مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹
صفحات: ۲۰۲-۱۹۷

Kowsar Medical Journal
Vol. 15, No. 4, Winter 2011
Pages: 197-202

تولید ایمونوگلوبولین در زرده تخم‌مرغ علیه پروتئین UreC *هلیکوباکتر پیلوری* به‌وسیله واکسیناسیون DNA

شقایق امیری جاوید[۱] *MSc*، سیدلطیف موسوی[*] *PhD*، علی هاتف سلمانیان[۲] *PhD*، محسن بصیری[۳] *MSc*

[*]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خاتم، تهران، ایران

[۲]پژوهشکده زیست‌فناوری گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

[۳]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

چکیده

اهداف: در حال حاضر درمان عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* که دلیل عمده التهاب، زخم معده و نیز سرطان معده است و معمولا با تجویز آنتی‌بیوتیک صورت می‌گیرد. اما به‌دلیل مشکلات ناشی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، سختی و هزینه‌های بالای درمان، امروزه توجه به استفاده از آنتی‌بادی‌ها معطوف شده است. کارآیی آنتی‌بادی‌های ضداوره‌آز *هلیکوباکتر پیلوری* در درمان عفونت این باکتری اثبات شده است. با توجه به صرفه اقتصادی و کارآیی واکسن DNA در ایجاد ایمنی درازمدت، این پژوهش با هدف استفاده از این واکسن برای تولید ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY) علیه زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا ژن *ureC* از *هلیکو باکتر پیلوری*، در ناقل پوکاریوتی pCI کلون شد. ناقل نوترکیب pCI-*ureC* به‌عنوان واکسن DNA به مرغ تزریق شد. پس از تکمیل دوره ایمن‌سازی IgY از طریق ترسیب با پلی‌اتیلن‌گلیکول از زرده تخم‌مرغ جدا و با روش ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: واکسن DNA به‌کار رفته سبب تولید آنتی‌بادی ویژه UreC در مرغ شد که براساس نتایج به‌دست‌آمده از ELISA دارای قابلیت شناسایی زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز است.

نتیجه‌گیری: واکسیناسیون با DNA روشی کارآ و به‌صرفه برای تولید آنتی‌بادی موثر علیه اوره‌آز *هلیکوباکتر پیلوری* به‌منظور استفاده‌های درمانی است.

کلیدواژه‌ها: *هلیکوباکترپیلوری*، ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY)، اوره‌آز، واکسن DNA

Production of chicken egg yolk immunoglobulin against *Helicobacter pylori* UreC protein by DNA vaccination

Amiri Javid Sh.[1] *MSc*, Mousavi S. L.[*] *PhD*, Salmanian A. H.[2] *PhD*, Basiri M.[3] *MSc*

[*]Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
[1]Department of Biology, Khatam University, Tehran, Iran
[2]Plant Biotechnology Research Center, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, Iran
[3]Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Current therapies against *Helicobacter pylori* infection, which is associated with gastritis, peptic ulcer and gastric cancer, are performed by antibiotic use. Due to increase of antibiotic resistance and difficulty and cost of treatment, new approaches have focused on using specific antibodies. Accordingly, efficiency of antibodies specific to *H. pylori* urease has been demonstrated. Considering the longtime benefit and efficacy of DNA vaccination, this study was designed on order to use DNA vaccination for generation of egg yolk immunoglobulin against UreC subunit of *H. pylori* urease.

Materials & Methods: *H. pylori ureC* gene was cloned into eukaryotic pCI expression vector. Recombinant pCI-*ureC* plasmid, amplified in *E. coli* host were purified and used for genetic immunization of chickens. IgY recovered from egg yolk, using Poly Ethylene Glycol precipitation and analyzed by indirect ELISA and urease test

Results: Using DNA vaccination, specific and biologically active IgY antibodies were produced and extracted, which based on ELISA results is able to detect UreC subunit of urease.

