مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۲، شماره ۱، بهار ۹۱، صفحات ۲۳ تا ۳۱

Original Article

همسانه‌سازی، بیان و تخلیص انتهای کربوکسیل زیرواحد C آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری به منظور تولید IgY در زردهٔ تخم مرغ

حسین بصیری[۱]، سید لطیف موسوی گرگری[۲]، ایرج رسولی[۳]، کاظم پریور[۴]، طاهر نژادستاری[۴]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
[۳] استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
[۴] استاد، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *هلیکوباکتر پیلوری (H.pylori) نوعی باکتری گرم منفی اسپیرال و میکروآیروفیل است که در لایه مخاطی معده انسان تکثیر و ایجاد عفونت می‌نماید. رویکردهای جدید در جهت بکارگیری درمان‌های اختصاصی نظیر ایمنوتراپی برای ریشه‌کنی این عفونت می‌باشند. آنزیم اوره‌آز یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا و آنتی‌ژنیک این باکتری است.*

روش بررسی: *دراین مطالعه تجربی، ابتدا بخش انتهای کربوکسیل زیر واحد C اوره‌آز، پس از تخلیص ژنوم باکتری، با کمک واکنش زنجیرهٔ پلیمراز (PCR) تکثیر شده و محصول روی ناقل بیانی pET28a کلون شد. پروتئین نوترکیب پس از تراریخت سازهٔ نوترکیب به باکتری E.coli سوش Bl21DE3 بیان شد و نتایج با استفاده از SDS-PAGE تحلیل و پروتئین نوترکیب از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی با کمک ستون Ni-NTA تخلیص شد. پروتئین نوترکیب تخلیص شده، به مرغ لگ‌هورن سفید تزریق و IgY با روش استون/کلروفرم تخلیص و با روش ELISA و SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *با تعیین توالی سازهٔ نوترکیب، صحت انجام همسانه‌سازی تأیید شد. بررسی با SDS-PAGE نشان داد پروتئین نوترکیب rUreCc به خوبی بیان و تخلیص شده است. همچنین نتایج الایزا ایمن‌زایی بالای این پروتئین نوترکیب را نشان داد.*

نتیجه‌گیری: *تولید پروتئین نوترکیب rUreCc هلیکوباکتر پیلوری در E.coli به عنوان سلول میزبان، امکان دسترسی آسان به آنتی‌ژن را فراهم کرد. علی‌رغم کوچک بودن آنتی‌ژن نوترکیب، توانایی ایمنی‌زایی آن شبیه به کل زیر واحد C اوره آز است.*

واژگان کلیدی: *هلیکوباکتر پیلوری، اوره‌آز، زیر واحد UreC، IgY*

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*: *H.pylori*) نوعی باکتری گرم منفی مارپیچی شکل است که در لایه مخاطی معده انسان تکثیر یافته و ایجاد عفونت می‌نماید. عفونت ایجاد شده توسط این باکتری که با تخریب بافت اپی‌تلیال معده همراه است، منجر به التهاب مزمن معده می‌شود که می‌تواند سبب ایجاد زخم‌های معده و دوازدهه شود. بررسی‌ها نشان داده که عفونت مزمن *H. pylori* با سرطان بدخیم معده مرتبط است و این امر موجب گشته که آژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) این باکتری را در زمره عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد (۱). شیوع عفونت با *H. pylori* در جهان به طور میانگین در حدود ۵۰ درصد جمعیت است، اما تفاوت معنی‌داری بین شیوع این عفونت در کشورهای غربی و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، حسین بصیری
(**email**: hosseinbasiri@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۲

Archive of SID
www.SID.ir

کشورهای آسیایی در حال توسعه به چشم می‌خورد (۲)، به طوری 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 ۶۰ تا ۸۰ درصد است (۳).

با توجه به اینکه تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه دشوار می‌باشد و در اکثر موارد تشخیص پس از پیشرفت بیماری صورت گرفته و کار درمان سخت می‌گردد، 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، به خصوص که سیستم ایمنی بدن نیز به علت 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 اپی‌تلیال می‌شود (۱). همچنین بررسی‌های اخیر حاکی از مقاومت گستردهٔ عفونت *H. pylori* به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی است (۴). بدین سبب رویکردهای اخیر در جهت به کارگیری درمان‌های اختصاصی و نوین برای مقابله با این عفونت می‌باشد که در این میان پروتئین اوره‌آز باکتری *H.pylori* هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی چندتبار یا تک‌تبار به این منظور است. اوره‌آز مهم‌ترین ترکیب پروتئینی *H. pylori* است و به عنوان یک آنتی‌ژن مهم جهت تشخیص این باکتری شناخته می‌شود. این آنزیم با هیدرولیز اوره و ایجاد آمونیاک به عنوان خنثی کنندهٔ اسید معده، شرایط را برای ادامه حیات باکتری در pH اسیدی معده فراهم می‌کند، به علاوه هیدروکسید آمونیوم تولید شده توسط این آنزیم در تخریب بافت‌های میزبان نقش عمده‌ای دارد (۵). همچنین نشان داده شده است که *H. pylori* از مولکول‌های MHC class II به عنوان گیرنده در سطح سلول‌های اپی‌تلیال معده استفاده می‌کند و این میان‌کنش موجب بروز آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد که این عمل به واسطهٔ اوره‌آز باکتری صورت می‌پذیرد (۶). علاوه بر این، اوره‌آز سبب تحریک ماکروفاژها برای ترشح اکسید نیتریک می‌شود که سبب ایجاد واسطه‌های التهابی می‌گردد (۷) و این امر به تخریب بافت اپی‌تلیال کمک کرده و یکی از مثال‌های به کارگیری سیستم ایمنی توسط باکتری می‌باشد. با توجه به نقش‌های مهم اوره‌آز در بیماری‌زایی و بقای *H. pylori*، این آنزیم به عنوان یک هدف مهم برای درمان های اختصاصی همچون استفاده از آنتی‌بادی‌ها قلمداد می‌شود.

