مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۲/هفته اول شهریور ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۰

ارزیابی توانایی پروتئین نوترکیب Omp۳۱ بروسلا ملی تنسیس در تکثیر سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده در شرایط آزمایشگاه

دکتر امیر قاسمی[۱]، دکتر محمد حسین سالاری[۲]، دکتر امیرحسن زرنانی[۳]،
دکتر محمود جدی تهرانی[۴]، دکتر رضا رنجبر[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بروسلا یک عامل بیماری‌زا و تهدید کننده‌ی سلامتی برای انسان و احشام در کشورهای در حال توسعه است. سویه‌های تخفیف حدت یافته‌ی بروسلا، امروزه به عنوان واکسن‌هایی برای جلوگیری و کنترل بروسلوز در حیوانات به کار می‌رود. اما به دلیل مشکلات حاصل از این واکسن‌ها، شناسایی کاندیداهای جدید به منظور توسعه‌ی واکسنی زیر واحد مورد نظر است. ایمنی سلولی، ایمنی غالب در حفاظت حیوان علیه بروسلوزیس است. از این رو، کاندیداهای مد نظر باید بتوانند سیستم ایمنی سلولی را تحریک و در آن نسبت به خود خاطره ایجاد کنند. یکی از روش‌هایی که به منظور بررسی قدرت ایجاد خاطره در سلول‌های T به وسیله‌ی آنتی‌ژن استفاده می‌شود، آزمایش بررسی تکثیر می‌باشد. در این مطالعه، تکثیر سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با پروتئین Omp۳۱ بروسلا ملی تنسیس با استفاده از دو روش ارزیابی تکثیر بر مبنای استفاده از ۳-(۵,۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵,۲- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) و (۳,۲)-bis-(۲-methoxy-۴-nitro-۵-sulphenyl)-(۲H)-tetrazolium-۵-Carboxanil ide (XTT) بررسی شد.

روش‌ها: موش‌های BalB/c با استفاده از PBS (Phosphate buffered saline)، Omp۳۱ نوترکیب و واکسن بروسلا ملی تنسیس Rev.۱ کشته شده ایمن شدند. ۳۰ روز پس از آخرین تزریق، موش‌ها کشته شدند و طحال آن‌ها جدا گردید. سلول‌های تک هسته‌ای طحال به دست آمده در مجاورت Omp۳۱ (۲/۵ µg/ml و ۵) نوترکیب قرار گرفتند. میزان تکثیر با اضافه کردن محلول‌های XTT یا MTT اندازه‌گیری و تغییر رنگ حاصل شد.

یافته‌ها: لنفوسیت‌های طحال موش‌هایی که با پروتئین نوترکیب Omp۳۱ ایمن شده بودند، بعد از مواجهه‌ی مجدد با این آنتی‌ژن، شروع به تکثیر کردند و این تکثیر، تفاوت معنی‌داری با تکثیر طحال موش‌های ایمن شده با PBS نشان می‌داد ($P < ۰/۰۱۰$). علاوه بر این، طحال موش‌های ایمن شده با Rev.۱ در مقایسه با گروه PBS تکثیر بیشتری نشان داد ($P < ۰/۰۱۰$). همچنین سهولت استفاده از آزمایش ارزیابی تکثیر با استفاده از XTT نیز نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: پروتئین Omp۳۱ توانایی تحریک ایمنی سلولی را دارد. علاوه بر این، آزمایش ارزیابی تکثیر با استفاده از رنگ XTT، آزمایشی راحت و ساده به منظور ارزیابی تکثیر سلول‌های طحال می‌باشد.

واژگان کلیدی: واکسن، پروتئین نوترکیب، سلول‌های طحالی، ارزیابی تکثیر

ارجاع: قاسمی امیر، سالاری محمد حسین، زرنانی امیرحسن، جدی تهرانی محمود، رنجبر رضا. **ارزیابی توانایی پروتئین نوترکیب Omp۳۱ بروسلا ملی تنسیس در تکثیر سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده در شرایط آزمایشگاه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۲): ۱۰۳۶-۱۰۴۵

۱- استادیار، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲- استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، پژوهشکده‌ی نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین ابن سینا، جهاد دانشگاهی و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- استاد، پژوهشکده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین ابن سینا، جهاد دانشگاهی تهران، تهران، ایران
۵- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد حسین سالاری
Email: mhsalari2002@gmail.com

