

Toxoplasma gondii DNA Aşısı Adayı SAG1 Geninin Klonlanması

Cloning DNA Vaccine Candidate SAG1 Gene of *Toxoplasma gondii*

Hüsniye Lalek, Esra Gürbüz, Serkan Karaca, Süleyman Yazar, Salih Kuk

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Toxoplasma gondii* tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de görülen bir parazittir. Mortaliteye de sebep olabilen bu parazit, gebelerden bebeklere geçişi sebebiyle oldukça önemli bir halk sağlığı sorunu olarak görülmektedir. Toxoplasmosise karşı henüz etkili bir aşı geliştirilememiştir. SAG1 proteini parazitin hem bradizoit hem de takizoit dönemlerinde salgılanan, hastalığın patogeneğinde önemi olan bir proteindir. Bu çalışmada DNA aşısı adayları arasında yer alan SAG1 geninin klonlanması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada, *T. gondii* takizoitlerinden genomik DNA izolasyonu, SAG1 genini hedef alan primerler kullanılarak PCR ile SAG1 geni çoğaltılması, SAG1 geninin pJET1.2 vektörüne klonlanması, rekombinant plazmidin kompetan *E. coli* hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmidin varlığı PCR tarama ile doğrulanmıştır. Pozitif kolonilerdeki rekombinant plazmitler saflaştırıldıktan sonra klonlama; PCR, restriksiyon enzim kesimleri ve DNA dizi analizi yöntemleri ile doğrulanmıştır.

Bulgular: SAG1 gene spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonrasında 1010 baz çiftlik PCR ürünü görüntülendi. *E. coli* kompetan hücrelerine transforme edilen rekombinant plazmid PCR-tarama ile gösterildi. Rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği PCR ile gösterildi. DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan genin DNA dizisi elde edildi.

Sonuç: Toxoplasmosise karşı umut verici DNA aşısı adaylarından olan ve *T. gondii* takizoitlerinden izole edilen SAG1 geni klonlanmıştır. (Türkiye Parazitol Derg 2015; 39: 255-9)

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, SAG1 Geni, DNA Aşısı, Klonlama

Geliş Tarihi: 26.07.2014

Kabul Tarihi: 13.08.2015

ABSTRACT

Objective: *Toxoplasma gondii*, which is observed in our country and worldwide, can cause mortality and is an important public health problem because of engaging babies from pregnant women. An effective vaccine against toxoplasmosis has not yet been developed. SAG1 protein is released from the bradyzoites and tachyzoites stages of *T. gondii* and is important at the pathogenesis of the disease. This study aimed to clone a promising DNA vaccine candidate, SAG1 gene, of *T. gondii*.

Methods: *T. gondii* genomic DNA was isolated from tachyzoites of *T. gondii*. SAG1 gene was amplified with specific primers and then cloned into the pJET1.2 vector. Recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* cells. The presence of recombinant plasmids was determined by polymerase chain reaction (PCR) screening. Following the purification of the recombinant plasmid from positive colonies, cloning was confirmed by PCR, restriction enzyme assays, and DNA sequence analysis.

Results: After PCR with SAG1 gene-specific primers, 1010-bp PCR products were obtained. Recombinant plasmid, which was transformed into competent *E. coli* cells, was verified by PCR screening. Moreover, PCR verified that the recombinant plasmids contained the SAG1 gene. The DNA sequence was analyzed, and the DNA sequence was obtained.

Conclusion: One of the promising DNA vaccine candidates against toxoplasmosis, SAG1 gene, has been cloned. (Türkiye Parazitol Derg 2015; 39: 255-9)

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmosis, SAG1 Gene, DNA Vaccine, Cloning

Received: 26.07.2014

Accepted: 13.08.2015

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Salih Kuk. E.posta: salihkuk@hotmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2015.3760

©Telif hakkı 2015 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolderg.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2015 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolderg.org

GİRİŞ

Toxoplasma gondii, çeşitli memeli ve kuş türlerini enfekte eden hücre içi zorunlu bir parazittir (1, 2). *T. gondii*, geniş bir konak yelpazesi olan, hem sağlık hem de ekonomik açıdan önemi yüksek bir protozoon parazit olarak kabul edilmektedir. Hem kasaplık hayvanlarda hem de insanlarda transplasental olarak bulaşması sonucunda; düşük, ölü doğum veya anomalili doğumlara neden olmaktadır.

