Archive of SID

استخراج، تخلیص و سم‌زدایی لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و ارزیابی فعالیت‌های بیولوژیکی آن

دکتر ایرج پاکزاد[۱]، دکتر عباس رضایی[۲*]، دکتر محمدجواد رسایی[۳]، دکتر احمد زواران‌حسینی[۴]، دکتر انوشیروان کاظم‌نژاد[۵]، دکتر بهمن تبرایی[۶]، دکتر سعید ریوندی[۷]

Title: *Extraction, purification and detoxification of Brucella abortus lipopolysaccharide and biological activities evaluation.*

Authors: *Pakzad I,(PhD); Rezaee A,(PhD); Rasaee MJ,(PhD); Zavaran HA,(PhD); Kazemnegad A,(PhD); Tabaraee B,(PhD); Raivandi S,(MSc).*

Introduction: *Lipopolysaccharide(LPS) of Brucella abortus is important in brucellosis diagnosis and as one of the components for developing a subunit vaccine against brucellosis. Comparision of LPS extraction methods and evaluation of B. abortus LPS toxicity have been considered as the goal of this research.*

Methods: *Brucella abortus LPS was extracted by n-butanol and hot phenol method ,in E.coli by hot phenol, then they were purified by ultracentrifugation. B. abortus LPS was detoxified by alkaline treatment. LPS SDS-PAGE was performed with polyacrylamide gels and stained with silver stain.*

Results: *Purified LPS from B.abortus by butanol extraction was shown to have less than 2%(wt/wt) contamination by protein and less than 1%(wt/wt) contamination by nucleic acids. In addition, purified LPS from B.abortus and E.coli extracted by phenol was shown to have below 4% (wt/wt) contamination by protein and below 1.5% contamination by nucleic acids.The electrophoresis pattern of B.abortus LPS and E.coli LPS was the same as the former studies. Pyrogenicity test of B.abortus LPS(10 µg/ml) and E.coli LPS (0.5 µg/ml) was positive, but D-LPS (10, 50µg/ml)was negative. In LAL test, 10 ng/ml of D-LPS was negative, but 0.04ng/ml of B.abortus LPS was positive and endotoxin unit of B.abortus LPS was less than E.coli LPS.*

Conclusion: *Results show that the amount of LPS of extracted by phenol method is higher ,and protein, nucleic acids contamination rate in butanol method is very low. In addition, D-LPS toxicity is severly decreased, hence, we can use several as many as B.abortus LPS for stimulating immune system.Besides, ability of B.abortus LPS is likely much less than the LPS from E.coli to evoke endotoxic shock, and it can be used as immunogen directly.*

Keywords: *Lipopolysaccharide(LPS), Brucella abortus, detoxification, LAL, rabbit pyrogenic test.*

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس * (نویسنده رابط)

۳- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۵- گروه آمار حیاتی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۶- انستیتو پاستور ایران

۷- شرکت پالایش و پژوهش خون ایران

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *لیپوپلی ساکارید* (LPS) *بروسلا آبورتوس در تشخیص بیماری تب مالت (بروسلوزیس) و بعنوان یکی از اجزای واکسن زیر واحدی برعلیه این بیماری حائز اهمیت است. مقایسه دو روش فنلی و بوتانلی در استخراج* LPS *بروسلاآبورتوس و بررسی میزان سمیت آن هدف این تحقیق است.*

روش‌کار: LPS *بروسلاآبورتوس با روش ان - بوتانل و فنل‌داغ و لیپوپلی ساکارید E.coli با روش فنل‌داغ استخراج و با روش اولتراسانتریفوژ خالص گردید. لیپوپلی‌ساکارید بروسلا با تیمار قلیائی سم‌زدایی شد. لیپوپلی‌ساکاریدهای تخلیص شده در ژل آکریل‌آمید الکتروفورز نموده و با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید.*

