مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال بیست و هفتم/شماره ۹۸/مهر ۱۳۸۸

کلونینگ ژن کد کننده‌ی آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز Leishmania Major (MRHO/IR/ER/75)

نوشا ضیاء*، دکترگیلدا اسلامی**، دکترمژگان بنده پور***، دکتر رسول صالحی****، دکتر بهرام کاظمی*****، دکتر کاظم پریور******، دکتر سید حسین حجازی*******

* کارشناس ارشد گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران.

** PhD انگل شناسی،گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، یزد، ایران.

*** دانشجوی PhD سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، تهران، ایران.

**** دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

***** استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

****** استاد، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.

******* دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۳

چکیده

مقدمه: Leishmania تک یاخته‌ی درون سلولی اجباری است و پشه‌ی خاکی به عنوان ناقل، با نیش زدن اشکال عفونی انگل را به میزبانان خود منتقل می‌کند. شناسایی آنتی‌ژن‌های کاندیدا برای واکسن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز از جمله‌ی این آنتی‌ژن‌ها می‌باشد.

روش ها: با استفاده از DNA استخراج شده از Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) توسط PCR، ژن کدکننده‌ی آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز تکثیر و محصول PCR در پلاسمید pTZ57R کلون شد. سپس کلنی‌های به دست آمده با دو آنزیم محدود اثر BamHI و EcoRI مورد هضم قرار گرفت. قطعه‌ی خارج شده در پلاسمید pET32a به عنوان حامل بیان ژن، ساب کلون گردید. برای تأیید کلون pET32a_man از روش هضم آنزیمی استفاده و سپس قطعه‌ی مربوط تعیین توالی گردید.

یافته ها محصول PCR بر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد. بعد از کلون کردن محصول PCR در پلاسمید pTZ57R و pET32a، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود اثر نشان داد که ژن کدکننده‌ی این آنزیم در هر دو پلاسمید به طور صحیح کلون شده است.

نتیجه گیری: توالی ژن آنزیم تکثیر شده با توالی آن در بانک ژن ۹۲٪ شباهت را نشان داد که این نتایج تأییدی بر حفاظت شده بودن (Conserved) توالی ژن این آنزیم در میان ژن‌های مختلف Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) است.

واژگان کلیدی: Leishmani major، آنزیم مانوز ۱- فسفات گوانیل ترانسفراز، کلونینگ

تعداد صفحات: ۹

تعداد جدول‌ها: ۱

تعداد نمودارها: -

تعداد منابع: ۱۷

آدرس نویسندهٔ مسئول: دکتر سید حسین حجازی، دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

E-mail: hejazi@med.mui.ac.ir

www.mui.ac.ir

مقدمه

Leishmania تک یاخته‌ی درون سلولی اجباری است و پشه‌ی خاکی به عنوان ناقل این انگل با نیش زدن، اشکال عفونی انگل یا پروماستیگوت‌های متاسیکلیک را به میزبانان مهره‌دار خود، از جمله انسان، منتقل می‌کند (۱). گونه‌های مختلف Leishmania اشکال بالینی مختلف پوستی، پوستی منتشره، پوستی مخاطی و احشایی را موجب می‌شوند. اکنون عمده‌ترین تلاش‌ها متوجه ساخت واکسنی مؤثر برای پیشگیری از لیشمانیوز است. در این راستا شناسایی آنتی‌ژن‌های کاندیدای واکسن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از این آنتی‌ژن‌ها، آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز (EC 2.7.7.13) می‌باشد. ژن این آنزیم در Leishmania major (L. major) روی کروموزوم شماره ۲۳ واقع شده و طول آن bp ۱۱۴۰ است (۲). در یوکاریوت‌ها، مانوز یک مونوساکارید کلیدی جهت گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد (۳)، به طوری که ترکیباتی که مانوز در آن‌ها دخیل است، برای فعالیت آنزیم‌ها، هورمون‌ها، رسپتورها، تشکیل گلیکوکالیکس سطحی سلول و ماتریکس خارج سلولی ضروری هستند و نیز این ماده نقش مهمی در واکنش‌های بین سلولی بازی می‌کند. در غیاب این آنزیم، تمام واکنش‌های بیوسنتزی مربوط به گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها و لیپیدها مختل خواهد شد (۴)؛ این آنزیم متعلق به خانواده‌ی ترانسفرازهاست (۵).

