

مقاله پژوهشی

کلون سازی و بررسی بیان ژن ureB هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از وکتور بیانی (+) pcDNA3.1

سمیرا خیری دستنایی^۱، عباس دوستی^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
^۲ دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۱۸

*مؤلف مسئول

عباس دوستی

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

تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰

پست الکترونیک:

abbasdoosti@yahoo.com

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی و سرطان غدد لنفاوی و دستگاه گوارشی است. هنوز واکنش مؤثری علیه هلیکوباکتر پیلوری تولید نشده است. آنزیم اوره آز که توسط ژن ureB کد می‌شود، یکی از عوامل مهم تحریک سیستم ایمنی میزبان است؛ بنابراین هدف از این تحقیق کلون سازی و بررسی بیان ژن ureB به‌عنوان کاندیدای واکنش ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد.

روش کار: در این بررسی تجربی، ژن کد کننده ی ureB از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR تکثیر شد. محصولات PCR به روش کلون سازی T/A در وکتور pTZ درج شدند و سپس با آنزیم‌های XbaI و XhoI بریده شده و وارد وکتور بیانی (+) pcDNA3.1 گردیدند. وکتور نهایی pcDNA3.1(+)-ureB به روش الکتروپوریشن در سلول‌های CHO ترانسفورم شد. برای بررسی بیان پروتئین از روش SDS-PAGE استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دهنده تشکیل وکتور نو ترکیب pTZ-ureB می‌باشد. هضم آنزیمی و تعیین توالی نیز صحت کلونینگ ژن ureB در وکتور (+) pcDNA3.1 را تأیید کرد. نتایج الکتروپوریشن و سپس بررسی بیان ژن کلون شده در سلول‌های جانوری، تشکیل باند پروتئینی مورد نظر را روی ژل SDS-PAGE نشان داد.

نتیجه گیری: بر پایه نتایج حاصل، ژن ureB کلون شده در وکتور بیانی (+) pcDNA3.1، توان بیان و تولید محصول پروتئینی اختصاصی این ژن در سلول‌های یوکاریوتی را دارد. لذا سازواره نهایی pcDNA3.1(+)-ureB از پتانسیل لازم برای بررسی ایمنی‌زایی در مدل حیوانی به‌عنوان واکنش ژنی برخوردار است.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، واکنش ژنی، همسانه سازی، ژن ureB

Cloning and evaluation of expression of the *Helicobacter pylori* ureB gene by using pcDNA3.1(+) expression vector

Original Article

Samira Kheiri-Dastenaee¹, Abbas Doosti^{2*}

¹ M.Sc. of Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Associate Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* causes the gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and lymphoma. There is no effective vaccine against this bacterium. Urease which is coded by ureB is one of the important stimulating agents for host immune system. The aim of this study was cloning and expression study of the ureB gene in order to create a gene vaccine against *H. pylori*.

Methods: In this experimental study, ureB gene was reproduced from *Helicobacter pylori* genome using PCR method. The PCR products were T/A cloned into pTZ vector and then digested with XhoI and XbaI enzymes and inserted to the pcDNA3.1(+) vector. pcDNA3.1(+)-ureB final construct was transformed in CHO cells using electroporation method. ureB gene expression was shown on a SDS-PAGE gel.

Results: The results show that the pTZ-ureB recombinant vector was generated. The restriction digest and sequencing confirmed the correctness of the cloning of ureB into pcDNA 3.1(+) vector. The electroporation results and study of gene expression in animal cells showed the desirable protein band on SDS-PAGE gel.

Conclusion: According to the results, the pcDNA3.1(+)-ureB expression vector can express the ureB gene product in eukaryotic cells. So the pcDNA3.1(+)-ureB final construct has a high potential as a DNA vaccine candidate for the evaluation of the immunogenicity in animal model.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Recombinant vaccine, Gene cloning, ureB gene.

Article Info

Received: Nov.15, 2016
Accepted: Dec.08, 2016

*Corresponding Author:

Abbas Doosti
Biotechnology Research
Center, Islamic Azad
University, Shahrekord
Branch, Shahrekord, Iran

Tel: 09133838830

Email:
abbasdoosti@yahoo.com

Vancouver referencing:

Kheiri-Dastenaee S, Doosti A. Cloning and evaluation of expression of the *Helicobacter pylori* ureB gene by using pcDNA3.1(+) expression vector. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences* 2016; 2(2): 115-125.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری مارپیچی شکل، گرم منفی و از رده اپسیلون پروتئوباکتیریا (Epsilonproteobacteria)، است. بیش از ۵۰ درصد از جمعیت جهان به این باکتری آلوده بوده و ابتلا به این عفونت معمولاً در سال‌های آغازین زندگی به وقوع می‌پیوندد (۱). شکل مارپیچی به این باکتری اجازه می‌دهد در میان لایه‌های مخاطی پوشاننده معده وارد شود (۲). این باکتری مولکول‌های اوره که ماده‌ای شیمیایی است را تجزیه می‌کند و آمونیاک و دی اکسید کربن تولید می‌کند. آمونیاک غلافی در اطراف باکتری به وجود می‌آورد که آن را در مقابل اسید معده محافظت می‌کند. لذا تولید مقادیر زیاد آنزیم اوره آزه، برای بقا و بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری ضروری است (۳). هلیکوباکتر پیلوری توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) به‌عنوان یک عامل سرطان‌زای انسانی، از گروه ۱ معرفی شده است. این باکتری سبب ایجاد التهاب معده‌ی شدید و زخم پپتیک در همه‌ی افراد مبتلا می‌شود. میزان شیوع هلیکوباکتر پیلوری بر اساس نژاد، طبقه اجتماعی، شرایط اجتماعی-اقتصادی، بهداشت و سن متفاوت است (۴ و ۱). امروزه راه‌های تشخیصی و درمانی متعددی برای هلیکوباکتر پیلوری به کار می‌رود. آزمون‌های تشخیصی برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری شامل آزمون‌های نیازمند به انجام آندوسکوپی مثل آزمون سریع اوره آزه (RUT)، کشت، بافت‌شناسی و واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز (PCR) و آزمون‌های غیر آندوسکوپی شامل سنجش آنتی‌بادی، آزمون تنفسی اوره و آزمون آنتی‌ژنی مدفوعی می‌باشند (۵ و ۶).

آنزیم اوره آزه دارای وزن مولکولی ۵۴۰ کیلو دالتون بوده و متشکل از دو زیر واحد بزرگ *ureA* با ۲۶/۵ کیلو دالتون و *ureB* با ۶۱ کیلو دالتون بوده و اندازه ژن آن ۱/۷ کیلو جفت باز می‌باشد (۷). اوره آزه یک متالو آنزیم نیکل است که تبدیل

اوره به آمونیوم و دی اکسید کربن را هیدرولیز می‌کند. اوره آزه فعال هلیکوباکتر پیلوری، بستگی به حضور ساختارهای ژنی *ureA/B* دارد تا هولو آنزیم ۵۵۰ kDa تشکیل دهد و ژن‌های *ureI/E/F* برای بیان بالای فعالیت اوره آزه لازم می‌باشند و ژن‌های *ureB/G/I* برای استقرار باکتری در معده لازم است (۸). *ureB* مؤثرترین و رایج‌ترین ایمونژن تمامی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری است که می‌تواند پاسخ ایمنی حفاظتی را در بدن علیه هلیکوباکتر پیلوری ایجاد کند؛ بنابراین اوره آزه‌ها از جمله *ureB* به‌عنوان کاندیدهای مناسب برای واکسن هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند (۹). در سال‌های اخیر واکسن‌های متعددی علیه عوامل عفونی ساخته شده است. واکسن‌های ژنی نوعی از واکسن‌ها می‌باشند که با کاربرد تکنیک‌های نوین مهندسی ژنتیک تولید می‌شوند. مزایای واکسن‌های ژنی شامل خطر عود یا بازگشت پایین عفونت، ایجاد پاسخ ایمنی مؤثر و طولانی، ایجاد هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی، پایداری بالا نسبت به واکسن‌های زنده‌ی ضعیف شده و هزینه‌ی پایین می‌باشد. معایب واکسن‌های ژنی کم است. پاسخ ایمنی طولانی می‌تواند منجر به التهاب مزمن شود و همچنین به‌طور اندکی خطر پایان یافتن فرایندهای سلولی نرمال را افزایش دهد (۱۰). هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن‌های مختلفی می‌باشد که برخی از آن‌ها به‌عنوان کاندیدهای مناسب برای تولید واکسن انتخاب شده‌اند که شامل اوره آزه‌ها، پروتئین شوک حرارتی (*hsp*)، پروتئین غلاف فلاژلی (*hpaA*) و ژن‌های *cagA*، *vacA*، *babA* و *hpaA* می‌باشند (۷). هدف از تحقیق حاضر، تکثیر، جداسازی و همسانه سازی ژن *ureB* هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد و ایجاد سازواره (Construct) ژنی یوکاریوتی به‌عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد.

روش کار

سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری

این مطالعه تجربی، در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد. برای جداسازی ژن و میزبان مناسب برای کلون سازی ژن‌ها به ترتیب از باکتری‌های هلیکوباکتر پیلوری و اشریشیاکلی استفاده شد. تکثیر و جداسازی ژن ureB از درون ژنوم سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری (ATCC 43504) انجام شد. این باکتری از انستیتو پاستور ایران گرفته شد. از اشریشیاکلی سویه TOP10F به منظور ترانسفورماسیون و تکثیر وکتورهای تازه ساخت، بهره گرفته شد. این سویه باکتریایی از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، تهیه شد. میزبان یوکاریوتی در این تحقیق، سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) بود. سلول‌های CHO از دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد گرفته شدند. برای کلون سازی محصولات PCR از وکتور pTZ57R/T (ساخت شرکت ترمو ساینتیفیک آمریکا) استفاده گردید. این وکتور که از این پس برای سهولت نگارش در این تحقیق به صورت pTZ آورده می‌شود، در واقع در سیستم کیت T/A Cloning شرکت مذکور می‌باشد. وکتور ساب کلونینگ به کار رفته در این تحقیق، وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(+) (ساخت شرکت اینویترژن آمریکا) بود. اندازه این وکتور ۵۴۲۸ جفت باز بوده و دارای مارکرهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین و نئومایسین به ترتیب برای غربالگری سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت ترانسفورم شده با این وکتور، می‌باشد. وکتور مذکور دارای پروموتور ویروسی قوی به نام CMV است که بیان بسیار بالای ژن‌های کلون شده را به عهده دارد.

استخراج DNA و تکثیر ژن ureB

DNA ژنومی هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) بر اساس روش کار موجود در کیت، خالص سازی شد. بررسی غلظت DNA تخلیص شده با دستگاه نانودراپ (ساخت شرکت ترمو ساینتیفیک، آمریکا)

انجام شد و علاوه بر آن کیفیت DNA نیز با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی گردید. برای تکثیر ژن ureB ابتدا پرایمرهای اختصاصی برای آن با طراحی شد. به این منظور، توالی ژنوم هلیکوباکتر پیلوری محتوی ژن ureB به شماره ثبت FM991728 از بانک ژن جهانی (Gene Bank) موجود در پایگاه (NCBI)، گرفته شد و با کمک نرم افزار Gene Runner، طراحی پرایمر انجام شد. توالی پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده به صورت زیر می‌باشد:

ureB-F: 5'- ATA GTCGAC
ATGAAAAAGATTAGCAGAAAAAG -3'
ureB-R: 5'- ATC
AGTACTCTAGAAAATGCTAAAGAGTTGT
G -3'

همان‌طور که در ساختار پرایمرها ملاحظه می‌شود، در انتهای ۵-پایه هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، به ترتیب جایگاه برش برای دو آنزیم XhoI و XbaI در نظر گرفته شد. این توالی‌های برش که در توالی پرایمرها، زیر آن‌ها خط کشیده شده است، برای سهولت کلون سازی در طی مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین در فرادست هر سایت برش، تعداد سه نوکلئوتید به عنوان پایه قرار داده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۲ میلی مولار MgCl₂، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱۰۰ نانومولار از هر یک از پرایمرها، ۱۰۰ نانوگرم از DNA ی ژنومی هلیکوباکتر پیلوری و ۱ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq، (سیناژن، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر گرایانت (شرکت اپندروف، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی شامل، یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و در ادامه ۳۲ مرحله تکراری شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و نیم و در نهایت طولیل شدن نهایی یک مرحله‌ای در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از اتمام کار دستگاه ترمال سایکلر،

محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بوماید، الکتروفورز شدند و با دستگاه عکس برداری از ژل (UVI Tech، انگلستان)، مشاهده و ثبت گردیدند.

کلون سازی T/A

در این تحقیق، پس از پایان الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، قطعات مربوط به محصولات PCR ژن *ureB* با استفاده از تیغ اسکالپل از روی ژل بریده و داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (کیاژن، آمریکا) مطابق دستورالعمل کیت اجرا شد. به منظور کلون سازی T/A، از کیت شرکت ترمو ساینتیفیک که حاوی وکتور pTZ (T-Vector) می باشد، استفاده شد. پس از درج قطعات ژنی مربوط به *ureB* در وکتور pTZ، انتقال وکتورهای نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه TOP10F به روش شیمیایی و با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد و استریل انجام شد. باکتری های ترانسفورم شده روی محیط LB-Agar حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شدند. باکتری هایی که وکتور pTZ را دریافت نموده بودند، به خاطر وجود ژن مقاومت به آمپی سیلین در این وکتور، رشد نموده و تشکیل کلنی دادند. تعدادی (بین ۱۰ تا ۱۵ کلنی) از کلنی های حاصل به صورت تصادفی انتخاب و برای غربالگری از لحاظ داشتن وکتور نوترکیب pTZ-*ureB* مورد آزمایش قرار گرفتند. استخراج پلاسمید از کلنی های انتخاب شده با استفاده از کیت شرکت Bioneer (ساخت کشور کره جنوبی)، انجام شد. تأیید صحت کلون سازی ژن در این مرحله، با سه روش PCR، هضم آنزیمی با دو آنزیم *XhoI* و *XbaI* و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت.

کلون سازی ژن در وکتور بیانی (ساب کلونینگ)

در این پژوهش، محصولات PCR ژن *ureB* ابتدا در T-Vector به نام pTZ کلون سازی شدند (مطابق مطالب پاراگراف بالا) و انتظار می رود وکتور نوترکیب pTZ-*ureB* ایجاد شده باشد. به دلیل اینکه وکتور pTZ فاقد پروموتور در فرادست ژن کلون شده است و از طرف دیگر این وکتور قادر

به تکثیر و بیان ژن در سلول های یوکاریوتی نیست، انتقال ژن *ureB* به یک وکتور بیانی یوکاریوتی، ضروری به نظر می رسد. وکتور pcDNA3.1(+) به عنوان وکتور بیانی یوکاریوتی مورد استفاده قرار گرفت. لذا ژن *ureB* باید از درون وکتور pTZ-*ureB* خارج و در وکتور pcDNA3.1(+) ساب کلون گردد. وکتور نوترکیب pTZ-*ureB* با آنزیم های *XhoI* و *XbaI* بریده شد تا ژن *ureB* از آن خارج گردد. از طرف دیگر وکتور pcDNA3.1(+) نیز با همین دو آنزیم برش داده شد تا به صورت خطی درآید. سپس همه این محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز شدند. پس از پایان الکتروفورز، قطعات مربوط به ژن *ureB* و وکتور pcDNA3.1(+) از روی ژل بریده و با کمک کیت تخلیص گردیدند. واکنش اتصال (Ligation) بین ژن و وکتور مذکور با استفاده از آنزیم T4-لیگاز (سیناژن، ایران) انجام شد تا وکتور بیانی نوترکیب pTZ-*ureB* تشکیل گردد. مراحل ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* با وکتور نوترکیب، مطابق آنچه برای وکتور pTZ شرح داده شد، صورت پذیرفت. تأیید صحت ساب کلونینگ به ترتیب با روش های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، بررسی شد.

الکتروپوریشن سازواری نهایی pcDNA3.1(+)-

ureB به سلول های جانوری

در این تحقیق به منظور بررسی بیان ژن *ureB* در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary) استفاده شد. سلول های CHO در محیط RPMI 1640 (شرکت گیپکو) حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. برای انجام ترانسفورماسیون این سلول ها از روش الکتروپوریشن (دستگاه مدل Gene Pulser Xcell شرکت Bio-Rad آمریکا) استفاده شد. تعداد ۱۰^۶ * ۲ عدد از سلول ها، شمارش و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کویت ۰/۴ مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۸۰۰

ژن ureB روی ژنوم استخراج شده از هلیکوباکتر پیلوری، همان‌طور که انتظار می‌رفت سبب تشکیل باند ۱۷۲۲ جفت بازی شد که نتایج آن در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱. نتیجه PCR برای ژن ureB.

M: مارکر ۱ kb ساخت شرکت فرمتاز.

شماره ۱ و ۲ و ۳ و ۴: باند ۱۷۲۲ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ureB
NC: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)

کلون سازی T/A و ساب کلونینگ

در این مرحله، ابتدا کلون سازی با الحاق بین وکتور pTZ و قطعه ژن ureB انجام گرفت که صحت آن به وسیله PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. به طوری که با انجام PCR استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ureB روی کلنی‌های رشد یافته حامل وکتور نو ترکیب pTZ-ureB، محصولات PCR به اندازه ۱۷۲۲ جفت باز پدید آمد. همچنین برش آنزیمی این وکتور با آنزیم‌های XbaI و XhoI موجب تشکیل دو باند به اندازه‌های ۲۸۸۶ و ۱۷۲۲ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور pTZ و قطعه ژن ureB بود. ساب کلونینگ ژن ureB درون وکتور pcDNA3.1(+)، نتایج موفقیت آمیزی در پی داشت. تأیید صحت ساب کلونینگ با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، انجام گرفت و نتایج همه این آزمایشات در سستی تشکیل سازواره نهایی -pcDNA3.1(+)-ureB را تأیید می‌کنند. هضم آنزیمی این وکتور نو ترکیب و الکتروپورز آن روی ژل آگارز یک درصد سبب تشکیل دو

نانوگرم در هر میکرولیتر از DNA (وکتور بیانی نو ترکیب pcDNA3.1(+)-ureB) به سلول‌ها اضافه شد و کووت به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس در دستگاه الکتروپوریشن قرار داده شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده ۰/۱۷۴ کیلوولت و ۴۰۰ میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس سلول‌های الکتروپوریت شده در فلاکس کشت حاوی محیط RPMI به همراه ۱۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. سپس به هر یک فلاکس‌های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین (آنتی‌بیوتیک انتخابی مناسب برای سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور pcDNA3.1(+)-ureB) افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری گردیدند. تمام مراحل فوق (الکتروپوریشن) برای فلاکس کشت دیگری از سلول‌های CHO که به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده بودند نیز به اجرا درآمد، با این تفاوت که به سلول‌های گروه کنترل، هیچ گونه DNA بی اضافه نگردید.

انجام SDS-PAGE

با توجه به اندازه پروتئین UreB (۶۱ کیلو دالتون)، ژل پلی اکریل آمید ۱۶ درصد به کار برده شد. نمونه‌های پروتئین پس از بارگذاری بر روی ژل عمودی، با اختلاف پتانسیل ۱۲۰ ولت به مدت ۴ ساعت الکتروفورز شدند و سپس ژل به رنگ کوماسی بلو، رنگ آمیزی شد.

