Journal of Microbial World
Volume 15, No. 2, September 2022

Original Article

Cloning and expression of UreB-Omp18 recombinant protein in Iranian *H. pylori* strain

Hassan Seyyedhamzeh[1], Safar Farajnia[2], Mohammad Kargar[3], Behzad baradaran[4], Farshid Kafilzadeh[3]

[1]PhD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences ,Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [2]Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Daneshgah Ave, Tabriz, Iran. [3]Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [4]Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Helicobacter pylori (H. pylori)* infection is accepted of chronic gastritis. Among the diagnostic methods, serological tests are widely available and relatively sensitive to detect *H. pylori* infection. However, the low specificity limits its application. The present study was aimed for designing, cloning and expression of UreB - Omp18 protein from Iranian *H. pylori* strain as a promising diagnostic candidate with high specificity.

Materials & Methods: After extraction of genomic DNA from focal *Helicobacter pylori* strain, *ureB* and *omp18* genes were amplified by primers designed for these genes by PCR reaction and cloned into pET-22b expression vector after enzymatic cleavage. The expression of the resulting recombinant protein was induced by IPTG and purified with high purity by affinity chromatography. The antigenic properties of the purified recombinant protein were confirmed by Western blotting.

Results: In this study, two *ureB* and *omp18* gene fragments were amplified by PCR as 597 and 479 bp fragments, respectively, and cloned as a hybrid fragment in the pET-22b vector. The expression of the recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3) appeared as a fragment of about 60 kDa on SDS-PAGE and was purified by Ni-NTA column. Western blot results of purified chimeric antigen with sera of *H. pylori* infected patients showed the antigenic properties of the recombinant protein.

Conclusion: In the present study, for the first time, the recombinant UreB-Omp18 protein was produced from the native strain of *Helicobacter pylori*, which can be a suitable candidate for designing a *Helicobacter pylori* diagnostic kit in the region.

Key Word: *Helicobacter pylori*, ureB, omp18, pET-22b, Western blotting.

Received: 17 April 2022 Revised: 2 July 2022 Accepted: 24 July 2022

Correspondence to: Safar Farajnia
Tel: +98 9143018589
E-mail: S.Farajnia@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 15(2): 108-118
DOI:10.30495/jmw.2022.1934280.1988

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۱) تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۱۱۸-۱۰۹

Original Article

کلون‌سازی و بیان پروتین نوترکیب UreB-Omp18 در سویه‌ی ایرانی هلیکوباکتر پیلوری

حسن سیدحمزه[۱]، صفر فرج نیا[۲*]، محمد کارگر[۳]، فرشید کفیل‌زاده[۳]، بهزاد برادران[۴]

[۱]گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۲]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
[۳]استاد، گروه میکروبیولوزی، دانشکده زیست شناسی واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۴]مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری عامل عفونت‌های مزمن گوارشی شناخته شده است. درمیان روش‌های تشخیصی، تست سرولوژیک یک روش دردسترس با حساسیت قابل قبول است. اما اختصاصیت پایین، کاربرد آن را محدود می‌کند. هدف از این مطالعه طراحی، کلون‌سازی و بیان پروتین نوترکیب حاصل از دو ژن ureB و omp18 از سویه بومی ایرانی می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک الگو در طراحی کیت سرولوژیک با اختصاصیت بالا به منظور تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری به کار رود.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج DNA ژنومی هلیکوباکتر پیلوری، ژن‌های ureB و omp18 با واکنش PCR تکثیر شده و بعد از برش آنزیمی در وکتور بیانی pET-22b کلون گردید. بیان پروتین نوترکیب حاصله با کمک IPTG القا و با خلوص بالا با کروماتوگرافی میل-ترکیبی (Affinity Chromatography) تخلیص شد. خاصیت آنتی‌ژنی پروتین نوترکیب تخلیص شده با روش وسترن بلاتینگ تایید گردید.

