بررسی توانایی پروتئین نوترکیب P39 بروسلا آبورتوس جهت تشخیص آنتی بادی ضد بروسلا در بیماران مبتلا به تب مالت

دکترحمید ابطحی[1]، دکتر علی هاتف سلمانیان[2]، دکتر سیما رافتی [3]

۱- استادیار،گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک.

۲- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ، تهران.

۳- دانشیار، گروه ایمنی شناسی ، انستیتو پاستور ایران.

تاریخ دریافت ۸۴/۸/۱ ، تاریخ پذیرش۸۴/۱۲/۲۷

چکیده

مقدمه: مطالعات زیادی جهت بررسی ایمنی زایی شاخص‌های آنتی ژنیک بروسلا ازجمله پروتئین P39 در حیوانات انجام گرفته است. در این تحقیق سعی شده است تا آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیبP39 در بیماران مبتلا به تب مالت بررسی گردد.

روش کار: در این تحقیق تجربی ابتدا پروتئین نو ترکیبP39 در باکتری اشریشیاکلی تولید گردید. برای بررسی آنتی‌ژنیسیته پروتئینP39 در بیماران مبتلا به تب مالت از آزمون وسترن بلات با شش سرم بیمار و یک سرم مربوط به فرد سالم استفاده گردید.

نتایج: در آزمون وسترن بلات آنتی بادی‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به پروتئینP39 نوترکیب متصل گردید.

نتیجه گیری: شناسایی پروتئین نوترکیبP39 آنتی بادی‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به تب مالت، نشان‌گر تشابه اپیتوپ‌های فرم نوترکیب با شکل طبیعی آن است.

واژگان کلیدی: بروسلا آبورتوس ، پروتئین نو ترکیبP39 ، آنتی ژنیسیته، وسترن بلات

نویسنده مسئول: اراک، سردشت،دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی

Email: h-abtahi2@yahoo.co.uk

مقدمه

بروسلا باکتری گرم منفی و داخل سلولی اختیاری است که باعث بروز بروسلوز در انسان و حیوانات می‌شود. با این که بروسلوز در محدوده جغرافیایی خاصی گسترش دارد ولی در بسیاری از مناطق از جمله نواحی مدیترانه‌ای،آسیای غربی و بخش‌هایی از آفریقا و آمریکای لاتین هنوز از مشکلات اصلی بهداشتی به شمار می‌آید(۱).

شیوع واقعی بروسلوز در انسان کاملاً مشخص نیست و گزارشات به دست آمده از مناطق آندمیک بسیار متغیر است. کنترل بروسلوز بر اساس شناسایی و حذف حیوانات آلوده، پاستوریزاسیون محصولات لبنی و واکسیناسیون حیوانات اهلی است. اولین واکسن مؤثر بروسلا، سویه زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوسS19 بود. گرچه این واکسن باعث حفاظت دام در برابر بروسلا آبورتوس می گردد 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 باشد(۲ ،۳). بنابراین تحقیق برای ساخت واکسن‌های سالم‌تر و مؤثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به نظر می‌رسد. دست‌یابی به این هدف یعنی واکسن‌های جدید بروسلوز نیازمند بررسی شاخص‌های اصلی آنتی ژنیک بروسلا است(۴).

پروتئین P39 یکی از اجزاء مهم بروسلرژن[1] است. ژن سازنده این پروتئین با ۱۲۰۵ باز اولین بار توسط دونوئل[2] شناخته و ترادف آن تعیین گردید. پروتئین P39 در فضای پری پلاسمیک قرار گرفته است(۵). این پروتئین از عوامل مهم ایمنی‌زا برعلیه بروسلا به شمار می‌آید. با وجود این که ایمنی‌زایی این پروتئین در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده ولی تاکنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه ایمنی‌زایی آنتی ژن فوق در انسان انجام نگرفته است. لذا در این تحقیق سعی شده است تا با بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب P39 در بیماران مبتلا به بروسلوزیز، اولین قدم در تعیین ایمنی زایی این آنتی ژن در انسان برداشته شود.

