مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۳، پاییز۱۳۸۹، صفحات۱۳- ۷

طراحی و ساخت پلاسمید حاوی کاست بیانی فیوژن پروتئین CFP-10، ESAT-6 *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*

مرصع فرناد[۱] ، حسین خان احمد شهررضا*[۲] ، بهمن تبرائی[۲]، بهادر یزدان پناه[۲] ، حسام موثق[۲]
منوچهر رستمی[۲]، طیبه سهرابی[۲]، رسول موخواه[۲]، جواد زره ساز[۳]، رحیم پیر حاجتی مهابادی[۳]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان
۲) مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
۳)دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
نویسنده رابط : حسین خان احمد شهرضا مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
تلفن همراه:۰۹۱۳۱۲۱٤۰۳۱ hossein_khanahmad@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/٦/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۹/۱/۳۰

چکیده:

زمینه و اهداف: در قرن گذشته تنها روش تشخیص عفونت نهفته *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* آزمایش پوستی توبرکولین بود. این آزمایش در بیماران آلوده با دیگر *مایکوباکتریوم‌ها* و در افراد واکسینه با BCG نتایج مثبت کاذب دارد. لذا، لزوم روش‌های تشخیصی کارآمد، سریع و دقیق مطرح می‌شود. دو آنتی‌ژن CFP-10 و ESAT-6 در تمام *مایکوباکتریوم‌های* پاتوژن وجود دارد ولی در سویه‌های مولد واکسن BCG و *مایکوباکتریوم‌های* فرصت طلب از جمله *مایکوباکتریوم آویوم* وجود ندارد. هدف این مطالعه ساخت سازه بیانی فیوژن پروتئین متشکل از دو ژن اختصاصی رمز کننده CFP-10 و ESAT-6 بود. این فیوژن پروتیین در آزمایش اختصاصی تشخیص عفونت فعال و نهفته *مایکو باکتریوم توبر کولوزیس* به‌کار برده می‌شود.

روش بررسی: DNA *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*(H37Rv)استخراج و تعیین غلظت گردید. برای تکثیر قطعات ESAT-6 ، CFP-10 و قطعه شامل ESAT-6 و CFP-10 پرایمر طراحی گردید و PCR و Overlap PCR انجام شد. محصول PCR حاصل از فیوژن ESAT-6 و CFP-10 در پلاسمید pTZ57T/A کلون شد. سپس پلاسمید pQE-60 وpT-ESAT-CFP با دو آنزیم *BamHI* و *NcoI* هضم شد. محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز، الکتروفورز شد. باندهای DNA حاوی ESAT-CFP و pQE-60 خطی شده از ژل آگارز استخراج گردید. قطعه ESAT-CFP در pQE-60 کلون مجدد شد. کلون‌های به‌دست آمده با PCR، هضم آنزیمی وتعیین توالی ارزیابی گردید. پلاسمید نهایی pQ-ESAT-CFP نامیده شد.

یافته‌ها: محصولات PCR، پلاسمید pT-ESAT-CFP و پلاسمید نهایی با هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شدند.

نتیجه‌گیری : با بیان سازه ژنی pQ-ESAT-CFP و تخلیص فیوژن پروتئین حاصل می‌توان از آن برای ساخت کیت تشخیصی *مایکوباکتریوم توبر کولوزیس*، جایگزین آزمایش توبرکولین، استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: سل نهفته، فیوژن پروتئینESAT-6CFP-10، کوآنتی فرون

مقدمه:

سل، یکی از قدیمی‌ترین امراض انسانی است که با وجـود استفاده گسترده از واکسن ضعیف شده و آنتی‌بیوتیک‌هـای مختلف، همچنان بزرگ‌تـرین عامـل مـرگ و میـر در بـین بیماری‌های عفونی می‌باشد. به‌طوری که سالیانه حدود ۲ تا ۳ میلیون مـرگ و میـر و۸ تـا ۱۰ میلیـون عفونـت جدیـد دارد(۱). آمار مرگ و میر و عوارض ناشی از سل ضرورت تحقیق در زمینه پیشگیری، تشخیص و درمان سل را بیشـتر نمایان می‌کند.

