Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 16(72): 62-70

Amplification, cloning, and expression of *Brucella melitensis* bp26 gene isolated from Markazi province in order to produce BP26 recombinant protein

Azizpour MM (MSc)[1], Hosseini SD (PhD)[2*], Akbary N (PhD)[3], Basiri H (PhD)[3], Nezamabadi M (BSc) [3], Eskandari S (MSc)[1], Sarikhani M (MSc)[4]

١- Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
2- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak Branch, Arak, Iran
3- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
4- IISc, Bangalore, India

Received:, Accepted:

Abstract

***Background*:** Brucellosis is a debilitative disease that imposes heavy costs on the economy and society. Therefore, using the most accurate and efficient method to diagnose this disease is essential. In Iran, Brucella melitensis is the common causative agent for brucellosis and BP26 protein of this bacterium has a good level of antigenicity. Thus, the aim of this study is to produce Brucella melitensis recombinant BP26 protein with a PET28a expression vector.

***Materials and Methods*:** In this applied-fundamental study, genomic DNA was isolated from bacterial culture through proteinase K (pK) and phenol/chlorophorm protocol. Then, two pairs of primers were designed based on the known sequence in the gene bank for amplification of Brucella melitensis bp26 gene and PCR reaction was set up and optimized. The PCR product was cloned first into PTZ57R/T vector and accessed on the PET28a vector and sequenced. The recombinant vector was transformed and expressed into E. coli BL21 (DE3). Then, the recombinant protein was purified with Ni-NTA column of chromatography against His tag.

Results: The size of PCR product was in accordance with the part of bp26 gene size in the gene bank. The bp26 gene without adding IPTG had little expression and 3 hours after adding IPTG with a 1 Mm concentration to culture media, extreme expression was observed.

Conclusion: The production of recombinant BP26 protein from isolated Brucella melitensis native to Markazi province was done. Noticing the importance of BP26 protein and its significance for future studies on providing brucellosis diagnosis kits, its production was made possible.

Keywords: Brucella melitensis, brucellosis, bp26 gene, OMP28

*Corresponding author:
Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Arak Branch, Arak, Iran
Email: hosseinida@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 16، شماره 3 (شماره پیاپی 72)،خرداد 1392،62-70

تکثیر، کلونینگ و بیان ژن bp26(omp28) *Brucellamelitensis* بومی استان مرکزی به منظور تولید پروتئین نو ترکیب BP26

مریم عزیزپور مغوان[1]، سید داود حسینی[2*]، حسین بصیری[3]، ندا اکبری[4]، میترا نظام آبادی[5] ، صابراسکندری[6]، محسن ساریخانی[7]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، ارک، ایران

2-استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مرکزی، اراک، ایران

3- مربی، گروه میکرب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

4- استادیار، گروه میکرب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

5- کارشناس میکروبیولوژی، گروه میکرب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

6- کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مرکزی، اراک، ایران

7- دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات هندوستان

تاریخ دریافت:91/9/2 تاریخ پذیرش:92/2/4

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز بیماری ناتوان کننده‌ای است که هزینه گزافی را بر اقتصاد و اجتماع تحمیل می‌کند. بنابراین استفاده از بهترین، دقیق‌ترین و به صرفه‌ترین روش برای تشخیص این بیماری ضروری می‌باشد. عامل شایع بروسلوز در ایران بروسلا بوده و پروتئین BP26 این باکتری خاصیت آنتی ژنیسیته خوبی دارد. بنابراین هدف از این تحقیق تولید پروتئین BP26 نوترکیب از باکتری بروسلا جهت استفاده در کیت تشخیص بروسلوز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بنیادی - کاربردی، از باکتری کشت شده، تخلیص DNA ژنومیک به روش پروتئیناز K و فنل/کلرفرم انجام شد. سپس با توجه به اطلاعات توالی ژن Brucella melitensis bp26 موجود در بانک اطلاعات ژن، برای ژن مذکور پرایمر طراحی شده و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز راه‌اندازی، بهینه‌سازی و انجام شد. در ادامه محصول واکنش ابتدا در وکتور PTZ57R/T الحاق گردید و پس از آن در وکتور pET-28a کلون گردید. وکتور نوترکیب به میزبان E. coli BL21(DE3) منتقل گردید و پروتئین نوترکیب و با ستون کروماتوگرافی Ni-NTA علیه His tag تخلیص گردید.

