Journal of Microbial World
Volume 16, No. 1, June 2023

Original Article

Cloning and study of expression of *Helicobacter Pylori* flaB gene in eukaryotic system for vaccine design

Pouya Khodadadi[1], Mohammad Kargar[2], Mahdi Bijanzadeh[3], Abbas Doosti[4], Shapoor Aghaei[5]

[1]Phd student, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [2]Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [3]Assistant Professor,Department of Medical Genetic, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. [4]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [5]Associate Professor, Department of Internal Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Flagella and motility are important factors in bacterial colonization and pathogenicity. *flaB* is one of the important genes encoding the flagellar protein, which produces antibody against this gene play major role in immunogenesis. The aim of the present study was to make a *flaB* gene construct and to evaluate its expression in eukaryotic cells as a candidate for vaccine production.

Materials & Methods: *flaB* cloning and subcloning was done in pTZ57RT and pBudCE4.1 plasmids. Then the accuracy of the obtained clones confirmed by PCR, double enzyme digestion and sequencing. After transferring the confirmed gene construct to the animal cells, the gene expression was checked at the level of transcriptome and proteome by RT-PCR and SDS-PAGE methods.

Results: PCR results showed amplification of a1563 bp segment related to *flaB* gene. Desired gene cloning had confirmed by PCR, double enzyme digestion and sequencing. The observation of 1563 bp and 56 kDa bands from RT-PCR and SDS-PAGE indicates the successful expression of *flaB* in HDF cells.

Conclusion: The recombinant gene construct can express the FlaB protein in animal cells. Therefore, according to the results, this construct can be used as a candidate to produce an effective gene vaccine against *Helicobacter pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, cloning, RT-PCR, recombinant vaccine.

Received: 26 December 2022 Revised: 9 April 2023 Accepted: 15 May 2023

Correspondence to: Mohammad Kargar
Tel: +98 9173149203
E-mail: mkargar@jia.ac.ir
Journal of Microbial World 2023, 16(1): 18-28
DOI:10.30495/jmw.2023.1982542.2059

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 شانزدهم شماره اول (پیاپی ٥٤) بهار ١٤٠٢
صفحات ٢٨-١٨

Original Article

کلون سازی و بیان ژن flab هلیکوباکتر پیلوری در سیستم یوکاریوتی به منظور تهیه واکسن

پویا خدادادی[1]، محمد کارگر[2*]، مهدی بیژن زاده[3]، عباس دوستی[4]، شاپور آقایی[5]

[1]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، فارس، ایران. [2]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، فارس، ایران. [3]دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شا پور اهواز، اهواز، ایران. [4]دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران. [5]استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: داشتن فلاژل و تحرک از عوامل مهم در استقرار و بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. flaB، یکی از ژن‌های مهم کد کننده پروتین تاژکی است که آنتی‌بادی تولید شده علیه آن نقش عمده‌ای در ایمنی‌زایی ایفا می‌کند. هدف از این پژوهش، ساخت سازواره ژنی حامل ژن flab و بررسی بیان آن در سلول‌های یوکاریوتی به‌عنوان گزینه‌ای برای تولید واکسن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: کلون‌سازی و ساب کلونینگ ژن flab در پلاسمیدهای pTZ57RT و pBudCE4.1 انجام شد. سپس صحت کلون‌های به‌دست آمده با روش‌های PCR، هضم آنزیمی دوگانه و توالی‌یابی تایید شد. پس از انتقال سازواره تایید شده به سلول‌های HDF، بیان ژن در سطح ترانس کریپتوم و پروتئوم به دو روش RT-PCR و SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج PCR نشان دهنده تکثیر قطعه ١٥٦٣ جفت بازی مربوط به ژن flaB بود. کلون‌سازی ژن مورد نظر با استفاده از سه روش PCR، هضم آنزیمی دوگانه و توالی‌یابی تایید گردید. مشاهده باندهای ١٥٦٣ جفت بازی و ٥٦ کیلودالتونی حاصل از RT-PCR و SDS-PAGE نشان دهنده بیان موفق این سازواره در سلول‌های HDF بود.

نتیجه‌گیری: سازواره نوترکیب توانایی تولید پروتین FlaB را در سلول‌های جانوری دارد، بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده این سازواره می‌تواند به عنوان یک انتخاب به منظور تولید واکسن ژنی موثر علیه هلیکوباکتر پیلوری استفاده گردد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، کلون سازی، RT-PCR، واکسن نوترکیب.

دریافت مقاله: ١٤٠١/١٠/٥ ویرایش مقاله: ١٤٠٢/١/٢٠ پذیرش مقاله: ١٤٠٢/٢/٢٥

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، مارپیچی و میکروآئروفیل است. این باکتری فاکتورهای بیماری‌زایی متعددی دارد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها فلاژل یا تاژک می‌باشد که برای حرکت در سطح مخاط معده و کلونیزاسیون باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. در هر قطب باکتری ٤ تا ٧ تاژک دیده می‌شود (١و٢). *هلیکوباکتر پیلوری* می‌تواند طیف وسیعی از بیماری‌های گوارشی شامل گاستریت مزمن فعال، زخم دئودنوم، زخم معده، سرطان معده و لنفوم معده را ایجاد کند (٣). مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که سالانه ٧٠٠٠٠٠ مورد مرگ در اثر ابتلا به سرطان معده ناشی از این باکتری رخ می‌دهد (٣). بر اساس مطالعات انجام شده شیوع آن در ایران ٦٠-٩٠٪ گزارش شده است (٤). *هلیکوباکتر پیلوری* شایع‌ترین عاملی است که جوامع انسانی را آلوده کرده و

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
تلفن: ٠٩١٧٣١٤٩٢٠٣ پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

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.

می‌تواند از بدو تولد افراد را آلوده کند. آمار نشان می‌دهد که بیش از نیمی از مردم دنیا میزبان این باکتری هستند (۵). نتایج بررسی‌های متعدد در مورد شیوع عفونت با این باکتری در مناطق مختلف دنیا بیانگر اختلاف در میزان شیوع بوده است. به طوری که در کشورهای در حال توسعه، آلودگی با این باکتری بطور چشمگیری بیشتر از کشورهای توسعه یافته گزارش شده است (٦). این آمار در کشورهای توسعه یافته، ۲۰ درصد جمعیت بالغ است و در کشورهای در حال توسعه میزان آلودگی بسیار بالاتر بوده و به ٤٠ تا ۸۰ درصد و گاه حتی به ۱۰۰ درصد جمعیت بالغ می‌رسد (۷).

از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی *هلیکوباکتر پیلوری* می‌توان به عواملی مانند تاژک، اوره‌آز، سیتوتوکسین واکوئل‌زا و جزیره پاتوژنسیته ***cag*** و چسبنده‌ها اشاره کرد (۸). مطالعات گسترده‌ای در مورد تاژک این باکتری انجام شده که نشان می‌دهد این اندامک در استقرار و کلونیزاسیون در مخاط معده نقش کلیدی ایفا می‌کند و عامل ایجاد عفونت پایدار در میزبان است (۹و۱۰و۱۱). بیش از ۵۰ پروتین در بیان و سنتز زیر واحدهای تاژک نقش دارند که از این میان حداقل ۲۰ پروتین تشکیل دهنده اجزای ساختاری پایه، قلاب و رشته تاژک هستند (۱۲). ساختار رشته تاژک از دو نوع فلاژلین تشکیل شده است پروتین فراوان‌تر FlaA است که در سراسر رشته پراکنده است و پروتین بزرگتر FlaB که تراکم آن نزدیک به مبدأ بیشتر است (۱۳). به دلیل بالا بودن ویژگی آنتی‌ژنی پروتین‌های تاژک، این اندامک می‌تواند به عنوان هدف مناسب تشخیصی و تهیه واکسن موثر علیه *هلیکوباکتر پیلوری* به کار رود (۱۲). فلاژلین به عنوان یکی از اهداف مهم سیستم ایمنی مطرح می‌باشد که بعد از واکنش میان باکتری و میزبان، با ترشح کموکاین‌ها منجر به فعال شدن ایمنی ذاتی و به دنبال آن ایمنی اکتسابی می‌گردد (۱۲).

مانند دیگر باکتری‌های بیماری‌زا به دلیل استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها و تغییرات آنتی‌ژنی *هلیکوباکتر پیلوری*، امروزه شاهد افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها هستیم. تغییرات آنتی‌ژنی در این باکتری و مقاومت به درمان، بروز عفونت مجدد، عدم تاثیر بر شکل‌های غیر فعال و هزینه بالای درمان باعث عدم ریشه کنی کامل این باکتری در مخاط معده می‌گردد. تداوم استقرار باکتری در معده افراد آلوده می‌تواند منجر به انواع بیماری‌های گوارشی و در موارد حاد منجر به آدنوکارسینوما گردد (١٤). به همین دلیل دست‌یابی به واکسن موثر برای جلوگیری از عفونت ضروری به نظر می‌رسد. گروهی از واکسن‌ها که امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند واکسن‌های ژنی بر پایه فاکتورهای بیماری‌زای باکتری‌ها می‌باشند. این نوع از واکسن‌ها به روش مهندسی ژنتیک تولید و پس از تزریق به موجود زنده، باعث ایجاد واکنش‌های ایمنی می‌شوند. این نسل از واکسن‌ها که واکسن‌های نسل سوم هستند، توانایی ایمنی‌زایی در برابر بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های مختلف مانند باکتری و ویروس و تومورهای با منشاء ژنتیکی را دارند (۱۵). همچنین در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله DNA سبب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی شده است. در تهیه این واکسن‌ها از یک یا دو پروتین ویروس استفاده می‌شود به همین دلیل از تحریک غیر ضروری سیستم ایمنی توسط سایر پروتین‌های پیکره میکروبی جلوگیری می‌شود. سایر مزایای واکسن‌های ژنی شامل مهندسی ساده‌تر، خالص بودن محصول، ذخیره‌سازی و نگه‌داری آسان آن‌ها می‌باشد (١٦و١٧).