روش کار

بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین نوترکیب P39 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 P39 از پلاسمید pGEX4T1 تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وتکنولوژی زیستی استفاده گردید. سرم شش بیمار مبتلا به بروسلوز از گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. تولید پروتئین نوترکیب P39 به روش نوترکیب در باکتری اشریشیاکلی انجام گرفت(۶). به طور خلاصه مراحل زیر برای تولید این پروتئین انجام شد. پس از تخلیص کروموزوم بروسلا آبورتوس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده با استفاده از PCR ژن P39 تکثیر گردید. سپس ژن به دست آمده در پلاسمید pGEX4T1کلون گردید.پس ازآن پلاسمید pGEX4T1-P39 به سلول‌های مستعد اشریشیا کلی سویه BL21 وارد

[1]- Brucellergene.
[2]- Donoel.

شد. برای تولید پروتئین P39 باکتری‌های اشریشیا کلی تراریخت شده با پلاسمیدpGEX4T1-P39 در محیط نوترین برات کشت داده شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با حداقل ۱۷۰ دور قرار گرفت. سپس با استفاده از IPTG القاء تولید پروتئین انجام گرفت. برای انجام تست ایمنوبلاتینگ (وسترن بلات) پس از الکتروفورز رسوب باکتری‌های القا یافته بر روی ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE ، باندهای پروتئینی به دست آمده بر روی ژل آکریل آمید به کاغذ نیترو سلولز منتقل گردید. عمل انتقال در محیط بافری ۲۵ میلی مولار تریس، ۱۹۲ میلی مولار گلایسین و ۲۰ درصد متانول به مدت یک ساعت و در شدت جریان ۹۰ ولت انجام گرفت. مرحله مسدود سازی کاغذ نیترو سلولز با قرار دادن کاغذ در محلول ۲/۵ درصد آلبومین سرم گاوی به مدت یک ساعت انجام شد. پس از مرحله مسدود سازی، کاغذ نیترو سلولز به مدت یک ساعت در سرم بیماران (۱/۱۰۰) مبتلا به تب مالت 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 درصد) شستشو شده و به مدت یک ساعت با آنتی هیومن کونژوگه با پراکسیداز (۱/۲۵۰۰) انکوبه گردید . در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها با بافرTBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیتروسلولز، کاغذ مزبوردرمحلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت.

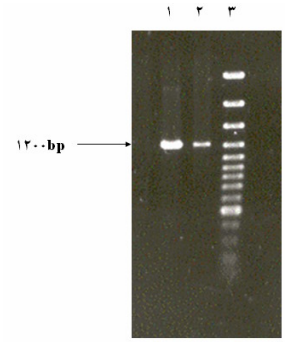
نتایج

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری بروسلا آبورتوس برابر ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن P39 استفاده گردید. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر۱۰۰ جفت بازی برابر ۱۲۰۵ جفت باز بود(شکل ۱).

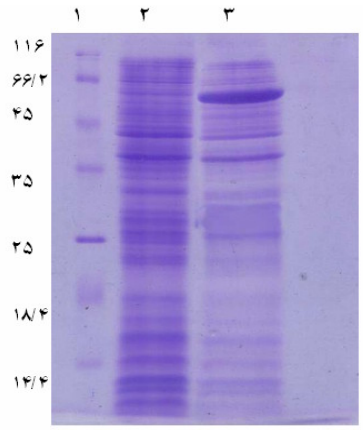
نتیجه ترادف ژن تکثیر یافته که در پلاسمید pSK کلون گردیده بود، با ترادف ژن P39 بروسلا آبورتوس یکسان بود.

پروتئین P39 پس از ۴ ساعت از القاء با IPTG تولید گردید. وزن پروتئین تولید شده در حدود ۶۴ کیلو دالتون است. نتیجه القای پروتئین P39 در شکل ۲ آمده است.

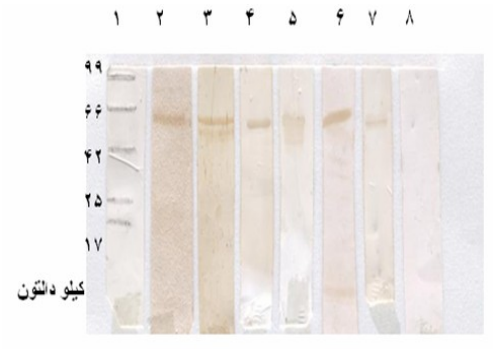
نتایج مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در آزمون وسترن بلات در شکل ۳ آمده است . بر اساس نتایج به دست آمده، در تمام نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا به بروسلوزیز باندهای مربوط به واکنش آنتی‌بادی با آنتی‌ژن در کاغذ نیتروسلولز مشاهده می شود. در عین حال هیچ باندی دال بر واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در نمونه‌های سرم نرمال دیده نشد(شکل ۳).



شکل ۱. ستون اول ودوم باند ۱۲۰۵ bp مربوط به ژنP39 ، ستون سوم مارکر ۱۰۰ bp



شکل ۲. تخلیص پروتئین P39 . ستون ۱: پروتئین مارکر، ستون ۲ : نمونه قبل از القا، ستون ۳ : نمونه بعد از القا



شکل ۳ . آزمون ایمنوبلات با سرم بیماران مبتلا به بروسلوزیز و سرم فرد سالم.
ستون ۱: پروتئین مارکر، ستون ۲ تا ۷ : ایمنوبلات با سرم بیماران ، ستون ۸ : ایموبلات با سرم فرد سالم

بحث

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 مؤثرتر برای کنترل این عفونت در حیوانات و انسان ضروری به نظر می‌رسد(۷).

پروتئین P39 در واقع در فضای پری پلاسمیک قرار گرفته است. وظایف متعددی را برای این پروتئین ذکر نموده‌اند. P39 به عنوان یک عامل اتصال شونده به سوبسترا در فضای پری پلاسمیک و انتقال سوبسترا به سلول شناخته شده است. علاوه بر آن این پروتئین دارای فعالیت‌های شیمیو تاکسی، حفاظت سلول از استرس‌های پری پلاسمیک و دخالت در شکل دهی برخی پروتئین‌ها است(۸).

مطالعات و تحقیقات متعددی در مورد آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی این پروتئین در حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است. در واقع P39 ازجمله عوامل اصلی ایمنی در بروسلرژن محسوب می‌گردد. این پروتئین قادر به تحریک واکنش‌های حساسیت تأخیری 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(۹). در یکی از این مطالعات با تلقیح ژن این پروتئین با استفاده از روش DNA واکسیناسیون، ایمنی‌زایی نسبتاً بالایی در برابر عفونت بروسلا در موش به دست آمده است. در این تحقیقات پروتئین P39 را به عنوان یکی از عوامل اصلی تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی معرفی نموده‌اند(۵).

با این که تحقیقات زیادی در مورد ایمنی زایی این پروتئین در حیوانات انجام شده است لیکن تاکنون هیچ گزارشی دال بر آنتی ژنیسیته و ایمنی زایی آن در انسان دیده نمی‌شود. بررسی آنتی ژنیسیته این پروتئین در انسان نشان‌گر تحریک پاسخ ایمنی در برابر این پروتئین است.

در این مطالعه با استفاده از آزمون وسترن بلات نشان داده شده است که پروتئین نوترکیب P39 در عین حالی که هیچ واکنشی با سرم افراد سالم ندارد، توسط سرم بیماران مبتلا به تب مالت شناسایی می‌شود. وجود آنتی‌بادی‌های ضدپروتئین نوترکیب P39 در سرم افراد مبتلا به تب مالت نشان‌دهنده دو موضوع است، اول این که شکل نوترکیب این پروتئین دارای اپیتوپ‌های مشابه با فرم طبیعی آن است. دوم این که پروتئین P39 علاوه بر این که دارای نقش مؤثری در تحریک پاسخ‌های ایمنی سلولی است(۸)، قدرت تحریک پاسخ‌های ایمنی هومورال را نیز دارد. با این که نقش آنتی بادی‌های ضد این پروتئین در ایمنی‌زایی بر علیه بروسلوز کاملاً مشخص نیست ولی وجود آنتی بادی‌های ضد P39، دارا بودن اپیتوپ‌های تحریک کننده لنفوسیت‌های B علاوه بر اپیتوپ‌های T در این ملکول را اثبات می کند.

نتیجه گیری

با در نظر گرفتن نتایج این تحقیق و سایر مطالعات انجام گرفته در زمینه ایمنی‌زایی پروتئین P39 ، می‌توان این نکته را استدلال نمود که آنتی ژن فوق می‌تواند یکی از عوامل مهم ایمنی‌زایی انسان در برابر تب مالت به حساب آیدکه 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 که‌شاخص‌های بیماری‌زایی آنها هنوز به طور کامل شناخته نشده است، تنها تلقیح یک آنتی ژن نمی‌تواند ایمنی‌زایی مؤثری را ایجاد نماید. بنابراین لازم است نظیر آنچه در مدل‌های مالاریا و جذام انجام شده است، از چند آنتی ژن باکتری برای ایمنی‌زایی استفاده شود. پیشنهاد می‌شود تا مطالعات ایمنی‌زایی در مدل‌های حیوانی و یا انسانی بر علیه بروسلوز با استفاده از چند آنتی ژن از گونه‌های بروسلا انجام گردد(۱۰،۱۱).

منابع

1. Schuring GG, Sriraganathan N, Corbel MG. Brucellosis Vaccines: past, present and future. Vet Microb 2002; 90: 479 – 496.

2. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the near east region. Vet Microb 2002; 90: 81 –111.

3. Corbel MG . Brucellosis: an over view Emerging. Infect Dis 1997; 3: 213 – 221.

4.Golding B, et al .Immunity and protection against Brucella abortus .Microbes and Infection 2001; 3: 43 -48.

5. Al-Mariri A, Tibor P, Mertens X, DeBolle P, Michel J, Godefroid K, Walravens A, Letesson JJ. Induction of Immune Response in BalB/c Mice with a DNA Vaccine Encoding Bacterioferritin or P39 of Brucella spp. Infect Immun2001;69(10):6264– 6270.

۶. ابطحی ح، سلمانیان ع ه، رافتی س، بهزادیان نژاد ق. بیان پروتئین نو ترکیب P39 بروسلا آبورتوس در باکتری اشریشیا کلی. ره آورد دانش، بهار ۱۳۸۳ ، سال هفتم، شماره ۲۶ ،ص ۷-۱ .

7. Ggrovel JP, Morono E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Micro 2002; 90: 281-297.

8. Denoel PA, et al. Charactization ,occurrence and molecular cloning of a 39 kilodalton Brucella abortus cytoplasmic protein Immunodominant in cattle. In fect Immun 1997; 65(2): 495-502.

9. Al–Mariri A, Tibor A, Mertens P. Protection of Balb/c mice against Brucella abortus 544 challege by vaccination with Bacterioferritin or p39 recombinant protein with CpG oligdeoxynucleotides as adjuvant. Infact Immun 2001; 69(8): 4816-4822.

10. Gelber RH, Mehra V, Bloom B, Murray LP, Siu P, Tsang M, Brenan PJ.Vaccination with pure Mycobacterium Lepare proteins inhibits M. Leprae multiplication in mouse footpads. Infection and Immunity 1994; 62: 4250-4255.

11. Khusmith S, Charoenvit Y, Kumar S, Sedegah M, Beaudoin RL, Hoffman SL. Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. Science 1991; 252: 715-718.

Specificity of recombinant P39 protein in detection of anti-Brucella antibody in patients with Brucellosis

Abtahi H[3], Salmanian AH[4], Rafati S[5]

Abstract

Introduction: In many studies, immunogenicity of Brucella proteins such as P39 in animals is investigated. In this study, we evaluated antigenicity of recombinant P39 from Brucella abortus in patients with Brucellosis.

Materials and Methods: In this experimental study, at first recombinant P39 was produced in Escherichia coli. Sera reactivity of six infected individuals against the recombinant P39 protein was analysed by Western Blot.

Results: Data indicated that P39 protein from Brucella abortus was recognized by patients' sera antibodies.

Conclusion: Our data showed that recombinant P39 protein can be detected as an antigen by sera in infected human. Therefore, recombinant P39 have same epitopes with natural form of this antigen.

Key words: Brucella abortus, recombinant P39 protein, antigenicity, Western Blot

[3] - Assistant professor, department of microbiology and immunology, Arak university of medical sciences.
[4] - Associate professor, National research center for genetic engineering and biotechnology, Tehran.
[5] - Associate professor, Pasteur institute of Iran, Tehran.