Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(76): 35-44

# Production of recombinant CagA protein of *Helicobacter pylori*

**Farjadi V[1], Abtahi H[2*], Zolfaghari M.R[1], Soufian S[3], Hasanzadeh L[4]**

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

Received:28 May 2013, Accepted: 4 Sep 2013

**Abstract**

***Background:*** *Helicobacter pylori (H. pylori)* is a gram negative bacilli that causes the stomach and duodenum diseases in human. An important virulence factor of *H. pylori* is CagA gene which increases the colonization in stomach epithelial cells and lead to inflammation and peptic ulcers. The aim of the present study was to produce recombinant protein containing highly antigenic region of CagA in *E. coli*.

***Materials and Methods:*** In this experimental study, the antigenic region of CagA gene with 1245 base pair was detected by bioinformatics methods, proliferated by PCR method, digested by BamHI and XhoI restriction enzymes and cloned into pET32a plasmid and was expressed in the *E. coli BL21 (DE3) pLysS* with induction by IPTG. The expressed protein was purified with Ni-NTA kit and its antigenicity was studied by western blotting method.

***Results*****:** Data showed the successful cloning and expression of the target gene. In western blotting, the produced protein interacted with infected human and mice sera.

***Conclusion*****:** Results indicated that recombinant CagA protein (65 KDa) maintained its antigenicity, so could be used for serological diagnosis of *H. pylori* diseases and production of vaccine.

***Keywords*****:** Cloning, CagA protein, *Helicobacter pylori*, recombinant proteins

[*]Corresponding author:
Adress: Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Email: abtahi@arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 7 (شماره پیاپی 76)، مهر 1392، 44-35

# تولید پروتئین نوترکیب CagA هلیکوباکتر پیلوری

**وحیده فرجادی[1]، حمید ابطحی[2*]، محمدرضا ذوالفقاری[3]، صفیه صوفیان[4]، لیلا حسن زاده[5]**

1. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست سلولی ملکولی، میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
2. دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
4. استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه پیام نور، اراک، ایران
5. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت:92/3/7 تاریخ پذیرش: 92/6/13

## چکیده

**زمینه و هدف:** هلیکوباکتر پیلوری باسیلی‌گرم منفی است که موجب بیماری‌های معده و دئودنوم در انسان می‌شود. از مهم‌ترین ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی این باکتری ژن CagA می‌باشد که موجب کلونیزاسیون بیشتر آن در سلول‌های اپی تلیال معده و ایجاد التهاب و زخم‌های گوارشی می‌گردد. هدف از این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب حاوی ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک CagA در باکتری *E. coli* می باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، قطعه حاوی ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA به طول 1245 جفت باز براساس برنامه‌های بیوانفورماتیکی به دست آمد. سپس با روش PCR تکثیر، با آنزیم‌های محدود کننده BamHI و XhoI برش و در پلاسمید pET32a کلون و در *E. coli BL21 (DE3) pLysS* با القا توسط IPTG بیان شد. از کیت Ni-NTA جهت تخلیص پروتئین بیان شده استفاده شد و آنتی ژنیسیته آن به روش لکه‌گذاری وسترن بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج حاکی از کلونینگ و بیان موفقیت‌آمیز ژن هدف بود. در وسترن بلاتینگ پروتئین تولید شده با سرم‌های آلوده انسان و موش واکنش نشان داد.

**نتیجه‌گیری**: نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب CagA (65 کیلو دالتون) آنتی ژنیسیته خود را حفظ می‌کند. بنابراین می‌تواند برای تشخیص سرولوژیک بیماری‌های هلیکوباکتر پیلوری و تولید واکسن مورد استفاده قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** کلونینگ، پروتئین CagA، هلیکوباکتر پیلوری، پروتئین نوترکیب

* **نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی.

Email: abtahi@arakmu.ac.ir .