با توجه به مشکلات ناشی از درمان‌های حاضر و با توجه به مزایای واکسن‌های نوترکیب، این مطالعه با هدف طراحی، ساخت و بررسی بیان سازواره ژنی ***flaB*** *هلیکوباکتر پیلوری* در سلول‌های یوکاریوتی، HDF (Human Dermal Fibroblast) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از بیوپسی معده بیماران مبتلا به سرطان معده و آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* برای جداسازی ژن مورد مطالعه استفاده شد. از باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP10F برای کلون‌سازی و تکثیر ژن‌های نوترکیب و همچنین از سلول

HDF به منظور بررسی بیان ژن *flaB* در سلول جانوری، استفاده شد. این سلول‌ها و سویه *E. coli* از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اهواز دریافت شد. به منظور همسانه‌سازی محصولات PCR به روش کلون‌سازی T/A، از کیت Thermo Fisher Scientific ساخت کشور آمریکا حاوی پلاسمید pTZ57R/T بهره گرفته شد. نشانگر انتخابی این وکتور ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. برای بیان ژن *flaB* لازم است این ژن از درون وکتور نوترکیب pTZ-*flaB* خارج و در یک وکتور بیانی یوکاریوتی درج شود. به این منظور از وکتور بیان شونده یوکاریوتی pBudCE4.1 (Invitrogen، آمریکا) استفاده شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به زئوسین برای انتخاب سلول‌های باکتریایی و جانوری ترانسفرم و ترانسفکت شده، از دیگر ویژگی‌های این حامل که دارای اندازه ٤٥٩٥ جفت باز می‌باشد، است (۲۱).

الف) استخراج DNA و تکثیر ژن flaB: به منظور استخراج DNA ژنومی *هلیکوباکتر پیلوری* از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) استفاده شد. توالی ژن *flaB* برای طراحی پرایمر از بانک ژن جهانی NCBI گرفته شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق که برای تکثیر و جداسازی ژن *flaB* مورد نیاز هستند، با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند. پرایمر رفت دارای توالی F: 5'- TAGTTCAGCAGGCACAGGG-3' و پرایمر برگشت دارای توالی F: 5'- AAACCACATTGATACTCTTAGC -3' بود. به منظور سهولت در کلون‌سازی و یا خارج ساختن ژن *flaB* از یک وکتور و کلون سازی مجدد آن در وکتورهای متفاوت دیگر، در انتهای ´۵ هر یک از پرایمرهای طراحی شده، سایت برش آنزیمی در نظر گرفته شد به طوری که جایگاه برش در توالی پرایمر رفت برای آنزیم *Sal*I و در توالی پرایمر برگشت برای آنزیم *Xba*I قرار داده شدند (شرکت سیناژن، ایران) (۲۱).

تکثیر ژن *flaB* با روش PCR انجام شد. برای این کار ابتدا میکس ساخته شد که حاوی مقدار ۱۲۵میکرولیتر از بافر PCRبا غلظت x ۱۰ به همراه ۵۰ میکرولیتر MgCl2 با غلظت ۵۰ میلی مولار و ۲۵ میکرولیتر Dntp با غلظت ۱۰ میلی‌مولار مخلوط شدند و با ۸۰۰ میکرولیتر آب تزریق به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. به طوری که به ازای هر میکروتیوپ واکنش، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط ذکر شده، از پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار و همچنین ۱ میکرولیتر آنزیم DNA پلی‌مراز Taq رقیق در یک میکروتیوپ، مخلوط شدند. در آخر ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA *هلیکوباکتر پیلوری* به مخلوط واکنش اضافه شد. برای جلوگیری از تبخیر، یک قطره (۲۰ میکرولیتر) روغن معدنی استریل به میکروتیوب‌ها اضافه شد. برنامه دمایی PCR در سه مرحله انجام شد. مرحله اول شامل حرارت اولیه در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه)، مرحله دوم متشکل از ۳۰ چرخه سه قسمتی بود. قسمت اول جهت دناتوره کردن (۹٤ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (٦۲ درجه سلسیوس به مدت ٤٥ ثانیه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در حرارت ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. بررسی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ‌آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه Uvdoc صورت پذیرفت (۲۱).

ب) کلون‌سازی T/A: برای کلون‌سازی ژن *flaB* در پلاسمید pTZ ابتدا محصول PCR به همراه کمترین مقدار ممکن از آگارز همراه آن، با تیغ اسکالپل از روی ژل بریده و سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، خالص‌سازی گردید. محصول PCR تخلیص شده، با استفاده از کیت کلون سازی T/A (ساخت شرکت ThermoFisher، آمریکا)، بر اساس دستور کار کیت، کلون شدند. سپس محصول اتصال ژن *flaB* و پلاسمید pTZ به باکتری‌های *E. coli* سویه TOP10F که به روش شیمیایی با استفاده از کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) مستعد شده بودند،

ترانسفورم شد. جهت تمایز سلول‌ها، باکتری‌های ترانسفرم شده روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت و در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، به منظور حفظ و تکثیر باکتری‌های ترانسفرم شده، تعدادی از کلنی‌ها به صورت تصادفی انتخاب و از آن‌ها روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ماتریکس تهیه شد. از بین ماتریکس‌های رشد یافته، تعدادی به صورت تصادفی انتخاب و در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط LB-Broth همراه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند. از باکتری‌های رشد یافته در این مرحله، با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، تخلیص پلاسمید صورت گرفت و تأیید اولیه کلون‌سازی ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *flaB* و انجام PCR، همچنین هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Sal*I و *Xba*I انجام شد(۲۱). سازواره pTZ-*flaB* حاصل در این مرحله جهت تأیید نهایی، توسط شرکت Generay کشور چین تعیین توالی گردید.

ج) کلون‌سازی ژن در وکتور بیانی: پلاسمید نوترکیب pTZ-*flaB* که در مرحله قبل تخلیص و تأیید شده بود، با استفاده آنزیم‌های برش‌دهنده *Sal* I و *Xba*I بریده و ژن *flaB* از وکتور جدا گردید. از طرف دیگر، وکتور بیانی pBud نیز توسط آنزیم‌های ذکر شده برش داده شد تا آماده پذیرش ژن *flaB* گردد. محصولات هضم آنزیمی مذکور روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. قطعات وکتور pBudCE4.1 خطی شده و ژن *flaB* از روی ژل بریده و به صورت جداگانه در دو میکروتیوب قرار داده شدند. تخلیص DNA از ژل با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، برای وکتور بیانی و ژن *flaB* انجام شد. به منظور ایجاد اتصال بین ژن *flaB* و حامل pBud خالص شده از ژل، از آنزیم T4 لیگاز استفاده شد. واکنش‌گرهای مرحله اتصال، ۳ میکرولیتر از حامل pBud، ۹ میکرولیتر از ژن *flaB*، ۲ میکرولیتر از بافر (۱۰X) لیگاز و ۱ میکرولیتر از آنزیم T4 لیگاز (۱واحد) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با افزودن آب مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. سپس مراحل ترانسفورم کردن در باکتری *E.coli* و کشت بر روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین، مطابق مرحله T/A انجام شد. تأیید درستی سازواره نهایی *flaB*– pBudCE4.1 با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و نهایتا تعیین توالی بررسی شد.

د) انتقال سازواره نهایی pBudCE4.1 –flaB به سلول‌های جانوری: در این تحقیق به منظور بررسی بیان ژن *flaB* در سلول جانوری، از سلول HDF استفاده و برای انتقال سازواره به این سلول‌ها از دستگاه الکتروپوریشن مدل Gene Pulser Xcell (شرکت Bio-Rad آمریکا) بهره گرفته شد.

به منظور انجام الکتروپوریشن سلول‌های HDF، تعداد ۲×۱۰^{۷} شمارش و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کووت مخصوص الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۹۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از سازواره نهایی *flaB*– pBudCE4.1، به سلول‌های درون کووت در شرایط استریل اضافه شد و کووت به مدت ۵ دقیقه روی یخ و پس از خشک و تمیز نمودن دیواره های بیرونی کووت، در دستگاه الکتروپوریشن قرار داده شد. پالس الکتریکی در شرایط ۰/۱۷۴ کیلو ولت و ۴۰۰ میکروفاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌ها بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس سلول‌های الکتروپوریت شده در فلاسک کشت حاوی محیط RPMI به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و در نهایت به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد CO2 قرار داده شدند.

سپس به هر فلاسک کشت مقدار ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین (مارکر انتخابی برای سلول‌های ترانسفرم شده با وکتور نوترکیب) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری گردیدند. تمام مراحل بالا (الکتروپوریشن) برای گروه دیگری از سلول‌ها که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شده بودند نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول‌های HDF شاهد، هیچ‌گونه DNA خارجی اضافه نگردید.

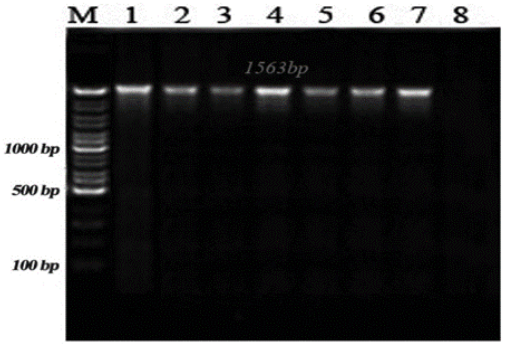
ه) بررسی بیان ژن در سطح ترانس کریپتوم (RNA) و پروتئوم (پروتین): ۱) RT-PCR: برای بررسی بیان اختصاصی ژن هدف

در سلول‌های HDF، استخراج RNA از این دو دسته سلول (ترانسفورم شده با سازواره و شاهد) با استفاده از کیت (شرکت Qiagen, آمریکا) انجام شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت (شرکت Japan, Takara) بر اساس دستورالعمل کیت تهیه شد. تست PCR با استفاده از پرایمرهای مخصوص ژن *flaB-F* و *flaB-R* بر روی cDNA تهیه شده به منظور شناسایی ژن هدف، با برنامه و میزان مواد مورد استفاده در مراحل قبل انجام و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد (۲۱).

