

Productin 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

تولید ناحیه آنتی ژنیک vacA هلیکوباکتر پیلوری در اشریشیاکلی

لیلا حسن زاده¹، حمید ابطی^{2*}، احسان الله غزنوی راد³، صفیه صوفیان⁴، وحیده فرجادی⁵

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 ژن‌سسته 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 میلی گرم در میلی لیتر 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

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

مقدمه

هلیکوباکتری پیلوری (*H. pylori*) باسیل گرم منفی، خمیده و میکروآتروفیلی (1، 2) است که مهم ترین علت بیماری های معده ای- روده ای از جمله گاستریت مزمن، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده و لنفوما می باشد (3، 4). هم چنین نقش آن در بروز بیماری هایی 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 هلیکوباکتری پیلوری در کشورهای توسعه یافته 50 درصد و در کشورهای در حال توسعه 80 درصد می باشد (8) به طوری که این ارگانسیم حداقل در معده بیش از نیمی از جمعیت جهان کلونیزه شده است (9). اما بیماری های مرتبط با *H. pylori* تنها در 10 تا 20 درصد این جمعیت ها دیده می شود (10). دو شاخص بیماری زایی در هلیکوباکتری پیلوری شناخته شده که عبارتند از: سیتوتوکسین مرتبط با ژن A (*CagA*) و سیتوتوکسین واکونله کننده A (*VacA*) (11، 12). ژن *vacA* عامل مهم بیماری زایی را کد می کند که باعث تشکیل حفره های اسیدی در سیتوپلاسم سلول و نیز تخریب سلول های اپیتلیال می شود (13).

درمان های موجود در ریشه کنی هلیکوباکتری پیلوری دارای عوارض جانبی می باشد و معایب متعددی مانند رویداد مقاومت های 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 هلیکوباکتری پیلوری در میزبان انسانی، ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیش گیری مانند واکسیناسون مطرح می شود.

در صورت استفاده از اپیتوپ های اصلی هر آنتی ژن (ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک) به جای آنتی ژن کامل و کوچک شدن قطعه مورد بررسی، پاسخ های ایمنی اختصاصی تری تحریک می شود و نیز تکثیر و ترکیب آن با سایر آنتی ژن ها راحت تر صورت می گیرد. بر طبق مطالعات موجود، در صورت استفاده از کل توالی ژن

vacA، به علت وزن ملکولی بالای پروتئین نو ترکیب حاصل، مقدار تولید پروتئین نو ترکیب کاهش یافته و باند مشاهده شده در لکه گذاری وسترن ضعیف خواهد بود که استفاده از آن را برای کاربردهای بعدی محدود می سازد (15).

بنابراین هدف از این تحقیق، تعیین ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک ژن *vacA* هلیکوباکتری پیلوری با استفاده از برنامه های بیوانفورماتیکی، بیان آن با استفاده از ناقل پلاسمیدی در *E. coli*، تخلیص پروتئین نو ترکیب حاصل و بررسی آنتی ژنیسته آن با سرم انسانی و آنتی بادی های اختصاصی به دست آمده از تلقیح پروتئین نو ترکیب به موش سوری به عنوان کاندید مناسبی برای طراحی کیت های تشخیصی و طراحی واکسن علیه هلیکوباکتری پیلوری است.

در این مطالعه برای بیان پروتئین از ناقل بیان کننده pET32a دارای پروتئین الحاقی (ترادف ویژه مربوط به 6 اسید آمینه هیسیتیدین در ناحیه 5 مکان کلونینگ ژن و توالی پپتیدی اتصال 109 اسید آمینه ای Trx•Tag™ پروتئین thioredoxin که به پروتئین نو ترکیب اضافه می شود) استفاده شده است. این امر باعث پایداری پروتئین در سلول شده و آن را از تخریب داخل سلولی حفظ می کند و به تخلیص پروتئین نو ترکیب کمک می نماید. هم چنین 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 نو ترکیب در آن صورت نمی گیرد.

مواد و روش ها

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

پلاسمید و سویه های باکتری و شرایط

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

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 XhoI و EcoRI برای جداسازی ژن vacA تهیه شد.

تکثیر ژن: تکثیر ناحیه آنتی ژنیک ژن vacA از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم 50 میکرولیتر و با استفاده از 500 نانوگرم DNA الگو، 3 میلی مولار از یون منیزیم، 1 میلی مولار از هر کدام از پرایمرها، 200 میلی مولار از هر دو کسبی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم expand پلیمرز (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 0/8 درصد 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

بیوتیک‌های نالیدیکیسک اسید، ونکومایسین و آمفوتریسین B کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت 48 تا 72 ساعت تحت شرایط میکروآتروفیل (Co2 10 درصد) 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 آزمون 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/NaCl از 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) در 567 میکرولیتر بافر TE (Mm, pH=8) حل شد. سپس سلول باکتری توسط SDS و پروتیناز 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 - ایزواامیل (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 در 100 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

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 ترانسفورماسیون به میزبان کلونینگ (E. coli DH5 α) 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 نو ترکیب:

کلونی‌های pLYsS BL21(DE3) E. coli حامل پلاسمیدهای pET32a-vacA در محیط نوترین برات حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین (17 میکرولیتر از آمپی سیلین 100 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و کلرآمفنیکل (17 میکرو لیتر از کلرآمفنیکل 47 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد. سپس 500 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 هیسیتیدینی 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

(Sodium dodecyl Electrophoresis) مورد ارزیابی قرار گرفت.

