Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(70): 34-42

Productnin of Antigenic region **VacA** ***Helicobacter pylori in E.coli***

Hasanzadeh L(M.Sc)[1], Abtahi H(Ph.D)[2]*, Ghaznavi-Rad E(Ph.D)[3] , Soufian S(Ph.D)[4], Farjadi V(M.Sc)[5]

1- Department of Biotechnology and Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- Department of Microbiology, Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4- Department of Biology, Payame Noor University, Arak, Iran
5- Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Received: 2 Sep 2012, Accepted: 14 Nov 2012

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* is the most common bacteria causing chronic infections worldwide. An important virulence factor of *H. pylori* is a vacuolating cytotoxin (VacA) that induces the formation of acidic vacuoles in cytoplasm and damage to epithelial cells. The aim of this study was to examine the antigenic properties of the recombinant VacA of *H. pylori* in infected sera of mice and human.

Materials and Methods: In this experimental study, the highly antigenic region of VacA gene (1233 bp) was detected by bioinformatics methods, and it was amplified by PCR method and cloned into the pET32a expression vector. After expression and purification of the target protein, its antigenicity was studied by Western Blotting using human sera infected with *H. pylori* and sera from immunized mice infected with purified recombinant VacA.

Results: PCR and sequencing results showed that the target gene was correctly cloned into the recombinant vector. Antibodies used in Western Blotting indicated the production and expression of the recombinant protein (65kDa) with concentration of 2.1 mg/ml.

Conclusion: Recombinant VacA protein has antigenic and immunogenic properties; thus, it is a proper candidate for designing *H. pylori* vaccine and diagnostic kits.

Keywords**:** Antigenic region, *Helicobacter pylori*, Recombinant protein, VacA gene

*Corresponding author:
Address: Department of Microbiology, Molecular and Medical Research Center, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: abtahi@arakmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 1 (شماره پیاپی70)، فروردین 1392، 42-34

تولید ناحیه آنتی ژنیک vacA هلیکوباکتر پیلوری در اشریشیاکلی

لیلا حسن زاده[1]، حمید ابطحی[2*]، احسان الله غزنوی راد[3]، صفیه صوفیان[4]، وحیده فرجادی[5]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
4- استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه پیام نور، اراک، ایران
5-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: 91/6/12 تاریخ پذیرش: 91/8/24

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکترپیلوری شایع‌ترین باکتری است که جوامع انسانی را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است. ژن vacA از مهم‌ترین شاخص‌های بیماری زایی این باکتری می‌باشد که باعث تشکیل واکوئل‌های اسیدی در سیتوپلاسم سلول و نیز تخریب سلول‌های اپیتلیال می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی خواص آنتی ژنیک پروتئین نوترکیب vacA هلیکوباکترپیلوری در سرم انسان و موش آلوده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، قطعه حاوی ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک ژن vacA به طول 1233bp بر اساس برنامه‌های بیوانفورماتیکی به دست آمد، پس از تکثیر ناحیه مورد نظر با استفاده از PCR، در ناقل پلاسمیدی pET32a کلون و بیان شد. پس از خالص سازی پروتئین نوترکیب، آنتی ژنیسیته آن به روش وسترن بلات با سرم افراد آلوده به عفونت فعال هلیکوباکترپیلوری و موش آلوده شده با پروتئین نوترکیب خالص شده بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج PCR و تعیین توالی نشان داد که ژن هدف به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده است. آنتی بادی‌های استفاده شده در وسترن بلات تولید و بیان پروتئین نوترکیب (65 کیلو دالتون) با غلظت 2/1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: تزریق پروتئین تولید شده به موش نشان داد که این پروتئین دارای خاصیت آنتی ژنیک و ایمونوژنیک می‌باشد. بنابراین می‌توان از آن به عنوان کاندید مناسبی برای طراحی کیت‌های تشخیصی و واکسن هلیکوباکترپیلوری استفاده نمود.

