Archive of SID

تحقیقی

بیان ژن leoA هلیکوباکترپیلوری در سلول‌های تخمدان همستر چینی به روش RT-PCR

نغمه میرابوالقاسمی[۱]، دکتر عباس دوستی*[۲]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

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

چکیده

زمینه و هدف : *عفونت هلیکوباکترپیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن باکتریایی در جهان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه است. ژن leoA نقش مهمی در بیماری‌زایی ایفا می‌کند و نقش اصلی این ژن افزایش ترشح سم توسط باکتری است. این مطالعه به منظور جداسازی و کلون‌سازی ژن leoA در وکتور بیانی pEGFP-C2 و بررسی بیان آن به روش RT-PCR در سیستم یوکاریوتی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ژن leoA از ژنوم هلیکوباکترپیلوری سویه استاندارد (ATCC 43504) به روش PCR تکثیر و جداسازی شد. سپس با روش کلون‌سازی T/A در ناقل pTZ درج گردید. ساب کلونینگ این ژن در وکتور بیانی pEGFP-C2 با آنزیم لیگاز انجام شد. سپس سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA به روش الکتروپوریشن در سلول‌های تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary: CHO) ترانسفرم گردید و بیان ژن leoA با روش SDS-PAGE و RT-PCR ارزیابی شد.*

یافته ها : *نتایج PCR نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن leoA بود. کلون‌سازی این ژن به ترتیب در وکتورهای pTZ و pEGFP-C2 با موفقیت انجام شد. هضم آنزیمی با دو آنزیم KpnI و SacII و همچنین تعیین توالی، صحت کلون سازی ژن را تایید کرد. مشاهده محصول پروتئینی ژن leoA در سلول‌های CHO نشان‌دهنده بیان موفقیت‌آمیز ژن leoA هلیکوباکترپیلوری در سیستم یوکاریوتی بود.*

نتیجه‌گیری : *سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA ، قدرت بیان موفق ژن leoA در سلول‌های جانوری را داشت.*

کلید واژه‌ها : *هلیکوباکترپیلوری ، ژن leoA ، الکتروپوریشن ، واکسن نوترکیب*

* نویسنده مسؤول : دکتر عباس دوستی ، پست الکترونیکی abbasdoosti@yahoo.com

نشانی : شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، صندوق پستی ١٦٦، تلفن ۳۲۲۲۷۵٦۲-۰۳۸، نمابر ۳۳۳٦۱۰٤۳

وصول مقاله : ۱۳۹۵/۷/۲٤ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۵/۱۱/۲٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹۵/۱۲/۷

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

مقدمه

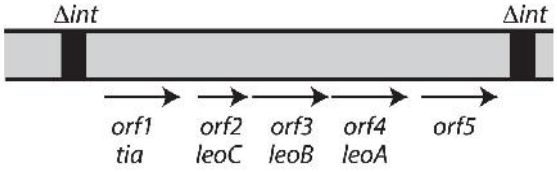
هلیکوباکترپیلوری (Helicobacter pylori) یک ارگانیسم میکروآئروفیلیک، گرم منفی، کند رشد، مارپیچی شکل و تاژک‌دار و ساکن روی سطح مجرای اپیتلیوم معده است (۳-۱). هلیکوباکترپیلوری دارای ۵-۲/۵ میکرومتر طول و ۱-۰/۵ میکرومتر عرض، با ۶-۴ تاژک قطبی است که برای تحرک باکتریایی ضروری است (۲). این باکتری از تنوع بالایی در ژنوم برخوردار بوده که می‌تواند یک عامل مهم در انطباق آن با معده میزبان باشد (۲). هلیکوباکترپیلوری در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از جمله زخم معده و دوازدهه، سرطان معده و التهاب بافت لنفاوی وابسته به مخاط (MALT) دخیل است (۶-۴). عفونت هلیکوباکترپیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن باکتریایی در دنیا به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است. ابتلا به عفونت معمولاً در دوران کودکی رخ می‌دهد؛ اما اثرات آن برای تمام عمر باقی می‌ماند. الگوی اپیدمیولوژیک این عفونت در کشورهای صنعتی و در حال توسعه متفاوت است. به طوری که در کشورهای صنعتی به‌تدریج و با افزایش سن، شیوع عفونت افزایش می‌یابد (۵و۷). leoA (Labile enterotoxin output A) یک عامل بیماری‌زایی GTPase است که در جزیره بیماری‌زایی کدگذاری می‌شود و بالقوه از طریق وزیکول ترشحی باعث افزایش انتشار سم می‌شود (۸). در حال حاضر leoA به عنوان یک پروتئین شبه دی‌آمینی باکتریایی شناخته می‌شود (۸و۹). پروتئین‌های خانواده دی‌آمینی، غشاها را تغییر می‌دهند و زمانی تصور می‌شد که به یوکاریوت‌ها محدود هستند (۸). leoA با دفع انتروتوکسین حساس به حرارت (Labile enterotoxin: LT) از طریق وزیکول غشاء (Membrane vesicle: MV) تکامل یافته و از سطح سلول باکتری آزاد می‌شود. در حال حاضر گزارش‌های بسیار کمی حاکی از نقش عملکردی پروتئین‌های دی‌آمینی باکتریایی وجود دارد. وزیکول‌های غشاء نقش مهمی در عملکرد حفاظت شده اعضای خانواده دی‌آمینی (DFMs) طی حوزه‌های تکاملی از پروکاریوت‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

به یوکاریوت‌ها نشان می‌دهند (۸).



