دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۶، صفحه ۱۱۴۸– ۱۱۴۰ (بهمن و اسفند ۱۳۹۴)

ISMJ 2016;18(6): 1140-1148

کلونینگ وتعیین توالی ژن کد کننده lipL21، در سروارهای واکسینال لپتوسپیرا اینتروگانس

رسول حسین‌پور [۱]، پژواک خاکی [۱*]، سهیلا مرادی بیدهندی [۱]، مجتبی نوفلی [۲]

[۱] بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
[۲] بخش واکسن‌های 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 لپتوسپیزا اینتروگانس ایجاد می‌شود. ژن بیان کننده LipL21 یکی از ژن‌های شناسایی شده در باکتری لپتوسپیرا است که فقط در سویه‌های بیماری‌زا وجود دارد. هدف از این تحقیق کلونینگ و آنالیز تعیین توالی ژن کد کننده لیپوپروتئین سطحی LipL21 در ۵ سروار واکسینال باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سروارهای بیماری‌زای 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 نوترکیب جهت تعیین توالی ارسال گردید.

یافته‌ها: آنالیز توالی ژن lipL21 در مورد سروارهای واکسینال داخلی و مقایسه آن‌ها با دیگر سروارهای موجود در بانک ژنی نشان داد که ۳ سروار واکسینال سرجوهاردجو، کانی کولا و پومونا دارای ۱۰۰ درصد تشابه با همدیگر می‌باشند و سروار گریپوتیفوزا دارای بیشترین اختلاف با سروارهای واکسینال می‌باشد. در کل نتایج نشان داد که این ژن یک ژن بسیار حفاظت شده در سروارهای واکسینال بومی و سروارهای موجود در بانک ژنی با درصد تشابه بالای ۹۵/۷ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که ژن lipL21 در میان سروارهای واکسینال بسیار حفاظت شده (۹۶/۴ درصد< شباهت) می‌باشد. بنابراین ژن کد کننده پروتئین سطحی LipL21 می‌تواند به‌عنوان 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 زیرواحد مؤثر مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لپتوسپیروزیس، لپتوسپیرا، ژن lipL21، کلونینگ

[*] کرج، بخش میکروب‌شناسی، مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

Email: P.Khaki@rvsri.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

مقدمه

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوزیس (Zoonosis) می‌باشد که توسط باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس ایجاد می‌گردد. لپتوسپیراها باکتری‌هایی هستند که طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی و همچنین انسان را آلوده می‌کند. از میان حیوانات حساس به این باکتری می‌توان از گاو، تک سمی‌ها، 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 می‌باشد. انتقال آن از طریق تماس افراد با آب یا خاک آلوده به ادرار پستانداران صورت می‌گیرد. لپتوسپیروزیس یک بیماری وابسته به شغل بوده و بیشتر در کشاورزان و دامداران مشاهده می‌شود (۳-۱). تشخیص اولیه عفونت لپتوسپیرا در انسان به خاطر شباهت علائم آن با دیگر بیماری‌های تب‌دار نظیر آنفلوآنزا، تب دانگ، منتژیت و هپاتیت بسیار مهم است (۴).

یکی از رویکردهای مهم تحقیقات مربوط به لپتوسپیروزیس، شناسایی پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) است که در گونه‌های بیماری‌زا، در سطح باکتری لپتوسپیرا قرار می‌گیرند و طی عفونت در پستانداران بیان می‌شوند (۵). ژن بیان کننده LipL21 یکی از ژن‌های شناسایی شده در باکتری لپتوسپیرا است که فقط در سویه‌های بیماری‌زا وجود دارد (۶).

