مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۶، خرداد ۱۳۹۶، صفحه ۴۱-۳۵

مطالعه بیان ژن ureI هلیکوباکترپیلوری به روش RT-PCR

مهسا فاضلی (MSc)[۱]، عباس دوستی (PhD)[۲*]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی
۲-مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی

دریافت: ۹۵/۱۲/۷، اصلاح: ۹۶/۱/۲۰، پذیرش: ۹۶/۲/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: هلیکوباکترپیلوری یک ارگانیسم مارپیچی شکل و گرم منفی بوده که عامل زخم معده است و نقش مهمی در ایجاد سرطان معده دارد. اجزای مختلف اوره آز، از عوامل مهم برای تحریک سیستم ایمنی هستند. هنوز واکسن موثری علیه این باکتری وجود ندارد و تحقیقات در زمینه یافتن واکسن، ضروری به نظر می رسد. هدف از تحقیق حاضر، ایجاد سازواره ژنی بر اساس ژن *ureI* و بررسی بیان آن است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تکثیر ژن *ureI* با انجام PCR روی ژنوم سویه استاندارد هلیکوباکترپیلوری تهیه شده از موسسه پاستور، صورت پذیرفت. قطعه ۶۱۲ جفت بازی مربوط به *ureI* به روش T/A cloning در پلاسمید pTZ کلون گردید، سپس ساب کلونینگ این ژن در پلاسمید PIRES2-EGFP انجام شد. سازواره PIRES2-EGFP-*ureI* به روش الکتروپوریشن به سلول های جانوری CHO منتقل و بیان یوکاریوتی ژن *ureI* با تکنیک RT-PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: کلونینگ قطعه ۶۱۲ جفت بازی ژن *ureI* در دو ناقل pTZ و PIRES2-EGFP با استفاده از تکنیک های PCR، هضم آنزیمی توسط *SacI* و *EcoRI* و تعیین توالی تایید گردید. پس از انجام RT-PCR روی سلول های CHO ترانسفرم شده، باند مربوط به ژن *ureI* تشکیل شد.

نتیجه‌گیری: وکتور نوترکیب PIRES2-EGFP-*ureI*، قدرت بیان ژن *ureI* را دارد. بیان موفق این ژن در سلول های جانوری، می تواند در جهت بررسی ایمنی زایی در حیوانات آزمایشگاهی به عنوان یک واکسن نوترکیب مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، کلون سازی، *ureI*، الکتروپوریشن، بیان ژن.

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری عامل التهاب دستگاه گوارش، زخم معده، زخم دوازدهه و یکی از عوامل اصلی سرطان معده است (۱). این میکروارگانیسم یک باکتری گرم منفی، مارپیچی شکل، متحرک و تاژک دار است و در دیواره معده انسان زندگی می کند. تحقیقات نشان داده که نسل بشر، حدود ۵۸۰۰۰ سال است که با این عفونت درگیر است (۲). حدود نیمی از مردم جهان به این عفونت مبتلا هستند. در بعضی از نقاط دنیا آلودگی بالاتر از ۸۰٪ نیز گزارش شده است مواردی از قبیل ۸۳٪ در سالخوردگان چینی، ۸۶٪ در کودکان بومیان آلاسکا، ۸۰٪ در خردسالان و بالغین بولیوی، ۸۴٪ در بالغین کشور پرتقال دیده شده است. از دیدگاه کلی، بیشترین مناطق آلوده دنیا شامل آمریکای مرکزی و شمالی و آسیا می باشند (۳). بین ۷/۴ تا ۶۵ درصد از کودکان در سطح جهان به هلیکوباکترپیلوری مبتلا هستند و ابتلا به این عفونت معمولا در دوران کودکی به وقوع می پیوندد و اثرات آن برای تمام عمر باقی می ماند (۵و۴). شیوع هلیکوباکترپیلوری در سال ۲۰۱۶ در کل جمعیت ایران به میزان ۵۴٪ گزارش شده است. به طوری که ۴۲٪ کودکان و ۶۲٪ بالغین در ایران به این عفونت مبتلا هستند (۶). فاکتورهای بیماری‌زایی هلیکوباکترپیلوری فاکتورهای متعددی چون اوره‌آز، فلاژل، ادهسین، سیتوکین واکوئل‌زا و جزیره پاتوژنسیته cag می‌باشند که ممکن است در بیماری‌زایی درگیر باشند (۷). هلیکوباکترپیلوری می تواند مقدار زیادی از اوره آز تولید کند و اوره را هیدرولیز کند. آنزیم اوره آز فعال دارای چندین زیر واحد است که مهمترین آنها UreA و UreB هستند (۸). کمپلکس ژنی آنزیم اوره آز به ترتیب به صورت *ureA*، *ureB*، *ureI*، *ureE*، *ureF*، *ureG* و *ureH* در ژنوم هلیکوباکترپیلوری در کنار هم قرار گرفته اند (۹). بررسی مطالعات گذشته نشان می دهد که اجزای مختلف این کمپلکس ژنی به عنوان واکسن های نوترکیب (واکسن های ژنی یا واکسن های پپتیدی) مورد بررسی قرار گرفته اند. در سال ۲۰۰۱، با هدف ایجاد واکسن نوترکیب، اجزای *ureA* و *ureB* در پلاسمید پروکاریوتی pET کلون سازی و در باکتری اشرشیاکلی بیان گردیده اند (۱۰). در مطالعات متعدد دیگر فعالیت تحریک سیستم ایمنی و واکنش سرمی برخی از اجزای این مجموعه ژنی به اثبات رسیده است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ در مالزی به انجام رسیده، ضمن کلون سازی و بیان ureG، خاصیت واکنش دهی آن با سرم خون انسان های مبتلا به هلیکوباکترپیلوری نشان داده شده است در صورتی که در نمونه های کنترل (افراد سالم)، چنین واکنشی دیده نشد (۱۱). در سال ۲۰۱۳، تحقیقات

