

Isolation and cloning of *Helicobacter Pylori ureE* gene into pIRES2-DSRed expression vector to generate a gene vaccine

Maryam Ghorbani¹, Abbas Doosti²

Background and Aim: As one of the factors of gastric ulcers and cancer, *Helicobacter pylori* can live in the acidic environment of stomach for many years due to having urease enzyme. This enzyme requires Ni²⁺ and a group of auxiliary proteins such as *ureE* for its catalytic activity. Urease is not only a requisite factor to colonize the *Helicobacter pylori* but it is also pathogenic with different mechanisms. Regarding the high prevalence of these bacteria finding a way to prevent infection with them is necessary. The present research aimed at homogenizing . cloning of *Helicobacter Pylori ureE* gene into pIRES2-DS Red expression vector in order to create a DNA (gene) vaccine.

Materials and Methods: In this experimental study, the *ureE* gene fragment was amplified through PCR method and it was cloned using T/A cloning in the pTZ vector. Sub-cloning of the gene was done in pIRES2-DS Red vector using T4-ligase enzyme and it was transformed into *E. coli* TOP10F strain; and, then, amplified. The gene construct, which is a DNA vaccine candidate, was transferred to CHO cells using electroporation method to investigate the gene expression in eukaryotic systems. *UreE* gene expression was assessed in eukaryotic cells by means of SDS-PAGE.

Results: *UreE* gene cloning was confirmed in two vectors including pTZ as a replicative vector and pIRES2-DS Red expression vector by PCR, enzyme digestion, and sequencing methods. SDS-PAGE results confirmed the successful expression of the *ureE* gene in the eukaryotic system of CHO cells.

Conclusion: The recombinant pIRES2-DSRed-*ureE* construct is capable of successfully generating of polypeptides derived from *Helicobacter Pylori ureE* gene expression in bestial cells. Given that the protein product of the *ureE* gene is one of the most important proteins of the mentioned bacterium, . the created recombinant DNA in this research can be used as a DNA vaccine candidate against *Helicobacter pylori* in . future.

Key Words: *Helicobacter pylori*, *ureE* genes, Cloning, Electroporation

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2016; 23 (4): 286-297.

Received: October 4, 2016

Accepted: November 23, 2016

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

² Corresponding Author; Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Email: abbasdoosti@yahoo.com

Tel: +98383257294

Fax: +983833361048

Postal Address; Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Biotechnology Research Center, Po Box 166

جداسازی و همسانه‌سازی ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری در ناقل بیانی pIRES2-DSRed به منظور ایجاد واکسن ژنی

مریم قربانی¹، عباس دوستی²

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یکی از عوامل زخم معده و ایجادکننده سرطان معده قادر است با دارابودن آنزیم اوره‌آز، در محیط اسیدی معده سال‌ها زندگی کند. این آنزیم به منظور فعالیت کاتالیتیکی خود، به Ni^{2+} و گروهی از پروتئین‌های کمکی از جمله *ureE* نیازمند است. اوره‌آز نه تنها فاکتوری لازم برای کلنیزه‌شدن هلیکوباکتر پیلوری است، بلکه با مکانیزم‌های مختلفی باعث بیماری‌زایی می‌شود. با توجه به شیوع بالای این باکتری، یافتن راهی برای پیشگیری از وقوع عفونت ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری در ناقل بیانی pIRES2-DSRed به منظور ایجاد واکسن ژنی بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، ابتدا قطعه ژن *ureE* به روش PCR تکثیر گردید و با کلون‌سازی T/A درون وکتور pTZ کلون شد. ساب‌کلونینگ این ژن در وکتور pIRES2-DSRed با استفاده از آنزیم T4-لیگاز انجام شد و در باکتری *E. coli* سویه Tpo10F ترانسفرم و تکثیر شد. سازواره حاصل که کاندیدای واکسن ژنی است، برای بررسی بیان ژن در سیستم یوکاریوتی، به روش الکتروپوریشن به سلول‌های CHO منتقل گردید. بررسی بیان ژن *ureE* در سلول‌های جانوری با SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: همسانه‌سازی ژن *ureE* در دو وکتور تکثیری pTZ و بیانی pIRES2-DSRed، با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. نتایج SDS-PAGE مؤید بیان موفقیت‌آمیز ژن *ureE* در سیستم یوکاریوتی سلول‌های CHO بود.

نتیجه‌گیری: سازواره ژنی نو ترکیب pIRES2-DSRed-*ureE* قادر به تولید موفق پلی‌پپتید حاصل از بیان ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های جانوی می‌باشد. با توجه به اینکه محصول پروتئینی ژن *ureE* یکی از پروتئین‌های مهم باکتری مذکور است، بنابراین می‌توان از سازواره ایجادشده در این مطالعه، به عنوان کاندیدای واکسن ژنی بر ضد هلیکوباکتر پیلوری در آینده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، ژن *ureE*، همسانه‌سازی، الکتروپوریشن

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1395؛ 23 (4): 286-297.

پذیرش: 1395/09/03

دریافت: 1395/07/13

¹ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

² نویسنده مسؤول؛ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

آدرس: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی - صندوق پستی 166
تلفن: 03832572946. نمابر: 03833361048 پست الکترونیکی: abbasdoosti@yahoo.com

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری، باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل¹ از خانواده کامپیلوباکتریاسه² با طول 2-4 میکرومتر و عرض 5-1 میکرومتر و معمولاً به شکل اسپرل است؛ ولی گاه به شکل میله‌ای هم دیده می‌شود. این باکتری وقتی در محیط کشت به مدت طولانی نگهداری شود، شکل کوکسی پیدا می‌کند. هلیکوباکتر پیلوری دارای چندین تاژک در یک قطب بوده و نوک تاژک‌ها دکمه‌مانند است (1). این باکتری اولین بار توسط Warren و Marshal در سال 1982 کشف گردید (2).

