



کلونینگ و تعیین توالی ژن کد کننده lipL21، در سرووارهای واکسینال لپتوسپیرا اینتروگانس

رسول حسین پور^۱، پژواک خاکی^{۱*}، سهیلا مرادی بیدهندی^۱، مجتبی نوفلی^۲

^۱ بخش میکروبی شناسی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

^۲ بخش واکسن های پزشکی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

دریافت مقاله: ۹۳/۷/۶- پذیرش مقاله: ۹۳/۹/۳

چکیده

زمینه: لپتوسپیروزیس نوعی بیماری مشترک بین انسان و دام است، که توسط باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس ایجاد می شود. ژن بیان کننده LipL21 یکی از ژن های شناسایی شده در باکتری لپتوسپیرا است که فقط در سویه های بیماری زا وجود دارد. هدف از این تحقیق کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL21 در ۵ سرووار واکسینال باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس در ایران می باشد. **مواد و روش ها:** سرووارهای بیماری زا لپتوسپیرا اینتروگانس در محیط کشت اختصاصی EMJH و ۱۰ درصد سرم خرگوش کشت داده شدند. بعد از استخراج DNA ژنومیک با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR گذاشته شد و محصول PCR در درون وکتور E.Coli DH5α انتقال داده شد. پلاسمیدهای نو ترکیب جهت تعیین توالی ارسال گردید. **یافته ها:** آنالیز توالی ژن lipL21 در مورد سرووارهای واکسینال داخلی و مقایسه آنها با دیگر سرووارهای موجود در بانک ژنی نشان داد که ۳ سرووار واکسینال سرجهاردجو، کانی کولا و پومونا دارای ۱۰۰ درصد تشابه با همدیگر می باشند و سرووار گریپوتیفوزا دارای بیشترین اختلاف با سرووارهای واکسینال می باشد. در کل نتایج نشان داد که این ژن یک ژن بسیار حفاظت شده در سرووارهای واکسینال بومی و سرووارهای موجود در بانک ژنی با درصد تشابه بالای ۹۵/۷ درصد می باشد. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که ژن lipL21 در میان سرووارهای واکسینال بسیار حفاظت شده (۹۶/۴ درصد > شباهت) می باشد. بنابراین ژن کد کننده پروتئین سطحی LipL21 می تواند به عنوان یک تست سرولوژیک مناسب با ویژگی و حساسیت بالا برای تشخیص درست و به موقع لپتوسپیروزیس در نمونه های کلینیکی و هم در آینده به عنوان کاندیدایی برای واکسن های زیر واحد مؤثر مورد استفاده قرار گیرد. **واژگان کلیدی:** لپتوسپیروزیس، لپتوسپیرا، ژن lipL21، کلونینگ

* کرج، بخش میکروبی شناسی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوزیس (Zoonosis) می باشد که توسط باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس ایجاد می گردد. لپتوسپیراها باکتری هایی هستند که طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی و همچنین انسان را آلوده می کند. از میان حیوانات حساس به این باکتری می توان از گاو، تک سمی ها، گوسفند، بز، خوک، سگ و جوندگان نام برد. این بیماری دارای انتشار جهانی بوده ولی در مناطق معتدل و مرطوب که دارای بارندگی زیاد بوده دارای شیوع بیشتری می باشد. انتقال آن از طریق تماس افراد با آب یا خاک آلوده به ادرار پستانداران صورت می گیرد. لپتوسپیروزیس یک بیماری وابسته به شغل بوده و بیشتر در کشاورزان و دامداران مشاهده می شود (۱-۳). تشخیص اولیه عفونت لپتوسپیرا در انسان به خاطر شباهت علائم آن با دیگر بیماری های تب دار نظیر آنفلوآنزا، تب دانگ، مننژیت و هیپاتیت بسیار مهم است (۴).