در دهه‌ی گذشته تحقیقات زیادی روی ژن آنزیم GDP-mannose pyrophosphorylase در Leishmania Mexicana (L. Mexicana) که همولوگ آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز در L. major است، انجام شده و نقش آن در پاتوژنیسیته انگل به اثبات رسیده است (۴).

در این بررسی قصد بر این بود تا ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز مربوط به L. major (MRHO/IR/75/ER) با هدف تولید پروتئین نوترکیب کلون شود. این ژن بالقوه می‌تواند جزء مهمی از یک مجموعه‌ی واکسن DNA باشد.

روش‌ها

در این بررسی تجربی، پروماستیگوت‌های L. major (MRHO/IR/75/ER) در محیط N.N.N رشد داده شد و سپس در محیط RPMI1640 همراه با مکمل ۱۰٪ FCS، به رشد انبوه رسید (۱). پروماستیگوت‌ها با سانتریفیوژ کردن در ۸۰۰۰ دور/دقیقه، به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد. بعد از ۳ بار شستشو با PBS، DNA ژنومی توسط روش فنل- کلروفرم استخراج شد (۶). ژن‌های Leishmania فاقد اینترون می‌باشد (۷). ژن مذکور با روش Nested-PCR از DNA ژنومی پروماستیگوت amplify گردید. بر اساس سکانس ژن موجود در بانک ژن، یک جفت پرایمر خارجی و یک جفت پرایمر داخلی طراحی شد، به طوری که در سمت '۵ پرایمر داخلی Forward، جایگاه برش آنزیم BamHI و در سمت '۵ پرایمر Reverse، جایگاه برش آنزیم EcoRI در نظر گرفته شد.

واکنش PCR با پرایمر خارجی: µg ۱ از DNA، مقدار pmol ۱۰ از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، mM ۱/۱۵ از $MgCl_2$، mM ۰/۲ از dNTPs، بافر PCR1X و ۱/۲۵ واحد Taq DNA polymerase که حجم آن‌ها با ddH_2O به µl ۲۵ رسانده شد. سپس ۳۰ سیکل انجام شد که هر یک شامل مرحله‌ی Denaturing در دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، مرحله‌ی Annealing در دمای ۵۲ درجه به مدت یک دقیقه، مرحله‌ی Extension در دمای ۷۲ درجه به مدت

www.mui.ac.ir

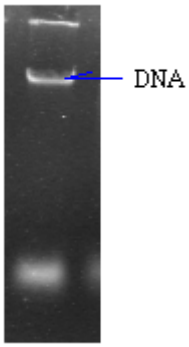
۱/۵ دقیقه و در پایان، مرحله‌ی Post extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود.

واکنش PCR با پرایمر داخلی: µg ۱ از DNA، مقدار ۱۰pmol از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۱/۱۵ mM از $MgCl_2$، ۰/۲ mM از dNTPs، بافر PCR1X و ۱/۲۵ واحد Taq DNA polymerase که حجم آن‌ها با ddH_2O به µl ۲۵ رسانده شد. سپس ۳۰ سیکل انجام شد که هر یک شامل مرحله‌ی Denaturing در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی Annealing در دمای ۴۸ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی Extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در پایان، مرحله‌ی Post extension در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد (۸).

محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و باند DNA مورد نظر با نور فرابنفش ۳۲۰ نانومتر مشاهده شد (۹). باند DNA از ژل جدا و خالص‌سازی شد (۱۰) و DNA خالص شده طی روش Cloning T/A درون پلاسمید pTZ57R/T کلون گردید. به طور خلاصه پلاسمید pTZ57R با آنزیم EcoRV برش داده شد و با آنزیم نوکلئوتید ترانسفراز به انتهای '۳ آن dTTP اضافه شد (۱۱). محصول واکنش Ligation در سلول پذیرای E. coli سوش Top 10 ترانسفورم شد (۱۲) و در پلیت آگار LB که حاوی µg/ml ۵۰ آمپی‌سیلین بود، پخش شد. کلنی‌ها توسط X-gal و IPTG غربال‌گری شد و کلنی‌های سفید دارای پلاسمید نوترکیب انتخاب گردید (۱۳). پلاسمید نوترکیب به روش آلکالین استخراج (۱۴) و با آنزیم BamHI و EcoRI هضم گردید. باند DNA آزاد شده، خالص‌سازی شد و درون پلاسمید بیان pET32a که با همین دو آنزیم برش داده شده بود، ساب کلون گردید و محصول واکنش در درون E. coli سوش BL21 ترانسفورم شد. کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB، کشت انبوه داده شد و سپس پلاسمید نوترکیب استخراج و با تجزیه و تحلیل توسط آنزیم‌های برش دهنده تأیید شد. به این منظور آنزیم Hind III که یک جایگاه برش روی ژن در موقعیت ۲۳۱ و یک جایگاه برش روی پلاسمید pET32a در موقعیت ۱۷۳ دارد، انتخاب گردید. همچنین ژن مذکور از پلاسمید pET32a نوترکیب با جفت پرایمرهای داخلی ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز آمپلی‌فای شد. محصول PCR خالص‌سازی گردید و با روش سانگر تعیین ترادف شد.

یافته‌ها

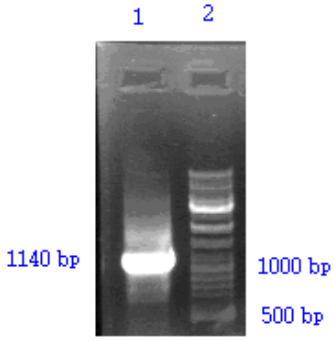
پروماستیگوت‌های Leishmania در محیط N.N.N رشد یافت و در محیط RPMI1640 به کشت انبوه رسید. در شکل ۱، DNA استخراج شده از پروماستیگوت‌های Leishmania به روش فنل – کلروفرم نشان داده شده است.



شکل ۱. الکتروفورز DNA ژنومی Leishmania در ژل آگاروز ۱٪

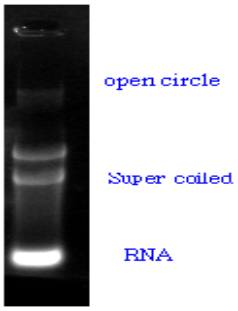
شکل ۲، الکتروفورز محصول Nested-PCR ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز در ژل آگاروز ۱/۵٪ را نشان می‌دهد.

www.mui.ac.ir



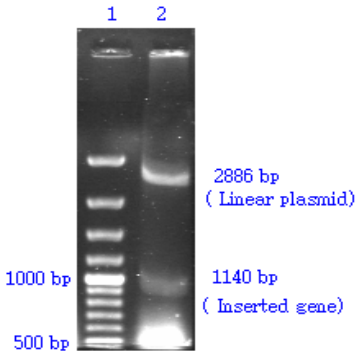
شکل ۲. الکتروفورز ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز حاصل از Nested-PCR
ستون ۱) محصول PCR2؛ ستون ۲) مارکر DNA

استخراج پلاسمید نوترکیب از ناقل، در شکل ۳ نشان داده شده است.



