

بیان ژن *leoA* هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های تخمدان همستر چینی به روش RT-PCR

نغمه میرابوالقاسمی^۱، دکتر عباس دوستی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

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

چکیده

زمینه و هدف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن باکتریایی در جهان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه است. ژن *leoA* نقش مهمی در بیماری‌زایی ایفا می‌کند و نقش اصلی این ژن افزایش ترشح سم توسط باکتری است. این مطالعه به منظور جداسازی و کلون‌سازی ژن *leoA* در وکتور بیانی pEGFP-C2 و بررسی بیان آن به روش RT-PCR در سیستم یوکاریوتی انجام شد. **روش بررسی:** در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ژن *leoA* از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد (ATCC 43504) به روش PCR تکثیر و جداسازی شد. سپس با روش کلون‌سازی T/A در ناقل pTZ درج گردید. ساب کلونینگ این ژن در وکتور بیانی pEGFP-C2 با آنزیم لیگاز انجام شد. سپس سازواره نهایی pEGFP-C2-*leoA* به روش الکتروپوریشن در سلول‌های تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary: CHO) ترانسفرم گردید و بیان ژن *leoA* با روش SDS-PAGE و RT-PCR ارزیابی شد. **یافته‌ها:** نتایج PCR نشان‌دهنده تکثیر قطعه 1758 جفت بازی مربوط به ژن *leoA* بود. کلون‌سازی این ژن به ترتیب در وکتورهای pTZ و pEGFP-C2 با موفقیت انجام شد. همضم آنزیمی با دو آنزیم *KpnI* و *SacII* و همچنین تعیین توالی، صحت کلون‌سازی ژن را تایید کرد. مشاهده محصول پروتئینی ژن *leoA* در سلول‌های CHO نشان‌دهنده بیان موفقیت‌آمیز ژن *leoA* هلیکوباکتر پیلوری در سیستم یوکاریوتی بود. **نتیجه‌گیری:** سازواره نهایی pEGFP-C2-*leoA*، قدرت بیان موفق ژن *leoA* در سلول‌های جانوری را داشت. **کلید واژه‌ها:** هلیکوباکتر پیلوری، ژن *leoA*، الکتروپوریشن، واکسن نو ترکیب

* نویسنده مسؤول: دکتر عباس دوستی، پست الکترونیکی abbasdoosti@yahoo.com

نشانی: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۶۶، تلفن ۰۳۸-۳۲۲۲۷۵۶۲، نامبر ۳۳۳۶۱۰۴۳

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۷/۲۴، اصلاح نهایی: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۷

مقدمه

توسعه متفاوت است. به طوری که در کشورهای صنعتی به تدریج و با افزایش سن، شیوع عفونت افزایش می‌یابد (۷و۵). *leoA* (Labile enterotoxin output A) یک عامل بیماری‌زایی GTPase است که در جزیره بیماری‌زایی کدگذاری می‌شود و بالقوه از طریق وزیکول ترشحی باعث افزایش انتشار سم می‌شود (۸). در حال حاضر *leoA* به عنوان یک پروتئین شبه دی آمینی باکتریایی شناخته می‌شود (۹و۸). پروتئین‌های خانواده دی آمینی، غشاها را تغییر می‌دهند و زمانی تصور می‌شد که به یوکاریوت‌ها محدود هستند (۸). *leoA* با دفع انتروتوکسین حساس به حرارت (Labile enterotoxin: LT) از طریق وزیکول غشاء (Membrane vesicle: MV) تکامل یافته و از سطح سلول باکتری آزاد می‌شود. در حال حاضر گزارش‌های بسیار کمی حاکی از نقش عملکردی پروتئین‌های دی آمینی باکتریایی وجود دارد. وزیکول‌های غشاء نقش مهمی در عملکرد حفاظت شده اعضای خانواده دی آمینی (DFMs) طی حوزه‌های تکاملی از پروکاریوت‌ها

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) یک ارگانسیم میکرو آئروفیلیک، گرم منفی، کند رشد، مارپیچی شکل و تازک‌دار و ساکن روی سطح مجرای اپیتلیوم معده است (۳-۱). هلیکوباکتر پیلوری دارای ۵-۲ میکرومتر طول و ۱-۰/۵ میکرومتر عرض، با ۶-۴ تازک قطبی است که برای تحرک باکتریایی ضروری است (۲). این باکتری از تنوع بالایی در ژنوم برخوردار بوده که می‌تواند یک عامل مهم در انطباق آن با معده میزبان باشد (۲). هلیکوباکتر پیلوری در پاتوژنز بیماری‌های مختلف از جمله زخم معده و دوازدهه، سرطان معده و التهاب بافت لنفاوی وابسته به مخاط (MALT) دخیل است (۶-۴). عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن باکتریایی در دنیا به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است. ابتلا به عفونت معمولاً در دوران کودکی رخ می‌دهد؛ اما اثرات آن برای تمام عمر باقی می‌ماند. الگوی اپیدمیولوژیک این عفونت در کشورهای صنعتی و در حال

