مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۶، آذر ۱۳۹۶، ۸۱۸-۸۰۷

بررسی بیان ژن lnT هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های HDF انسان به روش RT-PCR

راضیه رحمانی‌پیانی[۱]، عباس دوستی[۲]

دریافت مقاله: ۹۶/۲/۱۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۷/۱۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۸/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۶/۸/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری، باکتری مارپیچی شکل و گرم منفی است که موجب بیماری‌های معده و دوازدهه در انسان می‌شود. به دلیل وجود ایراداتی در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، تلاش‌های رو به افزایشی در جهت تولید واکسن مؤثر برای این عفونت صورت گرفته است. هدف از این تحقیق، ساخت سازواره ژنی حامل قطعه ژن lnT و بررسی بیان آن در سلول‌های انسانی به روش RT-PCR است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ژن lnT از ژنوم هلیکوباکتر پیلوری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) جدا شد. همسانه‌سازی محصولات PCR به روش کلون‌سازی T/A در وکتور T مناسب، انجام شد. سپس ژن lnT در وکتور بیانی یوکاریوتی pEGFP-C2 ساب‌کلون گردید. جهت بررسی بیان ژن lnT، سازواره pEGFP-C2-lnT به روش الکتروپوریشن به سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان منتقل و بیان آن به روش RT-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: انجام PCR منجر به تکثیر قطعه ۱۲۹۰ جفت بازی مربوط به ژن lnT گردید. این ژن با موفقیت در وکتور pTZ همسانه‌سازی شد و نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی نشان داد ژن lnT در وکتور بیانی ساب‌کلون گردیده و سازواره نهایی pEGFP-C2-lnT ایجاد شده است. بررسی بیان این ژن به روش RT-PCR، تشکیل باند اختصاصی این ژن را نشان داد.

نتیجه‌گیری: ژن lnT همسانه سازی شده در وکتور بیانی یوکاریوتی pEGFP-C2، توان تولید محصول اختصاصی این ژن در سلول‌های یوکاریوتی را دارد. لذا به‌نظر می‌رسد این سازواره ژنی، از پتانسیل لازم برای بررسی ایمنی‌زایی در مدل حیوانی به عنوان واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری برخوردار باشد.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری،کلونینگ، ژن lnT، RT-PCR

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
تلفن: ۳۳۶۱۰۴۶-۰۳۸۳، دورنگار: ۳۳۶۱۰۴۶-۰۳۸۳، پست الکترونیکی: abbasdoosti@yahoo.com

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، مارپیچی شکل، تاژکدار و میکروآئروفیل است [۱]. این باکتری باعث بروز بیماری‌هایی نظیر گاستریت مزمن، زخم معده، زخم دوازدهه، سرطان معده و لنفوم MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue) می‌گردد. هلیکوباکتر پیلوری از نظر ژنتیکی بسیار متنوع است و این تنوع ژنتیکی شامل چندین ژن بیماری‌زا در هلیکوباکتر پیلوری، نظیر cagA و vacA می‌باشد [۲].

امروزه از روش‌های مولکولی نوین برای تشخیص سریع باکتری‌ها استفاده می‌شود. مثلا" جهت تشخیص میکروارگانیسم‌هایی که در نمونه‌های مورد آزمایش، در مقادیر کم حضور دارند یا غیرقابل کشت می‌باشند، می‌توان از روش PCR، بهره جست. در همین راستا، با کمک آزمایش PCR می‌توان به صورت مستقیم و بدون نیاز به کشت، به تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی معده، پرداخت [۳]. با توجه به خطرات ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری، بهتر است که این عفونت در بیماران مبتلا، با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها تحت کنترل درآید [۴]. با وجود پیدایش هلیکوباکتر پیلوری‌های مقاوم به دارو، لزوم تلاش بیشتر برای پیش‌گیری از این عفونت با کمک واکسیناسیون ضروری به نظر می‌رسد. ژن lnT (Apolipoprotein N-acyltransferase)، ابتدا در باکتری گرم منفی سالمونلا انتریکا کشف شد اما پس از آن، ساختار و عملکرد lnT به صورت دقیق‌تر در باکتری اشریشیاکلی مورد مطالعه قرار گرفت [۵].