**مقدمه**

هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی و مارپیچی است که بیش از نیمی از جمعیت جهان را آلوده کرده است. عفونت با این باکتری با گاستریت مزمن، زخم‌های گوارشی، کارسینوم و لنفوم معده همراهی دارد (1، 2). این میکروارگانیسم به عنوان عامل سرطان‌زای کلاس یک معرفی شده است (3). سرطان معده چهارمین سرطان شایع در دنیا و دومین عامل مرگ و میر در بین سرطان‌ها است (4). اگرچه فاکتورهای متعددی ممکن است در بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری دخیل باشند، اما ظاهرا عامل اصلی در بیماری‌زایی این باسیل، سیتوتوکسین مرتبط با ژن A (CagA: Cytotoxin associated gene A) است. این ژن در یک لوکوس 40 کیلو بازی به نام جزیره بیماری زایی Cag (Cag PAI: Cag Pathogenicity Island) قرار دارد (5).

پروتئین CagA از قدرت ایمنی‌زایی بالایی برخوردار است و منجر به تخریب سلول‌های اپی تلیال معده می‌شود و به وسیله تداخل با سیستم‌های پیام رسانی سلول، باعث افزایش بیماری‌زایی باکتری و کلونیزاسیون بیشتر آن می شود. بنابراین حضور ژن CagA یک عامل کلیدی در ایجاد اختلالات گوارشی و شدت بیماری است (6، 7)، به طوری که در مطالعات انجام شده در ایران، 90 درصد از بیماران با سوء هاضمه، 57 درصد مبتلایان به زخم پپتیک و 89 درصد از بیماران با سرطان معده، CagA مثبت بوده اند (8).

درمان‌های موجود در ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری علاوه بر عوارض جانبی، دارای معایبی مانند مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، بروز عفونت مجدد، ریشه کنی ناقص عفونت، عدم تاثیر بر اشکال غیرفعال باکتری، عدم همکاری بیمار به دلیل چند دارویی بودن و هزینه بالا می باشند (9). بنابر این ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری مانند واکسیناسون مفید به نظر می رسد.

در صورت استفاده از اپی توپ‌های اصلی به جای استفاده از کل طول ژن و کوچک شدن قطعه مورد نظر، پاسخ‌های ایمنی اختصاصی‌تری تحریک می‌شود. به دلیل این که تخلیص شکل طبیعی پروتئین از باکتری در مقادیر بالا کاری دشوار و دارای راندمان پائین و پر هزینه است، لذا در این مطالعه سعی شده است تا با تولید شکل نوترکیب آن، به مقادیر بالا از این پروتئین دست یابیم.

بنابراین هدف از این مطالعه، تولید پروتئین نوترکیب حاوی ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک ژن CagA و ارزیابی خواص آنتی ژنیک آن با سرم انسانی و آنتی بادی‌های اختصاصی به دست آمده از تلقیح پروتئین حاصل به موش با هدف طراحی کیت‌های تشخیصی و تولید یک واکسن نوترکیب برای هلیکوباکتر پیلوری در آینده می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی از باکتری *E. coli* سویه‌های *DH5α* و *BL21 (DE3) pLysS* تهیه شده از شرکت اینویتروژن (Invitrogen, USA) و جهت کلونینگ و تولید پروتئین CagA از پلاسمید بیانی(+) pET32a (نواژن، آمریکا) استفاده گردید.

به منظور به دست آوردن هلیکوباکتر پیلوری، توسط پزشک متخصص از بیماران دچار اختلالات ناحیه فوقانی دستگاه گوارش، مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان امیرالمومنین (ع) اراک از ناحیه آنتروم معده بیوپسی به عمل آمد. نمونه بر روی محیط کشت کلمبیا آگار (Columbia agar) در شرایط میکروآئروفیلیک (دی اکسید کربن10 درصد، اکسیژن 5 درصد، نیتروژن 85 درصد) به مدت 3 تا 5 روز در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. هلیکوباکتر پیلوری براساس ریخت‌شناسی کلنی و رنگ آمیزی گرم و واکنش‌های مثبت کاتالاز، اکسیداز و اوره آز تعیین هویت شد. باکتری‌های رشد یافته برای استخراج DNA ژنومی استفاده شدند.

