مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۲: از ۱-۱۰
تابستان ۱۳۸۹

کلون، بیان، تخلیص و بررسی آنتی‌ژنیسیته ترکیب پروتئینی $UreB_{332}$-HpaA هلیکوباکتر پیلوری

بهاره حاجی‌خانی[۱]، شهین نجارپیرایه[۲*]، حوریه سلیمان‌جاهی[۳]، زهیر محمد حسن[۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۱۷ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۳/۱۶

چکیده

هدف: هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی با انتشار وسیع است که موجب آلودگی معده و دئودنوم در انسان‌ها می‌شود. امروزه برخی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی برای درمان عفونت 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 تلاش‌های روبه افزایشی در جهت تولید واکسن مؤثر برای این عفونت صورت گرفته است. هدف این تحقیق ساخت ناقل نوترکیب حامل ترکیب قطعه‌ای از زیر واحد بتای آنزیم اوره‌آز (UreB332) و ادهزین A هلیکوباکتر پیلوری (HpaA)، بیان آن در میزبان بیانی (*E.coli* BL21) و همچنین بررسی آنتی‌ژنیسیته آن به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای طراحی واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری است.

مواد و روش‌ها: ژن‌های کد کننده *ure*B332 و *hpa*A از ژنوم سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR جدا شده و با هضم آنزیمی به داخل ناقل pET28a وارد و سپس به داخل میزبان‌های کلون‌سازی و بیانی وارد شد. پس از تأیید بیان، ترکیب پروتئینی به روش کروماتوگرافی تمایلی توسط رزین نیکل تخلیص و سپس آنتی‌ژنیسیته آن به روش لکه گذاری وسترن بررسی شد.

نتایج: نتایج هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی نشان داد که ژن هدف به درستی در ناقل مورد نظر کلون شده است. این پروتئین نوترکیب توسط آنتی بادی چند تبار خرگوشی ضد هلیکوباکتر پیلوری و سرم انسان آلوده به این باکتری شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان این ترکیب آنتی‌ژنی را به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای بررسی‌های بعدی در مورد واکسن هلیکوباکتر پیلوری معرفی نمود.

کلیدواژگان: هلیکوباکتر پیلوری، اوره‌آز، کلون‌سازی، HpaA

۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) باسیل گرم منفی، میکروآئروفیل، خمیده و واجد فلاژل‌های قطبی است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ از بافت پوششی آنترال (Antral Epithelium) معده انسان جدا شد [۱]. این باکتری

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶
Email: najarp_s@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

یک بیماری‌زای اختصاصی معده انسان بوده که حداقل در معده بیش از نیمی از افراد جهان کلونیزه شده است. فراوانی کلی عفونت تا حد زیادی به شرایط اقتصادی و اجتماعی وابسته است. عفونت اغلب از طریق بلع دهانی باکتری کسب شده و اساساً بین افراد خانواده و در ابتدای کودکی انتقال می‌یابد [۲، ۳]. اکثر مبتلایان بدون علامت بوده با این‌حال عفونت در برخی از آن‌ها با توسعه اولسرهای پپتیک (Peptic Ulcer)، آدنوکارسینومای معده (Stomach Adenocarcinoma)، MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) لنفومای معده و لنفومای غیرهوچکینی (Non-Hodgkin's Lymphoma) همراه است [٤]. این ارگانیسم اخیراً توسط سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان عامل سرطان‌زای کلاس ۱ طبقه‌بندی شده و شواهد مستقیمی از سرطان‌زا بودن آن در مدل‌های حیوانی به‌دست آمده است [۵، ٦].

با وجود پاسخ‌های قوی ایمنی که علیه هلیکوباکتر پیلوری برانگیخته می‌شود، عفونت در اکثر موارد ریشه‌کن نمی‌شود. رژیم‌های درمانی کنونی علیه عفونت شامل ترکیبی از دو آنتی‌بیوتیک مختلف همراه با یک مهار کننده پمپ پروتونی است که در اکثر موارد به پاک‌سازی باکتری منجر می‌شود. با این‌حال معایب متعددی مانند رویداد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، بروز عفونت مجدد، عدم تأثیر بر اشکال غیرفعال باکتری و هزینه بالا برای این روش درمانی گزارش شده است [۷]. از این‌رو ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری (مانند واکسیناسون) مطرح می‌شود. اطلاع از نوع پاسخ ایمنی مؤثر در حفاظت علیه باکتری، شناسایی آنتی‌ژن‌های مناسب باکتری در تحریک ایمنی و پاسخ ایمنی ناشی از آن‌ها از نکات اصلی در راستای دستیابی به واکسن‌های کارآمد به‌شمار می‌آید.