Ayrıca immunokompromize hastalarda diğer birçok organ tutulumu yanında beyin tutulumu sonucu oluşturduğu meningoensefalit tablosu ile ölümlere sebep olmaktadır.

İnsanlara enfeksiyon, kontamine su ve besinleri tüketerek, doku kisti içeren etleri çiğ veya az pişmiş şekilde yiyerek, kan nakli, organ nakli ve transplasental geçiş gibi değişik yollarla bulaşabilmektedir. Dolayısıyla toxoplasmosis dünyada son derece yaygın olarak görülmektedir. Bu tip parazitlerde toplumların gelenekleri ve beslenme alışkanlıkları hastalığın boyutlarını doğrudan etkileyen faktörler arasında önemli bir yer tutmaktadır.

Toxoplasmosise bağlı fetal anomalilerin azaltılması için her yıl yüz milyonlarca doların harcaıldığı ve dünyada enfekte kişilerin tedavisinin yılda 7,7 milyar ABD dolarını bulduğu bildirilmiştir (3).

İnsanlarda bradizoit ve takizoit formu bulunan parazitin oluşturduğu toxoplasmosis hastalığının patogenezinde bir çok faktör rol oynamaktadır. Patogenezde konağa ait faktörlerin yanısıra parazite ait faktörler parazitin tanısının konulması ve parazitten korunmak için aşı geliştirilmesi çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. SAG1 proteini hastalığın patogenezinde önemli olan ve hem bradizoit hem de takizoit dönemlerinden salgılanan bir proteindir. Bu nedenle gerek aşı gerekse tanı için kit geliştirme çalışmalarında hedef molekül olarak günümüze kadar kullanılmıştır.

Bu çalışmada toxoplasmosis patogenezinde önemli rol oynayan ve gerek aşı gerekse tanı çalışmalarında kullanılan SAG1 geninin klonlanması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Total Genomik DNA İzolasyonu

Toxoplasma gondii Rh suş takizoitleri T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan alındı. Total genomik DNA izolasyonu, QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, Germantown, ABD) prosedürü modifiye edilerek yapıldı. Elde edilen son süzüntü içerisindeki total genomik DNA örneği PCR için -20°C'de saklandı.

Toxoplasma gondii SAG1 Gen Primerleri ve PCR

PCR reaksiyonu için aşağıdaki primerler kullanıldı:

TGSAG1 F: (5'-ATT AAG CTT ATG TTT CCG AAG GCA GTG -3')

TGSAG1 R:(5'-ATT GAA TTC TCA CGC GAC ACA AGC TG -3')

PCR reaksiyonu için toplam 25 µl'lik karışım hazırlandı: 12,5 µl Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Tartu, Estonya), 2 µl genomik DNA, 1 µl TgSAG1 F (20 pmol) ve 1µl TgSAG1 R (20 pmol) primeri. 95°C de 5 dk.'lık ön ısıtma sonrası sırasıyla 94°C de 1 dk. denatürasyon, 63°C de 1 dk. bağlanma, 72°C de 1 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 15 dk.'lık son uzama ile biten PCR programı kullanıldı. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1.5'lük agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görün-

tüleme cihazıyla görüntüldü (Carestream, Rochester, ABD).

PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürününün saflaştırılması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Berlin, Almanya) kullanıldı. Kit prosedürü uygulanarak elde edilen 50 µ saflaştırılmış PCR ürünü klonlama işlemine kadar -20°C'de saklandı.

SAG1 Geninin pJET1/2 Plazmidine Yerleştirilmesi

PCR ürününün klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Waltham, ABD) kullanıldı. Klonlama reaksiyonu 18 µl'lik karışım hazırlandı: 10 µl reaksiyon buffer, 1 µl DNA blunting enzim, 1 µl PCR ürünü. Karışım 3-5 sn. vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70°C'de 5 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışım buzlu suya konuldu. Karışıma 1µl pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/µl) (Şekil 3.1.) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenip 20 µl'ye tamamlandı. Karışım 3-5 sn. vortekslenip ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanıldı. Kalan klonlama reaksiyon ürünü olarak -20°C'de saklandı.