یکی از رویکردهای مهم تحقیقات مربوط به لپتوسپیروزیس، شناسایی پروتئین های غشای خارجی (OMPs) است که در گونه های بیماری زا، در سطح باکتری لپتوسپیرا قرار می گیرند و طی عفونت در پستانداران بیان می شوند (۵). ژن بیان کننده *LipL21* یکی از ژن های شناسایی شده در باکتری لپتوسپیرا است که فقط در سویه های بیماری زا وجود دارد (۶). تحقیقات نشان می دهند که *LipL21*، *LipL32*، *LipL41* و *OmpL1* در سطح لپتوسپیرا در دسترس آنتی بادی ها قرار دارند ولی *LipL36* فقط در ارگانسیم هایی که شکسته یا ترکیده باشند، در معرض قرار می گیرند (۶، ۷-۹). ژن های کد کننده پروتئین های غشای خارجی *LipL21*، *LipL32* و *OmpL1* به

شدت در میان لپتوسپیراهای اپیدمیک مختلف حفاظت شده می باشند (۱۰).

بیش از حدود ۵۰ سال پیش واکسن لپتوسپیروزیس تهیه و بر روی حیوانات آزمایشگاهی، دام، خوک، سگ، گوسفند، اسب و انسان مورد بررسی قرار گرفته است. اغلب این واکسن ها شامل پیکره کامل باکتری است که با روش های مختلفی مانند حرارت و یا مواد شیمیایی مختلف غیر فعال گردیده اند (۱۱-۱۳). واکسن کشته شده لپتوسپیروزیس در انسان نیز مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده گردید که آنتی بادی های اختصاصی بر علیه سروارهای مورد استفاده در واکسن، تولید شده است. در حال حاضر تنها کشوری که از واکسن لپتوسپیروزیس انسانی استفاده می کند کشور کوبا می باشد (۱۴-۱۶).

به دنبال واکسن های کشته شده باکتری لپتوسپیرا، نگاه ها به سمت ایمنی زایی توسط برخی اجزاء ساختمانی باکتری معطوف گردیده است. واکسن های نوترکیبی پروتئینی از این بین بیشترین پتانسل را در ایجاد ایمنی بر علیه لپتوسپیراها دارند. تعدادی واکسن نوترکیب تشکیل یافته از برخی اجزاء لپتوسپیرا مانند OMPs، لیپوپروتئین ها، LPS و فاکتورهای ویروالانس تهیه و مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷-۲۷).

در سال ۲۰۰۲ یک پروتئین شبه ایمنوگلوبولین 130 kDa به نام immunoglobulin-like (Lig A) از لپتوسپیرا اینتروگانس شناسایی و نقش ایمنی زایی آن مشخص گردید (۲۲). همچنین لیپوپروتئین های *LipL21*، *LipL32*، *LipL45*، *lipL41*، *ompL-1*، *GLP* و فاکتورهای ویروالانس *Chpk*، *SphH*، *Hsp58* می توانند کاندیدهای خوبی برای تهیه واکسن های نوترکیبی لپتوسپیروزیس باشند (۱۸، ۲۴-۲۶).

اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

PCR

پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن lipL21 با نرم افزار Vector NTI طراحی گردید. توالی این جفت پرایمر به صورت زیر می باشد.

Forward: 5'-CGACATGATCAATAGACTTATAGCTC-3'
Reverse: 5'-CAGTTATTGTTTGAAACCTCTTGAG-3'

واکنش PCR در حجم ۲۶ میکرولیتر (۱۳ میکرولیتر mix Master، مقدار ۱۰۰ نانوگرم 100.DNA پیکومول از هر پرایمر و ۳۶. میکرولیتر (50Mm) MgCl₂) طبق برنامه زیر انجام شد. برای دناتوراسیون اولیه، DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمرها به DNA هدف در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه و تکثیر پرایمرها در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ چرخه تکرار شد و سرانجام ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول PCR تمام نمونه‌ها توسط ژل الکتروفورز ارزیابی و تأیید گردید.