▣ این مقاله حاصل پایان نامه مهسا فاضلی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۵/د/۲۸۲ دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد می‌باشد.

*مسئول مقاله: دکتر عباس دوستی
آدرس: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی. تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۶۱۰۴۸
E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

انجام شده در مورد یک واکسن ژنی بر اساس *ureI* موید تحریک بسیار بالای سیستم ایمنی سلولی و هومورال بوده است (۱۲). *ureI* یک پروتئین غشایی با وزن مولکولی برابر با ۲۱/۷ کیلو دالتون است که برای زنده ماندن هلیکوباکترپیلوری در محیط اسیدی ضروری است. این ژن در انواع گونه‌های هلیکوباکتر وجود دارد (۱۳و۵). *ureI* در بیشتر سویه های هلیکوباکترپیلوری نقش حفاظتی دارد و به عنوان یک مولکول ردیاب در تشخیص هلیکوباکترپیلوری استفاده می شود (۱۴). در بعضی از مطالعات نشان داده شده که *ureI* ممکن است در فرآیند حمل و نقل باکتری در داخل بدن نقش داشته باشد. همچنین این ژن در حفاظت از اسید و تنظیم فعالیت اوره آز سیتوپلاسمی در میکروارگانیسم نقش دارد و بر اساس مطالعات موجود، آنزیم آوره آز باکتری، به عنوان یکی از بهترین کاندیداهای واکسن علیه هلیکوباکترپیلوری مطرح است (۸). امروزه از پلاسمیدهای حامل قطعات ژن خارجی به عنوان ایمونوژن استفاده می‌گردد. در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله DNA سبب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی شده است (۱۵). واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون: تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره سازی و نگهداری آسان می‌باشند (۱۶). مطابق آنچه اشاره شد، بیشتر اجزای کمپلکس ژنی اوره آز برای تحریک سیستم ایمنی میزبان علیه هلیکوباکترپیلوری مناسب هستند. از طرفی هنوز واکسن موثری علیه این باکتری تولید نشده است. نظر به توان بالای آنتی ژنیک اجزای آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری، می توان از آنها به عنوان کاندیداهای واکسن نوترکیب استفاده کرد. یعنی ایجاد سازواره ای دو منظوره که بتوان از آن در مسیر تولید پروتئین نوترکیب برای کاربرد به صورت واکسن پپتیدی یا تزریق مستقیم وکتور نوترکیب به میزبان به صورت واکسن ژنی بهره گرفت، مد نظر است. لذا هدف از این تحقیق کلون سازی ژن *ureI* در وکتور بیانی یوکاریوتی PIRES2-EGFP و مطالعه بیان آن در سطح RNA در رده سلول های تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary: CHO) می باشد.

مواد و روش‌ها

این یک تحقیق تجربی است که در بهار سال ۱۳۹۵ انجام شده است.

