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

Maryam Ghorbani[1], Abbas Doosti[2]

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

مقاله اصیل پژوهشی

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

مریم قربانی[1]، عباس دوستی[2]

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان یکی از عوامل زخم معده و ایجادکننده سرطان معده قادر است با دارابودن آنزیم اوره‌آز، در محیط اسیدی معده سال‌ها زندگی کند. این آنزیم به‌منظور فعالیت کاتالیتیکی خود، به +Ni2 و گروهی از پروتئین‌های کمکی از جمله *ureE* نیازمند است. اوره‌آز نه‌تنها 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 به‌منظور 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 مؤیّد بیان موفقیت‌آمیز ژن *ureE* در سیستم یوکاریوتی سلول‌های CHO بود.

نتیجه‌گیری: سازواره ژنی نوترکیب 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، به‌عنوان کاندیدای واکسن ژنی بر ضدّ 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.

دریافت: 1395/07/13 **پذیرش: 1395/09/03**

[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، میکروآئروفیل[1] از خانواده کامپیلوباکتریاسه[2] با طول 4-2 میکرومتر و عرض 5-1 میکرومتر و معمولاً به شکل اسپریل است؛ ولی گاه به شکل میله‌ای هم دیده می‌شود. این باکتری وقتی در محیط کشت به‌مدت طولانی نگه‌داری شود، شکل کوکسی پیدا می‌کند. هلیکوباکتر پیلوری دارای چندین تاژک در یک قطب بوده و نوک تاژک‌ها دکمه‌مانند است (1). این باکتری اولین‌بار 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 ایجادشده 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، اولین‌بار 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 کربوکسیلاسیون‌لیزین 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 به‌نام 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 UerE در کلبسیلا آئروژنز، در جمع‌آوری متالوسنتر اوره‌آز نقش دارد (10). این پروتئین اگرچه مانند یک پروتئین محلول رفتار می‌کند، پیش‌بینی‌شده دارای رشته‌های بتاآمفی‌پاتیک[3] است و بسیار محکم به رزین‌فنیل‌سفارز باند می‌شود. UreE[4] یک پروتئین سیتوپلاسمی است و هر مولکول دایمر آن طبق اندازه‌گیری‌های دیالیز تعادلی به 6/05±0/25 یون نیکل متصل می‌شود. جایگاه نیکل به‌شکل 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 بیسموتی[5]) به‌مدت یک هفته استفاده می‌شود (12). بازگشت دوباره این آلودگی به‌دلیل ایجاد مقاومت، درمان ثانویه و نهایی آن را دچار مشکل می‌کند و این امر هزینه‌های اقتصادی زیادی برای کشورها در پی دارد (13). اطلاع از نوع پاسخ ایمنی مؤثّر در حفاظت بر ضدّ باکتری و شناسایی آنتی‌ژن‌های مناسب باکتری در

[1] *Microaerophil*
[2] *Campylobacteraceae*
[3] *Amphipatic*
[4] *Urease E*
[5] *Bismuth*

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: *ureA*، *ureB*، *ureI*، *ureE*، *ureF*، *ureG* و *ureH* 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، مؤیّد 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 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 ضدّ 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 ضدّ 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 اشرشیاکلای 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:

کانامایسین و نئومایسین است و دارای پروموتر معروف CMV برای بیان ژن کلون‌شده می‌باشد. سلول جانوری رده تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary or CHO) که به‌منظور بررسی بیان ژن *ureE* در سیستم یوکاریوتی به‌کار گرفته شد، از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تهیه شد.