Rekombinant Plazmidin Kompetan *E.coli* Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon için 5 µl'lik ligasyon ürünü, buzlu suda bekletilen 100 µl OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücrelerine (Invitrogen, Carlsbad, ABD) eklendi ve buzlu suda 30 dk. inkübe edildi. Karışım 42°C'de 1 dk. bekletildikten sonra tekrar buzlu suya alınarak burada 1 dk. bekletilerek rekombinant plazmidin transformasyonu sağlandı. Daha sonra üzerine 37°C'ye ısıtılmış 250 µl SOC sıvı besiyeri eklendi. Elde edilen karışımı 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edildi. Transformasyon ürünü LB katı besiyere ekilerek 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerdeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besiyerine ekilerek aktarıldı. Besiyeri 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Klonlamanın Doğrulaması

Katı besi yerinde oluşan kolonilerin rekombinant plazmid içerip içermediğini tespit etmek için PCR Tarama yapıldı. 10 koloninin PCR Tarama için her biri 5 µl Master mix (SolisBioDyne FIREPol, Tartu, Estonya), 1 µl TgSAG1 F ve 1 µl TgSAG1 R primeri içeren 10 PCR tüpü hazırlandı. Tüpler numaralandırıldıktan sonra LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden 10 tanesi seçildi. Seçilen koloniler steril kürdanla alınarak tüplerdeki karışımlara bulaştırıldı. Karışımlar distile su ile toplam 25 µl'ye tamamlandı. PCR sonrası elde edilen PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'lük agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntüldü. (Carestream, Rochester, ABD).

Miniprep ve PCR ile Doğrulama

Kolonilerdeki rekombinant plazmidin varlığını doğrulamak için miniprep ve sonrasında PCR yapıldı. Bu amaçla High Pure Plazmid Isolation Kit (Roche, Berlin, Almanya) kullanıldı. PCR Tarama ile pozitif bulunan koloniler 5 ml'lik ampisilinli LB sıvı besiyerlerine ekilerek çalkalayıcı üzerinde 37°C'de bir gece inkübe edildi. Kit protokolü sonrasında rekombinant plazmid elde edildi.

Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid DNA, NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Scientific, Waltham, ABD) ile ölçüldü. Miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid DNA'nın 5'er µl'si alınarak etidyum bromidle boyanmış %1,5'lük agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla

görüntüldü (Carestream, Rochester, ABD).

Ayrıca görüntülenen rekombinant plazmidlerin SAG1 genini içerip içermediğini anlamak PCR yapıldı. PCR kurulurken template olarak miniprep ile elde edilen rekombinant plazmid kullanıldı. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1,5'lük agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntüldü (Carestream, Rochester, ABD).

Restriksiyon Enzim Deneyleri ile Doğrulama

Miniprep ile saflaştırılan rekombinant plazmid, restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlanan genin varlığı doğrulandı. Bunun için pJET1.2/blunt plazmitini klonlama bölgesindeki iki farklı bölgeden kesen *Bgl*III (Promega, Fitchburg, ABD) enzimi kullanıldı. Buzlu su içerisinde, 0,5 ml'lik steril tüpe, sıra ile 16,3 µl steril de-iyonize su, 2µl 10X restriksiyon enzim buffer, 0,2µl BSA ve 1µl DNA eklendi. Pipet yardımı ile karıştırıldıktan sonra 0,5µl *Bgl*III restriksiyon enzimi eklendi. Hazırlanan toplam 20 µl'lik karışım 37°C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ürünler etidyum bromidle boyanmış %1,5'lük agaroz jelde yürütüldü ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntüldü (Carestream, Rochester, ABD).

