مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸
صفحات: ۱۴۸-۱۴۳

PCR و RFLP ژن ureC (glmM) به‌منظور تشخیص و تیپ‌بندی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جداشده از نمونه بیوپسی معده بیماران با ناراحتی‌های گوارشی

محمدرضا نفیسی[۱] *PhD*، محمد علیپور شادباد[۲] *MSc*، علی کریمی[۱] *MSc*، قربانعلی رحیمیان[۳] *PhD*، عباسعلی ایمانی فولادی[*] *PhD*

چکیده

اهداف. *هلیکوباکتر پیلوری* یکی از پاتوژن‌های مهم است که سلول‌های اپی‌تلیال معده را آلوده می‌کند. هدف این مطالعه، بررسی و تیپ‌بندی *هلیکوباکتر پیلوری*‌های جداشده از نمونه‌های کلینیکی با استفاده از ژن ureC (glmM) بود.

مواد و روش‌ها. به‌منظور تیپ‌بندی *هلیکوباکتر پیلوری* از روش مولکولی استفاده شد. برای تعیین هتروژنیسیته ژنتیکی ۳۷ نمونه *هلیکوباکتر پیلوری* جداشده از محیط کشت، از روش PCR-RFLP استفاده شد. قطعه ۸۲۰ جفت‌بازی ژن ureC با آنزیم‌های محدودکننده HhaI، MboI هضم شد.

یافته‌ها. ۱۱ الگوی مختلف با هضم ناشی از آنزیم MboI و ۸ الگوی مختلف از هضم با آنزیم HhaI مشخص شد. مدل‌های حاصل از ترکیب الگوهای هضم دو آنزیم، ۲۱ الگوی متفاوت به‌وجود آورد.

نتیجه‌گیری. براساس نتایج این مطالعه، ارتباطی بین بیماری‌ها و الگوها وجود ندارد و تنوع ژنتیکی گسترده‌ای بین قطعات مشاهده می‌شود. این موضوع، نویدبخش ایجاد ابزاری کارآمد برای بررسی مولکولی اپیدمیولوژی و بررسی اجداد و پی بردن به منشا باکتریایی و پراکندگی آن در مناطق مختلف جغرافیایی است.

کلیدواژه‌ها: *هلیکوباکتر پیلوری*، PCR-RFLP، ژن ureC

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۶/۱۴، پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۲۸

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران imanifouladi.a@gmail.com
۱ مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲ مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۳ گروه بیماری‌های داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یکی از پاتوژن‌های موفق است که سلول‌های اپی‌تلیال معده را آلوده می‌کند [۱] و از سوی سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان سرطان‌زای درجه یک طبقه‌بندی شده است. سرطان معده دومین عامل مرگ‌ومیر در بین نئوپلازی‌ها و چهارمین سرطان شایع در دنیاست. هر سال، حدود ۶۵۰هزار مرگ و ۸۸۰هزار ابتلای جدید رخ می‌دهد که ۳/۴ موارد آن در کشورهای جهان سوم است [۲، ۳، ۴]. توالی کامل ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* سویه ۲۶۶۹۵ در سال ۱۹۹۷ توسط انیستیتو TIGR و دو سال بعد، توالی ژنوم سویه J99 منتشر شد [۵]. از فاکتورهای مهم در بیماری‌زایی باکتری، تولید اوره‌آز است و قسمت بزرگی از ژنوم باکتری را تشکیل می‌دهد. ژن‌های ساختمانی ureAB و ژن‌های کمکی ureIEFGH در این ارتباط شناسایی شده‌اند. ناحیه‌ای ۲/۲کیلوبازی در قسمت بالادست ژن ureAB وجود دارد. این منطقه در *هلیکوباکتر پیلوری* حاوی دو قالب باز خواندن (ORF) به نام‌های ureD و ureC است که در تولید اوره‌آز نقشی ندارند. ژن ureC حدود ۱/۳۶کیلوباز طول دارد. در قسمت پایین‌دست ureC، توالی‌های پالیندرومی وجود دارند. بررسی ۶۰ ایزوله *هلیکوباکتر پیلوری* به‌وسیله PCR و بررسی توالی DNA، حضور ژن ureC را در همه آنها نشان داده است. ژن ureC پروتئینی را رمز می‌کند که از لحاظ تکاملی ثابت مانده است. ژن ureC در سال ۱۹۹۷ توسط *گودوین* و همکاران به فسفوگلوکوزآمین‌موتاز (glmM) تغییر نام داد. بین این ژن در باکتری *اشریشیا کلی* و محصول ژن ureC، ۴۳٪ هومولوژی وجود دارد. ژن ureC، فسفوگلوکزآمین‌موتاز را رمز می‌کند [۶]. تنوع زیاد ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* در مقایسه با اکثر ارگانیزم‌ها غیرعادی است. این تنوع به‌کمک اثر هضم‌کننده آنزیم‌های اندونوکلئازی محدودکننده به‌دست آمده است و می‌تواند ناشی از جابه‌جایی تکه‌های کوچکی از زنجیره تکراری نوکلئوتید، جهش‌های خاموش یا جذب DNA خارجی باشد. شاید جهش‌های خاموش، مکانیزمی باشد که باعث بقای *هلیکوباکتر پیلوری* در محیط نامناسب معده می‌شود [۶، ۷].

