

## کلون سازی ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در ناقل یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 به منظور تولید واکسن ژنی

نویسندگان:

مریم صفرپور<sup>۱</sup>، زهرا کاظمی<sup>۱</sup>، الهام دوستی<sup>۲</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

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

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.4, Winter 2017

### چکیده:

**مقدمه:** هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین باکتری مولد التهاب معده، سرطان و لنفوم معده و زخم‌های گوارشی در انسان است. تیول پراکسیداز توسط ژن tagD کد می‌شود و در کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد. محصول ژن tagD سبب تحریک سیستم ایمنی در بدن میزبان می‌شود. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و کلونینگ ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری در ناقل یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 به عنوان کاندیدای واکسن ژنی بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، قطعه ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری به طول ۵۳۷ جفت باز با استفاده از روش PCR تکثیر شد. سپس محصولات PCR با استفاده از کیت کلون سازی شرکت ترمو فیشر در وکتور pTZ کلون گردیدند. ساب کلونینگ این ژن در وکتور بیانی یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 انجام شد و سپس با روش الکتروپوریشن به سلول‌های CHO منتقل و بیان گردید.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل نشان دهنده تکثیر و کلون سازی موفق ژن tagD و تشکیل وکتور pTZ-tagD می‌باشد. نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت کلون سازی این ژن در وکتور PFLAG-CMV-3 را تأیید کرد. بررسی بیان این ژن به روش SDS-PAGE تشکیل باند ۱۹ کیلو دالتونی مربوطه را نشان داد.

**نتیجه گیری:** ژن tagD کلون سازی شده در وکتور نو ترکیب PFLAG-CMV-3-tagD توان تولید محصول پروتئینی اختصاصی این ژن در سلول‌های CHO را دارد. از این رو سازواره ژنی مذکور برای بررسی ایمنی‌زایی در مدل حیوانی به عنوان واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری مناسب به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، tagD، کلونینگ، الکتروپوریشن

### مقدمه:

تأیید شده است و همین امر موجب شده است که اژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی نام این باکتری را در ردیف عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد [۳]. تفاوت معناداری بین گسترش این عفونت در کشورهای غربی و کشورهای در حال توسعه به چشم می‌خورد. شیوع سرولوژی مثبت هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای در حال توسعه ۹۰ درصد جمعیت است، در حالی که در کشورهای توسعه‌یافته، به‌استثنای ژاپن، شیوع زیر ۴۰ درصد است [۴]. این سرطان که مسئول مرگ ۶۵۰۰۰ نفر در جهان در سال ۲۰۰۰ بوده است، چهارمین بدخیمی رایج در دنیا است و ۱۰ درصد از کل مرگ‌ومیر سالیانه سرطان را به خود

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله‌ای شکل و میکرواثر فیل است که در سطح مجرای پوشش معده دیده می‌شود. این باکتری دلیل اصلی گاستریت فعال و مزمن، زخم معده و دوازدهه است. همچنین موجب التهاب طولانی در مخاط معده به وسیله نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها می‌شود. از آنجایی که این باکتری در لایه عمقی موکوس پوشاننده سلول‌های اپی تلیال معدی رشد کرده و تشکیل کلنی می‌دهد، یافته‌های آندوسکوپی خاصی نداشته و در نتیجه تشخیص بالینی آن مشکل است [۲۱]. با بررسی‌های انجام شده، نقش هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد بدخیمی و سرطان معده

Pars J Med Sci 2017;14 (4):43-50

\* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۸۲۳۶۳۸ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

اصلاح: ۱۳۹۵/۱۲/۳ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۳

دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۴

کننده آنتی ژن مورد نظر است که بدلیل داشتن پرموتر خاص جدا شده از ویروس های انسانی (مانند سایتومگالو ویروس) سبب القا ژن در داخل سلول ها و ارائه آن به سیستم ایمنی می شود؛ بنابراین پروتئین نوترکیبی که برای تحریک سیستم ایمنی لازم است به جای آن که در خارج از بدن تهیه و تجویز شود (مانند واکسن نوترکیب هپاتیت ب)، در داخل بدن تولید می شود. پروتئین القاشده که کاملاً شکل طبیعی خود را دارد، با طی مراحل مختلف سبب تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی می شود [۱۰].