یافته‌ها: دو قطعه‌ی ژنی ureB و omp18 به ترتیب با سایزهای ۵۹۷ و ۴۷۹ جفت باز توسط PCR تکثیر یافته و به شکل یک قطعه‌ی هیبرید در وکتور pET-22b کلون گردید. بیان پروتین نوترکیب حاصل در باکتری E. coli BL21(DE3) به شکل یک قطعه‌ی حدود ۶۰ کیلودالتونی در SDS-PAGE ظاهر گردیده و توسط ستون Ni-NTA تخلیص شد. نتایج وسترن بلات آنتی‌ژن کایمریک تخلیص شده با سرم بیماران مبتلا نشان دهنده ویژگی آنتی‌ژنی این پروتین نوترکیب بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار پروتین نوترکیب UreB- Omp18 از سویه بومی این باکتری تولید گردید که می‌تواند گزینه مناسبی برای طراحی کیت تشخیصی در منطقه باشد.

واژگان کلیدی: ureB, omp18, pET-22b وسترن بلات، هلیکوباکتر پیلوری.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱/۲۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۴/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۲

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی مارپیچی-خمیده و میکروائروفیل می‌باشد که در لایه‌های مخاطی و سطح آپیکال سلول‌های اپی‌تلیال معده انسان مستقر می‌شود (۱) و در معده‌ی حدود ۳۰ الی ۵۰ درصد افراد سالم وجود دارد (۲). این باکتری قادر است شکل خود را از مارپیچی به کوکوئیدی تغییر دهد و تصور بر این است که این قابلیت موجب تقویت بقاء باکتری در محیط معده میزبان می‌گردد. شکل مارپیچ *هلیوباکتر پیلوری*

*) آدرس برای مکاتبه: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران.
تلفن: ۰۹۱۴۳۰۱۸۵۸۹ پست الکترونیک: S.Farajnia@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

موجب می‌شود باکتری بتواند با موفقیت حرکت کند. در صورتی که شکل کوکوئیدی آن به تشکیل کلنی در لایه موکوسی اپی‌تلیوم معده کمک کرده و تهاجم باکتری را تسهیل می‌سازد. علاوه بر این، این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد که منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن شده و بدین ترتیب حذف باکتری و مبارزه با آن را با مشکل مواجه می‌کند (۳).

هلیکوباکتر پیلوری دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی می‌باشد که در بیماری‌زایی آن نقش دارند. از جمله می‌توان به پروتین‌های *Fla*B، *Fla*A، *Vac*A، *Cag*A، *Hsp*B، *Ure*B، *Ure*A و *Omp*18 اشاره کرد (٤). امروزه ارتباط قوی بین حضور این باکتری و ابتلا به بیماری‌هایی چون گاستریت، زخم پپتیک، سرطان معده، گاستریت آتروفیک، لنفوم بافت لنفاوی و لنفوم غیرهوچکینز ثابت شده است، برای مثال سرطان معده به عنوان سومین علت مرگ و میر در جهان سالانه باعث مرگ بیش از ۷۸٤,۰۰۰ نفر در جهان می‌شود (۵).

از جمله مهم‌ترین روش‌های تشخیص این باکتری، روش‌های سرولوژیکی است که به طور پیوسته برای غربالگری در مطالعات اپیدمیولوژیک نیز بکار می‌روند چرا که چنین آزمون‌هایی ارزان و سریع می‌باشند (٦و۷). دقت تست سرولوژیک تحت تأثیر شرایطی چون خون‌ریزی زخم، آتروفی معده و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها قرار نمی‌گیرد و همانند دیگر روش‌های تهاجمی و غیرتهاجمی باعث نتایج منفی کاذب نمی‌شود. دقت تست‌های سرولوژیک به آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در کیت‌های تجاری بستگی دارد (۸). از جمله آنتی‌ژن‌های مورد استفاده می‌توان به *Vac*A، *Cag*A، *Omp*18، *Ure*A، *Ure*B و *Gro*EL اشاره کرد.

اوره‌آز یکی از اصلی‌ترین فاکتورهای ویرولانس *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد که در متابولیسم، و تشکیل کلونی در موکوس معده نقش ایفاء می‌کند، همچنین به عنوان رایج‌ترین پروتینی است که به مقدار بسیار زیاد در باکتری تولید می‌شود. بنابراین می‌تواند به عنوان یک فاکتور تشخیصی عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به کار رود (۹). آنزیم اوره‌آز با وزن مولکولی ۵۵۰ کیلودالتون شامل دو پروتین ساختاری می‌باشد (۱۰). بر اساس شواهد موجود القای پاسخ ایمنی با درجه بالا این پروتین را کاندیدای مناسبی برای ساخت کیت سرولوژیک برای تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* می‌کند (۱۱). علاوه‌براین پروتین‌های غشای خارجی فعالیت‌های متعددی در این باکتری دارند. *هلیکوباکترپیلوری* ازطریق این پروتین‌ها به سلول‌های اپیتلیال معده می‌چسبد (۱۲). با وجود قابل دسترس بودن و حساسیت قابل قبول تست‌های سرولوژیک اما اختصاصیت تست‌های موجود بر اساس نوع آنتی‌ژن متفاوت است و این باعث محدود شدن کاربرد آن‌ها می‌شود (۱۳).