کلونینگ و تخلیص پلاسمید نو ترکیب

محصول PCR ژن lipL21 لپتوسپیرا اینتروگانس به کمک کیت (GeneJET PCR، Fermentas)، Purification kit طبق دستورالعمل خالص سازی شده و در وکتور pTZ57R/T در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب الحاق گردید. وکتورهای نو ترکیب به سلول مستعد E.Coli DH5α انتقال داده شد. سلول و وکتور به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد، سپس سلول‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک و نیم دقیقه در بن ماری تحت تأثیر شوک

از DNA واکسن ژن lipL21 باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار Lai در ایمن‌سازی خوکچه هندی استفاده شده که باعث افزایش تیتراژ آنتی‌بادی شده است در نتیجه DNA واکسن حاصل از ژن lipL21 یک کاندیدای مناسب برای پیشگیری از لپتوسپیروزیس است (۲۸).

هدف از این تحقیق کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL21 در ۵ سروار واکسینال باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس در ایران می باشد.

مواد و روش‌ها

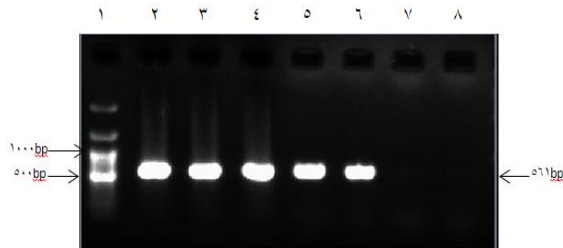
در این تحقیق از پنج سروار بیماریزای لپتوسپیرا از سروارهای موجود در آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروبی شناسی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج استفاده شد.

L.interrogans Sejroe hardjo (RTCC2821),
L.interrogans Canicola (RTCC2805),
L.interrogans Icterohaemorrhagiae (RTCC2812),
L. interrogans Pomona (RTCC2815),
L.interrogans Grippotyphosa (RTCC2808)

کشت و استخراج DNA

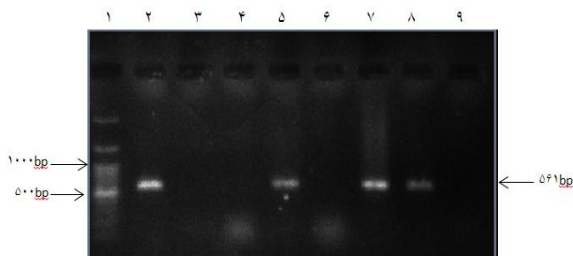
باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی (EMJH) همراه با سرم خرگوش و مکمل‌های غذایی در شرایط هوایی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و بعد از ۷-۱۰ روز رشد آن‌ها توسط میکروسکوپ دارک فیلد مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌ها جهت رسوب‌گیری در ۱۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. جهت استخراج DNA ژنومیک از روش استاندارد فنل کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز و

پروتئین سطحی lipL 21 در سرووارهای بیماری‌زا حضور داشته در حالی که در سرووار غیربیماری‌زای بایفلکسا وجود ندارد (شکل ۱).



شکل (۱) نتایج الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا بر روی ژل آگارز ۱ درصد
(۱) سایز مارکر، سرووارهای (۲) کانیکولا، (۳) پومونا، (۴) سرجهاردجو، (۵) ایکتره‌موراژی، (۶) گریپتوفوزا (نمونه‌های مثبت)، (۷) سرووار غیربیماری‌زای بایفلکسا (منفی)، (۸) کنترل منفی

ژن تکثیر شده با موفقیت در وکتور pTZ57R/T الحاق و به سلول E.Coli DH5 α انتقال داده شد. و نتایج حاصل از کلنی PCR این امر را تأیید کرد (شکل ۲).