DNA Dizi Analizi ile Doğrulama

Saflaştırılan rekombinant plazmidlerdeki klonlanan genin varlığı ve dizisi, DNA dizi analizi ile doğrulandı. DNA dizi analizi için pJET1.2 Forward Sequencing Primer, (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'), pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, (5'-AAGAACATCGATTTCCATGGCAG-3') primerleri ve Bigdye Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, ABD) kullanıldı. Sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazında (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, Waltham, ABD) analiz edildi.

DNA dizi analizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Australia) programı ile incelendikten sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programına girildi. Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *Toxoplasma* DNA dizileri ile karşılaştırıldı.

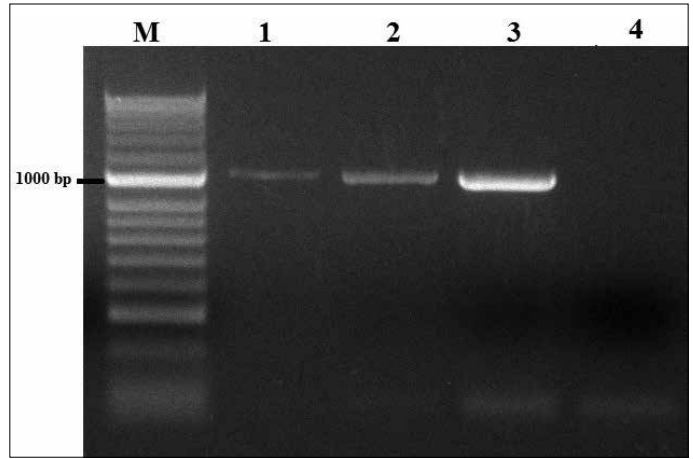
BULGULAR

SAG1 genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonrasında 1010 baz çiftlik PCR ürünü, %1,5'lük agaroz jelde 100 bç'lik eşliğinde yürütüldü ve görüntüldü (Resim 1).

Elde edilen 1010 bç'lik PCR ürünü pJET1.2/blunt klonlama vektörüne yerleştirildi. Ligasyon ürünü OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* kompetan hücrelerine transforme edildi. Bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edildi (Resim 2).

Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant plazmidini içerip içermediğini anlamak için PCR-Tarama yapıldı. Katı besiyerinden seçilen kolonilerin rekombinant plazmidini içerdiği PCR Tarama ile 1010 baz çiftlik PCR ürünü gösterildi (Resim 3).

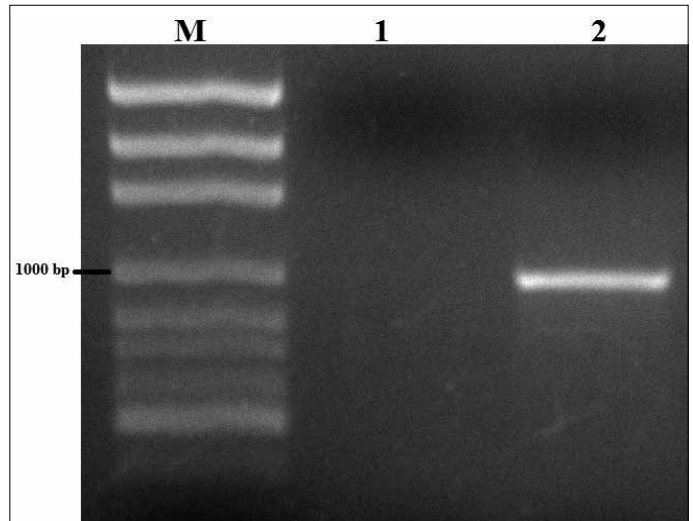
Rekombinant plazmid varlığı tespit edilen koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmidler saflaştırıldı. Rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği PCR ile gösterildi. Miniprep ile saflaştırılan rekombinant plazmid, pjetTg-SAG1 olarak isimlendirildi. Ayrıca saflaştırılan rekombinant plazmidler, *Bgl*III restriksiyon enzimleri ile kesildi ve klonlanan genin varlığı doğrulandı (Resim 4).



