

همساز سازی و بررسی بیان ژن **fliR** به عنوان واکسن ژنی علیه هلیکوباکتر پیلوری

مختار حیدری

کارشناس ارشد ژنتیک؛ تهران؛ ایران

چکیده

هلیکوباکتر پیلوری (HP) باکتری میله‌ای شکل و گرم منفی است که در بیش از ۶۰٪ از جمعیت جهان ایجاد آلودگی گوارشی می‌کند و در ایجاد تیپ B گاستریت، زخمهای معده و دوازدهه و سرطان معده نقش دارد. درمان آنتی بیوتیکی عفونتهای هلیکوباکتر پیلوری خصوصا در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران که عفونت هلیکوباکتر پیلوری شیوع بالایی دارد به دلیل هزینه زیاد و عدم همکاری بیماران در اجرای رژیمهای درمانی و ناراحتیهای ایجاد شده ناشی از مصرف آنتی بیوتیکهای مختلف و همچنین ایجاد باکتریهای مقاوم به انواع آنتی بیوتیکها جوابگوی این معزل نمی‌باشد و طراحی یک واکسن مناسب جهت پیشگیری و درمان این عفونت ضرورت پیدا می‌کند و مورد توجه است. به دلیل داشتن نقش عملکردی ژن **fliR** در تولید پروتئینهای مورد استفاده در تاژک هلیکوباکتر پیلوری، و ترشح عوامل بیماری‌زایی این باکتری به خارج از سلول، این پروتئین بعنوان یک کاندید مناسب واکسن قوی علیه عفونت هلیکوباکتر پیلوری مطرح است که می‌تواند در راهکارهای درمانی، پیشگیری کننده و حتی تشخیصی بکار رود. هدف از این تحقیق کلون کردن ژن **fliR** از سویه استاندارد (ATCC(40504 هلیکوباکتر پیلوری در وکتور بیانی مناسب و انتقال وکتور به میزبان باکتریایی مناسب (*E. coli* Top10) جهت تولید فرم نوترکیب این پروتئین است. باتوجه به نتایج حاصله سازواره ژنی PEGFP-C1- **fliR** می‌تواند کاندید مناسبی جهت تولید واکسن ژنی باشد.

واژه‌های کلیدی: همساز سازی؛ ژن **fliR**؛ واکسن ژنی؛ هلیکوباکتر پیلوری

۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری^۱ یک ارگانسیم اکسیداز و کاتالاز مثبت می‌باشد که مورفولوژی ویژه‌ای دارد و متحرک است. این باکتری دارای ۳ تا ۵ فلاژل قطبی بوده و تولید کننده قدرتمند آنزیم اوره‌آز است و شکل ظاهری آن به صورت مارپیچی و گرم منفی می‌باشد (۱ و ۲). تا به امروز ۵۷ گونه از این باکتری شناسایی شده است که یکی از مهم‌ترین آنها که در انسان ایجاد بیماری می‌کند، هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. این باکتری بصورت انتخابی در اپیتلیوم معده ساکن می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (۳). عفونت این باکتری با تجمع نوتروفیل، ماکروفاژ و لنفوسیت در اپیتلیوم معده همراه است ولی تعامل این میکروب با هپاران سولفات و تیرونکتین و اسید هیالورونیک از فعالیت فاگوسیتی، ماکروفاژها جلوگیری می‌کند (۴). تهاجم سلولی در هلیکوباکتر پیلوری وجود ندارد و یا بسیار نادر است. این باکتری به طور معمول به دنبال عفونت دهانی به همراه بزاق که شامل ترکیبات سولفات و نمکی مناسب برای اتصال هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد، وارد معده می‌گردد. باکتری برای فرار از شرایط اسیدی معده به حرکت توسط فلاژل نیاز دارد. تا بعد از جای‌گیری در موکوس با کمک اوره‌آز شرایط اسیدی معده را خنثی کند فلاژل باعث حرکت سریع ارگانسیم در موکوس معده و در نتیجه فرار باکتری از شرایط سخت و اسیدی معده می‌شود، این باکتری میکروآئروفیلیک و نوتروفیلیک است (۴). اغلب سویه‌های این باکتری فاکتورهای مهاجمی را تولید می‌کنند که مسیرهای پیام‌رسان درون سلول میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵). هلیکوباکتر پیلوری به لحاظ ژنتیکی، تنوع بالایی در میان گونه‌های باکتریایی داشته و دارای بالاترین نرخ نوترکیبی در گونه است (۶). تنوع بالا در این باکتری باعث شده است که باکتری بتواند با چالش‌های خاص در میزبان‌های فردی مقابله کند. فرض شده که باکتری از جهش و نوترکیبی برای سازگاری به وسیله تغییر مولکول‌هایی که با میزبان میانکش دارند، استفاده می‌کند (۷). عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن باکتریایی در جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد الگوی اپیدمیولوژیک این عفونت در کشورهای صنعتی و در حال توسعه متفاوت است به طوری که در کشورهای صنعتی به تدریج و با افزایش سن، شیوع عفونت افزایش می‌یابد؛ اما در کشورهای در حال توسعه بیشتر افراد در سن کودکی و درصد زیادی از افراد جوان نیز پس از بزرگسالی عفونی می‌شوند (۸). سرطان معده چهارمین سرطان رایج در جهان بوده و به عنوان دومین عامل مرگ و میر مرتبط با سرطان می‌باشد (۹). با وجود پاسخ‌های قوی ایمنی که علیه هلیکو باکتر پیلوری برانگیخته می‌شود، عفونت در اکثر موارد ریشه‌کن نمی‌شود. رژیم‌های درمانی کنونی علیه عفونت شامل ترکیبی از دو آنتی‌بیوتیک مختلف همراه با یک مهار کننده پمپ پروتونی است که در اکثر موارد به پاکسازی باکتری منجر می‌شود، با این حال معایب متعددی مانند بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، بروز عفونت مجدد، عدم تأثیر بر اشکال غیر فعال باکتری و هزینه بالا برای این روش درمانی گزارش شده است (۱۰). از این رو ضرورت دستیابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری (مانند واکسیناسیون) مطرح می‌شود. اطلاع از نوع پاسخ ایمنی مؤثر در حفاظت علیه باکتری، شناسایی آنتی‌ژن‌های مناسب باکتری در تحریک ایمنی و پاسخ ایمنی ناشی از آنها از نکات اصلی در راستای دستیابی به واکسن‌های کارآمد به شمار می‌آید. برای تولید یک واکسن مؤثر بر هلیکوباکتر پیلوری، آنتی‌ژن پایدار حفاظت شده و قوی ضروری است. در این زمینه آنتی‌ژن‌های مختلف مانند اوره‌آز بررسی شده‌اند (۱۱). براساس مقالات موجود اوره‌آز باکتری از بهترین کاندیداهای واکسن می‌باشد (۱۲). ژن اوره‌آز برای اولین بار در باکتری کلبسیلا کشف شد. اوره‌آز یک متالوآنزیم ضروری برای بقای هلیکوباکتر پیلوری در محیط اسیدی معده است (۱۳).

1 - Helicobacter pylori

واکسن‌های ژنی نسل نوینی از واکسن‌ها می‌باشد که در قیاس با واکسن‌های نسل قبلی دارای مزایایی هستند که از آن جمله می‌توان به توانایی تحریک هر دو سیستم ایمنی همورال و سلولار و پایداری ساختارهای *DNA* اشاره کرد. همچنین استفاده از این واکسن‌ها از ایجاد واکنش‌های آلرژیک جلوگیری می‌کنند (۱۴).

طرح موضوع

باکتری هلیکوباکتر میزبان انسان می‌باشد و باعث بیماریهای گوارشی مانند گاستریت، زخم دوازدهه، زخم معده و سرطان می‌باشد (۱۴).

