

تحديد هوية المورثة sodb1 لدى الليشمانيا المدارية وتنسيقها ضمن حامل التعبير المورثي pCI

د. شادي سكرية**

مريم شفيق*

د. محمود قويدر**

الملخص

يعد داء الليشمانيات أهم المشاكل الصحية في أجزاء كثيرة من العالم إذ يؤدي إلى ما يقدر بمليوني إصابة جديدة كل عام. ولا يوجد حتى الآن أي علاج مثالي لهذا الداء، مما يستدعي تطوير استراتيجيات وقائية عن طريق إيجاد لقاح فعال يحمي من الإصابة بالداء. حديثاً أظهرت اللقاحات المورثية (الجينية) والتي يستعمل فيها المورثات التي ترمز لمستضدات الطفيلي نتائجاً واعدة مما جعلها نهجاً جديداً في مجال اللقاحات ضد داء الليشمانيات. ومن هذه المستضدات الواعدة البروتين فوق أوكسيد ديسموتاز الحديد Iron superoxide dismutase B1 Fe-SODB1 والذي يعد مرشحاً محتملاً كلقاح ضد العديد من أنواع الليشمانيا. تم في هذه الدراسة عزل مورثة sodb1 لأول مرة من الليشمانيا المدارية، وذلك باستخدام تقانة PCR وبوجود مرئسات صممت بالاعتماد على التماثل الذي تظهره مورثة sodb1 بين الأنواع المدروسة من طفيلي الليشمانيا. بعد نجاح عملية عزل المورثة تم إدخالها في الحامل

* طالبة ماجستير - قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

** قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

pCI وذلك تحت سيطرة المحضض CMV بهدف تحديد خصائص الجين المرمزة لبروتين Fe-SODB1 في اللشمانيا المدارية وتطوير لقاح تجريبي يعتمد على هذه المورثة.

الكلمات المفتاحية: اللشمانيا المدارية، اللقاحات المورثية، فوق أوكسيد الديسموتاز .

Identification and Cloning of *Leishmania tropica* sodb1 Gene Using pCI Expression Vector

Mariam Shafie *

Dr. Chadi Soukkarieh **

Dr.Mahmoud Kweider**

Abstract

leishmaniasis is a significant health problem in many parts of the world resulting in an estimated 2 million new cases each year. However, there is currently no ideal treatment for Cutaneous Leishmania has been identified which emphasize the need for vaccine development. A multitude of vaccine strategies has been pursued including the use of killed and genetically modified parasites. Immunization with DNA vaccines encoding Leishmania antigens represents a new approach to a Leishmania vaccine. Iron superoxide dismutase B1 (Fe-SODB1) is considered a potential candidate for a leishmaniasis vaccine against many leishmania species. In the present work sodb1 was isolated from a *Leishmania tropica*, using PCR with a set of primers derived from conserved amino acids of iron SODs (Fe-SODs). Then it was inserted into pCI vector, under the transcriptional control of the CMV promoter. This study was performed to characterize the gene that code for FeSODB1 in *Leishmania tropica* and evaluate a DNA vaccine Fe-SODB1.

Key words: *Leishmania tropica*, superoxide dismutase, DNA vaccines.

* Master degree Student, Associated supervisor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University.

** Associat. Prof. , Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University.

المقدمة:

يعد داء الليشمانيات واحداً من أكثر الأمراض الطفيلية انتشاراً في العالم، إذ ينتشر في أربع قارات (آسيا، وأوروبا، وإفريقيا، وأمريكا)، ويستوطن في 88 دولة من بينها سوريا، وبلغت عدد الإصابات المسجلة في سوريا وفقاً لإحصائيات منظمة الصحة العالمية عام 2010 نحو 71,996 إصابة (WHO 2014)، بالإضافة إلى انتشار هذا الداء إلى مناطق جديدة لم تكن قد سجلت إصابات سابقة، ووجود نحو 20 % من الحالات لا يتم التبليغ عنها أو معالجتها (WHO 2015).

يسبب داء الليشمانيات طفيلي وحيد خلية إجباري التطفل داخل خلوي من جنس الليشمانيا *Leishmania* (Sharma and Singh 2009). يعرف للداء ثلاثة أشكال سريرية وهي: الداء الجلدي والجلدي المخاطي والحشوي. تختلف هذه الأشكال بحسب نوع الطفيلي المسبب والنسيج الذي يتوجه إليه الطفيلي (David and Craft 2009, Antinori, Schifanella et al. 2012).

وفي ظل الانتشار الواسع للداء وتسجيل مئات آلاف الإصابات الجديدة كل عام يصبح التوصل إلى لقاح آمن وفعال هو الحل الأمثل للوقاية من الإصابة بداء الليشمانيات و من ثم الحد من انتشاره ، إلا أن لقاحاً فعالاً يؤمن الحماية الكاملة من الإصابة مازال غير متوفر حتى الآن (Handman 2001). وتنازلت الدراسات في محاولة لتطوير اللقاحات بدءاً من استخدام الطفيليات الحية فالمُضعفة والمقتولة ثم اللقاحات المعتمدة على مُستضدات منقاة ومأشوبة وانتهاءً بتطوير اللقاحات المورثية (Nagill and Kaur 2011).