روش‌های مناسبی برای افتراق سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* برپایه تنوع ژنتیکی وجود ندارد؛ علی‌رغم تفاوت آنتی‌ژنیک سویه‌های مختلف، هیچ‌یک از روش‌های تعیین سویه (از قبیل بیوتایپینگ، سروتایپینگ و فاژتایپینگ) که در مورد سایر باکتری‌ها به‌کار می‌روند، قادر به تفکیک و تمایز دقیق سویه‌های مختلف *هلیکوباکتر پیلوری* نیستند [۵، ۸]. برای اهداف همه‌گیری‌شناسی و بالینی و همچنین به‌منظور بررسی انتقال بیمارستانی، خانوادگی، کارآیی درمان، عود و کلونی‌زایی مجدد باکتری، به ژنوتایپینگ و روش‌های دقیق مانیتورینگ عفونت‌های *هلیکوباکتر پیلوری* نیاز است [۵].

بررسی نتایج تحقیقات مختلف، بیانگر قدرت بالای تیپ‌بندی با روش‌های PCR-RFLP، RAPD و REP-PCR است. روش PCR-RFLP با استفاده از آنزیم *Hha*I، بهترین قدرت تفکیک را برای ژن ureC ایجاد می‌کند. روش‌های هضم کروموزومی (ریبوتایپینگ) و الکتروفورز در میدان ضربان‌دار، به‌دلیل محدودیت در قدرت تیپ‌بندی توصیه نمی‌شوند [۵].

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، ۳۷ نفر با دامنه سنی ۱۷ تا ۸۵ سال با میانگین سنی ۶۶ سال وارد مطالعه شدند (۲۱ مرد و ۱۶ زن). ابتدا با اخذ رضایت‌نامه از مراجعه‌کنندگان، از هر فرد نمونه ۴-۳ نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم توسط فوق‌تخصص گوارش و با دستگاه آندوسکوپی (Optic Fiber؛ ژاپن) گرفته شد. یک قطعه حاصل از بیوپسی، برای تشخیص سریع فعالیت اوره‌آزی در لوله حاوی اوره قرار گرفت. ۳ قطعه دیگر، برای آزمایشات میکروب‌شناسی و مولکولی در ویال‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ارسال شد.

نمونه بیوپسی حاصل از آندوسکوپی معده توسط لبه‌های دو لام استریل درون پلیت استریل تکه‌تکه شد و سوسپانسیون یکنواختی به‌دست آمد. مقداری از آن توسط لوپ استریل سرد روی محیط کشت BHI غنی‌شده با خون دفیبرینه‌شده گوسفند (۵٪) و انتخابی‌شده با آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم ۵میلی‌گرم در لیتر، ونکومایسین ۱۰میلی‌گرم در لیتر و پلی‌میکسین B ۲۵۰۰ واحدی و در شرایط میکروآیروفیلیک اتمسفر حاوی ۱۰٪ دی‌اکسیدکربن، رطوبت در حد اشباع و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. این شرایط در ظرف بی‌هوازی فاقد پالادیوم و با به‌کارگیری گاز پک و پنبه آغشته به آب فراهم آمد و نمونه‌ها به‌مدت ۳ تا ۵ روز انکوبه