به طور کلی ۳٪-۱٪ از ژنوم باکتری‌ها شامل ژن‌هایی است که کدکننده لیپوپروتئین‌هایی هستند که در پوشش سلول قرار می‌گیرند. این لیپوپروتئین‌ها نقش‌های کلیدی متعددی مثل محافظت از یکپارچگی دیواره سلولی، جذب مواد غذایی، ترشح پروتئین، فولدینگ فراسیتوپلاسمی پروتئین‌ها و بیماری‌زایی را دارا می‌باشند [۸-۶]. لیپوپروتئین‌های سنتز شده به عنوان پرولیپوپروتئین‌هایی هستند که توسط ماشین ترشح عمومی Sec (General secretion) یا Tat (Twin arginine translocation) به غشای سیتوپلاسمی منتقل می‌گردند [۹]. توالی سیگنال خاتمه لیپوپروتئین دارای یک موتیف لیپوباکس حفاظت شده شامل چهار اسیدآمینه (LVI/ASTVI/GAS/C) می‌باشد [۷] که این پیش‌سازهای لیپوپروتئین (توالی لیپوباکس) پردازش شده و به اشکال بالغ تبدیل می‌گردند و به سمت غشای خارجی سیتوپلاسم فرستاده می‌شوند. این اعمال توسط سه آنزیم: ۱-پرولیپوپروتئین دی‌آسیل گلیسریل ترانسفراز (lgT) که باعث اتصال دی‌آسیل گلیسریل به سیستین از طریق پیوند تیواتر می‌شود [۱۰]، ۲- پرولیپوپرتئین سیگنال پپتیداز (lspA) که باعث شکافتن سیگنال پپتیدی می‌شود و ۳- آپولیپوپروتئین ان‌آسیل ترانسفراز (lnT) که باعث انتقال آسیل به گروه آمین سیستئین می‌شود، انجام می‌پذیرد [۱۱].

هر سه آنزیم lgT، lspA و lnT برای رشد و زنده ماندن باکتری‌های گرم منفی که در غشای داخلی (سیتوپلاسمی) واقع شده‌اند ضروری هستند [۱۲]. ژن lnT، یکی از لیپوپروتئین‌های مهم پوششی هلیکوباکتر پیلوری را کد می‌کند. تا کنون مطالعه‌ای در مورد کلون-

سازی و بررسی بیان یوکاریوتی و یا پروکاریوتی ژن lnT هلیکوباکتر پیلوری، انجام نشده است اما کلون‌سازی و بررسی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک آن در باکتری‌های گرم منفی دیگری نظیر اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا مطالعه گردیده است [۵ ، ۱۲]. با توجه به خاصیت آنتی‌ژنیک این ژن و از آنجا که تا کنون بیان ژن lnT هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار نگرفته، برای اولین بار در این تحقیق بیان یوکاریوتی ژن lnT در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان (HDF: Human dermal fibroblast) مورد تحقیق قرار گرفته است. به منظور کاربرد ژن lnT در تحقیقات آینده به عنوان واکسن ژنی، لازم است بیان آن در سلول های یوکاریوتی تأیید گردد، لذا هدف از این تحقیق، کلون‌سازی و بررسی بیان اختصاصی ژن lnT هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های یوکاریوتی HDF به روش RT-PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد، از سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری برای استخراج DNA و بدست آوردن ژن lnT استفاده شد. باکتری اشریشیاکلی سویه TOP10F نیز به عنوان میزبان کلونینگ برای تکثیر پلاسمیدها مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از دو وکتور با نام‌های pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, USA) و pEGFP-C2 (Clontech Laboratory Inc., USA) بهره گرفته شد. وکتور pTZ57R/T که برای سهولت نگارش به صورت pTZ نشان داده می‌شود، طولی برابر ۲۸۸۶ جفت بازدارد و نشانگر انتخابی آن، مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است. وکتور pEGFP-C2، یک وکتور بیان‌کننده ژن در سلول‌های یوکاریوتی است و اندازه آن ۴۷۳۵ جفت باز بوده و دارای دو نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین و نئومایسین به ترتیب برای توانایی رشد سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی در محیط‌های انتخابی است. از سلول‌های انسانی HDF به عنوان میزبان یوکاریوتی برای بیان ژن در این تحقیق استفاده شده است.

به منظور استخراج DNA ژنومی از هلیکوباکتر پیلوری، از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) استفاده شد و روش کار مطابق دستورالعمل کیت اجرا شد. مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و علاوه بر آن، غلظت و کیفیت DNA تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000, PeqLab, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۴ - ۱۳]. برای طراحی پرایمرها، توالی ژن lnT با شماره ثبت FM991728 از بانک جهانی ژن NCBI گرفته شد. سپس توسط نرم‌افزار Gene Runner پرایمرهای مناسب طراحی گردیدند. پرایمرهای رفت و برگشت به ترتیب واجد جایگاه برش برای آنزیم‌های *KpnI* و *SacII* (نواحیی که زیر آنها خط کشیده شده است) بوده و توالی آنها به صورت زیر است:

lnT-F: 5´-TTAGGTACCATGCGTCTTCTTCTGTTCAATC-3´
lnT-R:5-ATTCCGCGGTTATGATCGTTTCCTAAAAAG-3

تکثیر ژن lnT از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش‌گرهای PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR

10X، ۱/۵ میکرومول MgCl2، ۲۰۰ میکرومول Mix dNTP، ۱۰۰ نانومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی تخلیص شده از هلیکوباکتر پیلوری و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq (سیناژن، ایران)، در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار گرفت [۳ ، ۱۳]. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد در یک مرحله و سپس ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۶۲ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ چرخه دنبال هم و جهت تکثیر قطعات ناتمام، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش، جهت الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ و بافر TBE 1X (Tris Borate EDTA) استفاده شد. سپس قطعات ژنی مربوط به ژن lnT، از ژل بریده شدند و توسط کیت استخراج DNA از ژل (Bioneer, South Korea)، محصولات PCR خالص شدند [۱۵].

