مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۸، مرداد ۱۳۹۶، صفحه ۶۴-۵۸

تولید انگلهای نوترکیب *لیشمانیا تروپیکا* بیان کننده دو پروتئین گزارشگر EGFP و لوسیفراز

طاهره طاهری (PhD)[۱*]، مهدیه اسکندر (MSc)[۱]، سیما رأفتی (PhD)[۱]

۱-بخش ایمنوتراپی و تحقیقات واکسن *لیشمانیا*، انستیتو پاستور ایران

دریافت: ۹۵/۱۲/۲۱، اصلاح: ۹۶/۱/۱۵، پذیرش: ۹۶/۲/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: انگل *لیشمانیا تروپیکا* عامل بروز لیشمانیوز پوستی و احشایی در ایران است. بعلت فقدان یک آزمون دقیق، حساس و غیرتهاجمی در مدل حیوانی، درمان و واکسیناسیون برعلیه آن با چالش بزرگی همراه است. لذا در این مطالعه، *لیشمانیا تروپیکا* با دو ژن گزارشگر پروتئین فلورسنت سبز (*egfp*) و لوسیفراز (*luc*) به شکل اتصال یافته (*egfp-luc*) ترانسفکت شد تا در مطالعات آتی بعنوان یک ابزار تشخیصی سریع و دقیق برای ردیابی و اندازه گیری میزان عفونت در بدن حیوان زنده مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشی-تجربی، سازه ژنی حاوی ژنهای *egfp-luc* از طریق نوترکیبی مشابه در ژنوم سویه ایرانی انگل *لیشمانیا تروپیکا* (در لوکوس 18srRNA) درج شد. برای غربالگری انگلهای ترانسفکت شده، از شاخص انتخابی G418 استفاده گردید. سپس بوسیله PCR با پرایمرهای مختلف ژنوتیپ انگلها بررسی شد. همچنین با استفاده از وسترن بلات، میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری بیان پروتئینهای گزارشگر ارزیابی شد.

یافته‌ها: مشاهدات اولیه فنوتیپی انگل با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که انگلهای نوترکیب *L. tropica*$^{EGFP-LUC}$ پروتئین EGFP را در سیتوپلاسم تولید کرده اند. میزان کمی شدت فلورسنت اندازه گیری شده در انگلهای نوترکیب با استفاده از فلوسایتومتری بیش از ۹۰٪ بود. نتایج آزمونهای PCR ورود ژنها را بدرون ژنوم و لوکوس مربوطه و وسترن بلات بیان هر دو ژن را در شکل پروماستیگوت انگل نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این اولین گزارش مبنی بر تولید انگلهای نوترکیب *لیشمانیا تروپیکا* بیان کننده هر دو ژن گزارشگر *egfp* و *luc* بطور همزمان است.

واژه‌های کلیدی: ***لیشمانیا تروپیکا*، لیشمانیوز پوستی، ترانسفکشن، ژنهای گزارشگر، پروتئین فلورسنت سبز، لوسیفراز، فلوسایتومتری، میکروسکوپ فلورسنت.**

