دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیستم، شماره ۳، صفحه ۲۵۶ - ۲۴۵ (مرداد و شهریور ۱۳۹۶)

Iran South Med J 2017;20(3): 245-256

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 ویرولانس آن عامل بسیار مهمی است. ژن **flaA** یکی از ژن‌های کد کننده 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.

موادوروش‌ها: 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 **pcDNA3.1(-)-flaA** 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 سویهٔ **TOP10F** تکثیر یافته است. همچنین هضم آنزیمی و تعیین توالی حاکی از تشکیل سازواره نهایی **pcDNA3.1(-)-flaA** 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 **pcDNA3.1(-)-flaA** قادر به بیان محصول پروتئینی ژن **flaA** *هلیکوباکتر پیلوری* در سلول‌های جانوری می‌باشد و پروتئین فلاژلین یکی از آنتی ژن‌های مهم این باکتری است. بنابراین به درستی می‌توان گفت که سازواره ژنی **pcDNA3.1(-)-flaA** 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

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری مارپیچی، کم هوازی (میکروآئروفیلیک) 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 دهندهٔ 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 فراوان‌تر flaA مرکب از ۱۵۳۰ نوکلئوتید که در سرتاسر رشته پراکنده است و پروتئین بزرگ‌تر 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 کلونیزاسون 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

در مقایسه با سایر واکسن‌ها 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 واکسن‌های نوترکیب، هدف ما از این مطالعه طراحی، ساخت سازواره ژنی و بررسی بیان ژن flaA *هلیکوباکتر پیلوری* در سلول‌های یوکاریوتی CHO می‌باشد.

موادوروش‌ها

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* سویهٔ 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 سویهٔ Top10F برای کلون سازی و تکثیر ژن‌های نوترکیب 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/Tاست) 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 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 DNAو 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´	CTGGGTACCCTAAGTTAAAAGCCTTAAGATA-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- پریم 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.

تکثیر ژن flaA با روش واکنش زنجیرهای پلی‌مراز (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 MgCl2 با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و ۲۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میلی‌مولار 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 پلیمراز Taq با غلظت ۵ واحد در هر میکرولیتر به علاوه ۰/۷۵ میکرولیتر آب مقطر) در یک میکروتیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری، مخلوط شدند. در آخر ۲ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA *هیلکوباکتر 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 سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه) و مرحله دوم متشکل از ۳۰ چرخه سه قسمتی بود. قسمت اول جهت دناتوره کردن (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) و قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) بود. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در حرارت ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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.

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)، خالص‌سازی 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 باکتری‌های E. coli سویه TOP10F که به روش شیمیایی با استفاده از کلرید کلسیم(۰/۱ مولار) مستعد شده بودند، ترانسفورم شد. سپس باکتری‌های ترانسفرم شده روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه داده شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، به منظور حفظ و تکثیر باکتری‌های ترانسفرم شده، تعداد ۲۰ کلنی به صورت تصادفی انتخاب و از آنها روی پلیت LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ماتریکس تهیه شد. ماتریکس‌های حاصل به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. 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 درستی کلون‌سازی ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن flaA و انجام PCR، همچنین هضم آنزیمی با آنزیم‌های EcoRVو 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-flaAکه در مرحله قبل تخلیص و تأیید گردیده است، با استفاده آنزیم‌های محدودالاثر EcoRV و KpnI بریده شد. تا ژن flaA از وکتور جدا گردد. از طرف دیگر، وکتور بیانی pcDNA3.1(–) نیز توسط آنزیم‌های 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. واکنش‌گرهای مرحله اتصال به صورت، ۳ میکرولیتر از حامل pcDNA3.1(–) (۶۰ نانوگرم)، ۹ میکرولیتر از ژن FlaA (۱۸۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر از بافر ۱۰X 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 آنتی‌بیوتیک، مطابق مرحله قبل انجام شد. تأیید درستی سازواره نهایی flaA– pcDNA3.1(–)با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و نهایتاً تعیین توالی بررسی شد.