یافته‌ها: *نتایج نشان داد که مقدار آلودگی پروتئینی واسیدهای نوکلئیک در روش بوتانلی به ترتیب کمتر از ۲٪ و ۱٪ و در روش فنلی برای هر دو باکتری به ترتیب کمتر از ٤ ٪ و ۱/۵٪ بود. الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکارید بروسلا و E.coli با تحقیقات قبلی مطابقت داشت. آزمایش تب‌زایی با* ۱۰µg/ml *لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس و* ۰/۵µg/ml *لیپوپلی ساکارید E.coli مثبت و در مقادیر*۱۰µg/ml *و۵۰ لیپوپلی ساکارید سم‌زدایی شده* (D-LPS) *منفی بود. آزمایش* (Limulus Amoebocyte lysate LAL) *با*۱۰ ng/ml *از* D-LPS *منفی و با* ng/ml ۰/۰٤ *لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس مثبت شد، و از طرف دیگر لیپوپلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس نسبت به لیپوپلی ساکارید E.coli واحد سمی کمتری داشت.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان می‌دهدکه میزان لیپوپلی ساکارید استخراجی در روش فنلی بیشتر ومقدار آلودگی پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک روش بوتانلی کمتر می‌باشد وسمیت* D-LPS *بروسلا آبورتوس بشدت کاهش یافته می‌توان چندین برابر لیپوپلی ساکارید بروسلا آبرتوس از آن، جهت تحریک سیستم ایمنی بکار برد. همچنین توانایی لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس نسبت به لیپوپلی ساکارید E.coli درایجاد شوک سپتیک بسیار ضعیف‌تر است و می‌توان بطور مستقیم از آن بعنوان ایمنوژن استفاده کرد.*

گل‌واژگان: *لیپوپلی ساکارید، بروسلا آبورتوس، سم‌زدایی،* LAL*، آزمایش تب‌زایی.*

مقدمه:

بروسلاها باکتری‌های گرم منفی کوچک، داخل سلولی اختیاری،شدیداً هوازی و سخت رشدی هستند که در گاو، گوسفند، بز و انسان ایجاد بروسلوزیس (بیماری مشترک بین انسان و دام) می‌کنند. در سال ۱۸۸۷ بروس(Bruce) باکتری مولد این بیماری را از طحال یکی از مبتلایان که به علت تب مالت در گذشته بود، جدا نمود و نام این باکتری را *میکروکوکوس ملی‌تنسیس* گذاشت. بروسلاها بر اساس تفاوت در میزبان اصلی و بیماری‌زایی به شش گونه طبقه‌بندی می‌شوند. بروسلاآبورتوس عامل تب مالت گاوی می‌باشد که در انسان ایجاد تب مواج (بروسلوز) می‌نماید، البته این بیماری توسط گونه‌های *بروسلا ملی‌تنسیس*، *بروسلاسویس* و *بروسلاکانیس* هم ایجاد می‌شود (۳-۱).

لیپوپلی‌ساکارید (LPS)، ترکیب عمده دیوارهٔ سلولی همه باکتری‌های گرم منفی می‌باشد و حدود ۴۰٪ وزن غشاء خارجی تشکیل داده و در استحکام آن نقش دارد. لیپوپلی‌ساکارید از سه بخش لیپید A، بخش مرکزی و زنجیره O تشکیل شده است خصوصیات اصلی لیپوپلی ساکارید، یعنی فعالیت اندوتوکسیک، ایمنومدولاتوری و تب‌زایی کاملاً شناخته شده می‌باشد (۲و۷-۴).

در شوک اندوتوکسین (سپتیک) واسطه‌های متعددی از سلول‌های فاگوسیتی (منوسیت‌ها و ماکروفاژها) و سلول‌های اندوتلیال بویژه IL-1β، TNF-α آزاد می‌شود که منجر به شوک می‌گردد (۸). همین واسطه‌ها با تأثیر بر روی سیستم‌های کنترل حرارتی بدن منجر به افزایش دما و تب می‌گردند (۹). به منظور بررسی آلودگی مواد دارویی تزریقی به مواد تب‌زا، آزمایش تب‌زایی در خرگوش انجام می‌شود. به دلیل محدویت‌های این آزمایش در سال‌های اخیر از آزمایش LAL[1] ،که بر اساس لخته شدن سلول‌های آمبوسیت خرچنگ نعلی شکل[2] توسط

[1] - limulus amoebocyte lysate

[2] - *Limulus polyphemus*

www.SID.ir

Archive of SID

لیپوپلی‌ساکارید است، استفاده می‌شود (۹).

لیپوپلی‌ساکارید *بروسلا آبورتوس* مانند سایر باکتری‌های گرم منفی از سه قسمت تشکیل شده و هفت ژن در سنتز آن نقش دارد (۲۳). ترکیب لیپید A آن با خانواده انتروباکتریاسه متفاوت می‌باشد، زنجیره O یک هموپلی‌مر خطی از ۹۶ تا ۱۰۰ زیر واحد است. بخش مرکزی کاملاً شناخته شده نیست (۱۲-۱۰).