جهت کلون‌سازی محصولات PCR از تکنیک کلون‌سازی T/A استفاده شد. برای الحاق قطعه ۱۲۹۰ جفت بازی مربوط به ژن lnT به وکتور pTZ از کیت (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده شد که حاوی پلاسمید pTZ و آنزیم T4-لیگاز می‌باشد. سپس محصول الحاق (Ligation)، به روش شیمیایی و با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد و استریل به میزبان باکتریایی (E. coli Top10F)، منتقل شد. باکتری‌های منتقل شده، روی پلیت محیط کشت LB-Agar حاوی ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه گذاری شدند. استخراج پلاسمید از باکتری‌های رشدیافته با استفاده از کیت (Bioneer, South Korea)، انجام شد. صحت کلون‌سازی ژن در وکتور pTZ و بررسی تشکیل وکتور نوترکیب pTZ-lnT، با روش‌های PCR و هضم آنزیمی با دو آنزیم *KpnI* و *SacII* صورت پذیرفت [۱۵].

به منظور بیان ژن lnT، از وکتور بیانی pEGFP-C2 استفاده شد. لذا ژن lnT باید از وکتور pTZ-lnT خارج و در وکتور بیانی وارد گردد. به این منظور، وکتور نوترکیب pTZ-lnT و وکتور بیانی pEGFP-C2 توسط آنزیم‌های *kpnI* و*sacII* برش خورده و محصولات حاصل روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. سپس قطعات مربوط به وکتور خطی شده pEGFP-C2 و ژن lnT، از روی ژل بریده شد و واکنش الحاق بین آنها با استفاده از آنزیم T4-لیگاز برقرار گردید. مراحل انتقال محصولات اتصال، به درون باکتری E. coli سویه TOP10F، انجام شد. به منظور تأیید صحت ساب‌کلونینگ و بررسی تشکیل سازواره نهایی pEGFP-C2-lnT، ابتدا واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت مخصوص ژن lnT انجام گرفت. برای تأیید بیشتر و دقیق‌تر سازواره نهایی، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *kpnI* و*sacII* و تعیین توالی صورت پذیرفت [۱۵].

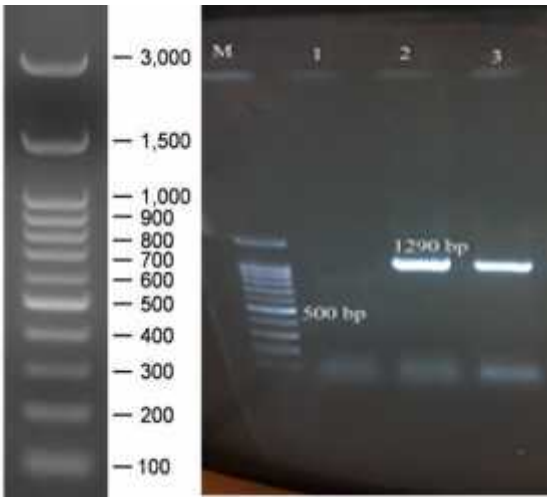
به منظور بررسی بیان ژن هدف در پلاسمید نوترکیب pEGFP-C2-lnT، از سلول‌های HDF انسانی استفاده گردید. برای انتقال این پلاسمید به سلول‌های HDF، روش الکتروپوریشن انجام شد. در این مرحله، از دستگاه الکتروپوریشن (Gene Pulser Xcell, BioRad, USA)

بهره گرفته شد. تعداد $2x10^6$ سلول در حجم ۴۰۰ میلی‌لیتر در کووت ۰/۴ میلی‌لیتری مخصوص دستگاه الکتروپوریشن ریخته شد. سپس مقدار ۶۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب pEGFP-C2-lnT به این سلول‌ها اضافه شد. شوک الکتریکی با شرایط تنظیم شده ۰/۲۴۰ کیلو ولت و ۴۸۰ میکروفاراد به سلول‌های HDF داده شد و نمونه‌ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس سلول‌های HDF در محیط کشت RPMI 1640 (Merck, Germany) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵٪ CO2 نگه‌داری شدند. سپس به محیط‌های کشت سلولی، مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک نئومایسین (نشانگر انتخابی پلاسمید pEGFP-C2) اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردیدند. تمام مراحل بالا (الکتروپوریشن) برای گروه دیگری از سلول‌های HDF که به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شده بودند نیز انجام شد با این تفاوت که به سلول‌های شاهد، هیچ گونه DNA خارجی اضافه نگردید [۱۶].

برای بررسی بیان اختصاصی ژن هدف در سلول‌های انسانی HDF، استخراج RNA از این دو دسته سلول (تست و شاهد) با استفاده از کیت (Qiagen, USA)، انجام شد. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Takara, Japan)، بر اساس روش کار کیت، تهیه شد. آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای lnT-F و lnT-R مخصوص ژن هدف روی cDNAهای حاصل، انجام شد و نتایج روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شدند.