استخراج DNA ژنومی باکتری بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفت (10). باکتری‌ها از سطح پلیت‌ها با کمک سواپ استریل جمع‌آوری شده و با 576 میکرولیتر بافر TE (pH=8) (EDTA 1 میلی‌مولار، Tris-HCl (pH=8)10 میلی مولار) حل گردید و سپس با اثر سدیم دودسیل سولفات 10 درصد (SDS) و آنزیم پروتئیناز K لیز شد. ژنوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl (NaCl 4/1 گرم، CTAB 10 گرم، DDW 100 میلی‌لیتر) استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزاء سلولی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت 1/24/25 و سانتریفوژ (10000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه) حذف گردیدند. DNA به دست آمده با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد و سپس در 30 میکرولیتر بافر TE حل گردید و از آنزیم RNase A به میزان 0/5 میکرولیتر به آن اضافه گردید.

کیفیت و کمیت DNA خالص شده با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز افقی 0/8 درصد در بافر TBE (Tris-base، اسید بوریک، EDTA) و اندازه‌گیری جذب نور در طول موج 260 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید (10).

برای تعیین ناحیه آنتی ژنیک و طراحی پرایمر، توالی ژن CagA با شماره دسترسی ACV92820 که 1182 اسید آمینه دارد، از بانک ژنی NCBI Center for (National Biotechnology Information) تهیه شد. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Emboss Antigenic (11)، ABCpred (12) و Bcepred(13) فاصله نوکلئوتیدهای886 تا 2131 به عنوان ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک در نظر گرفته شد (14) و توسط نرم افزار Oligo5 پرایمرهای مناسب طراحی گردید. یگانه بودن پرایمرها برای قطعه ژنی مورد نظر توسط برنامه Blast تایید شد.

Forward: 5'
TATGGATCCACAATAACGCTC 3'
Reverse: 5'
ATTCTCGAGTTCATCAAAAGATT 3'

پرایمر رفت (Forward) و برگشت (Reverse) به ترتیب دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم‌های محدود کننده BamHI و XhoI می‌باشند.

تکثیر ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) در حجم 50 میکرولیتر و با استفاده از 2 میکرولیتر DNA الگو، 1 میکرولیتر از هر پرایمر (10پیکومول)، 6 میکرولیتر از یون منیزیوم (25 میلی‌مولار)، 1 میکرولیتر از مخلوط هر چهار نوع دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs)، 1 میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمراز Expand (فرمنتاس) و 5 میکرولیتر بافر PCR (10X) انجام شد.

برنامه PCR در سه مرحله انجام شد. مرحله اول شامل حرارت اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم متشکل از 30 چرخه سه قسمتی بود. قسمت اول جهت دناتوره کردن (94 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (50 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (72 درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در حرارت 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و برای یک چرخه انجام شد (10). بررسی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز 0/8 درصد انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ‌آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام شد، سپس تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش (Roche, Germany) بر اساس دستور العمل آن انجام گرفت.

برای کلون‌سازی ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA در پلاسمید pET32a (+) ابتدا محصول PCR با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش یافته، سپس در ناقل مورد نظر که با همان آنزیم‌ها بریده شده بود، وارد شد .عمل اتصال با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در

حرارت 22 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام گرفت.

پلاسمید نوترکیب pET32a-CagA به ترتیب در باکتری‌های *E. coli* سویه *DH5α* به عنوان میزبان اولیه برای تکثیر پلاسمید نوترکیب و سویه *BL21 (DE3) pLysS* برای بیان ژن که به روش کلسیم کلراید (CaCl2) مستعد شده بودند، وارد شد (10). صحت کلونینگ به روش PCR و هضم آنزیمی تایید شد. علاوه بر این، برای تایید صحت ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR، پلاسمید نوترکیب به شرکت ژن فن آوران ارسال شد که سکانس ژن به روش ختم زنجیره (روش Sanger) تعیین گردید.

جهت تولید پروتئین نوترکیب CagA، کلنی‌های *E. coli BL21 (DE3) pLysS* حامل پلاسمیدهای pET32a-CagA در محیط نوترینت براث حاوی آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (آمپی سیلین 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کلرامفنیکل (کلرامفنیکل 35 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد بر روی انکوباتور شیکردار با 180 دور در دقیقه به مدت 18 ساعت کشت داده شد. در ارلن‌های حاوی محیط القای 50 میلی‌لیتری، 14 میکرولیتر آمپی سیلین و 14 میکرولیتر کلرامفنیکل اضافه گردید، سپس500 میکرولیتر از کشت فوق به محیط‌ها تلقیح نمودیم. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد با 220 دور در دقیقه قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (Optical Density=0/6)، توسط افزودن 50 میکرولیتر IPTG یک میلی‌مولار (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) القا صورت گرفت. چهار ساعت پس از افزودن IPTG، رسوب باکتری‌ها با سانتریفوژ در 8000 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه جمع آوری شد.

برای بررسی نتیجه القا از روش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل 12درصد (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) استفاده گردید (10).

به علت وجود دنباله هیستیدینی (6His.tag) در انتهای آمینی پروتئین بیان شده که توسط پلاسمید بیانی pET-32a اضافه شده است، تخلیص آن توسط رزین نیکل (Ni-NTA agarose resin) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (کیاژن، آمریکا) صورت گرفت. برای این منظور ابتدا تخریب سلول *E. coli* با استفاده از بافر A با pH=8 (100 میلی‌مولار $NaH_2PO_4$ ، 10 میلی‌مولار Tris-HCl، 8 مولار Urea) صورت گرفت. در مرحله بعد به ازاء هر 4 میلی‌لیتر محلول رویی، 1 میلی‌لیتر رزین Ni-NTA آگارز اضافه شد، سپس شست و شوی رزین با 3 میلی‌لیتر بافر B (همان محتویات بافر A اما با pH=6.3) انجام گرفت. سپس شستشوی پروتئین با 1-0/5 میلی‌لیتر از بافر C (همان محتویات بافر A اما با pH=5.9) صورت گرفت. برای جداسازی نهایی پروتئین، 2 میلی‌لیتر بافر D (همان محتویات بافر A اما با pH=4.5) استفاده شد. محلول رویی حاصل حاوی پروتئین نوترکیب CagA بود. سپس پروتئین نوترکیب با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS 1X) دیالیز گردید. برای اطمینان از صحت تخلیص، محلول‌های رویی به دست آمده از شست و شو با بافرهای C و D، در لودینگ بافر حل و به مدت 5 دقیقه جوشانده شد و با استفاده از SDS-PAGE ارزیابی شد. غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. برای تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده، ابتدا با استفاده از PBS جذب دستگاه صفر شد و کالیبره گشت، سپس 100 میکرولیتر از پروتئین تخلیص و دیالیز شده در داخل کووت دستگاه ریخته شد و یک بار در طول موج 260 نانومتر و یک بار نیز در طول موج 280 نانومتر جذب دستگاه خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر غلظت نهایی پروتئین به دست آمد:

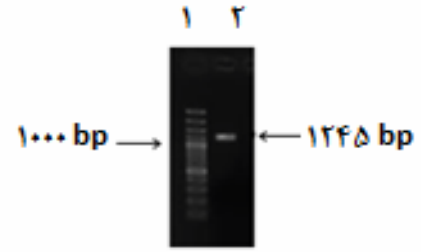
مقدار پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر : $(1.55 \times OD280) - (0.76 \times OD260)$

برای بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب از روش لکه‌گذاری وسترن (Western blotting) استفاده شد (10). روش وسترن بلاتینگ بدین شکل انجام شد که پس از الکتروفورز پروتئین‌های تخلیص شده با SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به دست آمده به غشاء پلی وینیلیدن دی فلوراید (PVDF) منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری30 گرم Tris-base، 14/3 گرم گلایسین و 200 میلی‌لیتر متانول و آب مقطر تا رسیدن حجم این مواد به یک لیتر، به مدت سه ساعت و در ولتاژ 90 ولت انجام گرفت. سپس مرحله مسدود سازی غشاء PVDF با قرار دادن آن در بافر بلوکه کننده به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، غشاءPVDF به مدت 1/5 ساعت در مجاورت آنتی بادی اول (سرم افراد هلیکوباکتر پیلوری مثبت که با بافر شستشو تا غلظت 1:100 رقیق شده بود و سرم افراد هلیکوباکتر پیلوری منفی به عنوان کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون با نمونه‌های سرم، غشاء PVDF سه مرتبه و هر بار به مدت 10 دقیقه با بافر TBS-T (15 میلی‌مولار NaCl، 10میلی‌مولار Tris-HCl (pH=7.4)، 0/1 درصد Tween 20) شست و شو داده شد، سپس به مدت 1/5 ساعت با آنتی بادی دوم (آنتی بادی ضد lgG انسانی کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز) با رقت 1:1000، انکوبه گردید. در نهایت پس از شست و شوی نمونه‌ها با بافرTBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در غشاء PVDF، غشاء مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین(DAB) قرار گرفت.

سپس پروتئین CagA نوترکیب به موش سوری تزریق گردیده و با آنتی بادی‌های حاصل از آن وسترن بلاتینگ انجام شد. برای این منظور از 2 گروه 5 تایی موش نر نژاد BALB/C استفاده شد. گروه اول کنترل منفی بودند که تزریقی روی آنها انجام نگرفت. به گروه دوم CagA نوترکیب تخلیص شده تزریق شد. برای تزریق، 175 میکرولیتر از پروتئین نوترکیب (با غلظت 1/5 میکروگرم بر میکرولیتر) با 325 میکرولیتر PBS و 500 میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (سیگما، آمریکا) مخلوط شد و به هر موش 200 میکرولیتر به شکل زیر جلدی از مخلوط فوق تزریق گردید. بعد از 7 روز، تزریق دوم با همان غلظت همراه با ادجوانت ناقص فروند انجام گرفت. تزریق سوم به همین ترتیب بعد از گذشت 14 روز از تزریق دوم همراه با ادجوانت ناقص فروند انجام شد. دو هفته بعد از سومین تزریق از قلب موش‌ها خون‌گیری و پلاسمای آنها جدا شد. سرم موش‌های تلقیح شده با CagA نوترکیب با رقت 1:100 به عنوان آنتی بادی اول و آنتی بادی ضد IgG موش متصل به آنزیم پراکسیداز (ABcam, UK) با رقت 1:2500 به عنوان آنتی بادی دوم در وسترن بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفتند. سرم موش‌های گروه کنترل نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

## یافته‌ها

غلظت DNA ژنومی به دست آمده از کلنی‌های رشد یافته هلیکوباکتر پیلوری 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد. این DNA به عنوان الگویی برای تکثیر ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA استفاده گردید. هر سه برنامه بیوانفورماتیکی نتایج یکدیگر را در تعیین بخش آنتی ژنیک تایید نمودند. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر، 1245 جفت باز بود (شکل 1). نتیجه مقایسه انجام شده بین ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pET32a کلون گردیده بود، با ترادف ارائه شده برای ژن CagA که در NCBI GenBank ثبت شده است، یکسان است و همولوژی 100 درصد دارد.

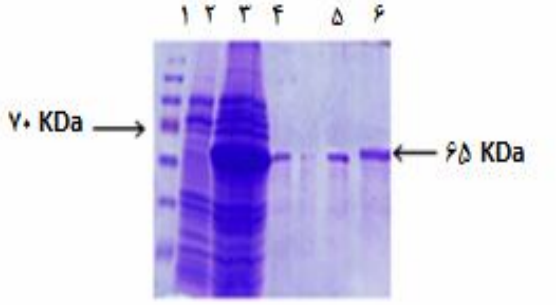



شکل 1: تکثیر ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA توسطPCR

ستون1: مارکر DNA (#SM0321, Fermentas)

ستون 2: محصول PCR

پروتئین نوترکیب پس از 4 ساعت از القا با IPTGتولید گردید. تولید پروتئین مورد نظر با وزن 65 کیلو دالتون با انجام SDS-PAGE تایید شد (شکل2). به دلیل قرار گرفتن دنباله هیستیدینی (6His.tag) در انتهای آمینی پروتئین حاصل، خالص سازی آن با استفاده از کیت Ni-NTA انجام گرفت و سپس محصول پروتئینی دیالیز شد. در این مطالعه از اوره 8 مولار استفاده شد که حتی بدون استفاده از سونیکاتور به خوبی پروتئین نوترکیب تخلیص شد (شکل2). نیتریلو تری استیک اسید (NTA) دارای 2 جایگاه آزاد برای میان کنش با 6His.tag می‌باشد. NTA به یون‌های فلزی مانند $Ni^{2+}$ (نیکل) با پایداری بالایی متصل شده و شرایط سخت شست و شو نیز موجب جدا شدن یون‌ها از آن نمی‌گردد. سپس غلظت پروتئین سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در محلول برابر با 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.




شکل 2: القا و تخلیص پروتئین نوترکیب حاوی ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA هلیکوباکتر پیلوری

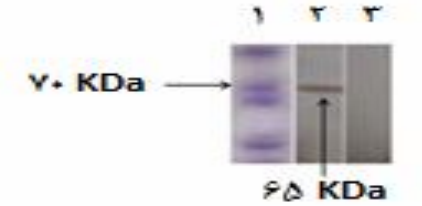
ستون1: مارکر پروتئین(#SM0661, Fermentas)

ستون2: نمونه قبل از القا

ستون3: نمونه 4 ساعت بعد از القا

ستون 4، 5 و 6: نمونه تخلیص شده

به منظور بررسی واکنش‌دهی پروتئین نوترکیب خالص شده با سرم افراد آلوده و سرم موش‌های ایمن شده، روش لکه‌گذاری وسترن انجام گرفت. ظهور باندهای ناشی از واکنش پروتئین نوترکیب حاصل با آنتی بادی‌های انسانی و موشی مورد استفاده در محل مورد نظر، نشان داد که پروتئین نوترکیب مورد بررسی، خاصیت آنتی ژنیک و ایمنوژنیک دارد. در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی بادی با پروتئین نوترکیب در سرم‌های نرمال انسان و موش(کنترل منفی) دیده نشد (شکل 3).




شکل3: وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب CagA هلیکوباکتر پیلوری با سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین نوترکیب تخلیص شده

ستون1: مارکر پروتئین (#SM0661, Fermentas)

ستون 2: وسترن بلاتینگ موش تلقیح شده با پروتئین نوترکیب CagA

ستون3: موش کنترل منفی

## بحث

در این مطالعه پروتئین نوترکیب حاوی ناحیه آنتی ژنیک ژن CagA با وزن مولکولی 65 کیلو دالتون در باکتری *E. coli* سویه *BL21 (DE3) pLysS* تولید شد.

استفاده از پروتئین کامل حاوی کل طول ژن به دلیل دارا بودن اپی توپ‌هایی که ضروری نیستند، باعث افزایش وزن مولکولی پروتئین حاصل می‌شود که کلون، بیان و تخلیص آن را مشکل می‌سازد و مقدار تولید پروتئین نوترکیب کاهش می‌یابد. بنابراین استفاده از پروتئین به شکل کامل، کاربردهای بعدی و ساخت واکسن را محدود می‌نماید. لذا در این تحقیق، ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک ژن CagA هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیکی تعیین گشت و کلون گردید.