Resim 1. *T. gondii* 1010 bp uzunluğundaki PCR ürününün %1,5'lük agaroz jelde görüntülenmesi. M;100 bp Ladder, 1; gDNA miktarı 1µl, 2; gDNA miktarı 3µl, 3; gDNA miktarı 5µl, 4; negatif kontrol



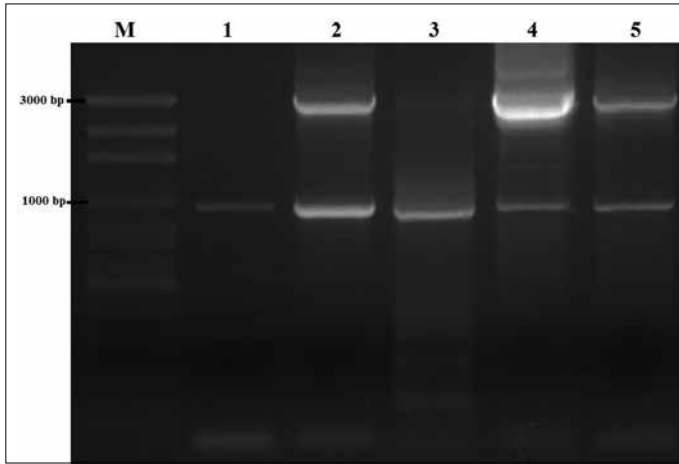
Resim 2. Transformasyon sonrası üretilen koloniler



Resim 3. PCR Screening ürünleri. M; 100 bp Ladder 1; negatif kontrol, 2; pozitif örnek

Tablo 1. DNA dizi analizi ile elde edilen *T. gondii* SAG1 genine ait DNA dizisi

1	atgtcgggt	tcgtgcacca	cttcattatt	tcttctgggt	ttttgacgag	tatgtttccg
61	aaggcagtga	gacgcgccgt	cacggcaggg	gtgtttgccg	cgcccacact	gatgtcgttc
121	ttgcgatgtg	gcgttatggc	atcgatccc	cctctgttg	ccaatcaagt	tgtcacctgc
181	ccagataaaa	aatcgacagc	cgcggtcatt	ctcacaccga	cggagaacca	cttcactctc
241	aagtgcctca	aaacagcgct	cacagagcct	cccactcttg	cgtactcacc	caacaggcaa
301	atctgcccag	cgggtactac	aagtagctgt	acatcaaagg	ctgtaacatt	gagctccttg
361	attcctgaag	cagaagatag	ctggtggacg	ggggattctg	ccagtctcga	cacggcaggg
421	atcaaactca	cagtccaat	cgagaagttc	cccgtgacaa	cgcagacggt	tgtggtcggg
481	tgcatcaagg	gagacgacgc	acagagttgt	atggtcacag	tgacagtaca	agccagagcc
541	tcatacggcg	tcaataatgt	cgcaagggtc	tctacgggtg	cagacagcac	tcttggctct
601	gtcaagttgt	ctgcggaagg	accactaca	atgaccctcg	tgtgcgggaa	agatggagtc
661	aaagtctctc	aagacaacaa	tcagtactgt	tccgggacga	cgctgactgg	ttgcaacgag
721	aaatcgttca	aagatatttt	gcaaaaatta	actgagaacc	cgtggcaggg	taacgcttcg
781	agtgataagg	gtgccacgct	aacgatcaag	aaggaagcat	ttccagccga	gtcaaaaagc
841	gtcattattg	gatgcacagg	gggatcgctt	gagaagcatc	actgtaccgt	gaaactggag
901	ttgcccgggg	ctgcagggct	agcaaatcgc	gtcgcgggaa	cagccagtca	cgtttcatt
961	ttgcatggg	tgatcgagct	tattggctct	atcgacgctt	gtgtcgcgtg	a

**Resim 4.** Rekombinant plazmid ürünleri.

M.100 bp Ladder, 1; 1010bç'lik pozitif *T. gondii* SAG1 PCR ürünü, 2-5; rekombinant plazmidten elde edilen PCR ürünleri

Klonlamanın doğruluğunu kesinleştirmek için son olarak rekombinant plazmidin DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan genin DNA dizisi elde edildi (Tablo 1).