طالب خان وهمکارانش درسال ۲۰۱۱پروتین غشای خارجی *Omp*18 را در E.coli کلون، بیان وتخلیص کردند و نشان دادند این پروتین نشانگر خوبی درتشخیص سرولوژیک این عفونت بوده ولی از ویژگی پایینی برخوردار می‌باشد (۲٦). مطالعه دیگر راخلیل پور وهمکارانش در سال ۲۰۱٤ انجام دادند.آن‌ها پروتین کمکی *Ure*G را که در فعال شدن اوره‌آز نقش داشت. از ژنوم این باکتری جداکرده ودر *E.coli* کلون کردند. این ژن در *E.coli* بیان شد وپروتین حاصل تخلیص گردید.۸۳ درصد نمونه‌ها با این پروتین مثبت ارزیابی شدند (۲۷).

هدف از این مطالعه طراحی، کلون‌سازی و بیان یک پروئین نوترکیب حاصل از دو ژن *ure*B و *omp*18 می باشد که با استفاده از سویه بومی انجام شده و می‌تواند به عنوان یک الگو در طراحی کیت سرولوژیک با اختصاصیت بالا برای تشخیص عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به کار رود.

مواد و روش‌ها

الف) باکتری مورد استفاده: سویه ایرانی *هلیکوباکتر پیلوری* از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه و برای کلون کردن و بیان ژن‌های *omp*18 و *ure*B، از باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب سویه‌های DH5α و Bl21(DE3) استفاده شد.

ب) طراحی پرایمر برای کلون‌سازی ژن‌های ureB و omp18: بعد از استخراج توالی ژن‌های مربوطه از پایگاه داده NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov) طراحی پرایمر با

کمک نرم‌افزار Gene Runner صورت گرفته و محل جایگاه‌های برش روی پرایمرها پیش بینی گردید. اختصاصیت پرایمرها با کمک Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) تایید گردید (جدول ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های *ureB* و *omp18*.

ژن	توالی پرایمر	دمای annealing
omp18-F	GGATCCATGGATAATAAGACTGTGGCC	54 °c
omp18-R	AAGCTTCTTCATTAATTTGACATCCACTCTTCTG	57°c
ureB-F	CATATGATGTATGGCCCTACTACAGGCGA	59°c
ureB-R	GGATCCTTGATCGGCTAAGCTTGCATC	57°c

در طراحی پرایمر برای ژن *ureB*، جایگاه برش *Nde*I در پرایمر بالا دست و جایگاه برش *Bam*HI در پرایمر پایین دست قرار داده شد. در رابطه با ژن *omp18*،جایگاه برش *Bam*HI در بالادست و *Hin*dIII در پایین دست ژن تعریف گردید.

ج) *تکثیر قطعات به روش PCR وانجام کلونینگ:* برای تکثیر قطعات *ureB* و *omp18* واکنش PCR با کمک آنزیم Pfu انجام شد. با توجه به آن که این آنزیم خاصیت تصحیح اشتباه (Proofreading) دارد احتمال ایجاد خطا در طی واکنش PCR کاهش می‌یابد. غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR مطابق یک واکنش استاندارد تنظیم گردید: حجم واکنش ۲۵میکرولیتر محتوی بافر PCR با غلظت ۱X، کلرید منیزیوم ۲ میلی‌مولار، پرایمرها ۰/۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱ واحد آنزیم Pfu و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده و تا حجم ۲۵ میکرولیتر آب بود. برنامه چرخش دمایی شامل ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سلسیوس و سپس ۳۰ چرخه به صورت ۲۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه دمای ۵۶ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه و ٤٥ ثانیه دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در انتهای چرخه نیز ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار داده شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ مشخص شده است. محصولات PCR به وسیله ژل آگارز ۱ درصد و توسط رنگ‌آمیزی به روش safe stain، زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت. حامل کلونینگ مورد استفاده در این مطالعه pET-22b (ساخت شرکت نووژن) بود. برای ساخت حامل واجد ژن‌های *ureB* و *omp18*، ابتدا محصول pcr، *ureB* و پلاسمید pET-22b توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Nde*I (ساخت شرکت فرمنتاز) هضم آنزیمی شده و پس از تخلیص قطعات مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (ساخت شرکت کیاژن) از ژل استخراج شدند. عمل الحاق ژن *ureB* به وکتور با استفاده ازآنزیم T4 لیگاز (ساخت شرکت fermentas) انجام پذیرفت. بعد از انجام مرحله الحاق، ترانسفورماسیون در سویه DH5α انجام شد سپس روی کلنی‌های به‌دست آمده، برای غربالگری و تأیید وجود ژن *ureB* آزمایش کلنی PCR انجام پذیرفت. بعد از تأیید کلونینگ قطعه‌ی ژنی *ureB*، واکنش PCR و هضم آنزیمی برای ژن *omp18* نیز مشابه روش قبلی و با استفاده از آنزیم‌های *Bam*HI-*Hin*dIII انجام و واکنش الحاق بین ژن *omp18* با وکتور نوترکیب حاوی قطعه‌ی ژنی *ureB* صورت گرفت. دوباره عمل ترانسفورماسیون به باکتری DH5α انجام شد. سپس روی کلنی‌های به‌دست آمده، برای غربالگری و تأیید وجود ژن *Omp18* آزمایش کلنی PCR انجام پذیرفت. در انتهای این مرحله پس از استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *omp18* و *ureB* با کمک کیت تخلیص پلاسمید، درستی قطعه کلون شده با تعیین توالی تایید گردید (۲۹).

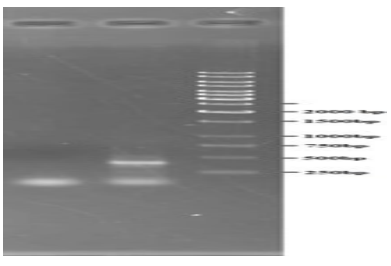
د) بیان و تخلیص پروتین نوترکیب حاوی ژن‌های *omp18 –ureB*: پس از تایید ژن‌های کلون شده *UreB* و *omp18* در پلاسمید pET-22b و ترانسفورم به باکتری DH5α، کشت در محیط LB انجام شده و بعد از برداشت کردن باکتری‌های نوترکیب و استخراج، پلاسمید به باکتری Bl21 (DE3) ترانسفورم گردید. سپس بیان پروتین نوترکیب با اضافه کردن IPTG در غلظت ۱ میلی‌مولار القا شد. برای این منظور باکتری نوترکیب در دمای ۳۷ درجه در محیط کشت LB در انکوباتور شیکردار کشت داده شد بعد از رسیدن OD (Optical density) به ۰/٦ ، محلول IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط اضافه شده و داخل انکوباتور شیکردار قرار داده شد بعد از رشد ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه، سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت

۱۰ دقیقه جمع‌آوری شده و پلت سلولی بعد از حل شدن در بافر سونیکاسیون بر روی یخ توسط سونیکیتور لایز شدند. در مرحله بعد سلول‌های لایزشده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. برای بررسی حضور پروتین از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکترفورز (SDS-PAGE) با ژل ۱۲ درصد و برای تخلیص پروتین از روش کروماتوگرافی Ni-NTA استفاده شد (۲۹).

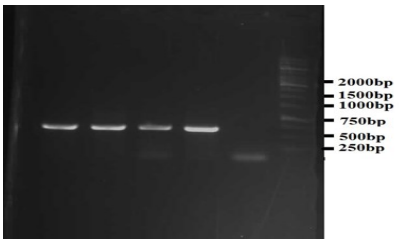
ه) تایید عملکرد پروتین تخلیص شده به روش وسترن بلات: در این مرحله بعد از راه‌اندازی نمونه‌های پروتین نوترکیب در ژل SDS-PAGE، نمونه‌های الکتروفورز شده با کمک بافر انتقال با روش Semi- Dry Western blotting از روی ژل به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. سپس بلاکینگ توسط شیر بدون چربی ۵ درصد انجام شد. مراحل وسترن بلات براساس برنامه متداول و با استفاده از سرم بیماران مبتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* انجام گرفت. نتایج برهم کنش و اتصال اختصاصی برای تایید خاصیت آنتی‌ژنی پروتین نوترکیب تولید شده توسط آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP با رقت ۱ به ۱۰۰۰ از این آنتی‌بادی بررسی گردید. در انتها محلول سوبسترای پراکسیداز حاوی دی‌آمینوبنزیدین(DAB)، برای پدیدار شدن رنگ به غشای حاوی پروتین اضافه و پس از ظهور رنگ با آب شسته شد.