تعتمد اللقاحات المورثية على استخدام بلازميد يتضمن المورثة المرزمة لمستضد معين يتم التعبير عنه في الخلايا حقيقية النوى (Dumonteil, Jesus et al. 2003, Murray, Berman et al. 2005)، ويعد هذا النمط من اللقاحات واعداً في مجال تطوير لقاح يؤمن الوقاية من الأمراض المعدية مثل داء الليشمانيات. تمتاز اللقاحات

المورثية بإمكانية إنتاجها بكميات كبيرة، وبشكل رخيص وبسيط وسريع، كما تتصف بالثباتية العالية في درجات حرارة مختلفة، إضافة إلى سهولة تخزينها ونقلها، وقدرتها على توليد مناعة طويلة الأمد وتوليد نوعي الاستجابة المناعية الخلطية وخلوية الوساطة، كما أن هذه اللقاحات آمنة ولا تعرض الجسم لخطر الإصابة بالمرض. كل هذه المزايا رشحت اللقاحات المورثية لتكون بديلاً عن باقي الاستراتيجيات التلقيحية (Encke, zu Putlitz *et al.* 1999, Palatnik-de-Sousa 2008).

تتالت الدراسات على هذا النمط من اللقاحات حيث أظهر الكثير منها عدداً من المورثات الواعدة في تحضير لقاح فعال ضد داء الليشمانيات (Encke, zu Putlitz *et al.* 2002, Méndez, Belkaid *et al.* 1999, et al. 2002). ولعل المورثة *sod1* واحدة من المورثات المهمة التي لم تحظ بالدراسة الكافية في داء الليشمانيات الجلدي المسبب بالليشمانيا المدارية والتي يمكن أن يكون لها دورٌ مهمٌ في تحريض استجابة مناعية واقية من الإصابة بالداء.

تُشكل أنزيمات فوق أوكسيد ديسموتاز Superoxide dismutase مجموعة كبيرة من الأنزيمات المعدنية Metalloenzymes واسعة الانتشار في كل من بدائيات وحقيقيات النوى (Boucher, Brzozowski *et al.* 2006)، وهي عبارة عن أنزيمات تقوم بتفكيك Dismutation الجذور الحرة لشاردة فوق الأوكسيد O_2^- إلى بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وجزيئة الأوكسجين، حيث تتشكل شاردة فوق الأوكسيد داخل الخلايا نتيجة تفاعلات الأكسدة الأنزيمية والعشوائية، وتكون الجذور الحرة لهذه الشاردة ذات تأثير سام على الخلايا الحية فهي تقوم بأكسدة وتحطيم الجزيئات البيولوجية مثل البروتينات والليبيدات (Beyer, Imlay *et al.* 1991).

تُصنف هذه الأنزيمات إلى ثلاث مجموعات وذلك اعتماداً على الذرة المعدنية المتوضعة في الموقع الفعال لها، وهي: فوق أوكسيد ديسموتاز الحديد (FeSOD)، وفوق أوكسيد ديسموتاز المنغنيز (MnSOD)، وفوق أوكسيد ديسموتاز الزنك /

نحاس (Cu/ZnSOD). حيث تتواجد أنزيمات MnSOD و Cu/ZnSOD في القالب الميتوكوندري و السيتوزول لحقيقيات النوى على التوالي. في حين تُصادف أنزيمات FeSOD في بدائيات النوى ووحيدات الخلية Protozoa إضافةً إلى تواجدها في النباتات والطحالب (Bannister, Bannister *et al.*, 1987).

بيّنت الدراسات دور هذه الأنزيمات كعوامل فوعة لدى العديد من العوامل الممرضة (Beaman and Beaman 1990, Franzon, Welch, Sword *et al.*, 1979, Arondel *et al.* 1990, Brehm, Haas *et al.*, 1992, Heinzen, Frazier *et al.* 1992)، إضافةً إلى دورها في تحريض استجابة مناعية مرتفعة موجهة ضد كل من *Phytomonas* (Marín, Rodríguez- González *et al.*, 2006)، *Trypanosoma cruzi* (Mateo, Sanchez-Moreno *et al.* 2010) *L. Donovan* (Danesh-Bahreini, Shokri *et al.*, 2011).

إحدى أهم الوظائف الحيوية لأنزيم Fe-SOD هي حماية الأحياء الدقيقة من عوامل الأكسدة، حيث أظهرت دراسة أن إعادة إدخال البروتين Fe-SOD إلى سلالة من *E. coli* طافرة (حذفت من جينومها المورثة SOD ففقدت قدرتها على مقاومة الجذور الحرة) أعادت قدرة هذه السلالة على مقاومة العوامل المولدة للجذور الحرة (Paramchuk, Ismail *et al.*, 1997). يسهم هذا الأنزيم أيضاً في حماية طفيليات اللشمانيا من القتل بالأكسدة داخل البالعات الكبيرة، إذ يؤدي خفض التعبير عنه down regulation باستعمال إحدى تقانات الإسكات المورثي gene silencing إلى انخفاض قدرة الأشكال داخلية السوط على حماية نفسها من عوامل الأكسدة داخل البالعات (Ghosh, Goswami *et al.*, 2003).

ونظراً للأهمية التي بينتها الدراسات المرجعية للأدوار التي يؤديها بروتين فوق أوكسيد ديسموتاز كأحد بروتينات الفوعة ولقدرته على تحريض استجابة مناعية مفيدة لدى حيوانات التجربة ونظراً لعدم وجود أي دراسة عن هذا البروتين أو المورثة المرمزة له في النوع *L. tropica* الذي بات العامل المسبب الرئيس للداء الجلدي في

سوريا، تهدف هذه الدراسة إلى تحري وجود المورثة *sodB1* في جينوم الليشمانيا المدارية *L. tropica* ومن ثم عزلها وتنسيتها ضمن حامل التعبير *pCI* الذي يعمل في الخلايا حقيقية النوى بهدف تحضير مادة أساسية للقاح تجريبي ضد الليشمانيا الجلدية المدارية المنتشرة في سوريا.

