Archive of SID

مقاله پژوهشی

کلون سازی ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در ناقل یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 به منظور تولید واکسن ژنی

نویسندگان:

مریم صفرپور[۱]، زهرا کاظمی[۱]، الهام دوستی[۲]، عباس دوستی*[۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

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

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.4, Winter 2017

چکیده:

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین باکتری مولد التهاب معده، سرطان و لنفوم معده و زخم‌های گوارشی در انسان است. تیول پراکسیداز توسط ژن tagD کد می‌شود و در کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد. محصول ژن tagD سبب تحریک سیستم ایمنی در بدن میزبان می‌شود. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و کلونینگ ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در ناقل یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 به عنوان کاندیدای واکسن ژنی بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، قطعه ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری به طول ۵۳۷ جفت باز با استفاده از روش PCR تکثیر شد. سپس محصولات PCR با استفاده از کیت کلون سازی شرکت ترمو فیشر در وکتور pTZ کلون گردیدند. ساب کلونینگ این ژن در وکتور بیانی یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 انجام شد و سپس با روش الکتروپوریشن به سلول‌های CHO منتقل و بیان گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان دهنده تکثیر و کلون سازی موفق ژن tagD و تشکیل وکتور pTZ-tagD می‌باشد. نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت کلون سازی این ژن در وکتور PFLAG-CMV-3 را تأیید کرد. بررسی بیان این ژن به روش SDS-PAGE تشکیل باند ۱۹ کیلو دالتونی مربوطه را نشان داد.

نتیجه‌گیری: ژن tagD کلون سازی شده در وکتور نوترکیب PFLAG-CMV-3-tagD توان تولید محصول پروتئینی اختصاصی این ژن در سلول‌های CHO را دارد. ازاین‌رو سازواره ژنی مذکور برای بررسی ایمنی‌زایی در مدل حیوانی به عنوان واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری مناسب به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، tagD، کلونینگ، الکتروپوریشن

مقدمه:

Pars J Med Sci 2017;14 (4):43-50

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله‌ای شکل و میکروآئروفیل است که در سطح مجرایی پوشش معده دیده می‌شود. این باکتری دلیل اصلی گاستریت فعال و مزمن، زخم معده و دوازدهه است. همچنین موجب التهاب طولانی در مخاط معده به وسیله نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها می‌شود. از آنجایی که این باکتری در لایه عمقی موکوس پوشاننده سلول‌های اپی تلیال معدی رشد کرده و تشکیل کلنی می‌دهد، یافته‌های آندوسکوپی خاصی نداشته و در نتیجه تشخیص بالینی آن مشکل است [۱و۲]. با بررسی‌های انجام‌شده، نقش هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد بدخیمی و سرطان معده تأییدشده است و همین امر موجب شده است که اژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی نام این باکتری را در ردیف عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد [۳]. تفاوت معناداری بین گسترش این عفونت در کشورهای غربی و کشورهای در حال توسعه به چشم می‌خورد. شیوع سرولوژی مثبت هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای در حال توسعه ۹۰ درصد جمعیت است، درحالی‌که در کشورهای توسعه‌یافته، به‌استثنای ژاپن، شیوع زیر ۴۰ درصد است [۴]. این سرطان که مسئول مرگ ۶۵۰۰۰ نفر در جهان در سال ۲۰۰۰ بوده است، چهارمین بدخیمی رایج در دنیا است و ۱۰ درصد از کل مرگ‌ومیر سالیانه سرطان را به خود

* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۸۲۳۶۳۸ پست الکترونیک:abbasdoosti@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۴ اصلاح: ۱۳۹۵/۱۲/۳ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۳

www.SID.ir

Archive of SID

اختصاص می‌دهد. عفونت هلیکوباکتر پیلوری در ایران نیز شایع بوده و این شیوع بین ۹۰-۶۰ درصد است، به خصوص سرطان معده از آمار بالایی برخوردار است. این مطلب نشان می‌دهد که ایران یک منطقه بسیار خطرناک برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری است [۵ و ۶]. در یک مطالعه شیوع ابتلا به این باکتری در استان اردبیل موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان شیوع در شهر اردبیل ۸۹/۵ درصد بوده است که این میزان بالاترین شیوع را در کشور به خود اختصاص داده است [۷].