Archive of SID

www.SID.ir

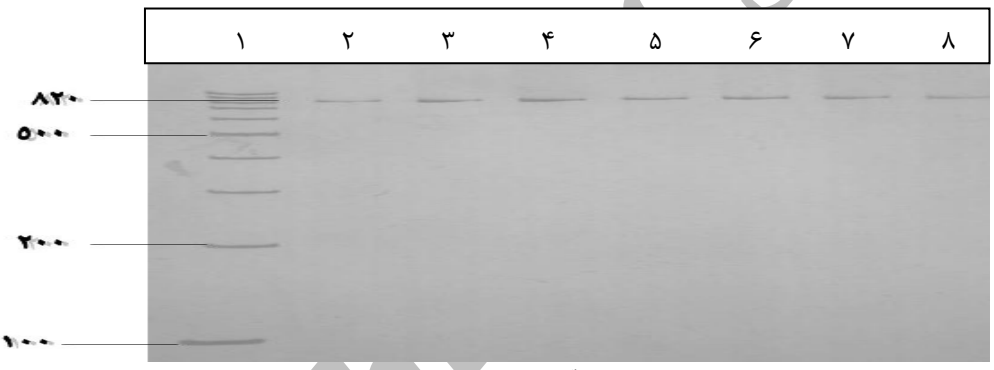
شدند. طی این مدت، کلنی‌های ریزی به قطر ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر که صاف، شفاف و محدب بودند ظاهر شدند. باکتری‌ها با رنگ‌آمیزی گرم و انجام آزمون‌های اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز هویت شدند [۹]. برای انجام آزمایش، DNA باید از نمونه‌های مورد آزمایش استخراج شود. نمونه‌های مورد بررسی شامل کلنی‌های حاصل از کشت‌ها بودند و استخراج طبق دستورالعمل مکتوب در کیت استخراج (Diatum؛ ایران) انجام شد. از کلنی‌های *اشریشیا کلی* به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. به‌منظور تشخیص ژن ureC، از آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱) توالی پرایمرهای مربوط به ژن ureC

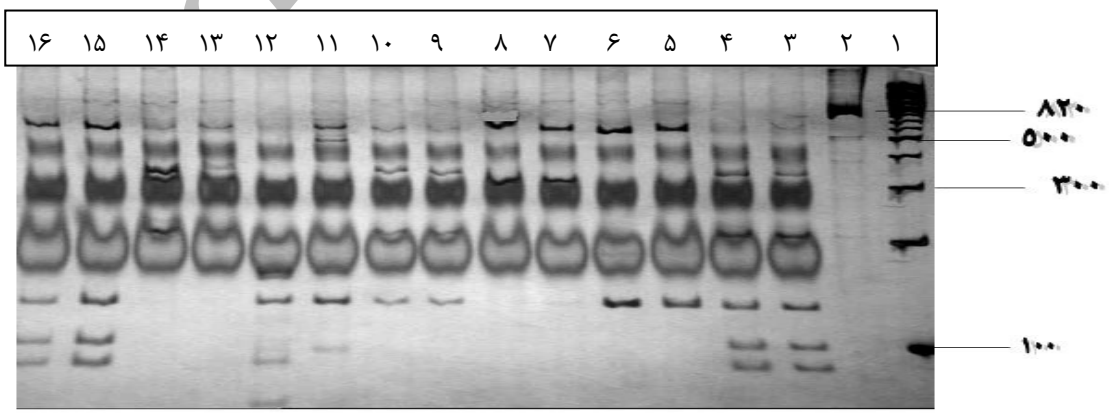
پرایمر	توالی	رفرانس	ژن هدف	محصول PCR
Forward	5`- TGG GAC TGA TGG CGT GAG GG - 3`	۱۲	ureC	۸۲۰ جفت‌باز
Reverse	5`- AAG GGC GTT TTT AGA TTT TT - 3			

جدول ۲) تعداد مبتلایان به نارسایی‌های مختلف به تفکیک تشخیص اندوسکوپی

نوع بیماری	ازوفاژیت	کانسر	زخم دئودنوم	زخم معده	گاستریت	عادی
تعداد مبتلایان	۱	۳	۵	۴	۲۱	۳



