ها نشان دهنده‌ی ارتباط بین گروه‌هاست.

ساختمان ثانویه و بررسی هیدروپتی قطعه‌ی ژن PGK در تصویر ۵ هیدروپتی توالی EST با شماره‌ی دسترسی AA825118 مربوط به لارو عفونی انگل نشان داده شده است. در این تصویر نواحی همولوگ قطعه‌ی ژن هدفی که مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت با نقطه چین نشان داده شده است. این قسمت‌ها که از اسید آمینه‌ی شماره‌ی ۹۱ (والین) شروع می‌شود و تا اسید

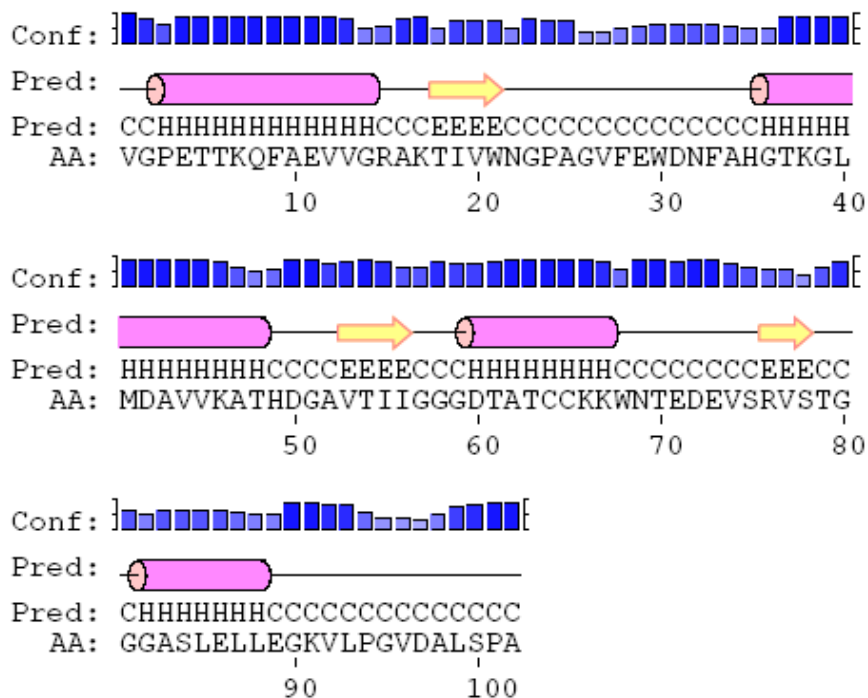
ژن که در بخش انتهایی C ژن فسفوگلیسرات کیناز واقع شده است، وجود همین نواحی است که می‌تواند بر حلالیت پروتئین نو ترکیب بیفزاید.

آمینو ۱۹۲ (آلانین) ادامه دارد، دارای ۳ نقطه‌ی عطف آبدوست است که به ترتیب به صورت نواحی I، II و III علامت‌گذاری شده‌اند. یکی از دلایل انتخاب این ناحیه از

(الف)



(ب)



تصویر ۵: ساختمان ثانویه‌ی قطعه‌ی ژن PGK به همراه هیدروپتی پروفایل EST مربوطه به شماره دسترسی AA825118 را نشان می‌دهد. الف) تصویر هیدروپتی مربوط به EST با شماره دسترسی AA825118 نشان داده شده است. قطعه‌ی ژن PGK همسانه-سازی شده که به منظور شناسایی مولکولی انتخاب شده است در جعبه‌ی نقطه‌چین‌دار مشخص گردیده است. این ناحیه دارای ۳ نقطه عطف هیدروفیل است که به ترتیب به صورت نواحی I، II و III علامت‌گذاری شده‌اند. ب) ساختمان ثانویه قطعه‌ی ژن هدف که معادل نواحی نقطه‌چین‌دار است در این قسمت مشاهده می‌شود. H، C و E به ترتیب، Coil، alpha helix و Strand را نشان می‌دهد. تعیین ساختمان ثانویه‌ی پروتئین توسط برنامه‌ی PSIPRED Protein Analyser انجام شده است.

بحث

سوماتیک تخم‌های داخل رحمی و هم‌چنین با شدت متوسطی در فیبرهای عضلانی و لایه‌های عضلانی زیر نگومنتی، میوآپتلیوم روده‌ای و در کیسه‌های ترشچی به صورت موضعی مشاهده گردیده است. بنابراین، پیشنهاد شده است که PGK می‌تواند در تشخیص سرمی این انگل استفاده شود.

