JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره دوم، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۹: ۱۲۹-۱۲۳

کلونینگ ژن *lipL41* با هدف تولید کنترل مثبت جهت تشخیص لپتوسپیراهای بیماریزا

مریم سادات سلطانی[۱]، پژواک خاکی[۲*]، سهیلا مرادی بیدهندی[۲]، محمد حسن شاه حسینی[۱] و سما رضا سلطانی[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- بخش میکروب شناسی، مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۲ آبان ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۲۳ فروردین ۱۳۹۳

چکیده

لپتوسپیروزیس، یکی از شایع ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان با انتشار جهانی می‌باشد. مشخص شده که LipL41 یک پروتئین غشای خارجی ایمونوژنیک می‌باشد که در لپتوسپیراهای بیماریزا وجود دارد و می‌تواند در روش‌های تشخیص سرولوژیکی و همچنین به عنوان یک کاندیدای مناسب در تهیه واکسن‌های نوترکیب به کار برده شود. هدف از این تحقیق بهره گیری از خصوصیات ژن lipL41 به منظور طراحی یک کنترل مثبت در افتراق سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا از غیربیماریزا با استفاده از PCR می‌باشد. در این تحقیق از پنج سروار بیماریزای لپتوسپیرا و یک سروار غیر بیماریزا استفاده گردید. باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی (EMJH) کشت داده شدند و DNA ژنومیک آن‌ها تخلیص گردید. ژن lipL41 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. جهت انجام کلونینگ ژن مورد نظر، محصول PCR، خالص سازی شده و در وکتور pTZ57R/T الحاق گردید و در باکتری اشریشیا کلی (Top10) کلون گردید. تأیید حضور lipL41 در کلنی‌های نوترکیب با برداشت از کلنی‌های رشد یافته روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین و انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر انجام شد. تخلیص DNA نوترکیب توسط کیت انجام گرفت. سپس پلاسمید حاوی ژن مورد نظر تعیین ترادف شد. محصول PCR به دست آمده یک قطعه ۱۰۶۵ bp را نشان می‌داد که نشان دهنده تکثیر ژن lipL41 بود این ژن فقط در سروارهای بیماریزا حضور دارد در صورتی که در سروار غیر بیماریزای لپتوسپیرا بایفلکسا مشاهده نگردید. تخلیص کلونی‌های مثبت وکتور پلاسمیدی به وسیله کیت صورت گرفت. واکنش PCR برای DNA نمونه به همراه کنترل مثبت در دو تیوب جداگانه انجام شد. محصول PCR مربوط به نمونه و کنترل مثبت با ژل الکتروفورز و سایز مارکر مقایسه و مورد تأیید قرار گرفت. به علت کند رشد بودن لپتوسپیرا و شرایط خاص نگهداری و عدم دسترسی همگان به سوش‌های رفرانس، استفاده از یک تست سریع و دقیق مولکولی مانند PCR به همراه یک کنترل مثبت به منظور تأیید صحت آن ضروری می‌باشد. بنابراین می‌توان از ژن کلون شده در این تحقیق که در آزمایشگاه تشخیصی لپتوسپیرا آماده شده است، به عنوان کنترل مثبت در آزمایش PCR در تمام آزمایشگاه‌ها استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *لپتوسپیروزیس، PCR، ژن lipL41، کنترل مثبت*

*نویسنده مسئول: پژواک خاکی

آدرس: بخش میکروب شناسی، مرکز تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۳۸۹۴۹۸۶

پست الکترونیک: p.khaki@rvsri.ac.ir

مقدمه

لپتوسپیروزیس، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های باکتریایی مشترک بین انسان و حیوان در سراسر جهان است که در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری، به خصوص نواحی که دارای بارندگی زیاد می‌باشند بیشتر رخ می‌دهد (۴و۱). این بیماری توسط باکتری *لپتوسپیرا* ایجاد می‌شود که به دو گروه بیماریزا و ساپروفیت تقسیم‌بندی شده و بر اساس ساختار آنتی ژنی به سروارهای مختلف گروه بندی می‌شود (۱).

