استخراج و ارزیابی مولکولی پروتئین های عمده غشای خارجی *بروسلا آبورتوس* S99

سحر کرمی [۱]، سید داور سیادت [۲*]، بهمن تبرایی [۳]، داریوش نوروزیان [٤]، ناصر هرزندی [٥]، محمد رضا آقا صادقی [۲]، محمد رضا رضوی [٦]، سید مهدی سادات [۷]، علی شریفات سلمانی [۸]، مهدی نجاتی [۹]، علیرضا کرد افشاری [۱۰]، ارفع مشیری [۱۱]

خلاصه

سابقه و هدف: بروسلا باکتری گرم منفی، کوکوباسیل، هوازی، درون سلولی اختیاری، غیرمتحرک و فاقد اسپور می‌باشد. که طیف گسترده‌ای از حیوانات و همچنین انسان را آلوده می‌نماید. امروزه پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs) بروسلا به عنوان ساختارهای ایمونوژنیک جهت طراحی و تولید واکسن زیر واحدی برای پیشگیری از بروسلوزیس انسانی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها: پروتئین‌های عمده غشای خارجی از سویه صاف بروسلا آبورتوس S99 از سلول‌های سونیکه شده به واسطه اولتراسانتریفیگاسیون و پیش هضم آنزیمی با لیزوزیم، استخراج و به وسیله کروماتوگرافی تبادل یونی و ژل فیلتراسیون به طور خالص تخلیص شدند. مقدار کل پروتئین تخلیص شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. با استفاده از SDS–PAGE، پروفایلی از پروتئین‌های غشاء خارجی بروسلا آبورتوس S99 به دست آمد که براساس وزن مولکولی از یکدیگر تفکیک شدند. در الگوی الکتروفورتیکی به دست آمده، پورین‌ها تخلیص شدند. در نهایت آزمون پیروژنی و سمیت غیر نرمال طبق پروتکل سازمان بهداشت جهانی روی نمونه‌های تخلیص شده انجام شد.

نتایج: غلظت پروتئین های عمده غشای خارجی استخراج شده در این مطالعه برابر ٦/۲۷ mg/ml بود که با توجه به الگوی الکتروفورتیک به دست آمده از SDS–PAGE، وزن مولکولی نمونه استخراج شده در محدوده‌ی ۳٦–۳۸ کیلودالتون می‌باشد. بر اساس وزن مولکولی محاسبه شده، این پروتئین‌ها در گروه پورین‌ها قرار می‌گیرند. نتیجه‌ی آزمون پیروژنی و سمیت غیر نرمال روی نمونه‌ها منفی بود.

نتیجه‌گیری: روش به کار رفته در این مطالعه به منظور تخلیص پروتئین‌های عمده غشای خارجی بروسلا آبورتوس S99 با غلظت بالا روشی مناسب و کارآمد بوده و با استفاده از این روش، پورین‌های باکتری به صورت اختصاصی قابل استخراج می‌باشند. نتیجه‌ی آزمون پیروژنی و سمیت غیر نرمال بی‌زیانی مصرف آنها را در مدل‌های حیوانی و مصارف انسانی تایید می‌نماید.

واژگان کلیدی: بروسلا آبورتوس، پروتئین‌های غشای خارجی باکتریایی، ارزیابی مولکولی

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲- استادیار بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران

۳- استادیار بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران

٤- دانشیار بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران

٥- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

٦- استادیار بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران

۷- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران

۸- کارشناس ارشد میکروبیولوژی بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران

۹- مربی بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران

۱۰- کارشناس بیولوژی سلولی- مولکولی بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران

۱۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

* **نویسنده مسوول:** سید داور سیادت

آدرس: تهران، خیابان پاستور، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران

پست الکترونیک: d.siadat@gmail.com

تلفن: ۲۱۳۷ ۱٤٤ ۰۹۱۲

دورنویس: ٦٦۹ ٦۹۲۹۱ ۰۲۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۵/۱۷

فصلنامه علمی – پژوهشی فیض، دوره سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، صفحات ۱۷۹-۱۷٤