شکل ۱ : تصویر شماتیک ساختار اوپرون ژن leoA (۸)

امروزه برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت هلیکوباکترپیلوری در دسترس هستند؛ اما هزینه زیاد، عدم تمایل بیماران برای مصرف دقیق دارو و بروز سویه‌های مقاوم از عوامل محدود کننده کفایت این درمان‌ها به‌شمار می‌روند. از این رو ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری مانند واکسیناسیون مطرح می‌شود. تلاش برای ساخت واکسن علیه هلیکوباکترپیلوری در اوایل دهه ۱۹۹۰ با علم به این که عفونت ناشی از این باکتری عامل اصلی زخم معده است؛ شروع شد (۳).

با توجه به افزایش روز افزون سویه‌های مقاوم هلیکوباکترپیلوری درمان آنتی‌بیوتیکی در ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد با شکست همراه می‌شود (۱۰). با توجه به بروز مقاومت به درمان‌های دارویی، پایداری بالای هلیکوباکترپیلوری در میزبان انسانی و امکان بروز عوارض متعدد ناشی از حضور طولانی مدت این ارگانیسم در معده، جایگزینی و یا به‌کارگیری یک سیستم کمکی همراه درمان‌های مبتنی بر آنتی‌بیوتیک در عفونت‌های ناشی از هلیکوباکترپیلوری یک ضرورت به نظر می‌رسد (۱۱). به‌رغم تحقیقات انجام شده روی واکسن هلیکوباکترپیلوری و نتایج خوب حاصله در مدل‌های حیوانی، در حال حاضر هیچ واکسنی مجوز کاربرد روی انسان را ندارد (۳). امروزه با استفاده از روش ساب‌کلونینگ، ژن‌های خاصی با هدف تشخیصی و حتی درمانی به کار برده می‌شوند. مطالعات گسترده‌ای در زمینه انتقال ژن به منظور برطرف کردن نقص ژنی یا درمان بیماری‌های مختلف صورت گرفته است (۱۲). در تحقیقات گذشته، اثرات ایمنی‌زایی علیه هلیکوباکترپیلوری برای انواع آنتی‌ژن‌های طبیعی و یا نوترکیب مانند اوره‌آز، پروتئین‌های شوک حرارتی، VacA، CagA، HP-NAP، کاتالاز، HpaA (Helicobacter pylori adhesin A) و سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase: SOD) نشان داده شده است (۳و۱۳و۱۴). واکسن‌های بسیاری در برابر عفونت‌های باکتریایی مانند واکسن‌های ژنی یا واکسن‌های DNA ابداع شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. واکسن ژنیک نوعی واکسن است که از طریق تزریق آن باعث ایجاد پاسخ ایمنی در میزبان می‌شود و می‌تواند در برابر بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای مختلف مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، تک‌یاخته‌ها و کرم‌های انگل ایمن‌سازی انجام دهد و حتی استفاده از آن برای تومورها و بیماری‌های با منشا ژنتیکی نیز مطرح است (۱۵). واکسن های ژنی به عنوان سومین انقلاب در علم واکسیناسیون معرفی می‌شوند. استفاده از واکسن‌های ژنی راهکار جدیدی برای ایجاد ایمنی علیه بیماری‌هاست. استفاده از این روش امروزه در حال گسترش است. زیرا واکسن‌های ژنی قادر به القای پاسخ ایمنی سلولی یا همورال یا هر دو هستند (۱۶). واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره‌سازی و نگهداری آسان هستند (۱۶). این مطالعه به منظور جداسازی و کلون‌سازی ژن leoA در وکتور بیانی pEGFP-C2 و بررسی بیان آن به روش RT-PCR در سیستم یوکاریوتی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد طی سال ۱۳۹۵ انجام شد.

سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول‌های جانوری: به سویه استاندارد هلیکوباکترپیلوری برای جداسازی ژن leoA و سویه‌ای از *E.coli* به عنوان میزبانی برای تکثیر وکتورهای نوترکیب نیاز بود. برای تکثیر و به‌دست آوردن ژن leoA، باکتری هلیکوباکترپیلوری سویه استاندارد (ATCC 40504) از بخش میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای تکثیر ژن‌های نوترکیب نیز از باکتری اشریشیا کلی سویه TOP10F استفاده شد که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه گردید. همچنین برای کلون سازی ژن از دو وکتور به‌نام‌های pTZ57R/T و pEGFP-C2 استفاده شد. وکتور pTZ57R/T به عنوان یک T-vector مورد استفاده بوده و برای کلون‌سازی محصولات PCR مناسب است. این وکتور که برای سهولت نگارش در این مقاله به صورت مخفف و به شکل pTZ آورده می‌شود؛ مربوط به کیت کلون‌سازی T/A (ساخت شرکت ترمو فیشر، آمریکا) است. اندازه وکتور pTZ برابر ۲۸۸۶ جفت باز و مارکر مقاوت آنتی‌بیوتیکی آن، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است. وکتور بیانی یوکاریوتی pEGFP-C2 (ساخت شرکت کلونتک، آمریکا) به اندازه ۴۷۳۵ جفت باز دارای پرومتور قوی CMV برای بیان ژن کلون شده است. مارکرهای انتخابی آن در سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی به ترتیب شامل مقاومت به کانامایسین و نئومایسین است. سلول یوکاریوتی مورد استفاده برای بررسی بیان ژن کلون شده، سلول تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary: CHO) است که از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تهیه شد.

استخراج DNA و تکثیر ژن leoA: به منظور استخراج DNA ژنومی از باکتری هلیکوباکترپیلوری از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران استفاده گردید. کیفیت DNA تخلیص شده، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

گرفت. برای تکثیر ژن leoA، ابتدا توالی ژن leoA با شماره ثبت FM991728 از بانک ژن جهانی گرفته شد. سپس پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند. در توالی رفت (Forward) از پرایمر 5´- AAGGGTACCGCAATGAATGAAACGCTAGAAC -3´ و در توالی برگشت (Reverse) از پرایمر 5´- TCACCGCGGAACACAAATTCAGTTCATTC -3´ استفاده شد. به منظور سهولت کلون‌سازی و یا خارج ساختن ژن leoA از یک وکتور و کلون‌سازی مجدد آن در وکتورهای متفاوت دیگر، در انتهای ۵- پریم پرایمرهای طراحی شده، سایت برش آنزیمی در نظر گرفته شد. به طوری که جایگاه برش در توالی پرایمر رفت سایت GGTACC برای آنزیم KpnI و در توالی برگشت سایت آنزیمی CCGCGG برای آنزیم SacII قرار داده شد (نواحی که زیر آنها خط کشیده شده است). در فرادست هر یک از توالی‌های برش آنزیمی، تعداد سه نوکلئوتید به عنوان پایه قرار داده شد. سپس واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl، شامل ۲۰ µm محلول dNTP Mix، ۱ µm پرایمر رفت، ۱ µm پرایمر برگشت، ۲µl نمونه DNA استخراج شده (۱۰۰ نانوگرم) و ۰/۲۵ µm آنزیم Taq DNA polymerase (یا یک واحد آنزیم Taq رقیق شامل ۰/۲۵ µm آنزیم DNA پلیمراز Taq در ۰/۷۵ µl آب مقطر) انجام گردید. در نهایت به منظور جلوگیری از تبخیر و آلودگی، یک قطره روغن معدنی استریل اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر حرارتی (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR، محصولات PCR به چاهک‌های ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند و با نور ماورای بنفش مشاهده شدند.

کلون‌سازی T/A: برای انجام کلون‌سازی T/A همان‌طور که در بخش معرفی وکتورها اشاره شد؛ از T-vector ساخت شرکت ترموفیشر استفاده شد. در این مرحله لازم است قطعه خالصی از ژن leoA تهیه و در وکتور pTZ درج گردد. وکتور pTZ در ابتدا به صورت خطی است و دارای یک نوکلئوتید T به صورت تک رشته در هر انتهای خود است و به همین علت T-vector نامیده می‌شود. از طرف دیگر، خاصیت بسیاری از آنزیم‌های DNA پلی‌مراز این است که در دو انتهای محصول PCR، یک نوکلئوتید A بدون الگو و به صورت تک‌رشته‌ای قرار می‌دهند. از آنجا که A مکمل T است؛ می‌توان محصولات PCR را در وکتور T به راحتی کلون کرد و به این سیستم، کلون‌سازی T/A گویند. محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن leoA روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و در مقابل نور UV، قطعه DNA مربوط به ژن leoA با آگارز همراه آن به کمک تیغ اسکالپل بریده شد. ژن leoA با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (ساخت شرکت Bioneer کشور کره جنوبی)، خالص‌سازی شد. واکنش اتصال (Ligation) بین محصولات PCR و وکتور pTZ مطابق دستور العمل کیت انجام شد. سپس محصول اتصال در باکتری اشریشیا کلی سویه TOP10F ترانسفورم و باکتری‌های یاد شده در محیط LB-Agar حاوی ۵۰ میکروگرم در هر میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت و گرمخانه‌گذاری شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (ساخت شرکت Bioneer کشور کره جنوبی)، استخراج پلاسمید صورت گرفت. بررسی صحت کلون‌سازی ژن و تشکیل ناقل نوترکیب pTZ-leoA به روش‌های PCR و هضم آنزیمی با دو آنزیم KpnI و SacII انجام شد.

کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی: در این مرحله برای ساخت سازواره نهایی، ژن leoA در وکتور بیانی pEGFP-C2 همسانه‌سازی شد. بدین منظور ژن leoA که در حامل pTZ کلون شده بود؛ وارد حامل pEGFP-C2 گردید و برای وارد کردن ژن leoA به حامل pEGFP-C2 از آنزیم‌های محدودالاثر KpnI و SacII استفاده شد. یعنی ابتدا ناقل نوترکیب pTZ-leoA با دو آنزیم مورد اشاره بریده شد تا قطعه ژن leoA از آن خارج گردید. همچنین وکتور بیانی pEGFP-C2 با همین دو آنزیم بریده شد تا خطی شود و آماده پذیرش ژن leoA گردد. سپس همه محصولات هضم آنزیمی، روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و قطعه ژن leoA و وکتور pEGFP-C2 از روی ژل با کمک تیغ اسکالپل بریده شدند و با استفاده از کیت، تخلیص گردیدند. واکنش اتصال بین وکتور pEGFP-C2 و ژن leoA با استفاده از آنزیم T4-لیگاز (ساخت شرکت سیناژن ایران)، انجام شد و مراحل ترانسفورمیشن محصولات اتصال (مطابق روش گفته شده در بالا) در باکتری *E.coli* سویه TOP10F صورت پذیرفت. به منظور تایید صحت ساب‌کلونینگ و تشکیل سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA، ابتدا PCR انجام گرفت. هضم آنزیمی با آنزیم‌های KpnI و SacII نیز برای تایید صحت کلون‌سازی انجام شد و تتیید نهایی سازواره حاصل به روش تعیین توالی ارزیابی گردید.

انتقال سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA به سلول‌های جانوری: به‌منظور بررسی بیان ژنleoA در سلول جانوری از سلول تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary: CHO) استفاده گردید و برای ترانس‌فورمیشن این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. در این مرحله از دستگاه الکتروپوریشن مدل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

Gene Pulser Xcell (ساخت شرکت Bio Rad آمریکا) استفاده شد. تعداد ۲×۱۰^{۶} عدد سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر در کووت ۰/۴ ویژه دستگاه الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۶۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از وکتور نوترکیب نهایی، به این سوسپانسیون سلولی اضافه شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده ۰/۱۷۴ کیلو ولت و ۴۰۰ میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس سلول‌های الکتروپوریت شده در فلاسک کشت حاوی محیط RPMI به همراه ۱۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی) کشت داده شدند و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند. سپس به هر یک از فلاسک‌های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسن (ژن مقاومت و مارکر انتخابی وکتور یوکاریوتی) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شدند. تمام مراحل فوق (الکتروپوریشن) برای سری دیگری از سلول‌های CHO که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند؛ نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد، هیچ DNA اضافه نگردید.

انجام SDS-PAGE: بیان پروتئین به روش SDS-PAGE انجام شد. سلول‌های CHO ترانسفرم شده و سلول‌های گروه شاهد به کمک پیپتینگ به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شدند و رسوب‌گیری انجام گردید. سپس به رسوب سلولی حاصل PBS اضافه شد و رسوب در PBS حل گردید. در مرحله بعد سلول‌ها با استفاده از روش ذوب و انجماد کاملاً متلاشی شدند. سپس الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو (Coomassie Blue) انجام شد.

بیان ژن leoA در سلول‌های CHO به روش RT-PCR: به‌منظور بررسی بیان اختصاصی ژن leoA در سیستم یوکاریوتی، از سلول‌های CHO ترانسفرم شده با وکتور pEGFP-C2-leoA و سلول‌های گروه شاهد (فاقد وکتور نوترکیب) با استفاده از کیت (Qiagen, USA)، استخراج RNA انجام شد. کیفیت و غلظت RNA های تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه cDNA از کیت شرکت ترموساینتیفیک ساخت آمریکا استفاده شد. واکنش PCR روی cDNA های حاصل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن leoA هلیکوباکترپیلوری انجام گردید.

یافته‌ها

تکثیر و جداسازی ژن leoAهلیکوباکترپیلوری: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز نشان دهنده قطعه ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن leoAهلیکوباکترپیلوری بود (شکل ۲). همچنین تخلیص محصولات PCR از ژل و الکتروفورز مقدار اندکی از آن (۳ ماکرولیتر) روی ژل آگارز، نشان‌دهنده کیفیت مناسب این محصول برای کلون‌سازی بود.

