

کلون‌سازی و بررسی بیان ژن ureG به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری

زهرا محمودی واشیان^۱(MSc) - دکتر عباس دوستی^۱(PhD)

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۰۶/۱۵ تاریخ ارسال: ۹۶/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۲/۰۶

چکیده:

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری، نوعی باکتری گرم منفی است که جمعیت زیادی از جوامع انسانی را در سراسر جهان دچار کرده است. اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری برای بقای آن در معددهی انسان ضروری است و ژن ureG یکی از مهم‌ترین عوامل مهم بیماری‌زایی آن است.

هدف: کلون‌سازی ژن ureG برای ایجاد واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نخست از هلیکوباکتر پیلوری DNA استخراج شد. تکثیر ژن ureG با استفاده از پرایمرهای ویژه این ژن انجام و فرآورده PCR به روش کلون‌سازی T/A در وکتور pTZ وارد شد. سپس، ژن ureG از درون وکتور pTZ با آنزیم‌های XbaI و SalI برش داده شد و در وکتور بیانی pCI-neo، ساب‌کلون شد. وکتور نو ترکیب pCI-neo-ureG را به روش الکتروپوریشن وارد سلول CHO کرده و بیان ژن ureG بر ژل SDS-PAGE مشاهده شد.

نتایج: تکثیر و جداسازی ژن ureG هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR با موفقیت انجام شد. نتایج نشان داد ژن ureG به ترتیب در وکتورهای pTZ و pCI-neo به درستی کلون شده و سازواره فرجامین(نهایی) pCI-neo-ureG تولید شده است. نتیجه وارد سازی سازواره نهایی در سلول CHO نیز نشان دهنده بیان و ایجاد یک باند ۲۳ کیلودالتونی روی ژل SDS-PAGE بوده است.

نتیجه‌گیری: ژن ureG کلون‌سازی شده در وکتور بیانی pCI-neo توانایی بیان و تولید فرآورده پروتئینی اختصاصی این ژن در سلول جانوری CHO را دارد. بنابراین، این سازواره ژنی را می‌توان به عنوان کاندیدای مناسبی برای بررسی‌های بعدی در مورد واکسن‌های نو ترکیب علیه هلیکوباکتر پیلوری در الگوی حیوانی شناساند.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، همانند سازی، موجود زنده

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و شش، شماره ۱۰۲، صفحات: ۲۹-۲۰

مقدمه

لایه‌ی موکوس پوشاننده سلول‌های اپی‌تلیال معددهی (pH: ۶-۷) رشد می‌کند و کلونی تشکیل می‌دهد ولی به مخاط نمی‌تازد (۵و۴). هلیکوباکتر پیلوری پروتئین‌های آن برای رشد خود باعث تعدیل pH مخاط معده و هماهنگی آن برای رشد خود می‌شود (۳). این ارگانیزم، همچنین، می‌تواند آنزیم اوره‌آز نیرومندی تولید کند و سبب تجزیه‌ی اوره و تولید آمونیاک و گاز کربنیک شود (۲). آمونیاک، توکسین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط این باکتری می‌توانند به طور مستقیم بر سلول‌های مخاطی معده اثر بگذارد و باعث آسیب آن‌ها شود (۵و۲). آلودگی هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان است که کمابیش نیمی از جمعیت جهان دچار آن هستند. همچنین، نشان داده شده که

هلیکوباکتر پیلوری گونه‌ای از هلیکوباکتر بوده و یکی از شاخه‌های پروتئوباکتریا، رده اپسیلون پروتئوباکتریا، راسته‌ی کامپلوباکتریالز و از جنس هلیکوباکتر است. همچنین، شایع‌ترین پدیده ریزه‌بین در جهان است که در مخاط معده وجود دارد (۱). این باسیل گرم منفی یک باکتری میکروآئروفیلی است که با آنزیم هیدروژناز و تجزیه مولکول هیدروژن انرژی تولید می‌کند (۲). این باکتری، همچنین، تعدادی آنزیم تولید می‌کند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان سه آنزیم اکسیداز، کاتالاز و اوره‌آز را نام برد. هلیکوباکتر پیلوری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی، بدخیمی معده و لنفوم است (۱و۳). هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل برخی فرم‌های گاستریت مزمن شناخته شده است که در

پروتئین‌های آنتی ژنی است. این پلاسمیدهای نوترکیب یک راست به داخل سلول گیرنده تزریق می‌شوند، در نتیجه سلول‌ها، DNA را برداشت کرده و آنتی‌ژن پروتئینی کد شده توسط آن را تولید می‌کنند. آنتی ژن بدست آمده به این روش، به برانگیختگی هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می‌انجامد. در پایان واکسن‌های DNA سبب بیان دراز مدت آنتی ژن می‌شوند. بنابراین، خاطره ایمنی دلخواهی ایجاد می‌کنند (۱۱). هدف این مطالعه، کلون‌سازی ژن ureG هلیکوباکتریلوری در وکتور بیانی یوکاریوت و ایجاد سازواره pCI-neo-ureG، همچنین، بررسی بیان این ژن در سلول‌های جانوری CHO، بوده است.