برای تولید یک واکسن مؤثر بر هلیکوباکتر پیلوری آنتی‌ژنی پایدار، حفاظت شده و قوی ضروری است. در این زمینه آنتی‌ژن‌های مختلفی مانند BabA، Hsp، HpaA، VacA، CagA، Urease، FlaA، FlaB و ... بررسی شده‌اند. تعدادی از آن‌ها دارای تنوع آنتی‌ژنی، واکنش تقاطعی با سایر پروتئین‌ها یا ایمنی‌زایی کمتری دارند. به‌عنوان مثال آنتی‌بادی ضد سیتوتوکسین واکوئوله A (VacA) و پروتئین شوک حرارتی (Heat Shock Protein: HSP) تنها در ٦٨ درصد افراد آلوده با هلیکوباکتر دیده می‌شود [۸]. براساس مقالات موجود اوره‌آز باکتری از بهترین کاندیداهای واکسن بوده [۹] و همچنین پروتئین غلاف فلاژلی (HpaA) نیز به علت حفاظت شدگی بالا و وجود آنتی‌بادی ضد آن در سرم حدود ۸۵ درصد از بیماران آلوده به باکتری به‌عنوان یک آنتی‌ژن مناسب برای بررسی حفاظت بخشی مطرح است [۱۰]. HpaA پروتئین اصلی غلاف فلاژلی با ۲۹ کیلودالتون وزن است. این پروتئین جزء پروتئین‌های غشای خارجی باکتری بوده و نقش مهمی را در اتصال باکتری ایفا می‌کند [۱۱].

تمام ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری مقادیر زیادی آنزیم اوره‌آز تولید می‌کند. این آنزیم دارای وزن مولکولی حدود ٥٤٠ کیلودالتون بوده و به‌صورت یک هگزامر واجد نیکل و متشکل از دو زیر واحد UreA (۲۹/٥ کیلودالتون) و UreB (٦٦ کیلودالتون) به نسبت ۱ به ۱ است [۱۲]. اوره‌آز یک عامل ویرولانس (Virulence) ضروری محسوب می‌شود و موتانت‌های آن ناتوان از کلونیزه کردن معده موش [۱۳] و موش خرما [۱٤] است. مطالعات نشان می‌دهد که UreB در مقایسه با UreA در مدل‌های موشی از سلامت و ایمنی‌زایی بالاتری برخوردار است [۱٥].

با استفاده از آنتی‌بادی‌های خنثی کننده آنزیم، شی (Shi) و همکارانش اپی‌توپ‌های مهم UreB که توسط سلول‌های T کمکی (T helper: Th) شناسایی می‌شود را به‌صورت U546-561، U237-251 و U229-244 معرفی کرده‌اند [۱٦]. همچنین هیروتا (Hirota) و همکاران به اپی‌توپ U321-339 اشاره کرده‌اند که واجد جایگاه فعال آنزیم نیز هست [۱۷]. در صورت استفاده از اپی‌توپ‌های اصلی هر آنتی‌ژن به جای آنتی‌ژن کامل، اولاً اختصاصیت قطعه بالا رفته و پاسخ‌های ایمنی اختصاصی‌تری تحریک می‌شود، دوم آن‌که با کوچک شدن قطعه مورد بررسی تکثیر و ترکیب آن با سایر آنتی‌ژن‌ها راحت‌تر صورت می‌گیرد. بنابراین به‌منظور معرفی کاندیدای

Archive of SID
www.SID.ir

مناسبی برای بررسی‌های بیشتر در زمینه تولید واکسنی کارآمد، در تحقیق حاضر به تولید، تخلیص و بررسی آنتی‌ژنیسیته قطعه UreB332 که حاوی اپی‌توپ‌های Th1 و Th2 است همراه با پروتئین HpaA به‌صورت ترکیب پروتئینی (Fusion Protein) نوترکیب پرداخته شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه باکتری و شرایط کشت

سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری ۲٦٦۹۵ تهیه و در محیط بروسلا آگار (Brucella Agar) غنی شده با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند، ۱۰ درصد سرم جنین گاو و آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid)، ونکومایسین (Vancomycin) و آمفوتریسین B (Amphotericin B) کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۷ روز تحت شرایط میکروآئروفیل (Co_2 ۵ درصد) و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از این مدت باکتری‌های رشد یافته برای استخراج DNA استفاده شد.

۲-۲- طراحی آغازگر برای ژن‌های *hpa*A و قطعه مورد نظر از *ure*B و انجام PCR

برای طراحی آغازگر، توالی ژن‌های مورد نظر از بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) تهیه شد. در مورد HpaA کل قطعه ژنی و در مورد UreB قطعه حاوی اپی‌توپ‌های اصلی آن در فاصله نوکلئوتیدهای ۱٦۸۳-٤۵۸ (آمینواسیدهای ۲۲۹ تا ۵٦۱) در نظر گرفته شد و توسط نرم‌افزار Gene Runner آغازگرهای مناسب طراحی شد.