این پژوهش باهدف ساخت ناقل نوترکیب حامل ژن tagD و بیان آن در سلول جانوری به عنوان کاندیدایی برای طراحی واکسن ژنی علیه این باکتری انجام شد.

## روش کار:

### سویه های باکتریایی، وکتورها و سلول جانوری

در این مطالعه تجربی، باکتری هلیکوباکتر پیلوری سویه استاندارد ATCC 43504 به منظور استخراج ژن tagD و باکتری E. coli سویه Top10F که به منظور ترانسفورماسیون و تکثیر سازه های ژنی نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند از مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد شهرکرد تهیه شدند. از وکتور PTZ T/A Cloning به منظور انجام روند کلونینگ و از وکتور بیانی یوکاریوتی PFLAG-CMV-3 برای ساب کلونینگ استفاده شد. سلول های جانوری CHO یا سلول تخمدان هامستر چینی (Chinese Hamster Ovary) به عنوان سلول پذیرنده جهت ترانسفورماسیون و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت.

### استخراج DNA و تکثیر ژن tagD

استخراج DNA (با استفاده از کیت سیناژن، طبق دستورالعمل مربوطه) انجام شد. کمیته و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده الکتروفورز ۱ درصد ژل آگارز و اسپکتوفتومتر نانودراپ (ND2000 Thermo) تأیید شد.

جهت طراحی پرایمر، توالی ژن tagD باکتری هلیکوباکتر پیلوری با شماره دسترسی AF021091 از بانک ژنی (National center for biotechnology information (NCBI)) تهیه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در مراحل مختلف انجام کار

اندازه محصول	توالی پرایمر (۵' به ۳')	نام پرایمر	نام ژن
۵۳۷ جفت باز	AGCAGATCTATTAGAAAGGATTTAACCATGC	tagD-F	tagD
	TCCGATATCTAACTTCTATTCCAACAC	tagD-R	

۲/۵، MgCl<sub>2</sub> 50 mM، میکرو مول ۱/۵، dNTP 10 mM، میکرو لیتر بافر PCR (10X) و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA

اختصاص می دهد. عفونت هلیکوباکتر پیلوری در ایران نیز شایع بوده و این شیوع بین ۶۰-۹۰ درصد است، به خصوص سرطان معده از آمار بالایی برخوردار است. این مطلب نشان می دهد که ایران یک منطقه بسیار خطرناک برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری است [۵ و ۶]. در یک مطالعه شیوع ابتلا به این باکتری در استان اردبیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان شیوع در شهر اردبیل ۸۹/۵ درصد بوده است که این میزان بالاترین شیوع را در کشور به خود اختصاص داده است [۷].

ژن tagD در هلیکوباکتر پیلوری پروتئین تیول پروکسیداز (Helicobacter pylori thiol peroxidase (HpTpx)) را کد می کند که پلی پپتیدی با ۱۶۶ آمینو اسید است [۸]. تیول پراکسیداز یکی از آدهسین های مهم هلیکوباکتر پیلوری است و در کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد [۸ و ۹]. همچنین این ژن نقش مهمی در فعال کردن هلیکوباکتر پیلوری برای زنده ماندن در شرایط استرس اکسیداتیو معده ایفا می کند. تیول پراکسیداز یکی از اعضای خانواده پروتئین های پروکسی ردوکسین (Peroxiredoxin (PRX)) می باشد و از فراوان ترین آنزیم های آنتی اکسیدانی در هلیکوباکتر پیلوری است. با این که مطالعات زیادی پیرامون هلیکوباکتر پیلوری انجام شده است، اطلاعات محدودی در خصوص ویژگی های بیوشیمیایی HpTpx در دسترس است. تیول پراکسیداز هلیکوباکتر به عنوان اسکاونجر (بازدارنده) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در حضور تیوردوکسین (Thioredoxin (Trx)) عمل می کند. میکروارگانیسم هایی که در آن ها HpTpx بی اثر شده است، نوعی کاهش توانایی در کلونیزاسیون و تجمع در معده موش های میزبان از خود بروز می دهند و از سویی دیگر به از بین رفتن توسط پراکسید و سوپراکسید در مقایسه با باکتری نوع وحشی حساس تر هستند. HpTpx همچنین نقش مهم و حیاتی را در مقابله با فشار اکسیداتیو ایفا می کند و سبب تحریک سیستم ایمنی در بدن میزبان می گردد. بررسی های اخیر حاکی از مقاومت گسترده عفونت هلیکوباکتر پیلوری به درمان های آنتی بیوتیکی است [۹].

