مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۱-۱۳
بهار و تابستان ۱۳۸۷

تولید IgY در زرده تخم مرغ بر علیه اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری از قطعه نوترکیب UreC

حسین بصیری[۱]، سیدلطیف موسوی‌گرگری[۲*]، ایرج رسولی[۳]، علی‌هاتف سلمانیان[۴]، کاظم پریور[۵]، طاهر نژادستاری[۶]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
۵- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۶- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۲۶

چکیده

هدف: هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی مارپیچی شکل و میکروآئروفیل است که در لایه مخاطی معده انسان تکثیر یافته و ایجاد عفونت می‌نماید. عفونت ایجاد شده توسط این باکتری که با تخریب بافت پوششی معده همراه است، منجر به التهاب مزمن معده می‌شود که می‌تواند سبب ایجاد زخم‌های معده و دوازدهه شود. رویکردهای اخیر در راستای به‌کارگیری درمان‌های اختصاصی برای مقابله با این عفونت است که در این میان آنزیم اوره‌آز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا و آنتی‌ژنیک این باکتری، هدف مناسبی برای این منظور است. هدف از مطالعه حاضرتولید IgY اختصاصی بر علیه زیرواحد C آنزیم اوره‌آز است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا به‌منظور تهیه پروتئین نوترکیب زیرواحد C اوره‌آز، پس از کشت و تخلیص ژنوم باکتری، با کمک PCR، ژن زیرواحد C آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری تکثیر و سپس روی ناقل بیانی *pET28a* کلون شد. پس از انتقال سازهٔ نوترکیب به باکتری اشرشیاکلی زیرگونه Bl21DE3، پروتئین نوترکیب مورد نظر بیان شد. در ادامه پروتئین نوترکیب از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص شد. در نهایت پس از تزریق پروتئین نوترکیب تخلیص شده به مرغ، تکمیل دورهٔ ایمن‌سازی، جمع‌آوری تخم مرغ‌ها و جداسازی زردهٔ تخم مرغ، IgY با رسوب‌گذاری به کمک پلی‌اتیلن‌گلیکول تخلیص و با سنجش الایزا ارزیابی شد.

نتایج: بررسی با SDS-PAGE نشان می‌دهد پروتئین نوترکیب به‌خوبی بیان و تخلیص شده است، همچنین نتایج به‌دست آمده با الایزا نشان‌دهندهٔ ایمنی‌زایی بالای پروتئین نوترکیب و توان بالای آنتی‌بادی در شناسایی زیرواحد C آنزیم اوره‌آز است. بررسی با SDS-PAGE همچنین نشان می‌دهد، تخلیص IgY با خلوص بیش از ۷۰ درصد انجام شده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به توان بالای آنتی‌بادی IgY-HpUc در شناسایی زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز، امکان استفاده از این آنتی‌بادی به‌صورت خوراکی به‌منظور محدود کردن رشد و توسعهٔ عفونت هلیکوباکتر پیلوری مطرح می‌شود.

کلیدواژگان: هلیکوباکتر پیلوری، آنزیم اوره‌آز، زیرواحد UreC، فناوری IgY.

* **نشانی مکاتبه:** تهران، بزرگراه خلیج فارس، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی: ۱۵۹-۱۸۱۵۵.
Email: slmousavi@shahed.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱ـ مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori: H.pylori*) یک باکتری گرم منفی مارپیچی شکل (Spiral) است که درلایه مخاطی معده انسان تکثیر یافته و ایجاد عفونت می‌نماید. عفونت ایجاد شده توسط این باکتری که با تخریب بافت پوششی معده همراه است، منجر به التهاب مزمن معده می‌شود که می‌تواند سبب ایجاد زخم‌های معده و دوازدهه شود. بررسی‌های اپیدمیولوژی و آماری، عفونت مزمن *H.pylori* را با سرطان بدخیم معده مرتبط ساخته است و این امر موجب شده که آژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) این باکتری را در زمره عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد [۱]. میزان عفونت با *H.pylori* در جهان به‌طور میانگین در حدود ۵۰ درصد جمعیت است. اما تفاوت معنی‌داری بین شیوع این عفونت در کشورهای غربی و کشورهای آسیایی در حال توسعه به چشم می‌خورد [۲]، به‌طوری که این میزان در کشورهای غربی در حدود ۳۰ درصد جمعیت است که از این میان ۰/۱ تا ۱ درصد به سرطان معده مبتلا می‌شوند، درحالی که میزان عفونت در کشورهای آسیایی بالاتر و در حدود ٦۰ تا ۸۰ درصد است [۳]. در ایران نیز عفونت *H.pylori* شایع بوده و به‌خصوص سرطان معده از آمار بالایی برخوردار است. این سرطان که مسئول مرگ ٦۵۰۰۰۰ نفر در جهان در سال ۲۰۰۰ است، در مردها پس از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان بوده و در مجموع حدود ۱۰ درصد از کل مرگ و میر سالیانه سرطان را به خود اختصاص می‌دهد [٤]. یکی از بالاترین آمارهای جهان در رابطه با سرطان معده مربوط به ایران و به‌طور دقیق استان اردبیل است که به تنهایی حدود یک سوم تمام موارد سرطان در اردبیل بین سال‌های ۱۹۹٦ تا ۱۹۹۹ مربوط به این سرطان بوده است [۵]. از سوی دیگر میزان عفونت به *H.pylori* در جمعیت اردبیل نیز بالا و در حدود ۸۹ درصد بوده است [٦]. به‌علاوه بررسی‌ها در جنوب کشور (شیراز) نیز ابتلای ۸۲ درصد تا ۹۸ درصد کودکان بین ۹ ماهه تا ۱۰ ساله را به این باکتری نشان می‌دهد [۷-۹].