تاکنون بسیاری از پروتئین‌های آنتی‌ژنیک حفاظت بخش این باکتری نظیر UreC، HpaA، FlaA، CagA، VacA مشخص شده است (۸). در میان این پروتئین‌های آنتی‌ژنیک، UreC یکی از چهار زیر واحد اوره‌آز است که توسط اغلب سوش‌های جدا شده *H. pylori* بیان می‌شود و ثابت شده است که قوی‌ترین آنتی‌ژن بین تمام پروتئین‌های شناخته شده *H.pylori* می‌باشد (۹). ژن *ureC* با ۱۷۱۰ جفت باز مسئول رمزگذاری ۵۶۹ اسید آمینهٔ پروتئین UreC، دارای توالی بسیار حفاظت شده‌ای با حدود ۹۵ درصد شباهت در سوش‌های مختلف *H. pylori* می‌باشد (۱۰). این اطلاعات مشخص می‌کند UreC می‌تواند کاندید مناسبی برای تهیه واکسن یا آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه *H. pylori* باشد. هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که دو شاخص مهم آنتی‌ژنیک در انتهای کربوکسیلی این زیر واحد قرار گرفته است که به همین منظور در این مطالعه این ناحیه از ژن در انتهای '۳ برای همسانه سازی انتخاب شد.

هدف از این مطالعه، تهیهٔ پروتئین نوترکیب UreCc و تولید IgY است تا در مطالعات بعدی برای پیشگیری یا ایمونوتراپی مورد استفاده قرار گیرد. به این منظور پس از تکثیر ناحیه '۳ ژن *ureC* به طول bp ۶۹۸ و انتقال آن روی ناقل *pET28a* به عنوان یک سامانهٔ بیانی پروکاریوتی مناسب، و القاء سازوارهٔ ژنی به میزبان *E.coli* سوش Bl21DE3، پروتئین نوترکیب بیان شد و پس از تخلیص به مرغ لگ هورن ۲۵ هفته‌ای تزریق شد. پس از انجام تزریق‌های یاداور و اطمینان از ایمن شدن مرغ‌ها با انجام الایزا، از زرده تخم مرغ تخلیص IgY صورت گرفت و پس از آن با الایزا و سنجش خنثی‌سازی آنزیم اوره‌آز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

باکتری *H. pylori* جدا شده از یک بیمار ایرانی (۱۱) (آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکدهٔ علوم پایه دانشگاه تهران، دکتر فریده سیاوشی و همکاران) تأیید شده با تست های بیوشیمیایی و مولکولی پس از کشت در بافر PBS (Phosphat buffered saline) سلول‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پلاسمید *pET28a* (Novagene، ایالات متحدهٔ آمریکا) و باکتری *E. coli* سوش BL21DE3 (Novagene، ایالات متحدهٔ آمریکا) به عنوان سیستم بیانی پروکاریوتی و میزبان مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای طراحی شده برای PCR سفارش داده شدند (شرکت Cinnagene) و آنزیم‌های *Taq*،

Archive of SID
www.SID.ir

Pfu، *T4 DNA ligase* و آنزیم های محدود الاثر *SalI* و *EcoRI* (Fermentas، آلمان) نیز خریداری شدند. کیت تخلیص DNA از ژل و تعیین توالی همسانه ها نیز تهیه شد (شرکت Bioneer کره). ستون میل ترکیبی Ni-NTA (شرکت Qiagen) خریداری شد. ادجوانت ناقص و کامل فروند از موسسهٔ رازی تهیه شد. از آنتی‌بادی پلی‌کلونال Anti IgY خرگوشی کونژوگه با آنزیم پروکسیداز (HRP) به عنوان آنتی‌بادی اختصاصی جهت انجام ELISA استفاده شد .مرغ تخم‌گذار نژاد Leghorn High Sex از دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد.