المواد والطرائق:

أولاً: السلالات والبلازميدات:

أستعملت من أجل تنسيل مورثة *sodB1* جراثيم *Escherichia coli* TOP10 كسلسلة مضيئة، وأستعمل بلازميد التعبير المورثي *pCI* (Promega®). من أهم الصفات التي يمتاز بها امتلاكه لمُحَضِّض *CMV* الذي يعمل في خلايا الثدييات، ومورثة مُقاومة للأمبسيلين لانتقاء المُستعمرات الإيجابية الحاوية على البلازميد المأشوب. تم حضن نواتج التحول الجرثومي في حاضنة درجة حرارتها 37 م وذلك باستخدام وسط (Luria-Bertani) (LB) (10 g of Tryptone, 5 g of Yeast Extracts, 10 g of NaCl) والمُضَاف له الصاد الحيوي الأمبسيلين Amp بهدف انتقاء المُستعمرات الإيجابية المُحتوية على *pCI-sodB1*.

ثانياً: الحصول على الطفيليات:

عزل الطفيلي من الآفة مباشرة لأشخاص مصابين بالليشمانيا الجلدية ومراجعين لمشفى الأمراض الجلدية بجامعة دمشق بعد التأكد من الإصابة من خلال إجراء الفحص المجهرى المباشر بتلوين لطاخة مرفوعة من مكان الإصابة بملون غيمزا .

ثالثاً: الاستنبات:

استنبتت هذه الطفيليات بعد أخذها مباشرة من الآفات الجلدية على الوسط نصف الصلب N.N.N. والمُضَاف له الصادين الحيويين بنسلين وستريبتومايسين penicillin و streptomycin (Cytogen) بتركيز 100 وحدة / مل، حيث حضنت الزروع عند درجة حرارة 26 مئوية. تمت مراقبة الزروع يومياً بالفحص المجهرى

للتأكد من نمو الأشكال أمامية السوط ومن ثم نقلت الطفيليات بتركيز بدئي 5×10^5 طفيلي/ ميلي لتر من الوسط نصف الصلب إلى وسط زرع سائل RPMI-1640 (Sigma) المدعم بـ 10% من مصّل البقر الجنيني (Sigma) FBS منزوع المتممة. وتمت مراقبة الزرع يومياً بتقييم عددها وأشكالها وحركتها، وذلك بغية الوصول إلى التركيز الأعظمي في طور الاستتباب من أجل استخدامها في التجارب اللاحقة.

رابعاً: استفراد DNA:

استُخلصَ DNA الكلي من 5 ميلي لتر من وسط الزرع السائل لطفيلي الليشمانيا الحاوي على قرابة 30×10^6 طفيلي/ ميلي لتر. ثقل وسط الزرع السائل باستخدام مثقلة مبردة، بسرعة دوران 4000 دورة/ الدقيقة، عند درجة حرارة 4 مئوية، مدة 10 دقائق. أُزيلَ السائل الطافي، وغُسلَ الراسب بدائرة ملحية فوسفاتية PBS للتخلص من بقايا وسط الزرع والمصل. بعد ذلك تم استخلاص DNA باستعمال طقم لاستخلاص DNA الجينومي وتنقيته (Wizard genomic DNA purification kit; Promega). وذلك باتباع الخطوات العامة لاستخلاص المنصوح بها من قبل الشركة المصنعة. تم حساب تركيزه بواسطة مقياس المطيافية الضوئية Genova، وحفظ عند الدرجة -20 مئوية.

خامساً: تحديد نوع طفيلي الليشمانيا بواسطة تفاعل PCR:

استخدمت تقنية PCR لتحديد نوع طفيلي الليشمانيا علماً أن هذا الداء يسببه نوعان من طفيلي الليشمانيا في سوريا هما *L. tropica* و *L. major*، ولذلك تم اختيار شفيع من المرئسات الخاصة بتسلسلات محددة ومحافظة من DNA صانعة السوط kinetoplastid DNA في كلا النوعين تحصر بينها تسلسلاً متغائراً في طوله حسب النوع وهما CSB2xF: `5`CGAGTAGCAGAACTCCCGTTCA3` و CSB1xR: `5`ATTTTTCGCGATTTTCGCGAACG3` (Ray 1989, Yurchenko, Merzlyak et al. 1999). أُجري تفاعل PCR على DNA المستفرد

من العزلة المدروسة بالإضافة إلى DNA المستفرد من سلالة مرجعية من الليشمانيا المدارية *L. tropica* (MHOM/SY/90/LEM2066)، و DNA مستفرد من سلالة مرجعية من الليشمانيا الكبرى *L. major* (MHOM/SY/91/LEM2397)، السلالتين المرجعيتين مأخوذتين من بنك مونبيليه - فرنسا الخاص بالسلالات المرجعية. حُضِر حجم نهائي لتفاعل PCR قدره 25µl يحوي على 0.25µg من DNA template، دائرة خاصة بالأنزيم بتركيز 1X، 1.5mM من MgCl₂، 0.2mM من dNTPs (Promega)، 0.5 µM من كل مرثسة و 1.25U من الأنزيم Go Taq DNA Polymerase (Thermo). تم إجراء تفاعل PCR ضمن الشروط الآتية : 4 دقائق في 94 م° ، 35 دورة (30 ثانية في 94 م°، 30 ثانية في 60 م° ، 30 ثانية في 72 م°) و 7 دقائق في 72 م°. ولتحليل نواتج تفاعل PCR رحلت العينات على هلامه أغاروز بتركيز 2%.