پلاسمیدها و سویه های باکتریایی و سلول های جانوری: پلاسمیدهای به کاربرده شده در این تحقیق شامل پلاسمید مخصوص کلون سازی T/A به نام pTZ57R/T (شرکت ترمو فیشر، آمریکا) است که به منظور سهولت نگارش به جای pTZ57R/T از مخفف آن به صورت pTZ، استفاده شده است. وکتور بیان شونده یوکاریوتی به نام PIRES2-EGFP (شرکت کلون تک، آمریکا) نیز برای بیان ژن هدف مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به ماهیت خاص این تحقیق که شامل جداسازی، کلون سازی و بیان ژن می باشد، نیاز به جمع آوری نمونه نبوده و از سویه های باکتریایی یا رده سلولی مشخص استفاده شده است. به منظور بدست آوردن ژن *ureI* از هلیکوباکترپیلوری سویه استاندارد استفاده شد. به منظور ترانسفورمیشن و تکثیر وکتورهای نوترکیب از باکتری *E. coli* سویه Top10F استفاده شد. این باکتری از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد تهیه شد. برای بررسی کارکرد ژن کلون شده در سلول جانوری، از سلول های تخمدان همستر چینی (CHO) استفاده شد.

استخراج DNA و تکثیر ژن *ureI*: تخلیص DNA ژنومی از هلیکوباکترپیلوری با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) مطابق روش کار کیت انجام شد. کیفیت DNA تخلیص شده روی ژل آگارز ۱٪، همراه با رنگ آمیزی بوسیله اتیدیوم بروماید بررسی شد. غلظت DNA خالص سازی شده با نانودراپ (شرکت پک لب، آمریکا) اندازه گیری گردید. واکنش PCR به منظور تکثیر ژن *ureI*، با استفاده از پرایمر رفت و برگشت 5'-TTGGAGCTCAAGGATAAGGCAATGCTAGGAC-3' و 5'-TGAGAATTCCACACCCAGTGTTGGATAAAG-3' صورت پذیرفت. در سر ۵–پریم هر یک از پرایمرهای مذکور رفت و برگشت به ترتیب سایت برش مخصوص دو آنزیم *Sac*I و *Eco*RI در نظر گرفته شد.

جهت انجام واکنش PCR از دستگاه Master Cycler Gradient (شرکت اپندرف، آلمان) استفاده شد و واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز *Taq* و ۲۰۰ میکرو مولار dNTP Mix انجام گرفت (همه مواد ساخت شرکت سیناژن، ایران). سپس ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، روی مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. همچنین شرایط دمایی جهت تکثیر ژن شامل یک سیکل حرارتی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۲ سیکل تکراری ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. در کنار نمونه ها از آب دیونیزه دو بار تقطیر برای کنترل منفی استفاده شد و محصولات PCR بدست آمده، بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردیدند و با نور ماورای بنفش (UV) مشاهده و مورد بررسی قرار گرفتند.

قطعه DNA مربوط به ژن *ureI* به کمک تیغ اسکالپل از ژل جداسازی و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (شرکت بیونیر، کره جنوبی) مطابق با دستورالعمل کیت، تخلیص شد. برای اطمینان از صحت قطعه ژن تخلیص شده و کیفیت آن، ۳ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد و در کنار مارکر الکتروفورز و مشاهده شد.

کلون سازی T/A: کلون سازی T/A تکنیکی است که برای کلون سازی محصولات PCR انجام می شود. در این تحقیق به منظور انجام کلون سازی T/A از T-vector با نام pTZ (شرکت ترمو فیشر، آمریکا) بهره گرفته شد. محصولات PCR به وکتور T، مطابق روش کار کیت، الحاق یا متصل (Legated) شدند. سپس محصول الحاق شده (Ligation) در باکتری اشرشیاکلی سویه TOP10 F به روش شیمیایی و با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد استریل ترانسفورم شد. باکتری‌های یاد شده در محیط آگاردار LB (لوریا برتانی آگار) محتوی ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت (شرکت کیاژن، آمریکا)، تخلیص پلاسمید انجام شد و سپس تایید اولیه صحت کلونینگ به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *ureI* صورت گرفت. تاییدات تکمیلی و نهایی سازواره حاصل به روش هضم آنزیمی و تعیین توالی ارزیابی گردید.