مقدمه

ایران یکی از مناطق اندمیک لیشمانیوز پوستی است که عامل آن دو گونه *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا تروپیکا* می باشد. لیشمانیوز پوستی به دو شکل متفاوت بروز می کند: لیشمانیوز جلدی روستایی (مرطوب) که عامل مولد آن *لیشمانیا ماژور* و لیشمانیوز جلدی شهری (خشک) که عامل ایجاد کننده آن *لیشمانیا تروپیکا* می باشد. علی رغم شباهت بین علائم بالینی بوجود آمده توسط این دو گونه انگل، تفاوتهای زیادی بین آنها وجود دارد که بر مشکلات درمان و تشخیص این بیماری افزوده است (۱). انگل *لیشمانیا تروپیکا* از انسان به انسان و توسط نیش پشه خاکی انتقال می یابد. *لیشمانیا تروپیکا* علاوه بر ایجاد لیشمانیوز پوستی، می تواند سبب احشایی شدن بیماری (لیشمانیوز احشایی) نیز شود (۲). علاوه بر آن، شواهدی مبنی بر لیشمانیوز مخاطی بوجود آمده از این انگل در ایران نیز گزارش شده است (۳ و ۲). این انگل در طول چرخه زندگی خود به دو شکل خارج سلولی (اماستیگوت) و داخل سلولی (پروماستیگوت) مشاهده می شود. هنوز بر علیه بیماری لیشمانیوز هیچگونه راه درمان مناسب و قطعی و یا واکسن مؤثری کشف نشده است. یکی از دلایل آن عدم وجود شیوه ای سریع و مؤثر برای انتخاب و غربالگری داروهای جدید و فعال می باشد. در روشهای قدیمی، اثرات سمی ترکیبات بر روی اماستیگوتها در کشت سلولی یا در مدل های حیوانی، پس از ثبوت ماکروفاژهای آلوده و رنگ آمیزی آنها با گیمسا و یا تهیه اسمیر توسط میکروسکوپ مورد مطالعه و ارزیابی قرار می گرفت (۴). روشهای متعددی نیز برای اندازه گیری میزان عفونت لیشمانیا در بافت حیوانات یا در ماکروفاژهای آلوده در *in vitro* استفاده می گردد. همچنین میزان عفونت در کف پای موشها از طریق آزمون رقیق سازی محدود یا مشاهده با میکروسکوپ پس از رنگ آمیزی با گیمسا تخمین زده می شود (۵). روشهای ملکولی مانند PCR و Real-time PCR نیز از روشهای رایج تشخیصی بشمار می آیند. گرچه آزمونهای ذکر شده، روشهای استاندارد کنونی محسوب می گردند اما با مشکلاتی از جمله هزینه بالا، وقت گیر بودن، قربانی کردن تعداد زیادی موش و مهمتر از همه اینکه قادر به شناسایی انگل و تشخیص میزان عفونت در مراحل اولیه بیماری در بافت زنده و یا زمانی که میزان انگل در بافت کم است نمی باشند. در دهه اخیر، استفاده از ملکولهای گزارشگر که فعالیت آنها در سلول قابل اندازه گیری است برای مشاهده فرآیندهای بیولوژیکی که در سلول رخ می دهد به شدت رو به گسترش بوده است. در این میان، ژنهای پروتئینهای گزارشگر بصری همچون لوسیفراز (LUC) و پروتئین فلورسنت سبز (EGFP) مناسب ترین و پرکاربردترین ژنها هستند. با استفاده از تصویر برداری موشها در طول دوره آزمایش، می توان بارها آنها را مورد بررسی قرار داد. لذا هر حیوان می تواند بعنوان کنترل خودش در طول آزمایش بارها مورد مطالعه قرار گیرد، بنابراین در طی آزمایش نه تنها حیوانی حذف نمی

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۷۹۲ انستیتو پاستور ایران می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر طاهره طاهری
آدرس: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش ایمنوتراپی و تحقیقات واکسن لیشمانیا. تلفن: ۶۶۱۱۲۸۱۰-۰۲۱
E-mail: tahereh_t@yahoo.com

شود بلکه اثر دارو یا واکسن بر روی هر حیوان بطور کامل بررسی می گردد و از قربانی شدن تعداد کثیری موش جلوگیری خواهد شد. یکی دیگر از مزایای لوسیفراز حساسیت بالای آن نسبت به ژنهای دیگر است (۶). پیش از این گونه های مختلفی از *لیشمانیا* بیان کننده پروتئینهای EGFP (۱۱-۷) یا پروتئین فلورسنت قرمز mCherry (۱۲) یا لوسیفراز (۱۶-۱۳ و ۶) به تنهایی تهیه و در تحقیقات متعدد مورد استفاده قرار گرفته اند. اخیراً انگلهای نوتراکیب *L. major*$^{EGFP-LUC}$ تولید و میزان بار انگلی و سیر بیماریزایی ناشی از آن با دقت بالا در موشهای حساس BALB/c در حداقل زمان (۱۵ روز پس از تزریق انگل) از طریق تصویر برداری مشاهده و اندازه گیری شد (۱۵).

هدف از این مطالعه تولید *لیشمانیا تروپیکا* نوتراکیب (*L. tropica*$^{EGFP-LUC}$) می باشد تا در مطالعات آتی بتوان به عنوان ابزاری دقیق و سریع در غربالگری دارو و واکسن بر روی موشهای BALB/c آلوده شده با این انگل مورد استفاده قرار گیرد و با توجه به حساسیت بالای ژنهای گزارشگر به کمک روش تصویر برداری پیش از قربانی کردن موشها بتوان میزان بار انگلی موجود در بافت را تخمین زد.