شکل (۲) ژن کلون شده lipL21 در باکتری E.Coli DH5 α
(۱) سایز مارکر، (۲)، (۵)، (۷)، (۸)، کلنی‌های PCR مثبت

با توجه به دندروگرام رسم شده که ارتباطات فیلوژنیک آن‌ها را نشان می‌دهد و همین طور بر اساس جدول تشابه و واگرایی سویه‌ها نتایج ذیل به دست آمد. آنالیز توالی ژن lipL 21 در مورد سرووارهای واکسینال داخلی و مقایسه آن‌ها با دیگر سرووارهای موجود در بانک ژنی نشان داد که ۳ سرووار واکسینال سرجهاردجو، کانی کولا و پومونا دارای ۱۰۰ درصد

گرمایی قرار گرفته و بلافاصله مجدداً به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. نهایتاً سلول‌ها روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. سپس حضور ژن lipL21 در کلنی‌های نوترکیب توسط PCR تأیید گردید. کلنی‌های نوترکیب در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده و تخلیص پلاسمید از سلول‌ها توسط کیت (Roche, Germany) انجام شد. برای تأیید انجام کلونینگ بر روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز شدند.

تعیین توالی و آنالیز نوکلئوتیدها

پلاسمید حاوی ژن مورد نظر جهت تأیید توالی ژن lipL21 به شرکت MacroGen کره جنوبی ارسال گردید.

درصد شباهت و اختلاف در میان گونه‌های لپتوسپیرا با استفاده از برنامه MEGA5 مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس دندروگرام مربوط به بررسی میزان قرابت سرووارها و جدول درصد تشابه و واگرایی در میان سرووارهای مختلف استفاده شده در تحقیق حاضر و سویه‌های لپتوسپیرای ثبت شده در بانک ژنی بر اساس آنالیز توالی ژن lipL21 بر اساس روش ClustalW ترسیم شد.

یافته‌ها

PCR و کلونینگ ژن lipL21

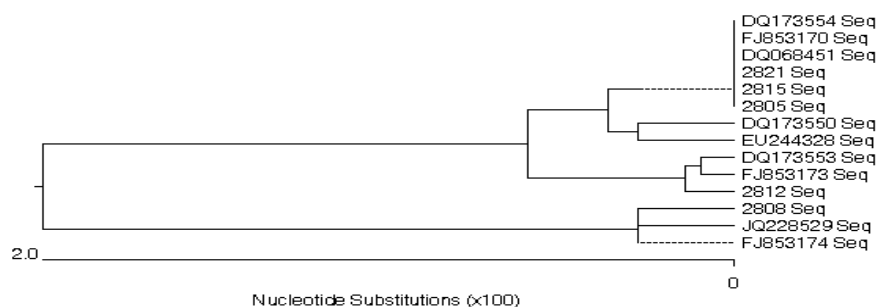
محصول PCR به دست آمده یک قطعه ۵۶۱ bp را نشان می‌داد که نشان دهنده تکثیر ژن lipL 21 بود که سپس توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از سایز مارکر (Fermentas, Germany) مورد تأیید قرار گرفت و نشان داد که ژن کد کننده

بسیار حفاظت شده در سروارهای واکسینال بومی و سروارهای موجود در بانک ژنی با درصد تشابه بالای ۹۵/۷ درصد می‌باشد. (جدول ۱)

تشابه با همدیگر می‌باشند و سروار گریپوتیفوزا دارای بیشترین اختلاف با سروارهای واکسینال می‌باشد. در کل نتایج نشان داد که این ژن یک ژن