از این رو ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری (مانند واکسن ژنی) مطرح می شود. واکسن های ژنی عبارتند از تزریق مستقیم پلاسمید (DNA) خاص، حاوی ژن رمز

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۲/۵ میکرو لیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرو مول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مول

ساب کلونینگ نیز به روش PCR و هضم آنزیمی تأیید و در نهایت تعیین توالی توسط شرکت Gen Ray انجام شد.

### انتقال سازواره نهایی PFLAG-CMV-3-tagD به سلول‌های جانوری

در این مطالعه به منظور بررسی بیان ژن tagD در سلول جانوری، از سلول CHO یا همان سلول تخمدان هامستر چینی و برای ترانسفورمیشن این سلول‌ها از روش الکتروپوریشن استفاده شد. به منظور انجام الکتروپوریشن از دستگاه الکتروپوریشن مدل Gene Pulser Xcell ساخت شرکت Bio Rad آمریکا کمک گرفته شد. تعداد  $10^6 \times 2$  از سلول‌های CHO شمارش و در حجم ۴۰۰ میکرولیتر در کووت ۴/۰ مخصوص الکتروپوریشن به همراه ۸۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از وکتور نوترکیب PFLAG-CMV-3-tagD ریخته شد. پالس الکتریکی با شرایط بهینه‌سازی شده  $0.174/4$  کیلو ولت و ۴۰۰ میکرو فاراد به سلول‌ها داده شد و سلول‌های حاصل در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین (۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت داده شدند.

### انجام SDS-PAGE

در نهایت وزن مولکولی و محل قرار گرفتن پروتئین بیان‌شده درون سلول‌های یوکاریوتی CHO، به وسیله آزمون SDS-PAGE (Sodium dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) تأیید شد. سلول‌های CHO ترانسفورم شده به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور بر دقیقه رسوب داده شدند. به رسوب سلولی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS اضافه و در نهایت سلول‌های حاصل روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی انجام شد.

### یافته‌ها:

تکثیر و جداسازی ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری الکتروفورز DNA تخلیص شده روی ژل آگارز ۱ درصد، نشان دهنده کیفیت مناسب DNA بود. همچنین غلظت DNA استخراجی برابر با ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود و این مطلب کیفیت مناسب DNA استخراجی را تأیید کرد. محصول PCR با اندازه قطعه مورد نظر ۵۳۷ جفت بازی همخوانی داشت (شکل ۱).

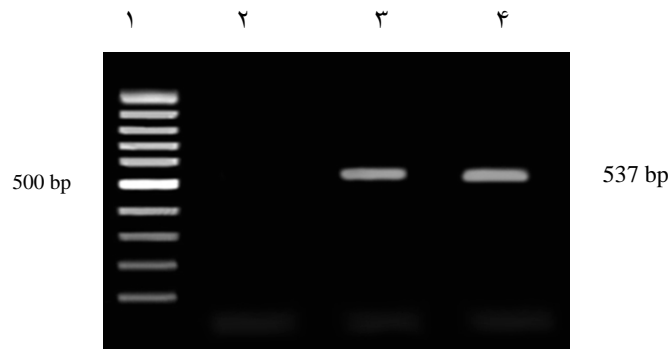
Polymerase انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طولی شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طولی شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول نهایی PCR در ژل آگارز یک درصد واجد اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شد و با اشعه ماورابنفش مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص‌سازی (شرکت Bioneer ساخت کشور کره جنوبی) مطابق دستورالعمل شرکت، از ژل آگارز خالص‌سازی شد.

### کلون سازی T/A

برای این منظور، محصولات PCR تخلیص شده از ژل با استفاده از کیت PTZ T/A Cloning (ساخت شرکت فرمتاز کشور آلمان) کلون و در باکتری اشرشیا کلی سویه TOP10 F ترانسفورم شدند. در مرحله بعد، باکتری‌های یادشده در محیط LB آگار محتوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت داده شدند. سپس تأیید اولیه صحت کلونینگ به روش PCR صورت گرفت و پس از آن، از کلنی‌های حاصل (با استفاده از کیت شرکت Bioneer ساخت کشور کره جنوبی) تخلیص پلاسمید انجام شد و تأیید نهایی سازه حاصل (PTZ-tagD) به کمک روش هضم آنزیمی صورت گرفت. طراحی وکتور PTZ استفاده شده در این پژوهش به گونه‌ای بود که در دو طرف ژن کلون شده واجد سایت برش آنزیم BglIII و EcoRV باشد.

### کلون سازی ژن در وکتور بیانی

در مرحله بعد، قطعه ژن tagD به وسیله هضم آنزیمی با آنزیم‌های EcoRV و BglIII از وکتور PTZ جداسازی و درون وکتور بیانی PFLAG-CMV-3 وارد شد. واکنش الحاق بین وکتور PFLAG-CMV-3 و قطعه tagD با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز انجام گرفت و سازه PFLAG-CMV-3-tagD ساخته شد. وکتورهای حاصل از طریق ترانسفورماسیون به سلول‌های میزبان E. coli محیط حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین وارد شدند. صحت



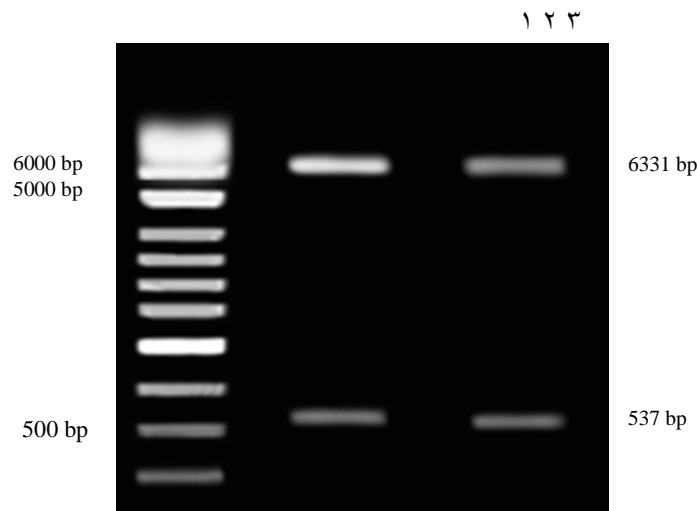
شکل ۱: محصول PCR ژن tagD با اندازه ۵۳۷ جفت باز

جفت باز مربوط به وکتور و قطعه دیگر به اندازه ۵۳۷ جفت باز مربوط به ژن tagD شد.

پس از انجام هضم آنزیمی وکتور PTZ در مرحله قبل، قطعه ژن مورد نظر از ژل آگارز استخراج و درون حامل PFLAG-CMV-3 با موفقیت ligate شد. صحت ساب کلونینگ در مرحله اول به وسیله PCR و پس از آن با استفاده از هضم آنزیمی (با دو آنزیم EcoRV و BglIII) مورد تأیید قرار گرفت. به طوری که برش وکتور PFLAG-CMV-3- tagD با دو آنزیم یادشده سبب تشکیل دو قطعه، یکی به اندازه ۶۳۳۱ جفت باز مربوط به وکتور PFLAG-CMV-3 و یک قطعه دیگر به اندازه ۵۳۷ جفت باز مربوط به ژن tagD شد که نشان دهنده تشکیل سازواره نهایی بود (شکل ۲).