Conclusion: DNA immunization can be used as a productive and economic method to generate efficient anti-urease antibodies for therapeutic proposes.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Egg Yolk Immunoglobulin (IgY), Urease, DNA Vaccine

نویسنده مسئول: سیدلطیف موسوی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی slmousavi@shahed.ac.ir فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۲/۳ پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۱۷

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باکتری اسپیرال و گرم‌منفی است که با تکثیر در لایه مخاطی معده انسان، ایجاد عفونت می‌نماید. عفونت ایجادشده توسط این باکتری که با تخریب بافت پوششی معده همراه است، منجر به التهاب مزمن معده و زخم‌های دوازدهه می‌شود. بررسی‌های اپیدمیولوژی و آماری نشان می‌دهد که عفونت مزمن *هلیکوباکتر پیلوری* با سرطان بدخیم معده، در ارتباط است و این امر موجب شده که آژانس پژوهش سرطان سازمان جهانی بهداشت، این باکتری را در زمره عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد [۱]. شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به‌میزان قابل توجهی به شرایط اقتصادی و اجتماعی جامعه وابسته است. شیوع این عفونت در بین افراد میان‌سال در جوامع در حال توسعه به‌ویژه در آسیا، ۸۰٪ و در کشورهای پیشرفته بین ۲۰ تا ۵۰٪ گزارش شده است [۲، ۳]. در ایران نیز عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* شایع بوده و سرطان معده نیز از آمار بالایی برخوردار است [۴، ۵، ۶].

برای درمان عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* از رژیم‌های درمانی سه‌گانه (دو آنتی‌بیوتیک و یک مهارکننده پمپ پروتونی یا ترکیبات بیسموتی) به‌مدت یک هفته استفاده می‌شود [۷]. اما بازگشت دوباره این آلودگی به‌دلیل ایجاد مقاومت، درمان ثانویه و نهایی آن را با مشکل مواجه می‌کند [۸، ۹]. مقاومت آنتی‌بیوتیکی *هلیکوباکتر پیلوری* در ایران نیز روند افزایشی دارد [۱۰]. از آن‌جا که سیستم ایمنی بدن به‌علت مکانیزم‌های دفاعی باکتری در برابر این بیماری، فاقد کارآیی لازم است [۱]، به‌کارگیری درمان‌های اختصاصی مانند ایمنی‌درمانی برای مقابله با این عفونت ضروری به‌نظر می‌رسد. از سوی دیگر، امروزه تکنولوژی نوین استفاده از آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ (IgY) به‌منظور کاربردهای تشخیصی و درمانی در حال گسترش است. این آنتی‌بادی که معادل IgG انسانی در پرندگان است، بعد از تولید در بدن مرغ از سرم به زرده منتقل شده و باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می‌شود. استخراج این آنتی‌بادی‌ها از تخم‌مرغ در مقایسه با سایر انواع آنتی‌بادی آسان‌تر است [۱۱]. مطالعات قبلی نشان داده است که IgY تولیدشده علیه سلول‌های لیزشده *هلیکوباکتر پیلوری* می‌تواند در درمان عفونت این باکتری موثر واقع شود [۱۲]. اما از آن‌جا که به‌کاربردن سلول‌های لیزشده ممکن است منجر به ایجاد واکنش‌های متقاطع با سایر باکتری‌های فلور طبیعی دستگاه گوارش شود، استفاده از یک آنتی‌ژن اختصاصی سبب افزایش کارآیی و اختصاصیت IgY می‌شود. طی بررسی‌های به‌عمل‌آمده، تعدادی از پروتئین‌های باکتری مانند UreC، HpaA، FlaA، CagA و VacA به‌عنوان آنتی‌ژن‌های حفاظت‌بخش در این باکتری تعیین شده‌اند [۱۳]. در میان آنها، پروتئین UreC (در گذشته با نام UreB شناخته می‌شد) که از زیرواحدهای آنزیم اوره‌آز است، به‌میزان بالایی در باکتری بیان می‌شود و مسئول خنثی‌سازی اسید معده به‌منظور تامین شرایط مناسب برای بقای باکتری است. همچنین نشان داده شده است که درصورت فقدان فعالیت اوره‌آزی، باکتری نمی‌تواند در معده انسان ایجاد عفونت نماید [۱۴، ۱۵]. با توجه به این یافته‌ها، UreC کاندیدای مناسبی برای تهیه واکسن یا آنتی‌بادی اختصاصی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* است و تاکنون نیز تجربیات موفقی برای تولید IgY با استفاده از پروتئین نوترکیب UreC صورت گرفته است [۱۶، ۱۷].

در این تحقیق، با توجه به مزیت واکسن‌های اسیدنوکلئیکی از لحاظ اقتصادی‌بودن و عدم نیاز به مراحل بیان و تخلیص پروتئین، سعی شده است تا با استفاده از واکسن‌های DNA حاوی ژن *ureC*، آنتی‌بادی اختصاصی علیه این پروتئین در مرغ‌های ایمن‌شده تولید شود و فعالیت بیولوژیک IgY حاصله، پس از جداسازی از زرده تخم‌مرغ مورد سنجش قرار گیرد.