بیـماری سـل انسـانی عفـونت ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* است. این *مایکوباکـتریوم*، معمولاً در ریه‌ها ایجاد عفونت می‌کند. پیشرفت آلودگی سل در اصل توسط سیستم ایمنی میزبان کنترل می‌شود. ممکن است سیستم ایمنی از طریق حذف سریع و یا شرایط نهفتگی، فعالیت باکتری را مهار کند. مرگ و میر بر اثر سل به‌دلیل تأخیر در تشخیص و جداسازی بیماری و همچنین مقاومت دارویی و آلودگی مشترک با HIV می‌باشد. لذا، پیش‌بینی می‌شود که بیماران در صورت تشخیص به‌موقع، عدم آلودگی همزمان با HIV و عدم مقاومت دارویی زنده خواهند ماند. بدین‌ترتیب اهمیت طراحی و ارائه راهکارهای تشخیصی سریع، دقیق و اختصاصی برای عفونت *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* بیش از پیش معلوم می‌شود(۲).

آزمایش استاندارد طلائی تشخیص سل، بر اسـاس تعیـین هویت باکتری در نمونه‌های خلط، آسپیره، بیوپسی یا خون می‌باشد. زمانی که باکتری در نمونه‌هـای فـوق‌الـذکر قابـل تشـخیص نباشـد ترکیبـی از آزمـایش‌هـای ایمونولـوژی، مشاهدات رادیولوژیک و علائـم بـالینی در تشـخیص ایـن بیماری کمـک مـی‌کنـد. بنـابرایـن، یـک روش تشخیصـی به‌تنهایی نمی‌تواند در تشخیص سل کارآمد باشد.

در حال حاضر یکی از آزمایش‌هـای ایمونولوژیـک بـرای تشـخیص سـل، Tuberculin Skin Test (TST) یـا همان آزمایش توبرکولین است. آزمایش توبرکولین جهت؛ تشخیص عفونت حـاد و فعـال سـل در کودکـان، تخمـین میزان شـیوع عفونـت در جامعـه، انتخـاب افـراد حسـاس به واکسن BCG، و شناسایی واکسیناسـیون موفـق BCG به‌کار می‌رود(۳).

از معایب این آزمایش نتایج مثبت و منفی کاذب آن می‌باشد. مواردی که موجب نتایج منفی کاذب می‌شود، عبارتند از: حالت پیشرفته بیماری سل، در بیماران مبتلا به‌سرخک یا دیگر بیماران حساسیت پوستی، در بعضی موارد بعد از شیمی درمانی، در افراد با سن بالا، در مواردی که درمان باعث تضعیف سیستم ایمنی شده باشد و عفونت سارکوئیدوزیس. مواردی که نتایج مثبت کاذب به‌همراه دارد، عبارتند از: بیماران مبتلا به‌عفونت با *مایکوباکتریوم-های* آتیپیک و کسانی که قبلا واکسینه شده‌اند(۳). از معایب دیگر این آزمایش لزوم بازگشت مجدد بیمار جهت دریافت نتیجه نهائی است. آزمایش TST از ویژگی پایین برخوردار است.آنـتی‌ژن‌های مورد اسـتفاده مخلوطی از آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* است و احتمال اشتراک این مجموعه آنتی‌ژنیک با سایر *مایکوباکتریوم‌های* پاتوژن و همچنین BCG وجود دارد.(۳و٤) در عین حال آزمایش TST اطلاعاتی از حالات ایمنی شخص مورد آزمایش به ما نمی‌دهد و در نهایت دارای مشکلات تکنیکی یا مشکلات در خواندن نتایج است. (۵و٦)