سادساً: تنسيل مورثة *sodB1* :

1- تضخيم المورثة *sodB1* من DNA الجينومي بواسطة تفاعل PCR: أجري تفاعل PCR بهدف عزل مورثة *sodB1* من DNA الجينومي باستخدام المرثسات النوعية SODB1-F:

'5'ATATCTCGAGGGATCCATGGCGTTCGCTGTTTCAGCC3' و SODB1-R:

'5'ATATTCTAGAAGCTTACTAAAGCTGGCTAGAGGCGA3' تم

تصميم المرثسات بالاعتماد على التسلسل النكليوتيدي لمورثة *sodB1* لليشمانيا الكبرى *L. major* المتواجد في البنك الجينومي (Genebank Accession No. XM_001685449) نظراً لعدم وجود التسلسل الكامل لجينوم الليشمانيا المدارية *L. tropica*. وأضيفت مواقع أنزيمات التقيد لطرفي هذه المرثسات بما يسمح بتنسيل الشدفة المضخمة في بلازميد التعبير المورثي لاحقاً، حيث تضم المرثسة الأمامية Forward التسلسل النيكلوتيدي لأنزيم التقيد (XbaI) بينما تضم المرثسة العكسية Reverse التسلسل

النيكلوتيدي لأنزيم التقييد (XhoI)، تم اصطناع المرئسات المختلفة من قبل شركة High-Fidelity (Thermo) الكندية. وتم استخدام أنزيم البلمرة (PFU Polymerase) عالي الوثوقية لتجنب الأخطاء في تسلسل النكليوتيدات أثناء تضخيم المورثة.

حضر حجم نهائي لتفاعل PCR قدره 25µl يحوي على 0.25µg من DNA template، دائرة خاصة بالأنزيم بتركيز 1X، 0.2mM من dNTPs (Promega)، 0.5µM من كل مرئسة و1.25U من PFU Polymerase. تم إجراء تفاعل PCR ضمن الشروط الآتية: 4 دقائق في 94 م، 35 دورة (30 ثانية في 94 م، 30 ثانية في 60 م، 30 ثانية في 72 م) و 7 دقائق في 72 م. ولتحليل نواتج تفاعل PCR رُحلت العينات على هلامة أغاروز بتركيز 2%.

2- هضم الجين والبلازميد باستخدام أنزيمات التقييد:

رفعت الشدفة من الهلامة ليتم تنقيتها بواسطة طاقم (GeneJET Gel Extraction Kit Thermo®)، تمت معاملة كلاً من المورثة **sodB1** والبلازميد pCI بأنزيمي التقييد **XhoI** و **XbaI**، يعتمد عمل هذه الأنزيمات على قطع DNA في تسلسلات محددة بحيث تترك نهايات متتامة يمكن استخدامها لاحقاً لربط هذه المورثة بالبلازميد، وذلك كخطوة أولى لعملية التتسيل، حيث استخدم 2µg من المورثة و5µg من البلازميد في كل تفاعل قطع.

3- تفاعل ربط المورثة **sodB1** إلى بلازميد التعبير المورثي pCI:

تمت تنقية ناتج تفاعل القطع بأنزيمات التقييد لكل من مورثة **sodB1** والبلازميدات للتخلص من الشدفة الصغيرة المقطوعة من البلازميدات ومن أطراف الشدفة المدخلة، باستخدام طقم التنقية (MSB spin PCR apace (Invitex) (clean up)، ثم ترحيل ناتج التنقية على هلامة من الأغاروز 1%.

تُربط المورثة والبلازميد المقطوعين بواسطة أنزيم T4 Ligasa بحيث تكون النسبة المولية للمورثة المدخلة إلى البلازميد 3/1، تعمل هذه الأنزيمات على إعادة الربط بتشكيل روابط فوسفاتية ثنائية الإستر .

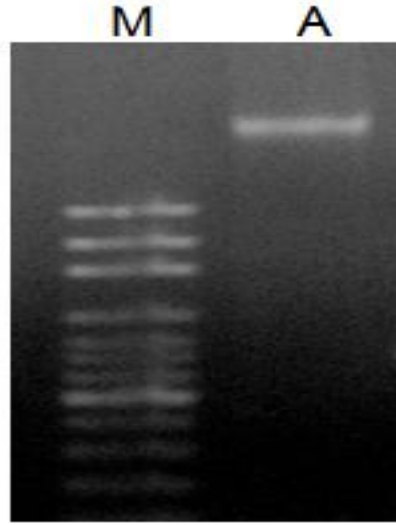
4- التحول الجرثومي:

تم في البداية تهيئة بكتيريا التنسيل *E. coli* top10 لرفع حيويتها وكفاءتها، وأدخل إليها بعد التهيئة البنى البلازميدية الناتجة وذلك بواسطة تقنية التحول الجرثومي الحراري من أجل تكثير نسخ البنى البلازميدي، ثم استُنبتت البكتريا المحورة على أطباق LB-Agare بوجود الأميسيلين، وحُضنت عند الدرجة 37°م. وبعد نمو البكتريا المحورة تم انتقاء عدد من المستعمرات النامية للتأكد من دخول البلازميدات المؤشبة لها بواسطة تفاعل PCR أجري مباشرة على محتوى المستعمرات الجرثومية تفاعل Colony PCR، وزرعت المستعمرات الإيجابية على 2 مل من الوسط السائل LB بوجود الأميسيلين وحُضنت المستنبت عند الدرجة 37°م مدة 16 ساعة. ثم عزلت البنى البلازميدية باستخدام طاقم Miniprep (Fermentas) واتبعت طريقة العمل المنصوح بها من الشركة المصنعة.

ويهدف التأكد من نجاح عملية التنسيل تمت معاملة كل من البلازميد المؤشب المعزول pCI-sodB1 والبلازميد pCI بأنزيمي التقيد XhoI و XbaI ومن ثم أجري رحلان كهربائي تحليلي لنتائج القطع على هلامة من الأغاروز.

النتائج:**أولاً: استفراد DNA الكلي:**

جُمعت الطفيليات من وسط الزرع بالنتفيل بسرعة دوران منخفضة، وبعد غسل الرسابة بدارئة PBS للتخلص من بقايا وسط الزرع والمصل، استخلص DNA من الرسابة الطفيلية كما هو مذكور في الطرائق. تم التأكد من جودة DNA المستفرد من العينات المختلفة بالرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة أغاروز بتركيز 0.8%. بتعريض الهلامة لمنبع للأشعة فوق البنفسجية تبين وجود عصابة واحدة تمثل DNA الجينومي (الشكل 1)، مما يشير إلى عدم تدركه أثناء التحضير.

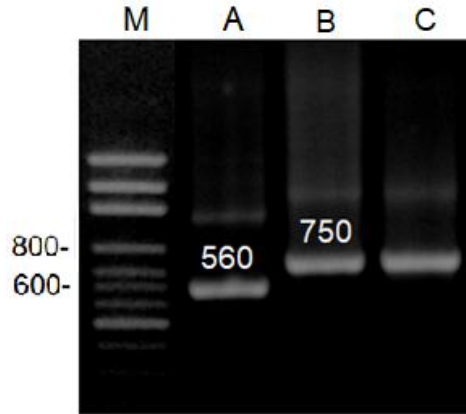


الشكل (1): الرحلان الكهربائي لـ DNA المستخلص من سلالة الليشمانيا المدروسة
العمود M: واسمات أطوال معيارية DNA Ladder، العمود A: DNA المستفرد من عينة
الليشمانيا المدروسة، تشير العصابات في العمود A لـ DNA الجينومي جيد التحضير

ثانياً: تحديد نوع طفيلي الليشمانيا بواسطة تفاعل PCR:

استخدمت تقنية PCR لتحديد نوع الطفيلي المسبب لداء الليشمانيا الجلدي. وبتضخيم DNA باستخدام المرئستين (CSB1XR/CSB2XF)، نحصل على شذفة بطول 560 bp في النوع *L. major* وشذفة بطول 750 bp في النوع *L. tropica*. أُجري في هذه الدراسة تفاعل PCR على DNA المستفرد من العزلة المدروسة بالإضافة إلى DNA المستفرد من سلالة مرجعية من النوع *L. tropica* و DNA مستفرد من سلالة مرجعية من النوع *L. major*.

أظهرت السلالة المدروسة بعد عملية الرحلان الكهربائي على الهلام عصابة بطول 560 bp، وبمقارنة طول هذه الشذفة مع أطوال الشذفة المميزة للسلالات المرجعية (الشكل 2)، نستنتج أن السلالة المُنمَّطة تنتمي لنوع الليشمانيا المدارية *L. tropica*.



الشكل (2): تنميط السلالة المدروسة باستخدام تفاعل PCR

العمود M: واسمات أطوال معيارية DNA Ladder، العمود A: السلالة المرجعية *L. major*

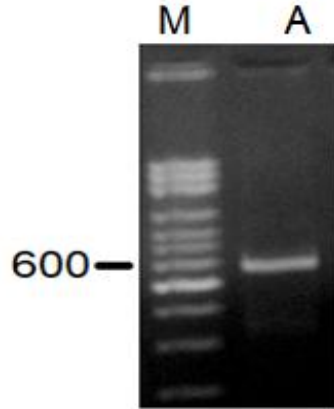
التي تمتاز بعصابة بطول 560bp العمود B

السلالة المرجعية *L. tropica* التي تمتاز بعصابة بطول 750bp، العمود C: ناتج تنميط للسلالة المدروسة ومن الملاحظ وجود عصابة بطول 750bp وبمقارنة مع العصابات المرجعية نستنتج أن

السلالة المنمطة تنتمي لنوع *L. tropica*.

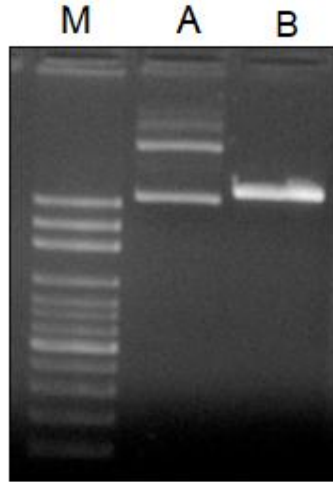
ثالثاً: تنسيق المورثة *sodb1*:

تم تضخيم المورثة *sodb1* بواسطة تقنية PCR ابتداءً من DNA الجينومي لليشمانيا بسبب خلو المورثة من الاثرونات وذلك باستخدام مرئسات نوعية تحتوي على مواقع لأنزيمات تقييد ومُصممة بالاعتماد على التسلسل النكاويدي للمورثة *sodb1* لليشمانيا الكبرى *L. major* كما ذكر في الطرائق، رحل 5µl من ناتج تفاعل PCR على هلامة أغاروز 1 % (الشكل 3). وتبين عند ترهل ناتج التضخيم على هلامة من الأغاروز وجود عصابة من DNA بطول يقارب 588 bp وهو الطول المتوقع للمورثة مضافاً له طول أجزاء المرئسات الحاوية على مواقع أنزيمات التقييد. مما يدل على نجاح عملية تضخيم مورثة *sodb1* للنوع *L. tropica*. بعد تضخيم المورثة *sodb1* تم هضم المورثة والبلازميد pCI بأنزيمي التقييد XhoI وXbaI، ثم تمت تنقية المورثة والبلازميدات المقطوعة بحسب الطرائق الموضحة أعلاه، ومن ثم رُحلت النواتج على هلامة الأغاروز (الشكل 4)، في خطوة لاحقة تمت عملية الربط باستخدام أنزيم الربط T4 Ligase حيث حصلنا على البنية البلازميدية pCI-sodb1.



الشكل (3): الرحلان الكهربائي لناتج تضخيم المورثة *sodb1*

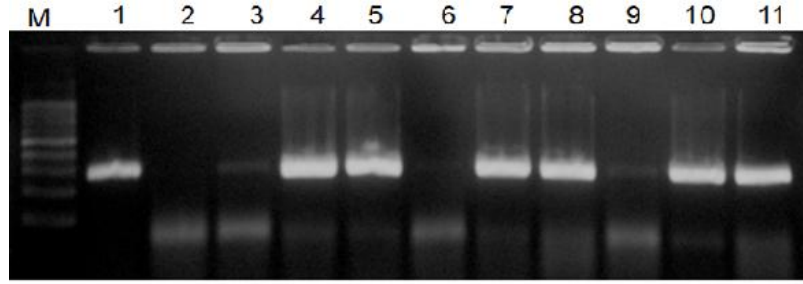
العمود M واسم الأطوال المعيارية، العمود A ناتج تضخيم المورثة *sodb1* ومن الملاحظ ظهور عصابة بطول 588 bp تقريباً.



الشكل (4): هضم البلازميد pCI بأنزيمي التقطيع XbaI و XhoI
العمود M: واسمات أطوال معيارية DNA Ladder، العمود A: البلازميد pCI قبل الهضم،
العمود B: البلازميد pCI بعد الهضم بأنزيمي التقطيع XbaI و XhoI

رابعاً: التحوير البكتيري وانتقاء المستعمرات المحورة:

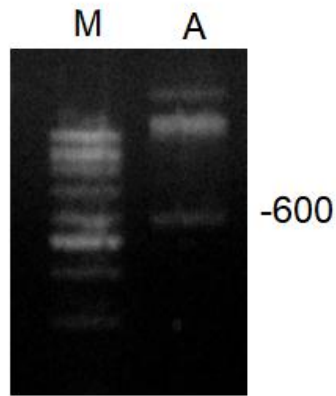
حُوت بكتريا *E. coli* TOP 10 بإدخال البنية البلازميدية إليها وُزعت على أوساط مناسبة بوجود الامبيسلين، والذي يسمح بنمو المستعمرات الحاوية على البنية البلازميدية فقط نظراً لامتلاكها صفة المقاومة لهذا الصاد، وللتأكد من نجاح عملية التحوير تم انتقاء 11 مُستعمرة جرثومية وطبق تفاعل PCR على المستعمرات (colony PCR) لانتقاء المستعمرات الحاوية على البنية البلازميدية pCI-sodB1، وعند ترحيل ناتج هذا التفاعل تبين وجود عدة مستعمرات أظهرت عصابة بطول 588 bp وتمثل طول المورثة sodB1 مما يؤكد نجاح عملية التحوير البكتيري بالبلازميد pCI-sodB1 ووجود البنية البلازميدية المؤشبة فيها (الشكل 5).



الشكل (5): انتقاء المستعمرات البكتيرية المحورة بالبنية البلازميدية **pCI-sodb1** العمود M: واسم الأطوال المعيارية، الأعمدة 1،4،5،7،8،10،11: المستعمرات الحاوية على البنية البلازميدية **pCI-sodb1** (عصابة بطول 588bp)، الأعمدة 2،3،6،7: المستعمرات السلبية الحاوية على **pCI** فقط.

خامساً: عزل DNA البلازميدي والتأكد من دخول المورثة بتفاعلات الهضم بأنزيمات التقيد:

استخلصت البنى البلازميدية المؤشبة من المستعمرات الإيجابية المنماة على الوسط السائل LB المضاف له أمبيسيلين بطريقة التحضير البلازميدي Miniprep، ثم تم هضم البنية البلازميدية المعزولة الحاوية على المورثة **pCI-sodb1** بأنزيمي التقيد **XbaI** و **XhoI**، ورُحِّلَ ناتج الهضم على هلامة الأغاروز 1.5% بهدف التحقق من البنية البلازميدية **pCI-sodb1** كما يظهره (الشكل 6). نلاحظ على الهلامة أن معاملة البنية البلازميدية **pCI-sodb1** بالأنزيمين تعطي عصابتين بطولين مختلفين هما البلازميد **pCI** بطول 3983 bp والمورثة **sodb1** بطول 588 bp.