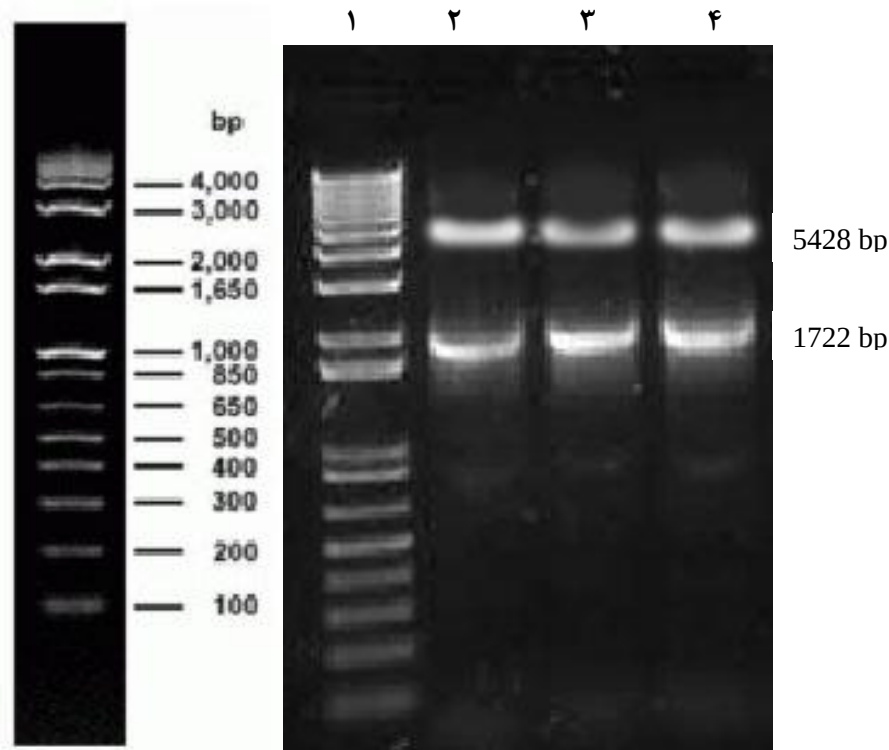
یافته‌ها

جداسازی و تکثیر ژن ureB هلیکوباکتر پیلوری

در این مطالعه، استخراج DNA ژنومی از باکتری هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت انجام شد. نتایج الکتروفورز DNA تخلیص شده بر روی ژل آگارز و بررسی غلظت DNA خالص سازی شده با نانودراپ نشان‌دهنده ۷۵ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. نتایج انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی

به ژن مورد مطالعه در این تحقیق شد. نتایج این مرحله در شکل های ۲ و ۳ ملاحظه می شود.

قطعه DNA به اندازه های ۵۴۲۸ جفت بازی مربوط به وکتور pcDNA3.1(+) و ۱۷۲۲ جفت بازی مربوط

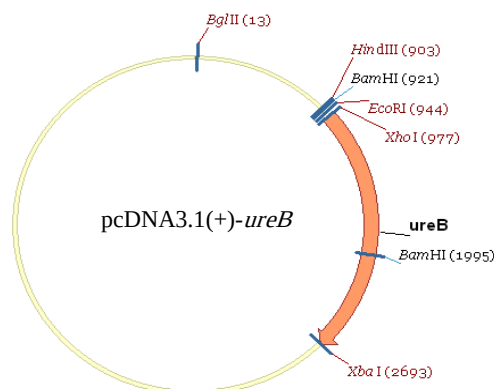


شکل ۲. هضم آنزیمی سازواره نهایی pcDNA3.1(+)-ureB با دو آنزیم XhoI و XbaI.

شماره ۱: مارکر 1Kb شرکت ترمو فیشر با شماره کاتالوگ 10816-

به ترتیب مربوط به وکتور pcDNA3.1(+) و ژن ureB است.

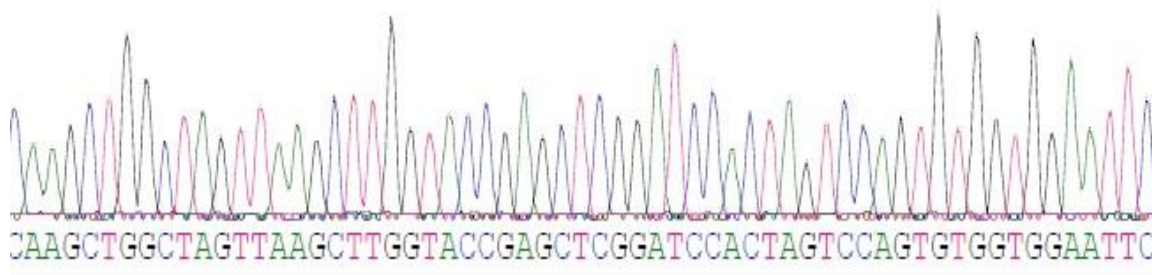
015. شماره های ۲ تا ۴ که باندهای با اندازه های ۵۴۲۸ و ۱۷۲۲ جفت بازی



شکل ۳. تصویر شماتیک وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-ureB

هیچ گونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن به وجود نیامده و درستی توالی آن مورد تأیید است. بخشی از نتایج تعیین توالی این ژن در شکل ۴ ملاحظه می‌شود.