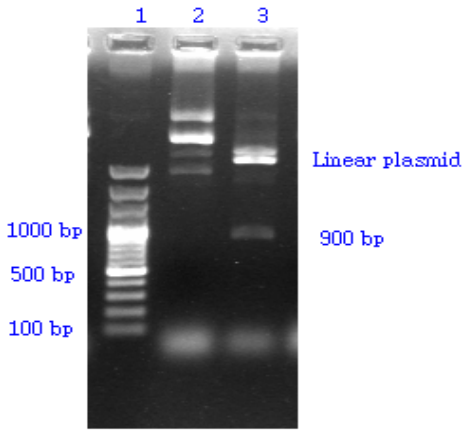
شکل ۳. الکتروفورز پلاسمید نوترکیب استخراج شده روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد

شکل ۴ استخراج ژن از پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های برش دهنده‌ی BamHI و EcoRI در ژل آگاروز ۱٪ را نشان می‌دهد.



شکل ۴. ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز استخراج شده از پلاسمید نوترکیب
۱) مارکر DNA؛ ۲) پلاسمید نوترکیب هضم شده توسط آنزیم‌های BamHI و EcoRI

حاصل هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم Hind III، باند ۹۰۰ bp از DNA بود که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد.



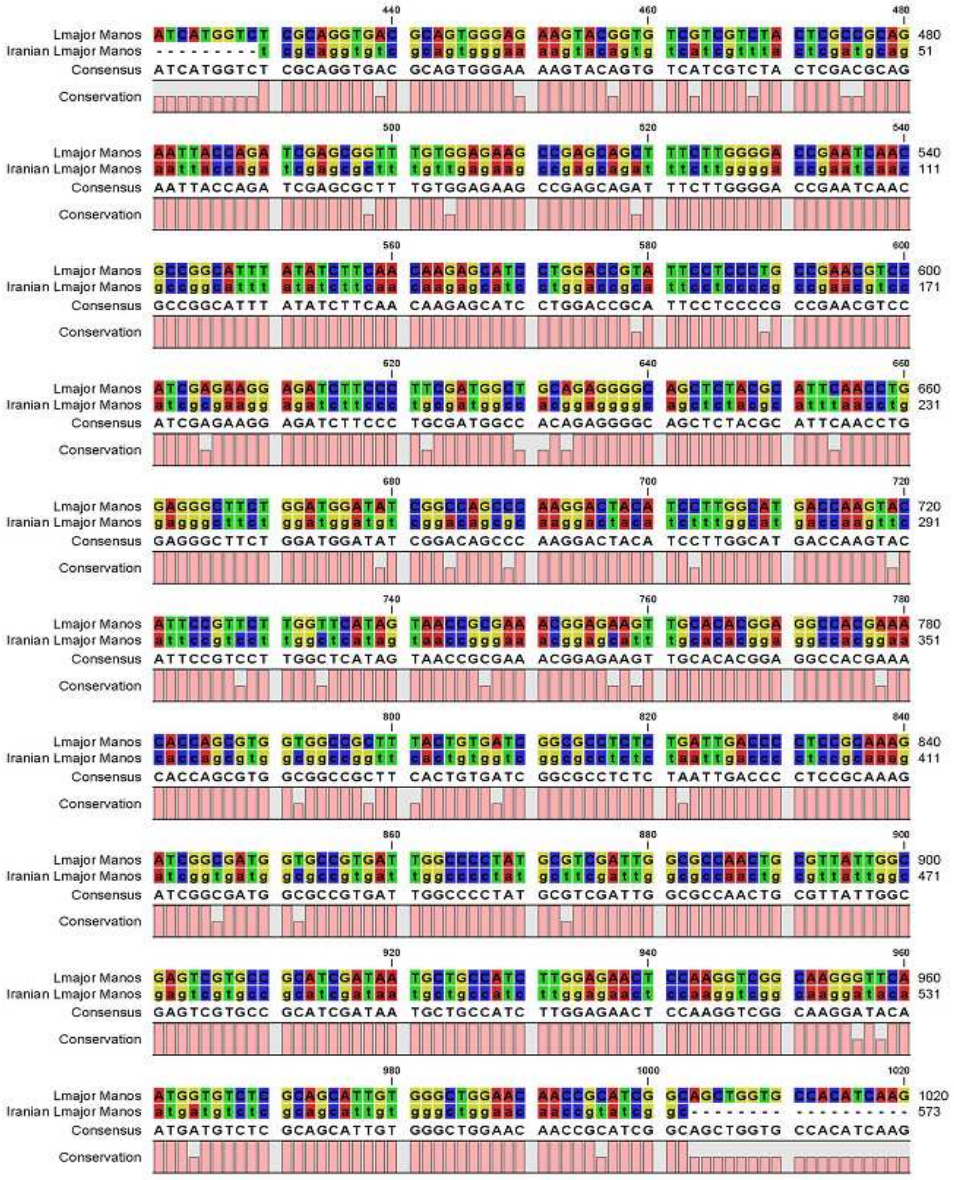
شکل ۵. الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ درصد حاصل هضم پلاسمید نوترکیب
ستون ۱) مارکر DNA؛ ستون ۲) پلاسمید pet32a هضم شده توسط آنزیم Hind III؛ ستون ۳) پلاسمید pet32a نوترکیب، هضم شده توسط آنزیم Hind III