الشكل(6): هضم البنية البلازميدية المعزولة الحاوية على المورثة pCI-sodb1
العمود M: واسمات أطوال معيارية DNA Ladder، العمود A: ناتج هضم البنية البلازميدية
المعزولة الحاوية على المورثة pCI-sodb1 بأنزيمي التقيد XbaI و XhoI

المناقشة:

تم في هذا البحث عزل واستنبات وتمييز سلالة من طفيلي الليشمانيا المسبب للداء الجلدي من أحد المرضى المراجعين لمشفى الأمراض الجلدية بدمشق، وتبين نتيجة لتتميز هذه السلالة باستخدام تقانة PCR وبالمقارنة مع سلالة مرجعية أن الطفيلي ينتمي لنوع الليشمانيا المدارية. ومن ثمّ تمّ عزل المورثة **sodb1** المرمزة لبروتين Fe-SODB1 من الليشمانيا المدارية لأول مرة وتسهيلها ضمن بلازميد التعبير المورثي pCI بهدف تطوير لقاح مورثي قادر على تحريض استجابة مناعية واقية من الإصابة بالليشمانيا الجلدية المدارية المنتشرة في سوريا.

بينت دراسة أجريت على الليشمانيا من النوع *L. donovani* والنوع *L. chagasi* وجود مورثتين **sodb1** و**sodb2** ترمزان لأنزيم Fe-SOD لدى الليشمانيا، ويختلف التعبير عن هاتين المورثتين خلال دورة حياة الطفيلي، إذ يزداد التعبير عن المورثة **sodb1** في الطورين داخلي السوط وأمامي السوط المخمج، بينما يزداد التعبير عن المورثة **sodb2** في الطور أمامي السوط غير المخمج، كما بينت هذه الدراسة أن نسبة التشابه بين الأنواع *L. donovani*، *L. chagasi*، *L. major* لكل من هاتين المورثتين أكثر من 90% وذلك لأهمية الأنزيم Fe-SOD في حماية الطفيلي من عوامل الأكسدة (Plewes, Barr et al., 2003).

أشارت أبحاث سابقة إلى قدرة بروتين SOD المنقى من خلاصة طفيلي الليشمانيا على تحريض استجابة مناعية لدى العوائل المختلفة، حيث بينت نتائج تلك الأبحاث وجود أضداد موجهة ضد هذا البروتين في مصل كلاب مصابة بالليشمانيا من النوع *L. infantum*، وفي مصل أشخاص مصابين بالليشمانيا من النوع *L. peruviana*، *L. amazonensis*، *L. braziliensis*، مما يجعل هذا البروتين مرشحاً لاستخدامه في تشخيص الإصابة بالليشمانيا عند الكلاب وعند البشر (

Marín, Longoni et al., 2009; Marín, Longoni et al., 2007).

كما بينت الدراسات المناعية التي اهتمت بالدور الوقائي لبروتين SODB1 من الإصابة بالليشمانيا وجود نتائج مشجعة. إذ أدى حقن الفئران BALB/c بالبروتين rSODB1 المأشوب وبوجود المواد المساعدة إلى تحريض استجابة مناعية خلوية الوساطة من النمط Th1 المرتبطة مع زيادة مستوى الأنترفيرون غاما $\text{IFN-}\gamma$ مقارنة مع مستوى IL-10 إضافة إلى زيادة مستوى IGg2a مقارنة بمستوى IGg1 (Daifalla, Bayih *et al.*, 2011). كما أن حقن هذا المستضد محملاً على جزيئات نانوية من الكيتوزان أدى أيضاً إلى زيادة مستوى IGg2a (Danesh-Bahreini, Shokri *et al.*, 2011). كما أظهرت دراسة حديثة قدرة البروتين المأشوب rSODB1 المحضر من الليشمانيا دونوفانية على توليد استجابة مناعية مرتفعة مرتبطة مع حماية جزئية عند الفئران BALB/c وذلك عند تحديها بطفيلي *L. major* (Daifalla, Bayih *et al.*, 2012). إضافة إلى ذلك تمت دراسة الاستجابة المناعية الناتجة عن تمنيع حيوانات التجربة باللقاحات المورثية المحضرة من بروتين SOD، فقد تبين أن اللقاح المورثي الذي تم تحضيره من SOD من *Schistosoma mansoni* داخل الحامل pC DNA حمى الفئران C57BL/6 من التحدي (Shalaby, Yin *et al.*, 2003)، وأيضاً فئران BALB حمايتها من التحدي بـ *Brucella abortus* من خلال التمنيع داخل الطحال بلقاح pC DNA SOD حيث أدى إلى تحريض استجابة مناعية خلوية من النمط الأول Th1 (Muñoz-Montesino, Andrews *et al.*, 2004)، وأثبتت دراسة أخرى أن اللقاح المورثي pVAX1-SOD أدى إلى حماية الفئران حماية جزئية عند تحديها بالليشمانيا الأمازونية وارتبطت هذه الحماية مع استجابة مناعية مختلطة تم توصيفها من خلال إنتاج $\text{IFN-}\gamma$ و IL-4 (Campos, Silva *et al.*, 2015).

المراجع:

1. Antinori S., L. Schifanella and M. Corbellino (2012). "Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease." European journal of clinical microbiology & infectious diseases **31**(2): 109- 118.
2. Bannister J. V., W. H. Bannister and G. Rotilio (1987). "Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **22**(2): 111-180.
3. Beaman L. and B. L. Beaman (1990). "Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutase contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host." Infection and immunity **58**(9): 3122-3128.
4. Beyer W., J. Imlay and I. Fridovich (1991). "Superoxide Dismutases." **40**: 221-253.
5. Boucher I. W., A. M. Brzozowski, J. A. Brannigan, C. Schnick, D. J. Smith, S. A. Kyes and A. J. Wilkinson (2006). "The crystal structure of superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*." BMC structural biology **6**(1): 20.
6. Brehm K., A. Haas, W. Goebel and J. Kreft (1992). "A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*." Gene **118**(1): 121-125.
7. Campos B. L., T. N. Silva, S. P. Ribeiro, K. I. Carvalho, E. G. Kallas, M. D. Laurenti and L. F. Passero (2015). "Analysis of iron superoxide dismutase-encoding DNA vaccine on the evolution of the *Leishmania amazonensis* experimental infection." Parasite Immunol **37**(8): 407-416.
8. Daifalla N. S., A. G. Bayih and L. Gedamu (2011). "Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in BALB/c mice: the contribution of Toll-like receptor agonists as adjuvant." Exp Parasitol **129**(3): 292-298.
9. Daifalla N. S., A. G. Bayih and L. Gedamu (2012). "Leishmania donovani recombinant iron superoxide dismutase B1 protein in the presence of TLR-based adjuvants induces