با توجه به این‌که تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه دشوار است و در اکثر موارد تشخیص پس از پیشرفت بیماری صورت گرفته و کار درمان سخت می‌شود، راه اصلی مبارزه با این سرطان نیز همچون التهاب و زخم معده، نابود کردن عفونت *H.pylori* شناخته می‌شود. از سوی دیگر مبارزه با این عفونت همواره با مشکلاتی همراه بوده است، به‌خصوص که سیستم ایمنی بدن نیز به‌علت مکانیزم‌های دفاعی *H.pylori* در برابر این بیماری فاقد کارایی لازم است و حتی طی مکانیزم‌های ویژه‌ای در خدمت بیماری‌زایی باکتری قرار گرفته و سبب تسهیل اتصال باکتری و تخریب بافت پوششی می‌شود [۱]. همچنین بررسی‌های اخیر نشان‌دهندهٔ مقاومت نسبتاً گستردهٔ عفونت *H.pylori* به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی است [۱۰] بدین سبب رویکردهای اخیر در جهت به‌کارگیری درمان‌های اختصاصی و نوین برای مقابله با این عفونت است که در این میان پروتئین اوره‌آز باکتری *H.pylori* هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی چندتبار (Polyclonal) یا تک‌تبار (Monoclonal) به این منظور است. اوره‌آز مهم‌ترین ترکیب پروتئینی *H.pylori* است و به‌عنوان یک آنتی‌ژن مهم برای تشخیص این باکتری شناخته می‌شود. این آنزیم با هیدرولیز اوره و ایجاد آمونیاک به‌عنوان خنثی‌کنندهٔ اسید معده، شرایط را برای ادامه حیات باکتری در pH اسیدی معده فراهم می‌کند به‌علاوه هیدروکسید آمونیوم تولید شده توسط این آنزیم در تخریب بافت‌های میزبان نقش عمده‌ای دارد [۱۱]. همچنین نشان داده شده است که *H.pylori* از مولکول‌های MHC class II (Major histocompatibility complex class II) به‌عنوان گیرنده در سطح سلول‌های پوششی معده استفاده می‌کند و این میان‌کنش موجب بروز مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در این سلول‌ها می‌شود که این عمل به‌واسطهٔ اوره‌آز باکتری صورت می‌پذیرد [۱۲]. علاوه بر این اوره‌آز سبب تحریک ماکروفاژها برای ترشح اکسید نیتریک می‌شود که موجب ایجاد واسطه‌های التهابی می‌شود [۱۳] و

Archive of SID
www.SID.ir

این امر به تخریب بافت پوششی کمک کرده و یکی از مثال‌های به‌کارگیری سیستم ایمنی توسط باکتری است. با توجه به این نقش‌های مهم اوره‌آز در بیماری‌زایی و بقای *H.pylori*، این آنزیم به‌عنوان یک هدف مهم برای درمان‌های اختصاصی همچون استفاده از آنتی‌بادی‌ها، قلمداد می‌شود.

تاکنون بسیاری از پروتئین‌های آنتی‌ژنیک حفاظت‌بخش این باکتری نظیر UreC، HpaA، FlaA، CagA، VacA و غیره مشخص شده است [۱۴-۱۹]. در میان این پروتئین‌های آنتی‌ژنیک، UreC یکی از چهار زیرواحد اوره‌آز است که توسط اغلب گونه‌های جدا شده *H.pylori* بیان می‌شود و ثابت شده است که قوی‌ترین آنتی‌ژن بین تمام پروتئین‌های شناخته شده *H.pylori* است [۱۴، ۲۰، ۲۱]. ژن *ureC* با ۱۷۱۰ جفت‌باز مسئول رمزگذاری ۵۶۹ اسیدآمینهٔ پروتئین UreC، دارای توالی بسیار حفاظت شده‌ای با حدود ۹۵ درصد شباهت در زیرگونه‌های مختلف *H.pylori* است [۲۲-۲۴]. این اطلاعات مشخص می‌کند UreC می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی برای تهیه واکسن یا آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه *H.pylori* مطرح باشد.

از سوی دیگر امروزه، در عرصهٔ کاربردهای متنوع آنتی‌بادی‌ها، تکنولوژی جدید استخراج IgY از زردهٔ تخمِ مرغ در حال گسترش است. IgY که معادل IgG انسانی در پرندگان در نظر گرفته می‌شود، در واقع از نظر تکاملی، نیای مادری IgG و IgE پستانداران است. این ایمونوگلوبولین توسط مرغ تولید شده و به درون زردهٔ تخم مرغ برای ایجاد ایمنی غیرفعال برای جنین، انتقال می‌یابد. تکنولوژی IgY از این پدیده از طریق استخراج IgY از زردهٔ تخم مرغ بهره می‌برد.

در این مطالعه، به‌منظور تهیهٔ آنتی‌بادی مرغی علیه پروتئین UreC باکتری *H.pylori*، ابتدا این پروتئین به شکل نوترکیب تولید شد؛ به این ترتیب که پس از تخلیص ژنوم و تکثیر ژن *ureC* با کمک PCR، قطعهٔ ژنی تکثیر شده روی ناقل *pET28a* به‌عنوان یک سامانهٔ بیانی پروکاریوتی، قرار داده شد و این سازوارهٔ ژنی به میزبان اشرشیاکلی زیرگونه BI21DE3 منتقل شد. بیان پروتئین نوترکیب با ایزوپروپیل بتا- دی تیو گالاکتوزید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) القاء شد و برای دستیابی به بیان مطلوب غلظت‌های مختلف IPTG برای القاء بررسی شد. در ادامه، نتایج با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی His-tag با رزین Ni-NTA تخلیص شد. در نهایت پس از تزریق پروتئین نوترکیب به مرغ، تکمیل دورهٔ ایمن‌سازی، جمع‌آوری تخم مرغ‌ها و جداسازی زردهٔ تخم مرغ از سفیده، IgY از طریق رسوب‌گذاری به کمک پلی‌اتیلن گلیکول (Polyethylene glycol: PEG) با خلوص بیش از ۷۰ درصد تخلیص شد و با سنجش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

باکتری *H.pylori* جدا شده از بیماران ایرانی [۲۵] (آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکدهٔ علوم پایه دانشگاه تهران، دکتر فریده سیاوشی و همکاران) تأیید شده با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، پس از کشت در بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پلاسمید *pET28a* (Novagen، ایالات متحدهٔ آمریکا) و باکتری اشرشیاکلی زیرگونه BL21DE3 (Novagen، ایالات متحدهٔ آمریکا) به‌عنوان سیستم بیانی پروکاریوتی و میزبان مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای (Primers) طراحی شده برای PCR توسط شرکت Cinnagen سنتز شد و آنزیم‌های DNA پلیمراز *Pfu* (*Pfu* DNA polymerase)، DNA لیگاز T4 (T4 DNA ligase) و آنزیم‌های محدودالاثر *SalI* و *EcoRI* از شرکت Fermentas (روسیه) خریداری شدند. کیت تخلیص DNA از ژل و تعیین توالی همسانه‌ها به شرکت Bioneer (کره جنوبی) سفارش داده شده‌اند. ستون میل ترکیبی Ni-NTA از شرکت Qiagen خریداری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۱- تخلیص DNA الگو