استخراج DNA و تکثیر ژن *ureE*:

به‌منظور 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 نرم‌افزار Generunner طراحی شد که پرایمر رفت 5'-TACCTCGAGTCCAACACTGGGTGTGAGATG-3' دارای سایت برش برای آنزیم محدودالاثر *XhoI* و پرایمر برگشت 5'-TACGAGCTCATTTCTTTTCTATTTTACGACCAC-3' نیز دارای سایت برشی برای آنزیم محدودالاثر *SacI* در سر 5-پریم بودند. زیرتوالی سایت برش هر یک از آنزیم‌های مذکور، خط کشیده شد. این سایت‌های برش، به‌منظور سهولت ساب‌کلونینگ و نقل و انتقال ژن بین وکتورها در نظر گرفته شدند. ملاک انتخاب این دو سایت برش آنزیمی، بر اساس جهت و نوع توالی‌های برشی موجود در وکتور بیانی pIRES2-DSRed بود؛ ضمن اینکه هیچ‌یک از آنزیم‌های *XhoI* و *SacI* نباید بر توالی‌های داخلی ژن *ureE* اثر داشته باشند.

واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد؛ به‌طوری که ابتدا مسترمیکس در حجم نهایی 1000میکرولیتر، شامل 100میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 10x، 40 میکرولیتر MgCl2 با غلظت 50 میلی‌مولار و 20میکرولیتر dNTP با غلظت 10میلی‌مولار با افزودن 840میکرولیتر آب تزریق، تهیه شد. سپس به‌ازای هر یک میکروتیوپ واکنش‌گر، مقدار 20میکرولیتر از مسترمیکس با 100نانومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، 100نانوگرم DNAی ژنومی هلیکوباکتر پیلوری و یک‌واحد 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 واسرشت‌شدن ابتدایی در دمای 95درجه سانتی‌گراد و در ادامه 30 چرخه شامل واسرشت‌شدن در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به‌مدّت 1 دقیقه، اتصال در دمای 62 درجه سانتی‌گراد به‌مدّت 1 دقیقه، طویل‌شدن در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدّت 1دقیقه و در نهایت طویل‌شدن نهایی در دمای 72درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5 دقیقه، طویل‌شدن در دمای 72درجه سانتی‌گراد به‌مدت 1 دقیقه و در نهایت طویل‌شدن نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 5دقیقه داخل دستگاه ترموسایکلر حرارتی (ساخت شرکت اپندرف، آلمان) انجام شد.

به‌منظور تأیید وجود قطعات ژنی حاصل از تکثیر ژن *ureE*، محصولات PCR روی ژل آگارز یک‌درصد در حضور نشانگر 100 جفت بازی با ولتاژ متوسط 90ولت به‌مدت 30دقیقه 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 میلی‌لیتری منتقل گردید و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (ساخت شرکت Bionner کشور کره جنوبی) تخلیص گردید. برای تأیید ژن تخلیص‌شده از ژل، 3میکرولیتر از محلول به‌دست‌آمده روی ژل آگارز یک‌درصد الکتروفورز شد.

کلون‌سازی T/A:

کلون‌سازی به‌روش T/A، تکنیکی است که مخصوص کلون‌سازی محصولات PCR است. در این تکنیک، از وکتورهای تجاری تحت عنوان T-Vector بهره گرفته می‌شود. T-Vector در واقع در ابتدای امر یک وکتور خطی است که در دو سر خود دارای نوکلئوتید T به‌صورت تک‌رشته‌ای می‌باشد و پس از درج محصول PCR در آن، به‌صورت حلقوی در می‌آید. از طرف دیگر بسیاری از آنزیم‌های پلی‌مرازی نظیر آنزیم DNA پلی‌مراز Taq، هنگام

تکثیر قطعات ژنی، در دو انتهای محصولات یک نوکلئوتید A به‌صورت تک‌رشته و بدون الگو اضافه می‌نمایند. چون T با A مکمل است و جفت می‌شوند؛ بنابراین محصولات PCR به‌آسانی در وکتورهای T، درج می‌گردند. به این روش، تکنیک کلون‌سازی T/A گویند.