- partial protection of BALB/c mice against *Leishmania major* infection." Exp Parasitol **131**(3): 317-324.
10. Danesh-Bahreini M. A., J. Shokri, A. Samiei, E. Kamali-Sarvestani, M. Barzegar-Jalali and S. Mohammadi-Samani (2011). "Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing *Leishmania* superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice." Int J Nanomedicine **6**: 835-842.
 11. David C. V. and N. Craft (2009). "Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Dermatologic therapy **22**(6): 491-502.
 12. Dumonteil E., R.-S. M. Jesus, E.-O. Javier and G. a.-M. M. del Rosario (2003). "DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*." Vaccine **21**(17): 2161-2168.
 13. Encke J., J. zu Putlitz and J. R. Wands (1999). "DNA vaccines." Intervirology **42**(2-3): 117-124.
 14. Franzon V., J. Arondel and P. Sansonetti (1990). "Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneri* pathogenesis." Infection and Immunity **58**(2): 529-535.
 15. Ghosh S., S. Goswami and S. Adhya (2003). "Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage." Biochem. J **369**: 447-452.
 16. Handman E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." Clinical microbiology reviews **14**(2): 229-243.
 17. Heinzen R., M. Frazier and L. Mallavia (1992). "Coxiella burnetii superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*." Infection and immunity **60**(9): 3814-3823.
 18. Marin C., S. S. Longoni, H. Mateo, J. A. de Diego, J. M. Alunda, G. Minaya and M. Sanchez-Moreno (2007). "The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* naturally infected dogs." Parasitol Res **101**(3): 801-808.

19. Marín C., S. S. Longoni, J. Urbano, G. Minaya, H. Mateo, A. Jose, M. J. Rosales, G. Pérez-Cordón, D. Romero and M. Sánchez-Moreno (2009). "Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Superoxide Dismutase-Excreted Antigen in Diagnosis of Sylvatic and Andean Cutaneous Leishmaniasis of Peru." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **80**(1): 55-60.
20. Marín C., I. Rodríguez-González and M. Sánchez-Moreno (2006). "Identification of excreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of Phytomonas." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**(6): 649-654.
21. Mateo H., M. Sanchez-Moreno and C. Marin (2010). "Enzyme-linked immunosorbent assay with purified Trypanosoma cruzi excreted superoxide dismutase." *Clin Biochem* **43**(15): 1257-1264.
22. Méndez S., Y. Belkaid, R. A. Seder and D. Sacks (2002). "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis." *Vaccine* **20**(31): 3702-3708.
23. Muñoz-Montesino C., E. Andrews, R. Rivers, A. González-Smith, G. Moraga-Cid, H. Folch, S. Céspedes and A. A. Oñate (2004). "Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of Brucella abortus induces SOD-specific CD4+ and CD8+ T cells." *Infection and immunity* **72**(4): 2081-2087.
24. Murray H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." *The Lancet* **366**(9496): 1561-1577.
25. Nagill R. and S. Kaur (2011). "Vaccine candidates for leishmaniasis: a review." *International immunopharmacology* **11**(10): 1464-1488.
26. Palatnik-de-Sousa C. B. (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years." *Vaccine* **26**(14): 1709-1724.
27. Paramchuk W. J., S. O. Ismail, A. Bhatia and L. Gedamu (1997). "Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from Leishmania chagasi:

- role in pathogenesis." Molecular and biochemical parasitology **90**(1): 203-221.
28. Plewes K. A., S. D. Barr and L. Gedamu (2003). "Iron Superoxide Dismutases Targeted to the Glycosomes of *Leishmania chagasi* Are Important for Survival." Infection and immunity **71**(10): 5910–5920.
29. Ray, D. S. (1989). "Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes." Molecular and Cellular Biology **9**(3): 1365-1367.
30. Shalaby K. A., L. Yin, A. Thakur, L. Christen, E. G. Niles and P. T. LoVerde (2003). "Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes." Vaccine **22**(1): 130-136.
31. Sharma U. and S. Singh (2009). "Immunobiology of leishmaniasis." Indian journal of experimental biology **47**(6): 412.
32. Welch D., C. Sword, S. Brehm and D. Dusanic (1979). "Relationship between superoxide dismutase and pathogenic mechanisms of *Listeria monocytogenes*." Infection and immunity **23**(3): 863-872.
33. WHO (2014). Leishmaniasis: strengthening cross-border collaboration for control in central Asian and middle-eastern countries of the WHO European and Eastern Mediterranean Regions.
34. WHO (2015). "Leishmaniasis."
35. Yurchenko V., E. Merzlyak, A. Kolesnikov, L. Martinkina and Y. Vengerov (1999). "Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes." Journal of clinical microbiology **37**(5): 1656-1657.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2018/07/04 .
تاريخ قبوله للنشر 2018/08/27 .