مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸۵ خرداد و تیر ۱۳۹۲، صفحات ۴۰ تا ۵۴

کاربرد بیوانفورماتیک و مهندسی ژن جهت طراحی کلون بهینه، برای افزایش تولید پروتیین فعال کننده‌ی نوتروفیل *هلیکوباکترپیلوری در اشریشیا کلی*

محمد علی حقیقی[۱]، دکتر اشرف محبتی مبارز[۲]، دکتر هاتف علی سلمانیان[۳]، دکتر محمد رضا زالی[۴]،
دکتر سید محمد موذنی[۵]، دکتر علی اصغر کارخانه[۶]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم پزشکی، گروه باکتری شناسی پزشکی mmmobarez@modares.ac.ir

دریافت: ۹۱/۵/۲ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: *پروتیین فعال کننده‌ی نوتروفیل درهلیکوباکترپیلوری (HP-NAP) از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زای این باکتری است که از اهمیت به‌سزایی در ایجاد ایمنی حفاظتی برعلیه این پاتوژن برخوردار است. این آنتی ژن کاندیدای بسیار مطرحی به‌عنوان بخشی از واکسن‌های چند قسمتی برعلیه این باکتری در مطالعات کلینیکی می‌باشد. به‌دلیل اهمیت پروتیین HP-NAP، در این مطالعه از آن به‌عنوان الگویی برای بهینه کردن ژن‌های هترولوگ که محتوای تیمین و آدنین بالا و میزان بیان پایینی در باکتری اشریشیاکلی دارند، استفاده شد.*

روش بررسی: *با کاربرد علوم بیوانفورماتیک ژن کد کننده‌ی این پروتیین برای بیان حداکثری در میزبان مربوطه بهینه و سپس ساخته شد.*

یافته‌ها: *در بهینه کردن ژن HP-NAP عوامل مختلفی تغییر داده شد. کدن‌ها به کدن‌های رایج در باکتری اشریشیا کلی تغییر کرد، محتوای G+C از ۳۸ درصد به ۴۵ درصد افزایش یافت و ساختارهای فضایی نامناسب در ساختمان دوم mRNA شکسته شد، این تغییرات منجر به طولانی شدن نیمه عمر mRNA و افزایش قابل ملاحظه‌ی بیان پروتیین نوترکیب HP-NAP به‌میزان حداقل ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر گردید.*

نتیجه‌گیری: *کاربرد ابزار بیوانفورماتیک در افزایش و بهینه‌سازی بیان پروتیین HP-NAP در باکتری اشریشیا کلی موفق بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد کاربرد این ابزارها روشی منطقی در بهینه کردن ژن‌هایی با منشا متفاوت جهت بیان در میزبان‌های بیانی دیگر باشد.*

واژگان کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، بیوانفورماتیک، بهینه‌سازی، پروتیین نوترکیب فعال کننده نوتروفیل، کلونوبیان

مقدمه

تقریبا نیمی از جمعیت جهان در بخش فوقانی دستگاه گوارش خود حامل باکتری *هلیکوباکترپیلوری* بوده، این درحالی است که شدت این عفونت درکشورهای جهان سوم بالاتر است (۲و ۱). هرچند این عفونت در اکثر موارد (۸۰ تا۹۰ درصد) بدون علایم باقی می‌ماند ولی عفونت به *هلیکوباکتر پیلوری*عامل مستعد کننده‌ی مهمی برای تکوین

۱- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه باکتری شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار پژوهشکده زیست فن آوری گیاهی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری
۴- متخصص داخلی، استاد مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۶- دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، استاد یار پژوهشکده زیست فن آوری صنعت و محیط زیست، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک وزیست فن آوری

Archive of SID
www.SID.ir

زخم پپتیک و ابتلا به سرطان معده شناخته شده است (۳). این باکتری به‌عنوان عامل سرطان‌زا از طرف سازمان جهانی بهداشت معرفی شده، در حال حاضر از دیدگاه پزشکی، مسوول بسیاری از مرگ و میرها در دنیا است (۵و ۴). شیوه‌ی درمان چند دارویی بیماران در ریشه کنی این عفونت موثر می‌باشد اما افزایش شیوع مقاومت دارویی و عفونت مجدد بعد از درمان آنتی‌بیوتیکی لزوم و اکسیناسیون را بر علیه این باکتری مورد تاکید قرار می‌دهد (۲). به‌همین منظور تحقیقات گسترده‌ای جهت شناسایی عوامل بیماری‌زایی و خواص ایمنی‌زایی آن‌ها برای طراحی و ساخت واکسنی مناسب علیه این باکتری در حال انجام است. پروتیین HP-NAP (Neutrophil Activating Protein) از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی شناخته شده در این باکتری است که نقش به‌سزایی در شکل‌گیری عفونت و تکوین علایم بیماری در میزبان را دارد. این آنتی ژن توسط تمامی سویه‌های بالینی *هلیکوباکترپیلوری* بیان شده و حضور آنتی‌بادی ضد آن در سرم بیماران مبتلا به عفونت با این باکتری دلیل بر وخامت بیماری است چرا که بیشتر در مراحل حاد بیماری حضور آن قابل مشاهده می‌باشد (۶-۸) مطالعات ساختار این پروتیین شباهت آن را به پروتیین‌های محافظت کننده DNA (DNA protecting protein)(۹) و متصل شونده به آهن (Ferritin like Protein) نشان می‌دهد (۱۱و ۱۰). خواص بیولوژیک متعدد این پروتیین در شرایط آزمایشگاهی و بالینی مورد بررسی و تایید قرارگرفته است. این پروتیین غشایی بوده و از طریق اتصال به موسین، به مخاط معده می‌چسبد. به احتمال زیاد HP-NAP پس از لیز سلولی آزاد می‌گردد و به دنبال عبور از سلول‌های اپیتلیال به بافت‌های زیرین رسیده، با تحریک سلول‌های ماست (Mast cell) ساکن در محل و تولید TNFα (Tumor Necrotic Factor Alpha) التهاب ایجاد می‌نماید. علاوه بر این با تاثیر بر روی مونوسیت‌ها با افزایش تولید فاکتوربافتی (Tissue Factor) و PAI2 (Plasminogen Activator Inhibitor-2) سرانجام تشکیل فیبرین و فعالیت‌های ترومبوتیک را افزایش می‌دهد و بدین‌ترتیب بارسوب فیبرین روی دیواره‌ی باکتری از فاگوسیت شدن آن جلوگیری می‌نماید و علاوه برآن با جلوگیری از تجزیه‌ی فیبرین و خروج ضایعات بافتی در محل عفونت از التیام بافتی جلوگیری کرده، گاستریت مزمن و جراحات بافتی ایجاد می‌نماید. این پروتیین سبب تکامل سلول‌های دندریتیک نابالغ و تمایز مونوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک بالغ می‌شود و بیان MHC II و تولید IL-12 را در این سلول‌ها افزایش می‌دهد (۷). از ویژگی‌های مهم این پروتیین در جذب و فراخوانی سلول‌های نوتروفیل در مخاط معده می‌باشد که در تکوین عفونت موثر بوده، میزان آسیب‌های بافتی بستگی به شدت حضور آن‌ها دارد. مهاجرت سریع نوتروفیل‌ها به محل عفونت با تولید اینترلوکین‌ها نه تنها شرایط کموتاکتیکی را برای حضور بیشتر نوتروفیل‌ها بلکه برای سایر سلول‌هایی نظیر مونوسیت‌ها، دندریتیک‌ها، لنفوسیت‌ها از طریق تولید CCL3 و CCL4 فراهم می‌آورد (۱۲و ۸). اشکال مونومری و دوازده وجهی پروتیین HP-NAP توانایی تحریک نوتروفیل را دارند بخش تحریک کننده‌ی نوتروفیل‌ها، هلیکس‌های H3 (L69-L75) و H4 (K89-E114) و کویل ارتباطی بین آن‌ها (H63-Thr68 وThr76-lys83) می‌باشد (۱۲و ۹). TLR2 گیرنده‌ی اختصاصی HP-NAP بر روی سلول بوده، خواص ایمونومادولاتوری این پروتیین بر روی سیستم ایمنی بدن برای تغییر سمت پاسخ‌ها از Th2 به Th1 با اتصال به این گیرنده آغاز شده و با تولید اینترلوکین‌های ۱۲ و ۲۳ مدیریت می‌گردد (۱۳). به‌دلیل این ویژگی‌ها HP-NAP ابزار جدید و مناسبی است که می‌تواند در طراحی واکسن‌های مناسب مفید باشد (۱۵و ۱۴). استراتژی کلون و بیان آنتی ژن‌های پروتیینی راهکار مناسبی جهت مطالعات ساختاری و ایمونولوژیکی آنتی‌ژن‌های میکروبی است ولی خواستگاه