سکانس ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major در بانک ژن جهانی با کد XM _ 001683281 ثبت شده است. در مطالعه‌ی حاصر مشخص گردید که بین سکانس ژن پیش‌گفته با ژن MRHO/IR/75/ER از L. major، ۹۲ درصد شباهت وجود دارد (شکل‌های ۶ و ۷). این ژن با کد FJ150423 در بانک جهانی ژن و با نام محققین این طرح تحقیقاتی ثبت گردید. تعدادی از اسیدهای آمینه‌ی جایگزین شده در آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز سویه‌ی ایران با L. major ثبت شده در بانک ژن XM _ 001683281 در جدول ۱ نشان داده شده است.

www.mui.ac.ir

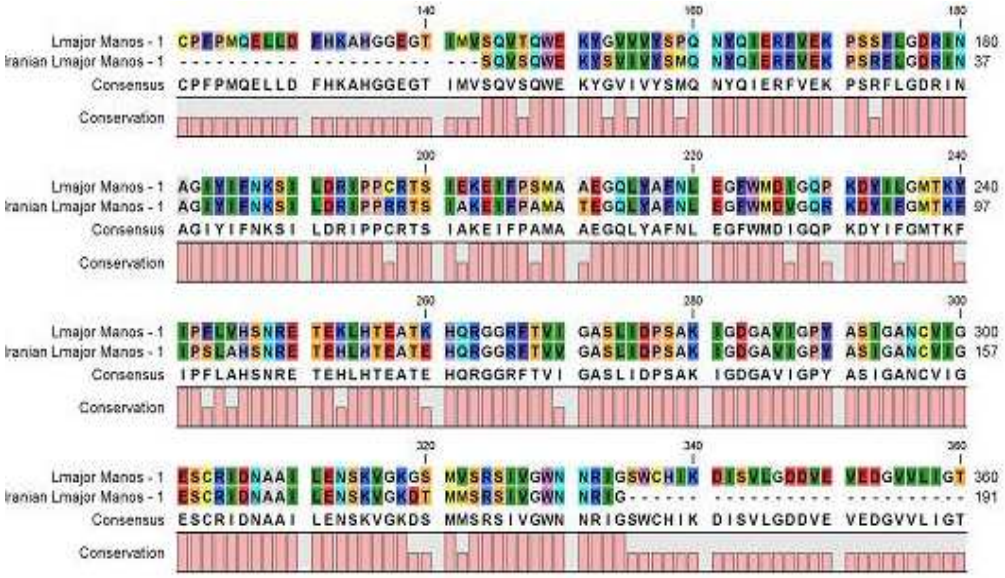
جدول ۱. اسیدهای آمینه‌ی جایگزین شده در آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major سویه‌ی ایران