شکل ۱) باندهای ۸۲۰ جفت‌بازی حاصل از PCR نمونه‌های کشت، در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ (ستون ۱، نشانگر اندازه؛ ستون‌های ۲ تا ۸، باندهای حاصل از نمونه‌ها)



شکل ۲) الگوهای حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از *Mbo*I (ستون ۱، نشانگر اندازه؛ ستون ۲، ژن ureC؛ ستون ۳ و ۴، الگوی M_1؛ ستون ۵ و ۶، الگوی M_2؛ ستون ۷ و ۸، الگوی M_3؛ ستون ۹ و ۱۰، الگوی M_4؛ ستون ۱۱، الگوی M_5؛ ستون ۱۲، الگوی M_6؛ ستون ۱۳ و ۱۴، الگوی M_7؛ ستون ۱۵ و ۱۶، الگوی M_8؛ در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪)

www.SID.ir

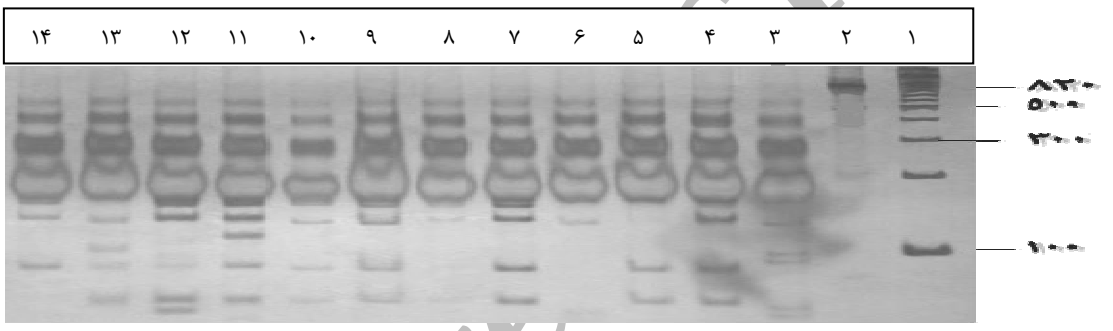
واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با DNAی استخراج‌شده (هدف) به‌میزان ۱ میکرولیتر (۲۰۰-۱۵۰ نانوگرم)، تک‌DNAپلیمراز (سیناژن؛ ایران) به‌میزان ۰/۲ میکرولیتر، بافر 10X (سیناژن؛ ایران) به‌میزان ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ ۵۰میلی‌مولار به‌میزان ۱/۵ میکرولیتر، dNTP ۲/۵میلی‌مولار به‌میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرها ۱۰میلی‌مولار هرکدام به‌میزان ۱ میکرولیتر و DDW به‌میزان ۱۶/۸ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (BioRad؛ آمریکا) با برنامه C۹۵° به‌مدت ۲ دقیقه، ۳۱ چرخه "C۹۵° به‌مدت ۱ دقیقه؛ C۶۳° به‌مدت ۱ دقیقه؛ و C۷۲° به‌مدت ۱ دقیقه" و در نهایت، C۷۲° به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس، محصول PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ در جریان ۱۰۰میلی‌آمپر به‌مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز شد (شکل ۱) [۱۰، ۱۱].

در پایان، RFLP با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده Mbo*I* و Hha*I* بر محصولات PCR به اجرا درآمد [۱۲].

نتایج

نوع بیماری گوارشی بیماران موردمطالعه در جدول ۲ مشخص شده است. به‌منظور تشخیص ژن ureC از پرایمر استفاده‌شده توسط *شوجی‌فوجی‌میتو* استفاده شد (جدول ۱). باندهای به‌دست‌آمده در ناحیه ۸۲۰ جفت‌بازی قرار گرفتند (شکل ۱).

با بررسی محصولات PCR ۳۷ نمونه، با آنزیم‌های محدودکننده Mbo*I* و Hha*I* به‌ترتیب ۸ و ۱۱ الگوی هضم آنزیمی متفاوت ایجاد و با نرم‌افزار NTsys آنالیز شد. الگوهای حاصل به‌ترتیب در اشکال ۲ و ۳ نشان داده است.