برای تخلیص DNA الگو، H. pylori جدا شده از یک بیمار ایرانی پس از کشت روی محیط بروسلا آگار غنی شده با سرم گوسفندی و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین، تریمتوپریم، آمفوتریسین B و پلی‌میکسین B، با لوپ جمع‌آوری شده و در بافر PBS دوباره حل شد و تا قبل از تخلیص ژنوم در یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تخلیص DNA ژنومیک، باکتری‌های جمع شده از روی پلیت در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE (Tris- EDTA) حل شده و ۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۱ میکرولیتر RNase (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/Nacl به آن اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پروتئین‌ها با روش فنل-کلروفرم و DNA با ایزوپروپانول رسوب داده شد (۱۲).

در تکثیر انتهای '۳ ژن زیر واحد C اوره‌آز، برای طراحی پرایمرها از اطلاعات *H. pylori* J99 (شماره کد: AB090088) استفاده شد: توالی پرایمرهای رفت *huCcF* و برگشت *huCcR* به ترتیب شامل GACAGGATCCCGCATTCG که دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر(*BamHI*) و GTAGCGTCGACAAAGATAGAAAACAGTT که دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالاثر (*SalI*) می‌باشند. حجم نهایی واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز ۳۰ µl حاوی ۲/۵mol/L از هر dNTP، ۱۵۰nmol/L از هریک از پرایمرها، $MgCl_2$ با غلظت ۵ mol/ L، ۲/۵U Taq پلیمراز، ۱۰۰ng DNA الگو و PCR 1X بافر بود. پارامترهای واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز برای تکثیر ژن *ureC* شامل واسرشته اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخهٔ ۳ مرحله‌ای شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، چسبیدن پرایمر در دمای ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلی‌مریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، و در نهایت پلی‌مریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بودند. در ادامه، جهت جلوگیری از بروز جهش در قطعهٔ تکثیر شده، واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز فوق با آنزیم *Pfu* پلی‌مراز نیز انجام شد. در ادامه نتایج واکنش زنجیرهٔ پلی‌مراز پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز با غلظت ۱۰ g/L و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید (EtBr) زیر نور UV مشاهده شد. اندازهٔ مورد انتظار قطعهٔ تکثیر شده ۶۹۸ bp است. پس از بارگذاری محصول واکنش روی ژل آگاروز با دمای پایین و استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز، قطعهٔ مورد نظر تخلیص شد.

در ساخت سازوارهٔ مولکولی ژن کد کنندهٔ rUreCc، پلاسمید *pET28a* و محصول تخلیص شدهٔ PCR با دو آنزیم محدودالاثر *SalI* و *BamHI* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت به صورت جداگانه هضم شدند، سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگاروز با دمای پایین بارگذاری شده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز، قطعات مورد نظر تخلیص شدند. برای انجام واکنش الحاق، واکنشی با حجم نهایی ۱۲ µl حاوی ۱۰۰ ng از قطعهٔ مورد نظر و ۸۰ ng از پلاسمید هضم شده و ۲U آنزیم *T4 DNA ligase* و بافر آنزیم با غلظت نهایی 1X در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد به مدت۴ ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاق به باکتری *E. coli* سوش BL21DE3 با روش شک حراتی القاء شدند و غربالگری همسانه‌های حاصل روی محیط LB آگار حاوی ۷۰ µg/ml کانامایسین انجام شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی، پس از کشت همسانه‌های غربال شده در محیط LB آبگوشتی حاوی ۷۰ µg/ml کانامایسین، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد (۱۲). سپس با انجام هضم آنزیمی قرار گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و در نهایت با انجام تعیین توالی از همسانه‌ها، صحت همسانه‌سازی تأیید شد. سیستم بیانی ساخته شده *pET 28a-ureCc E.coli* BL21DE3 نام‌گذاری شد.

برای بیان پروتئین نوترکیب هدف، *pET 28a-ureCc E.coli* BL21DE3 در محیط LB آبگوشتی حاوی ۶۰ µg/µl کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ rpm هوادهی، کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ایزوپروپیل تیو بتا- دی گالاکتوزید (IPTG) با غلظت ۰/۷ mM القاء و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در شیکر

Archive of SID

www.SID.ir

انکوباتور با ۲۰۰ rpm هوادهی انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها با سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند و نتایج با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند.

جهت تخلیص پروتئین نوترکیب، رسوب باکتریایی جمع‌آوری شده از مرحلهٔ قبل در بافر لیز کننده B با pH=۸ (این محلول حاوی ۱۰۰mM NaH_2PO_4 و Tris۱۰mM و ۸mM Urea است) دوباره حل شده و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و آمپیلافیکاسیون ۰/۵ در ۶ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای و در یخ سلول‌ها لیز شدند. در ادامه، سلول‌های لیزشده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۵۰۰rpm سانتریفوژ شدند. سپس رسوب از محلول رویی جدا شده و در بافر لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار به خوبی حل شد و هر کدام با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه پروتئین نوترکیب هدف با کمک ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شستشو با بافرهای شستشو دهندهٔ C با pH=۶/۳ وD با pH=۵/۹ و بافر فروشویی E با pH=۴/۵ (ترکیب همهٔ بافرهای ذکر شده شبیه به بافر B بوده و تنها pH آنها تنظیم شده است) تخلیص شد و نتایج با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت غلظت پروتئین با روش برادفورد تخمین زده شد.