نتایج تعیین توالی قطعه ژن کلون شده در وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-ureB، پس از مقایسه با توالی‌های موجود از این ژن در پایگاه داده‌های NCBI، نتایج نشان داد که

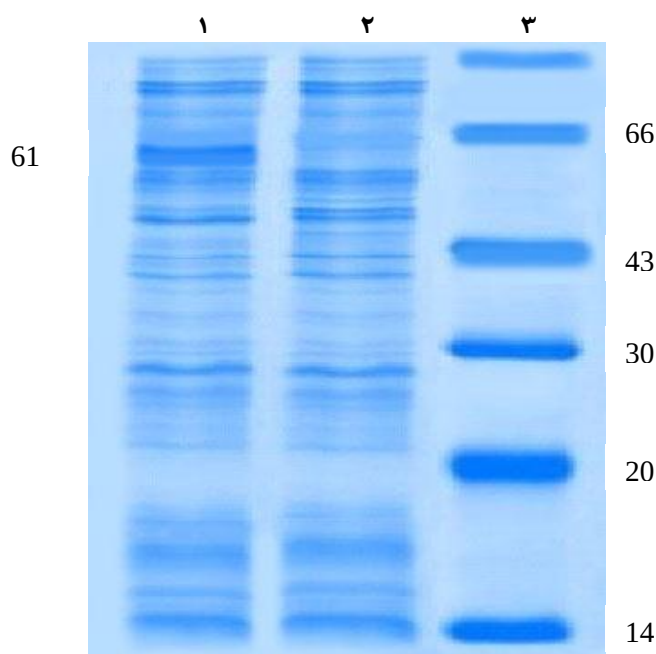


شکل ۴. تصویر بخشی از دندروگرام مربوط به تعیین توالی ژن ureB

الکتروپوریشن و بیان ژن

کنار سلول‌های گروه شاهد (سلول‌های CHO بدون دریافت وکتور و بدون مواجه شدن با آنتی‌بیوتیک نئومایسین) به منظور بررسی بیان ژن ureB بررسی شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز این دو دسته سلول روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ آمیزی آن با کوماسی بلو نشان داد، باند ۶۱ کیلو دالتونی مربوط به محصول ژن ureB در سلول‌های جانوری تشکلا شد (شکل ۵)

برای ترانسفورم نمودن وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-ureB بیان کننده ژن ureB در سلول‌های یوکاریوتی، از روش الکتروپوریشن کمک گرفته شد. نتایج دست کاری سلول‌های CHO به روش الکتروپوریشن با سازواره نهایی pcDNA3.1(+)-ureB، سبب ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین در سلول‌های CHO گردید. عصاره سلولی حاصل از سلول‌های ترانسفورم شده CHO در



شکل ۵. بیان ژن *ureB* و تشکیل باند ۶۱ کیلو دالتونی.شماره ۱: سلول ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب *pcDNA3.1(+)-ureB*

شماره ۲: سلول ترانسفورم نشده

شماره ۳: مارکر

بحث

در این مطالعه، ژن *ureB* به روش PCR تکثیر و در وکتور pTZ با موفقیت کلون شد. سپس ساب کلونینگ ژن مذکور در وکتور بیانی یوکاریوتی *pcDNA3.1(+)* انجام شد و نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت کلون سازی و تشکیل سازواره نهایی *pcDNA3.1(+)-ureB* را نشان داد.

از اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی، تلاش جهت یافتن واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری شروع شده است. هر چند تاکنون واکسن مؤثری علیه هلیکوباکتر پیلوری و برای پیشگیری از این عفونت باکتریایی تولید نشده است اما یکی از مؤثرترین واکسن‌ها در سال‌های اخیر از راه مهندسی ژنتیک تولید شده است و مراحل موفقیت را پشت سر گذاشته است. این واکسن در تحقیق Zeng و همکاران در سال ۲۰۱۵ در تعدادی از بچه‌های بین سنین ۶ تا ۱۵ سال مورد آزمایش قرار گرفت (۱۱). ارتباط و شباهت این تحقیق با تحقیق ما در انتخاب نوع ژن بوده است. به‌طوری‌که در هر دو تحقیق، ژن پایه و اصلی، ژن *ureB* هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. در تحقیق صورت گرفته توسط zeng، یک فیوژن پروتئین شامل زیر واحد B آنزیم اوره آز هلیکوباکتر پیلوری به همراه انترتوکسین B باکتری اشریشیاکلی، به‌عنوان واکسن خوراکی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱). هر چند در تحقیق ما، هدف از ساخت DNA نوترکیب، ایجاد واکسن ژنی بوده و نوع وکتورهای تکثیری و بیانی به کار رفته در این دو تحقیق با یکدیگر کاملاً متفاوت است. لازم به توضیح است، همان‌طور که در نتایج تحقیق ما دیده می‌شود، بیان ژن *ureB* در سلول‌های جانوری CHO در محیط کشت دیده شده و سازواره *pcDNA3.1(+)-ureB* قادر به بیان ژن *ureB* می‌باشد.

این نکته از این جهت حائز اهمیت است که علاوه بر امکان کاربرد این سازواره به‌صورت مستقیم به‌عنوان یک واکسن ژنی، امکان تخلیص پروتئین *UreB* نیز وجود دارد تا همانند تحقیق فوق‌الذکر، از آن به‌صورت واکسن خوراکی یا واکسن پیتیدی نیز استفاده شود.