مقدمه

بروسلا باکتری بی‌هوازی اختیاری و عامل بروسلوزیس می‌باشد. امروزه بیماری بروسلوزیس به دلیل مشکلات زیادی که در جوامع در حال توسعه و به خصوص مدیترانه ایجاد کرده است، بسیار مورد توجه است (۱). واکسن‌های حاصل از سوش‌های زنده‌ی ضعیف شده، با وجود کارایی مناسب مشکلاتی از جمله بیماری‌زایی در انسان، تحریک سقط جنین با تزریق آن به حیوان باردار و همچنین، ایجاد آنتی‌بادی‌هایی در سرم خون حیوان ایمن شده را رقم می‌زند که در آزمایش‌های تشخیصی مشکلاتی ایجاد می‌کند (۶-۲).

به دلیل غلبه‌ی ایمنی سلولی در حفاظت میزبان علیه بروسلا، می‌توان از آنتی‌ژنی که بتواند سیستم ایمنی سلولی از جمله سلول‌های T را تحریک و ایجاد خاطره نماید، جهت ساختن واکسن‌های زیر واحد علیه بروسلا استفاده کرد. آزمایش ارزیابی تکثیر، روشی است که به شناسایی آنتی‌ژن‌هایی که توانایی تحریک سیستم ایمنی سلولی و ایجاد سلول‌های T خاطره‌ای را دارند، کمک می‌کند. آزمایش ارزیابی تکثیر، میزان تکثیر لنفوسیت‌های کشت داده شده در آزمایشگاه در واکنش به در معرض قرارگیری مجدد به وسیله‌ی آنتی‌ژن را نشان می‌دهد (۷).

لنفوسیت‌های T در واکنش به پپتیدهای آنتی‌ژنیک قرار گرفته بر روی MHC (Major histocompatibility complex) سلول‌های بیان کننده‌ی آنتی‌ژن، شروع به تکثیر می‌کنند.

تکثیر لنفوسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی در واکنش با آنتی‌ژن‌ها فقط زمانی رخ می‌دهد که میزبان از قبل با آن آنتی‌ژن ایمن شده و یا از بیماری حاصل از میکروارگانیسم حاوی آن آنتی‌ژن بهبود یافته باشد. بنابراین لنفوسیت‌های یک میزبان طبیعی نباید در برخورد با آنتی‌ژن خاص تکثیری نشان دهد. تکثیر سلول‌های T که هم می‌تواند $CD4^+$ و یا $CD8^+$ اختصاصی آنتی‌ژن باشد، یک روش اصلی برای ارزیابی توانایی عملکرد ایمنی سلولی در واکنش به تحریک‌های متفاوت است (۸).

بیشترین روش مورد استفاده به منظور ارزیابی تکثیر، استفاده از ۳H-thymidin می‌باشد. این روش دارای حساسیتی بالا است و جواب به دست آمده قابلیت تکرار پذیری دارد. این روش بر مبنای اندازه‌گیری میزان ۳H-thymidin در ساختار DNAهای تازه ساخته شده در هنگام تکثیر سلول است. البته این روش هم مشکلاتی دارد که خطراتی مانند استفاده از مواد رادیواکتیو، خطرناک بودن برای سلامت انسان و در نهایت مدیریت پسماندهای حاصل از این آزمایش از آن جمله‌اند.

به منظور اجتناب از این مشکلات و به حداقل رساندن استفاده از عوامل رادیواکتیو، تعدادی از روش‌های ارزیابی تکثیر لنفوسیت‌ها توسعه داده شده است. این روش‌ها شامل احیای نمک‌های تترازولیوم از قبیل ide -(۲H)-tetrazolium-۵-Carboxanil -(۳,۲)-bis-(۲-methoxy-۴-nitro-۵-sulphenyl) (XTT) و Diphenyltetrazolium Bromide) -۵,۲- (۳-(۵,۴-Dimethylthiazol-۲-yl) (MTT)، استفاده از یک آنالوگ پیریمیدین مانند ۵-Bromodeoxyuridine و ردیابی آن در ساختار DNAهای تازه تشکیل یافته، اندازه‌گیری میزان تغییرات هگزوآمینیداز لیزوزومی (آزمایش NAG یا

(Net acid generation test) و ردیابی آنتی‌ژن‌های مرتبط با تکثیر است (۹).

