مجله دانشگاه علوم پزشکی جیرفت

سال ۲ (۲)، آذر ۱۳۹۵، صفحه ۱۲۵-۱۱۵

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

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی و سرطان غدد لنفاوی و دستگاه گوارشی است. هنوز واکسن 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 واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد.

روش کار: در این بررسی تجربی، ژن کد کننده‌ی 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 آنزیم های XhoI و XbaI 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 نوترکیب 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.

نتیجه‌گیری: 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 واکسن ژنی برخوردار است.

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

اطلاعات مقاله

دریافت : ۱۳۹۵/۰۸/۲۵

پذیرش : ۱۳۹۵/۰۹/۱۸

***مولف مسئول**

عباس دوستی

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

تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰

پست الکترونیک:

abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Jiroft University of Medical Sciences

Vol. 2, No. 2, November 2016, P.115-125

Original Article

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

Samira Kheiri-Dastenaei[1], 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-Dastenaei 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 پروتئوباکتریا (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 آز، 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 متعدی برای هلیکوباکتر پیلوری به کار می‌رود. آزمون‌های تشخیصی برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری شامل آزمون‌های نیازمند به انجام آندوسکوپی مثل آزمون سریع اوره آز (RUT)، کشت، بافت‌شناسی و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) و آزمون‌های غیر آندوسکوپی شامل سنجش آنتی‌بادی، آزمون تنفسی اوره و آزمون آنتی‌ژنی مدفوعی می‌باشند (۶ و ۵).

آنزیم اوره آز 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 آز یک متالو آنزیم نیکل است که تبدیل اوره به آمونیوم و دی اکسید کربن را هیدرولیز می‌کند. اوره آز فعال هلیکوباکتر پیلوری، بستگی به حضور ساختارهای ژنی ureA/B دارد تا هولو آنزیم ۵۵۰ kDa تشکیل دهد و ژن‌های فرعی ureI/E/F برای بیان بالای فعالیت اوره آز لازم می‌باشند و ژن‌های ureB/G/I برای استقرار باکتری در معده لازم است (۸). ureB مؤثرترین و رایج‌ترین ایمنوژن تمامی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری است که می‌تواند پاسخ ایمنی حفاظتی را در بدن علیه هلیکوباکتر پیلوری ایجاد کند؛ بنابراین اوره آزها 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 کاندیداهای مناسب برای تولید واکسن انتخاب شده‌اند که شامل اوره آزها، 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 به‌منظور ترانسفورماسیون و تکثیر وکتورهای تازه‌ساخت، 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 به‌صورت 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 اینویتروژن 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 پروموتر 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، خالص‌سازی 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 نرم‌افزار Gene Runner، طراحی پرایمر انجام شد. توالی پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده به‌صورت زیر می‌باشد:

ureB-F: 5'- ATA GTCGAC ATGAAAAAGATTAGCAGAAAAG -3'
ureB-R: 5'- ATC AGTACTCTAGAAAATGCTAAAGAGTTGTG -3'

همان‌طور که در ساختار پرایمرها ملاحظه می‌شود، در انتهای ۵-پریم 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 به‌عنوان 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 گرادیانت (شرکت اپندروف، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی شامل، یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و در ادامه ۳۲ مرحله تکراری شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و نیم و در نهایت طویل شدن نهایی یک مرحله‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از اتمام کار دستگاه ترمال سایکلر،

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

کلون سازی T/A

در این تحقیق، پس از پایان الکتوفورز 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 میلی‌لیتری قرار داده شدند. استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (کیاژن، آمریکا) مطابق دستورالعمل کیت اجرا شد. به‌منظور کلون سازی T/A، از کیت شرکت ترمو ساینتیفیک که حاوی وکتور pTZ (T-Vector) می‌باشد، 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. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط LB-Agar حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند. باکتری‌هایی که وکتور pTZ را دریافت نموده بودند، به خاطر وجود ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در این وکتور، رشد نموده و تشکیل کلنی دادند. تعدادی (بین ۱۰ تا ۱۵ کلنی) از کلنی‌های حاصل به‌صورت تصادفی انتخاب و برای غربالگری از لحاظ داشتن وکتور نوترکیب pTZ-ureB مورد آزمایش قرار گرفتند. استخراج پلاسمید از کلنی‌های 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 می‌رود وکتور نوترکیب pTZ-ureB ایجاد شده باشد. به دلیل اینکه وکتور pTZ فاقد پروموتر در فرادست ژن کلون شده است و از طرف دیگر این وکتور قادر به تکثیر و بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی نیست، انتقال ژن ureB به یک وکتور بیانی یوکاریوتی، ضروری به نظر می‌رسد. وکتور pcDNA3.1(+)به‌عنوان 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 آنزیم‌های 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 به‌صورت 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 pcDNA3.1(+)-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 روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، بررسی شد.