تاریخچه کشف هلیوباکتر پیلوری

بیزوزرو^۲ باسیل‌های فزری شکل موجود در مخاط معده و غدد معده^۱ سگ‌های سالم را شرح داد. سپس سالمون^۳ در سال ۱۸۹۶ این باکتری را در گربه‌ها و موش‌های صحرایی یافت و جزئیات بیشتری را مطرح کرد. کرینیتز^۴ در سال ۱۹۰۶ چندین نوع اسپیروکت را در معده^۵ یک بیمار مبتلا به کارسنیوما شرح داد که احتمال داد یکی از آنها هلیکوباکتر پیلوری باشد. در سال ۱۹۸۳ نیز دونگیس^۵ در نمونه‌های نکروسی گرفته شده از معده^۶ اجساد، این باکتری را مشاهده کرد ولی نتوانست ارتباط آنها را با بیماری معده مشخص کند. همچنین در سال ۱۹۴۰، فرید برگ^۶ و بارون^۷ ارگانیسیم‌های مشابهی را از نمونه‌های آندوسکوپی که در ارتباط با زخم‌های خوش خیم و بدخیم بودند، گزارش کردند. تا اینکه وارون^۸ و مارشال^۹ در سال ۱۹۸۳ در استرالیا موفق به جداسازی این میکروارگانیسیم‌ها از معده انسان شدند و همزمان با تحقیقات این محققان رولاسون^{۱۰} و همکارانش نیز موفق به جداسازی این باکتری از بیوپسی معده شده و این باکتری را با گاستریت مرتبط دانستند (۱۵). هلیکوباکتر پیلوری متعلق به *Proteobacteria* و خانواده^{۱۱} *Helicobacteraceae* است. تا به امروز ۵۷ گونه از این باکتری شناسایی شده است که از مهم‌ترین آنها که در انسان ایجاد بیماری می‌کند هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد (۳). توالی کامل ژنوم هلیکوباکتر پیلوری سویه ۲۶۶۹۵ در سال ۱۹۹۷ توسط انسیتو تایگر^{۱۱} و دو سال بعد، توالی سویه *J99* منتشر شد (۱۶).

متن اصلی

هلیکوباکتر پیلوری، باسیلی است گرم منفی، مارپیچی و تاژک دار که حدود ۳/۵ میکرون طول و ۰/۵ میکرون عرض دارد. این باکتری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های انسانی می‌باشد (۱۷). این باکتری اغلب در مخاط معده به صورت مارپیچی و در محیط کشت به صورت خمیده دیده می‌شود (۱۸ و ۱۹). محل استقرار هلیکوباکتر پیلوری در لایه مخاطی معده انسان است که این لانه‌گزینی موجب بروز عفونت و در پی آن تخریب بافت اپیتلیال معده می‌شود (۲۰). هلیکوباکتر پیلوری در معده انسان

-
2. Bizzozero
 3. Salmon
 4. Krienitz
 5. Doenges
 6. Freed berg
 7. barron
 8. Warron
 9. Marshall
 10. Rollason
 11. TIGR

کلونیزه شده و در ایجاد بیماریهای گوارشی مانند گاستریت، زخم دوازدهه، زخم معده و سرطان معده از اهمیت اتیولوژیک بالایی برخوردار است (۲۲ و ۲۱-۱۷). همچنین نقش آن در بروز بیماریهایی مانند آترواسکلروز، سنگ صفر، سوء هاضمه، سندرم متابولیک دیابت نوع ۱ و مقاومت انسولینی مطرح است (۲۳ و ۲۴).

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد عوامل متعددی بر شدت بروز اختلالات گوارشی مرتبط به هلیکوباکتر پیلوری مؤثر می‌باشد که از مهم‌ترین این موارد می‌توان به ژنتیک میزبان، عوامل محیطی و فاکتورهای ویروالانس اشاره نمود (۲۵ و ۲۲). از جمله عواملی که بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته فاکتورهای بیماری زامی باشد فاکتورهای بیماریزای هلیکوباکتر پیلوری فاکتورهای متعددی چون اوره آز، فلاژل، ادهسین، سیتوکین و اکوئل زا و جزیره پاتوژنسیته *cag* می‌باشد که ممکن است در بیماریزایی درگیر باشند (۲۶ و ۲۷).

همچنین مطالعات کلینیکی نشان داده است که ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری منجر به کاهش خطر بازگشت سرطان معده و بهبود لنفومای *MALT*^{۱۲} می‌گردد (۲۸ و ۲۹). ضایعات پیش سرطانی فقط در دسته‌ای از جمعیت ممکن است به سرطان منجر گردد، زیرا فاکتورهای بیماریزای باکتری و فاکتورهای ژنتیکی میزبان که در بین گروه‌های نژادی با هم متفاوت است در بیماریزایی این باکتری دارای اهمیت می‌باشند (۳۰). حدود نیمی از جمعیت جهان حامل این ارگانسیم هستند (۳۱)؛ اما بیماریهای مرتبط با آن تنها در ۱۰ تا ۲۰ درصد این جمعیت‌ها دیده می‌شود (۳۲).

به دلیل وسعت ضررهای جانی و مالی که در رابطه با این باکتری مطرح است به خصوص اینکه هلیکوباکتر پیلوری سر دسته عوامل عفونی ایجاد کننده سرطان دستگاه گوارش می‌باشد، توسعه مطالعات در این زمینه بسیار ارزشمند می‌باشد (۳۳ و ۳۴). در روند ایجاد بیماری باکتری می‌تواند سال‌ها در معده مستقر شده و با بکارگیری سیستم ایمنی باعث القاء التهاب درموکوس معده شود. با تداوم التهاب، گاستریت مزمن به وجود می‌آید که این شرایط در بیماران مختلف ممکن است به آتروفی معده، متاپلازی رودهای یا سرطان معده منجر گردد (۳۵ و ۳۶).

شیوع هلیکوباکتر پیلوری در گاستریت و متاپلازی رودهای

به نظر می‌رسد که هلیکوباکتر پیلوری نقش بسیار مهمی به عنوان کارسینوژن سرطان معده بازی می‌کند ولی تعداد اندکی از انسان‌هایی که دارای این عفونت می‌باشند به سمت سرطان می‌روند. باکتری در موکوس معده کولونیزه و باعث التهاب و پاسخ ایمنی می‌شود که منجر به تخریب موکوس مثل آتروفی و متاپلازی رودهای و دیس پلازی می‌شود (۳۸).

مشاهده شده که شیوع هلیکوباکتر پیلوری با میزان شیوع گاستریت مطابقت دارد (۳۹-۴۱). هر چند شیوع در جمعیت‌های مختلف متفاوت است (۴۲-۴۴). بین شیوع هلیکوباکتر پیلوری و گاستریت مزمن در گروه‌های سنی مختلف ارتباط مستقیمی وجود ندارد یعنی با افزایش سن بر میزان شیوع گاستریت مزمن افزوده می‌شود و از شیوع ابتلاء به هلیکوباکتر پیلوری کاسته می‌شود. رابطه مشابهی نیز بین گاستریت مزمن و گاستریت مزمن فعال وجود دارد. همچنین بین شیوع متاپلازی رودهای و شیوع گاستریت مزمن رابطه مستقیمی وجود دارد، یعنی هر دو با افزایش سن افزایش می‌یابند (۴۵).

در سال ۱۹۶۵ لورن^{۱۳} آدنوکارسینوم معده را به دو گروه رودهای^{۱۴} و منتشر^{۱۵} تقسیم کرد که از نقطه نظر بالینی، مورفولوژی و اپیدمیولوژی باهم فرق دارند. سرطان نوع رودهای به دنبال گاستریت مزمن (آتروفیک) و متاپلازی رودهای رخ می‌دهد و در

12. mucosa associated lymphoid tissue

13. Lavern

14. intestinal

15. diffuse

بخش انتهایی (دستیال) معده دیده می‌شود، در حالی که نوع منتشر جنبه ارثی داشته و بیشتر از مخاط طبیعی معده منشأ می‌گیرد (۴۶).

طبق نظریه آقای ربرت^{۱۶} متاپلازی روده‌ای در نواحی که سرطان معده شایع‌تر است بیشتر از نواحی دیگر جهان می‌باشد (۴۷). از سوی دیگر به طور مکرر ثابت شده است که سرطان معده به خصوص نوع روده‌ای با میزان ابتلاء به هلیکوباکتر پیلوری رابطه مستقیمی وجود دارد (۴۸-۵۱).

نوع سه متاپلازی روده‌ای را ناکامل می‌نامند (۵۲)؛ که به دیس پلازی منجر می‌شود (۵۳) سیلوا^{۱۷} طی مطالعه‌ای نتیجه گرفت که بیشترین شیوع هلیکوباکتر پیلوری در نواحی از مخاط است که متاپلازی ناکامل روده‌ای وجود دارد و این متاپلازی است که نشان دهنده آسیب طولانی مدت مخاط بوده و به دیس پلازی و سرطان منجر می‌گردد؛ بنابراین حضور ارگانسیم در پیامدهای بافتی ضرورت دارد (۵۴).

اپیدمیولوژی

هلیکوباکتر پیلوری ارگانسمی است که در تمام نقاط جهان گزارش شده است. هرچند بیشتر مبتلایان بدون علامت هستند اما زمانی که انسان را مبتلا می‌کند تبدیل به عفونت مزمن می‌شود. هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند تمام عمر، انسان را مبتلا نماید (۵۵-۵۷).

