

مقاله پژوهشی

کلونینگ و بیان نواحی آنتی ژنیک ژن CagA هلیکوباکتر پیلوری در باکتری اشرشیاکلی

مهدیه مالکی^۱، محمد رضا نصیری^{۱،۲*}، مجتبی طهمورث پور^۱، کیارش قزوینی^۳

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی حیوانی، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۱۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری شایع ترین پاتوژن گوارشی است که نیمی از مردم دنیا را آلوده ساخته و مهم ترین علت بیماری های معده ای-روده ای از جمله گاستریک مزمن، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده و لنفوما است. ژن CagA (سیتوتوکسین مرتبط با ژن A) یکی از مهم ترین شاخص های بیماری زای این باکتری است. هدف از این تحقیق ساخت ناقل نوترکیب حامل نواحی آنتی ژنیک ژن CagA و بیان آن در میزبان بیانی می باشد.

مواد و روش ها: برای رسیدن به این هدف بر اساس برنامه های بیوانفورماتیکی ناحیه ای از ژن CagA که دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک بود شناسایی شده و بر اساس آن قطعه ای به طول ۹۹۶ جفت باز با استفاده از روش PCR تکثیر شد. این قطعه با استفاده از هضم آنزیمی در ناقل pET32a کلون و سپس به داخل باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) ترنسفورم و بیان گردید.

نتایج: نتایج توالی یابی کلونینگ موفق ژن CagA را در حامل بیانی نشان داد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب تولید شده بر روی ژل SDS-PAGE، ۵۷ کیلو دالتون بر آورد شد و صحت بیان پروتئین تایید گردید.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه کلونینگ ناحیه ایی تویی مورد نظر با موفقیت انجام شده و احتمالا می توان پروتئین نو ترکیب به دست آمده را به عنوان کاندیدای مناسبی برای تولید IgY حاصل از مرغ های ایمن شده برای کنترل عفونت هلیکوباکتر پیلوری در انسان، طراحی کیت های تشخیصی و تولید واکسن هلیکوباکتر پیلوری معرفی نمود.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، ناحیه آنتی ژنیک، CagA، پروتئین نوترکیب

مقدمه

بدون علامت هستند و بدیهی است که ممکن است نقش مهمی را در اکولوژی طبیعی معده بازی کند (۴). بیش از ۵۰٪ جمعیت جهان H. پیلوری را در قسمت فوقانی دستگاه گوارش خود دارند. عفونت در کشورهای در حال توسعه شایع تر است و بروز آن در کشورهای غربی در حال کاهش است. تصور می شود شکل مارپیچ H. پیلوری (که از نام عمومی آن گرفته شده است) به منظور نفوذ به پوشش مخاطی معده تکامل یافته است (۵ و ۶). عفونت هلیکوباکتر پیلوری در ایران نیز شایع بوده و به خصوص سرطان معده از آمار بالایی بر خوردار است. این سرطان که مسئول مرگ ۶۵۰۰۰ نفر در جهان در سال ۲۰۰۰ است، در مردها پس از سرطان ریه دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان بوده و در مجموع حدود ۱۰ درصد از کل مرگ و میر سالیانه سرطان را به خود اختصاص می دهد (۷). میزان عفونت H. پیلوری در جمعیت اردبیل بالا و در حدود ۸۹ درصد بوده است و یکی از بالاترین

هلیکو باکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) شایع ترین پاتوژن گوارشی است که انسان ها را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است و بیش از نیمی از مردم دنیا آلوده به این باکتری هستند (۱). این باکتری نوعی باکتری گرم منفی مارپیچی شکل و مهم ترین علت بیماری های معده ای-روده ای از جمله گاستریک مزمن، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده و لنفوما است (۲). بررسی های اپیدمیولوژی و آماری عفونت مزمن هلیکوباکتر پیلوری را با سرطان بدخیم معده مرتبط دانسته اند و این امر موجب شده که آژانس پژوهش سرطان سازمان بهداشت جهانی (WHO) این باکتری را در زمره عوامل سرطان زای کلاس I قرار دهد (۳). بیش از ۸۰٪ از افراد آلوده به این باکتری

* نویسنده مسئول: محمد رضا نصیری، گروه بیوتکنولوژی حیوانی، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
Email: nassiryr@gmail.com

هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی بادی‌های اختصاصی به این منظور است.