لیپوپلی‌ساکارید *بروسلا آبورتوس* در جلوگیری از لیزباکتری توسط سیستم کمپلمان، اختلال در عرضه آنتی ژن توسط MHC کلاس ۲ به سلولهای TCD4، القاء سیکلو اکسیژناز، القاء تولید نیتریک اکساید، تولید کموکاین جاذب منوسیت‌ها (MCP1) فعال شدن NF-κβ و تولید گرانولوما نقش دارد (۱، ۱۳ و۱۴). لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* برخلاف لیپوپلی ساکارید *E.coli* قادر به تحریک سلولهای B انسانی می‌باشد که ممکن است ناشی از تفاوت در ماهیت شیمیایی لیپید A آن باشد (۸ و۱۵). لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* مانند جسم کشته شده باکتری مستقل از سلولهای T، سیستم ایمنی را تحریک می‌کند (۸ و۱۶). تزریق کونژوگه زنجیره O- آلبومین سرم گاوی (OPS-BSA) به موش Balb/C موجب القاء تولید آنتی‌بادی و محافظت در برابر چالش با سویه بیماری‌زایی بروسلا آبورتوس می‌شود(۱۷). آنتی‌بادی‌های اختصاصی لیپوپلی ساکارید موش Balb/C در برابر چالش با سویه بیماری‌زایی *بروسلا آبورتوس* ۵۴۴ حفاظت بخش بوده است (۱۸و۱۹) بدلیل اینکه تزریق لیپوپلی ساکارید باکتریهای گرم منفی در بدن پستانداران ایجاد شوک سپتیک می‌کند جهت تحریک سیستم ایمنی آن را باید سم‌زدایی نمود. سم‌زدایی از لیپوپلی ساکارید با روش‌های تیمار اسیدی و قلیایی واخیر اً با آلکالین فسفاتاز صورت می‌گیرد (۲و ۸). لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* در روش‌های سرولوژیک مرسوم (آزمایش رایت) جهت تشخیص بیماری بروسلوز در انسان و دام استفاده می‌شود و مهمترین ساختار محرک سیستم ایمنی همورال می‌باشد. از لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس بعنوان یکی از اجزاء یک واکسن زیر واحدی بر علیه بروسلوز نا م می‌برند (۲۲-۲۱). هدف این تحقیق مقایسه دو روش استخراج فنلی و بوتانلی لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و ارزیابی‌فعالیت بیولوژیکی آن می‌باشد.

استخراج لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* با دو روش بوتانلی و فنلی، همچنین لیپوپلی ساکارید *E.coli* با روش فنلی انجام گرفته وبا فرایند هضم آنزیمی و رسوب‌دهی متوالی با متانول سرد و اولتراسانتریفوژ متوالی[1] تخلیص شدند. لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* با روش تیمار قلیایی سم‌زدایی شد. لیپوپلی ساکارید این باکتری و شکل سم‌زدایی شده آن در مقایسه با لیپوپلی ساکارید *E.coli* با آزمایشات تب‌زایی در خرگوش و LAL مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار:

استخراج لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس*

الف- روش بوتانلی: باکتری بروسلا آبورتوس S19، S99 به صورت انبوه کشت گردید سپس با حرارت و فرمالین ۰/۵٪ کشته شدند. استخراج لیپوپلی ساکارید توسط ان- بوتانل اشباع شده با آب به روش Morrison و Levis که اخیراً توسط Phillips و همکارانش بهینه شده انجام گرفت (۳و ۸). این روش بدلیل عدم آسیب به سلولهای باکتریایی و عدم تخریب آنها بعنوان استخراج ملایم درنظر گرفته شده است. بطور خلاصه ۱۰گرم توده سلولی *بروسلا آبورتوس* در ۸۰ میلی‌لیتر PBS حل کرده سپس با ۸۰ میلی‌لیتر ان- بوتانل اشباع شده با آب در دمای ۴ °C استخراج گردید. با سانتریفوگاسیون در دور ۹۶۳۰g بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ °C فاز آبی جمع‌آوری شد. با لیو فیلیزاسیون حجم آن تقلیل یافته، ته نشین در بافر تریس ۱/ مولار با pH ۸ حاوی ۲٪ SDS و ۲٪ ۲-مرکاپتو اتانل حل گردید و بمدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ °C حرارت داده شد و بمدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C با RNase وDNase انکوبه گردید. سپس بمدت ۲ ساعت در دمای ۵۶ °C با پروتئیناز K انکوبه گردید. در دور ۹۶۳۰g بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. لیپو پلی ساکارید با متانول سرد (۴ حجم) رسوب داده شد، دوبار با متانول سرد شستشو گردید. در دور g ۱۰۰۰۰۰ با اولترا سانتیریفوژ رسوب داده شد و لیوفلیزه گردید (۳، ۸، ۲۳ و ۲۴).