بنابراین هدف از این پژوهش، استفاده از واکسن DNA برای تولید ایمونوگلوبولین زرده تخم مرغ (IgY) علیه زیر واحد UreC آنزیم اوره‌آز بود.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*: نمونه‌های جداشده باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* از بیماران ایرانی (اهدایی از طرف خانم دکتر *فریده سیاوشی* و همکاران؛ دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران)، در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط جامد BHI به‌علاوه ۰/۴٪ عصاره مخمر، ۱۰٪ FBS، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ونکومایسین، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسینB و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پلی‌میکسینB (سیگما؛ آلمان) تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰٪ گاز CO_2 به‌مدت ۲ تا ۴ روز در انکوباتور CO_2 کشت داده شد. پس از کشت با آزمون‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم، صحت کشت کنترل شد.

استخراج ژنوم از *هلیکوباکتر پیلوری*: به‌منظور تخلیص DNA ژنومی، باکتری‌های جمع‌آوری‌شده از محیط کشت در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE حل شده و به آن ۳ میکرولیتر سدیم‌دودسیل‌سولفات ۱۰٪ و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلریدسدیم ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (۱۰٪ CTAB، ۴٪ NaCl) به مخلوط اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت، DNA ژنومیک با استفاده از فنول- کلروفرم و تیمار با RNase A تخلیص شد. DNA ژنومیک حاصل، در بافر TE حل و خلوص و غلظت آن با اسپکتروفتومتری UV اندازه‌گیری شد [۱۸].

تکثیر ژن زیرواحد *ureC* آنزیم اوره‌آز: توالی پرایمرهای رفت (huCF) و برگشت (huCR) براساس توالی ۱۷۱۰نوکلئوتیدی ژن *ureC* سویه J99 *هلیکوباکتر پیلوری* (GenBank Accession Number: nc_000921) طراحی شدند که به‌ترتیب شامل 5'-GACACGAATTCATGAAGAAAATCTCAC-3' با

Archive of SID
www.SID.ir

جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر *Eco*RI و 5'-GTAGCGTCGACAAAGATAGAAAACAGTT-3' با جایگاه آنزیمی *Sal*I بودند (زیر جایگاه‌های آنزیمی خط کشیده شده است). حجم نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۰ میکرولیتر، حاوی ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۴ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۵u آنزیم *Pfu* DNA پلیمراز (سیناژن؛ ایران)، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو و بافر PCR ۱X بوده است. پارامترهای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن *ureC* شامل مرحله واسرشته‌شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه ۳مرحله‌ای شامل واسرشته‌شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در نهایت زمان کامل‌کردن پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بوده است.

همسانه‌سازی ژن *ureC*: ناقل pCI (انستیتو پاستور؛ ایران) و محصول تخلیص‌شده PCR با دو آنزیم محدودالاثر *Sal*I و *Eco*RI (سیناژن؛ ایران) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت به‌صورت جداگانه، هضم آنزیمی شدند. سپس قطعات روی ژل آگارز با نقطه ذوب پایین بارگذاری شد و بعد از انجام الکتروفورز قطعات مورد نظر بریده شده و به‌کمک کیت تخلیص DNA از ژل (شرکت iNtRON؛ کره جنوبی) از ژل تخلیص شد. واکنش الحاقی با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر، با غلظت ۲۰۰ نانوگرم از پلاسمید، ۶۰۰ نانوگرم محصول PCR هضم‌شده و ۲ واحد آنزیمی T_4 DNA ligase و بافر آن با غلظت نهایی ۱X در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاقی به باکتری *E.coli* سوش Top10F' با روش شوک حرارتی منتقل شد و غربالگری همسانه‌های حاصل روی محیط LBآگار حاوی ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین انجام شد. به‌منظور تایید همسانه‌های به‌دست‌آمده، باکتری‌های حاوی ناقل روی محیط LB مایع حاوی ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت و پلاسمیدهای آن به‌روش لیز قلیایی تخلیص شد. صحت همسانه‌های به‌دست‌آمده و وجود قطعه در درون ناقل پلاسمیدی، به‌کمک هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد.