یافته‌ها

الف) نتایج واکنش PCR و هضم آنزیمی: واکنش PCR با استفاده از پرایمر طراحی شده برای ژن‌های *ure*B و *omp*18 انجام شد. اندازه قطعات ژنی *ure*B، *omp*18 به ترتیب ۵۹۷ و ۴۷۹ جفت باز در ژل الکتروفورز تایید گردید (شکل ۱الف وب).



شکل ۱الف: تکثیر *omp*18 با استفاده از PCR با اندازه ژن ۴۷۹ جفت باز.

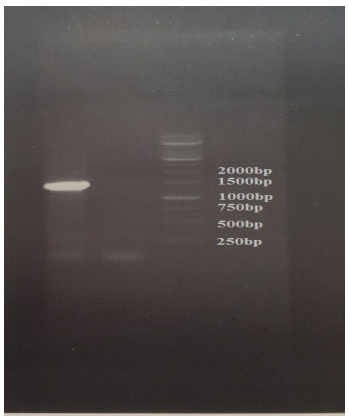


شکل ۱ب: تکثیر *ure*B با استفاده از PCR با اندازه ژن ۵۹۷ جفت باز.

به منظور اطمینان از عدم آلودگی با توالی‌های غیر اختصاصی، توالی تکثیر شده از ژل استخراج شده و توسط کیت استخراج از ژل تخلیص گردید.

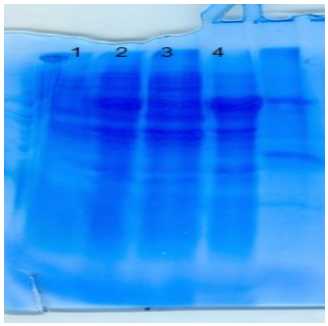
پس از آن محصولات PCR مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. محصول PCR ژن *ure*B توسط دو آنزیم *Bam*H1 و *Nde*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و محصول PCR ژن *omp*18 با دو آنزیم *Bam*HI و *Hin*dIII برش داده شدند.

ب) کلون و بیان ژن‌های ureB و omp18: عمل الحاق وکتور pET-22b با قطعات ژنی *ure*B و *omp*18 در دو مرحله صورت گرفت اول قطعه‌ی *ure*B روی وکتور برش یافته سوار شد و در مرحله‌ی بعد قطعه‌ی *omp*18 به مجموعه‌ی تشکیل شده اضافه گردید. اندازه ژن *ure*B، ۵۹۷ جفت باز، ژن *omp*18، ۴۷۹ جفت باز می‌باشد ولی در وکتور به دلیل داشتن سایت آنزیمی و بخش‌هایی از خود وکتور مانند توالی‌های کدکننده هیستیدین در مجموع ۱۱۶۰ جفت باز به دست آمد که با واکنش PCR تایید گردید (شکل ۲الف)، قطعات کلون شده با روش آنزیمی مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲).



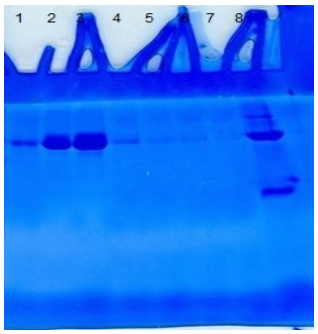
شکل ۲: نتایج PCR برای سازه *ureB-omp18*.اندازه سازه۱۱۶۰جفت باز.

ج) بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: بعد از ترانسفورم کردن وکتور نوترکیب حاصل به باکتری BL21-DE3 بیان پروتین نوترکیب با اضافه کردن ۱ میلی‌مولار IPTGالقا شد. پروتین نوترکیب حاصل در ژل SDS-PAGE باندی در محدوده ی ۶۰ کیلودالتون را نشان داد (شکل۳).



