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

زهرا محمودی واشیان(MSc)[1]-*دکتر عباس دوستی(PhD)[1]

*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 هلیکوباکترپیلوری برای بقای آن در معده‌ی انسان ضروری است و ژن ureG یکی از مهم‌ترین عوامل مهم بیماریزایی آن است.

هدف: کلون‌سازی ژن ureG برای ایجاد واکسن ژنی علیه هلیکوباکترپیلوری

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، نخست از هلیکوباکترپیلوری DNA استخراج شد. تکثیر ژن ureG با استفاده از پرایمرهای ویژه این ژن انجام و فراورده 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 نوترکیب 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 هلیکوباکترپیلوری 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 شده‌است. 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 نوترکیب علیه هلیکوباکترپیلوری در الگوی حیوانی شناساند.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکترپیلوری، همانند سازی، موجود زنده

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

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری گونه‌ای از هلیکوباکتر بوده و یکی از شاخه‌های پروتئوباکتریا، رده اپسیلون‌پروتئوباکتریا، 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). هلیکوباکترپیلوری به عنوان عامل برخی فرم‌های گاستریت مزمن شناخته شده است که در لایه‌ی موکوس پوشاننده سلول‌های اپی‌تلیال معدی(pH:۶-۷) رشد می‌کند و کلونی تشکیل می‌دهد ولی به مخاط نمی‌تازد(٤و٥). هلیکوباکترپیلوری پروتئازی تولید می‌کند که باعث تعدیل pH مخاط معده و هماهنگی آن برای رشد خود می‌شود(۳). این ارگانیسم، 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(۲و۵). آلودگی هلیکوباکترپیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان است که کمابیش نیمی از جمعیت جهان دچار آن هستند. همچنین، نشان داده‌شده که

۱. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تنها مخزن شناخته‌شده برای این عفونت معده‌ی انسان است(۲). عفونت هلیکوباکترپیلوری از راه دهان به دهان و مدفوع به دهان انتقال می‌یابد و عمدتاً در کودکی آغاز می‌شود و بدلیل وضعیت ویژه میکروب و نداشتن دسترسی مستقیم دستگاه ایمنی به آن تا آخر عمر در معده باقی می‌ماند(٦). در بررسی متعدد بر افراد سالم جامعه‌ی ایرانی، نزدیک ۸۰٪ افراد بالغ به عفونت هلیکوباکترپیلوری 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 هلیکوباکترپیلوری بیشتر در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد، ایجاد بار اقتصادی در بسیاری از این کشورها کرده‌است(۷). پیشنهاد شده که غربالگری هلیکوباکترپیلوری 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 هلیکوباکترپیلوری از بهترین کاندیداهای تولید واکسن بوده‌است(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، UreHو Ureas پروتئینی است(۹). از عوامل کمکی اوره‌آز، UreG نسبت به بقیه حیاتی‌تر است و حفاظت‌شدگی بالایی در ساختار ژنی دارد(۵و۹). برای رویارویی با باکتری هلیکوباکتر از روش‌های پیشگیری متعددی مانند تولید واکسن DNA استفاده شده‌است ولی مکانیسم‌های درگیر در پردازش واکسن‌های DNA هنوز به طور کامل درک نشده‌اند و در یکپارچگی DNA به سلول‌های میزبان و آنتی بادی‌های ضدDNA 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 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 هلیکوباکترپیلوری 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: هلیکوباکترپیلوری 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 ۲۸۸٦ 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 برده‌شد که اندازه این وکتور ٥٤٧٢ 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 گرفته‌شد.

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

هلیکوباکترپیلوری، تخلیص شد. چگونگی DNAی 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´- TCTAGATTTATGGTAAAAATTGGAG -3´
ureG-R: 5´- GTCGACCGTAAGTGTTCATCAATCTTC -3´

در بررسی نرم‌افزاری، اندازه محصول PCR با به کار بردن این پرایمرها، ٦٢٧ 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 نانوگرم DNAی ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱۰۰نانومولار 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 ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ٦٢ 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.

پ) کلون‌سازی **T/A**: قطعه DNAی 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.

کلون‌سازی 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 ٤٢ 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 ١٦ 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.