اخیراً یک آزمایش جدید جهت تعیین مقـدارانترفرون گامـا در خون با نـام تجـاریQuantiFERON_TB_gold برای تشخیص بیماری سل نهفته (Latent Tb)و هم‌چنین سل فعال تهیه شده است. این آزمایش بر اسـاس آنتـی‌ژن-های اختصاصی *مایکوباکتریوم توبرکولـوزیس* بـه‌نـام‌هـای ESAT-6وCFP-10 می‌باشد. این آزمایش پاسـخ ایمنـی سلولی برعلیه عفونت سل، با تعیـین مقـدار IFN-γ رهـا شده در پلاسما خون بعد از گرمخانه‌گذاری بـه‌مـدت یـک شبانه روز درحضوراین دو آنتی‌ژن، را شناسایی می‌کند. این آنتی‌ژن‌ها در*مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* وجـود دارد ولـی در سویه‌های واکسن BCG و *مایکوباکتریوم‌های* فرصـت طلب دیگر مانند *مایکوباکتریوم آویوم* دیده نمی‌شوند. ایـن دو آنتـی ژن بسـیار اختصاصـی هسـتند و در تشـخیص عفونت‌های *مایکو باکتریوم توبرکلـوزیس* مـی‌تواننـد یـک تشخیص بسیار کامـل(حتی در عفونـت‌هـای نهفتـه) ارایـه دهند (۱۰-۷). هدف این مطالعه ساخت سازه بیانی فیـوژن پروتئین متشکل از دو ژن اختصاصـی رمـز کننـده -CFP

10و ESAT-6 بـود. ایـن فیـوژن پـروتیین در آزمـایش اختصاصی تشخیص عفونت فعال و نهفته *مایکو باکتریوم توبرکولوزیس* به‌کار برده می شود.

مواد و روش‌ها:

مواد مورد استفاده عبارت بودند از:

۱.بـاکتری *E.coli* سـویه TOP10F′ بـه‌عنـوان سـلول میزبان مورد استفاده قرار گرفت.

۲. وکتورها: الف. ناقل غیر بیانیpTZ57R ب. ناقل بیانی pQE-60

۳.استخراج DNA توسط کیت فرمنتاز

٤.تخلیص پلاسمید توسط کیت فرمنتاز

۵.آنزیم‌های محدودالاثر*NcoI*،*BamHI* و همچنین آنزیم-هـایTaq DNA Polymerase، pfu و T4DNA Ligase از شرکت فرمنتاز

٦.آنتی بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و تتراسـایکلین از شرکـت سیگما

اولـین مرحلـه طراحـی پرایمـر از روی سـکانس قطعـات ESAT-6 (early secretory antigen 6 Kd) و CFP-10 (cultural filtrate protein) ژنـوم *مایکو باکتریوم توبرکولوزیس* به‌کمک نـرم‌افـزار Gene runner بود. شش پرایمر با اسامی زیر طراحی شد:

1.ESAT-6F 2.ESAT-6R1 3.ESAT-6R2 4.CFP-10F1 5.CFP-10F2 .6.CFP-10R

واکـنش‌هـای Polymerase Chain Reaction: (PCR) واکنش‌های PCR شامل PCR1,2 ESAT-6 برای تکثیر قطعه ESAT-6 و قسـمتی از قطعـه لینکـر بـا اسـتفاده از پرایمرهـای EF,R1 و EF,R2 و PCR1,2 CFP-10 بـرای تکثیـر قطعـه CFP-10 و قسـمتی از لینکـر بـا اسـتفاده از پرایمرهـای CF1,R و CF2,R گذاشـته شـد. دماهـای PCR شـامل دمـای واسرشتی اولیه ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه، دمای واسرشتی ثانویه ۹٤ درجه سانتی‌گـراد بـه‌مـدت ۳۰ ثانیـه، دمای اتصال(Anealing) ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۵ ثانیه، دمای گسترش (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گـراد به‌مدت ۵۰ ثانیه و تکرار سه دمای آخر به‌تعداد ۳۰ سـیکل و در انتها دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مـدت ۱۰ دقیقـه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا برداشت محصول PCR. کلیه واکنش‌های PCR با آنزیم pfu گذاشته شـد. مقـدار ۱۰۰ میکـرو لیتـر از محصـول PCR2 ESAT-6 و PCR2 CFP-10 بـا اسـتفاده از کیـت تخلـیص DNA شـرکت فرمنتاز از ژل آگارز تخلیص شد و به‌عنوان نمونه DNA (Sample) در واکنش Overlap PCR استفاده شد.