هلیکوباکتر پیلوری دارای طیف محدودی از میزبان‌هاست که تقریباً منحصر به انسان و برخی از پریمات‌هاست. عفونت حاصل از این باکتری می‌تواند به‌طور مستقیم از انسان به انسان، از طریق دهانی-دهانی یا مدفوعی-دهانی انتقال پیدا کند (1). عفونت ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری که با تخریب بافت اپی‌تلیال معده همراه است، منجر به التهاب مزمن معده می‌شود که می‌تواند سبب ایجاد زخم‌های معده و دوازده شود. عفونت مزمن هلیکوباکتر پیلوری با سرطان بدخیم معده مرتبط است. این باکتری همچنین عامل ایجاد بیماری‌های معده‌ای نظیر گاستریت حاد فعال، بیماری زخم معده، آتروفی مخاط معده و آدنوکارسینوم معده می‌باشد (3، 4).

برجسته‌ترین خصوصیت بیوشیمیایی این باکتری، تولید مقدار فراوان آنزیم اوره‌آز است (5). ژن اوره‌آز، اولین بار در کلبسیلا کشف شد. اوره‌آز یک آنزیم دارای نیکل است که به‌عنوان فاکتور بیماری‌زایی در انواع پاتوژن‌های انسانی عمل می‌کند و در متابولیسم منابع گوناگون نیتروژن در میکروارگانیسم‌ها و گیاهان مشارکت می‌کند (6، 7). تغییرات پس از ترجمه روی آنزیم اوره‌آز شامل کربوکسیلاسیون لیزین 219 و قراردادن دو یون نیکل در جایگاه فعال آن است (8).

برای فعالیت اوره‌آز، سه پروتئین اوره‌آز کمکی به نام UreD، UreF و UreG لازم است و پروتئین کمکی چهارمی به نام UreE به تسهیل این فرآیند کمک می‌کند. Apo اوره‌آز، UreD، UreF و UreG کمپلکسی می‌سازند که دی‌اکسیدکربن و نیکل را با هیدرولیز GTP به UreG می‌دهد؛ سپس نیکل به UreE منتقل می‌شود (9). پروتئین UreE در کلبسیلا آئروژنز، در جمع‌آوری متالوستتر اوره‌آز نقش دارد (10). این پروتئین اگرچه مانند یک پروتئین محلول رفتار می‌کند، پیش‌بینی شده دارای رشته‌های بتا آمفی‌پاتیک³ است و بسیار محکم به رزین فنیل سفارز باند می‌شود. UreE⁴ یک پروتئین سیتوپلاسمی است و هر مولکول دایمر آن طبق اندازه‌گیری‌های دیالیز تعادلی به $6/05 \pm 0/25$ یون نیکل متصل می‌شود. جایگاه نیکل به شکل هندسی هشت‌وجهی، با سه تا پنج لیگاند ایمیدازول هیستیدین اشغال می‌شود و بقیه لیگاندها، دهندگان نیتروژن و اکسیژن هستند (11). سلول‌هایی که در ژن *ureE* آنها، حذف اتفاق افتاده است، فعالیت اوره‌آزشان کم شده و همزمان محتوای نیکل آنها نیز کم می‌شود. UreE پروتئینی است که به نیکل متصل می‌شود و به‌عنوان دهنده نیکل به آپوپروتئین اوره‌آز عمل می‌کند. بررسی توالی ژن ترجمه‌شده، جایگاه‌های اتصال به فلز را نشان می‌دهد؛ از جمله انتهای کربوکسیل جایی که 10 تا 15 باقیمانده هیستیدین وجود دارد (11).

برای درمان عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری، از رژیم‌های درمانی سه‌گانه (دو آنتی‌بیوتیک و یک مهارکننده پمپ پروتونی یا ترکیبات بیسموتی⁵) به مدت یک هفته استفاده می‌شود (12). بازگشت دوباره این آلودگی به دلیل ایجاد مقاومت، درمان ثانویه و نهای آن را دچار مشکل می‌کند و این امر هزینه‌های اقتصادی زیادی برای کشورها در پی دارد (13). اطلاع از نوع پاسخ ایمنی مؤثر در حفاظت بر ضد باکتری و شناسایی آنتی‌ژن‌های مناسب باکتری در

³ Amphipatic⁴ Urease E⁵ Bismuth¹ Microaerophil² Campylobacteraceae

جزئی از پروتئین‌های کمکی اوره‌آز، از خاصیت آنتی‌ژنی برخوردار است (19).

مطابق با آنچه گفته شد، بیشتر اجزای مجموعه ژنی اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری برای تحریک سیستم ایمنی میزبان بر ضد هلیکوباکتر پیلوری مناسب هستند؛ اما در زمینه *ureE* مطالعات زیادی انجام نشده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر جداسازی، تکثیر، کلون‌سازی و بررسی بیان اولیه ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری در سیستم یوکاریوتی بد تا بتوان از آن به‌عنوان کاندیدای واکسن ژنی بر ضد این باکتری یاد کرد.

روش تحقیق

این مطالعه، یک مطالعه تجربی می‌باشد.

سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری:

در این مطالعه، باکتری هلیکوباکتر پیلوری، سویه استاندارد ATCC 43504 از بخش میکروبیولوژی انستیتوپاستور ایران تهیه شد. از این هلیکوباکتر به‌منظور استخراج DNA و تکثیر و جداسازی ژن *ureE* استفاده شد. باکتری اشرشیاکلاهی سویه Top10F که برای اهداف کلون‌سازی ژن و تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب استفاده می‌شود، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، تهیه شد. برای کلون‌سازی قطعات تکثیرشده ژن *ureE* (محصولات PCR)، از روش همسانه‌سازی T/A و وکتور T ساخت شرکت ترموفیشر آمریکا به‌نام pTZ57R/T (به‌صورت مخفف pTZ) بهره گرفته شد. اندازه این وکتور بدون درج ژن جدید در آن، 2886 جفت باز می‌باشد و نشانگر انتخابی آن برای باکتری‌های ترانسفرم‌شده، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است. وکتور بیانی مورد استفاده در این پژوهش، به نام pIRES2-DSRed و ساخت شرکت کلونتک آمریکا بود. اندازه این وکتور 5264 جفت باز است و نشانگرهای انتخابی این وکتور برای انتخاب سلول‌های باکتریایی و سلول‌های جانوری ترانسفرم‌شده، به‌ترتیب:

تحریک ایمنی و پاسخ ایمنی ناشی از آنها، از نکات اصلی در راستای دستیابی به واکسن‌های کارآمد به‌شمار می‌آید. برای تولید یک واکسن مؤثر بر هلیکوباکتر پیلوری، آنتی‌ژن پایدار، حفاظت‌شده و قوی ضروری است. در این زمینه آنتی‌ژن‌های مختلف مانند اوره‌آز بررسی شده‌اند (14).

بر اساس مقالات موجود، اوره‌آز باکتری به‌خاطر ارتباط با سطح هلیکوباکتر پیلوری و فراوانی توسط گروه‌های مختلف، یکی از بهترین کاندیداهای واکسن می‌باشد. ژن اوره‌آز برای حیات باکتری مهم است و اوره‌آز یک متالوآنزیم ضروری برای بقای باکتری در محیط اسیدی معده می‌باشد (14). مجموعه ژنی مسئول رمزگذاری و پردازش آنزیم اوره‌آز در کروموزوم هلیکوباکتر پیلوری، مشتمل بر چندین قطعه ژنی دنبال هم است که به‌ترتیب به‌صورت: *ureI*, *ureB*, *ureA*, *ureH* و *ureG*, *ureF*, *ureE* در کنار هم قرار گرفته‌اند (15). در تحقیقات گذشته، بخش‌های مختلف این مجموعه ژنی به‌عنوان واکسن ژنی یا واکسن پپتیدی مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مطالعه‌ای که کریمی و محمدی با هدف ایجاد واکسن نوترکیب در سال 2001 انجام دادند، زیرواحدهای *ureA* و *ureB* در وکتور pET کلون و در باکتری *E. coli* سویه BL21-DE3 بیان گردیدند (16). در مطالعات متعدد دیگر، فعالیت تحریک سیستم ایمنی و واکنش سرمی برخی از اجزای این مجموعه ژنی، به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای که در سال 2014 در مالزی به انجام رسید، ضمن کلون‌سازی و بیان *ureG*، خاصیت واکنش‌دهی آن با سرم خون انسان‌های مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری نشان داده شد؛ در صورتی که در نمونه‌های کنترل (افراد سالم)، چنین واکنشی دیده نشد (17). در سال 2013، مطالعه انجام‌شده در مورد یک واکسن ژنی بر اساس *ureI*، مؤید تحریک بسیار بالای سیستم ایمنی سلولی و هومورال بود (18). هر چند در مورد *ureE* مطالعات زیادی صورت نگرفته، اما مطالعات نشان داده است که محصول پروتئینی *ureE*، یک مولکول آنتی‌ژنی کم‌وزن است و *UreH* نیز به‌عنوان

آنزیم SmarTaq DNA polymerase (شرکت سیناژن، ایران) مخلوط شد. در پایان، برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، یک قطره روغن معدنی استریل روی واکنشگرها اضافه شد. مخلوط حاصل با شرایط دمایی 5 دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای 95 درجه سانتی گراد و در ادامه 30 چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، اتصال در دمای 62 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، طولیل شدن در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه، طولیل شدن در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه داخل دستگاه ترموسایکلر حرارتی (ساخت شرکت اپندرف، آلمان) انجام شد. به منظور تأیید وجود قطعات ژنی حاصل از تکثیر ژن *ureE*، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد در حضور نشانگر 100 جفت بازی با ولتاژ متوسط 90 ولت به مدت 30 دقیقه الکتروفورز گردید. سپس قطعه DNA مربوط به ژن *ureE* در حضور نور ماورای بنفش و با استفاده از تیغ اسکالپل بریده شد و به میکروتیوپ استریل 1/5 میلی لیتری منتقل گردید و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (ساخت شرکت Bionner کشور کره جنوبی) تخلیص گردید. برای تأیید ژن تخلیص شده از ژل، 3 میکرولیتر از محلول به دست آمده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

کلون سازی T/A:

کلون سازی به روش T/A، تکنیکی است که مخصوص کلون سازی محصولات PCR است. در این تکنیک، از وکتورهای تجاری تحت عنوان T-Vector بهره گرفته می شود. T-Vector در واقع در ابتدای امر یک وکتور خطی است که در دو سر خود دارای نوکلئوتید T به صورت تک رشته ای می باشد و پس از درج محصول PCR در آن، به صورت حلقوی در می آید. از طرف دیگر بسیاری از آنزیم های پلی مراز نظیر آنزیم DNA پلی مراز Taq، هنگام

کانامایسین و نتومایسین است و دارای پروموتور معروف CMV برای بیان ژن کلون شده می باشد. سلول جانوری رده تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary or CHO) که به منظور بررسی بیان ژن *ureE* در سیستم یوکاریوتی به کار گرفته شد، از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تهیه شد.