علائم بالینی بیماری در بیشتر موارد مشابه آنفلوانزا بوده و در صورت عدم تشخیص و درمان به موقع، بیماری وارد فاز حاد شده و صدمات جدی و طولانی مدت ایجاد می کند (۱۰). از روش‌های تشخیصی، مشاهده مستقیم باکتری در نمونه‌های کلینیکی توسط میکروسکوپ دارک فیلد را می‌توان نام برد که این روش بسیار مشکل و دارای حساسیت و ویژگی کمی می‌باشد و از طرف دیگرحساسیت و جدا کردن باکتری نیز از نمونه‌های کلینیکی با روش تشخیصی کشت در مورد این باکتری به دلیل کند رشد بودن و نیازمندی غذایی بالا، نیاز به انکوباسیون طولانی مدت و احتمال آلودگی کشت و ایجاد خطر برای کارکنان آزمایشگاه با موانع زیادی همراه است (۱۶و۱۳). با این که آزمایش آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) برای تشخیص این بیماری روشی استاندارد محسوب می‌شود ولی این روش نیز به دلیل نیاز به کشت *لپتوسپیرا* و کار با باکتری زنده با مشکلاتی مواجه است از جمله این که در این روش، نیاز به نگهداری دائمی‌تعداد کافی از سویه‌های استاندارد و پاساژ دائمی آن‌ها می‌باشد، که پرهزینه بوده و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیست. همچنین آزمایش MAT در مرحله حاد بیماری و زمان دفع باکتری از ادرار، قادر به شناسایی تیتر آنتی بادی نمی‌باشد (۱۲و۷). همچنین در روش سرولوژی ELISA نیز احتمال بروز پاسخ‌های مثبت کاذب وجود دارد، پس با توجه به موارد ذکر شده و از آن جایی که درمان فقط در روزهای اول بیماری موثر است، تشخیص صحیح و زود هنگام این بیماری حائز اهمیت است. به کار بردن تست مولکولی PCR برای تشخیص عفونت‌های لپتوسپیرایی خصوصاً در اوایل بیماری به عنوان یک روش سریع، حساس و اختصاصی مناسب می‌باشد (۱۵و ۶، ۵). ژن *lipL41* در میان سروارهای بیماریزای *لپتوسپیرا* مشاهده می‌شود و این ژن در میان آن‌ها به شدت حفظ شده است، ولی در سروارهای غیربیماریزای *لپتوسپیرا* دیده نمی‌شود به طوری که از این ژن می‌توان در تشخیص و افتراق سروارهای بیماریزا از سروارهای غیربیماریزا بهره جست (۲۱و۱۸، ۸).

مواد و روش کار

سروارهای *لپتوسپیرا* و کشت آنها

در این تحقیق از چهار سروار بیماریزای *لپتوسپیرا اینتروگانس*: Sejroe hardjo (RTCC2821), Canicola (RTCC2805) (Icterohaemorrhagiae Pomona (RTCC2812), RTCC 2815 و یک سروار غیربیماریزا *لپتوسپیرا بایفلکسا* (RTCC 2819) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه رفرانس *لپتوسپیرا* بخش میکروب شناسی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج استفاده گردید.

باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی EMJH (شرکت Difco) همراه با سرم خرگوش و مکمل‌های غذایی در شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و بعد از ۱۰-۷ روز رشد آن‌ها توسط میکروسکوپ دارک فیلد مورد بررسی قرار گرفت.

سپس نمونه‌ها جهت رسوب گیری در g ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند.

تخلیص DNA

جهت تخلیص DNA ژنومیک از روش استاندارد فنل کلروفرم ایزوامیل الکل استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA تخلیص یافته توسط الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

PCR

در این تحقیق به منظور شناسایی سروارهای بیماریزای *لپتوسپیرا* و افتراق آن‌ها از سروارهای غیربیماریزا از پرایمرهای اختصاصی *lipL41* استفاده شد که توالی آن‌ها به صورت زیر می‌باشد:

Forwad Oligonucleotide primer: **5'** TGTTACCCATGGGGAGAAAATTATCTTCTCT **3'**
Reverse Oligonucleotide primer: **5'** AAAGGACTCGAGTTACTTTGCGTTGCTTTC3'

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر (مقدار ۱۰۰نانوگرم DNA، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۲۵ µl (Master Mix 2x) (شرکت Ampliqon) طبق برنامه زیر انجام شد:

برای دناتوراسیون اولیه، DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای C° ۹۴ قرار داده شد و بعد از آن دناتوراسیون در C° ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، الحاق پرایمرها به DNA هدف در C° ۵۷ به مدت ۱ دقیقه وتکثیر پرایمرها در C° ۷۲ به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه تکرار شد و سرانجام ۱۰ دقیقه جهت تکثیر نهایی در C° ۷۲ قرار گرفت. محصول PCR تمام نمونه‌ها توسط ژل الکتروفورز ارزیابی و تأیید گردید.

