کومش- جلد ۱۳، شماره ۲ (پیاپی ۴۲)، زمستان ۱۳۹۰

بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب L7/L12 بروسلا آبورتوس در بیماران مبتلا به تب مالت

حمید ابطحی [۱*](Ph.D)، علی هاتف‌سلمانیان [۲](Ph.D)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی*

۲ - *پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری ، تهران ، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: پاسخ ایمنی نسبت به پروتئین نوترکیب L7/L12 ، علاوه بر نقش ایمنی‌زایی آن در پیش‌گیری تب مالت، اهمیت آن در تشخیص این عفونت را نیز نشان می‌دهد. در این تحقیق آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب 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 نوترکیب L7/L12 در باکتری اشریشیاکلی انجام گردید. جهت بررسی آنتی‌ژنیسیته 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 نوترکیب L7/Ll2 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 نوترکیب L7/L12 در میزبان اشریشیاکلی امکان‌پذیر است. پروتئین تولید شده خاصیت آنتی‌ژنیک خود را به خوبی حفظ می‌کند. شناسایی پروتئین نوترکیب L7/L12 آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به تب مالت نشان‌گر تشابه اپی‌توپ‌های فرم نوترکیب با شکل طبیعی آن است. بنابراین، می‌توان از آن در ایمنی‌زایی و تشخیص مبتلایان تب مالت استفاده کرد.

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

مقدمه

گسترش جهانی بروسلوزیز، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی به‌شمار می‌آورد. گرچه آمار انتشاریافته از شیوع این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است، بروسلوزیز گاوی ناشی از بروسلا آبورتوس هنوز بیش‌ترین مورد ابتلا را باعث می‌شود. شیوع دقیق بروسلوزیز انسانی مشخص نیست اما آمار انتشاریافته بین ا.ر.تا ۲۰۰ مورد در ایران ۱۳۲/۴ در 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 آبورتوس S19 بود. گرچه این واکسن باعث حفاظت دام در برابر بروسلا آبورتوس 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

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۱-۴۱۷۳۵۰۲ نمابر: ۰۸۶۱-۴۱۷۳۵۲۶

Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۵/۸

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

باشد [۲].

بنابراین تحقیق برای ساخت واکسن‌های سالم‌تر و موثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به‌نظر می‌رسد. دست‌یابی به این هدف یعنی واکسن‌های جدید بروسلوز نیازمند بررسی شاخص‌های اصلی آنتی‌ژنیک بروسلا است [۱].

تحقیقات در زمینه واکسن‌هایی که پایه اصلی آن‌ها پروتئین‌ها و عوامل ریبوزومی هستند که از ۳۰ سال قبل شروع شده است. بحث در مورد استفاده از این واکسن‌ها همواره نظر بسیاری از محققین را به‌خود معطوف نموده است. نتایج مطالعات متعدد نشان‌دهنده موثر بودن این عوامل در ایمنی‌زایی هستند. اهمیت ایمنی‌زایی این عوامل به‌خصوص در تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی و محدودسازی باکتری‌های داخل سلولی به اثبات رسیده است [۳]. نظیر این تحقیقات برای باکتری‌های گونه بروسلانیز انجام شده است در بین پروتئین‌های داخل سیتوپلاسمی و ریبوزومی بروسلا آبورتوس، پروتئینL1/L12 توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی را نسبت به سایر پروتئین‌ها از خود نشان داده‌اند [۴]. با وجود این‌که ایمنی‌زایی این پروتئین در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه ایمنی‌زایی آنتی‌ژن فوق در انسان انجام نگرفته است.

علاوه بر اهمیت پیش‌گیری از تب مالت تشخیص این عفونت از اهمیت بالایی برخوردار است. با وجود این‌که حساسیت و ویژگی تست‌های سرولوژیک تشخیص تب مالت به اثبات رسیده است، ولی واکنش متقاطع بین عامل بروسلوزیز و عوامل وبا، یرسینیا، فرانسیسلا و ... نیز گزارش شده است. بنابراین برای دست‌یابی به دیگر آنتی‌ژن‌های اختصاصی بروسلا باید دیگر شاخص‌های این باکتری از جمله L7/L12مورد بررسی و تحقیق قرار گیرند [۵].

لذا در این تحقیق سعی شده است تا با بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب L1/L12 در بیماران مبتلا به بروسلوزیز، اولین قدم در تعیین ایمنی‌زایی این آنتی‌ژن در انسان برداشته شود. علاوه بر اهمیت ایمنی‌زایی L7/L12 با اثبات تحریک پاسخ ایمنی در انسان، این آنتی‌ژن می‌تواند به‌عنوان شاخص تشخیصی نیز مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب L1/L12 در بیماران مبتلا به بروسلوز یک مطالعه تجربی است.

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل: بروسلا آبورتوس سویه S19 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران)، اشریشیاکلی سویه DH5α و اشریشیاکلی سویه BL21 (تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می‌باشند. برای کلونینگ اولیه و تعیین ترادف ژن مورد مطالعه از پلاسمید pSK^+ و جهت تولید پروتئین L1/L12 از پلاسمید pET28a تهیه شده از پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی استفاده گردید. سرم شش بیماران مبتلا به بروسلوز 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 به‌دست 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 (CTAB 10% و NaCl 0.7 M) استخراج گردید. پروتئین‌ها و سایر اجزا سلولی با استفاده از مخلوط فنل/کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵/۲۴/۱ برداشت گردید DNA. به‌دست 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 اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمد.

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

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 منیزیوم، 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 رنگ‌آمیزی 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 به‌ترتیب 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 به‌مدت یک شب انجام گرفت. پلاسمیدهای pSK$^+$ - L1/L12 و pET28a - L1/L12 را به ترتیب در سلول‌های مستعد اشریشیاکلی سویه DH5α و سویه BL21-pLYsS وارد می‌نماییم.

برای تائید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به‌دست آمده از محصول PCR ساختار پلاسمیدی pSK$^+$ - L1/L12 به شرکت MWG در آلمان ارسال گردید. ترادف نوکلوتیدی 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 مو لار 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.

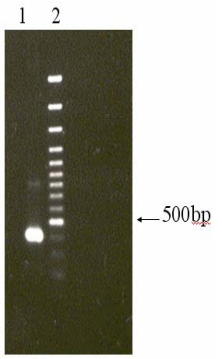
برای انجام تست ایمنوبلاتینگ (وسترن بلات) پس از الکتروفورز رسوب باکتری‌های القا یافته بر روی ژل ۱۰٪ SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به‌دست آمده بر روی ژل آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری ۲۵ میلی‌مولار تریس، ۱۹۲ میلی‌مولار گلایسین و ۲۰٪ متانول به‌مدت یک ساعت و در شدت جریان 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 نیتروسلولز سه مرتبه با بافر TBS-T (شامل NaCl نیم مولار، Tris pH 8.5 ۰/۰۲ مولار، tween20 ۰/۰۵٪) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی‌موس کونژوگه با پراکسیداز (۱/۲۵۰۰) انکوبه گردید. در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

با بافر TBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیتروسلولز، کاغذ مزبور در محلول دی‌آمینوبنزیدین (DAB) قرار گرفت.

نتایج

غلظت DNA کروموزومی به‌دست آمده از باکتری بروسلا آبورتوس برابر ۵۰۰µg/ml برآورد گردید. این DNA به‌عنوان 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).

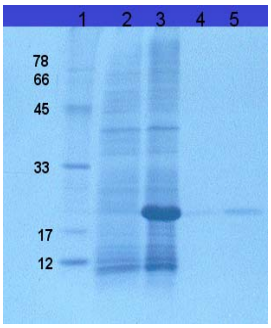


شکل ۱. ردیف ۱: محصول PCR ردیف ۲: DNA مارکر

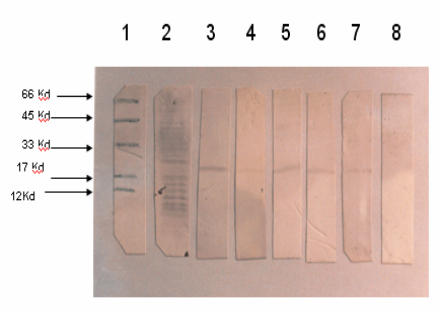
نتیجه ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pSK کلون گردیده بود، با ترادف ژن L7/L12 بروسلا آبورتوس یکسان بود.

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

نتایج مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در آزمون وسترن بلات در شکل شماره ۳ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، در تمام نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا به بروسلوزیز باندهای مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیتروسلولز مشاهده می‌شود. در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در نمونه‌های سرم فرد سالم دیده نشد (شکل ۳).



شکل ۲. ردیف ۱: پروتئین مارکر، ردیف ۲: محصول پروتئین قبل از القاء ۳: محصول پروتئین بعد از القا ۴و۵: 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 نتیجه‌گیری

در این مطالعه با استفاده از آزمون وسترن بلات نشان داده شده است که پروتئین نوترکیب L7/L12 در عین حالی‌که هیچ واکنشی با سرم افراد سالم ندارد، توسط سرم بیماران مبتلا به تب مالت شناسایی می‌شود. وجود آنتی‌بادی‌های ضدپروتئین نوترکیب L7/L12 در سرم افراد مبتلا به تب مالت نشان‌دهنده دو موضوع است. ابتدا این‌که شکل نوترکیب این پروتئین دارای اپی‌توپ‌های مشابه با فرم طبیعی آن است. دوم این‌که پروتئین L7/L12 علاوه بر این‌که دارای نقش موثری در تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد [۶]، قدرت تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال را نیز دارد. با این‌که نقش آنتی‌بادی‌های ضد این پروتئین در ایمنی‌زایی بر علیه بروسلوز کاملاً مشخص نیست ولی وجود آنتی‌بادی‌های ضد L7/L12 دارا بودن اپی‌توپ‌های تحریک‌کننده لنفوسیت‌های B علاوه بر اپی‌توپ‌های T را در این ملکول اثبات می‌کند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

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 آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی این پروتئین در حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است. در واقع L7/L12 از جمله عوامل اصلی ایمنی در بروسلرژن 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 آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی آن در انسان دیده نمی‌شود. بررسی آنتی‌ژنسیته این پروتئین 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 بروسلوزیز بر اساس تست‌های آگلوتیناسیون (رایت تست) می‌باشد. این تست‌ها با این‌که دارای حساسیت بالایی هستند ولی از نظر ویژگی کاملاً اختصاصی نبوده و با بسیاری از باکتری‌ها از جمله اشریشیاکلی، سالمونلا، فرانسیسلا، ویبریو کلرا، سودوموناس آئروزینوزا، هموفیلوس آنفلوآنزا، سراشیا مارسسنس حتی باکتری‌های گرم مثبت نظیر استرپتوکک‌های 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 توبرکلوزیز 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 نوترکیب L7/L12 می‌توان از این آنتی‌ژن به‌عنوان شاخص تشخیصی استفاده نمود. که ابته 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, Sriraganathan 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, Tabbaraee B, Delpisheh A. Immunogencity of HSA-L7/L12 (Brucella abortus ribosomal protein) in an animal model. Iran J Immunol 2009; 6: 12-21.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

[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 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 comparativeanalysis of tuberculous, brucellar and pyogenic spontaneous spondylodiscitis patients. J Infect 2007; 55: 158-163.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]