۲) SDS-PAGE: الکتروفورز ژل پلی آکریلامید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) تکنیکی برای جداسازی پروتین‌ها براساس توانایی حرکت‌شان در یک جریان الکتریکی براساس طول زنجیره پلی پپتیدی یا وزن مولکولی شان می‌باشد. در این روش با استفاده از دترجنت سدیم دودسیل سولفات ساختار دوم و سوم پروتین از بین می‌رود و پروتین‌ها به صورت زنجیره‌های پروتینی در می‌آیند، این روش شامل دو ژل Resolving و Stacking می‌باشد. ژل Stacking به قرارگیری پروتین‌ها درون چاهک‌ها کمک می‌کند و ژل Resolving که درصد اکریل آمید آن با ژل Stacking متفاوت می‌باشد، جداسازی پروتین‌ها براساس وزن مولکولی‌شان را به عهده دارد. سلول‌های HDF به روش ذوب و انجماد متناوب (freeze and thaw) متلاشی و سوسپانسیون حاصل از عصارهٔ سلولی با استفاده از سرنگ هامیلتون به چاهک‌های روی ژل وارد شدند. در یکی از چاهک‌ها مقدار ۵ میکرولیتر نشانگر پروتین ریخته و الکتروفورز با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت صورت گرفت. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص شدن پروتین‌های الکتروفورز شده، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو انجام شد (۲۱).

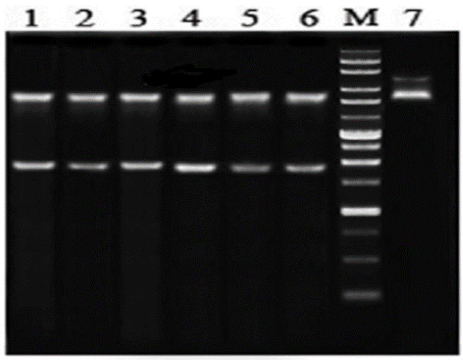
یافته‌ها

الف) تکثیر و جداسازی ژن flaB: استخراج DNA از باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* با موفقیت انجام و بررسی غلظت با استفاده از نانو دراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد که غلظت ۱۹۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر و باند به‌دست آمده نشان دهنده کیفیت مناسب DNA برای انجام PCR بود. انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *flaB*، منجر به تشکیل باند ۱۵۶۳ جفت بازی مربوط به این محصول شد (شکل ۱).



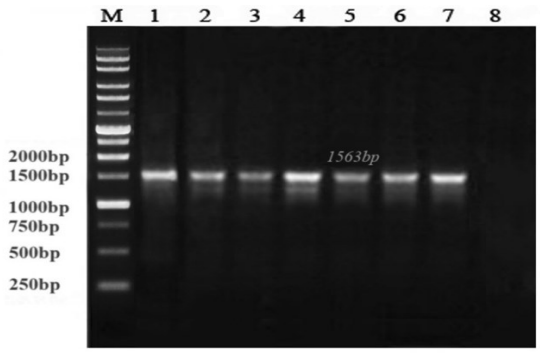
شکل ۱: تکثیر ژن *flaB* به روش PCR.ردیف M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۷-۱ تکثیر قطعه ژنی *flaB* (۱۵۶۳bp) و ردیف ۸ کنترل منفی.

ب) کلون سازی T/A و ساب کلونینگ: محصول PCR ژن *flaB* ابتدا در وکتور pTZ با استفاده از تکنیک T/A کلون و سپس در وکتور بیانی pBudCE4.1 ساب کلون گردید. نتایج انجام PCR روی پلاسمیدها نشان داد که اغلب آن‌ها حاوی ژن *flaB* *هلیکوباکتر پیلوری* بودند. همچنین یافته‌های به‌دست آمده از تست‌های تأییدی نظیر هضم آنزیمی و تعیین توالی نیز درستی کلون سازی ژن *flaB* در پلاسمید pTZ و تشکیل وکتور نوترکیب pTZ-*flaB* را تایید کردند. نتایج درج ژن *flaB* در وکتور بیانی با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی و تشکیل سازواره نهایی pBudCE4.1-*flaB* تایید شد. هضم آنزیمی این سازواره با دو آنزیم *Xba*I و *Sal*I و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز موجب تشکیل دو باند ۴۵۹۵ و ۱۵۶۳ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور pBudCE4.1 و ژن *flaB* گردید (شکل ۲). نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *flaB* کلون شده در سازواره نهایی در پایگاه بانک ژن جهانی BLAST و نتایج به‌دست آمده نشان داد که هیچ‌گونه جهش یا تغییر نوکلئوتیدی در توالی این ژن به‌وجود نیامده و درستی توالی آن تأیید شد.