(۱۵). واکسن های ژنی به عنوان سومین انقلاب در علم واکسیناسیون معرفی می شوند. استفاده از واکسن های ژنی راهکار جدیدی برای ایجاد ایمنی علیه بیماری هاست. استفاده از این روش امروزه در حال گسترش است. زیرا واکسن های ژنی قادر به القای پاسخ ایمنی سلولی یا همورال یا هر دو هستند (۱۶). واکسن های ژنی در مقایسه با سایر واکسن ها دارای مزایایی چون تولید ساده تر، خالص تر بودن محصول، ذخیره سازی و نگهداری آسان هستند (۱۶). این مطالعه به منظور جداسازی و کلون سازی ژن *leoA* در وکتور بیانی pEGFP-C2 و بررسی بیان آن به روش RT-PCR در سیستم یوکاریوتی انجام شد.

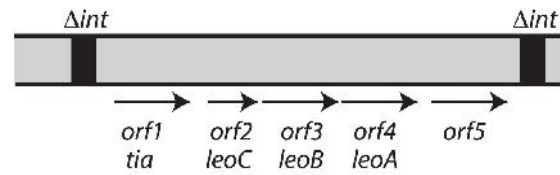
روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد طی سال ۱۳۹۵ انجام شد.

سویه های باکتریایی، وکتورها و سلول های جانوری: به سویه استاندارد هلیکوباکتریپیلوری برای جداسازی ژن *leoA* و سویه های از *E. coli* به عنوان میزبانی برای تکثیر و کتورهای نو ترکیب نیاز بود. برای تکثیر و به دست آوردن ژن *leoA*، باکتری هلیکوباکتریپیلوری سویه استاندارد (ATCC 40504) از بخش میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای تکثیر ژن های نو ترکیب نیز از باکتری اشریشیا کلی سویه TOP10F استفاده شد که از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد تهیه گردید. همچنین برای کلون سازی ژن از دو وکتور به نام های pTZ57R/T و pEGFP-C2 استفاده شد. وکتور pTZ57R/T به عنوان یک T-vector مورد استفاده بوده و برای کلون سازی محصولات PCR مناسب است. این وکتور که برای سهولت نگارش در این مقاله به صورت مخفف و به شکل pTZ آورده می شود؛ مربوط به کیت کلون سازی T/A (ساخت شرکت ترمو فیشر، آمریکا) است. اندازه وکتور pTZ برابر ۲۸۸۶ جفت باز و مارکر مقاوت آنتی بیوتیکی آن، ژن مقاومت به آمپی سیلین است. وکتور بیانی یوکاریوتی pEGFP-C2 (ساخت شرکت کلون تک، آمریکا) به اندازه ۴۷۳۵ جفت باز دارای پروموتور قوی CMV برای بیان ژن کلون شده است. مارکرهای انتخابی آن در سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی به ترتیب شامل مقاومت به کانامایسین و نئومایسین است. سلول یوکاریوتی مورد استفاده برای بررسی بیان ژن کلون شده، سلول تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary: CHO) است که از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد تهیه شد.

استخراج DNA و تکثیر ژن *leoA*: به منظور استخراج DNA ژنومی از باکتری هلیکوباکتریپیلوری از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران استفاده گردید. کیفیت DNA تخلیص شده، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار

به یوکاریوت ها نشان می دهند (۸).



شکل ۱: تصویر شماتیک ساختار اوپرون ژن *leoA* (۸)

امروزه برخی از آنتی بیوتیک ها برای درمان عفونت هلیکوباکتریپیلوری در دسترس هستند؛ اما هزینه زیاد، عدم تمایل بیماران برای مصرف دقیق دارو و بروز سویه های مقاوم از عوامل محدود کننده کفایت این درمان ها به شمار می روند. از این رو ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری مانند واکسیناسیون مطرح می شود. تلاش برای ساخت واکسن علیه هلیکوباکتریپیلوری در اوایل دهه ۱۹۹۰ با علم به این که عفونت ناشی از این باکتری عامل اصلی زخم معده است؛ شروع شد (۳).

