بهینه‌سازی استخراج لیپوپلی‌ساکارید سویه خشن بروسلاآبورتوس به روش فنل-کلروفورم-پترولیوم اتر

سعید عالمیان[1*]، آرمین کلانتری[1]

۱- بخش تحقیق و تولید واکسن و آنتی ژن‌های بروسلوز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۵ مهر ۱۳۹۸، بازنگری:۲۴ مهر ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۳۰ مهر ۱۳۹۸

چکیده

بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده که یک تهدید برای بهداشت عمومی و همچنین صنعت پرورش دام محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی روش استخراج لیپو پلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس سویه خشن که می‌توان از آن به عنوان آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص گاوهای واکسینه با این واکسن استفاده نمود. این مطالعه کاربردی در آزمایشگاه تحقیق و تولید بخش بروسلوز انجام شد. به این منظور ابتدا سویه خشن با روش کشت در محیط اختصاصی بروسلا آگار تکثیر و با روش PCR مورد تأیید نهایی قرار گرفت و لیپو پلی‌ساکارید خشن باکتری بروسلا آبورتوس به روش فنل - کلروفورم - پترولیوم اتر استخراج گردید و نتایج حاصل از استخراج LPS خشن به کمک روش‌های LAL و PAGE – SDS مورد تائید قرار گرفت. در روش فنل - کلروفورم - پترولیوم اتر لیپو پلی‌ساکارید خشن پس از استخراج و ترسیب با محلول متانول تست LAL صورت گرفت که ایجاد لخته، نشانگر وجود LPS بود. همچنین الکتروفورز در ژل (پلی آکریلامید ۱۴ درصد) با رنگ‌آمیزی نیترات نقره باندی کمتر از ۱۴ کیلو دالتون مشاهده گردید. بر اساس این مطالعه روش فنل - کلروفورم - پترولیوم اتر یک روش ایده آل جهت استخراج لیپو پلی‌ساکارید خشن (R-LPS) سویه خشن بوده و برای تهیه آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژیک و همچنین کیت الایزا جهت تشخیص گاوهای واکسینه با این واکسن استفاده می‌شود.

واژگان کلیدی: *بروسلا آبورتوس، سویه خشن، لیپو پلی‌ساکارید خشن ، LAL، SDS – PAGE*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: alamiansaeed@gmail.com

مقدمه

بروسلاها باکتری‌های گرم منفی، کوکوباسیل، داخل سلولی اختیاری، هوازی و سخت رشدی هستند که در گاو، گوسفند، بز و انسان ایجاد بروسلوزیس (بیماری مشترک بین انسان و دام) می‌کنند. دیوید بروس در ۲۶ دسامبر ۱۸۸۷ میلادی عامل بیماری را کشف نمود و میکروکوکوس ملیتنسیس (در ارتباط با نام یونانی جزیره مالت) نام‌گذاری کرد. بروسلاها در حال حاضر بر اساس خواص فنوتیپی و ژنتیکی به ۱۰ جنس طبقه‌بندی می‌شوند.

بروسلا آبورتوس عامل تب مالت گاوی می‌باشدکه در انسان ایجاد تب مواج می‌نماید، بروسلوز گاوی یکی از بیماری‌های بومی در ایران بوده که هم از نظر اقتصادی و هم از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت است. البته این بیماری توسط گونه‌های بروسلا ملی تنسیس، بروسلا سویس و بروسلا کنیس هم ایجاد می‌شود (۱۲).