ب- روش فنلی: لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و *E.coli* (O157) با روش Westphal استخراج گردید. سلول‌های باکتری با حرارت و فرمالین ۰/۵٪ کشته شدند. ۵ گرم باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۷ حاوی EDTA میلی‌مولار حل کرده و بمدت یک دقیقه در دور بالا بهم زده و چندین بار فریز تاو (یخچال ۷۰-، بن ماری آب جوش)گردید. ۱۰۰ میلی‌گرم لیزوزیم افزوده و به بطور شبانه همراه با بهم زدن در دمای ۴ °C انکوبه شد. سپس در دمای ۳۷°C بمدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. با بهم زن (Vortex) بمدت ۳ دقیقه بهم زده، سپس حجم سوسپانسیون با سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ حاوی کلرورمنیزیوم ۲۰ میلی‌مولار به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد آنزیم‌های RNase و DNase با غلظت نهایی

[1] - sequential ultracentrifugation

www.SID.ir

Archive of SID

یک میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شده و بمدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه گردید به‌منظور غیرفعال سازی آنزیم‌ها محلول مذکور در دمای ۶۰°C بمدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. سوسپانسیون باکتری به دمای ۷۰°C رسانده و هم حجمش فنل ۹۰٪ با دمای ۷۰°C اضافه گردید و بمدت ۱۵ دقیقه بهم زده، سپس در حمام آب یخ سرد شد. در دور ۲۰۰۰۰g بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز فنلی و آبی از هم جدا نموده و هر دو فاز را با متانول سرد رسوب داده شد. رسوب در آب مقطر یا تریس حل کرده و با پروتئیناز K، RNase، DNase تیمار شد سپس در دور ۲۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. مایع روئی ۲ شب با PBS دیالیز شده و در دور ۱۰۰۰۰۰g با اولتراسانتریفوژ رسوب داده و لیوفلیزه گردید(۳و ۲۳).

جذب با روش اسپکتروفتومتری

جذب محصول استخراجی به روش اسپکتروفتومتری در مراحل مختلف برای وجود لیپوپلی ساکارید، تخمین مقدار پروتئین و اسیدهای نوکلئیک گرفته شد (۸).

آنالیز شیمیایی

مقدار پروتئین با روش برادفورد با استفاده از BSA بعنوان استاندارد تعیین گردید. مقدار اسیدهای نوکلئیک با روش اسپکتروفتومتری تخمین زده شد، مقدار لیپوپلی ساکارید با ماده ۱ و ۹ دی متیل متیلن بلو و با استفاده از لیپو پلی ساکارید استاندار *سالمونلا تیفی موریوم* L-۶۵۱۱ در طول موج ۵۱۰ نانومتر تعیین گردید (۲۳).

SDS-PAGE

الکتروفورزیس لیپوپلی ساکارید در ژل ۱۴٪ SDS-PAGE حاوی اوره ۴ مولار انجام گرفت سپس با روش نیترات نقره رنگ آمیزی گردید (۸ و ۲۵).

سم‌زدایی از لیپوپلی ساکارید:

لیپوپلی ساکارید تخلیص شده با سود ۱/ نرمال در دمای ۱۰۰°C بمدت ۲ ساعت انکوبه شده سپس pH مخلوط با HCl یک نرمال به ۳/۵ رسانده و بدقت فاز رویی جداسازی گردید(۲).

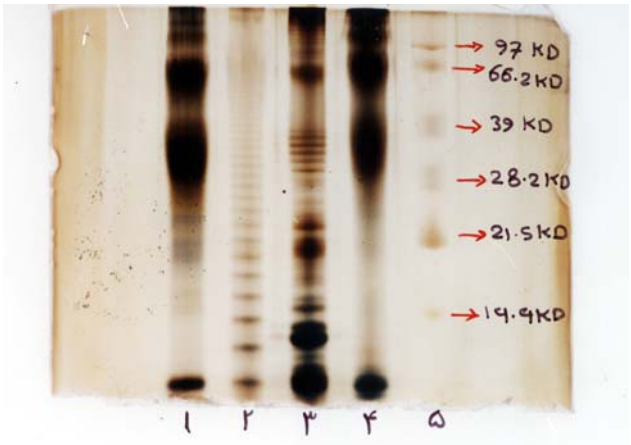
مطالعات بیولوژیک: لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس*، شکل سم‌زدایی شده آن (D-LPS) و لیپوپلی ساکارید *E.coli* برای فعالیت‌های بیولوژیک آزمایش تب زایی در خرگوش و LAL ارزیابی شدند.

آزمایش تب‌زایی در خرگوش: لیپوپلی ساکارید بعنوان القاء کننده تب در انسان وحیوانات آزمایشگاهی شناخته شده است. مواد تزریقی که باعث افزایش دمای بدن خرگوش شوند بعنوان پیروژن (تب‌زا) ثبت می‌شوند. در این تحقیق از خرگوش نژاد نیوزیلندی (موسسه رازی:NZW) استفاده شد. آزمایش تب‌زایی در خرگوش بطور خلاصه با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و ۵۰، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر D-LPS، همچنین ۵۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید *E.coli* در گروه‌های سه‌تایی خرگوش بصورت ۳ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تزریق شد. دمای اولیه مقعد (رکتوم) ثبت گردید. بعد از ۳۰ دقیقه ترکیبات فوق در رگ مارژینال گوش تزریق شد. هر یک ساعت به مدت ۳ ساعت دما ثبت گردید. وقتی دمای بدن یکی از خرگوش‌ها بیش از ۰/۶ درجه سانتیگراد افزایش یافت، یا افزایش دمای مجموع سه خرگوش هر گروه به ۱/۴ درجه سانتیگراد رسید معرف مثبت بودن آزمایش تب‌زایی است (۸و ۹).

آزمایش LAL: این آزمایش با کیت Gel Clot (HAEMACHEM U.S.A) طبق دستور موسسات USP و FAD برای اندوتکسین باکتری‌ها بامقادیر ng/mL ۳۲، ۰/۷۸، ۰/۱۹۵/۳۹، ۰/۰۴۸۷/۰۹۷۵، ۰/۰۱۲۱/۰، ۰/۰۰۳، از لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و ng/mL ۴۰۰۰، ۱۰، ۰/۵ از لیپوپلی ساکارید سم‌زدایی شده (D-LPS) انجام شد (۸).

یافته‌ها:

لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و *E.coli* در ژل ۱۴٪ SDS-PAGE حاوی اوره ۴ مولار الکتروفورزیس و با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد (شکل ۱).



شکل ۱- SDS-PAGE لیپوپلی ساکاریدهای *B.abortus*، *E.coli* و *S.typhi murium*. مقادیر ۱۰ (خانه ۱)و ۲۰ میکروگرم (خانه ۴) از لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس*، ۱۰ میکروگرم از لیپوپلی ساکارید *E.coli* (خانه۲)و سالمونلا تیفی موریوم (خانه ۳). اسمیر خانه ۱و۴ که کندتر حرکت کرده گروهی از باندها هستند که معرف لیپوپلی ساکارید دست نخورده (لیپید A، بخش مرکزی و زنجیره O) می باشد. سریعترین باند در تمام خانه‌ها نشان دهنده لیپید A به تنهایی است. خانه ۵ مارکر می باشد.

www.SID.ir

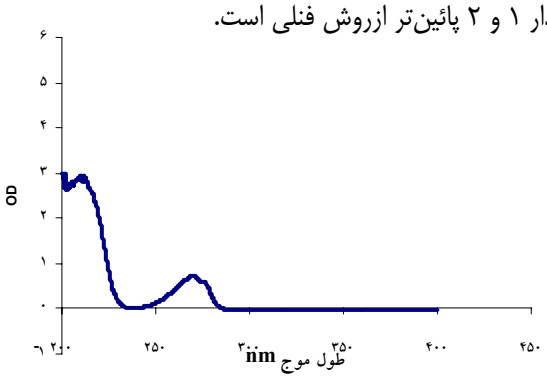
Archive of SID

الگـوی آن با مطالعات قبلی لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* و *E.coli* مشـابه می‌باشد. خانه ۱ و۴ مربوط به ۱۰و۲۰ میکروگرم از لیـپو پلـی ساکارید *بروسلا آبورتوس* می‌باشد. شمای آن شامل یـک بـاند سـبک مـی‌باشد که نشانگر قسمت مرکزی و لیپید A لیپوپلـی سـاکاریدی *بروسـلا آبورتـوس* مـی‌باشد. باند سنگین که بصـورت اسـمیر دیده می‌شود نشان دهنده لیپوپلی ساکارید دست نخـورده اسـت کـه تفاوت در تعداد واحد قندی زنجیره O موجب اسمیر شده است.

خانـه ۲ و۳ مربوط ۱۰ میکروگرم از لیپوپلی ساکارید *E.coli* و *سالمونلا تیفـی موریـوم* است که حالت نردبانی دارند سبک‌ترین بـاند احـتمالاً لیپـید A می‌باشد. الگوی نردبانی بخاطر اینست که واحدهای زنجیره O بجای یک قند از ۴ قند تشکیل شده است.

مقایسـه مـیزان لیپوپلـی سـاکارید استخراجی در روش بوتانلی و فنلی

مقدار لیپوپلی پلی ساکارید استخراجی از ۱۵ گرم جسم سلولی باکـتری *بروسـلا آبورتوس* در روش فنلی ۱۰±۱۵۰ میلی‌گرم و با روش بوتانلـی ۴±۳۰ میلـی‌گـرم بـود. مقـدار آلودگـی پروتئینی و اسـیدهای نوکلئیک لیپوپلی ساکارید خام در روش بوتانلی با توجه به نمودار ۱ و ۲ پائین‌تر ازروش فنلی است.



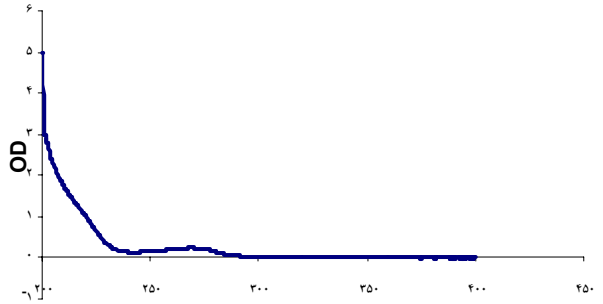
نمـودار ۱- طـیف جـذب اسـپکتروفتومتری نمونـه استخراج فنلی لیپوپلـی سـاکارید *بروسـلا آبورتـوس* نشـان دهـنده پـیک جذب لیپوپلـی سـاکارید در ۱۹۰ تـا ۲۲۰نانومتر و پیک جذب در۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر مربوط به پروتئین واسیدهای نوکلئیک است.

بعـد از تخلیص مقدار آلودگی پروتئینی واسیدهای نوکلئیک روش بوتانلـی بـه ترتیـب۲٪،۱٪،۰٪ و مقدار آلودگی پروتئینی واسیدهای نوکلئیک در روش فنلی به ترتیب کمتر از ۴٪ و۱/۵٪ است.

آزمایش تب زایی در خرگوش

ایـن آزمـایش بـا مقـدار۱۰µg/mL لیپوپلـی سـاکارید *بروسلا آبورتـوس*،۰/۵µg/mL لیپوپلـی ساکارید *E.coli* مثبت و با مقادیر ۱۰،۵۰ µg/mL D-LPS بروسلا آبورتوس منفی بود.

آزمـایش LAL: این آزمایش با کیت Gel Clot طبق دستورات USP و FAD بـرای اندوتکسـین باکـتری‌هـا انجام شد. کمترین مقـدار لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* که در آن آزمایش LAL مثبـت بـود، ۰/۰۴۸۷ng/mL تعییـن گـردید. باتوجه به حساسیت تشخیصـی کیتEU ۰/۱۲۵ ~۰/۰۴۸۷ng/mL از لیپوپلی ساکارید *بروسـلا آبورتـوس* مـی‌باشـد. طـبق دسـتورالعمل ایـن کیـت ۱ng/mL~۱۲EU از لیپوپلـی سـاکارید (0111:B4) *E.coli* برابـر اسـت و بـنابر ایـن یـک میلـی‌گرم لیپوپلی ساکارید *E.coli* برابر EU ۱۲۰۰۰۰۰۰ و یـک میلـی‌گـرم لیپوپلـی سـاکارید *بروسـلا آبورتوس* برابر ۲۵۰۰۰۰۰EU می‌باشد. و مقادیر ۰/۱۰،۲۵ng/mL، از D-LPS *بروسـلا آبورتوس* نتیجه آزمایش LAL آنها منفی بود. در حالـی کـه همیـن مقادیـر و مقدارهـای بسیار کمتر از لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* نتیجه آزمایش آنها مثبت بود. این نشان می‌دهد سمیت D-LPS تا حد زیادی کاهش یافته است.



نمـودار ۲- طیف جذب اسپکتروفتومتری نمونه استخراج بوتانلی لیپوپلـی سـاکارید *بروسـلا آبورتـوس* نشـان دهـنده پـیک جذب لیپوپلـی سـاکارید در ۱۹۰ تـا ۲۲۰نانومتر و پیک جذب در۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر مربوط به پروتئین واسیدهای نوکلئیک است .