در این راستا، به دلیل اهمیت پروتئین‌های ترشچی نظیر PGK که همواره می‌توانند به عنوان یک ملکول هدف با خواص آنتی‌ژنتیکی مورد نظر قرار گیرد، اقدام به شناسایی ملکولی این ژن از انگل توکسوکارا کنیس گردید. با توجه به این که توالی ژن کامل فسفو گلیسرات کیناز از این انگل هنوز در بانک ژن موجود نیست، استفاده از قطعات ژنی EST ضروری می‌نماید. تا کنون ESTهایی که در بانک ژن برای این ژن ثبت شده‌اند، به طور عمده از انگل بالغ جداسازی گردیده‌اند. توالی‌های مربوط به لارو در بانک ژن محدود است، که احتمالاً می‌تواند به علت دسترسی بسیار محدود به لارو انگل در محیط طبیعی باشد. تکثیر لارو در محیط آزمایشگاهی نیز با مشکلات عدیده‌ای مواجه است که همه‌ی این موارد بالطبع جمع‌آوری و مطالعه روی لارو این انگل را مشکل نموده است. در این پژوهش سعی شده است که نواحی از این ژن به منظور شناسایی انتخاب شود که این نواحی در هر دو مرحله‌ی لاروی و کرم بالغ مشترک است. این کار با انجام عمل هم‌ترازی این ژن که از دو مرحله‌ی لاروی و بالغ جدا شده بود، امکان‌پذیر گردید، بنابراین با فرض این که شباهت ژنتیکی در مواد دفعی - ترشچی مترشحه از دو فرم بالغ و لاروی احتمالاً در بخش‌هایی از توالی کد کننده‌ی آن‌ها وجود دارد اقدام به انجام عمل هم‌ترازی قطعه‌ی ژن HO348231 از انگل بالغ توکسوکارا کنیس در بانک ژن صورت گرفت. عمل هم‌ترازی منجر به مشاهده‌ی EST با شماره دسترسی AA825118 از لارو عفونی انگل شد که از آن برای طراحی آغازگرهای رفت و برگشت استفاده گردید. همان طور که

توکسوکارا کنیس به عنوان یک انگل مشترک بین انسان و دام به عنوان یک مشکل جدی در جامعه قلمداد می‌شود که اصلی‌ترین راه کنترل آن در وهله‌ی نخست تشخیص دقیق آن است. مشکل درمان عفونت‌ها عموماً با مقاومت - های دارویی همراه است، به همین دلیل است که تشخیص عفونت در ابتدای ایجاد آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ملکول‌های ترشچی به صورت یک سد دفاعی بین انگل و سیستم ایمنی میزبان می‌باشد، بنابراین، آن‌ها در واکنش‌های ایمنی با انگل نقش مهمی دارند و کاندیدای مناسبی احتمالاً در تشخیص عفونت هستند. با توجه به مطالعه‌ی منابع موجود چنین به نظر می‌آید که آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی به ویژه در مرحله‌ی لاروی که در روند گلیکولیز و تولید انرژی در انگل نقش دارند، جهت استفاده در آزمایش‌های تشخیصی حائز اهمیت باشند. در این راستا، آنزیم‌های ترشچی نظیر PGK همواره می‌تواند به عنوان یک ملکول هدف با خواص آنتی‌ژنتیکی مورد نظر قرار گیرند. در تحقیقی ایمنیت‌زایی ژن کد کننده‌ی فسفوگلیسرات کیناز (PGK) ضد فاسیولاهپاتیکا با نتیجه‌ی حفاظتی ۶۹ درصد بررسی شد (Jaros et al. 2010). از آنزیم PGK در تولید آزمون تشخیصی در ترماتودی به نام شیتوزوما مانسونی با به کارگیری از یک آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد آنتی‌ژن به نام Phosphoglycerate kinase (SmPGK) استفاده شده است (Lee et al. 1995). به نظر می‌رسد، آنزیم PGK نقش اساسی در تولید انرژی چه به صورت حرکت و یا انقباض ماهیچه‌ای دارد (Hong et al. 2003). انگل دیگری از کلاس ترماتودها به نام کلونورکیس سیننسیس (*Clonorchis sinensis*) نیز که برای تولید انرژی به میزان زیادی وابسته به انجام عمل گلیکولیز است. در تحقیق فوق با انجام آزمایش ایمنی الکترون روی انگل بالغ و با استفاده از افزایش ایمنی سرم موش بر ضد Cs-PGK نو ترکیب انجام شده است، تراکم زیادی از این آنزیم در اپیتلیوم روده و در مجرای اسپرمی یافت شده است. PGK در سلول‌های

مترشحه از دو فرم بالغ و لاروی شباهت آشکاری حداقل در بخش‌های میانی و انتهایی C توالی وجود دارد. با شناسایی مولکولی این قطعه ژن راه برای مطالعه‌ی آتی در خصوص بیان مؤثر این ژن هموار گردید.