یافته‌ها: اندازه ژن تکثیر شده با اندازه بخشی از ژن Brucella melitensis bp26 موجود در بانک اطلاعات ژن مطابقت داشت. ژن bp26 بدون القاء با IPTG به میزان کم بیان شده و با افزودن آن به غلظت 1 میلی‌مولار به محیط کشت در ساعت سوم، حداکثر بیان مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تولید پروتئین نوترکیب BP26 از باکتری ملیتنسیس بومی استان مرکزی با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET-28a امکان‌پذیر گردید. با توجه به اهمیت این پروتئین و به منظور بررسی‌های بیشتر در آینده در خصوص تهیه کیت تشخیص بروسلوز، امکان تولید آن در کشور فراهم شد.

واژگان کلیدی: بروسلا ملیتنسیس، بروسلوزیس، پروتئین BP26، ژن bp26

***نویسنده مسئول:** اراک، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی مرکزی

Email: hosseinida@yahoo.com

مقدمه

بروسلوز از بیمارهای شایع مشترک بین انسان و دام در جهان می‌باشد که بالغ بر نیم میلیون مورد جدید سالانه به آن مبتلا شده و میزان شیوع آن در برخی کشورها ، ده مورد در هر 100000 نفر است. این بیماری میل به مزمن شدن و ماندگاری دارد و می‌تواند به بیماری‌های گرانولوماتوزی تبدیل شود که هر دستگاهی را آلوده نماید. عامل این بیماری باکتری بروسلا است که بیماریزاترین و مهاجم‌ترین گونه آن برای انسان بروسلا ملی تنسیس (Brucella melitensis) می‌باشد و بعد از آن به ترتیب نزولی بروسلا آبورتوس (B. abortus)، بروسلا سویس (B. suis) و بروسلا کنیس (B. canis) می‌باشد. با وجود آندمیک بودن آن در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، تشخیص و کنترل آن معمولا به صورت دقیق صورت نمی‌گیرد. علاوه بر آن، از آنجایی که بروسلوز عامل مهم بیماری و مرگ و میر در دامپزشکی محسوب می‌شود می‌تواند موجب زیان اقتصادی در کشورهای در حال توسعه باشد(4-1).

به طور کلاسیک شناسایی و تشخیص بروسلا بر اساس کشت و بررسی‌های فنوتیپی (بیوتایپینگ) استوار است. بدون شک تهیه اطلاعات به این روش، نیازمند صرف وقت زیاد و داشتن نیروی باتجربه بوده و بایستی در شرایط زیستی بی خطر و مطمئن سطح 3 (Biosafety level 3) صورت گیرد. کشت (خون، مغز استخوان و سایر نمونه ها) و شناسایی گونه‌های بروسلا با تکنیک‌های قراردادی، بسیار وقت‌گیر و خطرناک بوده و همیشه به نتیجه نمی رسد. انجام آزمایش‌های سرولوژی هم بر اساس هر مرحله از بیماری متفاوت است. تست آگلوتیناسیون سرم به طور معمول برای شناسایی بروسلوز حاد استفاده می‌شود در حالی که تست 2-مرکاپتواتانول (2-ME) و تست ثبوت مکمل (Complement fixation tests) برای تشخیص بروسلوز مزمن وقتی که تیتر آگلوتیناسیون پایین است به کار می رود. سایر آزمون‌هایی که برای تشخیص بروسلوز انسانی به کار می‌روند شامل: تست رز بنگال، تست کومبس و آگلوتیناسیون لاتکس می‌باشد (7–5). در این آزمون‌ها در اکثر بیماران مبتلا به بروسلوز از هفته سوم به بعد نتایج آزمایش سرمی منفی کاذب می‌گردد (درموارد مزمن بیماری به علت پائین بودن میزانIgM یا عدم وجود آن واکنش آگلوتیناسیون ممکن است صورت نگیرد یا ابتلاء به بروسلوز ناشی از گونه بروسلا کنیس). در برخی موارد، بررسی سرم نتیجه مثبت کاذب را نشان می‌دهد (در صورت ابتلاء به وبا، تولارمی، عفونت ناشی از یرسینیا انتروکولیتیکا، تماس با واکسن‌های حاوی ویبریو کلرا، فرانسیسلا و عفونت‌های ناشی ازگونه‌های سالمونلا، پسودومونا مالتوفیلا و اشریشیا کلی تیپO116 و ...)(9 -8) .

پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) در باکتری‌ها از پروتئین، لیپید و قند تشکیل شده است. این پروتئین‌ها که آنتی ژن‌های گروه نیز نامیده می‌شوند، پروتئین‌های پورینی هستند. پروتئین‌های اصلی غشاء خارجی گونه‌های بروسلا در سال 1980 به عنوان آنتی ژن‌های قوی ایمونوژن شناسایی شده و بر اساس وزن مولکولی طبقه‌بندی شدند. وزن مولکولی گروه اول 94-88 کیلودالتون، وزن مولکولی گروه دوم 43-33 کیلودالتون و وزن مولکولی گروه سوم 34-25 کیلودالتون می‌باشد. بررسی های اخیر در خصوص ترادف ژنوم بروسلا ملی‌تنسیس نشان داده که 5 ژن اختصاصی مشابه omp31 و omp25 در آن وجود دارد (پروتئین‌های 20 کیلودالتون، 28 کیلودالتون و 31 کیلو دالتون). پروتئین 28 کیلودالتون بروسلایی که توسط سه گروه تحقیقاتی به طور جداگانه کشف شد، CP28، BP26 یا Omp28 نامیده شد. این پروتئین به ویژه در اندازه‌گیری آنتی بادی ضد بروسلایی در حیوانات آلوده مفید موثر بود و روی کروموزوم 1 باکتری قرار دارد (13-10) .

پروتئین نوترکیب BP26 بروسلا ملی‌تنسیس جزء ایمونوژن‌های مهم این باکتری می‌باشد و ژن bp26 آن از نظر ترادف بسیار شبیه ژن bp26 سایر گونه‌های بروسلا می‌باشد (14). بدین منظور در این مطالعه بنیادی - کاربردی، برای طراحی یک آزمون حساس و اختصاصی برای تشخیص این بیماری، جداسازی و بیان ژن bp26 بروسلا

ملی‌تنسیس جدا شده از استان مرکزی و تخلیص پروتئین BP26 انجام شد .

مواد و روش‌ها

باکتری بروسلا ملی‌تنسیس جدا شده از استان مرکزی(تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج)، با رعایت شرایط زیستی بی خطر و مطمئن سطح 2 (biosafety level 2) در6 میلی‌لیتر محیط کشت BB (Brucella Broth) در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مرکزی (اراک) کشت و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. این باکتری در مدت چهار روز رشد کرد. سپس نمونه را در 4000 g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع رویی را دور ریخته و DNA باکتری مطابق روش پروتئیناز K و فنل/کلرفرم استخراج شد(15). دراین روش ابتدا رسوب به دست آمده از سوسپانسیون کشت باکتری در بافر TE (10 میلی‌مولار تریس کلراید و EDTA یک میلی‌مولار با PH=8) حل شد و در دور 4000 g به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی، بافر لیز کننده (سدیم دودسیل سولفات 10درصد ، پروتئیناز K، EDTA نیم مولار ، تریس کلراید یک مولار و Nacl پنج مولار) را اضافه و به مدت یک شب گرماگذاری نموده (هر 15 دقیقه تکان داده شد) پس از لیز سلولی، DNA با فنل/کلرفرم استخراج و در بافر TE باPH=8 حل شده و 15 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد در فور گرماگذاری شده مقدار DNA تخلیص شده با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های 260و280 نانومتر به دست آمد.

با استفاده از توالی ژن bp26، پرایمرهای رفت و برگشت به ترتیب زیر طراحی و ساخته شد.

پرایمر رفت:

5′-AGGATCCATGAACACTCGTGCTAG-3′

پرایمربرگشت:

5′-AAGCTTCTTGATTTCAAAAACGAC-3′

پرایمرها دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش با آنزیم‌های BamHI و Hind III می‌باشند .