شکل ۳) الگوهای حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از Hha*I* (ستون ۱، نشانگر اندازه؛ ستون ۲، ژن ureC؛ ستون ۳ و ۴، الگوی h_1؛ ستون ۵، الگوی h_2؛ ستون ۶، الگوی h_3؛ ستون ۷، الگوی h_4؛ ستون ۸، الگوی h_5؛ ستون ۹، الگوی h_6؛ ستون۱۰، الگوی h_7؛ ستون ۱۱، الگوی h_8؛ ستون ۱۲، الگوی h_9؛ ستون ۱۳، الگوی h_{10}؛ ستون ۱۴، الگوی h_{11}؛ در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪)

پس از تعیین الگوها با هضم آنزیمی، فراوانی هرکدام از الگوهای حاصل مشخص شد. در هضم با آنزیم Mbo*I* الگوهای m_3 و m_2 به‌ترتیب با ۱۴ و ۱۰ مورد، فراوان‌ترین و الگوهای m_6 و m_8 با ۱ مورد کمترین فراوانی را داشتند. ولی در هضم آنزیمی Hha*I*، الگوهای h_2 و h_5 به‌ترتیب با ۱۳ و ۹ مورد، بیشترین و الگوهای h_4، h_7، h_9، h_{10} و h_{11} با ۱ مورد کمترین فراوانی را داشتند. نتایج در جداول ۳ و ۴ آورده شده‌اند.

ارتباط بین اختلالات گوارشی و الگوهای حاصل بررسی شد. در الگوهای آنزیم محدودکننده Mbo*I* در گاستریت، الگوهای m_2 و m_3 با ۷ و ۸ مورد بیشترین فراوانی را داشتند. در الگوهای آنزیم محدودکننده Hha*I* در گاستریت، h_2، h_3 و h_5 با ۷، ۳ و ۵ مورد و در زخم دئودنوم، h_2 با ۳ مورد بیشترین فراوانی را داشتند. مدل‌های حاصل از ترکیب الگوهای هضم دو آنزیم، ۲۱ الگوی متفاوت ایجاد کردند که فراوان‌ترین الگوها m_3h_5 و m_2h_2 بودند.

بحث

در مطالعه حاضر، به‌منظور تایپینگ ایزوله‌های به‌دست‌آمده، هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده Mbo*I* و Hha*I* روی محصولات PCR انجام شد. *هلیکوباکتر پیلوری* از تنوع ژنتیکی بسیار زیادی برخوردار است و اثر این آنزیم‌ها بر محصول PCR با توجه پرایمر به‌کاربرده‌شده، می‌تواند تفاوت‌های بین ایزوله‌های *هلیکوباکتر پیلوری* را مشخص کند؛ در این مطالعه، ۲۱ الگوی متفاوت در بین ۳۷ ایزوله به‌دست آمد که می‌توان ادعا کرد، الگوهای به‌دست‌آمده برای بررسی‌های همه‌گیری‌شناسی و درمان مناسب هستند. با آنزیم Mbo*I*، شایع‌ترین الگو m_3 با فراوانی ۱۴ مورد و با آنزیم Hha*I*، الگوی h_2 با فراوانی ۱۳ مورد بود. مدل‌های حاصل از ترکیب الگوهای هضم دو آنزیم ۲۱ الگوی متفاوت ایجاد کردند که فراوان‌ترین الگوها m_3h_5 و m_2h_2 به ترتیب با ۷ و ۶ مورد فراوانی بودند. *فرشاد* و همکاران ژنوتیپ

Archive of SID
www.SID.ir

سوش‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جداشده از بیماران مبتلا به زخم‌معده یا بدون زخم‌معده را براساس الگوی RFLP-PCR در ژن‌های ureAB، vacA و cagA بررسی کردند. آنالیز پلی‌مورفیزم‌های ureAB، ۱۰ الگوی قابل افتراق را مشخص کرد که الگوی ureAB 5a شایع‌ترین الگو در تمام سوش‌ها بود (۴۷/۶۱٪). برای ژن‌های ureAB و cagA هیچ ارتباطی بین الگوهای خاص DNA و حالت کلینیکی بیماری مشاهده نشد [۱۲].