Archive of SID

www.SID.ir

متفاوت ژن‌ها، تفاوت در محتوای درصد G+C و تفاوت در کدن‌های مورد استفاده در سلول‌های مختلف سبب کاهش میزان بیان پروتیین‌های نوترکیب در سیستم‌های پروکاریوتی گردیده است. راه کار مناسبی که هم‌اکنون پیش رو قرار گرفته، استفاده از بهینه سازی ژن می‌باشد. در این روش کدن کد کننده‌ی اسید آمینه در یک ژن با منشا متفاوت (Heterologous) با کدن رایج (Codon usage) همان اسید آمینه در میزبان جدید تغییر می‌یابد و سبب افزایش بیان ژن هترولوگوس می‌گردد. از این روش در مطالعات تهیه‌ی واکسن‌ها در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی (گیاهی) استفاده شده است (۱۷و ۱۶). *کاربرد این روش‌ها در اصلاح عملکرد آنزیم‌ها و بیان انبوه آن‌ها در صنعت نیز مورد توجه قرار گرفته است.* نبود راه کار مناسب در مطالعات قبلی جهت افزایش مقادیر کم بیان پروتیین نوترکیب HP-NAP در میزبان‌های بیانی همچون باکتری *اشریشیاکلی* (*E. coli*) یا *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) از مشکلات جدی کاربرد این پروتیین در مطالعات ایمنی‌زایی و تولید واکسن شمرده می‌شود (۱۸و ۷، ۲) اگر چه قبلا برای افزایش بیان این پروتیین بیشتر بر روی بهینه کردن شرایط محیط کشت تمرکز شده بود (۱۹)؛ لیکن پیشرفت علوم بیوانفورماتیک راه حل‌های منطقی را برای تغییرات بر روی خود ژن و نحوه‌ی بیان آن بدون تغییر در ردیف اسیدهای آمینه پروتیین کد شونده‌ی پیش‌رو قرار داد. هدف این مطالعه افزایش بیان پروتیین HP-NAP در باکتری *اشریشیاکلی به روش بهینه سازی ژن این پروتیین* به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی بود.

روش بررسی

هم ردیفی توالی (Alignment): توالی اسیدهای آمینه پروتیین HP-NAP درسویه‌های مختلف *هلیکو باکتر پیلوری*، از بانک ژنی (NCBI Gene Bank) استخراج و با استفاده از نرم افزار میزان شباهت آنها با هم مقایسه گردید.

بررسی جایگاه‌های‌های برش آنزیمی: جایگاه‌های برش آنزیمی در توالی ژنی HP-NAP با کاربرد نرم‌افزار تعیین شد. با الگو قرار دادن نقشه ژنتیکی پلاسمیدهای pUC57 و pET28a(+) جایگاه برش آنزیمی *BamHI* در پایین دست و *Hind*III در بالا دست این ژن تعبیه گردید.

بهینه کردن (Optimization) و کلون سازی ژن HP-NAP: توالی بازهای ژن HP-NAP (۴۳۵ bp) به‌همراه جایگاه‌های انتخاب شده برش آنزیمی، با کاربرد نرم‌افزار Optimum Gene TM Algorithm جهت بیان در باکتری *E. coli* بهینه‌سازی شد (۲۰). کلون سازی ژن بهینه شده (HP-NAP) درون پلاسمید pUC57 توسط شرکت Genscript www.genescript.com(Piscataway.Newjersy USA), انجام گردید. برای پیشگیری از هرگونه تغییر ترادف در بازها، توالی ژن سنتز شده فوق (Sequencing) توسط شرکت سازنده تعیین گردید و با کاربرد نرم‌افزار Vector NTI AdvancedTM 11(Invitrogen; USA) ترادف اسیدآمینه‌های کد شونده توسط این ژن بررسی و با توالی پروتیین مرجع مقایسه شد.

پیش بینی ساختار دوم RNA پیامبر (mRNA): پیش‌بینی و مقایسه‌ی ساختار دوم و پایداری mRNA قبل و بعد از بهینه شدن ژن HP-NAP به کمک نرم افزار Centrodfold انجام گردید (۲۱).

طراحی آغازگرها (Primer) و شرایط PCR: با الگو قرار دادن توالی بهینه شده ژن HP-NAP و توالی ژنی پلاسمیدهای pUC57 (Genscript: USA) pET28a(+)(Novagen; USA) و کاربرد نرم‌افزار آنالیز آغازگر OLIGO (OLIGO Primer Analysis Software) آغازگرهای لازم جهت آزمایش‌های تاییدی کلونینگ این ژن طراحی گردید. تکثیر ژن مورد نظر با PCR تحت برنامه‌ی دمایی شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ دوره

Archive of SID

www.SID.ir

شامل ۹۴، ۵۶ و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هر کدام یک دقیقه و در نهایت یک مرحله ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

سویه‌های باکتریایی، ناقل‌ها و آنزیم‌ها: *اشریشیاکولی* JM107، DH5α و *اشریشیاکولی* BL21-DE3 به‌ترتیب به‌عنوان میزبان‌های تکثیری و بیانی استفاده شدند. پلاسمیدهای pUC57 و pET28a(+) به‌ترتیب جهت کلون و بیان ژن هدف مورد استفاده قرار گرفتند. آنزیم‌های محدودکننده *Bam*HI و *Hin*dIII در برش‌های آنزیمی و DNAT4 لیگاز (Fermentas) در واکنش الحاق استفاده شدند. از آنزیم DNA PolymeraseTaq نیز جهت تکثیر و تایید قطعه‌ی ژن هدف در پلاسمید بیانی با PCR استفاده شد (۲).