تخلیص انبوه پلاسمید و ایمن‌سازی مرغ‌ها: به‌منظور تخلیص انبوه پلاسمید pCI-ureC از همسانه حاوی قطعه مورد نظر، از کیت تخلیص پلاسمید با حجم بالا (شرکت iNtRON؛ کره جنوبی) طبق دستور کار سازنده استفاده شد. نگهداری و آزمایشات انجام‌شده روی مرغ‌ها در مجموعه حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم دانشگاه شاهد و براساس ضوابط استاندارد صورت پذیرفت. هر گروه مورد آزمایش شامل ۲ مرغ ۲۵هفته‌ای نژاد لگ‌هورن سفید، به‌صورت زیرجلدی و با ۵۰۰ میکروگرم پلاسمید pCI-ureC یا pCI خالی (به‌عنوان کنترل منفی) و حجم مساوی از دکستران با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تزریق شدند. ۳ دوز یادآور با همان مقدار DNA پلاسمیدی و دکستران ۶۰۰۰ با فاصله زمانی ۲، ۴ و ۶ هفته پس از تزریق اول و یک یادآور حاوی ۱۰۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب UreC (به‌دست‌آمده از پژوهش قبلی [۱۶]) در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر همراه با حجم مساوی ادجونت ناقص فروند (موسسه سرم‌سازی رازی؛ ایران) تزریق شد. شایان ذکر است که استفاده از دکستران ۶۰۰۰، دریافت DNA توسط سلول‌های یوکاریوتی را افزایش می‌دهد [۱۹].

ارزیابی ایمنی: به‌منظور تایید ایمن‌شدن مرغ‌ها، یک هفته پس از تکمیل دوره ایمن‌سازی، خونگیری از حیوانات به‌عمل آمد و پس از جداسازی سرم، از روش ELISA غیرمستقیم استفاده شد. در این روش پلیت‌های ۹۶چاهکی با پروتئین نوترکیب UreC (در هر چاهک ۲ میکروگرم) پوشش داده شد. بعد از اضافه‌کردن محلول بلاکینگ حاوی شیرخشک (w/v) ۰/۵، سرم مرغ‌های ایمن‌شده و کنترل با رقت ۱:۱۰۰ تا ۱:۳۲۰۰ (رقت‌های متوالی) به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از شستشو با PBS-T آنتی‌بادی کونژوگه ضدآنتی‌بادی مرغی با رقت ۱:۲۰۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و سپس سوبسترای OPD و H_2O_2 و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه برای مهار واکنش به آن اسیدسولفوریک ۳ مولار اضافه شد. شدت رنگ ایجادشده در طول موج ۴۹۲ نانومتر با قرائتگر ELISA خوانده شد. پس از اطمینان از ایمنی مرغ‌ها، تخم‌مرغ‌ها به‌صورت روزانه به‌مدت ۲ ماه جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی IgY از زرده تخم‌مرغ: به‌منظور به‌دست‌آوردن IgY مورد نظر، زرده‌های تخم‌مرغ از سفیده جدا شده و پس از شستشو با آب مقطر، کیسه زرده پاره و محتویات آن به‌خوبی جدا شد. دوبرابر حجم زرده به آن بافر فسفات (سدیم‌فسفات ۱۰ میلی‌مولار، pH=۷/۶) اضافه و به‌طور کامل مخلوط شد. سپس به آن پودر PEG۶۰۰۰ ۳/۵٪ (وزنی به حجمی) افزوده و به کمک همزن به‌خوبی حل و یکنواخت شد. بعد از ۲۰ دقیقه به‌وسیله سانتریفیوژ (۳۰ دقیقه در ۴۴۲۰g)، محلول رویی حاوی لیپوپروتئین‌ها حذف و به رسوب حاصله، بافر فسفات حاوی PEG ۱۲٪ اضافه شد. دوباره بعد از ۲۰ دقیقه مخلوط‌کردن، محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد و رسوب برای خشک‌شدن روی کاغذ واتمن شماره یک قرار گرفت و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رسوب باقی‌مانده روی فیلتر در بافر فسفات حل و پس از تعیین غلظت پروتئین با روش *برادفورد*، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۰].

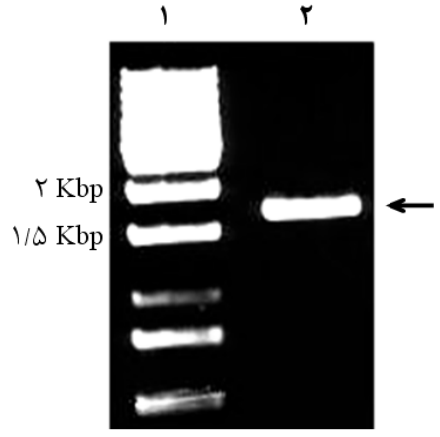
اختصاصیت IgY جداشده از زرده تخم‌مرغ در شناسایی پروتئین UreC آنزیم اوره‌آز: برای اطمینان از این‌که IgYهای خالص‌شده از زرده تخم‌مرغ ساختار و فعالیت خود را حفظ کرده‌اند، مجددا از روش ELISA غیرمستقیم بر علیه UreC نوترکیب استفاده شد. در این روش نیز UreC به‌عنوان آنتی‌ژن در کف پلیت قرار گرفت و IgY خالص‌شده به‌عنوان آنتی‌بادی به آن اضافه شد.

