



کلونینگ و بررسی بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری در سیستم یوکاریوتی

محترم صادقی^۱، عباس دوستی^{*۱}

^۱ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۷/۱۲ - پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۲۰)

چکیده

زمینه: هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین باکتری است که جوامع انسانی را در ابعاد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است. بیان فلاژل و تحرک باکتری در کلونیزاسیون و ویرولانسی آن عامل بسیار مهمی است. ژن *flaA* یکی از ژن‌های کدکننده فلاژلین می‌باشد که نقش کلیدی در حرکت باکتری و کلونیزاسیون آن دارد و از نظر ایمنی بخشی نیز مورد توجه می‌باشد. هدف از این مطالعه طراحی، ساخت سازواره و بررسی بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های یوکاریوتی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا از هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد، DNA ژنومی تخلیص و ژن *flaA* با پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر و جداسازی شد. سپس با بهره‌گیری از تکنیک همسانه سازی T/A در پلاسمید pTZ کلون گردید. به منظور بیان ژن *flaA* و ایجاد سازواره نهایی، ژن *flaA* از پلاسمید pTZ خارج شد و در وکتور بیانی (-)pcDNA3.1 ساب کلون گردید. سازواره *flaA*-(-)pcDNA3.1 به روش الکتروپوریشن به سلول جانوری CHO منتقل و بیان یوکاریوتی ژن *flaA* با تکنیک SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد محصول PCR ژن *flaA* در وکتور pTZ کلون و در باکتری اشریشیا کلای سویه TOP10F تکثیر یافته است. همچنین هضم آنزیمی و تعیین توالی حاکی از تشکیل سازواره نهایی *flaA*-(-)pcDNA3.1 است. در نهایت بررسی بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری در سلول جانوری CHO، نشان داد سازواره ژنی حاصل قادر به بیان موفق محصول ژن *flaA* در سیستم یوکاریوتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه سازواره نهایی *flaA*-(-)pcDNA3.1 قادر به بیان محصول پروتئینی ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های جانوری می‌باشد و پروتئین فلاژلین یکی از آنتی‌ژن‌های مهم این باکتری است. بنابراین به درستی می‌توان گفت که سازواره ژنی *flaA*-(-)pcDNA3.1 کاندیدای مناسبی برای استفاده در زمینه واکسن‌های ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد و در تحقیقات آینده می‌توان از آن برای بررسی ایمنی زایی در حیوانات آزمایشگاهی بهره گرفت.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، ژن *flaA*، کلون‌سازی، الکتروپوریشن

* شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری ماریچی، کم هوازی (میکروآتروفیلیک) و گرم منفی است که حدود ۳/۵ میکرون طول و ۰/۵ میکرون عرض دارد. زیر میکروسکوپ با درشت نمایی بالا بین ۳ تا ۷ فلاژل در هر باکتری دیده می‌شود که فلاژل‌ها برای حرکت باکتری در محیط‌های ژله‌ای (سطح مخاط معده) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱ و ۲). هلیکوباکتر پیلوری از عوامل اصلی گاستریت مزمن فعال، زخم دئودنوم، زخم معده، سرطان معده و لنفوم معده شناخته شده است (۳). این باکتری شایع‌ترین باکتری است که جوامع انسانی را مبتلا ساخته و می‌تواند از بدو تولد افراد را آلوده کند. همچنین گفته می‌شود که بیش از ۵۰ درصد مردم دنیا میزبان این باکتری هستند (۴ و ۵). تاکنون مطالعات و بررسی‌های متعددی در مورد شیوع عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در مناطق مختلف دنیا انجام شده است که نتایج آنها بیانگر میزان‌های شیوع متفاوت و اختلاف در مناطق مختلف بوده است (۶). در کشورهای توسعه یافته، عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری در بین ۴۰-۲۰ درصد جمعیت بالغ و در کشورهای در حال توسعه میزان این عفونت بالاتر است و نزدیک به ۸۰ درصد جمعیت بالغ را در بر می‌گیرد (۷).

فاکتورهای متعددی در بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری دخالت دارند از جمله می‌توان به تاژک، اوره‌آز، سیتوتوکسین مرتبط با ژن A و چسبنده‌ها اشاره کرد (۸ و ۹). مطالعات گسترده‌ای در مورد تاژک هلیکوباکتر پیلوری صورت گرفته که نشان دهنده نقش کلیدی این اندامک در استقرار، کلونیزاسیون و ایجاد عفونت این پاتوژن در مخاط معده است (۱۰). در بیان، ترشح و مونتاژ دستگاه پیچیده تاژک در هلیکوباکتر پیلوری بیش از حدود ۵۰ پروتئین نقش دارند. که حداقل ۲۰ تا از این پروتئین‌ها تشکیل دهنده اجزای ساختاری پایه، قلاب و رشته تاژک هستند