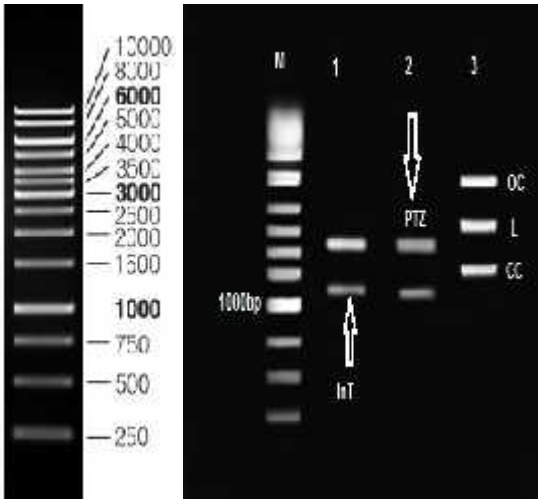
نتایج

بررسی غلظت DNA خالص‌سازی شده با نانودراپ نشان‌دهنده مقدار ۱۸۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر از محلول بود. نتیجه واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن lnT، باعث تشکیل باند ۱۲۹۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱٪ شد (شکل ۱).



شکل ۱- نتیجه PCR برای ژن lnT
M: مارکر bp 100 ساخت شرکت فرمنتاز (شماره کاتالوگ DL007)
شماره ۱: کنترل منفی (نمونه PCR بدون DNA)
شماره‌های ۲ و ۳: محصول PCR برای ژن lnT باندازه ۱۲۹۰ جفت بازی

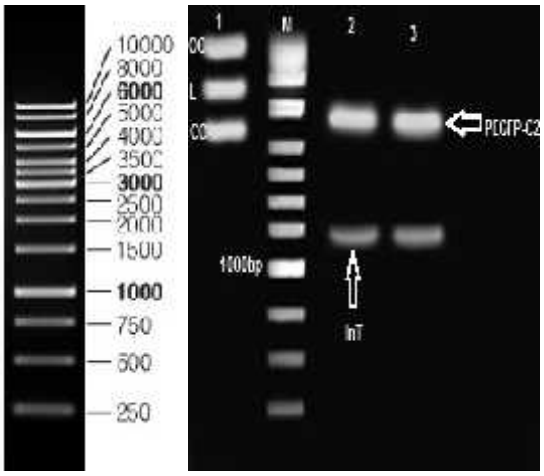
پس از وارد کردن ژن lnT به درون وکتور pTZ، وکتور نوترکیب pTZ-lnT ایجاد شده به روش هضم آنزیمی توسط *KpnI* و *SacII* تأیید شد که نتیجه آن در شکل ۲ ملاحظه می‌شود. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، قطعه ۱۲۹۰ جفت بازی از داخل ناقل بیرون آمده و به صورت باند جداگانه پایین‌تر از باند پلاسمید خطی شده قرار گرفته است.



شکل ۲- نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمید pTZ-lnT
M: مارکر 1kb ساخت شرکت فرمنتاز (شماره کاتالوگ SM0311).
شماره ۱، ۲: تشکیل باند ۲۸۸۶ جفت بازی مربوط به وکتور pTZ و باند ۱۲۹۰ جفت بازی مربوط به ژن lnT حاصل برش دو آنزیمی
شماره ۳: کنترل پلاسمید (Un Cut)

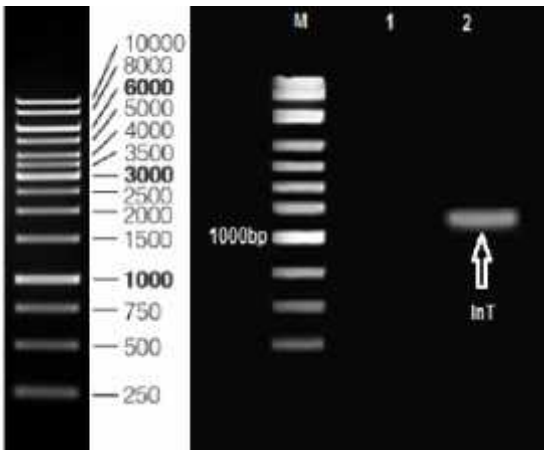
در مرحله ساب‌کلونینگ، ژن lnT بریده شده با دو آنزیم *KpnI* و *SacII* به داخل وکتور بیانی pEGFP-C2 که توسط همان آنزیم‌ها برش خورده بود، وارد شد. صحت نتایج این مرحله با روش هضم آنزیمی سنجیده شد که نتایج آن در شکل ۳ آمده است.