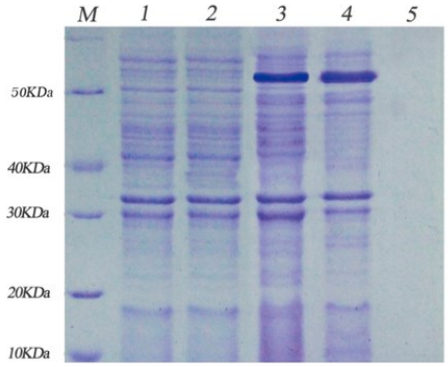


شکل ۲: هضم دوگانه آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBudCE4.1-*flaB* با آنزیم‌های *Xba*I و *Sal*I. M: مارکر DNA، ۱ و ٦ : قطعه vector pBudCE4.1 (4595bp) + *flaB* fragment (1563 bp)، 7:وکتور نوترکیب pBudCE4.1-*flaB* برش نیافته.

ج)الکتروپوریشن و بررسی بیان ژن در سطح ترانس کریپتوم (RNA) و پروتئوم: پس از الکتروپوریشن سازواره نهایی pBudCE4.1-*flaB* در سلول‌های HDF، کشت وتأیید آن‌ها، به منظور بررسی بیان ژن *flab* در این سلول جانوری، با RT-PCR و SDS-PAGE انجام شد. نتایج نشان داد سلول‌ها در مراحل کشت در حضور زئوسین نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند که تایید کننده دریافت پلاسمید نوترکیب pBudCE4.1-*flaB* بود. نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید بیان ژن *flaB* *هلیکوباکتر پیلوری* در سلول‌های یوکاریوتی مثبت بود به طوری که پس از انجام PCR بر روی cDNA سنتز شده، باند ۱۵٦۳ جفت بازی به‌دست آمد، اما نتایج حاصل از سلول‌های فاقد pBudCE4.1-*flaB* (کنترل منفی) فاقد باند مورد نظر بود. این نتایج نشان دهنده نسخه برداری موفق ژن *flaB* در سلول‌های HDF می‌باشد (شکل ۳). همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز عصاره این سلول‌ها روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آن با کوماسی بلو، باند ٥٦ کیلودالتونی مربوط به بیان ژن *flaB* درسلول‌های ترانسفرم شده را نشان داد (شکل ٤)، نتایج حاصل از RT-PCR و SDS-PAGE موید این موضوع می‌باشد که فرآیند بیان سازواره pBudCE4.1-*flaB* در سلول‌های HDF با موفقیت انجام شده است.



شکل ۳: واکنش کلنی RT-PCR به منظور تایید نسخه‌برداری ژن *flaB* در سلول‌های انسانی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *flaB*. M : مارکر DNA ۱کیلو بازی، ۱-۷: قطعه ۱٥٦۳ جفت بازی تکثیر یافته از cDNA ژن *flaB* در سلول‌های HDF و ۸: کنترل منفی.



شکل ٤: SDS-PAGE سلول‌های HDF ترانسفکت شده با سازواره: M مارکر، ۲و۱: سلول فاقد سازواره، ردیف ٤ و۳ باندهای مربوط به بیان پروتین‌های *FlaB*(56KDa)، ردیف ٥: کنترل منفی.

بحث

از جمله آنتی‌ژن‌های مهم *هلیکوباکتر پیلوری* آنتی‌ژن‌های تاژکی هستند. تعداد تاژک 5 تا 7 عدد در هر باکتری و عامل تحرک و کلونیزاسیون در بافت و مخاط معده می‌باشد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه زیر واحدهای FlaB و FlaA سازنده تاژک از سرم اغلب بیماران آلوده جداسازی شده است (۱۸و۱۹). به دنبال شیوع وسیع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری، امروزه درمان‌های چند دارویی اغلب با شکست مواجه می‌شوند. محققان از اوایل دهه 1990 میلادی، تلاش‌های زیادی برای یافتن واکسن علیه *هلیکوباکتر پیلوری* انجام داده‌اند. اگرچه هنوز موفق به تولید یک واکسن موثر در پیشگیری از آلودگی با این باکتری نشده‌اند اما در دهه‌های اخیر توجه بیشتری به

سازواره های مهندسی شده بر پایه ژن‌های بیماری‌زا *هلیکوباکتر پیلوری* شده است(۲۰). تحقیقات نشان داده است واکسن‌های نوکلئیک اسید توانایی تحریک ایمنی سلولی و هومورال را دارند و همچنین می‌توانند از ابتلا به عفونت‌های بعدی توسط باکتری جلوگیری کنند (۱۷). در این تحقیق ژن *flaB* با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و با موفقیت در وکتور pTZ کلون شد. سپس ساب کلونینگ در وکتور یوکاریوتی pBudCE4.1 انجام شد و نتایج کلون‌سازی با روش‌های PCR، هضم آنزیمی وتوالی‌یابی مورد تائید قرار گرفت.