آغازگرهای پیشرو و معکوس برای *hpa*A واجد جایگاه برش آنزیم‌های *Hind*III و *Xho*I به‌ترتیب به‌صورت 5'-ATA AAG CTT TCG GTG GTG GAA CGA TG-3' و 5'-TAT CTC GAG TTG TCG GTT TCT TTT GC-3' و برای *ure*B332 آغازگرهای حاوی جایگاه برش آنزیم‌های *Nde*I و *Sac*I به‌ترتیب به‌صورت 5'-AAC CCA TAT GTC TGC AAT CAA TCA TGC-3' و 5'-TTG GAG CTC GCT CAC TTT ATT GGC TG -3' تهیه شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۰/۵ میکرومول از هر آغازگر، ۵ میکرولیتر بافر PCR (۵X) واجد $MgSO_4$، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTP، ۲/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز *pfu* (Takara، ژاپن) و ۲۰۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. شرایط PCR برای هر دو ژن به‌طور یکسان و به‌صورت ابتدا ۲ دقیقه در ۹۸ درجه و سپس ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه برای ۳۰ چرخه و در نهایت ۸ دقیقه در ۷۲ درجه انجام گرفت. پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد و سپس قطعات ژنی مورد نظر از ژل بریده و توسط کیت استخراج DNA (ساخت شرکت Bioneer، کره) خالص شد.

۲-۳-کلون‌سازی ژن‌های *hpa*A و *ure*B332 و تهیه ترکیب آن‌ها

با توجه به جایگاه‌های آنزیمی تعبیه شده در آغازگرها، قطعات در شرایط بافری خاص هر آنزیم برش خورده و سپس از روی ژل آگارز توسط کیت استخراج خالص‌سازی شد. ناقل pET28a نیز با آنزیم‌های مشابه با آنزیم‌های برش‌دهنده هر یک از ژن‌ها در شرایط مشابه برش خورده و سپس ناقل‌های خطی شده از ژن استخراج شدند. در مرحله بعد واکنش الحاق بین ناقل‌ها و قطعات برش خورده با استفاده از آنزیم لیگاز انجام گرفت و ناقل‌های حاصل به‌صورت جداگانه از طریق ترنسفورماسیون (Transformation) به میزبان کلونینگ (*E.coli* DH5α) مستعد شده وارد شد. پس از رشد کلونی‌ها استخراج پلاسمید از آن‌ها توسط کیت استخراج پلاسمید (ساخت شرکت Bioneer، کره) انجام گرفت و صحت کلونینگ به روش PCR و هضم آنزیمی تأیید شد. به‌منظور تهیه ترکیب پروتئین‌ها، ناقل نوترکیب pET28a-*ure*B332 توسط آنزیم‌های *Hind*IIII و *Xho*I برش خورده و

Archive of SID

www.SID.ir

سپس *hpa*A برش خورده با همین آنزیم‌ها طی فرایند الحاق وارد ناقل نوترکیب شد. پس از انتقال به میزبان کلونینگ و استخراج پلاسمید، صحت این مرحله نیز به روش PCR و هضم آنزیمی تأیید شده و مقداری از ناقل حاوی ترکیب ژن‌ها برای تعیین توالی به خارج از کشور ارسال شد.

۲-٤- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب UreB332-HpaA

انتقال ناقل نوترکیب به میزبان بیانی اشرشیاکلی BL21 طی مراحل کشت و صلاحیت‌دار کردن باکتری، ترنسفورماسیون و تأیید آن مشابه موارد ذکر شده در مرحله قبل صورت گرفت. باکتری‌های حاوی ناقل نوترکیب در محیط LB براث (Luria-Bertani Broth) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (Kanamycin) به میزان ۳۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری ٦۰۰ نانومتر (Optical Density$_{600}$: OD$_{600}$) برابر با ۰/۸، توسط IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مول القا شدند. پس از طی ٤ ساعت دیگر انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رسوب سلولی حاصل از سانتریفوژ در PBS (Phosphate Buffered Saline) حل شده و مورد ۱۰ چرخه ٤۰ ثانیه‌ای سونیکاسیون (Sonication) در ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. وزن مولکولی و محل قرارگیری پروتئین نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE (Sodium dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) بررسی شد. در مرحله بعد پروتئین مورد نظر به علت وجود دنباله هیستیدینی توسط رزین نیکل و کروماتوگرافی تمایلی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen- آمریکا) تخلیص شد.