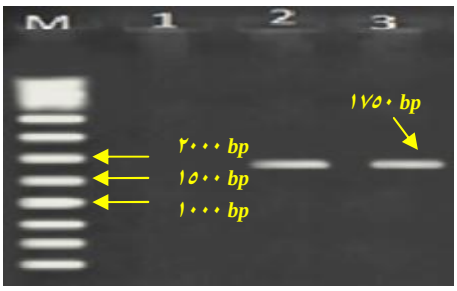
کلون‌سازی T/A و ساب کلونینگ: کلون‌سازی محصول PCR به روش T/A cloning در وکتور pTZ، به منظور ایجاد همسانه‌ای از ژن leoA، موجب تولید سازواره ژنی pTZ-leoAگردید. تست‌های تاییدی به‌کار رفته در مورد صحت همسانه‌سازی ژن leoA شامل PCR و هضم آنزیمی بود که واکنش PCR نشان داد؛ درصد زیادی از کلون‌های حاصل، واجد سازواره pTZ-leoA هستند. همچنین هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های SacII و KpnI بر روی پلاسمیدهای تخلیص شده، حضور قطعه ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن leoA در وکتور pTZ را نشان داد.

ساب‌کلونینگ ژن leoA در پلاسمید بیانی pEGFP-C2 منجر به تشکیل وکتور نوترکیب pEGFP-C2-leoA گردید. تایید صحت ساب‌کلونینگ به سه روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد. ابتدا با پرایمرهای اختصاصی ژن leoA روی وکتورهای نوترکیب pEGFP-C2-leoA واکنش PCR انجام شد و تشکیل باند ۱۷۵۸ جفت بازی در هر یک از نمونه‌های PCR شده؛ نشان‌دهنده صحت ساب‌کلونینگ بود. همچنین نتایج حاصل از هضم آنزیمی وکتور بیانی نوترکیب pEGFP-C2-leoA با دو آنزیم KpnI و SacII سبب تشکیل دو قطعه شد. یعنی پس از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز، یک قطعه به اندازه ۴۷۳۵ جفت باز مربوط به وکتور pEGFP-C2 و یک قطعه به اندازه ۱۷۵۸ جفت باز مربوط به ژن leoA مشاهده شد (شکل ۳). تعیین توالی سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA نشان‌دهنده صحت کلون‌سازی ژن leoA در وکتور بیانی یوکاریوتی مورد نظر بود. به‌طوری که مقایسه توالی به‌دست آمده با توالی‌های موجود از این ژن در بانک ژن جهانی (NCBI) صحت توالی و عدم وجود هر گونه تغییر در توالی کلون شده را اثبات کرد.

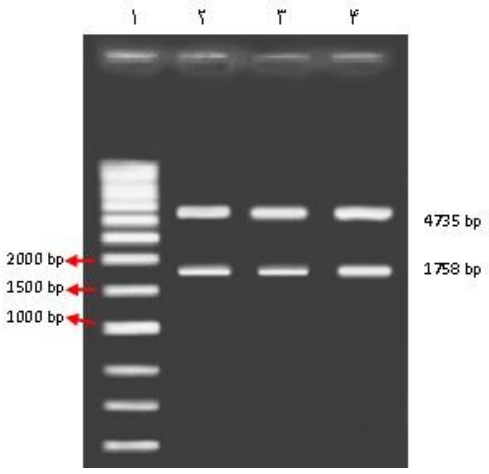
الکتروپوریشن و بیان ژن : برای انتقال سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA به سلول‌های CHO از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. سپس سلول‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین کشت داده شدند. رشد سلول‌ها در محیط کشت حاوی نئومایسین نشان‌دهنده انتقال وکتور نهایی به این سلول‌های جانوری است. همچنین در محیط کشت سلول‌های گروه شاهد (فاقد وکتور pEGFP-C2-leoA) در حضور نئومایسین هیچ رشد و تکثیر سلولی مشاهده نشد. عصاره لایز سلولی حاصل از سلول‌های CHO ترانسفرم شده به‌منظور بررسی بیان ژنleoA مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های به‌دست آمده از الکتروفورز سوسپانسیون این سلول‌ها روی ژل SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آن با کوماسیبلو نشان‌دهنده بیان موفق ژن leoA هلیکوباکترپیلوری در سیستم

www.SID.ir

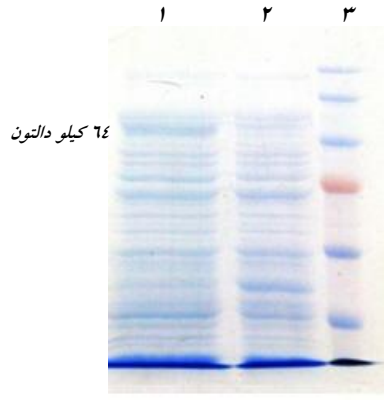
Archive of SID



شکل ۲ : تکثیر ژن leoA به روش PCR روی ژل آگارز یک درصد
M : مارکر 1Kb ساخت شرکت ترموفیشر، ۱: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)، شماره‌های ۲ و ۳ : باند ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن leoA



شکل ۳ : هضم آنزیمی سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA با دو آنزیم SacII و KpnI
شماره ۱: مارکر 1Kb شرکت ترموفیشر، شماره‌های ۲ تا٤: باند کوچک‌تر با اندازه ۱۷۵۸ جفت باز و باند بزرگ‌تر به اندازه ٤۷۳۵ جفت باز به ترتیب مربوط به ژن leoA و وکتور pEGFP-C2