کلون سازی ژن در وکتور بیانی: ابتدا وکتور بیانی PIRES-EGFP توسط آنزیم‌های محدودالاثر *Sac*I و *Eco*RI (شرکت ترمو فیشر، آمریکا) و در حضور

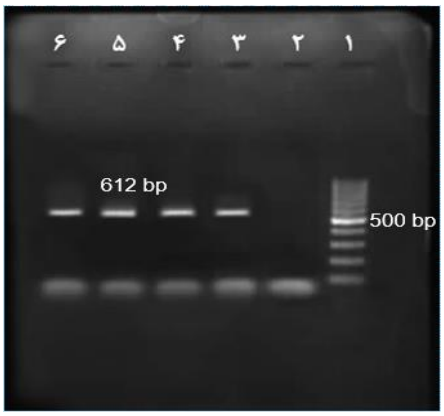
بافر Y/Tango بریده شد. پس از گذشت ۴ ساعت محلول حاصل روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. تک باند مشاهده شده نشان دهنده برش وکتور PIRES-EGFP توسط این آنزیم‌ها بود. باند بریده شده توسط کیت استخراج DNA از ژل (شرکت بیونیر، کره جنوبی)، خالص سازی شد. همچنین ژن *ureI* کلون شده در وکتور PTZ نیز به همین روش توسط دو آنزیم *Sac*I و *EcoR*I برش داده شد. ژن *ureI* جداسازی و تخلیص شده از وکتور pTZ با وکتور PIRES-EGFP در حضور آنزیم T4-لیگاز (شرکت ترمو فیشر، آمریکا) مخلوط گردید و واکنش اتصال بین ژن *ureI* و وکتور بیانی PIRES-EGFP انجام شد. محصول واکنش اتصال به باکتری *E. coli* سویه TOP10F منتقل و در محیط کشت LB Agar حاوی کانامایسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شد. پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های بدست آمده، صحت کلون‌سازی و تشکیل وکتور نوترکیب PIRES-EGFP-*ureI* به ترتیب با روش های PCR، هضم آنزیمی با دو آنزیم *Sac*I و *EcoR*I و نهایتا تعیین توالی، مورد بررسی قرار گرفت (۱۵).

ترانسفرم کردن سلول جانوری با سازواره نهایی PIRES-EGFP-uerI: به منظور بررسی بیان ژن *ureI* در سلول جانوری، از سلول تخمدان هامستر چینی (CHO) استفاده شد و برای ترانسفورمیشن این سلول ها از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. به منظور انجام الکتروپوریشن از دستگاه الکتروپوریشن مدل Gene Pulser Xcell (شرکت بیوراد، آمریکا) استفاده شد. تعداد ۲×۱۰^{۶} از سلول های CHO شمارش و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کووت ۰/۴ مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۸۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از وکتور نوترکیب PIRES-EGFP-*ureI*، به سلول های درون کووت در شرایط استریل (زیر هود) اضافه شد و کووت به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. دیواره های بیرونی کووت حاوی سلول ها با کمک گاز استریل خشک شد و در دستگاه الکتروپوریشن قرار داده شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه سازی شده ۰/۱۷۴ کیلو ولت و ۴۰۰ میکروفاراد به سلول ها داده شد و سلول ها بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس سلول های الکتروپوریت شده در فلاسک کشت حاوی محیط RPMI (شرکت گیبکو، آمریکا) به همراه ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتک های پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO2 قرار داده شدند. سپس به هر یک فلاسک های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آنتی بیوتیک نئومایسن (مارکر انتخابی برای سلول های ترانسفرم شده با وکتور نوترکیب) اضافه شد و سلول ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری گردیدند. تمامی مراحل فوق (الکتروپوریشن) برای سری دیگری از سلول های CHO که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول های گروه شاهد، هیچگونه DNA اضافه نگردید.

بررسی بیان ژن در سطح RNA: برای مطالعه بیان ژن *uerI* کلون شده در وکتور PIRES-EGFP از روش رونوشت برداری معکوس (reverse transcription) بهره گرفته شد. به این منظور، از سلول‌های CHO ترانسفرم شده با پلاسمید نوترکیب PIRES-EGFP-uerI و سلول های گروه کنترل (فاقد وکتور نوترکیب) با استفاده از کیت (شرکت کیاژن، آمریکا)، استخراج RNA صورت پذیرفت. کیفیت و غلظت RNA های بدست آمده با استفاده از نانودراپ (شرکت پک لب، آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه cDNA از کیت (شرکت ترمو فیشر، آمریکا) استفاده شد. واکنش PCR روی cDNA های حاصل، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *uerI* هلیکوباکترپیلوری انجام شد. با توجه به اینکه بیشتر مراحل این تحقیق، منجر به تولید محصول در هر مرحله می گردد، لذا معیار سنجش متغییر ها، مشاهده یا عدم مشاهده محصول تولیدی در هر مرحله است.