۲-۵- تولید آنتی‌بادی چند تبار (Polyclonal)

به‌منظور تهیه آنتی‌بادی چند تبار ضد هلیکوباکتر پیلوری، ابتدا مقداری از لیزات سلول کامل پیکره هلیکوباکتر پیلوری (حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم پروتئین) به همراه ۱ میلی‌لیتر PBS و ۱ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند (Complete Freund's Adjuvant) مخلوط شده و به خرگوش ماده سفید به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. دوزهای یادآور به همراه ادجوانت ناقص فروند (Incomplete Freund's Adjuvant) و با فواصل دو هفته‌ای با همان روش تزریق شد. یک هفته پس از آخرین تزریق از حیوان خون‌گیری شده و سرم آن در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-٦- بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب

برای بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب از روش لکه‌گذاری وسترن (Western) استفاده شد. محصول پروتئینی پس از انجام SDS-PAGE به غشای نیتروسلولزی (۰/٤۵ میکرومتر) انتقال داده شد و به‌منظور ممانعت از واکنش‌های غیراختصاصی، غشا توسط اسکیم میلک (Skim Milk) ۱ درصد مسدود شد. سپس غشا، به‌مدت دو ساعت در مجاورت آنتی‌بادی چند تبار خرگوشی ضد هلیکوباکتر پیلوری (غلظت ۱:۲۵۰۰ در PBS-توئین) قرار گرفت. پس از سه مرحله شستشو، هر بار ۵ دقیقه در بافر TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20)، غشا به‌مدت ۱-۲ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه نشاندار که با TBS-T تا غلظت ۱:۵۰۰۰ رقیق شده بود، قرار داده شد. پس از شستشو، غشا در معرض محلول سوبسترای پراکسیداز شامل دی‌آمینوبنزیدین ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و پراکسید هیدروژن ۰/۱ درصد در TBS قرار داده شد. پس از ظهور باندها، غشای نیتروسلولز با آب مقطر شستشو و در محل تاریک نگهداری شد.

۲-۷- بررسی فعالیت اوره‌آزی پروتئین نوترکیب

به‌منظور بررسی فعالیت آنزیمی قطعه پروتئینی تولید و تخلیص شده از کیت اوره‌آز سریع (شرکت بهارافشان، ایران) استفاده شد. میزان ۱۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب به یک ویال آزمون افزوده شد و ایجاد رنگ قرمز ناشی از هیدرولیز اوره محیط و تغییر رنگ معرف فنل قرمز (Phenol Red) به‌عنوان

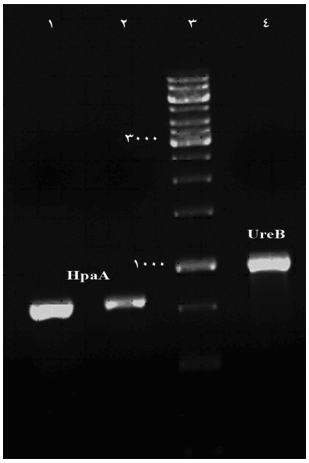
Archive of SID
www.SID.ir

واکنش مثبت و وجود فعالیت اوره‌آزی تلقی شد. از پروتئین نوترکیب HpaA به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

۳- نتایج

۳-۱- استخراج DNA و انجام PCR

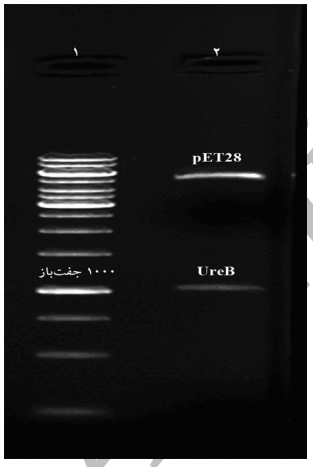
پس از استخراج DNA از کلونی‌های رشد یافته هلیکوباکتر پیلوری، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر یک از ژن‌ها انجام گرفت. باندهای مربوط به هر کدام از ژن‌های تکثیر شده روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده و اندازه آن‌ها از طریق مقایسه با نشانگر (Marker) استاندارد تأیید شد. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود باندهای ۱۰۱۷ و ۸۵۰ جفت‌بازی به‌ترتیب حاصل از تکثیر ژن‌های *ure*B و *hpa*A روی ژل آگارز کاملاً مشخص است.