کلونینگ و تخلیص پلاسمید نوترکیب و تعیین توالی

محصول PCR ژن *lipL41* *لپتوسپیرا اینتروگانس* سروار Sejroe hardjo (RTCC2821) به کمک کیت (شرکت Fermentas) خالص سازی گردید و در وکتور pTZ57R/T الحاق گردید و به باکتری *اشریشیا کلی* (Top10) انتقال داده شد. پس از قرار دادن سلول و وکتور به مدت یک ساعت روی یخ، سلول‌ها در دمای C° ۴۲ به مدت یک و نیم دقیقه در بن ماری تحت تاثیر شوک گرمایی قرار گرفته و بلافاصله مجددا به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. نهایتا سلول‌ها روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین در C°۳۷ به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. سپس حضور ژن *lipL41* در کلنی‌های نوترکیب توسط PCR تائید گردید (Colony PCR). کلنی‌های نوترکیب در محیط مایع LB حاوی آمپی سیلین رشد کرده وتخلیص پلاسمید از سلول‌ها توسط کیت (شرکت Roche) انجام شد (۱۷).

پلاسمید حاوی ژن مورد نظر جهت تأیید توالی ژن *lipL41* به شرکت Macrogen کره جنوبی فرستاده شد.

نتایج

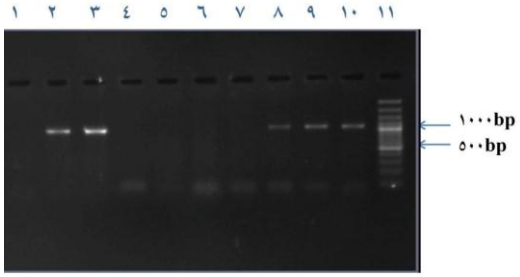
محصول PCR به دست آمده یک قطعه bp ۱۰۶۵ را نشان می‌داد که نشان دهنده تکثیر ژن *lipL41* بود، سپس توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ٪۱ و با استفاده از سایز مارکر bp ۱۰۰ (شرکت (Fermentas) مورد تأیید قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ژن فقط در سروارهای بیماریزا حضور داشته در حالی که در سروار غیربیماریزای *لپتوسپیرا بایفلکسا* وجود ندارد (شکل ۱). ژن *lipL41* تکثیر یافته *لپتوسپیرا اینتروگانس* در وکتور pTZ57R/T الحاق گردید و به باکتری *اشریشیا کلی* (Top10) انتقال داده شد. تأیید حضور ژن *lipL41* در کلنی‌های نوترکیب با برداشت از کلنی‌های رشد یافته روی پلیت LB آگار حاوی آمپی

سیلین و انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر انجام شد (شکل۲).

شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی براساس ژن *lipL41* جهت شناسایی سروارهای بیماریزا از غیربیماریزا بر روی ژل آگارز ۱٪ به کمک مارکر bp ۱۰۰. شماره ۱ (سایز مارکر)، شماره ۲ (کنترل مثبت) (*L. interrogans* Sejroe hardjo)، شماره ۳ (*L. interrogans* Canicola)، شماره ٤ (*L. interrogans* Icterohaemorrhagiae) شماره ٥ (*L. interrogans* Pomona)، شماره ٦ (*L.biflexa*)، شماره ۷ (کنترل منفی).

بحث و نتیجه گیری

لپتوسپیروزیس یک بیماری زئونوز با انتشار جهانی می‌باشد (۲۳ و ۲۲). براساس گزارش‌های به دست آمده از نقاط مختلف کشور در خصوص افزایش وقوع بیماری و با توجه به اهمیت جنبه‌های بهداشتی و اقتصادی ناشی از لپتوسپیروزیس، بررسی و مطالعه روش‌های سریع تشخیص این بیماری امری مهم تلقی می‌گردد (۹).



شکل ۲- بررسی ژن کلون شده *lipL41* در باکتری *اشریشیا کلی* (Top10) توسط کلنی PCR. شماره ۱ (کنترل منفی)، شماره ۲ (کنترل مثبت)، شماره ۳-۸-۹-۱۰(کلنی‌های PCR مثبت، شماره‌های٤-٥-٦-۷ (کلنی‌های PCR منفی) شماره۱۱(سایز مارکر bp ۱۰۰).

همچنین به علت شرایط خاص نگهداری این باکتری، دسترسی همگان به سوش‌های استاندارد محدود می‌باشد. بنابراین PCR به عنوان یک روش سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص عفونت‌های لپتوسپیرایی خصوصا در اوایل بیماری بسیار حائز اهمیت است (۲۴ و ۳) و انجام آن بر مبنای ژن *lipL41* که در میان سروارهای بیماریزا ثابت است برای شناسایی لپتوسپیراهای بیماریزا در نمونه‌های کلینیکی بسیار مفید می‌باشد (۲۱ و ۱۸، ۱۱).