پس از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز، یک قطعه به اندازه ۴۷۳۵ جفت باز مربوط به وکتور pEGFP-C2 و یک قطعه به اندازه ۱۲۹۰ جفت باز مربوط به ژن lnT مشاهد شد. تعیین توالی وکتور نوترکیب pEGFP-C2-lnT نشان‌دهنده درستی کلون سازی ژن lnT در وکتور بیانی یوکاریوتی مورد نظر بود به طوری که مقایسه توالی حاصل با توالی‌های موجود از این ژن در بانک ژن جهانی (NCBI) درستی سکانس و عدم وجود هرگونه تغییر در توالی کلون‌شده را نشان داد.

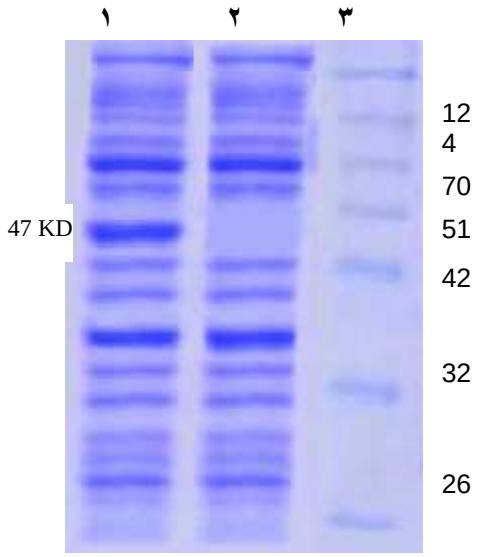


شکل۳- نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمید نوترکیب pEGFP-C2-lnT
شماره ۱: کنترل پلاسمید (Un Cut)
M: مارکر 1Kb ساخت شرکت فرمنتاز (شماره کاتالوگ SM0311).
شماره‌های ۲ و ۳: تشکیل باند ۴۷۳۵جفت بازی مربوط به وکتور $pEGFP-C_2$ و باند ۱۲۹۰جفت بازی مربوط به ژن lnT

پس از الکتروپوریشن و در نتیجه دستکاری سلول‌های HDF، سلول‌های مقاوم به نئومایسین در محیط کشت حاصل گردید که نشان‌دهنده فعالیت موفق وکتور pEGFP-C-lnT در سلول‌های انسانی HDF است. نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تأیید بیان ژن lnT هلیکوباکتر پیلوری در سلول‌های یوکاریوتی مثبت بود. به طوری که پس از انجام PCR روی cDNAهای بدست آمده از تست RT-PCR برای سلول‌های دریافت‌کننده وکتور نوترکیب حامل ژن lnT، باند ۱۲۹۰ جفت بازی مربوط به ژن lnT تشکیل شد. اما همین آزمایش برای سلول‌های فاقد وکتور نوترکیب، مثبت نبود. نتایج این آزمایش مؤید بیان موفق ژن lnT در سلول‌های HDF می‌باشد (شکل ۴). شکل ۵ نشان‌دهنده باند ۴۷ کیلودالتونی مربوط به محصول پروتئینی ژن lnT، روی ژل SDS-PAGE است.



شکل۴- نتیجه بررسی بیان ژن lnT در سلول‌های یوکاریوتی به روش RT-PCR
M: مارکر 1Kb ساخت شرکت فرمنتاز (شماره کاتالوگ SM0311).
شماره ۱: کنترل منفی
شماره ۲: تشکیل باند ۱۲۹۰ جفت بازی مربوط به ژن lnT



شکل۵- نتیجه بررسی بیان ژن lnT در سلول‌های یوکاریوتی به روش SDS-PAGE
شماره ۱: سلول‌های بیان‌کننده ژن lnT که باند ۴۷ کیلودالتونی مربوط به پروتئین LnT را نشان می دهد.
شماره ۲: سلول ترانسفرم نشده (شاهد فاقد پلاسمید نوترکیب pEGFP-C2-lnT)
شماره ۳: مارکر پروتئینی شرکت ترموساینتیفیک (شماره کاتالوگ ۲۶۶۱۶)

بحث

از آن‌جا که عفونت هلیکوباکتر پیلوری جزء شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی است و در ٪۷۵-٪۵۰ درصد از جمعیت جهان نفوذ کرده و ممکن است برای چند دهه در افراد آلوده باقی بماند [۱]،رژیم‌های درمانی مختلفی برای ریشه‌کن کردن هلیکوباکتر پیلوری پیشنهاد شده است [۱۷]. از جمله: استفاده از مهارکننده پمپ پروتون همراه با چند آنتی‌بیوتیک مانند آموکسی‌سیلین به علاوه کلاریترومایسین یا مترونیدازول به عنوان خط اول درمان برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری در نظر گرفته شده [۱۸]، که در بیشتر موارد به دلایل مختلفی این نوع درمان منجر به شکست می‌شود [۱۹].

یکی از شاخص‌ترین علل عدم موفقیت این نحوه درمان، مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها است. یکی از انواع درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری که می‌تواند دارای مزایای زیادی باشد استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی است که هم قادر به شناسایی اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد و هم از چسبیدن آن به سطوح اپی‌تلیال سیستم گوارش انسان جلوگیری می‌کند [۲۰].