یافته‌ها

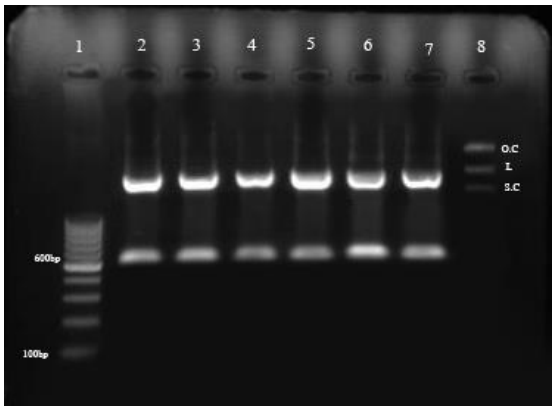
جداسازی ژن *ureI* هلیکوباکترپیلوری: در این مطالعه، استخراج DNA ژنومی از باکتری هلیکوباکترپیلوری با موفقیت انجام شد و غلظت DNA پس از خوانش با نانودراپ، ۲۳۵ نانوگرم در هر میکرولیتر نشان داده شد. نتایج الکتروفورز DNA تخلیص شده بر روی ژل آگارز، نشان دهنده کیفیت مناسب آن جهت انجام آزمایشات مولکولی بود. طول قطعه حاصل از تکثیر ژن *ureI*، با توجه به پرایمرهای طراحی شده، پس از انجام واکنش PCR قطعه ای به طول ۶۱۲ جفت باز بود. در این آزمایش، از نمونه فاقد DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از آنجا که DNA الگو برای تکثیر ژن *ureI*، در واقع ژنوم هلیکوباکترپیلوری سویه استاندارد می باشد، لذا این الگوی استاندارد، علاوه بر ایفای نقش به عنوان DNA الگو، به مثابه کنترل مثبت نیز می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. تکثیر ژن *ureI* به روش PCR، ردیف ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ساخت شرکت فرمنتاز، ردیف ۲: نمونه کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)، ردیف ۶-۳: باند ۶۱۲ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *ureI*

کلون سازی T/A و ساب‌کلونینگ: کلون سازی محصول PCR به روش T/A در وکتور pTZ، به منظور ایجاد همسانه‌ای از ژن *ureI*، موجب تولید سازه pTZ-*ureI* گردید. تست‌های تاییدی به کار رفته در مورد صحت همسانه سازی ژن *ureI* شامل PCR و هضم آنزیمی بود که واکنش PCR نشان داد درصد زیادی از کلون‌های حاصل، واجد سازه pTZ-*ureI* می‌باشند. همچنین هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *Sac*I و *EcoR*I بر روی پلاسمیدهای تخلیص شده، حضور قطعه ۶۱۲ جفت بازی مربوط به ژن *ureI* در وکتور pTZ را نشان داد. هضم آنزیمی این سازواره با دو آنزیم *Sac*I و *EcoR*I و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز موجب تشکیل دو باند ۵۳۰۸ و ۶۱۲ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور PIRES2-EGFP و ژن *ureI* گردید. نتایج مربوط به هضم آنزیمی سازواره نهایی PIRES2-EGFP-*ureI* با دو آنزیم *Sac*I و *EcoR*I در شکل ۲ نشان داده شده است. داده های حاصل از تعیین توالی ژن *ureI* کلون شده در سازواره نهایی در پایگاه بانک ژن جهانی BLAST شد و

نتایج نشان داد که هیچگونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن بوجود نیامده و درستی توالی آن مورد تایید است.



شکل ۲. هضم آنزیمی سازواره نهایی PIRES2-EGFP-*ureI* با دو آنزیم SacI و EcoRI. ردیف ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی ساخت شرکت فرمنتاز، ردیف ۷-۲: قطعه ژن به اندازه ۶۱۲ جفت باز مربوط به ژن *ureI* و قطعه دیگر به اندازه ۵۳۰۸ جفت باز مربوط به وکتور PIRES2-EGFP، ردیف ۸: پلاسمید نوترکیب PIRES2-EGFP-*ureI*