ساب کلون ژن HP-NAP: پلاسمید pUC57+HP-NAP حاوی ژن سینتتیک HP-NAP (Accession Number:HQ831507) در میزبان *اشریشیاکولی* JM107 تکثیر شد و با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Fermentase)خالص سازی گردید و سپس جهت الحاق در پلاسمید بیانی پلاسمید pET28a(+) (Novagen) مورد هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و III *Hind* قرار گرفت (۲). قطعه‌ی بریده شده ژنی پس از خالص سازی از ژل، در پلاسمید(+)pET28a، که توسط همین دو آنزیم بریده شده بود با واکنش الحاق (Ligation) وارد گردید. در تمامی مراحل برای تخلیص قطعه و یا پلاسمید بریده شده از روی ژل از کیت تخلیص (Roche) استفاده شد. محصول الحاق (پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-NAP) به باکتری *اشریشیاکولی* JM107 انتقال داده شد. غربالگری باکتری‌های حامل پلاسمیدهای مورد نظر به کمک روش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن HP-NAP بهینه شده، انجام گردید. جهت تایید نهایی کلون شدن ژنHP-NAP در pET28a(+)، از هضم آنزیمی آنزیم‌های محدودکننده یاد شده روی پلاسمیدهای نوترکیب خالص شده، استفاده شد (۱۴).

بیان و خالص‌سازی پروتیین نوترکیب HP-NAP: پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-NAP به میزبان بیانی *اشریشیاکولی* BL21-DE3 انتقال داده شد. جهت غربالگری توانایی بیان باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب رشد یافته بر روی LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، کشت مجزای کلنی در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین تهیه و در انکوباتور با حرکت دورانی (۲۰۰ دور در دقیقه) و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب گرماگذاری گردید و از آن‌ها جهت کشت مجدد ۱۵ محیط مایع LB با شرایط قبل استفاده شد و زمانی که کدورت محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ تا ۱ رسید، پلاسمیدهای نوترکیب با ۱ میلی‌مولار ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) القا شدند. پنج نمونه در زمان‌های صفر، سه، پنج، هفت، هجده ساعت از کشت باکتری‌های القا شده تهیه و میزان بیان پروتیین در زمان‌های مختلف با کمک روش PAGE-SDS در ژل ۱۲/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با کوماسی R-250 مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). سلول‌های باکتری در محیط کشت پس از القا در ساعت‌های مذکور جمع‌آوری و رسوب داده شدند. رسوب باکتری‌های مذکور بعد از شستشو شدن با بافر تخریب (۵۰ میلی‌مول NaH_2PO_4، ۳۰۰ میلی‌مول NaCl، ۱۰ میلی‌مول ایمیدازول pH=۸) مجددا در همین بافر به همراه آنزیم لیزوزیم (۵mg/ml) و PMSF (۱۷۰µg/ml) به شکل سوسپانسیون در آمده و بر روی یخ در ده نوبت با فاصله‌ی چهل و پنج ثانیه و در هر نوبت سی ثانیه با فرکانس ۰/۶ ثانیه و توان ۷۰ درصد تحت اثر امواج فراصوت قرار گرفتند تا به‌طور کامل متلاشی شوند. در مرحله‌ی بعد لیزات سلولی در ۲۰۰۰۰×g برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. به منظور

Archive of SID
www.SID.ir

پیگیری نحوه‌ی بیان پروتیین، به شکل رسوبی (Inclusion Body) و یا محلول، برای تعیین روش مناسب تخلیص پروتیین با استفاده از رزین نیکل، (QIAGEN) یک نمونه از مایع رویی به تنهایی و یک نمونه از رسوب پس از حل شدن در بافر B (۱۰۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۱۰ میلی‌مولار Tris-Cl، ۸ مولار اوره pH=۸) به‌وسیله رزین نیکل و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب HP-NAP یک کشت شبانه به شرحی که قبلا داده شد تهیه و از آن برای کشت مجدد ۱۰۰×۱۰ میلی‌لیتر از محیط تازه LB در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری استفاده گردید. زمانی‌که جمعیت باکتری‌ها به کدورت مناسب رسیدند با ۱ میلی‌مول IPTG القا و به‌مدت پنج ساعت بعد از آن در ۳۷ درجه‌ی ۸ سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این زمان، سلول‌های باکتری با سانتریفوژ در ۹۰۰۰×g جمع‌آوری و با بافر Tris بیست میلی‌مولار شستشو داده شدند. با انتخاب روش تخلیص پروتیین‌های نوترکیب تحت شرایط رسوبی (Denature Condition) رسوب سلول‌های باکتری در بافر B حل و پس از انتقال به ستون رزین نیکل (QIAGEN)، با بافر C (۱۰۰ میلی‌مول NaH2PO4، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl و ۸ مول اوره، pH=۶/۳) شستشو شده و در پایان با استفاده از بافر استخراج (بافر C حاوی ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار pH=۶/۳)، پروتیین از ستون جدا و جمع‌آوری شد (۲۲و ۱۴). میزان خلوص پروتیین‌ها به کمک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفته، غلظت پروتیین با روش براد فورد تعیین و مقدار کل پروتئین خالص شده از یک لیتر کشت باکتری محاسبه گردید (۲۳). پیش‌بینی وزن ملکولی پروتیین بیان شده درپلاسمید بیانی با استفاده از نرم افزار ExPASy- Compute pI/Mw tool انجام گردید.

وسترن بلات: پروتئین نوترکیب از ژل SDS-PAGE به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (PVDF) توسط دستگاه بلات Bio-Rad در شرایط مرطوب منتقل شد. برای کنترل انتقال پروتیین از مارکر پروتیینی از پیش رنگ شده استفاده گردید (Pre-stain ladder SM0607). مسدود سازی (Blocking) غشای PVDF با محلول TBS (۵۰ میلی‌مولار Tris، ۱۵۰ میلی‌مولار Nacl) حاوی ۵ درصد شیر خشک (Fat Free Milk) به‌مدت ۳ ساعت انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد غشا با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی برعلیه 6His-tag (Roche) در بافر TBS-T بار قت ۱:۱۰۰۰ به‌مدت ۳ ساعت در دمای اتاق مجاور شد. شستشو با بافر TBS-T (TBSحاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) انجام شد. پس از شستشوی نهایی غشا با محلول ۰/۰۶ درصد DAB (۵۰ میلی‌مولار Tris به همراه یک دهم درصد آب اکسیژنه) قرار گرفت و پس از ظهور باند واکنش با آب مقطر متوقف شده و از آن عکس تهیه گردید (۱۶).

یافته‌ها

بررسی هم‌ردیفی پروتیین HP-NAP: ژن HP-NAP در تمامی سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* حفاظت شده و مقایسه‌ی ترادف اسیدهای آمینه پروتیین HP-NAP در بسیاری ازسویه‌های استاندارد و بیماری‌زای این باکتری همسانی (Identity) ۹۸٪ الی ۱۰۰٪ را در بین آن‌ها مشخص می‌نماید.

بهینه و کلون‌سازی توالی ژن *HP-NAP*: ترادف کد کننده‌ی ژن HP-NAP با تغییر عوامل متعددی که می‌توانند بر روی بیان آن در باکتری *اشریشیاکلی* تاثیر گذار باشند، بهینه گردید. این بهینه سازی در ۲ بخش قابل بررسی بود که در بر گیرنده‌ی تنظیم Codon usage bias (شکل ۱) و افزایش درصد محتوای سایتوزین و گوانین می‌شد (شکل ۲).