در تصویر ۶ نشان داده شده است، مشابهت ژن فسفولیسرات کیناز انگل توکسوکارا کنیس به ویژه در ناحیه‌ی انتهایی C در دو فرم بالغ و لارو در ۸۴ درصد توالی مقایسه شده به میزان ۹۳ درصد می‌باشد. این یافته‌ها دال بر این است که همولوژی ژنتیکی در مواد دفعی- ترشچی

AA825118-L	1	CAAA	AAAA	NTT	-----	-----	-----	-----	NT	CT	TNC
HO34823-A	1	ACCC	GGGA	ATTC	CGGCC	ATTAC	GCCGGG	GAAT	TGG	AGCG	GCATG
AA825118-L	19	AAGGT	TNN	TNAAC	CGGTAT	TCAG	GCTT	TCGG	NAAAA	TTC	CCCNAT
HO34823-A	61	AAGGT	CATC	---	AAC	CGGTAT	CAG	CATC	---	CG	AAAAGT
AA825118-L	79	GGN	NC	CA	AAAA	TTNT	TAAAC	GA	AACT	G	GATN
HO34823-A	114	AAAG	GAT	CG	TAAA	-----	CG	AACT	GA	---	TGG
AA825118-L	139	TTC	CA	AA	ATTT	TNT	CTTT	CC	CG	TT	NG
HO34823-A	158	---	TC	AAA	AT	TC	CT	TCC	GGT	CG	ATT
AA825118-L	199	CGN	GGG	GCG	CAACA	AGT	CG	NN	AT	TGA	AGT
HO34823-A	209	CGC	GGC	GC	---	ACA	AGT	CG	CT	GAT	CT
AA825118-L	259	TTCT	AGAT	GTC	GG	ACC	GAA	AACA	CGA	AG	CCAT
HO34823-A	264	---	TCT	AGAT	GTC	GG	ACC	GAA	AACA	CGA	AG

AA825118-L	319	ACG	ATT	GT	GGA	AT	TGG	AC	CG	G	AGG
HO34823-A	322	ACG	ATT	GT	GGA	AT	TGG	AC	CG	G	AGG
AA825118-L	379	TAA	AG	ACT	CAT	GGA	TGC	AGT	CGT	TA	AGG
HO34823-A	381	TAA	AG	ACT	CAT	GGA	TGC	AGT	CGT	TA	AGG
AA825118-L	439	TGG	CG	GT	GATA	CAC	GAC	GT	GC	A	AGA
HO34823-A	441	TGG	CG	GT	GATA	CAC	GAC	GT	GC	A	AGA
AA825118-L	499	AAG	CA	CT	G	G	AG	G	T	G	G
HO34823-A	501	AAG	CA	CT	G	G	AG	G	T	G	G
AA825118-L	559	CG	CT	CT	CG	GC	A	TA	A	AC	GT
HO34823-A	561	CG	CT	CT	CG	GC	A	TA	A	AC	GT

AA825118-L	619	CGT	GG	TAT	CG	CT	GT	GAA	AT	AG	CG
HO34823-A	621	CGT	GG	TAT	CG	CT	GT	GAA	AT	AG	CG
AA825118-L	679	TG	TAG	CTA	AGT	CAG	TGA	AC	GT	TG	TTT
HO34823-A	681	TG	TAG	CTA	AGT	CAG	TGA	AC	GT	TG	TTT
AA825118-L	739	TTT	CT	T	A	C	A	A	C	G	T
HO34823-A	741	TTT	CT	T	A	C	A	A	C	G	T
AA825118-L	799	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA
HO34823-A		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

تصویر ۶: توالی بخش انتهایی ژن فسفولیسرات کیناز از فرم بالغ (HO348231-A) و لارو (AA825118-L) انگل توکسوکارا کنیس. بخش‌های تیره مربوط به توالی‌های یکسان و بخش‌های خاکستری مربوط به توالی‌های محافظت شده در هر دو توالی می‌باشند. ابتدای قطعه‌ی همسانه‌سازی شده با اسید آمینه والین (GTC) و کدون توقف (TAA) با علامت ستاره و به رنگ خاکستری نشانه‌گذاری گردیده است. ناحیه‌ی انتخاب شده به منظور شناسایی مولکولی با کروشه مشخص شده است. محل آغازگرهای رفت و برگشت با نیزه یک طرفه نمایش داده شده است.