انتقال سازواره نهایی flaA– pcDNA3.1(–)به سلول‌های 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 سلول‌ها از روش الکتروپوریشن (دستگاه مدل Gene Pulser Xcell شرکت Bio-Rad آمریکا) بهره گرفته شد. به منظور انجام الکتروپوریشن. تعداد ۲×۱۰۶ از سلول‌های 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 سلول‌های درون کووت در شرایط استریل (زیر هود) اضافه شد و کووت به مدت ۵ دقیقه روی یخ و پس از خشک و تمیز نمودن دیواره‌های 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 FBS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 قرار داده شدند. سپس به هر یک فلاسک‌های کشت مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی بیوتیک نئومایسن (مارکر انتخابی برای سلول‌های ترانسفرم شده با وکتور نوترکیب) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر در انکوباتور نگهداری گردیدند.

انجام SDS-PAGE

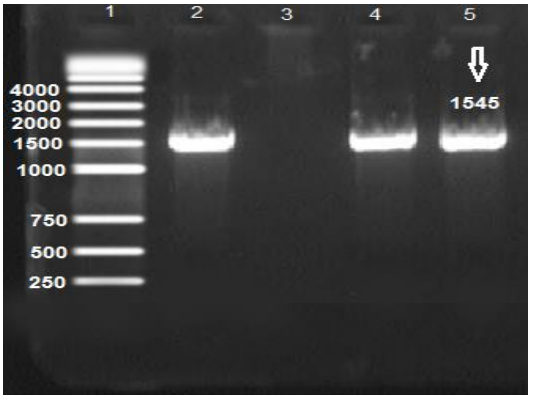
الکتروفورز ژل پلی آکریلامید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) تکنیکی برای جداسازی پروتئین‌ها براساس توانایی حرکتشان در یک جریان الکتریکی براساس طول زنجیره پلی پپتیدی یا وزن مولکولی‌شان می‌باشد. در این روش با استفاده از دترجنت سدیم دودسیل سولفات ساختار دوم و سوم پروتئین از بین می‌رود و پروتئین‌ها به صورت 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 Resolving و Stacking 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 thow) متلاشی شدند و سوسپانسیون حاصل از عصارهٔ 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 DNAی تخلیص شده 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.

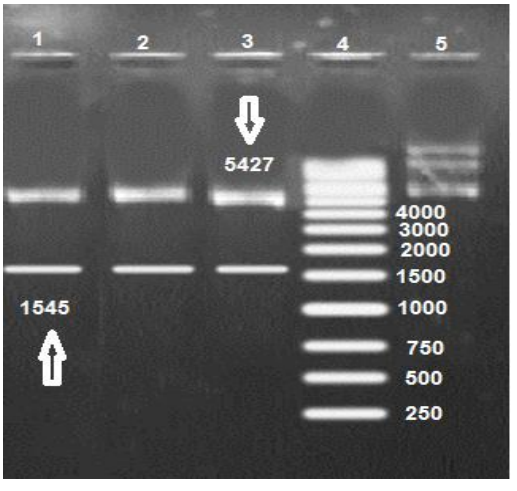


شکل ۱) تکثیر ژن flaA به روش PCR.
ستون ۱: مارکر 1kb ساخت شرکت فرمنتاز، ستون ۲، ۴ و ۵: باند ۱۵۴۵ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن flaAو ستون ۳: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)

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 به‌دست 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 کلون سازی ژن

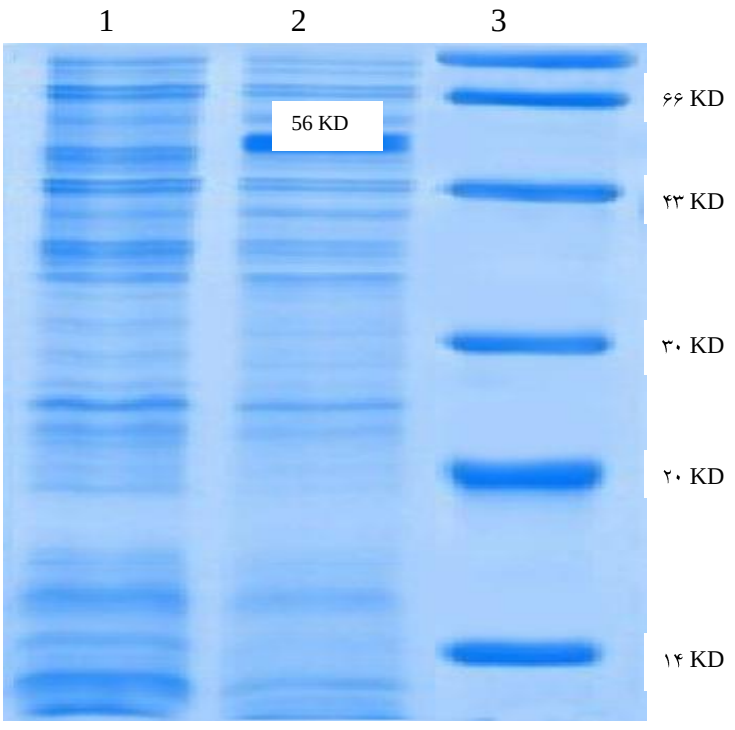
flaA در پلاسمید pTZ و تشکیل وکتور نوترکیب pTZ-flaA را مشخص کردند. برای بیان ژن flaA لازم است این ژن از درون وکتور نوترکیب pTZ-flaA خارج و در یک وکتور بیانی یوکاریوتی درج شود. به این منظور از وکتور بیان شونده یوکاریوتی pcDNA3.1(–) استفاده شد. نتایج درج ژن flaA در این وکتور بیانی که با روش‌های، هضم آنزیمی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



شکل ۲) هضم آنزیمی سازواره نهایی pcDNA3.1(–)-flaA با دو آنزیم EcoRV وKpnI
ستون ۱، ۲ و 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 فرمنتاز و ستون ۵: پلاسمیدpcDNA3.1(–)-flaA بدون انجام هضم آنزیمی

الکتروپوریشن و بیان ژن

پس از الکتروپوریشن سازواره نهایی pcDNA3.1(–)-flaA 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 آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند که مؤید دریافت پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(–)-flaAمی‌باشد. نتایج حاصل از الکتروفورز عصاره این سلول‌ها روی ژل عمودی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی آن با کوماسی بلو نشان داد، باند ۵۶ کیلودالتونی مربوط به محصول ژن flaA در سلول‌های ترانسفرم شده تشکیل شده است (شکل ۳).



شکل ۳) نتیجه بیان ژن flaA و تشکیل پروتئین ۵۶ کیلو دالتونی
شماره ۱: سلول ترانسفرم نشده شماره۲: سلول ترانسفرم شده با پلاسمید بیانی pcDNA3.1(-)-flaAو شماره ۳: مارکر

بحث

هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عوامل عفونی در جوامع انسانی می‌باشد. علی‌رغم تلاش‌های بسیار در راستای یافتن واکسن برای پیشگیری از این عفونت، تا کنون واکسن مؤثری علیه آن تولید نشده است (۱۹).

مهم‌ترین رکن در اثر بخشی یک واکسن، قدرت آنتی‌ژنیسیته آن است. از جمله آنتی ژن‌های مهم *هلیکوباکتر پیلوری*، می‌توان آنتی ژن‌های تاژکی را نام برد. *هلیکوباکتر پیلوری* بین ۵ تا ۷ تاژک دارد که به باکتری، قدرت تحرک و کلونیزاسیون می‌بخشد. بررسی‌ها نشان داده که موتاسیون‌هایی که سبب حذف فلاژل‌های باکتری می‌گردند، موجب کاهش بیماری‌زایی باکتری می‌شوند. پروتئین‌های تاژکی در *هلیکوباکتر پیلوری* شامل پروتئین‌های اصلی (FlaA) و فرعی (FlaB) می‌باشند. بررسی سرم بیماران مبتلا به *هلیکوباکتر پیلوری*، وجود آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های FlaA و FlaB را اثبات نموده است (۲۰).