گروهی از محققان پس از تخلیص DNA از سویه استاندارد *هلیکوباکتر پیلوری* قطعه ژنی *flaA* را به روش PCR تکثیر و جداسازی کردند. قطعات ژنی حاصل در سیستم کلون سازی T/A بر پایه وکتور pTZ کلون‌سازی و سپس در باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP10F تکثیر شدند. ساب کلونینگ در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(-) انجام شد. صحت مراحل انجام شده با روش تعیین‌توالی و هضم آنزیمی مورد تائید قرار گرفت. در نهایت بیان ژن در سلول‌های مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب محققین یاد شده با توجه به بیان موفق سازواره حاصل در سلول‌های یوکاریوتی pcDNA3.1(-)-*flaA* نشان دادند که می‌تواند این سازواره می‌تواند انتخاب مناسبی برای تهیه واکسن ژنی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* باشد (۱۸). در مطالعه دیگری ژن *flaA* برای تهیه سازواره مهندسی شده انتخاب شد. ابتدا این ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش PCR تکثیر و سپس محصول PCR به وکتور T/A (pTZ57RT) کلون شد. محصول این مرحله با هضم آنزیمی با آنزیم‌های اختصاصی تائید گردید. بعد از انجام ساب کلونینگ درون وکتور بیانی pBudCE4.1، صحت نتایج با روش تعیین توالی و هضم آنزیمی تائید شد. بیان موفق *flaA* در سلول‌های جانوری نشان داد که این ژن می‌تواند برای تهیه واکسن ژنی استفاده شود. علاوه بر آن نویسندگان بعد از بررسی تحریک سیستم ایمنی توسط سازواره نوترکیب، این ژن را عامل تحریک مناسب سیستم ایمنی در موش‌های BALB/c معرفی نموده‌اند (۲۱)، که نتایج و روش کار پژوهش‌های قبلی با مطالعه ما تا مرحله بیان ژن‌ها در سلول‌های یوکاریوتی هم‌خوانی دارد. در پژوهشی دیگر، کلون‌سازی و بیان ژن *flaA* *کمپیلوباکتر ژوژنی* (باکتری مشابه *هلیکوباکتر پیلوری* از نظر ساختاری) به همراه بیان ژن های متعدد تاژکی شامل *flgK* و *flgG*، *flgE1*، *fliE*، *fliH*،*flaA* انجام شد و نتایج حاصل نشان داد که ترکیبات تاژک پتانسیل بالایی برای تهیه واکسن‌های ژنی دارند (۲۲).

در مطالعه‌ای ملکی و همکاران بخشی از توالی ژن *cagA* را تکثیر و سپس درون وکتور pET32 کلون‌سازی کردند. بیان ژن کلون‌شده در باکتری *E.coli* بررسی و صحت کلون‌سازی با روش SDS-PAGE مورد تائید قرار گرفت. نتایج مذکور نشان داد که پروتین نوترکیب بیان شده می‌تواند به‌عنوان گزینه‌ای برای تهیه واکسن برعلیه *هلیکوباکتر پیلوری* مورد استفاده قرار گیرد(۲۳). در مطالعه دیگری، ژن *ureA* کلون و بیان آن در سیستم پروکاریوتی بررسی شد. پس از صحت تولید پروتین مورد نظر و تائید خلوص بالای پروتین UreA تولید شده، این محصول نوترکیب به عنوان گزینه‌ای برای تولید واکسن علیه *هلیکوباکتر پیلوری* پیشنهاد گردید (۲۴). دوستی و همکاران قطعه ژنی *hcpD* را با استفاده از کیت استخراج DNA جداسازی و با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر نمودند. مراحل کلون‌سازی در وکتور pTZ صورت گرفت و ساب کلونینگ در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1(-) انجام شد. صحت مراحل کلون‌سازی با سه روش هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. سپس بیان ژن مورد نظر در سلول‌های CHO با روش SDS-PAGE بررسی شد. نتایج مؤید بیان پروتین در سیستم یوکاریوتی بود. این پژوهشگران اعلام کردند که pcDNA3.1(-)-*hcpD* می‌تواند به‌عنوان واکسن نوترکیب علیه *هلیکوباکتر پیلوری مورد* استفاده قرار گیرد(۱۴). نتایج به‌دست آمده در این مطالعات با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع نسبتا بالای *هلیکوباکترپیلوری* در سراسر دنیا