Amino acid position	Replaced aa	Amino acid position	Replaced aa
Threonine 147	Serine	Glycine 153	Serine
Valine 155	Isileucine	Proline 159	Methionine
Serine 173	Arginine	Cysteine 197	Proline
Glutamic acid 202	Alanine	Serine 208	Alanine
Alanine 121	Threonine	Isoleucine 227	Valine
Prolone 230	Arginine	Leucine 235	Phenylalanine
Tyrosine 240	Phenylalanine	Phenylalanine 243	Serine
Valine 245	Alanine	Lysine 235	Histidine
Lysine 260	Glutamic acid	Isoleucine 270	Valine
Glycine 319	Aspartic acid	Serine 320	Threonine
Valine 322	Methionine		



شکل ۶. مقایسه‌ی ترادف اسیدهای نوکلئیک در آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major ثبت شده در بانک جهانی ژن (Accession No. XM _ 001683281) با آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز با L. major سویه‌ی ایران (Accession No. FJ150423)

www.mui.ac.ir



شکل ۷. مقایسه‌ی ترادف اسیدهای آمینه در آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major ثبت شده در بانک جهانی ژن (Accession No. XM _ 001683281) با آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major سویه‌ی ایران (Accession No. FJ150423).

بحث

لیشمانیوز پوستی در کشور ایران یک مشکل عمده‌ی بهداشتی محسوب می‌شود (۱۵). کنترل این بیماری از طریق مبارزه با ناقل آن، پشه خاکی، به خاطر بیولوژی و اکولوژی خاص آن تا کنون موفقیت قابل توجهی در بر نداشته است. شناسایی فراکسیون‌هایی از Leishmania که در نحوه‌ی شکل‌گیری پاسخ ایمنی میزبان علیه آن مؤثر بوده، همچنین در بیماری‌زایی این تک‌یاخته نقش محوری ایفا می‌کند، از ضرورت‌هایی است که هم‌اکنون سازمان جهانی بهداشت و محققان بر آن تأکید دارند؛ این امر محقق نمی‌شود مگر از طریق شناسایی ژن‌های کد کننده‌ی ترکیبات و پروتئین‌های پیش‌گفته، چرا که از این طریق می‌توان هم پروتئین‌های نوترکیب مهم و دخیل در چگونگی بروز پاسخ ایمنی را در مقیاس کلان تولید کرد و هم با دستکاری ژن‌های کد کننده‌ی آن‌ها، به خصوص پروتئین‌هایی که در بیماری‌زایی اهمیت دارند، در تعدیل بیماری‌زایی Leishmania اقدام نمود (۱۶). در این مطالعه برای اولین بار کلون و توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده‌ی آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز از L. major سویه‌ی ایران مشخص گردید. ژن کد کننده‌ی این آنزیم در L .major پیش از این کلون و سکانس نشده و محصول پروتئینی این ژن برای انجام آزمون‌های آنتی‌ژنیسیته و ایمنی بخشی علیه Leishmania در دسترس نبود. در بررسی ترادف اسیدهای آمینه‌ی این ژن با ترادف اسیدهای آمینه‌ی آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major تفاوت‌هایی مشاهده شد. اسیدهای آمینه‌ی سیستئین در موقعیت ۱۹۷ جایگزین اسیدهای آمینه پرولین شده و تعدادی اسیدهای آمینه‌ی آرژنین به رشته‌ی پروتئینی اضافه شده است. جایگزینی این اسیدهای آمینه منجر به تغییراتی در ترکیب و صورت بندی پروتئین شده و ممکن است از نظر عملکرد از پروتئین‌های هم‌خانواده‌ی دیگر متفاوت شده باشد.