TARTIŞMA

Toxoplasma gondii'nin hayat döngüsü; takizoit, bradizoit ve sporozoit olmak üzere üç enfektif dönem içermektedir. SAG1 geni takizoit dönemine spesifik bir antijendir. *T. gondii* antijenleri içerisinde en iyi karakterize edilenlerden biri olan SAG1 yüksek derecede korunmuş bir genidir. SAG1 antijenine karşı vücutta hem humoral hem de hücrel immun cevap oluşmaktadır. Bu nedenle; SAG1, gerek parazitin tanısında gerekse parazite karşı aşı çalışmalarında yoğun olarak kullanılan bir antijen olmuştur (3, 4).

Rekombinant SAG1 proteini insanlarda tanı amacıyla ELISA'da kullanılmış ve sensitivitenin %93,9 spesifitesinin ise %100 olduğu

bildirilmiştir (5). ELISA'nın yanı sıra avidite testlerinde de rekombinant SAG1 proteini başarı ile kullanılarak ticari kitler geliştirilmiştir (6). SAG1 proteini, tanı çalışmalarında tek başına kullanıldığı gibi GRA1 ve GRA7 gibi rekombinant proteinlerle de kombine edilerek kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (7, 8). SAG1 geni tanı çalışmaları dışında aşı çalışmalarında da en önemli aday molekül olarak kabul edilmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda SAG1 gen tabanlı DNA aşılmasının hem humoral hem de hücrel cevabı uyardığı *T. gondii*'ye karşı kısmi koruma sağladığı gösterilmiştir (9). SAG1 geni tek başına veya diğer aday moleküllerle beraber kullanılarak *T. gondii*'ye karşı geliştirilecek aşının etkinliği artırılmaya çalışılmıştır (10, 11, 12).

İnsanda *T. gondii* enfeksiyonu tanısında birçok zorlukla karşılaşmaktadır. Bu zorluklardan bir kısmını tanı testlerinin sensitivite ve spesifitesinin düşüklüğü oluşturmaktadır. Bunun yanında tanı için değerlendirilecek örneğin idrar, kan, balgam, BOS gibi farklı materyaller olması yeni zorlukları da karşımıza çıkarmaktadır. Bu nedenle insan serum ve tükürüğünde *T. gondii* spesifik IgG antikorlarını tespit edebilecek rekombinant SAG1 antijeni içeren ELISA geliştirilmiştir. Toxoplazmosiste immun hastalardan elde edilen 49 serum örneği ve nonimmun kontrol grubundan elde edilen 42 serum örneği çalışmada değerlendirilmiştir. Rekombinant SAG1 serum bazlı ELISA'da IgG antikorları %100 sensitif ve spesifik olarak bulunmuştur (13).

Birçok tanı testinde *T. gondii* lizat ve tam hücre antijenleri kullanılırken bunun yerine MIC1-MAC1-SAG1'den oluşan kimerik proteinin tanı amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada üç proteinin tamamı yerine MIC1'in 25-182. aminoasitler arası, MAC1'in 30-220 aa arası ve SAG1'in 49 ile 198'inci aa arası 270 serum örneğini değerlendirmek için kullanılmıştır. Sonuç olarak insan serum örneklerinde *T. gondii* enfeksiyonunun tespiti için MIC1-MAC1-SAG1 kimerik antijeninin etkin ve ümit verici bir aday olarak ticari testlerde kullanılabileceği belirtilmiştir (14).

SAG1 genini içeren multi-antijenik DNA aşısının IL-12 ile birlikte verilmesinin *T. gondii*'ye karşı güçlü, etkin ve uzun süreli koruma sağladığı bildirilmiştir (15).