(۱۱). رشته تاژک از دو نوع فلاژلین تشکیل شده، پروتئین فراوان تر flaA مرکب از ۱۵۳۰ نوکلئوتید که در سرتاسر رشته پراکنده است و پروتئین بزرگ تر flaB که به نظر می‌رسد به طور انحصاری در نزدیک مبدأ می‌باشد (۱۲). فلاژلین به عنوان یکی از اهداف مهم سیستم ایمنی به شمار رفته و به عنوان یک لیگاند برای گیرنده‌های شبه زنگوله‌ای فعال یا TLR5 (Toll-like receptor 5) سلول‌های میزبان عمل می‌نماید (۱۳). تحریک TLR5 توسط پاتوژن‌های مختلف منجر به فعال سازی پاسخ‌های ایمنی ذاتی و به دنبال آن ایمنی اکتسابی می‌گردد (۱۴). flaA هلیکوباکتر پیلوری با کاهش فعالیت داخلی TLR5 ممکن است به فرار از پاسخ ایمنی میزبان و کلونیزاسیون مداوم باکتری کمک کند (۱۵).

استفاده از آنتی‌بیوتیک یکی از راه‌های درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری محسوب می‌شود. با توجه به گسترش شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری، عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عدم موفقیت در ریشه‌کنی عفونت و پایداری بالای هلیکوباکتر پیلوری در میزبان انسانی، عدم تأثیر بر اشکال غیرفعال باکتری، عدم همکاری بیمار به دلیل چند دارویی بودن و هزینه بالا، دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری مانند واکسیناسیون ضروری می‌باشد (۱۶). واکسن‌های نسل سوم واکسن‌های ژنی یا واکسن DNA هستند. این واکسن‌ها در واقع تزریق مستقیم پلاسمیدی است که قدرت بیان ژن مورد نظر در داخل سلول‌های بدن را دارد و می‌تواند باعث ایمنی‌زایی در برابر بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های مختلف مانند باکتری، ویروس شوند و حتی برای تومورها و بیماری‌های با منشأ ژنتیکی نیز می‌تواند کاربرد داشته باشند (۱۷). در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله DNA سبب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی شده است. واکسن‌های ژنی

اندازه این وکتور ۲۸۸۶ جفت باز است. از وکتور بیانی (-)pcDNA3.1 (ساخت شرکت Invitrogen، کشور آمریکا) به عنوان وکتور بیان شونده در سیستم یوکاریوتی استفاده شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به نئومایسین برای انتخاب سلول‌های جانوری ترانسفرم شده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آمپی‌سیلین برای انتخاب سلول‌های باکتریایی ترانسفرم شده، از ویژگی‌های دیگر این وکتور است. اندازه وکتور (-)pcDNA3.1، ۵۴۲۷ جفت باز می‌باشد.

استخراج DNA و تکثیر ژن *flaA*

به منظور استخراج DNA ژنومی هلیکوباکتر پیلوری از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت سیناژن ایران) استفاده شد. توالی ژن *flaA* به منظور طراحی پرایمر با شماره ثبت FM۹۹۱۷۲۸ از بانک ژن جهانی NCBI گرفته شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق که برای تکثیر و جداسازی ژن *flaA* مورد نیاز هستند، با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند. پرایمر رفت دارای توالی

5' ACGGATATCATGGCTTTTCAGGTCAATACAA-3'

و پرایمر برگشت

5' CTGGGTACCTAAGTTAAAAAGCCTTAAGATA-3'

است. به منظور سهولت کلون‌سازی و یا خارج ساختن ژن *flaA* از یک وکتور و کلون‌سازی مجدد آن در وکتورهای متفاوت دیگر، در انتهای ۵- پرایم هر یک از پرایمرهای طراحی شده، سایت برش آنزیمی در نظر گرفته شد. به طوری که جایگاه برش در توالی پرایمر رفت سایت GATATC برای آنزیم EcoRV و در توالی پرایمر برگشت سایت آنزیمی GGTACC برای آنزیم KpnI قرار داده شد. پرایمرهای مذکور توسط شرکت سیناژن تولید شدند.

در مقایسه با سایر واکنش‌ها دارای مزایایی چون: تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره سازی و نگهداری آسانمی‌باشند (۱۸)

با توجه به مشکلات ناشی از درمان‌های حاضر و با توجه به مزایای واکنش‌های نو ترکیب، هدف ما از این مطالعه طراحی، ساخت سازواره ژنی و بررسی بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های یوکاریوتی CHO می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری

در این مطالعه تجربی، به سویه‌های استاندارد باکتریایی، برای استخراج DNA و کلون‌سازی ژن نیاز است. باکتری هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد، برای جداسازی ژن مورد مطالعه در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت که از بخش میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. از باکتری اشرشیا کلای سویه Top10F برای کلون‌سازی و تکثیر ژن‌های نو ترکیب استفاده شد. این سویه *E. coli* از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد تهیه شد. همچنین در این تحقیق به منظور بررسی بیان ژن *flaA* در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary) استفاده شد که این سلولاز مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد دریافت شد. به منظور همسانه‌سازی محصولات PCR به روش کلون‌سازی T/A، از کیت شرکت Thermo Fisher Scientific (ساخت کشور آمریکا که حاوی پلاسمید pTZ57R/T است) بهره گرفته شد که نشانگر انتخابی این وکتور، ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است. در این مقاله به منظور سهولت نگارش، نام وکتور pTZ57R/T به صورت مخفف pTZ نوشته می‌شود و

درصد انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه Uvdoc صورت پذیرفت.