H. pylori جدا شده از بیماران ایرانی پس از کشت روی محیط بروسلا آگار غنی شده با سرم گوسفندی و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین (Vancomycin)، تریمتوپریم (Trimthoprim)، آمفوتریسین B (Amphotericin B) و پلی میکسین B (Polymyxin B)، با لوپ جمع‌آوری و در بافر PBS حل شد و تا قبل از تخلیص ژنوم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور تخلیص DNA ژنومی، باکتری‌های جمع شده از روی پلیت در ۵٦۷ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شده و به آن ۳ میکرولیتر سدیم دو دسیل سولفات ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (Cetyl trimethylammonium bromide) (٤ درصد NaCl و ۱۰ درصد CTAB) به مخلوط اضافه شد و ده دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت DNA ژنومی با استفاده از فنل-کلروفرم و تیمار با RNase عاری از DNase تخلیص شد [۲۵]. DNA ژنومی حاصل، در بافر TE حل شد و خلوص و غلظت آن با UV (Ultra violet) اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد [۲٦].

۲-۲- تکثیر ژن زیرواحد C اوره‌آز

توالی آغازگرهای رفت *huc*F و برگشت *huc*R به‌ترتیب شامل 5'-GAGGAATTCGAAATGAAAAAGATTAG-3' که دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر *EcoRI* و 5'-ATCGTCGACGAAAATGCTAAAG-3' که دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر *SalI* هستند. حجم نهایی PCR ۳۰ میکرولیتر، حاوی ۲/۵ مول در لیتر از هر dNTP، ۱۵۰ نانومول در لیتر از هریک از آغازگرها، $MgCl_2$ با غلظت ۵ میلی‌مولار، ۲/۵ واحد *Pfu* پلیمراز، ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو و بافر PCR ۱X بوده است. پارامترهای PCR برای تکثیر ژن *ureC* شامل واسرشته (Denaturation) اولیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخهٔ ۳ مرحله‌ای شامل واسرشته شدن در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال (Annealing) آغازگر در دمای ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱/۵ دقیقه، و در نهایت پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بودند. نتایج PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید (Ethidium bromide) زیر نور ماوراء بنفش (UV) مشاهده شدند. پس از بارگذاری محصول واکنش روی ژل آگارز دارای نقطه ذوب پایین (Low Melting Point Agarose) و استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگارز، قطعهٔ مورد نظر تخلیص شد.

۲-۳- ساخت سازوارهٔ مولکولی همسانه‌سازی ژن *ureC*

پلاسمید *pET28a* و محصول تخلیص شدهٔ PCR با دو آنزیم محدودالاثر *SalI* و *EcoRI* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳ ساعت به‌صورت جداگانه هضم شدند، سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز با دمای پایین بارگذاری شده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگارز، قطعات مورد نظر تخلیص شدند. برای انجام واکنش الحاق، واکنشی با حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم از قطعهٔ مورد نظر و ۸۰ نانوگرم از پلاسمید هضم شده و ۲ واحد آنزیم DNA لیگاز T4 و بافر آنزیم با غلظت نهایی ۱ X در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲ ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاق به باکتری اشرشیاکلی زیرگونه BL21DE3 با روش شوک حرارتی منتقل شدند و غربالگری همسانه‌های حاصل روی محیط LB (Luria Bertani) آگار حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین (Kanamycin) انجام شد. به‌منظور تأیید همسانه‌سازی، پس از کشت همسانه‌های غربال شده در محیط LB آبگوشتی حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد [۲۷]، سپس با انجام هضم آنزیمی قرار

Archive of SID

www.SID.ir

گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و در نهایت با انجام تعیین توالی از همسانه‌ها، صحت همسانه‌سازی تأیید شد. سیستم بیانی ساخته شده pET 28*a-ureC E.coli* BL21DE3 نام‌گذاری شد.

۲-٤- بیان پروتئین نوترکیب هدف

pET 28*a-ureC E.coli* BL21DE3 در محیط LB آبگوشتی حاوی ٦٠ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور (Shaker incubator) با ۲۰۰ دور در دقیقه هوادهی، کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ٦٠٠ نانومتر با IPTG با غلظت ۰/۷ میلی‌مولار القاء و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ ساعت در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه هوادهی انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها با سانتریفیوژ در دور ٦٠٠٠ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شدند و نتایج بیان پروتئین با SDS-PAGE بررسی شد.

۲-۵- تخلیص پروتئین نوترکیب

رسوب باکتریایی جمع‌آوری شده از مرحلهٔ قبل در بافر لیزکننده B (NaH_2PO_4) ۱۰۰ میلی‌مولار، Tris ۱۰۰ میلی‌مولار و Urea ۸ میلی‌مولار) با pH= ۸ حل شده و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Ultrasonic) با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و آمپلی‌فیکاسیون (Amplification) ۰/۵ در ٦ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای و در حمام یخ لیز شد. سلول‌های لیز شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل در بافر لیزکننده حاوی اوره ۸ مولار به‌خوبی حل و هر کدام با SDS-PAGE بررسی شد. پروتئین نوترکیب هدف با کمک ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شستشو با بافرهای شستشودهندهٔ C با pH=٦/۳ و D با pH=۵/۹ و بافر فروشویی E (Elution Buffer) با pH=٤/۵ (ترکیب همهٔ بافرهای ذکر شده شبیه به بافر B بوده و تنها pH آن‌ها تنظیم شده است) تخلیص و نتایج با SDS-PAGE بررسی شد و در نهایت غلظت پروتئین با روش برادفورد (Bradford) به‌دست آمد.