واکنش Over lap PCR :

برای به‌دسـت آوردن قطعـهOver lap (شـامل CFP-10 F2 R و ESAT-6 F R2) واکنش PCR با شـرایط زیـر انجام شد. مقدار ۱ میکرو لیتر از محصول PCR2 ESAT و PCR2 CFP ، ۵ میکرولیتـر بـافر pfu ، ۱ میکرولیتـر dNTP، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای جلوبر و معکوس، نـیم میکرولیتر آنزیم pfu و ۳۷,۵ میکرولیتر آب در لوله PCR ریخته و تحت شرایط دمایی زیر واکنش انجام شـد: دمـای واسرشتی اولیه ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه، دمای واسرشتی ثانویه ۹٤ درجه سانتی‌گـراد بـه‌مـدت ۳۰ ثانیـه، دمای اتصال (Anealing) ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه وتکرار دو مرحله آخر به‌تعداد چهار سیکل و سـپس دمای واسرشتی ثانویه ۹٤ درجه سـانتی‌گـراد بـه‌مـدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصـال (Anealing) ۵۸ درجـه سـانتی‌گـراد به‌مدت ٤۵ ثانیه، دمای گسترش (Extension) ۷۲ درجـه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه و تکـرار سـه دمـای آخـر بـه‌تعـداد ۳۰ سـیکل و در انتهـا دمـای ۷۲ درجـه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه و دمای ٤ درجه تـا برداشـت محصول PCR. بعد از به‌دست آوردن قطعه Over(bp ٦۰۹lap)، از روش Gel Extraction توسـط کیـت فرمنتازتخلیص و آماده برای مرحله Taq treatment شد.

واکنش Taq treatment : در ایـن واکـتش میـزان ۱۰۰ میکرولیتـر محصـول PCR اسـتخراج شـده از ژل، ۱۲ میکرولیتر بـافر۱۰X ،۲ میکرولیتـر dNTP 10mM، 0.4 میکرولیتـر آنـزیم Taq DNA polymerase و 5.6 میکرولیتر آب در لوله اپندورف نیم میلی‌لیتری ریخته شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجـه سـانتی‌گـراد انکوبـه شد.

واکنش اتصال (Ligation): در این مرحله بین محصـول Overlap PCR (شامل ESAT-6 و CFP-10) و ناقل PTZ57T/A واکنش اتصـال گذاشـته شـد. بـا مقـدار ۳

میکرولیتر از ناقل pTZ57T/A ، ۸ میکرولیتر محصول Overlap PCR، ۳ میکرولیتر بافر 10x لیگاز، ۱ میکرولیتر آنزیم Ligase T4 DNA و ۱۵ میکرولیتر آب. واکنش ligation به‌مدت یک ساعت در دمای اطاق و ۱۸ ساعت (Over night) در دمای یخچال گذاشته شد. در این مرحله قطعه 609 bp که درون ناقل PTZ طی واکنش Ligation وارد شده بود (محصول واکنش اتصال) در باکتری *E.coli* TOP10F′ ترانسفورم شد.حاصل ترانسفورمیشن در محیط LB Agar حاوی آمپی سیلین کشت داده شد و به انکوباتور37 درجه سانتی‌گراد برای یک شبانه روز منتقل گردید. از کلنی‌های حاصل، پلاسمید استخراج شد و با روش PCR و هضم آنزیمی بررسی شد و پلاسمید pT-ESAT-CFP استخراج شد. برای تایید صحت استخراج پلاسمید۲ میکرولیتر از این پلاسمید با pTZ57R سیرکولار روی ژل ۱٪ الکتروفورز شد.