آزمایش ارزیابی تکثیر بر مبنای استفاده از XTT دارای منافع زیادی است که از آن جمله می‌توان به استفاده نکردن از مواد رادیواکتیو، ساده بودن و همچنین اختصاصیت بالای آن اشاره کرد (۱۰). با وجود سهولت استفاده از این روش نسبت به روش‌های دیگر، از این آزمایش به منظور شناسایی آنتی‌ژن‌های بروسلایی که می‌توانند باعث تکثیر لنفوسیت‌های خاطره‌ای شوند، استفاده نشده است. حفاظت نسبی علیه عفونت با بروسلا ملی تنسیس در موش‌های ایمن شده با Omp۳۱ بروسلا ملی تنسیس نشان داده شده است (۱۲-۱۱) و همچنین آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این آنتی‌ژن می‌تواند حیوان را علیه عفونت با بروسلا ملی تنسیس محافظت نماید (۱۴-۱۳).

همچنین ثابت شده است که پروتئین نوترکیب Omp۳۱ می‌تواند با سرم خرگوش ایمن شده با سوش واکسن بروسلا ملی تنسیس واکنش دهد (۱۵). از این رو، در مطالعه‌ی حاضر به بررسی تکثیر لنفوسیت‌های موش‌های ایمن شده در مواجهه با پروتئین نوترکیب Omp۳۱ با استفاده از دو روش XTT و MTT پرداخته شد.

روش‌ها

روش ایمن‌سازی موش‌ها با استفاده از آنتی‌ژن نوترکیب و سوش واکسن، پیشتر توسط Delpino و همکاران گزارش شده است (۱۶). از این رو ۳ گروه موش (هر گروه شامل ۵ موش) به نام‌های A، B و C تعریف شد. در روز صفر به گروه A، ۳۰ µg پروتئین نوترکیب Omp۳۱ (۱۸-۱۷)، به گروه B سوش واکسن کشته شده‌ی بروسلا ملی تنسیس Rev.۱ همراه با ادجوانت ناقص فروند، و به گروه C، PBS (Phosphate buffered saline) همراه با ادجوانت کامل از طریق صفاقی تزریق شد. در روز ۱۵ به گروه‌های A و C تزریق‌ها همراه با ادجوانت ناقص فروند تکرار شد.

تهیه‌ی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs یا Mononuclear cells) از طحال

بعد از ۴۵ روز از اولین تزریق، موش‌ها در زیر هود ابتدا از طریق گردن، فلج و در نهایت کشته شدند. بعد از ضد عفونی کردن با الکل ۷۰ درصد، به منظور تهیه‌ی سلول‌های MNCs، بلافاصله طحال آن‌ها جدا و سلول‌های طحال به دست آمد. به سلول‌های طحال ۱۰ cc PBS حاوی ۵ درصد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) سرد اضافه شد و سانتریفیوژ گردید (۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه). این عمل یک بار دیگر انجام گرفت. سپس مایع رویی دور ریخته شد و این بار ۵ cc PBS-EDTA سرد به سلول‌ها اضافه و سعی شد با احتیاط سلول‌ها دوباره به حالت سوسپانسیون درآید. با دقت این سوسپانسیون سلول‌های طحال به ۵ cc فایکول استریل اضافه گردید؛ به نحوی که سوسپانسیون روی فایکول قرار بگیرد. در ادامه، ترکیب به دست آمده سانتریفیوژ گردید. سعی شد برنامه‌ی دستگاه طوری تنظیم شود که دستگاه به آرامی سرعت بگیرد (۸۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه).

در ادامه، هاله‌ی سفید بین دو مرحله با دقت بسیار بالا با پیپت پاستور جدا گردید و یک بار دیگر با PBS-EDTA سرد شستشو داده شد. سپس سلول‌ها شمارش و همراه محیط DMEM (Sigma, USA)

(Dulbecco's modified Eagle's medium) بدون فنل رد در داخل هر چاهک تقسیم شد. تعداد سلول در هر چاهک ۲×۱۰^{۵} در ۱۰۰ µl محیط کشت DMEM بدون فنل رد بود. سعی شد تا حد امکان زنجیره‌ی سرد در مراحل یاد شده رعایت شود (۴ °C) (۲۰-۱۹).

آزمایش XTT

روش انجام آزمایش ارزیابی تکثیر سلولی با استفاده از XTT پیشتر نشان داده شده است (۲۱). از این رو به منظور بررسی نحوه‌ی پاسخ‌دهی سلول‌های طحالی به پروتئین توترکیب Omp۳۱، سلول‌های طحالی به دست آمده از هر گروه در مرحله‌ی قبل در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه تقسیم شدند. در هر چاهک، ۲۰۰ هزار سلول بعد از شمارش ریخته شد و برای هر گروه از ۳ چاهک استفاده گردید. سلول‌های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور دارای ۵ درصد $CO_۲$ در مجاورت Omp۳۱ (۲/۵ µg/ml و ۵)، کانکاوالین A (۳ µg/mL) و PBS (۳ چاهک برای هر کدام) قرار گرفتند.

محلول XTT از حل کردن ۱ mg/ml پودر XTT در محیط از پیش گرم شده تا حدود ۵۰ درجه DMEM بدون فنل رد به دست آمد. به ۵ cc از این محلول، ۲۵ µl محلول PMS ۵ mM (Phenazine methosulfate) (Sigma) اضافه شد. از این محلول به دست آمده، ۱۰۰ µl به هر چاهک اضافه گردید. بعد از اضافه کردن محلول XTT-PMS، پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ °C به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند و بعد از آن با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر جذب نوری آن‌ها خوانده شد. میزان SI (Stimulation index) با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

SI= (mean OD of Stimulated culture − mean OD of DMEM blank control)/ (mean OD of Unstimulated culture − mean OD of DMEM blank control)

آزمایش MTT

در روش MTT تغییر رنگ زرد به بنفش اساس تمایز بین سلول‌های زنده و مرده می‌باشد و مقدار جذب نوری هر چاهک مشخص کننده‌ی میزان این تبدیل رنگ ناشی از فعالیت دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده است (۱۱). محلول ترازولیوم از حل کردن ۵ mg پودر MTT (Sigma) در ۱ ml بافر PBS به دست آمد. این محلول با عبور از فیلتر ۰/۲۲ µm از عوامل آلاینده پاک شد که به مدت ۴ هفته در تاریکی قابل نگهداری می‌باشد (۱۱). همانند قسمت قبلی سلول‌های طحالی به دست آمده به تعداد ۲۰۰ هزار سلول در هر چاهک در مجاورت Omp۳۱، کانکاوالین A و PBS (۳ چاهک برای هر کدام) کشت داده شد. ۲۰ µl از محلول آماده‌ی MTT به هر چاهک افزوده شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C و سانتریفوژ (۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm)، محیط رویی برداشته شد. سپس ۱۰۰ µl دی متیل سولفوکساید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک افزوده شد و پس از ۱۵ دقیقه جذب نوری (OD یا Optical density) میکروپلیت توسط دستگاه، با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر جذب نوری آن‌ها خوانده شد (۲۲). برای به دست آوردن SI از فرمول پیش‌گفته استفاده شد.

آنالیز آماری

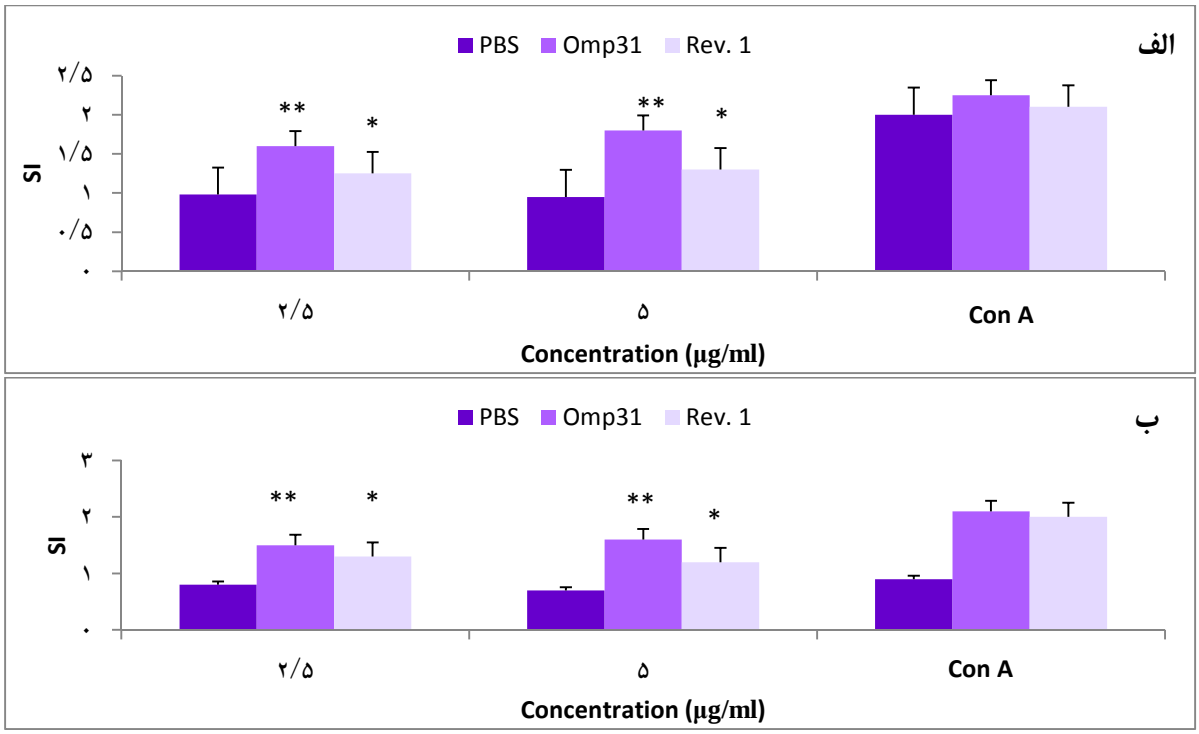
اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی شدند. نتایج بین گروه‌ها با آزمون ANOVA (Analysis of variance) مقایسه گردید و اختلاف $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به منظور بررسی توانایی پروتئین Omp۳۱ در ایجاد حافظه در سلول‌های ایمنی، آزمایش بررسی تکثیر سلول‌های طحالی انجام گرفت. در این مطالعه برای اولین بار در مورد آنتی‌ژن‌های باکتریایی از آزمایش ارزیابی تکثیر با استفاده از رنگ XTT استفاده شد.

بدین من ظور، ۳ گروه موش تعریف شد و هر گروه با Omp۳۱ (A)، Rev.۱ (B) و PBS (C) به ترتیب ایمن شدند.

بعد از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs) طحال و مجاورت دادن آن‌ها با Omp۳۱، کانکاوالین A و PBS، مشاهده گردید که سلول‌های طحالی جدا شده از موش‌های گروه A و B در پاسخ به تحریک با Omp۳۱ و کانکاوالین A شروع به تکثیر نمودند. در صورتی که تکثیری در پاسخ به PBS دیده نشد. اختلاف معنی‌داری میان SI حاصل از مجاورت سلول‌های طحالی گروه A ($P < ۰/۰۱۰$) و B ($P < ۰/۰۵۰$) با Omp۳۱ در مقایسه با گروه C دیده شد (شکل ۱ الف و ب).



شکل ۱. واکنش‌های تکثیری سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با Rev.1، پروتئین نوترکیب Omp۳۱ و PBS (Phosphate buffered saline) مجدد با غلظت های متفاوت پروتئین نوترکیب Omp31 نشان داده شده است.

الف:- نتایج حاصل از آزمایش XTT ب:- نتایج حاصل از آزمایش MTT

$P < ۰/۰۵۰$ ** ،$P < ۰/۰۱۰$ *

بحث

تاکنون آنتی‌ژن‌های متعددی به عنوان کاندیدا برای ساخت واکسن زیر واحد علیه عفونت حاصل از بروسلا معرفی شده‌اند. اما تنها تعداد کمی از این آنتی‌ژن‌ها توانسته‌اند حفاظت نسبی در موش‌های ایمن شده با این آنتی‌ژن‌ها ایجاد کنند (۳۳-۲۳، ۱۸).

این آنتی‌ژن‌ها بیشتر آنتی‌ژن‌هایی هستند که می‌توانند سیستم ایمنی سلولی را به خوبی تحریک کنند و این موضوع به دلیل غلبه‌ی ایمنی سلولی در حفاظت بدن علیه بروسلا می‌باشد، هر چند که سیتم ایمنی هومورال نیز در این زمینه نقش مهمی بر عهده دارد (۳۵-۳۴).

در مطالعاتی که تا کنون با استفاده از پروتئین نوترکیب Omp۳۱ صورت گرفته است، توانایی این آنتی‌ژن در تحریک تکثیر سلول‌های طحال موش ایمن شده اثبات نشده است. از این رو در این مطالعه برای اولین بار با استفاده از آزمایش ارزیابی تکثیر XTT و MTT نشان داده شد که این آنتی‌ژن می‌تواند آنتی‌ژنی باشد که علاوه بر تحریک سیستم ایمنی هومورال (۱۵)، ایمنی سلولی را نیز تحریک کند.

همچنین نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با Rev.۱، بعد از در معرض قرار گیری با Omp۳۱ در شرایط آزمایشگاهی شروع به تکثیر می‌کند که این تکثیر، اختلاف معنی‌داری با تکثیر سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با PBS دارد ($P < ۰/۰۵۰$). این یافته نشان دهنده‌ی این است که آنتی‌ژن Omp۳۱ در فرایند ایمن‌سازی با استفاده از واکسن Rev.۱ نقش مهمی بازی می‌کند. در همین راستا، در مطالعاتی که پیش از این بر روی بررسی نقش حفاظت‌بخشی Omp۳۱ در حیوانات آزمایشگاهی ایمن شده با این آنتی‌ژن در مقابل عفونت بروسلا ملی تنسیس انجام شده است، به توانایی این آنتی‌ژن در ایجاد حفاظت نسبی علیه عفونت بروسلوزیس حاصل از بروسلا ملی تنسیس اشاره شده است (۳۶، ۱۸، ۱۲).

بنابراین نتایج این مطالعه ضمن تأیید نتایج منتشر شده‌ی قبل، بر اهمیت استفاده از این آنتی‌ژن در ساخت واکسن زیر واحدی علیه عفونت بروسلا ملی تنسیس تأکید دارد. در این مطالعه سعی شد از روش ارزیابی تکثیر با استفاده از XTT نیز به منظور بررسی تکثیر سلول‌های طحالی استفاده شود. آزمایش بررسی تکثیر با استفاده از XTT، روشی بیوشیمیایی بر مبنای فعالیت آنزیم‌های میتوکندری است که در مدت کوتاهی پس از مرگ سلول‌ها غیر فعال می‌شوند. بعد از احیای XTT به وسیله آنزیم‌های میتوکندریایی، XTT تبدیل به ترکیبی نارنجی رنگ و محلولی به نام فورمازان (Formazan) می‌شود که میزان غلظت این رنگ نشان دهنده‌ی تعداد سلول‌ها است که می‌توان OD آن را در طول موج ۴۹۲ نانومتر خواند (۳۷). به منظور بهینه کردن فعالیت XTT از یک پذیرنده‌ی میانی الکترون به نام PMS استفاده می‌شود که این پذیرنده با وجود بالا بردن کارآیی آزمایش، هیچ گونه اثر منفی بر روی عملکرد XTT ندارد (۳۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که این آزمایش می‌تواند به خوبی تکثیر سلول‌های تحریک شده را مانند آزمایش MTT نشان دهد. اما این آزمایش وقت و زمان کمتری برای انجام آن نیاز دارد. از این رو می‌تواند انتخاب بهتری برای انجام آزمایش بررسی تکثیر باشد. مطالعات صورت گرفته در ارتباط با آزمایش بررسی تکثیر سلولی با استفاده از XTT بر اهمیت و کارآیی بالای این

آزمایش اشاره کرده‌اند (۴۰–۳۹، ۲۱).

نتایج این مطالعه بر ضرورت استفاده از Omp۳۱ در ساخت واکسنی زیر واحد علیه عفونت بروسلا ملی تنسیس اشاره دارد. علاوه بر این، XTT می‌تواند یک آزمایش قابل اعتماد، تکرار پذیر و راحت در ارزیابی تکثیر سلول‌های طحال موش باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط گرانت‌های پژوهشی از دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره‌ی ۸۷۲۳ و پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین ابن سینا به شماره‌ی ۴۹–۸۸ حمایت شده است.

