Archive of SID

Original Article

کلون، بیان و تخلیص پروتئین سطحی ۳۶ کیلو دالتونی نوترکیب (Omp2b) بروسلا آبورتوس

نازنین بهشتی[۱]، اشرف محبتی مبارز[۲*]، بهمن تبرایی[۳]، ناصر هرزندی[۴]، نیما خرم آبادی[۵]، هانیه آقا بابا[۶]، امیر بختیاری[۷]

۱ ـ کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، البرز، ایران.
۲ ـ دانشیار میکروب شناسی، دانشکده علوپزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳ ـ استادیار میکروب شناسی، انستیتو پاستور ، بخش واکسن، تهران، ایران
۴ ـ استادیار میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد، کرج، البرز، ایران
۵ ـ دکتری باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۶ ـ کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۷ ـ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده آزاد، کرج، البرز، ایران

چکیده

زمینه: بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز بوده که منجر به ضررهای اقتصادی فراوانی می‌شود. گونه بروسلا، باکتری‌های کوکوباسیل گرم منفی داخل سلولی هستند که قادر به تکثیر در فاگوزوم های ماکروفاژها می‌باشند و در بسیاری از گونه‌های حیوانی و انسان‌ها بیماری ایجاد می‌کنند. پیشگیری و تشخیص، هر دو لازمه ریشه کنی این بیماری می‌باشند. شناسایی و ارزیابی آنتی ژن‌های متفاوت سلول بروسلا در پیشبرد برنامه‌های پیشگیری و تشخیص نقش کلیدی دارند. در این تحقیق تولید و تخلیص پروتئین غشای خارجی ۳۶ کیلو دالتونی نوترکیب (Omp2b) بروسلا آبورتوس به انجام رسید.

مواد و روش‌ها: ژن پروتئین غشای خارجی ۳۶ کیلو دالتونی بروسلا آبورتوس توسط آنزیم PrimeSTAR® HS DNA polymerase تقویت و در pJET1.2 کلون و ژن هدف در pET28a(+) ساب کلون شد. pET28a نوترکیب در E.coli BL21(DE3) ترانسفورم شد. بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از ۱ میلی مولار IPTG القا و پروتئین‌های حاصله توسط وسترن بلات بررسی شدند و Omp2b نوترکیب توسط آنتی سرم خرگوشی بروسلا ردیابی شدند.

نتایج: ظهور باند قهوه‌ای-طلایی در جایگاه واکنش در وسترن بلات تأییدی بر کلون و بیان موفقیت آمیز بود. ما با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی، Omp2b نوترکیب را تخلیص کردیم که این روش پروتئین‌های ریفولد شده را بر روی ستون فراهم کرد.

نتیجه گیری: Omp2b با موفقیت کلون، بیان و تخلیص شد. پروتئین‌های نوترکیب توسط آنتی سرم پلی کلونال شناسایی شدند که این امر صحت پروسه را تأیید می‌کند.

کلمات کلیدی: بروسلا آبورتوس، کلون، بیان، Omp2b

مقدمه

بروسلوز از مهم‌ترین بیمارهای مشترک بین انسان و دام در کل جهان می‌باشد که به سبب کاهش باروری و افزایش سقط جنین، ضررهای اقتصادی فراوانی را منجر می‌شود. عفونت انسان‌ها معمولاً از طریق مصرف شیر غیر پاستوریزه و سایر محصولات روزانه ایجاد می‌شود. بروسلا کوکوباسیل های گرم منفی داخل سلولی اختیاری فاقد اسپور که در فاگوزوم های ماکروفاژها تکثیر می کنند. این باکتری منجر به بیماری در بسیاری از گونه‌های حیوانی و انسان‌ها می‌شود (۱). ریشه کنی این بیماری از یک سو وابسته به پیشگیری از موارد جدید بیماری و از سوی دیگر تشخیص به موقع بیماری در انسان و دام است که هر دو از چالش‌های پیش روی محققین می‌باشد. شناسایی و ارزیابی آنتی ژن مختلف سلول بروسلا در پیشبرد اهداف پیشگیری و تشخیص، نقش کلیدی دارند (۲).

در بیماری‌های عفونی از قبیل بروسلوز، شناسایی آنتی ژن‌هایی که قادر به تحریک سیستم دفاعی میزبان هستند، دارای اهمیت بسیاری است (۳). غشا خارجی باکتری‌ها از اجزا مختلفی تشکیل شده است که پروتئین‌ها نقش مهمی را در تحریک پاسخ ایمنی ایفا می کنند. پروتئین‌های لایه خارجی یا OMP به دلیل خصوصیت ایمنوژنیکیشان بیشتر مورد توجه محققین هستند. OMP های اصلی بروسلا شامل OMP های گروه ۱ (۸۸-۹۴kDa) و گروه ۲ (۳۶-۳۸kDa) و گروه ۳ (۳۱-۳۴kDa و ۲۵-۲۷kDa) هستند که دو ژن omp2a و omp2b

نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری‌شناسی
تلفن: ۸۲۸۸۳۸۶۲ ـ ۰۲۱
Email:mmmobarez@modares.ac.ir

www.SID.ir
http://jfums.hbi.ir

Archive of SID

پروتئین های پورینی 36kDa را کد می کنند که به ترتیب پروتئین‌های Omp2a و Omp2b نامیده می‌شوند. دو ژن omp25 وomp31 نیز OMP های گروه ۳ را کد می‌کنند (۴). کلون، بیان و ارزیابی این پروتئین‌های بروسلا به کشف روش‌های جدید در تشخیص و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سرم کمک می‌کند.

Omp2b از پروتئین‌های ایمونوژنیک سلول بروسلا است. این پروتئین قادر به القا پاسخ‌های ایمنی است که در آزمایشات ایمونوژنیک قابل ردیابی هستند. بنابراین در القا سیستم ایمنی برای هدف‌های مختلف مفید خواهد بود (۴).

در اینجا ما Omp2b بروسلا که یک پروتئین ۳۶ کیلو دالتونی است را کلون، بیان و تخلیص کردیم. تولید Omp2b نوترکیب به گسترش روش‌های تشخیصی بروسلوز و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی سرم کمک خواهد کرد که هر دو لازمه ریشه کنی بروسلوز در انسان‌ها و حیوانات می‌باشند.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری مورد استفاده، محیط‌های کشت و شرایط رشد:

بروسلا ابورتوس ۵۴۴ بروسلا بر روی محیط کشت بروسلا آگار به مدت ۷۲ ساعت در دمای۳۵ºC کشت داده شد. E.coli DH5α به عنوان میزبان غیر بیانی E.coli BL21(DE3) به عنوان میزبان بیانی انتخاب و در محیط‌های کشت Luria- Bertani براث و یا LB آگار کشت داده شدند. جهت انتخاب آنتی بیوتیکی آمپی‌سیلین ($50\ \mu g\ ml^{-1}$) و کانامایسین ($30\ \mu g\ ml^{-1}$) به محیط‌های LB براث و LB آگار افزوده شدند.

تقویت DNA: PCR باکتریایی را با استفاده از کیت (AccuPrep® DNA Extraction Kit, Bioneer) از بروسلا ابورتوس ۵۴۴ که به مدت ۷۲ ساعت بر روی محیط کشت رشد کرده بود، استخراج کردیم. ناحیه کد کننده Omp2b بروسلا ابورتوس، شامل ۱۱۳۸ جفت نوکلئوتید است. پرایمرها بر اساس سکانس نوکلئوتیدی ژن omp2b بروسلا ابورتوس طراحی شدند. پرایمر پیشرو ژن omp2b به گونه‌ای طراحی شد که دارای جایگاه محدودالاثر BamH1 و پرایمر پیرو دارای جایگاه محدودالاثر HindIII بودند (در زیر جایگاه آن‌ها خط کشیده شده است).

پرایمر پیشرو 5′ TTAGGATCCATGAACATCAAGAGCCTTCTCCTTG 3′

پرایمر پیرو 5′AACAAGCTTCTTAACGTCGATCTGATTAGAACGAACG 3′

ژن omp2b توسط آنزیم (TaKaRa) Primestar®HS DNA polymerase که دارای امانت داری بالایی است تقویت شد. PCR در یک حجم نهایی۲۵µl انجام شد کـه شـامل۰/۷۵µl از ۵۰ میکرومولار dNTP،۵µl از بافر ۰/۱µl,5x از پرایمرهای پیشرو و پیرو، ۰/۱۵µl از DNA پلیمراز، ۱µl از ژنوم بروسلا ابورتوس و ۱۷.۲۵µl از آب بود. برنامه PCR شامل یک سیکل ۹۸ºC به مدت ۵-۳ دقیقه؛ ۳۰ سیکل ۹۸ºC به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ºC به مدت ۱۰ ثانیه، ۷۲ºC به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل ۷۲ºC به مدت ۱۰-۵ دقیقه بود که در آخر محصولات PCR در دمای۴ºC در یخچال نگهداری شدند.

کلون ژن omp2b: محصولات PCR ژن omp2b بروسلا ابورتوس بـا انتهـای بـلانت مستقیماً بـه درون pJET1.2/blunt (clone JET® PCR cloning kit, Fermatase) کلون شدند. جایگاه کلونینگ در ناحیه pJET1.2/blunt eco47IR وجود دارد که به انتخاب بهتر پلاسمیدهای کلون شده کمک می‌کند. pJET1.2 نوترکیب به طور شیمیایی به درون E.coliDH5α ترانسفورم شد. پلاسمیدهای نوترکیب توسط کیت AccuPrep® Plasmin Mini Extraction Kit(Bioneer) استخراج شدند. یک پلاسمید کلون شده برای الحاق به درون وکتور هدف (pET28a) Novagen(+) انتخاب شد و توسط آنزیم‌های محدودالاثر BamH1 و HindIII برش داده شد.

بیان ژن omp2b در E.coli : pET28a(+)نوترکیب به درون میزبان بیانی E.coli BL21(DE3) ترانسفورم شد. بیان ژن omp2b با استفاده از ۱ میلی مولار IPTG القا شد و میزان بیان هر ۱ ساعت یک‌بار به مدت ۴ ساعت بررسی شد. سلول‌های القا شده بر روی ژل SDS-PAGE آنالیز شدند. نمونه‌ها توسط سوسپانسیون رسوب باکتری‌ها در بافر حاوی ۱۰ میلی لیتر بافر ژل، ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS و ۰/۲ میلی لیتر محلول برموفنل (۰/۵٪ در اتانول) و ۱ میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول (2-ME) در یک حجم نهایی ۲۰ میلی لیتر از آب مقطر تهیه شدند و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ºC حرارت داده شدند. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها بر روی ژل لود شدند، سپس توسط رنگ آمیزی با کوماسی بلو G-250 بررسی شدند.

پروتئین‌های نوترکیب به روش وسترن بلات بررسی و Omp2b نوترکیب توسط آنتی سرم خرگوشی ردیابی شد. غلظت پروتئین‌های خالص شده به روش برادفورد نیز اندازه گیری شدند.

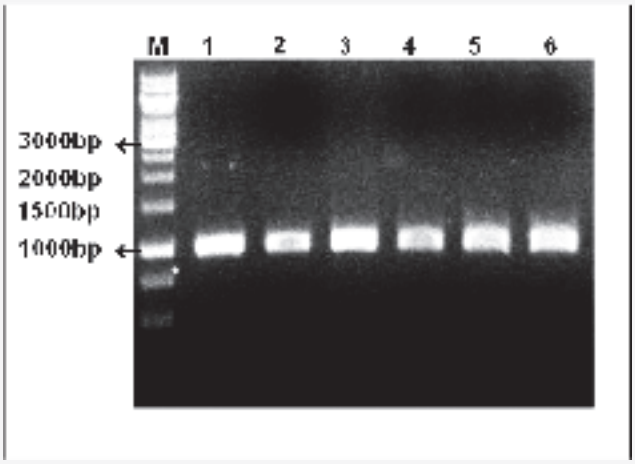
آنالیز وسترن بلات از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده: انتقال پروتئین‌ها از ژل پلی آکریل آمید به یک غشا نیتروسلولزی با استفاده از بافر تریس/گلیسین همراه با ۲۰٪ متانول صورت گرفت. جایگاه‌های غیر اختصاصی نیز توسط توئین ۲۰ (0.05-0.1%) بلوکه شدند. غشاها ۳ بار توسط TBS-T شسته شدند و سپس ۲-۱ ساعت در آنتی بادی (anti-6-His کانجوگه با پراکسیداز) قرار گرفتند. سپس غشاها ۳ بار توسط TBS-T شسته شدند و واکنش توسط محلول سـوبسـترا DAB/H_2O_2 ($5mg\ ml^{-1}$) و ۰.۱٪ پراکسید هیدروژن در TBS(pH 5.7) حاصل شد. با پیدایش باند قهوه‌ای طلایی در جایگاه واکنش، غشاها توسط آب مقطر شسته شدند تا واکنش آنزیمی متوقف شود و نتایج بعد از خشک شدن کامل غشاهای نیتروسلولزی خوانده شدند.

نتایج

ژنوم DNA تهیه شده از بروسلا ابورتوس در PCR به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت و در این مرحله آنزیم DNA polymerase Primestar®HS استفاده شد. نتایج باندی با وزن مولکولی صحیح برای ژن omp2b را نشان دادند.

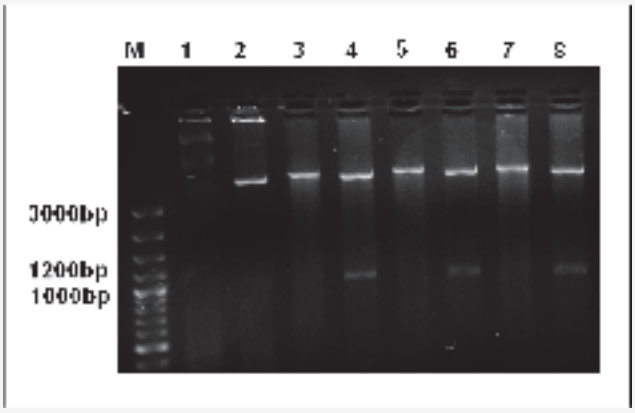
www.SID.ir
http://jfums.hbi.ir

Archive of SID

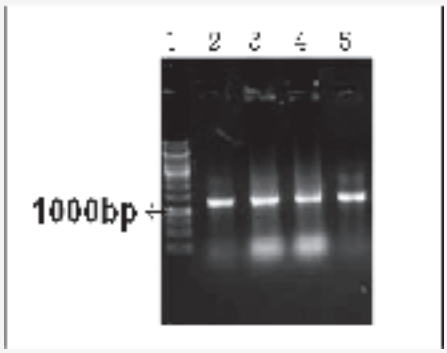


شکل ۱. PCR از ژن omp2b با استفاده از DNA polymerase .Primestar®HS
وزن مولکولی ژن omp2b ۱۱۳۸bp می‌باشد. (M:DNA ladder 1kb ۲-۶: نمونه‌ها)

کلونینگ ژن omp2b بروسلا آبورتوس. قطعات مورد نظر را از pJET1.2 نوترکیب خارج کرده و به درون وکتور pET28a(+) ساب کلون کردیم. پلاسمید های کلون شده به واسطه هضم آنزیمی (شکل ۲) و کلونی PCR بررسی شدند (شکل ۳).

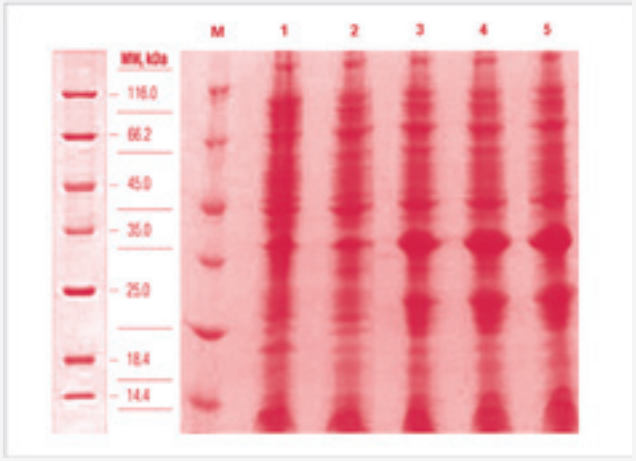


شکل ۲. هضم تک آنزیمی و هضم آنزیمی دوگانه pET28a (+) کلون شده.
1:pTE28a,M:DNA ladder ۱۰۰ bp) بدون هضم آنزیمی
pTE28a,M:۲ (۶۳۹۷bp) با هضم تک آنزیمی ۷،۳،۵: pET28a با
هضم تک آنزیمی ۴،۶،۸: pET28a با هضم آنزیمی دوگانه)



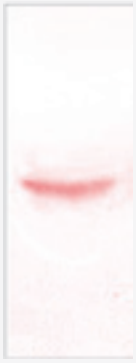
شکل ۳. Colony PCR با استفاده از پرایمر universal (DNA ladder۱kb:1 ،۲-۵ نمونه‌ها)

بیان پروتئین Omp2b در E.coli. بیان سلول‌های القا شده توسط ۱ mM IPTG هر ۱ ساعت به مدت ۴ ساعت بررسی شدند.



شکل ۴. بیان پروتئین Omp2b هر ۱ ساعت به مدت ۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل حضور نوکلئوتیدهای اضافی طراحی شده برای جایگاه‌های محدودالاثر در پرایمرها وزن مولکولی Omp2b تغییر کرد. (M: مارکر ۱: BL۲۱ Eoli القا نشده ۲: ۱ ساعت بعد از القا ۳: ۲ ساعت ۴: ۳ ساعت ۵: ۴ ساعت) SDS-PAGE بهترین میزان بیان را ۳-۴ ساعت بعد از القا نشان داد.

وسترن بلات. پروتئین‌های نوترکیب خالص شده بعد از دیالیز توسط وسترن بلات آنالیز شدند. (شکل ۵)



شکل ۵. وسترن بلات از Omp2b

بحث

بروسلا باکتری گرم منفی داخل سلولی اختیاری است که قادر به ایجاد بیماری عفونی در بسیاری از گونه‌های حیوانی و انسان‌ها می‌باشد (۵). در حیوانات بروسلا ترجیحاً در ارگان‌های تولید مثل و بافت جنینی جایگزین می‌شود که سبب بروز سقط جنین و ناباروری می‌شود و به دنبال آن خسارت‌های اقتصادی مهمی را حاصل می‌کند (۶). در انسان‌ها بروسلا تمایل به تکثیر در سیستم رتیکواندوتلیال را دارد و به واسطه

www.SID.ir
http://jfums.hbi.ir

Archive of SID

تماس با حیوانات آلوده، تنفس آئروسل و یا مصرف محصولات حیوانات آلوده از قبیل شیر، محصولات شیر یا گوشت آلوده بیماری مزمن تب مواج را ایجاد می‌کند (۷). در واقع بروسلوز انسانی یکی از رایج‌ترین بیماری‌های زئونوتیک است که به درمان طولانی مدت با آنتی بیوتیک ها نیاز دارد (۸). برنامه‌های آزمایش و کشتار توأم با واکسیناسیون مهم‌ترین روش‌های کنترل بروسلوز حیوانی هستند بنابراین جلوگیری از بروسلوز انسانی به طور دائم وابسته به کنترل بیماری در حیوانات است (۸).

واکسن‌هایی که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، واکسن‌های بروسلا آبورتوس S19 و بروسلا ملیتنسیس Rev.1 هستند. این واکسن‌ها دارای اشکالاتی از قبیل ایجاد سقط جنین در گاوهای باردار، مشکل تشخیص بین حیوانات واکسینه شده از حیوانات آلوده توسط تست‌های سرولوژیکی، مقاومت آنتی بیوتیکی و ابتلا انسان به بروسلوز در صورت تماس هستند. به این دلایل دانشمندان تلاش می‌کنند تا واکسن‌های امن و غیر تکثیر شونده ای را فراهم کنند که تولید آن‌ها آسان باشد (۸). بنابراین شناسایی آنتی ژن‌های حفاظت شده بخش بروسلا برای تولید واکسن‌های ساب سلولار ضروری می‌باشد (۵).

OMP های بروسلا به طور گسترده به عنوان آنتی ژن‌های ایمونوژنیک و حفاظت بخش شناسایی شده‌اند، بنابراین در تولید روش‌های تشخیصی و واکسن‌ها می‌توانند آنتی ژن‌های سودمندی باشند (۸). آنتی بادی‌های منوکلونال علیه بسیاری از OMP های بروسلا تولید شده‌اند. حفاظت پسیو توسط این آنتی بادی‌های منوکلونال عدم حفاظت یا حفاظت کمی را علیه سویه‌های صاف بروسلا در موش ایجاد کردند، در حالی که مخلوطی از این آنتی بادی‌های منوکلونال علیه سویه خشن بروسلا اوویس به شدت حفاظت بخش بودند. این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل کاهش دسترسی آنتی بادی‌ها به OMP ها در سویه‌های صاف در مقایسه با سویه‌های خشن به دلیل مانع استری زنجیره‌های O پلی ساکاریدی باشد. به هر صورت این OMP ها می‌توانند به طور بالقوه علیه سویه‌های صاف بروسلا توسط القا ایمنی سلولی حفاظت بخش باشند (۵).

از آنجایی که تهیه پروتئین طبیعی بروسلا به کشت انبوه و خالص سازی پروتئین نیاز دارد که هم پروسه تولید بسیار مشکل و خطرآفرین است و هم سطح پروتئین‌های سطحی به حدی نیست که خالص سازی فرم طبیعی آن به صرفه باشد، مطالعه ارزش واقعی حفاظت بخشی آن‌ها به عنوان ایمونوژن ها مشکل است. تکنیک‌های مولکولی کلونینگ این مسیر را آسان کرده‌اند و قادرند میزان بالایی از پروتئین را تولید کنند.

به این منظور در این مطالعه ما Omp2b را کلون و بیان کردیم که این پروتئین دارای قدرت بالقوه برای تحریک پاسخ‌های ایمنی است و می‌توان در تشخیص بیماری توسط ارزیابی سرم از آن بهره گرفت (۴).

ژن Omp2b توسط PCR تولید و در سیستم بیانی pET28a(+) کلون شد. در یک مطالعه دیگری که بر روی پروتئین Omp2b صورت گرفت از وکتور پلاسمیدی pET3a برای کلون ژن omp2b استفاده شد که نتایج قابل قبولی را حاصل کرد (۹). هم چنین محقق دیگری با استفاده از ویکتور pGEM-7Zf ژن omp31 بروسلا ملیتنسیس را کلون کرد و نتیجه آن رضایت بخش بود (۳). به هر صورت سیستم بیانی pET۲۸a(+) از نظر کارآمدی کلونینگ و تولید پروتئین نوترکیب سازگاری خوبی با پروتئین ما داشته و از طرفی استفاده از آن در تجربیات مختلف نتایج قابل قبولی بدست آورده است.

References :