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بروسلوزیس یکی از پنج بیماری شایع زئونوزیس (مشترک بین انسان و دام) است که به وسیله ارگانیسم متعلق به جنس بروسلا که باکتری گرم منفی، فاقد اسپور و داخل سلولی اختیاری می‌باشد، ایجاد می‌گردد [۳،۲،۱]. جنس بروسلا بر اساس تنوع آنتی ژنی و میزبان اولیه شامل ۷ گونه‌ی بروسلا ملی تنسیس (در گوسفند و بز)، بروسلا سوئیس (در خوک)، بروسلا آبورتوس (در گاو)، بروسلا اویس (در گوسفند)، بروسلا کانیس (در سگ)، بروسلا نئوتومه (در موش جنگلی) و بروسلا ماریس (در پستانداران دریایی) می‌باشد [٥،٤]. بروسلا آبورتوس سبب سقط ناگهانی جنین در گاوها می‌شود. بروسلاها با آلوده کردن محصولات لبنی و نیز آسیب رساندن به دام-ها، ضررهای اقتصادی جبران ناپذیری را موجب می‌شوند. با وجود اینکه بروسلوزیس یک معضل بزرگ بهداشتی برای انسان و حیوانات اهلی در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود، در حال حاضر واکسن مؤثر و مفیدی برای مصارف انسانی طراحی و تولید نشده است [٧،٦]. در این راستا، شاخص‌های آنتی‌ژنیک دیواره سلولی بروسلا مثل لیپوپلی‌ساکارید و پروتئین‌های غشای خارجی (OMPs; Outer Membrane Proteins) به عنوان کاندیداهای بالقوه برای طراحی واکسن‌های زیر واحدی مورد توجه قرار گرفته‌اند [١٠-٨]. این مطالعه روی OMPs بروسلا آبورتوس S99 متمرکز شده است. OMPs به عنوان آنتی ژن‌های حفاظتی محسوب شده و براساس وزن مولکولی به سه گروه عمده طبقه بندی می‌شوند: گروه ۱ با وزن مولکولی ۸۸ تا ۹٤ کیلو دالتون، گروه ۲ با وزن مولکولی ۳٦ تا ۳۸ کیلو دالتون - به عنوان پورین‌ها - و گروه ۳ با وزن مولکولی ۳٤-۳۱ و ۲۷-۲۵ کیلو دالتون [١٥-١١]. OMPs جزء ترکیبات ساختاری باکتری هستند و به عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی عمل کرده و پاسخ‌های ایمنی را القاء می‌کنند. به دلیل اینکه بروسلا فاقد پیلی، فلاژل و کپسول می‌باشد، بیشترین میزان پاسخ‌های سیستم ایمنی علیه ترکیبات ساختاری دیواره آن (از جمله OMPs) ایجاد می‌شود. با توجه به اینکه بروسلا باکتری داخل سلولی است، به نظر می‌رسد که پاسخ ایمنی سلولی علیه این گروه از ترکیبات پروتئینی دیواره سلولی در ایجاد پاسخ موثر و حفاظت بخش، نقش اصلی را بر عهده داشته باشد. از این رو استخراج OMPs با بازدهی بالا و قابل بکارگیری در مقیاس صنعتی، به منظور استفاده به عنوان یک جزء آنتی ژنیک در طراحی واکسن بروسلوز، ضروری می‌باشد [١٦].

مواد و روش ها

۱- سویه باکتریایی، شرایط کشت و فرمانتاسیون

بروسلا آبورتوس سویه S99 از کلکسیون سویه‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این سویه از بیووار ۱ که سویه‌ای صاف و مستقل از CO2 (CO2-Independent) به منظور رشد می‌باشد، ابتدا در محیط کشت بروسلا آگار شیب‌دار (Slant) در دمای ۳۷° C به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد و سپس به منظور تهیه بذر سلولی در یک فلاسک ۵ لیتری حاوی بروسلا براث (Brucella Broth) به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. فرآیند فرمانتاسیون برای تهیه توده سلولی بروسلا آبورتوس در محیط کشت بهینه سازی شده انجام گردید [۱۷].