این ارگانسیم بندرت خود به خود بدون درمان از بین می‌رود، حتی عود پس از درمان نیز گزارش شده است بخصوص در کشورهایی که میزان ابتلا به این باکتری زیاد است (۵۸). عفونت با این باکتری در مناطق گوناگون جهان بسته به سن، موقعیت جغرافیایی، عوامل اقتصادی-اجتماعی، محیطی، فرهنگی و استعداد ژنتیکی برای عفونت متغیر است (۵۹). به عنوان مثال ابتلای به این عفونت در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران در سن پایین‌تری رخ می‌دهد (۶۰).

شیوع ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری در نقاط مختلف جهان متفاوت است. شیوع آن با افزایش سن افزایش می‌یابد. در کشورهای پیشرفته تا سن ۵۰ سالگی به ۵۰٪ و در کشورهای در حال پیشرفت تا سن ۳۰ سالگی، به ۸۰٪ می‌رسد (۶۱). شیوع جمعی هلیکوباکتر پیلوری در دهه پنجم زندگی بیشتر می‌شود پس از آن کاهش می‌یابد. میزان ابتلا در زنان ۱۰٪ کمتر از مردان بوده است که احتمالاً به دلیل مراجعه مکرر زنان به درمانگاه‌های زنان و استفاده وسیع از آنتی بیوتیک می‌باشد (۶۲)؛ اما در بیشتر مطالعات جهانی میزان ابتلاء وابسته به جنس نیست (۶۳ و ۶۴). محل زندگی از نظر کمبود امکانات بهداشتی در ابتلاء به عفونت اهمیت دارد (۶۷).

حتی در کشورهای پیشرفته می‌توان مناطقی را دید که شیوع ابتلاء به عفونت بیشتر از نقاط دیگر است (۶۵). سن ابتلاء از عوامل تعیین کننده آسیب‌های مخاطی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری است. احتمال داده می‌شود که عفونت باید از سنین کودکی آغاز شود تا خطر سرطان افزایش یابد (۶۶). در کشورهای عقب مانده بر خلاف کشورهای پیشرفته، ۵۰٪ ابتلاء در سنین کمتر از ۲۰ سالگی رخ می‌دهد (۶۷).

گذشته از سن، خطر اصلی دیگر برای کسب عفونت فقر است. مطالعات نشان داده که بین سطح اقتصادی-اجتماعی افراد و

شیوع این عفونت ارتباط نزدیکی وجود دارد (۶۸). برای نمونه در کشور هند ۸۰ درصد افراد زیر ۲۰ سال دارای سطح

اقتصادی-اجتماعی پایین از نظر آنتی بادی ضد هلیکوباکتر پیلوری مثبت می‌باشند، اما شیوع عفونت در کشورهای توسعه یافته

16.Robert

17.Silva

دارای سطح اجتماعی-اقتصادی بالاتر بین ۱/۳ تا ۴/۱۹ درصد گزارش شده است (۶۹). بر اساس مطالعات انجام شده در ایران، میزان شیوع آلودگی در افراد ۳۵-۵۵ سال بین ۴/۸۸ تا ۹۳ درصد و در افراد ۶-۲۰ سال استانیهای اردبیل و یزد به ترتیب ۵/۴۷ و ۶/۳۰ درصد و در افراد ۱۰ تا ۲۵ سال شهر تهران ۹/۴۴ درصد گزارش شده است (۷۰ و ۷۱).

توانایی‌ها و مزایای ویژه واکسنهای ژنی:

- ۱- فاقد محدودیت‌های واکسن‌های متداول، نو ترکیب پروتئینی و پپتیدی است.
 - ۲- توان ایمن سازی بر علیه چندین سویه مختلف واجد تنوع پادگنی *Antigenic Variation* را دارد.
 - ۳- تولید پادگن در شکل کاملاً طبیعی و ارائه مناسب پادگن به سیستم ایمنی.
 - ۴- تحریک ایمنی هومورال، سلولی و مخاطی است.
 - ۵- ایمنی پایدار.
 - ۶- نیاز به مقدار بسیار کمتر واکسن در مقایسه با سایر واکسنها (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ بار کمتر).
 - ۷- عدم واکنش سیستم ایمنی به وکتور تزریقی و عدم تولید پادتن بر علیه سلولهای گیرنده وکتور. رفع مشکل پاسخ ایمنی بر علیه حامل زنده (واکسن‌های باکتریال، ویروسی زنده ویا وکتورهای ویروسی).
 - ۸- فقدان مشکل امکان فعال شدن واکسنهای ضعیف شده و خطر ایجاد عفونت.
 - ۹- امکان تولید واکسن‌های چندگانه.
 - ۱۰- سهولت و سرعت تولید انبوه و مشابه بودن مراحل تولید واکسن‌های مختلف (*Generic*)
 - ۱۱- سهولت مراحل کنترل کیفی (*GMP*)
 - ۱۲- پایداری در دماهای مختلف و عدم نیاز به زنجیره سرد جهت نگهداری.
- مراحل طراحی، تولید و کنترل کیفی واکسن‌های ژنی بسیار آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر از واکسن‌های متداول است و این عامل از نظر اقتصادی بسیار با ارزش است و دیگر اینکه واکسن‌های ژنی را می‌توان به شکل خشک شده برای مدت‌های طولانی بدون نیاز به یخچال ذخیره نمود نقل و انتقال آن بسیار با سهولت صورت می‌گیرد و برای مناطقی که مشکلات تهیه سردخانه وجود دارد بسیار مناسب است (۱۲۰).

تحقیقات در عرصه واکسن‌های ژنی نیازمند مقدمات زیر است:

انتخاب آنتی‌ژن مناسب جهت استفاده در واکسن ژنی

در صورتی که آنتی‌ژن مورد نظر شناخته شده و ردیف *DNA* یا *RNA* آن شناسایی شده باشد می‌توان با روش‌های مختلف اقدام به استخراج ژنوم و تهیه ژن مورد نظر جهت پیوند نمودن به واکسن ژنی را نمود.

انتخاب پلاسمید مناسب جهت پیوند ژن مورد نظر:

انواع پلاسمیدهای القاء کننده آنتی‌ژن در سلول‌های حیوانی و انسانی موجود است. بر اساس هدف تحقیق انتخاب پلاسمید مناسب و سایر بخشهای مورد نیاز واکسن ژنی را می‌توان انتخاب نمود (۱۲۰).

سلول مناسب جهت تولید واکسن ژنی

تهیه مقادیر لازم از پلاسمید واکسن ژنی

از روش‌های مختلفی جهت تولید پلاسمید خالص واکسن ژنی می‌توان استفاده نمود ولیکن به دلیل نقش آلودگی‌ها در کاهش میزان ترانسفکشن و تحریک سیستم ایمنی لازم است پلاسمیدی خالص تهیه شود. البته می‌توان پلاسمید را به روش‌های متداول تولید نموده و سپس اقدام به حذف اندوتوکسین و سایر ناخالصی‌های آن نمود (۱۲۰).

مواد و روش کار

مواد و لوازم مصرفی مورد استفاده

در جدول زیر نام مواد و واکنش‌گرهای مورد استفاده در این تحقیق آورده شده است.

جدول ۱. مواد مورد استفاده

نام ماده	شرکت سازنده	نام ماده	شرکت سازنده
آب مقطر تزریقی	سیناژن	$CaCl_2$	Merck
$MgCl_2$	سیناژن	<i>SalI</i>	Fermentas
<i>dNTP</i>	<i>Bioflux</i>	<i>SacII</i>	Fermentas
<i>Primers</i>	سیناژن	استیک اسید	Merck
<i>Taq DNA polymerase</i>	سیناژن	سر سمپلر آبی فیلتر دار	Trefflab
<i>Agarose</i>	سیناژن	سر سمپلر آبی ساده	Trefflab
<i>Ethidium Bromide</i>	سیناژن	سر سمپلر زرد ساده	Trefflab
<i>1kb DNA ladder</i>	سیناژن	سر سمپلر کریستالی ساده	Trefflab
<i>100bp DNA ladder</i>	سیناژن	تیوپ ۱/۵ میلی لیتر	Trefflab
<i>Loading Buffer</i>	سیناژن	تیوپ ۰/۵ میلی لیتر	Trefflab
<i>DNA</i> کیت استخراج از ژل	<i>Bioneer</i>	تیوپ ۰/۲ میلی لیتر	Trefflab
<i>T/A cloning Kit</i>	<i>Fermentas</i>	کیت استخراج پلاسمید	<i>Bioneer</i>
لوله آزمایش	<i>Jet biofil</i>	<i>pET32a vector</i>	<i>Invitrogen</i>
پارافیلیم	Merck	متانول	Merck
اتانول	Merck	آنتی بیوتیک آمپی سیلین	Merck
پلیت کشت باکتری ۱۰ سانتی	<i>Jet biofil</i>	آنتی بیوتیک نئوماپسین	Merck
هلیکوباکتر پیلوری	انستیتو پاستور ایران	گاز استریل	کاوه
<i>E. coli Top10</i>	انستیتو پاستور ایران	فالکون ۱۵	<i>Jet biofil</i>
<i>SDS PAGE ladder</i>	<i>Fermentas</i>	فالکون ۵۰	<i>Jet biofil</i>
<i>SDS PAGE</i>	<i>Fermentas</i>	دستکش	Maxwell

			<i>loading</i>
<i>Merck</i>	<i>LB-Broth</i>	<i>Sigma</i>	<i>TEMED</i>
<i>Merck</i>	<i>LB-Agar</i>	<i>Sigma</i>	رنگ کوماسی بلو
کاوه	پنبه	<i>Sigma</i>	آکریل آمید
<i>Sigma</i>	گلاپسین	<i>Sigma</i>	بیس آکریل آمید
<i>Sigma</i>	<i>SDS</i>	<i>Sigma</i>	تریس بازی
		<i>Sigma</i>	<i>APS</i>

مراحل انجام PCR

- ۱- مرحله شروع^{۱۸}: این مرحله به منظور فعال شدن آنزیم‌های *DNA* پلی‌مراز مقاوم به حرارت مورد استفاده قرار می‌گیرد و طی آن به مدت ۱ تا ۹ دقیقه دمای محلول به ۹۴ درجه سانتی‌گراد رسانده می‌شود.
- ۲- مرحله واسرشت^{۱۹}: این مرحله اولین قسمت از سیکل‌های حرارتی منظم است و مخلوط واکنش را تا دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد حرارت می‌دهند. در این درجه حرارت، پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته‌ای *DNA* شکسته می‌شوند و *DNA* الگو به دو مولکول تک رشته‌ای تبدیل می‌گردد.
- ۳- مرحله اتصال^{۲۰}: دمای محلول به میزان ۵۰ تا ۶۰ درجه کاهش می‌یابد. در این مرحله آغازگرها به *DNA* الگو تک رشته‌ای متصل می‌شوند آنزیم پلی‌مراز پس از اتصال به هیبرید آغازگر-الگو، همانندسازی *DNA* را آغاز می‌کند. باید توجه داشت که به طور طبیعی، دمای اتصال^{۲۱} در حدود ۳ تا ۵ درجه پایین‌تر از نقطه ذوب آغازگرها است.
- ۴- مرحله طویل شدن^{۲۲}: دمای محلول در این مرحله باید متناسب با نوع *DNA* پلی‌مراز مورد استفاده باشد. برای آنزیم *Taq polymerase* دمای اپتیمم ۷۲ درجه است. در این مرحله آنزیم *DNA* پلی‌مراز با استفاده از *dNTP*های موجود در محلول، یک رشته *DNA* جدید را در جهت ۵' به ۳' و در مقابل رشته‌های الگو می‌سازد.
- ۵- مرحله طویل شدن نهایی^{۲۳}: پس از آخرین سیکل *PCR*، این مرحله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام می‌شود تا اطمینان حاصل گردد که همه مولکولهای تک رشته *DNA* همانندسازی شده‌اند.
- ۶- نگاهداری نهایی^{۲۴}: محلول نهایی به مدت کوتاهی در دمای ۱۵ درجه قابل نگاهداری می‌باشد.

اجزای مورد استفاده در PCR

- ۱- *DNA* الگو: شامل نواحی از مولکول *DNA* است که باید همانند سازی شوند.
- ۲- یک جفت آغازگر: دارای انتهای ۳' مکمل با رشته‌های رهبر^{۲۵} و پیرو^{۲۶} *DNA* الگو می‌باشند.

-
- 18 Initialization step
 - 19 Denaturation step
 - 20 Annealing step
 - 21 Annealing temperature
 - 22 Extension/Elongation step
 - 23 Final elongation step
 - 24 Final hold
 - 25 Sense or Laggin
 - 26 Anti sense or Leading

۳- آنزیم *DNA* پلی‌مراز: معمولاً از آنزیم‌های مقاوم به حرارت که دمای بهینه‌ای در حدود ۷۲ درجه سانتی‌گراد دارند استفاده می‌شود.

۴- دنوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات‌ها (*dNTPs*): که آنزیم *DNA* پلی‌مراز برای سنتز رشته جدید *DNA* از آن‌ها استفاده می‌کند.

۵- محلول بافری *PCR*: محلولی است که شرایط را برای فعالیت و پایداری بهینه آنزیم *DNA* پلی‌مراز فراهم می‌کند. متداول‌ترین بافری که در *PCR* مورد استفاده قرار می‌گیرد، حاوی ۱۰۰ میکرومول بافر یونی در دو قطبی تریس هیدرو کلرید ۲۷، ۵۰۰ میکرومول پتاسیم کلرید^{۲۸} که برای اتصال آغازگر به *DNA* الگو کمک می‌کند، ژلاتین، ۱۵ میکرومول منیزیم کلرید^{۲۹} می‌باشد. منیزیم یکی از اساسی‌ترین اجزاء *PCR* می‌باشد، برای تکثیر قطعات *DNA* جهش یافته می‌توان از منگنز استفاده کرد. در واقع آنزیم *DNA* پلی‌مراز، برای عملکرد خود به منیزیم وابسته است. غلظت منیزیم آزاد تحت تأثیر غلظت *dNTP* است. یون منیزیم با *dNTPs*، یک کمپلکس محلول را تشکیل می‌دهد که تشکیل این کمپلکس برای ورود *dNTPs*، به داخل زنجیره در حال سنتز *DNA* ضروری است. باید توجه کرد که غلظت این بافر X_{10} می‌باشد و قبل از استفاده از آن به میزان ۱:۱۰ رقیق شد.

روش انجام آزمایش *PCR* برای تکثیر ژن *fliR*

رقیق‌سازی پرایمرها

با توجه به اینکه پرایمرهای اولیه به صورت لیوفیلیزه هستند، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر به پرایمرها اضافه شد و به خوبی حل گردید. به منظور رقیق‌سازی، ۳۰ میکرولیتر از پرایمرهای حل شده، در تیوپ‌های حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب استریل رقیق شد تا غلظت ۱ پیکومولار بدست آمد.

نحوه انجام *PCR*

ساختن میکس^{۳۰}: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از بافر *PCR* با غلظت X_{10} به همراه ۴۰ میکرولیتر *MgCl2* با غلظت ۵۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر *dNTP* با غلظت ۱۰ میلی‌مولار مخلوط شد و با ۸۴۰ میکرولیتر آب تزریق به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

واکنش *PCR* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. به طوری که به ازای هر تیوپ واکنش، ۲۰ میکرولیتر از مخلوط ذکر شده (میکس)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت، همچنین ۱ میکرولیتر آنزیم *Taq* رقیق (شامل ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم *DNA* پلی‌مراز *Taq* بعلاوه ۰/۷۵ آب مقطر) در یک میکروتیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری، مخلوط شدند. در آخر ۲ میکرولیتر از *DNA* هیلکوباکتر پیلوری و یک قطره روغن استریل اضافه شد. مخلوط حاصل با توجه به دمای اتصال پرایمرها (۶۲ درجه سانتی‌گراد) داخل دستگاه ترموسایکلر حرارتی قرار داده شد.

27 Tris-HCL
28 KCL
29 Mgcl2
30 Mix

جدول ۲. برنامه دمایی PCR برای تکثیر ژن *fliR*

مرحله	حرارات (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
Prog1 Initial denaturation	۹۵	۵	۱
Prog2 Seg1:Denaturation	۹۴	۱	۳۰
Seg2:Anneal	۶۲	۱	
Seg3:Extension	۷۲	۱	
Prog3 FinalExtension	۷۲	۵	۱
Hold Temperature	۱۰	۵	۱

روش تهیه بافر $TBE_{10}x$

مقادیر ۲۷/۲۴ گرم پودر تریس^{۳۱}، ۱۳/۹۱ گرم بوریک اسید^{۳۲} و ۱/۸۶ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^{۳۳} را با هم مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانده و حرارت داده تا محلول کاملاً شفاف شود. به این ترتیب بافر $TBE_{10}x$ ساخته شد. برای تهیه ژل آگارز به بافر $TBE_{10}x$ نیاز است که به منظور تهیه $TBE_{10}x$ ، 60 میلی لیتر از $TBE_{10}x$ با ۵۴۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد.

روش تهیه اتیدیوم بروماید

مقدار یک میلی گرم از پودر اتیدیوم بروماید را با احتیاط کامل در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در ظرف در بسته در تاریکی و جای مخصوصی نگهداری شد. با توجه به اینکه، اتیدیوم بروماید یکی از مواد موتاژن بسیار خطرناک است، لازم است هنگام استفاده از آن احتیاط لازم منظور گردد.

روش تهیه ژل آگارز یک درصد

با توجه به حجم قالب ژل، میزان ۰/۲۲ گرم از پودر آگارز با ترازوی دیجیتال وزن شد و با ۲۲ میلی لیتر از بافر $TBE_{10}x$ مخلوط گردید. این ترکیبات حرارت داده شد تا پودر آگارز ذوب شود و در بافر $TBE_{10}x$ کاملاً به صورت محلول شفاف در آید. پس از آن که حرارت محصول حاصل کمی کاهش یافت (تا ۵۰ درجه سانتی گراد)، مقدار ۱ میکرو لیتر محلول اتیدیوم بروماید

31 Tris
32 Buric Acid
33 EDTA

(۱۰ mg/ml) اضافه گردید. محلول حاصل در قالب ژل^{۳۴} ریخته شد و شانه^{۳۵} به منظور ایجاد چاهک داخل ژل قرار داده شد. پس از گذشت حدود ۱۵ دقیقه ژل در داخل قالب به صورت بسته شکل خواهد گرفت.

روش انجام الکتروفورز

۱- شانه از ژل خارج شد و ظرف ژل در تانک الکتروفورز حاوی بافر *TBE 1x* قرار داده شد، به طوری که بافر تمام سطح ژل را پوشاند.

۲- مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه *DNA* تکثیر یافته (محصول *PCR*) با ۲ میکرولیتر *Loading Buffer 6x* مخلوط گردید و درون چاهکها ریخته شد. (برای مشاهده *DNA* تخلیص شده نیز می توان مقدار ۵ میکرولیتر از آنرا درون چاهکها ریخت و مراحل زیر را زیر نمود)

۳- تانک الکتروفورز به منبع جریان برق وصل شد و ولتاژ جریان به طور متوسط روی ۹۰ ولت تنظیم گردید.

۴- پس از حدود ۲۰-۳۰ دقیقه جریان ولتاژ برق قطع گردید و ژل برای بررسی، داخل دستگاه *Uvdoc* قرار داده شد. در نهایت باندهای مورد نظر که مربوط به ژن *fliR* می باشند، با استفاده از تیغ اسکالپل^{۳۶} بریده شده و به تیوپهای استریل ۱/۵ میکرولیتری منتقل گردیدند.

مراحل استخراج *DNA* از ژل

برای این کار از کیت شرکت *Bioneer* استفاده گردید.

۱- باند ژن مورد نظر روی ژل آگارز، به وسیله تیغ اسکالپل بریده و درون تیوپ ۱/۵ قرار گرفت.

۲- برابر حجم ژل از بافر شماره ۱ ریخته شد.

۳- تیوپ ۱۰ دقیقه روی هیتر ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و چند دقیقه یکبار ورتکس شد. این کار تا زمان ذوب شدن کامل ژل، ادامه یافت.

۴- محلول حاصل، داخل ستون (ستون تعبیه شده توسط کیت) ریخته شد و یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول زیرین دور ریخته شد.

۵- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شماره ۲ روی ستون ریخته شد و مطابق شرای مرحله قبل، سانتریفیوژ انجام شد.

۶- مرحله ۵ یکبار دیگر تکرار گردید.

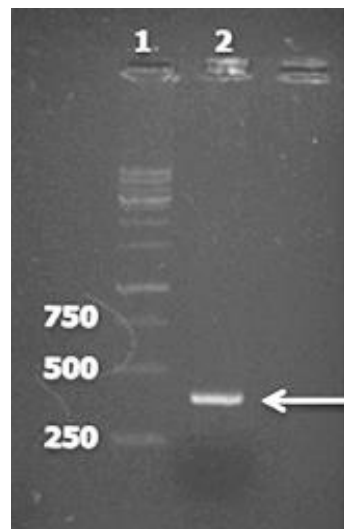
۷- ستون داخل تیوپ تمیز منتقل شد و تا زمانی که کاملاً خشک شود، نگهداری شد. ملاک تشخیص خشک بودن ستون، عدم استشمام بوی الکل است.

۸- مقدار ۳۰ میکرولیتر آب تزریق روی ستون ریخته شد و پس از گذشت ۵ دقیقه، تیوپ به همراه ستون درون آن به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ گردید.

۹- محلول زیرین حاوی محصول *PCR* تخلیص شده از ژل می باشد. برای تأیید صحت تخلیص ژن، مقدار ۲ میکرولیتر از محلول زیرین بدست آمده، روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

نتایج

نتایج استخراج *DNA* و انجام *PCR* روی ژن *fliR* استخراج *DNA* از باکتری هلیکوباکتر پیلوری با موفقیت انجام شد. الکتروفورز *DNA* ی 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 *fliR* منجر به تشکیل باند ۳۶۰ جفت بازی مربوط به این محصول گردید. محصولات *PCR* روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند که نتایج حاصل از *PCR* ژن *fliR* در شکل ۱-۴ آمده است.



شکل ۱. نتیجه *PCR* برای ژن *fliR*

شماره ۱: مارکر ۱ *kb* ساخت شرکت فرمنتاز.

شماره ۲: باند ۳۶۰ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *fliR*

شماره ۳: کنترل منفی (نمونه *PCR* بدون *DNA*)

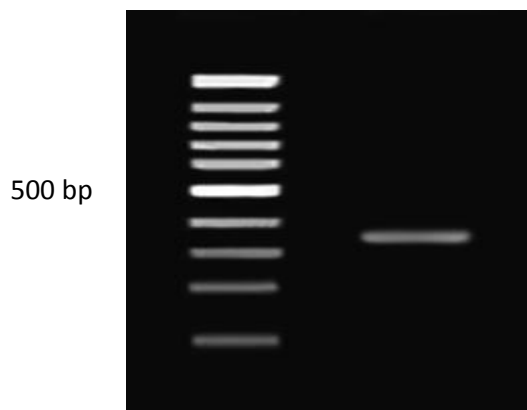
نتایج تأیید همسانه سازی *T* در وکتور *PTZ*

در این مرحله سازواره ژنی *fliR-PTZ* ساخته شد که شرح نتایج حاصل شده از مراحل مختلف مربوط به آن به صورت زیر است.

نتیجه تخلیص محصول *PCR* از ژل آگارز

باند ۳۶۰ جفت بازی مربوط به ژن *fliR* با استفاده از تیغ اسکالپل از روی ژل آگارز بریده شد و با استفاده از کیت *Bioneer* تخلیص گردید. مقدار ۳ میکرولیتر از محصول تخلیص شده از ژل، روی ژل آگار ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید تا صحت تخلیص مورد تأیید قرار گیرد. نتیجه آن در شکل ۲-۴ نشان داده شده است.

1 2



شکل ۲ نتیجه تخلیص قطعه ژن *fliR* از ژل آگارز.

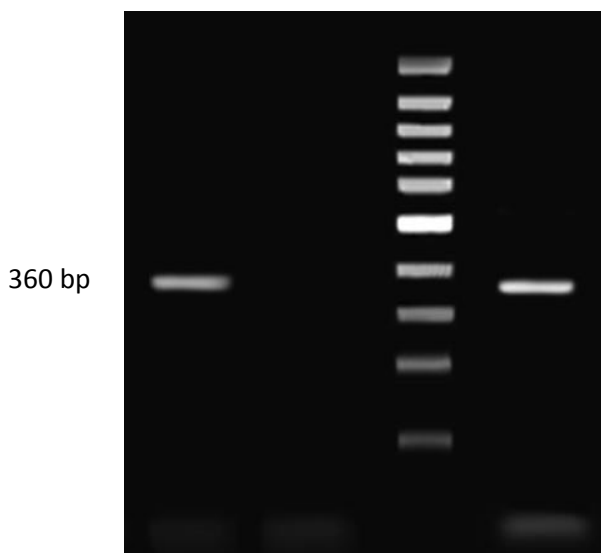
شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز

شماره ۲: ژن *fliR* تخلیص شده از ژل

نتیجه تأیید صحت همسانه سازی *T* به روش *PCR*

روش تأیید اولیه حضور ژن *fliR* در پلاسمید *PTZ*، انجام *PCR* روی کلنی‌ها یا ماتریکس‌های حاصل از انجام روش *T/A* *cloning* است. به این منظور واکنش *PCR* با پرایمرهای اختصاصی ژن *fliR* روی ۴ نمونه از ماتریکس‌ها انجام شد. تشکیل باند ۳۶۰ جفت بازی در هر یک از نمونه‌های *PCR* شده، نشان دهنده صحت کلون سازی *T* و تشکیل سازواره ژنی *PTZ-fliR* می‌باشد. نتایج این مرحله در شکل ۳-۴ آورده شده است.