1. Cha SB, Rayamajhi N, Kang ML, Lee WJ, Shin MK, Yoo HS. Comparative study of gamma interferon production in mice immunized with outer membrane proteins and whole bacteria of Brucella abortus. Jpn J Infect Dis. 10;63(1):49-51.
2. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet Microbiol. 2010;90(1-4):479-96.
3. Vizcaino N, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Brucella melitensis omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. Infect Immun. 1996;64(9):3744-51.
4. Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future. Vet Microbiol. 2002;90(1-4):229-47.
5. Guilloteau LA, Laroucau K, Vizcaino N, Jacques I, Dubray G. Immunogenicity of recombinant Escherichia coli expressing the omp31 gene of Brucella melitensis in BALB/c mice. Vaccine. 1999;17(4):353-61.
6. Van De Verg LL, Hartman AB, Bhattacharjee AK, Tall BD, Yuan L, Sasala K, et al. Outer membrane protein of Neisseria meningitidis as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of Brucella melitensis in mouse and guinea pig intranasal immunization models. Infect Immun. 1996;64(12):5263-8.
7. Bhattacharjee AK, Van de Verg L, Izadjoo MJ, Yuan L, Hadfield TL, Zollinger WD, et al. Protection of mice against brucellosis by intranasal immunization with Brucella melitensis lipopolysaccharide as a noncovalent complex with Neisseria meningitidis group B outer membrane protein. Infect Immun. 2002;70(7):3324-9.
8. Pasquevich KA, Estein SM, Garcia Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, et al. Immunization with recombinant Brucella species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against Brucella abortus infection. Infect Immun. 2009;77(1):436-45.
9. Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, Grayon M, Verger JM, de Bolle X, et al. Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of Brucella spp. J Bacteriol. 2001;183(16):4839-47.
10. Fang CM, Zainuddin ZF, Musa M, Thong KL. Cloning, expression, and purification of recombinant protein from a single synthetic multivalent construct of Mycobacterium tuberculosis. Protein Expr Purif. 2006;47(2):341-7.

www.SID.ir
http://jfums.hbi.ir

Archive of SID

Original Article

Cloning and Expression of Brucella Outer Membrane Protein 36kDa (OMP2b) in E. coli

Beheshti Nazanin[1], Mohabati Mobarez Ashraf[2*], Tabaraie Bahman[3], Harzandi Naser[4], Khoramabadi Nima[5], Aghababa Haniyea[6], Bakhtyiari Amir[7]

1- MSc, Dept of Microbiology, Faqulty of Sciences, Islamic Azad yniversity, Karaj ,Alborz, Iran
2- Associate Professor, Dept of Bacteriology, Faqulty of Medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3- Asistant Professor, Institute Pasteur of Iran, Vaccine Department, Karaj, Alborz, Iran
4- Asistant Professor, Dept of Microbiology, Faqulty of Science, Islamic Azad University, Karaj, Alborz, Iran
5- PhD Student, Dept of Bacteriology, Faqulty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6- MSc, Dept of Bacteriology, Faqulty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
7- MSc, Dept of Microbiology, Faqulty of Sciences, Islamic Azad University, Karaj, Alborz, Iran

Abstract

Background & Objective: Brucellosis is an important zoonotic disease of economic significance. Brucella species are gram-negative, facultative intracellular bacteria, and are capable of replicating in the phagosomes of macrophages. They cause infection in several animal species and humans. Prevention of new diseases and diagnosis of cases infected with the organism are both essential for eradication of the disease. Characterization and evaluation of different antigens of Brucella cells has a key role in progression of prevention and diagnosis programs. Here, we report the production and purification of recombinant 31kDa outer membrane protein Brucella abortus (Omp2b).

Materials & Methods: Brucella abortus 36kDa outer membrane protein gene was amplified with PrimeSTAR® HS DNA polymerase, cloned in pJET1.2. The target gene was subcloned in pET28a (+). Recombinant pET28a vectors were transformed into E coli BL21 (DE3). Expression of recombinant protein was induced with 1mM IPTG. Proteins were absorbed to Ni-NTA agarose resins and Recombinant proteins were eluted with 250mM imidazol. Imidazol removed by dialysis. Proteins were assayed by Western-blotting and rOmp2b was probed by Brucella rabbit anti serum.

Result: Appearance of a golden brown band at the site of reaction, in Western blotting confirmed successfully clone and expression. We purified Omp2b by affinity chromatography and this method prepared refolds proteins on the column.

Conclusion: Omp2b were successfully cloned, expressed and purified. The recombinant proteins were recognized by polyclonal antiserum which suggests the accuracy of procedure.

Keywords: Brucella abortus, Cloning, Expression, Omp2b

Corresponding author: Mohabati Mobarez Ashraf, Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 82883862
Fax: + 98 21 82884555
E – mail: mmmobarez@modares.ac.ir

www.SID.ir
http://jfums.hbi.ir