الکتروپوریشن و بیان ژن: نتایج نشان داد، سلول‌ها در مراحل کشت در حضور نئومایسین نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم شده‌اند که موید دریافت پلاسمید نوترکیب حاصل می باشد. نتایج انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید بیان ژن *ureI* در سلول های جانوری، مثبت بود. به طوری که پس از انجام واکنش PCR روی cDNA های حاصل از واکنش رونوشت برداری معکوس برای سلول های دریافت کننده پلاسمید نهایی نوترکیب حامل ژن هدف، باند ۶۱۲ جفت بازی مربوط به ژن *ureI* تشکیل شد. اما همین آزمایش برای سلولهای فاقد پلاسمید نوترکیب، مثبت نبود. نتایج این آزمایش تایید کننده بیان موفق ژن *ureI* در سلول های تخمدان همستر چینی می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، ژن *ureI* به عنوان یکی از مهمترین آنتی ژن های هلیکوباکترپیلوری در سیستم یوکاریوتی بیان شد. این ژن در وکتور بیانی یوکاریوتی PIRES2-EGFP کلون سازی و بیان موفق آن در سطح RNA به روش RT-PCR در سلول های جانوری CHO یا تخمدان همستر چینی دیده شد. کمپلکس ژنی اوره آز در بر گیرنده مهمترین و موثرترین ژن هایی است که مستقیما با حیات و بقای هلیکوباکترپیلوری ارتباط دارند. این مجموعه ژنی که شامل زیر واحد های اصلی و ژن های کمکی است در مجموع شامل ۷ ژن به نام‌های *ureA*، *ureB*، *ureI*، *ureE*، *ureF*، *ureG* و *ureH* است (۹). در تحقیقات متعدد، بیشتر اجزای کمپلکس اوره آز با اهداف مختلف، کلون سازی و مطالعه شده اند و اغلب مطالعات وجود خاصیت آنتی ژنیک در سایر اجزای این خوشه ژنی را نشان داده اند. در سال ۲۰۱۳، Jie و همکاران اقدام به تکثیر و کلون سازی بخش *ureI* از مجموعه ژنهای اوره آزی نمودند. این محققان ژن *ureI* را در پلاسمید بیانی pCDNA3.1(+) درج و وکتور نوترکیب pCDNA3.1(+)-*ureI* را تولید کردند. این محققان در نتیجه کار خود اعلام نمودند که این سازواره ژنی قادر به بیان موفق محصول پروتئینی UreI می باشد و محرک سیستم ایمنی حیوانات آزمایشگاهی به صورت واکسن ژنی می باشد و نتیجه گیری کلی این کار موفقیت این سازواره در ایجاد پاسخ ایمنی بسیار قوی از نوع ایمنی سلولی و همورال به صورت توام بود. تحقیق Jie و همکاران از چند دیدگاه با کار ما شباهت دارد. در درجه اول اینکه مثل تحقیق ما از ژن *ureI* استفاده نموده اند. دوم اینکه، این ژن را در وکتور بیانی یوکاریوتی درج نموده اند و نتایج مناسبی بدست آورده اند (۱۲). هر چند نوع وکتور یوکاریوتی به کار رفته در تحقیق ما با تحقیق اخیر متفاوت بوده است. در تحقیق دیگری، پژوهشگران اقدام به تکثیر زیر واحد های *ureA* و *ureB* از ژنوم هلیکوباکترپیلوری های ایزوله شده در ایران پرداختند. این قطعات ژنی ابتدا در وکتور پروکاریوتی pET درج شدند و بیان آن ها در باکتری اشرشیاکلی بررسی شد (۱۰).

این تحقیق از نظر تکنیک های مورد استفاده، شباهت زیادی با تحقیق ما داشت اما در تحقیق حاضر، اقدام به جداسازی بخش دیگری از مجموعه ژنی اوره آز شده و ژن *ureI* را تکثیر و درج نمودیم. بررسی بیان *ureI* نیز بر خلاف کار این محققان، در سلول یوکاریوت انجام پذیرفت. اهمیت موضوع بیان یوکاریوتی که در مطالعه ما بر آن تاکید می گردد، به خاطر ایجاد پتانسیل لازم برای این سازواره است. همانگونه که در محیط آزمایشگاه قادر به بیان ژن در سیستم یوکاریوتی است، لذا قادر به تولید محصول خود در صورت تزریق به عضله حیوان آزمایشگاهی (به عنوان واکسن ژنی) نیز می باشد. Gu و همکاران ژن *ureB* هلیکوباکترپیلوری را به منظور بیان آن در گیاه موزاییک تنباکو کلون سازی کردند. در این مطالعه ژن *ureB* هلیکوباکترپیلوری درون وکتور pBI121 کلون سازی شد و پس از کلون سازی توسط روش های RT-PCR و وسترن بلات بیان این ژن را تایید کردند. این مطالعه اولین گزارش از بیان ژن هلیکوباکترپیلوری در یک سیستم گیاهی بود. در مطالعه Gu و همکاران نیز همانند تحقیق ما، بیان ژن در مرحله بیان RNA و به روش RT-PCR سنجش شده است (۱۷). Strugastky و همکارانش عنوان کردند که هلیکوباکترپیلوری با بیماری های گوارشی مانند گاستریت مزمن، زخم معده، لنفوم معده و سرطان معده در ارتباط است و همچنین عنوان کردند *ureI* پروتئین غشای داخلی هلیکوباکترپیلوری و به شدت حفاظت شده است و یک عامل کلیدی برای کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در معده پستانداران است و *ureI* می تواند به عنوان آنتی ژن و یک نشانگر مولکولی خوبی برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری مورد استفاده قرار گیرد (۱۸).