مواد و روش‌ها

الف) سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری: هلیکوباکتریلوری سویه استاندارد که در جداسازی ژن ureG استفاده شد، از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای ترانسفورماسیون و تکثیر وکتورهای نوترکیب از باکتری E. coli سویه Top10F استفاده شد. این باکتری از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد گرفته شد. برای کلون‌سازی محصولات PCR به روش کلون‌سازی T/A از کیت شرکت Thermo Fisher Scientific ساخت کشور آمریکا که حاوی پلاسمید pTZ57R/T است، بهره گرفته شد. در این مقاله برای آسانی نگارش نام وکتور pTZ57R/T به صورت مخفف pTZ نگاشته می‌شود. اندازه این وکتور ۲۸۸۶ جفت باز بوده و نشانگر انتخابی وکتور pTZ، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است. به منظور بررسی بیان ژن ureG، وکتور بیانی pCI-neo (ساخت شرکت Promega، کشور آمریکا) به کار برده شد که اندازه این وکتور ۵۴۷۲ جفت باز است. نشانگرهای انتخابی این وکتور برای انتخاب سلول‌های باکتریایی و سلول‌های جانوری ترانسفرم شده، به ترتیب آمپی‌سیلین و نئومایسین است. سلول جانوری CHO نیز به منظور بررسی بیان یوکاریوت ژن ureG به کار گرفته شد.

ب) استخراج DNA و تکثیر ژن DNA:ureG ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) از

تنها مخزن شناخته شده برای این عفونت معده‌ی انسان است (۲). عفونت هلیکوباکتریلوری از راه دهان به دهان و مدفوع به دهان انتقال می‌یابد و عمدتاً در کودکی آغاز می‌شود و بدلیل وضعیت ویژه میکروبی و نداشتن دسترسی مستقیم دستگاه ایمنی به آن تا آخر عمر در معده باقی می‌ماند (۶). در بررسی متعدد بر افراد سالم جامعه‌ی ایرانی، نزدیک ۸۰٪ افراد بالغ به عفونت هلیکوباکتریلوری دچارند که نزدیک ۵٪ الی ۱۰٪ این افراد به بیماری‌های معده و دوازدهه دربردارنده: زخم معده و دوازدهه و به میزان بسیار کمتری بدخیمی معده یا لنفوم دچار می‌شوند. از آنجایی که شیوع بالای عفونت هلیکوباکتریلوری بیشتر در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد، ایجاد بار اقتصادی در بسیاری از این کشورها کرده است (۷). پیشنهاد شده که غربالگری هلیکوباکتریلوری ممکن است روشی مقرون به صرفه در کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان معده باشد، و با کاهش نیاز به خدمات بهداشتی به کاهش ایجاد زخم معده و سایر هزینه‌های سوءهاضمه کمک کند (۸). برپایه مقاله‌های موجود اوره‌آز باکتری هلیکوباکتریلوری از بهترین کاندیداهای تولید واکسن بوده است (۵). وجود اوره‌آز برای بقای هلیکوباکتر بایسته است. این آنزیم در محیط اسیدی معده همراه با دو یون نیکل در جایگاه فعالش فعالیت می‌کند. همچنین، فعالیت این آنزیم نیازمند هیدرولیز GTP و تشکیل کمپلکس حاوی APO-Urease، UreF، UreH و Ureas پروتئینی است (۹). از عوامل کمکی اوره‌آز، UreG نسبت به بقیه حیاتی‌تر است و حفاظت‌شدگی بالایی در ساختار ژنی دارد (۹ و ۵). برای رویارویی با باکتری هلیکوباکتر از روش‌های پیشگیری متعددی مانند تولید واکسن DNA استفاده شده است ولی مکانیسم‌های درگیر در پردازش واکسن‌های DNA هنوز به طور کامل درک نشده‌اند و در یکپارچگی DNA به سلول‌های میزبان و آنتی‌بادی‌های ضد DNA هنوز نگرانی‌هایی وجود دارد. نخستین بار واکسن‌های تجربی DNA نزدیک ۲۵ سال پیش برای تعدادی از عوامل ویروسی، باکتریایی و عوامل انگلی بر الگوهای حیوانی بررسی شد (۱۰).

یکی از راهبردهای واکسیناسیون که در تعدادی از بیماری‌ها بررسی شده، استفاده از DNA پلاسمیدی کدکننده

کلون سازی T/A در وکتور pTZ براساس روش کار کیت، انجام و محصول Ligation بین وکتور pTZ و ژن ureG فراهم شد. ترانسفورماسیون محصول Ligation به درون سلول‌های باکتریایی، به روش شیمیایی طی سه مرحله شستشوی سلول‌های Ecoli سویه Top10F با استفاده از CaCl₂ یک دهم مولار سرد و استریل انجام شد. سپس، آزمایش با شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ادامه یافت. در پایان باکتری‌های ترانسفرم شده روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد (۱۳). از کلنی‌های بدست آمده با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، پلاسمید تخلیص و پذیرش اولیه درستی کلون‌سازی ژن به روش PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ureG و همچنین هضم آنزیمی با آنزیم‌های XbaI و SalI انجام و سازواره pTZ-ureG حاصل در این مرحله برای تایید نهایی توسط شرکت Generay چین تعیین توالی شد.

کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی: برای وارد ساختن ژن ureG در وکتور بیانی pCI-neo، نخست وکتور نو ترکیب pTZ-ureG با دو آنزیم XbaI و SalI هضم شد تا ژن ureG از آن خارج و همچنین، وکتور بیانی pCI-neo نیز با دو آنزیم XbaI و SalI هضم آنزیمی. همه محصولات هضم آنزیمی شد نامبرده، روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. قطعه ژن ureG و وکتور pCI-neo از روی ژل بریده و به صورت جداگانه در دو میکروتیوب، قرار داده شدند و تخلیص DNA از ژل با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، برای هر دوی آنها انجام شد.

مرحله Ligation بین وکتور pCI-neo و ژن ureG آنزیم T4-Ligase انجام شد. همه مراحل ترانسفورماسیون در باکتری Ecoli سویه TOP10F و شوک حرارتی و کشت روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک، مطابق مرحله پیش از آن انجام شد. تایید درستی سازواره نهایی pCI-neo-ureG با روش‌های PCR و هضم آنزیمی و در پایان تعیین توالی ارزیابی شد.

هلیکوباکتریپلوری، تخلیص شد. چگونگی DNA تخلیص شده، روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. برای تکثیر ژن ureG از پرایمرهای اختصاصی این ژن که در این تحقیق نمودارسازی شده‌اند، بکار رفت. پرایمرها با نرم‌افزار Gene runner و از روی ژن ثبت شده در بانک ژن جهانی به شماره ثبت FM991728، طراحی و برای تولید به شرکت سیناژن ارائه شد. توالی پرایمرهای بکار رفته برای تکثیر ژن ureG به صورت زیر است:

ureG-F: 5'-TCTAGATTTATGGTAAAAAATTGGAG-3'
ureG-R: 5'-GTCGACCGTAAGTGTTTCATCAATCTTC-3'

در بررسی نرم‌افزاری، اندازه محصول PCR با به کار بردن این پرایمرها، ۶۲۷ جفت باز بود. همچنین، برای آسانی کلون‌سازی، در انتهای ۵' هر یک از پرایمرهای F و R به ترتیب سایت برش برای آنزیم‌های XbaI و SalI تعبیه شده (بخش‌هایی که زیر آنها خط کشیده شده است).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانومولار از هر یک از پرایمرهای ureG-F و ureG-R، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۱/۲ میلی مولار MgCl₂ و ۱ واحد آنزیم SmarTaq DNA polymerase (شرکت سیناژن، ایران) در دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندروف، آلمان) انجام شد (۱۲).

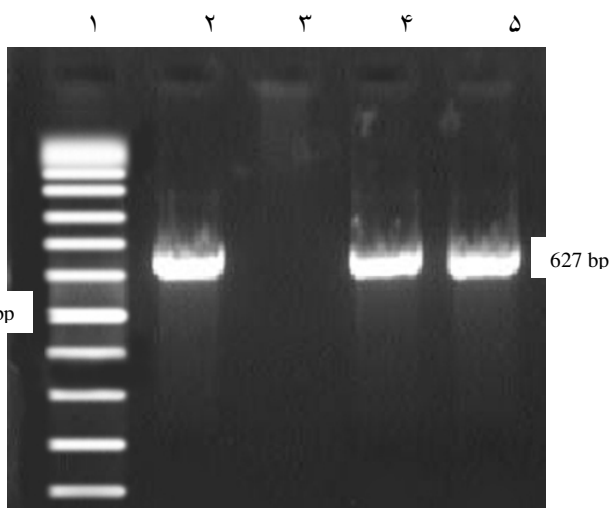
یک مرحله واسرشت شدن نخستین در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ مرحله شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت دراز شدن نهایی یک مرحله‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز شد و با نور ماورای بنفش مشاهده شد.

کلون‌سازی T/A: قطعه DNA مربوط به ژن ureG پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، با تیغ اسکالپل جدا شد. سپس، با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، خالص‌سازی صورت گرفت. برای اطمینان از درستی خالص‌سازی، مقدار ۲ میکرولیتر از ژن تخلیص شده، روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و بررسی شد.

CHO از روش الکتروفورز روی ژل عمودی SDS-PAGE استفاده شد. سلول‌های CHO به روش ذوب و انجماد متناوب (freeze and thaw) متلاشی و سوسپانسیون حاصل از افشروی سلولی با سرنگ هامیلتون به چاهک‌های روی ژل وارد شد. همچنین، در یکی از چاهک‌ها ۵ میکرولیتر نشانگر پروتئین ریخته و الکتروفورز با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت انجام شد. پس از به پایان رساندن الکتروفورز برای مشخص شدن پروتئین‌های الکتروفورز شده، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو انجام و در پایان از ژل عکس برداری شد.