همانطور که در بخش معرفی وکتورها در بالا اشاره شد، وکتور pTZ به‌منظور کلون‌سازی T/A مورد استفاده قرار گرفت و مراحل الحاق ژن به وکتور موردنظر مطابق دستور کار کیت مربوطه انجام شد. وکتورهای pTZ نوترکیب حامل ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری، به‌روش شیمیایی و با استفاده از کلرید کلسیم 0/1 مولار سرد استریل و سپس شوک حرارتی به سلول‌های *E. coli* سویه TOP10F منتقل گردیدند. باکتری‌های ترانسفرم‌شده، روی پلیت لوریا برتانی آگار حاوی 50میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (ساخت شرکت Bionner کشور کره جنوبی)، تخلیص پلاسمید انجام شد و تأیید صحت همسانه‌سازی T/A به دو روش PCR و هضم آنزیمی انجام شد. PCR روش اولیه تأیید صحت کلونینگ بود و با انجام هضم آنزیمی، کلون‌شدن ژن موردنظر در پلاسمید به‌صورت نهایی تأیید شد. برای انجام هضم آنزیمی، از آنزیم‌های محدودالاثر *SacI* و *XhoI* استفاده شد.

کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی (ساب‌کلونینگ):

ساب‌کلونینگ به‌معنی وارد کردن یک ژن از وکتوری به وکتور دیگر می‌باشد. با توجه به اینکه وکتور pIRES2-DSRed به‌عنوان وکتور بیانی یوکاریوتی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، بنابراین باید ژن *ureE* به‌روش مناسبی در آن درج گردد. به این منظور، ابتدا وکتور نوترکیب 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 آنزیم‌ها بریده شد تا سرهای مناسب برای پذیرش ژن *ureE* در آن ایجاد گردد. همه محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز 1درصد 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 به‌روش شیمیایی با به‌کاربردن 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 آنتی‌بیوتیک انتخابی (50 میکروگرم در هر میلی‌لیتر از کانامایسین) و به‌دنبال آن گرمخانه‌گذاری به‌مدت یک شب در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انجام شد. تأیید صحت کلونینگ، روی کلنی‌های به‌دست‌آمده از این مرحله انجام شد. برای تأیید صحت کلونینگ به‌ترتیب سه روش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* (ساخت شرکت ترمو فیشر آمریکا) و در نهایت تعیین توالی به‌کار برده شد.

انتقال سازواره نهایی pIRES2-DSRed-*ureE* به سلول‌های جانوری:

در این مطالعه به‌منظور بررسی بیان ژن *ureE* در سلول‌های یوکاریوتی، از سلول CHO استفاده شد و برای دگرگونی این سلول‌ها، روش الکتروپوریشن به‌کار گرفته شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 (ساخت شرکت مرک آلمان) حاوی 10درصد FBS (ساخت شرکت مرک آلمان) و 100میکروگرم در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین (به‌منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی) و در دمای 37درجه سانتی‌گراد و در حضور 5درصد گازکربنیک کشت داده شدند. برای انجام انتقال ژن به این سلول‌ها، روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاهGene Pulser Xcell (ساخت شرکت Bio-Radآمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. تعداد 2×10^6 عدد از سلول‌هایCHO شمارش و در حجم 400 میکرولیتر در کووت 0/4 استریل مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد.

سپس مقدار 800 نانوگرم در هر میکرولیتر از ژن مورد نظر برای انتقال (وکتور نوترکیب pIRES2-DSRed-*ureE*) به سول‌های CHO اضافه شد و به آرامی مخلوط گرید. این سوسپانسیون سلولی به‌مدّت 10دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از انتقال کوت حاوی سلول‌ها به درون دستگاه الکتروپوریشن، پالس‌الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده 0/174 کیلوولت و 400 میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بلافاصله به‌مدّت 2 دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس سلول‌های ترانسفرم‌شده در فلاسک حاوی محیط کشت RPMI به‌همراه 10درصد FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و به‌مدت 5ساعت در انکوباتور با دمای 37درجه سانتی‌گراد و 5درصد CO2 قرار داده شدند. سپس به هر یک از فلاسک‌های کشت، آنتی‌بیوتیک نئومایسین به‌عنوان نشانگر انتخابی سلول‌های دریافت‌کننده وکتور نوترکیب به‌مقدار 100میکروگرم در هر میلی‌لیتر اضافه شد. درنهایت سلول‌ها به‌مدت 3 روز دیگر در انکوباتور نگهداری شدند. تمام مراحل فوق (الکتروپوریشن) همچنین برای سری دیگری از سلول‌های CHO که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند، انجام شد؛ با این تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد، به‌جای DNA، مقدار 2 میکرولیتر PBS استریل اضافه شد.