Archive of SID
www.SID.ir

چالش IgY-UreC با آنزیم اوره‌آز: به‌منظور ارزیابی قدرت خنثی‌سازی IgY-UreCهای تولیدشده، آزمایش سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز انجام شد. برای این منظور، پس از کشت *هلیکوباکتر پیلوری* در محیط آبگوشتی BHI و ۱۰٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت حاصل به محیط‌های جدید تلقیح شد و پس از نگهداری در شرایط مشابه، پس از رسیدن جذب نوری به ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر که معادل تقریبی 10^8 c.f.u. در هر میلی‌لیتر محیط کشت است، مقادیر متفاوتی از IgY تخلیص‌شده (۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به کشت باکتری افزوده شد. پس از ۶ ساعت انکوباسیون به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز، ۲۵ میکرولیتر محیط معرف اوره حاوی ۲٪ اوره و ۰/۰۳ معرف فنل‌رد به ۲۰۰ میکرولیتر از کشت حاصل افزوده و پس از گذشت ۸ ساعت شدت رنگ در طول موج ۵۵۰ نانومتر ثبت شد. با توجه به تفاوت غلظت‌های موجود و تفاوت در فعالیت آنزیم اوره‌آز در معرف، تغییر رنگ ایجاد شد. میزان جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر نسبت مستقیم با pH محیط و میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز دارد.

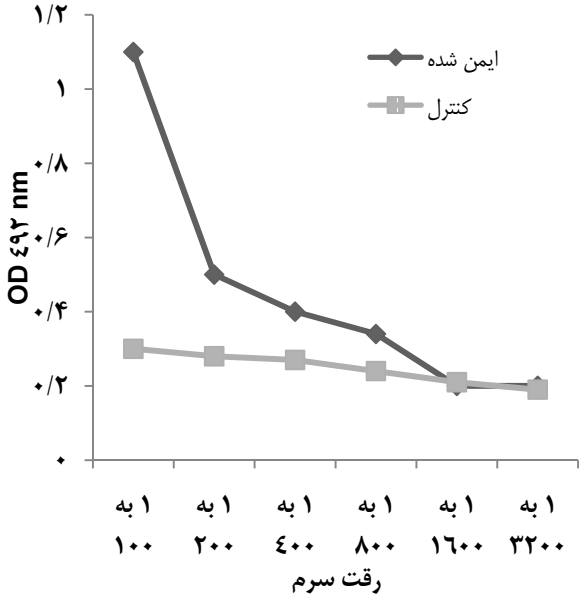
نتایج

تکثیر ژن زیرواحد *ureC* آنزیم اوره‌آز: محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۱٪ به‌صورت تک‌باند و از لحاظ اندازه در جای مناسب قرار گرفت که نشان‌دهنده اختصاصی‌بودن پرایمرها و فراوان‌سازی صحیح قطعه مورد نظر بود (شکل ۱).



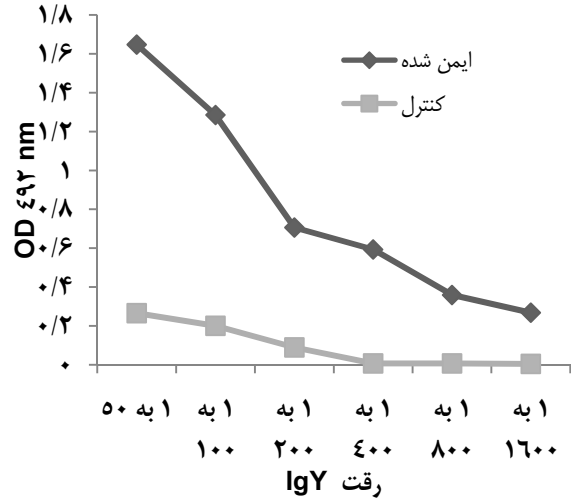
شکل ۱) الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن *ureC*.
۱) نشانه اندازه مولکولی DNA (Kb ۱).
۲) محصول PCR ژن *ureC* با آنزیم *Pfu* پلی‌مراز (bp ۱۷۱۰).