در این مرحله برای جدا کردن و برش قطعه مورد نظر هضم آنزیمی با مقادیر ذیل بر روی پلاسمید-pT ESAT-CFP انجام شد: ۷ میکرولیترآنزیم*BamHI* ، ۲۰ میکرولیتر بافر*Bam HI* 10x ، ۵۰ میکرولیتر نمونه تخلیص شده ناقل pT-ESAT-CFP ، ۱۳۰ میکرولیتر آب. نمونه هضم شده وارد مرحله Clean up شد. بعد از تخلیص پلاسمید خطی شده یک هضم آنزیمی دیگر با آنزیم *Nco*I که در ابتدای قطعه مورد نظر تعبیه شده بود، با مقادیر زیر انجام شد: ۷ میکرولیترآنزیم *Nco*I، ۲۰ میکرولیتر بافر *Nco*I 10x، ۵۰ میکرولیتر نمونه تخلیص شده پلاسمید برش خورده pT-ESAT-CFP با آنزیم *BamHI* ، ۱۳۰ میکرولیترآب.

بعد از هضم آنزیمی دوم، قطعه ESAT-6CFP-10 از ژل آگارز تخلیص شد. در این مرحله ناقل بیانی pQE-60 طی فرآیند تخلیص پلاسمید تخلیص شد و برای مرحله تخلیص، یک هضم آنزیمی با آنزیم *Nco*I گذاشته شد. در این مرحله بین قطعه ESAT-CFP حاصل از واکنش هضم آنزیمی آماده گردید. برای خطی کردن ناقل pQE-60 هضم آنزیمی با آنزیم *BamHI* انجام شد. پس از ترانسفورمیشن محصول اتصال بین ناقل pQE-60 و قطعه ESAT-CFP در باکتری *E. coli* TOP10F´:

محصول واکنش اتصالpQE60 و قطعه ESAT-CFP در باکتری*E. coli* TOP10F´ با فرآیند ترانسفورماسیون منتقل شد .

جداسازی سلول‌های *E. coli* TOP10F´ کلون شده از غیر کلون شده:

ظروف پتری حاوی Luria Bertani (LB) آگاربرای کشت باکتری*E. coli* TOP10F´ حاوی 100µg/ml آمپی سیلین بود. این محیط باعث رشد کلون‌های حاوی پلاسمید pQ60ESAT-CFP شد. پس از ۲٤ ساعت پلاسمید ار کلنی‌ها استخراج شد و مورد بررسی قرار گرفت.

هضم آنزیمی بر روی پلاسمید pQ60ESAT-CFP:

بعد از تخلیص یکی از کلنی‌های تائید شده، هضم آنزیمی بر روی **پلاسمید** pQ60ESAT-CFP با آنزیم *BamH*I و *Nco*I گذاشته شد و روی ژل ۲٪ با مارکرkb ۱ بررسی شد. در نهایت پلاسمید pQ60ESAT-CFP با استفاده ار پرایمرهای ESAT-F و CFP-R تعیین توالی گردید.

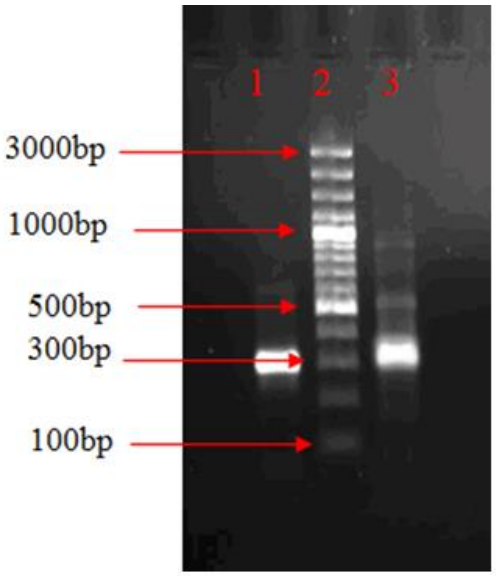
یافته‌ها:

PCR:

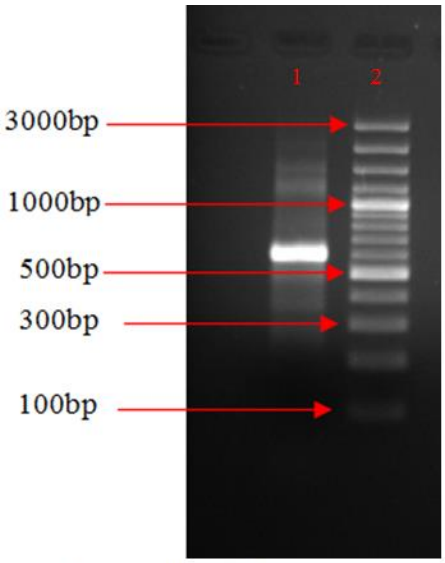
نتایج حاصل از PCR قطعات ESAT-6 و CFP-10 نشان داد که قطعهESAT-6، ۲۹۵ جفت باز و قطعه CFP-10، ۳۱٤ جفت تکثیر شده‌است (شکل۱).

Overlap PCR:

نتیجه حاصل از overlap PCR، قطعه-CFP 10ESAT-6را با اندازه ٦۰۹ جفت باز نشان داد(شکل۲).



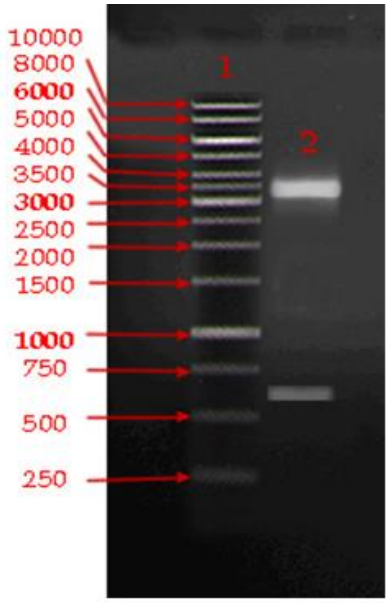
شکل ۱: ستون ۱: محصول PCR2 (ESAT-6) (۲۹۵ جفت باز) ستون ۲: مارکر 100bp
ستون ۳: محصول PCR2 (CFP-10) (۳۱٤ جفت باز)



شکل۲: ستون۱: باند مربوط به قطعه bp ٦٠٩ Overlap PCR
(ESAT-6CFP-10)ستون ۲: مارکرbp ۱۰۰

هضم آنزیمی بر روی pQ60ESAT-CFP :

حاصل هضم **pQ60ESAT-CFP** با **آنزیم‌های *NcoI* و *BamHI*** **قطعه** ۳٤۰۰bp بدنه ناقل pQE60 و قطعه ٦۰۹bp مورد نظر (ESAT-CFP) بود. به‌عبارت دیگر قطعه رمز کننده فیوژن پروتئین ESAT-6CFP-10 در داخل ناقل بیانی PQE-60 کلون شده بود(شکل۳).



شکل ۳. ستون ۱: مارکر۱۰۰ جفت بازی ستون ۲: قطعه bp ۳٤۰۰ (بدنه وکتور) و قطعه bp ٦۰۹ (ESAT-CFP) حاصل هضم آنزیمی pQ-ESAT-CFP با آنزیمهای *BamHI* و *NcoI*

بحث:

طبق تخمین سازمان جهانی بهداشت یک سوم جمعیت جهان به‌عفونت *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* آلوده هستند. جداسازی و درمان عفونت نهفته این باکتری خصوصاً در کشورهای صنعتی از مهم‌ترین اقدامات برای مبارزه با این عفونت می‌باشد(۱).

در قرن گذشته تنها تشخیص کاربردی برای عفونت نهفته *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* آزمایش پوستی توبرکولین بود. متاسفانه این آزمایش دارای مشکلات متعددی از جمله نتایج مثبت کاذب در بیماران آلوده با دیگر *مایکوباکتریوم‌ها* و همچنین در اشخاص واکسینه شده با BCG می‌باشد. آزمایش سنجش رهاسازی اینترفرون گاما Interferon Gama Release Assay (IGRA) به‌عنوان جایگزین برای TST براساس تحریک پاسخ‌های سیستم ایمنی سلولی در ارتباط با DTH (Delayed Type Hypersensitivity) است(۵). در اشکال اولیه آزمایش IGRA، خون فرد مشکوک به سل در لوله آزمایش و در معرض PPD قرار می‌گرفت و همچنان مشکلات ذکر شده برای TST را داشت. (۱۱) جهت رفع این مشکلات، آزمایش جدید IGRA بر پایه آنتی‌ژن‌های منطقه RD1 (Region of Difference) می‌باشد. این منطقه در تمام اعضاء کمپلکس توبر کولوزیس وجود دارد. این ناحیه دو آنتی‌ژن مهم *مایکوباکتریوم توبر کولوزیس* به نام‌های ESAT-6 و CFP-10 را رمزگذاری می‌کند که مسئول بیماری‌زایی و ویرولانس باکتری است. ESAT-6 و CFP-10 به‌وسیله ژن‌هایی رمزگذاری می‌شوند که در سویه‌های واکسن BCG وجود ندارد. هم‌چنین در بسیاری از سویه‌های فرصت طلب مانند *مایکوباکتریوم آویوم* هم وجود ندارد(۷و۱۱). در نسل جدید آزمایش IGRA خون محیطی بیمار در لوله آزمایش در معرض پروتیین‌های ESAT-6 و CFP-10 قرار می‌گیرد. در صورت ابتلا به‌شکل حاد یا شکل نهفته عفونت سل (LTBI) Latent Tuberculosis Infection سلول‌های لنفوسیت به‌علت داشتن خاطره مواجه قبلی تحریک و انترفرون گاما ترشح می کند. در این آزمایش از فیتوهماگلوتیناسیون A به‌عنوان شاهد مثبت و (PBS) Phosphate Buffer Saline به‌عنوان شاهد منفی استفاده می شود(۱۲).

نتـایج مطالعـات Igner Brock و همکـاران در سـال ۲۰۰٤ و همچنین Emil Porsa و همکاران در سال۲۰۰٦ با استفاده از کیت QuantiFERON-TB ، نشان‌دهنده عدم بروز پاسخ مثبت کاذب در افراد واکسینه شده با واکسن BCG بود. در صورتی که آزمایش PPD در افراد واکسینه شده با BCG پاسخ مثبت کـاذب نشـان می‌دهد (۱۲و۱۳).