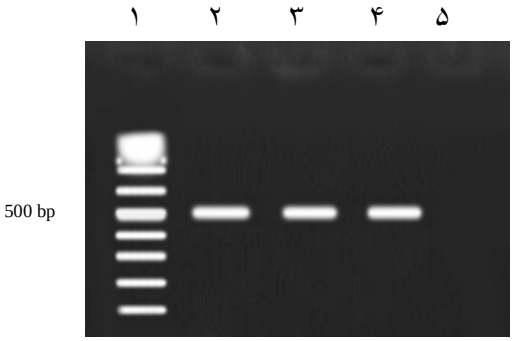
انجام SDS-PAGE:

بررسی بیان ژن *ureE* کلون‌شده در وکتور pIRES2-DSRed، به روش SDS-PAGE صورت گرفت. این روش شامل الکتروفورز نمونه‌های پروتئین (ولتاژ 200 ولت به‌مدّت 3 ساعت صورت)، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو و رنگ‌بری توسط محلول رنگ‌بر است. به این منظور، سلول‌های CHO به‌روش ذوب و انجماد متناوب (freeze and thow) تخریب شدند و عصاره سلولی به‌دست‌آمده با استفاده از سرنگ هامیلتون به چاهک‌های روی ژل عمودی وارد گردید. همچنین در یکی از چاهک‌ها مقدار 5میکرولیتر نشانگر پروتئینی ریخته شد و الکتروفورز انجام شد؛ سپس رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی‌بلو انجام گرفت.

یافته‌ها

تکثیر و جداسازی ژن *ureE* هلیکوباکتر پیلوری:

DNA از باکتری هلیکوباکترپیلوری با موفقیت استخراج شد. الکتروفورز DNA تخلیص‌شده روی ژل آگارز یک‌درصد، نشان‌دهنده 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 یک‌درصد الکتروفورز گردیدند (شکل 1).



شکل 1- تکثیر ژن *ureE* به‌روش 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 مسترمیکس PCR بدون DNA)

کلون‌سازی T/A و ساب‌کلونینگ[1]:

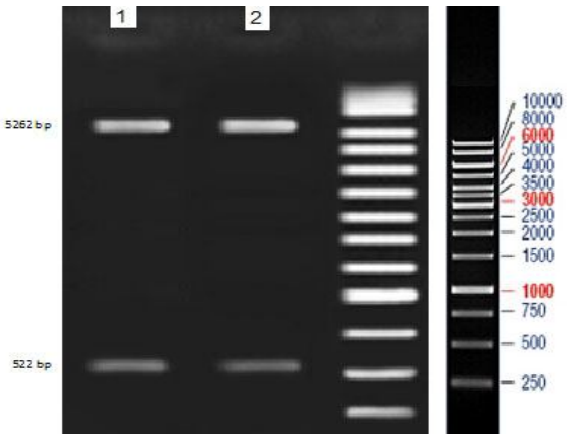
کلون‌سازی محصولات PCR به روش T/A منجر به ساخت سازواره ژنی pTZ-*ureE* شد. آزمون‌های بررسی صحت کلون‌سازی T/A که شامل PCR و هضم آنزیمی بود، نشان داد در بسیاری از کلنی‌های به‌دست‌آمده، ناقل نوترکیب pTZ-*ureE* تشکیل شده است؛ به‌طوری که با انجام PCR روی این کلنی‌ها، محصول 522 جفت بازی مربوط به ژن کلون‌شده،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