		Percent Identity															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Divergence	1	■	96.6	99.1	100.0	100.0	100.0	99.6	99.1	100.0	99.5	100.0	99.3	96.6	96.1	1	2805 Seq
	2	3.5	■	96.4	96.6	96.6	96.6	96.6	96.4	96.6	96.4	96.6	96.6	100.0	99.5	2	2808 Seq
	3	0.9	3.7	■	99.1	99.1	99.1	98.8	99.6	99.1	98.6	99.1	99.8	96.4	96.3	3	2812 Seq
	4	0.0	3.5	0.9	■	100.0	100.0	99.6	99.1	100.0	99.5	100.0	99.3	96.6	96.1	4	2815 Seq
	5	0.0	3.5	0.9	0.0	■	100.0	99.6	99.1	100.0	99.5	100.0	99.3	96.6	96.1	5	2821 Seq
	6	0.0	3.5	0.9	0.0	0.0	■	99.6	99.1	100.0	99.3	100.0	99.3	96.6	96.1	6	DQ068451 Seq
	7	0.4	3.5	1.3	0.4	0.4	0.4	■	96.8	99.6	99.3	99.6	98.9	96.6	96.1	7	DQ173550 Seq
	8	0.9	3.7	0.4	0.9	0.9	0.9	1.3	■	99.1	98.4	99.1	99.8	96.4	95.9	8	DQ173553 Seq
	9	0.0	3.5	0.9	0.0	0.0	0.0	0.4	0.9	■	99.3	100.0	99.3	96.6	96.1	9	DQ173554 Seq
	10	0.5	3.7	1.4	0.5	0.5	0.5	0.5	1.4	0.5	■	99.5	98.8	96.4	95.9	10	EU244328 Seq
	11	0.0	3.5	0.9	0.0	0.0	0.0	0.4	0.9	0.0	0.5	■	99.3	96.6	96.1	11	FJ853170 Seq
	12	0.7	3.5	0.2	0.7	0.7	0.7	1.1	0.2	0.7	1.3	0.7	■	96.6	96.1	12	FJ853173 Seq
	13	3.5	0.0	3.7	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.7	3.5	3.5	3.5	■	99.5	13	FJ853174 Seq
	14	4.1	0.5	3.9	4.1	4.1	4.1	4.1	4.3	4.1	4.3	4.1	4.1	0.5	■	14	JQ228529 Seq

جدول ۱) درصد تشابه و اگرایی در میان سروارهای مختلف استفاده شده در تحقیق حاضر و سروارهای لپتوسپیرای ثبت شده در بانک ژنی بر اساس آنالیز توالی ژن lipL21



شکل ۳: دندروگرام مربوط به بررسی میزان قرابت سروارهای واکسینال استفاده شده در این تحقیق با نمونه‌های لپتوسپیرای ثبت شده در بانک ژنی بر اساس ژن lipL21 با استفاده از نرم‌افزار MEGA5

قدم مهمی در کنترل و ریشه‌کنی این بیماری در سطح کشور برداشت.

آزمون‌های سرولوژیکی برای تشخیص لپتوسپیروزیس حائز اهمیت می‌باشند. الیزا یکی از متداول‌ترین تست‌های تشخیص سرولوژیکی است و برای تشخیص بیماری‌های عفونی بسیار رایج شده است و با توجه به حساسیت و ویژگی قابل توجهی که در اغلب مطالعات نشان داده است و با توجه به اینکه در آزمون میکرو آگلوتیناسیون MAT از باکتری زنده استفاده می‌گردد پس می‌توان از پروتئین‌های نوترکیبی

بحث

علیرغم واکسیناسیون بر علیه لپتوسپیروزیس در برخی نقاط کشور مخصوصاً استان‌های شمالی همچنان میزان ابتلا به بیماری بالا می‌باشد. این مسئله می‌تواند بیانگر آن باشد که در حال حاضر اطلاع جامع و دقیقی از سروارهای شایع لپتوسپیروزیس و وضعیت بیماری در کشور به خصوص در نواحی که شیوع بیماری بالا می‌باشد، وجود ندارد. بنابراین با مطالعه دقیق بیماری در کشور و جداسازی سروارهای بومی و استفاده از آن‌ها در ساخت واکسن و تهیه واکسن جدید می‌توان

لپتوسپیرو به عنوان آنتی ژن مورد استفاده در الایزا به جای MAT برای تشخیص لپتوسپیروزیس استفاده کرد (۲۹ و ۳۰).