ژن tagD در هلیکوباکتر پیلوری پروتئین تیول پروکسیداز (Helicobacter pylori thiol peroxidase (HpTpx)) را کد می‌کند که پلی‌پپتیدی با ۱۶۶ آمینو اسید است [۸]. تیول‌پراکسیداز یکی از ادهسین‌های مهم هلیکوباکتر پیلوری است و در کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد [۸ و ۹]. همچنین این ژن نقش مهمی در فعال کردن هلیکوباکتر پیلوری برای زنده ماندن در شرایط استرس اکسیداتیو معده ایفا می‌کند. تیول‌پراکسیداز یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های پروکسی ردوکسین (Peroxiredoxin (PRX)) می‌باشد و از فراوان‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در هلیکوباکتر پیلوری است. با این که مطالعات زیادی پیرامون هلیکوباکتر پیلوری انجام‌شده است، اطلاعات محدودی در خصوص ویژگی‌های بیوشیمیایی HpTpx در دسترس است. تیول‌پراکسیداز هلیکوباکتر به عنوان اسکاونجر (بازدارنده) H_2O_2 در حضور تیوریدوکسین (Thioredoxin (Trx)) عمل می‌کند. میکروارگانیسم‌هایی که در آن‌ها HpTpx بی اثر شده است، نوعی کاهش توانایی در کلونیزاسیون و تجمع در معده موش‌های میزبان از خود بروز می‌دهند و از سویی دیگر به از بین رفتن توسط پراکسید و سوپراکسید در مقایسه با باکتری نوع وحشی حساس‌تر هستند. HpTpx همچنین نقش مهم و حیاتی را در مقابله با فشار اکسیداتیو ایفا می‌کند و سبب تحریک سیستم ایمنی در بدن میزبان می‌گردد. بررسی‌های اخیر حاکی از مقاومت گسترده عفونت هلیکوباکتر پیلوری به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی است [۹]. ازاین‌رو ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری (مانند واکسن ژنی) مطرح می‌شود. واکسن‌های ژنی عبارتند از تزریق مستقیم پلاسمید (DNA) خاص، حاوی ژن رمز کننده آنتی‌ژن مورد نظر است که بدلیل داشتن پروموتر خاص جداشده از ویروس‌های انسانی (مانند سایتومگالو ویروس) سبب القا ژن در داخل سلول‌ها و ارائه آن به سیستم ایمنی می‌شود؛ بنابراین پروتئین نوترکیبی که برای تحریک سیستم ایمنی لازم است به جای آن‌که در خارج از بدن تهیه و تجویز شود (مانند واکسن نوترکیب هپاتیت ب)، در داخل بدن تولید می‌شود. پروتئین القاشده که کاملاً شکل طبیعی خود را دارد، با طی مراحل مختلف سبب تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی می‌شود [۱۰].

این پژوهش باهدف ساخت ناقل نوترکیب حامل ژن tagD و بیان آن در سلول جانوری به عنوان کاندیدایی برای طراحی واکسن ژنی علیه این باکتری انجام شد.

روش کار:

سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری

در این مطالعه تجربی، باکتری هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد ATCC 43504 به منظور استخراج ژن tagD و باکتری E. coli سویه Top10F که به منظور ترانسفورماسیون و تکثیر سازه‌های ژنی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند از مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد شهرکرد تهیه شدند. از وکتور PTZ T/A Cloning به منظور انجام روند کلونینگ و از وکتور بیانی یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 برای ساب‌کلونینگ استفاده شد. سلول‌های جانوری CHO یا سلول تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary) به عنوان سلول پذیرنده جهت ترانسفورماسیون و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و تکثیر ژن tagD

استخراج DNA (با استفاده از کیت سیناژن، طبق دستورالعمل مربوطه) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده الکتروفورز ۱ درصد ژل آگارز و اسپکتوفتومتر نانودرآپ (ND2000 Thermo) تأیید شد.