ت) کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی: برای وارد ساختن ژن ureG در وکتور بیانی pCI–neo، نخست وکتور نوترکیب pTZ-ureG با دو آنزیم XbaI وSalI 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 آنتی بیوتیک، 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.

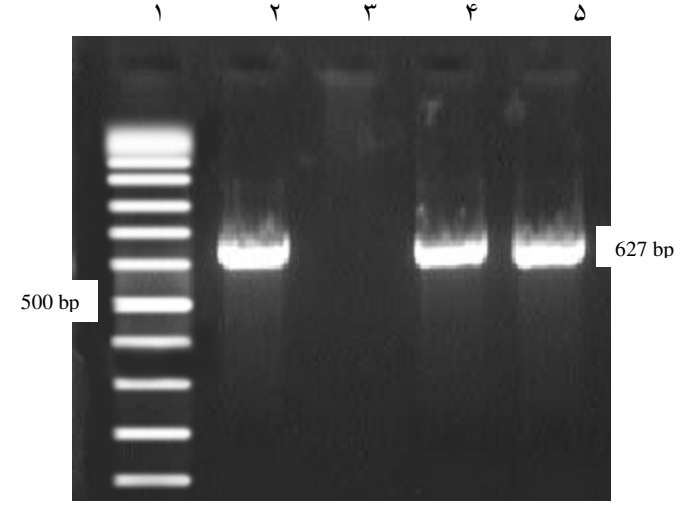
ث) انتقال سازواره نهایی **pCI-neo-ureG** به سلول‌های جانوری: در این تحقیق برای بررسی بیان ژن ureG در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان‌ها مستر چینی(Chinese Hamster Ovary) استفاده شد و برای ترانسفورماسیون این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. سلول‌ها در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱۰۰میکروگرم در هر میلی لیتر پنی‌سیلین 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 ۲×۱۰^{۶} عدد از سلول‌های CHO شمرده و در حجم ٤۰۰ میکرولیتر در کووت ۰/٤ 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 داده‌شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده ۰/۱۷٤ کیلوولت و ٤۰۰ 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 پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت و به مدت ٦ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 قرار داده‌شدند. سپس، به هر یک از فلاسک‌های کشت ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسن(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 شده‌بودند نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد، هیچگونه DNA یی افزوده نشد.

ح) انجام **SDS-PAGE** : برای بررسی تولید محصول ژن ureG کلون شده در وکتور بیانی pCI-neo در سلول‌های CHO از روش الکتروفورز روی ژل عمودی SDS-PAGE استفاده شد. سلول‌های CHO به روش ذوب و انجماد متناوب(freeze and thow) متلاشی و سوسپانسیون حاصل از افشره‌ی 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 کوماسی‌بلو انجام و در پایان از ژل عکس برداری شد.

نتایج

الف) تکثیر و جداسازی ژن ureG هلیکوباکترپیلوری: استخراج DNA از باکتری هلیکوباکترپیلوری با موفقیت انجام شد. نتایج الکتروفورز DNAی ژنومی این باکتری روی ژل‌آگارز 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 ٦۲۷ جفت بازی بدست آمد. نتایج این مرحله در شکل ۱ نشان داده شده است.