نتایج

الف) تکثیر و جداسازی ژن ureG هلیکوباکتریلوری: استخراج DNA از باکتری هلیکوباکتریلوری با موفقیت انجام شد. نتایج الکتروفورز DNA ژنومی این باکتری روی ژل آگارز نشان دهنده کیفیت مناسب آن برای انجام ادامه آزمایش‌ها بود. پس از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن ureG و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، باند ۶۲۷ جفت بازی بدست آمد. نتایج این مرحله در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: تکثیر ژن ureG به روش PCR شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتاز شماره ۲، ۴ و ۵ نمونه‌های مثبت که باند ۶۲۷ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ureG را نشان می‌دهند. شماره ۳: کنترل منفی

تخلیص قطعه DNA مربوط به ژن ureG از روی ژل آگارز با کیت استخراج DNA از ژل انجام شد و الکتروفورز دوباره

انتقال سازواره نهایی pCI-neo-ureG به سلول‌های جانوری: در این تحقیق برای بررسی بیان ژن ureG در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان‌ها مستر چینی (Chinese Hamster Ovary) استفاده شد و برای ترانسفورماسیون این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. سلول‌ها در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵٪ CO₂ کشت داده شدند. برای ترانسفورماسیون این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن (دستگاه مدل Gene Pulser Xcell شرکت Bio-Rad آمریکا) استفاده شد. تعداد ۱۰^۶ × ۲ عدد از سلول‌های CHO شمرده و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کووت ۰/۴ ویژه الکتروپوریشن ریخته شد. سپس، ۸۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از وکتور نوترکیب neo-ureG-pCI، به سلول‌های درون کووت در شرایط استریل (زیر هود) افزوده و کووت به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. دیواره‌های بیرونی کووت حاوی سلول‌ها با کمک گاز استریل خشک شد و در دستگاه الکتروپوریشن قرار داده شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده ۰/۱۷۴ کیلوولت و ۴۰۰ میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بی‌درنگ به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

سپس، سلول‌های الکتروپوریت شده در فلاسک کشت حاوی محیط RPMI به همراه ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین کشت و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. سپس، به هر یک از فلاسک‌های کشت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین (مارکر انتخابی برای سلول‌های ترانسفرم شده با وکتور نوترکیب) افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شد. تمام مراحل بالا (الکتروپوریشن) برای سری دیگری از سلول‌های CHO که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد، هیچگونه DNA بی افزوده نشد.

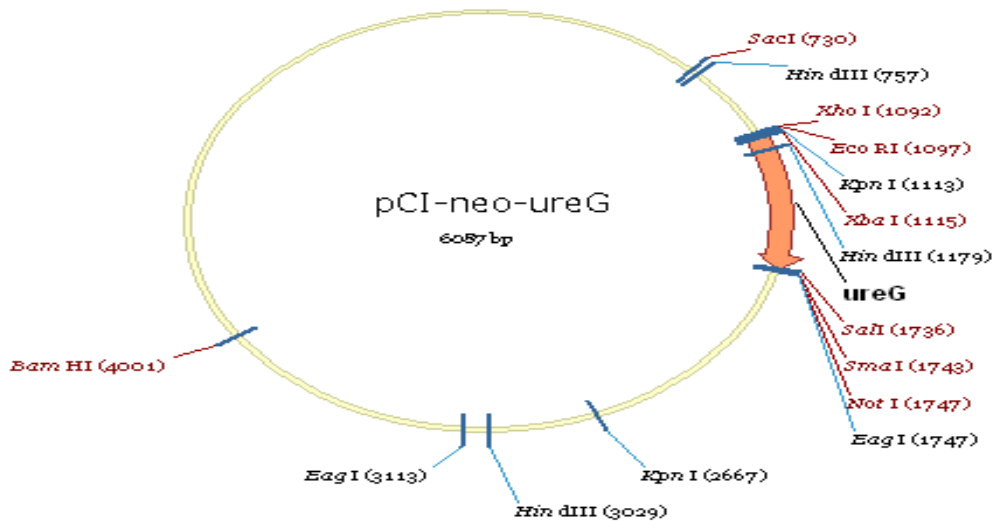
ح) انجام SDS-PAGE: برای بررسی تولید محصول ژن ureG کلون شده در وکتور بیانی pCI-neo در سلول‌های

تکثیر و تخلیص این ژن بود.

در این تحقیق تنها برای کلون‌سازی، نگهداری و تکثیر ژن *ureG* استفاده شد. برای بیان ژن *ureG* لازم است این ژن از درون وکتور نو ترکیب pTZ-*ureG* خارج و در یک وکتور بیانی ساب کلون شود. چون هدف این پژوهش ایجاد سازواره ژنی براساس ژن *ureG* به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه هلیکوباکتریلوری است، نیاز به استفاده از یک وکتور بیان شونده در سلول یوکاریوت است که به این منظور وکتور بیان شونده یوکاریوت pCI-neo انتخاب شد. مراحل هضم آنزیمی وکتور نو ترکیب pTZ-*ureG* و وکتور بیانی neo-pCI با دو آنزیم *Xba*I و *Sal*I با موفقیت انجام شد. نتایج ساب کلونینگ ژن *ureG* در وکتور neo-pCI به ترتیب با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شد. در نهایت سازواره ژنی pCI-neo-*ureG* بدست آمد که نگاره نقشه‌ی ژنی آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

۲ میکرولیتر از محصول تخلیص شده، نشان دهنده‌ی درستی (ب) کلون‌سازی T/A و ساب کلونینگ: محصول PCR تخلیص شده از ژل آگارز به روش همسانه‌سازی T/A در پلاسمید pTZ کلون شد. نتایج PCR بر کلنی‌های بدست آمده از این مرحله نشان داد که بسیاری از کلونی‌های حاصل حاوی ژن *ureG* هلیکوباکتریلوری هستند. همچنین، آزمایش‌های تاییدی و تکمیلی دیگر مانند هضم آنزیمی و تعیین توالی نیز درستی کلون‌سازی ژن *ureG* در پلاسمید pTZ را تایید کردند. بنابراین، در این مرحله سازواره ژنی pTZ-*ureG* تشکیل شد.