شکل ۳: بیان *ureB-omp18* *هلیکو باکتر پیلوری* در میزبان باکتریایی BL21 (DE3) و BL21(DE3)PlysS. ستون ۱: سویه Bl21قبل از القا، ستون ۲: سویه 18Bl21 ساعت بعد از القا، ستون۳ :BL21(DE3)PlysS قبل از القا. ستون ٤: BL21(DE3)Plys ۱۸ ساعت بعد از القا، ستون ۵: IgG به‌عنوان مارکر وزن مولکولی.

برای تخلیص پروتین نوترکیب تولید شده، از روش کروماتوگرافی میل-ترکیبی با رزین Ni-NTA با کمک His-tag انتهای آمینی پروتین صورت گرفت (۱٤و۱۵). نمایش نمونه‌ی تخلیص شده در ژل SDS-PAGE یک باند واضح در محدوده‌ی ۶۰ کیلودالتون را نشان داد (شکل٤).



شکل ٤: تخلیص پروتین نوترکیب UreB-Omp18، ستون‌های ۱-۷ elevations ۱-۷، ستون ۸ IgG مارکر وزن مولکولی.

د) تایید صحت آنتی‌ژن نوترکیب UreaB- Omp-18 با روش وسترن بلاتینگ: براساس نتایج وسترن بلات، خاصیت آنتی‌ژنی پروتین نوترکیب حاصل به وسیله‌ی برهم کنش اختصاصی با سرم بیماران مبتلا به *هلیکو باکتر پیلوری* به شکل یک باند واضح در محدوده ی ۶۰ کیلو دالتون تایید گردید (شکل۵).

شکل ۵: تایید واکنش پروتین نوترکیب UreB-Omp18.

بحث

از مهمترین راه‌های تشخیص غیرتهاجمی برای عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* می‌توان به روش سرولوژیک اشاره نمود که روشی در دسترس، کم هزینه و با حساسیت بالا اما اختصاصیت پایین است (۹و۱۳). دلیل تفاوت در نتایج روش‌های مختلف، هتروژن بودن سویه‌های مختلف این باکتری می‌باشد. برای رفع این مشکل، از ترکیبی از آنتی‌ژن‌های مهم باکتری برای تشخیص استفاده می‌شود. از طرف دیگر این کیت‌ها قادر به تشخیص بین عفونتی که به تازگی ایجاد شده و عفونتی که قبلاً در بدن وجود داشته است نمی‌باشند که تا حدودی به دلیل ماندگاری آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد (۱۶). از بین تست‌های سرولوژیک، ایمونواسی با استفاده از روش الایزا و با استفاده از چندین آنتی‌ژن، سال‌هاست که مورد استفاده قرار می‌گیرد اگرچه بسیاری از آن‌ها مقرون به صرفه نیستند (۱۷). همچنین نظر به تفاوت آنتی‌ژنی بین سویه‌های شایع در جوامع مختلف استفاده از سویه‌های بومی برای تهیه آنتی‌ژن ضروری می‌نماید. این مطالعه با هدف تهیه یک آنتی‌ژن نوترکیب از سویه‌های بومی برای تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* انجام گرفت تا در کنار حساسیت و اختصاصیت بالا، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشد (۱۸).

در مطالعه حاضر، دو آنتی‌ژن *Ure*B و *Omp*18 از باکتری

هلیکوباکتر پیلوری انتخاب شدند و یک پروتین نوترکیب با خلوص بالا از سویه بومی این *باکتری* تولید گردید.

بیان آنتی‌ژن *Ure*B در این باکتری ۱۰۰ درصد بود و بدین ترتیب این فاکتور را به عنوان آنتی‌ژن بسیار مناسبی در تهیه کیت تشخیصی با حساسیت بالا معرفی می‌کند (۱۹). این آنتی‌ژن قادر است پاسخ‌های ایمنی را در اغلب افراد مبتلا تحریک نماید (۲۰). قدرت بالای ایمنی‌زایی این فاکتور باعث شده است استفاده از آن در تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* مورد توجه محققین قرار گیرد (۱۸و۲۱).