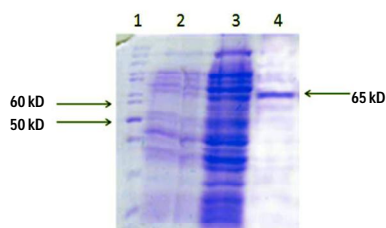
بررسی آنتی ژنیسته پروتئین نو ترکیب:

برای بررسی آنتی ژنیسته پروتئین نو ترکیب از روش لکه گذاری وسترن (Western blotting) استفاده شد. محصول پروتئینی پس از انجام SDS-PAGE به غشای نیتروسولولزی (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 تیترا 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 آمینوبنزدین (DAB) قرار گرفت. پس از ظهور باند مورد نظر، غشا با آب مقطر شستشو و در محل تاریک نگهداری شد.

تزریق پروتئین vacA نو ترکیب 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 نو ترکیب تخلیص شده تزریق شد. برای تزریق 1 سی سی از پروتئین نو ترکیب (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 بلائینگ مورد استفاده قرار گرفت. سرم‌های به دست آمده از تلقیح پروتئین نو ترکیب به موش با رقت 1:100 به عنوان آنتی بادی اولیه و conjugated goat anti-mouse peroxidase IgG (Bioscience) با رقت 1:2500 به

استفاده از رزین نیکل انجام گرفت و سپس محصول پروتئینی دیالیز شد و محصول استخراج روی ژل، تک بانندی در ناحیه مورد نظر نشان داد (شکل 1). غلظت پروتئین نو ترکیب تولید شده 2/1 میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد.



شکل 1. القا و تخلیص پروتئین نو ترکیب vacA هلیکوباکتریلوری
ستون 1: 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب مورد بررسی خاصیت آنتی ژنیک دارد و می‌تواند با سرم‌های آلوده انسان و موش واکنش نشان دهد (شکل 2).

هلیکوباکتریلوری 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 vacA (vacuolating cytotoxin) از عوامل بیماری‌زایی (Virulence) هلیکوباکتریلوری 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 پره‌توکسین 140 کیلودالتونی را کد می‌کند. این

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

یافته‌ها

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 هلیکوباکتریلوری، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. برای تکثیر ناحیه آنتی ژنیک از غلظت‌های مختلف یون منیزیم و دماهای متفاوت Annealing استفاده گردید. بهترین غلظت یون منیزیم، غلظت 3 میلی مولار 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 نو ترکیب: پس از وارد سازی قطعه مورد نظر به درون ناقل، ایجاد ناقل نو ترکیب 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 نو ترکیب vacA:

پس از انتقال ناقل نو ترکیب 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

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 برجسب هیستیدینی (22).

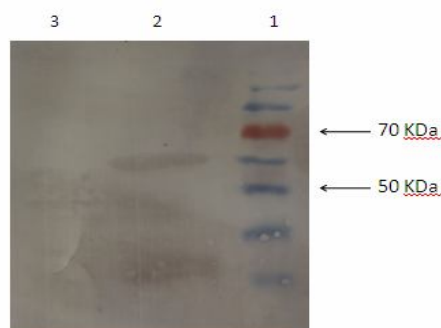
استفاده از ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک و کوچک کردن ژن مورد نظر، باعث اختصاصی‌تر شدن قطعه مورد بررسی می‌شود که این امر باعث سهولت کار و افزایش حفاظت بخشی می‌شود. بنابراین امروزه تکنولوژی استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب پروتئینی برای ایمن سازی به سمت شناسایی اپیتوپ‌های اصلی هر آنتی‌ژن برای تحریک 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 هلیکوباکتر پیلوری و سرم موش‌های ایمن شده است. بنابراین این پروتئین از قدرت آنتی ژنیسته و ایمونوژنیسته 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 کیت‌های 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

پروتئین در حالت واسرشته آن به صورت تقریباً 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).



شکل 2. وسترن بلات پروتئین نوترکیب vacA
ستون 1: مارکر پروتئین، ستون 2: وسترن بلات موش تلقیح شده با vacA نوترکیب، ستون 3: 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 پروموتور قوی T7 بوده که تحت کنترل اپراتور Lac می‌باشد و در ژنوم میزبان (E. coli BL21(DE3) pLYsS) رونویسی از ژن تحت کنترل این پروموتور 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 متأثر 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 نسبتاً کند رشد و پر نیاز، نظیر هلیکوباکتر پیلوری، تولید پروتئین‌ای نوترکیب در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی بسیار مقرون به صرفه است.

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 Immunol 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 in Helicobacter 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.

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

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و بخش میکروب شناسی دانشگاه، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

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.

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. Vacuolating 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]