1 2 3 4



شکل ۳. نتیجه انجام *PCR* برای ژن *fliR* روی نمونه‌های ماتریکس

شماره‌های ۱ و ۴: نتیجه مثبت برای *PCR* روی ژن *fliR* که باند ۳۶۰ جفت بازی را نشان می‌دهد

شماره ۲: کنترل منفی

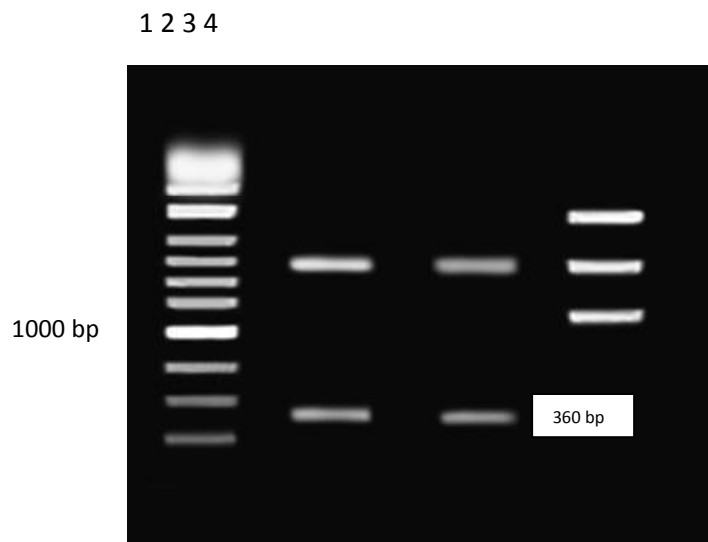
شماره ۳: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمتناز

نتیجه تأیید صحت همسانه سازی *T* به روش هضم آنزیمی

تأیید صحت کلون سازی با روش هضم آنزیمی روشی نسبتاً مطمئن است. در این تحقیق با توجه به اینکه در سر ۵-پریم پرایمرهای ژن *fliR* سایت برش دو آنزیم *SacII* و *Sall* قرار داده شده بود، لذا تأیید صحت کلون سازی در این مرحله نیز با استفاده از همین دو آنزیم صورت گرفت.

نمونه‌هایی از ماتریکس که در مرحله ۴-۲-۱ از نظر حضور ژن *fliR* و تشکیل وکتور نوترکیب *PTZ-fliR* مورد تأیید قرار گرفته بودند، در اینجا مورد استفاده قرار گرفتند. به این صورت که ابتدا کشت باکتری‌های حامل پلاسمید *PTZ-fliR* در محیط ۵ میلی لیتری *LB-Broth* در حضور آنتی بیوتیک آمپی سیلین صورت پذیرفت و پس از رشد باکتری‌ها، استخراج پلاسمید با کیت *Bioneer* انجام شد.

هضم آنزیمی روی پلاسمیدهای *PTZ-fliR* تخلیص شده، نشان دهنده صحت کلون سازی *T* و تأیید ایجاد پلاسمید نوترکیب *PTZ-fliR* می‌باشد که نتایج آن در شکل ۴-۴ آمده است.



شکل ۴. نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمید *PTZ-fliR*

شماره ۱: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی

شماره ۲ و ۳: پلاسمیدهای دارای قطعه ژن *fliR* بریده شده با آنزیم

شماره ۴: پلاسمید *PTZ-fliR* بریده نشده با آنزیم

نتیجه تأیید سازواره نهایی *PEGFP-C1-fliR*

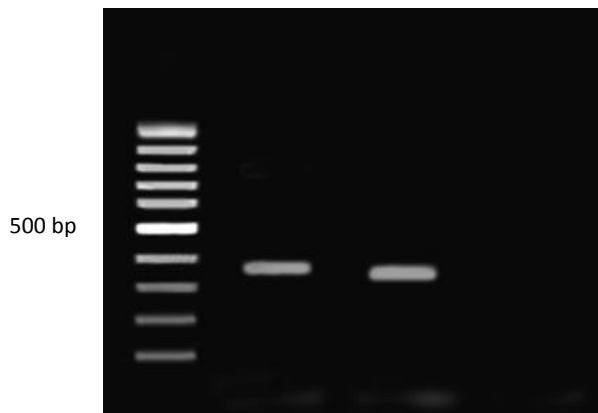
یکی از اهداف اصلی این تحقیق ساب کلونینگ ژن *fliR* در پلاسمید بیانی *PEGFP-C1* بوده است. در واقع در این مرحله محصول *PCR* مربوط به ژن *fliR* که در مراحل قبل در وکتور *PTZ* همسانه سازی گردیده است، لازم است از پلاسمید

PTZ- fliR خارج و وارد پلاسمید بیانی یوکاریوتی *PEGFP-C1* گردد. تأیید صحت ساب کلونینگ و تشکیل وکتور نو ترکیب *PEGFP-C1- fliR* به سه روش *PCR*، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد.

نتیجه تأیید سازواره نهایی *PEGFP-C1- fliR* به روش *PCR*

بررسی حضور ژن *fliR* در پلاسمید *PEGFP-C1*، با انجام *PCR* روی کلنی‌ها یا ماتریکس‌های حاصل از انجام روش ساب کلونینگ صورت پذیرفت؛ بنابراین واکنش *PCR* با پرایمرهای اختصاصی ژن *fliR* روی چند نمونه تصادفی از ماتریکس‌ها انجام شد. تشکیل باند ۳۶۰ جفت بازی در هر یک از نمونه‌های *PCR* شده، نشان دهنده صحت ساب کلونینگ است. نتایج این مرحله در شکل ۴-۵ نشان داده شده است.

1 2 3 4



شکل ۵. نتیجه انجام *PCR* روی پلاسمید نو ترکیب *PEGFP-C1- fliR*

شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز

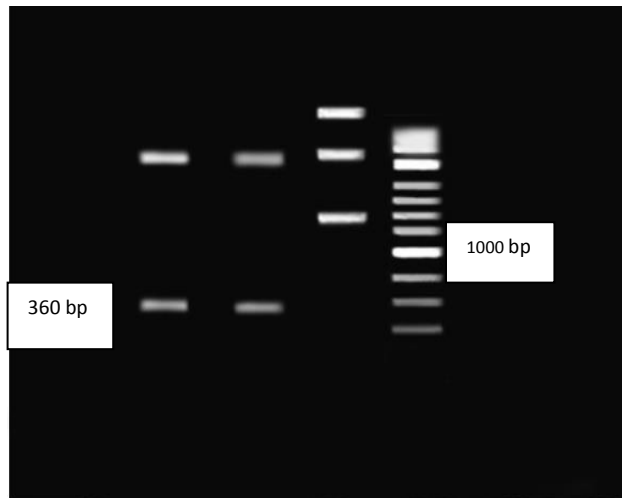
شماره ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت پس از انجام *PCR* روی پلاسمید نو ترکیب *PEGFP-C1- fliR*

شماره ۴: کنترل منفی

نتیجه تأیید سازواره نهایی *PEGFP-C1- fliR* به روش هضم آنزیمی

نتایج حاصل از هضم آنزیمی وکتور بیانی نو ترکیب *PEGFP-C1- fliR* با دو آنزیم *SacII* و *SalI* نشان دهنده تشکیل سازواره نهایی است. به طوری که برش وکتور *PEGFP-C1- fliR* با دو آنزیم فوق الذکر سبب تشکیل دو قطعه می‌گردد. یک قطعه به اندازه ۵۳۰۸ جفت باز مربوط به وکتور *PEGFP-C1* و یک قطعه ژن به اندازه ۳۶۰ جفت باز مربوط به ژن *fliR* تشکیل می‌گردد. نتایج این مرحله در شکل ۴-۶ آورده شده است.

1 2 3 4



شکل ۶. نتیجه هضم آنزیمی روی پلاسمید نوترکیب *PEGFP-C1-fliR*

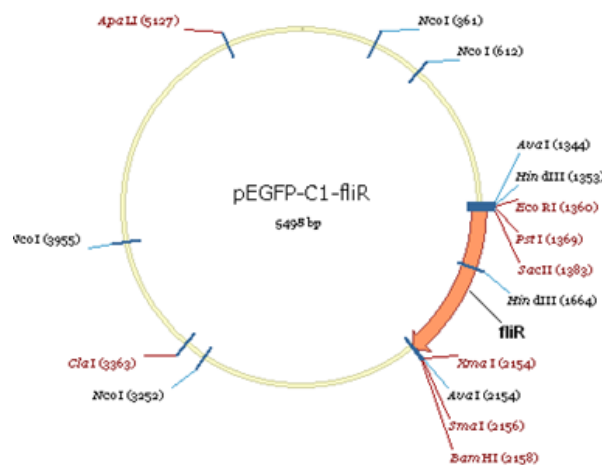
شماره‌های ۱ و ۲: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب *PEGFP-C1-fliR* که قطعه ۳۶۰ جفت بازی از آن خارج شده است.