۲- استخراج OMPs *بروسلا آبورتوس* S99

توده‌ی سلولی به ازای هر ۱ گرم وزن مرطوب در ml ۱۰۰ بافر تریس هیدروکلراید mM ۱۰ (pH ۷/۵) معلق و به ازای ml ۱۰۰ از تعلیق فوق، ۱ میلی گرم از RNAase و DNAase اضافه شد. نمونه‌ها روی یخ نگهداری و با دستگاه سونیکاتور (Bronson) با سیکل پیوسته (۷ پالس در ۱ دقیقه) تیمار شدند. نمونه‌ها دو بار در g ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ٤° C ، جهت حذف سلول‌های شکسته نشده، سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول رویی در rpm ٤۳٥۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه اولتراسانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل که حاوی غشاهای خام می‌باشد، در بافر تریس هیدروکلراید mM ٥۰ (pH ۷/۵) همراه با فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) mM ۲ حل شد و استخراج دترجنتی غشای سیتوپلاسمی به وسیله استفاده از سدیم N- لوریل سارکوزینات انجام گرفت [۱۷]. محلول نهایی که حاوی پروتئین‌های غشای خارجی است در مقابل تریس بافر در دمای ٤ ° C به مدت ۷۲ ساعت دیالیز گردید. به منظور جداسازی پپتیدوگلیکان از پروتئین‌های غشای خارجی، لیزوزیم (mg ۱ به ازای هر ٥۰mg پروتئین غشایی) اضافه شد و بعد از این مرحله دوباره نمونه در ۱۲۰۰۰۰rpm برای ۲۰ دقیقه در دمای ٤ ° C اولتراسانتریفیوژ گردید. مایع رویی حاوی پروتئین‌های غشای خارجی در دمای ٤ ° C نگهداری می‌شود [۲۲-۱۸].

۳- کروماتوگرافی تعویض یونی

نمونه‌ها بعد از لیوفیلیزاسیون، در تریس بافر mM ۱۰ (شامل ۰/۱ درصد زویترجنت و M ۰/۲۵ سدیم کلراید) حل شده و سپس وارد ستون DEAE-Sephacel شدند. مرحله Elution در دمای اتاق با میزان $2ml.cm^{-2}.h^{-1}$ بعد از شستشوی اولیه، یک شیب NaCl (۰/۲۵ تا ۰/۷۵) به مدت ۲٤ ساعت برقرار شد. نمونه‌ها تحت جریان مشابه ستون تبادل یونی، از یک ستون سفاکریل S-300 حاوی بافر تریس mM ۱۰ (شامل ۰/۱ درصد زویترجنت و ۰/۲۵ مولار سدیم کلراید)، عبور کرده و جداسازی شدند.

٤- تعیین غلظت پروتئین در نمونه استخراج شده

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت پروتئین با استفاده از اسپکتروفتوستر ND-1000 تعیین شد. در این روش مقدار ۱ میکرولیتر پروتئین ارزیابی می‌شود. در استفاده از این دستگاه، ۱ میکرولیتر از نمونه روی انتهای فیبر اپتیک (فیبر گیرنده) قرار گرفته، سپس یک فیبر اپتیک دیگر (فیبر منبع) در تماس با نمونه قرار می‌گیرد. یک لامپ زنون پالس دهنده به عنوان منبع نوری عمل کرده و یک اسپکتروفتومتر برای آنالیز نور عبور کرده از نمونه استفاده شد. غلظت پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه –کنترل شده به وسیله نرم افزار– خوانده و نمودار آن رسم می‌گردد.

۵- SDS-PAGE

سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورزیس روی ژل ۱۲ درصد انجام شد و از مارکر پروتئینی (Ferments) به منظور تعیین وزن مولکول نمونه OMPs استخراج شده استفاده گردید [۲۳،۲۰].

۶- آزمون تب زایی در خرگوش (Rabbit Pyrogen Test)

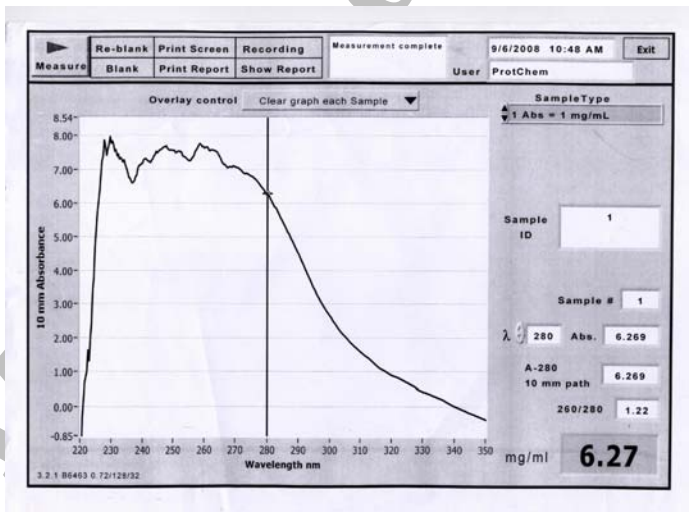
جهت بررسی تب‌زایی یا عدم تب زایی، آزمون پیروژنی برای نمونه استخراج شده طبق روش فارماکوپه انجام شد. ابتدا OMPs (۳ mg/ml) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان)، به صورت وریدی به گروه پنج تایی خرگوش تزریق شد. سپس دمای بدن خرگوش‌ها در هر ساعت، تا ساعت سوم پس از تزریق، توسط رکتومتر مورد سنجش قرار گرفت [۲۴].

۷- آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال (Abnormal Toxicity Test)

این آزمون برای تعیین بی‌زیانی مصرف OMPs تخلیص شده در خرگوش انجام گرفت. به یک گروه پنج تایی خرگوش، ۳ mg/ml OMPs به ازای هر کیلوگرم وزن، به صورت عضلانی تزریق شد. خرگوش‌ها به مدت هفت روز در شرایط نرمال پرورشی، نگهداری و به مدت هفت روز از نقطه نظر کاهش وزن، عوارض جانبی محل تزریق و مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند [۲۴].

نتایج

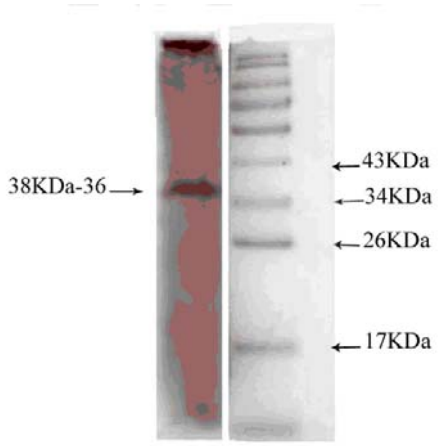
در تحقیق حاضر پس از تلقیح بذر سلولی به محیط کشت بهینه سازی شده، تا انتهای فاز لگاریتمی رشد، تمام پارامترهای تخمیری در شرایط کنترل شده و اپتیمم کشت غوطه ور به صورتی در فرمانتور تنظیم گردید تا سلول‌ها به حداکثر رشد خود برسند. غلظت پروتئین موجود در نمونه، با روش ND-1000 اسپکتروفتومتری و به واسطه آنالیز نمونه در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه، برابر ۶/۲۷ mg/ml بود (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- اندازه گیری غلظت پروتئین های عمده غشای خارجی بروسلا آبورتوس S99 در جذب نوری ۲۸۰ نانومتر با روش اسپکتوفتومتر ND-1000

آنالیز SDS – PAGE نمونه روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد، در مقایسه با مارکر پروتئینی، یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۳۸-۳۶ کیلودالتون را نشان داد که با توجه به وزن مولکولی موجود به عنوان پورین در بروسلا تقسیم بندی می‌شود (شکل شماره ۱). نتایج هر دو آزمون تب زایی و سمیت غیرنرمال به دنبال تزریق نمونه استخراج شده منفی بود به طوری‌که در آزمون تب زایی، افزایش دمای بدن هیچ‌کدام از خرگوش‌ها بیش‌تر از ۰/۶ °C نبود و همچنین مجموع افزایش دمای بدن پنج خرگوش نیز کمتر از ۱/۶ °C بود. در آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال نیز هیچ‌کدام از مدل های حیوانی دچار کاهش وزن نشدند، در محل تزریق عارضه ای مشاهده نشد و تمام آنها تا پایان روز هفتم (روز آخر در آزمون ایجاد سمیت غیر نرمال) زنده بودند.

www.SID.ir



شکل شماره ۱- الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های غشای خارجی بروسلا آبورتوس S99 (باند چپ) در مقایسه با پروتئین مارکر (باند راست).

بحث

در این مطالعه به منظور تخلیص OMPs *بروسلا آبورتوس* S99 از روش بهینه سازی شده که آمیزه‌ای از روش‌های Connolly و همکاران و نیز روش Verstreate و همکاران می‌باشد، استفاده شده است [۲۶،۲۵]. استخراج مقدار زیاد پروتئین‌های عمده غشای خارجی *بروسلا آبورتوس* S99 در این مطالعه تاییدی بر کارایی روش فوق جهت استخراج OMPs بروسلا آبوتوس می‌باشد. الگوی الکتروفورتیک نمونه تخلیص شده با الگوهای روش‌های دیگر تخلیص (Dubray و Bezard) متفاوت بوده و ثابت می‌کند که تفاوت در روش استخراج و تخلیص سبب تفاوت در پروفایل‌های پروتئینی SDS–PAGE خواهد شد [۲۷]. به دنبال استخراج OMPs در این تحقیق، فقط یک باند پروتئینی به دست آمد که با توجه به قرار گرفتن در طیف ۳۶-۳۸ کیلودالتون به دسته دوم از پروتئین‌های غشای خارجی *بروسلا* یعنی پورین‌ها تعلق دارد. پورین‌ها در *بروسلا آبورتوس* نسبت به *بروسلا ملی‌تنسیس* بیشتر بوده و نسبت به پروتئین‌های دیگر غشای خارجی توانایی بیشتری در تحریک سیستم ایمنی دارند. پورین‌های بروسلا توسط دو ژن OMP2a و OMP2b کد می شوند که بیش از ۸۵ درصد تشابه توالی دارند. پورین‌های بروسلا با پروتئین RopA در ریزوبیوم لگومینوزاروم (*Rhizobium leguminosarum*) و پروتئین OMP43 در بارتونلا هنسله (*Bartonella henselae*) از نظر توالی آمینواسیدی تشابهات زیادی دارند (به ترتیب ۴۰-۳۰ درصد و ۳۸ درصد). همان‌طور که ذکر شد روش استخراج به کار رفته در این مطالعه منجر به جداسازی مقدار زیادی از پورین‌های بروسلا آبورتوس S99 شده و به عنوان روشی اختصاصی برای استخراج و جداسازی این گروه از پروتئین‌ها پیشنهاد می‌گردد. همچنین منفی بودن آزمون تب‌زایی نشان دهنده عدم آلودگی نمونه با اجزایی مثل لیپوپلی ساکارید و پپتیدوگلیکان دیواره‌ای طی فرآیند استخراج OMPs می‌باشد. در نهایت منفی بودن آزمون سمیت غیر نرمال با تایید آزمون پیروژنی، استفاده از این نمونه جهت ایمنی زایی و کاربرد تحقیقاتی-تولیدی آن در مدل حیوانی را ممکن می سازد.

نتیجه گیری

همان طور که بیان شد، روش استخراج به کار رفته در این مطالعه منجر به جداسازی اختصاصی پورین‌های *بروسلا آبورتوس* S99 شده و به عنوان روشی بهینه شده برای استخراج و جداسازی این گروه از پروتئین‌ها پیشنهاد می‌گردد. همچنین بی زیانی مصرف پروتئین‌های تخلیص شده در روش فوق با منفی شدن آزمون تب‌زایی و سمیت غیر نرمال بیانگر عدم آلودگی نمونه با ناخالصی‌ها و عوامل تب زا طی مراحل متعدد فرآیند استخراج OMPs می‌باشد و استفاده از این نمونه را جهت مطالعات فازهای تحقیقاتی-بالینی در مدل حیوانی امکان پذیر می‌نماید. بدین ترتیب با صنعتی نمودن این روش پژوهشی می‌توان چشم اندازی مطلوب در جهت تولید انبوه این گروه از پروتئین‌های عمده‌ی غشای خارجی در امر تحقیقات واکسن بروسلا داشت و از این گروه از پروتئین‌ها به تنهایی در شکل مونووالانت و یا کونژوگه با سایر اجزای باکتری، در پیشگیری از بروسلوزیس انسانی و یا دامی استفاده نمود.

References:

[1] Corbel MJ. Brucellosis: an overview. ***Emerg Infect Dis*** 1997; 3(2): 213-21.
[2] Young EJ. An overview of human brucellosis. ***Clin Infect Dis*** 1995; 21(2): 283-9.
[3] Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS. Intracellular trafficking of Brucella abortus in J774 macrophages. ***Infect Immun*** 2000; 68(7): 4255-63.
[4] Holt John G, editor. Bergey's Manual of systematic bacteriology. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984; p. 377-88.

Archive of SID
www.SID.ir

[5] Parker MT, Collier LH, editors. Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology, and immunity.8th ed. Philadelphia: Decker; Saint Louis, Mo.: Sales and distribution, U.S. and Puerto Rico, Mosby-Year Book; 1990; p. 339-53.
[6] Trujillo IZ, Zavala AN, Caceres JG, Miranda CQ. Brucellosis. ***Infect Dis Clin North Am*** 1994; 8(1): 225-41.
[7] Diaz R, Jones LM, leong D, Wilson JB. Surface antigens of smooth brucellae. ***J Bacteriol*** 1968; 96(4): 893-901.
[8] Cloeckaert A, Zygmunt MS, de wergifosse P, Dubray G, Limet JN. Demonstration of peptidoglycan-associated Brucella outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. ***J Gen Microbiol*** 1992; 138(7): 1543-50.
[9] Cloeckaert A, verger JM, Grayon M, Vizcaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of Brucella. ***FEMS Microbiol Lett*** 1996; 145(1): 1-8.
[10] Santos JM, Verstreate DR, Perera VY, Winter AJ. Outer membrane proteins from rough strains of four Brucella species. ***Infect Immun*** 1984; 46(1): 188-94.
[11] Gamazo C, vitas AI, Moriyon I, Lopez–Goni I, Diaz R. Brucella group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein. ***FEMS Microbiol Lett*** 1993; 112(2): 141-6.
[12] Salhi I, Boigegerain RA, Machold J, weise C, cloeckaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of Brucella spp. ***Infect Immun*** 2003; 71(8): 4326-32.
[13] Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstreate DR, Winter AJ. Porins of Brucella species. ***Infect Immun*** 1984; 44(1): 16-21.
[14] Jap BK, Walian P.J. Structure and functional mechanism of porins. ***Physiol Rev*** 1996; 76(4): 1073-88.
[15] Dubray G. Protective antigens in brucellosis. ***Ann Inst Pasteur Microbiol*** 1987; 138(1): 84-7.
[16] Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. Brucella outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. ***Clin Diagn Lab Immunol*** 1999; 6(4): 627-9.
[17**] S**harifat Salmani A, Siadat SD, Ahmadi H, Nejati M, Norouzian D, Tabaraie B, Abbasi M, Karbasian M,. Mohabati Mobarez., shapouri R .Optimization of *Brucella abortus* S99 Lipopolysaccharide extraction by phenol and Butanol methods. ***Res J Bio sci*** 2008; 3(6): 578-80.
[18] 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.
[19] Kreuzer DL, Robertson DC. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of Brucella abortus. ***Infect Immun*** 1979; 23(3): 819-28.
[20] Moriyon I, Berman DT. Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the Brucella cell envelope. ***J Bacteriol*** 1982; 152(2): 822-8.
[21] Moriyon I, Berman DT. Isolation, purification, and partial characterization of Brucella abortus matrix protein. ***Infect Immun*** 1983; 39(1): 394-402.
[22] Osborn MJ, Wu HC. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. ***Annu Rev Microbiol*** 1980; 34: 369-422.
[23] Verstreate DR, winter AJ. Comparison of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 Brucella abortus strains. ***Infect Immun*** 1984; 46(1): 182-7.
[24] Sharifat Salmani A, Siadat SD, Fallahian M, Ahmadi H, Norouzian D, Yaghmai P, Aghasadeghi MR, Izadi Mobarakeh Jalal, Sadat SM, Zangeneh M, Kheirandish M. Serological evaluation of brucella abortus S99 lipopolysaccharide extracted by an optimized method. ***Am J Infec Dis*** 2009; 5(1): 11-6.
[25]Connolly JP, Comerci D, Alefntis TG, walz A, Quan M, Chafin R, et al. Proteomic analysis of Brucella abortus cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. ***Proteomics*** 2006; 6(13): 3767-80.
[26] Verstreate DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, winter AJ. Outer membrane proteins of Brucella abortus: isolation and characterization***. Infect Immun*** 1982; 35(3): 979-89.
[27] Dubray G, Bezard G. Isolation of three Brucella abortus cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. ***Ann Rech Vet*** 1980; 11(4): 367-73.

Archive of SID

www.SID.ir