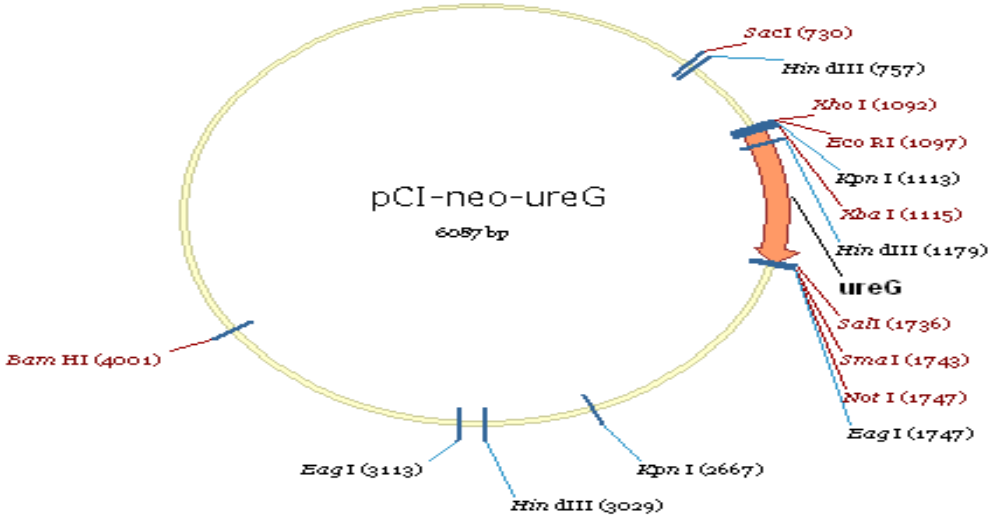
شکل۱:تکثیر ژن ureG به روش PCR شماره۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز شماره ۲، ٤ و ۵ نمونه های مثبت که باند ٦۲۷ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ureG را نشان می دهند.شماره ۳: کنترل منفی

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

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 هلیکوباکترپیلوری 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 تکثیر و تخلیص این ژن بود.

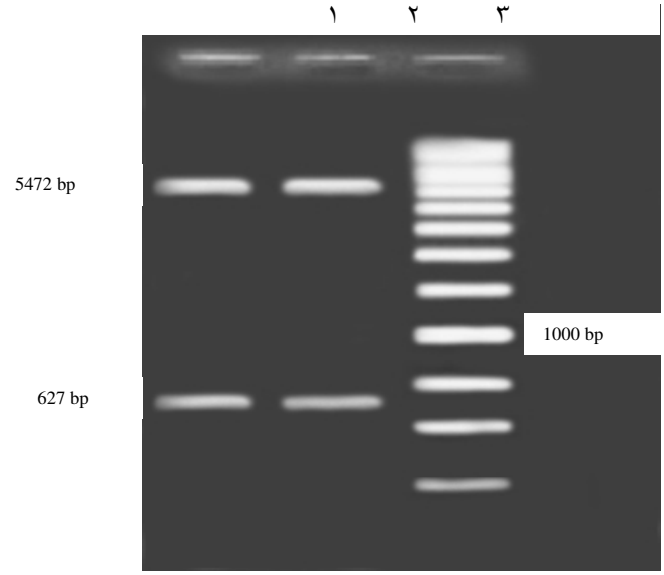
در این تحقیق تنها برای کلونسازی، نگهداری و تکثیر ژن ureG استفاده شد. برای بیان ژن ureG لازم است این ژن از درون وکتور نوترکیب pTZ-ureG خارج و در یک وکتور بیانی ساب کلون شود. چون هدف این پژوهش ایجاد سازواره ژنی براساس ژن ureG به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه هلیکوباکترپیلوری است، نیاز به استفاده از یک وکتور بیان شونده در سلول یوکاریوت است که به این منظور وکتور بیان شونده یوکاریوت pCI–neo انتخاب شد. مراحل هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pTZ-ureG و وکتور بیانی neo–pCI با دو آنزیم XbaI و SalI با موفقیت انجام شد. نتایج ساب کلونینگ ژن ureG در وکتور pCI–neo 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.



شکل۲. تصویر سازواره نهایی pCI-neo-ureG

نتایج هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pCI-neo-ureG با دو آنزیم XbaI و SalI و الکتروفورز آن روی ژل آگارز سبب تشکیل دو قطعه ژنی می‌شود که قطعه بزرگ‌تر به اندازه ۵۴۷۲ جفت باز مربوط به وکتور pCI–neo و قطعه کوچک‌تر به 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

که هیچگونه جهش یـا تغییـر نوکلئوتیـدی در تـوالی ایـن ژن بوجود نیامده و صحت توالی آن تایید شد.