شماره ۳: پلاسمید نوترکیب *PEGFP-C1-fliR* بریده نشده

شماره ۴: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی فرمنتاز

نتیجه تأیید سازواره نهایی *PEGFP-C1-fliR* به روش تعیین توالی

تعیین توالی سازواره نهایی *PEGFP-C1-fliR* نشان دهنده صحت کلون سازی ژن *fliR* در وکتور بیانی یوکاریوتی مورد نظر می‌باشد. مقایسه توالی بدست آمده با توالی‌های دیگر این ژن در بانک ژن جهانی پس از انجام *BLAST*، نیز صحت توالی و عدم وجود بازهای تغییر یافته را نشان می‌دهد. تصویر شماتیک سازواره نهایی حاصل از این تحقیق در شکل ۴-۷ نشان داده شده است.



شکل ۷. تصویر شماتیک پلاسمید نوترکیب بیانی یوکاریوتی *PEGFP-C1-fliR*

۱،۱ نتایج حاصل از انجام SDS-PAGE

پس از الکتروپوریشن سازواره نهایی *PEGFP-C1-fliR* در سلول‌های *CHO* و کشت و تأیید آنها، به منظور بررسی بیان ژن *fliR* در این سلول جانوری، SDS-PAGE انجام شد. نتایج این آزمایش در شکل ۴-۸ نشان داده شده است. محصول پروتئینی حاصل از ژن *fliR* به وزن؟؟؟ کیلو دالتون در شکل نشان داده شده است.



شکل ۸. نتیجه بیان ژن *fliR* و تشکیل پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی

شماره ۱: مارکر

شماره ۲: سلول ترانسفرم نشده

شماره ۳: سلول ترانسفرم نشده سلول ترانسفرم شده با پلاسمید بیانی *PEGFP-C1-fliR*

منابع

- ۱) راسل آ. د، کپرا آ.ی. نحوه عمل آنتی بیوتیک ها و جذب آن ها به داخل باکتری ها. کسری کرمانشاهی ر، بهشتی مآل، عباسی م.ر. عوامل ضد باکتریایی و مقاومت در برابر آنها. چاپ اول. اصفهان. انتشارات دانشگاه اصفهان. ۱۳۷۵. ۷۰.
- ۲) موری پ. ر، روزنتال ک، فالر م. آ. کمپیلوباکتر و هلیکوباکتر. بهادر ع، بهادر ف. باکتری شناسی پزشکی مورای. چاپ اول. تهران. انتشارات خسروی با همکاری نشر دیباج. ۱۳۸۷. ۲۶۵-۲۶۶.
- 3) Alarcon T, Vega AE, Domingo D, Martínez MJ, and Lopez-Brea M. 2003. Clarithromycin Resistance among Helicobacter pylori Strains Isolated from Children: Prevalence and Study of Mechanism of Resistance by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol.* 41(1): 486–488.
- 4) Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* 397:176–180.
- 5) Belzer, C., J. Stoof, C. S. Beckwith, E. J. Kuipers, J. G. Kusters, and A. H. M. van Vliet. 2005. Differential regulation of urease activity in Helicobacter hepaticus and Helicobacter pylori. *Microbiology* 151:3989–3995.
- 6) Carrol ED, Guiver M, Nkhoma S, Mankhambo LA, Marsh J, Balmer Banda DL, Jeffers G, White SA, Molyneux EM, Molyneux ME, Smyth RL, and Hart CA, 2007. High Pneumococcal DNA Loads Are Associated With Mortality in Malawian Children With Invasive Pneumococcal Disease. *Pediatr Infect Dis J.* 26(5): 416–422.
- 7) Chan, F. K., K. F. To, J. C. Wu, M. Y. Yung, W. K. Leung, T. Kwok, Y. Hui, H. L. Chan, C. S. Chan, E. Hui, J. Woo, and J. J. Sung. 2002. Eradication of Helicobacter pylori and risk of peptic ulcers in patients starting longterm treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a randomized trial. *Lancet* 359:9–13.
- 8) Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, and Saverymuttu S. 2001. PCR-Based Diagnosis of Helicobacter pylori Infection and Real-Time Determination of Clarithromycin Resistance Directly from Human Gastric Biopsy Samples. *J Clin Microbiol.* 39(4): 1217–1220.
- 9) Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum, and M. Archer. 1975. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* ii:58–59.
- 10) Eidt, S., M. Stolte, and R. Fischer. 1994. Helicobacter pylori gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Pathol.* 47:436–439.
- 11) El-Omar, E. M., K. Oien, A. El-Nujumi, D. Gillen, A. Wirz, S. Dahill, C. Williams, J. E. S. Ardill, and K. E. L. McColl. 1997. Helicobacter pylori infection and chronic acid hyposecretion. *Gastroenterology* 113:15–24.
- 12) Ernst, P. B., and B. D. Gold. 2000. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:615–640.
- 13) Fallone, C. A., A. N. Barkun, M. U. Gottke, L. M. Best, V. G. Loo, S. Veldhuyzen van Zanten, T. Nguyen, A. Lowe, T. Fainsilber, K. Kouri, and R. Beech. 2000. Association of

- Helicobacter pylori* genotype with gastroesophageal reflux disease and other upper gastrointestinal diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 95:659–669.
- 14) Falsafi T, Mobasheri F, Nariman F, and Najafi M. 2004. Susceptibilities to Different Antibiotics of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Patients at the Pediatric Medical Center of Tehran, Iran. *J Clin Microbiol.* 42(1): 387–389.
- 15) Fischbach, W., M. E. Goebeler-Kolve, B. Dragosics, A. Greiner, and M. Stolte. 2004. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* 53:34–37.
- 16) Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, and Favalli C. 2002. New Site of Modification of 23S rRNA Associated with Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(12): 3765–3769.
- 17) Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, and Favalli C. 2003. Detection of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* in Stool Samples. *J Clin Microbiol.* 41(8): 3636–3640.
- 18) Ford, A. C., M. Qume, P. Moayyedi, N. L. Arents, A. T. Lassen, R. F. Logan, K. E. McColl, P. Myres, and B. C. Delaney. 2005. *Helicobacter pylori* “test and treat” or endoscopy for managing dyspepsia: an individual patient data meta-analysis. *Gastroenterology* 128:1838–1844.
- 19) Fox, J. G. 2002. The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50:273–283.
- 20) Fox, J. G., P. Correa, N. S. Taylor, A. Lee, G. Otto, J. C. Murphy, and R. Rose. 1990. *Helicobacter mustelae*-associated gastritis in ferrets. An animal model of *Helicobacter pylori* gastritis in humans. *Gastroenterology* 99:352–361.
- 21) Garcia-Arata MI, Baquero F, De Rafael L, De Argila CM, Gisbert JP, Bermejo F, Boixeda D, and Canton R. 1999. Mutations in 23S rRNA in *Helicobacter pylori* Conferring Resistance to Erythromycin Do Not Always Confer Resistance to Clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(2): 374–376.
- 22) Genta, R. M. 2002. Review article: after gastritis—an imaginary journey into a *Helicobacter*-free world. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16(Suppl. 4): 89–94.
- 23) Gisbert, J. P., and J. M. Pajares. 2002. Review article: *Helicobacter pylori* “rescue” regimen when proton pump inhibitor-based triple therapies fail. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16:1047–1057.
- 24) Godoy APO, Ribeiro ML, Benvengo YHB, Vitiello L, Miranda MCB, Mendonça S and Pedrazzoli Jr J. 2003. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterology.* 3(20): (available at : <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/3/20>)
- 25) Goldman RC, Zakula D, Flamm R, Beyer J, and Capobianvo J. 1994. Tight Binding of Clarithromycin, Its 14-(R)-Hydroxy Metabolite, and Erythromycin to *Helicobacter pylori* Ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(7):1496-1500.