شوجی‌فوجی‌میتو و همکاران با استفاده از ژن ureC و آنزیم‌های *Alu*I، Mbo*I* و Hha*I* روی ۲۵ ایزوله کلینیکی هضم آنزیمی انجام دادند و ۲۵ الگوی مختلف به‌دست آوردند. سپس، از ۱۴ بیمار قبل و بعد از درمان نمونه‌گیری کردند که ۱۲ مورد *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شد. چون از دو ناحیه آنتروم و تنه معده نمونه‌گیری شده بود، در ۱۰ مورد الگوهای RFLP-PCR ایزوله‌های هر دو ناحیه یکسان بودند. ولی در ۲ مورد، الگوی RFLP به‌دست‌آمده از ایزوله‌های آنتروم و تنه تفاوت داشت. همچنین آنها تا ۵ ماه پس از درمان بیماران را پیگیری کرده و از این افراد نمونه‌گیری مجدد به‌عمل آوردند که الگوهای RFLP یکسانی با قبل از درمان به‌دست آمد. ایشان به این نتیجه رسیدند که این روش تایپینگ قابل اعتماد است و همچنین آلوده بودن فرد با یک سویه یا بیشتر را نشان می‌دهد [۱۳].

گوسن با مطالعه ۱۰۰ نمونه حاصل از کشت قبل و بعد از درمان در ۱۰ کشور اروپایی، الگوهای RFLP یکسانی به‌دست آورد و گزارش داد که چندین تیپ محدود RFLP در اروپا عفونت ایجاد می‌کنند. همچنین RFLP-PCR با ژن ureC روشی کارآمد برای افتراق بین عود عفونت یا کسب عفونت با سویه جدید است و در تشخیص عفونت قابلیت بالایی دارد [۶].

اندرسون با روش PCR-RFLP و با استفاده از ژن ureC و آنزیم محدودکننده Hha*I*، تنوع ژنتیکی باکتری‌های جداشده از روس‌ها و استونیایی‌های مقیم در یک منطقه را یکسان نشان داد. بنابراین، تنوع ژنتیکی با ناحیه جغرافیایی مرتبط است. مکانیزم‌های پیدایش این تنوع بالا، جهش نقطه‌ای، نوترتیبی کروموزومی و انتقال افقی ژن‌ها بین سویه‌ها هستند [۱۴].

با مطالعه ۱۵۷ کلون باکتری به‌دست‌آمده از افراد خانواده (والدین و فرزندان) و ۱۳۱ بیمار از مناطق مختلف جغرافیایی در اروپا و آفریقا با استفاده از دو ژن ureC (gLmM) و hspA، انتقال آللی بین افراد خانواده نشان داده شد. چندین مکانیزم از جمله جهش نقطه‌ای، نوترکیبی داخل جنس و گرفتن آلل از خارج موجبات تنوع سویه‌ها در افراد خانواده هستند. همچنین، بررسی DNA در افراد خانواده و افراد دیگر توالی منحصر به فردی را نشان داد. بررسی نقشه فیلوژنتیکی نشان داد که نمونه‌های جداشده از تنه معده در مقایسه با نمونه‌های جداشده از آنتروم، تنوع ژنتیکی بیشتری دارند [۱۵].

در مطالعه‌ای عنوان شد که شاید بتوان در جمعیت‌های بزرگتر، بین اختلالات گوارشی و سویه معینی از *هلیکوباکتر پیلوری* ارتباطی مشاهده کرد [۹]. طی مطالعه‌ای در اصفهان برای تیپ‌بندی، *نواب* و همکاران با استفاده از ژن ureC و آنزیم‌های ALU1، MBO1 و CFO1 به‌ترتیب ۵، ۵ و ۴ الگوی مختلف مشاهده کردند [۱۶].

هلیکوباکتر پیلوری از تنوع ژنتیکی فوق‌العاده‌ای برخوردار است؛ به‌طوری‌که در مطالعه حاضر، با بررسی ۳۷ نمونه با استفاده از آنزیم Mbo*I* ۸ الگو، با استفاده از آنزیم Hha*I* ۱۱ الگو و در مجموع ۲۱ الگوی متفاوت ایجاد شد. علل به‌وجود آمدن این تنوع و کارآیی آن در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در سال ۱۹۹۷، *دان* و همکاران با جمع‌آوری نتایج تحقیقات مختلف، در ایالات متحده به این نتیجه رسیدند که متغیر بودن جایگاه چندین ژن در نقشه ژنتیکی حکایت از نوترتیبی زیاد در ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* دارد. *هلیکوباکتر پیلوری* تنوع زیادی در ژن‌هایی مثل اوره‌آز، ژن‌های کمکی، فلاژلین، سیتوتوکسین واکوئل‌زا و cagA نشان می‌دهد. آزمایش آلل‌های مختلف در ۶ ژن به‌وسیله MLEE، تنوع ژنتیکی در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* را تایید می‌کند. سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* به‌طور ذاتی قابلیت تراریختی قطعات DNA را دارند، به‌طوری‌که تصور می‌شود، نوترکیبی، مکانیزم تنوع ژنتیکی مذکور باشد [۷].