مواد و روش‌ها

کشت انگل: در این مطالعه آزمایشی-تجربی، انگلهای *لیشمانیا تروپیکا* تیپ وحشی سویه ایران (MOHM/IR/09/Khamesipour-Mashhad) و یا ترانسفکت شده با EGFP-LUC (*L. tropica*$^{EGFP-LUC}$) در محیط کشت M199 کامل حاوی ۱۰ ٪ سرم جنین گاوی غیرفعال شده با دما (Heat-inactivated Fetal Calf sera) و مکملها (۴۰ میلی مولار HEPES، ۲ میلی مولار L-گلوتامین، ۵/۰ میلی گرم در میلی لیتر Hemin و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر سولفات جنتامایسین) کشت داده شدند (۱۷و۱۵).

تهیه و غربالگری انگل *لیشمانیا تروپیکا* نوتراکیب: پلاسمید pLEXSY-EGFP-LUC-Neo^r در میزبان باکتریایی DH5α توسط کیت استخراج DNA پلاسمیدی تخلیص گردید (۱۷و۱۵). قطعه 5'SSU-EGFP-LUC-Neo^r-3'SSU با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Swa*I هضم و از پلاسمید جدا و خالص شد. تعداد تقریباً 10^8 پروماستیگوت *لیشمانیا تروپیکا* تیپ وحشی در مرحله لگاریتمی رشد در بافر الکتروپوریشن (۲۱ میلی مولار HEPES، ۱۳۷ میلی مولار NaCl، ۷/۰ میلی مولار Na_2HPO_4 و ۶ میلی مولار گلوکز، pH ۵/۷) حل شد. مقدار ۴۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون انگل (حاوی تقریباً 4×10^7 انگل) با تقریباً ۱۰ میکروگرم DNA مخلوط (یا بدون DNA بعنوان کنترل منفی) و درون کوت ۲ میلی لیتری (Bio-Rad، USA) سرد ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه گردید.

سپس انگلها با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن (Gene PulserEcell، USA) و ۲ پالس الکتریکی با فاصله زمانی ۲۰ ثانیه در شرایط ولتاژ ۴۵۰ ولت، ظرفیت ۵۰۰ میکروفاراد ترانسفکت شد. انگلهای ترانسفکت شده به ۳ میلی لیتر محیط کشت M199 کامل بدون آنتی بیوتیک منتقل شدند. برای غربالگری و انتخاب انگلهای دریافت کننده سازه ژنی، پس از ۲۴ ساعت انگلها به روی پلیتهای حاوی ۲٪ آگار Noble و محیط کشت M1992x با یا بدون آنتی بیوتیک G418 انتقال و تا زمان رشد کلونها در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (۱۷ و ۱۵).

مطالعات ژنوتیپی و تأیید وقوع نوترکیبی مشابه در انگلهای ترانسژن یا نوترکیب: کلونهای انگل مقاوم به آنتی بیوتیک کشت و DNA ژنومی آنها با استفاده از کیت (GF-1, Vivantis) استخراج گردید. ابتدا با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی ژنهای *egfp* و لوسیفراز (۱۷) حضور ژنهای گزارشگر در ژنوم تأیید شد. سپس وقوع نوترکیبی هومولوگ در لوکوس 18rRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F3001 (مشابه با توالی ژنوم انگل) و A1715 (مشابه با توالی پلاسمید) (۷) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

وسترن بلات: بررسی کیفی بیان پروتئینهای EGFP و LUC با استفاده از وسترن بلات و آنتی بادی منوکلونال ضد GFP و LUC کونژوگه شده با HRP (Acris Antibodies GmbH) صورت گرفت. رسوب سوسپانسیون انگلهای نوترکیب و تیپ وحشی (بعنوان کنترل منفی) با بافر نمونه 2X (۵/۴ میلی مولار (pH ۸/۶) Tris-HCl ۱۰٪ گلیسرول، ۲٪ SDS، ۵٪ ۲-مرکاپتواتانل، ۰۵/۰٪ رنگ بوموفنل بلو) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه جوشانده و بر روی ژل SDS-PAGE ۵/۱۲٪ الکتروفورز شد. باندهای تفکیک شده پروتئین با استفاده از سیستم بلاتینگ Bio-Rad به روی کاغذ نیتروسلولز (Protean, Schleicher & Schuell) منتقل شد.