با توجه به این که وکتور pTZ موجود در کیت شرکت Thermo Fisher Scientific وکتوری تکثیری است و به سبب داشتن یک نوکلئوتید T در انتهاهای ۳-پریم آزاد خود می‌تواند محصولات PCR که دارای نوکلئوتید A در انتهاهای آزاد خود هستند را براساس قانون بازهای مکمل A-T بپذیرد، این مرحله را کلون‌سازی T/A گویند. بنابراین، وکتور pTZ

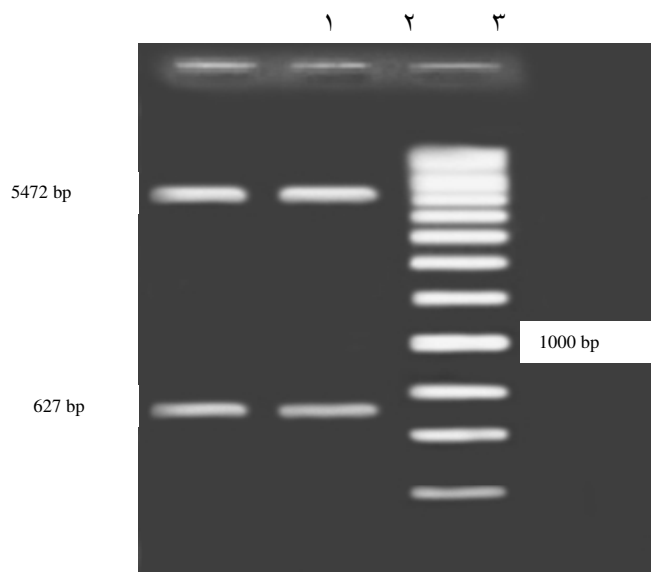


شکل ۲. تصویر سازواره نهایی pCI-neo-*ureG*

اندازه ۶۲۷ جفت باز مربوط به ژن *ureG* است. نتایج این مرحله در شکل ۳ نمایش داده شده‌است. داده‌های حاصل از تعیین توالی ژن *ureG* کلون شده در سازواره نهایی نشان داد

نتایج هضم آنزیمی وکتور نو ترکیب pCI-neo-*ureG* با دو آنزیم *Xba*I و *Sal*I و الکتروفورز آن روی ژل آگارز سبب تشکیل دو قطعه ژنی می‌شود که قطعه بزرگ‌تر به اندازه ۵۴۷۲ جفت باز مربوط به وکتور neo-pCI و قطعه کوچک‌تر به

که هیچگونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن بوجود نیامده و صحت توالی آن تایید شد.



هضم آنزیمی سازواره نهایی pCI-neo-ureG با دو آنزیم SalI و XbaI

شماره‌های ۱ و ۲: دارای دو باند با اندازه‌های ۵۴۷۲ و ۶۲۷ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور pCI-neo و ژن ureG شماره ۳: مارکر 1Kb شرکت فرمتاز

به عفونت، آنتی‌ژن‌های این باکتری، سبب شکل‌گیری واکنش‌های دستگاه ایمنی میزبان می‌شوند (۱۴)، بنابراین می‌توان از ژن‌های کدکننده این آنتی‌ژن‌ها به صورت واکسن‌های DNA بهره جست. بررسی‌های پژوهشگران دیگر نشان داد، آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتریپیلوری به عنوان یکی از بهترین آنتی‌ژن‌ها در بدن میزبان عمل می‌کند، بر این اساس از آن می‌توان به عنوان کاندیدای واکسن علیه هلیکوباکتریپیلوری استفاده کرد (۱۵). در طی چند سال اخیر تحقیقات گسترده‌ای به منظور یافتن راهی برای رویارویی با این باکتری صورت پذیرفته که برخی از این تحقیقات شامل واکسن‌های DNA نیز می‌شوند. از برتری‌های واکسن‌های ژنی می‌توان به آسانی آماده‌سازی، پایداری در درجه حرارت‌های مختلف، امکان نگهداری و انتقال آسان و برانگیختگی هر دو سیستم ایمنی هومورال و سلولی اشاره کرد. اما اکنون داده‌ها نشان می‌دهد که هیچ‌گونه واکسن موثری علیه هلیکوباکتریپیلوری ساخته نشده‌است و پروانه کاربرد عمومی در جوامع انسانی را نیافته است (۱۶). یکی از راهبردهای واکسیناسیون که در تعدادی از بیماری‌ها بررسی شده، استفاده از DNA پلاسمیدی کدکننده