۲-٦- ایمن‌سازی مرغ و ارزیابی ایمنی

۱۵ قطعه مرغ ۲۵ هفته‌ای نژاد لگ‌هورن سفید به‌صورت زیرجلدی در ناحیه سینه با پروتئین نوترکیب تخلیص شده (۲۰۰ میکروگرم) با حجم مساوی از ادجوانت ناقص فروند (Froud's incomplete adjuvant) (مؤسسه رازی) ایمن‌سازی شدند. سه یادآور با همان مقدار پروتئین و ادجوانت ناقص به‌ترتیب با فاصلهٔ زمانی سه، پنج و هفت هفته پس از تزریق اول، تزریق شد. پس از تکمیل دورهٔ ایمن‌سازی به‌منظور تأیید ایمن‌سازی مرغ‌ها، از آن‌ها خون‌گیری انجام شد و پس از جداسازی سرم سنجش ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های ۹٦ چاهکی که با پروتئین نوترکیب UreC (در هر چاهک ۲ میکروگرم) پوشش داده شده بودند، انجام شد. پس از مسدودسازی (Blocking) با ژلاتین ۳ درصد (وزنی به حجمی: w/v) با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۱۰۰۰ سرم مرغ‌های ایمن شده و کنترل به چاهک اول، تا رقت ۱:٦٤۰۰۰ سریالی از رقت‌ها تهیه شد. پس از شستشو با PBS-T (PBS + 0.05 Tween)، کونژوگه خرگوشی ضد آنتی‌بادی مرغی با رقت ۱:۳۰۰۰۰ به چاهک‌ها افزوده شد و سپس سوبسترای OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، پس از مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ٤۹۲ نانومتر، شدت رنگ با قرائت‌گر ELISA خوانده شد. پس از اطمینان از ایمنی مرغ‌ها، تخم مرغ‌ها به‌صورت روزانه به‌مدت ۲ ماه جمع‌آوری و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۷- جداسازی و تخلیص IgY-HpUc

به‌منظور تخلیص آنتی‌بادی IgY-HpUc، ابتدا زرده‌های تخم مرغ از سفیدهٔ تخم مرغ جدا شده و به‌خوبی با آب مقطر شستشو داده شد، کیسهٔ زرده پاره و از محتویات آن با دقت

Archive of SID
www.SID.ir

جدا شد. سپس بافر فسفات (سدیم فسفات ۱۰۰میلی‌مولار، pH= ۷/٦) به‌اندازه دو برابر حجم زرده به آن افزوده شد و سپس به‌خوبی مخلوط شد. به مخلوط ۳/۵ درصد (وزنی به حجمی) پودر PEG افزوده و با کمک استیرر (Stirer) به‌خوبی حل شد، بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به‌وسیله سانتریفیوژ (۳۰ دقیقه در ٤٤۲۰g) لیپوپروتئین‌ها از محلول رویی جدا شدند و سپس محلول رویی با کمک فیلتراسیون با کاغذ صافی (واتمن شمارهٔ ۱) از باقی‌ماندهٔ لیپیدها عاری شد. در مرحلهٔ بعد با افزودن PEG غلظت نهایی آن به ۱۲ درصد (وزنی به حجمی) رسید، پس از حل شدن کامل PEG، محلول سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g) و رسوب در بافر فسفات حل شد (هم حجم، حجم به‌دست آمده از مرحلهٔ فیلتراسیون) و دوباره ۱۲ درصد (وزنی به حجمی) به آن PEG اضافه شده و به‌خوبی حل شد. بعد از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، محلول دوباره سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g). محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در بافر فسفات حاوی ٦۰ درصد گلیسرول با حجمی معادل حجم اولیهٔ زردهٔ تخم مرغ، حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۸].

ELISA -۸-۲

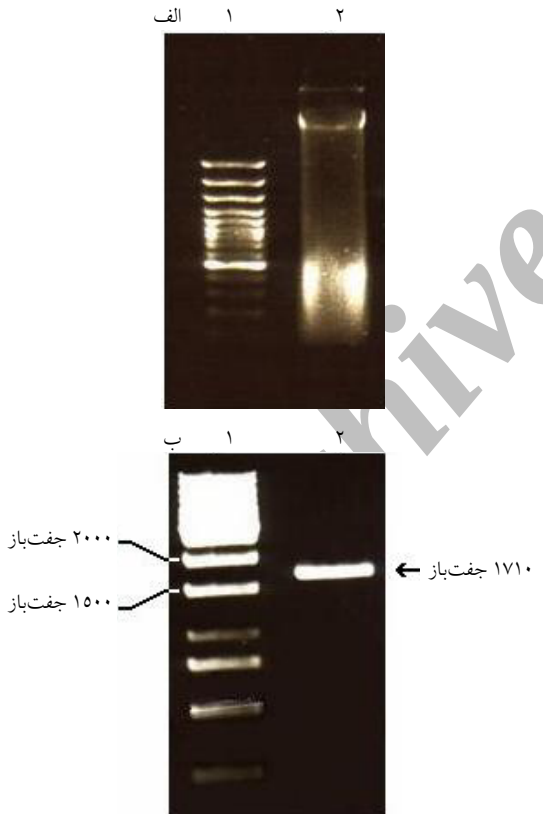
برای سنجش قدرت واکنش‌دهی آنتی‌بادی IgY-HpUc بر علیه زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز *H.pylori*، سنجش ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های ۹٦ چاهکی که با پروتین نوترکیب UreC (در هر چاهک ۲ میکروگرم) پوشش داده شده بودند، انجام شد. پس از مسدودسازی با ژلاتین ۳ درصد (وزنی به حجمی) با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی IgY-HpUc و آنتی‌بادی کنترل به چاهک اول، تا رقت ۱:٦٤۰۰ به‌صورت سریالی از رقت‌ها تهیه شد و پس از شستشو، کونژوگه ضد آنتی‌بادی مرغی با رقت ۱:۳۰۰۰۰ به چاهک‌ها افزوده شد و سپس سوبسترای OPD و H_2O_2 به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، پس از مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ٤۹۲ نانومتر، شدت نور با قرائت‌گر ELISA خوانده شد.

۳- نتایج

PCR -۱-۳

ژنوم تخلیص شده از باکتری *H.pylori* در شکل ۱- الف نشان داده شده است. در شکل ۱- ب محصول PCR ژن *ureC* با آنزیم *Pfu* پلیمراز با اندازهٔ مورد انتظار نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود طول قطعه به‌دست آمده در مقایسه با شاهد با اندازه ژن *ureC* (۱۷۱۰ جفت‌باز) هم‌خوانی دارد که بیان‌گر تکثیر صحیح ژن است.