برای ایمن‌سازی مرغ و ارزیابی ایمنی، ۱۵ قطعه مرغ ۲۵ هفته‌ای نژاد لگ هورن سفید به صورت زیرجلدی در ناحیه سینه با پروتئین نوترکیب تخلیص شده (۲۰۰µg) با حجم مساوی از ادجوانت ناقص فروند (مؤسسه رازی) ایمن سازی شدند. سه یادآور با همان مقدار پروتئین و ادجوانت ناقص به ترتیب با فاصلهٔ زمانی سه، پنج و هفت هفته پس از تزریق اول، تزریق شد. پس از تکمیل دورهٔ ایمیونیزاسیون به منظور تأیید ایمن‌سازی مرغ‌ها، از آنها خون‌گیری انجام شد و پس از جداسازی سرم سنجش ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب rUreC و rUreCc (درهر چاهک ۲µg) پوشش داده شده بودند، انجام شد. پس از بلاکینگ با ژلاتین (w/v)۳٪ با افزودن ۱۰۰µl از رقت ۱:۱۰۰۰ سرم مرغ‌های ایمن شده و کنترل به چاهک اول، تا رقت ۱:۶۴۰۰۰ 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 و H2O2 به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، پس از مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ۴۹۲ نانومتر، شدت رنگ با قرائت‌گر ELISA خوانده شد. پس از اطمینان از ایمنی مرغ‌ها، تخم مرغ‌ها به صورت روزانه به مدت ۲ ماه جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور جداسازی و تخلیص IgY-HpUc، ابتدا زرده‌های تخم مرغ از سفیدهٔ تخم مرغ جداشده و به خوبی با آب مقطر شستشو داده شدند، به این صورت که کیسهٔ زرده پاره شد و محتویات آن با دقت جدا شد. سپس دو برابر حجم زرده، به آن بافر فسفات (سدیم فسفات ۱۰۰mM، ۷/۶ =pH) افزوده شد و سپس به خوبی مخلوط گردید. به مخلوط، (w/v) ۳/۵٪ پودر PEG افزوده و با کمک استیرر به خوبی حل شد. بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به وسیله سانتریفیوژ (۳۰ دقیقه در ۴۴۲۰g) لیپوپروتئین‌ها از محلول رویی جدا شد و سپس محلول رویی با کمک فیلتراسیون با کاغذ صافی(واتمن شمارهٔ ۱)، از باقیماندهٔ لیپید ها عاری گردید. در مرحلهٔ بعد با افزودن PEG غلظت نهایی آن به (w/v) ۱۲٪ رسید. پس از حل شدن کامل PEG، محلول سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g) و رسوب در بافر فسفات حل شد (هم حجم، حجم بدست آمده از مرحلهٔ فیلتراسیون) و دوباره (w/v)۱۲٪ به آن PEG اضافه شده و به خوبی 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 ۶۰٪ گلیسرول با حجمی معادل حجم اولیهٔ زردهٔ تخم مرغ حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

برای سنجش قدرت واکنش‌دهی آنتی‌بادی IgY-HpUc بر علیه زیر واحد UreC آنزیم اوره آز *H. pylori*، از ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی که با پروتین نوترکیب UreC (درهر چاهک ۲µg) پوشش داده شده بودند، استفاده شد. پس از بلاکینگ با ژلاتین (w/v)۳٪ با افزودن ۱۰۰µl از رقت ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی IgY-HpUc و آنتی‌بادی کنترل به چاهک اول، تا رقت ۱:۶۴۰۰ 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 ۴۹۲nm، شدت نور با قرائت‌گر ELISA خوانده شد.

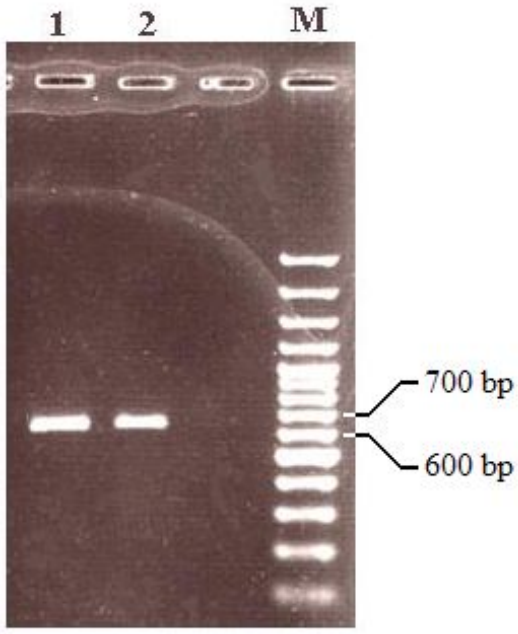
یافته‌ها

در شکل ۱ محصول PCR قطعه کد کننده rUreCc با آنزیم های *Taq* پلی‌مراز و *Pfu* پلی‌مراز با اندازهٔ مورد انتظار (۶۹۸bp) نشان داده شده است.