References

1. Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in Brucella species. J Bacteriol 2004; 186(15): 5040-51.
2. Ghasemi A, Ranjbar R, Amani J. In silico analysis of chimeric TF, Omp31 and BP26 fragments of Brucella melitensis for development of a multi subunit vaccine candidate. Iran J Basic Med Sci 2014; 17(3): 172-80.
3. Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, Lopez-Goni I, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet Res 2004; 35(1): 1-38.
4. Jimenez de Bagues MP, Marin CM, Blasco JM, Moriyon I, Gamazo C. An ELISA with Brucella lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of B. melitensis infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival B. melitensis strain Rev 1 vaccination. Vet Microbiol 1992; 30(2-3): 233-41.
5. Baldi PC, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Abdon LF, Velikovsky CA, Kittelberger R, et al. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of Brucella abortus in cattle vaccinated with B. abortus S19 or experimentally infected with Yersinia enterocolitica serotype 0:9. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3(4): 472-6.
6. Blasco JM, Diaz R. Brucella melitensis Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. Lancet 1993; 342(8874): 805.
7. Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. Allergy 2004; 59(8): 809-20.
8. Froebel KS, Pakker NG, Aiuti F, Bofill M, Choremi-Papadopoulou H, Economidou J, et al. Standardisation and quality assurance of lymphocyte proliferation assays for use in the assessment of immune function. European Concerted Action on Immunological and Virological Markers of HIV Disease Progression. J Immunol Methods 1999; 227(1-2): 85-97.
9. Yu HG, Chung H, Yu YS, Seo JM, Heo JW. A new rapid and non-radioactive assay for monitoring and determining the proliferation of retinal pigment epithelial cells. Korean J Ophthalmol 2003; 17(1): 29-34.
10. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 506-8.
11. Sadeghifard N, Aslani MM, Ghasemi A. Comparison of different laboratory methods for diagnosis of helicobacter pylori. Journal of Biological Sciences 2006; 6(6): 1146-9.
12. Estein SM, Cassataro J, Vizcaino N, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Bowden RA. The recombinant Omp31 from Brucella melitensis alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against Brucella ovis infection in BALB/c mice. Microbes Infect 2003; 5(2): 85-93.
13. Jacques I, Cloeckaert A, Limet JN, Dubray G. Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smooth lipopolysaccharide of Brucella. J Med Microbiol 1992; 37(2): 100-3.
14. Cloeckaert A, Jacques I, Bosseray N, Limet JN, Bowden R, Dubray G, et al. Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of Brucella. J Med Microbiol 1991; 34(3): 175-80.
15. Ghasemi A, Salari MH, Zarnani AH, Pourmand MR, Ahmadi H, Mirshafiey A, et al. Immune reactivity of Brucella melitensis-vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins. Iran J Microbiol 2013; 5(1): 19-23.
16. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with Brucella

recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against Brucella abortus infection in BALB/c mice. Vaccine 2007; 25(37-38): 6721-9.
17. Ghasemi A, Salari MH, Pourmand MR, Zarnani AH, Ahmadi H, Shirazi MH, et al. Optimization and Efficient Purification in Production of Brucella melitensis Recombinant HSP and TF Proteins With Low Endotoxin Contents. Jundishapur J Microbiol 2013; 6(7 SP e6875).
18. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovsky CA, de la Barrera S, et al. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against B. ovis than Rev.1 vaccination. Vaccine 2007; 25(22): 4437-46.
19. Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, et al. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World J Gastroenterol 2007; 13(2): 236-43.
20. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1999; 265(1): 144-50.
21. Hojjat-Farsangi M, Ghaemimanesh F, Daneshmanesh AH, Bayat AA, Mahmoudian J, Jeddi-Tehrani M, et al. Inhibition of the receptor tyrosine kinase ROR1 by anti-ROR1 monoclonal antibodies and siRNA induced apoptosis of melanoma cells. PLoS One 2013; 8(4): e61167.
22. Slavotinek A, McMillan TJ, Steel CM. Measurement of radiation survival using the MTT assay. Eur J Cancer 1994; 30A(9): 1376-82.
23. Ghasemi A, Salari MH, Zarnani AH, Pourmand MR, Ahmadi H, Shirazi MH, et al. Immunogenicity assessment of Brucella mellitensis HSP and TF proteins by immunized rabbit serum. Iran J Allergy Asthma Immunol 2013; 12(2): 192-4.
24. Yang Y, Yin J, Guo D, Lang X, Wang X. Immunization of mice with recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase protein confers protection against Brucella melitensis infection. FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 61(2): 159-67.
25. Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, MacMillan AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding Brucella melitensis 16M genes. Vaccine 2007; 25(1): 43-54.
26. Luo D, Ni B, Li P, Shi W, Zhang S, Han Y, et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of Brucella abortus in BALB/c mice. Infect Immun 2006; 74(5): 2734-41.
27. Yang X, Hudson M, Walters N, Bargatze RF, Pascual DW. Selection of protective epitopes for Brucella melitensis by DNA vaccination. Infect Immun 2005; 73(11): 7297-303.
28. Araya LN, Winter AJ. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of Brucella abortus by passive transfer of immune T cells or serum. Infect Immun 1990; 58(1): 254-6.
29. Velikovsky CA, Goldbaum FA, Cassataro J, Estein S, Bowden RA, Bruno L, et al. Brucella lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with Brucella abortus 544 independently of the adjuvant formulation used. Infect Immun 2003; 71(10): 5750-5.
30. Al-Mariri A, Tibor A, Mertens P, De B, X, Michel P, Godefroid J, et al. Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. Infect Immun 2001; 69(8): 4816-22.
31. Cespedes S, Andrews E, Folch H, Onate A. Identification and partial characterisation of a new protective antigen of Brucella abortus. J Med Microbiol 2000; 49(2): 165-70.
32. Tabatabai LB, Pugh GW, Jr. Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. Vaccine 1994; 12(10): 919-24.
33. Oliveira SC, Splitter GA. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against Brucella abortus infection. Vaccine 1996; 14(10): 959-62.
34. Hoover DL, Crawford RM, Van De Verg LL, Izadjoo MJ, Bhattacharjee AK, Paranavitana CM, et al. Protection of mice against brucellosis by vaccination with Brucella melitensis WR201(16MDeltapurEK). Infect Immun 1999; 67(11): 5877-84.
35. Letesson JJ, Tibor A, van Eynde G, Wansard V, Weynants V, Denoel P, et al. Humoral immune responses of Brucella-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant Brucella proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4(5): 556-64.
36. Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody reactivity to Omp31 from Brucella melitensis in human and animal infections by smooth and rough Brucellae. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11(1): 111-4.
37. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical

assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regul 1995; 5(2): 69-84.
38. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res 1988; 48(17): 4827-33.
39. Liu SB, Hu PZ, Hou Y, Li P, Cao W, Tian Q. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes the proliferation of mesenchymal stem cells in vivo and in vitro. Chin Med J (Engl) 2009; 122(7): 839-43.
40. Ghasemi A, Zarnani AH, Ghoodjani A, Rezania S, Salari MH, Jeddi-Tehrani M. Identification of a new immunogenic candidate conferring protection against Brucella melitensis infection in Mice. Mol Immunol. 2014; 62(1): 142-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 14.04.2014
Vol. 32, No. 292, 1st Week, September 2014
Accepted: 11.07.2014

In-Vitro Potential of Recombinant Omp31 Protein from Brucella Melitensis in Inducing the Proliferation of Immunized Mouse Lymphocytes

Amir Ghasemi PhD[1], Mohammad Hossein Salari PhD[2], Amir Hassan Zarnani PhD[3], Mahmood Jeddi-Tehrani PhD[4], Reza Ranjbar PhD[5]

Original Article

Abstract

Background: Brucella melitensis infection is still a major health problem for human and cattle in developing countries and the Middle East. Cell-mediated immunity is the dominant immune response required for protection against brucellosis. So, identifying of new candidates which can induce cell-mediated immunity is demanded. Proliferation assay is one of the methods used to evaluate the potential of an antigen to generate memory T-cell. In the present study, the proliferation of speloncyets obtained from immunized mice was evaluated when they were challenged by recombinant Omp31 (rOmp31) in vitro.

Methods: Mice were immunized by phosphate buffered saline (PBS), rOmp31 and formalin-killed Brucella melitensis Rev.1 with Freund's adjuvant. At the day 30, after the last immunization, spleens were removed and homogenized. Purified rOmp31 (2.5 and 5 µg/ml) was added to 2×10^5 spleen cells and then, the speloncytes were incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 48 hours, XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] and MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assays were used to show the splenocyte proliferation.

Findings: The splenocytes of mice immunized with rOmp31or Rev.1 started to proliferate after stimulation with rOmp31. There was a significant difference between SIs obtained from rOmp31 and Rev compared to phosphate buffered saline group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively).

Conclusion: Based on our findings, rOmp31 could generate a good memory cellular immune response. In addition, the method described here to study the speloncyte proliferation using XTT, is a simple and efficient method.

Keywords: Brucella, Vaccine, Recombinant protein, Splenocyte, Proliferation assay

Citation: Ghasemi A, Salari MH, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Ranjbar R. **In-Vitro Potential of Recombinant Omp31 Protein from Brucella Melitensis in Inducing the Proliferation of Immunized Mouse Lymphocytes.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(292): 1036-45

1- Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Nanobiotechnology Research Center, Avecina Research Institute AND Immunology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Professor, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
5- Associate Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Mohammad Hossein Salari PhD, Email: mhsalari2002@gmail.com