تولید آنتی‌بادی ویژه UreC در مرغ‌های ایمن‌شده با پلاسمید pCI-UreC: ارزیابی اولیه با استفاده از سرم مرغ‌های ایمن‌شده، نشان‌دهنده شناسایی اختصاصی پروتئین نوترکیب UreC توسط این آنتی‌بادی بود. در همین شرایط، سرم به‌دست‌آمده از حیواناتی که با ناقل پلاسمیدی pCI فاقد قطعه UreC (به‌عنوان کنترل منفی) تزریق شده بودند، قادر به شناسایی پروتئین نوترکیب UreC نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱) نتایج ELISA غیرمستقیم برای آنتی‌بادی به‌دست‌آمده از سرم مرغ‌های ایمن‌شده و مقایسه آن با گروه کنترل

اختصاصیت IgY جداشده از زرده تخم‌مرغ در شناسایی پروتئین UreC آنزیم اوره‌آز: نتایج این آزمایش در نمودار ۲ ارایه شده است که نشان می‌دهد IgY پس از خالص‌سازی نیز فعالیت خود را حفظ کرده است.

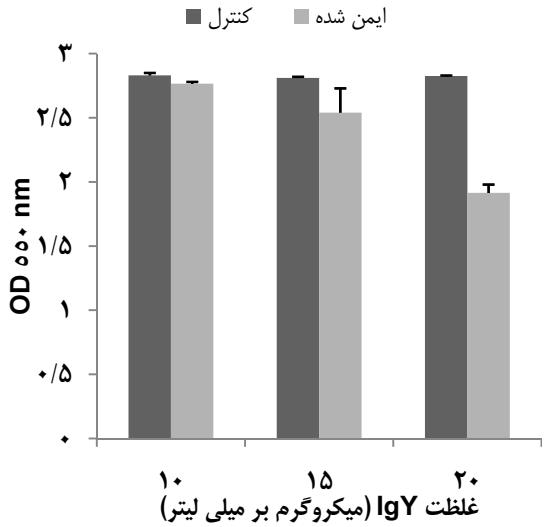


نمودار ۲) تیتراسیون IgY مرغ‌های ایمن‌شده با پلاسمید pCI-ureC به‌همراه یک یادآور پروتئینی UreC به‌وسیله ELISA غیرمستقیم

خنثی‌سازی آنزیم اوره‌آز در محیط *در شیشه* با IgY تولیدشده: ۲۰ میکروگرم از IgY خالص توانست به‌خوبی فعالیت آنزیم اوره‌آز حاصل از 10^9 باکتری را در زمان ۸ ساعت متوقف نماید. بررسی انجام‌شده روی IgY به‌دست‌آمده از مرغ‌های کنترل منفی

Archive of SID
www.SID.ir

نشان داد که حتی در غلظت‌های بالاتر نیز اثری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز *هلیکوباکتر پیلوری* نداشته است (نمودار ۳).



نمودار ۳) نمودار خنثی‌سازی اوره‌آز در محیط کشت *هلیکوباکتر پیلوری* با استفاده از IgY مرغ‌های ایمن‌شده با پلاسمید pCI-ureC در مقایسه با IgY به‌دست آمده از گروه کنترل. کاهش جذب نوری در طول موج ۵۵۰ nm نشان‌دهنده مهار فعالیت اوره‌آز باکتری در نمونه‌های حاوی IgY ضد UreC است. آزمایش با دو تکرار انجام شده و داده‌ها به‌صورت میانگین نمایش داده شده‌اند.

بحث

نیاز به جایگزینی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* از یک سو و سهولت تولید انبوه آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ [۲۱] از سوی دیگر، IgY را به‌عنوان گزینه مناسبی برای کاربرد درمانی علیه این عفونت مطرح ساخته است. تولید IgY مستلزم ایمن‌سازی پرنده با آنتی‌ژن مورد نظر است که برای این منظور در تحقیقات مختلف از عصاره لیز سلولی، آنتی‌ژن خالص یا DNA رمزکننده آنتی‌ژن استفاده شده است. عملکرد IgY تهیه‌شده علیه عصاره لیز سلول *هلیکوباکتر پیلوری* در مهار عفونت این باکتری، ثمربخش گزارش شده است [۱۲].