واژگان کلیدی: ناحیه آنتی ژنیک، هلیکوباکترپیلوری، پروتئین نوترکیب، ژن vacA

* **نویسندهٔ مسئول:** اراک، میدان بسیج، دانشگاه علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی

Email: abtahi@arakmu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری (H. pylori) باسیل گرم منفی، خمیده و میکروآئروفیلی(1، 2) است که مهم‌ترین علت بیماری‌های معده‌ای- روده‌ای از جمله گاستریت مزمن، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده و لنفوما می‌باشد(3، 4). هم‌چنین نقش آن در بروز بیماری‌هایی مانند آتروسکلروز، سنگ صفرا و سوء هاضمه، سندرم متابولیک، دیابت نوع 1 و مقاومت انسولینی مطرح است(5، 6). این باسیل به عنوان عامل سرطان زای کلاس 1 معرفی شده است(7). شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری در کشورهای توسعه یافته50 درصد و در کشورهای در حال توسعه 80 درصد می‌باشد(8) به طوری که این ارگانیسم حداقل در معده بیش از نیمی از جمعیت جهان کلونیزه شده است(9). اما بیماری‌های مرتبط با H. pylori تنها در 10 تا 20 درصد این جمعیت ها دیده می‌شود(10). دو شاخص بیماری‌زایی در هلیکوباکترپیلوری شناخته شده که عبارتند از: سیتوتوکسین مرتبط با ژن A (CagA) و سیتوتوکسین واکوئله کننده A (VacA)(11، 12). ژن vacA عامل مهم بیماری‌زایی را کد می‌کند که باعث تشکیل حفره‌های اسیدی در سیتوپلاسم سلول و نیز تخریب سلول‌های اپیتلیال می‌شود(13).

درمان‌های موجود در ریشه کنی هلیکوباکترپیلوری دارای عوارض جانبی می‌باشد و معایب متعددی مانند رویداد مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، بروز عفونت مجدد، عدم تأثیر بر اشکال غیرفعال باکتری و هزینه بالا برای آنها گزارش شده است(14). بنابراین به دلیل پایداری بالای هلیکوباکترپیلوری در میزبان انسانی، ضرورت دست‌یابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیش‌گیری مانند واکسیناسون مطرح می شود.

در صورت استفاده از اپیتوپ‌های اصلی هر آنتی ژن (ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک) به جای آنتی ژن کامل و کوچک شدن قطعه مورد بررسی، پاسخ‌های ایمنی اختصاصی تری تحریک می شود و نیز تکثیر و ترکیب آن با سایر آنتی ژن‌ها راحت‌تر صورت می‌گیرد. بر طبق مطالعات موجود، در صورت استفاده از کل توالی ژن vacA، به علت وزن ملکولی بالای پروتئین نوترکیب حاصل، مقدار تولید پروتئین نوترکیب کاهش یافته و باند مشاهده شده در لکه گذاری وسترن ضعیف خواهد بود که استفاده از آن را برای کاربردهای بعدی محدود می‌سازد(15).

بنابراین هدف از این تحقیق، تعیین ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک ژن vacA هلیکوباکترپیلوری با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیکی، بیان آن با استفاده از ناقل پلاسمیدی در E.coli، تخلیص پروتئین نوترکیب حاصل و بررسی آنتی ژنیسیته آن با سرم انسانی و آنتی‌بادی‌های اختصاصی به دست آمده از تلقیح پروتئین نوترکیب به موش سوری به عنوان کاندید مناسبی برای طراحی کیت‌های تشخیصی و طراحی واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری است.

در این مطالعه برای بیان پروتئین از ناقل بیان کننده pET32a دارای پروتئین الحاقی (ترادف ویژه مربوط به 6 اسید آمینه هیستیدین در ناحیه ´5 مکان کلونینگ ژن و توالی پپتیدی اتصالی 109 اسید آمینه ای Trx•Tag™ پروتئین thioredoxin که به پروتئین نوترکیب اضافه می‌شود) استفاده شده است. این امر باعث پایداری پروتئین در سلول شده و آن را از تخریب داخل سلولی حفظ می‌کند و به تخلیص پروتئین نوترکیب کمک می‌نماید. هم‌چنین برای افزایش تولید پروتئین و جلوگیری از تخریب آنزیمی آن در سلول میزبان E.coli، از سویه BL21 استفاده شده است. سویه BL21 دارای حداقل پروتئاز های سیتوپلاسمی بوده بنابراین تخریب پروتئین نوترکیب در آن صورت نمی‌گیرد.

مواد و روش ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی منتج از پایان نامه دانشجویی به شماره 684 می‌باشد.