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *ure*B و *hpa*A از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری روی ژل آگارز ۱ درصد؛ **ستون ۱، ۲)** محصول PCR برای ژن *hpa*A با اندازه ۸۵۰ جفت‌باز، **ستون ۳)** نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت‌بازی، **ستون ٤)** محصول PCR برای قطعه ژنی *ure*B332 با اندازه ۱۰۱۷ جفت‌باز

۳-۲- ساخت ناقل نوترکیب pET28a-ureB332-hpaA

پس از واردسازی قطعه *ure*B به درون ناقل pET28a، ایجاد ناقل نوترکیب pET28a-*ure*B332 با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Nde*I و *Sac*I تأیید شد که نتیجه آن در شکل ۲ مشاهده می‌شود. همان‌گونه که انتظار می‌رود قطعه ۱۰۱۷ جفت‌بازی از داخل ناقل بیرون آمده و به‌صورت باند جداگانه پایین‌تر از باند پلاسمید خطی شده قرار گرفته است. در مرحله بعد *hpa*A برش خورده با *Hind*III و *Xho*I به داخل ناقل نوترکیب حاوی *ure*B332 که با همین آنزیم‌ها برش خورده بود وارد شد. انجام PCR با استفاده از ناقل نوترکیب حاوی *ure*B332-*hpa*A به‌عنوان الگو و آغازگرهای پیشروی ژن اول و معکوس ژن دوم، حضور قطعه حاصل از ورود هر دو ژن به ناقل را تأیید نمود. مطابق شکل ۳ باند ۱۹٦۷ جفت‌بازی حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر روی ژل آگارز مشاهده شد. همچنین انجام هضم آنزیمی دوگانه پلاسمید نوترکیب pET28a-*ure*B332-*hpa*A با *Nde*I و *Xho*I موجب شد که ترکیب ژنی *ure*B332-*hpa*A با اندازه ۱۹۰۸ جفت‌بازی از پلاسمید خطی شده pET28a خارج شود که نتیجه آن در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل ۲ نتیجه بررسی صحت کلون شدن قطعه ژنی مشتق از *ure*B؛ **ستون ۱)** نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت‌بازی، **ستون ۲)** نتیجه هضم آنزیمی دوگانه پلاسمید نوترکیب pET28a-*ure*B332 با *Nde*I و *Sac*I که موجب شده قطعه ژنی *ure*B332 با اندازه ۱۰۱۷ جفت‌بازی از پلاسمید خطی شده pET28a خارج شود.

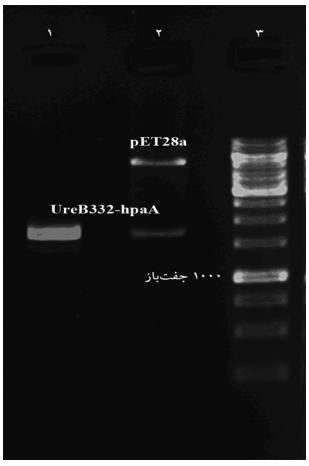
۳-۳- بیان و تخلیص ترکیب پروتئینی UreB332-HpaA

پس از انتقال ناقل نوترکیب pET28a-*ure*B332-*hpa*A

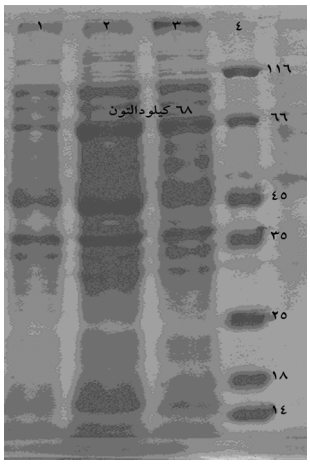
Archive of SID

www.SID.ir

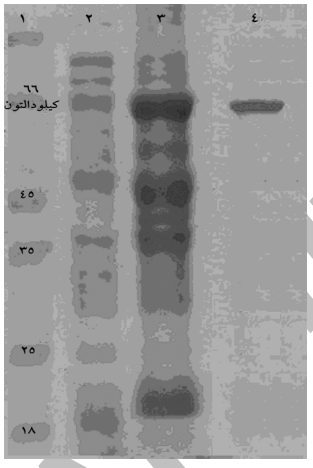
به سلول‌های مستعد شده باکتری *E.coli* BL21(DE3)، به‌منظور بیان پروتئین، القا با IPTG انجام شد و تولید پروتئین مورد نظر با وزن ٦٨ کیلودالتون با انجام SDS-PAGE تأیید شد که نتیجه آن در شکل ٤ آمده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود باند ٦٨ کیلودالتونی حاصل از بیان ترکیب پروتئینی در نمونه غیرالقا وجود ندارد اما در نمونه‌های القا شده به‌خوبی قابل مشاهده است. پس از کشت انبوه باکتری، رسوب سلولی با استفاده از سونیکاسیون شکسته شده و پس از سانتریفوژ رسوب و مایع رویی حاصل با انجام SDS-PAGE از نظر وجود پروتئین نوترکیب بررسی شد. نتایج نشان داد که بخش اعظم پروتئین مورد نظر در رسوب [به‌صورت انکلوزیون‌بادی (Inclusion Body)] قرار دارد (شکل٥). با توجه قرار گرفتن برچسب هیستیدینی در ابتدای ترکیب پروتئینی و براساس ماهیت پروتئین نوترکیب، خالص‌سازی آن در حالت واسرشته (Denature) با استفاده از رزین نیکل و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت و محصول استخراج روی ژل SDS-PAGE، تک باندی در ناحیه مورد انتظار (٦٨ کیلودالتون) نشان داد (شکل٥).