Archive of SID

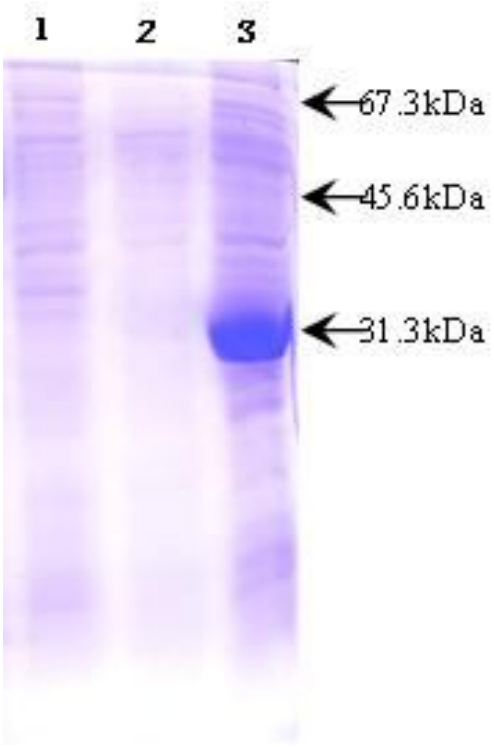
www.SID.ir

شکل ۲- نتیجهٔ تعیین توالی قطعهٔ ureCc همسانه سازی شده بر روی حامل pET28a .



شکل ۱- محصول PCR قطعه کد کننده rUreCc به طول ۶۹۸ bp. ستون ۱، محصول PCR قطعهٔ پایانهٔ '۳ ژن *ureC* با آنزیم *Taq* پلیمراز و ستون ۲، محصول PCR قطعهٔ پایانهٔ'۳ ژن *ureC* با آنزیمPfu وستون M، نشانهٔ اندازهٔ مولکولی DNA را نشان می‌دهد.

توالی نوکلئوتیدی قطعه کد کننده rUreCc همسانه شده و زنجیرهٔ پلی پپتیدی مربوط به آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

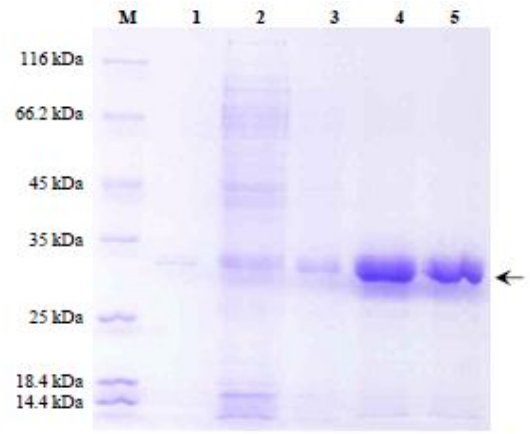


شکل ۳- بررسی بیان ژن‌های نوترکیب به کمک SDS-PAGE. ستون‌های ۱، ۲و ۳: به ترتیب نمونه قبل از القاء، نمونه حاوی پروتئین های محلول و نمونه حاوی پروتئین های نامحلول حاصل از بیان rUreCc.

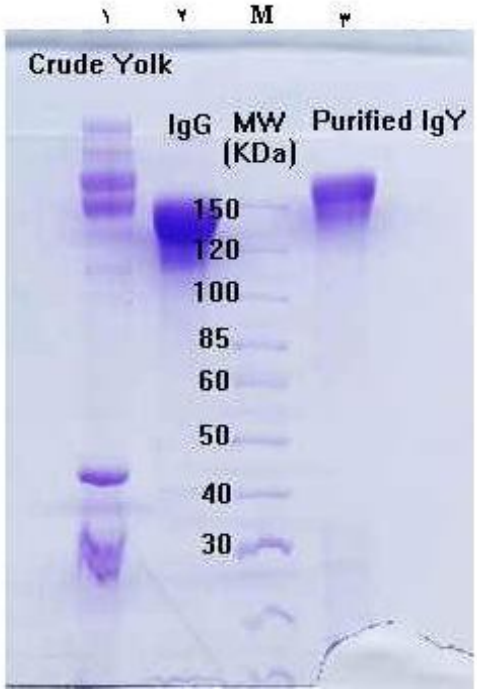
ایزوپروپیل تیو بتا- دی گالاکتوزید (IPTG) با غلظت mol/ L ۰/۷ توانست به صورت کارامد سیستم بیانی pET 28a-*ureC* را القاء کند (شکل ۳). بخش اعظم محصول *E.coli* BL21DE3

www.SID.ir

بیان *ureC* در رسوب پس از لیز سلولی مشاهده شد که نشان می‌دهد پروتئین بیانی تشکیل اجسام نامحلول را داده و تقریباً ۳۵٪ کل پروتئین‌ها سلول باکتریایی را به خود اختصاص داد.