کلون سازی T/A

برای کلون سازی ژن *flaA* در پلاسمید pTZ ابتدا محصول PCR به همراه کمترین مقدار ممکن از آگارز همراه آن، با تیغ اسکالپل از روی ژل بریده شد. سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، خالص سازی گردید. محصول PCR تخلیص شده، با استفاده از کیت T/A (ساخت شرکت ThermoFisher، آمریکا)، بر اساس دستور کار کیت، وارد وکتور pTZ گردید. به این منظور واکنش اتصال بین ژن *FlaA* و پلاسمید pTZ انجام شد و محصول اتصال در باکتری های *E. coli* سویه TOP10F که به روش شیمیایی با استفاده از کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) مستعد شده بودند، ترانسفورم شد. سپس باکتری های ترانسفرم شده روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت شبانه داده شدند. پس از مشاهده کلنی ها، به منظور حفظ و تکثیر باکتری های ترانسفرم شده، تعداد ۲۰ کلنی به صورت تصادفی انتخاب و از آنها روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، ماتریکس تهیه شد. ماتریکس های حاصل به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از بین ماتریکس های رشد یافته، تعدادی به صورت تصادفی انتخاب و در لوله های حاوی ۵ میلی لیتر محیط LB-Broth همراه با آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شدند. از باکتری های رشد یافته در این مرحله، با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، تخلیص

تکثیر ژن *flaA* با روش واکنش زنجیرهای پلی مرز (PCR) انجام شد. برای این کار ابتدا میکس ساخته شد که حاوی مقدار ۱۲۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت ۱۰X به همراه ۵۰ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار و ۲۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی مولار مخلوط شد 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 (میکس)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (۰/۱ میکرومولار از هر پرایمر)، همچنین ۱ میکرولیتر آنزیم Taq رقیق (مقدار ۱/۲۵ واحد آنزیم شامل ۰/۲۵ میکرولیتر 5u/ul آنزیم DNA پلیمرز Taq با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر به علاوه ۰/۷۵ میکرولیتر آب مقطر) در یک میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری، مخلوط شدند. در آخر ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA هیلو باکتر پیلوری به مخلوط واکنش اضافه شد. برای جلوگیری از تبخیر، یک قطره (۲۰ میکرولیتر) روغن معدنی استریل به هر میکروتیوپ اضافه شد.

برنامه دمایی PCR در سه مرحله انجام شد. مرحله اول شامل حرارت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم متشکل از ۳۰ چرخه سه قسمتی بود. قسمت اول جهت دناتوره کردن (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۶۳ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در حرارت ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. بررسی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱/۵

(-)pcDNA3.1 با روش های PCR، هضم آنزیمی و نهایتاً تعیین توالی بررسی شد.

انتقال سازواره نهایی *flaA* -(-)pcDNA3.1 به سلول های جانوری

در این تحقیق به منظور بررسی بیان ژن *flaA* در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary) استفاده شد و برای ترانسفورمیشن این سلول ها از روش الکتروپوریشن (دستگاه مدل Gene Pulser Xcell شرکت Bio-Rad آمریکا) بهره گرفته شد. به منظور انجام الکتروپوریشن 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 *flaA* -(-)pcDNA3.1، به سلول های درون کووت در شرایط استریل (زیر هود) 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 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 به همراه ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتوماایسین 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 نئوماایسین (مارکر انتخابی برای سلول های ترانسفرم شده با وکتور نوترکیب) اضافه شد و سلول ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری گردیدند.

پلاسمید صورت گرفت و تأیید اولیه درستی کلون سازی ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *flaA* و انجام PCR، همچنین هضم آنزیمی با آنزیم های EcoRV و KpnI انجام شد. سازواره pTZ-*flaA* حاصل در این مرحله جهت تأیید نهایی، توسط شرکت Generay کشور چین تعیین توالی گردید.

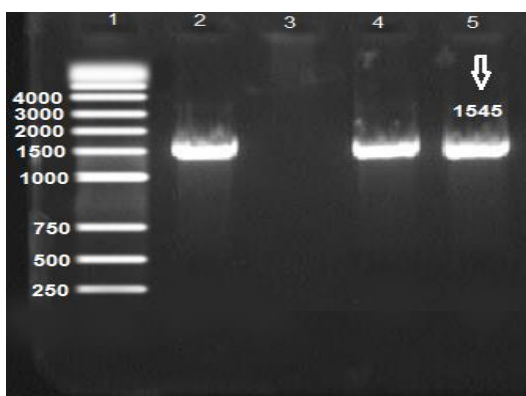
کلون سازی ژن در وکتور بیانی

پلاسمید نوترکیب pTZ-*flaA* که در مرحله قبل تخلیص و تأیید گردیده است، با استفاده آنزیم های محدودالایر EcoRV و KpnI بریده شد. تا ژن *flaA* از وکتور جدا گردد. از طرف دیگر، وکتور بیانی (-)pcDNA3.1 نیز توسط آنزیم های ذکر شده برش داده شد تا آماده پذیرش ژن *flaA* گردد. محصولات هضم آنزیمی مذکور، روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. قطعه ژن *flaA* و وکتور (-)pcDNA3.1 خطی شده، از روی ژل بریده شدند و به صورت جداگانه در دو میکروتیوب، قرار داده شدند. تخلیص DNA از ژل با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، برای ژن و وکتور بیانی انجام شد.