با توجه به افزایش روز افزون سویه های مقاوم هلیکوباکتریپیلوری درمان آنتی بیوتیکی در ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد با شکست همراه می شود (۱۰). با توجه به بروز مقاومت به درمان های دارویی، پایداری بالای هلیکوباکتریپیلوری در میزبان انسانی و امکان بروز عوارض متعدد ناشی از حضور طولانی مدت این ارگانسم در معده، جایگزینی و یا به کارگیری یک سیستم کمکی همراه درمان های مبتنی بر آنتی بیوتیک در عفونت های ناشی از هلیکوباکتریپیلوری یک ضرورت به نظر می رسد (۱۱). به رغم تحقیقات انجام شده روی واکسن هلیکوباکتریپیلوری و نتایج خوب حاصله در مدل های حیوانی، در حال حاضر هیچ واکسنی مجوز کاربرد روی انسان را ندارد (۳). امروزه با استفاده از روش ساب کلونینگ، ژن های خاصی با هدف تشخیصی و حتی درمانی به کار برده می شوند. مطالعات گسترده ای در زمینه انتقال ژن به منظور برطرف کردن نقص ژنی یا درمان بیماری های مختلف صورت گرفته است (۱۲). در تحقیقات گذشته، اثرات ایمنی زایی علیه هلیکوباکتریپیلوری برای انواع آنتی ژن های طبیعی و یا نو ترکیب مانند اوره آز، پروتئین های شوک حرارتی، *VacA*، *CagA*، *HP-NAP*، کاتالاز، *HpaA* (*Helicobacter pylori* adhesin A) و سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase: SOD) نشان داده شده است (۳ و ۱۳ و ۱۴). واکسن های بسیاری در برابر عفونت های باکتریایی مانند واکسن های ژنی یا واکسن های DNA ابداع شده و مورد بررسی قرار گرفته اند. واکسن ژنیک نوعی واکسن است که از طریق تزریق آن باعث ایجاد پاسخ ایمنی در میزبان می شود و می تواند در برابر بیماری های ناشی از عوامل بیماری زای مختلف مانند باکتری ها، ویروس ها، تک یاخته ها و کرم های انگل ایمن سازی انجام دهد و حتی استفاده از آن برای تومورها و بیماری های با منشأ ژنتیکی نیز مطرح است

گرفت. برای تکثیر ژن leoA، ابتدا توالی ژن leoA با شماره ثبت FM991728 از بانک ژن جهانی گرفته شد. سپس پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند. در توالی رفت (Forward) از پرایمر 3'-AAGGGTACCGCAATGAATGAAACGCTAGAAC-5' و در توالی برگشت (Reverse) از پرایمر 3'-TCACCGCGGAACACAAATTCAGTTCATTC-5' استفاده شد. به منظور سهولت کلون‌سازی و یا خارج ساختن ژن leoA از یک وکتور و کلون‌سازی مجدد آن در وکتورهای متفاوت دیگر، در انتهای 5- پرایمرهای طراحی شده، سایت برش آنزیمی در نظر گرفته شد. به طوری که جایگاه برش در توالی پرایمر رفت سایت GGTACC برای آنزیم KpnI و در توالی برگشت سایت آنزیمی CCGCGG برای آنزیم SacII قرار داده شد (نواحی که زیر آنها خط کشیده شده است). در فرادست هر یک از توالی‌های برش آنزیمی، تعداد سه نوکلئوتید به عنوان پایه قرار داده شد. سپس واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ μl، شامل ۲۰ μm محلول dNTP Mix، ۱ μm پرایمر رفت، ۱ μm پرایمر برگشت، ۲ μl نمونه DNA استخراج شده (۱۰۰ نانوگرم) و ۰/۲۵ μm آنزیم Taq DNA polymerase (یا یک واحد آنزیم Taq دقیق شامل ۰/۲۵ μm آنزیم DNA پلیمریز Taq در ۰/۷۵ μl آب مقطر) انجام گردید. در نهایت به منظور جلوگیری از تبخیر و آلودگی، یک قطره روغن معدنی استریل اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر حرارتی (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۲ چرخه شامل اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR، محصولات PCR به چاهک‌های ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند و با نور ماورای بنفش مشاهده شدند.

کلون‌سازی T/A: برای انجام کلون‌سازی T/A همان‌طور که در بخش معرفی وکتورها اشاره شد؛ از T-vector ساخت شرکت ترموفیشر استفاده شد. در این مرحله لازم است قطعه خالصی از ژن leoA تهیه و در وکتور pTZ درج گردد. وکتور pTZ در ابتدا به صورت خطی است و دارای یک نوکلئوتید T به صورت تک رشته در هر انتهای خود است و به همین علت T-vector نامیده می‌شود. از طرف دیگر، خاصیت بسیاری از آنزیم‌های DNA پلی‌مراز این است که در دو انتهای محصول PCR، یک نوکلئوتید A بدون الگو و به صورت تک‌رشته‌ای قرار می‌دهند. از آنجا که A مکمل T است؛

می‌توان محصولات PCR را در وکتور T به راحتی کلون کرد و به این سیستم، کلون‌سازی T/A گویند. محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن leoA روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و در مقابل نور UV، قطعه DNA مربوط به ژن leoA با آگارز همراه آن به کمک تیغ اسکالپل بریده شد. ژن leoA با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (ساخت شرکت Bioneer کشور کره جنوبی)، خالص‌سازی شد. واکنش اتصال (Ligation) بین محصولات PCR و وکتور pTZ مطابق دستور العمل کیت انجام شد. سپس محصول اتصال در باکتری اشریشیا کلی سویه TOP10F ترانسفورم و باکتری‌های یاد شده در محیط LB-Agar حاوی ۵۰ میکروگرم در هر میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت و گرمخانه‌گذاری شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (ساخت شرکت Bioneer کشور کره جنوبی)، استخراج پلاسمید صورت گرفت. بررسی صحت کلون‌سازی ژن و تشکیل ناقل نوترکیب pTZ-leoA به روش‌های PCR و هضم آنزیمی با دو آنزیم KpnI و SacII انجام شد.

کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی: در این مرحله برای ساخت سازواره نهایی، ژن leoA در وکتور بیانی pEGFP-C2 همسانه‌سازی شد. بدین منظور ژن leoA که در حامل pTZ کلون شده بود؛ وارد حامل pEGFP-C2 گردید و برای وارد کردن ژن leoA به حامل pEGFP-C2 از آنزیم‌های محدودالتر KpnI و SacII استفاده شد. یعنی ابتدا ناقل نوترکیب pTZ-leoA با دو آنزیم مورد اشاره بریده شد تا قطعه ژن leoA از آن خارج گردید. همچنین وکتور بیانی pEGFP-C2 با همین دو آنزیم بریده شد تا خطی شود و آماده پذیرش ژن leoA گردد. سپس همه محصولات هضم آنزیمی، روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و قطعه ژن leoA و وکتور pEGFP-C2 از روی ژل با کمک تیغ اسکالپل بریده شدند و با استفاده از کیت، تخلیص گردیدند. واکنش اتصال بین وکتور pEGFP-C2 و ژن leoA با استفاده از آنزیم T4-لیگاز (ساخت شرکت سیناژن ایران)، انجام شد و مراحل ترانسفورمیشن محصولات اتصال (مطابق روش گفته شده در بالا) در باکتری *E. coli* سویه TOP10F صورت پذیرفت. به منظور تایید صحت ساب‌کلونینگ و تشکیل سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA، ابتدا PCR انجام گرفت. هضم آنزیمی با آنزیم‌های KpnI و SacII نیز برای تایید صحت کلون‌سازی انجام شد و نتایج نهایی سازواره حاصل به روش تعیین توالی ارزیابی گردید.

انتقال سازواره نهایی pEGFP-C2-leoA به سلول‌های جانوری: به‌منظور بررسی بیان ژن leoA در سلول جانوری از سلول تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary: CHO) استفاده گردید و برای ترانس‌فورمیشن این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. در این مرحله از دستگاه الکتروپوریشن مدل

۲). همچنین تخلیص محصولات PCR از ژل و الکتروفورز مقدار اندکی از آن (۳ ماکرولیتر) روی ژل آگارز، نشان‌دهنده کیفیت مناسب این محصول برای کلون‌سازی بود.

کلون‌سازی T/A و ساب کلونینگ: کلون‌سازی محصول PCR به روش T/A cloning در وکتور pTZ، به منظور ایجاد همسانه‌ای از ژن *leoA* موجب تولید سازواره ژنی pTZ-*leoA* گردید. تست‌های تاییدی به کار رفته در مورد صحت همسانه‌سازی ژن *leoA* شامل PCR و هضم آنزیمی بود که واکنش PCR نشان داد؛ درصد زیادی از کلون‌های حاصل، واجد سازواره pTZ-*leoA* هستند. همچنین هضم آنزیمی دو گانه با آنزیم‌های *SacII* و *KpnI* بر روی پلاسمیدهای تخلیص شده، حضور قطعه ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن *leoA* در وکتور pTZ را نشان داد.

ساب کلونینگ ژن *leoA* در پلاسمید بیانی pEGFP-C2 منجر به تشکیل وکتور نوترکیب pEGFP-C2-*leoA* گردید. تایید صحت ساب کلونینگ به سه روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد. ابتدا با پرایمرهای اختصاصی ژن *leoA* روی وکتورهای نوترکیب pEGFP-C2-*leoA* واکنش PCR انجام شد و تشکیل باند ۱۷۵۸ جفت بازی در هر یک از نمونه‌های PCR شده؛ نشان‌دهنده صحت ساب کلونینگ بود. همچنین نتایج حاصل از هضم آنزیمی وکتور بیانی نوترکیب pEGFP-C2-*leoA* با دو آنزیم *KpnI* و *SacII* سبب تشکیل دو قطعه شد. یعنی پس از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز، یک قطعه به اندازه ۴۷۳۵ جفت باز مربوط به وکتور pEGFP-C2 و یک قطعه به اندازه ۱۷۵۸ جفت باز مربوط به ژن *leoA* مشاهده شد (شکل ۳). تعیین توالی سازواره نهایی pEGFP-C2-*leoA* نشان‌دهنده صحت کلون‌سازی ژن *leoA* در وکتور بیانی یوکاریوتی مورد نظر بود. به طوری که مقایسه توالی به دست آمده با توالی‌های موجود از این ژن در بانک ژن جهانی (NCBI) صحت توالی و عدم وجود هر گونه تغییر در توالی کلون شده را اثبات کرد.