در مطالعه دیگری Wang و همکاران ژن *ureI* باکتری هلیکوباکترپیلوری را در باکتری اشرشیاکلی کلون سازی کردند که در نهایت به تولید کانستراکت BL21+/*ureI* انجامید. آنها همچنین با روشSDS PAGE و وسترن بلات نشان دادند که پروتن نوترکیب *ureI* در اجسام انکلوزیونی تولید شده و قادر است علیه هلیکوباکتر فعالیت کند. آنها بیان این پروتئین در پلاسمید پروکاریوتی را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان پروتئین r*UreI*/his در اجسام انکلوزیونی قادر است بر علیه آنتی بادی های هلیکوباکتر و هیس تگ فعالیت کند (۱۹). با توجه به شیوع نسبتا بالای هلیکوباکترپیلوری در جوامع انسانی در سراسر دنیا و بخصوص معرفی آن به عنوان یکی از عوامل مهم سرطان دستگاه گوارش انسان، لزوم توجه به راه های پیشگیری از این عامل عفونی را گوشزد می کند.

یکی از بهترین راه ها در پیشگیری از بروز این عفونت، واکسیناسیون است. تا کنون واکسن موثری علیه هلیکوباکترپیلوری تولید نشده و مطالعه در زمینه واکسن های نوترکیب می‌تواند به عنوان ابزار پیشگیری مناسب و گام بزرگی در مهار عفونت هلیکوباکترپیلوری باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه تجربی، ژن *ureI* هلیکوباکترپیلوری ابتدا به روش T/A کلون شد و وکتور نوترکیب pTZ-*ureI* تولید شد. این پلاسمید نوترکیب به عنوان منبع مطمئنی از ژن *ureI* می تواند در اختیار سایر محققان در کشور قرار گیرد و در مراکز تحقیقاتی به بانک ذخیره ژن آنها، افزوده گردد. از طرفی وکتور نوترکیب نهایی PIRES2-EGFP-*ureI* که بواسطه آن ژن *ureI* (که ویژگی مهم آن تحریک سیستم ایمنی میزبان است) در سلول های جانوری در محیط کشت سلولی بیان شد، از دو دیدگاه دارای اهمیت است. یکی کاربرد آن در تحقیقات آینده به عنوان تولید کننده محصول *ureI* و استفاده به عنوان کاندیدای واکسن نوترکیب پپتیدی و از سوی دیگر کاربرد آن به صورت مستقیم در حیوانات آزمایشگاهی به صورت واکسن ژنی، می تواند مد نظر قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جهت حمایت از این تحقیق و همچنین از همکاری آقایان حمیدرضا کبیری سامانی و اسماعیل محمودی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Study of the Expression of Helicobacter Pylori Urei Gene by RT-PCR

M. Fazeli (MSc)[1], A. Doosti (PhD) *[2]

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

J Babol Univ Med Sci; 19(6); Jun 2017; PP: 35-41
Received: Feb 25th 2017, Revised: Apr 9th 2017, Accepted: May 15th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Helicobacter pylori is a spiral shaped and gram negative bacterium which causes peptic ulcer and has an important role in gastric carcinoma. Different components of urease are the important factor to stimulate the immune system. There is no effective vaccine against this bacteria and research on finding an effective vaccine is necessary. The aim of present study was to produce ureI gene construct and evaluation of the expression of this gene.

METHODS: In this experimental study, the amplification of ureI gene was performed using PCR on standard strains of H. pylori genome that obtained from Pasteur institute. 612 bp fragment of ureI gene was cloned by T/A cloning technique into pTZ plasmid, and sub-cloning was done in PIRES2-EGFP vector. PIRES2-EGFP-ureI recombinant vector was transformed using electroporation into CHO cells and ureI gene expression was evaluated by RT-PCR.

FINDINGS: Cloning of 612 bp fragment for ureI gene in pTZ and PIRES2-EGFP vectors had confirmed using PCR, digestion by SacI/EcoRI restriction enzymes and sequencing. After the RT-PCR on transformed CHO cells, the ureI gene fragment was observed.