پیشگیری از بیماری در انسان وابسته به کنترل بیماری در مخازن دامی است. این بیماری در گاو بیشتر توسط بروسلا آبورتوس به وجود می‌آید که علاوه بر اهمیت فراوان از نظر بهداشت و سلامت جامعه، به دلیل القای سقط جنین و کاهش تولید شیر باعث ایجاد خسارات اقتصادی قابل توجه به صنعت پرورش گاو می‌گردد. جهت کنترل بیماری بروسلوز در دام‌ها از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته استفاده می‌گردد. از جمله واکسن‌ها می‌توان به واکسن Rev.1 برای نشخوارکنندگان کوچک مانند گوسفند و بز و واکسن S19 در گاو و گوساله اشاره نمود (۱). از معایب این واکسن‌ها آن است که به دلیل فنوتیپ Smooth موجب تحریک تولید آنتی‌بادی‌های مداخله کننده در تست‌های سرولوژیک معمول شده و در نتیجه امکان تفریق تشخیص سرولوژیک دام‌های آلوده از واکسینه وجود ندارد. واکسن ایریبا (RB51) یک سویه خشن (Rough) بروسلا آبورتوس جهت واکسیناسیون گاوها می‌باشد که به علت مزایای قابل توجه- از جمله عدم تحریک تولید آنتی‌بادی‌های مداخله کننده در آزمایش‌های سرولوژی معمول تشخیص بروسلوز و در نتیجه امکان انجام همزمان برنامه‌های تست و کشتار و واکسیناسیون- در سال‌های اخیر جایگزین واکسن قدیمی S19 در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران شده است (۱۸). با این وجود، با توجه به این‌که در آزمایش‌های سرولوژی رایج از سویه‌های صاف (Smooth) به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده و آنتی‌بادی‌های ضد LPS صاف بروسلاها تشخیص داده می‌شوند، امکان شناسایی دام‌های واکسینه با سویه ایریبا که دارای LPS خشن می‌باشد، توسط این آزمایش‌ها وجود ندارد (۸، ۱۰).

لیپو پلی‌ساکارید ترکیب عمده دیوارهٔ سلولی همه باکتری‌های گرم منفی می‌باشد و حدود ۴۰ درصد از وزن غشاء خارجی را تشکیل داده و در استحکام آن نقش دارد. لیپو پلی‌ساکارید از سه بخش لیپید A بخش مرکزی و زنجیره O تشکیل شده است. خصوصیات اصلی لیپو پلی‌ساکارید، یعنی فعالیت اندوتوکسیک، تنظیم‌کنندگی ایمنی و تب‌زایی کاملاً شناخته شده می‌باشد (۴، ۵). در این راستا، به دلیل این‌که LPS بروسلاها مهم‌ترین جزء تحریک‌کننده پاسخ‌های هومورال بوده و عمده آنتی‌بادی‌های تولیدی در بدن میزبان علیه آن است، LPS خشن بروسلا آبوتوس سویه RB51 می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن در آزمایش‌های سرولوژی تشخیص دام‌های واکسینه با آن به کار گرفته شود (۲، ۴، ۶). استفاده از آنتی‌ژن خشن سویه RB51 در تست‌های سرولوژی می‌تواند راهی دقیق برای شناسایی گاوهای واکسینه با این سویه باشد. همچنین از این

آنتی‌ژن می‌توان جهت شناسایی سرولوژیک آلودگی با عوامل بروسلایی خشن از قبیل بروسلا اوویس (عامل التهاب بیضه در قوچ‌ها) و بروسلا کنیس (عامل بروسلوز در سگ که زئونوتیک نیز می‌باشد) استفاده نمود. در سال‌های اخیر روش‌های متفاوتی به منظور تشخیص پاسخ آنتی‌بادی علیه بروسلاها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این روش‌ها، به‌کارگیری آزمایش الیزای غیر مستقیم است که در مطالعات متعدد، مناسب بودن آن برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد LPS بروسلایی مورد تأیید مراکز تحقیقاتی معتبر قرار گرفته است (۷). استفاده از روش الیزای غیرمستقیم می‌تواند صحتی برای واکسیناسیون دام‌ها با سویه RB51 باشد که گامی اساسی جهت کنترل و مبارزه با بیماری بروسلوز باشد.

هدف از این مطالعه استخراج LPS خشن سویه واکسینال RB51 با روش روش فنل – کلروفورم - پترولیوم اترکه توسط تست Limulus Amebocyte Lysate (LAL) و SDS–PAGE مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی کاربردی در آزمایشگاه تحقیق و توسعه بخش واکسن و آنتی‌ژن‌های بروسلوز مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج انجام شد.

سویه واکسینال باکتری بروسلا آبورتوس RB51 در محیط اختصاصی بروسلا آگار روی بوآت‌های شیشه‌ای پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت انبوه کشت گردید. سپس اجرام توسط آب مقطر استریل همراه ساچمه شیک شدند تا جرم از سطح محیط جدا گردد. سپس سوسپانسیون در دور ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد و با استن سرد سه بار شستشو انجام گرفت و در آخر جرم همراه استن باقی‌مانده در پلیت استریل ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت زیر هود بیولوژیک قرار داده شد تا جرم کاملاً خشک گردد (۳).

PCR سویه RB51: سویه واکسینال باکتری بروسلا آبورتوس RB51 از کمپانی CZV اسپانیا تهیه گردید. تست PCR جهت تائید سویه واکسینال RB51 با پرایمرهای اختصاصی مورد تأیید قرار گرفت (۹).

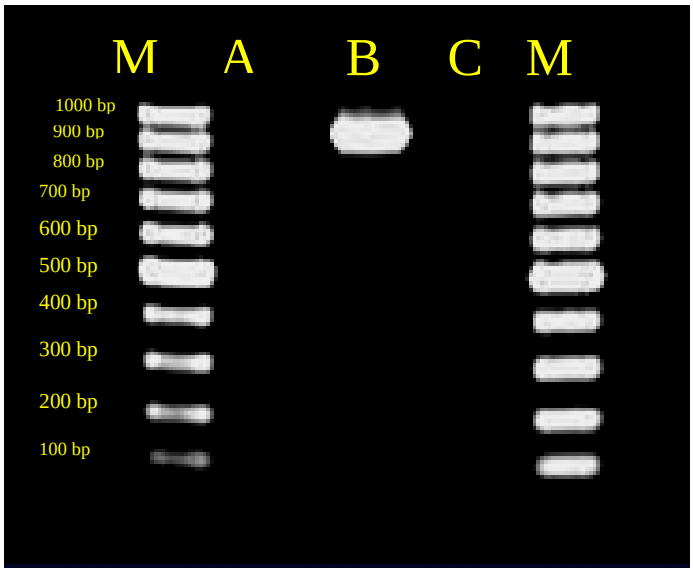
استخراج LPS خشن بروسلا آبورتوس سویه RB51 و ارزیابی آن: جهت استخراج از روش فنل – کلروفوم - پترولیوم اتر استفاده شد. در این مرحله برای بهینه‌سازی استخراج LPS از روش ترسیب استفاده شد به این صورت که ۵ برابر حجم به‌دست آمده، متانول سرد به همراه استات سدیم که در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود به سوسپانسیون اضافه شد و به مدت یک روز در فریزر مستقر گردید (۶). بعد از استخراج برای ارزیابی LPS، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون استخراج شده و ۰/۲ از کنترل مثبت کیت و ۰/۲ آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی به هر ویال جداگانه اضافه و کاملاً مخلوط گردیدند و محتویات ویال به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

SDS-PAGE : الکتروفورزیس لیپو پلی‌ساکارید در ژل ۱۴ درصد SDS-PAGE انجام گرفت به این صورت که مایع رویی و محتویات ترسیب داده شده به صورت جداگانه به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. سپس با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید (۱۱).

نتایج

در روش PCR که برای شناسایی ژن WboA با پرایمرهای اختصاصی Primers1: 5′ T T T A G T T T G C C G T A A T A TA G G T C T A G و Primers 2 : 5′ G C C A A A A CC T G T C3′ C C A A C C C A A A T G C T انجام گردید که