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

شماره‌های ۱و۲: دارای دو باند با اندازه های ۵۴۷۲ و ۶۲۷ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور pCI-neo و ژن ureG

شماره ۳: مارکر 1Kb شرکت فرمنتاز

پ) الکتروپوریشن و بیان ژن : برای ترابـرد وکتـور نوترکیـب pCI-neo-ureG بیان‌کننده ژن ureG به سلول‌هـای جـانوری از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. نتایج ترانسفرم کـردن سلول‌های CHO به روش الکتروپوریشن بـا سـازواره نهـایی pCI-neo-ureG، سبب ایجاد مقاومت نسبت به آنتـی‌بیوتیـک نئومایسین در سلول‌های CHO شد. عصاره سلولی حاصـل از سلول‌های ترانسفرم شـده CHO در کنـار سـلول‌هـای گـروه شاهد(سلول‌های CHO بدون دریافت وکتور و بـدون روبـرو شدن با آنتی‌بیوتیک نئومایسین) برای بررسـی بیـان ژن ureG بررسی شد. نتایج الکتروفورز عصاره این دو دسته سلول روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آن بـا کوماسـی بلـو نشان داد، باند ۲۳ کیلودالتونی مربوط بـه محصـول ژن ureG در سلول‌های ترانسفرم شده تشکیل شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به این که هلیکوباکترپیلوری به عنوان پاتوژن انسـانی هراس انگیز(خطرناک) به شـمار مـی‌آیـد، بنـابراین بایسـتگی بررسی راه‌های پیشگیری از آن روشن است. در مسـیر ابـتلای بـه عفونـت، آنتـی‌ژن‌هـای ایـن بـاکتری، سـبب شـکل‌گیـری واکنش‌های دسـتگاه ایمنـی میزبـان مـی‌شـوند(۱۴)، بنـابراین، می‌توان از ژن‌هـای کـدکننـده‌ی ایـن آنتـی‌ژن‌هـا بـه صـورت واکسن‌های DNA بهره جست. بررسی‌های پژوهشگران دیگر نشان داد، آنزیم اوره‌آز هلیکوباکترپیلـوری بـه عنـوان یکـی از بهترین آنتی‌ژن‌ها در بدن میزبان عمل می‌کند، بر این اسـاس از آن می‌توان به عنوان کاندیدای واکسن علیه هلیکوباکترپیلـوری استفاده کرد(۱۵). در طی چند سال اخیر تحقیقات گسـترده‌ای به منظور یافتن راهی برای رویارویی با ایـن بـاکتری صـورت پذیرفته که برخی از این تحقیقات شامل واکسـن‌هـای DNA نیز می‌شوند. از برتری‌های واکسن‌های ژنی می‌توان به آسـانی آماده‌سازی، پایداری در درجه حـرارت‌هـای مختلـف، امکـان نگهداری و انتقال آسان و برانگیختگی هـر دو سیسـتم ایمنـی هومورال و سلولی اشاره کرد. اما اکنون داده‌ها نشان مـی‌دهـد که هیچ‌گونه واکسن موثری علیـه هلیکوبـاکترپیلـوری سـاخته نشده‌است و پروانه کاربرد عمومی در جوامع انسـانی را نیافتـه است(۱۶). یکی از راهبردهای واکسیناسیون که در تعـدادی از بیماری‌ها بررسی شده، استفاده از DNA پلاسمیدی کدکننـده