در سال ۲۰۱۳ دانشمندان موفق به همسانه سازی زیر واحد CagA هلیکوباکتر پیلوری شدند و وجود خاصیت آنتی ژنیسته پروتئین نوترکیب حاصل را اثبات کردند (۱۷). هر چند کلونینگ زیر واحد CagA با رویکرد تشخیصی و نه درمانی پیش از این نیز انجام شده است (۱۸). اما با این حال تاکنون در ایران هیچ تحقیقی مبنی بر تولید پروتئین نوترکیب حاوی آنتی ژنیک زیر واحد CagA هلیکوباکتر پیلوری که در این تحقیق مدنظر ما بود، انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری هلیکوباکتر پیلوری

نمونه های بیوپسی از معده ۳۰ بیمار تحت درمان در بیمارستان قائم شهر مشهد که مشکوک به آلوده بودن به هلیکوباکتر پیلوری بودند جمع آوری و بر روی محیط کشت کلمبیا آگار در شرایط میکروآئرو فیلک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز کشت داده شدند. تعیین هویت باکتری با تست اوره آز مورد تایید قرار گرفت و باکتری‌های رشد یافته به منظور استخراج DNA در فریزر -۲۰ درجه نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت Qiagen آلمان طبق دستور العمل مربوطه انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر نانودراب (ND2000) (Thermo) و الکتروفوروز ژل ۱ درصد آگاروز تعیین شد. DNA به دست آمده جهت نگهداری به دمای -۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

تعیین نواحی آنتی ژنیک ژن CagA

جهت تعیین نواحی آنتی ژنیک ژن CagA توالی ژن CagA با شماره دسترسی FJ798973 از بانک ژنی NCBI تهیه و با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی زیر نواحی آنتی ژنیک این ژن تعیین شد.

Antigeni (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.PI>)
Immuneepitope (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)
Pepito (<http://pepito.proteomics.ics.uci.edu>)
Bcepred PI (<http://www.imtech.res.in/cgibin/bcepred/bcepred>)

آمارهای جهان در رابطه با سرطان معده مربوط به استان اردبیل است که به تنهایی حدود یک سوم تمام موارد سرطان در اردبیل بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۱۹۹۹ مربوط به این سرطان بوده است (۸). به علاوه بررسی‌ها در شهر شیراز نیز ابتلای ۹۸-۸۲ درصد کودکان بین ۹ ماهه تا ۱۰ ساله را به این باکتری نشان می‌دهد (۳). عفونت هلیکوباکترپیلوری با لنفومای MALT و سرطان معده در ارتباط است و تصور می‌شود که CagA در گسترش سرطان نقش داشته باشد (۹). پروتئین Cag A به وسیله ژن Cag A کد می‌شود که در انتهای جزایر بیماری زایی (pathogenicity island (PAI) واقع شده است که ژن آن حاوی ۴۰ کیلو جفت باز با وزن معادل ۱۴۰ کیلو دالتون است و دارای قدرت ایمونوژنیسیته فراوان می‌باشد (۱۰). در سال ۲۰۰۱ دانشمندان اعلام کردند که سوبه‌هایی از هلیکوباکتر پیلوری که دارای ژن CagA هستند توانایی ایجاد زخم‌های طولانی را دارند (۱۱). همچنین CagA یک پروتئین با خاصیت آنتی ژنیکی بسیار قوی است که با واکنش‌های برجسته‌ی التهابی تولید شده به وسیله‌ی ترشح اینترلوکین-۸ در ارتباط است (۱۲). چند عامل بیماری زائی در H.پیلوری وجود دارند که در ایجاد سرطان موثر شناخته شده‌اند و از جمله آن‌ها پروتئین CagA است (۱۳). در سال ۲۰۱۰ کلیموویچ و همکاران به دنبال بررسی معرف‌های ایمنی برای تشخیص CagA هلیکوباکتر پیلوری اولین مجموعه از آنتی بادی‌های منوکلونال را بر علیه CagA تولید و مشخص کردند. آن‌ها همچنین بیان داشتند که استفاده از فن آوری پروتئین نوترکیب امکان به دست آوردن آنتی ژن خالص CagA را ایجاد کرده است (۱۴). دانشمندان در سال ۲۰۱۲ ضمن اعلام این مطلب که عفونت مزمن با باکتری‌های گرم منفی هلیکوباکتر پیلوری یک عامل خطر عمده برای توسعه سرطان معده است بیان کردند که شواهد موجود نشان می‌دهد که ژن CagA (سیتوتوکسین مرتبط با ژن A) دارای یک نقش کلیدی آنکوژنیک در بیماری زائی هلیکوباکتر پیلوری است. آن‌ها اعلام کردند که برخی از فعالیت‌های بیولوژیکی CagA نیاز به فسفوریلاسیون تیروزین آن به وسیله کینازهای سلول میزبان دارند (۱۵). به علاوه بررسی‌های اخیر نشان دهنده‌ی مقاومت نسبتاً زیاد هلیکوباکترپیلوری به درمان‌های آنتی بیوتیکی است (۱۶). در نتیجه درمان‌های اخیر در جهت به کارگیری درمان‌های اختصاصی و نوین برای مقابله با این عفونت است که در این میان پروتئین CagA که یکی از پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری است

طراحی آغازگرها و شبیه سازی کلونینگ

با استفاده از نرم افزار Primer premier5 دو جفت آغازگر اختصاصی و دنباله دار به منظور تکثیر نواحی آنتی ژنیک ژن CagA هلیکوباکتر پیلوری با توجه به همولوژی توالی ها طراحی گردید.

آغازگر رفت لینکر دار

(5'CGCGGATCCATGGGCGTATTTGATGAATCCTT
BamHI برای آنزیم

آغازگر برگشت لینکر دار

(5'CCGGAATTCTTCTTGGAGGCGTTGGTATATTT
EcoRI برای آنزیم

پس از طراحی آغازگرها جهت شبیه سازی کلونینگ و بررسی چهارچوب صحیح ژن در ناقل pET32 از نرم افزار CLC Main Workbench 5 استفاده شد.

تکثیر ژن

PCR با استفاده از ۵۰ نانوگرم از DNA الگو، ۲/۵ µl بافر تکثیر ۱۰x، ۲ µl مخلوط ۱۰ mM dNTP، ۲۵ mM MgCl₂، ۱/۵ µl، ۰/۷۵ از هر کدام از آغازگرها (۱۰ µM)، ۱u آنزیم Pfu و ۱۶µl آب انجام شد. برنامه حرارتی جهت انجام PCR شامل حرارت °C ۹۴ به مدت ۱۰ دقیقه (یک چرخه) برای شروع بود. مرحله دوم در قالب °C ۳۲ چرخه شامل مراحل واسرشتگی در حرارت °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در °C ۵۷ به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. در پایان تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۷۲ در یک چرخه انجام گردید. پس از انجام واکنش، محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ برده شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید محصولات توسط ژل نگار مشاهده و بررسی گردید. محصولات PCR ژن مورد نظر با استفاده از کیت خالص سازی شرکت فرمنتاز طبق دستور عمل العمل شرکت خالص سازی شدند.

کلونینگ ژن CagA

جهت همسانه سازی قطعه ژن CagA در ناقل بیانی، ابتدا محصولات PCR خالص سازی شدند. ناقل pET32a با آنزیم های BamHI و EcoRI برش خورده و ناقل pET32a خطی شده از ژن استخراج شدند. در مرحله بعد واکنش الحاق بین ناقل pET32a و قطعه CagA هضم شده با آنزیم های ذکر

شده با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز در دمای ۸ درجه و به مدت ۱۶ ساعت انجام گرفت و ناقل های حاصل از طریق ترانفورماسیون به میزبان اولیه جهت تکثیر اولیه (E. Coli DH5a) وارد شدند. سپس استخراج پلاسمید از کلونی های رشد کرده توسط کیت استخراج پلاسمید متعلق به شرکت فرمنتاز انجام شد و صحت کلونینگ به روش کلونی PCR و هضم آنزیمی تایید گردید. برای بیان، پلاسمیدهای حامل ژن CagA (قطعه اپیتوپیک مورد نظر) به باکتری E.coli سویه BL21 (DE3) ترانسفورم شدند. صحت قالب خوانش ژن^۱ به وسیله تعیین توالی و نرم افزار CLC Main Workbench 5 تایید شد.

بیان پروتئین نو ترکیب

از کلونی های BL21 (DE3) حامل پلاسمیدهای pET32a-cagA در محیط LB براث حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۱۷ میکرو لیتر از آمپی سیلین ۱۰۰mg/ml) کشت داده شد و ۱۰۰ میکرو لیتر از باکتری های کشت داده شده به ۱۰۰ میلی لیتر از محیط القا اضافه و روی انکوباتور شیکر دار و در حرارت ۳۷ درجه انکوبه گردید تا به جذب نوری ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD:600) رسید. در مرحله بعد القا به وسیله افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر IPTG^۲ ۱ مولار انجام شد. در نهایت وزن مولکولی و محل قرار گرفتن پروتئین به دست آمده به وسیله آزمون SDS-PAGE^۳ تایید شد (Sambrook et al). جهت بررسی محلولیت پروتئین نو ترکیب، از محیط کشت باکتری القا شده با IPTG بعد از ۴ ساعت انکوباسیون ۱ میلی لیتر برداشته و سلول ها با دور ۸۰۰۰g به مدت ۳ دقیقه رسوب داده شد. رسوب حاصل در ۱x PBS به خوبی حل شده و باکتری ها به روش سونیکا سیون (آمیلیفیکا سیون ۸۰ و به مدت ۱۰ دقیقه) سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی و رسوب حاصل بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ آمیزی شد.

نتایج

تعیین نواحی آنتی ژنیک ژن CagA

نتایج پیش بینی سرورهای بیوانفورماتیکی برای تعیین بخش های آنتی ژنیک ژن CagA نشان داد که فاصله نوکلئوتیدی ۴۹۴ تا ۱۴۹۰ دارای بالاترین خاصیت آنتی ژنیک می باشد.

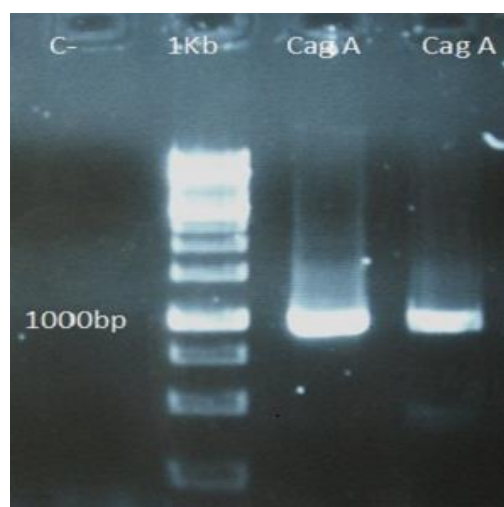
³ Sodium dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

¹ Open Reading Frame

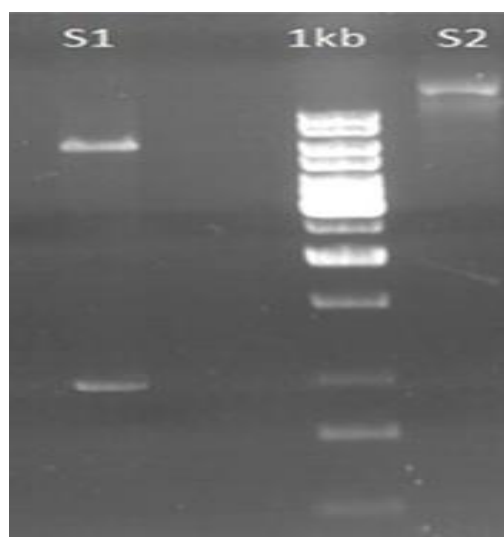
² Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

استخراج DNA و PCR

غلظت DNA استخراجی برابر با ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود که نتایج الکتروفورز کیفیت مناسب DNA استخراجی را تایید کردند. محصول PCR با آنزیم pfu با اندازه قطعه مورد انتظار (۹۹۶ جفت باز) همخوانی داشت و دمای مناسب برای اتصال ۵۷ درجه در نظر گرفته شد (شکل ۱).



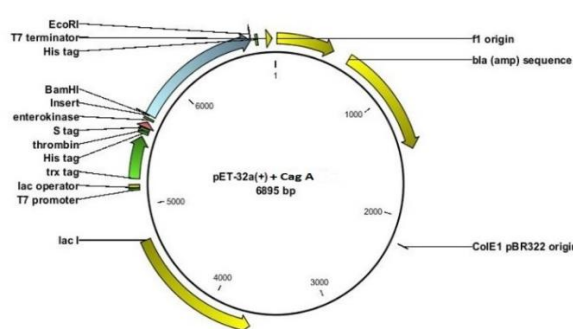
شکل ۱. ژل آگاروز ۱ درصد محصول PCR به طول ۹۹۶ جفت باز مربوط به ژن Cag A



شکل ۲. تایید قطعه همسانه شدی، الکتروفورز ژل آگارز محصولات هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم های BamH I و EcoR I. ستون S1 ناقل هضم شده PET32-Cag A، ستون S2 ناقل هضم نشده PET32-Cag A

تعیین صحت همسانه سازی

صحت همسانه سازی با هضم آنزیمی ناقل نوترکیب PET32/CagA با آنزیم های BamHI و EcoRI و انجام کلونی PCR با آغازگرهای T7 promoter و Terminator تایید شد (شکل ۲). تعیین توالی ناقل نوترکیب با آغازگرهای T7 و Terminator نشان داد که قطعه هدف به درستی در ناقل پلاسمیدی کلون شده است و قالب خواندن آن (ORF) به طور صحیح پروتئین مربوطه را تولید می کند (شکل ۳).



شکل ۳. نقشه ناقل نوترکیب PET32-Cag A که با برنامه CLC Main Workbench رسم شده است.

بیان پروتئین CagA

بیان پروتئین نوترکیب با IPTG و نمونه گیری در زمان های مختلف انجام شد و تولید پروتئین مورد نظر برای ژن CagA با وزن ۵۷ کیلو دالتون با انجام SDS-PAGE تایید گردید (شکل ۴). ناقل pET32 توالی تیوردوکسین را به پروتئین اضافه می کند که باعث انحلال پذیری پروتئین های دارای باند دی سولفیدی می شود اما نتایج نشان داد که پروتئین CagA به صورت نامحلول بوده و وزن ملکولی آن با اضافه شدن پروتئین تیوردوکسین توسط ناقل، ۵۷ کیلو دالتون است. همان طور که مشاهده می شود باند ۵۷ کیلو دالتونی حاصل از بیان پروتئین در نمونه القا شده به خوبی قابل مشاهده می باشد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به دشوار بودن تشخیص بیماری های گوارشی در مراحل اولیه، مکانیزم دفاعی بدن در مقابل هلیکوباکتر پیلوری و مقاوم شدن این باکتری به درمان های آنتی بیوتیکی نیاز به درمان های اختصاصی و نوین برای مبارزه با این عفونت وجود دارد که یکی از آنها تولید آنتی بادی اختصاصی می باشد. برای

آن انتخاب قطعه در فاصله نوکلئوتیدی ۴۹۴ تا ۱۴۹۰ بود. پروتئین نو ترکیب حاوی نواحی آنتی ژنیک ژن Cag A در باکتری *E.coli* سویه BL21(D3) با وزن ۵۷ کیلو دالتون تولید شد. ناقل PET-32 استفاده شده در این تحقیق به پروتئین Cag A یک پروتئین Trx.tag (thioredoxin) اضافه می کند که باعث پایداری پروتئین در سلول شده و از تخریب آن جلوگیری می نماید. در این مطالعه پروتئین CagA بیان شده در این ناقل PET32a کاملاً به شکل نامحلول (Inclusion body) بود. فر جادی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ نامحلول بودن این پروتئین را گزارش کردند (۱۳). این موضوع می تواند به دلیل هیدروفوبیسیته بالا یا تشکیل ناقص باندهای دی سولفیدی در ساختار پروتئین باشد. نتایج بررسی میزان هیدروفوبیسیته این پروتئین با نرم افزار CLC Main Work bench5 نشان داده است که میزان هیدروفوبیسیته آن ۰/۴۶۳ می باشد که توجه کننده عدم محلولیت آن نبود بنابراین این احتمالاً تشکیل ناقص باندهای دی سولفیدی در ساختار پروتئین عامل ایجاد این مسئله باشد.

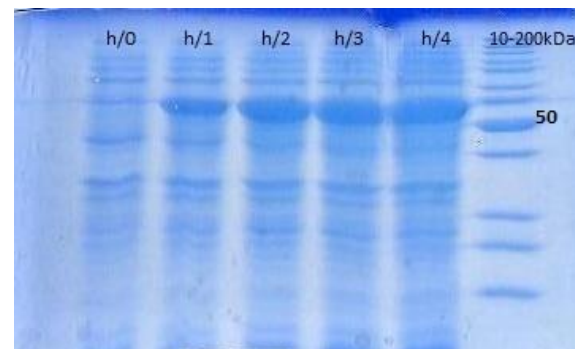
نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که ترکیب پروتئینی حاوی CagA به درستی تهیه شده است و این پروتئین به احتمال زیاد می تواند به عنوان کاندید مناسبی برای تولید واکسن و یک ابزار سرو لوژیک برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری بوده و در طراحی کیت های تشخیصی مورد استفاده قرار بگیرد. علاوه بر این امکان استفاده از این پروتئین برای تولید ایمونوگلوبین Y ضد هلیکوباکتر پیلوری در زرده تخم مرغ و استفاده از آن به صورت خوراکی برای درمان بیماران مبتلا به این ارگانیسم وجود دارد که تایید این مسئله نیازمند مطالعات گسترده تر، ایمن سازی مرغ ها و بررسی پاسخ های ایمنی ناشی از آن می باشد.

تشکر و قدردانی

از کلیه پرسنل آزمایشگاه مرکزی بیمارستان قائم مشهد که در انجام این پژوهش نهایت همکاری را به عمل آوردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع را اعلام نکرده اند.



شکل ۴. بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با الکتروفورز SDS-PAGE (ژل پاپین ۱۲٪ و ژل بالا ۶٪) در ساعت های مختلف. حضور پروتئین CagA بر روی ژل کاملاً مشخص است. وزن پروتئین CagA نو ترکیب ۳۷ کیلو دالتون می باشد که با اضافه شدن پروتئین الحاقی در وزن ۵۷ کیلو دالتون مشاهده می شود.

تولید آنتی بادی، انتخاب ایمونوژن اختصاصی برای پاتوژن مورد نظر الزامی است (۱۹). هلیکوباکتر پیلوری می تواند پروتئین Cag A را از طریق ساختمان های ترشحی IV به داخل سلول های اپی تلیوم معده منتقل کند که پس از فسفوریله شدن توسط تیروزین، نقش مهمی در پاسخ سلول های میزبان، ایفاء می کند (۲۰). بنابراین افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری Cag A مثبت، مستعد ابتلا به زخم های معده، دوازدهه و سرطان معده می باشند. امروزه مطالعات جهت افزایش اختصاصیت و پی شگیری از بروز واکنش های متقاطع با سایر باکتری های فلور دستگاه گوارش بیشتر بر استفاده از آنتی ژن های خالص معطوف شده است بنابراین نیازمند آنتی ژن هایی از هلیکوباکتر پیلوری با قدرت ایمونوژنسیته بالا برای کاهش عوارض جانبی و افزایش اختصاصیت هستیم (۱۰) که از این میان پروتئین CagA هدف بالقوه مناسبی برای تولید آنتی بادی های اختصاصی می باشد. استفاده از اپی توپ های اصلی آنتی ژن به جای پروتئین کامل برای ایجاد تحریک ایمنی بسیار سودمند است و کوچک تر و اختصاصی تر شدن قطعه هدف باعث سهولت کار و احتمالاً حفاظت بخشی بیشتر می شود. هر چند نمونه های دیگری از کلونینگ و بیان در مورد هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از ناقل های مختلف به انجام رسیده اما قطعه اپی توپیک انتخابی توسط ما تا کنون در هیچ پژوهش مشابهی بررسی نشده است. در این پژوهش از نرم افزارهای آنالین بیوانفورماتیکی برای شناسایی نواحی آنتی ژنیک ژن Cag A استفاده شد که حاصل



References

1. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(4):713-39.
2. Cover T, Blaser M. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Annual review of medicine*. 1992;43(1):135-45.
3. Azizi F, Hatami H, Janghorbani M. *Epidemiology and control of common diseases in Iran*. Tehran: Eshtiagh Publications. 2000:602-16.
4. Blaser MJ. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. *EMBO reports*. 2006;7(10):956.
5. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori: molecular genetics and cellular biology*: Horizon Scientific Press; 2008.
6. Brown LM. *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission*. *Epidemiologic reviews*. 1999;22(2):283-97.
7. Sadjadi A, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Sepehr A, Nouraei M, Sotoudeh M, et al. Cancer occurrence in Ardabil: Results of a population-based Cancer Registry from Iran. *International journal of cancer*. 2003;107(1):113-8.
8. Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Obodi B, Haghighat M, Hayati M, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2006;54(4):259-61.
9. Lax AJ. Bacterial toxins and cancer—a case to answer? *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(4):343-9.
10. Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, de Mascarel A, Samoyeau R, Salamon R, et al. cagA Status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(4):1319-22.
11. Mobley H, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Oigical reviews*. 1995;59(3):451-80.
12. Klimovich AV, Samoylovich MP, Gryazeva IV, Terekhina LA, Suvorov AN, Klimovich VB. Development of Immunoreagents for Diagnostics of CagA-Positive *Helicobacter pylori* Infections. *Helicobacter*. 2010;15(3):193-200.
13. Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*. 1993;22(1):89.
14. Czinn SJ, Cai A, Nedrud JG. Protection of germ-free mice from infection by *Helicobacter felis* after active oral or passive IgA immunization. *Vaccine*. 1993;11(6):637-42.
15. Queiroz DM, Silva CI, Goncalves MH, Braga-Neto MB, Fialho AB, Fialho AM, et al. Higher frequency of cagA EPIYA-C Phosphorylation Sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients. *BMC gastroenterology*. 2012;12(1):107.
16. Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to *H. pylori*. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2006;12(35):5593-8.
17. Suzuki H, Masaoka T, Miyazawa M, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Gastric mucosal response to *Helicobacter pylori*. *The Keio journal of medicine*. 2002;51(supplement2):40-4.
18. Oluwasola A, Otegbayo J, Ola S, Ebili H, Afolabi A, Odaibo G. Correlation of Serum Anti-*Helicobacter pylori* Immunoglobulin A (IGA) with Histological Parameters of Chronic Gastritis in Ibadan, Nigeria. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. 2012;10(1):18-24.
19. Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari MR, Soufian S, Hasanzadeh L. Production of recombinant CagA protein of *Helicobacter pylori*. *Arak Medical University Journal*. 2013;16(7): p:37
20. Malaki P, latifi NS, Zahri S. Allelic Variation of *Helicobacter pylori* babY and cagA with clinical outcome, Review, GI. 2012; 17(4).



Original Article

Cloning and Expression of *Helicobacter Pylori* CagA Gene Antigenic Regions in *E. coli*Maleki M¹, Nassiri MR^{2,1*}, Tahmoores pour M¹, Qazvini K³

1. Animal Science Department, College of Agriculture, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Animal Biotechnology Department, Institute of Biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Department of Microbiology, School of Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 13 Nov 2015

Accepted: 29 Feb 2016

Abstract

Background & Objective: *Helicobacter pylori*, which has infected about 50 percent of the world population, is one of the most common gastrointestinal pathogens and the most prevalent cause of gastro-intestinal diseases, such as chronic gastric ulcers, gastric and duodenal ulcers, gastric cancer and lymphoma. The CagA Gene (cytotoxin-associated gene A) is a major virulence factor of this pathogenic bacterium. The aim of this study was to construct a recombinant vector carrying the antigenic regions of CagA gene and also to express this gene.

Material & methods: The major epitopes of the CagA gene were identified based on bioinformatics. Through this procedure, a gene fragment of 996 bp was isolated by PCR, inserted into a pET32a vector using the enzymatic digestion and then transformed into the *E. coli* strain BL2I (DE3).

Results: The results of sequencing represented the successful cloning of the CagA gene in the expression vector and introducing the accessibility to the antigen. The molecular weight of the produced recombinant protein was estimated 57 KD on an SDS-PAGE gel and the accuracy of the protein expression was verified.

Conclusions: The results of this study proved the successful cloning of the epitope area. The recombinant protein can probably be introduced as a good candidate for the production of IgY from the chicken immunized and the control of *Helicobacter pylori* infection in humans. It could also be possibly used for the design of diagnostic kits and vaccines for *Helicobacter pylori*

Keywords: *Helicobacter pylori*, CagA, Recombinant protein

***Corresponding author: Mohammad Reza Nassiri**, Animal Biotechnology Department, Institute of Biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran
Email: nassiry@gmail.com