الکتروپوریشن سازواره‌ی نهایی pcDNA3.1(+)-ureB به سلول‌های جانوری

در این تحقیق به‌منظور بررسی بیان ژن ureB در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary) استفاده شد. سلول‌های CHO در محیط RPMI 1640 (شرکت گیبکو) حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. برای انجام ترانسفورماسیون این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن (دستگاه مدل Gene Pulser Xcell شرکت Bio-Rad آمریکا) استفاده شد. تعداد $۲*۱۰^{۶}$ عدد از سلول‌ها، شمارش و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کویت ۰/۴ مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۸۰۰

نانوگرم در هر میکرولیتر از DNA (وکتور بیانی نوترکیب 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 کیلو ولت و ۴۰۰ میکرو فاراد 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 نئومایسن (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 به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده بودند نیز به اجرا درآمد، با این تفاوت که به سلول‌های گروه کنترل، هیچ‌گونه DNA یی 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، رنگ‌آمیزی 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 ی خالص‌سازی شده با نانودراپ نشان‌دهنده ۷۵ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. نتایج انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی 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 ژنureB .

M: مارکر kb ۱ ساخت شرکت فرمنتاز.

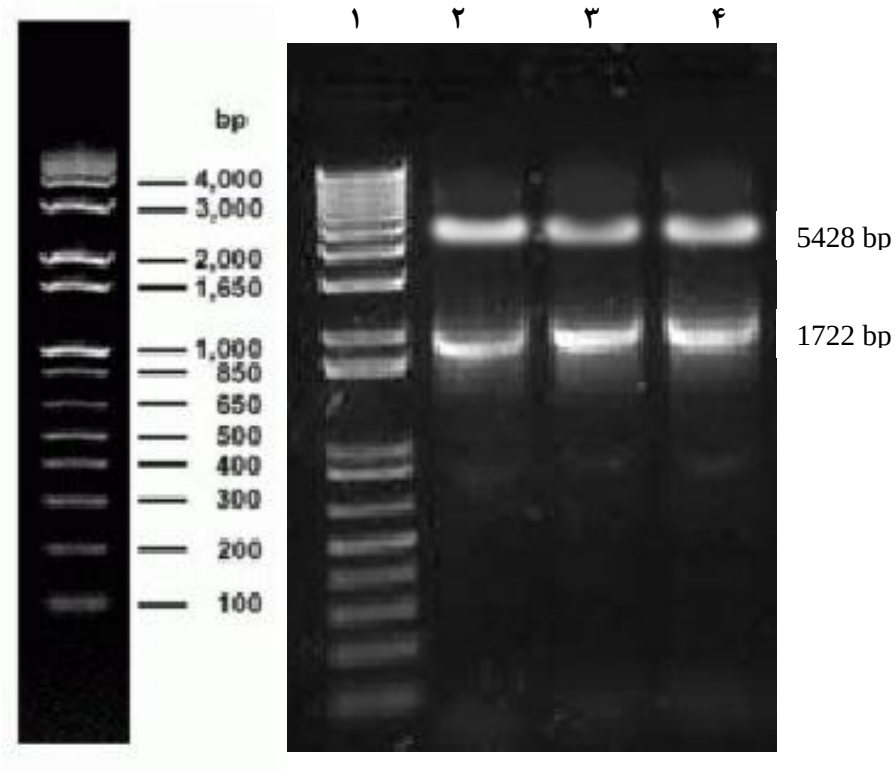
شماره ۱ و ۲ و ۳ و ۴: باند ۱۷۲۲ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن ureB

NC: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)

کلون سازی T/A و ساب کلونینگ

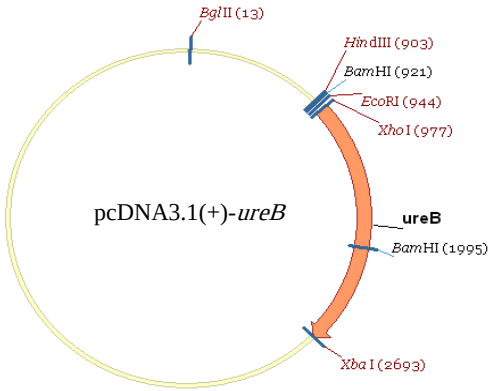
در این مرحله، ابتدا کلون سازی با الحاق بین وکتور pTZ و قطعه ژن ureB انجام گرفت که صحت آن به‌و سیله‌ی PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. به‌طوری‌که با انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ureB روی کلنی‌های رشد یافته حامل وکتور نوترکیب pTZ-ureB، محصولات PCR به اندازه ۱۷۲۲ جفت باز پدید آمد. همچنین برش آنزیمی این وکتور با آنزیم‌های XhoI و XbaI 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 موفقیت‌آمیزی در پی داشت. تأیید صحت ساب کلونینگ با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، انجام گرفت و نتایج همه این آزمایشات در ستی تشکیل سازواره نهایی pcDNA3.1(+)-ureB را تأیید می‌کنند. هضم آنزیمی این وکتور نوترکیب و الکتروفورز آن روی ژل آگارز یک درصد سبب تشکیل دو

قطعه DNA به اندازه های ۵۴۲۸ جفت بازی مربوط به وکتور pcDNA3.1(+) و ۱۷۲۲ جفت بازی مربوط به ژن مورد مطالعه در این تحقیق شد. نتایج این مرحله در شکل‌های ۲ و ۳ ملاحظه می‌شود.



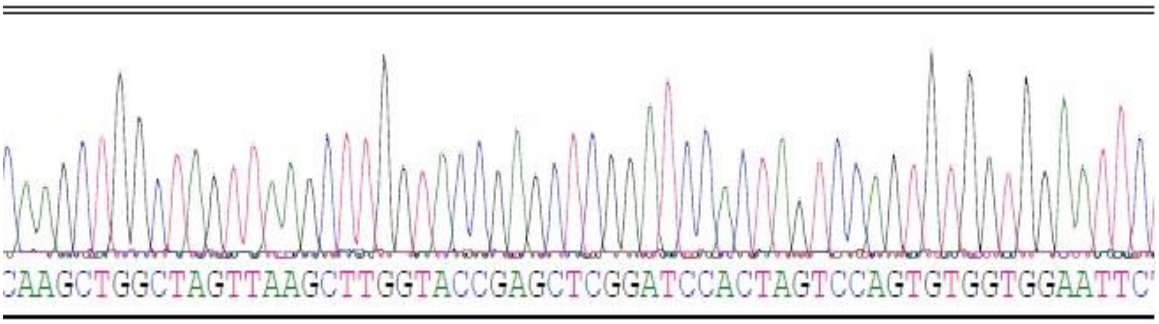
شکل ۲. هضم آنزیمی سازواره نهایی pcDNA3.1(+)-ureB با دو آنزیم XhoI و XbaI.

شماره ۱: مارکر 1Kb شرکت ترمو فیشر با شماره کاتالوگ -10816 015. شماره‌های ۲ تا ۴ که باندهای با اندازه‌های ۵۴۲۸ و ۱۷۲۲ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور pcDNA3.1(+) و ژن ureB است.