شکل ٤ : نتیجه بیان ژن leoA و تشکیل باند پلی‌پپتیدی ٦٤ کیلودالتون

یوکاریوتی بود. محصول پروتئینی حاصل از ژن leoA به‌وزن ۶۴ کیلودالتون با انجام SDS-PAGE در شکل ۴ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید بیان ژن leoA در سلول‌های CHO مثبت بود. به‌طوری که پس از انجام PCR روی cDNA های حاصل از واکنش رونوشت‌برداری معکوس برای سلول‌های دریافت کننده وکتور نوترکیب حامل ژن هدف، باند ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن leoA تشکیل شد؛ اما همین آزمایش برای سلول‌های فاقد وکتور نوترکیب، مثبت نبود. نتایج این آزمایش موید بیان موفق ژن leoA در سلول‌های CHO است.

بحث

در این مطالعه ژن leoA به‌منظور ایجاد سازواره نوترکیب با هدف ایجاد کاندیدای مناسب واکسن ژنی مورد استفاده قرار گرفت و از روش الکتروپوریشن برای ترانسفرم کردن سلول‌ها استفاده گردید. روش‌های انجام شده در راستای کسب نتایج مطلوب در این تحقیق، مطابق روش‌های به‌کار رفته توسط بسیاری از محققین است.

در تحقیقات مختلف از روش‌های مختلفی برای انتقال ژن‌ها به سلول‌های بنیادی استفاده شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به لیپوفکشن، میکرواینجکشن، الکتروپوریشن و استفاده از وکتورهای ویروسی اشاره کرد که هر کدام واجد مزایا و معایب مربوط به خود هستند. روش انتقال غیرویروسی، کم‌هزینه‌تر، آسان‌تر و نسبت به روش‌های ویروسی ایمن‌تر است (۱۲و۱۷).

ژن leoA ممکن است یکی از مهم‌ترین آنها برای بیماران مبتلا به زخم معده و گاستریت مزمن باشد؛ ولی پرسش‌های بی‌پاسخ بسیاری در مورد آن وجود دارد. در سال ۱۹۹۹ Michetti و همکاران واکسیناسیون خوراکی با اوره‌آز نوترکیب هلیکوباکترپیلوری در بزرگسالان آلوده به هلیکوباکترپیلوری را مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند واکسیناسیون به علت سمیت LT باعث ایجاد اسهال می‌شود و با وجود کاهش قابل توجه در کلونی‌سازی درمعده، سبب ریشه‌کن کردن و کاهش التهاب معده نمی‌شود (۱۸).

در مطالعه Sutton و همکاران کفایت واکسن HpaA نوترکیب ارزیابی و ایمن‌سازی پروفیلاکتیک به کاهش کلونیزاسیون باکتری در موش‌های BALA/c و QS منجر شد (۱۹). در مطالعه Shi و همکاران ضمن معرفی اپی‌توپ‌های اصلی زیرواحد UreB به صورت U546-561، U237-251 و U229-244 نشان داده شد تلقیح زیرجلدی پپتیدهای مصنوعی حاوی این اپی‌توپ‌ها همراه ادجوانت فروند به موش موجب برانگیخته شدن پاسخ‌های +CD4 T علیه اوره‌آز باکتری می‌شود. آنها از پروتئین به صورت نوترکیب استفاده کردند که در مقایسه با پپتیدهای مصنوعی کم‌هزینه‌تر و کاربردی‌تر است (۲۰). در مطالعه Malfertheiner و همکاران ایمنی‌زایی واکسن نوترکیبی که شامل vacA، cagA و NAP با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم بود؛ در افراد سالم ارزیابی و نتیجه‌گیری شد این واکسن بسیار ایمن بوده و منجر به القای پاسخ‌های آنتی‌بادی و سلول‌های T می‌شود (۲۱). مطالعه حاجی‌خانی و همکاران روی

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

ژن‌های کدکننده ureB332 و hpaA انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از HpaA در واکسن‌های چندآنتی‌ژنی مانند HpaA-UreB در مقایسه با استفاده آن به تنهایی اثر بیشتری خواهد داشت. همچنین آزمون اوره‌آز سریع روی هر سه پروتئین نوترکیب HpaA، UreB332 و ترکیب آنها انجام شد و نتیجه‌گیری شد UreB332 و ترکیب آن با HpaA واجد فعالیت اوره‌آزی است که علاوه بر تایید ارتباط فعالیت اوره‌آزی با زیر واحد B، تایید کننده وجود ساختارهای مناسب برای بروز فعالیت آنزیمی در پروتئین‌های نوترکیب تولید شده است (۱۱).