افزایش شاخص CAI (Codon Adaptation Index) نشان دهنده‌ی افزایش کدون‌های مورد استفاده برای بیان این ژن در باکتری *اشریشیاکلی* است (شکل ا- الف). پراکندگی درصد

Archive of SID

www.SID.ir

کاربرد کدن‌های مورد استفاده (Frequency of Optimal Codon) در بعد از بهینه شدن به کمترین حد ممکن کاهش یافته و تغییرات با انتخاب کدن‌هایی بوده است که در مسیر متابولیسم سلول *اشریشیاکلی* بیشترین کاربرد را داشته‌اند (شکل ۱- ب). انتخاب و تغییر کدن مناسب به‌نحوی بوده که محتوی سیتوزین+ گوانین از ۳۸ درصد حد اکثر به ۴۵ درصد افزایش یافته است (شکل ۲). در مراحل بهینه‌ی کردن ساختارهای Stem- Loop در mRNA اولیه که منجر به اختلال در اتصال ریبوزوم می‌گردد، برداشته شده و این تغییر با مقایسه‌ی بین ساختمان دوم mRNA در قبل و بعد از بهینه‌سازی ژن HP-NAP در شکل ۳ قابل مشاهده است. مقایسه‌ی تغییر در بازهای قبل و بعد از بهینه شدن ژن HP-NAP به‌وضوح میزان کم کدون‌های مورد استفاده در باکتری *اشریشیاکلی* را قبل از تغییر این ژن نشان می‌دهد (شکل ۴). ژن HP-NAP با موفقیت پس از بهینه‌سازی در پلاسمید pUC57 توسط شرکت سازنده کلون سازی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی ژن بهینه ساخته شده و مقایسه‌ی هم ردیفی ترجمه‌ی ترادف اسید آمینه کد شده توسط آن با پروتیین هدف هیچ‌گونه تغییری را در اسیدهای آمینه کد شونده به‌وسیله‌ی ژن بهینه شده نشان نمی‌دهد (شکل ۵) و تایید می‌نماید که اعمال تغییرات روی ژن بدون هیچ‌گونه تغییری بر روی ردیف اسیدهای آمینه در پروتیین هدف بوده است. نتایج مقایسه‌ای سایر تغییرات در شکل ۶ آمده است.

آغازگرهای طراحی شده: آغازگرهای پیش رونده (Forward) با ترادف 5 GGA,TCC,ATG,AAA,ACC,TTC,GA 3 و معکوس (Reverse) با ترادف 5 AAGCTTTTACGCCAGGTGC 3 (هر کدام ۲۰ باز) توانایی شناسایی ژن بهینه شده HP-NAP را در روی هر یک از پلاسمیدهای pET28a و pUC57 دارا می‌باشد. در طراحی آغازگرها ملاحظات لازم برای پیشگری از تشکیل ساختارهای نامناسب اعم از لوپ، دایمر و یکسان بودن طول آغازگرها و نزدیک بودن دمای آنیلینگ و اتصال اختصاصی رعایت گردیده است.

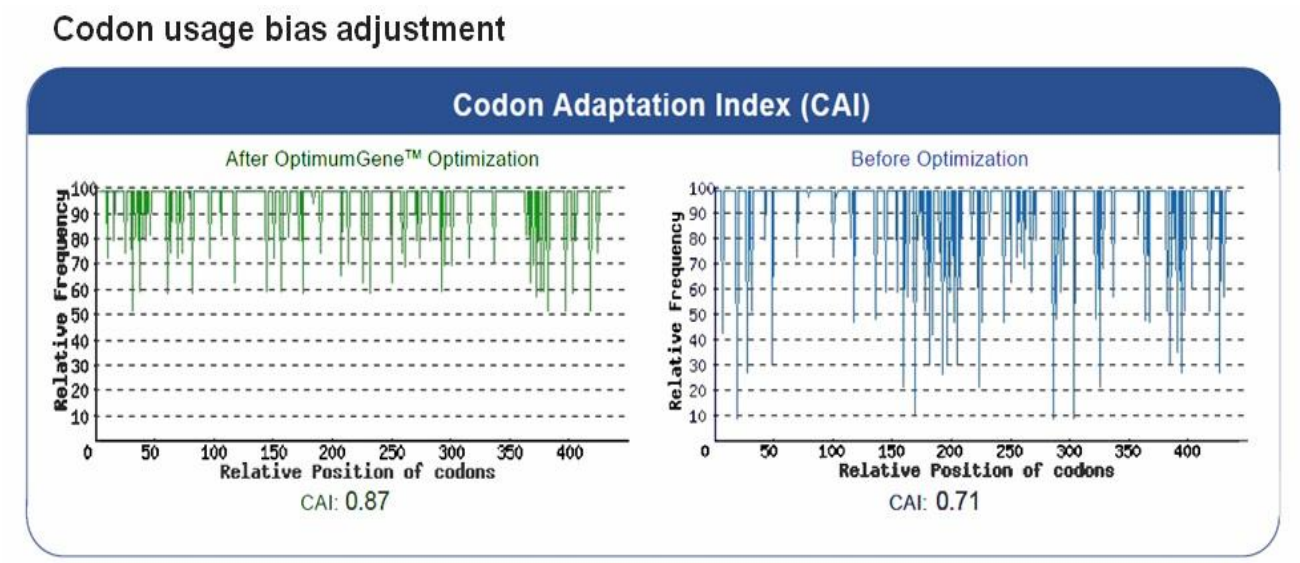
ساب کلون‌سازی در pET28a(+): الحاق ژن بهینه شده HP-NAP بدرون پلاسمید pET28a(+) با موفقیت انجام شد. نتایج آزمایش PCR با آغازگرهای طراحی شده و تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۴۷(bP) باز (شکل ۷) و همچنین خروج قطعه‌ای با همین اندازه در نتیجه‌ی هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدوداثر *Bam*HI و *HindIII* برروی پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-NAP این الحاق را تایید می‌نماید (شکل ۸).

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب HP-NAP: نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتیین در محدوده‌ی باند ۲۰ کیلودالتونی راهنمای وزنی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۲۰۴۷۷ دالتون پیش‌بینی شده همخوانی دارد (شکل ۹- الف) وزن خود پروتیین حدود ۱۶۹۳۳ دالتون است (۱۴۴ اسید آمینه) و اضافه شدن ۳۴ اسید آمینه مربوط به جایگاه چند گانه کلونینگ (Multiple Cloning Site) پلاسمید pET32a(+) به ابتدای آن موجب افزایش ۳/۵ کیلودالتونی آن شده است. بیان این پروتیین از ساعت سوم آغاز و در ساعت پنجم به بیشترین مقدار خود رسید بین ساعت پنجم، هفتم و القای شبانه تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت. با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که بیشترین مقدار پروتئین نوترکیب به‌صورت ذرات جامد غیر محلول (اینکلوژن) در فاز رسوبی قرار دارند. رسوبی بودن این پروتیین با نتایج به‌دست آمده از تخلیص فاز مایع حاصل از لیزات سلول با روش Native و استفاده از بافرهای فاقد اوره نیز تایید گردید و مشخص شد تنها مقادیر اندکی از پروتیین در فاز مایع قرار دارد. بررسی الکتروفورتیک نتایج تخلیص پروتیین نوترکیب حاکی از خلوص قابل توجه این پروتئین می‌باشد (شکل ۹-الف). نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ بیان این پروتیین را به‌طور اختصاصی تایید کرده و