الکتروپوریشن و بیان ژن: برای انتقال سازواره نهایی pEGFP-C2-*leoA* به سلول‌های CHO از روش الکتروپوریشن بهره گرفته شد. سپس سلول‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین کشت داده شدند. رشد سلول‌ها در محیط کشت حاوی نئومایسین نشان‌دهنده انتقال وکتور نهایی به این سلول‌های جانوری است. همچنین در محیط کشت سلول‌های گروه شاهد (فاقد وکتور pEGFP-C2-*leoA*) در حضور نئومایسین هیچ رشد و تکثیر سلولی مشاهده نشد. عصاره لایز سلولی حاصل از سلول‌های CHO ترانسفرم شده به منظور بررسی بیان ژن *leoA* مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده از الکتروفورز سوسپانسیون این سلول‌ها روی ژل SDS-PAGE و رنگ آمیزی آن با کوماسیلو نشان‌دهنده بیان موفق ژن *leoA* هلیکوباکتریلوری در سیستم

Gene Pulser Xcell (ساخت شرکت Bio Rad آمریکا) استفاده شد. تعداد 2×10^6 عدد سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر در کووت ۰/۴ و ویژه دستگاه الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۶۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از وکتور نوترکیب نهایی، به این سوسپانسیون سلولی اضافه شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده ۰/۱۷۴ کیلو ولت و ۴۰۰ میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. سپس سلول‌های الکتروپوریت شده در فلاسک کشت حاوی محیط RPMI به همراه ۱۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی) کشت داده شدند و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ درصد قرار داده شدند. سپس به هر یک از فلاسک‌های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین (ژن مقاومت و مارکر انتخابی وکتور یوکاریوتی) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری شدند. تمام مراحل فوق (الکتروپوریشن) برای سری دیگری از سلول‌های CHO که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند؛ نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول‌های گروه شاهد، هیچ DNA اضافه نگردید.

انجام SDS-PAGE: بیان پروتئین به روش SDS-PAGE انجام شد. سلول‌های CHO ترانسفرم شده و سلول‌های گروه شاهد به کمک پیتینگ به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شدند و رسوب گیری انجام گردید. سپس به رسوب سلولی حاصل PBS اضافه شد و رسوب در PBS حل گردید. در مرحله بعد سلول‌ها با استفاده از روش ذوب و انجماد کاملاً متلاشی شدند. سپس الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو (Coomassie Blue) انجام شد.

بیان ژن *leoA* در سلول‌های CHO به روش RT-PCR: به منظور بررسی بیان اختصاصی ژن *leoA* در سیستم یوکاریوتی، از سلول‌های CHO ترانسفرم شده با وکتور pEGFP-C2-*leoA* و سلول‌های گروه شاهد (فاقد وکتور نوترکیب) با استفاده از کیت (Qiagen, USA)، استخراج RNA انجام شد. کیفیت و غلظت RNA های تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه cDNA از کیت شرکت ترموسایننتیک ساخت آمریکا استفاده شد. واکنش PCR روی cDNA های حاصل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *leoA* هلیکوباکتریلوری انجام گردید.

یافته‌ها

تکثیر و جداسازی ژن *leoA* هلیکوباکتریلوری: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز نشان‌دهنده قطعه ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن *leoA* هلیکوباکتریلوری بود (شکل

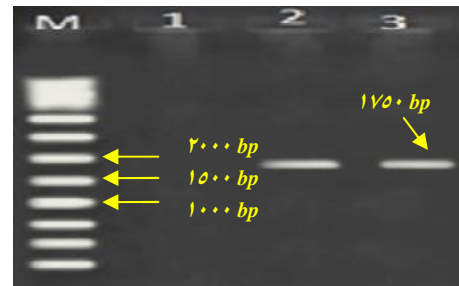
انجام PCR روی cDNA های حاصل از واکنش رونوشت‌برداری معکوس برای سلول‌های دریافت کننده وکتور نو ترکیب حامل ژن هدف، باند ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به ژن *leoA* تشکیل شد؛ اما همین آزمایش برای سلول‌های فاقد وکتور نو ترکیب، مثبت نبود. نتایج این آزمایش موید بیان موفق ژن *leoA* در سلول‌های CHO است.

بحث

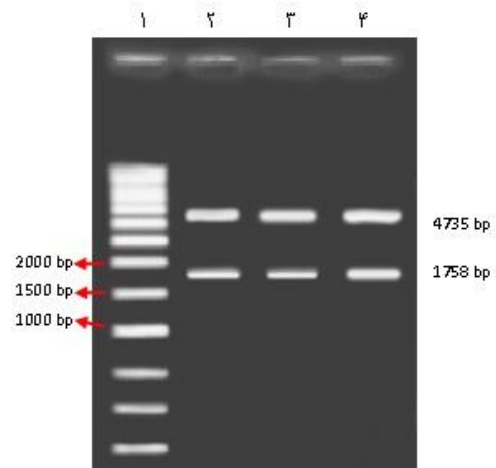
در این مطالعه ژن *leoA* به منظور ایجاد سازواره نو ترکیب با هدف ایجاد کاندیدای مناسب واکنش ژنی مورد استفاده قرار گرفت و از روش الکتروپوریشن برای ترانسفرم کردن سلول‌ها استفاده گردید. روش‌های انجام شده در راستای کسب نتایج مطلوب در این تحقیق، مطابق روش‌های به کار رفته توسط بسیاری از محققین است. در تحقیقات مختلف از روش‌های مختلفی برای انتقال ژن‌ها به سلول‌های بنیادی استفاده شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به لیپوفکشن، میکرواینجکشن، الکتروپوریشن و استفاده از وکتورهای ویروسی اشاره کرد که هر کدام واجد مزایا و معایب مربوط به خود هستند. روش انتقال غیر ویروسی، کم هزینه‌تر، آسان‌تر و نسبت به روش‌های ویروسی ایمن‌تر است (۱۲ و ۱۷).