برای اطمینان بیشتر ژن *ureC* همسانه‌شده برای تعیین ترادف ارسال شد که نتیجه حاصل با توالی‌های موجود در بانک ژن مطابقت داشت.

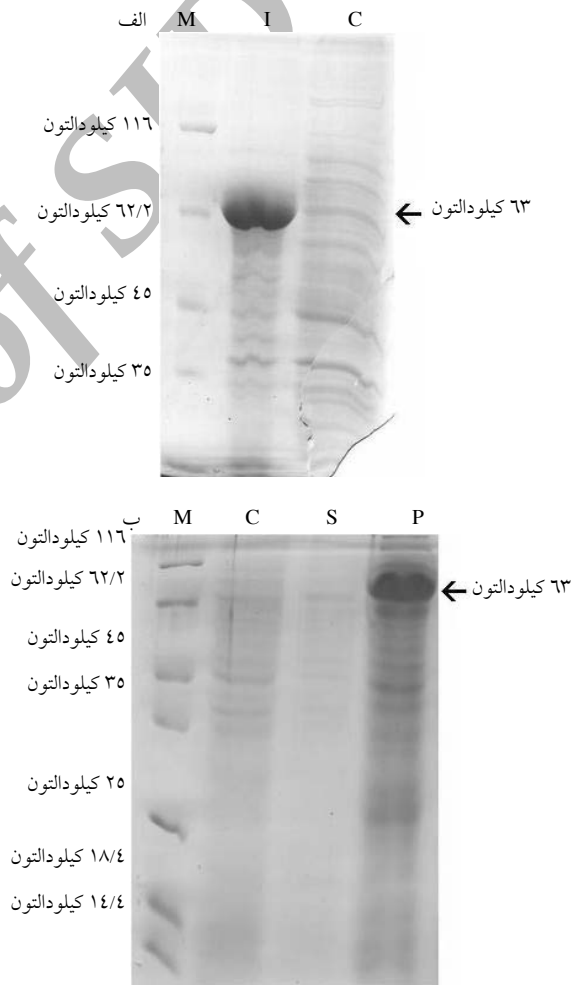


شکل ۱ ژنوم تخلیص شدهٔ *H.pylori* و محصول PCR ژن *ureC* با آنزیم‌های *Taq* و *Pfu* پلیمراز. پانل الف: ستون ۱: نشانهٔ اندازهٔ مولکولی DNA (Fermentas 100bp-plus DNA ladder) و ستون ۲: ژنوم تخلیص شدهٔ *H.pylori* را نشان می‌دهد. پانل ب: ستون ۱: نشانهٔ اندازهٔ مولکولی DNA (Fermentas 100bp-plus DNA ladder) و ستون ۲: محصول PCR ژن *ureC* با آنزیم *Pfu* پلیمراز را نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۲- بیان پروتئین نوترکیب هدف

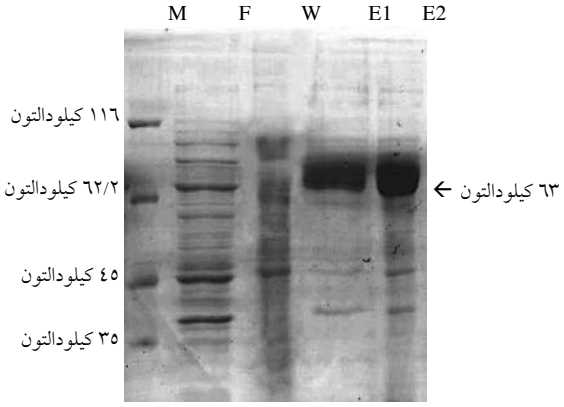
IPTG با غلظت ۰/۷ مول در لیتر توانست به‌صورت کارآمد سیستم بیانی pET28a-*ureC E.coli* BL21DE3 را القاء کند (شکل ۲- الف). بخش اعظم محصول بیان *ureC* در رسوب پس از لیز سلولی مشاهده شد، که نشان می‌دهد پروتئین بیان‌شده تشکیل اجسام نامحلول را داده و تقریباً ۳۵ درصد کل پروتئین‌های سلول باکتریایی را به خود اختصاص داده است (شکل۲- ب).



شکل ۲ بررسی بیان پروتئین نوترکیب UreC روی ژل SDS-PAGE. پانل الف (ژل ۱۰ درصد): ستون M: نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون I: نمونهٔ بیان پروتئین پس از القاء، ستون C: نمونهٔ کنترل قبل از القاء. پانل ب (ژل ۱۲ درصد): ستون M: نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون C: نمونهٔ کنترل قبل از القاء، ستون S: نمونهٔ محلول رویی حاصل از لیز سلولی پس از سانتریفیوژ، ستون P: نمونهٔ رسوب سلولی. پروتئین به‌صورت اجسام نامحلول تولید شده است.

۳-۳- تخلیص پروتئین UreC

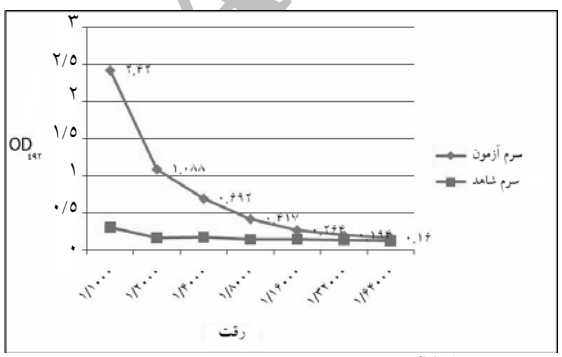
با توجه به این‌که پروتئین نوترکیب UreC به‌صورت اجسام نامحلول تولید می‌شد، بنابراین تخلیص آن در شرایط واسرشته، طبق دستورالعمل کیت Qiagen صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود پروتئین پس از شستشو و حذف پروتئین‌های غیراختصاصی، با خلوص قابل قبولی پس از فروشویی با بافر E استحصال شد.



شکل ۳ بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب UreC با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد. ستون M: نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون F: نمونهٔ خروجی ستون پس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون W: نمونهٔ خروجی ستون پس از شستشو با بافرهای شستشودهنده. ستون E1 و E2: نمونهٔ خروجی ستون پس از فروشویی با بافر E.