برای انجام PCR مواد ذکر شده در جدول 1 را با دقت اضافه کرده و واکنش PCR مطابق برنامه جدول 2 انجام شد .

جدول 1. میزان و مواد لازم جهت انجام واکنش PCR

مواد	مقدار بر حسب میکرولیتر
بافرPCR	2/5
کلرید منیزیم (50 میلی مولار)	1
نوکلئوتیدها (10 میلی مولار)	1
پرایمر رفت	1
پرایمر برگشت	1
DNA پلیمراز	0/5
نمونه	3
آب مقطر	15
حجم نهایی	25

جدول 2. برنامه داده شده به دستگاه ترموسایکلر جهت انجام واکنش PCR

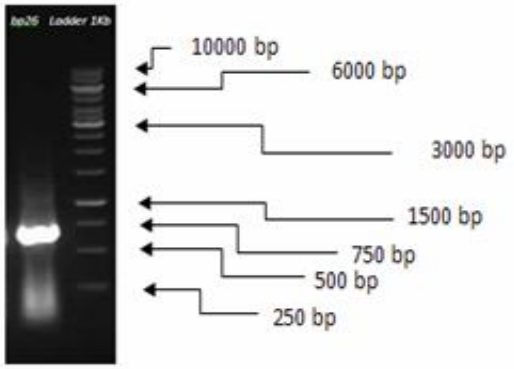
مرحله	دما	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	95	2	1
واسرشت	95	1	34
اتصال	60	1	
بازآرایی	72	1	
بازآرایی نهایی	72	10	1
نگهداری	4		-

پس از تکثیر ژن bp26 جهت تایید، بر روی ژل آگارز 1 درصد برده شد و پس از مشاهده باند مورد نظر، محصول PCR با استفاده از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit شرکت فرمنتاز تخلیص شد. سپس ژن bp26 تخلیص شده با آنزیم T4DNA Ligase شرکت فرمنتاز در وکتور PTZ57R/T کلون گردید (در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب گرماگذاری انجام گردید) و محصول آن به باکتری DH5α مستعد شده به روش شوک حرارتی منتقل شد. جهت تایید انتقال وکتور نوترکیب به باکتری، از کلنی‌های رشد کرده، PCR صورت گرفت. به منظور کلون‌سازی ژن bp26 تخلیص شده در وکتور PET28a، هضم آنزیمی و کتور نوترکیب PTZ57R/T و وکتور PET28a با آنزیم‌های

BamHI و HindIII شرکت فرمنتاز انجام شد. ژنbp26 و وکتور PET28a هضم آنزیمی شده با استفاده از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction Kit شرکت فرمنتاز از روی ژل آگارز تخلیص شده و عمل اتصال ژن bp26 در وکتور PET28a با آنزیم T4DNA Ligase شرکت فرمنتاز انجام گردید. محصول Ligation به باکتری E.coli سوش(BL21(DE3 مستعد شده به روش شوک حرارتی منتقل شد. جهت تایید انتقال وکتور نوترکیب، کلنی PCR صورت گرفت. از کلنی حاوی وکتور نوترکیب PET28a در محیط کشت LB-Broth حاوی کانامایسین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب گرماگذاری شد. از کشت روز قبل 140 میکرولیتر به محیط کشت LB-Broth حاوی کانامایسین افزوده در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. زمانی که OD_{600} (Optical density) محیط کشت در حدود 0/6 -4/ 0گردید، 1میلی لیتر از محیط کشت برداشته و در 4000 g به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع‌رویی به دقت خالی و رسوب سلولی به عنوان نمونه صفر (قبل از اضافه نمودن IPTG) در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای القاء بیان ژن به محیط کشت IPTG اضافه شد تا جایی که غلظت آن 1 میلی‌مولار باشد و مجدد در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. در هر یک از ساعات (1/5، 3 و5 ساعت) بعد از القا، 1میلی‌لیتر ازمحیط کشت برداشته و در 4000g به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به دقت خالی شد (مایع‌رویی رسوب سلولی ساعت 5 جهت بررسی ترشحی بودن پروتئین ، نگهداری گردید). رسوب سلولی در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به همین روش رسوب سلولی باکتری (BL21(DE3 حاوی وکتور PET28a بدون insert (فاقد قطعه ژن bp26) قبل از اضافه نمودن IPTG و 5 ساعت پس از اضافه نمودن IPTG، در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس جهت تایید بیان ژن bp26، نمونه‌ها روی SDS-10PAGEدرصد بررسی گردید. به منظور تخلیص پروتئین، مطابق روش ذکر شده برای بیان ژنbp26، باکتری حاوی وکتور نوترکیب PET28a کشت داده شده و رسوب سلولی جهت بررسی و تایید تخلیص پروتئین روی SDS-10PAGEدرصد بررسی گردید (پروتئین BP26 با استفاده از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA علیه His tag شرکت کیاژن و براساس دستورالعمل آن تخلیص شد) .

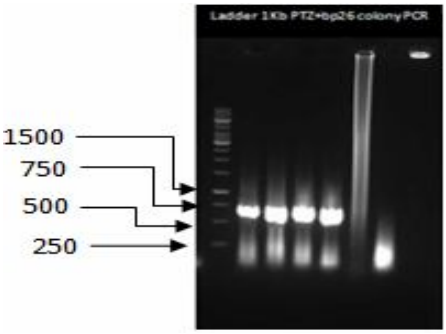
نتایج

غلظت DNA کروموزومی به دست آمده از باکتری بروسلا ملی‌تنسیس برابر 803 نانوگرم بر میکرولیتر برآورد گردید. این DNA به عنوان الگو برای تکثیر ژن bp26 استفاده گردید. جهت تایید تکثیر ژن، محصول PCR روی ژل آگارز 1 درصد برده شد. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته درمقایسه با نشان گر نشان دهنده تکثیر ژن مورد نظر بود (شکل 1) .



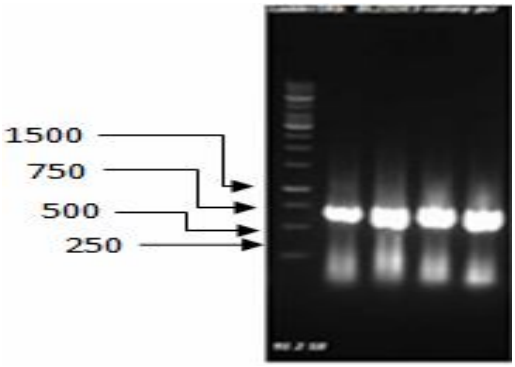
شکل 1 . اندازه ژن بر روی ژل آگارز 1 درصد ، ستون 1: ژن bp26 و ستون 2: DNA Ladder 1 Kb شرکت فرمنتاز

از کلنی‌های به دست آمده از مرحله انتقال وکتور نوترکیب PTZ57R/T به باکتری DH5α مستعد شده به طور تصادفی شش کلنی انتخاب شد و Colony PCR انجام گردید. چهار کلنی از شش کلنی حاوی وکتور نوترکیب PTZ57R/T می‌باشد (شکل2) .



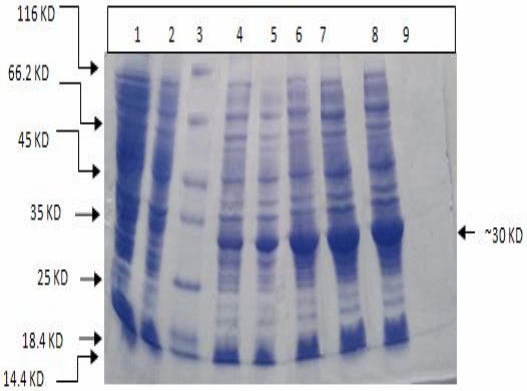
شکل2. نتیجه کلنی PCR از کلنی های ترنسفورم شده با وکتور PTZ57R/Tحاوی ژنbp26 روی ژل آگارز 1درصد، ستون Ladder 1Kb:1، ستون 2 تا 5: کلنی های مثبت (حاوی ژنbp26)) ، ستون 6 و 7: کلنی‌های منفی (بدون ژن bp26)

پس از انتقال ژن bp26 به وکتور PET28a و انتقال آن به باکتری E.coli سوش(BL21(DE3 برای به دست آوردن کلنی حاوی وکتور نوترکیب، کلنی PCR صورت گرفت (شکل3) .



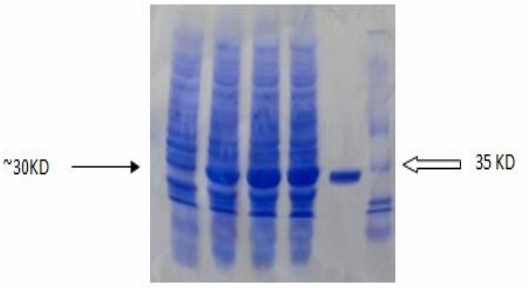
شکل3. نتیجه کلنی PCR چهار کلنی باکتری E.Coli سوش BL21(DE3) ترنسفورم شده با وکتور PET28a حاوی ژنbp26 روی ژل آگارز 1درصد ، ستون 1: DNA Ladder 1 Kb ; ، ستون 5-2 :کلنی‌های مثبت حاوی ژن bp26

از کلنی‌هایی که PCR مثبت بوده و حاوی وکتور PET28a نوترکیب بودند (شکل 3)، به منظور بررسی بیان شدن ژن bp26، روی SDS-PAGE 10درصد بررسی گردید. همان‌طور که در شکل4 مشاهده می شود این ژن بدون القاء با IPTG به میزان کم بیان شده و سه ساعت پس از اضافه نمودن IPTG حداکثر بیان را داشته و بعد از آن تغییر قابل ملاحظه ای مشاهده نمی شود. از طرفی با توجه به اینکه هیچ باندی در ستون 9 مشاهده نمی شود، پروتئین بیان شده ترشحی نمی‌باشد .



شکل 4. بررسی بیان ژن bp26 روی SDS-PAGE 10 درصد:ستون 1: رسوب کشت باکتری (BL21(DE3 حاوی وکتور PET28a بدون insert قبل از اضافه نمودن IPTG(No IPTG)، ستون 2: رسوب کشت همان باکتری 5 ساعت پس از اضافه نمودن IPTG، ستون 3: Protein ; Ladderشرکت فرمنتاز ،ستون 4: رسوب کشت باکتری (BL21(DE3 حاوی وکتور PET28a نوترکیب قبل از اضافه نمودن IPTG، ستون 5 تا 9: رسوب کشت همان باکتری 1 ، ۲،۳ و 5 ساعت بعد از اضافه نمودن IPTG

پس از بیان و تخلیص پروتئین BP26، به منظور بررسی تخلیص شدن، روی SDS-PAGE10درصد بررسی گردید(شکل 5) .



شکل5. اندازه پروتئین OMP28 تخلیص شده روی SDS-PAGE 10 درصد که از سمت چپ به راست به ترتیب نشان دهنده: ستون 1: رسوب کشت باکتری (BL21(DE3 حاوی وکتور PET28a نوترکیب قبل از اضافه نمودن IPTG، ستون 2 تا 4: رسوب کشت باکتری 1/5 ، 3 و 5 ساعت بعد از اضافه نمودن IPTG ،ستون 5: پروتئین OMP28 تخلیص شده، ستون Protein Ladder:6; شرکت فرمنتاز

بحث

بروسلوز در اکثر نقاط کشورهای در حال توسعه اندمیک بوده و علیرغم واکسیناسیون احشام، هنوز هم بروسلوز هر ساله موجب ضرر و زیان اقتصادی شده و موجب آلودگی انسان می‌شود. روش‌های معمول برای تشخیص موارد بالینی بروسلوز وقت‌گیر بوده و علاوه بر خطرناک بودن انجام این آزمایش‌ها برای کارکنان آزمایشگاه‌ها، دقت، صحت و درستی آن صد درصد نمی‌باشد. بنابراین با توجه به قرارگرفتن ایران در منطقه شایع بروسلوز، اهمیت لزوم تحقیق در خصوص دستیابی به بهترین، دقیق‌ترین و به صرفه‌ترین روش برای تشخیص این بیماری روشن است. اگرچه تحقیقات وسیعی در خصوص تولید پروتئین BP26 و بررسی خواص آن صورت گرفته است ولی اطلاعات مدونی از چگونگی ساخت کیت به دست نیامده است. بنابراین استفاده از روشی که نیاز به تماس مستقیم با باکتری بیماری‌زا نبوده و از طرفی دقت و سرعت انجام آن بالا باشد ضروری به نظر می‌رسد. تولید فرآورده‌های مختلف از باکتری‌های بیماریزا خطر انتقال و انتشار باکتری در محیط و آلوده شدن افراد را به دنبال دارد. بنابراین امروزه برای تولید فرآورده‌های این باکتری‌ها بیشتر از روش‌های زیست فناوری استفاده می‌گردد. به همین منظور از سال 1996 تلاش برای جداسازی، بیان ژن‌های مختلف غشاء خارجی و پری پلاسمی گونه‌های متفاوت بروسلا و تخلیص این پروتئین‌ها آغاز شد. اقدامات مهم و اساسی در این زمینه صورت گرفت و توالی‌های متفاوتی از این ژن تکثیر و بررسی شد(16). تمامی این تلاش‌ها مبنی بر بیان این پروتئین و بررسی در خصوص آنتی ژنیسیته آن، نشان دهنده یکسان و مشترک بودن نتایج حاصل از تحقیقات بوده و بیان‌گر بالا بودن آنتی ژنیسیته پروتئین حاصل از بیان ژن bp26 بود. از طرفی ترادف ژن bp26 سویه‌های رفرانس B melitensis و B. abortus بسیار شبیه هم بوده و تنها یک جابجایی نوکلئوتید در B. suis و B. ovis وجود دارد. با وجود این در سطح اسیدآمینه هیچ تفاوتی بین سویه‌های رفرانس وجود ندارد. تنها اختلاف جزیی در ترادف ژن bp26 بین هفت بیوار B. abortus و سویه‌های واکسن S19 و RB51 یافت گردید. هم‌چنین آنها نشان دادند که ترادف نوکلئوتید ژن bp26 B. abortus S19 تقریبا با B. melitensis 16M یکسان است(17).

در این مطالعه ابتدا ژن bp26 پس از تکثیر به وکتور PTZ57R/Tمنتقل شد که چند مزیت داشت:

- داشتن یک مخزن برای تکثیر ژن bp26
- بررسی کارکرد صحیح جایگاه‌های آنزیمی برشی طراحی شده روی پرایمرها
- اطمینان از اثر آنزیمی برشی روی ژن bp26 به منظور انجام مرحله Ligation

پس از هضم آنزیمی، ژن bp26 به این وکتور منتقل شده و در شرکت تکاپو زیست تعیین ترادف گردید. نتایج حاصل نشان دهنده یکسان بودن توالی و اندازه ژن bp26 جدا شده از باکتری بروسلا ملی‌تنسیس در ایران با اندازه و توالی تکثیر شده این ژن توسط دیگر محققان در کشورهای مختلف (ثبت شده در بانک ژن) بود(18).

وکتور بیانی PET28a دارای شش اسید آمینه هیستیدین پس از پروموتور خود و قبل از جایگاه ورود ژن bp26 می‌باشد. بنابراین هنگام بیان ژن bp26 دم هیستیدینی به خود می‌گیرد. بالا بودن میزان بیان پروتئین به دلیل استفاده از سیستم نسخه‌برداری-بیانی پروموتر T7 در باکتری E.col*i* بود. پروتئین نوترکیب تولید شده در باکتری E.col*i* سوش BL21(DE3) ترشحی نبوده و بیشترین میزان بیان ژن، با افزودن IPTG یک میلی‌مولار و گرماگذاری به مدت 3 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد حاصل شد.

مهم‌ترین بخش پس از تولید پروتئین‌های نوترکیب، مرحله تخلیص این پروتئین و جلوگیری از هدررفتن یا غیر فعال شدن آن است. کلون نمودن ژن bp26در ناقلPET28a ، پروتئین BP26 نوترکیبی دارای دنباله اتصالی His (His tag) را حاصل می‌آورد که می‌توان آن را به وسیله ستون کروماتوگرافی Ni-NTA علیه His tag شرکت کیاژن تخلیص کرد.

برای تولید دستیابی به واکسن و ابزار تشخیص جدید، به خصوص واکسن نوترکیب و آنتی ژن، اولین قدم جداسازی و تخلیص کاندیدای مورد نظر است. بنابراین در این تحقیق پروتئین BP26 نوترکیب تولید و تخلیص گردید.

نتیجه گیری

تولید پروتئین نوترکیب BP26 از باکتری بروسلا ملی‌تنسیس بومی استان مرکزی با استفاده ازناقل پلاسمیدی pET-28a در کشور امکان‌پذیر گردید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه دانشجویی (مریم عزیزپور مغوان) دانشجوی کارشناسی ارشدرشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات استان مرکزی (اراک) تحت عنوان" تکثیر، کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب B.melitensis (omp28) BP26 بومی ایران به منظور استفاده در کیت تشخیص سرولوژیک برسلوز " می‌باشد. لذا بدین‌وسیله از جناب آقای بهروزی خواه، رئیس محترم بخش بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی شعبه کرج که سویه بومی باکتری *B.* melitensis را در اختیار ما قرار دادند و نیز کلیه بزرگوارانی که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مرکزی (اراک) با صبر و حوصله همکاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1.Álvarez J, Sáez JL, García N, Serrat C, Pérez-Sancho M, González S, et al. Management of an outbreak of brucellosis due to B. melitensis in dairy cattle in Spain. Research in veterinary science. 2011;90(2):208-11.

2.Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, Wernery U, Al Dahouk S, Straube E, et al. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC infectious diseases. 2010;10(1):100-1.

3.Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. Diagnosis of brucellosis. Open Veterinary Science Journal. 2010;4(1):46-60.

4.Abbas B, Aldeewan A. Occurrence and epidemiology of Brucella spp. in raw milk samples at Basrah province, Iraq. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2009;12(2):136-42.

5.Bax H, Van Veelen M, Gyssens I, Rietveld A. Brucellosis, an uncommon and frequently delayed diagnosis. Neth J Med. 2007;65(9):352-5.

6.Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucella: A pathogen without classic virulence genes. Veterinary microbiology. 2008;129(1):1-14.

6.Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croatian medical journal. 2010;51(4):296-305.

7.Varshochi M, Majidi J, Amini M, Ghabili K, Shoja MM. False positive seroreactivity to brucellosis in tuberculosis patients: a prevalence study. International journal of general medicine. 2011;4:207.

8.Vrioni G, Kouvardas S, Pagarliota A, Charalampaki N, Tarpatzi A, Zerva L. Serologic diagnosis of human brucellosis using Wright, Rose Bengal, Brucellacapt and Elisa tests in a nonendemic area in Greece. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007;29:S643-S4.

9.Gupta V, Kumari R, Vohra J, Singh S, Vihan V. Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of Brucella melitensis infection in goats. Small Ruminant Research. 2010;93(2):119-25.

10.Thavaselvam D, Kumar A, Tiwari S, Mishra M, Prakash A. Cloning and expression of the immunoreactive Brucella melitensis 28 kDa outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis. Journal of medical microbiology. 2010;59(4):421-8.

11.Ficht T. Brucella taxonomy and evolution. Future microbiology. 2010;5(6):859-66.

12.Zygmunt MS, Baucheron S, Vizcaino N, Bowden RA, Cloeckaert A. Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of Brucella ovis infection in rams. Veterinary microbiology. 2002;87(3):213-20.

13.Liu W, Hu S, Qiao Z, Chen W, Liu L, Wang F, et al. Expression, purification, and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of Brucella melitensis M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2011;58(1):32-8.

14.Matrone M, Keid L, Rocha V, Vejarano M, Ikuta C, Rodriguez C, et al. Evaluation of DNA extraction protocols for Brucella abortus pcr detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. Brazilian Journal of Microbiology. 2009;40(3):480-9.

15.Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet J-Y, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of Brucella spp: past, present and future. Veterinary microbiology. 2002;90(1):229-47.

16.Seco-Mediavilla P, Verger J-M, Grayon M, Cloeckaert A, Marín CM, Zygmunt MS, et al. Epitope mapping of the Brucella melitensis BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2003;10(4):647-51.

17.Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, Snellings NJ, Rubin FA, Van De Verg LL, et al. Cloning of a Brucella melitensis group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. Infection and immunity. 1996;64(7):2490-9.