(پ) الکتروپوریشن و بیان ژن: برای ترابرد وکتور نو ترکیب pCI-neo-ureG بیان‌کننده ژن ureG به سلول‌های جانوری از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. نتایج ترانسفرم کردن سلول‌های CHO به روش الکتروپوریشن با سازواره نهایی pCI-neo-ureG، سبب ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین در سلول‌های CHO شد. عصاره سلولی حاصل از سلول‌های ترانسفرم شده CHO در کنار سلول‌های گروه شاهد (سلول‌های CHO بدون دریافت وکتور و بدون رویرو شدن با آنتی‌بیوتیک نئومایسین) برای بررسی بیان ژن ureG بررسی شد. نتایج الکتروفورز عصاره این دو دسته سلول روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آن با کوماسی بلو نشان داد، باند ۲۳ کیلودالتونی مربوط به محصول ژن ureG در سلول‌های ترانسفرم شده تشکیل شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به این که هلیکوباکتریپیلوری به عنوان پاتوژن انسانی هراس‌انگیز (خطرناک) به شمار می‌آید، بنابراین بایستگی بررسی راه‌های پیشگیری از آن روشن است. در مسیر ابتلای

حاصل از این پژوهش پروتئین UreG به شکلی موفقیت آمیز کلون سازی و بیان شد که نشان دهنده ی واکنش پذیری پروتئین مطلوب با نمونه های کشت مثبت هلیکوباکتریپیلوری در بیماران است که به تولید پروتئین نوترکیب انجامید ولی با اکثر نمونه های کنترل واکنش نشان نداد. بنابراین، این نتیجه بدست آمد که پتانسیل تشخیصی این پروتئین جدید نیازمند بررسی بیشتر است (۱۶). دوستی و همکاران در سال ۲۰۰۹ طی یک پژوهش با کلون سازی ژن omp31 در پی تولید واکسن ژنی برآمدند. نتایج این تحقیق و بررسی ایمنی زایی آن در موش نژاد BALB/c نشان دهنده ی فعالیت مناسب این واکسن ژنی بود که باعث کنشگری سلول های Th-1 در موش شده است (۱۹). زیر واحد ureB آنزیم اوره آز، در سال ۲۰۰۷ توسط Begue و همکاران در وکتور یوکاریوت pcDNA3.1/V5-His-TOPO کلون سازی شد. در این پژوهش وکتور نوترکیب بدست آمده، به عنوان واکسن ژنی در حیوانات آزمایشگاهی مدل، بررسی شد. نتایج تحقیق آنها نشان داد، در حیوانات واکنشینه شده با این واکسن نوترکیب، ایمنی کمابیش بالایی علیه هلیکوباکتریپیلوری پدید آمد (۲۰). یکی از هدف های تحقیق ما، کاربرد یکی از زیر واحدهای اوره آز (ureG)، به عنوان واکسن ژنی در تحقیقات آینده است. نتایج تحقیق Begue، مسیر روشن تری برای کاربرد اجزای آنزیم اوره آز به عنوان واکسن ژنی نشان می دهد. در تحقیق ما نیز از ناقل یوکاریوت با پایه pCI-neo و با کلون سازی ureG به عنوان یکی از مهم ترین اعضای خوشه ژنی اوره آز استفاده شده است. شیوع بسیار بالای عفونت هلیکوباکتریپیلوری در جهان و نقش آن در ناراحتی های معده باعث شد روش های درمانی مختلفی علیه این باکتری به کار برده شود. اما سویه های مقاوم به دارو که در سال های اخیر افزایش یافته اند، عرصه درمان این عفونت را روز به روز تنگ تر و مشکل تر می کنند (۲۱). همین مسائل، پژوهشگران را بر آن داشته تا به دنبال راه هایی موثر برای پیشگیری از عفونت هلیکوباکتریپیلوری باشند. بنابراین، یافتن آنتی ژن هایی که سیستم ایمنی میزبان را علیه این عفونت، برانگیزند، نخستین و مهم ترین گام در این راستا است. یکی از مواردی که برای انتخاب نوع ژن برای تولید واکسن ژنی اهمیت دارد، اطمینان

پروتئین های آنتی ژنی است که یک راست به داخل سلول گیرنده تزریق می شود، در نتیجه، سلول ها DNA را برداشت کرده و آنتی ژن پروتئینی کد شده توسط آن را بیان می کنند که منجر به هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می شود. در انتها واکسن های DNA به سبب این که موجب بیان دراز مدت آنتی ژن می شوند و خاطره ایمنی دلخواه ایجاد می کنند به عنوان روش پیشگیری مطلوبی شناخته شده اند (۱۰). نجار پیرایه و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پژوهشی ژن hpaA باکتری هلیکوباکتریپیلوری را کلون کردند و مشاهده کردند که این ژن به آنتی ژن های پلی کلونال خرگوش واکنش نشان می دهد و بیان آن افزایش می یابد، بنابراین، می توان از پروتئین HpaA حاصل از بیان ژن hpaA به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه هلیکوباکتریپیلوری استفاده کرد (۱۷). حاجی خانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ پروژه ی کلون، بیان، تخلیص و بررسی آنتی ژنیسیته ترکیب پروتئینی UreB332-HpaA در هلیکوباکتریپیلوری را انجام دادند که طبق نتایج آن هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی نشان داد که ژن هدف به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده است و می توان از این ترکیب آنتی ژنی به عنوان کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن علیه این باکتری استفاده کرد (۱۸). Fong و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی ساختار UreG، UreF و UreH و چگونگی کارکرد آنها در پیشبرد فعالیت اوره آز در هلیکوباکتریپیلوری پروژه هایی انجام دادند که نشان داد این عوامل برای این آنزیم ضروری هستند. سازوکار دادن نیکل برای UreG که در این پژوهش وجود دارد، نشانگر استراتژی کلی برای تحویل نیکل به آنزیم های فلزی دیگر است، همین طور نشان داد که چگونه پروتئین های جانبی اوره آز ترکیب ویژه ای را شکل می دهند و برای جفت شدن با هیدرولیز گوانوزین تری فسفات ۵ برای تحویل نیکل به اوره آز برهمکنش داشته باشند. طبق نتایج پژوهش Fong، اهمیت UreG از دیگران بیشتر و حیاتی تر است و همچنین دریافتند که این آنزیم یک متالوآنزیم است و در محیط اسیدی معده فعالیت می کند (۹). خلیل پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ در یک پژوهش، واکنش بین پروتئین UreG هلیکوباکتریپیلوری با سرم هلیکوباکتریپیلوری را انجام دادند که براساس نتایج