تحقیقات نشان می‌دهند که LipL32، LipL21، OmpL1 و LipL41 در سطح لپتوسپیرا در دسترس آنتی‌بادی‌ها قرار دارند ولی LipL36 فقط در ارگانیسم‌هایی که شکسته یا ترکیده باشند، در معرض قرار می‌گیرند (۶، ۹-۷). ژن‌های کد کننده پروتئین‌های غشای خارجی LipL32، LipL21 و OmpL1 به شدت در میان لپتوسپیراهای اپیدمیک مختلف حفاظت شده می‌باشند (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 واکسن‌ها شامل پیکره کامل باکتری است که با روش‌های مختلفی مانند حرارت و یا مواد شیمیایی مختلف غیر فعال گردیده‌اند (۱۳-۱۱). واکسن کشته شده لپتوسپیروزیس در انسان نیز مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده گردید که آنتی بادی‌های اختصاصی بر علیه سرووارهای مورد استفاده در واکسن، تولید شده است. در حال حاضر تنها کشوری که از واکسن لپتوسپیروزیس انسانی استفاده می‌کند کشور کوبا می‌باشد (۱۶-۱۴).

به‌دنبال واکسن‌های کشته شده باکتری لپتوسپیرا، نگاه‌ها به سمت ایمنی‌زایی توسط برخی ازاجزاء ساختمانی باکتری معطوف گردیده است. واکسن‌های نوترکیبی پروتئینی از این بین بیشترین پتانسل را در ایجاد ایمنی بر علیه لپتوسپیراها دارند. تعدادی واکسن نوترکیب تشکیل یافته از برخی از اجزاء لپتوسپیرا مانند OMPs، لیپوپروتئین‌ها، LPS و فاکتورهای ویرولانس تهیه و مورد بررسی قرار گرفته است (۲۷-۱۷).

در سال ۲۰۰۲ یک پروتئین شبه ایمنوگلوبولین 130 kDa به نام immunoglobulin-like (Lig A) protein A از لپتوسپیرا انتروگانس شناسایی و نقش ایمنی‌زایی آن مشخص گردید (۲۲). همچنین لیپوپروتئین‌های LipL45، LipL32، LipL21، lipL41، ompL-1، GLP و فاکتورهای ویرولانس Hsp58، SphH، Chpk می‌توانند کاندیدهای خوبی برای تهیه واکسن‌های نوترکیبی لپتوسپیروزیس باشند (۱۸، ۲۶-۲۴).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

از DNA واکسن ژن lipL21 باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس سروار Lai در ایمن‌سازی خوکچه هندی استفاده شده که باعث افزایش تیتر 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 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از پنج سروار بیماریزای لپتوسپیرا از سروارهای موجود در آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا بخش میکروب‌شناسی 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.interrogance Grippotyphosa (RTCC2808)

کشت و استخراج DNA

باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی (EMJH) همراه با سرم خرگوش و مکمل‌های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و بعد از ۱۰-۷ 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 اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

PCR

پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن lipL21 با نرم‌افزار Vector NTI طراحی گردید. توالی این جفت پرایمر به صورت زیر می‌باشد.

Forward:5- CGACATGATCAATAGACTTATAGCTC-3´
Riverse:5´- CAGTTATTGTTTGGAAACCTCTTGAG-3´

واکنش PCR در حجم ۲۶ میکرولیتر (۱۳ میکرولیتر mix Master، مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA،100 پیکومول از هر پرایمر و ۳۶/. میکرولیتر (50Mm MgCl2) طبق برنامه زیر انجام شد. برای دناتوراسیون اولیه، DNA به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 نوترکیب

محصول PCR ژن lipL21 لپتوسپیرا اینتروگانس به کمک کیت (Fermentas، GeneJET PCR Purification kit) طبق دستورالعمل خالص سازی شده و در وکتور pTZ57R/T در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب الحاق گردید. وکتورهای نوترکیب 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 ونیم دقیقه در بن ماری تحت تأثیر شوک

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]
[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

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 تأئید گردید. کلنی‌های نوترکیب در محیط مایع LB حاوی آمپی‌سیلین 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 آنالیزنوکلئوتیدها

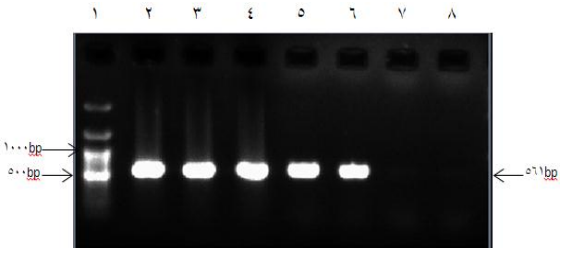
پلاسمید حاوی ژن مورد نظر جهت تأیید توالی ژن lipL21 به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید.