پروتئین‌های آنتی‌ژنی است که یک راست به داخل سلول گیرنده تزریق می‌شود، در نتیجه، سلول‌ها DNA را برداشت کرده و آنتی‌ژن پروتئینی کد شده توسط آن را بیان می‌کنند که منجر به هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می‌شود. در انتها واکسن‌های DNA به سبب این که موجب بیان درازمدت آنتی‌ژن می‌شوند و خاطره ایمنی دلخواه ایجاد می‌کنند به عنوان روش پیشگیری مطلوبی شناخته شده‌اند(۱۰). نجار پیرایه و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پژوهشی ژن hpaA باکتری هلیکوباکترپیلوری را کلون کردند و مشاهده کردند که این ژن به آنتی‌ژن‌های پلی‌کلونال خرگوش واکنش نشان می‌دهد و بیان آن افزایش می‌یابد، بنابراین، می‌توان از پروتئین HpaA حاصل از بیان ژن hpaA به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه هلیکوباکترپیلوری استفاده کرد(۱۷). حاجی‌خانی و همکاران در سال ۱۳۸۹پروژه‌ی کلون، بیان، تخلیص و بررسی آنتی‌ژنیسیته ترکیب پروتئینی UreB332-HpaA در هلیکوباکترپیلوری 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 شده‌است و می‌توان از این ترکیب آنتی‌ژنی 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 اوره‌آز در هلیکوباکترپیلوری پروژه‌هایی 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 اوره‌آز ترکیب ویژه‌ای را شکل می دهند و برای جفت شدن با هیدرولیز گوانوزین تری‌فسفات۵ برای تحویل نیکل به اوره‌آز برهمکنش داشته‌باشند. طبق نتایج پژوهش Fong، اهمیت UreG از دیگران بیشتر و حیاتی‌تر است و همچنین دریافتند که این آنزیم یک متالوآنزیم است و در محیط اسیدی معده فعالیت می‌کند(۹). خلیل پور و همکاران در سال ۲۰۱٤ در یک پژوهش، واکنش بین پروتئین UreG هلیکوباکترپیلوری با سرم هلیکوباکترپیلوری را انجام دادند که براساس نتایج حاصل از این پژوهش پروتئین UreG به شکلی موفقیت‌آمیز کلون‌سازی و بیان شد که نشان‌دهنده ی واکنش‌پذیری پروتئین مطلوب با نمونه های کشت مثبت هلیکوباکترپیلوری 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(۱٦). 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 ایمنی‌زایی آن در موش نژاد BALB/c نشان دهنده‌ی فعالیت مناسب این واکسن ژنی بود که باعث کنشگری سلول‌های Th-1 در موش شده‌است(۱۹). زیرواحد ureB آنزیم اوره آز، در سال ۲۰۰۷ توسط Begue و همکاران در وکتور یوکاریوت pcDNA3.1/V5-His-TOPO کلون‌سازی 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 واکسینه شده با این واکسن نوترکیب، ایمنی کمابیش بالایی علیه هلیکوباکترپیلوری پدید آمد(۲۰). یکی از هدف‌های تحقیق ما، کاربرد یکی از زیرواحدهای اوره‌آز(ureG)، به عنوان واکسن ژنی در تحقیقات آینده است. نتایج تحقیق Begue، مسیر روشن‌تری برای کاربرد اجزای آنزیم اوره‌آز به عنوان واکسن ژنی نشان می‌دهد. در تحقیق ما نیز از ناقل یوکاریوت با پایه pCI-neo و با کلون‌سازی ureG به عنوان یکی از مهم‌ترین اعضای خوشه ژنی اوره‌آز استفاده شده‌است. شیوع بسیار بالای عفونت هلیکوباکترپیلوری در جهان و نقش آن در ناراحتی‌های معده باعث شد روش‌های درمانی مختلفی علیه این باکتری به کار برده‌شود. اما سویه‌های مقاوم به دارو که در سال‌های اخیر افزایش یافته‌اند، عرصه درمان این عفونت را روز به روز تنگ‌تر و مشکل‌تر می‌کنند(۲۱). همین مسائل، پژوهشگران را بر آن داشته تا به دنبال راه‌هایی موثر برای پیشگیری از عفونت هلیکوباکترپیلوری باشند. بنابراین، یافتن آنتی‌ژن‌هایی که سیستم ایمنی میزبان را علیه این عفونت، برانگیزند، نخستین و مهم‌ترین گام در این راستا ست. یکی از مواردی که برای انتخاب نوع ژن برای تولید واکسن ژنی اهمیت دارد، اطمینان

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(۲۳و۲٤). 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 هلیکوباکترپیلوری استفاده کرد.

ژن ureG طبیعی(غیرسنتتیک) هلیکوباکترپیلوری پیروزمندانه در وکتور pTZ کلون شده و با نگرش درستی نتایج توالی یابی، می‌توان از این ژن به عنوان منبعی برای تحقیقات آینده بهره برد. همچنین، سازه ژنی pCI-neo-ureG که شامل وکتور بیان شونده یوکاریوت pCI-neo است می‌تواند در راستای تولید واکسن‌های نوترکیب 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 منافعی ندارند.

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 Gastroduodenal 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 Gastrointestin 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 Itsseroreactivity. 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]

1. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran