

همسانه‌سازی، بیان و تخلیص انتهای کربوکسیل زیر واحد C آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری به منظور تولید IgY در زرده تخم مرغ

حسین بصیری^۱، سید لطیف موسوی گرگری^۲، ایرج رسولی^۳، کاظم پریور^۴، طاهر نژادستاری^۴

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ دانشیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد

^۳ استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد

^۴ استاد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) نوعی باکتری گرم منفی اسپیرال و میکروآیروفیل است که در لایه مخاطی معده انسان تکثیر و ایجاد عفونت می‌نماید. رویکردهای جدید در جهت بکارگیری درمان‌های اختصاصی نظیر ایمونوتراپی برای ریشه‌کنی این عفونت می‌باشند. آنزیم اوره‌آز یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا و آنتی‌ژنیک این باکتری است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا بخش انتهای کربوکسیل زیر واحد C اوره‌آز، پس از تخلیص ژنوم باکتری، با کمک واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) تکثیر شده و محصول روی ناقل بیانی pET28a کلون شد. پروتئین نوترکیب پس از تراریخت سازه نوترکیب به باکتری *E. coli* سوش BL21DE3 بیان شد و نتایج با استفاده از SDS-PAGE تحلیل و پروتئین نوترکیب از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی با کمک ستون Ni-NTA تخلیص شد. پروتئین نوترکیب تخلیص شده، به مرغ لگ‌هورن سفید تزریق و IgY با روش استون/کلروفرم تخلیص و با روش ELISA و SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: با تعیین توالی سازه نوترکیب، صحت انجام همسانه‌سازی تأیید شد. بررسی با SDS-PAGE نشان داد پروتئین نوترکیب rUreCc به خوبی بیان و تخلیص شده است. همچنین نتایج الایزا ایمن‌زایی بالای این پروتئین نوترکیب را نشان داد.

نتیجه‌گیری: تولید پروتئین نوترکیب rUreCc هلیکوباکتر پیلوری در *E. coli* به عنوان سلول میزبان، امکان دسترسی آسان به آنتی‌ژن را فراهم کرد. علی‌رغم کوچک بودن آنتی‌ژن نوترکیب، توانایی ایمن‌زایی آن شبیه به کل زیر واحد C اوره‌آز است.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، اوره‌آز، زیر واحد UreC، IgY.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*: *H. pylori*) نوعی باکتری گرم منفی مارپیچی شکل است که در لایه مخاطی معده انسان تکثیر یافته و ایجاد عفونت می‌نماید. عفونت ایجاد شده توسط این باکتری که با تخریب بافت اپی‌تلیال معده

همراه است، منجر به التهاب مزمن معده می‌شود که می‌تواند سبب ایجاد زخم‌های معده و دوازدهه شود. بررسی‌ها نشان داده که عفونت مزمن *H. pylori* با سرطان بدخیم معده مرتبط است و این امر موجب گشته که آژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) این باکتری را در زمره عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد (۱). شیوع عفونت با *H. pylori* در جهان به طور میانگین در حدود ۵۰ درصد جمعیت است، اما تفاوت معنی‌داری بین شیوع این عفونت در کشورهای غربی و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، حسین بصیری

(email: hosseinbasiri@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۲

کشورهای آسیایی در حال توسعه به چشم می خورد (۲)، به طوری که این میزان در کشورهای غربی در حدود ۳۰ درصد جمعیت است که از این میان ۱/۰ تا ۱ درصد به سرطان معده مبتلا می شوند، درحالی که میزان عفونت در کشورهای آسیایی بالاتر و در حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد است (۳).

با توجه به اینکه تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه دشوار می باشد و در اکثر موارد تشخیص پس از پیشرفت بیماری صورت گرفته و کار درمان سخت می گردد، راه اصلی مبارزه با این سرطان نیز هم چون التهاب و زخم معده، نابود کردن عفونت *H. pylori* شناخته می شود. از سوی دیگر مبارزه با این عفونت همواره با مشکلاتی همراه بوده است، به خصوص که سیستم ایمنی بدن نیز به علت مکانیزم های دفاعی *H. pylori* در برابر این بیماری فاقد کارایی لازم است و حتی طی مکانیزم های ویژه ای در خدمت بیماری زایی باکتری قرار گرفته و سبب تسهیل اتصال باکتری و تخریب بافت اپی تلیال می شود (۱). همچنین بررسی های اخیر حاکی از مقاومت گسترده عفونت *H. pylori* به درمان های آنتی بیوتیکی است (۴). بدین سبب رویکردهای اخیر در جهت به کارگیری درمان های اختصاصی و نوین برای مقابله با این عفونت می باشد که در این میان پروتئین اوره آز باکتری *H. pylori* هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی بادی های اختصاصی چندتبار یا تک تبار به این منظور است. اوره آز مهم ترین ترکیب پروتئینی *H. pylori* است و به عنوان یک آنتی ژن مهم جهت تشخیص این باکتری شناخته می شود. این آنزیم با هیدرولیز اوره و ایجاد آمونیاک به عنوان خنثی کننده اسید معده، شرایط را برای ادامه حیات باکتری در pH اسیدی معده فراهم می کند، به علاوه هیدروکسید آمونیوم تولید شده توسط این آنزیم در تخریب بافت های میزبان نقش عمده ای دارد (۵). همچنین نشان داده شده است که *H. pylori* از مولکول های MHC class II به عنوان گیرنده در سطح سلول های اپی تلیال معده استفاده می کند و این میان کنش موجب بروز آپوپتوز در این سلول ها می گردد که این عمل به واسطه اوره آز باکتری صورت می پذیرد (۶). علاوه بر این، اوره آز سبب تحریک ماکروفاژها برای ترشح اکسید نیتریک می شود که سبب ایجاد واسطه های التهابی می گردد (۷) و این امر به تخریب بافت اپی تلیال کمک کرده و یکی از مثال های به کارگیری سیستم ایمنی توسط باکتری می باشد. با توجه به نقش های مهم اوره آز در بیماری زایی و بقای *H. pylori*، این آنزیم به عنوان یک هدف مهم برای درمان های اختصاصی همچون استفاده از آنتی بادی ها قلمداد می شود.

تاکنون بسیاری از پروتئین های آنتی ژنیک حفاظت بخش این باکتری نظیر UreC، HpaA، FlaA، CagA، VacA مشخص شده است (۸). در میان این پروتئین های آنتی ژنیک، UreC یکی از چهار زیر واحد اوره آز است که توسط اغلب سوش های جدا شده *H. pylori* بیان می شود و ثابت شده است که قوی ترین آنتی ژن بین تمام پروتئین های شناخته شده *H. pylori* می باشد (۹). ژن *ureC* با ۱۷۱۰ جفت باز مسئول رمزگذاری ۵۶۹ اسید آمینه پروتئین UreC، دارای توالی بسیار حفاظت شده ای با حدود ۹۵ درصد شباهت در سوش های مختلف *H. pylori* می باشد (۱۰). این اطلاعات مشخص می کند UreC می تواند کاندید مناسبی برای تهیه واکسن یا آنتی بادی های اختصاصی بر علیه *H. pylori* باشد. همچنین مطالعات نشان داده اند که دو شاخص مهم آنتی ژنیک در انتهای کربوکسیلی این زیر واحد قرار گرفته است که به همین منظور در این مطالعه این ناحیه از ژن در انتهای ۳' برای همسانه سازی انتخاب شد.

هدف از این مطالعه، تهیه پروتئین نو ترکیب UreCc و تولید IgY است تا در مطالعات بعدی برای پیشگیری یا ایمونوتراپی مورد استفاده قرار گیرد. به این منظور پس از تکثیر ناحیه ۳' ژن *ureC* به طول ۶۹۸ bp و انتقال آن روی ناقل *pET28a* به عنوان یک سامانه بیانی پروکاریوتی مناسب، و القاء سازواره ژنی به میزبان *E. coli* سوش BL21DE3، پروتئین نو ترکیب بیان شد و پس از تخلیص به مرغ لگ هورن ۲۵ هفته ای تزریق شد. پس از انجام تزریق های یادآور و اطمینان از ایمن شدن مرغ ها با انجام الایزا، از زرده تخم مرغ تخلیص IgY صورت گرفت و پس از آن با الایزا و سنجش خنثی سازی آنزیم اوره آز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

باکتری *H. pylori* جدا شده از یک بیمار ایرانی (۱۱) (آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه تهران، دکتر فریده سیاوشی و همکاران) تأیید شده با تست های بیوشیمیایی و مولکولی پس از کشت در بافر PBS (Phosphat buffered saline) سلول ها جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پلاسمید *pET28a* (Novagene، ایالات متحده آمریکا) و باکتری *E. coli* سوش BL21DE3 (Novagene، ایالات متحده آمریکا) به عنوان سیستم بیانی پروکاریوتی و میزبان مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهای طراحی شده برای PCR سفارش داده شدند (شرکت Cinnagene) و آنزیم های Taq،

پرایمر در دمای ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلی‌مریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، و در نهایت پلی‌مریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بودند. در ادامه، جهت جلوگیری از بروز جهش در قطعه تکثیر شده، واکنش زنجیره پلی‌مراز فوق با آنزیم *Pfu* پلی‌مراز نیز انجام شد. در ادامه نتایج واکنش زنجیره پلی‌مراز پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز با غلظت ۱۰ g/L و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمایید (EtBr) زیر نور UV مشاهده شد. اندازه مورد انتظار قطعه تکثیر شده ۶۹۸ bp است. پس از بارگذاری محصول واکنش روی ژل آگاروز با دمای پایین و استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز، قطعه مورد نظر تخلیص شد.

در ساخت سازواره مولکولی ژن کد کننده *UreCc*، پلاسمید *pET28a* و محصول تخلیص شده PCR با دو آنزیم محدودالایر *BamHI* و *Sall* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت به صورت جداگانه هضم شدند، سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگاروز با دمای پایین بارگذاری شده و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل آگاروز، قطعات مورد نظر تخلیص شدند. برای انجام واکنش الحاق، واکنشی با حجم نهایی ۱۲ µl حاوی ۱۰۰ ng از قطعه مورد نظر و ۸۰ ng از پلاسمید هضم شده و ۲U آنزیم *T4 DNA ligase* و بافر آنزیم با غلظت نهایی ۱X در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاق به باکتری *E. coli* BL21DE3 با روش شک حرارتی القاء شدند و غربالگری همسانه‌های حاصل روی محیط LB آگار حاوی ۷۰ µg/ml کانامایسین انجام شد. به منظور تأیید همسانه‌سازی، پس از کشت همسانه‌های غربال شده در محیط LB آبگوشتی حاوی ۷۰ µg/ml کانامایسین، تخلیص پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد (۱۲). سپس با انجام هضم آنزیمی قرار گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید و در نهایت با انجام تعیین توالی از همسانه‌ها، صحت همسانه‌سازی تأیید شد. سیستم بیانی ساخته شده *pET 28a-ureCc E.coli* نام‌گذاری شد.

برای بیان پروتئین نو ترکیب هدف، *pET 28a-ureCc E.coli* BL21DE3 در محیط LB آبگوشتی حاوی ۶۰ µg/ml کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با ۲۰۰ rpm هوادهی، کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاتوزید (IPTG) با غلظت ۰/۷ mM القاء و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در شیکر

Pfu DNA ligase و آنزیم‌های محدودالایر *Sall* و *EcoRI* (Fermentas، آلمان) نیز خریداری شدند. کیت تخلیص DNA از ژل و تعیین توالی همسانه‌ها نیز تهیه شد (شرکت Bioneer کره). ستون میل ترکیبی Ni-NTA (شرکت Qiagen) خریداری شد. ادجوانت ناقص و کامل فروند از موسسه رازی تهیه شد. از آنتی‌بادی پلی‌کلونال Anti IgY خرگوشی کونزوگه با آنزیم پروکسیداز (HRP) به عنوان آنتی‌بادی اختصاصی جهت انجام ELISA استفاده شد. مرغ تخم‌گذار نژاد Leghorn High Sex از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد.

برای تخلیص DNA الگو، *H. pylori* جدا شده از یک بیمار ایرانی پس از کشت روی محیط بروسلا آگار غنی شده با سرم گوسفندی و حاوی آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین، تریمتوپریم، آمفوتریسین B و پلی‌میکسین B، با لوپ جمع‌آوری شده و در بافر PBS دوباره حل شد و تا قبل از تخلیص ژنوم در یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تخلیص DNA ژنومیک، باکتری‌های جمع شده از روی پلیت در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شده و ۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰ درصد و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۱ میکرولیتر RNase (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر ۵ M NaCl و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl به آن اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پروتئین‌ها با روش فنل-کلروفرم و DNA با ایزوپروپانول رسوب داده شد (۱۲).

در تکثیر انتهای ۳' ژن زیر واحد C اوره‌آز، برای طراحی پرایمرها از اطلاعات *H. pylori* J99 (شماره کد: AB090088) استفاده شد: توالی پرایمرهای رفت *huCcF* و برگشت *huCcR* به ترتیب شامل GACAGGATCCCGCATTCG که دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر (*BamHI*) و GTAGCGTCGACAAAGATAGAAAACAGTT که دارای جایگاه شناسایی آنزیم محدودالایر (*Sall*) می‌باشند. حجم نهایی واکنش زنجیره پلی‌مراز ۳۰ µl حاوی ۲/۵ mol/L از هر dNTP، ۱۵۰ nmol/L از هر یک از پرایمرها، MgCl₂ با غلظت ۵ mol/L، ۲/۵U Taq پلیمراز، ۱۰۰ ng DNA الگو و PCR ۱X بافر بود. پارامترهای واکنش زنجیره پلی‌مراز برای تکثیر ژن *ureC* شامل واسرشته اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه ۳ مرحله‌ای شامل واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، چسبیدن

روزانه به مدت ۲ ماه جمع‌آوری و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور جداسازی و تخلیص IgY-HpUc، ابتدا زرده‌های تخم مرغ از سفیده تخم مرغ جدا شده و به خوبی با آب مقطر شستشو داده شدند، به این صورت که کیسه زرده پاره شد و محتویات آن با دقت جدا شد. سپس دو برابر حجم زرده، به آن بافر فسفات (سدیم فسفات ۱۰۰mM، pH=۷/۶) افزوده شد و سپس به خوبی مخلوط گردید. به مخلوط، (w/v) ۳/۵٪ پودر PEG افزوده و با کمک استیرر به خوبی حل شد. بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به وسیله سانتریفیوژ (۳۰ دقیقه در ۴۴۲۰g) لیپوپروتئین‌ها از محلول رویی جدا شد و سپس محلول رویی با کمک فیلتراسیون با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱)، از باقیمانده لیپیدها عاری گردید. در مرحله بعد با افزودن PEG غلظت نهایی آن به (w/v) ۱۲٪ رسید. پس از حل شدن کامل PEG، محلول سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g) و رسوب در بافر فسفات حل شد (هم حجم، حجم بدست آمده از مرحله فیلتراسیون) و دوباره (w/v) ۱۲٪ به آن PEG اضافه شده و به خوبی حل شد. بعد از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، محلول دوباره سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g). محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در بافر فسفات حاوی ۶۰٪ گلیسرول با حجمی معادل حجم اولیه زرده تخم مرغ حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

برای سنجش قدرت واکنش‌دهی آنتی‌بادی IgY-HpUc بر علیه زیر واحد UreC آنزیم اوره‌آز *H. pylori* از ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب UreC (در هر چاهک ۲μg) پوشش داده شده بودند، استفاده شد. پس از بلاکینگ با ژلاتین (۳٪ w/v) با افزودن ۱۰۰μl از رقت ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی IgY-HpUc و آنتی‌بادی کنترل به چاهک اول، تا رقت ۱:۶۴۰۰ سریالی از رقت‌ها تهیه شد و پس از شستشو، کونژوگه ضد آنتی‌بادی مرغی با رقت ۱:۳۰۰۰۰ به چاهک‌ها افزوده شد و سپس سوبسترای OPD و H₂O₂ به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، پس از مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ۴۹۲nm، شدت نور با قرائت‌گر ELISA خوانده شد.

یافته‌ها

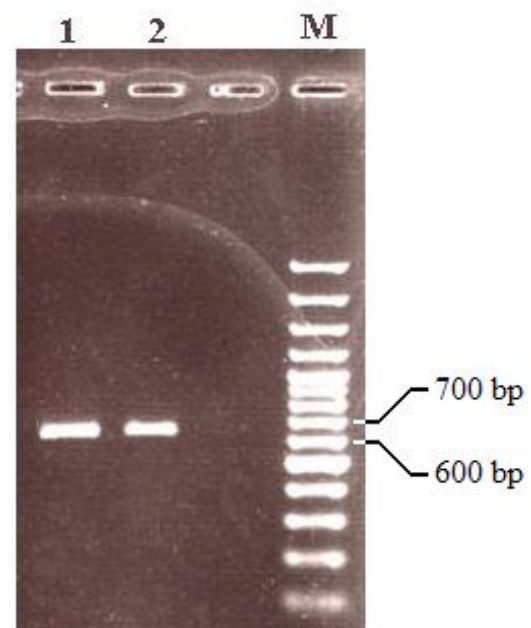
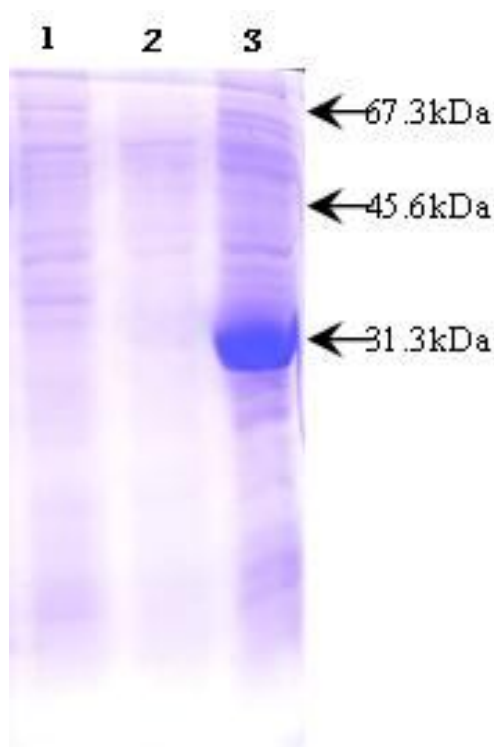
در شکل ۱ محصول PCR قطعه کد کننده rUreCc با آنزیم های Taq پلی‌مراز و Pfu پلی‌مراز با اندازه مورد انتظار (۶۹۸bp) نشان داده شده است.

انکوباتور با ۲۰۰ rpm هوا دهی انکوبه شدند. در ادامه سلول‌ها با سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شدند و نتایج با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تخلیص پروتئین نوترکیب، رسوب باکتریایی جمع‌آوری شده از مرحله قبل در بافر لیز کننده B با pH=۸ (این محلول حاوی ۱۰۰mM NaH₂PO₄ و ۱۰mM Tris و ۸mM Urea است) دوباره حل شده و با استفاده از دستگاه اولتراسونیک با قدرت رزونانس ۷۵ درصد و آمپلیفیکاسیون ۰/۵ در ۶ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای و در یخ سلول‌ها لیز شدند. در ادامه، سلول‌های لیز شده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۸۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب از محلول رویی جدا شده و در بافر لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار به خوبی حل شد و هر کدام با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه پروتئین نوترکیب هدف با کمک ستون میل ترکیبی Ni-NTA پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنده C با pH=۶/۳ و D با pH=۵/۹ و بافر فروشویی E با pH=۴/۵ (ترکیب همه بافرهای ذکر شده شبیه به بافر B بوده و تنها pH آنها تنظیم شده است) تخلیص شد و نتایج با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت غلظت پروتئین با روش برادفورد تخمین زده شد.

برای ایمن‌سازی مرغ و ارزیابی ایمنی، ۱۵ قطعه مرغ ۲۵ هفته‌ای نژاد لگ هورن سفید به صورت زیرجلدی در ناحیه سینه با پروتئین نوترکیب تخلیص شده (۲۰۰μg) با حجم مساوی از ادجوانت ناقص فروند (مؤسسه رازی) ایمن‌سازی شدند. سه یادآور با همان مقدار پروتئین و ادجوانت ناقص به ترتیب با فاصله زمانی سه، پنج و هفت هفته پس از تزریق اول، تزریق شد. پس از تکمیل دوره ایمونیزاسیون به منظور تأیید ایمن‌سازی مرغ‌ها، از آنها خون‌گیری انجام شد و پس از جداسازی سرم سنجش ELISA غیرمستقیم در پلیت‌های ۹۶ چاهکی که با پروتئین نوترکیب rUreC و rUreCc (در هر چاهک ۲μg) پوشش داده شده بودند، انجام شد. پس از بلاکینگ با ژلاتین (۳٪ w/v) با افزودن ۱۰۰μl از رقت ۱:۱۰۰۰ سرم مرغ‌های ایمن شده و کنترل به چاهک اول، تا رقت ۱:۶۴۰۰۰ سریالی از رقت‌ها تهیه شد. پس از شستشو با PBS-T (PBS + 0.05 Tween)، کونژوگه خرگوشی ضد آنتی‌بادی مرغی با رقت ۱:۳۰۰۰۰ به چاهک‌ها افزوده شد و سپس سوبسترای OPD و H₂O₂ به چاهک‌ها افزوده و بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، پس از مهار واکنش با اسید سولفوریک، در طول موج ۴۹۲ نانومتر، شدت رنگ با قرائت‌گر ELISA خوانده شد. پس از اطمینان از ایمنی مرغ‌ها، تخم مرغ‌ها به صورت



شکل ۲- نتیجه تعیین توالی قطعه *ureC* همسانه سازی شده بر روی حامل pET28a.



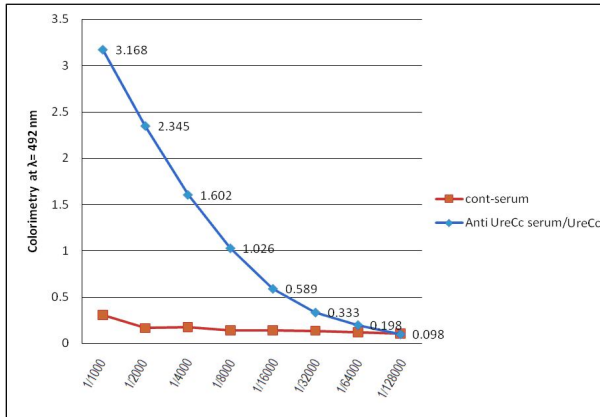
شکل ۱- محصول PCR قطعه کد کننده *rUreC* به طول ۶۹۸ bp. ستون ۱، محصول PCR قطعه پایانه ۳' ژن *ureC* با آنزیم *Taq* پلیمرز و ستون ۲، محصول PCR قطعه پایانه ۳' ژن *ureC* با آنزیم *Pfu* و ستون ۳، نشاننده اندازه مولکولی DNA را نشان می‌دهد.

شکل ۳- بررسی بیان ژن‌های نو ترکیب به کمک SDS-PAGE. ستون‌های ۱، ۲ و ۳: به ترتیب نمونه قبل از القاء، نمونه حاوی پروتئین‌های محلول و نمونه حاوی پروتئین‌های نامحلول حاصل از بیان *rUreC*.

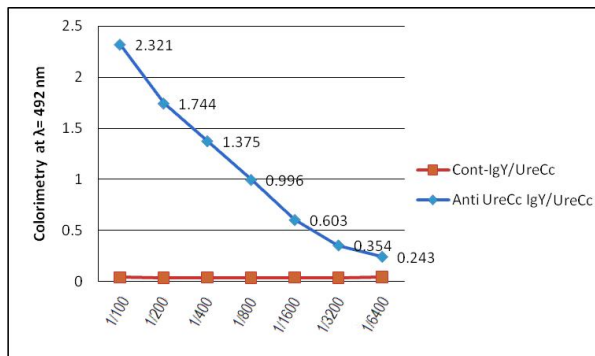
ایزوپروپیل تیو بتا-دی گالاتوزید (IPTG) با غلظت ۰/۷ mol/L توانست به صورت کارآمد سیستم بیانی *pET 28a-ureC* را *E.coli* BL21DE3 را القاء کند (شکل ۳). بخش اعظم محصول

توالی نوکلئوتیدی قطعه کد کننده *rUreC* همسانه شده و زنجیره پلی پپتیدی مربوط به آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب rUreCc به صورت اجسام نامحلول تولید می‌شد، بنابراین تخلیص آن در شرایط دنا‌توره، طبق دستور العمل کیت کیاژن صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد، پروتئین پس از شستشو و حذف پروتئین‌های غیراختصاصی، با خلوص قابل قبولی پس از فروشویی با بافر E استحصال شد.



نمودار ۱- تیتراسیون سرم مرغ‌های ایمن شده با rUreCc به وسیله الایزا غیر مستقیم. این نمودار نتایج الایزای رقت‌های مختلف از سرم مرغ‌های ایمن شده با UreCc را علیه این پروتئین، نشان می‌دهد.

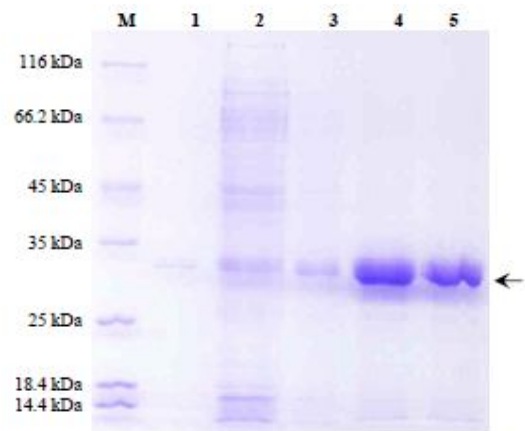


نمودار ۲- بررسی فعالیت محصول آنتی‌بادی مرغی ضد rUreCc به وسیله الایزا غیر مستقیم. این نمودار نتایج الایزای آنتی‌بادی مرغی ضد rUreCc علیه پروتئین rUreCc را نشان می‌دهد.

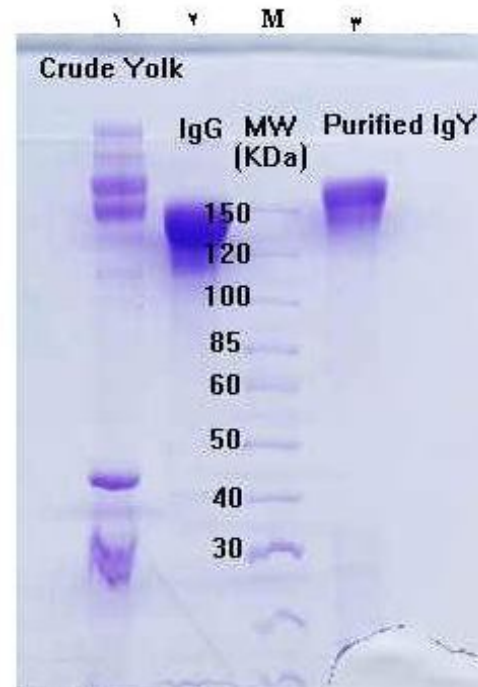
در نمودار ۱ نتیجه ELISA غیر مستقیم سرم مرغ‌های ایمن شده علیه پروتئین نوترکیب rUreCc مشاهده می‌شود. همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است سطح ایمنی مرغ‌ها نسبت به پروتئین نوترکیب rUreCc به خوبی افزایش یافته است.

در شکل ۵ ژل مربوط به آنالیز آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE ۹٪ مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد، آنتی‌بادی با خلوص بالایی استحصال شده است. پس از اطمینان از خلوص آنتی‌بادی به منظور بررسی واکنش‌دهی آنتی‌بادی سنجش ELISA انجام شد. در نمودار ۲ نتیجه ELISA غیرمستقیم آنتی‌بادی IgY-

بیان *ureC* در رسوب پس از لیز سلولی مشاهده شد که نشان می‌دهد پروتئین بیانی تشکیل اجسام نامحلول را داده و تقریباً ۳۵٪ کل پروتئین‌ها سلول باکتریایی را به خود اختصاص داد.



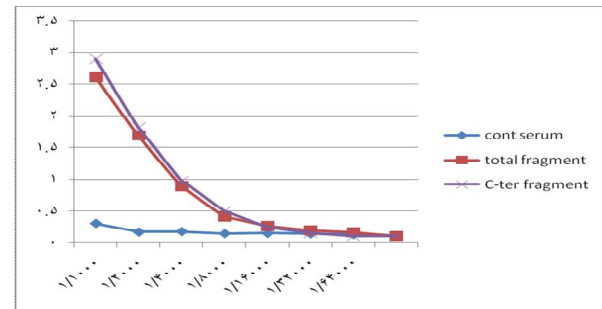
شکل ۴- بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب UreCc با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد. ستون M، نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۱، نمونه بیان پروتئین قبل از تخلیص، ستون ۲، نمونه خروجی ستون پس از بارگذاری محلول حاوی پروتئین نوترکیب، ستون ۳، نمونه خروجی ستون پس از شستشو با بافرهای شستشو دهنده. ستون ۴ و ۵، نمونه خروجی ستون پس از فروشویی با بافر E.



شکل ۵- بررسی تخلیص آنتی‌بادی IgY-HpUc روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد*. ستون M، نشانه اندازه مولکولی پروتئین، ستون ۱، نمونه مربوط به زرده تخم مرغ قبل از تخلیص، ستون ۲، نمونه مربوط به IgG تخلیص شده و ۳، نمونه IgY-HpUc تخلیص شده. در این ژل بافر نمونه (sample buffer) فاقد ۲- مرکاپتو اتانل می‌باشد.

بنابراین از تشکیل پلاک‌های دندانی در انسان ممانعت به عمل می‌آورد (۲۱). مطالعات نشان داده‌اند که زردۀ تخم مرغ حاصل از مرغ‌های ایمن شده حاوی مقدار زیادی آنتی‌بادی است که قادر به شناسایی اختصاصی آنتی‌ژن می‌باشند که از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است (۲۲). شاین و همکاران برآورد کرده‌اند که ۱ میلی‌لیتر از زردۀ تخم مرغ (۱۵ml/egg) حاوی ۹/۴mg IgY (۱۴۱mg/egg) می‌باشد. هر مرغ ۲۵۰ تخم مرغ در سال (۴۰۰۰ml زردۀ تخم مرغ) می‌گذارد، بنابراین یک مرغ سالیانه ۴۰g IgY تولید می‌کند (۲۳). اخیراً شاین و همکاران تأثیر IgY ضد *H. pylori* به دست آمده از مرغ‌های ایمن شده با عصارۀ لیز سلولی این باکتری در مونگولین جربیل (*Mongolian gerbil*) که آلوده به *H. pylori* است را گزارش کردند. در این مطالعه IgY ضد *H. pylori* موجب کاهش التهاب لایۀ مخاطی معده که توسط این باکتری تحریک می‌شود، گردید. از طرفی میزان التهاب با تعیین میزان لنفوسیت‌های بافتی و نفوذ نوتروفیل‌ها مشخص شد (۲۴). آنها همچنین انواعی از IgY‌های حاصل از مرغ‌های ایمن شده با پروتئین‌های مختلف *H. pylori* را تهیه کردند (۲۵). اگر IgY دارای تأثیر اختصاصی نباشد، هیچ مهاری در رشد باکتری رخ نمی‌دهد. با توجه به آزمایشاتی که در آنها از مدل جربیل استفاده شده بود، به وضوح مشخص شد که IgY صدمات سطوح مخاطی معده ناشی از عفونت *H. pylori* را کاهش می‌دهد، بنابراین ارزش درمانی IgY که به صورت خوراکی استفاده می‌شود، در مدل‌های آزمایشگاهی مثل جربیل، به دلیل توانایی مهار باکتری‌ها می‌باشد. دلایل متقاعد کننده بیشتر در حمایت از اختصاصیت این آنتی‌بادی‌ها در مهار اتصال *H. pylori* به سلول‌های AGS حاصل می‌شود که با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) تأیید شده است. اگر چه مکانیسمی که در آن IgY از لانه‌گزینی *H. pylori* ممانعت می‌کند تا به حال مشخص نشده است، نتایج نشان می‌دهند که IgY می‌تواند خصوصیات مربوط به قدرت چسبندگی *H. pylori* را مهار کند. ارتباط بین مهار فعالیت اوره‌آز و خصوصیات مربوط به چسبندگی باید مشخص شود. مطالعات در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهند که کل آنزیم اوره‌آز *H. pylori* احتمالاً ایمنی کافی ایجاد نمی‌کند و احتمالاً در چنین حالتی فعالیت آنزیم از بین نمی‌رود (۲۶). با این حال، IgY تولید شده با استفاده از عصارۀ لیز سلولی، با دیگر باکتری‌هایی که به طور معمول در انسان یافت می‌شوند، واکنش متقاطع می‌دهد (۲۷). بنابراین نیازمند آنتی‌ژن‌هایی از *H. pylori* با قدرت ایمونوژنیته بالا برای کاهش عوارض

HpUc تخلیص شده علیه پروتئین نوترکیب rUreCc مشاهده می‌گردد. همان طور که در نمودار ۲ مشخص است آنتی‌بادی IgY-HpUc تخلیص شده، پروتئین نوترکیب rUreC را به خوبی شناسایی می‌کند. همچنین در مقایسه با توانایی آنتی‌بادی علیه قطعه کلی زیر واحد C، این آنتی‌بادی توانایی خوبی در شناسایی rUreC دارد (نمودار ۳).



نمودار ۳ - مقایسه کارایی آنتی‌سرم‌ها در شناسایی پروتئین UreC. این نمودار نتایج الایزای رقت‌های مختلف از سرم مرغ‌های ایمن شده با پروتئین‌های rUreC و rUreCc را، علیه پروتئین rUreC نشان می‌دهد.

بحث

درمان سه‌گانه شامل دو آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و کلاریترومایسین و یک مهار کننده پمپ پروتونی به مدت یک هفته به عنوان درمان منتخب برای عفونت *H. pylori* در بسیاری از کنفرانس‌ها و مجامع عمومی پیشنهاد شده است (۱۴). با این حال، این نوع درمان در اغلب موارد با دلایل مختلفی منجر به شکست می‌شود (۱۵). مهم‌ترین دلیل برای عدم کارایی این نحوه درمان، مقاومت *H. pylori* به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها است. درمان عفونت *H. pylori* با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی می‌تواند دارای مزایای زیادی به دلیل شناسایی اختصاصی *H. pylori* و جلوگیری از چسبیدن آن به سطوح اپی‌تلیال سیستم گوارش انسان باشد (۱۶). تحقیقات اخیر در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی با استفاده از مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که ایمن‌سازی با آنتی‌ژن‌های طبیعی و یا نوترکیب می‌تواند در برابر عفونت *H. pylori* حفاظت بخش باشد (۱۷). استفاده خوراکی از IgY زردۀ تخم مرغ توسط بسیاری از محققین بر علیه عوامل بسیاری از بیماری‌های گوارشی مثل انتروتوکسیژنیک *E. coli* (۱۸)، روتاویروس‌های انسانی (۱۹) و سودوموناس آئروژنزا (۲۰) با موفقیت به کار گرفته شده است. IgY هم‌چنین لانه‌گزینی استرپتوکوکوس موتانس را در روی دندان‌ها مهار می‌کند،

این مطالعه نشان می‌دهد که IgY تهیه شده از مرغ لگ هورن سفید ایمن شده با انتهای کربوکسیلی زیر واحد C آنزیم اوره‌آز می‌تواند به خوبی IgY تهیه شده بر علیه کل زیرواحد C این آنزیم (۲۶)، در شناسایی پروتئین نوترکیب UreC در سنجش الیزا توانمند باشد و همچنین تیتراژ این آنتی بادی با توجه به اینکه در رقت $1/8000$ توانایی شناسایی آنتی ژن نوترکیب را دارد، بالا می‌باشد. این نتایج با مطالعاتی که نشان دهنده وجود شاخص‌های آنتی‌ژنیک غالب در انتهای کربوکسیلی زیرواحد C آنزیم اوره‌آز می‌باشند سازگار است (۲۷). در پایان، نتایج مثبت این مطالعه نشان می‌دهد که IgY حاصل از مرغ‌های ایمن شده با بخش‌های پروتئینی *H.pylori* ممکن است روش جدیدی برای کنترل عفونت با این باکتری در انسان ایجاد کند. با این حال، بعضی از مسایل برای استفاده بالینی حل نشده باقی می‌ماند که شامل تأثیر IgY بر انسان، ماندگاری تأثیر IgY پس از قطع استفاده و توانایی از بین بردن یک عفونت ایجاد شده، می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد به دلیل حمایت مالی و ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش در قالب پایان نامه دکتری و خانم دکتر سیاوشی و آقای دکتر علی هاتف سلمانیان به دلیل حمایت‌های علمی و در اختیار قرار دادن سوش بومی هلیکوباکتر پیلوری تشکر و قدردانی می‌گردد.

جانبی و افزایش اختصاصیت می‌باشیم. اگر اوره‌آز *H.pylori* یک هدف درست برای ایجاد واکنش‌های مؤثر باشد، بهتر است برای تولید آنتی‌بادی‌هایی که فعالیت آنزیم اوره‌آز را خنثی می‌کنند، مورد استفاده قرار گیرند. بر اساس این واقعیت، ما تلاش کردیم تا آنتی‌بادی اختصاصی‌تری بر علیه زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز تولید کنیم که بتواند به صورت اختصاصی مکانیسم‌های دفاعی بدن را تحریک کند. در این مطالعه، ایمن سازی مرغ‌ها با پروتئین نوترکیب UreC تخلیص شده منجر به تولید مقدار قابل توجهی آنتی‌بادی در زرده تخم مرغ شد، بدون اینکه روی تخم‌گذاری مرغ‌ها تأثیر داشته باشد. تغییرات در تولید آنتی بادی نیز شبیه به گزارشات قبلی بود (۲۷). به منظور کاربرد عملی IgY در مواد غذایی یا دارویی برای درمان عفونت *H.pylori*، پایداری IgY در مقابل گرما، اسید و پپسین با اندازه‌گیری میزان فعالیت باقیمانده آنتی‌بادی با روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت. از لحاظ ایمونولوژیک IgY-Hp در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه فعال باقی می‌ماند که این موضوع امکان پاستوریزاسیون به منظور استریل کردن محصولات را مطرح می‌کند. غنی‌سازی محصولات غذایی با این ایمنوگلوبولین، در کنار مقدار زیاد تولید و اثرپذیری IgY می‌تواند به طور قابل توجهی آلودگی با *H.pylori* را کاهش دهد. Horie و همکارانش نشان دادند که استفاده از نوشیدنی دوغ که با آنتی‌بادی‌های زرده تخم مرغ علیه آنزیم اوره‌آز، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای *H.pylori* غنی شده بود می‌تواند به طور مؤثری عفونت با این باکتری را کاهش دهد (۲۷).

REFERENCES

1. Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2006; 12: 5593-98.
2. Malaty HM, Nyren O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2003; 8: 8-12.
3. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2002; 347: 1174-86.
4. Megraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. Gut 2004; 53: 1374-84.
5. Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial urease. Microbiol Rev 1995; 59: 451-80.
6. Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, et al. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells : a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. J Exp Med 1998; 187: 1659-69.
7. Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. J Immunol 2002; 168: 6002-6006.
8. Nilsson I, Utt M. Separation and surveys of proteins of *Helicobacter pylori*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 771: 251-60.
9. Rupnow MF, Owens DK, Shachter R, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* vaccine development and use: a cost-effectiveness analysis using the Institute of Medicine Methodology. Helicobacter 1999; 4: 272-280.

10. Akada JK, Shirai M, Takeuchi H, Tsuda M, Nakazawa T. Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Mol Microbiol* 2000; 36: 1071-84.
11. Siavoshi F, Malekzadeh R, Daneshmand M, Ashktorab H. *Helicobacter pylori* Endemic and Gastric Disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2075-80.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular cloning, a Laboratory manual*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
13. Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulines from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E.coli* strain. *J Immunol Methods* 1993; 164: 207-14.
14. Malfertheiner P, Me'graud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection- the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-80.
15. Me'graud F, Lamouliatte H. The treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1333-43.
16. Suzuki H, Masaoka T, Miyazawa M, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Gastric mucosal response to *Helicobacter pylori*. *Keio J Med* 2002; 51: S40-44.
17. Koesling J, Lucas B, Develioglou L, Aebischer T, Meyer TF. Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium* aroA against *H. pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine* 2001; 12: 413-20.
18. Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Frohlich AA, Baidoo SK. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23: 283-88.
19. Sarker SA, Casswall TH, Juneja LR, Hoq E, Hossain I, Fuchs GJ, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 19-25.
20. Sugita-Konishi Y, Shibata K, Yun SS, Hara-Kudo Y, Yamaguchi K, Kumagai S. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996; 60: 886-88.
21. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Otake S, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1997; 31: 268-74.
22. Verdolva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J Chromatogr* 2000; 749: 233-42.
23. Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1061-66.
24. Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H.pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol* 2003; 52: 217-22.
25. Hirota K, Nagata K, Norose Y, Futagami S, Nakagawa Y, Senpuku H, et al. Identification of an antigenic epitope in *Helicobacter pylori* urease that induces neutralizing antibody production. *Infect Immun* 2001; 69: 6597-603.
26. Shin JH, Roe IH, Kim HG. Production of anti-*Helicobacter pylori* urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of *H. pylori* urease. *J Med Microbiol* 2004; 53: 31-34.
27. Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. *J Dairy Sci* 2004; 87: 4073-79.