پلاسمید و سویه های باکتری و شرایط

کشت: سویه استاندارد هلیکوباکترپیلوری تهیه و در محیط بروسلا آگار(Brucella Agar) غنی شده با 5 درصد خون دفیبرینه گوسفند، 10 درصد سرم جنین گاو و آنتی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، ونکومایسین و آمفوتریسین B کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت 48 تا 72 ساعت تحت شرایط میکروآئروفیل (Co2 10درصد) و 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از این مدت باکتری‌های رشد یافته برای استخراج DNA استفاده شد. H. pylori براساس ریخت شناسی (Morphology) کلونی و رنگ آمیزی گرم و واکنش‌های مثبت کاتالاز و اکسیداز و اوره آز تعیین هویت شد.

از باکتری E.coli سویه DH5α به عنوان میزبان اولیه استفاده شد. برای بیان ژن E.coli BL21 (DE3) pLYsS و وکتور بیانی pET32a مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی DNA ژنومی: برای تکثیر و جداسازی ژن vacA، ابتدا کروموزوم باکتری با استفاده از روش CTAB/NaClاز کشت سلولی جداسازی گردید. بدین منظور رسوب باکتری به مدت 2 دقیقه و با 5000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار 1/5 میلی‌لیتر از محلول حاصل در 567 میکرولیتر بافر TE (Tris 10 Mm, EDTA 1 Mm, pH=8) حل شد. سپس سلول باکتری توسط SDS و پروتئیناز K لیز شده و DNA توسط محلول CTAB/NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl) استخراج گردید. پروتئین‌ها و مواد اضافی با دو بار اضافه کردن محلول فنل- کلروفرم- ایزوامایل (1/24/25) از محلول خارج شدند. برای رسوب DNA از ایزوپروپانول استفاده شد. در پایان آن را با اتانول 70 درصد شستشو داده و در100 میکرولیتر بافر TE محلول شد. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگاروز 0/8 درصد در بافر TBE بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج های 260 و 280 نانومتر به دست آمد.

تعیین ناحیه آنتی ژنیک و طراحی پرایمر: توالی ژن vacA با شماره دسترسی U95971 که 4243 جفت باز و 1323 اسید آمینه دارد از بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) تهیه شد. سپس با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Emboss Antigenic، ABCpred و Bcepred فاصله نوکلئوتیدهای 1224 تا 2457 به عنوان ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک در نظر گرفته شد(16) و توسط نرم افزار Oligo5 پرایمرهای مناسب طراحی گردید. در این مرحله از آنالیزهای کامپیوتری توسط برنامه Blast استفاده شد. پرایمرهای رفت (Forward) (5'GGAATTCTATAAAGCTTCTCTTACC 3') و برگشت (Reverse) (5'CATCTCGAGTGCTTTAATGTCATTG 3') به ترتیب واجد جایگاه برش آنزیم های EcoRI و XhoI برای جداسازی ژن vacA تهیه شد.

تکثیر ژن: تکثیر ناحیه آنتی ژنیک ژن vacA از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) در حجم 50 میکرولیتر و با استفاده از 500 نانوگرم DNA الگو، 3 میلی مولار از یون منیزیم، 1 میلی‌مولار از هر کدام از پرایمرها، 200 میلی‌مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم expand پلیمراز (فرمنتاز) و بافر مربوط به آن انجام شد. به این صورت که ابتدا حرارت 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه برای شروع انتخاب شد. فرایند واسرشتگی (Denaturation) در حرارت 94 درجه سانتی‌گراد در 30 سیکل به مدت یک دقیقه، اتصال (Annealing) در 50 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط (Extension) در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام گرفت. در پایان جهت تکثیر قطعات ناتمام، Extension 5 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد انجام گردید. پس از انجام واکنش، محصول PCR روی ژل آگاروز 0/8درصد برده شد و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV و تایید محصول در مقایسه با نشانگر، قطعه ژنی مورد نظر از ژل بریده و فرایند خالص سازی آن طبق پروتکل توسط کیت استخراج(Fermentas,Lithuania) انجام گرفت.