شکل ٣ ستون ١) محصول PCR برای ترکیب *ure*B332-*hpa*A (انجام گرفته روی پلاسمید نوترکیب برای تأیید کلون‌سازی)، **ستون ٢)** نتیجه هضم شآنزیمی دوگانه پلاسمید نوترکیب با NdeI و XhoI که موجب شده ترکیب ژنی *ure*B332-*hpa*A با اندازه ١٩٠٨ جفت‌بازی از پلاسمید خطی شده pET28a خارج شود. **ستون ٣)** نشانگر وزن مولکولی ١٠٠٠ جفت‌بازی



شکل ٤ ارزیابی بیان UreB332-HpaA نوترکیب در میزبان بیانی *E.coli*, BL-21(DE3) روی SDS-PAGE؛ **ستون ١)** لیزات باکتریایی حاصل از یک کلون نوترکیب القا نشده (کنترل بیان)، **ستون‌های ٢ و ٣)** لیزات باکتریایی حاصل از ٢ کلون نوترکیب القا شده با IPTG و بیان UreB332-HpaA نوترکیب (٦٨ کیلودالتون)



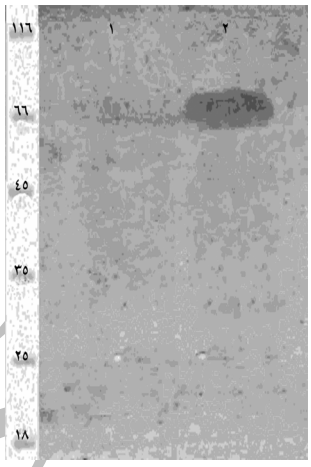
شکل ٥ نتیجه SDS-PAGE انجام شده روی محصول سونیکاسیون و تخلیص؛ **ستون١)** نشانگر پروتئینی، **ستون‌های ٢ و ٣)** به‌ترتیب مایع رویی و رسوب حاصل از سانتریفوژ محصول سونیکاسیون سلول‌های بیان کننده پروتئین نوترکیب UreB332-HpaA، **ستون ٤)** پروتئین نوترکیب UreB332-HpaA تخلیص شده توسط رزین نیکل

٣-٤- لکه‌گذاری وسترن

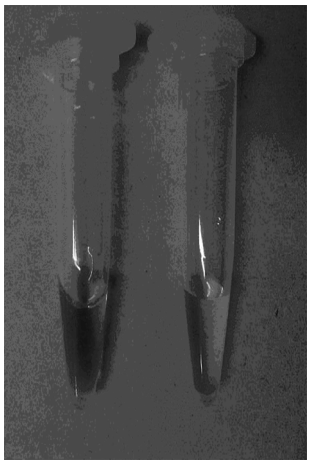
به‌منظور بررسی واکنش‌دهی پروتئین نوترکیب با آنتی‌بادی چند تبار ضد هلیکوباکتر پیلوری، آزمون لکه‌گذاری وسترن انجام گرفت. ظهور باندهای ناشی از واکنش پروتئین با

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌بادی مورد استفاده در محل مورد انتظار آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب مورد بررسی را تأیید نمود (شکل٦).



شکل ٦ ایمونوبلاتینگ UreB332-HpaA نوترکیب با آنتی‌بادی چند تبار خرگوشی علیه هلیکوباکتر پیلوری؛ **ستون ۱**) لیزات باکتریایی حاصل از کلون نوترکیب القا نشده (کنترل بیان)، **ستون ۲**) لیزات باکتریایی حاصل از یک کلون نوترکیب القا شده با IPTG



شکل ۷ آزمون اوره‌آز سریع؛ سمت راست واکنش منفی (با استفاده از HpaA نوترکیب)، سمت چپ واکنش مثبت (با استفاده از UreB332-HpaA نوترکیب)

۳-۵- آزمون اوره‌آز سریع

میزان ۱۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب تخلیص شده به تیوب آزمایش افزوده شد. ظهور سریع رنگ قرمز وجود فعالیت اوره‌آزی را در پروتئین UreB332-HpaA تأیید نمود. به‌عنوان کنترل منفی از مقدار ۱۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب و خالص شده HpaA استفاده شد که در این مورد تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۷).