استخراج DNA و تکثیر ژن *ureE*:

به منظور استخراج DNA ژنومی از باکتری هلیکوباکتر پیلوری، از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران استفاده شد؛ سپس توالی پرایمرها برای تکثیر ژن *ureE* با استفاده از نرم افزار Generunner طراحی شد که پرایمر رفت سایت برش برای آنزیم محدودالایتر *XhoI* و پرایمر برگشت 5'-TACCTCGAGTCCAACACTGGGTGTGAGATG-3' دارای سایت برشی برای آنزیم محدودالایتر *SacI* در سر 5-پرایم بودند. زیرتوالی سایت برش هر یک از آنزیم های مذکور، خط کشیده شد. این سایت های برش، به منظور سهولت ساب کلونینگ و نقل و انتقال ژن بین وکتورها در نظر گرفته شدند. ملاک انتخاب این دو سایت برش آنزیمی، بر اساس جهت و نوع توالی های برشی موجود در وکتور بیانی pIRES2-DSRed بود؛ ضمن اینکه هیچ یک از آنزیم های *XhoI* و *SacI* نباید بر توالی های داخلی ژن *ureE* اثر داشته باشند.

واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد؛ به طوری که ابتدا مستر میکس در حجم نهایی 1000 میکرولیتر، شامل 100 میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 10x، 40 میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت 50 میلی مولار و 20 میکرولیتر dNTP با غلظت 10 میلی مولار با افزودن 840 میکرولیتر آب تزریق، تهیه شد. سپس به ازای هر یک میکروتیوپ واکنش گر، مقدار 20 میکرولیتر از مستر میکس با 100 نانومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، 100 نانوگرم DNA ژنومی هلیکوباکتر پیلوری و یک واحد

روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شده و قطعه ژن *ureE* و وکتور pIRES2-DSRed از روی ژل با استفاده از تیغ اسکالپل بریده و جدا شدند. تخلیص DNA از ژل با کمک کیت (Bioneer کشور کره جنوبی) انجام شد. واکنش اتصال (Ligation) بین وکتور بیانی و ژن *ureE* با استفاده از آنزیم T4-لیگاز (ساخت شرکت سیناژن ایران) انجام شد. محصولات اتصال به روش شیمیایی با به کار بردن کلرید کلسیم 0/1 مولار استریل، وارد باکتری *E. coli* سویه TOP10F شدند و مراحل شوک حرارتی و کشت روی محیط لوریا برتانی آگار دارای آنتی بیوتیک انتخابی (50 میکروگرم در هر میلی لیتر از کانامایسین) و به دنبال آن گرمخانه گذاری به مدت یک شب در دمای 37 درجه سانتی گراد انجام شد. تأیید صحت کلونینگ، روی کلنی های به دست آمده از این مرحله انجام شد. برای تأیید صحت کلونینگ به ترتیب سه روش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم های *SacI* و *XhoI* (ساخت شرکت ترمو فیشر آمریکا) و در نهایت تعیین توالی به کار برده شد.

انتقال سازواره نهایی pIRES2-DSRed-*ureE* به سلول های جانوری:

در این مطالعه به منظور بررسی بیان ژن *ureE* در سلول های یوکاریوتی، از سلول CHO استفاده شد و برای دگرگونی این سلول ها، روش الکتروپوریشن به کار گرفته شد. سلول ها در محیط کشت RPMI 1640 (ساخت شرکت مرک آلمان) حاوی 10 درصد FBS (ساخت شرکت مرک آلمان) و 100 میکروگرم در هر میلی لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین (به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی) و در دمای 37 درجه سانتی گراد و در حضور 5 درصد گاز کربنیک کشت داده شدند. برای انجام انتقال ژن به این سلول ها، روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه Gene Pulser Xcell (ساخت شرکت Bio-Rad آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. تعداد 2×10^6 عدد از سلول های CHO شمارش و در حجم 400 میکرو لیتر در کووت 0/4 استریل مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد.

تکثیر قطعات ژنی، در دو انتهای محصولات یک نوکلئوتید A به صورت تک رشته و بدون الگو اضافه می نمایند. چون T با A مکمل است و جفت می شوند؛ بنابراین محصولات PCR به آسانی در وکتورهای T، درج می گردند. به این روش، تکنیک کلون سازی T/A گویند.

همانطور که در بخش معرفی وکتورها در بالا اشاره شد، وکتور pTZ به منظور کلون سازی T/A مورد استفاده قرار گرفت و مراحل الحاق ژن به وکتور مورد نظر مطابق دستور کار کیت مربوطه انجام شد. وکتورهای pTZ نو ترکیب حامل ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری، به روش شیمیایی و با استفاده از کلرید کلسیم 0/1 مولار سرد استریل و سپس شوک حرارتی به سلول های *E. coli* سویه TOP10F منتقل گردیدند. باکتری های ترانسفرم شده، روی پلیت لوریا برتانی آگار حاوی 50 میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شدند. از کلنی های حاصل با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (ساخت شرکت Bionner کشور کره جنوبی)، تخلیص پلاسمید انجام شد و تأیید صحت همسانه سازی T/A به دو روش PCR و هضم آنزیمی انجام شد. PCR روش اولیه تأیید صحت کلونینگ بود و با انجام هضم آنزیمی، کلون شدن ژن مورد نظر در پلاسمید به صورت نهایی تأیید شد. برای انجام هضم آنزیمی، از آنزیم های محدودالثر *SacI* و *XhoI* استفاده شد.