نیتروسلولز با بافر پوشش دهنده متشکل از بافر TBS (۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، ۱/۰٪ Tween20) و ۵/۲ ٪ پروتئین آلبومین سرم پوشانده و سپس با آنتی بادی ضد GFP (رقت ۱:۵۰۰۰) یا LUC (رقت ۱:۱۰۰۰۰) به مدت ۲ ساعت مجاور شد. پس از شستشو و حذف آنتی بادیهای آزاد در محیط، کاغذ در مجاورت سوبسترای DAB (3,30-Diaminobenzidine) قرار گرفت تا باندها ظاهر شوند و در پایان با قرار دادن آن در آب واکنش متوقف گردید (۱۷ و ۱۵).

بررسی بیان EGFP بوسیله مشاهدات میکروسکوپی و فلوسایتومتری: برای اندازه گیری میزان کمی شدت فلورسنت EGFP بیان شده در سیتوپلاسم پروماستیگوتهای انگل نوترکیب، سوسپانسیون انگل در غلظت 10^6 انگل در میلی لیتر در محلول PBS (۸ میلی لیتر Na_2HPO_4، ۷۵/۱ میلی مولار KH_2PO_4، ۲۵/۰ میلی مولار KCl، ۱۳۷ میلی مولار NaCl، pH 7.2) شستشو داده شده و سپس در همین محلول و با استفاده از سیستم فلوسایتومتری مدل FACScaliburBD (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) مورد بررسی قرار گرفت (۱۴و۱۳و۷). همچنین بیان ژن *egfp* از نظر کیفی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Epi-fluorescence microscope, Nikon, E200) مشاهده و عکسبرداری شد (۱۷).

یافته‌ها

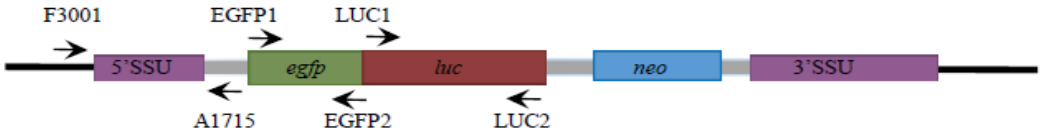
***تهیه انگلهای لیشمانیا تروپیکا* نوترکیب و غربالگری کلونها:** ژن پروتئینهای گزارشگر EGFP-LUC در ژنوم انگل تیپ وحشی لیشمانیا تروپیکا بطور پایدار ترانسفکت گردید و کلونهای حاوی ژنهای دریافت کننده ژن با مقاومت در حضور آنتی بیوتیک G418 انتخاب شدند.

مطالعات ژنوتیپی و تأیید وقوع نوترکیبی مشابه در انگلهای ترانسژن یا نوترکیب: با استفاده از پرایمرهای مختلف (جدول ۱) حضور ژنهای *egfp* (EGFP2 و EGFP1) و *luc* (LUC2 و LUC1) در ژنوم و نیز محل دقیق ورود این دو ژن به داخل ژنوم در جایگاه لوکوس 18srRNA F3001، A1715) اثبات

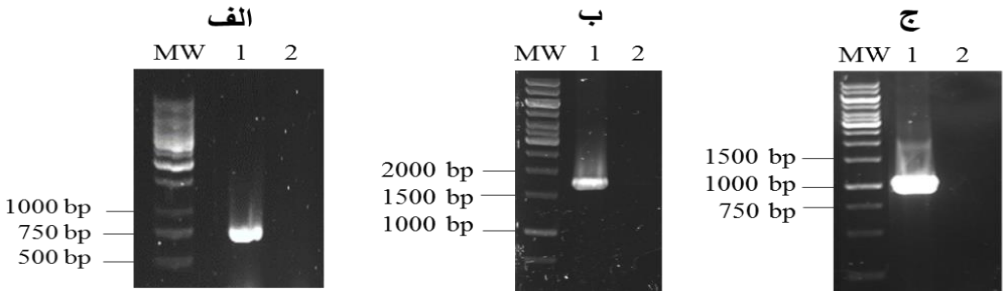
گردید. در شکل ۱ جایگاه اتصال پرایمرها مشخص گردیده است. شکلهای ۲ الف و ۲ب به ترتیب نتایج PCR برای حضور ژنهای *egfp* (قطعه تقریباً ۷۵۰ جفت باز) و *لوسیفراز* (قطعه تقریباً ۱۶۵۰ جفت باز) و شکل ۲ج وقوع نوترکیبی صحیح در ژنوم انگل نوترکیب (قطعه تقریباً ۱۰۰۰ جفت باز) را نشان می دهد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام ژن یا موقعیت	نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول (جفت باز)
egfp	EGFP1	5′-ATGATATCAAGATCTATGGTGAGCAAGGGC-3′	~ ۷۵۰ bp
	EGFP2	5′-GCTCTAGATTAGGTACCCTTGTACAGCTCGTC-3′	
لوسیفراز	LUC1	5′-GCTAAGCTTATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG-3′	~ ۱۶۵۰ bp
	LUC2	5′-ATTCTAGATTACACGGCGATCTTTCCGGCAC-3′	
نوترکیبی مشابه	F3001	5′-GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG-3′	~ ۱۰۰۰ bp
	A1715	5′-TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC-3′	