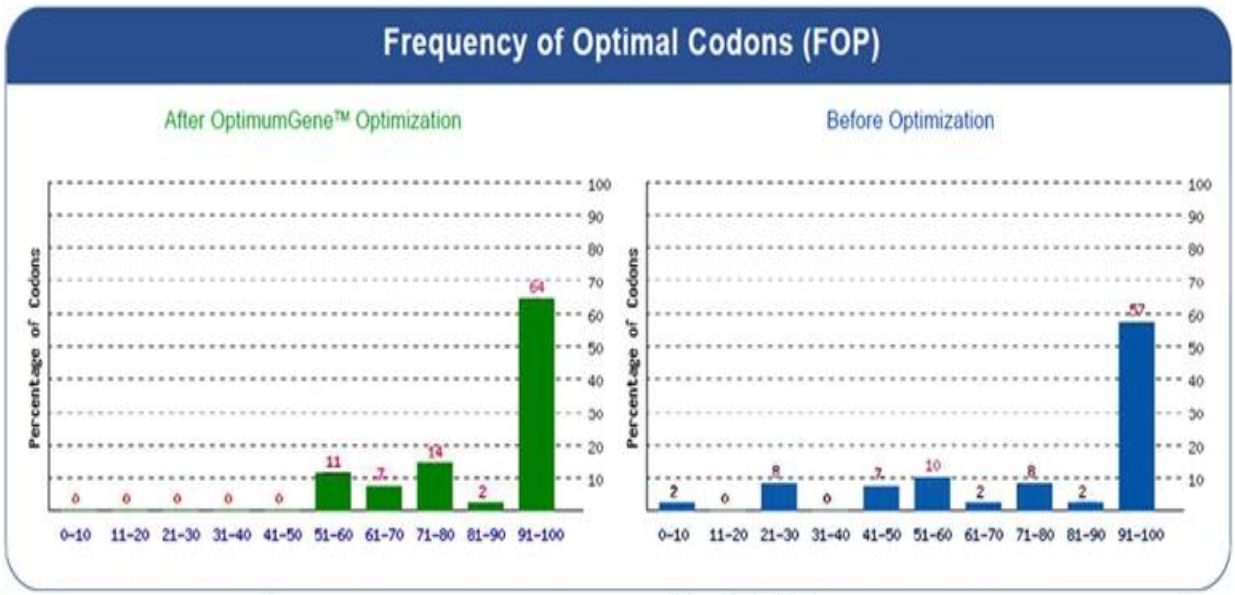
Archive of SID

www.SID.ir

نشان می‌دهد از درجه‌ی خلوص بالایی برخوردار است (شکل ۹- ب). براساس اندازه‌گیری با روش برادفورد (به‌همراه استاندارد BSA) و اسپکتروفتومتری، استحصال پروتیین رسوبی ازیک لیتر کشت باکتری حدودا میزان ۸۰۰ میلی‌گرم تعیین شد.

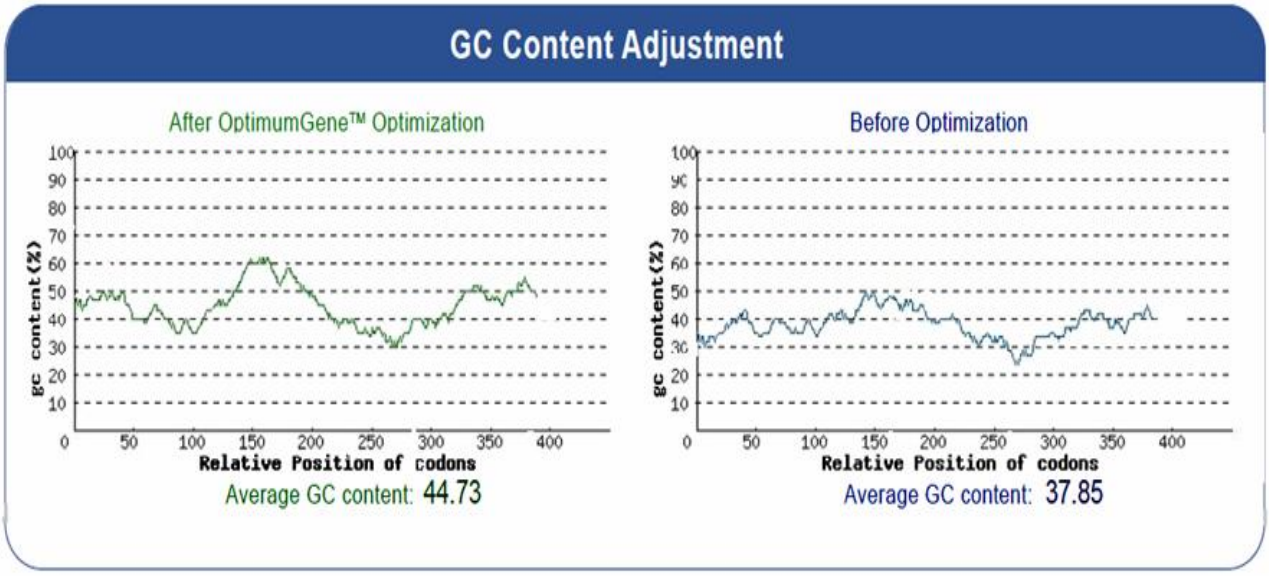


شکل۱- الف: توزیع وفرکانس Codon usage در طول ژن HP-NAP. آیده آل ترین مقدار شاخص CAI برای بیان یک ژن برابر۱ است ومقادیر بالاتر از۰/۹ به معنی سطح بیان حداکثری است (High expression)

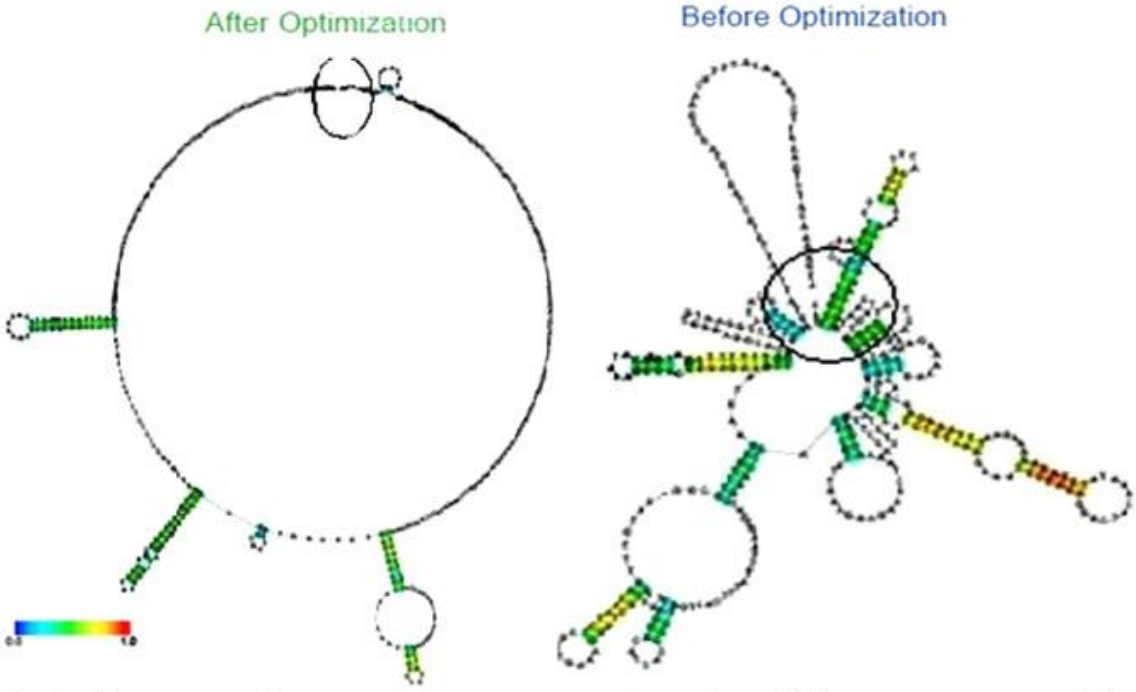


شکل۱- ب: فرکانس توزیع کدون ها درژن HP-NAP بین گروه های مختلفی که بر اساس درصد کاربری آنها در باکتری *اشریشیا کلی* تقسیم شده اند. مقایسه قبل وبعد از بهینه سازی تجمع کدون های بهینه شده در گروه های با درصد کاربری بالاتر نشان می دهد

www.SID.ir



شکل۲: مقایسه محتوای درصد سیتوزین گوانین قبل وبعد ازبهینه سازی ژنHP-NAP.