به منظور ایجاد اتصال بین ژن *flaA* و حامل (-)pcDNA3.1 خالص شده از ژل، از آنزیم T4 لیگاز استفاده شد. واکنش گره های مرحله اتصال به صورت، ۳ میکرولیتر از حامل (-)pcDNA3.1 (۶۰ نانوگرم)، ۹ میکرولیتر از ژن *FlaA* (۱۸۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر از بافر X ۱۰ لیگاز و ۱ میکرولیتر از آنزیم T4 لیگاز (۱ واحد) 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 آنتی بیوتیک، مطابق مرحله قبل انجام شد. تأیید درستی سازواره نهایی *flaA*-

روی ژل آگارز ۱ درصد، نشان دهنده کیفیت مناسب DNA برای انجام PCR بود.

انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *flaA*، منجر به تشکیل باند ۱۵۴۵ جفت بازی مربوط به این محصول می‌باشد. محصولات PCR روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند که نتایج حاصل از PCR ژن *flaA* در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱) تکثیر ژن *flaA* به روش PCR

ستون ۱: مارکر 1kb ساخت شرکت فرمتناز، ستون ۲، ۴ و ۵: باند ۱۵۴۵ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *flaA* ستون ۳: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)

کلون‌سازی T/A و ساب کلونینگ

محصول PCR ژن *flaA* ابتدا در وکتور pTZ کلون و سپس در وکتور بیانی (-)pcDNA3.1 ساب کلون شد. بدین صورت که ابتدا ژن *flaA* با استفاده از تکنیک T/A، در پلاسمید pTZ کلون شد. در این مرحله انتظار می‌رود وکتور نوترکیب pTZ-*flaA* به دست آمده باشد. تأیید درستی تشکیل این سازواره ژنی به سه روش PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شد. نتایج انجام PCR روی پلاسمیدهای بدست آمده، نشان داد که اغلب این پلاسمیدها، حاوی ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند. همچنین یافته‌های بدست آمده از تست‌های تأییدی نظیر هضم آنزیمی و تعیین توالی نیز درستی کلون‌سازی ژن

انجام SDS-PAGE

الکتروفورز ژل پلی آکریلامید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) تکنیکی برای جداسازی پروتئین‌ها براساس توانایی حرکتشان در یک جریان الکتریکی براساس طول زنجیره پلی پپتیدی یا وزن مولکولی‌شان می‌باشد. در این روش با استفاده از دترجنت سدیم دودسیل سولفات ساختار دوم و سوم پروتئین از بین می‌رود و پروتئین‌ها به صورت زنجیره‌های پروتئینی در می‌آیند. سیستم ژلی که به طور گسترده برای جداسازی طیف وسیعی از پروتئین‌ها استفاده می‌شود سیستم Laemmli می‌باشد، این سیستم شامل دو ژل Stacking و Resolving می‌باشد. ژل Stacking به قرارگیری پروتئین‌ها درون باندها کمک می‌کند و ژل Resolving که درصد آکریلامید آن با ژل Stacking متفاوت می‌باشد، جداسازی پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی‌شان را عهده‌دار می‌باشد. در این تحقیق تأیید بیان پروتئین به روش SDS-PAGE انجام شد. سلول‌های CHO به روش ذوب و انجماد متناوب (freeze and thaw) متلاشی شدند و سوسپانسیون حاصل از عصاره سلولی با استفاده از سرنگ هامیلتون به چاهک‌های روی ژل وارد گردید. همچنین در یکی از چاهک‌ها مقدار ۵ میکرولیتر نشانگر پروتئین ریخته شد و الکتروفورز با ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت صورت گرفت. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص شدن پروتئین‌های الکتروفورز شده، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو انجام گرفت.

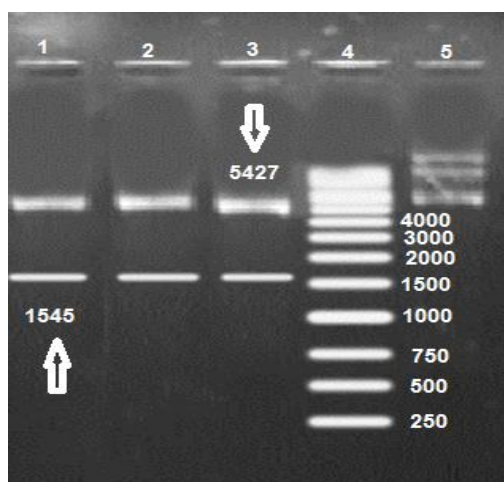
یافته‌ها

تکثیر و جداسازی ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری

استخراج DNA از باکتری هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت انجام شد. الکتروفورز DNA تخلیص شده

KpnI و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز موجب تشکیل دو باند ۵۴۲۷ و ۱۵۴۵ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور (-)pcDNA3.1 و ژن *flaA* گردید (شکل ۲). داده‌های حاصل از تعیین توالی ژن *flaA* 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 تأیید است.

flaA در پلاسمید pTZ و تشکیل وکتور نو ترکیب -pTZ *flaA* را مشخص کردند. برای بیان ژن *flaA* لازم است این ژن از درون وکتور نو ترکیب pTZ-*flaA* خارج و در یک وکتور بیانی یوکاریوتی درج شود. به این منظور از وکتور بیان شونده یوکاریوتی (-)pcDNA3.1 استفاده شد. نتایج درج ژن *flaA* در این وکتور بیانی که با روش‌های، هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شد، نشان داد سازواره نهایی *flaA*-(-)pcDNA3.1 تشکیل شده است. هضم آنزیمی این سازواره با دو آنزیم EcoRV و



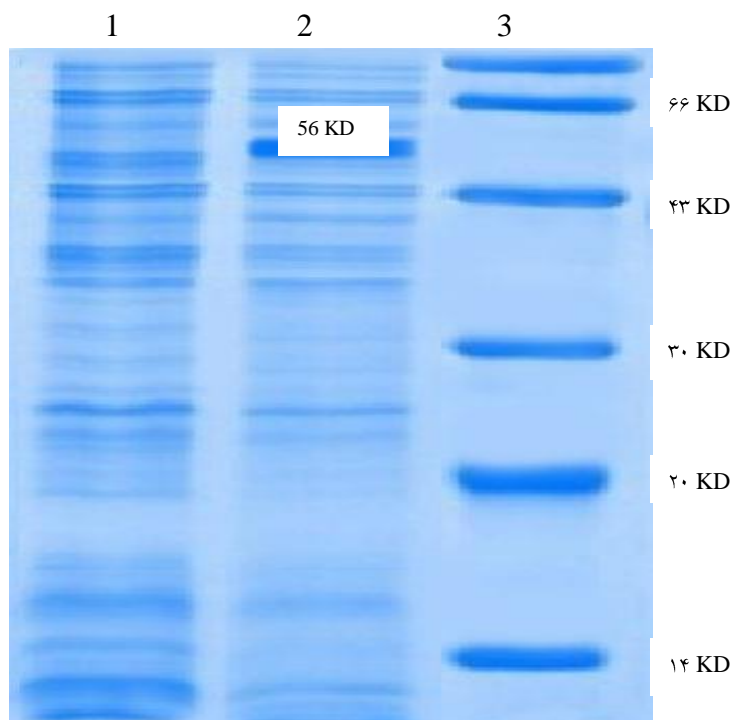
شکل ۲) هضم آنزیمی سازواره نهایی *flaA*-(-)pcDNA3.1 با دو آنزیم KpnI و EcoRV

ستون ۱، ۲، ۳: باند ۱۵۴۵ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *flaA* و باند ۵۴۲۷ جفت بازی مربوط به پلاسمید (-)pcDNA3.1 ستون ۴: مارکر 1kb ساخت شرکت فرمتاز و ستون ۵: پلاسمید *flaA*-(-)pcDNA3.1 بدون انجام هضم آنزیمی

آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند که مؤید دریافت پلاسمید نو ترکیب *flaA*-(-)pcDNA3.1 می‌باشد. نتایج حاصل از الکتروفورز عصاره این سلول‌ها روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ آمیزی آن با کوماسی بلو نشان داد، باند ۵۶ کیلودالتونی مربوط به محصول ژن *flaA* در سلول‌های ترانسفرم شده تشکیل شده است (شکل ۳).

الکتروپوریشن و بیان ژن

پس از الکتروپوریشن سازواره نهایی *flaA*-(-)pcDNA3.1 در سلول‌های CHO و کشت و تأیید آنها، به منظور بررسی بیان ژن *flaA* در این سلول جانوری، SDS-PAGE انجام شد. بدین صورت که ابتدا سلول‌های CHO ترانسفرم شده در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین کشت داده شدند. نتایج نشان داد، سلول‌ها در مراحل کشت در حضور نئومایسین نسبت به این



شکل ۳) نتیجه بیان ژن *flaA* و تشکیل پروتئین ۵۶ کیلو دالتونی
شماره ۱: سلول ترانسفرم نشده شماره ۲: سلول ترانسفرم شده با پلاسمید بیانی *flaA*-pcDNA3.1(-) شماره ۳: مارکر

بحث

هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع ترین عوامل عفونی در جوامع انسانی می باشد. علی رغم تلاش های بسیار در راستای یافتن واکسن برای پیشگیری از این عفونت، تا کنون واکسن مؤثری علیه آن تولید نشده است (۱۹). مهم ترین رکن در اثر بخشی یک واکسن، قدرت آنتی ژنیسته آن است. از جمله آنتی ژن های مهم هلیکوباکتر پیلوری، می توان آنتی ژن های تاژکی را نام برد. هلیکوباکتر پیلوری بین ۵ تا ۷ تاژک دارد که به باکتری، قدرت تحرک و کلونیزاسیون می بخشد. بررسی ها نشان داده که موتاسیون هایی که سبب حذف فلاژل های باکتری می گردند، موجب کاهش بیماری زایی باکتری می شوند. پروتئین های تاژکی در

هلیکوباکتر پیلوری شامل پروتئین های اصلی (*FlaA*) و فرعی (*FlaB*) می باشند. بررسی سرم بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری، وجود آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن های *FlaA* و *FlaB* را اثبات نموده است (۲۰). یان (Yan) و همکاران، اقدام به ایجاد سازواره ژنی بر اساس ژن های *flaA* و *flaB* هلیکوباکتر پیلوری نمودند. این محققان هر یک از این دو ژن را به صورت مجزا از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری جداسازی نموده و به روش همسانه سازی T/A، کلون کردند. سپس ژن های مذکور را به صورت فیوژن در پلاسمید پروکاریوتی به نام pET32a وارد و به بررسی بیان پروتئین مربوطه پرداختند. نتایج تحقیقات آنها نشان دهنده موفقیت بیان پروتئین فیوژن حاصل از کلون سازی دو ژن *flaA* و *flaB* بود.

این تحقیق از لحاظ انتخاب ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری برای کلون سازی و بررسی بیان، با کار ما شباهت داشته اما از دو دیدگاه شامل بیان پروکاریوتی و تولید پروتئین فیوژن با تحقیق ما که به صورت بیان یوکاریوتی ارزیابی گردیده است، متفاوت می باشد. این محققان نشان دادند که بیان ژن های تاژکی به صورت نوترکیب در سیستم پروکاریوتی موفقیت آمیز است و در تحقیق ما نیز بیان موفق ژن *flaA* در سیستم یوکاریوتی به اثبات رسید (۲۱). در تحقیق صورت گرفته، گروهی از محققان به بررسی کلونینگ و بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری به صورت کایمریک همراه با ژن *flaC* باکتری *E. coli* پرداختند.

هدف از تحقیق این محققین، استفاده از پروتئین نوترکیب *FlaA* به عنوان آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری و کاربرد *flaC* اشریشیا کلی به عنوان ادجوانت به صورت توأم بوده است. در واقع در این تحقیق آنتی ژن و ادجوانت، هر دو در کنار هم بیان شده اند. استفاده از *flaA* در این پژوهش، با ژن مورد استفاده در کار ما مشابه است و نشان دهنده اهمیت بالای ژن *flaA* به عنوان کاندید مناسب برای تحقیقات واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری می باشد (۲۲). به طور کلی، ژن های مسئول رمزگذاری پروتئین های تاژکی در ایجاد تحریک سیستم ایمنی میزبان از اهمیت ویژه ای برخوردارند.

در تحقیق دیگری که صورت گرفته، جداسازی و کلون سازی ژن *flaA* و تعداد دیگری از ژن های تاژکی باکتری کامپیلوباکتر ژورنی انجام شده است. این باکتری از لحاظ ساختار و بسیاری از خصوصیات، جزء نزدیکترین باکتری ها به هلیکوباکتر پیلوری می باشد. این محققان ژن های مورد نظر خود را پس از انجام *PCR*، جداسازی نموده و به صورت مستقیم و با استفاده از کیت، کلون سازی و بیان نمودند. اهمیت این تحقیق، تمرکز بر کلون سازی و بیان ژن های متعدد تاژکی شامل

اهمیت بررسی و ارزیابی دارد (۲۳).

گروهی از محققان، ژن *flaA* و ویریو پاراهمولیتیکوس را کلون سازی و بیان نمودند. این پژوهشگران پیشنهاد نمودند که پروتئین نوترکیب *FlaA* می تواند به عنوان یک واکسن نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد یا می توان از آن برای مطالعات ساختار و عملکرد بهره گرفت که این موارد پیشنهادی در خصوص ژن *flaA* به کار رفته در تحقیق ما نیز صادق است (۲۴). بیشتر موارد اشاره شده در بالا، کلون سازی و بررسی بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری یا نمونه ای دیگری از باکتری ها را مد نظر قرار داده اند. بیشتر آنها با توجه به بررسی های صورت گرفته، پیشنهاد داده اند که ژن *flaA* یا پروتئین نوترکیب حاصل از آن، از ویژگی های لازم برای کاربرد در زمینه تحقیقات واکسن را دارد. در تحقیق ما نیز ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یکی از مهم ترین ژن های تاژکی این باکتری، با موفقیت کلون و در سیستم یوکاریوتی بیان شده است. بیان موفق ژن کلون شده در سلول یوکاریوتی در سیستم *in vitro*، نوید موفقیت آن در بیان در بافت های جانوری و تحقیق به صورت *in vivo* را می دهد تا در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرد. هر چند بسیاری از انواع واکسن ها تاکنون علیه هلیکوباکتر پیلوری آزمایش شده اند اما همچنان نیاز به تحقیقات بیشتر تا دستیابی به واکسنی مؤثر احساس می شود (۱۹).