[1] *Subcloning*

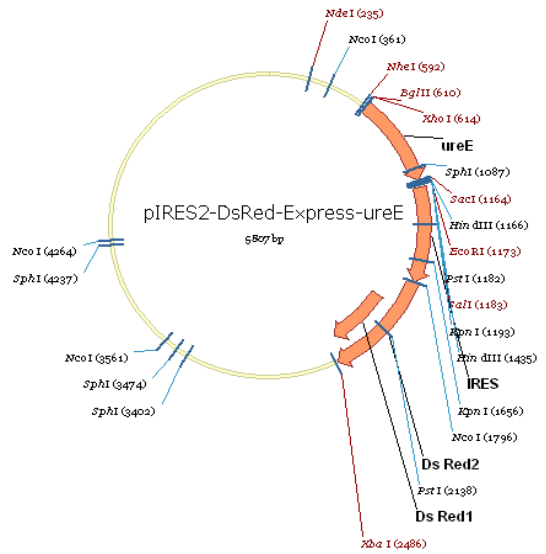
2886 و 522 جفت بازی گردید که به‌ترتیب نشان‌دهنده وکتور pTZ و قطعه ژن *ureE* می‌باشند.

نتایج ساب‌کلونینگ 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 نوترکیب 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 به‌ترتیب مربوط به وکتور pIRES2-DSRed و ژن *ureE* می‌باشند.

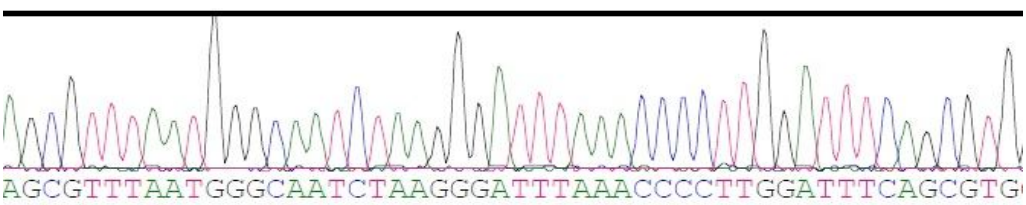
تصویر حاصل از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی سازواره نهایی در شکل 2 نمایش داده شده است. نتایج تعیین توالی ژن *ureE* کلون‌شده در سازواره نهایی، نشان‌دهنده صحت کلون‌سازی این ژن و عدم وجود هرگونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن بود. در شکل 3 نیز تصویر شماتیک واکسن ژنی ایجاد شده در این تحقیق دیده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



شکل2- هضم آنزیمی سازواره نهایی pIRES2-DSRed-*ureE* با دو آنزیم *XhoI* و *SacI*. شماره های 1و 2: باندهای با اندازه های 5262 و 522 جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور pIRES2-DSRed و ژن *ureE* . شماره 3: مارکر یک کیلو جفت بازی شرکت ترمو فیشر با شماره کاتالوگ SM0313.



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



تسکل 4- تصویر بخشی از دندروگرام مربوط به تعیین توالی ژن *ureE*

بحث

هلیکوباکتر پیلوری، باسیلی مارپیچی 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 نه‌تنها 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 به‌نظر 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 محرّک‌بودن 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 به‌کار 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* در 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 محرّک

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 مؤیّد 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 آزمایشکاهی تزریق گردد، موجب تحریک سیستم ایمنی و ایجاد ایمنی حفاظتی نسبی بر ضدّ 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، محرّک سیستم ایمنی میزبان 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 نوترکیب بهره گرفته شد که با دز نظر گرفتن تحقیقات دیگران، به نظر می‌رسد این ژن می‌تواند از قدرت ایمنی‌زایی مؤثری بر ضدّ 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 ضدّ 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 پپتیدی 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 پاسخ های 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.

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 Supple 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, Soleimanjahi 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.