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

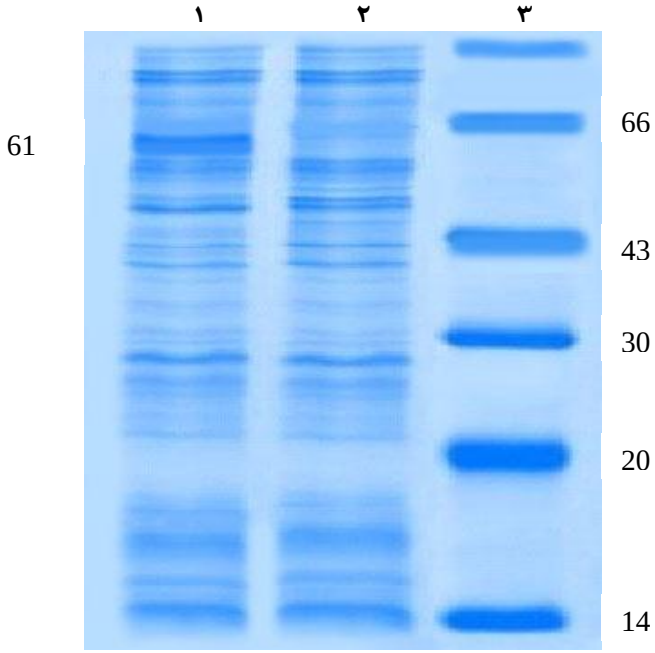
نتایج تعیین توالی قطعه ژن کلون شده در وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-ureB، پس از مقایسه با توالی‌های موجود از این ژن در پایگاه داده های NCBI، نتایج نشان داد که هیچ‌گونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن به وجود نیامده و درستی توالی آن مورد تأیید است. بخشی از نتایج تعیین توالی این ژن در شکل ۴ ملاحظه می‌شود.



شکل ٤. تصویر بخشی از دندروگرام مربوط به تعیین توالی ژن ureB

الکتروپوریشن و بیان ژن

برای ترانسفورم نمودن وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-ureB بیان‌کننده ژن ureB در سلول های 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 کنار سلول‌های گروه شاهد (سلول‌های CHO بدون دریافت وکتور و بدون مواجه‌شدن با آنتی‌بیوتیک نئومایسین) به‌منظور بررسی بیان ژن ureB بررسی شدند. نتایج حاصل از الکتروفورز این دو دسته سلول روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آن با کوماسی بلو نشان داد، باند ۶۱ کیلو دالتونی مربوط به محصول ژن ureB در سلول های جانوری تشکیل شد (شکل ۵)



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 موفقی 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 انتروتوکسین 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 می باشد.

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 پپتیدی 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. آن ها این آنتی‌ژن را کلون کردند و ژن های رمز گذار مربوط به زیرواحد اوره آز و حساسیت

آنتی‌ژنی 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 استاندارد هلیکو باکتر 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 تائید بیان ترکیب پروتئینی به روش کروماتوگرافی تمایلی توسط رزین نیکل تخلیص و سپس آنتی‌ژنیسیته آن به روش لکه‌گذاری وسترن 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 آنتی‌ژنی 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 آمینواسیدی از UreB به‌عنوان یک ترکیب پروتئینی همراه با گلوتاتیون S-ترانسفراز را در E.coli تولید نمودند. آنتی سرم تولید شده در اثر ایمن‌سازی 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 در سیستم کلون سازی T/A بر پایه وکتور TOPO کلون سازی و سپس در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA4-His ساب 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 نوترکیب pTZ-ureB می‌توان از آن به‌عنوان بانک ژن ureB برای انجام تحقیقات متعدد در زمینه تولید پروتئین نوترکیب یا تولید آنتی بادی علیه هلیکو باکتر پیلوری و غیره نام برد که می‌تواند در اختیار محققان کشور قرار گیرد. مهم‌تر از این مقوله، وکتور نوترکیب بیانی به دست آمده در این پژوهش با نام pcDNA3.1(+)-ureB از پتانسیل لازم در دو راستا برخوردار است. از این سازواره می‌توان در مسیر تولید واکسن‌های نوترکیب به‌صورت بیان ژن ureB و تولید محصول پروتئینی و تخلیص آن با اهداف کاربردی به‌صورت واکسن نوترکیب پروتئینی نظر داشت. جهت دوم که بیشتر در این پروژه مدنظر بوده، استفاده از این وکتور بیانی نوترکیب 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

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

تقدیر و تشکر

این مقاله از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد با شماره ثبت ۹۴/۲۴۸ حاصل شده است. محققان و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به‌ویژه 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 Microbiolog 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.