تشکر قدردانی

از حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین هزینه‌های این پژوهش که از محل اعتبار پژوهانه طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۱۰ صورت گرفته است، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Behnke, J.M.; Barnard, C.J and Wakelin, D. (1992). Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *International Journal of Parasitology*. 22: 861-907.
- Buchan, D.W.A.; Minneci, F.; Nugent, T.C.O.; Bryson, K. and Jones, D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. *Nucleic Acids Research* . 41: 340-348.
- Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F. et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*. 36: 465-469.
- Gems, D.; Ferguson, C.J.; Robertson, B.D.; Nieves, R.; Page, A.P.; Blaxter, M.L. and Maizels, R.M. (1995). An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 18517-18522.
- Glickman, L.T.; Schantz, P.M. and Grieve, R.B. (1986). Toxocariasis, p: 201-231. In K. W. Walls and P. M. Schantz(ed.), *Immunodiagnosis of parasitic diseases*, vol. 1. Helminthic Diseases. Academic Press, Inc., New York.
- Hong, S.J.; Shin, J.K., Kang, S.Y. and Ryu, J.R. (2003). Ultrastructural localization of phosphoglycerate kinase in adult *Clonorchis sinensis*. *Parasitology Research*, 90: 369-371.
- Jaros, S.; Jaros, D.; Wesolowska, A.; Zygner, W. and Wedrychowicz, H. (2010). Blocking *Fasciola hepatica*'s energy metabolism - a pilot study of vaccine potential of a novel gene - phosphoglycerate kinase. *Veterinary Parasitology*. 20; 172: 229-237.
- Lee, K.W.; Thakur, A.; Karim, A.M. and LoVerde, P.T. (1995). Immune response to *Schistosoma mansoni* phosphoglycerate kinase during natural and experimental infection: identification of a schistosome-specific B-cell epitope. *Infection and Immunity*. 63: 4307-4311.
- Loukas, A.; Mullin, N.P.; Tetteh, K.K.A.; Moens, L. and Maizels, R.M. (1999). A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Current Biology*. 9: 825-828.
- Loukas, A.; Selzer, P.M. and Maizels, R.M. (1998). Characterisation of Tc-cpl-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92(2): 275-285.
- Maizels, R.M.; Gems, D.H. and Page, A.P. (1993). Synthesis and secretion of TES antigens from *Toxocara canis* infective larvae. In: Lewis JW, Maizels RM, editors. *Toxocara and Toxocarosis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspectives*. London: Institute of Biology, p: 141-150.
- Norhaida, A.; Suharni, M.; Liza Sharmini, A.T.; Tuda, J. and Rahmah, N. (2008). rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 102: 151-160.
- Taira, K.; Saeed, I.; Permin, A.; Kapel and C.M.O. (2004). Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Veterinary Parasitology* 121: 115-124.
- Tetteh K.K.A.; Loukas, A.; Trip, C. and Maizels, R.M. (1999). Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infection and Immunity*. 67: 4771-4779.

Molecular identification of phosphoglycerate kinase gene from the secretory-excretory antigens of *Toxocara canis*

Jolodar, A.¹

Received: 17.11.2013

Accepted: 01.07.2014

Abstract

Toxocara canis has a worldwide distribution and is regarded as the main cause of human toxocariasis. Infection in humans, particularly children, is frequently caused by accidental ingestion of embryonated *Toxocara* eggs present in soil, water, food, dirty hands. In this study, C-terminus part of an expressed sequence tag (EST) encoded phosphoglycerate kinase gene was selected from the NCBI Genbank (accession number HO348231) and amplified using semi-nested RT-PCR. CDNA was synthesized with the extracted total RNA as template and the modified oligo (dT) as primer. The product of RT-PCR and pMalc2x expression vector both were digested by *Bam*HI and *Hind*III restriction enzymes and ligated. This construct was eventually transferred to bacterium *E. coli*, strain TG1. After plasmid purification, the insert was sequenced and characterized. Sequence comparisons with GenBank database were done using the BLAST software. Based on the sequence data, the complete sequence contained 304 nucleotides encoding an open reading frame of 101 amino acid residues with a predicted molecular mass of 10.497 kDa and theoretical pI of 5. The results of this study indicated that the C-terminus part of phosphoglycerate kinase was successfully cloned and expressed in *E. coli*. Analysis of recombinant protein showed that part of this protein belongs to "phosphoglycerate kinase superfamily". Multiple alignment shows that TcPGK had 95% and 85% similarity with phosphoglycerate kinase from *Ascaris suum* and also *Loa loa* and *Burigia malayi*, respectively.

Key words: cDNA, *Toxocara canis*, Secretory-Excretory, Semi-Nested RT-PCR

1- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran