ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۲۵۸- ۲۵۱

بررسی بیان pcDNA3.1(+)/ESAT-6 در سلول‌های میوبلاست موش BALB/c بر علیه سل گاوی

Evaluation of the expression pcDNA3.1(+)/ESAT-6 by myoblast cells of BALB/c mice against Bovine Tuberculosis

اعظم ترابی*[۱]، مجتبی طهمورث‌پور[۱]، فاطمه واحدی[۲]، نادر مصوری[۳]، محمدرضا نصیری[۱]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استادان، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۲- استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد
۳- استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج

Torabi A*[1] , Tahmoorespur M[1], Vahedi F[2], Mosavari N[3], Nassiri MR[1]

1. PhD graduate Student, Professors, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2. Assistant professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad
3. Assistant Professor, Department of PPD and Tuberculin production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Azadehtorabi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۱- تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

بیماری سل گاوی یکی از مهم‌ترین بیماریهای مشترک بین انسان و دام است. این بیماری به لحاظ شیوع و زیان اقتصادی همواره مورد توجه محققین مختلف بوده است. علیرغم تلاش‌های بسیار جهت تهیه واکسن موثر علیه این بیماری، هنوز مطالعات گسترده در این زمینه ادامه دارد. از آنجا که واکسیناسیون BCG در گاو مصونیت متغیری ایجاد کرده و مطلوبیت کافی نداشته، لذا ایمن سازی با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های محافظت کننده، راهکاری امید بخش برای ساخت واکسن به شمار می‌آید. مایکوباکتریوم بویس (*M. bovis*) پاتوژن مهم بیماری سل گاوی است و آنتی‌ژن ESAT-6 می‌تواند به عنوان ایمونوژن حفاظتی و نیز کاندید مناسب برای DNA واکسن محسوب شود. از این‌رو، انجام این مطالعه با هدف کلونینگ و تایید بیان پروتئین نوترکیب به عنوان کاندیدای ایمنی‌زایی در سلول های میوبلاست موش BALB/c مورد بررسی قرار گرفت. آنتی‌ژن ESAT-6 در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(+) کلون شد. صحت پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6، با روش کلونی PCR، نقشه‌یابی آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6 به سلول‌های میوبلاست موش تزریق و پس از یک هفته از بافت ماهیچه نمونه‌گیری شد. نتایج تجزیه وسترن بلات، بیان پروتئین نوترکیب ESAT-6 را در سلول‌های میوبلاست تایید کرد. پیش‌بینی ساختاری نشان داد که پروتئین نوترکیب از شاخص آنتی‌ژنیسیتی و هیدروفوبیسیتی برخوردار است. نتایج آزمایش نشان داد که بیان پروتئین rESAT-6 در سلول های میوبلاست موش تاییدی بر عملکرد پلاسمید نوترکیب در سلول‌های میوبلاست موش است و پلاسمید نوترکیبpcDNA3.1(+)/ESAT-6 پتانسیل استفاده در بررسی ایمنی‌زایی و تشخیص را در تحقیقات دارد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌ژن ESAT-6
سل گاوی
سلول‌های میوبلاست
مایکوباکتریوم بویس
DNA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]

مقدمه

بیماری سل گاوی[1] توسط پاتوژن مایکوباکتریوم بویس[2] (*M. bovis*) ایجاد می‌شود که طیف وسیعی از میزبان‌ها را به خود اختصاص داده است (Pollock and Neill 2002). ابتلا به این بیماری مرگ زودرس گاو و خسارت شدید اقتصادی را به دنبال دارد؛ به طوری‌که سالانه با آلوده شدن بیش از ۵۰ میلیون راس گاو خسارت اقتصادی گسترده‌ای بالغ بر سه میلیارد دلار به بخش دامپروری وارد می‌شود (Buddle et al. 2006). همچنین این بیماری تهدیدی جدی برای بهداشت عمومی در کشورهای در حال توسعه است و از جمله زئونوزهای قابل توجه در فهرست بیماری‌های OIE[3] در سال 2013 میلادی بوده است (WHO 2012; OIE 2013).

در بیماری سل گاوی هر یک از روش‌های درمانی و تشخیصی رایج دارای معایبی هستند (Ottenhoff and Kaufmann 2012). در حال حاضر BCG[4] سویه تخفیف حدت یافته *M. bovis*، تنها واکسن موجود علیه این بیماری است که مصونیت متغیری از صفر تا ۸۵ درصد ایجاد کرده و مطلوبیت کافی را نداشته است (Xu et al. 2007; Okada et al. 2011). لذا، توسعه واکسن‌های جدید با کارآیی مطلوب در برابر عفونت *M. bovis* ضروری است. از اینرو، اولویت تحقیقات جهانی معرفی راهکارهای جدید و موثر بر علیه این بیماری است. از جمله استراتژی‌های جدید، DNA واکسن‌های بیان کننده آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریومی است (Souza et al. 2008 ; Tullius et al. 2008; Chen et al. 2010). مقایسه ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم لپره[5] با سویه واکسن مایکوباکتریوم بویس BCG و مایکوباکتریوم میکروتی[6] نشان داده یک ناحیه ژنی که اصطلاحاً RD1[7] نامیده می‌شود در ژنوم ارگانیسم‌های کم حدت حذف شده است. RD1، شامل ۹ ژن از *RV 3871* تا *RV3879c* است که در بیماری‌زایی مایکوباکتریومی نقش بسیار مهمی دارد (Mahairas et al. 1996). علاوه بر این، یک ناحیه حذفی در مایکوباکتریوم میکروتی در مقایسه با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد که شامل ۱۳ ژن رمزگردان (ORFs) از *RV3864* تا *RV3876* است، که اشتراک بین ناحیه RD1 و ناحیه حذفی *M. micorti* شامل ژن‌های (*RV3875*) *ESAT-6* و (*RV3874*) *CFP-10* می‌باشد (Buddle et al. 2002; Gao et al. 2004; Xu et al. 2008). این ایمونوژن‌ها پروتئین‌های آنتی‌ژنی قدرتمندی در ابتدای دوره عفونت *M. bovis* تولید می‌کنند که توسط سلول‌های T شناسایی شده و آزادسازی اینترفرون گاما[8] را به دنبال دارند. پروتئین ESAT-6 با وزن مولکولی ۶ کیلو دالتون یکی از پروتئین‌های هدف در عفونت *M. bovis* است (Waters et al. 2006 ; Ahmad and Sadhna 2013). ایمن‌سازی با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های محافظت کننده، راهکاری امید بخش برای ساخت واکسن‌های مبتنی بر DNA به شمار می‌آید (Hoft 2008). با این حال، یکی از موانع عمده در توسعه این نوع از واکسن‌ها، تخریب سریع DNA خارجی در سلول میزبان است (Hung et al. 2002). در استراتژی واکسن‌های مبتنی بر DNA، انتقال DNA پلاسمیدی به سلول‌های سوماتیک و سپس بیان پلاسمید نوترکیب در سلول میزبان از اهمیت بسیار ویژه‌ای برخوردار است (Perkins et al. 2005). لذا، یکی از مراحل کلیدی در طراحی روش‌های اختصاصی جهت تشخیص و درمان، اطمینان از بیان آنتی‌ژن است (Pollock et al. 2001). به منظور اطمینان از توان سلول‌های میوبلاست موش BALB/c در بیان پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6 تحقیق حاضر انجام شد که به علت تشابه عملکرد از موش BALB/c به عنوان مدل استفاده شد از طرفی با توجه به اهمیت این آنتی‌ژن، کلونینگ، ایمنی‌زایی و تایید بیان پروتئین rESAT-6 در سلول‌های میوبلاست موش BALB/c و همچنین پیش‌بینی ساختاری آنتی‌ژنیسیتی و هیدروفوبیسیتی آن انجام شد.

[1] Bovine tuberculosis (BTB)
[2] *Mycobacterium bovis (M.bovis)*
[3] International Office of Epizootics (still known by its French acronym Office International des Epizooties)
[4] Bacille Calmette-Guérin (BCG)
[5] *Mycobacterium leprae*
[6] *Mycobacterium microti*
[7] Region of difference 1 (RD1)
[8] IFN-γ

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرهای اختصاصی کلونینگ ژن *ESAT-6* و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

DNA استخراج شده‌ی باکتری *M. bovis* سویه AN5 از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تهیه شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از طیف سنجی و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. آغازگرهای اختصاصی کلونینگ ژن *ESAT-6* توسط نرم‌افزارهای BioEdite و Primer Premier V.5 به گونه‌ای طراحی شد که دارای کدون آغاز و پایان باشند (جدول۱). جایگاه برش آنزیم *Hind*III (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) در آغازگر بالادست ژن و جایگاه برش آنزیم *Xho*I (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) در آغازگر پایین دست قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک آنزیم *pfu* (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) با غلظت واکنش استاندارد انجام شد. به این منظور در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر، بافر با غلظت 1X، سولفات منیزیوم ۱/۵ میلی‌مولار، dNTP ۰/۲ میلی‌مولار، آغازگرها ۰/۵ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم و یک میکرولیتر نمونه و تا حجم ۲۵ میکرولیتر آب استفاده شد.

کلونینگ ژن *ESAT-6* در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(+) در این مطالعه از وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(+) (شرکت Novagen، آمریکا) استفاده شد. برای ساخت وکتور حاوی ژن *ESAT-6*، محصول PCR و پلاسمید pcDNA3.1(+) با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده *Hind*III و *Xho*I هضم آنزیمی شد. سپس محصول PCR و پلاسمید pcDNA3.1(+) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری و قطعات مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل AccuPrep ™ (شرکت Bioneer، کره) تخلیص شدند.

عمل اتصال[1] با استفاده از کیت T4 لیگاز (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) انجام شد (شکل۱). ترانسفورماسیون با استفاده از کیت TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (شرکت فرمنتاز، لیتوانی) در باکتری *E. coli* سویه TOP10 انجام شد. در تمام مراحل کشت باکتری، از محیط کشت LB استفاده شد و در مواردی که نیاز به آنتی‌بیوتیک بود، آمپی‌سیلین استریل شده با فیلترهای Milipore (۰/۲ میکرون) و با غلظت 100 µg/ml به محیط اضافه شد. به منظور غربالگری و تایید وجود ژن *ESAT-6* در پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6، آزمایشات کلونی PCR و نقشه‌یابی آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I ، *Xba*I ، *Hind*III و *Nar*I انجام شد. همچنین توالی-یابی ژن با استفاده از روش Sanger با دوبار خوانش صورت گرفت. سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج (شرکت Bioneer، کره) به روش Miniperep انجام شد (Sambrook and Russell 2001).

ایمنی‌زایی

موش‌های ماده نژاد BALB/c با سن ۸-۶ هفته و میانگین وزنی ۳۰-۲۵ گرم انتخاب و تحت شرایط یکسان نگهداری شدند. تزریقات با استفاده از سرنگ انسولین و به صورت داخل ماهیچه-ای[2] انجام شد و از بافر نمکی فسفات[3] نیز به عنوان حامل در حجم ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد. گروه اول، گروه کنترل منفی بوده که PBS را دریافت کردند، گروه دوم، گروه کنترل مثبت که پلاسمید pcDNA3.1(+) و گروه سوم پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6 را به عنوان تیمار دریافت کردند. پس از یک هفته موش‌ها با استفاده از کلروفرم بیهوش شدند و نمونه بافت ماهیچه از محل تزریق تهیه شد.

SDS-PSGE

استخراج پروتئین کل با استفاده از کیت ترایزول (محصول شرکت Invitrogen) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس به منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب از روش استاندارد SDS-PAGE استفاده شد. ژل با استفاده از کوماسی بریلیانت بلو رنگ-آمیزی شد (Sambrook and Russell 2001).

تجزیه وسترن بلات

وسترن بلات[4] طبق روش استاندارد شرکت تولید کننده آنتی‌بادی (شرکت abCam) انجام شد. پس از انجام الکتروفورز پروتئین، عمل انتقال پروتئین به غشای نیتروسلولزی با استفاده از سیستم Bio-Rad Miniprotean II بر اساس الکتروترانسفر انجام شد. به طور خلاصه غشا نیتروسلولزی به مدت یک شب در محلول مسدود سازی (شامل پنج درصد شیر خشک بدون چربی

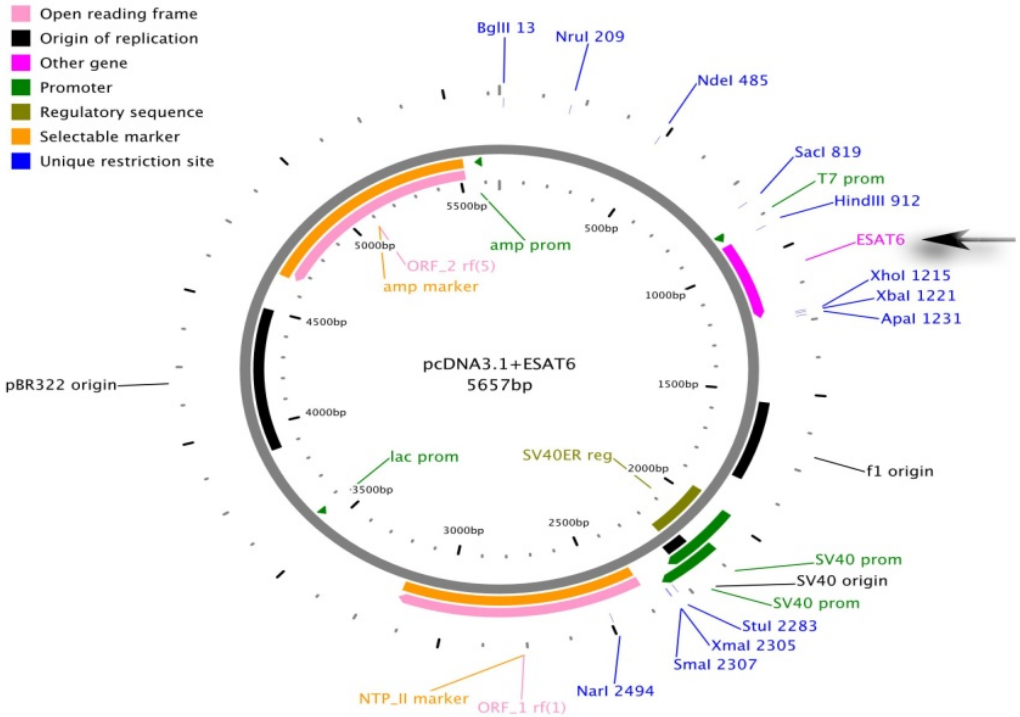
[1] Ligation

[2] Intra muscular (IM)
[3] Phosphate buffered saline (PBS)
[4] Western blotting

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]

جدول۱- توالی آغازگرهای کلونینگ ژن *ESAT-6*. نواحی تیره جایگاه برش آنزیم است.

آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه تکثیری (bp)
F(*Hind* III)	AGC A/AGCTT ATT ATG GGA ACAGAGCAGCAGTGGAA	۲۹۰
R(*Xho* I)	TATGCGAACATCCCAGTGAC TGA GAGCT/C GGT TAA AGC	



شکل۱- نقشه شماتیک پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1+/ESAT-6 و سایت‌های آنزیمی؛ قطعه ژن *ESAT-6* وارد شده به پلاسمید با فلش نشان داده شده است.

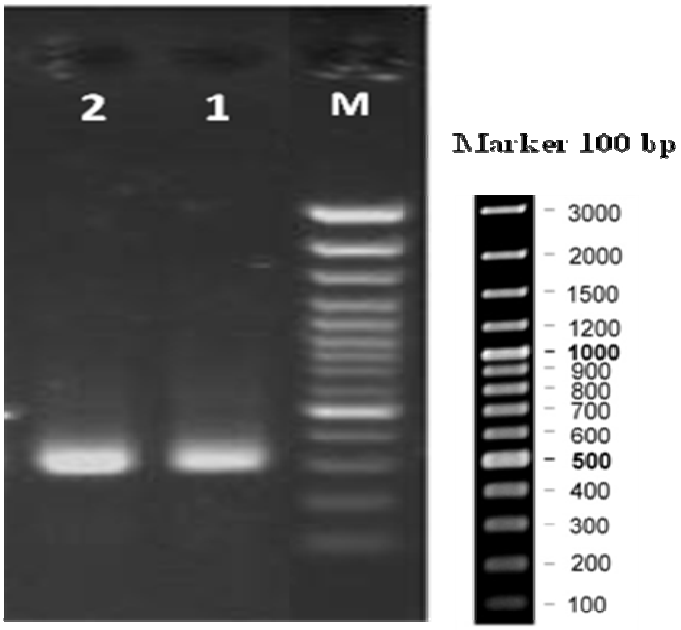
در بافر PBS) در دمای ۴°C قرار گرفت. پس از سه بار شستشو با محلول PBS، غشا به مدت دو ساعت در محلول آنتی‌بادی اولیه (محصول شرکت abCam و با غلظت یک به ۱۰۰۰ در PBS) همراه با تکان دادن در دمای محیط قرار گرفت. پس از سه بار شستشو با محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰، غشا به مدت دو ساعت در محلول آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه با پراکسیداز محصول شرکت abCam و با غلظت یک به ۲۰۰۰ در PBS) با شرایط مرحله قبل قرار گرفت. پس از شستشو و به منظور ظهور باند مورد نظر، غشای نیترو سلولزی در محلول سوبسترا (شامل ۰/۵ میلی‌گرم دی‌آمینوبنزیدین محصول سیگما و آب اکسیژنه ۰/۱ درصد در PBS) قرار گرفت.

پیش‌بینی خواص آنتی‌ژنیسیتی پروتئین ESAT-6 پیش‌بینی ساختاری جهت بررسی خصوصیات آنتی‌ژنیک پروتئین با نرم‌افزار CLC Main Workbench V.۵/5 با استفاده از روش Kolaskar و Tongaonkar انجام شد (Kolaskar and Tongaonkar 1990).

نتایج و بحث

کیفیت و کمیت DNA ژنومی *M. Bovis* سویه AN5 مناسب بود. منحنی بدست آمده از طیف‌سنجی دارای یک پیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و فاقد پیک‌های اضافی بود که خلوص DNA استخراج شده را نشان داد. به منظور تکثیر ژن *ESAT-6* دماهای متفاوت اتصال آغازگر استفاده شد. بهترین دمای مناسب برای اتصال آغازگر به ژن ۵۸°C انتخاب شد (شکل۲).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR. M) نشانگر ۱۰۰ bp plus فرمنتاز؛ ستون ۱ و ۲) تکثیر ژن *ESAT-6*

به منظور تایید پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6 کلون نوترکیب به طور مستقیم برای الگوی واکنش PCR استفاده شد (شکل ۳).

دومین مرحله به منظور قرار گرفتن ژن در پلاسمید نقشه‌یابی آنزیمی بود. آنزیم‌های محدودکننده *Nar* I و *Xba* I قطعاتی به طول ۴۳۸۸ bp و 1275 bp، آنزیم‌های محدودکننده *Nar* I و *Xho* I قطعاتی به طول ۴۳۸۲ bp و ۱۲۸۱ bp و آنزیم‌های محدودکننده *Nar* I و *Hind* III قطعاتی به طول ۴۰۷۹ bp و ۱۵۸۴ bp تولید کردند. بررسی طول قطعات حاصل از هضم تاییدی بر وارد شدن قطعه ژنی به درون پلاسمید بود (شکل ۴).

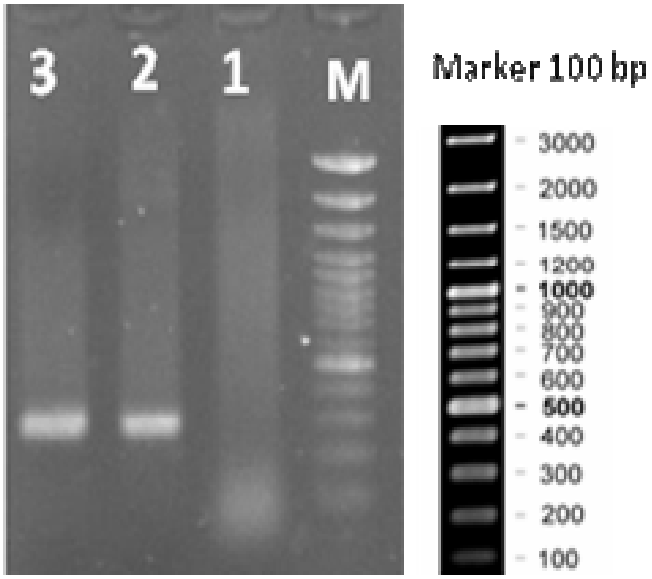
مرحله آخر جهت تایید کلونینگ توالی‌یابی ژن *ESAT-6* بود که صحت ترادف نوکلئوتیدی ژن جدا شده تایید شد.

نواحی آنتی‌ژنیک، الگوی آنتی‌ژنیسیتی و همچنین الگوی هیدروفوبیسیتی بر اساس آنالیز پیش‌بینی ساختاری خصوصیات آنتی‌ژنیک پروتئین انجام شد. سه ناحیه پپتیدی کد شده بر اساس توالی اسید آمینه از شاخص آنتی‌ژنیکی بالایی برخوردار می‌باشند. میانگین آنتی‌ژنیسیتی پروتئین ۰/۹۹۴۵ محاسبه شد (Kolaskar and Tongaonkar 1990).

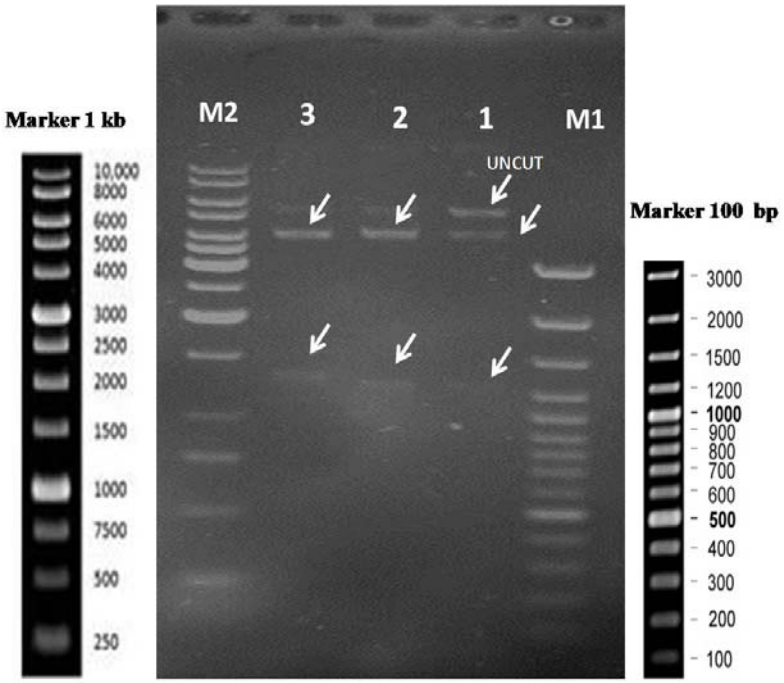
به منظور تایید کارایی پلاسمید نوترکیب ESAT-6 /pcDNA3.1(+)، بیان پروتئین rESAT-6 در سلول‌های میوبلاست موش BALB/c مورد بررسی قرار گرفت. به دنبال SDS-PAGE با انجام وسترن بلات از آنتی‌بادی اختصاصی استفاده شد که ظهور باند مورد نظر، بیان پروتئین هدف در سلول های میوبلاست را تایید کرد (شکل ۵).

مطالعات Waters (2006) و Ravn (1999) نشان دادند آنتی‌ژن ایمنی‌زای ESAT-6 می‌تواند کاندید تشخیص بالقوه بیماری باشد، که بسیار اختصاصی عمل می‌کند. این آنتی‌ژن در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعات ژن *ESAT-6* در وکتور بیان پروکاریوتی pET32a(+) قرار گرفت و بیان پروتئین در باکتری *E.coli* سویه (BL21(DE۳ در حضور و عدم حضور deformylase بررسی شد. نتایج نشان داد فرم N-formylated پروتئین ترشحی ESAT–6 مایکوباکتریومی می‌تواند بهتر مورد شناسایی سلول‌های T قرار گیرد. در مطالعه‌ای که توسط Parthasarathy et al. (2012) انجام گرفت کلون و بیان پروتئین ESAT-6 در *E.coli* انجام شد که نتایج حاکی از سودمند بودن پروتئین نوترکیب در تشخیص BTB است. در مطالعه‌ای دیگر Wang et al. (2005) بیان ژن *ESAT-6* را با برچسب هیستیدینی در وکتور بیان pQE30 و در سویه M15 باکتری *E.coli* بررسی کردند که نتایج نشان داد برای داشتن عملکرد طبیعی پروتئین

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]