چندین پروتئین غشای خارجی در لپتوسپیرو شناخته شده‌اند که کار اتصال به ماتریکس خارج سلولی میزبان را انجام می‌دهند. همچنین این پروتئین‌ها ممکن است برای اتصال لپتوسپیرو به بافت‌های میزبان و مقاومت کردن در برابر کمپلمان هم دارای اهمیت باشند (۳۱ و ۳۲).

بسیاری از لیپوپروتئین‌ها برای مثال lipL32، Lip145 و lipL 21 می‌توانند کاندیدای واکنش باشند. lipL41 و 32lipL به عنوان اهدافی مسلم در طی عفونت لپتوسپیروشناسایی شده‌اند. اینها دارای پتانسیل لازم برای اهداف سرولوژیکی و احتمالاً اهدافی برای نسل جدید واکنش‌ها می‌باشند (۳۳).

تحقیقات ارزنده‌ای در کشورهای دیگر بر روی این پروتئین‌های سطحی در راستای شناخت بیشتر درباره این باکتری و تلاش در جهت ساخت واکنش سواب یونیت بر علیه بیماری لپتوسپیروزیس صورت پذیرفته است. اما در ایران خلاء مطالعاتی در این زمینه مشهود است و با توجه فراوانی این بیماری در بین حیوانات اهلی و لبنی در ایران امیدواریم این پژوهش که در قالب طرحی جامع‌تر در کشورمان ایران در حال انجام است، شروعی در جهت رفع این خلاء باشد.

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که ژن lipL21 در میان سرووارهای واکسینال بسیار حفاظت شده (۹۶/۴ درصد > شباهت) می‌باشد و آنالیز این سکونس‌ها با سکونس‌های سایر کشورهای دیگر موجود در بانک ژنی درصد بالایی از تشابه (۹۵/۷ درصد > شباهت) را نشان داد که حاکی از این می‌باشد این ژن سرووارهای بیماری‌زای لپتوسپیرو در سراسر دنیا بسیار حفاظت

شده است.

در مطالعه‌ای که توسط هانجیانگ هی (Hanjiang He) در سال ۲۰۰۸ در کشور گینه انجام شد از DNA واکنش lipL21 باکتری لپتوسپیرو ایتروگانس سروار Lai در ایمن سازی خوک‌ها استفاده شد. در این مطالعه از قطعه‌ی کامل ژن lipL21 استفاده شد و آن را کلون کردند سپس آن را در داخل یک وکتور یوکاریوتی به نام pcDNA3.1(+) وارد کرده و به سلول COS-7 منتقل کردند و خوک‌ها را با آن ایمن کردند. شش هفته بعد از دومین ایمن‌سازی سلول‌های طحال را به منظور بررسی توانایی تکثیرشان جدا کردند. تیتراژ آنتی بادی‌ها افزایش یافته بود و شاخص تحریک اسپلنوسایت‌ها افزایش معناداری داشت. و در نهایت به این نتیجه رسیدند که واکنش حاصل از lipL21 یک کاندیدای مناسب برای پیشگیری از لپتوسپیروزیس است (۲۸).

زوایی لین (Xuai Lin) و همکاران در سال ۲۰۰۸ از پروتئین‌های چند اپی‌توبی نوترکیب برای تشخیص لپتوسپیروزیس استفاده کردند. آن‌ها چند اپی‌توب غالب ایمنی از پروتئین‌های غشای خارجی 1 OmpL، LipL21 و LipL32 را انتخاب کردند. این اپی‌توب‌ها علاوه بر IgG، IgM اختصاصی نیز تولید می‌کنند که با سرم بیماران با سروتیپ‌های مختلف لپتوسپیرو ایتروگانس واکنش می‌دهند. بر اساس ۵ اپی‌توب انتخاب شده یک ژن r-LMP سنتز کردند و یک سیستم بیان E.coli برای آن ساختند و از پروتئینی که از این ژن r-LMP بیان شد در ردیابی آنتی بادی‌های ضد لپتوسپیرو با تکنیک وسترن بلات استفاده کردند (۳۴).