از آن‌جا که تولید آنتی‌بادی‌ها دارای مراحل پرهزینه از جمله تولید پروتئین نوترکیب و تخلیص آن می‌باشد [۲۱]، جهت کاهش چشم‌گیر چنین فرآیندهایی می‌توان از DNA واکسن استفاده نمود. اخیراً مشخص شده است که استفاده از واکسن‌های اسید نوکلئیک سبب تحریک ایمنی سلولی و ایمنی هومورال می‌گردد که ایمنی هومورال

می‌تواند میزبان را در برابر عفونت‌های بعدی محافظت کند [۲۲]، بنابراین ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیش‌گیری مانند واکسیناسون مفید به نظر می‌رسد. Farjadi و همکاران ناحیه‌ای از ژن cagA را انتخاب نمودند و بعد از انجام PCR، در پلاسمید pET32 کلون و در باکتری اشریشیاکلی بیان شد. سپس پروتئین بیان شده تخلیص و آنتی‌ژنیسیته آن بررسی گردید. نتایج نشان‌دهنده کلونینگ و بیان موفقیت‌آمیز ژن بود و بدین معنی این است که می‌توان از آن به عنوان واکسن ژنی استفاده نمود [۲۳].

Hasanzadeh و همکاران در مطالعه‌ای، بیان و آنتی‌ژنیسیته ژن vacA در هلیکوباکتر پیلوری را بررسی کردند. در این مطالعه نیز بعد از استخراج DNA ژنومی هلیکوباکتر پیلوری، PCR جهت تکثیر انجام شد. جهت کلونینگ ژن وارد وکتور pET32 شد و بعد از مستعد کردن باکتری اشریشیاکلی با کلسیم کلرید، وکتور نوترکیب pET32–vacA را وارد اشریشیاکلی کرده و از باکتری E.coli BL21 به عنوان میزبان بیانی برای تولید پروتئین نوترکیب استفاده شد. سپس با روش SDS-PAGE بیان پروتئین نوترکیب تأیید گردید. از آن‌جا که نتایج توالی‌یابی نشان داد ژن مورد نظر به درستی انتخاب شده و نتایج SDS-PAGE نیز نشان‌دهنده بیان پروتئین نوترکیب بود، این پروتئین را می‌توان به عنوان یک واکسن در نظر گرفت [۲۴].

Ghasemi و همکاران مطالعه‌ای روی کلونینگ و بیان ناحیه بیماری‌زایی $babA_2$ برای تولید واکسن علیه هلیکوباکتر پیلوری انجام دادند. بعد از تخلیص DNA باکتری و تکثیر ژن $babA_2$، جهت کلونینگ، ژن مورد نظر وارد وکتور pTZ شد. سپس وکتور نوترکیب pTZ- $babA_2$ وارد باکتری اشریشیاکلی گردید. ژن مورد نظر با استفاده از روش هضم آنزیمی جداسازی شد و آزادی ژن با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید. جهت بیان از سیستم بیانی پروکاریوتی استفاد شد. بیان پروتئین نوترکیب نیز به روش SDS-PAGE تأیید شد و نتایج توالی‌یابی نشان‌دهنده این بود که ژن $babA_2$ به درستی انتخاب شده و می‌توان از آن به عنوان کاندیدی برای واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری استفاده کرد [۲۵] .

Maleki و همکاران ناحیه‌ای از ژن cagA را براساس برنامه بیوانفورماتیکی شناسایی کردند و بعد از انجام PCR و کلون کردن در ناقل pET32 و بیان ژن در باکتری اشریشیاکلی، سپس صحت بیان پروتئین به روش SDS-PAGE تأیید شد. از آن‌جا که نتایج نشان‌دهنده کلونینگ موفقت‌آمیز این ژن بود، گزارش شد که احتمالاً می‌توان پروتئین نوترکیب بدست آمده را به عنوان کاندیدای مناسب برای واکسن ژنی معرفی کرد [۲۶]. Doosti و همکاران دو ژن P39 و stX2 به ترتیب مربوط به بروسلا ملیتنسیس و اشریشیاکلی را درون وکتور pcDNA3.1 کلون نمودند و سازواره ژنی pcDNA3.1- stX2-p39 را به عنوان واکسن ژنی دوگانه بر علیه اشریشیا کلی و بروسلا ملیتنسیس معرفی نمودند [۲۷].

Soleimani و همکاران بر روی ژن hpaA هلیکوباکتر پیلوری مطالعه‌ای انجام دادند. بعد از استخراج DNA از هلیکوباکتر پیلوری، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن hpaA، PCR انجام شد. جهت انجام کلونینگ ژن وارد

وکتور pET28a و سپس وکتور نوترکیب وارد باکتری اشریشیاکلی شد. برای تأیید کلونینگ از روش هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای استخراج شده استفاده گردید. جهت بیان ژن از پروکاریوت (اشریشیا کلی سویه BL21) استفاده شد. از روش SDS-PAGE نیز برای تایید بیان پروتئین نوترکیب استفاده شد. از آن‌جا که تمام نتایج این تحقیق برای ژن hpaA موفقیت آمیز بود در نتیجه می‌توان گفت این مطالعه می‌تواند جهت تولید واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری کمک کننده باشد [۲۸].