از سال ۱۹۹۰ تا به حال چندین پروتکل PCR جهت تشخیص DNA *لپتوسپیرا* در نمونه‌های کلینیکی به کار گرفته شده است که اکثر آن‌ها حساسیت بالایی را نشان دادند (۱۹و۱۷، ۵، ۳، ۲). بنابراین می‌توان از روش PCR برای تشخیص سریع و دقیق این باکتری بهره جست. در تحقیقات مختلف انجام شده در سطح دنیا توسط دیگر محققین، حضور ژن *lipL41* در میان سروارهای بیماریزای *لپتوسپیرا* مورد بررسی و تأیید قرارگرفته است (۲۱و۱۸، ۱۴، ۱۱، ۸). در سال ۲۰۰۵ Natarajaseenivasan و همکاران به کمک آزمایش PCR میزان ثبات ژن‌های *lipL41* و *ompL1* را در *جدایه‌های لپتوسپیرا* و همین طور در سویه‌های رفرانس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این دو ژن در میان لپتوسپیراهای بیماریزا پایدار و حفظ شده می‌باشند و بنابراین می‌توان از آن‌ها به منظور استفاده در تشخیص لپتوسپیروزیس بهره برد (۱۴). همچنین در مطالعه ای در سال ۲۰۰۵ توسط Theodoridis و همکاران، PCR بر مبنای ژن *lipL41* برای تشخیص سریع و قابل اعتماد لپتوسپیراهای بیماریزا در نمونه‌های مختلف بالینی تأیید شد (۲۰).

نتایج تحقیق ما با نتایج سایر محققین در خصوص وجود ژن *lipL41* در لپتوسپیراهای بیماریزا و عدم وجود آن در سروارهای غیر بیماریزا مطابقت دارد. با توجه به دستیابی به نتایج مشابه با مطالعات سایر محققین در نقاط مختلف دنیا در خصوص حضور ژن *lipL41*

در سروارهای بیماریزای *لپتوسپیرا* می‌توان از این ژن برای افتراق لپتوسپیراهای بیماریزا از غیر بیماریزا استفاده کرد. ولی در اکثر واکنش‌های PCR به علت استفاده نکردن از یک کنترل مثبت در کنار نمونه‌ها، هنگام عدم مشاهده باند در نمونه‌های مورد آزمایش، قضاوت قطعی در مورد منفی بودن نتیجه واکنش همواره با تردید همراه است بنابراین به منظور تأیید نتایج آزمایش PCR، وجود کنترل مثبت در کنار نمونه‌های مورد آزمایش ضروری است.

با توجه به موارد ذکر شده می‌توان از ژن کلون شده در این تحقیق که به صورت یک قطعه ژن خالص در آزمایشگاه تشخیصی لپتوسپیرا موسسه واکسن و سرم سازی رازی آماده شده است، به عنوان کنترل مثبت جهت استفاده در آزمایش PCR در تمام آزمایشگاه‌ها استفاده نمود.

منابع

1. Adler, B., and A. de la Peña Moctezuma. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* **140**: 287-96.
2. Ambily, R., Siju Joseph, M., Krishna, S.V. (2012). lipL41 gene specific PCR for the detection. *JIVA* **10**: 5-7.
3. Bal, A.E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R.A., De Meza-Brewster, J., Korver, H., Terpstra, W.J. (1994). Detection of Leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 1894-8.
4. Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, m.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* **3**: 757-71.
5. Brown, P.D., Gravekamp, C., Carrington, D.G., Van de Kemp, H., Hartskeerl, R.A., Edwards, C.N., PN, L. (1995). Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* **43**: 110-4.
6. Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F.P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E.D., Ferreira, A.G.P., Riley, L.W., Reis, M.G., Haake, D.A., Ko, A.I. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 3303-10.
7. Fraune, C.K., Schweighauser, A., Francey, T. (2013). Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *Journal of American Veterinary Medicine Association* **242**: 1373-80.
8. Haake, D.A., Mazel, M.K., McCoy, A.M., Milward, F., Chao, G., Matsunaga, J., EA, W. (1999). Leptospiral outer membrane proteins ompL1 and lipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and immunity* **67**: 6572-82.
9. Khaki, P., Moradibidhendi, S., Vand e Yousefi, J. (2005). Prevalence Of leptospirosis in Iran p. 179, *4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society*, Thailand.
10. Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 296-326.
11. Lin, X.A., Sun, A., Ruan, P., Zhang, Z., Yan, J. (2011). Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira* interrogans major outer membrane proteins ompL1 and lipL41. *BMC Microbiology* **11**: 21.
12. Mulla, S., Chakraborty, T., Patel, M., Pandya, H.P., Dadhaniya, V., Vaghela, G. (2006). Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT

techniques. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* **49**: 468-70.
13. Musso, D., La Scola, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **46**: 245-52.
14. Natarajaseenivasan, K., Vijayachari, V., Sharma, S., Sugunan, A.P., Sehgal S.C. (2005). Phenotypic & genotypic conservation of ompL1 & lipL41 among leptospiral isolates of Andaman Islands. *Indian Journal of Medical Research* **122**: 343-7.
15. Ooteman, M.C., Vago, A.R., Koury, M.C. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal Microbiology Methods* **65**: 247-57.
16. Palaniappan, R.U., Ramanujam, S., YF, C. (2007). Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Current Opinion in Infectious Disease* **20**: 284-92.
17. Perez, J., Goarant, C. (2010). Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology* **10**: 325.
18. Shang, E., Theresa, A., Haake, D. (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding lipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infection and immunity* **64**: 2322-30.
19. Smythe, L.D., Smith, I.L., Smith, G.A., Dohnt, M.F., Symonds, M.L., Barnett, L.J., McKay, D.B. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira spp*. *BMC Infectious Diseases* **2**: 13.
20. Theodoridis, D., Böhmer, J., Homuth, M., Strutzberg-Minder, K. (2005). Development of a novel ELISA for serodiagnosis of leptospirosis and additional detection of pathogenic *Leptospira* by polymerase chain reaction for veterinary routine diagnostics. *Revista Cubana de Medicine Tropical* **57**: 49-50.
21. Vedhagiri, K., Natarajaseenivasan, K., Chellapandi, P., Prabhakaran, S.G., Selvin, J., Sharma, S., Vijayachari, P. (2009). Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes ompL1, lipL32 and lipL41 of pathogenic *Leptospira* Species. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* **7**: 96-106.
22. Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences* **33:**557-69.
23. WHO (1999). Leptospirosis worldwide. *The Weekly Epidemiological Record* **74**: 237-42.
24. Zuerner, R., Haake, D., Adler, B., Segers, R. (2000). Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**: 455-62.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 2, 2014

Cloning of the *lipL41* Gene for Preparation of Positive Control to Detection of Pathogenic Leptospires

Soltani, M.S.[1], Khaki, P.[2]*, Moradi-Bidhendi, S.[2], Shahhosseiny, M.H.[1], Soltani, S.R.[1]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- National Reference Laboratory for Leptosera, Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran

Received date:3 November 2013 *Acceptance date: 12 April 2014*

Abstract: *Leptospirosis is one of the most important zoonosis with worldwide distribution. lipL41 is an immunogenic outer membrane protein found in pathogenic Leptospira species and may be used in diagnostic method and also can be a good candidate for recombinant vaccine against leptospirosis. The aim of this study was designing a positive control for molecular diagnosis of pathogenic Leptospira spp. by PCR based on lipL41 gene. Five pathogenic serovars and one saprophytic species were used in this study. The serovars were subcultured into the selective culture medium (EMJH) and then the genomic DNA extracted. The lipL41 gene amplified using the specific primers. The PCR product were ligated in pTZ57R/T vector and transformed in competent E. coli Top10 cells. The confirmation of the recombinants was made by picking the white colonies and carrying out colony PCR amplification of the gene. The recombinant plasmids were extracted using a commercial extraction kit. PCR amplification of the lipL41 gene using the specific primers resulted in a 1065 bp in all five pathogenic serovars tested. No PCR products were amplified from the non-pathogenic L. biflexa. Positive colonies plasmid vector was isolated from cells by kit. PCR test was carried out with positive control and PCR products were observed on gel electrophoresis. Due to slow growth of Leptospira, and because of limited diagnostic capacity using a rapid and accurate molecular tests like PCR with a positive control to confirm its accuracy is essential. Therefore, the cloned lipL41 gene in this study that has been prepared in Leptospira reference laboratory can be used as a positive control in all laboratories using the PCR test.*

Keywords: *Leptospirosis, PCR, lipL41 gene, Positive control*

[*]Corresponding author: Khaki, P.
Address: Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. Tel: 09123894986
Email: p.khaki@rvsri.ac.ir