کلونینگ ژن vacA: با توجه به جایگاه آنزیمی تعبیه شده در پرایمرها، قطعه ژنی در شرایط بافری خاص هر آنزیم برش خورد. ناقل pET32a نیز با آنزیم‌های

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

مشابه با آنزیم‌های برش دهنده قطعه ژنی در شرایط مشابه برش خورده و سپس ناقل‌های خطی شده استخراج شدند. در مرحله بعد واکنش الحاق بین ناقل و قطعه برش خورده با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 در حرارت 22 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام گرفت و ناقل‌های حاصل از طریق ترنسفورماسیون به میزبان کلونینگ (E. coli DH5α) مستعد شده با روش کلسیم کلراید(cacl2) وارد شدند. پس از رشد کلونی‌ها، استخراج پلاسمید از آنها توسط کیت استخراج پلاسمید انجام گرفت و صحت کلونینگ به روش PCR و هضم آنزیمی تایید شد. سپس پلاسمیدهای حامل ژن vacA به باکتری E.coli سویه pLYsS BL21 (DE3) مستعد شده انتقال یافتند. صحت این مرحله نیز از طریق تعیین توالی تایید شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: از کلونی‌های E.coli BL21(DE3) pLYsS حامل پلاسمیدهای pET32a-vacA در محیط نوترین براث حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین (17 میکرولیتر از آمپی سیلین100میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کلرآمفنیکل (17 میکرو لیتر از کلرآمفنیکل 47 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد. سپس500 میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به 50 میلی‌لیتر از محیط القا اضافه و بر روی انکوباتور شیکردار و حرارت 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به جذب نوری 0/6 در طول موج 600 نانومتر(OD600) رسید. سپس توسط افزودن 50 میکرولیتر IPTG یک میلی مولار (Isopropyl β-D-thiogalactosidase) القا صورت گرفت. پس از طی 4 ساعت دیگر انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد، رسوب سلولی حاصل از سانتریفوژ به علت وجود دنباله هیستیدینی در پروتئین بیان شده توسط رزین نیکل (Ni-NTA agarose resin) بر اساس کروماتوگرافی تمایلی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen- آمریکا) تخلیص شد و سپس با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS)(pH 7.2) دیالیز گردید. در پایان وزن ملکولی و محل قرارگیری پروتئین خالص شده با استفاده از SDS-PAGE Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Sodium dodecyl مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب: برای بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب از روش لکه گذاری وسترن (Western blotting) استفاده شد. محصول پروتئینی پس از انجام SDS-PAGE به غشای نیتروسلولزی(کاغذ PVDF) انتقال داده شد و به منظور ممانعت از واکنش‌های غیراختصاصی، غشا توسط اسکیم میلک (Skim Milk) 1 درصد مسدود شد. سپس غشا، به مدت دو ساعت در مجاورت آنتی بادی اول(سرم افراد مبتلا به عفونت فعال H. pylori با تیتر بالا) با غلظت 1:100 قرار گرفت. پس از سه مرحله شستشو هر بار 15 دقیقه در بافر TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20)، غشا به مدت 1 تا 2 ساعت در معرض آنتی بادی ثانویه (Antihuman IgG) که با بافر بلوکه کننده تا غلظت 1:1000 رقیق شده بود، قرار داده شد. پس از شستشو، غشا در معرض محلول دی آمینوبنزیدین (DAB) قرار گرفت. پس از ظهور باند مورد نظر، غشا با آب مقطر شستشو و در محل تاریک نگهداری شد.

تزریق پروتئین vacA نوترکیب به موش سوری: برای این منظور از 2 گروه موش استفاده شد. گروه اول کنترل بودند که تزریقی روی آنها انجام نگرفت. به گروه دوم vacA نوترکیب تخلیص شده تزریق شد. برای تزریق 1 سی سی از پروتئین نوترکیب (2/1 میکروگرم در میلی‌لیتر) با 1 سی سی ادجوانت کامل فروند مخلوط شد و به هر موش 200 میکرو لیتر به شکل زیر جلدی تزریق گردید. بعد از 7 روز، تزریق دوم همراه با ادجوانت ناقص فروند انجام گرفت. تزریق سوم به همین ترتیب بعد از گذشت 14 روز از تزریق دوم همراه با ادجوانت ناقص انجام شد. دو هفته بعد از سومین تزریق از موش‌ها خون‌گیری شد و سرم آنها برای وسترن بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفت. سرم‌های به دست آمده از تلقیح پروتئین نوترکیب به موش با رقت 1:100 به عنوان آنتی بادی اولیه و conjugated goat anti-mouse IgG (Bioscience) peroxidase با رقت 1:2500 به

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

عنوان آنتی بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفتند. سرم موش‌های گروه کنترل نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