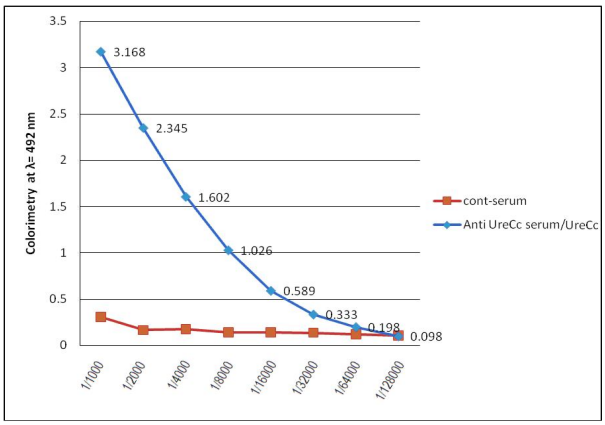


شکل ۴- بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب UreCc با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد. ستون M ، نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۱، نمونه بیان پروتئین قبل از تخلیص، ستون ۲، نمونهٔ خروجی ستون پس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون ۳، نمونهٔ خروجی ستون پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنده. ستون ۴ و ۵ ، نمونهٔ خروجی ستون پس از فروشویی با بافر E.

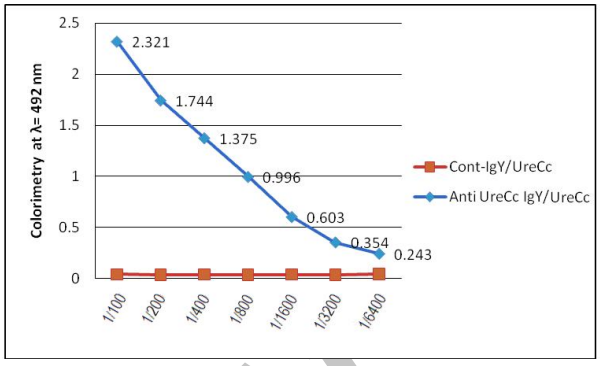


شکل ۵- بررسی تخلیص آنتی‌بادی IgY-HpUc روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد*. ستون M ، نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۱، نمونهٔ مربوط به زردهٔ تخم مرغ قبل از تخلیص، ستون۲، نمونهٔ مربوط به IgG تخلیص شده و۳، نمونهٔ IgY-HpUc تخلیص شده. *:در این ژل بافر نمونه(sample buffer) فاقد ۲- مرکاپتو اتانل می باشد.

با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب rUreCc به صورت اجسام نامحلول تولید می‌شد، بنابراین تخلیص آن در شرایط دناتوره، طبق دستور العمل کیت کیاژن صورت گرفت. همان طور که در شکل۴ مشاهده می‌گردد، پروتئین پس از شستشو و حذف پروتئین‌های غیراختصاصی، با خلوص قابل قبولی پس از فروشویی با بافر E استحصال شد.



نمودار ۱- تیتراسیون سرم مرغ های ایمن شده با rUreCc به وسیله الایزا غیر مستقیم. این نمودار نتایج الایزای رقت‌های مختلف از سرم مرغ‌های ایمن شده با UreCc را علیه این پروتئین، نشان می‌دهد.



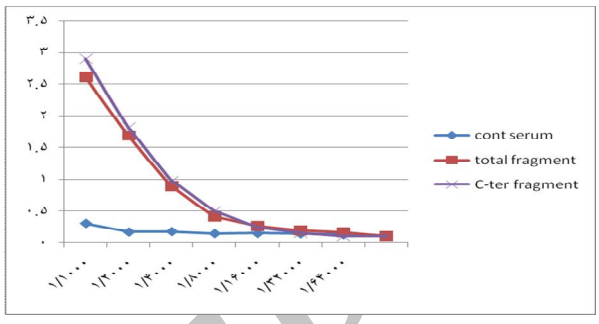
نمودار ۲- بررسی فعالیت محصول آنتی‌بادی مرغی ضد rUreCc به وسیله الایزا غیر مستقیم. این نمودار نتایج الایزای آنتی‌بادی مرغی ضد rUreCc علیه پروتئین rUreCc را نشان می‌دهد.

درنمودار ۱ نتیجهٔ ELISA غیر مستقیم سرم مرغ‌های ایمن شده علیه پروئین نوترکیب rUreCc مشاهده می‌شود. همانطور که در نمودار ۱ مشخص است سطح ایمنی مرغ‌ها نسبت به پروتئین نوترکیب rUreCc به خوبی افزایش یافته است.

در شکل ۵ ژل مربوط به آنالیز آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE ۹٪ مشاهده می‌شود. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، آنتی‌بادی با خلوص بالایی استحصال شده است. پس از اطمینان از خلوص آنتی‌بادی به منظور بررسی واکنش‌دهی آنتی‌بادی سنجش ELISA انجام شد. در نمودار ۲ نتیجهٔ ELISA غیرمستقیم آنتی‌بادی IgY-

Archive of SID
www.SID.ir

HpUc تخلیص شده علیه پروئین نوترکیب rUreCc مشاهده می‌گردد. همان طور که در نمودار ۲ مشخص است آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده، پروتئین نوترکیب rUreC را به خوبی شناسایی می‌کند. هم‌چنین در مقایسه با توانایی آنتی‌بادی علیه قطعه کلی زیر واحد C، این آنتی‌بادی توانایی خوبی در شناسایی rUreC دارد (نمودار ۳).