Liu و همکاران در مطالعه خود به منظور طراحی واکسن، سه ژن VacA، CagAو UreB را به عنوان آنتی ژن‌های کاندید در نظر گرفتند (15). به منظور تسهیل در بیان آنتی ژن‌ها، قطعه‌ای از هر آنتی ژن (VacA: اسید آمینه

744-805، CagA: اسید آمینه 389-230و UreB: اسید آمینه 387-250) برای ساخت پروتئین فیوژن انتخاب شد و از پلاسمید زنده ضعیف شده *Salmonella typhimurium* برای بیان پروتئین فیوژن (ترتیب قرارگیری: CVU) استفاده گردید. نتایج نشان داد که واکسن مورد نظر به طور قابل توجهی کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در موش‌های آلوده به عفونت را کاهش می‌دهد.

ژن CagA در ناحیه I از جزیره بیماری‌زایی Cag (Cag PAI) قرار دارد و بزرگ‌ترین قطعه ژنی آن می‌باشد. این جزیره دارای 31 ژن است که 6 ژن آن، سیستم ترشحی نوع چهار را رمزدهی می‌کنند که پروتئین CagA را پس از ورود به سلول میزبان ترشح می‌کنند (16، 17). CagA یک پروتئین 120 تا 140 کیلو دالتونی می‌باشد که وجود این ژن در باکتری موجب تولید سایتوکاین‌هایی مانند عامل نکروز تومور (TNF) و اینترلوکین های 1، 6 و 8 توسط سلول‌های اپی تلیال می‌شود. اینترلوکین 8 موجب جذب نوتروفیل‌ها می‌شود. رهایی پروتئازها و ملکول‌های فعال اکسیژن توسط نوتروفیل‌ها موجب التهاب معده و زخم معده می‌گردد(18، 19). به همین دلیل به نظر می‌رسد که عفونت با سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری CagA مثبت با زخم معده و دوازده و سرطان معده همراهی داشته باشد (6، 20).

در این مطالعه برای بیان پروتئین از ناقل بیان کننده pET32a (+) که دارای منشاء همانندسازی F1 و پروموتر قوی T7 که تحت کنترل اپراتور Lac می‌باشد، استفاده شد. این ناقل سیستم رونویسی مستقل از سلول میزبان دارد و دارای پروتئین‌های الحاقی (ترادف ویژه مربوط به 6 اسید آمینه هیستیدین (6His.tag) در ناحیه ´5 مکان کلونینگ ژن که به انتهای آمینی پروتئین اضافه می‌شود و توالی پپتیدی اتصالی 109 اسید آمینه‌ای پروتئین thioredoxin (Trx.tag) که در بالا دست 6His.tag قرار دارد و به پروتئین نوترکیب اضافه می‌شود. علاوه بر این بعد از 6His.tag ابتدایی ناحیه S.Tag وجود دارد) می‌باشد که این امر نه تنها فعالیت بیولوژیکی پرونئین نوترکیب را از بین نمی‌برد، بلکه باعث پایداری پروتئین در سلول شده و آن را از تخریب داخل سلولی حفظ می‌کند و به تخلیص پروتئین نوترکیب کمک می‌نماید (21). طبق محاسبات، وزن پروتئین نوترکیب تولید شده 45 کیلو دالتون می‌باشد که به دلیل اضافه شدن پروتئین‌های الحاقی، وزن آن روی ژل 65 کیلو دالتون مشاهده می‌شود.

سویه *BL21* استفاده شده در این تحقیق، فاقد پروتئازهای سیتوپلاسمی بوده، بنابر این تخریب پروتئین نوترکیب در آن صورت نمی‌گیرد.

در مورد باکتری‌های نسبتاً کند رشد و پر نیاز نظیر هلیکوباکتر پیلوری، تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی بسیار مقرون به صرفه است. زیرا پروتئین های نوترکیب در اکثر موارد خواص ساختاری پروتئین طبیعی را دارند. علاوه بر این، خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب نسبت به پروتئین طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود (22).