این تحقیق از لحاظ انتخاب ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری برای کلون سازی و بررسی بیان، با کار ما شباهت داشته اما از دو دیدگاه شامل بیان پروکاریوتی و تولید پروتئین فیوژن با تحقیق ما که به صورت بیان یوکاریوتی ارزیابی گردیده است، متفاوت می باشد. این محققان نشان دادند که بیان ژن های تاژکی به صورت نوترکیب در سیستم پروکاریوتی موفقیت آمیز است و در تحقیق ما نیز بیان موفق ژن *flaA* در سیستم یوکاریوتی به اثبات رسید (۲۱). در تحقیق صورت گرفته، گروهی از محققان به بررسی کلونینگ و بیان ژن *flaA* هلیکوباکتر پیلوری به صورت کایمریک همراه با ژن *flaC* باکتری *E. coli* پرداختند.

هدف از تحقیق این محققین، استفاده از پروتئین نوترکیب *FlaA* به عنوان آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری و کاربرد *flaC* اشریشیا کلی به عنوان ادجوانت به صورت توأم بوده است. در واقع در این تحقیق آنتی ژن و ادجوانت، هر دو در کنار هم بیان شده اند. استفاده از *flaA* در این پژوهش، با ژن مورد استفاده در کار ما مشابه است و نشان دهنده اهمیت بالای ژن *flaA* به عنوان کاندید مناسب برای تحقیقات واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری می باشد (۲۲). به طور کلی، ژن های مسئول رمزگذاری پروتئین های تاژکی در ایجاد تحریک سیستم ایمنی میزبان از اهمیت ویژه ای برخوردارند.

در تحقیق دیگری که صورت گرفته، جداسازی و کلون سازی ژن *flaA* و تعداد دیگری از ژن های تاژکی باکتری کامپیلوباکتر ژورنی انجام شده است. این باکتری از لحاظ ساختار و بسیاری از خصوصیات، جزء نزدیکترین باکتری ها به هلیکوباکتر پیلوری می باشد. این محققان ژن های مورد نظر خود را پس از انجام *PCR*، جداسازی نموده و به صورت مستقیم و با استفاده از کیت، کلون سازی و بیان نمودند. اهمیت این تحقیق، تمرکز بر کلون سازی و بیان ژن های متعدد تاژکی شامل

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از SDS-PAGE که نشان دهنده تولید موفقیت‌آمیز پروتئین ۵۶ کیلو دالتونی حاصل از بیان ژن *flaA* در سلول‌های جانوری است، انتظار می‌رود که با ورود این آنتی‌ژن به سلول‌های حیوانی بتواند سیستم ایمنی را تحریک کرده که البته این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری از جمله ایمنی‌سازی حیوان و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی آن دارد. لذا بیان اولیه و موفق ژن *flaA* در سیستم یوکاریوتی (سلول CHO) که در پژوهش حاضر محقق شد، راهی روشن در راستای کاربرد *flaA*-pcDNA3.1(-) به عنوان واکسن ژنی در مدل حیوانی پیش رو قرار می‌دهد.

سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد. محققان و نویسندگان این مقاله بدین وسیله

مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، بخصوص آقای دکتر حسین انصاری و آقای حمیدرضا کبیری که ما را در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند، اعلام نمایند. همچنین از همکاری صمیمانه همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد کمال امتنان داریم. این مقاله با امکانات آزمایشگاهی و تجهیزات مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شده است. هزینه مواد و وسایل مصرفی با بودجه شخصی و توسط محققان تأمین گردیده است.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Doosti A, Rahimian GA, Nassiri J, et al. Prevalence of the *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens in Shahrekord. *Armaghane Danesh* 2007; 12(1): 29-38. (Persian)
2. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 449-90.
3. Souod N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic Analysis of *cagA* and *vacA* Genes in *Helicobacter Pylori* Isolates and their relationship with Gastroduodenal diseases in the west of Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2013; 15(5): 371-5.
4. Pakbaz Z, Shirazi MH, Pourmand MR, et al. Evaluation of Rapid Urease Test Compared with Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Iran South Med J* 2014; 16(6): 394-400. (Persian).
5. Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, et al. Real-Time PCR assay using allele-specific TaqMan probe for detection of clarithromycin resistance and its point mutations in *Helicobacter pylori*. *J Isfahan Med Sch* 2011; 29(126): 65-73. (Persian)
6. Haggerty TD, Perry S, Sanchez L, et al. Significance of transiently positive enzyme-linked immunosorbent assay results in detection of *Helicobacter pylori* in stool samples from children. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2220-3.
7. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Role of NADPH-insensitive nitroreductase gene to metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* strains. *Daru* 2010; 18(2): 137-40.
8. Haiko J, Westerlund-Wikström B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)* 2013; 2(4): 1242-67.