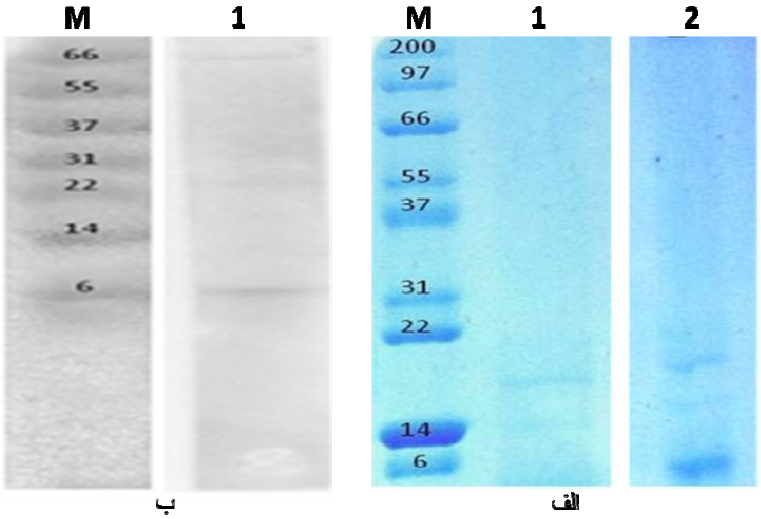
شکل ۳- الکتروفورز تکثیر ژن *ESAT-6* کلون نوترکیب در طی PCR. M) نشانگر ۱۰۰ bp plus فرمنتاز؛ ستون ۱، ۲ و ۳) تکثیر ژن *ESAT-6*. ستون ۱ کلون منفی بوده و تکثیری صورت نگرفت.



شکل۴- تایید کلونینگ ژن *ESAT-6* در پلاسمید pcDNA3.1(+) با کمک نقشه‌یابی آنزیمی. ستون M1) نشانگر ۱۰۰ bp plus فرمنتاز؛ ستون۱) هضم با آنزیم‌های *Nar* I و *Xba* I شامل قطعات ۴۳۸۸ bp و 1275 bp؛ ستون ۲) آنزیم‌های *Nar* I و *Xho* I شامل قطعات ۴۳۸۲ bp و ۱۲۸۱ bp؛ ستون۳) آنزیم‌های *Nar* I و *Hind* III شامل قطعات ۴۰۷۹ bp و ۱۵۸۴ bp؛ ستون M2) نشانگر 1 kb فرمنتاز (باند پلاسمید برش نخورده pcDNA3.1(+) در ستون ۱ قابل مشاهده است).

نوترکیب ESAT-6 روش خالص سازی بسیار حائز اهمیت است. این در حالی است که در استراتژی واکسن‌های مبتنی بر DNA، بیان پلاسمید نوترکیب در سلول میزبان رخ می‌دهد که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Perkins et al. 2005). در مطالعه حاضر ژن *ESAT-6* در وکتور pcDNA3.1(+) تحت کنترل راه‌انداز قدرتمند CMV کلون شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]



شکل ۵- تایید پروتئین نوترکیبESAT-6. الف) SDS-PAGE پروتئین. ستون M) نشانگر؛ ستون۱) کنترل منفی؛ ستون ۲) گروه تیمار. ب) وسترن بلات با آنتی بادی منو کلونال علیه rESAT-6. ستون M) نشانگر ؛ ستون۱) گروه تیمار.

وکتور pcDNA3.1(+) ضمن کارآمدی و سازگاری با ژن کلون شده دارای پایداری و بیان بالا در سلول‌های پستانداران می‌باشد. به منظور تکثیر مطلوب، از سویه TOP10 باکتری *E. coli* استفاده شد (Invitrogen. User Manual ۲۰۱۰). سپس بیان پروتئین rESAT-6 در سلول‌های میوبلاست موش BALB/c بررسی شد. پروتئین ESAT-6 کاندید آنتی‌ژن مناسبی برای روشهای تشخیصی و توسعه واکسن‌های DNA می‌باشد (Xu et al. 2008; Boggaram et al. 2013; Ahmad Mir and Sadhna 2013). بیان پروتئین rESAT-6 در سلول‌های میوبلاست موش تاییدی بر عملکرد پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)/ESAT-6 است که پتانسیل بررسی ایمنی‌زایی و همچنین تشخیص را در تحقیقات آینده دارا می‌باشد. پیشنهاد می‌شود آزمایشات الایزا و دیگر تست‌های تشخیصی درون‌تنی به منظور ارتقا پاسخ ایمنی و توسعه عملکرد ایمنی‌زایی جهت ارزیابی این کاندید DNA واکسن مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

مولفین مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و دانشگاه فردوسی مشهد ابراز می‌دارند.

منابع

Ahmad Mir S, Sadhna S (2013) Cloning, expression and N-terminal formylation of ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Protein Expression and Purification 92: 223-229.

Boggaram V, Gottipati KR, Samten XW (2013) Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species. Journal of Biological Chemistry 288: 25500-25511.

Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW (2002) Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. Vaccine 20:1126-1133.

Buddle BM, Wedlock DN, Denis M (2006) Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. Veterinary Microbiology 112: 191-200.

Chen H, Wang W, Song C, Yu S, Ding C (2010) Marek's disease virus VP22 enhances potentially the immune response of ESAT-6/CFP-10 against Mycobacterium bovis infection. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 42: 337-344.

Gao L, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel J, Brown E (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. Molecular Microbiology 53: 1677-1693.

Hoft DF (2008) Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. Lancent 372: 164-175.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]

(1999) Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Infectious Disease 179: 637-645.
Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual; End r, editor: New York, Cold Spring Harbor Press. 1.116-1.118 p.
Souza PR, Zarate-Blades CR, Hori JI, Ramos SG, Lima DS, Schneider T, Rosada RS, Torre LG, Santana MH, Brandão IT, Masson AP, Coelho-Castelo AA, Bonato VL, Galetti FC, Gonçalves ED, Botte DA, Machado JB, Silva CL (2008) Protective efficacy of different strategies employing Mycobacterium leprae heat-shock protein 65 against tuberculosis. Expert Opinion on Biological Therapy 8: 1255-1264.
Tullius MV, Harth G, Maslesa-Galic S, Dillon BJ, Horwitz. MA (2008) A replication-limited recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against tuberculosis designed for human immunodeficiency virus-positive persons is safer and more efficacious than BCG. Infectious Immunology 76: 5200-5214.
Wang B, Xu Y, Wu C, Xu Y, Wang H (2005) Cloning, expression, and refolding of a secretary protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expression Purification 39: 184-188.
Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Vordermeier HM, Hewinson WR, Greenwald R, Esfandiari R, McNair J, Pollock JM, Andersen P, Lyashchenko PK (2006) early antibody responses to experimental mycobacterium bovis infection of cattle. Clinical and Vaccine Immunology 13: 648-654.
WHO (2012) Global tuberculosis report. Available at: http://wwwwhoint/tb/publications/global_report/en/
Xu J, Xu W, Chen X, Zhao D, Wang Y (2008) Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by *Mycobacterium tuberculosis* and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice. Vaccine 26: 4519-4525.
Xu Y, Zhu B, Wang Q, Chen J, Qie Y, Wang J, Wang H, Wang B, Wang H (2007) Recombinant BCG coexpressing Ag85B, ESAT-6 and mouse-IFN-gamma confers effective protection against *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL/6 mice. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical microbiology 51: 480-487.

Hung CF, He L, Juang J, Lin TJ, Ling M, Wu TC (2002) Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen. Journal of Virology 76: 2676-2682.
Invitrogen (2010) User Manual pcDNA3.1 (+)/(-). Catalog nosV790+20 and V795-20 version K 2010-28-0104.
Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. Federation of European Biochemical Societies Letters 276: 172-174.
Mahairas G, Sabo P, Hickey M, Singh D, Stover C (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. Journal of Bacteriology 178: 1274-1282.
OIE (2013) List of diseases in force in 2013. Available at: http://wwwoieint/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/.
Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Kaneda Y, Saunderson P, Tan EV, McMurray DN (2011) A novel therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using the cynomolgus monkey model and mouse model. Procedia in Vaccinology 4: 42-49.
Ottenhoff THM, Kaufmann SHE (2012) Vaccines against tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? Plos Pathogens 8.
Parthasarathy S, Veerasami M, Appana G, Chandran D, Das D, Alwar Srinivasan V (2012) Use of ESAT-6-CFP-10 fusion protein in the bovine interferon-gamma ELISPOT assay for diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. Journal of Microbiological Methods 90: 298-304.
Pollock JM, Neill SD (2002) *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Veterinary Journal 163: 115-127.
Pollock J, Buddle B, Andersen P (2001) Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. Tuberculosis (Edinb) 81: 65-69
Perkins SD, Flick-Smith HC, Garmory HS, Essex-Lopresti AE, Stevenson FK, Phillpotts RJ (2005) Evaluation of the VP22 protein for enhancement of a DNA vaccine against anthrax. Genetic Vaccines Therapy 3.
Ravn P, Demissie A, Eguale T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA, Mustafa AS, Jensen AK, Holm A, Rosenkrands I, Oftung F, Olobo J, Reyn FR, Andersen P

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.1.4]