وکتور بیان شونده یوکاریوت pCI-neo است می‌تواند در راستای تولید واکسن‌های نو ترکیب به صورت بیان ژن ureG و تولید محصول پروتئینی و تخلیص آن با اهداف کاربردی به صورت واکسن پپتیدی مد نظر قرار گیرد. همچنین، بیان نخست و موفق ژن ureG در سیستم یوکاریوت که در پژوهش ما محقق شد، راهی روشن در راستای کاربرد pCI-neo-ureG به عنوان واکسن ژنی در الگوی حیوانی پیش رو قرار می‌دهد.

سپاسگزاری و سپاسداری

این مقاله دستاورد پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. پژوهشگران و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، بویژه دکتر حسین انصاری و آقای حمیدرضا کبیری که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری کردند، به آگاهی برسانند. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

از وجود خاصیت آنتی‌ژنی در محصول ژن برگزیده است. برخی تحقیقات در گذشته نشان داد که اگر آنزیم اوره‌آز، به صورت مستقیم به حیوان آزمایشگاهی تزریق شود، موجب تحریک سیستم ایمنی و ایجاد ایمنی حفاظتی نسبی علیه این باکتری خواهد شد (۲۲). برخی بررسی‌ها، ویژگی آنتی‌ژنی در بیشتر اجزای کمپلکس ژنی اوره‌آز را نشان داده‌اند. این گردآور ژنی بخش‌هایی شامل ureA, ureB, ureI, ureE, ureF, ureG و ureH که هر کدام به صورت مجزا، محرک سیستم ایمنی میزبان هستند (۲۳ و ۲۴). با بررسی این یافته‌های پژوهشگران دیگر (موارد مورد اشاره در بالا)، به خوبی نشان داده می‌شود که مثال‌های متعددی از این دست در مورد نتایج مثبت واکسن‌های ژنی وجود دارد. در مطالعه ما، سازواره ژنی pCI-neo-ureG تولید و تایید نهایی شده‌است و از این سازواره ژنی می‌توان در انجام تحقیقات واکسن علیه هلیکوباکتریپیلوری استفاده کرد.

ژن ureG طبیعی (غیرسنتتیک) هلیکوباکتریپیلوری پیروزمندانه در وکتور pTZ کلون شده و با نگرش درستی نتایج توالی‌یابی، می‌توان از این ژن به عنوان منبعی برای تحقیقات آینده بهره برد. همچنین، سازه ژنی pCI-neo-ureG که شامل

منابع

1. Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Souod N. Real-Time PCR assay using Allele-Specific TaqMan probe for detection of clarithromycin resistance and its point mutations in *Helicobacter pylori*. *J Isfahan Med Sch* 2011; 29(126): 65-73. [Text In Persian]
2. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(2): 33-39.
3. Kuo CH, Liu CJ, Yang CC, Kuo FC, Hu HM, et al. A Rapid and Accurate Method to Evaluate *Helicobacter pylori* Infection, Clarithromycin Resistance, and CYP2C19 Genotypes Simultaneously From Gastric Juice. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(21):e3458.
4. Hassan MA, Ahmed EH, Abdel-Raady BA, Amin IA, Refaiy AE, et al. Evaluation of Non Invasive versus Invasive Methods for Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection among Patients with Gastrointestinal Disorders. *Egypt J Immunol* 2016; 23(2):39-49.
5. Hatzifot C, Wern BW, Morrow WJ. *Helicobacter pylori* vaccine strategies triggering a gut reaction. *Immunol Today* 2000; 21(12): 615-9.
6. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F and et al. World gastroenterology organisation global guideline: *Helicobacter pylori* in developing countries. *J Gastrointest Liver Dis* 2011; 20(3):299-304.
7. Enroth H, Wreiber K, Rigo R, Risberg k, Uribe A, et al. Invitro aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, Intro cellular composition and surface properties. *Helicobacter* 1999; 4(1): 7-16.
8. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori* physiology and genetice. *Amer Soc Microbiol* 2001;22: 2-7.
9. Fong YH, Wong HC, Yuen MH, Lau PH, Chen YW, and et al. Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins facilitate maturation of *Helicobacter pylori* urease. *PLOS Biology* 2013;11(10).
10. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D and et al. Oral

immunization with urease and Escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults.