جهت طراحی پرایمر، توالی ژن tagD باکتری هلیکوباکترپیلوری با شماره دسترسی AF021091 از بانک ژنی (National center for biotechnology information (NCBI)) تهیه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در مراحل مختلف انجام کار

نام ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر (´۵ به ´۳)	اندازه محصول
tagD	tagD-F	AGCAGATCTATTAGAAAGGATTTAACCATGC	۵۳۷ جفت باز
	tagD-R	TCCGATATCTAACTTCCTATTCCAACAC	

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرو مول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مول dNTP 10 mM، ۱/۵ میکرو مول MgCl2 50 mM، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA

www.SID.ir

Archive of SID

Polymerase انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول نهایی PCR در ژل آگارز یک درصد واجد اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شد و با اشعه ماورابنفش موردبررسی قرار گرفت. محصول PCR ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی (شرکت Bioneer ساخت کشور کره جنوبی) مطابق دستورالعمل شرکت، از ژل آگارز خالص‌سازی شد.

کلون سازی T/A

برای این منظور، محصولات PCR تخلیص شده از ژل با استفاده از کیت PTZ T/A Cloning (ساخت شرکت فرمنتاز کشور آلمان) کلون و در باکتری اشرشیا کلی سویه TOP10 F ترانسفورم شدند. در مرحله بعد، باکتری‌های یادشده در محیط LB آگار محتوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت داده شدند. سپس تأیید اولیه صحت کلونینگ به روش PCR صورت گرفت و پس‌ازآن، از کلنی‌های حاصل (با استفاده از کیت شرکت Bioneer ساخت کشور کره جنوبی) تخلیص پلاسمید انجام شد و تأیید نهایی سازه حاصل (PTZ-tagD) به کمک روش هضم آنزیمی صورت گرفت. طراحی وکتور PTZ استفاده شده در این پژوهش به‌گونه‌ای بود که در دو طرف ژن کلون شده واجد سایت برش آنزیم BglII و EcoRV باشد.

کلون سازی ژن در وکتور بیانی

در مرحله بعد، قطعه ژن tagD به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم‌های BglII و EcoRV از وکتور PTZ جداسازی و درون وکتور بیانی PFLAG-CMV-3 وارد شد. واکنش الحاق بین وکتور PFLAG-CMV-3 و قطعه tagD با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز انجام گرفت و سازه PFLAG-CMV-3- tagD ساخته شد. وکتورهای حاصل از طریق ترانسفورماسیون به سلول‌های میزبان E. coli در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین وارد شدند. صحت ساب‌کلونینگ نیز به روش PCR و هضم آنزیمی تأیید و در نهایت تعیین توالی توسط شرکت Gen Ray انجام شد.

انتقال سازواره نهایی PFLAG-CMV-3-tagD به سلول‌های جانوری

در این مطالعه به منظور بررسی بیان ژن tagD در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی و برای ترانسفورمیشن این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن استفاده شد. به منظور انجام الکتروپوریشن از دستگاه الکتروپوریشن مدل Gene Pulser Xcell ساخت شرکت Bio Rad آمریکا کمک گرفته شد. تعداد ۱۰۶ × ۲ از سلول‌های CHO شمارش و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کووت ۰/۴ مخصوص الکتروپوریشن به همراه ۸۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از وکتور نوترکیب PFLAG-CMV-3-tagD ریخته شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده ۰/۱۷۴ کیلو ولت و ۴۰۰ میکرو فاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌های حاصل در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین (۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت داده شدند.

انجام SDS-PAGE

در نهایت وزن مولکولی و محل قرار گرفتن پروتئین بیان‌شده درون سلول‌های یوکاریوتی CHO، به وسیله آزمون SDS-PAGE (Sodium dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) تأیید شد. سلول‌های CHO ترانسفورم شده به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه رسوب داده شدند. به رسوب سلولی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه و در نهایت سلول‌های حاصل روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی انجام شد.