مطالعات به‌منظور افزایش اختصاصیت و پیشگیری از بروز واکنش‌های متقاطع با سایر باکتری‌های فلور دستگاه گوارش، بیشتر بر استفاده از آنتی‌ژن‌های خالص باکتری معطوف شده‌اند که در این میان آنزیم اوره‌آز به‌عنوان پروتئین غالب در مقایسه با سایر پروتئین‌های *هلیکوباکتر پیلوری* (با توجه به نقش مهم آن در خنثی‌نمودن محیط اسیدی معده)، از پتانسیل مطلوبی برای این منظور برخوردار است [۲۲، ۲۳]. مطالعات قبلی روی آنزیم اوره‌آز، خاصیت آنتی‌ژنیک زیرواحد C این آنزیم را به‌اثبات رسانده است [۱۶، ۲۴]. در این مطالعات، کارآیی پروتئین نوترکیب UreC در ایجاد ایمنی علیه باکتری و در مدل حیوانی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. اما آن‌چه قابل توجه است، مشکلات تولید و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب است. به همین منظور، جستجو برای یافتن روش‌های جایگزین به‌منظور ورود آنتی‌ژن به داخل بدن مورد توجه قرار گرفته است و در این میان واکسن‌های DNA، جایگاه ویژه‌ای دارند. واکسن‌های اسیدنوکلئیکی به‌علت سهولت در تولید انبوه پلاسمید نوترکیب در مقایسه با تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب و نیز افزایش مدت ایمنی به‌علت بیان مداوم و طولانی‌مدت آنتی‌ژن، سبب کاهش هزینه فرآیند ایمن‌سازی و صرفه اقتصادی در تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن خاص می‌شوند. در مورد تولید آنتی‌بادی اختصاصی در زرده تخم‌مرغ (IgY) و علیه *هلیکوباکتر پیلوری* نیز گزارشاتی در مدل ماکیان وجود دارد [۲۵]. در این روش برای تولید IgY علیه UreC *هلیکوباکتر پیلوری* از اردک استفاده شده بود، اما آنتی‌بادی به‌دست‌آمده فاقد توانایی خنثی‌نمودن فعالیت آنزیم اوره‌آز بود [۱۷]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که استفاده از یادآور پروتئینی به‌همراه واکسن‌های DNA (روش *پرایم- بوست*) شیوه موثری در تحریک ایمنی هومورال و افزایش تولید آنتی‌بادی است [۲۶]، لذا در این بررسی نیز پس از خاتمه واکسیناسیون با واکسن DNA از یادآور پروتئینی (پروتئین نوترکیب UreC *هلیکوباکتر پیلوری*) به‌منظور افزایش تولید و کارآیی IgY علیه این باکتری، استفاده شد. نتایج تیتراسیون سرم مرغ‌های ایمن‌شده نشان می‌دهد که این شیوه ایمن‌سازی با تحریک موثر ایمنی هومورال، سبب تولید آنتی‌بادی ضدUreC در پرنده و انتقال موفقیت‌آمیز آن به زرده تخم‌مرغ شده است. در مطالعات گذشته، استفاده از این روش برای تخلیص IgY فعال و کارآمد از زرده تخم‌مرغ حیوانات نشان داده شده بود [۱۶]. در این مورد نیز به‌کارگیری این روش، موجب به‌دست‌آمدن محصول فعال شد که قابلیت شناسایی و اتصال با پروتئین UreC را نشان می‌دهد (نمودار ۲). تیتراسیون IgY تولیدشده در سرم مرغ ایمن و بعد از تخلیص از زرده نشان داد که فعالیت این آنتی‌بادی طی مراحل کار کاهش نیافته و توانسته است پتانسیل کاری خود را حفظ کند. این IgY برخلاف محصول پژوهش مشابه پیشین [۱۷] می‌تواند فعالیت آنزیمی اوره‌آز را در باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* نیز خنثی نماید (نمودار ۳). از آن‌جا که تاثیر خنثی‌سازی فعالیت اوره‌آز در مهار عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* مشخص شده است [۲۷، ۲۸]، توانایی محصول IgY به‌دست‌آمده در خنثی‌نمودن اوره‌آز نشان‌دهنده پتانسیل مناسب آن برای کاربرد درمانی علیه عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* است.