و توانایی آن در ایجاد سرطان دستگاه گوارش در انسان، دستیابی به راه‌های پیشگیری از آلودگی با این عامل عفونی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در دهه‌های اخیر لزوم تولید واکسن موثر در پیشگیری از عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* مورد توجه بوده است. اگرچه هنوز واکسن کارآمد در این زمینه تولید نشده است، اما واکسن‌های ژنی بر پایه ژن‌های بیماری‌زای این باکتری بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد ژن *flaB* *هلیکوباکتر پیلوری* با موفقیت در وکتور بیانی pBudCE4.1 کلون‌سازی شد. این سازواره (pBudCE4.1- *flaB*) می‌تواند به‌عنوان منبعی برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* در پستانداران مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به بیان موفقیت آمیز ژن *flaB* در سیستم یوکاریوتی، پروتین نوترکیب حاصل، پتانسیل استفاده به‌عنوان واکسن نوترکیب پپتیدی را دارا می‌باشد. جنبه دیگر این پژوهش استفاده از وکتور بیانی نوترکیب یوکاریوتی pBudCE4.1- *flaB* در تولید و کاربرد مستقیم واکسن ژنی در حیوانات آزمایشگاهی است که نیازمند بررسی بیشتر در زمینه ایمن سازی حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

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

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به دلیل پشتیبانی علمی از این پژوهش اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1- Park HE, Park S, Nizamutdinov D, Seo JH, Park JS, Jun JS, Shin JI, Boonyanugomol W, Park JS, Shin MK, Baik SC. Antigenic Determinant of *Helicobacter pylori* FlaA for developing serological diagnostic methods in children. pathogens. 2022 Dec;11(12):1544.

2- Seong Kim J, Hoon Chang J, Il Chung S, Sun Yum J. Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* fliD gene, an essential factor in flagellar structure and motility. Journal of bacteriology. 1999 Nov 15;181(22):6969-76.

3- Khodadadi P, Kargar M, Bijanzadeh M, Doosti A, Aghaei S. Association of cagA, cagC, virB2, and vacA Subtypes of *Helicobacter pylori* with Adenocarcinoma Development in Iranian Patients. Jundishapur Journal of Microbiology. 2020 Jul 31;13(7).

4- Ghorbani-Dalini S, Kargar M, Doosti A, Najafi A. The relationship between *Helicobacter pylori* disease and bacterial count in stomach. Health. 2014;6(4):259–62.

5- Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Najafi A. Five-year monitoring of considerable changes in tyrosine phosphorylation motifs of the *Helicobacter pylori* cagA gene in Iran. Journal of applied genetics. 2014 Aug;55:417-22.

6- LL, Oliveira MA, Goncalves MH, Chaves FK, Benigno TG, Gomes AD, et al. *Helicobacter pylori* strains of asymptomatic children from a high-risk gastric cancer area in northeastern Brazil.MemInst Oswaldo Cruz. 2014;109(8):1045–9. doi: 10.1590/0074-0276140279.

7- Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Role of NADPH-insensitive nitroreductase gene to metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* strains. Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences. 2010;18(2):137.

8- Heidari K, Kaboosi H, Jamali A, Ghaemi EA, Peyravii Ghadikolaii F. Prevalence of pathogenic genes cagA and vacA of *helicobacter pylori* isolated in patients with digestive disorders. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2019 May 10;13(1):80-8.

9- Ishaq S, Nunn L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. Gastroenterology and hepatology from bed to bench. 2015;8(Suppl1):S6.

10- Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. Journal of digestive diseases. 2013 Jul;14(7):341-9.

11- Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Current microbiology. 2017 Jul;74:863-9.

12- Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in Campylobacter and Helicobacter. Annual review of microbiology. 2011 Oct 13;65:389-410

13- Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomedical journal. 2016 Feb 1;39(1):14-23.

14- Eslami E, Doosti A. Cloning and expression study of the hcpD gene of *Helicobacter pylori*. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2017 Jan 1;17(1):46-57.

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. Genetika. 2015;47(2):499-507.

16- Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. J Infect Dis. 1996; 173(5): 1171-1175.

17- Doosti A. Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of Clostridium botulinum in *E.coli*. JMW. 2013 Jun; 5(3&4): 77-84. [Persian]

18- Sadeghi M, Doosti A. Cloning And Study Of Expression Of *Helicobacter Pylori* flaA gene In Eukaryotic System. ISMJ. 2017 Jul 10;20(3):245-56. [Persian]

19- Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. Infect Immun 1996;64:2445e8.

20-Kheiri-Dastenaei S, Doosti A. Cloning and evaluation of expression of the *Helicobacter pylori* ureB gene by using pcDNA3. 1 (+) expression vector. JJUMS.2016 Aug 10;3(1):82-91.

21- Ansari H, Tahmasebi-Birgani M, Bijanzadeh M. DNA vaccine containing Flagellin A gene induces significant immune responses against *Helicobacter pylori* infection: An in vivo study. Iran J Basic Med Sci. 2021 Jun;24(6):796.

22- Yeh HY, Hiett KL, Line JE, Oakley BB, Seal BS. Construction, expression, purification and antigenicity of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellar proteins. Microbiological research. 2013 May 6;168(4):192-8.

23- Maleki M, Nassiri MR, Qazvini K. Cloning and Expression of *Helicobacter Pylori* cagA gene antigenic regions in E. coli. JFUMAY . 2016 Apr 10;6(1):113-9.[Persian]

24- Mehran MJ, Zendehbad SH, Malla SU. 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 Jan 1;7(1):111-7.