پروتئین‌های بیان شده توسط RD1 باعث تخریـب غشـاء سـلول میزبان می‌شوند و *مایکو باکتریوم توبرکلوزیس* ایـن پـروتئین‌هـا را برای لیز کردن سلول میزبان و انتشار و عبـور از سـلولی بـه سـلول دیگر استفاده می‌کند. این دو آنتی‌ژن بسیار اختصاصی هسـتند و در تشخیص عفونت‌های *مایکوباکتریوم توبرکلـوزیس* مـی‌تواننـد یـک روش تشخیص مناسب (حتی در عفونت‌های نهفته) باشند. (۱و۱۳). در حال حاضر کیت‌های موجود حـاوی یکـی از ایـن دو آنتـی‌ژن به‌صورت منفرد است. ایـن مسـئله حساسـیت و اختصاصـیت ایـن روش تشخیصی را تنزل می‌دهـد. در تحقیـق موجـود شـکل‌هـای فضایی هر دو پروتئین بررسی شد و توسـط یـک لینکـر مناسـب ، پرایمر مربوط بـه‌متصـل کـردن ایـن دو آنتـی‌ژن کـه همـان قطعـه Overlap است، طراحی شد. در نتیجه امکان متصل کردن این دو آنتی‌ژن به هم میسر شد. یک قطعه واحد که توالی هـر دو آنتـی‌ژن ESAT-6 وCFP-10 در آن موجـود باشـد فـراهم گردیـد و در نهایت این توالی در ناقـل بیـانی pQE-60 کلـون مجـدد شـد. در جستجوهای انجام شده گـزارشـی بـرای کلـون شـدن قطعـه ژنـی مشابه در ایـن ناقل به‌دست نیامد. بنابراین، با بیان این سازه ژنی در باکتری و تخلیص فیوژن پروتئـین ESAT-6CFP-10 می‌توان از آن برای ساخت کیت تشخیصی *مـایکو بـاکتریوم تـوبر کولـوزیس* استفاده نمود و آن را جایگزین آزمایش توبرکولین کرد. به‌طوری که محدودیت‌های آزمایش توبرکولین از جملـه نتـایج مثبـت و منفـی کاذب و هم‌چنین عدم تشخیص سل نهفته از میان برداشـته شـود. علاوه بر ESAT-6 وCFP-10 آنتی‌ژن TB7.7 نیـز اختصاصـی کمپلکس *توبر کولوزیس* می‌باشـد. از ایـن پـروتیین نیـز مـی‌تـوان به‌تنهایی یـا همـراه بـا دو پـروتیین ذکـر شـده در ایـن مطالعـه در کیت‌های تشخیصی استفاده نمود.

نتیجه گیری :

قطعه رمز کننده فیوژن پـروتئین ESAT-6CFP-10 در داخـل ناقل بیانیPQE-60 کلون شد.

تقدیر وتشکر:

با تشکر و قدردانی فراوان از کلیه کارکنـان بخـش BCG و آقـای دکتر محمد ابوالحسنی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

فهرست مراجع:

1.Kaufmann SHE, VanHelden P. *Hand book of tuberculosis*. New York, Wiley-vech Verlag GmbH and Co. 2008; PP:63-76.
2. Rubin EJ, Akerley BJ, Novik VN, Lampe DJ, Husson RN, Mekalanos JJ. *In vivo* transposition of mariner-based elements in entericbacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **96:** 1645–1650.
3.Davies P, Drobniewski F. The use of interferon-c-based blood tests for the detection of latent tuberculosis infection. Eur Respir J 2006; **28**: 1-3 .
4. Martinez V, Carcelain G. T-cell and serological responses to Erp, an exported *Mycobacterium tuberculosis* protein in tuberculosis patients and healthy individuals. *BMC Infec Dis* 2007; **2**: 2-7.
5. Kang YA, Lee HW, Yoon Hl, Cho B, Han SK, Shim YS, Yim JJ. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon assay for the diagnosis of latent tuberculosis Infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *J Am Med Assoc* 2005; **293**:(22): 2756-2761.
6.Diel A, Nienhaus C, Lange K, Walter M, Forßbohm M, Schaberg T. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res* 2006; **7**:77: 1-9.
7. Camus JC, Pryor MJ. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Microbiol* 2002; **31**: 1-3.
8. Okkels LM, Andersen P. Protein-protein interactions of proteins from the ESAT-6 family of *Mycobacterium tuberculosis. J bacteriol* 2004; **186**: 1-2.
9. Brodin P, Rosenkrands I. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors?. *Tren microbiol* 2004; **12**: 1-4.
10. pym AS, brodin P. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat med* 2003; **40**: 2-4.
11. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, *et al*. Specific detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens, *Am J Respir Crit Care Med* 2004;**170**: 59–64.
12. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **170:** 65-69.
13. Porsa E, Cheng L, Seale M M, Delclos G L, Ma X, Reich R, *et al*, Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population .*Clin Vaccine Immunol* 2006; **13** : 53-58 **.**