

Cloning and Expression Study of the *hcpD* Gene of *Helicobacter pylori*

Eslami E¹, Doosti A*²

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

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

*Corresponding author. Tel: + 989133838830, Fax: +983833361048, E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Received: Oct 22, 2016

Accepted: Feb 18, 2017

ABSTRACT

Background & Objectives: *hcpD* gene in *Helicobacter pylori* is a member of cysteine-rich proteins family which triggers the host's immune system and antibody production. *H. pylori* is found in human's stomach and causes digestive diseases such as duodenal ulcer, chronic gastritis and stomach cancer. The objectives of this study were to isolate, amplify and clone *H. pylori*'s *hcpD* gene in pcDNA3.1 (-) vector and to study its expression in eukaryotic system.

Methods: *H. pylori* genomic DNA was isolated by extraction kit. The *hcpD* gene was amplified using PCR reaction and then purified from gel, followed by pTZ cloning. Subcloning of *hcpD* was performed in pcDNA3.1 (-) eukaryotic expression vector. The accuracy of cloning steps was investigated through PCR, enzymatic digestion by *Bam*HI and *Eco*RV enzymes, and sequencing, respectively. Transfer of expression construct into CHO cells was done by electroporation. The gene expression in these cells was analyzed using RT-PCR and SDS-PAGE.

Results: PCR results showed amplification of a 933bp segment related to *hcpD* gene. Successful cloning of the gene in pTZ vector and construction of pTZ-*hcpD* recombinant vector were achieved. Enzymatic digestion and sequencing confirmed the correctness of subcloning and creation of pcDNA3.1 (-)-*hcpD* construct. *hcpD* was expressed in eukaryotic system, and its protein product was observed on SDS-PAGE gel.

Conclusion: pTZ-*hcpD* construct can be used as a source of *H. pylori*'s *hcpD* gene for future research, like production of recombinant protein and vaccine in different systems. Furthermore, successful expression of the gene using pcDNA3.1 (-)-*hcpD* in CHO animal cells shows the potential of vector as a gene vaccine against *H. pylori*.

Keywords: *hcpD* Gene; *Helicobacter pylori*; Electroporation; Gene Expression.

کلونینگ و بررسی بیان ژن *hcpD* هلیکوباکتر پیلوری

عفت اسلامی^۱، عباس دوستی^{۲*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ فاکس: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۴۸ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: ژن *hcpD* به عنوان یکی از ژن های کد کننده خانواده پروتئین های غنی از سیستمین هلیکوباکتر پیلوری است. این دسته از پروتئین ها سبب تحریک سیستم ایمنی میزبان و تولید آنتی بادی می گردند. هلیکوباکتر پیلوری مستقر در معده انسان سبب بیماری های گوارشی نظیر: زخم دوازدهه، گاستریت مزمن و سرطان معده می شود. هدف از این مطالعه، تکثیر، جداسازی و همسانه سازی ژن *hcpD* هلیکوباکتر پیلوری در وکتور pcDNA3.1(-) و بررسی بیان آن در سیستم یوکاریوتی است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، DNA ژنومی از هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از کیت استخراج DNA تخلیص شد. سپس ژن *hcpD* به روش PCR تکثیر و ژن مورد نظر پس از خالص سازی از روی ژل، در وکتور pTZ کلون گردید. ساب کلونینگ ژن *hcpD* در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(-) انجام شد. صحت مراحل کلون سازی به ترتیب با سه روش PCR، هضم آنزیمی با آنزیم های *EcoRV* و *BamHI* و نهایتاً تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. سازه بیانی ساخته شده توسط منفذزایی الکتریکی به سلول های CHO منتقل شد. بیان ژن در سلول های CHO با تکنیک های RT-PCR و SDS-PAGE آنالیز شد.

یافته ها: نتایج PCR نشان دهنده تکثیر قطعه ۹۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *hcpD* بود. کلون سازی این ژن در وکتور pTZ، با موفقیت انجام شد و پلاسمید نوتر کیب pTZ-*hcpD* بدست آمد. هضم آنزیمی و تعیین توالی، موید درستی ساب کلونینگ ژن و ایجاد سازواره نهایی *hcpD*-pcDNA3.1(-) است. بیان ژن *hcpD* در سیستم یوکاریوتی انجام و محصول پروتئینی این ژن روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد.

نتیجه گیری: سازواره pTZ-*hcpD* به عنوان منبعی از ژن *hcpD* هلیکوباکتر پیلوری برای تحقیقات آینده نظیر تولید پروتئین نوتر کیب و ایجاد واکسن نوتر کیب در سیستم های مختلف می باشد. از طرف دیگر، بیان موفق ژن *hcpD* با کمک وکتور نوتر کیب *hcpD*-pcDNA3.1(-) در سلول های جانوری CHO، نشان دهنده پتانسیل این وکتور به عنوان واکسن نوتر کیب علیه هلیکوباکتر پیلوری می باشد.

واژه های کلیدی: ژن *hcpD*، هلیکوباکتر پیلوری، منفذزایی الکتریکی، بیان ژن

دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰

مقدمه

شکل است که عفونت ناشی از آن گسترش جهانی دارد. این باکتری به صورت بسیار موفق به زندگی در معده انسان ها سازش یافته، به طوری که نیمی از مردم دنیا به این باکتری آلوده گشته اند. این باکتری

عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع ترین عفونت های مزمن باکتریایی در انسان است. هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، ماریچی

عامل اصلی التهاب مزمن معده، زخم‌های معده و دوازدهه، به علاوه یکی از عوامل بروز سرطان معده و لنفوما است [۲،۱]. در حال حاضر اولین خط درمان این باکتری، درمان ۳ دارویی به مدت هفت روز است. به طور معمول برای درمان آن از یک ترکیب ضد اسید از دسته مهارکننده‌های پمپ پروتون مانند امپرازول، لانزوپرازول، پنتوپرازول و یا دسته ممانعت‌کننده‌های H_2 مانند رانیتیدین، سایمتیدین، فوماتیدین و روکساتیدین همراه با یک یا دو آنتی بیوتیک (کلاریترومایسین، آموکسی سیلین و یا میترونیدازول) استفاده می‌شود [۳]. این روش درمانی به دلیل مقاومت سویه‌های شایع *هلیکوباکتر پیلوری* به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها، بروز عفونت مجدد، عدم تأثیر بر شکل‌های غیر فعال و هزینه بالا محدودیت دارد [۴]. بهترین راه جلوگیری از عفونت‌ها، واکسیناسیون است. تا کنون تحقیقات زیادی در زمینه دستیابی به واکسنی موثر علیه *هلیکوباکتر پیلوری* انجام شده است. نمونه ای از واکسن‌ها که در این راستا مورد مطالعه قرار گرفته اند، شامل کل سلول (کشته شده یا ضعیف شده)، واکسن‌های زیر واحدی نوترکیب و واکسن‌های ژنی می‌باشند [۵]. اگرچه تولید پروتئین‌های نوترکیب نسبت به پروتئین‌های طبیعی مقرون به صرفه است و از آنها برای تولید آنتی بادی‌ها و واکسن استفاده می‌شود؛ اما تولید و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب از جمله مراحل پر هزینه، تولید آنتی بادی‌ها می‌باشد [۶]. به همین علت استفاده از واکسن‌های وابسته به DNA می‌تواند سبب کاهش چشمگیری در چنین فرآیندهایی شود [۷]. در سال‌های اخیر، بسیاری از واکسن‌ها مانند واکسن‌های DNA در برابر باکتری‌های بیماری زا ابداع شده اند. واکسن DNA یک نوع واکسن است که با تولید آن به روش مهندسی ژنتیک و تزریق آن به موجود زنده، باعث واکنش‌های ایمنی می‌شود. این واکسن می‌تواند در برابر بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری زا مختلف

مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و تک یاخته ای‌ها و حتی برای سرطان‌ها و بیماری‌ها با منشأ ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند [۸]. در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله DNA باعث ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی می‌شود [۹]. چندین ژن بیماری‌زایی از *هلیکوباکتر پیلوری* که در شدت عفونت نقش دارند، شناسایی شده است. جزیره بیماری‌زایی^۱ یا PAI از مهمترین فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری می‌باشد. همچنین ژن *cagA* در انتهای جزیره بیماری‌زایی *Cag* قرار دارد. آنتی ژنی دیگر از این باکتری، *VacA* است که با آسیب به سلول‌های اپی تلیال دستگاه گوارش میزبان مرتبط است [۱۰]. ژن *HP0160 (hcpD)* متعلق به خانواده *هلیکوباکتر* و پروتئین‌های غنی از سیستئین^۲ یا HCP است که عملکرد آن در محیط داخل بدن موجود زنده هنوز ناشناخته است. اخیرا با تجزیه و تحلیل ساختار بلوری *HP0336* ساختمان پروتئین HCP تصویرسازی شد؛ که باندینگ پنی سیلین فعال در *hcpA*، *hcpB* و همچنین ژن *hcpD* نشان داده شده است [۱۱]. مطالعات نشان داده که پروتئین HCP خاص باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد و از این جهت حائز اهمیت است که می‌توان با سنجش ایمونولوژیکی پروتئین HCP، عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* را تشخیص داد [۱۲]. با بررسی میزان آنتی بادی‌های HCP می‌توان گروه‌های مختلف بیماران مبتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* مثبت را شناسایی و مشخص کرد [۱۳]. با توجه به اینکه محصول ژن *hcpD* قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌باشد، لذا این مطالعه به منظور تکثیر و جداسازی ژن *hcpD* از ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* طراحی شد. همچنین کلون سازی این ژن در وکتور مناسب بیانی و بررسی بیان آن در سلول‌های CHO

¹ Pathogenicity Island

² Cysteine rich proteins

اختصاصی با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند که توالی ژن hcp^3 با شماره ثبت FM991728 از بانک ژن جهانی گرفته شد. پرایمرهای اختصاصی طراحی شده عبارت بودند از:

$hcpD$ -Forward: 5'-AAAGATATCATGAT AAGAATTGGACTAAAAAG-3' $hcpD$ -reverse: 5'-ATTGGATCCTTATTGCGTATCATCTTGCGTGTC-3'

به منظور سهولت کلون سازی و یا خارج ساختن ژن مورد نظر از یک وکتور و کلون سازی مجدد آن در وکتورهای متفاوت دیگر در انتهای ۵-پریم پرایمرهای طراحی شده، سایت برش آنزیمی در نظر گرفته شد؛ به طوری که در ۵-پریم هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت به ترتیب سایت برش آنزیمهای *EcoRV* و *BamHI* در نظر گرفته شد. در توالی پرایمرها، نواحی که زیر آنها خط کشیده است، جایگاه برش هستند. تکثیر به روش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۰/۵ ماکرولیتر dNTP^۴ با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار، ۰/۷۵ ماکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار، ۰/۳ میکروگرم DNA الگو و ۱ واحد از آنزیم DNA پلی-مراز Taq^۵ در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصول PCR حاصله در ژل آگارز ۱/۵ درصد افقی آنالیز شد و ژن مورد نظر با استفاده از کیت، از روی ژل خالص سازی شد. به منظور ساخت سازه T/A^۶، از کیت همسانه سازی استفاده شد؛ که ژن *hcpD* مطابق دستورالعمل کیت، در حامل pTZ درج گردید. پلاسمید نوترکیب ساخته شده به داخل سلولهای مستعد *E. coli* Top10 ترانسفورم شد و بر روی محیط کشت LB-Agar^۷ حاوی آمپی سیلین (۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت داده شد. تایید کلونینگ ژن مورد

(تخمندان هامستر چینی)، به منظور تولید واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری انجام شد.

روش کار

مواد، ناقلین ژن و سلولهای پروکاریوتی و یوکاریوتی
در این مطالعه تجربی، حامل (-)pcDNA3.1 از شرکت Invitrogen آمریکا تهیه شد و باکتری هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد (ATCC(43504 از بخش میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران و باکتری اشرشیاکلای سویه TOP10F از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه شدند. آگارز از شرکت سیناژن ایران خریداری گردید. آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و نئوماپسین از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. کیت استخراج DNA ژنومی، از شرکت سیناژن و کیت تخلیص DNA از ژل و کیت استخراج پلاسمید از شرکت BioNeer کره جنوبی خریداری شدند. T/A Cloning Kit از شرکت ترموفیشر آمریکا خریداری شد. مواد شیمیایی استفاده شده در ژل SDS-PAGE^۱ از شرکت Sigma-Aldrich و محیط کشت LB-Broth و LB-Agar از شرکت Merck آلمان خریداری شدند.

استخراج DNA ژنومی از باکتری هلیکوباکتر پیلوری

با توجه به اینکه ژن مورد نظر *hcpD* خاص باکتری هلیکوباکتر پیلوری است؛ بنابراین برای دسترسی به ژن مورد نظر نیاز به استخراج DNA ژنومی این باکتری می‌باشد که با استفاده از کیت استخراج DNA، انجام شد. محصول استخراج در ژل آگارز ۱/۵ درصد افقی آنالیز شد.

ساخت سازه ژنی T/A

ژن مورد نظر توسط تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرز یا PCR^۲ جداسازی و تکثیر شد. جفت پرایمرهای

³ *Helicobacter* Cysteine-Rich Protein

⁴ Deoxynucleotide Triphosphate

⁵ Taq DNA Polymerase

⁶ Timin/Adenin

⁷ Luria Bertani Agar

¹ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

² Polymerase Chain Reaction

شد. هدف از این کار حذف DMSO^۲ از روی سلول‌ها می‌باشد. سپس مقدار ۲ میلی لیتر محیط تازه حاوی ۱۰ درصد FBS^۴ به رسوب سلول‌ها اضافه شد و به آرامی با پیپتاژ، سلول‌ها به صورت سوسپانسیون در آمدند. سپس سلول‌ها در فلاسک کشت به همراه محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS و با افزودن ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر از پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂، انکوبه و پاساژ داده شدند.

ترانسفکشن سازه بیانی *hcpD* به سلول جانوری

CHO

برای انتقال سازه بیانی *hcpD* به سلول CHO هامستر چینی، ابتدا استخراج پلاسمید نوتر کیب از سلول‌های مستعد *E. coli*، طبق دستور العمل کیت استخراج پلاسمید، انجام شد. غلظت سلول‌های CHO برای ترانسفکشن 2×10^6 cells/ml بود؛ که ۴۰۰ ماکرولیتر از سلول‌های CHO آماده شده با ۵۰ ماکرولیتر از محلول DNA سازه بیانی (*hcpD*-pcDNA3.1(-))، در شرایط استریل (زیر هود) مخلوط گردید و پس از انتقال به کووت ۴/۰ مخصوص منفذ زایی الکتریکی به مدت ۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. منفذزایی الکتریکی در دستگاه Gene pulser Xcell ساخت شرکت BioRad با پارامترهای ولتاژ ۰/۱۷۴ کیلو ولت، مقاومت ۴۰۰ μ F و دو پالس انجام شد. سلول‌های الکتروپوریت شده در فلاسک کشت حاوی محیط RPMI به همراه ۱۰ درصد FBS و حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و برای بازیافت سلول‌ها و بیان ژن‌های کلون شده به مدت ۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂، انکوبه شدند. سپس به هر یک از فلاسک‌های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آنتی بیوتیک نئومایسین (مارکر انتخابی برای

نظر توسط آنالیز برش با آنزیم‌های محدودالتر *BamHI* و *EcoRV* انجام شد.

ساب کلونینگ (ساخت سازه بیانی برای ژن *hcpD*)

برای انتقال ژن *hcpD* به وکتور بیانی (-)pcDNA3.1، ابتدا وکتور مورد نظر توسط آنزیم‌های محدودالتر *BamHI* و *EcoRV* بریده شد. برش و جداسازی ژن *hcpD* از وکتور PTZ نیز توسط همین آنزیم‌های محدودالتر انجام شد. محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز، الکتروفورز شد و قطعه ژل حاوی ژن *hcpD* با استفاده از کیت شرکت BioNeer تخلیص گردید. واکنش اتصال بین ژن *hcpD* و وکتور (-)pcDNA3.1 با استفاده از آنزیم T4-لیگاز انجام شد. تایید درستی کلون سازی، با روش‌های هضم آنزیمی و تعیین توالی و وکتور نوتر کیب، بررسی شد.

کشت سلول CHO

در این تحقیق، برای بررسی بیان ژن *hcpD* در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی^۱ استفاده شد. سلول‌های CHO در نیتروژن مایع نگهداری می‌شوند و سپس در زمان مورد نظر مجدداً ذوب می‌شوند و مورد استفاده قرار می‌گیرند. کرایووایال حاوی CHO، از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در تانک کوچک مخصوص حمل ازت مایع تحویل گرفته شد. برای دفریز کردن سلول‌های CHO، کرایووایال حاوی سلول‌های CHO از تانک ازت خارج و در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا به صورت محلول در آید. در یک فالكون ۱۵ میلی لیتری استریل، مقدار ۵ میلی لیتر محیط کشت سلول RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS ریخته شد. سپس کرایووایال به زیر هود منتقل و سوسپانسیون سلولی به صورت قطره قطره به درون فالكون اضافه گردید. فالكون حاوی سلول‌ها با ۳۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته

² Dimethyl Sulfoxide

³ Roswell Park Memorial Institute Medium

⁴ Fetal Bovine Serum

¹ Chinese Hamster Ovary

لیتر ازت درون یک بشر افزوده گردید، سپس میکروتیوپ حاوی نمونه ۳ تا ۴ بار درون ازت برده شد (مرحله فریز) و به صورت متناوب در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد (مرحله ذوب شدن) قرار داده شد، در این مرحله انتظار می‌رود سلول‌ها کاملاً متلاشی شده باشند. درون میکروتیوپ دیگری مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره سلولی به دست آمده با ۳۰ میکرولیتر محلول لودینگ مخلوط شد. درب میکروتیوپ با پارافیلیم بسته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوشانده شد. نمونه (عصاره سلولی)، آماده الکتروفورز است.

آنالیز بیان پروتئین نوترکیب

بیان ژن در سلول‌های CHO توسط تکنیک SDS-PAGE آنالیز گردید. SDS-PAGE در ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد انجام شد و نمونه‌ها به روش رنگ آمیزی کوماسی بلو، رنگ آمیزی شدند. بعد از یک ساعت قرار گرفتن ژل در محلول رنگ، رنگ بری توسط محلول رنگ بر (متانول، اسید استیک و آب مقطر)، تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت.

یافته‌ها

استخراج DNA از باکتری هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت انجام شد. الکتروفورز DNA ی تخلیص شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، نشان دهنده کیفیت مناسب DNA برای انجام PCR بود. همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، این DNA فاقد هرگونه شکستگی و خورد شدگی به صورت اسمیر^۲ است. انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *hcpD*، سبب تشکیل قطعه ۹۳۳ جفت بازی شد که مربوط به این ژن می‌باشد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند که نتایج حاصل از PCR برای ژن *hcpD*، در شکل ۲ آمده است.

سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط ۵ درصد CO₂ انکوبه گردیدند. لازم به ذکر است از سلول‌های CHO بدون اضافه کردن محلول DNA به عنوان کنترل منفی در ترانسفکشن استفاده شد.

بررسی بیان ژن *hcpD* در سلول‌های CHO به روش RT-PCR

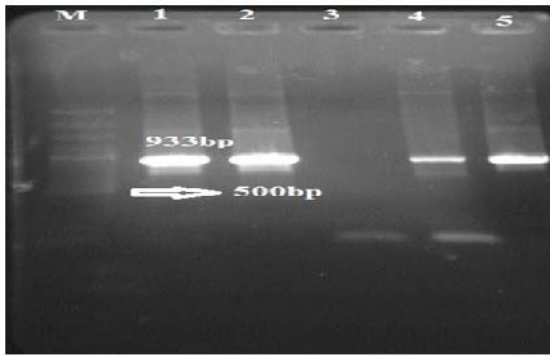
با هدف ارزیابی بیان اختصاصی ژن *hcpD* در سلول‌های CHO ترانسفرم شده، آزمایش RT-PCR انجام شد. از سلول‌های CHO ریز منفذ زایی شده با پلاسמיד نوترکیب *hcpD(-)-pCDNA3.1* و سلول‌های گروه کنترل (بدون پلاسמיד) با استفاده از کیت (Qiagen, USA)، تخلیص RNA صورت پذیرفت. کیفیت و غلظت RNAهای تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه cDNA^۱ از کیت شرکت ترمو ساخت آمریکا استفاده شد. واکنش PCR روی cDNAهای بدست آمده، با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن *hcpD* انجام شد.

آماده سازی نمونه‌ها جهت الکتروفورز در ژل SDS-PAGE

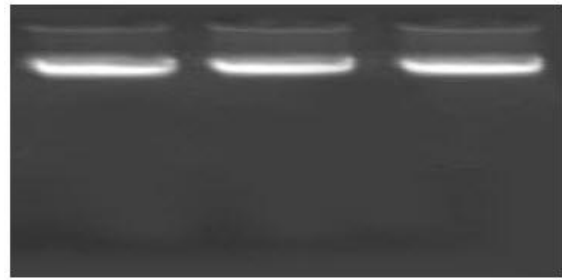
در این مرحله از عصاره سلولی که حاوی پروتئین بیان شده است، جهت الکتروفورز در ژل استفاده شد؛ به این ترتیب که ابتدا سلول‌های CHO ترانسفورم شده و سلول‌های گروه شاهد (فاقد وکتور نوترکیب) به کمک پیتاژ به صورت سوسپانسیون سلول در آورده شدند و هر کدام به صورت جداگانه به فالكون‌های استریل ۱۵ میلی لیتری منتقل و در ۳۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی دور ریخته شد، به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه شد تا هموژن گردد و سوسپانسیون سلولی حاصل به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل و درب تیوپ‌ها با پارافیلیم محکم بسته شد. مقدار ۳۰۰ میلی

² Smear

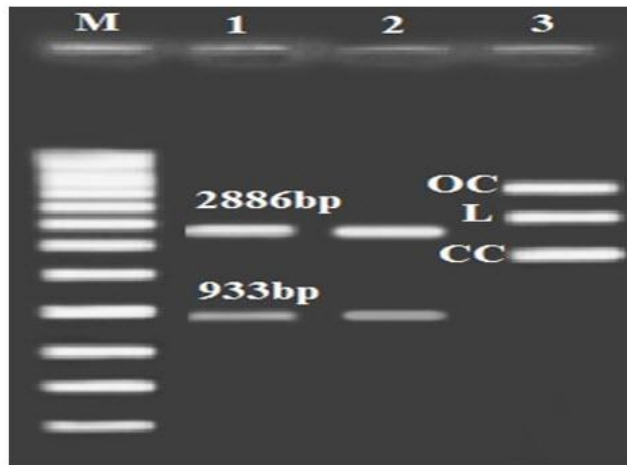
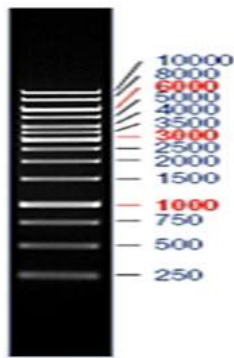
¹ Complementary DNA



شکل ۲. نتیجه الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن *hcpD* به روش PCR
 M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز، شماره‌های ۱، ۲، ۴ و ۵: نشان دهنده باند ۹۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *hcpD* شماره ۳: کنترل منفی (نمونه فاقد DNA).



شکل ۱. تصویر الکتروفورز DNA ی ژومی تخلیص شده از هلیکوباکتر پیلوری

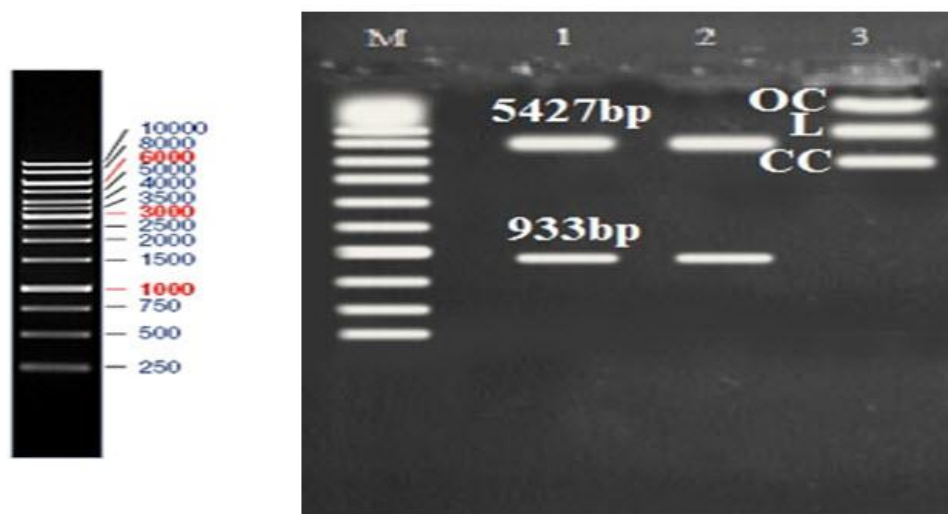


شکل ۳. تصویر الگوی برش پلاسمید نوترکیب pTZ-*hcpD* توسط آنزیم‌های محدودالایر *BamHI* و *EcoRV*
 M: مارکر 1Kb شرکت اینویترژن، شماره‌های ۱ و ۲: باند کوچکتر با اندازه ۹۳۳ جفت باز و باند بزرگتر به اندازه ۲۸۸۶ جفت باز به ترتیب مربوط به ژن *hcpD* و وکتور pTZ، شماره ۳: وکتور نوترکیب pTZ-*hcpD* بریده نشده (Un Cut).

بود، توسط استراتژی برش با آنزیم‌های محدودالایر از پلاسمید نوترکیب pTZ-*hcpD* خارج و به پلاسمید بیانی یوکاریوتی (-)pcDNA3.1 منتقل شد. تایید صحت ساب کلونینگ به روش هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد. شکل ۴ تایید ساب کلونینگ ژن مورد نظر را در وکتور بیانی (-)pcDNA3.1 نشان می‌دهد. نتیجه این برش آنزیمی، سبب تشکیل دو قطعه ۵۴۲۷ و ۹۳۳ جفت بازی می‌شود که به ترتیب مربوط به وکتور بیانی (-)pcDNA3.1 و ژن *hcpD* است.

شکل ۳ نشان‌دهنده صحت کلون سازی ژن هدف در وکتور pTZ می‌باشد به طوری که برش آنزیمی وکتور نوترکیب pTZ-*hcpD* با آنزیم‌های محدودالایر *BamHI* و *EcoRV*، سبب تشکیل دو قطعه ۲۸۸۶ و ۹۳۳ جفت بازی به ترتیب مربوط به ژن و وکتور شده است. این نتایج با الگوی قطعات پیش‌بینی شده مطابقت داشت.

بعد از تایید صحت کلونینگ، مرحله ساب کلونینگ انجام شد؛ که محصول PCR مربوط به ژن *hcpD* که در مرحله قبل در وکتور pTZ کلون گردیده

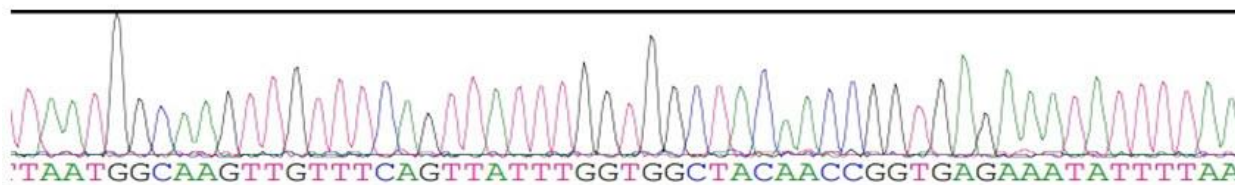


شکل ۴. هضم آنزیمی سازواره نهایی *pCDNA3.1(-)hcpD* توسط آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRV*

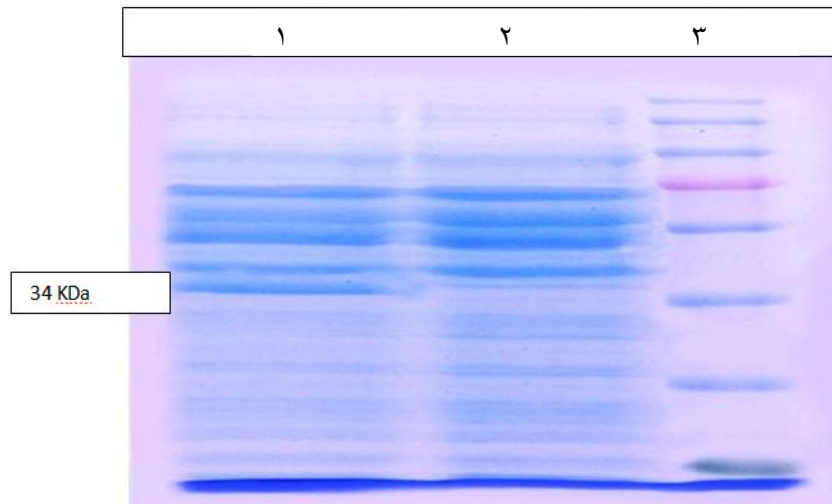
M: مارکر 1Kb شرکت اینویترورژن، شماره‌های ۱ و ۲: دارای دو باند ۵۴۲۷ و ۹۳۳ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور و ژن *hcpD*. شماره ۳: وکتور نوترکیب *pCDNA3.1(-)hcpD* بریده نشده (Un Cut).

بود. به طوری که پس از انجام PCR روی cDNAهای بدست آمده از واکنش رونوشت برداری معکوس برای سلول‌های دریافت کننده وکتور نوترکیب، باند ۹۳۳ جفت بازی مربوط به ژن *hcpD* تشکیل شد. اما همین آزمایش برای سلول‌های فاقد وکتور نوترکیب، منفی بود. نتایج این آزمایش موید بیان موفق ژن *hcpD* در سلول‌های CHO می‌باشد. همچنین نتایج SDS-PAGE باندی با وزن مولکولی ۳۴ کیلودالتون را نشان داد که بیانگر بیان پروتئین نوترکیب حاصل از ژن *hcpD* است.

نتیجه تعیین توالی موید صحت کلونینگ ژن کلون شده در وکتور *pCDNA3* می‌باشد. بخشی از دندروگرام حاصل از تعیین توالی، در شکل ۵ آورده شده است. بعد از تایید وکتور نهایی *pCDNA3.1(-)hcpD* و انتقال آن به سلول‌های CHO به روش ریز منفذ زایی، بیان ژن هدف با دو روش RT-PCR و الکتروفورز روی ژل SDS-PSGE بررسی شد. نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید بیان ژن *hcpD* در سلول‌های جانوری، مثبت



شکل ۵. تصویر بخشی از دندروگرام حاصل از تعیین توالی ژن *hcpD*.



شکل ۶. طرح الکتروفورزی القاء پروتئین نوترکیب تولید شده در سلول CHO. شماره ۱: پروتئین نوترکیب تولید شده، شماره ۲: سلول CHO فاقد سازه ژنی، شماره ۳: مارکر

بحث

در این مطالعه سلول‌های CHO به عنوان میزبان مناسب برای کلونینگ و بیان ژن *hcpD* در نظر گرفته شد و پروتئین نوترکیب تولید گردید. می‌توان از پروتئین نوترکیب به دست آمده ژن *hcpD* در این تحقیق، جهت تشخیص آنتی بادی ضد *hcpD* در افراد مبتلا به عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* و تولید واکسن ژنی استفاده نمود. راههای درمانی که تاکنون برای از بین بردن عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* به کار گرفته شده به دلایل مختلف، نتیجه مطلوبی نداشته‌اند. برای عدم استفاده از رژیم‌های درمانی؛ دلایل متعددی از جمله رویداد مقاومت آنتی بیوتیکی، بروز عفونت مجدد، عدم تاثیر بر اشکال غیرفعال باکتری و هزینه بالای این روش درمانی ذکر شده است [۴] و دلایل عدم استفاده از پروتئین‌های نوترکیب در تولید آنتی بادی‌ها و واکسن به دلیل پرهزینه بودن مراحل تولید و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب [۶] بوده است. از تلاش برای یافتن روش‌های جایگزین به منظور ورود آنتی ژن به داخل بدن، تولید واکسن‌های DNA می‌باشد که از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. واکسن‌های اسید نوکلئیکی به علت سهولت در تولید انبوه پلاسمید نوترکیب در مقایسه با تولید و تخلیص

پروتئین نوترکیب و نیز افزایش مدت ایمنی به علت بیان مداوم و طولانی مدت آنتی ژن، سبب کاهش هزینه فرآیند ایمن سازی و صرفه اقتصادی در تولید آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن خاص می‌شوند [۱۴]. واکسن‌های ژنی روشی جدید جهت ایجاد ایمنی موثر علیه بیماری‌ها می‌باشند. تزریق DNA رمز گذار آنتی ژن‌ها موجب بروز پاسخ ایمنی از نوع هومورال و سلولی می‌شود. واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون تولید ساده تر، خالص تر بودن محصول، ذخیره سازی و نگهداری آسان می‌باشند [۱۵]. در حال حاضر از پلاسمیدهای حامل قطعات DNA خارجی به عنوان ایمونوژن استفاده می‌شود [۱۴]. برای تولید یک واکسن موثر بر *هلیکوباکتر پیلوری* نیاز به آنتی ژنی پایدار، حفاظت شده و قوی ضروری است. در این زمینه بر روی آنتی ژن‌های مختلفی چون BabA, FlaB, FlaA, Urease, CagA, VacA, HpaA, Hsp و ... مطالعاتی صورت گرفته است [۱۶]. پس از شناسایی، ژن مناسب به وکتور مخصوصی کلون شده و سپس مواد ارزیابی در کشت سلولی و حیوانات آزمایشگاهی از نظر تولید آنتی ژن و القاء سیستم ایمنی هومورال و تولید آنتی بادی و ایمنی سلولی می‌شود. ژن *hcpD* یکی دیگر از آنتی ژن‌های

شناخته شده در هلیکوباکتر پیلوری می باشد. مطالعات مختلفی درباره پروتئین HCP انجام شده؛ که در اینجا به برخی از آنها اشاره می کنیم که هدف از انتخاب ژن *hcpD* را بازگو می کند. نتایج مطالعاتی که اغلب روی باکتری هلیکوباکتر پیلوری انجام شده اند همه با هم توافق داشته اند که پروتئین HCP توسط هلیکوباکتر پیلوری در شرایط طبیعی بیان شده و این پروتئین ها توسط سیستم ایمنی بدن میزبان شناخته می شوند. در مطالعه ای که به بررسی میزان آنتی بادی های ضد HCP در بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری، پرداخته شده است، میزان این گونه آنتی بادی ها بسیار بالا گزارش شده است [۱۲]. مطالعاتی از این دست نشان می دهد، ژن *hcpD* می تواند محرک خوبی برای سیستم ایمنی میزبان باشد و برای تحقیقات در زمینه واکسن های نو ترکیب مناسب است. تحقیقات زیادی در راستای یافتن واکسنی موثر علیه هلیکوباکتر پیلوری در دست انجام است. در سال ۲۰۱۳ در طی تحقیقی که در چین صورت پذیرفت، ژن *ureI* هلیکوباکتر پیلوری به عنوان واکسن نو ترکیب علیه هلیکوباکتر پیلوری مورد آزمایش قرار گرفت. این محققان ژن *ureI* را در وکتور pCDNA3 کلون نموده و میزان ایمنی زایی آنرا در موش های C57BL/6 ارزیابی نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد، واکسن مورد بررسی بر پایه یکی از ژن های هلیکوباکتر پیلوری، توانایی ایجاد پاسخ ایمنی قوی علیه باکتری مذکور را داشته است. شباهت کار ما با این تحقیق استفاده از یکی از ژن های کد کننده محصولات آنتی ژنیک هلیکوباکتر و همچنین شباهت وکتور مورد استفاده بوده است [۱۷]. یکی از موفق ترین واکسن هایی که تا کنون علیه هلیکوباکتر پیلوری مورد استفاده قرار گرفته است، در گزارشی که در سال ۲۰۱۵ گزارش شده نمایان است. در این تحقیق، کودکان بین ۶ تا ۱۵ سال با استفاده از واکسن نو ترکیب خوراکی علیه هلیکوباکتر پیلوری واکسینه شدند. نتایج نشان داد که این واکسن

نو ترکیب بسیار موثر عمل کرده و هم اکنون مراحل کار آزمایشی بالینی را طی می کند. این نوع گزارشات، یافتن واکسنی موثر علیه این عامل مهم عفونی را نوید می دهد. موفقیت نسبی این تحقیق نشان می دهد، کاربرد تکنیک های مهندسی ژنتیک و تولید واکسن های مهندسی شده و نو ترکیب راهکار مناسبی برای تولید واکسن هستند [۱۸]. در تحقیق ما نیز ژن *hcpD* به عنوان یکی از آنتی ژن های مهم هلیکوباکتر پیلوری، در وکتور یوکاریوتی مناسبی کلون و بیان گردیده است و از پتانسیل لازم برای استفاده به عنوان واکسن نو ترکیب در حیوانات آزمایشگاهی برخوردار است. محصول ژن *hcp*، نقش های مهم و موثری در هلیکوباکتر پیلوری ایفا می کند. مطالعات مختلفی که در ارتباط با پنی سیلین انجام شده است نشان می دهد که از هر شش پروتئین HCP، چهار تا از آنها قادر به هیدرولیز پنی سیلین و سفالوسپورانیک اسیداز هستند. برخی از انواع پروتئین های HCP مانند HcpA، HcpB و HcpD، به مشتقات پنی سیلین متصل گشته و آنها را هیدرولیز می کنند. اغلب مطالعات روی ژن *hcp* در سطح ژنومی صورت گرفته و جنبه های مختلف فعالیت پروتئین های مختلف HCP، هنوز به خوبی انجام نشده است. در یک مطالعه ایمونوپروتئومیکس، افزایش تیتراژ آنتی بادی HcpC در سرم بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شده و میزان آن قابل توجه بوده است [۱۹]. در مطالعه حاضر که به هدف بررسی بیان ژن *hcpD* در سلول جانوری انجام شد؛ از وکتور بیانی (-) pCDNA3.1 استفاده گردید. نتایج آزمایشات ما تایید کننده بیان موفق ژن هدف در سطح RNA (با توجه به نتایج RT-PCR)، در سلول های تخمدان هامستر چینی بود. نتایج SDS-PAGE نیز پروتئین نو ترکیب با وزن مولکولی ۳۴KDa را در سلول های CHO نشان داد.

نتیجه گیری

در این مطالعه، بیان ژن *hcpD* در سلول‌های CHO با موفقیت انجام شد و پروتئین مذکور با موفقیت القاء و تولید گردید. از آنجا که شرط موفقیت یک ژن کد کننده پروتئین‌های آنتی ژنیک، در کاربرد به صورت واکسن ژنی، مشاهده بیان آن در سلول‌های یوکاریوتی است. لذا می‌توان سازه نوترکیب pcDNA3.1(-)-*hcpD* به دست آمده، در این تحقیق را به عنوان کاندیدای مناسبی برای

بررسی‌های بعدی در مورد واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب سال ۱۳۹۴، به نگارش در آمده است. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از همکاری بی شائبه جناب آقای دکتر حسین انصاری و جناب آقای حمیدرضا کبیری ابراز می‌دارند.

References

- 1- Doosti A, Rahimian GH, Nassiri J, Yavari-Forushani P. Prevalence of the *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens in Shahrekord. *Armaghan Danesh*. 2007 Spring; 12(1):29-38. [Full text in Persian]
- 2- Cover TL. *Helicobacter pylori* Diversity and gastric cancer risk. *MBio*. 2016 Nov-Dec;7(6):e01869-15.
- 3- Kargar M, Ghorbani S, Doosti A, Souod N. Real-time PCR assay using allele-specific TaqMan probe for detection of clarithromycin resistance and its point mutations in *Helicobacter Pylori*. *J Isfahan Med Sch*. 2011 Apr; 29(126):65-73 [Full text in Persian]
- 4- 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*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Aug; 18(3):347-53.
- 5- Yang J, Dai LX, Pan X, Wang H, Li B, Zhu J, et al. Protection against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice by oral administration of multi-epitope vaccine of CTB-UreI-UreB. *Pathog Dis*. 2015 Jul;73(5). pii: ftv026.
- 6- Kaparakis M, Walduck AK, Price JD, Pedersen JS, Van Rooijen N, Pearse MJ, et al. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2008 May; 76(5):2235-9.
- 7- Silva DG, Stevens RH, Macedo JM, Albano RM, Falabella ME, Fischer RG, et al. Presence of *Helicobacter pylori* in supragingival dental plaque of individuals with periodontal disease and upper gastric diseases. *Arch Oral Biol*. 2010 Nov; 55(11): 896-901.
- 8- Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (*stx2*) genes. *Genetika*. 2015 Apr; 47(2): 499-507.
- 9- Donnelly JJ, Ulmer JB. DNA vaccines for viral diseases. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Mar; 32(2): 215-22.
- 10- Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M. Genetic Analysis of *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates and their relationship with gastroduodenal diseases in the west of Iran. *Iran Red Crescent Med J*. 2013 May; 15(5):371-75.
- 11- Mittl PR, Luthy L, Rinhardt C, Joller H. Detection of high titers of antibody against helicobacter cysteine-rich proteins A, B, C, and E in *Helicobacter pylori* infected individuals. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jul; 10(4):542-5.
- 12- Luthy L, Grutter MG, Mittl PR. The crystal structure of *Helicobacter pylori* cysteine-rich protein B reveals a novel fold for a penicillin-binding protein. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):10187-93.
- 13- Ogura M, Perez JC, Mittl PR, Lee HK, Dailide G, Tan S, et al. *Helicobacter pylori* evolution: lineage-specific adaptations in homologs of eukaryotic Sell1-like genes. *PLoS Comput Biol*. 2007 Aug;3(8):e151.

- 14- Hasson SSAA, Al-Busaidi JKZ, Sallam TA. The past, current and future trends in DNA vaccine immunizations. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015 May; 5(5): 344-53.
- 15- Doosti A. Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of *Clostridium botulinum* in *E. coli*. *J Microbial World*. 2013 Jun; 5(3&4): 77-84. [Full text in Persian]
- 16- Yan J, Mao YF, Shao ZX. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World J Gastroenterol*. 2005 Jan; 11(3): 421-5.
- 17- Jie L, Wen Y, Sheng L, Yan Z, Cui Ming Z, Yi Mou W. Immunocompetence of *Helicobacter pylori* ureI DNA vaccine in mice. *Chin J Zoonoses*. 2013 May; 29(9): 895-898.
- 18- Zeng M, Mao XH, Li JX, Tong WD, Wang B, Zhang YJ, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2015 Oct;386(10002):1457-64.
- 19- Krishnamurthy P, Parlow MH, Schneider J, Burroughs S, Wickland C, Vakil NB, et al. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 1999 Aug; 181(16):5107-10.