کلون سازی ژن در وکتور بیانی (ساب کلونینگ):

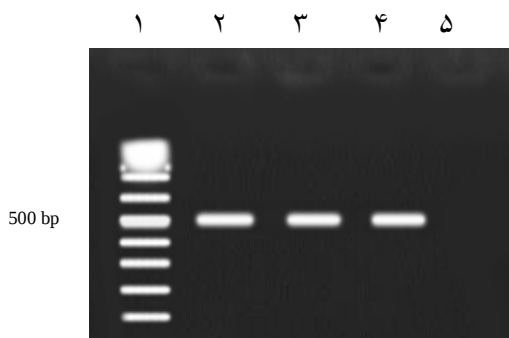
ساب کلونینگ به معنی وارد کردن یک ژن از وکتوری به وکتور دیگر می باشد. با توجه به اینکه وکتور pIRES2-DSRed به عنوان وکتور بیانی یوکاریوتی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، بنابراین باید ژن *ureE* به روش مناسبی در آن درج گردد. به این منظور، ابتدا وکتور نو ترکیب pTZ-*ureE* توسط دو آنزیم *SacI* و *XhoI* برش داده شد تا ژن *ureE* از آن خارج گردد. سپس وکتور pIRES2-DSRed نیز با همین آنزیم ها بریده شد تا سرهای مناسب برای پذیرش ژن *ureE* در آن ایجاد گردد. همه محصولات هضم آنزیمی

ژل با کوماسی بلو انجام گرفت.

یافته‌ها

تکثیر و جداسازی ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری:

DNA از باکتری هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت استخراج شد. الکتروفورز DNA تخلیص شده روی ژل آگارز یک درصد، نشان دهنده کیفیت مناسب DNA برای انجام PCR بود. انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *ureE*، باند 552 جفت بازی مربوط به محصول را تشکیل داد؛ سپس محصولات PCR روی ژل یک درصد الکتروفورز گردیدند (شکل 1).



شکل 1- تکثیر ژن *ureE* به روش PCR. شماره 1: مارکر 100 bp ساخت شرکت ترموفیشر. شماره‌های 2، 3 و 4: باند 552 جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *ureE*. شماره 4: کنترل منفی (نمونه مستر میکس PCR بدون DNA)

کلون سازی T/A و ساب کلونینگ¹:

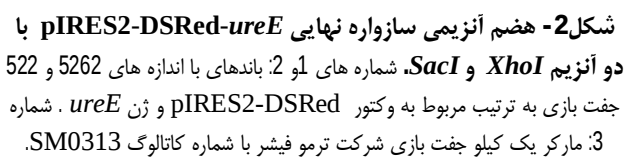
کلون سازی محصولات PCR به روش T/A منجر به ساخت سازواره ژنی pTZ-*ureE* شد. آزمون‌های بررسی صحت کلون سازی T/A که شامل PCR و هضم آنزیمی بود، نشان داد در بسیاری از کلنی‌های به دست آمده، ناقل نو ترکیب pTZ-*ureE* تشکیل شده است؛ به طوری که با انجام PCR روی این کلنی‌ها، محصول 522 جفت بازی مربوط به ژن کلون شده، به دست آمد. همچنین هضم آنزیمی وکتور pTZ-*ureE* با دو آنزیم *SacI* و *XhoI* منجر به تشکیل دو باند

سپس مقدار 800 نانوگرم در هر میکرولیتر از ژن مورد نظر برای انتقال (وکتور نو ترکیب pIRES2-DSRed-*ureE*) به سول‌های CHO اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. این سوسپانسیون سلولی به مدت 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از انتقال کوت حاوی سلول‌ها به درون دستگاه الکتروپوریشن، پالس الکتریکی با شرایط بهینه سازی شده 0/174 کیلوولت و 400 میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بلافاصله به مدت 2 دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس سلول‌های ترانسفرم شده در فلاسک حاوی محیط کشت RPMI به همراه 10 درصد FBS و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و به مدت 5 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد و 5 درصد CO₂ قرار داده شدند. سپس به هر یک از فلاسک‌های کشت، آنتی بیوتیک نئومایسین به عنوان نشانگر انتخابی سلول‌های دریافت کننده وکتور نو ترکیب به مقدار 100 میکروگرم در هر میلی لیتر اضافه شد. در نهایت سلول‌ها به مدت 3 روز دیگر در انکوباتور نگهداری شدند. تمام مراحل فوق (الکتروپوریشن) همچنین برای سری دیگری از سلول‌های CHO که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند، انجام شد؛ با این تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد، به جای DNA، مقدار 2 میکرولیتر PBS استریل اضافه شد.