ژن *leoA* ممکن است یکی از مهم‌ترین آنها برای بیماران مبتلا به زخم معده و گاستریت مزمن باشد؛ ولی پرسش‌های بی‌پاسخ بسیاری در مورد آن وجود دارد. در سال ۱۹۹۹ Michetti و همکاران واکنش‌ناسیون خوراکی با اوره آز نو ترکیب هلیکوباکتریلیوری در بزرگسالان آلوده به هلیکوباکتریلیوری را مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند واکنش‌ناسیون به علت سمیت LT باعث ایجاد اسهال می‌شود و با وجود کاهش قابل توجه در کلونی‌سازی در معده، سبب ریشه کن کردن و کاهش التهاب معده نمی‌شود (۱۸).

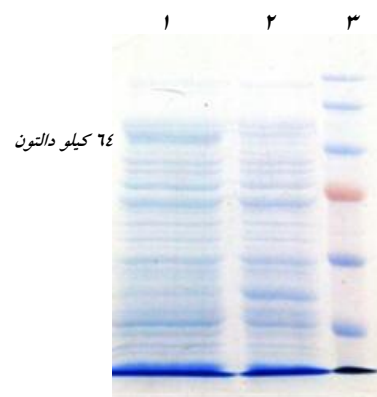
در مطالعه Sutton و همکاران کفایت واکنش HpaA نو ترکیب ارزیابی و ایمن‌سازی پروفیلاکتیک به کاهش کلونیزاسیون باکتری در موش‌های BALA/c و QS منجر شد (۱۹). در مطالعه Shi و همکاران ضمن معرفی اپی‌توپ‌های اصلی زیر واحد UreB به صورت U237-251، U546-561، و U229-244 نشان داده شد تلقیح زیرجلدی پپتیدهای مصنوعی حاوی این اپی‌توپ‌ها همراه ادجوانت فروند به موش موجب برانگیخته شدن پاسخ‌های CD4+ T علیه اوره آز باکتری می‌شود. آنها از پروتئین به صورت نو ترکیب استفاده کردند که در مقایسه با پپتیدهای مصنوعی کم هزینه‌تر و کاربردی‌تر است (۲۰). در مطالعه Malfertheiner و همکاران ایمنی‌زایی واکنش نو ترکیبی که شامل *vacA*، *cagA* و NAP با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم بود؛ در افراد سالم ارزیابی و نتیجه‌گیری شد این واکنش بسیار ایمن بوده و منجر به القای پاسخ‌های آنتی‌بادی و سلول‌های T می‌شود (۲۱). مطالعه حاجی‌خانی و همکاران روی



شکل ۲: تکثیر ژن *leoA* به روش PCR روی ژل آگارز یک درصد M: مارکر 1Kb ساخت شرکت ترموفیشر، ۱: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)، شماره‌های ۲ و ۳: باند ۱۷۵۸ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *leoA*



شکل ۳: هضم آنزیمی سازواره نهایی *pEGFP-C2-leoA* با دو آنزیم *KpnI* و *SacII* شماره ۱: مارکر 1Kb شرکت ترموفیشر، شماره‌های ۲ تا ۴: باند کوچک‌تر با اندازه ۱۷۵۸ جفت باز و باند بزرگ‌تر با اندازه ۴۷۳۵ جفت باز به ترتیب مربوط به ژن *leoA* و وکتور *pEGFP-C2*



شکل ۴: نتیجه بیان ژن *leoA* و تشکیل باند پلی‌پپتیدی ۶۴ کیلو دالتون

یوکاریوتی بود. محصول پروتئینی حاصل از ژن *leoA* به وزن ۶۴ کیلو دالتون با انجام SDS-PAGE در شکل ۴ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید بیان ژن *leoA* در سلول‌های CHO مثبت بود. به طوری که پس از