آنتی‌ژن *Omp*18 یک آنتی‌ژن به خوبی حفاظت شده در باکتری می‌باشد و همولوژی بسیار اندکی با همتاهای خود در دیگر میکروارگانیسم‌ها دارد (۲۲). بنابراین وجود آن باعث افزایش اختصاصیت پروتین نوترکیب تولیدی به عنوان آنتی‌ژن برای استفاده در کیت تشخیصی می‌گردد. این پروتین را به همین دلیل به عنوان پروتینی مناسب برای تشخیص‌های سرولوژیکی معرفی می‌کنند (۲۲). در این مطالعه، آنتی ژنیسیتی دو آنتی‌ژن با ایجاد آنتی‌ژن نوترکیب *Ure*B-*Omp*18 با استفاده از ایمونوبلاتینگ بررسی گردید. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی‌های انجام شده از تلخیص و وسترن بلات، مشخص شد این پروتین نوترکیب توسط سرم بیماران مبتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* شناسایی گردیده و لذا می‌تواند به عنوان نامزدی مناسب برای به کارگیری در کیت‌های تجاری تشخیصی به کار برده شود. در مطالعات قبلی، از آنتی‌ژن‌های *Omp*18 و *Ure* B بصورت مجزا استفاده شده بود (۲۳و۲٤). اما ترکیبی از این دو آنتی‌ژن در طراحی کیت تشخیصی استفاده نشده است. از آنجا که تهیه پروتین‌های نوترکیب به تنهایی بسیار زمان بر و هزینه بردار می‌باشد، تهیه یک آنتی‌ژن نوترکیب چندگانه بسیار توجیه پذیر است. همچنین معمولاً اندازه فاکتورهای حدت باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* بسیار بزرگ است و همراه کردن آن‌ها با یکدیگر مشکل بوده و نتیجه مطلوب را نمی‌دهد. در نتیجه تهیه یک آنتی‌ژن نوترکیب کایمریک واجد نواحی ایمونوژنیک از آنتی‌ژن‌های هدف، با تکنیک مورد استفاده در این مطالعه، می‌تواند در مطالعات تشخیصی و همچنین تهیه واکسن بر علیه باکتری، بسیار مؤثر و راحت‌تر باشد (۱۹و۲۵).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان استفاده از آنتی‌ژن کایمریک تهیه شده از *Ure*B-*Omp*18 را به عنوان آنتی‌ژنی مؤثر و جدید در مطالعات سرولوژیک برای تشخیص عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* معرفی نمود. از سوی دیگر، پروتین نوترکیب تهیه شده می‌تواند برای تهیه واکسن در جلوگیری از بروز عفونت و ایجاد سرطان معده، مورد مطالعه قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر وقدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی و همکاری کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم تشکر می‌کنند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

Reference

1. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Hamada F, Yoshida T, Yokota K, et al. Seventeen-year effects of eradicating Helicobacter pylori on the prevention of gastric cancer in patients with peptic ulcer; a prospective cohort study. Journal of gastroenterology. 2015; 50(6), 638-644.
2. Li M, Oshima T, Horikawa T, Tozawa K, Tomita T, Fukui H, et al. Systematic review with meta-analysis: vonoprazan, a potent acid blocker, is superior to proton-pump inhibitors for eradication of clarithromycin-resistant strains of Helicobacter pylori. Helicobacter. 2018; 23 (4): e12495.
3. Baj J, Korona-Głowniak I, Forma A, Maani A, Sitarz E, Rahnama-Hezavah M, et al. Mechanisms of the Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumor Microenvironment in Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. Cells. 2020; 9(4):1055.
4. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomedical journal. 2016; 39(1): 14-23.
5. Ricci AD, Rizzo A, Brandi G. DNA damage response alterations in gastric cancer: Knocking down a new wall. Future Medicine; 2021.
6. Skrebinska S, Mégraud F, Bessède E. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2018; 23: e12515.
7. Paloheimo L, Tiusanen T, Suovaniemi O, SyrjÄnen K. Serological Biomarker Test (GastroPanel®) in the Diagnosis of Functional Gastric Disorders, Helicobacter pylori and Atrophic Gastritis in Patients Examined for Dyspeptic Symptoms. Anticancer Research. 2021; 41(2): 811-9.
8. Darma A, Nugroho BST, Yoanna V, Sulistyani I, Athiyyah AF, Ranuh RG, et al. Comparison of Helicobacter pylori stool antigen, salivary IgG, serum IgG, and serum IgM as diagnostic markers of H. pylori infection in children. Iranian journal of microbiology. 2019; 11(3): 206.
9. Graham DY, Miftahussurur M. Helicobacter pylori urease for diagnosis of Helicobacter pylori infection: A mini review. Journal of advanced research. 2018; 13:51-7.
10. Morihara F, Fujii R, Hifumi E, Nishizono A, Uda T. Effects of vaccination by a recombinant antigen ureB138 (a segment of the β-subunit of urease) against Helicobacter pylori infection. Journal of medical microbiology. 2007; 56(6): 847-53.
11. Khalilpour A, Santhanam A, Lee CW, Saadatnia G, Velusamy N, Osman S, et al. Antigenic proteins of Helicobacter pylori of potential diagnostic value. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013; 14(3): 1635-42.
12. Blaser N, Backert S, Pachathundikandi SK. Immune cell signaling by Helicobacter pylori: impact on gastric pathology. Helicobacter pylori in Human Diseases. 2019: 77-106.
13. Miftahussurur M, Yamaoka Y. Diagnostic methods of Helicobacter pylori infection for epidemiological studies: critical importance of indirect test validation. BioMed research international. 2016; 2016.

14. Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stiiber D, Henco K. 6xffis-ni-nta chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. Protocols for gene analysis. 1994: 371-87.

15. Khosroshahi SA, Farajnia S, Ghiamirad M, Tanomand A, Veisi K, Rahbarnia L, et al. Development and evaluation of a single domain antibody against human epidermal growth factor receptor (EGFR). Protein expression and purification. 2016; 120: 59-64.

16. Atkinson NS, Braden B. Helicobacter pylori infection: diagnostic strategies in primary diagnosis and after therapy. Digestive diseases and sciences. 2016; 61(1): 19-24.

17. Vakil N. The cost of diagnosing Helicobacter pylori infection. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2001; 15: 10-5.

18. Shafaie E, Saberi S, Esmaeili M, Karimi Z, Najafi S, Tashakoripoor M, et al. Multiplex serology of Helicobacter pylori antigens in detection of current infection and atrophic gastritis-A simple and cost-efficient method. Microbial pathogenesis. 2018; 119: 137-44.

19. Yan J, Mao Y-F, Shao Z-X. Frequencies of the expression of main protein antigens from Helicobacter pylori isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. World journal of gastroenterology: WJG. 2005; 11(3): 421.

20. Mony TJ, Kwon H-S, Won M-K, Kang Y-M, Lee S-H, Kim S-Y, et al. Anti-urease immunoglobulin (IgY) from egg yolk prevents Helicobacter pylori infection in a mouse model. Food and Agricultural Immunology. 2019; 30(1): 662-76.

21. Khalilpour A, Kazemzadeh-Narbat M, Tamayol A, Oklu R, Khademhosseini A. Biomarkers and diagnostic tools for detection of Helicobacter pylori. Applied microbiology and biotechnology. 2016; 100(11): 4723-34.

22. Voland P, Hafsi N, Zeitner M, Laforsch S, Wagner H, Prinz C. Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of Helicobacter pylori. Infection and Immunity. 2003; 71(7): 3837-43.

23. Talebkhan Y, Ebrahimzadeh F, Esmaeili M, Zamaninia L, Nahvijoo A, Khedmat H, et al. Helicobacter pylori Omp18 and its application in serologic screening of infection. Current microbiology. 2011; 62(1): 325-30.

24. Keikha M, Eslami M, Yousefi B, Ghasemian A, Karbalaei M. Potential antigen candidates for subunit vaccine development against Helicobacter pylori infection. Journal of cellular physiology. 2019; 234(12): 21460-70.

25. Raoufi E, Akrami H, Khansarinejad B, Abtahi H. Expression and antigenic evaluation of Helicobacter pylori UreB fragment. Jundishapur Journal of Microbiology. 2017;10(5).

26. Talebkhan Y, Ebrahimzadeh F, Esmaeili M, Zamaninia L, Nahvijoo A, Khedmat H, Fereidooni F, Mohagheghi MA, Mohammadi M .Helicobacter pylori Omp18 and its application in serologic screening of infection.Curr Microbiol. 2011 Jan;62(1):325-30. doi: 10.1007/s00284-010-9694.

27. 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 Nov 18;7:809. doi: 10.1186/1756-0500-7-809.PMID: 25406411

28. Sambrook J. FEF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory manual. 3 Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.