نقش عمده‌ی این آنزیم در بیماری‌زایی Saccharomyces cerevisiae و Candida albicans

www.mui.ac.ir

ثابت شده است. سنتز پروتئین‌های مهمی در Leishmania مانند GPI-anchor، PPgs، LPG و GIPLs، به صورت مستقیم یا غیر مستقیم، وابسته به GDP-mannose pyrophosphate می‌باشد (۱۷). در مطالعات انجام شده‌ی قبلی مشخص گردیده است که در غیاب مانوز، سلول‌های یوکاریوت به ناچار از مسیرهای دیگری این هگزوز را تولید می‌نمایند. مانوز یک متابولیت حیاتی برای سنتز ترکیبات گلیکوکونژوگه در یوکاریوت‌هاست که در مطالعات انجام گرفته از طریق حذف ژن GDP-mannose pyrophosphorylase در قارچ‌ها، نقش حیاتی آن مشخص شده و نقص در این ژن موجب زوال ارگانیسم‌های پیش‌گفته گردیده است (۱۷). عدم فعالیت ژن GDP-mannose pyrophosphorylase تاکنون برای هیچ یوکاریوت تک سلولی و یا پرسلولی گزارش نشده است و اطلاعات موجود پیشنهاد می‌دهد که حذف کامل مسیر مانوز منجر به عدم تولید ترکیبات حاوی مانوز می‌شود که در زندگی یوکاریوت‌ها غیر قابل جبران است. در موتانت‌های L. mexicana حذف ژن GDP-mannose pyrophosphorylase موجب فقدان کامل سنتز گلیکوکونژوگه‌های حاوی مانوز شده است. این موتانت‌ها قادر به آلوده‌سازی ماکروفاژها در مدل حیوانی موش بوده است، که این امر اثبات می‌کند محصول ژن GDP-mannose pyrophosphorylase به عنوان یک فاکتور مهم بیماری‌زایی مطرح می‌باشد (۱۷).

مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی ژن مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L. major ایرانی، با توالی این ژن در سایر سویه‌ها نشان‌دهنده‌ی ۹۲٪ شباهت بین این سویه‌ها بود و تفاوت اندکی بین توالی اسیدهای آمینه‌ی آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز L .major سویه‌ی ایران با این آنزیم در سایر سویه‌ها دیده شد. این نتایج تأییدیست بر این مدعا که توالی نوکلئوتیدی ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز در بین گونه‌های مختلف Leishmania حفاظت شده (Conserved) است. با استفاده از محصول به دست آمده از الحاق ژن آنزیم مانوز ۱ فسفات گوانیل ترانسفراز به پلاسمید تکثیر pTZ57R و انتقال توالی ژن مربوط به پلاسمید بیان pET32a، می‌توان آنزیم نوترکیب مربوط به این ژن را تولید کرد و با تغییرات مناسب در آن، بیماری‌زایی انگل Leishmania را تعدیل و یا از آن در تحقیقات مربوط به ساخت واکسن‌های DNA و داروهای مؤثر در درمان نوع جلدی آن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله، نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل حمایت‌های مالی از این طرح اعلام می‌دارند.

References

1. John DT, Petri WA, Markell EK, Voge M. Markell and Voge's medical parasitology. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2006. p. 148-59.
2. Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit (PSU). GeneDB. [Online]. 2006. Available from: URL:http://www.genedb.org/genedb/Search?name=LmjF23.0110&organism=leish
3. Davis AJ, Perugini MA, Smith BJ, Stewart JD, Ilg T, Hodder AN, et al. Properties of GDP-mannose pyrophosphorylase, a critical enzyme