مطالعات صورت گرفته توسط محققین ذکر شده از لحاظ همسانه سازی ژن هلیکوباکتر پیلوری و بررسی بیان پروتئین تولید شده توسط سازواره ساخته شده با مطالعه حاضر همخوانی دارد، با این تفاوت که در این مطالعه از وکتور pTZ57R/T جهت کلونینگ و از وکتور بیانی pEGFP-C2 جهت بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی استفاده شد. وکتور بیانی pEGFP-C2 دارای یک ناحیه شروع همانندسازی SV40 در سلول‌های پستانداران می‌باشد، بنابراین این وکتور در سلول جانوری بیان دارد.

ممکن است محدودیت جذب پلاسمیدهای نوترکیب به درون سلول‌های نوترکیب و کاهش بیان محصول ژن هدف از محدودیت‌های تحقیق در زمینه واکسن‌های ژنی باشد که البته با کاربرد انواع نانوذرات یا استفاده از الکتروپوریشن بافتی این مساله حل شود.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، کلون‌سازی موفقیت آمیز ژن lnT را نشان داد. هم‌چنین در این تحقیق مشخص شد که پلاسمید بیانی pEGFP-C2 وکتور مناسبی برای بیان ژن lnT می‌باشد و مشاهده باند ۴۷ کیلودالتونی به روش SDS-PAGE دلالت بر بیان این ژن در سلول‌های یوکاریوتی دارد. بنابراین به نظر می‌رسد می‌توان از سازواره ژنی pEGFP-C2-lnT به عنوان یک پلاسمید دی ان ای واکسن برای تحقیقات آینده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد و هم‌چنین از جناب آقای دکتر حسین انصاری و آقای حمیدرضا کبیری به دلیل حمایت‌های علمی تشکر و قدردانی می‌گردد..

References

[1] Lv ZF, Wang FC, Zheng HL, Wang B, Xie Y, Zhou XJ, et al. Meta-analysis: is combination of tetracycline and amoxicillin suitable for Helicobacter pylori infection? *World J Gastroenterol* 2015; 21(8): 2522-33.

[2] Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbințeanu-Braticevici C. Helicobacter pylori infection: old and new. *J Med Life*. 2017; 10(2): 112-7.

[3] Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, et al. Comparison of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004; 10(13): 1958-60.

[4] Thorell K, Bengtsson-Palme J, Liu OH, Palacios Gonzales RV, Nookaew I, Rabeneck L, et al. In Vivo Analysis of the Viable Microbiota and Helicobacter pylori Transcriptome in Gastric Infection and Early Stages of Carcinogenesis. *Infect Immun* 2017; 85(10). pii: e00031-17.

[5] Vidal-Ingigliardi D, Lewenza S, Buddelmeijer N. Identification of essential residues in apolipoprotein N-acyl transferase, a member of the CN hydrolase family. *J Bacteriol* 2007; 189(12): 4456-64.

[6] Sutcliffe IC, Harrington DJ. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28(5): 645-59.

[7] Babu MM, Priya ML, Selvan AT, Madera M, Gough J, Aravind L, et al. A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol* 2006; 188(8): 2761-73.

[8] Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* 2011; 79(2): 548-61.

[9] McDonough JA, Hacker KE, Flores AR, Pavelka MS Jr, Braunstein M. The twin-arginine translocation pathway of *Mycobacterium smegmatis* is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases. *J Bacteriol* 2005; 187(22): 7667-79.

[10] Sankaran K, Wu HC. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 1994; 269(31): 19701-6.

[11] Okuda S, Tokuda H. Lipoprotein sorting in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65: 239-59.

[12] Robichon C, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP. Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2005; 280(2): 974-83.

[13] Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Baghernejad M. Molecular assessment of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* strains using rapid and accurate PCR-RFLP method in gastric specimens in Iran. *Afr J Biotechnol* 2011; 10(39): 7675-8.

[14] Lee JH, Park Y, Choi JR, Lee EK, Kim HS. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Med J* 2010; 51(1): 104-10.

[15] Fathpour H, Doosti A, A Ghasemi-Dehkordi P, Shirazi G. Generation of pcDNA3.1-GH as a recombinant expression vector of ostrich growth

hormone cDNA in Saccharomyces cerevisiae. *Bulg J Vet Med* 2015; 18(2): 99–104.

[16] Hashemzehi R, Doosti A, Kargar M, Jaafarinia M. Gene cloning and evaluation of the Acinetobacter baumannii nlpD gene expression in human dermal fibroblast cells using RT-PCR. *Feyz* 2017; 21(4): 359-66.

[17] Ben Chaabane N, Al-Adhba HS. Ciprofloxacin-containing versus clarithromycin-containing sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A randomized trial. *Indian J Gastroenterol* 2015; 34(1): 68-72.