پروتئین فیوژن (ترتیب قرارگیری CVU) استفاده گردید. نتایج نشان داد واکنش مورد نظر به‌طور قابل توجهی کلونیزاسیون هلیکوباکتریلوری را در موش‌های آلوده به عفونت کاهش می‌دهد (۲۳). در مطالعه Gong و همکاران واکنش SS1 هلیکوباکتریلوری همراه با ادجوانت کیتوزان به کار برده شد و نتیجه گیری گردید که اثر حمایتی کیتوزان همانند اثر حمایتی سم ویا خوب و مؤثر بوده و کیتوزان می‌تواند به عنوان ادجوانت در کنار واکنش‌های ژنی علیه هلیکوباکتریلوری گسترش یابد (۲۴).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ژن *leoA* به‌طور موفقیت آمیزی در حامل pTZ کلون و نیز در حامل بیانی pEGFP-C2 ساب کلون شد. بررسی SDS-PAGE نشان داد که ژن *leoA* قادر به بیان پروتئینی ۶۴ کیلو دالتونی است. لذا به‌نظر می‌رسد که سازواره تولید شده در این مطالعه می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای واکنش ژنی علیه هلیکوباکتریلوری در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۲۸۴/د/۹۵) خانم نغمه میرابوالقاسمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بود. بدین وسیله از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، به‌خصوص آقایان محمد چهل‌گردی و حمیدرضا کبیری که ما را انجام این مطالعه یاری نمودند؛ صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایم.

References

1. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997 Aug; 388(6642): 539-47. doi: 10.1038/41483
2. Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EM, Zeitune JM. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: A review. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014 Mar; 7: 9-17. doi: 10.4137/CGast.S13760
3. Ruggiero P, Censini S. *Helicobacter pylori*: A brief history of a still lacking vaccine. *Diseases*. 2014; 2(2): 187-208. doi: 10.3390/diseases2020187
4. Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M. Genetic analysis of *cagA* and *vacA* Genes in *Helicobacter Pylori* isolates and their relationship with gastroduodenal diseases in the West of Iran. *Iran Red Crescent Med J*. 2013 May; 15(5): 371-75. doi: 10.5812/ircmj.3732
5. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett*. 2014 Apr; 345(2): 196-202. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.016
6. Rahimian G, Sanei MH, Shirzad H, Azadegan-Dehkordi F, Taghikhani A, Salimzadeh L, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori vacA* increase markedly gastric mucosal TGF-β1 mRNA expression in gastritis patients. *Microb Pathog*. 2014 Feb-Mar; 67-68: 1-7. doi: 10.1016/j.micpath. 2013.12.006
7. Doosti A, Rahimian G, Nassiri J, Yavari-Forushani P. [Prevalence of the *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains

ژن‌های کدکننده *ureB332* و *hpaA* انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از *HpaA* در واکنش‌های چندآنتی‌ژنی مانند *HpaA-UreB* در مقایسه با استفاده آن به تنهایی اثر بیشتری خواهد داشت. همچنین آزمون اوره‌آز سریع روی هر سه پروتئین نوترکیب *HpaA*، *UreB332* و ترکیب آنها انجام شد و نتیجه گیری شد *UreB332* ترکیب آن با *HpaA* واجد فعالیت اوره‌آزی است که علاوه بر تایید ارتباط فعالیت اوره‌آزی با زیر واحد B، تایید کننده وجود ساختارهای مناسب برای بروز فعالیت آنزیمی در پروتئین‌های نوترکیب تولید شده است (۱۱).

در مطالعه نجار پیرایه و همکاران کلون و بیان ژن *hpaA* هلیکوباکتریلوری در اشریشیا کلی ارزیابی شد. پس از ترانسفورماسیون، بیان پروتئین *HpaA* با غلظت‌های مختلف ایزوپروپیل تیوبتایدی گالاتوزید (IPTG) القا و با SDS-PAGE شناسایی گردید. ایمنی‌زایی پروتئین *rHpaA* با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال خرگوشی علیه آنتی‌ژن‌های کامل هلیکوباکتریلوری با آزمون وسترن بلاتینگ تعیین شد. نتایج نشان داد پروتئین نوترکیب *HpaA* ایمنی‌زایی قابل قبولی را از خود نشان می‌دهد و تولید پروتئین‌های اختصاصی نوترکیب نظیر *HpaA* استراتژی جایگزین و مناسبی برای ساخت واکنش هلیکوباکتریلوری است (۲۲). در مطالعه Liu و همکاران به‌منظور طراحی واکنش، سه ژن *ureB*، *vacA*، و *cagA* به‌عنوان آنتی‌ژن‌های کاندید در نظر گرفته شدند. به‌منظور تسهیل در بیان آنتی‌ژن‌ها، قطعه‌ای از هر آنتی‌ژن برای ساخت پروتئین فیوژن انتخاب شد و از پلاسمید زنده ضعیف شده *Salmonella typhimurium* برای بیان