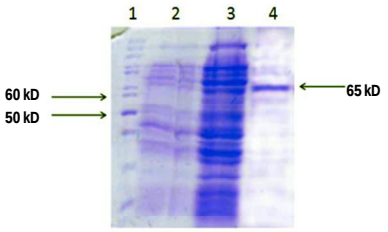
یافته ها

استخراج DNA و PCR: هر سه سرور بیوانفورماتیکی نتایج یکدیگر را در تعیین ناحیه آنتی ژنیک تایید نمودند. پس از استخراج DNA از کلونی‌های رشد یافته هلیکوباکترپیلوری، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. برای تکثیر ناحیه آنتی ژنیک از غلظت‌های مختلف یون منیزیوم و دماهای متفاوت Annealing استفاده گردید. بهترین غلظت یون منیزیوم، غلظت 3 میلی‌مولار و دمای مناسب برای اتصال پرایمرها 50 درجه سانتی گراد بود. باند 1233 جفت بازی حاصل از تکثیر ژن vacA روی ژل آکاروز 0/8 درصد مشاهده و اندازه آن از طریق مقایسه با مارکر استاندارد تایید شد.

ساخت ناقل نوترکیب: پس از وارد سازی قطعه مورد نظر به درون ناقل، ایجاد ناقل نوترکیب با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های EcoRI و XhoI و نیز PCR تایید شد. نتایج به دست آمده از هضم آنزیمی و PCR نشان می‌دهند که ژن به درستی در ناقل پلاسمیدی کلون شده است. هم‌چنین تعیین ترادف به روش ختم زنجیره (Sanger) انجام گرفت. نتایج تعیین توالی (sequencing) و هم‌ردیفی (Alignment) دال بر صحت ترادف جدا شده بود.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب vacA:

پس از انتقال ناقل نوترکیب به سلول مستعد شده باکتری، به منظور بیان پروتئین، القا با IPTG انجام شد و تولید پروتئین مورد نظر با وزن 65 کیلو دالتون با انجام SDS-PAGE تایید شد که نتیجه آن در شکل 1 آمده است (وزن پروتئین اصلی 45KD می‌باشد که به دلیل اضافه شدن پروتئین‌های الحاقی توسط وکتور، وزن آن روی ژل 65 کیلو دالتون مشاهده می‌شود). همان‌طور که ملاحظه می‌شود باند 65 کیلو دالتونی حاصل از بیان ترکیب پروتئینی در نمونه غیر القا وجود ندارد اما در نمونه‌های القا شده به خوبی قابل مشاهده است. با توجه به قرار گرفتن برچسب هیستیدینی(6x His.tag) در ابتدای ترکیب پروتئینی، خالص‌سازی آن با استفاده از رزین نیکل انجام گرفت و سپس محصول پروتئینی دیالیز شد و محصول استخراج روی ژل، تک باندی در ناحیه مورد نظر نشان داد (شکل1). غلظت پروتئین نوترکیب تولید شده 2/1 میلی گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.



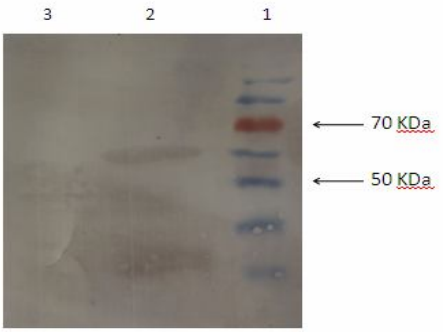
شکل1. القا و تخلیص پروتئین نوترکیب vacA هلیکوباکترپیلوری
ستون1: مارکر پروتئین، ستون 2: نمونه قبل از القا، ستون 3: نمونه بعد از القا، ستون 4: نمونه تخلیص شده

وسترن بلات: به منظور بررسی واکنش دهی پروتئین نوترکیب خالص شده با سرم افراد آلوده و سرم موش‌های ایمن شده، آزمون لکه گذاری وسترن انجام گرفت. ظهور باندهای ناشی از واکنش پروتئین حاصل با آنتی بادی‌های انسانی و حیوانی مورد استفاده در محل مورد نظر، نشان داد که پروتئین نوترکیب مورد بررسی خاصیت آنتی ژنیک دارد و می‌تواند با سرم‌های آلوده انسان و موش واکنش نشان دهد (شکل2).