مجموعه ژنی مسئول کد گذاری و پردازش آنزیم اوره آز در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری، شامل چندین زیر واحد دنبال هم است که به ترتیب به صورت *ureA*، *ureB*، *ureI*، *ureE*، *ureF*، *ureG* و *ureH* در کنار هم چیده شده‌اند (۱۲). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ توسط کریمی و همکاران صورت گرفته، با هدف ایجاد واکسن نوترکیب، به بررسی زیر واحدهای *ureA* و *ureB* پرداختند. در واقع این محققان ابتدا به روش PCR، اقدام به جداسازی بخش‌های *ureA* و *ureB* از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری‌های ایزوله شده در ایران نمودند. سپس قطعات ژنی یاد شده را در وکتور pET کلون سازی و در باکتری *E. coli* سویه BL21 بیان کردند (۱۴). این تحقیق از نظر تکنیک‌های به کار گرفته شده شباهت زیادی با کار ما داشته اما در تحقیق حاضر، ما اقدام به جدا سازی بخش *ureB* از مجموعه ژنی اوره آز نموده و ژن مذکور را کلون نمودیم. بررسی بیان *ureB* نیز برخلاف کار کریمی و همکاران، در سلول یوکاریوت انجام پذیرفت. Lue و همکاران یک پروتئین جدیدی از زیر واحد *ureB* از هلیکوباکتر پیلوری را ایجاد کردند و خواص بیولوژیکی آن را آزمایش کردند (۱۵) Ferreo و همکاران بیان کردند که اوره آز مخصوصاً *ureB* به‌عنوان هدف مناسب در واکسن می‌باشد و در تحقیقات مختلف به کار می‌رود. آن‌ها این آنتی‌ژن را کلون کردند و ژن‌های رمزگذار مربوط به زیرواحد اوره آز و حساسیت

در سیستم کلون سازی T/A بر پایه وکتور TOPO کلون سازی و سپس در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA4-His سواب کلون شده‌اند (۱۸). تکنیک‌های به کار رفته در این تحقیق، دقیقاً مشابه مسیر کار تحقیقاتی ما بوده با این تفاوت که وکتورهای تکثیری و بیانی به کار گرفته شده، با کار ما یکسان نمی‌باشد. تمام شواهد بالا مؤید مسیر انتخاب شده درست در تحقیق ماست. در مجموع می‌توان گفت که با توجه به شیوع بسیار بالای هلیکوباکتر پیلوری در جوامع بشری و به‌ویژه ایران (۵ و ۱)، هرگونه تلاش در زمینه پیشگیری یا درمان این عفونت حائز اهمیت است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این کار تحقیقاتی نشان می‌دهد، ژن ureB هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت تکثیر، جداسازی و در وکتور pTZ کلون سازی شده است. تا این مرحله و با در دست داشتن پلاسمید نو ترکیب pTZ-ureB می‌توان از آن به‌عنوان بانک ژن ureB برای انجام تحقیقات متعدد در زمینه تولید پروتئین نو ترکیب یا تولید آنتی بادی علیه هلیکوباکتر پیلوری و غیره نام برد که می‌تواند در اختیار محققان کشور قرار گیرد. مهم‌تر از این مقوله، وکتور نو ترکیب بیانی به دست آمده در این پژوهش با نام ureB(+)-pcDNA3.1 از پتانسیل لازم در دو راستا برخوردار است. از این سازواره می‌توان در مسیر تولید واکسن‌های نو ترکیب به‌صورت بیان ژن ureB و تولید محصول پروتئینی و تخلیص آن با اهداف کاربردی به‌صورت واکسن نو ترکیب پروتئینی نظر داشت. جهت دوم که بیشتر در این پروژه مدنظر بوده، استفاده از این وکتور بیانی نو ترکیب یوکاریوتی به‌منظور کاربرد در تحقیقات در زمینه واکسن ژنی است. به بیان دیگر، تولید اولیه و موفق محصول پروتئینی ژن ureB در سیستم یوکاریوتی که در پژوهش حاضر محقق شد، راهی روشن در راستای کاربرد pcDNA3.1(+)-ureB به‌عنوان واکسن ژنی در حیوانات

آنتی ژنی آن را تعیین نمودند (۱۶). بهاره حاجی خانی و همکاران در سال ۲۰۱۰، بر روی قطعه‌ای از زیر واحد B آنزیم اوره آز و ژن HpaA هلیکوباکتر پیلوری و بیان آن تحقیق نمودند. در تحقیق صورت گرفته، ژن‌های کدکننده‌ی ureB332 و hpaA از ژنوم سویه استا ندارد هلیکوباکتر پیلوری جدا شده و با هضم آنزیمی به داخل ناقل pET28a وارد گردید. سپس سازواره حاصل به داخل میزبان‌های کلون سازی و بیانی ترانسفورم شد و پس از تأیید بیان ترکیب پروتئینی به روش کروماتوگرافی تمایلی توسط رزین نیکل تخلیص و سپس آنتی ژنیسیته آن به روش لکه گذاری و سترن بررسی شد. نتایج هضم آنزیمی PCR و تعیین توالی نشان داد که ژن هدف به‌درستی در حامل مورد نظر کلون شده است. آن‌ها دریافتند که استفاده از HpaA در واکسن‌های چند آنتی ژنی مانند HpaA-UreB در مقایسه با استفاده آن به تنهایی تأثیر بیشتری خواهد داشت (۸). در تحقیق حاجی خانی نکته قابل توجه این است که از دو ژن هلیکوباکتر استفاده شده است؛ یعنی از یکی از بخش‌های خوشه ژنی اوره آز که نتایج ایمنی‌زایی خوبی داشته و استفاده از ژن کمکی hpaA بر تأثیر آن افزوده است. در تحقیق ما نیز از این جنبه که یکی از اجزای اوره آز کلون سازی و بررسی شده است، مشابهت نشان می‌دهد. فوجی و همکاران با توجه به حضور جایگاه فعال آنزیم اوره آز در زیر واحد B، قطعه‌ای ۱۳۵ آمینو اسیدی از UreB به‌عنوان یک ترکیب پروتئینی همراه با گلو تاتیون S- ترانسفراز را در E.coli تولید نمودند. آنتی سرم تولید شده در اثر ایمن سازی با UreB-GST اتصال اختصاصی به سطح مخاط معده‌ی انسان آلوده به هلیکوباکتر پیلوری را نشان داده و موجب مهار فعالیت اوره آز باکتری شده است درحالی‌که اوره آز کامل خالص شده چنین آنتی سرمی را القا نمی‌کند (۱۷). در تحقیق دیگری که با تحقیق ما شباهت دارد، روی ژن ureB به‌عنوان واکسن ژنی تحقیقاتی صورت گرفته است. در تحقیق مذکور، پس از تکثیر ureB به روش PCR، محصولات PCR