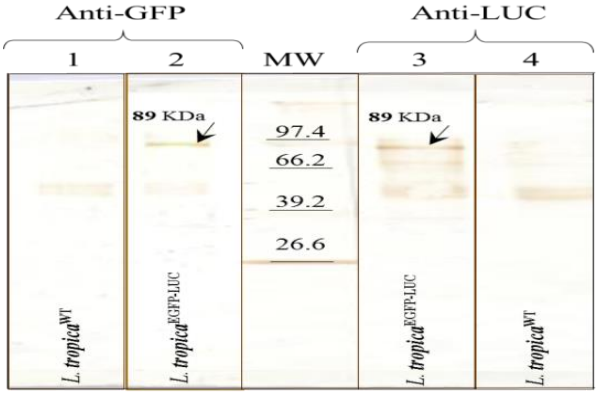
شکل ۱. موقعیت ژنها و محل اتصال پرایمرها. خط طوسی پلاسمید، خط سیاه ژنوم و فلشها محل اتصال پرایمرها را نشان می دهند.



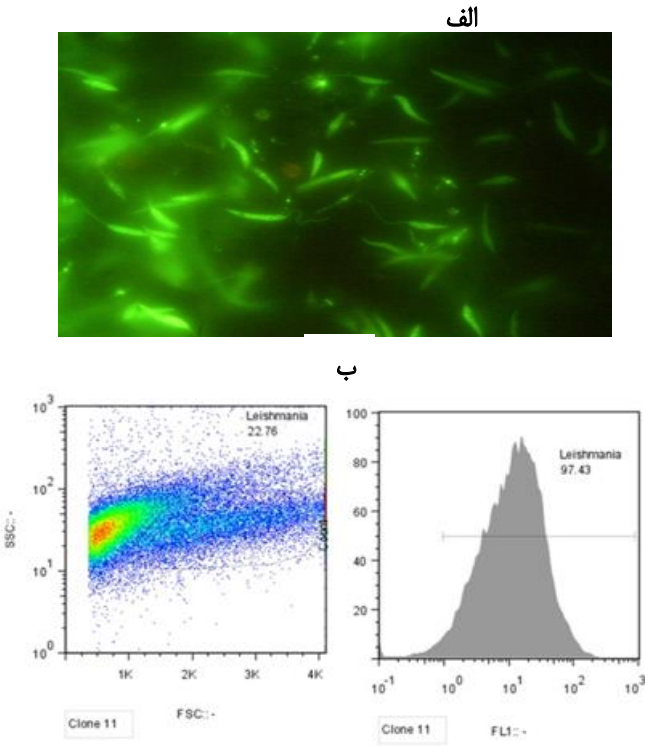
شکل ۲. نتایج PCR برای تأیید حضور ژنهای *egfp* (الف)، *luc* (ب) و تأیید وقوع نوترکیبی در ژنوم انگل نوترکیب (ج).
MW: شاخص وزن ملکولی، ستون ۱: انگل نوترکیب و ستون ۲: انگل تیپ وحشی

بررسی بیان پروتئینهای گزارشگر با استفاده از وسترن بلات: بیان پروتئینهای گزارشگر به هم اتصال یافته با حضور باندی به وزن تقریبی ۸۹ کیلودالتون در انگلهای نوترکیب با استفاده از وسترن بلات و آنتی بادی های ضد EGFP (شکل ۳، ستون ۲) و ضد لوسیفراز (شکل ۳، ستون ۳) تأیید شد. با توجه به اینکه وزن پروتئینهای EGFP و لوسیفراز به ترتیب ۲۷ و ۶۲ کیلودالتون است، باندی به وزن تقریبی ۸۹ کیلودالتونی نشانگر بیان دو ژن گزارشگر بصورت اتصال یافته می باشد. ستونهای ۱ و ۴ انگل تیپ وحشی را نشان می دهد که بعنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی بیان EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری: فنوتیپ انگلهای *L. tropica*$^{EGFP-LUC}$ از نظر بیان پروتئین EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. همانطور که در شکل ۴الف مشاهده می گردد پروتئین گزارشگر EGFP در سیتوپلاسم انگل بیان گردید بطوری که کل پیکره انگل حتی تاژک انگل به رنگ سبز فلورسنت دیده می شود. به منظور بررسی کمی و تخمین میزان شدت فلورسنت EGFP، چند کلون از انگلهای ترانسفکت شده با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. درصد شدت فلورسنت EGFP در کلونهای مختلف بین ۹۱ تا ۹۸ درصد بود. در شکل ۴ب نتایج فلوسایتومتری یکی از کلونهای انگل نوترکیب نشان داده شده است.



