

بررسی آنتی‌ژنیسته پروتئین نو ترکیب L7/L12 بروسلا آبور توس در بیماران مبتلا به تب مالت

حمید ابطیحی^{۱*} (Ph.D)، علی هاتف سلمانیان^۲ (Ph.D)

۱ - دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

۲ - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پاسخ ایمنی نسبت به پروتئین نو ترکیب L7/L12، علاوه بر نقش ایمنی‌زایی آن در پیش‌گیری تب مالت، اهمیت آن در تشخیص این عفونت را نیز نشان می‌دهد. در این تحقیق آنتی‌ژنیسته پروتئین نو ترکیب L7/L12 در بیماران مبتلا به تب مالت بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: پس از تکثیر ژن L7/L12، ژن در ناقل پلاسمیدی pET28a کلون گردید. سپس تولید پروتئین نو ترکیب L7/L12 در باکتری اشریشیاکلی انجام گردید. جهت بررسی آنتی‌ژنیسته پروتئین L7/L12 در بیماران مبتلا به تب مالت از آزمون وسترن بلات با پنج سرم بیمار و یک سرم مربوط به فرد سالم استفاده گردید.

یافته‌ها: ترادف نوکلئوتیدی ژن تکثیر شده توسط روش PCR با ژن L7/L12 یکسان بود. تولید پروتئین نو ترکیب L7/L12 با القا پلاسمید pET28a-L7/L12 توسط IPTG انجام گردید. تخلیص پروتئین با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از کیت Ni-NTA انجام شد. سرم مبتلایان به تب مالت در روش وسترن بلات با پروتئین تولید شده واکنش داد.

نتیجه‌گیری: تولید پروتئین نو ترکیب L7/L12 در میزبان اشریشیاکلی امکان‌پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی‌ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند. شناسایی پروتئین نو ترکیب L7/L12 آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به تب مالت نشان‌گر تشابه اپی‌توپ‌های فرم نو ترکیب با شکل طبیعی آن است. بنابراین، می‌توان از آن در ایمنی‌زایی و تشخیص مبتلایان تب مالت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بروسلا آبور توس، پروتئین نو ترکیب L7/L12، تب مالت، وسترن بلات، اشریشیاکولی

۱۰۰۰۰۰ جمعیت است [۱].

پیش‌گیری از بروسلوزیز در انسان به ریشه‌کنی یا کنترل در حیوانات وابسته است. رعایت نکات بهداشتی باعث محدود شدن موارد عفونت می‌گردد. اولین واکسن موثر بروسلا سویه زنده ضعیف شده بروسلا آبور توس S19 بود. گرچه این واکسن باعث حفاظت دام در برابر بروسلا آبور توس می‌گردد ولی عوارض ناشی از آن باعث شده است تا استفاده آن در دام‌ها با احتیاط انجام گردد و در عین حال تجویز آن در انسان ممنوع

مقدمه

گسترش جهانی بروسلوزیز، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی به‌شمار می‌آورد. گرچه آمار انتشار یافته از شیوع این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است، بروسلوزیز گاوی ناشی از بروسلا آبور توس هنوز بیش‌ترین مورد ابتلا را باعث می‌شود. شیوع دقیق بروسلوزیز انسانی مشخص نیست اما آمار انتشار یافته بین ا.ر. تا ۲۰۰ مورد در ایران ۱۳۲/۴ در

باشد [۲].

پاسخ ایمنی در انسان، این آنتی ژن می تواند به عنوان شاخص تشخیصی نیز مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

بررسی آنتی ژنسیسته پروتئین نو ترکیب L1/L12 در بیماران مبتلا به بروسلاز یک مطالعه تجربی است.

باکتری های مورد استفاده در این تحقیق شامل: بروسلا آبورتوس سویه S19 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، اشریشیاکلی سویه DH5 α و اشریشیاکلی سویه BL21 (تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می باشند. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pSK⁺ و جهت تولید پروتئین L1/L12 از پلاسمید pET28a تهیه شده از پژوهش گاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی استفاده گردید. سرم شش بیماران مبتلا به بروسلاز از گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

تخلیص کروموزوم بروسلا آبورتوس بر اساس روش CTAB/NaCl انجام گرفته است. در این روش ابتدا باکتری در محیط تریپتی کیس سوی برات در دمای ۳۷°C کشت داده شد. رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری را در بافر TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8) حل نموده ابتدا با استفاده از آنزیم لیزوزیم و سپس با اثر SDS و آنزیم پروتئیناز K لیز گردید. کروموزوم باکتری با استفاده از محلول CTAB/NaCl (10% CTAB و 0.7 M NaCl) استخراج گردید. پروتئین ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل به نسبت ۲۵/۲۴/۱ برداشت گردید DNA. به دست آمده با استفاده از ایزوپروپانول الکل رسوب داده شد و سپس توسط اتانول ۷۰٪ شستشو گردید. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز آن در ژل آگارز ۰/۸٪ در بافر TBE بررسی گردید. مقدار DNA تخلیص شده نیز با اندازه گیری جذب نور در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد.

با استفاده از ترادف ژن L7/L12 طراحی پرایمرهای جلو (Forward) و عقب (Reverse) انجام شد:

بنابراین تحقیق برای ساخت واکسن های سالم تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به نظر می رسد. دستیابی به این هدف یعنی واکسن های جدید بروسلاز نیازمند بررسی شاخص های اصلی آنتی ژنیک بروسلا است [۱].

تحقیقات در زمینه واکسن هایی که پایه اصلی آنها پروتئین ها و عوامل ریبوزومی هستند که از ۳۰ سال قبل شروع شده است. بحث در مورد استفاده از این واکسن ها همواره نظر بسیاری از محققین را به خود معطوف نموده است. نتایج مطالعات متعدد نشان دهنده موثر بودن این عوامل در ایمنی زایی هستند. اهمیت ایمنی زایی این عوامل به خصوص در تحریک پاسخ های ایمنی سلولی و محدودسازی باکتری های داخل سلولی به اثبات رسیده است [۳]. نظیر این تحقیقات برای باکتری های گونه بروسلا نیز انجام شده است در بین پروتئین های داخل سیتوپلاسمی و ریبوزومی بروسلا آبورتوس، پروتئین L1/L12 توانایی تحریک پاسخ های ایمنی سلولی را نسبت به سایر پروتئین ها از خود نشان داده اند [۴]. با وجود این که ایمنی زایی این پروتئین در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است ولی تاکنون هیچ مطالعه ای در زمینه ایمنی زایی آنتی ژن فوق در انسان انجام نگرفته است. علاوه بر اهمیت پیش گیری از تب مالت تشخیص این عفونت از اهمیت بالایی برخوردار است. با وجود این که حساسیت و ویژگی تست های سرولوژیک تشخیص تب مالت به اثبات رسیده است، ولی واکنش متقاطع بین عامل بروسلاز و عوامل وبا، یرسینیا، فرانسیسلا و ... نیز گزارش شده است. بنابراین برای دستیابی به دیگر آنتی ژن های اختصاصی بروسلا باید دیگر شاخص های این باکتری از جمله L7/L12 مورد بررسی و تحقیق قرار گیرند [۵].

لذا در این تحقیق سعی شده است تا با بررسی آنتی ژنسیسته پروتئین نو ترکیب L1/L12 در بیماران مبتلا به بروسلاز، اولین قدم در تعیین ایمنی زایی این آنتی ژن در انسان برداشته شود. علاوه بر اهمیت ایمنی زایی L7/L12 با اثبات تحریک

را به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی سویه DH5a و سویه BL21-pLYsS وارد می‌نماییم.

برای تأیید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به‌دست آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی L1/L12 - pSK⁺ به شرکت MWG در آلمان ارسال گردید. ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR با استفاده از روش سنگر (Sanger) تعیین می‌گردد.

برای تولید پروتیین L7/L12 باکتری‌های اشریشیاکلی تراریخت شده با پلاسمید pET28a - L7/L12 را در محیط نوترین برات کشت داده و در حرارت ۳۷°C بر روی شیکر با حداقل ۱۷۰ دور قرار گرفت. پس از این‌که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید (OD 0.6) از محلول یک مولار IPTG به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی آن به یک میلی‌مولار برسد. چهار ساعت پس از افزودن IPTG رسوب باکتری‌ها با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ RPM به مدت نیم ساعت به‌دست آورده شد. برای بررسی نتیجه القا از الکتروفورز رسوب باکتری بر روی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE استفاده گردید. آزمون وسترن بلات به صورت زیر انجام شد.

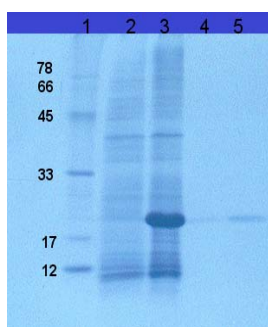
برای انجام تست ایمونوبلاتینگ (وسترن بلات) پس از الکتروفورز رسوب باکتری‌های القا یافته بر روی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به‌دست آمده بر روی ژل آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری ۲۵ میلی‌مولار تریس، ۱۹۲ میلی‌مولار گلیسین و ۲۰٪ متانول به مدت یک ساعت و در شدت جریان ۹۰ ولت انجام گرفت. مرحله مسدودسازی کاغذ نیترو سلولز با قرار دادن کاغذ در محلول ۲/۵٪ آلبومین سرم گاوی به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدودسازی، کاغذ نیترو سلولز به مدت یک ساعت در سرم بیمار مبتلا به تب مالت (۱/۱۰۰) و یک نمونه سرم فرد سالم (کنترل منفی) قرار داده شد. پس از انکوباسیون یک ساعته با نمونه‌های سرم، نوارهای کاغذ نیترو سلولز سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار، ۰/۰۲ Tris pH 8.5، ۰/۰۲ مولار، ۰/۰۵ tween20) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی‌موس کونژوگه با پراکسیداز (۱/۲۵۰۰) انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها

Forward Primer: 5': GGA AAT GGATCC ATG GCT GAT CTC GAC AA
Reverse Primer: 5' CCA CTCGAG CTT GAG TTC AAC CTT GGC CA

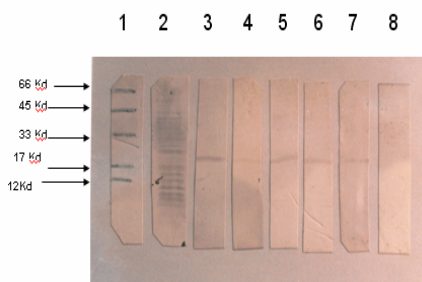
پرایمر جلو دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم BamHI و پرایمر عقب دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI می‌باشد.

تکثیر ژن L1/L12 با استفاده از PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شده است. غلظت عوامل PCR به‌قرار ۵۰۰ نانوگرم از DNA الگو، یک میلی‌مولار از هر پرایمر، ۲/۵ میلی‌مولار از یون منیزیم، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات، ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر 1X PCR است. برنامه استفاده شده برای PCR به‌صورت: حرارت اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه (یک سیکل)، مرحله دوم PCR متشکل از سی سیکل که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتوراسیون ۹۴°C (به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۳°C (به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف ۷۲°C (به مدت یک دقیقه) است. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه است. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر تریس-اسید بوریک-EDTA انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت. تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص تهیه شده از شرکت رش (Roche) بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت.

برای کلون‌سازی ژن L1/L12 در دو پلاسمید pSK و pET28a به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR را با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده و سپس در ناقلین ذکر شده وارد شد. لازم به ذکر است که پلاسمیدهای فوق نیز با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده شده است. عمل اتصال ژن L1/L12 در این پلاسمیدها با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase در حرارت ۱۶°C به مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای L1/L12 - pSK⁺ و pET28a - L1/L12



شکل ۲. ردیف ۱: پروتئین مارکر، ردیف ۲: محصول پروتئین قبل از القاء
۳: محصول پروتئین بعد از القا ۴ و ۵: پروتئین تخلیص شده



شکل ۳. ردیف ۱: پروتئین مارکر ۲: وسترن بلات لیز شده E.coli با سرم
بروسلوزیز ۳ الی ۷: وسترن بلات پروتئین L7/L12 خالص شده با سرم
بروسلوزیز ۸: وسترن بلات پروتئین L7/L12 خالص شده با سرم طبیعی

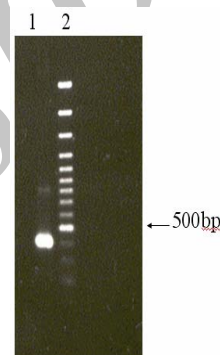
بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه با استفاده از آزمون وسترن بلات نشان داده شده است که پروتئین نو ترکیب L7/L12 در عین حالی که هیچ واکنشی با سرم افراد سالم ندارد، توسط سرم بیماران مبتلا به تب مالت شناسایی می شود. وجود آنتی بادی های ضد پروتئین نو ترکیب L7/L12 در سرم افراد مبتلا به تب مالت نشان دهنده دو موضوع است. ابتدا این که شکل نو ترکیب این پروتئین دارای اپی توپ های مشابه با فرم طبیعی آن است. دوم این که پروتئین L7/L12 علاوه بر این که دارای نقش موثری در تحریک پاسخ های ایمنی سلولی دارد [۶]، قدرت تحریک پاسخ های ایمنی هومورال را نیز دارد. با این که نقش آنتی بادی های ضد این پروتئین در ایمنی زایی بر علیه بروسلوز کاملاً مشخص نیست ولی وجود آنتی بادی های ضد L7/L12 دارا بودن اپی توپ های تحریک کننده لنفوسیت های B علاوه بر اپی توپ های T را در این ملکول اثبات می کند.

با بافر TBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولوز، کاغذ مزبور در محلول دی آمینوبنزیدین (DAB) قرار گرفت.

نتایج

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری بروسلا آبورتوس برابر $50.0 \mu\text{g/ml}$ برآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن L7/L12 استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی برابر ۳۷۵ جفت باز بود (شکل ۱).



شکل ۱. ردیف ۱: محصول PCR ردیف ۲: DNA مارکر

نتیجه ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسמיד pSK کلون گردیده بود، با ترادف ژن L7/L12 بروسلا آبورتوس یکسان بود.

پروتئین L7/L12 پس از ۴ ساعت از القا با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود ۱۹ کیلو دالتون است. نتیجه القای پروتئین L7/L12 در شکل ۲ آمده است.

نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل شماره ۳ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده، در تمام نمونه های سرمی بیماران مبتلا به بروسلوز باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولوز مشاهده می شود. در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه های سرم فرد سالم دیده نشد (شکل ۳).

اختصاصی نبوده و با بسیاری از باکتری‌ها از جمله اشریشیاکلی، سالمونلا، فرانسیسلا، ویبریو کلرا، سودوموناس آئروزیوزا، هموفیلوس آنفلوآنزا، سراشیا مارسسنس حتی باکتری‌های گرم مثبت نظیر استریتوکوک‌های گروه A و برخی انگل‌ها از جمله مالاریا واکنش مثبت کاذب می‌دهد [۱۰، ۹]. در نتایج مطالعات اخیر حتی این واکنش متقاطع را با افراد مبتلابه تورکلوزیز نیز گزارش شده است [۱۲، ۱۱]. ویژگی تست‌های سرولوزیک به‌خصوص در برنامه‌های ریشه‌کنی تب مالت از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا با توجه به این مطالعات برای تشخیص تب مالت باید در جستجوی آنتی‌ژن‌های بروسلا با ویژگی بالا بود. با توجه به نتیجه مطالعه حاضر دال بر پاسخ آنتی‌بادی مبتلایان به تب مالت با پروتئین نو ترکیب L7/L12 می‌توان از این آنتی‌ژن به‌عنوان شاخص تشخیصی استفاده نمود. که البته نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

منابع

- [1] Refai M. Incidence and control of brucellosis in the near east region. *Vet Microb* 2002; 90: 81-110.
- [2] Mandell, Douglas, and Bennet's. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone pub. 7th ed. 2010.
- [3] Mallick AI, Singha H, Khan S, Anwar T, Ansari MA, Khalid R, et al. Escheriosome-mediated delivery of recombinant ribosomal L7/L12 protein confers protection against murine brucellosis. *Vaccine* 2007; 25: 7873-7884.
- [4] Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet Microbiol* 2005; 109: 11-17.
- [5] Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, Yilmaz M, Kurt C, et al. The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 241-243.
- [6] Schuring GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microb* 2002; 90: 479-496.
- [7] Gupta VK, Rout PK, Vihan VS. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Res Vet Sci* 2007; 82: 305-313.
- [8] Pakzad I, Rezaee A, Rasaee MJ, Tabaraee B, Delpisheh A. Immunogenicity of HSA-L7/L12 (*Brucella abortus* ribosomal protein) in an animal model. *Iran J Immunol* 2009; 6: 12-21.

از مهم‌ترین روش‌های کنترل بروسلوز؛ واکسیناسیون بر علیه این بیماری است. برای دستیابی به یک واکسن بدون عوارض واکسن‌های رایج تحقیق برای ساخت واکسن‌های سالم‌تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به‌نظر می‌رسد [۷].

مطالعات و تحقیقات متعددی در مورد آنتی‌ژن‌سپت و ایمنی‌زایی این پروتئین در حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است. در واقع L7/L12 از جمله عوامل اصلی ایمنی در بروسلوز محسوب می‌گردد. این پروتئین قادر به تحریک واکنش‌های حساسیت تاخیری و هم‌چنین افزایش تولید انترفرون گاما است. علاوه بر آن ایمنی‌زایی حیوان با این پروتئین باعث کنترل و کاهش شدید تعداد باکتری‌های بیماری‌زای بروسلا آبورتوس در حیوان می‌شود [۸]. با این‌که تحقیقات زیادی در مورد ایمنی‌زایی این پروتئین در حیوانات انجام شده است لیکن تاکنون هیچ گزارشی دال بر آنتی‌ژن‌سپت و ایمنی‌زایی آن در انسان دیده نمی‌شود. بررسی آنتی‌ژن‌سپت و ایمنی‌زایی در انسان نشانگر تحریک پاسخ ایمنی در برابر این پروتئین است.

با در نظر گرفتن نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام گرفته که در زمینه ایمنی‌زایی پروتئین L7/L12 دیده می‌شود، می‌توان این نکته را استدلال نمود که آنتی‌ژن فوق می‌تواند یکی از عوامل مهم ایمنی‌زایی انسان در برابر تب مالت به حساب آید، که البته رسیدن به این نتیجه خود نیازمند انجام تحقیقات دیگری در زمینه ایمنی‌زایی آن در انسان است. در عین حال باید توجه داشت در مورد عوامل پاتوژنی نظیر بروسلا آبورتوس که شاخص‌های بیماری‌زایی آن‌ها هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است، تنها تلقیح یک آنتی‌ژن نمی‌تواند ایمنی‌زایی موثری را ایجاد نماید. بنابراین لازم است نظیر آن‌چه در مدل‌های مالاریا و جذام انجام شده است، از چند آنتی‌ژن باکتری برای ایمنی‌زایی استفاده شود.

اصولاً تشخیص بروسلوز بر اساس تست‌های آگلوتیناسیون (رایت تست) می‌باشد. این تست‌ها با این‌که دارای حساسیت بالایی هستند ولی از نظر ویژگی کاملاً

immunodiagnosis for porcine brucellosis. *Vet Res Commun* 2008; 32: 209-213.

[11] Varshochi M, Majidi J, Amini M, Ghabili K, Shoja MM. False positive seroreactivity to brucellosis in tuberculosis patients: a prevalence study. *Int J Gen Med* 2011; 4: 207-210.

[12] Turunc T, Demiroglu YZ, Uncu H, Colakoglu S, Arslan H. A comparative analysis of tuberculous, brucellar and pyogenic spontaneous spondylodiscitis patients. *J Infect* 2007; 55: 158-163.

[9] Mainar-Jaime RC, Munoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Moriyón I, Blasco JM. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in Brucella-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Can Vet J* 2005; 46: 913-916.

[10] Thirlwall RE, Commander NJ, Brew SD, Cutler SJ, McGiven JA, Stack JA. Improving the specificity of

Archive of SID

Antigenicity of recombinant L7/L12 in patients with brucellosis

Hamid Abtahi (Ph.D)^{*1}, Ali Hatef Salmanian (Ph.D)²

1 - Medical and Molecular Research Center of Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2 - National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

(Received: 09 Jan 2011 Accepted: 30 Jul 2011)

Introduction: Immune response to recombinant L7/L12, in addition to protective role, may show its importance in detection Brucellosis tests. The aim of this study was to examine antigenicity of recombinant L7/L12 from *Brucella abortus* by Brucellosis human sera.

Material and Methods: We amplified L7/L12 gene by polymerase chain reaction (PCR) method and sub-cloned to prokaryotic expression vector pET28a. *Escherichia coli* BL21-DE3-plySs was transformed with pET28a-L7/L12 and gene expression was induced by IPTG. Recombinant L7/L12 was further analyzed by Western Blot. Sera reactivity of five infected individual were further analyzed against the recombinant L7/L12 protein.

Results: The sequencing result was confirmed by Sanger method and it was the same as L7/L12 gene. *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS was transformed with pET28a-L7/L12 and gene expression was induced by IPTG. The expressed protein was purified by affinity chromatography by Ni-NTA resin. The data also indicated that L7/L12 protein from *Brucella abortus* recognized by patient sera.

Conclusion: Our data showed that recombinant L7/L12 protein can be produced by pET28a in *Escherichia coli*. This protein was recognized by sera in infected human as an antigen. Therefore, recombinant L7/L12 has same epitopes with natural form of this antigen. Recombinant L7/L12 also seems to be a promising antigen for protection and serologic diagnosis of Human brucellosis.

Key words: *Brucella abortus*, L7/L12 recombinant protein, Brucellosis, Blotting, Western, *Escherichia coli*

* Corresponding author: Fax: +98 861 417 3526; Tel: +98 861 417 3502
h_abtahi2@yahoo.co.uk