کالن (Cullen) در سال ۲۰۰۳ نشان داد که پروتئین LipL21 در طول عفونت بیان می‌شود و ایمونوژنیک است برای این منظور آن‌ها به ۷ هامستر لپتوسپیروهای

است که در گونه‌های بیماری‌زای لپتوسپیراهای مختلف موجود بوده و حفاظت شده باشد. قرار گرفتن در معرض سطح یک ویژگی کلیدی برای آنتی ژن مؤثر است (۳۶ و ۳۷).

برای درک مولکولی بیماری‌زایی لپتوسپیروزیس، بررسی خصوصیات ژنتیکی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های غشای خارجی ضروری است. با توجه به اینکه این ژن در میان سرووارهای مختلف لپتوسپیروزیس بسیار حفاظت شده است بنابراین ژن کد کننده پروتئین سطحی LipL21 می‌تواند به عنوان یک تست سرولوژیک مناسب با ویژگی و حساسیت بالا برای تشخیص درست و به موقع لپتوسپیروزیس در نمونه‌های کلینیکی و هم در آینده به عنوان کاندیدایی برای واکسن‌های زیر واحد مؤثر مورد استفاده قرار گیرد.

بیماری‌زا را تلقیح کردند و یک مورد هم به عنوان شاهد قرار دادند. با آزمایش وسترن بلائینگ نشان دادند که هر ۷ هامستر پروتئین LipL21 را بیان کرده‌اند در حالی که در شاهد هیچ اثری از این پروتئین ردیابی نشد. همچنین با مطالعه‌ای که بر روی توالی ژن lipL21، شش سوش بیماری‌زا انجام گرفت مشخص شد که ۹۶ تا ۱۰۰ درصد در بین این سویه‌ها شباهت دارد (۶).

ایمنی و اثربخشی واکسن لپتوسپیروزیس ممکن است توسط واکسن زیر واحد ساب یونیت القا کننده ایمنی حفاظتی بهتر از واکسن‌هایی باشد که از جسم کامل سلولی استفاده می‌شود (۳۵) بنابراین طراحی و ساخت یک واکسن نو ترکیب کارآمد برای کنترل لپتوسپیروزیس بسیار مهم است و نیاز به یک آنتی ژن

References:

- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757-71.
- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982.
- World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization Malta, 2003.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis W. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 494-501.
- Zhao W, Chen CY, Zhang XY, et al. Molecular characterization of the pL40 protein in *Leptospira interrogans*. *Can J Microbiol* 2009; 55: 739-49.
- Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2003; 71: 2414-21.
- Shang ES, Exner MM, Summers TA, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun* 1995; 63: 3174-81.
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 2005; 73: 4853-63.
- Haake DA, Walker E, Blanco DR, et al. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun* 1991; 59: 1131-40.
- Zhang XY, Yu Y, He P, et al. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005; 37: 649-56.
- Fornazari F, Silva RC, Langoni H, et al. Detection of *Leptospira* spp. in slaughtered sheep from Brazil. In: Animal hygiene and sustainable livestock production Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, p: 1013-5.
- Silva CCM, Giongo V, Simpson AJG, et al. Effects of hydrostatic pressure on the *Leptospira interrogans*: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar hardjo. *Vaccine* 2001; 19: 1511-4.
- Wang Z, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact* 2007; 6: 39.