شکل ۳. نتایج بررسی بیان ژنهای گزارشگر در انگلهای نوترکیب با استفاده از وسترن بلات و آنتی بادیهای ضد EGFP و لوسیفراز. ستونهای ۲ و ۳: انگلهای نوترکیب، ستونهای ۱ و ۴: انگلهای تیپ وحشی و MW: شاخص وزن ملکولی



شکل ۴. الف) تصویر انگل *L. tropica*$^{EGFP-LUC}$ با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (درشتنمایی ۱۰۰۰×). ب) نتایج شدت فلورسنت EGFP در انگل *L. tropica*$^{EGFP-LUC}$ با استفاده از فلوسایتومتری

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، انگل *لیشمانیا تروپیکا* بیان کننده هر دو پروتئین EGFP و لوسیفراز تولید گردید. ارزیابی انجام شده با فلوسایتومتری شدت فلورسنت بیش از ۹۰ درصد را در انگلهای نوترکیب نشان داد. از طرفی نتایج وسترن بلات با استفاده از هر دو آنتی بادی ضد LUC و EGFP حاکی از بیان موفق دو پروتئین بصورت اتصال یافته به هم می باشد. پیش از این از ژنهای *egfp* و یا لوسیفراز بطور جداگانه در انگل *لیشمانیا* استفاده شده است. اما این اولین گزارشی است که دو ژن *egfp* و *luc* بصورت اتصال یافته در *لیشمانیا تروپیکا* ترانسفکت گردیده است. در مورد پاتوژنیسیتی این گونه از انگل *لیشمانیا* در میزبان پستاندار و نیز وجود مدل حیوانی مناسب برای آن دانش کافی در دسترس نیست (۱۸) و این موضوع اهمیت مطالعه بر روی این انگل را شدت می بخشد. همچنین استفاده از ابزارهایی با اختصاصیت و حساسیت بالا که بتوان در کمترین زمان ممکن حداقل میزان انگل در بافت آلوده را تشخیص داد و برای حیوان تهاجمی نباشد و کمترین آسیب یا قربانی شدن موش را در پی داشته باشد در مطالعات و تحقیقات ضروری به نظر می رسد. در مطالعات پیشین نشان داده شد که با استفاده از انگلهای نوترکیب لیشمانیا ماژور بیان کننده ژنهای گزارشگر *egfp* و *لوسیفراز* به تنهایی و یا به صورت متصل به هم می توان پیش از قربانی کردن موش، با استفاده از تصویر برداری وجود عفونت انگلی و سیر پیشرفت بیماری را علاوه بر محل تزریق انگل در غدد لنفاوی نیز مشاهده، ردیابی و اندازه گیری نمود (۱۵ و ۷).

در مورد بیان ژنهای گزارشگر در *لیشمانیا تروپیکا* گزارشات بسیار معدودی وجود دارد. در سال ۲۰۱۳ Patel Parbhu- و همکاران، *لیشمانیا تروپیکا* حامل ژن *egfp* را تولید و فقط در آزمونهای *in vitro* استفاده نمودند (۱۹). در سال ۲۰۱۲ Talmi-Frank و همکاران، لیشمانیا تروپیکا ترانسفکت شده با ژن LUC را به گوش رت تزریق کردند، اما فقط یک روز پس از ایجاد آلودگی موفق به مشاهده بار انگلی در موضع آلوده با استفاده از تصویربرداری بیولومینوسنس شدند (۱۸).