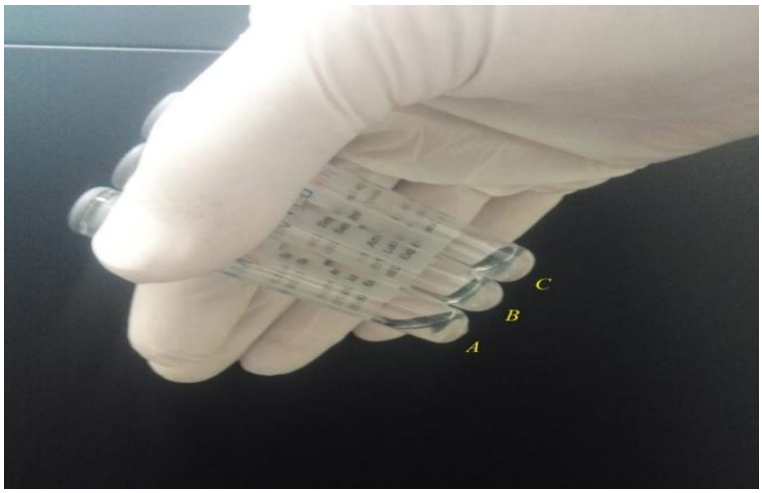
Anealling در ایـــن پروســـه بـــا دمـــای ۵۹/۵ درجـــه سـانتی‌گراد بهینه‌سـازی شـد و بـر روی آگـارز بـا غلظـت ۱ درصـد بانـدی بـه انـدازه ۹۰۰ bp کـه مؤیـد بـاکتری بروسلا آبورتـوس سـویهRB51 مـی‌باشـد. (شـکل شـماره ۱)



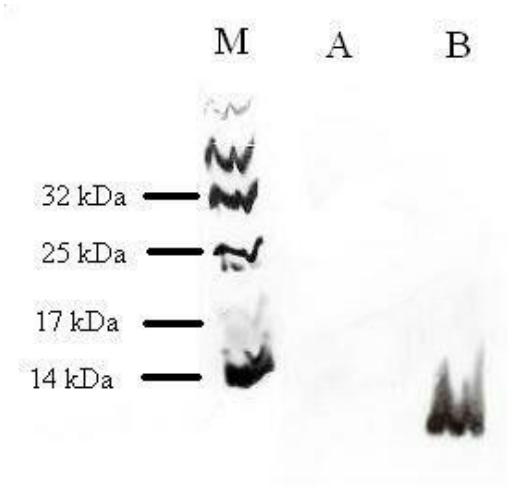
شکل ۱- نتایج الکتروفورز بروسلا آبورتوس سویه RB51. به ترتیب چاهک‌ها; M: مارکر 1000 bp (شرکت سیناژن). A : بروسلا آبورتوس سویه ۹۹ (کنترل مثبت). C : کنترل منفی. B : ژن WboA بروسلا آبورتوس سویه RB51 با وزن مولکولی 900 bp

LPS اســـتخراج شـــده بـــا روش فنـــل - کلروفـــوم - پترولیـــوم اتـــر بـــا تســـت (Limulus Amebocyte Lysate) LAL مـورد ارزیـابی قـرار گرفـت و نتـایج بـه شـکل ایجـاد لختـه در لولـه‌های حـاوی LPS اسـتخراج شده مشاهده گردید (شکل ۲).

تائیـد نهـایی LPS اسـتخراج شـده بـا روش – SDS PAGE در ژل ۱۴ درصـد صـورت پـذیرفت بـه ایـن صـورت کـه بانـدی کمتـر از ۱۴ کیلـو دالتـون مؤیـد حضور لیپو پلی‌سـاکارید خشـن بروسـلا آبورتـوس سـویه RB51 بود (شکل ۳).



شکل ۲- ژلاتینه شدن توسط اندوتوکسین لیپو پلی‌ساکارید خشن (R – LPS) بروسلا آبورتوس سویه A.RB51 : کنترل منفی. B : کنترل مثبت کیت.C : LPS بروسلا آبورتوس سویه RB51



شکل ۳- ژل ۱۴ درصد SDS-PAGE با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است A : استخراج لیپو پلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس سویه RB51 شده بدون ترسیب. B : استخراج لیپو پلی‌ساکارید بروسلا آبورتوس سویه RB51 با ترسیب استات سدیم و متانول وزن مولکولی کمتر از ۱۴ کیلو دالتون . M: مارکر پروتئین

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام می‌باشد که دارای چرخه انتقال بین حیوانات در حیات وحش و دام‌های اهلی می‌باشد. این بیماری در دام‌های اهلی باعث عوارضی از جمله سقط جنین، از دست دادن قدرت تولید مثل، کاهش شیر و کاهش وزن می‌گردد به همین جهت بهترین راه پیشگیری واکسیناسیون در دام است. سویه واکسینال بروسلا آبورتوس RB51 (ایریبا) با دارا بودن فنوتیپ خشن (Rough) که از مزایای قابل توجه آن می‌توان به عدم تحریک تولید آنتی‌بادی‌های مداخله کننده در آزمایش‌های سرولوژی معمول تشخیص بروسلوز و در نتیجه امکان انجام همزمان برنامه‌های تست و کشتار و واکسیناسیون، ثبات فنوتیپی، قابلیت استفاده از آن در دام بالغ و آبستن و بیماری‌زائی کم آن در انسان اشاره نمود. در این راستا، به دلیل این‌که LPS بروسلاها مهم‌ترین جزء تحریک کننده پاسخ‌های هومورال بوده و عمده آنتی‌بادی‌های تولیدی در بدن میزبان علیه آن است، LPS خشن بروسلا آبورتوس سویه RB51 می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن در آزمایش‌های سرولوژی تشخیص دام‌های واکسینه به کار گرفته شود.

در این مطالعه از سویه واکسینال RB51 کلکسیون میکروبی بخش بروسلوز مؤسسه رازی، استفاده گردید. برای استخراج لیپو پلی‌ساکارید خشن بروسلا آبورتوس سویه RB51 از روش فنل- کلروفورم- پترولیوم اتر استخراج گردید. نتایج به‌دست آمده از این مرحله با نتایج Nielsen و همکاران که از روش galanos برای استخراج LPS سویه RB51 استفاده کردند، مطابقت داشت. به منظور بالا بردن میزان کیفیت LPS تخلیص شده، بر طبق روش Moreno و همکاران عمل ترسیب توسط متانول سرد و استات سدیم صورت گرفت تا کیفیت LPS به‌دست آمده نسبت به روش‌های دیگر افزایش چشمگیری داشته باشد. LPS به‌دست آمده همچنین با تست LAL مورد ارزیابی قرار گرفت که باعث ایجاد لخته و دال بر وجود LPS– R (لیپو پلی‌ساکارید خشن) بروسلا آبورتوس سویه RB51 می‌باشد. همچنین از هر دو فاز، مایع رویی و مایع رسوب داده شده PAGE – SDS انجام گرفت که نشان داد مایع رویی فاقد LPS –R و مایع ترسیب داده شده حاوی LPS – R بروسلا آبورتوس سویه RB51 می‌باشد که در شکل ۳ نشان داده شده است.

بر اساس یافته‌های این پژوهش، دیواره خشن سویه واکسینال RB51 استخراج و تخلیص گردید که با به‌کارگیری روش‌های مختلف سایر محققین بهینه‌سازی آن صورت پذیرفت. به این صورت که مرحله ترسیب به منظور افزایش خلوص LPS به‌دست آمده به عنوان یک فرآیند تکمیلی به روش‌های ارایه شده توسط سایر محققین، به سایر مراحل تخلیص اضافه گردید. بنابراین می‌توان گفت از این آنتی‌ژن استخراج شده در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص گاوهای واکسینه با این سویه واکسن استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاری مدیران ارشد مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و همکاران بخش بروسلوز تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1- Avila-Calderon E D, Merino A L, Sriranganathan N, Boyle S M, Rodriguez C. A History of the Development of Brucella Vaccines. BioMed Research International. 2013; 8.

2- Diaz-Aparicio E, Arellano-Reynoso B, Herrera E, Hernandez M, Suarez-Games F. Characterization of the Transitory Immune Response in Cows Immunized with RB51 and its Implication on Diagnosis within Brucellosis EndemicZones. International Journal of Dairy Science. 2007; 2(4): 364-371.

3- Galanos C, Luderitz O, Westphal O. A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides. European Journal Biochem. 1969; 245-249.

4- Kreutzer D, Buller C S, Robertson D C. Chemical Characterization and Biological Properties of Lipopolysaccharides Isolated from Smooth and Rough Strains of Brucella abortus. Infection and Immunity. 1979; 23(3): 811-8.

5- Moreno E, Sherry S L, Jones L, Berman D. Immunochemical Characterization of Brucella Lipopolysaccharides and Polysacharides. Infection and Immunity. 1981; 222-241.

6- Moreno E, Pitt M, Jones L, Schurig G, Berman D. Purification and Characterization of Smooth and Rough Lipopolysaccharides from Brucella abortus. Journal of Bacteriology. 1979; 361-369.

7- Nielsen K, Smith P, Conde S, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G. and *et. al.* Rogh Lipopolysaccharide of Brucella abortus SRB51 as a common Antigen for Serologicsl Detection of B. ovis, B. canis, and B. abortus SRB51 Expoure Using Indirect Enzyme Immunoassay and Flurescence Polarization. Journal of Immunoassay. 2004; 25(2):171-182.

8- Robles C A, Nielsen K, Willems P. Evaluation of three different antigens in an indirect enzyme- linked immunoassay for the detection of antibodies, against, Brucella, abortus SRB51 in vaccinated heifers. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2009; 127(1-2): 153-155.

9- Ramesh V, Yongqun H, Larissa S B, Schuring G G. Complementation of Brucella abortus Strain RB51 with a functional WboA Gene Results in O – Antigen Synthesis and Enhanced Vaccine Efficacy but No Change in Rough Phenotype and Attenuation. Infect Immun. 2000; 68(7): 3927-3932.

10- Wang Z, Wu Q. Research progress in live attenuated Brucella vaccine development. Curr Pharm Biotechnol. 2013; 14(10): 87-96.

11- Xinghang Y. and *et al.* Progress in Brucella Vaccine Development. Front . Biol. 2013; 8: 60-77.

12- Zowghi E. Proceeding of Second Iranian National congress of Brucellosis,Shahid Beheshti. University of Medical Sciences, 2007 [in Persian].

Optimization of Rough Lipopolysaccharide Extraction from *Brucella abortus* by Phenol – Chloroform - Petroleum ether

Saeed Alamian [1*], Armin Kalantari [1]

1- Brucellosis Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI); Agricultural Research, Educationand Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Receive: September 27, 2019; Revise: October 16, 2019; Accept: October 22, 2019

Summary

Brucellosis is an important zoonotic disease which threatens public health and livestock industry. The aim of this study was to optimize extraction of rough lipopolysaccharide from *Brucella abortus* which can be used as the antigen for the development of serological tests to diagnose vaccinated animals. This applied study was performed in the Brucellosis Research and Production Laboratory. For this purpose, the rough strain was cultured in Brucella agar specific medium and final diagnosis was performed by PCR method. The rough lipopolysaccharide of Brucella abortus was extracted by phenol-chloroform-petroleum ether method and the results of rough LPS extraction were approved by LAL and SDS - PAGE methods. Extraction and precipitation of Lipopolysaccharide with cold methanol and sodium acetate was performed by using Phenol – Chloroform - Petroleum ether method. Then Lipopolysaccharide was identified by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test and formation of clots indicated presence of Lipopolysaccharide. Also SDS – PAGE (14 % Polyacrylamide gel) followed by silver nitrate staining showed a 12 KDa band which indicates Rough Lipopolysaccharide. According to the results of this study, it seems that Phenol – Chloroform - Petroleum ether method is an excellent method for extraction of rough LPS of antigen for the development of serological tests and ELISA Kit to diagnose vaccinated animals.

Keywords: *Brucella abortus, Rough Lipopolysaccharide, LAL, SDS-PAGE*