در مطالعه نجار پیرایه و همکاران کلون و بیان ژن hpaA هلیکوباکترپیلوری در اشریشیا کلی ارزیابی شد. پس از ترانسفورماسیون، بیان پروتئین HpaA با غلظت‌های مختلف ایزوپروپیل تیو بتا دی گالاکتوزید (IPTG) القا و با SDS-PAGE شناسایی گردید. ایمنی‌زایی پروتئین rHpaA با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال خرگوشی علیه آنتی‌ژن‌های کامل هلیکوباکتر پیلوری با آزمون وسترن بلاتینگ تعیین شد. نتایج نشان داد پروتئین نوترکیب HpaA ایمنی‌زایی قابل قبولی را از خود نشان می‌دهد و تولید پروتئین‌های اختصاصی نوترکیب نظیر HpaA استراتژی جایگزین و مناسبی برای ساخت واکسن هلیکوباکترپیلوری است (۲۲). در مطالعه Liu و همکاران به‌منظور طراحی واکسن، سه ژن vacA، cagA و ureB به‌عنوان آنتی‌ژن‌های کاندید در نظر گرفته شدند. به‌منظور تسهیل در بیان آنتی‌ژن‌ها، قطعه‌ای از هر آنتی‌ژن برای ساخت پروتئین فیوژن انتخاب شد و از پلاسمید زنده ضعیف شده Salmonella typhimurium برای بیان پروتئین فیوژن (ترتیب قرارگیری CVU) استفاده گردید. نتایج نشان داد واکسن مورد نظر به‌طور قابل توجهی کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری را در موش‌های آلوده به عفونت کاهش می‌دهد (۲۳). در مطالعه Gong و همکاران واکسن SS1 هلیکوباکترپیلوری همراه با ادجوانت کیتوزان به کار برده شد و نتیجه گیری گردید که اثر حمایتی کیتوزان همانند اثر حمایتی سم وبا خوب و مؤثر بوده و کیتوزان می‌تواند به عنوان ادجوانت در کنار واکسن‌های ژنی علیه هلیکوباکترپیلوری گسترش یابد (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن leoA به‌طور موفقیت‌آمیزی در حامل pTZ کلون و نیز در حامل بیانی pEGFP-C2 ساب‌کلون شد. بررسی SDS-PAGE نشان داد که ژن leoA قادر به بیان پروتئینی ۶۴ کیلو دالتونی است. لذا به‌نظر می‌رسد که سازواره تولید شده در این مطالعه می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای واکسن ژنی علیه هلیکوباکترپیلوری در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۲۸۴/د/۹۵) خانم نغمه میرابوالقاسمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بود. بدین‌وسیله از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به‌خصوص آقایان محمد چهل‌گردی و حمیدرضا کبیری که ما را انجام این مطالعه یاری نمودند؛ صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

References

1. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature. 1997 Aug; 388(6642): 539-47. doi: 10.1038/41483

2. Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EM, Zeitune JM. Virulence factors of Helicobacter pylori: A review. Clin Med Insights Gastroenterol. 2014 Mar; 7: 9-17. doi: 10.4137/CGast.S13760

3. Ruggiero P, Censini S. Helicobacter pylori: A brief history of a still lacking vaccine. Diseases. 2014; 2(2): 187-208. doi: 10.3390/diseases2020187

4. 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. doi: 10.5812/ircmj.3732

5. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer Lett. 2014 Apr; 345(2): 196-202. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.016

6. Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, Azadegan-Dehkordi F, Taghikhani A, Salimzadeh L, et al. Virulence factors of Helicobacter pylori vacA increase markedly gastric mucosal TGF-β1 mRNA expression in gastritis patients. Microb Pathog. 2014 Feb-Mar; 67-68: 1-7. doi: 10.1016/j.micpath. 2013.12.006

7. Doosti A, Rahimian G, Nassiri J, Yavari-Forushani P. [Prevalence of the cagA-positive Helicobacter pylori strains isolated from gastric biopsy specimens in Shahrekord]. Armaghane Danesh. 2007; 12(1): 29-38. [Article in Persian]

8. Michie KA, Boysen A, Low HH, Møller-Jensen J, Löwe J. LeoA, B and C from enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) are bacterial dynamins. PLoS One. 2014 Sep; 9(9): e107211. doi: 10.1371/journal.pone.0107211

9. Brown EA, Hardwidge PR. Biochemical characterization of the enterotoxigenic Escherichia coli LeoA protein. Microbiology. 2007 Nov; 153(Pt 11): 3776-84. doi: 10.1099/mic.0.2007/009084-0

10. Vaise Malekshahi Z, Hatef Salmanian A, Ebrahimizadeh W, Amiri Javid Sh. [The effect of DNA vaccine induced IgY against C-Urease in mice infected with Helicobacter pylori]. Med J Tabriz Univ Med Sci. 2012; 34(5): 79-86. [Article in Persian]

11. Hajikhani B, Najar-Piraye S, Soliman-Jahi H, Zuhair MH. [Cloning, expression, purification and study of the antigenicity of Helicobacter pylori UreB332-HpaA protein]. Modares Journal of Medical Sciences. 2013; 13(2): 1-10. [Article in Persian]

12. Jalali Kondori B, Asadi MH, Azemati F. [Subcloning of NGF Gene into pSecTag2/Hygro Secretory Vector and Expression in PC12 Cell Line]. Shefaye Khatam. 2014; 3(1): 21-28. [Article in Persian]

13. Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C,

www.SID.ir

Archive of SID

Rappuoli R. The design of vaccines against Helicobacter pylori and their development. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 523-63. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.523

14. Every AL, Stent A, Moloney MB, Ng GZ, Skene CD, Edwards SJ, et al. Evaluation of superoxide dismutase from Helicobacter pylori as a protective vaccine antigen. Vaccine. 2011 Feb; 29(7): 1514-18. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.019

15. Doosti A, Ghasemi- Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (Stx2) genes. Genetica. 2015; 47(2): 499-507. doi: 10.1016/j.phrp.2015.08.004

16. Doosti A. [Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of Clostridium botulinum in E. Coli]. Journal of Microbial World. 2013; 5(3-4): 77-84. [Article in Persian]

17. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius NP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. Neurobiol Dis. 2005 Feb; 18(1): 184-92. doi:10.1016/j.nbd.2004.09.010

18. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, et al. Oral immunization with urease and Escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults. Gastroenterology. 1999 Apr; 116(4): 804-12.

19. Sutton P, Doidge C, Pinczower G, Wilson J, Harbour S, Swierczak A, et al. Effectiveness of vaccination with recombinant HpaA from Helicobacter pylori is influenced by host genetic background. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007 Jul; 50(2): 213-9. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00206.x

20. Shi Y, Wu C, Zhou WY, Mao XH, Guo G, Zou QM. Identification of H-2d restricted Th epitopes in Urease B subunit of Helicobacter pylori. Vaccine. 2007 Mar; 25(14): 2583-90. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.024

21. Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, Kaufmann SH, Ulrichs T, Novicki D, et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular Helicobacter pylori vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. Gastroenterology. 2008 Sep; 135(3): 787-95. doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.054

22. Najar Peerayeh Sh, Atoofi J, Hoseinkhani S, Farshchian M. Cloning and expression of Helicobacter pylori HpaA Gene. Yakhteh Medical Journal. 2009; 11(3): 273-6.

23. Liu KY, Shi Y, Luo P, Yu S, Chen L, Zhao Z, et al. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated Salmonella typhimurium expressing Helicobacter pylori CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. Vaccine. 2011 Sep; 29(38): 6679-85. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.099

24. Gong Y, Tao L, Wang F, Liu W, Jing L, Liu D, et al. Chitosan as an adjuvant for a Helicobacter pylori therapeutic vaccine. Mol Med Rep. 2015 Sep; 12(3): 4123-32. doi: 10.3892/mmr.2015.3950

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

99 / Journal of Gorgan University of Medical Sciences
2018 Winter / vol 19 / no 4

Original Paper

Expression of leoA gene of *Helicobacter pylori* in CHO animal cells by RT-PCR method

Naghmeh Mirabolghasemi (M.Sc)[1], Abbas Doosti (Ph.D)*[2]

[1]M.Sc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [2]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Downloaded from goums.ac.ir at 15:04 +0330 on Monday January 8th 2018

Abstract

Background and Objective: *Helicobacter pylori* infection is one of the most common chronic bacterial infections all over the world, particularly in the developing countries. LeoA gene plays an important role in pathogenesis, and the main role of this gene is to increase the bacterial toxin secretion. This study was conducted to isolate and clone the leoA gene in a pEGFP-C2 expression vector and evaluate its expression in eukaryotic system.

Methods: In this laboratory study, the leoA gene was amplified from the standard strain of *Helicobacter pylori* genome (ATCC 43504) by PCR method. It was then inserted into the pTZ vector by cloning T/A. Sub cloning of this gene was performed in a pEGFP-C2 expression vector with a ligase enzyme. The final structure of pEGFP-C2-leoA was transformed by electroporation in CHO (Chinese hamster ovary) cells and the expression of the leoA gene was evaluated by SDS-PAGE and RT-PCR.

Results: The results of PCR indicated that the 1758 bp fragment was amplified from the leoA gene. Cloning of this gene was performed successfully in pTZ and pEGFP-C2 vectors, respectively. The enzyme digestion with two KpnI and SacII enzymes, as well as sequencing, confirmed the accuracy of gene cloning. The observation of the protein product of the leoA gene in CHO cells indicated the successful expression of the LeoA gene in the eukaryotic system of *Helicobacter pylori*.

Conclusion: The final construct of pEGFP-C2-leoA had a successful expression of the leoA gene in animal cells.

Keywords: *Helicobacter pylori*, LeoA gene, Electroporation, Recombinant vaccine

*** Corresponding Author: Doosti A (Ph.D), E-mail: abbasdoosti@yahoo.com**

Received 15 Oct 2016 **Revised** 12 Feb 2017 **Accepted** 25 Feb 2017

Cite this article as: Mirabolghasemi N, Doosti A. [Expression of leoA gene of *Helicobacter pylori* in CHO animal cells by RT-PCR method]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018 Winter; 19(4): 92-99. [Article in Persian]

www.SID.ir