یان (Yan) و همکاران، اقدام به ایجاد سازواره ژنی بر اساس ژن‌های 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 همسانه‌سازی T/A، کلون کردند. سپس ژن‌های 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 می‌باشد. این محققان نشان دادند که بیان ژن‌های تاژکی به صورت نوترکیب در سیستم پروکاریوتی موفقیت‌آمیز 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 شده‌اند. 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* می‌باشد (۲۲). به طور کلی، ژن‌های مسئول رمزگذاری پروتئین‌های تاژکی در ایجاد تحریک سیستم ایمنی میزبان از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

در تحقیق دیگری که صورت گرفته، جداسازی و کلون سازی ژن flaA و تعداد دیگری از ژن‌های تاژکی باکتری کامپیلوباکتر ژوژنی انجام شده است. این باکتری از لحاظ ساختار و بسیاری از خصوصیات، جزء نزدیکترین باکتری‌ها به *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد. این محققان ژن‌های 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 ژن‌های متعدد تاژکی شامل flaA، fliH، fliE، flgE1، flgG و flgK بود و نتیجه‌گیری نمودند که ژن های فلاژلی از پتانسیل لازم برای توسعه به صورت واکسن برخوردارند. تحقیق مذکور مؤید انتخاب مسیر درست در کار ماست که ایجاد واکسن نوترکیب بر اساس ژن flaA چه به صورت پپتیدی و یا به صورت واکسن ژنی، ارزش و اهمیت بررسی و ارزیابی دارد (۲۳).

گروهی از محققان، ژن flaA ویبریو پاراهمولیتیکوس را کلون سازی و بیان نمودند. این پژوهشگران پیشنهاد نمودند که پروتئین نوترکیب FlaA می‌تواند به عنوان یک واکسن نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد یا می‌توان 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، کلون‌سازی و بررسی بیان ژن flaA *هلیکوباکتر پیلوری* یا نمونه‌ای دیگری از باکتری‌ها را مد نظر قرار داده‌اند. بیشتر آنها با توجه به بررسی‌های صورت گرفته، پیشنهاد داده‌اند که ژن flaA یا پروتئین نوترکیب حاصل از آن، از ویژگی‌های لازم برای کاربرد در زمینه تحقیقات واکسن را دارد. در تحقیق ما نیز ژن flaA *هلیکوباکتر پیلوری* به عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های 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 بافت‌های جانوری و تحقیق به صورت in vivoرا می‌دهد تا در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرد. هر چند بسیاری از انواع واکسن‌ها تاکنون علیه *هلیکوباکتر پیلوری* آزمایش شده‌اند اما همچنان نیاز به تحقیقات بیشتر تا دستیابی به واکسنی مؤثر احساس می‌شود (۱۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از SDS-PAGE که نشان دهندهٔ 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 نامهٔ 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 تإمین 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 Immun 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, Hiett 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.

OriginalArticle

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

M. Sadeghi [1], 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 essential 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 on immunization. This study aimed 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 using the specific primers. Then, this gene was cloned into pTZ vector by T/A cloning technique. To express *flaA* gene and generate the final construct, the *flaA* gene was removed from pTZ plasmid and subcloned 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 using the SDS-PAGE method.

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 pyloriflaA* gene expression in CHO cells showed that the generated gene construct could express the *flaA* product in a eukaryotic system, successfully.

Conclusion: Given that the pcDNA3.1 (-)-*flaA* as a final construct can express the *flaA* protein of the *Helicobacter pylori* in animal cells. Flagellin protein is one of the essential antigens of the bacterium So we can appropriately say that gene pcDNA3.1(-)-*flaA* construct is a suitable candidate for usage in the field of gene vaccines against *Helicobacter pylori* and it can be used to check the immunization in the laboratory animals in the future research.

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 FlaAGene 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.

[*]*Addressforcorrespondence:* 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