انجام SDS-PAGE

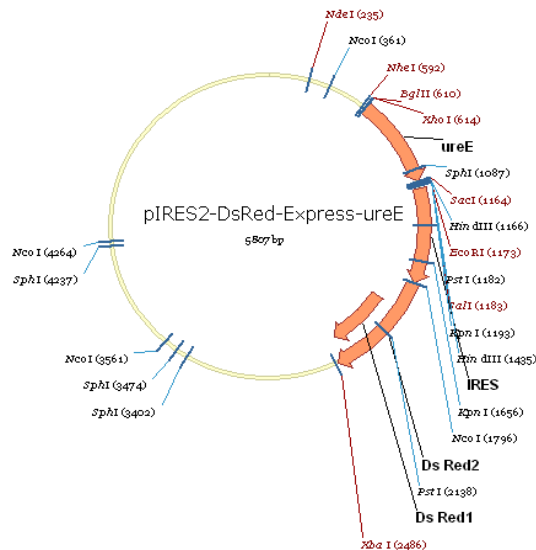
بررسی بیان ژن *ureE* کلون شده در وکتور pIRES2-DSRed، به روش SDS-PAGE صورت گرفت. این روش شامل الکتروفورز نمونه‌های پروتئین (ولتاژ 200 ولت به مدت 3 ساعت صورت)، رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو و رنگ بری توسط محلول رنگ بر است. به این منظور، سلول‌های CHO به روش ذوب و انجماد متناوب (freeze and thaw) تخریب شدند و عصاره سلولی به دست آمده با استفاده از سرنگ هاملتون به چاهک‌های روی ژل عمودی وارد گردید. همچنین در یکی از چاهک‌ها مقدار 5 میکرولیتر نشانگر پروتئینی ریخته شد و الکتروفورز انجام شد؛ سپس رنگ آمیزی

¹ Subcloning

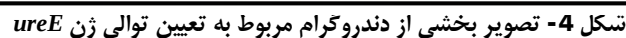


نتایج ساب کلونینگ که شامل خروج ژن *ureE* و درج آن در وکتور بیانی یوکاریوتی pIRES2-DSRed است، با سه روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج PCR روی وکتور نو ترکیب pIRES2-DSRed-*ureE*، حضور ژن *ureE* را در این وکتور تأیید نمود. همچنین برش آنزیمی این وکتور با آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* سبب تشکیل دو قطعه به اندازه‌های 5264 و 522 جفت بازی گردید که به ترتیب مربوط به وکتور pIRES2-DSRed و ژن *ureE* می‌باشند.

تصویر حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی سازواره نهایی در شکل 2 نمایش داده شده است. نتایج تعیین توالی ژن *ureE* کلون شده در سازواره نهایی، نشان دهنده صحت کلون سازی این ژن و عدم وجود هرگونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن بود. در شکل 3 نیز تصویر شماتیک واکسن ژنی ایجاد شده در این تحقیق دیده می شود. همچنین در شکل 4، بخشی از تصویر دندروگرام حاصل از تعیین توالی ژن *ureE* کلون سازی شده، دیده می شود.



شکل 3- تصویر شماتیک سازواره نهایی pIRES2-DSRed-ure



بحث

هلیکوباکتر پیلوری، باسیلی ماریپچی و تاژکدار است که عامل یکی از شایع‌ترین عفونت‌های انسانی می‌باشد. محل استقرار هلیکوباکتر پیلوری در لایه‌های مخاطی معده انسان است (1).

واکسیناسیون هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند بار عفونت و پیامدهای آن را کاهش دهد. یک واکسن ایده‌آل نه تنها باید ایمنی اثبات‌شده و سابقه بهره‌وری خوبی داشته باشد، بلکه باید ارزان قیمت بوده و ایمنی درازمدت ارائه دهد و کمترین تکرار دوز را نیاز داشته باشد. واکسیناسیون هلیکوباکتر پیلوری، هم از منظر درمان این بیماری و هم از منظر جلوگیری از بروز آن، یک روش مناسب برای رفع این مشکل به نظر می‌آید (20). واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره‌سازی و نگهداری آسان می‌باشند (21).

در این مطالعه، یکی از ژن‌های مجموعه ژنی اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری، مورد بررسی قرار گرفت. این مجموعه ژنی، شامل اجزای متعددی است که در تحقیقات گذشته، برخی از این اجزا از مسیرهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در بسیاری از موارد، خاصیت آنتی‌ژنیک این اجزا و محرک بودن آنها برای سیستم ایمنی، به اثبات رسیده است که در ادامه به شرح و مقایسه این موارد پرداخته می‌شود.

در سال 2001، کریمی و همکاران به روش PCR، اقدام به جداسازی بخش‌های *ureA* و *ureB* از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری‌های ایزوله‌شده در ایران پرداختند. سپس این محققین قطعات ژنی یادشده را در وکتور pET کلون‌سازی و در باکتری *E. coli* سویه BL21 بیان نمودند (16). این مطالعه از نظر تکنیک‌های به کار گرفته‌شده، شباهت زیادی با مطالعه حاضر دارد؛ اما در مطالعه حاضر، جداسازی بخش دیگری از مجموعه ژنی اوره‌آز انجام شد و ژن *ureE* جداسازی و کلون گردید. در مطالعه حاضر همچنین بررسی بیان *ureE* نیز بر خلاف کار کریمی و همکاران، در سلول یوکاریوت انجام

پذیرفت. اهمیت موضوع بیان یوکاریوتی که در این مطالعه بر آن تأکید گردید، به‌خاطر ایجاد پتانسیل لازم برای این سازواره است که همان‌گونه که در محیط آزمایشگاه قادر به تولید محصول در سیستم یوکاریوتی است، قادر به تولید محصول خود در صورت تزریق به عضله حیوان آزمایشگاهی (به عنوان واکسن ژنی) نیز می‌باشد.