یکی از مزیتهای پروتئین های گزارشگر خنثی بودن آنها است و یکی از بحث برانگیزترین جنبه های استفاده از این پروتئین ها، احتمال تأثیر بیان آنها بر سیستم ایمنی موش است. در این زمینه مطالعات زیادی صورت گرفته و گزارشات ضد و نقیضی وجود دارد. برخی به بی تأثیر بودن آنها اشاره دارند و نتایج برخی از مطالعات نیز حاکی از آن است که پروتئین EGFP بر روی سیستم ایمنی تأثیرگذار است (۲۱ و ۲۰ و ۵ و ۴).

Sadeghi و همکاران نشان دادند که بین عفونت زایی *L. major* تیپ وحشی با رده نوترکیب *L. major*$^{EGFP-LUC}$ در شرایط *in vitro* هیچ تفاوتی وجود ندارد (۲۲). همچنین در مطالعه مشابهی Seif و همکاران نشان دادند که با وجودی که انگل های نوترکیب در موشهای BALB/c التهاب بیشتری نسبت به انگل‌های تیپ وحشی در موضع آلوده ایجاد می کنند، اما تفاوت معنی داری از نظر میزان بار انگلی و پاسخ ایمنی بین آن دو وجود ندارد (۲۳). براساس نتایج این مطالعه، انگلهای نوترکیب *لیشمانیا تروپیکا* بیان کننده هر دو پروتئین گزارشگر EGFP و LUC بطور همزمان بطور موفقیت آمیز تولید گردید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری خانم معتمدی در بخش ویروس شناسی (همکاری در انجام فلوسایتومتری) و آقای شهرام غلامعلیزاده در بخش ایمنوتراپی و تحقیقات واکسن *لیشمانیا* تقدیر و تشکر می گردد.

Production of Recombinant Leishmania Tropica Parasites Expressing Two Proteins of Egfp and Luciferase Reporter

T. Taheri (PhD)*[1], M. Eskandar (MSc)[1], S. Rafati (PhD)[1]

1.Department of Immunotherapy and Leishmania Vaccine Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(8); Aug 2017; PP: 58-64
Received: Mar 11th 2017, Revised: Apr 4th 2017, Accepted: May 6th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *L. tropica* is the major cause of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. Due to lack of an accurate, sensitive and noninvasive detection test in animal model is a major problem. Here, we designed *L. tropica* stably transfected with two reporter genes as fused form, enhanced green fluorescent protein (*egfp*) and Luciferase (*luc*), named as *egfp-luc* to use as a specific tools for detection and measurement of parasite load in live animals.

METHODS: In an experimental study, linearized cassette containing *egfp-luc* genes was stably integrated into Iranian strain of wild-type *L. tropica* genome, 18srRNA locus, by homologous recombination. Transfectants were screened by G418 resistance, confirmed by PCR and western blotting and the expression of EGFP signals were observed by fluorescent microscope and flow cytometry.

FINDINGS: Primary phenotype observations of parasite (by fluorescent microscopy and flow cytometry) were shown that recombinant *L. tropica*$^{\text{EGFP-LUC}}$ was successfully produced EGFP protein into cytoplasm. Quantification of EGFP intensity was more than 90%. Furthermore, the results of PCR and western blotting verified the proper integration into genome and expression of both genes in promastigotes.

CONCLUSION: This is the first report to show the generation of recombinant *L. tropica*$^{\text{EGFP-LUC}}$ expressing two reporter genes simultaneously.

KEY WORDS: *Leishmania Tropica, Cutaneous Leishmaniasis, Transfection, Reporter Genes, Egfp, Luciferase, Flow Cytometry, Fluorescent Microscopy.*

Please cite this article as follows:

Taheri T, Eskandar M, Rafati S. Production of Recombinant Leishmania Tropica Parasites Expressing Two Proteins of Egfp and Luciferase Reporter. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(8):58-64.

* **Corresponding author: T. Taheri (PhD)**
Address: Immunotherapy and Leishmania Vaccine Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 66112810
E-mail: tahereh_t@yahoo.com

References

1.Steverding D. The history of leishmaniasis. Paras Vec.2017;10(82):1-10.

2.Alborzi A, Pouladfar GR, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Kadivar MR. Isolation of leishmania tropica from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. Am J Trop Med Hyg. 2008;79(3):435-7.

3.Shirian S, Oryan A, Hatam G-R, Daneshbod K, Daneshbod Y. Molecular diagnosis and species identification of mucosal leishmaniasis in Iran and correlation with cytological findings. Acta cytologica. 2012;56(3):4-309.

4.Ashutosh SG, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N. Use of Leishmania donovani field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(9):3776-83.

5.Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Quelette MOlivier M, Papadopouou B. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying Leishmania spp. infections in macrophages and in animal models. Mol Biochem Parasitol. 2000;110(2):195-206.