CONCLUSION: The PIRES2-EGFP-ureI recombinant vector can express the ureI gene. The successful gene expression of this target gene in animal cells can be used to evaluate the immunogenicity as a vaccine in laboratory animals. Also, this generated recombinant vector has the potential for assay as DNA vaccine in future experiments.

KEY WORDS: *Helicobacter pylori, cloning, ureI, Electroporation, Gene Expression.*

Please cite this article as follows:

Fazeli M, Doosti A. Study of the Expression of Helicobacter Pylori Urei Gene by RT-PCR. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(6):35-41.

* **Corresponding author: A. Doosti (PhD)**
Address: Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R.Iran
Tel: +98 38 33361048
E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

References

1.Suganya K, Prem Kumar A, Sekar B, Sundaran B. Protection of mice against gastric colonization of Helicobacter pylori by therapeutic immunization with systemic whole cell inactivated vaccines. Biologicals. 2017;45(2017):39-46.

2.Mendoza-Elizalde S, Olivares-Cervantes AL, Zuñiga G, Valencia-Mayoral P, Vigueras Galindo JC, Velázquez-Guadarrama N. Microevolutionary history of helicobacter pylori during Infection: a review. J Genetic Gen Res. 2016;3(1):1-5.

3.Thaker Y, Moon A, Afzali A. Helicobacter Pylori: A Review of Epidemiology, Treatment, and Management. J Clin Gastroenterol Treat. 2016;2(19):1-5.

4.Li L, Ke Y, Yu C, Li G, Yang N, Zhang J, et al. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori in Chinese children: A multicenter retrospective study over 7 years. Helicobacter. 2017;22(3): e12373.

5.Doosti A, Rahimian GH, Nassiri J, Yavari-Forushani P. Prevalence of the cagA-Positive Helicobacter pylori Strains Isolated from Gastric Biopsy Specimens in Shahrekord. Armaghane Danesh. 2007;12(1), 29-38. [In Persian]

6.Moosazadeh M, Lankarani KB, Afshari M. Meta-analysis of the prevalence of helicobacter pylori infection among children and adults of Iran. Int J Prev Med. 2016;7:48-52.

7.Covacci A, Telford JL, Del-Giudice G. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science. 1999;284(5418):1328-33.

8.Yang J, Dai LX, Pan X, Wang H, Li B, Zhu J, et al. Protection against helicobacter pylori infection in BALB/c mice by oral administration of multi-epitope vaccine of CTB-UreI-UreB. Pathog Dis. 2015;73(5):26.

9.Mobley HLT. The role of helicobacter pylori urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. Aliment Pharmacol Ther. 1996;10(1):57-64.

10.Karimi M, Mohammadi M. Cloning and expression of recombinant helicobacter pylori urease A and B subunits as a putative vaccine. I B J. 2001;5(4):107-111.

11.Khalilpour A, Osman S, Yunus MH, Santhanam A, Vellasamy N, Noordin R. Helicobacter pylori recombinant UreG protein: cloning, expression, and assessment of its seroreactivity. BMC Res Notes. 2014;7:809-17.

12.Jie L, Wen Y, Sheng L, Yan Z, Cui-ming Z, Yi-Mou W. Immunocompetence of Helicobacter pylori ureI DNA vaccine in mice. Chin J Zoonos. 2013;29(9):895-8.

13.Skouloubris S, Thiberge JM, Labigne A, Reuse HD. The Helicobacter pylori UreI protein Is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. Infect Immun. 1998;66(9):4517-21.

14.Hatzifoti C, Wren BW, Morrow WJ. Helicobacter pylori vaccine strategies-triggering a gut reaction. Immunol Today. 2000;21(12):615-19.

15.Doosti A. Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of Clostridium botulinum in E. coli. J Microbial World. 2013;5(13):77-84.[In Persian].

16.Yu Y, Zhang S, Sun Z, Wang S, Yu W. Enhanced immune responses using plasmid DNA replicon vaccine encoding the Hc domain of clostridium botulinum neurotoxin serotype A. Vaccine. 2007;25(52): 8843-50.

17.Gu Q, Han N, Liu J, Zhu M. Cloning of Helicobacter pylori urease subunit B gene and its expression in tobacco (Nicotiana tabacum L.). Plant Cell Rep. 2005;24(9):532-9.

18.Strugatsky D, McNulty R, Munson K, Chen CK, Soltis SM, Sachs G, et al. Structure of the proton-gated urea channel from the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature. 2012;493:255-8.

19.Wang BN, Shi QF, Li H, Li MY, Chen CP, Zheng QW, et al. Cloning of ureI gene from Helicobacter pylori and its expression in E coli. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2007;27(1): 24-27.