شکل۳: مقایسه ساختار دوم mRNA قبل وبعد از بهینه سازی ژن. دایره بر روی شکل موقعیت جایگاه اتصال ریبوزوم را نشان می دهد. درحالت بهینه این جایگاه برای اتصال به ریبوزوم هیچگونه محدودیت فضایی ندارد

www.SID.ir

```
Optimized     7   ATGAAAACCTTCGAAATCCTGAAACACCTGCAAGCCGACGCCATCGTTCTGTTTATGAAA
Original      7   ATGAAAACATTTGAAATTCTAAAACATTTGCAAGCGGATGCGATCGTGTTATTTATGAAA

Optimized    67   GTCCACAACTTCCACTGGAATGTCAAAGGCACCGATTTCTTTAACGTTCATAAAGCGACG
Original     67   GTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAGGCACCGATTTTTTCAATGTGCATAAAGCCACT

Optimized   127   GAAGAAATTTATGAAGAATTTGCGGACATGTTCGATGACCTGGCCGAACGTATCGTCCAG
Original    127   GAAGAAATTTATGAAGAGTTTGCGGACATGTTTGACGATCTCGCTGAAAGGATCGTTCAA

Optimized   187   CTGGGTCATCACCCGCTGGTGACCCTGAGTGAAGCAATTAAACTGACGCGCGTCAAAGAA
Original    187   TTAGGGCATCACCCCTTAGTCACTTTATCCGAAGCGATCAAACTCACTCGTGTTAAAGAA

Optimized   247   GAAACCAAAACGAGCTTTCACTCTAAAGATATCTTCAAAGAAATCCTGGAAGACTACAAA
Original    247   GAAACTAAAACGAGCTTCCACTCTAAAGACATCTTTAAAGAAATTCTAGAGGACTACAAA

Optimized   307   TACCTGGAAAAAGAATTCAAAGAACTGAGCAACACCGCAGAAAAAGAAGGCGATAAAGTG
Original    307   TATCTAGAAAAAGAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGCTGAAAAAGAAGGCGATAAAGTT

Optimized   367   ACCGTTACGTACGCTGACGACCAACTGGCGAAACTGCAAAAATCAATCTGGATGCTGCAA
Original    367   ACCGTAACTTATGCGGATGATCAATTAGCCAAGTTGCAAAAATCCATTTGGATGCTGCAA

Optimized   427   GCGCACCTGGCGTAA
Original    427   GCCCATTTGGCTTAA
```

شکل ٤: مقایسه ترادف ژن HP-NAP قبل وبعد از بهینه سازی ژن . رنگ قرمز بازهای تغییر یافته را نشان می دهد .

```
Optimized     1   MKTFEILKHLQADAIVLFMKVHNFHWNVKGTDFFNVHKATEEIYEEFADMFDDLAERIVQ
Original      1   MKTFEILKHLQADAIVLFMKVHNFHWNVKGTDFFNVHKATEEIYEEFADMFDDLAERIVQ

Optimized    61   LGHHPLVTLSEAIKLTRVKEETKTSFHSKDIFKEILEDYKYLEKEFKELSNTAEKEGDKV
Original     61   LGHHPLVTLSEAIKLTRVKEETKTSFHSKDIFKEILEDYKYLEKEFKELSNTAEKEGDKV

Optimized   121   TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA*
Original    121   TVTYADDQLAKLQKSIWMLQAHLA*
```

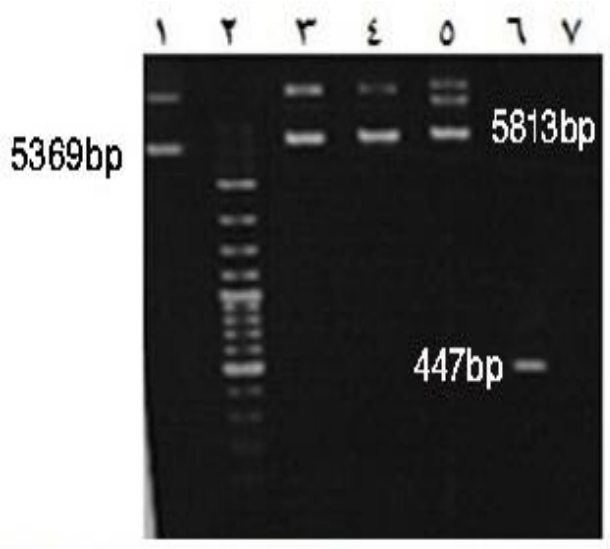
شکل۵: هم ردیفی اسیدهای آمینه کد شده توسط ژن HP-NAP در قبل وبعد از بهینه سازی

www.SID.ir

Restriction Enzymes	Optimized	Original
* Green: filtered sites: Blue: checked sites (not filtered); Red: kept sites.		
HindIII(AAGCTT)	1(442)	1(442)
BamHI(GGATCC)	1(1)	1(1)
Polymerase slippage site 1	0	0
Polymerase slippage site 2	0	0
Ribosome binding site	0	0

CIS-Acting Elements	Optimized	Original
E.coli_RBS(AGGAGG)	0	0
PolyT(TTTTTT)	0	1
PolyA(AAAAAAA)	0	0
Chi_sites(GCTGGTGG)	0	0
T7Cis(ATCTGTT)	0	0

شکل۶: بررسی وجود سایر ترادف های اختصاصی در HP-NAP اولیه و بهینه شده.



شکل ۷: تایید قطعه ژنی HP-NAP در پلاسمید pET28a(+)

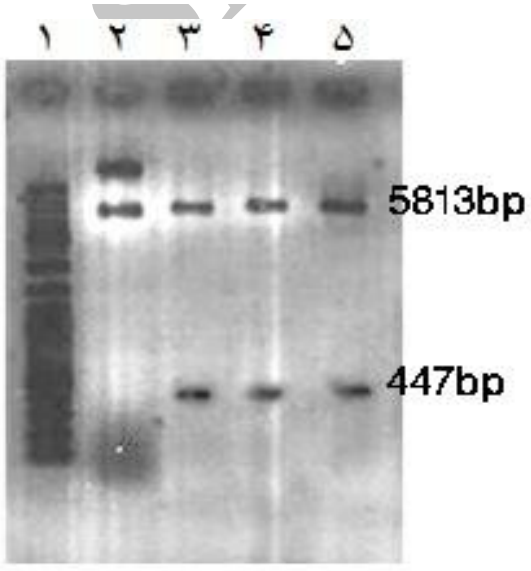
۱- پلاسمید pET28a (+) بدون حضور قطعه HPNAP