با بررسی توالی ۳ ژن flaA، flab و vacA در ۳۳ نمونه جداشده از بیماران کانادایی، آلمانی و آفریقای جنوبی مشخص شد که انتقال ژنتیکی افقی در *هلیکوباکتر پیلوری* به‌طور مکرر اتفاق می‌افتد. همچنین، نتایج نشان‌دهنده وجود نوترکیبی بسیار بالا در *هلیکوباکتر پیلوری* در مقایسه با *اشریشیا کلی* و *نایسریا گنوره‌آ* بود [۱۷]. بیشتر تغییرات ژنتیکی، منشاء نوترکیبی هومولوگ دارند [۱۳]. دلیل تنوع ژنتیکی، قابلیت طبیعی باکتری برای تراریختی ژنتیکی و نوترکیبی است [۱۸].

Archive of SID
www.SID.ir

تنوع زیاد ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* در مقایسه با اکثر ارگانیزم‌ها غیرعادی است. این تنوع را می‌توان به‌کمک اثر هضم‌کننده آنزیم‌های آندونوکلئازی محدودکننده به‌دست آورد. تنوع ژنتیکی ناشی از جابه‌جایی تکه‌های کوچکی از زنجیره تکراری نوکلئوتید، جهش‌های خاموش یا جذب DNA خارجی، نوترکیبی هومولوگ، نوترتیبی کروموزومی، انتقال افقی ژن‌ها بین سویه، در جهت سازش باکتری با محیط پرفشار و نامناسب معده حایز اهمیت است [۱۹].

نتیجه‌گیری

در تعیین تنوع ژنتیکی ایزوله‌ها، گرچه شواهدی دال بر ارتباط بین الگوهای حاصل و اختلالات گوارشی مشاهده نشد. با توجه به نتایج مطالعات که الگوهای موجود در هر منطقه را محدود و خاص همان منطقه نشان دادند، شاید بتوان در جمعیت‌های بزرگتر یا با متاآنالیز چندین مطالعه صورت‌گرفته در مناطق مختلف، بین اختلالات گوارشی و سویه‌های موجود ارتباطی پیدا کرد و سویه‌های بارز را تعیین نمود. در نهایت، روش PCR-RFLP علاوه بر توانایی شناسایی باکتری به‌طور مستقیم از نمونه‌های بیوپسی قابلیت تیپ‌بندی و شناسایی عود یا عفونت با سویه جدید را دارد.

تشکر و قدردانی: این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی شهرکرد است و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه به انجام رسید.

منابع

1- Kumar S, Kumar A, Kumar DV. Direct detection and analysis of vacA genotypes and cagA gene of Helicobacter pylori from gastric biopsies by a novel multiplex polymerase reaction assay. J Diagno Microbiol Infect Dis. 2008;62(4):366-73.

2- Quina M. Historical perspective. In: Malfertheiner P, Michetti P. A price Helicobacter pylori an atlas. UK: Science Press; 1996.

3- Surebaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 2002;347(15):1175-86.

4- Goto Y, Ando T, Nishio K, Ishida Y, Kawai1 S, Goto H, et al. The ACE gene polymorphism is associated with the incidence of gastric cancer among H. pylori seropositive subjects with atrophic gastritis. Asian Pacific J Cancer Prev. 2005;6(4):464-7.

5- Burucoa C, Lhomme V, Fauchere JL. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of Helicobacter pylori isolates: Experimental results and meta-analysis. JCM. 1999;37(12):4071-80.

6- Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree F, Olckers A, Botha SJ, et al. Evaluation of a novel semi nested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of Helicobacter pylori in saliva and dental plaque. J Clin Microbiol. 2002;40:205-9.