آزمایشگاهی مناسب، پیش رو قرار می دهد که البته این موضع نیاز به بررسی بیشتری از جمله ایمن سازی در حیوان و ارزیابی پاسخ های ایمنی حاصل از آن دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد با شماره ثبت ۹۴/۲۴۸ حاصل شده است. محققان و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به ویژه آقای دکتر حسین انصاری و آقای حمیدرضا کبیری که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند.

References

1. Haley KP, Gaddy JA. Nutrition and *Helicobacter pylori*: Host Diet and Nutritional Immunity Influence Bacterial Virulence and Disease Outcome. *Gastroenterology Research and Practice* 2016;1-10.
2. Daniela LN, Claudia LM, Cristina S, Bruno R. Salette, Eridication of *Helicobacter pylori*. *Jornal of Controlled Release* 2014;189: 169-72.
3. Zhou Z, Gong S, Li XM, Yang Y, Guan R, Zhou S, et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Medical Microbiology* 2015 ;64(1): 104- 7.
4. Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P. *Helicobacter pylori vacA* genotypes in Shahrekordian (Iran) H. pylori-positive patients. *Research Journal of Biological Sciences* 2009;4(1): 11-15.(In Persian)
5. Doosti A, Rahimian Gh, Nasiri J, Yavari-Foroshani P. Identification the frequency of cytotoxin associated gene in *Helicobacter pylori* strain isolated from biopsy samples in shahrekord. *Armaghan-e- Danesh* 2007;29(1):12-38.(In Persian)
6. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *The American journal of gastroenterology* 2007;102(8):1808-25.
7. Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (Stx2) genes. *GENETIKA-BELGRADE*. 2015 Jan 1;47(2):499-507. (In Persian)
8. Hajikhani B, Najar Peerayeh S, Soleimanjahi H, Hassan ZM. Cloning, expression, purification and antigenicity of recombinant UreB332-HpaA fusion protein from *Helicobacter pylori*. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2010;13(2):1-10.(In Persian)
9. Kathryn A, Joanne V, Elizabeth A, Amy E. In Vivo Complementation of *ureB* Restores the Ability of *Helicobacter pylori* To Colonize. *Infection and Immunity* 2002;70(2): 771-8.
10. Harry K, Cynthia KL, Thomas PM. Vaccine development against infection with *Helicobacter pylori*. *British Medical Bulletin* 1998;54(1): 229-41.
11. Zeng M, Mao XH, Li JX, Tong WD, Wang B, Zhang YJ, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2015;386(10002):1457-64.
12. Mobley HLT. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10(1):57-64.
13. Shi Y, Wu C, Zhou WY, Mao XH, Guo G, Zou QM. Identification of H-2 d restricted Th epitopes in Urease B subunit of *Helicobacter pylori*. *Vaccine* 2007;25(14):2583-90.
14. Karimi M, Mohammadi M. Cloning and Expression of Recombinant *Helicobacter pylori* Urease A and B Subunits as a Putative Vaccine. *Iranian Biomedical Journal* 2001;5(4):107-11.(In Persian)
15. Lu DS, Mao XH, Zou QM, Wu C, Yang J, Zhang WJ, et al. Recombinant *Helicobacter pylori* urease B subunit and its biological properties. *Academic journal of the first medical college of PLA* 2003;23(6):549-52.
16. Ferrero RL, Thiberge JM, Huerre M, Labigne A. Recombinant antigens prepared from the urease subunits of *Helicobacter* spp.: evidence of protection in a mouse model of gastric infection. *Infection and immunity* 1994;62(11):4981-9.
17. Fujii R, Morihara F, Fukushima K, Oku T, Hifumi E, Uda T. Recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against H. pylori-associated disease. *Biotechnology and bioengineering* 2004;86(7):737-46.
18. Hatzifoti C, Roussel Y, Harris AG, Wren BW, Morrow JW, Bajaj-Elliott M. Mucosal immunization with a urease B DNA vaccine induces innate and cellular immune responses against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2006;11(2):113-22.