در مطالعه انجام‌شده توسط حاجی‌خانی و همکاران (1389)، ژن‌های کدکننده *ureB332* و *hpaA* از ژنوم سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری جدا شد و با هضم آنزیمی به داخل ناقل pET28a وارد گردید. سپس سازواره حاصل به داخل میزبان‌های کلون‌سازی و بیانی منتقل شد و پس از تأیید بیان ترکیب پروتئینی به‌روش کروماتوگرافی تمایلی توسط رزین نیکل تخلیص و سپس آنتی‌ژنیسیته آن به‌روش 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* واکسن‌های چند آنتی‌ژنی مانند *HpaA-UreB* در مقایسه با استفاده آن به‌تنهایی، تأثیر بیشتری خواهد داشت (22). در مطالعه حاجی‌خانی نکته قابل توجه این است که از دو ژن هلیکوباکتر استفاده شده است؛ یعنی از یکی از بخش‌های خوشه ژنی اوره‌آز (*ureB*) که نتایج ایمنی‌زایی خوبی داشته استفاده شده و کاربرد ژن کمکی *hpaA*، بر تأثیر آن افزوده است. تشابه کار ما با مطالعه انجام‌شده توسط حاجی‌خانی و همکاران، استفاده از یکی از اجزای اوره‌آز در هر دو مطالعه است.

در سال 2013، Jie و همکاران اقدام به جداسازی و کلون‌سازی بخش *ureI* از مجموعه ژن‌های اوره‌آزی نمودند. این محققان با هدف انجام واکسن ژنی، ژن *ureI* را در وکتور بیانی یوکاریوتی pCDNA3.1(+) وارد نمودند و سازواره نهایی *pCDNA3.1(+)-ureI* را به‌دست آوردند. این محققان در نتیجه کار خود اعلام نمودند که این سازواره ژنی، قادر به بیان موفق محصول پروتئینی UreI بوده و محرک

نوترکیب بهره گرفته شد که با در نظر گرفتن تحقیقات دیگران، به نظر می‌رسد این ژن می‌تواند از قدرت ایمنی‌زایی مؤثری بر ضد هلیکوباکتر پیلوری برخوردار باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ژن *ureE* باکتری هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت تکثیر و جداسازی شد. سپس این ژن در وکتور pTZ کلون‌سازی گردید؛ بنابراین می‌توان گفت، ناقل نوترکیب pTZ-*ureE* می‌تواند به‌عنوان منبعی از ژن *ureE*، برای انجام تحقیقات متعدد در زمینه تولید پروتئین نوترکیب یا تولید آنتی‌بادی بر ضد هلیکوباکتر پیلوری و غیره در اختیار محققان کشور قرار گیرد. نکته مهم‌تر اینکه، سازه ژنی نهایی به‌دست‌آمده در این مطالعه با نام pIRES2-DSRed-*ureE*، از دو جهت از پتانسیل‌هایی برخوردار است؛ اول اینکه از این سازواره ژنی می‌توان برای تولید پروتئین نوترکیب UreE استفاده کرد و از محصول به‌دست‌آمده، به‌صورت واکسن پیتیدی استفاده نمود. کاربرد دوم که در این پروژه نیز بیشتر مدّ نظر بوده، استفاده از این وکتور بیانی نوترکیب یوکاریوتی در تولید واکسن ژنی است. به بیان دیگر، تولید اولیه و موفق محصول پروتئینی ژن *ureE* در سیستم یوکاریوتی که در پژوهش حاضر محقق شد، راهی روشن در راستای کاربرد pIRES2-DSRed-*ureE* به‌عنوان واکسن ژنی در مدل حیوانی پیش رو قرار می‌دهد. البته این موضع نیاز به مطالعات بیشتر به‌ویژه در زمینه واکسیناسیون حیوان آزمایشگاهی و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی آن دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سرکار خانم مریم قربانی با کد اخلاق مصوبه پایان نامه IR.IAUSHK.1395.5213 می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کمال تشکر داریم.

سیستم ایمنی موش‌های نژاد C57BL/6 به‌صورت واکسن ژنی می‌باشد. نتیجه‌گیری کلی این کار، موفقیت این سازواره ژنی در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار قوی از نوع سلولار و همولار به‌صورت همزمان بود. مطالعه Jie و همکاران از چند جنبه مشابه و مؤید مطالعه حاضر است. اول اینکه Jie و همکاران همانند مطالعه حاضر از یک ژن موجود در مجموعه ژنی اوره‌آز بهره گرفتند. دوم اینکه، Jie و همکاران نیز این ژن را در وکتور یوکاریوتی بیان نموده و نتایج خوبی مشاهده نمودند. (18)؛ هر چند نوع وکتور یوکاریوتی به‌کار رفته در مطالعه حاضر با مطالعه Jie و همکاران متفاوت بود.

یکی از مواردی که برای انتخاب نوع ژن اهمیت دارد، اطمینان از وجود خاصیت آنتی‌ژنی در محصول ژن مورد نظر است. مطالعات نشان می‌دهد که آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری، در صورتی که به‌صورت خالص به حیوان آزمایشگاهی تزریق گردد، موجب تحریک سیستم ایمنی و ایجاد ایمنی حفاظتی نسبی بر ضد این باکتری می‌شود (23). مطالعات دیگر وجود خاصیت آنتی‌ژنیک در سایر اجزای خوشه ژنی اوره‌آز را نشان داده‌اند. این خوشه ژنی دارای بخش‌هایی شامل: *ureA*، *ureB*، *ureI*، *ureE*، *ureF*، *ureG* و *ureH* است که هر کدام به‌صورت مجزا، محرک سیستم ایمنی می‌باشند (15، 24). در مطالعات دیگر روی سایر میکروارگانیسم‌ها نیز ژن *ureE* به‌عنوان یک عامل آنتی‌ژنی معرفی شده است. مثلاً در یرسنیا انتروکولیتیکا، از ژن *ureE* به‌عنوان آنتی‌ژن نام برده‌اند (25). با بررسی این تحقیقات که توسط محققان دیگر به نتیجه رسیده است، به خوبی مشخص می‌گردد که ژن *ureE* فاکتور مناسبی برای بررسی در راستای ایجاد واکسن نوترکیب است.