بحث:

از لیپوپلـی سـاکارید *بروسـلا آبورتـوس* در تشـخیص تب مالت و تحـریک سیسـتم ایمنـی مـی‌تـوان استفاده نمود. در این تحقیق لیپوپلـی سـاکارید *بروسـلا آبورتـوس* بـه دو روش فنلی و بوتانلی اسـتخراج شـده، کارایـی و خلـوص محصـول مـورد بررسی قرار گرفـت. همچنیـن سـم‌زدایی از لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* همـراه بـا ارزیابـی فعالیـت بـیولوژیک LPS *بروسـلا آبورتـوس*، D-LPS و لیپوپلی ساکارید *E.coli* و مقایسه آنها با هم انجام شد. مقـدار لیپوپلـی ساکارید استخراجی در روش بوتانلی، بدلیل ملایم بـودن آن و آسـیب ناجـیز بـه سـلولها، همچنیـن مقـدار آلودگی پروتئینـی و اسـیدهای نوکلئـیک آن پائیـن‌تـر از روش فنلی بود (نمـودار ۱و۲). طبق تحقیقات انجام گرفته توسط موریسون ولیف مشخص شد که روش استخراج فنلی موجب تخریب شدید اجزای سـلولها و حتـی LPS مـی‌شـود. در حالـیکه روش اسـتخراج

www.SID.ir

Archive of SID

بوتانلی به میزان کمتری موجب تخریب اجزای سلولها و LPS می‌شود (۸). الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس و *E.coli*نشان داد که لیپوپلی ساکارید *E.coli* حالت نردبانی دارد ولی لیپوپلی ساکارید *بروسلا* از یک باند سبک و چند باند سنگین تشکیل شده که مطابق الگوی الکتروفورزی این لیپوپلی ساکاریدها در تحقیقات Golding و همکارانش می‌باشد (۸و ۲۴) الگوی نردبانی بخاطر اینست که واحدهای زنجیره O بجای یک قند از ۴ قند تشکیل شده است. باند سبک نشانگر قسمت مرکزی و لیپید A لیپوپلی ساکاریدی بروسلا آبورتوس می‌باشد. باندهای سنگین نشان دهنده لیپوپلی ساکارید دست نخورده با تفاوت در تعداد واحدهای قندی زنجیره O می‌باشد.

همچنین الگوی جذب اسپکتروفتومتری لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* نشان داد که بالاترین جذب در طول موج ۱۹۰ نانومتر است در حالیکه جذب لیپوپلی ساکارید باکتری‌های دیگر درطول موج۲۱۰ نانومتر است که این مطابق تحقیقات مصطفایی و همکارانش می‌باشد. این ناشی از تفاوت ترکیب شیمیایی لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* با سایر باکتریها است (۲۴).

در تحقیقات Golding و همکاران مشخص شد که سمیت لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* در آزمایشات کشندگی در موش و تب‌زایی درخرگوش از لیپوپلی ساکارید *E.coli* بسیار کمتر است، اما تعداد واحد اندوتوکسین یک میلی‌گرم لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* از یک میلی‌گرم لیپوپلی ساکارید *E.coli* بیشتر می‌باشد. در آزمایش تب‌زایی در خرگوش مشاهده شد که لیپوپلی ساکارید *E.coli* نسبت به لیپو پلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* بسیار قوی‌تر می باشد و آزمایش تب‌زای D-LPS با مقدار مساوی از لیپوپلی ساکارید بروسلا آبرتوس منفی بود. این نشان دهنده غیر سمی شدن لیپید A با داسیله شدن (deacylation) می‌باشد. در آزمایش LAL نیمه کمی تعداد واحد اندوتوکسین یک میلی‌گرم لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* از یک میلی‌گرم لیپوپلی ساکارید *E.coli* کمتر و از یک میلی‌گرم D-LPS بیشتر بود. این نتایج احتمالاً ناشی از تفاوت ماهیت لیپید A لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* با *E.coli* می‌باشد. این نشان دهنده این است که لیپوپلی ساکارید *بروسلاآبورتوس* در ایجاد شوک سپتیک بسیار ناتوان‌تر از لیپوپلی ساکارید *E.coli* است و شکل D-LPS تقریباً فاقد قدرت تب زایی و سمی می باشد.بنابراین می توان جهت تحریک سیستم ایمنی و یا بعنوان حامل در واکسنها از LPS وD-LPS *بروسلا آبورتوس* استفاده کرد.

نتیجه‌گیری:

میزان استخراج لیپوپلی ساکارید *بروسلا آبورتوس* در روش فنلی چند برابر بیشتر از روش بوتانلی است ولی میزان آلودگی پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در روش فنلی بالاتر از روش بوتانلی است. D-LPS قدرت سمی آن بشدت کاهش یافته، همچنین توانایی لیپوپلی ساکارید *بروسلا* نسبت به لیپوپلی ساکارید *E.coli* در آزمایشهای LAL و تب‌زایی در خرگوش بسیار کمتر می‌باشد و می‌توان از آن بعنوان ایمنوژن بطور مستقیم استفاده کرد.

References:

1- Forestier C, Deleuil F. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. J Immunol 2000; 165(9) : 5202-10.

2- Tiwari PR, Gupta W, Rishi P. Immunobiology of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-drived immunoconjugates vaccinate mice against *Salmonella typhimurium*. Microbiol Immunol 1998; 42(1) : 1-5.

3- Morrison CD, Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from *E.coli* 0111: B4 prepared by two extraction procedures. J Biol Chem 1975; 250(8) : 2911-9.

4- Bhattacharjee KA, Van de Verg I, Zadjoo JM, et al. Protection of mice against Brucellosis by intranasal immunization with *Brucella melitensis* lipopolysaccharide as a noncovalent complex with *Neisseria meningitides* group B outer membrane protein. Infect Immun 2002; 70(7) : 3324-9.

5- Freer E, Pizarro J, Weintraub A, et al. The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. Infect Immun 1999;67(11):6181-6.

6- Wu MA, Amdams GL, Pugh R. Immunochemical and partial chemical characterization of fractions of membrane-bound smooth lipopolysaccharide-protein complex from *Brucella abortus*. Mol Cell Biochem.1987; 93: 93-102.

7- Cloeckaert A, Grayon M, Verger JM, et al. Monoclonal antibodies to *brucella* rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *B.abortus*. Res Microbiol 1993; 144: 475-84.

8- Golding B, Hoffman T, Frasch C, et al. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *E.coli*, suggesting the possible use of *B.abortus* as a carrier in vaccines. Infect Immun 1992; 60(4) : 1385-9.

9- Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the *in vitro* pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9(3) : 588-97.

www.SID.ir

Archive of SID

10- Ugalde EJ, Czibener C, Feldman FM. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: Role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. Infect Immun 2000; 68(10) : 5716-23.

11- Cloeckaert A, Grayon M, Verger JM, et al. Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. Res Microbiol 2000; 151(3): 209-16.

12- Meikle JP, Perry BM, Cherwonogrodzky WJ, et al. Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. Infect Immun 1989; 57(9) : 2820-8.

13- Lopez-Urrutia L, Alonso A, Nieto LM, et al. Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. Infect Immun 2000; 68(3): 1740-5.

14- Lopez-urrutia L, Alonso A, Nieto LM, et al. *Brucella* lipopolysaccharides induce cyclooxygenase-2 expression in monocytic cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289(2) : 372-8.

15- Stevens GM, Olsen CS, Pugh WG. Comparison of spleen cell prolifration in response to *Brucella abortus* 2308 lipopolysaccharide or proteins in mice vaccinated with strain 19 or RB51. Infect Immun 1995; 63(8) : 3199-205.

16- Betts M, Beining P, Brunswick M, et al. Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-indepent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. Infect Immun 1993 ; 61(5) : 1722-9.

17- Jacques J, Bernaardin OV, Dubray G. Induction of antibody and protective responses in mice by *Brucella* O-polysaccharide-BSA conjugate. Vaacine. 1991; 9: 896-900.

18- Jacquues I, Cloeckaert A, Limet JN. Protection conferred on mice by combination of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smoth lipopolysaccharide of *Brucella*. J Med Microbiol 1992; 37(2) : 100-3.

19- Van De Verg LL, Hartman BA, Bhattacharjee KA, et al. Outer membrane protein of *Neisseria meningitides* as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* in mouse and guinea pig intranasal immunization models. Infect Immun 1996; 64(12): 5263-8.

20- Bowden AR, Cloeckaert A, Zygmunt SM. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* Species studied by enzyme- linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infect Immun 1995; 63(10): 3945-52.

21- Tabatabai BL, Pugh WG, Stevens GM, et al. Monophosphoryl lipid A-induced immune enhancement of *Brucella abortus* salt-extractable protein and lipopolysaccharide vaccine in balb/c mice. Am J Vet Res 1992; 53(10): 1900-7.

22- Rojas N, Zamora O, Cascente J. Comparison of the antibody response in adult cattle against different epitopes of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. J Vet Medcine 2001; 48(8) : 623-7.

23- Apicella AM, Griffiss M, Schneider H. Isolation and characterization of lipopolysaccharides, lipooligosaccharides, and lipid A. Methods Enzymol. 1994; 235: 242-52.

۲۴- مصطفایی، ع. خالص سازی و مقایسه آنتی‌ژنهای عمده غشاء خارجی بروسلا آبورتوس (سویه S۱۹) وبروسلا ملی تنسیس (سویه M۱۶) وبررسی واکنش آنها با سرم بیماران با وسترن بلات والیزا .پایان نامه دکتری دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۸، ص ۴۶-۷۰.

25- Tsai M C, Frasch EC. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide agels. Anal Biochem 1982; 119: 115-9.

www.SID.ir