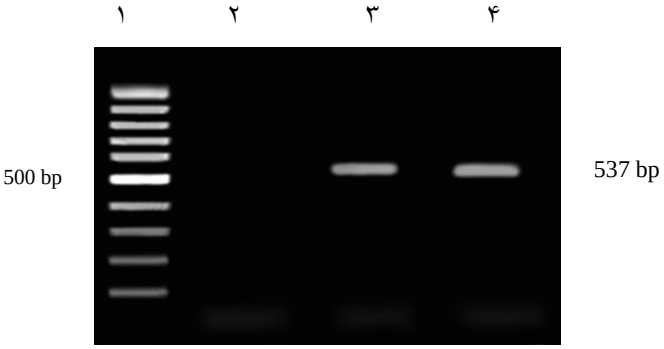
یافته‌ها:

تکثیر و جداسازی ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری

الکتروفورز DNA تخلیص شده روی ژل آگارز ۱ درصد، نشان دهنده کیفیت مناسب DNA بود. همچنین غلظت DNA استخراجی برابر با ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و این مطلب کیفیت مناسب DNA استخراجی را تأیید کرد. محصول PCR با اندازه قطعه مورد نظر ۵۳۷ جفت بازی همخوانی داشت (شکل۱).

www.SID.ir

Archive of SID

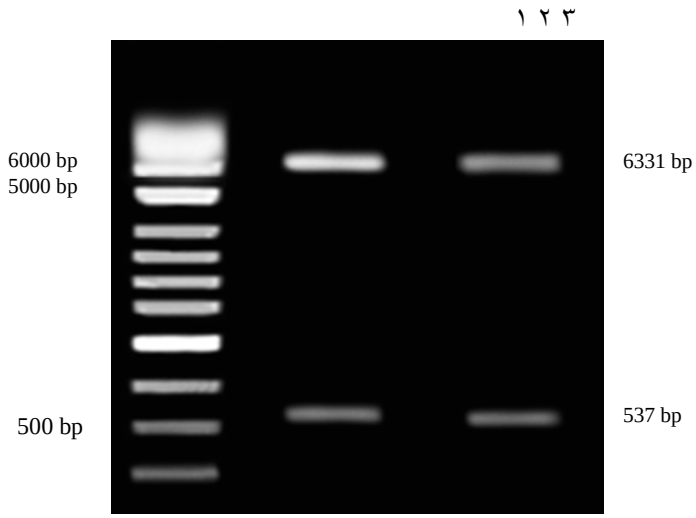


شکل ۱: محصول PCR ژن tagD با اندازه ۵۳۷ جفت باز

کلون سازی T/A و ساب کلونینگ

کلون سازی محصول PCR به روش T/A کلونینگ در وکتور PTZ انجام و سپس درون سلول‌های مستعد اشرشیا کلی سویه TOP10F ترانسفورم شد. به منظور تأیید صحت همسانه سازی قطعات ژنی مذکور، از آزمون‌های PCR و هضم آنزیمی استفاده شد. واکنش PCR نشان داد که کلون‌های حاصل واجد سازه ژنی نامبرده هستند. پس از استخراج پلاسمید در حضور آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و انجام هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های BglII و EcoRV، حضور قطعه ژنی مذکور در وکتور PTZ تأیید شد. به‌طوری‌که برش آنزیمی سبب تشکیل دو قطعه به‌اندازه ۲۸۸۶ جفت باز مربوط به وکتور و قطعه دیگر به‌اندازه ۵۳۷ جفت باز مربوط به ژن tagD شد.