در مطالعات صورت‌گرفته توسط محققین دیگر در سال‌های اخیر که به برخی از آنها در بالا اشاره شد، توان ایمنی‌زایی بخش‌ها و زیرواحدهای مختلف اوره‌آز و پروتئین‌های کمکی در کنار این آنزیم به اثبات رسیده است. در تحقیق حاضر از ژن *ureE* به‌منظور ایجاد یک واکسن

منابع:

- 1- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 449-90.
- 2- Thombre NA, Gide PS. Floating-bioadhesive gastroretentive caesalpinia pulcherrima-based beads of amoxicillin trihydrate for *Helicobacter pylori* eradication. Drug Deliv. 2016; 23(2): 405-19.
- 3- 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.
- 4- Doosti A, Rahimian GA, Nassiri J, Yavari-Foroushani P. Prevalence of the cagA-Positive *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Biopsy Specimens in Shahrekord. Armaghane-e-Danesh. 2007; 12(1): 29-38. [Persian]
- 5- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved *bacilli* in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984;1(8390):1311-5.
- 6- Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev. 1995; 59(3): 451-80.
- 7- Lee MH, Mulrooney SB, Remner MJ, Markowicz Y, Hausinger RP. *Klebsiella aerogenes* Urease Gene Cluster: Sequence of ureD and Demonstration that Four Accessory Genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) are Involved in Nickel Metallocenter Biosynthesis. J Bacteriol. 1992; 174(13): 4324-30.
- 8- Soriano A, Hausinger RP. GTP-dependent activation of Urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(20): 11140-4.
- 9- Soriano A, Colpas GJ, Hausinger RP. UreE stimulation of GTP dependent Urease activation in the UreD-UreF-UreG-Urease ap protein complex. Biochemistry. 2000; 39(40): 12435-40.
- 10- Mulrooney SB, Hausinger RP. Sequence of the *Klebsiella aerogenes* Urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. J Bacteriol. 1990; 172(10): 5837-43.
- 11- Lee MH, Pankratz HS, Wang S, Scott RA, Finnegan MG, Johnson MK, et al. Purification and characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly. Protein Sci. 1993; 2(6): 1042-52.
- 12- Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Role of NADPH-insensitive nitroreductase gene to metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* strains. Daru. 2010; 18(2): 137-40.
- 13- Wang WH, Wong BC, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Cho CH, Lai KC, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection with dual resistance to metronidazole and clarithromycin in Hong Kong. Aliment Pharmacol Ther. 2000; 14(7): 901-10.
- 14- Pounder RE, Ng, D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther. 1995; 9 Suppl 2: 33-9.
- 15- Mobley HL. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. Aliment Pharmacol Ther. 1996; 10 suppl 1: 57-64.
- 16- Karimi M, Mohammadi M. Cloning and Expression of Recombinant *Helicobacter pylori* Urease A and B Subunits as a Putative Vaccine. Iran Biomed J. 2001; 5(4): 107-111.
- 17- Khalilpour A, Osman S, Yunus MH, Santhanam A, Vellasamy N, Noordin R. *Helicobacter pylori* recombinant UreG protein: cloning, expression, and assessment of its seroreactivity. BMC Res Notes. 2014; 7: 809.
- 18- Jie L, Wen Y, Sheng L, Yan Z, Cui-ming Z, Yi-mou W. Immunocompetence of *Helicobacter pylori* ureI DNA vaccine in mice. Chinese Journal of Zoonoses. 2013; 29 (9): 895-898.
- 19- Fernando N, Torres P, Vaira D, Holton J. Colonization by *Helicobacter pylori* of leprosy patients in Spain: immunomodulation to low molecular weight antigens of *H. pylori*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(5): 682-6.

- 20- Emancipator D, Nedrud JG, Czinn SJ. *Helicobacter pylori* vaccines: is DNA the answer? *Helicobacter*. 2006; 11(6): 513-6.
- 21- Doosti A. Cloning of gene encoding neurotoxin heavy chain of *Clostridium botulinum* in *E. coli*. *Journal of Microbial World*. 2013; 5(3-4): 77-84. [Persian]
- 22- Hajikhani B, Najar-Peerayeh S, Soleimanzahi H, Zuhair MH. Cloning, expression, purification and antigenicity of recombinant UreB332-HpaA fusion protein from *Helicobacter pylori*. *Modares J Med Sci (Pathobiology)*. 2010; 13(2): 1-10. [Persian]
- 23- Talebi Bezmin Abadi A, Lee YY. Chinese *Helicobacter pylori* vaccine: Solution for an old challenge? *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016; 7(3): 412-5.
- 24- Lazowska I, Trzeciak L, Godlewska R, Hennig E, Jagusztyn-Krynicka K, Popowski J, et al. In Search of Immunogenic *Helicobacter pylori* Proteins by Screening of Expression Library. *Digestion*. 2000;61(1):14-21.
- 25- Gu W, Wang X, Qiu H, Luo X, Xiao D, Xiao Y, et al. Comparative antigenic proteins and proteomics of pathogenic *Yersinia enterocolitica* bio-serotypes 1B/O: 8 and 2/O: 9 cultured at 25°C and 37°C. *Microbiol Immunol*. 2012; 56(9): 583-94.