- isolated from gastric biopsy specimens in Shahrekord]. *Armaghane Danesh*. 2007; 12(1): 29-38. [Article in Persian]
8. Michie KA, Boysen A, Low HH, Møller-Jensen J, Löwe J. *LeoA*, B and C from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are bacterial dynamins. *PLoS One*. 2014 Sep; 9(9): e107211. doi: 10.1371/journal.pone.0107211
9. Brown EA, Hardwidge PR. Biochemical characterization of the enterotoxigenic *Escherichia coli* *LeoA* protein. *Microbiology*. 2007 Nov; 153(Pt 11): 3776-84. doi: 10.1099/mic.0.2007/009084-0
10. Vaise Malekshahi Z, Hatf Salmanian A, Ebrahimzadeh W, Amiri Javid Sh. [The effect of DNA vaccine induced IgY against C-Urease in mice infected with *Helicobacter pylori*]. *Med J Tabriz Univ Med Sci*. 2012; 34(5): 79-86. [Article in Persian]
11. Hajikhani B, Najjar-Piraye S, Soliman-Jahi H, Zuhair MH. [Cloning, expression, purification and study of the antigenicity of *Helicobacter pylori UreB332-HpaA* protein]. *Modares Journal of Medical Sciences*. 2013; 13(2): 1-10. [Article in Persian]
12. Jalali Kondori B, Asadi MH, Azemati F. [Subcloning of NGF Gene into pSecTag2/Hygro Secretory Vector and Expression in PC12 Cell Line]. *Shefaye Khatam*. 2014; 3(1): 21-28. [Article in Persian]
13. Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C,

- Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 523-63. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.523
14. Every AL, Stent A, Moloney MB, Ng GZ, Skene CD, Edwards SJ, et al. Evaluation of superoxide dismutase from *Helicobacter pylori* as a protective vaccine antigen. *Vaccine.* 2011 Feb; 29(7): 1514-18. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.019
15. Doosti A, Ghasemi- Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (Stx2) genes. *Genetica.* 2015; 47(2): 499-507. doi: 10.1016/j.phrp.2015.08.004
16. Doosti A. [Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of *Clostridium botulinum* in *E. Coli*]. *Journal of Microbial World.* 2013; 5(3-4): 77-84. [Article in Persian]
17. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius NP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. *Neurobiol Dis.* 2005 Feb; 18(1): 184-92. doi:10.1016/j.nbd.2004.09.010
18. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, et al. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology.* 1999 Apr; 116(4): 804-12.
19. Sutton P, Doidge C, Pinczower G, Wilson J, Harbour S, Swierczak A, et al. Effectiveness of vaccination with recombinant HpaA from *Helicobacter pylori* is influenced by host genetic background. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Jul; 50(2): 213-9. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00206.x
20. 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 Mar; 25(14): 2583-90. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.024
21. Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, Kaufmann SH, Ulrichs T, Novicki D, et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology.* 2008 Sep; 135(3): 787-95. doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.054
22. Najar Peerayeh Sh, Atoofi J, Hoseinkhani S, Farshchian M. Cloning and expression of *Helicobacter pylori* HpaA Gene. *Yakhteh Medical Journal.* 2009; 11(3): 273-6.
23. Liu KY, Shi Y, Luo P, Yu S, Chen L, Zhao Z, et al. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. *Vaccine.* 2011 Sep; 29(38): 6679-85. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.099
24. Gong Y, Tao L, Wang F, Liu W, Jing L, Liu D, et al. Chitosan as an adjuvant for a *Helicobacter pylori* therapeutic vaccine. *Mol Med Rep.* 2015 Sep; 12(3): 4123-32. doi: 10.3892/mmr.2015.3950

Original Paper

Expression of *leoA* gene of *Helicobacter pylori* in CHO animal cells by RT-PCR method

Naghmeh Mirabolghasemi (M.Sc)¹, Abbas Doosti (Ph.D)^{*2}

¹M.Sc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. ²Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Helicobacter pylori* infection is one of the most common chronic bacterial infections all over the world, particularly in the developing countries. *LeoA* gene plays an important role in pathogenesis, and the main role of this gene is to increase the bacterial toxin secretion. This study was conducted to isolate and clone the *leoA* gene in a pEGFP-C2 expression vector and evaluate its expression in eukaryotic system.

Methods: In this laboratory study, the *leoA* gene was amplified from the standard strain of *Helicobacter pylori* genome (ATCC 43504) by PCR method. It was then inserted into the pTZ vector by cloning T/A. Sub cloning of this gene was performed in a pEGFP-C2 expression vector with a ligase enzyme. The final structure of pEGFP-C2-*leoA* was transformed by electroporation in CHO (Chinese hamster ovary) cells and the expression of the *leoA* gene was evaluated by SDS-PAGE and RT-PCR.

Results: The results of PCR indicated that the 1758 bp fragment was amplified from the *leoA* gene. Cloning of this gene was performed successfully in pTZ and pEGFP-C2 vectors, respectively. The enzyme digestion with two KpnI and SacII enzymes, as well as sequencing, confirmed the accuracy of gene cloning. The observation of the protein product of the *leoA* gene in CHO cells indicated the successful expression of the *LeoA* gene in the eukaryotic system of *Helicobacter pylori*.

Conclusion: The final construct of pEGFP-C2-*leoA* had a successful expression of the *leoA* gene in animal cells.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *LeoA* gene, Electroporation, Recombinant vaccine

* Corresponding Author: Doosti A (Ph.D), E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Received 15 Oct 2016

Revised 12 Feb 2017

Accepted 25 Feb 2017