مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار ۱۳۹۰، دوره سوم، شماره هشتم،صفحه ۲۸-۲۳

تولید و ارزیابی سرمی لیپوپروتئین غشای خارجی ۱۸کیلودالتونی (Omp19) نوترکیب *بروسلا ابورتوس* S19 در مدل موشی BALB/c

فاطمه فرحی[۱]، اسمائیل اصلی[۱]، اشرف محبتی مبارز[۲]، امیر بختیاری[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، بخش باکتری شناسی

نویسنده مسؤول: دکتر اسمائیل اصلی، دانشگاه آزاد اسلامی-واحد کرج، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی. e.asli87@gmail.com

دریافت: ۹۰/۱/۴ پذیرش: ۹۰/۳/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یک بیماری زئونوز بوده و اهمیت بالایی از نظر اقتصادی دارد. پیشگیری و تشخیص بروسلوز حیوانی و انسانی هر دو از چالش های پیش روی محققین می باشند. ارزیابی آنتی ژنهای مختلف سلول بروسلا از نظر پاسخهای ایمونولوژیکی در پیشبرد برنامه های پیشگیری و تشخیص نقش کلیدی دارند. هدف این مطالعه تولید و ارزیابی سرمی لیپوپروتئین غشای خارجی ۱۸کیلودالتونی (Omp19) نوترکیب *بروسلا آبورتوس* می باشد.

روش بررسی: ژن omp19 *بروسلا آبورتوس* ابتدا با آنزیم PrimSTAR® HS DNA polymerase تکثیر و در وکتور pJET1.2 کلون و تعیین توالی شد. ژن هدف از وکتور تأیید شده با استفاده از آنزیم های محدودالاثر BamHI و HindIII خارج و در وکتور pET28a(+) کلون شد. pET28a(+) حاوی ژن omp19، در میزبان بیانی ***E. coli*** BL21(DE3) ترانسفورم و تولید پروتئین نوترکیب با IPTG القا و با وسترن بلات تأیید شد. Omp19 نوترکیب با استفاده از ستون رزین نیکل تخلیص شد. پروتئین نوترکیب خالص جهت ارزیابی حضور آنتی بادی اختصاصی در نمونه سرم بیماران و دامهای مبتلا به بروسلوز به روش وسترن بلات استفاده شد.

یافته ها: شناسائی و تشخیص آنتی بادی علیه Omp19 نوترکیب، در نمونه های سرمی عفونی بیماران و دامهای مبتلا، تحریک پاسخ ایمنی به این پروتئین را، در طول بیماری بروسلوز نشان می دهد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، Omp19 نوترکیب *بروسلا آبورتوس* یک آنتی ژن مناسب برای تحقیقات واکسن و تشخیص سرولوژیک می باشد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، *بروسلا آبورتوس*، Omp19 نوترکیب.

www.SID.ir

مقدمه

بروسلوز جزء یکی از بیماری های مشترک بین انسان و دام است. اساسا حیوانات را مبتلا کرده و به وسیله شیر ، پنیر و کره غیر پاستوریزه به انسان نیز قابل انتقال است. بیماری ایجاد شده توسط بروسلا در انسان، علائم اختصاصی ندارد. در اغلب موارد باکتری بروسلا باعث سقط جنین در حیوانات آلوده و لاغر شدن حیوان، مرگ و خسارات اقتصادی می شود (۱-۳). پیشگیری از بروز موارد جدید بیماری و تشخیص بیماری هر دو از چالش های پیش روی محققین می باشند. برای پیشگیری از عفونت حیوانی واکسن های تجاری در دسترس می باشند که سویه های زنده تخفیف حدت یافته اند. استفاده گسترده از این سویه ها موجب کنترل بیماری در بسیاری از نقاط جهان شده و اساس استراتژی های مقابله با بیماری را تشکیل می دهند. این واکسن ها شامل Rev-1, S19, RB51 می باشند (۴و۵). معایب واکسنهای زنده از سویه های صاف (S19, Rev-1) شامل عدم انگیزش پاسخ سرولوژیکی پایدار، سقط جنین در حیوانات باردار و خطر آلوده شدن انسان از مهمترین موارد می باشند (۴-۷). عوارض RB51 با ظاهر ناصاف، از دو واکسن قبلی کمتر است، به همین دلیل در بعضی کشورها جایگزین واکسن S19 برای گاوها شده است. توانایی ایجاد عفونت را در جفت و جنین حیوان آبستن را دارا می باشد، قابلیت تولید آنتی‌بادی هومورال را ندارد و تیتر آنتی بادی مقاومی تولید نمی شود (۸-۱۰). ولی برای بروسلوز انسانی هنوز واکسن تأیید شده ای وجود ندارد. از آنجا که پروتئین های سطحی خود سلول بروسلا تا حدی (براساس تجربیات) خاصیت ایمنی زایی دارند و در سوئیچ پاسخ ایمنی به بروسلا نقش کلیدی دارند، در اینجا از یک پروتئین سطحی استفاده شده است (۱۱و۱۲). هدف از این مطالعه تولید و ارزیابی سرمی لیپوپروتئین غشای خارجی ۱۸کیلودالتونی (Omp19) نوترکیب *بروسلا آبورتوس* می باشد.

روش بررسی

با استفاده از سایت NCBI توالی کد کننده پروتیئن ۱۸ kDa (Omp19) تهیه شد. رمز شروع ATG و رمز پایان TGA است، تعداد نوکلئوتیدهای قطعه هدف ۵۵۳ که تولید کننده آنتی ژن ۱۸کیلو دالتونی فعال کننده سیستم ایمنی می باشد. کل ژن از ATG آغازی تا TGA برای طراحی کلون استفاده شد. آنزیم BamHI روی پرایمر اول و آنزیم HindIII روی پرایمر دوم و به ترتیب قبل از ATG و بعد از TGA در ناحیه ’5 طراحی شدند.

FB18F 5’-
AACGGATCCATGGGAATTTCAAAAGC
AAGTCTGCTC-3’
FB18R 5’-
AAAAAGCTTTCAGCCCAACAGCGTCA
CGGCCTGC-3’

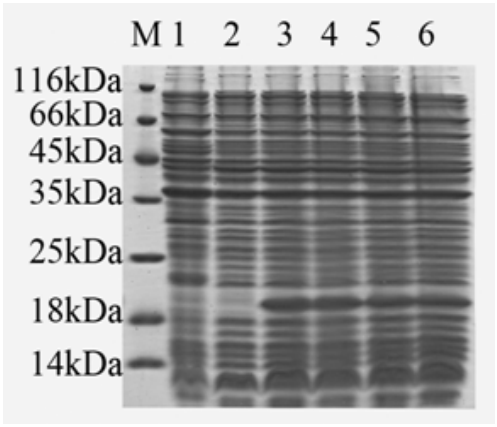
ژن omp19 *بروسلا آبورتوس* ابتدا با آنزیم PrimStar® HS تکثیر و قطعه هدف با انتهایBlunt در وکتور pJET1.2 کلون و تعیین توالی شد. pJET1.2 حاوی insert به *E.coli* DH5α ترنسفورم شد، در DH5α تکثیر یافت. غربالگری کلونی های ترانسفورم شده برای حضور ژن هدف توسط پرایمر اختصاصی و یونی ورسال انجام شد. پس از استخراج پلاسمید از DH5α، ژن هدف از وکتور تأیید شده بوسیله آنزیم های محدودالاثر طراحی شده روی پرایمر ها خارج و در وکتور pET28a(+) کلون شد. پلاسمید حاوی ژن هدف، در سویه *E.cloi* BL21(DE3) ترانسفورم و تولید پروتئین نوترکیب با 1mM IPTG القا شد. روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی خرگوشی پلی کلونال پروتئین های غشای خارجی بروسلا انجام شد. پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون رزین نیکل با روش Refolding تخلیص شد. در نهایت با روش دیالیز پروتئین محلول در کیسه دیالیز باقی مانده و ایمیدازول بر اساس پدیده انتشار خارج شد. برای ارزیابی پروتئین تخلیص شده از روشهای SDS-PAGE ، Bradford، spectrophotometry استفاده شد. با روشهای مذکور پروتئین ۱۸ کیلو دالتونی با غلظت مشخص جدا سازی شد.

Archive of SID
www.SID.ir

موشهای ماده BALB/c ۸-۶ هفته ای پس از یک هفته دوره آداپتاسیون به صورت زیر جلدی آنتی ژن ها را دریافت کردند. گروه۱ کنترل منفی (PBS)، گروه۲ کنترل مثبت (Rev1) ، گروه۳ کنترل مثبت (S19) ، گروه ۴ rOmp19. ایمن سازی در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ انجام شد. مقدار تلقیح آنتی ژن های نام برده ۲۰ میکروگرم در هر بار تزریق بود. برای گروه کنترل مثبت (گروه ۳ و۲) در روز صفر ۵×۱۰^{۴} cfu در حجم ۰/۵ میلی لیتر در نرمال سالین استریل تزریق صفاقی انجام گردید. ۴ هفته پس از آخرین تزریق، موشها با تزریق ۵×۱۰ cfu از سویه های ویرولان *Brucella abortus* 445 به صورت تزریق داخل صفاقی، درگیر شدند. چهار هفته پس از درگیر سازی موشها با اتر بیهوش شدند. پس از باز کردن شکم ، طحال حیوان جدا گردید. تعداد کلنی های رشد کرده در هر گروه با توجه به رقت آن به صورت لگاریتم در مبنای ۱۰ محاسبه شد. ردیابی آنتی بادی در سرم بیماران و دامهای مبتلا، نشان دهنده شکل گیری پاسخ سیستم ایمنی به این پروتئین حین بیماری است. برای بررسی کمی سلولهای لمفوسیتها از آزمایش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستالهای آبی رنگ نامحلول انجام شد.

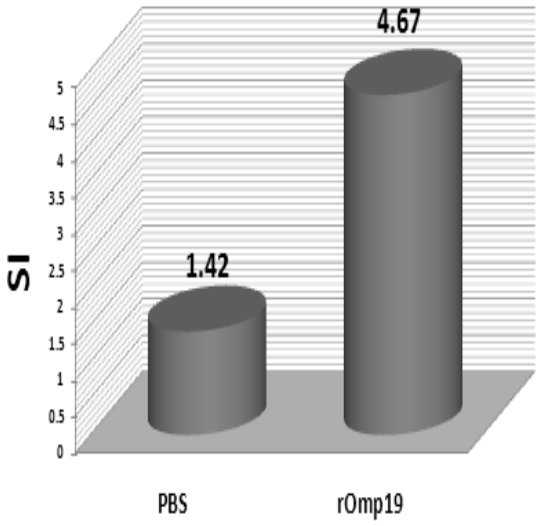
یافته ها

Omp19 بروسلا ابورتوس با موفقیت درpJET1.2 کلون شد. نتایج تعیین توالی موید صحت کلونینگ است. سپس قطعه مورد نظر، در وکتوربیانی PET28a(+) ساب کلون شد. PCR و هضم آنزیمی انجام این مرحله را نیز تایید کردند. میزبان بیانی(DE3) *E. coli* BL21 حاوی پلاسمید کد کننده پروتئین 18-kDa، کشت داده و القا شد تا پروتئین نوترکیب بیان شود (شکل ۱).
وکتور و میزبان بیانی استفاده شده، برای تولید حجم بالای پروتئین مناسب بودند. تولید پروتئین نوترکیب با موفقیت انجام گرفت و صحت نتایج با بهره گرفتن از اس دی اس پیج و وسترن بلات تایید شد. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از Ni-NTA resin انجام گرفت.



شکل ۱. بیان rOmp19 در *E. coli* BL21. (M) marker ، (1) *E. coli* BL21، (2) noninduced strain، (3-6) نمونه های *E. coli* BL21 نوترکیب، ۴-۱ ساعت پس از القا.

ردیابی آنتی بادی درنمونه های سرمی عفونی، نشان دهنده شکل گیری پاسخ سیستم ایمنی به این پروتئین است (شکل۲و جدول ۱).



شکل ۲: پاسخ تکثیر لیمفوسیت نسبت به آنتی ژن توسط تست MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) بااستفاده از آنتی سرم پلی کلونال ارزیابی شد.

www.SID.ir

جدول ۱. میزان clearance و protection پروتئین نوترکیب تفاوت معنی داری نسبت به گروه های کنترل نشان می دهد.

Group	Log Unit Protection	%clearance
rOmp19	۱/۳۵	٪۲۶

بحث

بروسلوز جزء بیماری های مشترک بین انسان و دام است (۲و۳). واکسن هایی برای پیشگیری از بروسلوز حیوانی در دسترس است. استفاده از سویه های زنده واکسن، نیز مشکلاتی را در بر دارد که موجب سوق دادن محققان به استفاده از عوامل جدیدی برای ایمنی زایی می شوند. ازجمله مشکلات استفاده از واکسن های زنده، ایمنی کوتاه مدت و نیز ایجاد بیماری خفیف و در برخی موارد سقط در دام های بالغ می باشد. موارد متعددی از اپیدمی های با منشاء سویه های واکسن گزارش شده است (۴و۶و۸). برای بروسلوز انسانی هنوز واکسن تأیید شده ای وجود ندارد. از آنجا که پروتئین های سطحی سلول بروسلا ایمونوژن هستند (۱۱و۱۳). در اینجا از پروتئین سطحی Omp19 استفاده شده است. برای بدست آوردن پروتئین مورد نظر از تکنیک نوترکیبی استفاده گردید که قادر است میزان بالایی از پروتئین را در اختیار بگذارد. برای تولید پروتئین های نوترکیب وکتورهای پلاسمیدی متعددی وجود دارد، در این روش از pET28a (+) استفاده شد که از نظر کارآمدی کلونینگ و تولید پروتئین نوترکیب سازگاری خوبی با پروتئین Omp19 داشته است. برای تخلیص پروتئین از روش دناتوراسیون با اوره و طبق پروتوکل Qiagen استفاده شد. برای حذف اوره از Renaturation بر روی خود رزین استفاده گردید که در همان زمان تخلیص، پروتئین را به شکل فولد شده و محلول فراهم می کند. در مطالعات گذشته بروسلوز، Omp19 به عنوان یک آنتی ژن ایمونوراکتیو مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است.

J. J. Letesson در سال ۱۹۹۷هشت پروتئین بروسلا را (Omp36, Omp25 Omp19 Omp16, Omp10,p15, p39 وp17) به عنوان آنتی ژن های کاندید برای تشخیص سرولوژیکی بروسلوزیس بررسی کرد. .این مطالعات سبب پیشرفت معرف تشخیصی چند پروتئینی برای بروسلوزیس بود (۱۴).

Anne Tibor در سال ۲۰۰۲ تاثیر حذف Omp19 بر خصوصیات غشای خارجی *بروسلا ابورتوس* و بیماری زایی آن در موش را بررسی کرد. این یافته ها نشان داد که غیر فعال شدن ژن omp19 خصوصیات غشای خارجی *بروسلا ابورتوس* را تغییر می دهد (۱۵).

Guillermo H. Giambartolomei در سال ۲۰۰۴ بیان کرد که لیپوپروتئینها و نه لیپو پلی ساکارید، واسطه های کلیدی پاسخ التهاب اولیه هستند که از طریق *بروسلا ابورتوس* کشته شده با حرارت، استنباط شد. التهاب یکی از نشانه های بروسلوز است. ظرفیت لیپوپروتئین Omp19 برای تولید پاسخ التهابی اولیه مورد بررسی قرار گرفت (۱۶) .

در مطالعه تولید و ارزیابی سرمی لیپوپروتئین غشای خارجی ۱۸کیلودالتونی (Omp19) نوترکیب *بروسلا ابورتوس*S19 در مدل موشی BALB/c، گروه های موشی که آنتی ژن rOmp19 را دریافت کرده بودند، 1.35 log unit protection نشان دادند، که به طور معنی داری متفاوت از گروه های ایمن شده با S19 و PBS به عنوان گروه های کنترل می باشد.

نتیجه گیری

تشخیص و شناسایی آنتی بادی نسبت به پروتئین نوترکیب، در نمونه های سرمی عفونی، نشان دهنده تحریک پاسخ ایمنی است. لیپوپروتئین غشای خارجی ۱۸کیلودالتونی نوترکیب *بروسلا ابورتوس* به عنوان کاندید مناسب واکسن بروسلوز معرفی می شود.

تشکر و قدردانی

ازهمراهی تمامی اساتید محترم در دانشگاه آزاد کرج، دانشکده علوم و دانشگاه تربیت مدرس، بخش باکتری شناسی تشکر و قدردانی می شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Glynn MK, Lynn TV. *Brucellosis.* J Am Vet Med Assoc. 2008; 233 (6):900-8.
2- Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. *Brucellosis*. N Engl J Med. 2005; 352 (22): 2325-36.
3- Tonna I, Tonna A. *Brucellosis.* N Engl J Med. 2005; 353 (10): 1071-2.
4- Ficht TA, Kahl-McDonagh M M, Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht A C. *Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines*. Vaccine. 2009; 27: (4) D40-3.
5- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. *Brucellosis vaccines: past, present and future.* Vet Microbiol. 2002; 90 (1-4): 479-96.
6- Shumilov KV, Sklyarov O, Klimanov A. *Designing vaccines against cattle brucellosis.* Vaccine. 2010; 28 (5):F31-4.
7- Thillerot V. *Brucella vaccines and prevention of brucellosis*. Maroc Med. 1975; 55 (586): 22-7.
8- Montaraz JA, Winter AJ. *Comparison of living and nonliving vaccines for Brucella abortus in BALB/c mice*. Infect Immun.1986; 53 (2): 245-51.
9- Pugh GW, Tabatabai LB, Bricker BJ, Mayfield JE, Phillips M, Zehr E S, et al. *Immunogenicity of Brucella-extracted and recombinant protein vaccines in CD-1 and BALB/c mice.* Am J Vet Res. 1990; 51 (9): 1413-20.
10- Tabatabai LB, Pugh GW, Stevens MG, Phillips M, McDonald T J. *Monophosphoryl lipid A-induced immune enhancement of Brucella abortus salt-extractable protein and lipopolysaccharide vaccines in BALB/c mice.* Am J Vet Res. 1992; 53 (10): 1900-7.
11- Caro-Hernandez P, Fernandez-Lago L de, Miguel MJ, Martin-Martin AI, Cloeckaert A, et al. *Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of Brucella ovis.* Infect Immun. 2007; 75 (8):4050-61.
12- Lindler L E, Hadfield TL, Tall BD, Snellings NJ, et al. *Cloning of a Brucella melitensis group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis*. Infect Immun. 1996; 64 (7): 2490-9.
13- Tibor A, Decelle B, Letesson JJ. *Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of Brucella spp. are lipoproteins*. Infect Immun. 1999; 67 (9): 4960-2.
14- Letesson J J, Tibor A, van Eynde G, Wansard V, Weynants V, et al. *Humoral immune responses of Brucella-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant Brucella proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay.* Clin Diagn Lab Immunol. 1997; 4 (5):556-64.
15- Tibor A, Wansard V, Bielartz V, Delrue R M, et al. *Effect of omp10 or omp19 deletion on Brucella abortus outer membrane properties and virulence in mice.* Infect Immun. 2002; 70 (10): 5540-6.
16- Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, et al. *Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed Brucella abortus.* J Immunol. 200; 173 (7):4635-42.

Archive of SID

www.SID.ir