نمودار ۳- مقایسه کارایی آنتی‌سرم‌ها در شناسایی پروتئین UreC . این نمودار نتایج الایزای رقت‌های مختلف از سرم مرغ‌های ایمن شده با پروتئین های rUreC و rUreCc را، علیه پروتئین rUreC، نشان می‌دهد.

بحث

درمان سه‌گانه شامل دو آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و کلاریترومایسین و یک مهار کنندهٔ پمپ پروتونی به مدت یک هفته به عنوان درمان منتخب برای عفونت *H. pylori* در بسیاری از کنفرانس‌ها و مجامع عمومی پیشنهاد شده است (۱۴). با این حال، این نوع درمان در اغلب موارد با دلایل مختلفی منجر به شکست می‌شود (۱۵). 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 به دلیل شناسایی اختصاصی *H.pylori* و جلو گیری از چسبیدن آن به سطوح اپی‌تلیال سیستم گوارش انسان باشد (۱۶). تحقیقات اخیر در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی با استفاده از مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که ایمن‌سازی با آنتی‌ژن‌های طبیعی و یا نوترکیب می‌تواند در برابر عفونت *H.pylori* حفاظت بخش باشد (۱۷). استفادهٔ خوراکی از IgY زردهٔ تخم مرغ توسط بسیاری از محققین بر علیه عوامل بسیاری از بیماری‌های گوارشی مثل انتروتوکسیژنیک *E.coli* (۱۸)، روتاویروس‌های انسانی (۱۹) و سودوموناس آئروژنزا (۲۰) با موفقیت به کار گرفته شده است. IgY هم‌چنین لانه‌گزینی استرپتوکوکوس موتانس را درروی دندان‌ها مهار می‌کند، بنابراین از تشکیل پلاک‌های دندانی در انسان ممانعت به عمل می‌آورد (۲۱). مطالعات نشان داده‌اند که زردهٔ تخم مرغ حاصل از مرغ‌های ایمن شده حاوی مقدار زیادی آنتی‌بادی است که قادربه شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن می‌باشند که از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است (۲۲). شاین و همکاران براورد کرده‌اند که ۱ میلی‌لیتر از زردهٔ تخم مرغ (۱۵ml/egg) حاوی ۹/۴mg (۱۴۱mg/egg) IgY می‌باشد. هر مرغ ۲۵۰ تخم مرغ در سال (۴۰۰۰ml زردهٔ تخم مرغ) می‌گذارد، بنابراین یک مرغ سالیانه IgY۴۰g تولید می‌کند (۲۳). اخیراً شاین و همکاران تأثیر IgY ضد *H.pylori* به دست آمده از مرغ‌های ایمن شده با عصارهٔ لیز سلولی این باکتری در مونگولین جربیل (*Mongolian gerbil*) که آلوده به *H.pylori* است را گزارش کردند. در این مطالعه IgY ضد *H.pylori* موجب کاهش التهاب لایهٔ مخاطی معده که توسط این باکتری تحریک می‌شود، گردید. از طرفی میزان التهاب با تعیین میزان لنفوسیت‌های بافتی و نفوذ نوتروفیل‌ها مشخص شد (۲۴). آنها همچنین انواعی از IgYهای حاصل از مرغ‌های ایمن شده با پروتئین‌های مختلف *H.pylori* را تهیه کردند (۲۵). اگر IgY دارای تأثیر اختصاصی نباشد، هیچ مهاری در رشد باکتری رخ نمی‌دهد. با توجه به آزمایشاتی که در آنها از مدل جربیل استفاده شده بود، به وضوح مشخص شد که IgY صدمات سطوح مخاطی معده ناشی از عفونت *H.pylori* را کاهش می‌دهد، بنابراین ارزش درمانی IgY که به صورت خوراکی استفاده می‌شود، در مدل‌های آزمایشگاهی مثل جربیل، به دلیل توانایی مهار باکتری‌ها می‌باشد. دلایل متقاعد کنندهٔ بیشتر در حمایت از اختصاصیت این آنتی بادی‌ها در مهار اتصال *H.pylori* به سلول‌های AGS حاصل می‌شود که با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) تأیید شده است. اگر چه مکانیسمی که در آن IgY از لانه گزینی *H.pylori* ممانعت می‌کند تا به حال مشخص نشده است، 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 می‌دهند که کل آنزیم اوره‌آز *H.pylori* احتمالاً ایمنی کافی ایجاد نمی‌کند و احتمالاً در چنین حالتی فعالیت آنزیم از بین نمی‌رود (۲۶). با این حال، IgY تولید شده با استفاده از عصارهٔ لیز سلولی، با دیگر باکتری‌هایی که به طور معمول در انسان یافت می‌شوند، واکنش متقاطعی می‌دهد (۲۷). بنابراین نیازمند آنتی‌ژن‌هایی از *H.pylori* با قدرت ایمنوژنسیتهٔ بالا برای کاهش عوارض