درصد شباهت و اختلاف در میان گونه‌های لپتوسپیرا با استفاده از برنامه MEGA۵ مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس دندروگرام مربوط به بررسی میزان قرابت سروارها و جدول درصد تشابه و واگرایی در میان سروارهای 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

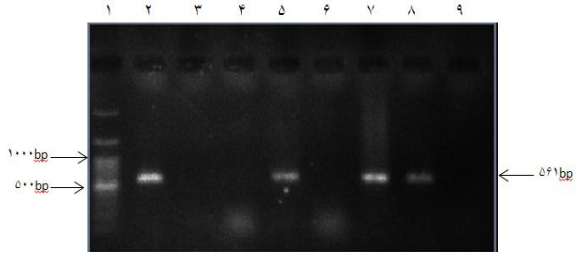
PCR و کلونینگ ژن lipL21

محصول PCR به دست آمده یک قطعه bp ۵۶۱ 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 پروتئین سطحی lipL 21 در سروارهای بیماری‌زا حضور داشته در حالی که در سروار 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، سروارهای (۲) کانیکولا، (۳) پومونا، (۴) سرجوهاردجو، (۵) ایکتروهموراژیه، (۶) گریپوتیفوزا (نمونه‌های مثبت)، (۷) سروار غیربیماری‌زای بایفلکسا (منفی)، (۸) کنترل منفی

ژن تکثیر شده با موفقیت در وکتور pTZ57R/T الحاق و به سلول E.Coli DH5α 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 DH5α
(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 سروارهای واکسینال داخلی و مقایسه آن‌ها با دیگر سروارهای موجود در بانک ژنی نشان داد که ۳ سروار واکسینال سرجوهاردجو، کانی کولا و پومونا دارای ۱۰۰ درصد

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]
[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

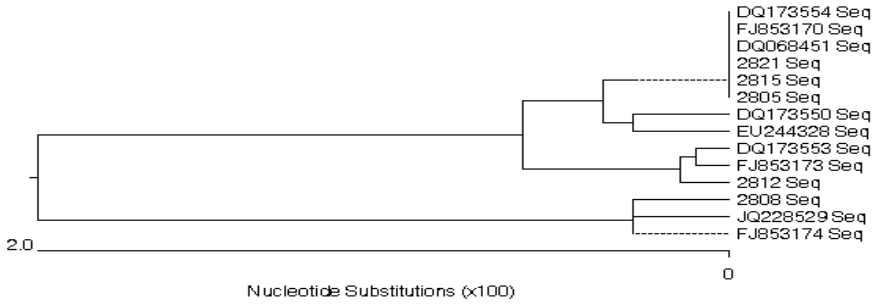
تشابه با همدیگر می‌باشند و سروار گریپوتیفوزا دارای بیشترین اختلاف با سرووارهای واکسینال می‌باشد. در کل نتایج نشان داد که این ژن یک ژن بسیار حفاظت شده در سرووارهای واکسینال بومی و سرووارهای موجود در بانک ژنی با درصد تشابه بالای ۹۵/۷ درصد می‌باشد. (جدول ۱)

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
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		98.8	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	3.7	3.5	3.7	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
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		

Divergence

جدول ۱) درصد تشابه و واگرایی در میان سرووارهای مختلف استفاده شده در تحقیق حاضر و سرووارهای لپتوسپیرای ثبت شده در بانک ژنی بر اساس آنالیز توالی ژن lipL 21



شکل ۳): دندروگرام مربوط به بررسی میزان قرابت سرووارهای واکسینال استفاده شده در این تحقیق با نمونه‌های لپتوسپیرای ثبت شده در بانک ژنی بر اساس ژن lipL21 با استفاده از نرم‌افزارMEGA5

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 سرووارهای شایع لپتوسپیرا 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 سرووارهای بومی و استفاده از آن‌ها در ساخت واکسن و تهیه واکسن جدید می‌توان 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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

لپتوسپیرا به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده در الایزا به جای MAT برای تشخیص لپتوسپیروزیس استفاده کرد (۲۹ و ۳۰).