14. Adler B, Faine S. Immunogenicity of boiled compared with formalized leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. *J Hyg* 1980; 84: 1-10.
15. Chapman AJ, Faine S, Adler B. Antigens recognized by the human immune response to vaccination with a bivalent hardjo/pomona leptospiral vaccine. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 64: 111-8.
16. Sbenberg E, Torten M. A new leptospiral vaccine for use in man. I. Development of a vaccine from *Leptospira* grown on a chemically defined medium. *J Infect Dis* 1973; 128: 642-6.
17. Seixas FK, Fernandes CH, Hartwig DD, et al. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Can J Microbiol* 2007; 53: 472-9.
18. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999; 67: 6572-82.
19. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 2004; 22: 1545-52.
20. Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, et al. Whole genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 244: 305-13.
21. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, et al. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect Immun* 2002; 70: 2311-8.
22. Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SSD, et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2002; 70: 5924-30.
23. Brown JA, LeFebvre RB, Pan MJ. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 1991; 59: 1772-7.
24. Diament D, Brunialti MKC, Romero EC, et al. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun* 2002; 70: 1677-83.
25. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68: 2276-85.
26. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001; 69: 4958-68.
27. Matsuo K, Isogai E, Araki Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 887-90.
28. He H, Wang W, Wu Z, et al. Protection of guinea pigs against *Leptospira interrogans* serovar Lai by LipL21 DNA vaccine. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 385-91.
29. Adler B, Murphy A, Locarnini SA, et al. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 452-7.
30. Terpstra WJ, Lighthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 377-85.
31. Barbosa AS, Abreu PA, Neves FO, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun* 2006; 74: 6356-64.
32. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun* 2007; 75: 2441-50.
33. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med* 2005; 51: 210-4.
34. Lin XA, Chen Y, Yan J. Recombinant multiepitope protein for diagnosis of leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1711-4.
35. Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang Y-F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 284-92.
36. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, et al. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 2004; 186: 2818-28.
37. Haake D, Champion CI, Martinich C, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol* 1993; 175: 4225-34.

Original Article

Cloning and sequencing of the gene encoding LipL21 in the vaccinal leptospira serovars

R. Hoseinpur¹, P. Khaki^{1*}, S. Moradi Bidhendi¹, M. Noofeli²

¹ *Leptospira Reference laboratory, Department of Microbiology, Razi Vaccine Research Institute, Karaj, Iran*

² *Human Bacterial Vaccines Research and Production Department, Razi Vaccine Research Institute, Karaj, Iran*

(Received 28 Sep, 2014 Accepted 24 Nov, 2014)

Abstract

Background: Leptospirosis is a zoonotic disease in humans and animals, caused by the bacterium *Leptospira interrogans*. Gene expressing LipL21 is one of the genes identified in the bacterium, existing only in the pathogenic strains. The aim of this study was to cloning and analyzing the sequence of the gene encoding surface lipoprotein, LipL21, in five vaccinal *leptospira* serovars in Iran.

Material and Methods: Pathogenic *Leptospira interrogans* serovars were cultured in EMJH medium with 10% rabbit serum. After genomic DNA extraction, PCR with specific primers was employed and the resulting product inserted in a vector then transferred into E. Coli DH5α. The recombinant plasmids were finally sent for sequencing.

Results: The analysis of gene lipL21 in domestic vaccinal serovars and comparison of them with other serovars in the GenBank database revealed that three vaccinal serovars; serjo hardjo, canicola and pomona had 100% similarity with each other and grippotyphosa serovar had the highest difference with the vaccinal serovars. In general, the results showed that this gene is a highly conserved gene in the domestic vaccinal serovars and serovars in the GenBank database with more than 95.7 percent similarity.

Conclusion: These results showed that the gene, lipL21, is highly conserved in the vaccinal serovars (similarities > 96.4 %). Therefore, the gene encoding surface protein LipL21 can serve as a useful serologic test with high specificity and sensitivity for diagnosis of leptospirosis in clinical samples and in future as an effective subunit vaccine candidate to be used.

Key words: Leptospirosis, *Leptospira* Spp., lipL21 gene, cloning

*Address for correspondence: Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran;
E-mail: P.Khaki@rvsri.ac.ir