هلیکوباکترپیلوری شایع‌ترین باکتری است که جوامع انسانی را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است(17). مطالعات نشان داده است که 5 درصد افراد مبتلا به عفونت با این باکتری طی 10 سال دچار بدخیمی معده می‌شوند(18). ژن vacuolating cytotoxin (VacA) از عوامل بیماری زایی(Virulence) هلیکوباکترپیلوری است که باعث می‌شود باکتری در مخاط معده کلونیزه شود و با سیستم ایمنی میزبان مقابله کند و باعث تخریب بافتی شود. vacA دارای دامنه‌ای از 3864 تا 3933 جفت باز است که یک پره‌توکسین140 کیلودالتونی را کد می کند. این

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

پروتئین در حالت واسرشته آن به صورت تقریبا 90 کیلودالتون است(19). VacA باعث بقای H. pylori در محیط اسیدی معده می‌شود، به طوری که واکسینه کردن موش با آن با ایمنی مؤثری مانع کلونیزاسیون باکتری در موش می‌شود(20).



شکل2. وسترن بلات پروتئین نوترکیب vacA
ستون1: مارکر پروتئین، ستون 2: وسترن بلات موش تلقیح شده با vacA نوترکیب، ستون3 : موش طبیعی

بحث

سیستم pET از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشریشیاکلی می‌باشد. در این سیستم ژن هدف تحت کنترل پروموتر قوی T7 بوده که تحت کنترل اپراتور Lac می باشد و در ژنوم میزبان (E. coli BL21(DE3) pLYsS) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتر توسط RNA پلیمراز فاژ T7 که در سلول باکتری کلون شده است، انجام می‌پذیرد. بنابراین به علت استقلال سیستم رونویسی ژن از سلول میزبان، تولید mRNA و نهایت تولید پروتئین در این سیستم متاثر از عوامل سلولی دخیل در سنتز پروتئین نمی‌باشد؛ به همین دلیل تولید محصول در این سیستم بیش از سیستم‌هایی است که در آنها رونویسی وابسته به پلیمرازهای سلول میزبان است(21)؛ چنانچه در این تحقیق میزان پروتئین 2/1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد شد.

در مورد باکتری‌های نسبتا کند رشد و پر نیاز، نظیر هلیکوباکترپیلوری، تولید پروتئین‌ای نوترکیب در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی بسیار مقرون به صرفه است. زیرا پروتئین‌های نوترکیب در اکثر موارد خواص ساختاری پروتئین طبیعی را دارند. بنابراین می‌توان تولید پروتئین‌هایی را که در حالت طبیعی به میزان اندک صورت می‌گیرد، در حالت نوترکیب به میزان دلخواه افزایش داد. علاوه بر این، خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب نسبت به پروتئین طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود به عنوان مثال از طریق برچسب هیستیدینی(22).

استفاده از ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک و کوچک کردن ژن مورد نظر، باعث اختصاصی‌تر شدن قطعه مورد بررسی می‌شود که این امر باعث سهولت کار و و افزایش حفاظت بخشی می‌شود. بنابراین امروزه تکنولوژی استفاده از آنتی‌ژن های نوترکیب پروتئینی برای ایمن سازی به سمت شناسایی اپیتوپ‌های اصلی هر آنتی ژن برای تحریک ایمنی و استفاده از آنها به جای پروتئین کامل پیش می‌رود(22). از این رو در این مطالعه، قطعه‌ای از ژن vacA که حاوی تعدادی از اپیتوپ‌های مهم است، تولید و بررسی شد.

به طور کلی نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که ترکیب پروتئینی حاوی vacA به درستی تهیه و تخلیص شده است. بررسی لکه گذاری وسترن نیز نشان دهنده واکنش پذیری و قابلیت شناسایی این ترکیب توسط سرم انسان آلوده به عفونت فعال هلیکوباکترپیلوری و سرم موش‌های ایمن شده است. بنابراین این پروتئین از قدرت آنتی ژنیسیته و ایمونوژنیسیته مناسبی برخوردار بوده و دارای اپیتوپ‌های مشابه با فرم طبیعی است و می‌تواند به عنوان یک کاندید مناسب برای تولید واکسن و نیز ابزار سرولوژیک برای شناسایی بیماری H. pylori و طراحی کیت های تشخیصی(ELISA) مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