نتیجه‌گیری

IgY ضد زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز *هلیکوباکتر پیلوری* می‌تواند جایگزین کمکی مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور تسریع در درمان عفونت حاصل از این باکتری باشد. استفاده از واکسن DNA به‌همراه یادآور پروتئینی، راهکار موثری در تسهیل فرآیند تولید IgY علیه آنتی‌ژن UreC باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* است و می‌تواند منجر

Archive of SID
www.SID.ir

به تولید آنتی‌بادی فعال و موثر علیه آنزیم اوره‌آز این باکتری شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات علوم پایه دانشگاه شاهد بابت حمایت مالی از این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

1- Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to H. pylori. World J Gastroenterol. 2006;12(35):5593-8.
2- Prinz C, Schwendy S, Voland P. Helicobacter pylori and gastric cancer: Fitting the global burden. World J Gastroenterol. 2006;12(34):5458-64.
3- Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. New Engl J Med. 2002;347(15):1174-86.
4- Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghighat M, Hayati M, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children (Iran). Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;54:259-61.
5- Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil: A high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. J Clin Pathol. 2004;57(1):37-42.
6- Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population-based cancer registry from Iran. Int J Cancer. 2003;107(1):113-8.
7- Sherif M, Mohran Z, Fathy H, Rockabrand DM, Rozmajzl PJ, Frenck RW. Universal high-level primary metronidazole resistance in Helicobacter pylori isolated from children in Egypt. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4832-4.
8- Graham DY, Boer WA, Tytgat GN. Choosing the best anti-Helicobacter pylori therapy: Effect of antimicrobial resistance. Am J Gastroenterol. 1996;91(6):1072-6.
9- Wang WH, Wong BC, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Cho CH, Lai KC, et al. High prevalence of Helicobacter pylori infection with dual resistance to metronidazole and clarithromycin in Hong Kong. Aliment Pharmacol Ther. 2000;14:901-10.
10- Mohammadi M, Doroud D, Mohajerani N, Massarrat S. Helicobacter pylori antibiotic resistance in Iran. World J Gastroenterol. 2005;11:6009-13.
11- Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody. Agric Biol Chem. 1990;54(10):2531-5.
12- Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5):1061-6.
13- Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. J Med Microbiol. 2003;52(3):217-22.
14- Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in genotobiotic piglets. Infect Immun. 1991;59(7):2470-5.
15- Wirth HP, Beins MH, Yang M, Tham KT, Blaser MJ. Experimental infection of Mongolian gerbils with wild type and mutant Helicobacter pylori strains. Infect Immun. 1998;66(10):4856-66.
16- Basiri H, Mousavi SL, Rasouli I, Basiri M. Production and evaluation of IgY in chicken egg yolk against Helicobacter pylori urease using different recombinant fragments of UreC. Iran J Clin Infec Diseases. 2010;5(2):89-95.
17- Kazimierczuk K, Cova L, Ndeboko B, Szczyrk U, Targosz A, Brzozowski T, et al. Genetic immunization of ducks for production of antibodies specific to Helicobacter pylori UreB in egg yolks. Acta Biochim Pol. 2005;52(1):261-6.
18- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laboratory manual. 4th ed. New York: CSHL Press; 2001.
19- Rollier C, Charollois C, Jamard C, Trepo C, Cova L. Maternally transferred antibodies from DNA-immunized avian protect offspring against Hepadnavirus infection. J Virol. 2000;74(10):4908-11.
20- Polson AMB, Wechmar V, Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun. 1980;9(5):475-93.
21- Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. J Immunol Methods. 1993;160(2):207-14.
22- Dubois A, Lee CK, Fiala N, Kleanthous H, Mehlman PT, Monath T. Immunization against natural Helicobacter pylori infection in nonhuman primates. Infect Immun. 1998;66(9):4340-6.
23- Michetti P, Corthesy-Theulaz I, Davin C, Haas R, Vaney AC, Heitz M, et al. Immunization of BALB/c mice against Helicobacter felids infection with Helicobacter pylori urease. Gastroenterology. 1994;107(4):1002-11.
24- Corthesy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, Saraga E, Vaney AC, Haas R, et al. Oral immunization with Helicobacter pylori urease B subunit as a treatment against Helicobacter infection in mice. Gastroenterology. 1995;109(1):115-21.
25- Cova L. DNA-designed avian IgY antibodies: Novel tools for research, diagnostics and therapy. J Clin Virol. 2005;34(1):70-4.
26- Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: Exciting prospects for improved vaccination. Immunol Today. 2000;21(4):163-5.
27- Corthesy-Theulaz IE, Hopkins S, Bachmann D, Saldinger PF, Porta N, Haas R, et al. Mice are protected from Helicobacter pylori infection by nasal immunization with attenuated Salmonella typhimurium phoPc expressing urease A and B subunits. Infect Immun. 1998;66(2):581-6.
28- Gomez-Duarte OG, Lucas B, Yan ZX, Panthel K, Haas R, Meyer TF. Protection of mice against gastric colonization by Helicobacter pylori by single oral dose immunization with attenuated Salmonella typhimurium producing urease subunits A and B. Vaccine. 1998;16(5):460-71.

Archive of SID

www.SID.ir