[18] Olokoba AB, Obateru OA, Bojuwoye MO. Helicobacter pylori eradication therapy: A review of current trends. *Niger Med J* 2013; 54(1): 1-4.

[19] Megraud F, Lamouliatte H. The treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(11): 1333-43.

[20] Suzuki H, Masaoka T, Miyazawa M, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Gastric mucosal response to *Helicobacter pylori*. *Keio J Med* 2002; 51(2): 40-4.

[21] Kaparakis M, Walduck AK, Price JD, Pedersen JS, Van Rooijen N, Pearse MJ, et al. Macrophages are mediators of gastritis in acute *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun* 2008; 76(5): 2235-9.

[22] Silva DG, Stevens RH, Macedo JM, Albano RM, Falabella ME, Fischer RG, et al. Presence of *Helicobacter pylori* in supragingival dental plaque of individuals with periodontal disease and upper gastric diseases. *Arch Oral Biol* 2010; 55(11): 896-901.

[23] Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari MR, Soufian S, Hasanzadeh L. Production of recombinant CagA protein of *Helicobacter pylori*. *AMUJ* 2013; 16(7): 35-44. [Farsi]

[24] Hasanzadeh L, Ghaznavi-Rad E, Soufian S, Farjadi V, Abtahi H. Expression and antigenic evaluation of VacA antigenic fragment of *Helicobacter pylori*. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(7): 835-40.

[25] Ghasemi SA, Arjunan S, Senthilkumar R. Clonning and expression of bab-Pathogenicity island antigens for the production of vaccine against *Helicobacter pylori*, the risk factor for gastric cancer. *Asian J Pharm Clin Res* 2014; 7(3): 88-92.

[26] Maleki M, Nassiri MR, Tahmoores pour M, Qazvini K. Cloning and Expression *of Helicobacter Pylori* CagA Gene Antigenic Regions in *E. coli. J Fasa Univ Med Sci* 2016; 6(1): 113-9. [Farsi]

[27] Doosti A, Ghasemi-Dehkordi P, Kargar M, Sharifi A. Generation of divalent DNA vaccine based on p39 and shiga-like toxin2 (stx2) genes. *Genetika* 2015; 47(2): 499-507.

[28] Soleimani N, Mohabati Mobarez A, Farhangi B. Cloning, expression and purification flagellar sheath adhesion of Helicobacter pylori in Escherichia coli host as a vaccination target. *Clin Exp Vaccine Res* 2016; 5(1): 19-25.

Survey of *Helicobacter Pylori lnT* Gene Expression in HDF Cells by RT-PCR Method

R. Rahmani-Piani[۱], A. Doosti[۲]

Received: 03/05/2017 Sent for Revision: 07/10/2017 Received Revised Manuscript: 11/11/2017 Accepted: 20/11/2017

Background and Objectives: *Helicobacter pylori* is a gram-negative and spiral bacterium that causes stomach and duodenal disease in humans. Because of the presence of disadvantages in antibiotic therapies, increasing efforts have been made to produce effective vaccine for this infection. The aim of this study was to generate a construct carrying the lnT gene and to survey its expression in human cells with RT-PCR method.

Materials and Methods: In this laboratory study, lnT gene from the genome of *Helicobacter pylori* bacterial was isolated via polymerase chain reaction (PCR). Cloning of the PCR products was done by T/A cloning method in the appropriate T vector. Then, the lnT gene was subcloned into a pEGFP-C2 eukaryotic expression vector. To study the lnT gene expression, the final pEGFP-C2-lnT construct was transformed into human dermal fibroblasts (HDF) cells by electroporation and its expression was analyzed by RT-PCR.

Results: The performance of the PCR resulted in amplification of 1290 bp segment as to lnT gene. This gene was successfully cloned in pTZ vector and enzyme digestion and sequencing results showed lnT gene was subcloned in the expression vector and final construction of the pEGFP-C2-lnT was created. Gene expression analysis by RT-PCR showed the relevant band.

Conclusion: Based on the obtained results, lnT gene cloned in the pEGFP-C2 eukaryotic expression vector has the ability to produce the specific product of this gene in eukaryotic cells. Therefore, this gene construction has the required potential to evaluate the immunogenicity in an animal model as a gene vaccine against *Helicobacter pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*, Cloning, lnT gene, RT-PCR

Funding: This research was funded by Shahrekord Branch, Islamic Azad University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University approved the study (IR.IAUSHK.1395.5213).

How to cite this article: Rahmani-Piani R, Doosti A. Survey of *Helicobacter Pylori lnT* Gene Expression in HDF Cells by RT-PCR Method. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2017; 16(9): 807-18. [Farsi]

1- MSc in Genetics, Dept. of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Associate Prof. of Molecular Genetics, Biotechnology Research Center, Dept. of Biology, Faculty of Basic Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
(Corresponding Author): Tel: (0383) 3361046, Fax:(0383)3361046, Email: abbasdoosti@yahoo.com