پس‌ازآنجام هضم آنزیمی وکتور PTZ در مرحله قبل، قطعه ژن مورد نظر از ژل آگارز استخراج و درون حامل PFLAG-CMV-3 با موفقیت ligate شد. صحت ساب کلونینگ در مرحله اول به وسیله PCR و پس‌ازآن با استفاده از هضم آنزیمی (با دو آنزیم BglII و EcoRV) مورد تأیید قرار گرفت. به‌طوری‌که برش وکتور PFLAG-CMV-3- tagD با دو آنزیم یادشده سبب تشکیل دو قطعه، یکی به‌اندازه ۶۳۳۱ جفت باز مربوط به وکتور PFLAG-CMV-3 و یک قطعه دیگر به‌اندازه ۵۳۷ جفت باز مربوط به ژن tagD شد که نشان دهنده تشکیل سازواره نهایی بود (شکل ۲).



شکل ۲: هضم آنزیمی سازواره نهایی PFLAG-CMV-3- tagD با دو آنزیم *BglII* و *EcoRV*. باند ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به وکتور PFLAG-CMV-3 و باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن tagD

الکتروپوریشن و بیان ژن

الکتروپوریشن سازواره نهایی PFLAG-CMV-3-tagD در سلول‌های CHO انجام و صحت آن به وسیله رشد در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین و واکنش PCR تأیید شد. به منظور بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

بیان ژن tagD در این سلول‌ها، واکنش SDS-PAGE انجام شد. محصول پروتئینی حاصل از ژن tagD به وزن ۱۹ کیلو دالتون نشان دهنده بیان این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی CHO بود.

بحث:

در این پژوهش ژن tagD از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR جداسازی و تکثیر و سپس در وکتور pTZ کلون و وکتور نوترکیب pTZ-tagD ایجاد و تأیید شد. این وکتور نوترکیب می‌تواند به عنوان مخزنی از ژن tagD، برای پژوهش‌های بعدی مورد استفاده قرارگرفته یا در اختیار سایر پژوهشگران کشور قرار گیرد. سپس با انتقال ژن از وکتور pTZ-tagD به پلاسمید یوکاریوتی PFLAG-CMV-3، سازواره نهایی PFLAG-CMV-3-tagD ایجاد شد. از آنجایی که بیان یوکاریوتی ژن هدف در سلول‌های جانوری دیده شد، به نظر می‌رسد بتوان از این وکتور نوترکیب جدید برای انجام پژوهش‌هایی نظیر آزمایشات واکسن ژنی یا تولید واکسن پپتیدی علیه هلیکوباکتر پیلوری که بیشتر جوامع انسانی در جهان با آن درگیر هستند و هنوز واکسن موثری برای پیش‌گیری از این عفونت تولید نشده، استفاده کرد. سد مخاطی معده از چندین لایه به نام‌های لایه پیش اپی‌تلیال (موکوس)، اپی‌تلیال و پس اپی‌تلیال (فیبروبلاست و سلول‌های ایمنی) تشکیل‌شده است. هرگونه اختلال در این ناحیه منجر به انواع مشکلات بالینی از جمله التهاب و یا حتی سرطان معده می‌شود. به منظور ایجاد و توسعه یک بیماری توسط عوامل عفونی در این نواحی، عامل باکتریایی باید بر سد این ناحیه غلبه کند. در میان باکتری‌های پاتوژن، باکتری هلیکوباکتر پیلوری نقش حیاتی در توسعه التهاب، زخم و آدنوکارسینوم دارد و این امر به دلیل دارا بودن سازوکارهای مختلف برای فرار از این سد و پاسخ میزبان است [۱۱]. عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در جوامع انسانی است و مطالعات نشان می‌دهند که بیش از ۵۰ درصد از جمعیت جهان به این باکتری آلوده هستند [۱۲ و ۱۳]. در ۱۰–۱۵ درصد افراد این عفونت می‌تواند منجر به التهاب شدید، بیماری زخم معده، لنفوم و یا سرطان معده شود [۱۱]. مطالعات نشان داده‌اند که اشخاص میزبان این باکتری ۲/۲۶ برابر بیشتر از سایرین در معرض خطر سرطان معده هستند [۱۴]. هلیکوباکتر پیلوری جزء متغیرترین میکروارگانیسم‌ها به لحاظ ژنتیکی در بین باکتری‌ها محسوب می‌شود. مطالعات متعددی به منظور تعیین عوامل بیماری‌زا برای آزمایش‌های غربالگری این باکتری انجام‌گرفته است. جهش‌های اتفاق افتاده روی ژنوم این باکتری کار تشخیص آن را بسیار مشکل کرده است و با مزمن شدن این عفونت زمینه برای ایجاد سرطان فراهم می‌شود [۱۵]. با توجه به دشوار بودن تشخیص بیماری در مراحل اولیه، مقاوم شدن این باکتری به درمان‌های آنتی بیوتیکی و گسترش بیماری در سطح بالا، نیاز به درمان‌های اختصاصی و نوین نظیر طراحی واکسن اختصاصی برای مبارزه با آن احساس می‌شود. یکی از روش‌های ارزشمندی که مورد توجه متخصصین ایمنی‌شناسی قرارگرفته است، تجویز پلاسمید حاوی ژن رمز کننده آنتی‌ژن‌ها موسوم به واکسن‌های ژنی است که نسل سوم واکسن‌ها را شامل می‌شود [۱۰و۱۶]. به دلیل افزایش اختصاصی بودن، پیشگیری از تخریب باکتری‌های فلور طبیعی دستگاه گوارش و کاهش عوارض جانبی، آنتی‌ژن‌های اختصاصی از هلیکوباکتر پیلوری با قدرت ایمنی‌زایی بالا استفاده می‌شود [۱۷] که از این میان ژن tagD هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی است. ژن tagD که پروتئین تیول‌پراکسیداز در هلیکوباکتر پیلوری (HpTpx) را رمزدهی می‌کند، یکی از مهم‌ترین مولکول‌های چسبان در هلیکوباکتر پیلوری و یک پروتئین آنتی‌اکسیدان است که در توانمندسازی هلیکوباکتر پیلوری به منظور بقا و زنده ماندن در فشار و استرس اکسیداتیو معده نقش ایفا کرده و در کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد [۹و۱۸]. باوجود مطالعات گسترده انجام‌شده روی هلیکوباکتر پیلوری، تاکنون هیچ مطالعه اختصاصی روی ژن tagD انجام‌نشده است، درحالی‌که بررسی‌های مشابهی روی دیگر ژن‌های بیماری‌زایی هلیکوباکتر انجام‌گرفته است. پژوهشگران ایرانی در سال ۲۰۰۹، مطالعه‌ای روی ژن hpaA هلیکوباکتر پیلوری انجام دادند. در این مطالعه ژن hpaA درون وکتور بیانی پروکاریوتی pET28a کلون و درون باکتری E.coli BL21DE3 ترانسفورم و بیان پروتئین نوترکیب HpaA به وسیله واکنش SDS-PAGE درون میزبان جدید تأیید شد [۱۹]. همچنین مطالعه مشابه دیگری در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت که در آن ژن بیماری‌زای ureB122 هلیکوباکتر پیلوری درون وکتور pET32a کلون و درون سلول‌های باکتریایی E. coli BL21DE3 ترانسفورم شد. بررسی میزان بیان پروتئین مذکور توسط واکنش SDS-PAGE انجام و پس از تأیید، به عنوان کاندید واکسن معرفی شد [۲۰]. همچنین گانزالز و همکاران در سال ۲۰۱۳، ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری را جداسازی و درون وکتور بیانی پروکاریوتی کلون کردند. بیان پروتئین ۸۰ کیلو دالتونی CagA صحت انجام کار را تأیید کرد [۲۱]. در سال ۲۰۱۴، ژن ureA هلیکوباکتر پیلوری توسط پژوهشگران ایرانی، در وکتور pTZ57R/T کلون و درون میزبان DH5α ترانسفورم و پس از تأیید، درون وکتور بیانی ساب‌کلون و بیان پروتئین مربوطه موردبررسی قرار گرفت. خلوص بالای پروتئین بیان‌شده تأیید و به عنوان واکسنی بر پایه پروتئین علیه این باکتری پیشنهاد شد [۲۲]. در همه موارد بالا، از ژن‌های رمزگذار آنتی‌ژن‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

هلیکوباکتر پیلوری به منظور انجام پژوهش‌های کلون سازی ژن استفاده‌شده است. در پژوهش حاضر نیز یکی از آنتی‌ژن‌های مهم هلیکوباکتر پیلوری مد نظر بوده است، اما اختلاف در انتخاب وکتور یوکاریوتی برای ایجاد سازواره نهایی از ژن tagD بود که هیچ یک از پژوهش‌های مورد اشاره بالا از آن بهره نگرفته و هدف آن‌ها تولید محصول پروتئینی برخی از ژن‌های باکتری مذکور به منظور تولید واکسن‌های پپتیدی بوده است. سازواره نهایی تولید و تأییدشده در این پژوهش، پتانسیل دوگانه برای تولید پروتئین نوترکیب و یا کاربرد مستقیم در حیوانات آزمایشگاهی به عنوان واکسن DNA را دارد. این وکتور نوترکیب در صورت تزریق به عضلات حیوانات آزمایشگاهی ممکن است با محدودیت مشترک موجود برای همه واکسن‌های ژنی روبرو باشد. این محدودیت شامل عدم جذب کافی DNA تزریق‌شده در سلول‌های هدف است. البته امروزه با کاربرد نانو ذرات یا انجام الکتروپوریشن بافتی میزان جذب واکسن ژنی تزریقی افزایش داشته است.

نتیجه‌گیری:

با توجه به این که تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه دشوار بوده و در اکثر موارد تشخیص پس از پیشرفت بیماری حاصل می‌شود که کار درمان را سخت می‌کند، راه اصلی مبارزه با این نوع سرطان نیز همچون التهاب و زخم معده، پیشگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. ازآنجاکه مبارزه با این عفونت همواره با مشکلاتی همراه است، رویکردهای پژوهشی در زمینه به‌کارگیری اختصاصی و نوین روش‌های مهندسی ژنتیک برای مقابله با این عفونت از جمله تولید واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری است. ایجاد سازواره ژنی با استفاده از ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری به عنوان کاندیدای مناسبی جهت ساخت واکسن ژنی علیه این باکتری است. هر چند تا رسیدن به یک واکسن مطلوب راه طولانی در پیش است.

تشکر و قدردانی:

محققان و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد برای همکاری در اجرای این پژوهش اعلام نمایند.

تعارض منافع:

هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

References:

1. Mónica O, Armelle M. The Role of Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. Biology 2013; 2(3): 1110-1134.
2. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Role of NADPH-insensitive nitroreductase gene to metronidazole resistance of Helicobacter pylori strains. DARU 2010; 18(2): 137-140.
3. Cover TL. Helicobacter pylori Diversity and Gastric Cancer Risk. m Bio 2016; 7(1): 1869-15.
4. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, et al. A review of Helicobacter pylori diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. World J Gastroenterol 2014; 20(6): 1438-1449.
5. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population based Cancer Registry from Iran. Int J Cancer 2003; 107(1): 113-8.
6. Souod N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic Analysis of cagA and vacA Genes in Helicobacter Pylori Isolates and Their Relationship with Gastroduodenal Diseases in the West of Iran. Iran Red Cres Med J 2013; 15(5): 371-5.
7. Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children (south of Iran). Diagn Micr Infec Dis 2006; 54(4): 259-61.
8. Austin CM, Wang G, Maier RJ. Aconitase Functions as a Pleiotropic Posttranscriptional Regulator in Helicobacter pylori. J Bacteriol 2015; 197(19): 3076-3086.
9. Wang G, Olczak AA, Walton JP, et al. Contribution of the Helicobacter pylori Thiol Peroxidase Bacterioferritin Comigratory Protein to Oxidative Stress Resistance and Host Colonization. Infect Immun 2005: 73(1): 378–384.
10. Xu Y, Yuen PW, Ka-Wing Lam J. Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. Pharmaceutics 2014; 6: 378-415.
11. Mnich E, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, et al. Impact of Helicobacter pylori on the healing process of the gastric barrier. World J Gastroenterol 2016; 22(33): 7536-7558.
12. Glynn MK, Friedman CR, Gold BD, et al. Seroincidence ofHelicobacter pylori infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. Clinic Infect Dis 2002; 35(9): 1059-65.
13. Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, et al. Molecular assessment of clarithromycin resistant Helicobacter pylori strains using rapid and accurate

www.SID.ir

Archive of SID

PCR-RFLP method in gastric specimens in Iran. African J Biotechnol 2011: 10(39): 7675-7678.

14. Yaghoubi M, Byjarchy R. Meta-analysis and review Effect of family history stomach cancer in disease. J Jahad Univ 2008; 12(4); 235-237.
15. Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, et al. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among Helicobacter pylori strains. Proc Natl Acad Sci U S A 2000: 97(26); 14668-73.
16. Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Javadi GR, et al. DNA Vaccine Encoding the Omp31 Gene of Brucella melitensis Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. Res J Biol Sci 2009; 4(1): 126-131.
17. Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, et al. cagA Status and eradication treatment outcome of anti-Helicobacter pylori triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1319-22.
18. Olczak AA, Seyler Jr R, Olson JW, et al. Association of Helicobacter pylori Antioxidant Activities with Host Colonization Proficiency. Infect Immun 2003; 71(1): 580-583.
19. Najar Peerayeh S, Atoofi J, Hoseinkhani S, et al. Cloning and Expression of Helicobacter pylori HpaA Gene. Yakhteh Med J 2009; 11(3): 273-276.
20. Najar Peerayeh S, Farshchian M, Sadeghizadeh M, et al. Cloning and Expression of Helicobacter Pylori UreB122 (a Segment of the B-subunit of Urease Gene). Iran J Clin Infect Dis 2011; 6(4), 120-127.
21. González L, Marrero K, Reyes O, et al. Cloning and expression of a recombinant CagA -gene fragment of Helicobacter pylori and its preliminary evaluation in serodiagnosis. Biomedical 2013; 33(4):546-53.
22. Mehran MJ, Zendehbad SH, Malla S. Cloning and expression of a partial UreA antigen for the production of vaccine against helicobacter pylori, the risk factor for gastric cancer. Asian J Pharm Clin Res 2014; 7(1): 111-117.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine

Maryam Safarpour[1], Zahra Kazemi[1], Elham Doosti[2], Abbas Doosti[*2]

Received: 2016/14/11 Revised: 2017/21/02 Accepted: 2017/13/03

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.4, Winter 2017

Pars J Med Sci 2017; 14(4):43-50

Abstract

Introduction:
Helicobacter pylori is strongly associated with gastritis, stomach cancer, gastric lymphoma and peptic ulcer in human. Thiol peroxidase is encoded by tagD gene and plays a significant role in colonizing H. pylori in the stomach. The product of tagD gene stimulates the immune system in the host. This study aimed to isolate and clone tagD gene in the eukaryotic expression vector PFLAG-CMV-3 as a DNA vaccine candidate.

Materials and methods:
In this experimental research, tagD gene (537 bp) was amplified by PCR. The PCR products were cloned using cloning commercial kits (Thermo Fisher Co., COUNTRY) in pTZ vector. This gene was subcloned in the eukaryotic expression vector (PFLAG-CMV-3 vector), then transferred into CHO cells by electroporation method and was expressed.

Results:
The results indicate that amplification and cloning of tagD gene was successful, and the pTZ-tagD vector was formed. PFLAG-CMV-3 vector construction was confirmed by digestion and gene sequencing. The 19 kDa band was observed by gene expression analysis on SDS-PAGE.

Conclusions:
tagD gene in the PFLAG-CMV-3-tagD recombinant vector has the ability to produce specific protein in CHO cells. Therefore, this gene construct is useful to evaluate the immunogenicity as a DNA vaccine against H. pylori infection in animal models.

Keywords: Helicobacter pylori, tagD, cloning, electroporation

* Corresponding author, Email: abbasdoosti@yahoo.com

www.SID.ir