ژن کلون شده در این تحقیق که ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک(1233bp) به جای استفاده از کل طول ژن(4243bp) بود، از نظر سکانس با ژن vacA ، 100 درصد همولوژی را نشان داد. تولید این پروتئین با

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

استفاده از ناقل بیانی pET32a در میزبان E. coli انجام شد. پروتئین نوترکیب حاصل در مقایسه با پروتئین طبیعی کوچک‌تر است(65 KDa) اما دارای همان خاصیت آنتی ژنیک و اپیتوپ‌های مشابه با فرم طبیعی می‌باشد و می‌توان از آن جهت تشخیص آنتی بادی ضد vacA در افراد مبتلا و تولید DNA واکسن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و بخش میکروب شناسی دانشگاه، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. The Lancet. 1983;321(8336):1273-5.
2. Kumar S, Kumar A, Dixit VK. Direct detection and analysis of vacA genotypes and cagA gene of Helicobacter pylori from gastric biopsies by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2008;62(4):366-73.
3. Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. ASM News.1995; 61: 21–6.
4. Sanders MK, Peura DA. Helicobacter pylori-associated diseases. Current gastroenterology reports. 2002;4(6):448-54.
5. Pasceri V, Cammarota G, Patti G, Cuoco L, Gasbarrini A, Grillo RL, et al. Association of virulent Helicobacter pylori strains with ischemic heart disease. Circulation. 1998;97(17):1675-9.
6. Laurila A, Bloigu A, Näyhä S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Association of Helicobacter pylori infection with elevated serum lipids. Atherosclerosis. 1999;142(1):207-10.
7. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer research. 1998;58(19):4255-9.
8. Mahan KL, Escott- Stump S. Krause's food, nutrition & diet therapy. 11 ed. United States of America: Saunders; 2004.p.692-3.
9. The ehurogast Study Group. Epidemiology of, and risk factors for, Helicobacter pylori infection among 3,154 asymptomatic subjects in 17 populations. Gut. 1993; 34:1672–6.
10. Ashour AR, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmao VR, Queiroz DM. Detection of vaca genotypes in Helicobacter pylori strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis duodenal ulcer or gastric carcinoma. FEMS Imunol Med Microbiol. 2002; 33: 173-8.
11. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infection and immunity. 1995;63(1):94-8.
12. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive inHelicobacter pylori isolates in Japan. Gut. 1998;42(3):338-43.
13. Soltermann A, Koetzer S, Eigenmann F, Komminoth P. Correlation of Helicobacter pylori virulence genotypes vacA and cagA with histological parameters of gastritis and patient's age. Modern pathology. 2007;20(8):878-83.
14. Chi CH, Lin CY, Sheu BS, Yang HB, Huang AH, Wu JJ. Quadruple therapy containing amoxicillin and tetracycline is an effective regimen to rescue failed triple therapy by overcoming the antimicrobial resistance of Helicobacter pylori. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2003;18(3):347-53.
15. Talebkhan Y, Mahboudi F, Sarrami R, Barkhordari F, Amani M, Mohammadi M. Cloning and expression of the heterogenic vacuolating cytotoxin from an Iranian Helicobacter pylori strain. IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY. 2004;2(2):123.[Persian]
16. Kolaskar A, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS letters. 1990;276(1):172-4.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:00 +0330 on Friday November 24th 2017

17. Czinn SJ, Nedrud JG. Oral immunization against Helicobacter pylori. Infection and immunity. 1991;59(7):2359-63.
18. Takata T, Fujimoto S, Anzai K, Shirotani T, Okada M, Sawae Y, et al. Analysis of the expression of CagA and VacA and the vacuolating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. The American journal of gastroenterology. 1998;93(1):30-4.
19. Atherton JG, Cover TL, Papini E, Telford JL. Vaculating cytotoxin. In: Helicobacter pylori : Physiology and Genetics. Mobley HL, Mendez GL, Hazell ST (eds). Washington DC, ASM Press, 2001; p: 97-110.
20. Pan ZJ, van der Hulst RWM, Tytgat GNJ, Dankert J, van der Ende A. Relation between vacA subtypes, cytotoxin activity, and disease in Helicobacter pylori-infected patients from The Netherlands. The American journal of gastroenterology. 1999;94(6):1517-21.
21. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual: CSHL press; 2001.
22. Hajikhani B, NajarPeerayeh S, Soleimanjahi H, Mohammad Hassan Z. 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.[Persian]