7- Reuse HD, Labigne A, Mengin-Lecreulx D. The H. pylori ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. J Bacteriol. 1997;179(11):3488-93.

8- Shahamat M, Alavi M, Watts JEM, Gonzalez JM, Sowers KR, Maeder DW, et al. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of Helicobacter pylori. JCM. 2004;42(8):3613-9.

۹- سیاوشی فریده، ملک‌زاده رضا، دین‌پرست نوید. تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با روش RAPD-PCR. مجله گوارش. ۱۳۸۳؛۱(۹):۹-۱۱.

10- Lairmore TC. Polymerase chain reaction. Method. 1990;3(1):1-6.

11- Jack Vanden H. Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and other PCR procedures. Pennsylvania: Pennsylvania State University; 1997.

۱۲- فرشاد شهره، ژاپونی عزیز، البرزی عبدالوهاب، کلانی مهدی. تعیین ژنوتیپ سوش‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده یا بدون زخم معده بر اساس الگوی RFLP-PCR ژن‌های vacA، ureAB و cagA. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان. ۱۳۸۷؛۱۵(۳):۷-۱۱.

13- Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of Helicobacter pylori. JCM. 1994;32(2):331-4.

14- Anderson H. Diversity of Helicobacter pylori genotypes in Estonian patients with chronic inflammatory gastric diseases. Tartu: Publication of University of Tartu; 2006.

15- Raymond J, Thiberge JM, Chevalier C, Kalach N, Bergeret M, Labigne A. Genetic and transmission analysis of Helicobacter pylori strains within a family. CDC. 2004;10(10):1816-21.

۱۶- نواب‌اکبر فرح. طرز شناسایی و تفکیک سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش PCR-RFLP بر روی نمونه‌های بیوپسی دستگاه گوارش در منطقه اصفهان [پایان‌نامه دکتری]. اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛ ۱۳۸۰.

17- Bjorkholm B, Salama NR. Genomics of Helicobacter. Helicobacter. 2003;8(1):1-7.

18- Karnholz A, Hoefler C, Odenbreit S, Fischer W, Hofreuter D, Haas R. Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in Helicobacter pylori. J Bacteriol. 2006;188(3):882-93.

19- Moore RA, Kureishi A, Wong S, Bryan LE. Categorization of clinical isolates of Helicobacter pylori based on restriction digest analyses of polymerase chain reaction amplified ureC genes. J Clin Microbiol. 1993;(31):1334-5.

Archive of SID
www.SID.ir

Kowsar Medical Journal
Volume 14, Issue 3, Fall 2009
Page: 24

PCR and RFLP of ureC (glmM) gene for identification and typing of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens of gastric patients

Nafisi M. R.[1] *PhD*, Alipour Shadbad M.[2] *MSc*, Karimi A.[1] *MSc*, Rahimian G. A.[3] *PhD*, Imani Fooladi A.[*] *PhD*

Abstract

Aims. *Helicobacter pylori* is one of the important pathogens that infected epithelial cells of stomach. The aim of this study was to analyze and type *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsy specimens with ureC (glmM) gene.

Materials & Methods. Molecular method was used in order to type *Helicobacter pylori*. PCR-RFLP was used to determine the genetic heterogenesity of 37 specimens of *Helicobacter pylori* isolated from culture. 820bp amplified fragment of ureC gene was digested with the restriction enzymes Hha*I*, Mbo*I*.

Results. 11 different patterns with Hha*I* and 8 different patterns with Mbo*I* were identified. In combination, 21 different RFLP patterns were identified.

Conclusion. Based on the results of this study, there is no significant relationship between gastric diseases and different patterns and there is a widespread genetic diversity between the fragments. This is promising the production of effective equipment for molecular analysis of epidemiology and analyzing ancestors and understanding the bacterial origin and its scattering in different geographic regions.

Keywords: *Helicobacter pylori*, PCR-RFLP, ureC Gene

Archive of SID

Submission Date: 17/2/2009, Acceptation Date:12/7/2009
* Correspondence address: Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran imanifouladi.a@gmail.com
1 Research Center of Cell & Molecular Sciences, Shahrekord University of Medical Sicences, Shahrekord, Iran
2 Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Internal Department, Shahrekord University of Medical Sicences, Shahrekord, Iran
www.SID.ir