٤- بحث

با توجه به بروز مقاومت به درمان‌های دارویی، پایداری بالای هلیکوباکتر پیلوری در میزبان انسانی و امکان بروز عوارض متعدد ناشی از حضور طولانی مدت این ارگانیسم در معده، امروزه مطالعات وسیعی در زمینه بررسی آنتی‌ژن‌های متفاوت این باکتری و امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان واکسن در حال انجام است.

امروزه تکنولوژی استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب پروتئینی برای ایمن‌سازی به سمت شناسایی اپی‌توپ‌های اصلی آنتی‌ژن برای تحریک ایمنی و استفاده از آن‌ها به جای پروتئین کامل پیش می‌رود. در این حالت کوچک شدن قطعه مورد نظر و اختصاصی‌تر شدن آن باعث سهولت کار و احتمالاً افزایش حفاظت بخشی می‌شود. با توجه به مطالعات انجام شده، قطعه‌ای از زیرواحد B آنزیم اوره‌آز باکتری که حاوی تعدادی از اپی‌توپ‌های مهم و همچنین جایگاه فعال آنزیم به‌صورت متصل با پروتئین غلاف فلاژلی آن در تحقیق حاضر تولید و بررسی شد.

مطالعات نشان داده است که پروتئین‌های نوترکیب در اکثر موارد، خواص ساختاری پروتئین طبیعی را دارد و در مورد باکتری‌های نسبتاً کند رشد و پر نیاز نظیر هلیکوباکتر پیلوری تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی بسیار مقرون به صرفه است. به‌طوری که می‌توان تولید پروتئین‌هایی را که در حالت طبیعی به میزان اندک صورت می‌گیرد، در حالت نوترکیب به میزان دلخواه افزایش داد. علاوه بر این، خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب نسبت به پروتئین طبیعی راحت‌تر انجام می‌شود (به‌عنوان مثال از طریق برچسب هیستیدینی). استفاده از ترکیب پروتئین‌ها در مقایسه با مصرف

Archive of SID
www.SID.ir

جداگانه آن‌ها می‌تواند احتمال برداشت همزمان آن‌ها توسط سلول‌های میزبانی را افزایش دهد و هر دو پروتئین به میزان برابر و در شرایط یکسان سیستم ایمنی را تحریک می‌نمایند.

شی و همکاران در سال ۲۰۰۷ ضمن معرفی اپی‌توپ‌های اصلی زیرواحد UreB به‌صورت U546-561، U237-251 و U229-244 نشان دادند که تلقیح زیرجلدی پپتیدهای مصنوعی حاوی این اپی‌توپ‌ها همراه ادجوانت فروند به موش موجب برانگیخته شدن پاسخ‌های CD_4^+ T علیه اوره‌آز باکتری می‌شود [۱۶].

قطعه مورد بررسی در تحقیق حاضر به گونه‌ای انتخاب شده که حاوی تمام این اپی‌توپ‌ها است. همچنین در بررسی حاضر از پروتئین به‌صورت نوترکیب استفاده شد که در مقایسه با پپتیدهای مصنوعی کم هزینه‌تر و کاربردی‌تر است.

در سال ۲۰۰٤ توسط فوجی (Fuji) و همکاران با توجه به حضور جایگاه فعال آنزیم اوره‌آز در زیرواحد B، قطعه‌ای ۱۳۵ آمینواسیدی از UreB به‌عنوان یک ترکیب پروتئین همراه با گلوتاتیون S ترنسفراز در اشرشیاکلی تولید شد [۱۸]. آنتی‌سرم تولید شده در اثر ایمن‌سازی خرگوش با UreB-GST، اتصال اختصاصی به سطح مخاط معده انسان‌های آلوده با هلیکوباکتر پیلوری را نشان داده و موجب مهار فعالیت اوره‌آز باکتری شده است. در حالی که اوره‌آز کامل خالص شده چنین آنتی‌سرمی را القا نمی‌کند [۱۸].

قطعه UreB332 تولید شده در بررسی حاضر براساس مطالعات موجود حاوی توالی آمینواسیدی مربوط به جایگاه فعال آنزیم نیز هست. آزمون اوره‌آز سریع که در تحقیق حاضر روی هر سه پروتئین نوترکیب HpaA، UreB332 و ترکیب آن‌ها انجام شد، نشان داد که UreB332 و ترکیب آن با HpaA واجد فعالیت اوره‌آزی است که علاوه بر تأیید ارتباط فعالیت اوره‌آزی با زیرواحد B، تأیید کننده وجود ساختار مناسب برای بروز فعالیت آنزیمی در پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در این بررسی است.