۳-۴- ایمن‌سازی مرغ

در نمودار ۱ نتیجهٔ ELISA غیرمستقیم سرم مرغ‌های ایمن‌شده علیه پروتئین نوترکیب UreC مشاهده می‌شود. همان‌طور که در نمودار مشخص است، سطح ایمنی مرغ‌ها نسبت به پروتئین نوترکیب UreC به‌خوبی افزایش یافته است.

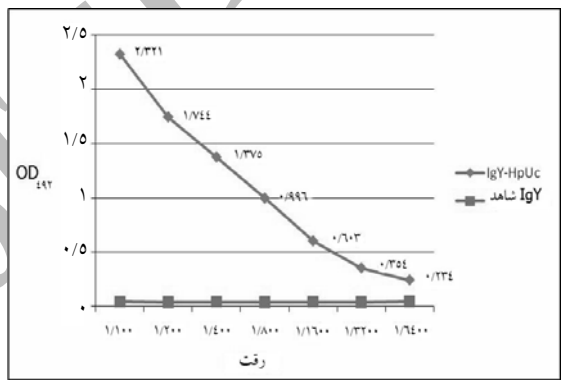


نمودار ۱ نتیجهٔ ELISA غیرمستقیم سرم مرغ‌های ایمن‌شده علیه پروتئین نوترکیب UreC.

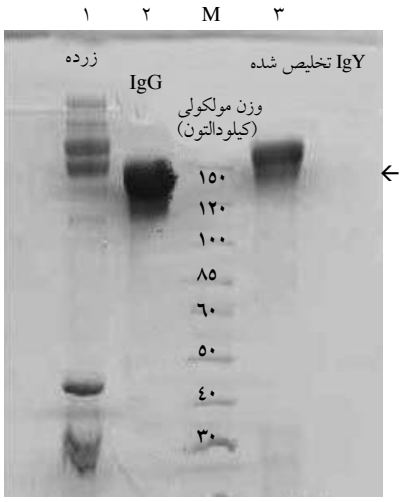
Archive of SID
www.SID.ir

۳-۵- تخلیص IgY-HpUc و انجام ELISA

در شکل ٤ ژل مربوط به آنالیز آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE ۹ درصد مشاهده می‌شود و استحصال آنتی‌بادی با خلوص بالا نیز در شکل قابل مشاهده است. پس از اطمینان از خلوص آنتی‌بادی به‌منظور بررسی واکنش‌دهی آنتی‌بادی سنجش ELISA انجام شد، در نمودار ۲ نتیجهٔ ELISA غیرمستقیم آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده علیه پروتئین نوترکیب UreC مشاهده می‌شود. همان‌طور که در نمودار مشخص است، آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده، پروتئین نوترکیب UreC را به‌خوبی شناسایی می‌کند.



نمودار ۲ نتیجهٔ ELISA غیرمستقیم آنتی‌بادی مرغی (IgY) تخلیص شده علیه پروتئین نوترکیب UreC.



شکل ٤ بررسی تخلیص آنتی‌بادی IgY-HpUc روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. ستون M: نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۱: نمونهٔ مربوط به زردهٔ تخم مرغ قبل از تخلیص، ستون۲: نمونهٔ مربوط به IgG تخلیص شده و۳: نمونهٔ IgY-HpUc تخلیص شده.
•: در این ژل بافر نمونه (Sample buffer) فاقد ۲- مرکاپتو اتانل است.

٤- بحث

درمان سه‌گانه، شامل دو آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین (Amoxicillin) و کلاریترومایسین (Clarithromycin) و یک مهارکنندهٔ پمپ پروتونی به‌مدت یک هفته به‌عنوان درمان منتخب برای عفونت *H.pylori* در بسیاری از کنفرانس‌ها و مجامع عمومی پیشنهاد شده است [۲۹]. با این حال، این نوع درمان اغلب با دلایل مختلفی منجر به شکست شده است [۳۰]. مهم‌ترین دلیل برای عدم کارایی این نحوهٔ درمان مقاومت *H.pylori* به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها است. درمان عفونت *H.pylori* با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی می‌تواند دارای مزایای زیادی به‌دلیل شناسایی اختصاصی *H.pylori* و جلوگیری از چسبیدن آن به سطوح پوششی سیستم گوارش انسان باشد [۳۱]. تحقیقات اخیر در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی با استفاده از مدل‌های حیوانی، نشان می‌دهد که ایمن‌سازی با آنتی‌ژن‌های طبیعی یا نوترکیب می‌تواند در برابر عفونت *H.pylori* حفاظت‌بخش باشد [۳۲]. استفادهٔ خوراکی از IgY زردهٔ تخم مرغ توسط بسیاری از محققین بر علیه عوامل بسیاری از بیماری‌های گوارشی مثل، انتروتوکسیژنیک اشرشیاکلی (*E.coli* Enterotoxigenic) [۳۳]، روتاویروس‌های (Rotaviruses) انسانی [۳٤، ۳۵] و سودوموناس آئروژنزا (*Pseudomonas aeruginosa*) [۳٦] با موفقیت به‌کار گرفته شده است. IgY همچنین لانه‌گزینی استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) را در روی دندان‌ها مهار می‌کند، بنابراین از تشکیل پلاک‌های دندانی در انسان ممانعت به‌عمل می‌آورد [۳۷]. مطالعات نشان می‌دهند که زردهٔ تخم مرغ حاصل از مرغ‌های ایمن‌شده حاوی مقدار زیادی آنتی‌بادی است که قادر به شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن هستند که از نظر اقتصادی نیز مقرون به‌صرفه است [۳۸-٤۰]. شاین (Shin) و همکاران [٤۱] تخمین زده‌اند که ۱ میلی‌لیتر از زردهٔ تخم مرغ (۱۵ میلی‌لیتر به ازای هر تخم مرغ) حاوی ۹/٤ میلی‌گرم (۱٤۱ میلی‌لیتر به ازای هر تخم مرغ) IgY است. هر مرغ در سال ۲۵۰ تخم مرغ (٤۰۰۰ میلی‌لیتر زردهٔ تخم مرغ) می‌گذارد، بنابراین یک مرغ