6.Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent Leishmania expressing luciferase forrapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harbouring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. Cell Microbiol. 2005;7(3):383-92.

7.Bolhassani A, Taheri T, Taslimi Y, Zamanilui S, Zahedifard F, Seyed N, Torkashvand F, Vaziri B, Rafati S. Fluorescent Leishmania species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. Exp Parasitol. 2011;127:637-45.

8.Doroud D, Zahedifard F, Vatanara A, Taslimi Y, Vahabpour R, Torkashvand F, Vaziri B, Rouholamini Najafabadi A, Rafati S. C-Terminal domain deletion enhances the protective activity of cpa/cpb loaded solid lipid nanoparticles against leishmania major in BALB/c Mice. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:1236.

9.Taheri T, Gholami E, Saatchi F, Seyed N, Taslimi Y, Rafati S. Expressional comparison between episomal and stable transfection of a selected tri-fusion protein in leishmania tarentolae. Vaccine Res. 2014;1(1):1-9.[In Persian].

10.Saljoughian N, Taheri T, Zahedifard F, Taslimi Y, Doustdari F, Bolhassani A, Doroud D, Azizi H, Heidari K, Vasei M, Namvar Asl N, Papadopoulou B, Rafati S. Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant L. tarentolae Vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:2174.

11.Zahedifard F, Gholami E, Taheri T, Taslimi Y, Doustdari F, Seyed N, Torkashvand F, Meneses C, B. P, Kamhawi S, Valenzuela JG, Rafat S. Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant leishmania tarentolae expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. PLoS Neglect Tro Dis. 2014;8(3):2751.

12.Andrés Vacas CS, Óscar Velasco-Rodriguez, Miriam Algarabel-Olona, José Peña-Guerrero, Esther Larrea, et al.Construction of two mcherry plasmids (pXG-mCherry) for transgenic leishmania: valuable tools for future molecular analysis. J Parasitol Res. 2017;2017.

13. Coelho AC, Oliveira JC, Espada CR, Reimão JQ,Trinconi bC, Silvia RB. Uliana. a luciferase-expressing leishmania braziliensis line that leads to sustained skin lesions in BALB/c mice and allows monitoring of miltefosine treatment outcome. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(5):e0004660.

14.Reimão JQ, Oliveira JC, Trinconi CT, Cotrim PC, Coelho AC, Uliana SRB. Generation of luciferase-expressing leishmania infantum chagasi and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioimaging. PLOS Neglect Tropic Dis. 2015;9:e0003556.

15.Taheri T, Saberi Nik H, Seyed N, Doustdari F, Etemadzadeh M-H, Torkashvand F, Sima Rafati. Generation of stable L. major+EGFP-LUC and simultaneous comparison between EGFP and luciferase sensitivity. Experiment Parasitol. 2015;150:44-55.

16.Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. Leishmania (Leishmania) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. Sci Rep 2017;7(9):44141.

17.Taheri T, Seyed N, Rafati S. DNA integration in Leishmania genome: an application for vaccine study and drug screening. Vaccine Design. 2016;1:603-22.
18.Talmi-Frank D, Jaffe CL, Nasereddin A, Baneth G. Leishmania tropica experimental infection in the rat using luciferase-transfected parasites. Veterinary Parasitol. 2012;62:187:57.
19.Patel Ap, Deacon A, Getti G. Development and validation of four leishmania species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. Parasitol. 2014;141(4):501-10.
20.Eixarch H, Gómez A, Kádár E, George M, Martínez N, Espejo C, Petriz J, Gimeno R, Barquinero J. Transgene expression levels determine the immunogenicityof transduced hematopoietic grafts in partially myeloablated mice. Molecular Thera. 2009;17(11):1904-9.
21.Skelton D, Satake N, Kohn D. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice. Gene therapy. 2001;8(23):1813-4.
22.Sadeghi S, Seyed N, Etemadzadeh M-H, Abediankenari S, Rafati S, Taheri T. In vitro infectivity assessment by drug susceptibility comparison of recombinant leishmania major expressing enhanced green fluorescent protein or EGFP-luciferase fused genes with wild-type parasite. Korean J Parasitol. 2015;53(4):385-94.
23.Seif S, Kazemi F, Gholami E, Seyed N, Taslimi Y, Habibzadeh S, et al. EGFP reporter protein: its immunogenicity in Leishmania-infected BALB/c mice. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(9):3923-34.