SONUÇ

Bu çalışmada; *T. gondii* SAG1 geni elde edilmiş ve klonlanmıştır. Klonlama sonrası DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizi sonucunda kullanılan standart *T. gondii* suşunda mutasyonların olmadığı BLAST analizi ile tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen SAG1 geni immün yanıtı arttırmak amacıyla genetik ya da genetik olmayan adjuvanlarla kombine edilerek gerek DNA aşısı gerekse protein aşısı olarak kullanılabilir. Ayrıca SAG1 genine ilaveten güçlü humoral ve hücrel immün yanıt oluşturan *T. gondii*'nin diğer antijenleri de elde edilebilir. Bu antijenlerin SAG1 geni ile kombinasyonu sonrasında DNA aşısı ve rekombinant protein aşısı oluşturulabilir. SAG1 geni ve proteinine eklenecek diğer *T. gondii* gen ve proteinlerine ilaveten aşı protokollerine eklenecek genetik ve genetik olmayan adjuvanlarla etkin bir aşı oluşturulmaya çalışılabilir. Bu aşının etkinliği laboratuvar hayvan modellerinde akut ve kronik toksoplazmosis karşı koruyuculuğu hücrel ve humoral immün yanıtı uyarmadaki yeterliliği açısından test edilebilir. Diğer taraftan, aşı yanında ELISA ve avidite tanı kitleri için de klonlanan SAG1 geninin ekspresyonu ettiği protein kullanılabilir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayına gerek yoktur.

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - H.L., S.K., S.Y.; Tasarım - H.L., E.G., S.K.; Denetleme - S.Y., S.K.; Kaynaklar - H.L., S.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - H.L., E.G., S.K.; Analiz ve/veya Yorum - S.K., S.Y.; Literatür Taraması - H.L., S.K.; Yazıyı Yazan - S.K.; Eleştirel İnceleme - S.K., S.Y.

Teşekkür: Yazarlar, bu çalışmayı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür eder (Proje Kodu: TYL-2012-4295).

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TYL-2012-4295) tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval is not required for this study.

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - H.L., S.K., S.Y.; Design - H.L., E.G., S.K.; Supervision - S.Y., S.K.; Funding - H.L., S.K.; Data Collection and/or Processing - H.L., E.G., S.K.; Analysis and/or Interpretation - S.K., S.Y.; Literature Review - H.L., S.K.; Writer - S.K., Critical Review - S.K., S.Y.

Acknowledgement: The authors would like to thank to Erciyes University Scientific Research Projects Unit that supported our study (Project Code: TYL-2012-4295).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was financially supported by Erciyes Üniversitesi Scientific Research Projects Unit (TYL-2012-4295)

KAYNAKLAR

1. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. Sherris Medical Microbiology. Fourth Edition. New York: McGraw Hill Medical; 2014; 722-7.
2. Ferreira da Silva Mda F, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. Mol Biosyst 2008; 4: 824-34. [CrossRef]
3. Caner A. Kök hücre ve karaciğer transplantasyonu hastalarında toksoplazmosisin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve nested polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile takibi. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2007; 164.
4. Doğan KB. Gebelerde *Toxoplasma gondii* ve sitomegalovirüs seropozitiflik, serokonversiyon ve fetusa geçiş oranının değerlendirilmesi. Malatya: İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2006; 42.
5. Durdu B. Sağlıklı gebelerde *Toxoplasma gondii* seropozitifliği, IgG avidite değerlerinin incelenmesi ve seropozitifliğe etki eden çeşitli risk faktörlerinin araştırılması. İstanbul: Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. 2008; 57.
6. Yaman K. *Toxoplasma gondii* antijenlerinin karakterizasyonu. Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2007; 37.
7. Kotresha D, Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. APMIS 2010; 118: 529-42. [CrossRef]
8. Lekutis C, Ferguson DJ, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. Exp Parasitol 2000; 96: 89-96. [CrossRef]
9. Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. J Immunol 1991; 147: 3496-500. [CrossRef]
10. Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. Exp Parasitol 1992; 74: 106-11.
11. Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int J Parasitol 1996; 26: 169-73. [CrossRef]
12. Kasper LH. Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol 1987; 9: 433-45. [CrossRef]
13. Chahed Bel-Ochi N, Bouratbine A, Mousli M. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G antibodies in human sera and saliva. Clin Vaccine Immunol 2013; 20: 468-73. [CrossRef]
14. Holec-Gasior L, Ferra B, Drapala D. MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. Clin Vaccine Immunol 2012; 19: 1977-9. [CrossRef]
15. Xue M, He S, Cui Y, Yao Y, Wang H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. Parasitol Int 2008; 57: 424-9. [CrossRef]