۲- مارکر Mix-DNA

۳-۴-۵- کلون‌های مختلف پلاسمید pET28a (+) با حضور قطعه HPNAP

۶- آزمایش PCR و محصول تکثیر ژن Nap در پلاسمید نوترکیب pET28a(+)-NAP

۷- کنترل منفی



شکل ۸: نتیجه هضم آنزیمی حامل بیانی pET28a-Nap

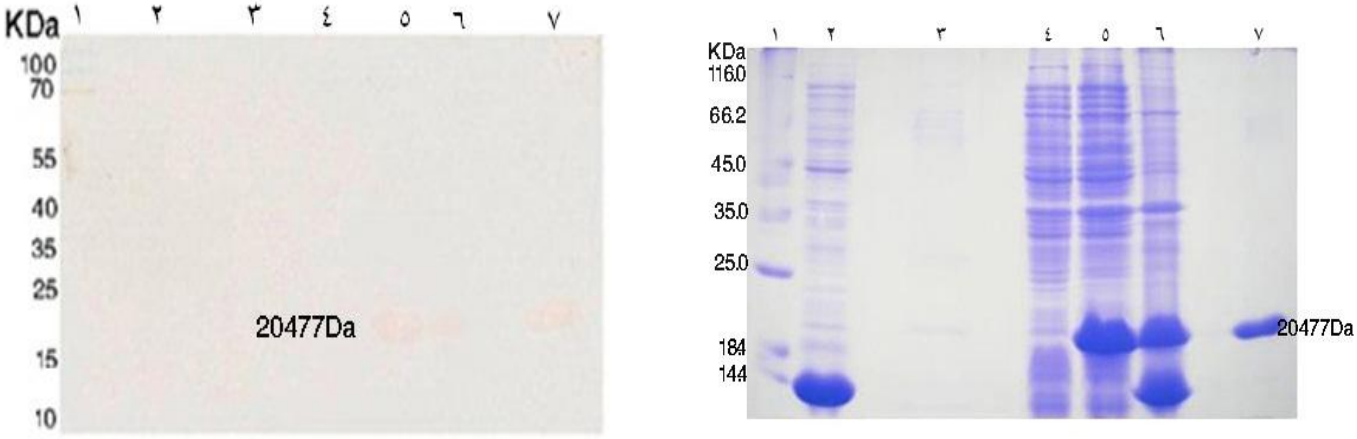
۱- مارکر DNA

۲- پلاسمید pET28a-Nap هضم نشده

۳- الی۵- کلون‌های مختلف pET28a(+)-NAP و خروج قطعه HP-NAP

در نتیجه هضم آنزیمی همزمان آنزیم‌های BamHI و HindIII

www.SID.ir



شکل راست ۹- الف: تخلیص، بیان و وضعیت حلالیت پروتیین HP-NAP در ژل SDS-PAGE ۱۲٪

۱- راهنمای وزنی پروتیین SM0431 ۲- محلول رویی حاصله از شکست سلول با لیزوزیم و امواج فرا صوتی ۳- استخراج پس از عبور محلول‌رویی از رزین نیکل با روش Native با استفاده از بافر شستشوی بدون اوره حاوی ۲۵۰ میلی‌مول ایمیدازول ۴- سویه حاوی پلاسمید القا نشده ۵- بیان پروتیین HP-NAP پس از ۵ ساعت القای باکتری اشریشیاکولی BL21-DE3 حاوی پلاسمید pET28a(+)-HP-NAP ۶- رسوب حاصله از شکست سلول با لیزوزیم و امواج فرا صوتی حل شده در بافر هشت مولار اوره ۷- مرحله‌ی پایانی تخلیص پروتیین نوترکیب HP-NAP با روش‌های Denature با استفاده از بافر شستشوی (Buffer C) حاوی اوره هشت مولار و ۲۵۰ میلی‌مول ایمیدازول.

***شکل چپ ۹- ب:** (الگوی قرارگیری نمونه‌ها در این ژل با ژل تصویر راست یکسان است). وسترن بلات با آنتی‌بادی ضد ساختار پلی‌هیستیدین متصل شده به پروتیین نو ترکیب HP-NAP.*

۱- راهنمای وزنی پروتیین (Prestain ladder)SM0671، ۵- و ۷- جواب مثبت پاسخ شماره ۶ در ژل به‌طور ضعیف دیده می‌شود. بقیه‌ی جواب‌ها نیز مطابق انتظار منفی است.

بحث

شیوع جهانی عفونت با *هلیکوباکترپیلوری* در جوامع بشری و افزایش بروز مقاومت دارویی، ساخت و طراحی واکسن را به‌عنوان منطقی‌ترین روش مبارزه برعلیه این عفونت، پیش روی محققین قرار داده است (۱). در بین انواع آنتی ژن‌های شناخته شده از *هلیکوباکترپیلوری*، HP-NAP دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که سبب شده محققین آن را انتخاب مناسبی برای ساخت واکسن بر علیه این عفونت و حتی بعضی از بیماری‌های دیگر نیز بدانند (۸و ۷). پروتیین HP-NAP عضو گروه پروتیین‌های شبه فریتین است (Ferritin-Like Proteins) و بررسی‌های هم ردیفی در این مطالعه نشان می‌دهد تنوع این پروتیین در بین سویه‌های مختلف بسیار کم و توالی آن در بین آن‌ها حفاظت شده است (۱۳). در این مطالعه با بهره‌گیری همزمان از ابزارهای بیوانفورماتیک و تجربیات عملی سعی شد تا با اتخاذ روشی منطقی مشکل کاهش بیان آنتی ژن HP-NAP که از جدی‌ترین مشکلات پیش روی تولید و کاربرد این پروتیین است، مرتفع گردد. خواستگاه متفاوت و بالا بودن محتوی آدنین و تیمین این پروتیین از مهمترین دلایل کاهش بیان آن در میزبان‌های پروکاریوتیک مثل باکتری *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سابتیلیس* می‌باشد (۱۰و ۲). این اشکال به همراه فاکتورهای متعددی که بیان ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند به کمک ابزارهای بیوانفورماتیک تصحیح و سرانجام ژنی طراحی و ساخته شد که پیش‌بینی گردید پروتیین HP-NAP را در مقادیر بالایی در میزبان بیانی *اشریشیاکلی* بیان کند. از عوامل موثر در افزایش این پتانسیل، ارتقای محتوای