### کلون سازی T/A و ساب کلونینگ

کلون سازی محصول PCR به روش T/A کلونینگ در وکتور PTZ انجام و سپس درون سلول‌های مستعد اشرشیا کلی سویه TOP10F ترانسفورم شد. به منظور تأیید صحت همسانه سازی قطعات ژنی مذکور، از آزمون‌های PCR و هضم آنزیمی استفاده شد. واکنش PCR نشان داد که کلون‌های حاصل واجد سازه ژنی نامبرده هستند. پس از استخراج پلاسمید در حضور آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و انجام هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های BglIII و EcoRV، حضور قطعه ژنی مذکور در وکتور PTZ تأیید شد. به طوری که برش آنزیمی سبب تشکیل دو قطعه به اندازه ۲۸۸۶



شکل ۲: هضم آنزیمی سازواره نهایی PFLAG-CMV-3- tagD با دو آنزیم *EcoRV* و *BglIII* باند ۶۳۳۱ جفت بازی مربوط به وکتور PFLAG-CMV-3 و باند ۵۳۷ جفت بازی مربوط به ژن tagD

سلول‌های CHO انجام و صحت آن به وسیله رشد در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین و واکنش PCR تأیید شد. به منظور بررسی

### الکتروپوریشن و بیان ژن

الکتروپوریشن سازواره نهایی PFLAG-CMV-3-tagD در

بیان ژن tagD در این سلول‌ها، واکنش SDS-PAGE انجام شد. محصول پروتئینی حاصل از ژن tagD به وزن ۱۹ کیلو دالتون نشان دهنده بیان این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی CHO بود.

### بحث:

در این پژوهش ژن tagD از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR جداسازی و تکثیر و سپس در وکتور pTZ کلون و وکتور نو ترکیب pTZ-tagD ایجاد و تأیید شد. این وکتور نو ترکیب می‌تواند به عنوان مخزنی از ژن tagD برای پژوهش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفته یا در اختیار سایر پژوهشگران کشور قرار گیرد. سپس با انتقال ژن از وکتور pTZ-tagD به پلاسمید یوکاریوتی PFLAG-CMV-3، سازواره نهایی PFLAG-CMV-3-PFLAG-CMV-3-tagD ایجاد شد. از آنجایی که بیان یوکاریوتی ژن هدف در سلول‌های جانوری دیده شد، به نظر می‌رسد بتوان از این وکتور نو ترکیب جدید برای انجام پژوهش‌هایی نظیر آزمایشات واکنش ژنی یا تولید واکنش پپتیدی علیه هلیکوباکتر پیلوری که بیشتر جوامع انسانی در جهان با آن درگیر هستند و هنوز واکنش موثری برای پیشگیری از این عفونت تولید نشده، استفاده کرد. سد مخاطی معده از چندین لایه به نام‌های لایه پیش اپی تلیال (موکوس)، اپی تلیال و پس اپی تلیال (فیبروبلاست و سلول‌های ایمنی) تشکیل شده است. هرگونه اختلال در این ناحیه منجر به انواع مشکلات بالینی از جمله التهاب و یا حتی سرطان معده می‌شود. به منظور ایجاد و توسعه یک بیماری توسط عوامل عفونی در این نواحی، عامل باکتریایی باید بر سد این ناحیه غلبه کند. در میان باکتری‌های پاتوژن، باکتری هلیکوباکتر پیلوری نقش حیاتی در توسعه التهاب، زخم و آدنوکارسینوم دارد و این امر به دلیل دارا بودن سازوکارهای مختلف برای فرار از این سد و پاسخ میزبان است [۱۱]. عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی در جوامع انسانی است و مطالعات نشان می‌دهند که بیش از ۵۰ درصد از جمعیت جهان به این باکتری آلوده هستند [۱۲ و ۱۳]. در ۱۰-۱۵ درصد افراد این عفونت می‌تواند منجر به التهاب شدید، بیماری زخم معده، لنفوم و یا سرطان معده شود [۱۱]. مطالعات نشان داده‌اند که اشخاص میزبان این باکتری ۲/۲۶ برابر بیشتر از سایرین در معرض خطر سرطان معده هستند [۱۴]. هلیکوباکتر پیلوری جزء متغیرترین میکروارگانیسم‌ها به لحاظ ژنتیکی در بین باکتری‌ها محسوب می‌شود. مطالعات متعددی به منظور تعیین عوامل بیماری‌زا برای آزمایش‌های غربالگری این باکتری انجام گرفته است. جهش‌های اتفاق افتاده روی ژنوم این باکتری کار تشخیص آن را بسیار مشکل کرده است و با مزمن شدن این عفونت زمینه برای ایجاد سرطان فراهم می‌شود [۱۵]. با توجه به دشوار بودن تشخیص

بیماری در مراحل اولیه، مقاوم شدن این باکتری به درمان‌های آنتی بیوتیکی و گسترش بیماری در سطح بالا، نیاز به درمان‌های اختصاصی و نوین نظیر طراحی واکنش اختصاصی برای مبارزه با آن احساس می‌شود. یکی از روش‌های ارزشمندی که مورد توجه متخصصین ایمنی‌شناسی قرار گرفته است، تجویز پلاسمید حاوی ژن رمز کننده آنتی‌ژن‌ها موسوم به واکنش‌های ژنی است که نسل سوم واکنش‌ها را شامل می‌شود [۱۰ و ۱۶]. به دلیل افزایش اختصاصی بودن، پیشگیری از تخریب باکتری‌های فلور طبیعی دستگاه گوارش و کاهش عوارض جانبی، آنتی‌ژن‌های اختصاصی از هلیکوباکتر پیلوری با قدرت ایمنی‌زایی بالا استفاده می‌شود [۱۷] که از این میان ژن tagD هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی است. ژن tagD که پروتئین تیول پراکسیداز در هلیکوباکتر پیلوری (HpTpx) را رمزدهی می‌کند، یکی از مهم‌ترین مولکول‌های چسبان در هلیکوباکتر پیلوری و یک پروتئین آنتی‌اکسیدان است که در توانمندسازی هلیکوباکتر پیلوری به منظور بقا و زنده ماندن در فشار و استرس اکسیداتیو معده نقش ایفا کرده و در کلونیزاسیون این باکتری در مخاط معده نقش حیاتی دارد [۹ و ۱۸]. با وجود مطالعات گسترده انجام شده روی هلیکوباکتر پیلوری، تاکنون هیچ مطالعه اختصاصی روی ژن tagD انجام نشده است، در حالی که بررسی‌های مشابهی روی دیگر ژن‌های بیماری‌زایی هلیکوباکتر انجام گرفته است. پژوهشگران ایرانی در سال ۲۰۰۹، مطالعه‌ای روی ژن hpaA هلیکوباکتر پیلوری انجام دادند. در این مطالعه ژن hpaA درون وکتور بیانی پروکاریوتی pET28a کلون و درون باکتری E. coli BL21DE3 ترانسفورم و بیان پروتئین نو ترکیب HpaA به وسیله واکنش SDS-PAGE درون میزبان جدید تأیید شد [۱۹]. همچنین مطالعه مشابه دیگری در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت که در آن ژن بیماری‌زای ureB122 هلیکوباکتر پیلوری درون وکتور pET32a کلون و درون سلول‌های باکتریایی E. coli BL21DE3 ترانسفورم شد. بررسی میزان بیان پروتئین مذکور توسط واکنش SDS-PAGE انجام و پس از تأیید، به عنوان کاندید واکنش معرفی شد [۲۰]. همچنین گانزالز و همکاران در سال ۲۰۱۳، ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری را جداسازی و درون وکتور بیانی پروکاریوتی کلون کردند. بیان پروتئین ۸۰ کیلو دالتونی CagA صحت انجام کار را تأیید کرد [۲۱]. در سال ۲۰۱۴، ژن ureA هلیکوباکتر پیلوری توسط پژوهشگران ایرانی، در وکتور pTZ57R/T کلون و درون میزبان DH5α ترانسفورم و پس از تأیید، درون وکتور بیانی ساب‌کلون و بیان پروتئین مربوطه مورد بررسی قرار گرفت. خلوص بالای پروتئین بیان شده تأیید و به عنوان واکنشی بر پایه پروتئین علیه این باکتری پیشنهاد شد [۲۲]. در همه موارد بالا، از ژن‌های رمزگذار آنتی‌ژن‌های مختلف