Archive of SID
www.SID.ir

جانبی و افزایش اختصاصیت می‌باشیم. 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. بر اساس این واقعیت، ما تلاش کردیم تا آنتی‌بادی اختصاصی‌تری بر علیه زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز تولید کنیم که بتواند به صورت اختصاصی مکانیسم‌های دفاعی بدن را تحریک کند. در این مطالعه، ایمن سازی مرغ‌ها با پروتئین نوترکیب UreC تخلیص شده منجر به تولید مقدار قابل توجهی آنتی‌بادی در زردهٔ تخم مرغ شد، بدون اینکه روی تخم‌گذاری مرغ‌ها تأ ثیر داشته باشد. تغییرات در تولید آنتی بادی نیز شبیه به گزارشات قبلی بود (۲۷). به منظور 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 گرفت. از لحاظ ایمونولوژیک IgY-Hp در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه فعال باقی می‌ماند که این موضوع امکان پاستوریزاسیون به منظور استریل کردن محصولات را مطرح می‌کند. غنی‌سازی محصولات غذایی با این ایمنوگلوبولین، در کنارمقدار زیاد تولید و اثرپذیری IgY می‌تواند به طور قابل توجهی آلودگی با *H.pylori* را کاهش دهد. Horie و همکارانش نشان دادند که استفاده از نوشیدنی دوغ که با آنتی‌بادی‌های زردهٔ تخم مرغ علیه آنزیم اوره‌آز، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای *H.pylori*، غنی شده بود می‌تواند به طور مؤثری عفونت با این باکتری را کاهش دهد (۲۷).

این مطالعه نشان می‌دهد که IgY تهیه شده از مرغ لگ هورن سفید ایمن شده با انتهای کربوکسیلی زیر واحد C آنزیم اوره‌آز می‌تواند به خوبی IgY تهیه شده بر علیه کل زیرواحد C این آنزیم (۲۶)، در شناسایی پروتئین نوترکیب UreC در سنجش الیزا توانمند باشد و همچنین تیتر این آنتی بادی با توجه به اینکه در رقت $^{1}/_{8000}$ توانایی شناسایی آنتی ژن نوترکیب را دارد، بالا می‌باشد. این نتایج با مطالعاتی که نشان دهنده وجود شاخص‌های آنتی‌ژنیک غالب در انتهای کربوکسیلی زیرواحد C آنزیم اوره‌آز می‌باشند سازگار است (۲۷). در پایان، نتایج مثبت این مطالعه نشان می‌دهد که IgY حاصل از مرغ‌های ایمن شده با بخش‌های پروتئینی *H.pylori* ممکن است روش جدیدی برای کنترل عفونت با این باکتری در انسان ایجاد کند. با این حال، بعضی از مسایل 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، می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد به دلیل حمایت مالی و ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش در قالب پایان نامه دکتری و خانم دکتر سیاوشی و آقای دکتر علی هاتف سلمانیان به دلیل حمایت‌های علمی و در اختیار قرار دادن سوش بومی هلیکوباکتر پیلوری تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2006; 12: 5593-98.
2. Malaty HM, Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2003; 8: 8-12.
3. Suerbaum S, Michtti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002; 347: 1174-86.
4. Megroaud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. Gut 2004; 53: 1374-84.
5. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial urease. Microbiol Rev 1995; 59: 451-80.
6. Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, et al. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells : a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. J Exp Med 1998; 187: 1659-69.
7. Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. J Immunol 2002; 168: 6002-6006.
8. Nilsson I, Utt M. Separation and surveys of proteins of *Helicobacter pylori*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 771: 251-60.
9. 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: 272-280.

Archive of SID

www.SID.ir

10. 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: 1071-84.

11. Siavoshi F, Malekzadeh R, Daneshmand M, Ashktorab H. *Helicobacter pylori* Endemic and Gastric Disease. Dig Dis Sci 2005; 50: 2075–80.

12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. Molecular cloning, a Laboratory manual. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

13. Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulines from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E.coli* strain. J Immunol Methods 1993; 164: 207-14.

14. Malfertheiner P, Me´graud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 167–80.

15. Me´graud F, Lamouliatte H. The treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 1333–43.

16. Suzuki H, Masaoka T, Miyazawa M, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Gastric mucosal response to *Helicobacter pylori*. Keio J Med 2002; 51: S40–44.

17. 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; 12: 413–20.

18. Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Frohlich AA, Baidoo SK. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23: 283–88.

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

20. 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: 886–88.

21. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, et al. 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: 268–74.

22. Verdolva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J Chromatogr 2000; 749: 233–42.

23. Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 1061–66.

24. 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: 217–22.

25. Hirota K, Nagata K, Norose Y, Futagami S, Nakagawa Y, Senpuku H, et al. Identification of an antigenic epitope in Helicobacter pylori urease that induces neutralizing antibody production. Infect Immun 2001; 69: 6597-603.

26. Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-Helicobacter pylori ureasespecific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of H. pylori urease. J Med Microbiol 2004; 53: 31–34.

27. Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. J Dairy Sci 2004; 87: 4073–79.

Archive of SID

www.SID.ir