www.mui.ac.ir

and drug target in Leishmania mexicana. J Biol Chem 2004; 279(13): 12462-8.
4. Garami A, Ilg T. Disruption of mannose activation in Leishmania mexicana: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. EMBO J 2001; 20(14): 3657-66.
5. The Gene Ontology. Mannose-1-phosphate guanylyltransferase activity. [Online]. 2009. Available from: URL: http://www.genedb.org/amigo-cgi/term-details.cgi?term=GO%3A0004475&speciesdb=GeneDB_Lmajor
6. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
7. Fong D, Lee B. Beta tubulin gene of the parasitic protozoan Leishmania mexicana. Mol Biochem Parasitol 1988; 31(1): 97-106.
8. McPherson MJ, Moller SG, Beynon R, How C. PCR: The basics from Background to Bench. 1st ed. Oxford: BIOS Scientific Publishing Ltd; 2000. p. 9-21.
9. Boffey SA. Agarose gel electrophoresis of DNA. In: Walker JM, Editor. Methods in molecular biology. 1st ed. London: Humana Press; 1984. p. 43-50.
10. Gaastra W, Jorgensen PL. The extraction and isolation of DNA. In: Walker JM, Editor. Methods in molecular biology. 1st ed. London: Humana Press; 1984. p. 67-76.
11. Gaastra W. Ligation of DNA with T4 DNA. In: Walker JM, Editor. Methods in molecular biology. 1st ed. London: Humana Press; 1984: p. 225-30.
12. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 1983; 166(4): 557-80.
13. Bothwell AL, Yancopulos GD, Alt FW. Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes. Boston: Jones & Bartlett Publishers; 2000. p. 247-60.
14. Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. Anal Biochem 1993; 212(2): 394-401.
15. WHO: Initiative for Vaccine Research (IVR). Leishmaniasis. [Online]. 2009. Available from: URL: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/leishmaniasis/en/
16. Nadim A, Javadiyan E, Mohebali M. The experience of leishmaniazation in the Islamic Republic of Iran. Med J Islamic Rep Iran 1997; 3(2): 284-9.
17. Warit S, Zhang N, Short A, Walmsley RM, Oliver SG, Stateva LI. Glycosylation deficiency phenotypes resulting from depletion of GDP-mannose pyrophosphorylase in two yeast species. Mol Microbiol 2000; 36(5): 1156-66.

www.mui.ac.ir

Orginal Article

Journal of Isfahan Medical School
Vol 27, No 98, October 2009

Received: 8.12.2008
Accepted: 21.2.2009

Cloning of Mannose-1-Phosphate Guanyltransferase Encoding Gene (MRHO/IR/ER/75) in Leishmania Major

Noosha Zia MSc[*], Gilda Eslami PhD[**], Mojgan Bandehpour PhD[***], Rasool Salehi PhD[****], Bahram Kazemi PhD[*****], Kazem Parivar[******], Hossein Hejazi PhD[*******]

[*] MSc, Department of Biochemistry, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[**] PhD, Department of Parasitology and Mycology, School of Para-medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
[***] Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[****] Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[*****] Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[******] Professor of Biochemistry, Sciences and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[*******] Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Background: Leishmania is an obligate interacellular protozoa and sand fly, as a vector, transmits infectious forms of the parasite to vertebrate host. In this way it is important to find candidate antigens which could tend to prevent the disease.

Methods: The gene coding mannose 1 phosphate guanyl transferase enzyme was amplified from genomic DNA isolated from the Iranian strain of *L. major* (MRHO/IR/75/ER) as a template. The Polymerase Chain Reaction (PCR) product was ligated into the pTZ57R plasmid and the recombinant gene was digested using restriction enzymes, BamHI and EcoRI. The fragment was ligated into the pET32a plasmid, as an expression vector. The cloned pET32a-GDP mannose was confirmed using restriction enzyme digestion method and the DNA fragment was sequenced.

Findings: Electrophoresis method confirmed the PCR product is related to the enzyme mannose 1 phosphate guanyl transferase. After the ligation of the product into the pTZ57R and pET32a, and the restriction enzyme digestion by BamHI and EcoRI, the correct frame of cloned gene in vectors was confirmed.

Conclusion: There was 92 percent homology between the cloned gene coding enzyme mannose 1 phosphate guanyl transferase in this study and the ones present in gene bank. It is suggested that the gene encoding mannose 1 phosphate guanyl transferase enzyme is conserved among different genera of Leishmania.

Key words: **Leishmania major, Mannose 1phosphate guanyltransferase, Cloning.**

Page count: 9
Tables: 1
Figures: -
References: 17

Address of Correspondence: Hossein Hejazi, Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
E-mail: hejazi@med.mui.ac.ir

www.mui.ac.ir