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

بسیاری از لیپوپروتئین‌ها برای مثال Lipl45، lipL32 و lipL 21 می‌توانند کاندیدای واکسن باشند. lipL41 و 32lipL به‌عنوان اهدافی مسلم در طی عفونت لپتوسپیرایی شناسایی شده‌اند. اینها دارای پتانسیل لازم برای اهداف سرولوژیکی و احتمالاً اهدافی برای نسل جدید واکسن‌ها می‌باشند (۳۳).

تحقیقات ارزنده‌ای در کشورهای دیگر برروی این پروتئین‌های سطحی در راستای شناخت بیشتر درباره این باکتری و تلاش در جهت ساخت واکسن ساب 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 سروارهای 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 سروارهای بیماری‌زای لپتوسپیرا 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 واکسن lipL21 باکتری لپتوسپیرا اینتروگانس 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. تیتر آنتی بادی‌ها افزایش یافته بود و شاخص تحریک اسپلنوسایت‌ها افزایش معناداری داشت. و در نهایت به این نتیجه رسیدند که واکسن حاصل از lipL21 یک کاندیدای مناسب برای پیشگیری از لپتوسپیروزیزیس است (۲۸).

زوایی لین (Xuai Lin) و همکاران در سال ۲۰۰۸ از پروتئین‌های چند اپی‌توپی نوترکیب برای تشخیص لپتوسپیروزیزیس استفاده کردند. آن‌ها چند اپی‌توپ غالب ایمنی از پروتئین‌های غشای خارجی OmpL 1، LipL21 و LipL32 را انتخاب کردند. این اپی‌توپ‌ها علاوه‌بر IgM، IgG اختصاصی نیز تولید می‌کنند که با سرم بیماران با سروتیپ‌های مختلف لپتوسپیرا اینتروگانس واکنش می‌دهند. بر اساس ۵ اپی‌توپ 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 لپتوسپیرا 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 لپتوسپیراهای

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

بیماری‌زا را تلقیح کردند و یک مورد هم به عنوان شاهد قرار دادند. با آزمایش وسترن بلاتینگ 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 لپتوسپیرایی 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 نوترکیب کارآمد برای کنترل لپتوسپیروزیس بسیار مهم است و نیاز به یک آنتی ژن 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 سروارهای مختلف لپتوسپیرا 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.

References:

1.Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003; 3: 757-71.
2.Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982.
3.World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization Malta, 2003.
4.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.
5.Zhao W, Chen CY, Zhang XY, et al. Molecular characterization of the pL40 protein in Leptospira interrogans. Can J Microbiol 2009; 55: 739-49.
6.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.
7.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.
8.Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, et al. Surfaceome of Leptospira spp. Infect Immun 2005; 73: 4853-63.
9.Haake DA, Walker E, Blanco DR, et al. Changes in the surface of Leptospira interrogans serovar grippotyphosa during in vitro cultivation. Infect Immun 1991; 59: 1131-40.
10.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.
11.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.
12.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.
13.Wang Z, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. Microb Cell Fact 2007; 6: 39.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

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, Ligthart 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.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]

ISMJ 2016; 18(6): 1140-1148

Original Article

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

R. Hoseinpur [1], P. Khaki [1*], S. Moradi Bidhendi [1], M. Noofeli [2]

[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., *lipL*21 gene, cloning

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

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-02]

[DOI: 10.7508/ismj.1394.06.004]