می‌شود که کار درمان را سخت می‌کند، راه اصلی مبارزه با این نوع سرطان نیز همچون التهاب و زخم معده، پیشگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. از آنجاکه مبارزه با این عفونت همواره با مشکلاتی همراه است، رویکردهای پژوهشی در زمینه به‌کارگیری اختصاصی و نوین روش‌های مهندسی ژنتیک برای مقابله با این عفونت از جمله تولید واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری است. ایجاد سازواره ژنی با استفاده از ژن tagD هلیکوباکتر پیلوری به عنوان کاندیدای مناسبی جهت ساخت واکسن ژنی علیه این باکتری است. هر چند تا رسیدن به یک واکسن مطلوب راه طولانی در پیش است.

### تشکر و قدردانی:

محققان و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد برای همکاری در اجرای این پژوهش اعلام نمایند.

### تعارض منافع:

هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

هلیکوباکتر پیلوری به منظور انجام پژوهش‌های کلون سازی ژن استفاده شده است. در پژوهش حاضر نیز یکی از آنتی‌ژن‌های مهم هلیکوباکتر پیلوری مد نظر بوده است، اما اختلاف در انتخاب وکتور یوکاریوتی برای ایجاد سازواره نهایی از ژن tagD بود که هیچ یک از پژوهش‌های مورد اشاره بالا از آن بهره نگرفته و هدف آن‌ها تولید محصول پروتئینی برخی از ژن‌های باکتری مذکور به منظور تولید واکسن‌های پپتیدی بوده است. سازواره نهایی تولید و تأیید شده در این پژوهش، پتانسیل دوگانه برای تولید پروتئین نوترکیب و یا کاربرد مستقیم در حیوانات آزمایشگاهی به عنوان واکسن DNA را دارد. این وکتور نوترکیب در صورت تزریق به عضلات حیوانات آزمایشگاهی ممکن است با محدودیت مشترک موجود برای همه واکسن‌های ژنی روبرو باشد. این محدودیت شامل عدم جذب کافی DNA تزریق شده در سلول‌های هدف است. البته امروزه با کاربرد نانو ذرات یا انجام الکتروپوریشن بافتی میزان جذب واکسن ژنی تزریقی افزایش داشته است.

### نتیجه‌گیری:

با توجه به این که تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه دشوار بوده و در اکثر موارد تشخیص پس از پیشرفت بیماری حاصل

## References:

- Mónica O, Armelle M. The Role of Helicobacter pylori Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology* 2013; 2(3): 1110-1134.
- Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Role of NADPH-insensitive nitroreductase gene to metronidazole resistance of Helicobacter pylori strains. *DARU* 2010; 18(2): 137-140.
- Cover TL. Helicobacter pylori Diversity and Gastric Cancer Risk. *m Bio* 2016; 7(1): 1869-15.
- Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, et al. A review of Helicobacter pylori diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol* 2014; 20(6): 1438-1449.
- Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population based Cancer Registry from Iran. *Int J Cancer* 2003; 107(1): 113-8.
- Souod N, Kargar M, Doosti A, et al. Genetic Analysis of cagA and vacA Genes in Helicobacter Pylori Isolates and Their Relationship with Gastrointestinal Diseases in the West of Iran. *Iran Red Cres Med J* 2013; 15(5): 371-5.
- Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children (south of Iran). *Diagn Micr Infec Dis* 2006; 54(4): 259-61.
- Austin CM, Wang G, Maier RJ. Aconitase Functions as a Pleiotropic Posttranscriptional Regulator in Helicobacter pylori. *J Bacteriol* 2015; 197(19): 3076-3086.
- Wang G, Olczak AA, Walton JP, et al. Contribution of the Helicobacter pylori Thiol Peroxidase Bacterioferritin Comigratory Protein to Oxidative Stress Resistance and Host Colonization. *Infect Immun* 2005; 73(1): 378-384.
- Xu Y, Yuen PW, Ka-Wing Lam J. Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. *Pharmaceutics* 2014; 6: 378-415.
- Mnich E, Kowalewicz-Kulbat M, Sicińska P, et al. Impact of Helicobacter pylori on the healing process of the gastric barrier. *World J Gastroenterol* 2016; 22(33): 7536-7558.
- Glynn MK, Friedman CR, Gold BD, et al. Seroincidence of Helicobacter pylori infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. *Clinic Infect Dis* 2002; 35(9): 1059-65.
- Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, et al. Molecular assessment of clarithromycin resistant Helicobacter pylori strains using rapid and accurate