ساتون (Sutton) و همکاران در سال ۲۰۰۷ به بررسی کفایت واکسن HpaA نوترکیب پرداخته و مشاهده کردند که ایمن‌سازی پروفیلاکتیک (Prophylactic) به کاهش کلونیزاسیون باکتری در موش‌های BALB/c و QS منجر می‌شود [۱۹]. در این تحقیق اشاره شده که استفاده از HpaA در واکسن‌های چند آنتی‌ژنی مانند HpaA-UreB در مقایسه با استفاده آن به تنهایی تأثیر بیشتری خواهد داشت [۱۹].

به‌طور کلی نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که ترکیب پروتئینی حاوی UreB332 و HpaA به درستی تهیه و تخلیص شده است. بررسی لکه‌گذاری وسترن نیز نشان‌دهنده واکنش‌پذیری و قابلیت شناسایی این ترکیب توسط آنتی‌بادی چند تبار خرگوشی ضد هلیکوباکتر پیلوری است. همچنین وجود فعالیت اوره‌آزی در این پروتئین نوترکیب تأیید کننده وجود ساختار مناسب در پروتئین تولیدی است.

به‌علت وجود هر دو آنتی‌ژن مهم UreB و HpaA در ترکیب تولید شده در تحقیق حاضر، انتظار می‌رود که این ترکیب قادر به تحریک پاسخ ایمنی مناسب و حفاظت بخش در مدل حیوانی باشد که تأیید این مسئله نیاز به مطالعات بیشتر از جمله ایمن‌سازی حیوان مناسب و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی ناشی از آن دارد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از اساتید و دانشجویان گروه ایمنی‌شناسی که ما را در این تحقیق یاری رساندند، تشکر و قدردانی می نماییم.

٦- منابع

[1] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet1984; 1(8390): 1311-5.

[2] Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, Herranz M, Saldinger

Archive of SID
www.SID.ir

PF, Corthésy-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. Gastroenterology 1999; 116(4): 804-12.

[3] Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. J Gastroenterol Hepatol 2001; 16(7): 734-9.

[4] Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepman NY, Sugg JE, Hopkins RJ. *Helicobacter pylori* and early duodenal ulcer status post-treatment: a review. Helicobacter 2001; 6(2): 84-92.

[5] Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. Gastroenterology 1998; 115(3): 642-8.

[6] Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer Res1998; 58(19): 4255-9.

[7] Chi CH, Lin CY, Sheu BS, Yang HB, Huang AH, Wu JJ. Quadruple therapy containing amoxicillin and tetracycline is an effective regimen to rescue failed triple therapy by overcoming the antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18(3): 347-53.

[8] Yan J, Mao YF, Shao ZX. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. World J Gastroenterol 2005; 11(3): 421-5.

[9] Hatzifoti C, Wren BW, Morrow WJ. *Helicobacter pylori* vaccine strategies--triggering a gut reaction. Immunol Today 2000; 21(12): 615-9.

[10] Carlsohn E, Nyström J, Bölin I, Nilsson CL, Svennerholm AM. HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. Infect Immun 2006; 74(2): 920-6.

[11] Lundstrom AM, Bolin I, Bystrom M, Nystrom S. Recombinant HpaA purified from *Escherichia coli* has biological properties similar to those of native *Helicobacter pylori* HpaA. APMIS 2003; 111(3): 389-97.

[12] Lee CK, Weltzin R, Thomas WD Jr, Kleanthous H, Ermak TH, Soman G, Hill JE, Ackerman SK, Monath TP. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with Helicobacter felis. J Infect Dis 1995; 172(1): 161-72.

[13] Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. Infect Immun 1994; 62(8): 3586-9.

[14] Andrutis KA, Fox JG, Schauer DB, Marini RP, Murphy JC, Yan L, Solnick JV. Inability of an isogenic urease-negative mutant stain of

Archive of SID

www.SID.ir

Helicobacter mustelae to colonize the ferret stomach. Infect. Immun 1995; 63(9): 3722–5.

[15] Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(14): 6499-503.

[16] 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; 25(14): 2583-90.

[17] 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.

[18] Fujii R, Morihara F, Fukushima K, Oku T, Hifumi E, Uda T. Recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against *H. pylori*-associated disease. Biotechnol Bioeng 2004; 86(7): 737-46.

[19] Sutton P, Doidge C, Pinczower G, Wilson J, Harbour S, Swierczak A, Lee A. Effectiveness of vaccination with recombinant HpaA from *Helicobacter pylori* is influenced by host genetic background. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50(2): 213-9.

Archive of SID

www.SID.ir