9. Kikuchi S, Crabtree JE, Forman D, et al. Association between infections with CagA-positive or -negative strains of *Helicobacter pylori* and risk for gastric cancer in young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma Among Young Adults. Am J Gastroenterol 1999; 94(12): 3455-9.
10. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. CsrA regulates *Helicobacter pylori* J99 motility and adhesion by controlling flagella formation. Helicobacter 2014; 19(6): 443-54.
11. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1997; 388(6642): 539-47.
12. Chaban B, Ng SY, Kanbe M, et al. Systematic deletion analyses of the fla genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon, *Methanococcus maripaludis*. Mol Microbiol 2007; 66(3): 596-609.
13. Häse CC. Analysis of the role of flagellar activity in virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Microbiology 2001; 147(Pt 4): 831-7.
14. Mizel SB, Bates JT. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. J Immunol 2010; 185(10): 5677-82.
15. Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, et al. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. Microbes Infect 2003; 5(15): 1345-56.
16. Wheeldon TU, Hoang TT, Phung DC, et al. Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* eradication therapy in Vietnam: reinfection and clinical outcome. Aliment Pharmacol Ther 2005; 21(8): 1047-53.
17. Doosti A, Ghaasemi-Dehkordi P, Kargar M, et al. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin 2 (stx2) gene. Genetika 2015; 47(2): 499-507.
18. Doosti A. Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of *Clostridium botulinum* in *E. coli*. J Microbial World 2013; 5(3): 77-84. (Persian)
19. Talebi Bezmin Abadi A. Vaccine against *Helicobacter pylori*: inevitable approach. World J Gastroenterol 2016; 22(11): 3150-7.
20. Kabir S. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: a review. Helicobacter 2007; 12(2): 89-102.
21. Yan J, Liang SH, Mao YF, et al. Construction of expression systems for flaA and flaB genes of *Helicobacter pylori* and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins. World J Gastroenterol 2003; 9(10): 2240-50.
22. Mori J, Vranac T, Smrekar B, et al. Chimeric flagellin as the self-adjuvanting antigen for the activation of immune response against *Helicobacter pylori*. Vaccine 2012; 30(40): 5856-63.
23. Yeh HY, Hiatt KL, Line JE, et al. Construction, expression, purification and antigenicity of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellar proteins. Microbiol Res 2013; 168(4): 192-8.
24. Yuan Y, Wang X, Guo S, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of recombinant flagellin A from *Vibrio parahaemolyticus*. Chinese J Oceanol Limnol 2010; 28(6): 1254-60.

Original Article

Cloning and Study of Expression of *Helicobacter Pylori FlaA* Gene in Eukaryotic System

M. Sadeghi¹, A. Doosti^{1*}

¹ Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

(Received 3 Oct, 2016 Accepted 9 Jan, 2017)

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* is the most common bacterium causing chronic infections worldwide. Expression of flagella and bacterial motility are very important in colonization and virulence. *FlaA* gene is one of the flagellin-encoding genes that play the key role in the colonization and bacterial motility and it has a significant impact in immunization. The aim of this study was to design, construct and evaluate the *Helicobacter pylori flaA* gene expression in eukaryotic cells.

Material and Methods: In this experimental study, genomic DNA was purified from the *Helicobacter pylori* standard strain and *flaA* gene was amplified and isolated by PCR method with use of the specific primers. Then, this gene was cloned into pTZ vector by T/A cloning technique. In order to *flaA* gene expression and generation of final construct, the *flaA* gene was removed from pTZ plasmid and sub-cloned into the pcDNA3.1 (-) expression vector. The pcDNA3.1 (-)-*flaA* construct was transformed into CHO cells by electroporation, and *flaA* eukaryotic gene expression was studied on SDS-PAGE.

Results: The results showed that *flaA* gene PCR product was cloned into pTZ vector and amplified in *Escherichia coli* TOP10F strain. Also the enzymatic digestion and sequencing showed that the pcDNA3.1 (-)-*flaA* was performed. Finally, the evaluation of the *Helicobacter pylori flaA* gene expression in CHO cells showed that the generated gene construct can express the *flaA* product in eukaryotic system, successfully.

Conclusion: Given that the pcDNA3.1 (-)-*flaA* as a final construct is able to express the *flaA* protein of the *Helicobacter pylori* in animal cells. Flagellin protein is one of the important antigens of the bacterium. So we can properly say that gene pcDNA3.1(-)-*flaA* construct is an appropriate candidate for use in the field of gene vaccines against *Helicobacter pylori* and in future researches can be used to check the immunization in laboratory animals.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *flaA* gene, Cloning, Electroporation

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Sadeghi M, Doosti A. Cloning and Study of Expression of *Helicobacter Pylori FlaA* Gene in Eukaryotic System. *Iran South Med J* 2017; 20(3): 245-256

Copyright © 2017 Sadeghi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
Email: abbasdoosti@yahoo.com

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>