- PCR-RFLP method in gastric specimens in Iran. *African J Biotechnol* 2011; 10(39): 7675-7678.
14. Yaghoubi M, Byjarchy R. Meta-analysis and review Effect of family history stomach cancer in disease. *J Jahad Univ* 2008; 12(4): 235-237.
15. Salama N, Guillemin K, McDaniel TK, et al. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(26): 14668-73.
16. Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Javadi GR, et al. DNA Vaccine Encoding the Omp31 Gene of *Brucella melitensis* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. *Res J Biol Sci* 2009; 4(1): 126-131.
17. Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, et al. cagA Status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1319-22.
18. Olczak AA, Seyler Jr R, Olson JW, et al. Association of *Helicobacter pylori* Antioxidant Activities with Host Colonization Proficiency. *Infect Immun* 2003; 71(1): 580-583.
19. Najar Peerayeh S, Atoofi J, Hoseinkhani S, et al. Cloning and Expression of *Helicobacter pylori* HpaA Gene. *Yakhteh Med J* 2009; 11(3): 273-276.
20. Najar Peerayeh S, Farshchian M, Sadeghizadeh M, et al. Cloning and Expression of *Helicobacter Pylori* UreB122 (a Segment of the B-subunit of Urease Gene). *Iran J Clin Infect Dis* 2011; 6(4), 120-127.
21. González L, Marrero K, Reyes O, et al. Cloning and expression of a recombinant CagA -gene fragment of *Helicobacter pylori* and its preliminary evaluation in serodiagnosis. *Biomedical* 2013; 33(4):546-53.
22. Mehran MJ, Zendeabad SH, Malla S. 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; 7(1): 111-117.

## Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine

Maryam Safarpour<sup>1</sup>, Zahra Kazemi<sup>1</sup>, Elham Doosti<sup>2</sup>, Abbas Doosti<sup>\*2</sup>

Received: 2016/14/11

Revised: 2017/21/02

Accepted: 2017/13/03

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 14, No.4, Winter 2017

Pars J Med Sci 2017; 14(4):43-50

### Abstract

#### Introduction:

Helicobacter pylori is strongly associated with gastritis, stomach cancer, gastric lymphoma and peptic ulcer in human. Thiol peroxidase is encoded by tagD gene and plays a significant role in colonizing H. pylori in the stomach. The product of tagD gene stimulates the immune system in the host. This study aimed to isolate and clone tagD gene in the eukaryotic expression vector PFLAG-CMV-3 as a DNA vaccine candidate.

#### Materials and methods:

In this experimental research, tagD gene (537 bp) was amplified by PCR. The PCR products were cloned using cloning commercial kits (Thermo Fisher Co., COUNTRY) in pTZ vector. This gene was subcloned in the eukaryotic expression vector (PFLAG-CMV-3 vector), then transferred into CHO cells by electroporation method and was expressed.

#### Results:

The results indicate that amplification and cloning of tagD gene was successful, and the pTZ-tagD vector was formed. PFLAG-CMV-3 vector construction was confirmed by digestion and gene sequencing. The 19 kDa band was observed by gene expression analysis on SDS-PAGE.

#### Conclusions:

tagD gene in the PFLAG-CMV-3-tagD recombinant vector has the ability to produce specific protein in CHO cells. Therefore, this gene construct is useful to evaluate the immunogenicity as a DNA vaccine against H. pylori infection in animal models.

**Keywords:** Helicobacter pylori, tagD, cloning, electroporation

\* Corresponding author, Email: abbasdoosti@yahoo.com