- 26) Gressmann, H., B. Linz, R. Ghai, K. P. Pleissner, R. Schlapbach, Y. Yamaoka, C. Kraft, S. Suerbaum, T. F. Meyer, and M. Achtman. 2005. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet.* 1:e43.
- 27) Gueneau, P., and S. Loiseaux-De Goer. 2002. *Helicobacter*: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infect. Genet. Evol.* 1:215–223.
- 28) Herbarth, O., P. Krumbiegel, G. J. Fritz, M. Richter, U. Schlink, D. M. Muller, and T. Richter. 2001. *Helicobacter pylori* prevalences and risk factors among school beginners in a German urban center and its rural county. *Environ. Health Perspect.* 109:573–577.
- 29) Holtmann, G., C. Cain, and P. Malfertheiner. 1999. Gastric *Helicobacter pylori* infection accelerates healing of reflux esophagitis during treatment with the proton pump inhibitor pantoprazole. *Gastroenterology* 117:11–16.
- 30) Huang, J. Q., S. Sridhar, and R. H. Hunt. 2002. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet* 359:14–22.
- 31) Hua-Xiang X.H, Xue-Gong F and Nicholas J.T. 1999. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J. Gastroenterol.* 5(3):263-266.
- 32) Hung, L. C., J. Y. Ching, J. J. Sung, K. F. To, A. J. Hui, V. W. Wong, R. W. Leong, H. L. Chan, J. C. Wu, W. K. Leung, Y. T. Lee, S. C. Chung, and F. K. Chan. 2005. Long-term outcome of *Helicobacter pylori*-negative idiopathic bleeding ulcers: a prospective cohort study. *Gastroenterology* 128:1845–1850.
- 33) Jackson, S., P. L. Beck, G. F. Pineo, and M. C. Poon. 2005. *Helicobacter pylori* eradication: novel therapy for immune thrombocytopenic purpura? A review of the literature. *Am. J. Hematol.* 78:142–150.
- 34) Josenhans, C., R. L. Ferrero, A. Labigne, and S. Suerbaum. 1999. Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes of *Helicobacter felis*. *Mol. Microbiol.* 33:350–362.
- 35) Kabir, S. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* 9:115–123.
- 36) Kalach N, Benhamou PH, Campeotto F, Bergert M, Dupont C, and Raymond J. 2001. Clarithromycin Resistance and Eradication of *Helicobacter pylori* in Children. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(7): 2134–2135.
- 37) Kalach N, Bergeret M, Benhamou PH, Dupont C, and Raymond J. 2001. High Levels of Resistance to Metronidazole and Clarithromycin in *Helicobacter pylori* Strains in Children. *J Clin Microbiol.* 39(1): 394–397.
- 38) Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, Reddy R, Asaka M, Kashima K, S. Osato MS, El-Zaatari FAK, Graham DY, and Kwon DH. 2000. Regional Differences in Metronidazole Resistance and Increasing Clarithromycin Resistance among *Helicobacter pylori* Isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(8): 2214–2216.
- 39) Kato S, Fujimura S, Udagawa H, Shimizu T, Maisawa S, Ozawa K, and Inuma K. 2002. Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Strains in Japanese Children. *J Clin Microbiol.* 40(2): 649–653.

- 40) Kuipers, E. J. 1998. Review article: relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12:25–36.
- 41) Kuipers, E. J. 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13:3–12.
- 42) Kuipers, E. J., A. M. Uytterlinde, A. S. Pena, H. J. Hazenberg, E. Bloemena, J. Lindeman, E. C. Klinkenberg-Knol, and S. G. Meuwissen. 1995. Increase of *Helicobacter pylori*-associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: implications for long-term safety. *Am. J. Gastroenterol.* 90:1401–1406.
- 43) Kuipers, E. J., J. C. Thijs, and H. P. Festen. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9(Suppl. 2):59–69.
- 44) Kuipers, E. J., L. Lundell, E. C. Klinkenberg-Knol, N. Havu, H. P. Festen, B. Liedman, C. B. Lamers, J. B. Jansen, J. Dalenback, P. Snel, G. F. Nelis, and S. G. Meuwissen. 1996. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *N. Engl. J. Med.* 334:1018–1022.
- 45) Kumala W, and Rani A. 2006. Pattern Of *Helicobacter pylori* Isolate Resistance To Fluoroquinolones, Amoxicilin, Clarithromycin and Metronidazoles. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 37(5):970-974.
- 46) Kusters, J. G., and E. J. Kuipers. 1998. Non-*pylori Helicobacter* infections in humans. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10:239–241.
- 47) Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. Vandenbroucke- Grauls. 1997. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* 65:3672–3679.
- 48) Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., Kuipers, E. J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *J. Clin Microbiol Rev.* 19(3): 449–490.
- 49) Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Glaunec JML, Deforges L, Soussy CJ, Petit JC, Delchier JC, and Tankovic J. 2003. Fast and Accurate Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* and Identification of Clarithromycin Resistance Mutations in *H. pylori* Isolates from Gastric Biopsy Specimens by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 41(10): 4573–4577.
- 50) Lee JH, Shin JH, Roe IH, Sohn SG, Lee JH, Kang GH, Lee HK, Jeong BC, and Lee SH. 2005. Impact of Clarithromycin Resistance on Eradication of *Helicobacter pylori* in Infected Adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4): 1600–1603.
- 51) Lehours, P., A. Menard, S. Dupouy, B. Bergey, F. Richy, F. Zerbib, A. Ruskone-Fourmestreaux, J. C. Delchier, and F. Megraud. 2004. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect. Immun.* 72:880–888.
- 52) Leung, W. K., S. R. Lin, J. Y. Ching, K. F. To, E. K. Ng, F. K. Chan, J. Y. Lau, and J. J. Sung. 2004. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 53:1244–1249.
- 53) Liu Z, Shen J, Zhang L, Shen L, Li Q, Zhang B, Zhou J, Gu L, Feng G, Ma J, You WC and Deng D. 2008. Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori*-23S rRNA in Chinese

subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiology, 8(81): (available at : <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/81>)

54) Liu, H., H. Ye, A. Ruskone-Fourmestraux, D. De Jong, S. Pileri, C. Thiede, A. Lavergne, H. Boot, G. Caletti, T. Wundisch, T. Molina, B. G. Taal, S. Elena, T. Thomas, P. L. Zinzani, A. Neubauer, M. Stolte, R. A. Hamoudi, A. Dogan, P. G. Isaacson, and M. Q. Du. 2002. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. Gastroenterology 122:1286–1294.

55) Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, and Russmann H. 2007. Evaluation of the Novel Helicobacter pylori ClariRes Real-Time PCR Assay for Detection and Clarithromycin Susceptibility Testing of H. pylori in Stool Specimens from Symptomatic Children. J Clin Microbiol. 45(6): 1718–1722.

56) Mackay I.M. Oligonucleotide Design for In-house Real-time PCR Applications in Microbiology. Nitsche A. Real-Time PCR in Microbiology From Diagnosis to Characterization. Norfolk. Caister Academic Press. 2007. 41-71.

57) Mackay I.M. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries. Mackay I.M, Mackay J.F, Nissen M.D. and Sloat T.P. Real-Time PCR in Microbiology From Diagnosis to Characterization. Norfolk. Caister Academic Press. 2007. 1-41.

58) Mackay I.M. The Role of Real-time PCR in Routine Microbial Diagnostics. Claas E.C.J, Melchers W.J.G, van den Brule A.J.C. Real-Time PCR in Microbiology From Diagnosis to Characterization. Norfolk. Caister Academic Press. 2007. 231-269.

59) Maeda S, Yoshida H, Matsunaga H, Ogura K, Kawamata O, Shiratori Y, and Omata M . 2000. Detection of Clarithromycin-Resistant Helicobacter pylori Strains by a Preferential Homoduplex Formation Assay. J Clin Microbiol. 38(1): 210–214.

60) Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Kanai F, Shiratori Y and Omata M. 1998. Helicobacter pylori specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance. Gut. 43:317–321.

Assimilation and Checking Flir Gene Expression as a Gene Vaccine Against Helicobacter Pylori

Mukhtar Heydari

Senior Expert In Genetics; Tehran; Iran

Abstract

Helicobacter pylori (HP) is a rod-shaped, gram-negative bacterium that causes gastrointestinal infections in more than 60% of the world's population and is involved in causing type B gastritis, gastric and duodenal ulcers, and gastric cancer. Antibiotic treatment of Helicobacter pylori infections, especially in developing countries, including Iran, where Helicobacter pylori infection has a high prevalence due to the high cost, lack of cooperation of patients in the implementation of treatment regimens, and discomfort caused by the use of different antibiotics and also the creation of bacteria. Antibiotic resistant strains are not the answer to this problem and designing a suitable vaccine to prevent and treat this infection is necessary and is of interest. Due to the functional role of the fliR gene in the production of proteins used in the Helicobacter pylori flagellum, and the secretion of the pathogenic factors of this bacterium outside the cell, this protein is considered as a suitable candidate for a strong vaccine against Helicobacter pylori infection, which can be used in Therapeutic, preventive and even diagnostic solutions are used. The purpose of this research is to clone the fliR gene from the ATCC standard strain (40504) of Helicobacter pylori in a suitable expression vector and transfer the vector to a suitable bacterial host (E. coli Top10) to produce the recombinant form of this protein. According to the results, the PEGFP-C1-fliR gene system can be a suitable candidate for gene vaccine production.

Keyword : Neighboring Flir Gene; Vaccination; Helicobacter Pylori.