Archive of SID
www.SID.ir

سیتوزین گوانین بود که سبب افزایش طول عمر mRNA می‌شود. علاوه بر این شکست ساختارهای نامناسبی مثل Stem-loop که ممانعت فضایی در چسبیدن mRNA به جایگاه اتصال ریبوزوم ایجاد می‌کنند و حذف عناصر Negative Cis-Acting Sites افزایش بیان را ترغیب می‌نماید. در مطالعات قبلی نیز کاربرد بیوانفورماتیک در بهینه‌سازی بیان ایمونوژن چند قسمتی تهیه شده از آنتی ژن‌های باکتری *اشریشیاکلی* O157 H:7 جهت افزایش بیان در گیاه *موفق بوده است* (۲۴). در این مطالعه تجربیات عملی درکلون و بیان این ژن بهینه شده درمی بان بیانی *اشریشیاکلی* و تولید پروتیین نوترکیب HP-NAP، صحت پیش‌بینی‌های انجام شده توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک را تایید کرده، موفقیت این روش را در افزایش قابل ملاحظه تولید پروتیینی که مقادیر کم بیان آن در مطالعات قبلی اشاره شده بود را نشان می‌دهد (۱۸و ۱۰، ۲). در مقایسه با مطالعات قبلی که با تغییر و کنترل شرایط کشت بیان این پروتیین را افزایش می‌داد (۱۹)، بهینه‌سازی در سطح ژن ضمن اینکه بیان این پروتیین را در ساده‌ترین شرایط کشت با مقادیر قابل توجهی افزایش داده از سرعت تولید بالاتری نیز برخوردار بود (۵ ساعت در مقابل ۲۴ ساعت). که این مساله در کاهش هزینه‌های تولید حایز اهمیت است بیشترین مقدار بیان این پروتیین در مطالعه‌ای که از اتصال این پروتیین با پروتیین MBP(Maltose Binding Protein) انجام شده بود، صد میلی‌گرم در لیتر بوده است که این مقدار در مقایسه با مقدار بیان این پروتیین در مطالعه (۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) حاضر بسیار پایین‌تراست (۱۸). از مجموع نتایج بلاتینگ پروتیین نوترکیب تولید شده با آنتی‌بادی ضد هیستیدین و تعیین ترادف صحت پروتیین تولیدی تایید می‌شود.

نتیجه گیری

کاربرد ابزار بیوانفورماتیک در بهینه کردن ژن HP-NAP جهت تولید انبوه این پروتیین موفق بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد کاربرد این ابزارها روشی منطقی در بهینه کردن ژن‌هایی با منشا متفاوت جهت بیان در میزبان‌های بیانی دیگر باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پروژه دکتری می‌باشد که توسط دانشگاه تربیت مدرس حمایت مالی شده است. از مرکز تحقیقات گوارش و کبد، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری که در اجرای این تحقیقات همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌گردد.

References

1- Agarwal K, Agarwal S. Helicobacter pylori vaccine: from past to future. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83: 169-75.

2- Iankov ID, Haralambieva IH, Galanis E. Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *Vaccine*. 2010; 29: 1710-20.

3- Del Giudice G, Malfertheiner P, Rappuoli R. Development of vaccines against Helicobacter pylori. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8: 1037-49.

4- Selgrad M, Malfertheiner P. New strategies for Helicobacter pylori eradication. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8: 593-7.

5- Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial

Archive of SID

www.SID.ir

interactions in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology*. 2008; 134: 306-23.

6- De Bernard M, D'Elios MM. The immune modulating activity of the Helicobacter pylori HP-NAP: Friend or foe? *Toxicon*. 2009 15; 56: 1186-92.

7- Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, et al. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of Helicobacter pylori is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med*. 2000; 191: 1467-76.

8- D'Elios MM, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, de Bernard M. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50: 157-64.

9- Kottakis F, Papadopoulos G, Pappa EV, Cordopatis P, Pentas S, Choli-Papadopoulou T. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein activates neutrophils by its C-terminal region even without dodecamer formation, which is a prerequisite for DNA protection--novel approaches against Helicobacter pylori inflammation. *FEBS J*. 2008; 275: 302-17.

10- Tonello F, Dundon WG, Satin B, et al. The Helicobacter pylori neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol Microbiol*. 1999; 34: 238-46.

11- Dundon WG, Polenghi A, Del Guidice G, Rappuoli R, Montecucco C. Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in Helicobacter pylori. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 199: 143-9.

12- Choli-Papadopoulou T, Kottakis F, Papadopoulos G, Pendas S. Helicobacter pylori neutrophil activating protein as target for new drugs against H. pylori inflammation. *World J Gastroenterol*. 2011; 7; 17: 2585-91.

13- Amedei A, Cappon A, Codolo G, et al. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1092-101.

14- Iankov ID, Penheiter AR, Carlson SK, Galanis E. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for detection of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *J Immunol Methods*. 2012; 384: 1-9.

15- Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular Helicobacter pylori vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology*. 2008; 135: 787.

16- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of Escherichia coli O157: H7. *Vaccine.* 2010; 28: 6923-9.

17- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. Immunogenicity of a plant-derived edible chimeric EspA, Intimin and Tir of Escherichia coli O157: H7 in mice. *Plant Sci*. 2010; 180: 620-7.

18- Kang QZ, Duan GC, Fan QT, Xi YL. Fusion expression of Helicobacter pylori neutrophil-activating protein in E.coli. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 454-6.

19- Niccolai A, Fontani S, Kapat A, Olivieri R.

Archive of SID

www.SID.ir

Maximization of recombinant Helicobacter pylori neutrophil activating protein production in Escherichia coli: improvement of a chemically defined medium using response surface methodology. *FEMS.* 2003; 221: 257-62.

20- Amani J, Mousavi SL, Rafati S, Salmanian AH. In silico analysis of chimeric espA, eae and tir fragments of Escherichia coli O157:H7 for oral immunogenic applications. *Theor Biol Med Model*. 2009; 6: 28.

21- Sato K, Hamada M, Asai K, Mituyama T. CentroidFold: a web server for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37: W277-W80.

22- Aghbaba H, Mohabati Mobarez A, Behmanesh M, Khoramabadi N, Mobarhan M. Production and purification of mycolyl transferase B of Mycobacterium tuberculosis. *Tanaffos*. 2011; 10: 23-30.

23- Dakterzada F MMA, Habib Roudkenar M, Forouzandeh M. Cloning and expression of N-terminal domain of pseudomonas aeruginosa flagellin and evaluation of antibodies raised against it on motility inhibition of pseudomonas aeroginosa. *J Zanjan Uni Med Sci.* 2012; 20: 1-11.

Archive of SID

www.SID.ir

Application of Bioinformatics and Genetic Engineering for Designing Optimized Cloning and Overexpression of Neutrophil Activating Protein of *Helicobacter pylori* in *Escherichia coli*

Haghighi MA[1], Mohabati Mobarez A[1], Salmanian AH[2], Zali MR[3], Moazzeni SM[4], Karkhane AA[5]

[1]Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Dept. of Plant Biotechnology. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

[3]Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases (RCGLD), University of Shahid Beheshti Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4]Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[5]Dept. of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Corresponding Author: Mohabati Mobarez A, Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran**.**

E.mail: mmmobarez@modares.ac.ir

Received: 23 Jul 2012 **Accepted:** 3 Feb 2013

***Background and Objective*:** As the main virulence factor of *Helicobacter pylori*, HP-NAP has an important role in immunoprotection against this pathogen. This antigen is a strong candidate as a part of multi-component vaccine in the clinical trial against this bacterium. Due to NAP importance, it was used in this study as a template for optimization of heterologous genes with a low A-T content and low expression in *E. coli*.

***Materials and Methods*:** A synthetic single gene that could reach the highest level of expression in the host was designed by using bioinformatics tools.

Results: A number of factors that influence gene expression level were changed for *HP-NAP* gene optimizing: the codon usage bias in *E. coli* was changed; the G+C content was upgraded from 38% to 45%; and the stem-loop structure was broken. These could result to prolong of the half-life of the mRNA and overexpression of recombinant of HP-NAP protein up to 800 mg per liter.

Conclusion: Applying of bioinformatics tools was appropriated to optimize of HP-NAP overexpression in *E. coli*. From our results, it appears that combination of *In Silico* and experimental approach is a logical approach for expression of heterologous genes in another host.

Keywords: Helicobacter pylori, Bioinformatics, Optimization, Recombinant HP-NAP, Cloning, Expression.

Archive of SID

www.SID.ir