در این مطالعه، قطعه‌ای از ژن CagA (1245جفت باز) که حاوی تعدادی از اپی توپ‌های مهم است، تولید و بررسی شد و در لکه‌گذاری وسترن، پروتئین نوترکیب حاصل با سرم افراد آلوده به عفونت فعال هلیکوباکترپیلوری و سرم موش‌های تلقیح شده با CagA نوترکیب واکنش نشان داد. این پروتئین باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی و اختصاصی هومورال و سلولی در موش می‌شود، پس به نظر می رسد از قدرت آنتی ژنیسیته و ایمنوژنیسیته مناسبی برخوردار بوده و دارای اپی توپ‌های مشابه با فرم طبیعی است و می‌توان از آن در طراحی DNA واکسن و کیت‌های تشخیصی استفاده کرد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه به منظور کوچک کردن اندازه پروتئین نوترکیب و افزایش پاسخ‌های ایمنی اختصاصی، به جای استفاده از کل توالی ژن CagA، ناحیه دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک تعیین و سپس کلون و بیان گردید. بر

طبق نتایج، پروتئین نوترکیب CagA با واسطه حضور پلاسمید بیانی pET32a توانست با مقدار بالایی بیان شده (غلظت 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در سلول *E. coli* پایدار بماند. بنابر این می‌توان از آن در طراحی DNA واکسن و کیت‌های تشخیصی استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش منتج از پایان نامه دانشجویی سرکار خانم وحیده فرجادی با عنوان (بررسی آنتی ژنیسیته نواحی آنتی ژنیک پروتئین نوترکیب CagA هلیکوباکتر پیلوری) می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری کرده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

## منابع

1. Dawsey SM, Mark SD, Taylor PR, Limburg PJ. Gastric cancer and H pylori. Gut. 2002;51(3):457-8.
2. Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. ASM News. 1995;61:21-6.
3. Forman D. Helicobacter pylori and gastric cancer. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 1996;31(S215):48-51.
4. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. International journal of cancer Journal international du cancer. 1993;55(6):891-903.
5. Kikuchi S, Crabtree JE, Forman D, Kurosawa M. Association between infections with CagA-positive or –negative strains of Helicobacter pylori and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma Among Young Adults. The American journal of gastroenterology. 1999;94(12):3455-9.
6. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer research. 1995;55(10):2111-5.
7. Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the Helicobacter pylori vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? Gut. 1999;45(4):499-502.
8. Talebkhan Y, Mohammadi M, Mohagheghi MA, Vaziri HR, Eshagh Hosseini M, Mohajerani N, et al. cagA gene and protein status among Iranian Helicobacter pylori strains. Digestive diseases and sciences. 2008;53(4):925-32.
9. Wheeldon TU, Hoang TT, Phung DC, Bjorkman A, Granstrom M, Sorberg M. Long-term follow-up of Helicobacter pylori eradication therapy in Vietnam: reinfection and clinical outcome. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2005;21(8):1047-53.
10. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
11. http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input.
12. http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html.
13. http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html.
14. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS letters. 1990;276(1-2):172-4.
15. Liu KY, Shi Y, Luo P, Yu S, Chen L, Zhao Z, et al. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated Salmonella typhimurium expressing Helicobacter pylori CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. Vaccine. 2011;29(38):6679-85.
16. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori. Molecular microbiology. 1998;28(1):37-53.
17. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in Helicobacter pylori pathogenesis. Cellular microbiology. 2008;10(8):1573-81.
18. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the Helicobacter pylori CagA protein. Nature reviews Cancer. 2004;4(9):688-94.
19. Ali M, Khan AA, Tiwari SK, Ahmed N, Rao LV, Habibullah CM. Association between cag-pathogenicity island in Helicobacter pylori

isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. World journal of gastroenterology : WJG. 2005;11(43):6815-22.
20. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. Gut. 1997;40(3):297-301.
21. McCormick M, Mierendorf R. S.Tag: A Multipurpose Fusion Peptide for Recombinant Proteins. . inNovations 1994;1:4-7.
22. Hajikhani B, Najar Peerayeh S, Soleimanjahi H, Hassan ZM. [Cloning, expression, purification and antigenicity of recombinant UreB332-HpaA fusion protein from Helicobacter pylori]. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2010;13(2):1-10.