Gastroenterology 1999;116(4): 804-12.

11. Senatore FJ, Wilmot J, Birk JW. Helicobacter pylori treatment: Still a work in progress. Postgrad Med 2016; 128(1):152-7.

12. Doosti A, Mokhtari-Farsani A, Chehelgerdi M. Molecular characterization of Gyr-A gene polymorphism in Salmonella enterica serovar enteritidis isolated of egg shells. J Food Safety 2016; 36 (4), 557-562.

13. Doosti A, Ghasemi Dehkordi P, Khodabakhsh H. cDNA cloning and sequencing of ostrich growth hormone. Arch Biol Sci 2012; 64 (2), 445-449.

14. Paolo R and Stefano C. Helicobacter pylori: A Brief History of a Still Lacking Vaccine. J Diseases 2014; 2: 187-208.

15. Vaez J, Amini M, Farzad R. An overview of the latest information from the peculiarities and the pathogenesis of Helicobacter pylori. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2006;14(1): 97-110. [Text In Persian]

16. Khalilpour A, Osman S, Yunus HM, Santhanam A, Vellasamy N and et al. Helicobacter pylori recombinant UreG protein:cloning, expression, Andassessment of Its seroreactivity. BMC 2014;7(55): 9-802.

17. Najar-Peerayeh SH, Atoofi J, Hoseinkhani S, Farshchian M. Cloning and Expression of Helicobacter pylori HpaA Gene. Cell J Yakhteh 2009; 11(3): 273-276. [Text In Persian]

18. Hajikhani B, Najar-Piraye SH, Saliman-Jahi H, Mohammad-Hasan Z. Cloning, expression,

purification and study the antigenicity of protein synthesis UreB332-HpaA Helicobacter pylori .

Modares J Med Sci Pathol 1389;13(2): 1-10. [Text In Persian]

19. Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Javadi GR, Sardari S, Shokrgozar MA. DNA Vaccine Encoding the Omp31 Gene of Brucella melitensis Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. Res J Biol Sci 2009; 4(1):126-131.

20. Begue RE, Cruz AR, Ramgoolam A, Breslin MB. Immunogenicity of Helicobacter pylori urease B protein and DNA vaccines in a mouse model. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2007; 45(4):493-6.

21. Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Baghernejad M. Molecular assessment of clarithromycin resistant Helicobacter pylori strains using rapid and accurate PCR-RFLP method in gastric specimens in Iran. Afr J Biotechnol. 2011; 10(39): 7675-8.

22. Talebi -Bezmin -Abadi A, Yeh-Lee Y. Chinese Helicobacter pylori vaccine: Solution for an old challenge? World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics, 2016; 7(3): 412-15.

23. Mobley HLT. The role of Helicobacter pylori urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 1996; 10(1): 57-64.

24. Lazowska I, Trzeciak L, Godlewska R, Hennig E, Jagusztyn-Krynicka K, Popowski J, Regula J, Ostrowski J. In Search of Immunogenic Helicobacter pylori Proteins by Screening of Expression Library. Digestion, 2000; 61(1):14-21.

Cloning and Gene Expression of ureG Gene as a DNA Vaccine Candidate Against Helicobacter Pylori

Zahra Mahmoudi Vashian (MSc)¹-* Abbas Doosti (PhD)¹

*Corresponding Address: Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: abbasdoosti@yahoo.com

Received: 05/Sep/2016 Revised: 10/May/2017 Accepted: 16/May/2017

Abstract:

Introduction: Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium that has infected many human societies worldwide. the urease of H. pylori is essential for its survival in the human stomach and the ureG gene is one of the most important virulence factors.

Objective: The aim of this study is the cloning of the ureG gene in order to generate a gene vaccine against H. pylori.

Materials and Methods: In this experimental study, the DNA was extracted from helicobacter pylori. amplification of ureG gene was performed using specific primers and the PCR products were cloned into pTZ vector using T/A cloning technique. the ureG gene was then cut from the pTZ vector using the XbaI and SalI enzymes and the gene was subcloned in the pCI-neo expression vector. the pCI-neo-ureG recombinant vector was transformed into CHO cells by electroporation, and ureG gene expression was detected on a SDS-PAGE gel.

Results: The H. pylori ureG gene was amplified and isolated by PCR successfully. the results showed that the ureG gene was cloned into pTZ and pCI-neo vectors, correctly and the pCI-neo-ureG final construct was generated. the results of insertion of final construct into CHO cells showed the 23 KDa product on SDS-PAGE gel.

Conclusion: The ureG gene cloned into pCI-neo expression vector has the potency of expression and production of the specific product of this gene in CHO animal cell. therefore, this gene construct can be used as a suitable candidate for the further experiments of recombinant vaccines against H. pylori in animal models.

Conflict of interest: none Declared

Key words: Cloning, Organism, Helicobacter pylori

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 102, Pages: 20-29

Please cite this article as: Mahmoudi Vashian Z, Doosti A. Cloning and Gene Expression of ureG Gene as a DNA Vaccine Candidate Against Helicobacter Pylori. J of Guilan Univ of Med Sci 2017; 26(102):20-29. [Text in Persian]