Archive of SID
www.SID.ir

سالیانه ٤٠ گرم IgY تولید می‌کند. اخیراً شاین و همکاران [٤٢] تأثیر IgY ضد *H.pylori* به‌دست آمده از مرغ‌های ایمن‌شده با عصارهٔ لیز سلولی این باکتری در مونگولین جربیل (*Mongolian gerbil*) که آلوده به *H.pylori* است را گزارش کرده‌اند. در این مطالعه IgY ضد *H.pylori*، التهاب لایهٔ مخاطی معده که توسط این باکتری تحریک می‌شود را کاهش می‌دهد. میزان التهاب با تعیین میزان لنفوسیت‌های بافتی و نفوذ نوتروفیل‌ها مشخص می‌شود [٤١]. آن‌ها همچنین انواعی از IgYهای حاصل از مرغ‌های ایمن‌شده با پروتئین‌های مختلف *H.pylori* را تهیه کردند [٤٢]. اگر IgY دارای تأثیر اختصاصی نباشد، هیچ مهاری در رشد باکتری رخ نمی‌دهد. با توجه به آزمایش‌هایی که در آن‌ها از مدل جربیل استفاده شده بود، به‌وضوح مشخص شده است که IgY صدمات سطوح مخاطی معده ناشی از عفونت *H.pylori* را کاهش می‌دهد، بنابراین ارزش درمانی IgY که به‌صورت خوراکی استفاده می‌شود، در مدل‌های آزمایشگاهی مثل جربیل، به‌دلیل توانایی مهار باکتری‌ها است. دلایل متقاعدکنندهٔ بیشتر در حمایت از اختصاصیت این آنتی‌بادی‌ها در مهار اتصال *H.pylori* به سلول‌های AGS حاصل می‌شود که با میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning electron microscope: SEM) تأیید شده است. اگر چه مکانیسمی که در آن IgY از لانه گزینی *H.pylori* ممانعت می‌کند، تا به حال مشخص نشده است، اما نتایج نشان می‌دهند که IgY می‌تواند خصوصیات مربوط به قدرت چسبندگی *H.pylori* را مهار کند. ارتباط بین مهار فعالیت اوره‌آز و خصوصیات مربوط به چسبندگی باید مشخص شود. مطالعات در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که کل آنزیم اوره‌آز *H. pylori* احتمالاً ایمنی کافی ایجاد نمی‌کند و احتمالاً در چنین حالتی فعالیت آنزیم از بین نمی‌رود [٤٣]. با این حال IgY تولید شده با استفاده از عصارهٔ لیز سلولی، با دیگر باکتری‌هایی که به‌طور معمول در انسان یافت می‌شوند، واکنش تقاطعی می‌دهد [٤٤]. بنابراین نیازمند آنتی‌ژن‌هایی از *H.pylori* با قدرت ایمنی‌زایی بالا برای کاهش عوارض جانبی و افزایش اختصاصیت هستیم. اگر اوره‌آز *H.pylori* یک هدف درست برای ایجاد واکسن‌های مؤثر باشد، بهتر است برای تولید آنتی‌بادی‌هایی که فعالیت آنزیم اوره‌آز را خنثی می‌کنند، مورد استفاده قرار گیرند. براساس این واقعیت، ما تلاش کردیم تا آنتی‌بادی اختصاصی‌تری بر علیه زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز تولید کنیم که بتواند به‌صورت اختصاصی مکانیسم‌های دفاعی بدن را تحریک کند. در این مطالعه ایمن‌سازی مرغ‌ها با پروتئین نوترکیب UreC تخلیص شده منجر به تولید مقدار قابل توجهی آنتی‌بادی در زردهٔ تخم مرغ شد بدون این‌که روی تخم‌گذاری مرغ‌ها تأثیر داشته باشد. تغییرات در تولید آنتی‌بادی نیز شبیه به گزارش‌های قبلی بود [٤٥]. به‌منظور کاربرد عملی IgY در مواد غذایی یا دارویی برای درمان عفونت *H.pylori*، پایداری IgY در مقابل گرما، اسید و پپسین با اندازه‌گیری میزان فعالیت باقی‌ماندهٔ آنتی‌بادی با روش ELISA مورد بررسی قرار گرفته است [٤١]. از لحاظ ایمونولوژیک IgY-Hp در ٦٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ دقیقه فعال باقی می‌ماند که این موضوع امکان پاستوریزاسیون (Pasteurization) به‌منظور استریل کردن محصولات را مطرح می‌کند. غنی‌سازی محصولات غذایی با این ایمنوگلوبولین، در کنارمقدار زیاد تولید و اثرپذیری IgY می‌تواند به‌طور قابل توجهی آلودگی با *H.pylori* را کاهش دهد. هوری (Horie) و همکاران [٤٤] نشان دادند که استفاده از نوشیدنی دوغ که با آنتی‌بادی‌های زردهٔ تخم مرغ علیه آنزیم اوره‌آز، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای *H.pylori*، غنی شده بود، می‌تواند به‌طور مؤثری عفونت با این باکتری را کاهش دهد. در پایان، نتایج مثبت این مطالعه نشان می‌دهد که IgY حاصل از مرغ‌های ایمن‌شده با بخش‌های پروتئینی *H.pylori* ممکن است روش جدیدی برای کنترل عفونت با این باکتری در انسان ایجاد کند. با این حال بعضی از مسائل برای استفادهٔ بالینی حل نشده باقی می‌ماند که شامل، تأثیر IgY بر انسان، ماندگاری تأثیر IgY پس از قطع استفاده و توانایی از بین بردن یک عفونت ایجاد شده، است.

٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد بابت حمایت مالی از این تحقیق و خانم دکتر سیاوشی بابت اهدای زیرگونه باکتری، اعلام می‌دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

٦- منابع

[1] Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to H.pylori. world J Gastroenterol 2006; 12(35): 5593-8.

[2] Malaty HM, Nyren O. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter 2003; 8 Suppl 1: 8-12.

[3] Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med 2002; 347(15): 1174-86.

[4] Prinz C, Schwendv S, Voland P. H pylori and gastric cancer: shifting the global burden. World J Gastroentrol 2006; 12(34): 5458-64.

[5] Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraie M, Sotoudeh M, Yazdanbod A, Shokoohi B, Mashayekhi A, Arshi S, Majidpour A, Babaei M, Mosavi A, Mohagheghi MA, Alimohammadian M. Cancer occurrence in Ardabil: results of a population-based cancer registry from Iran. Int J Cancer 2003; 107(1): 113-8.

[6] Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, Yoonessi A, Tavangar M, Abedi BA, Sotoudehmanesh R, Pourshams A, Asgari AA, Doulatshahi S, Alizadeh BZ, Arshi S, Madjidpoor A, Mir Moomen S, Fleischer DE. Prevalence of gastric precacerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. J Clin Pathol 2004; 57(1): 37-42.

[7] Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghighat M, Hayati M, Rashidi M. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children (south of Iran). Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54(4): 259-61.

[8] Naghavi M. Death report from 10 provinces in Iran, 1 st ed. Tehran: Ministry of Health. 2000; 384.

[9] Nadim A, Noorai M. Cancers. In: Azizi F, Hatami H, Janghorbani M (eds). Epidemiology and control of common diseases in Iran, 1st ed. Tehran: Eshtiagh. 2000: 216–17.

[10] Mégraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004; 53(9): 1374-84.

[11] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. Microbiol Rev 1995; 59(3): 451-80.

[12] Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epitelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. J Exp Med 1998; 187(10): 1659-69.

[13] Gobert AP. Urease release by Helicobacter pylori stimulate macrophage inducible nitric oxide synthase. J Immunol 2002; 168: 6002-6.

[14] Corthésy-Theulaz I, Porta N, Glauser M, Saraga E, Vaney AC, Haas R, Kraehenbuhl JP, Blum AL, Michetti P. Oral immunization with Helicobacter pylori urease B subunit as a treatment against Helicobacter infection in mice. Gastroenterology 1995; 109(1): 115-21.

[15] Opazo P, Müller I, Rollán A, Valenzuela P, Yudelevich A, García-de la Guarda R, Urra S, Venegas A. Serological response to Helicobacter pylori recombinant antigens in Chilean

Archive of SID

www.SID.ir

infected patients with duodenal ulcer, non-ulcer dyspepsia and gastric cancer. APMIS 1999; 107: 1069-78.

[16] Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of H.pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J Bacteriol 1993; 175(11): 3278-88.

[17] Ghiara P, Rossi M, Marchetti M, Di Tommaso A, Vindigni C, Ciampolini F, Covacci A, Telford JL, De Magistris MT, Pizza M, Rappuoli R, Del Giudice G. Therapeutic intragastric vaccination against Helicobacter pylori in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. Infect Immun 1997; 65(12): 4996-5002.

[18] Nilsson I, Utt M. Separation and surveys of proteins of Helicobacter pylori. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002;771(1-2): 251-60.

[19] Marchetti M, Aricò B, Burroni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of Helicobacter pylori infection that mimics human disease. Science 1995; 267(5204): 1655-8.

[20] Rupnow MF, Owens DK, Shachter R, Parsonnet J. Helicobacter pylori vaccine development and use: a cost-effectiveness analysis using the Institute of Medicine Methodology. Helicobacter 1999; 4(4): 272-80.

[21] Pappo J, Thomas WD Jr, Kabok Z, Taylor NS, Murphy JC, Fox JG. Effect of oral immunization with recombinant urease on murine Helicobacter felis gastritis. Infect Immun 1995; 63(4): 1246-52.

[22] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzegerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature 1997; 388(6642): 539-47.

[23] Akada JK, Shirai M, Takeuchi H, Tsuda M, Nakazawa T. Identification of the urease operon in Helicobacter pylori and its control by mRNA decay in response to pH. Mol Microbiol 2000; 36(5): 1071-84.

[24] Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity. J Bacteriol 1991; 173(6): 1920-31.

[25] Siavoshi F, Malekzadeh R, Daneshmand M, Ashktorab H. Helicobacter pylori endemic and gastric disease. Dig Dis Sci 2005; 50(11): 2075–80.

[26] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (M). 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; Chapter 1 p: 21, 52; Chapter 2 p: 60, 80; Chapter 7 p: 3, 35; Chapter 9 p: 14, 22.

[27] Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly

Archive of SID

www.SID.ir

TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. Biochemistry 1966; 5(2): 467–77.

[28] 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.

[29] Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G; European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16(2): 167–80.

[30] Mégraud F, Lamouliatte H. Review article: the treatment of refractory Helicobacter pylori infection. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17(11): 1333–43.

[31] Suzuki H, Masaoka T, Miyazawa M, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Gastric mucosal response to Helicobacter pylori. Keio J Med 2002; 51 Suppl 2: 40–4.

[32] Koesling J, Lucas B, Develioglou L, Aebischer T, Meyer TF. Vaccination of mice with live recombinant Salmonella typhimurium aroA against H. pylori: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. Vaccine 2001; 20(3-4): 413–20.

[33] Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Frohlich AA, Baidoo SK. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against entero-toxigenic Escherichia coli K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23(4): 283–8.

[34] Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, Hammarström L. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 32(1): 19–25.

[35] Ebina T. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. Arch Virol 1996; 12 Suppl: 217–23.

[36] Sugita-Konishi Y, Shibata K, Yun SS, Hara-Kudo Y, Yamaguchi K, Kumagai S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. Biosci Biotechnol Biochem 1996; 60(5): 886–8.

[37] Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, Hirasawa M, Katz J, Childers NK, Michalek SM. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to Streptococcus mutans. Caries Res 1997; 31(4): 268–74.

[38] Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. Biosci Biotechnol Biochem 1993; 57(3): 450–4.

[39] Li X, Nakano T, Sunwoo HH, Paek BH, Chae HS, Sim JS. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. Poult Sci 1998; 77(2): 266–70.

[40] Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000; 749(2): 233–42.

Archive of SID

www.SID.ir

[41] Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH. 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.

[42] 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(Pt 3): 217–22.

[43] Hirota K, Nagata K, Norose Y, Futagami S, Nakagawa Y, Senpuku H, Kobayashi M, Takahashi H. Identification of an antigenic epitope in Helicobacter pylori urease that induces neutralizing antibody production. Infect Immun 2001; 69(11): 6597–603.

[44] Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-Helicobacter pylori urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of H.pylori urease. J Med Microbiol 2004; 53 (Pt 1): 31–4.

[45] Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, Park CK, Kim M, Hatta H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. J Dairy Sci 2004; 87(12): 4073–9.

Archive of SID

www.SID.ir