مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۱، دوره ۶۷، شماره ۴، ۳۸۵-۳۸۱

شناسایی آنتی ژن‌های پیکره مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس

رسول مدنی[۱*] شبنم آزاده[۲] نادر مصوری[۳] مصطفی جعفرپور[۲] فریبا گلچین فر[۱] تارا امامی[۱] روح الله کشاورز[۳]

۱) بخش بیوشیمی و پروتئومیکس، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران.
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، مازندران - ایران.
۳) بخش توبرکولین، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۷ بهمن ماه ۱۳۹۰ ، پذیرش نهایی: ۱۸ اردیبهشت ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس نوعی آنتریت گرنولوماتوزی مزمن در نشخوارکنندگان با عامل مسبب مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP) است. به نظر می رسد شناسایی آنتی ژن های پیکره ای این باکتری می تواند جهت طراحی واکسن، تشخیص بیماری و مطالعه پاتوژنز این بیماری مفید باشد. **هدف:** شناسایی پروتئین های پیکره باکتری به عنوان آنتی ژن اصلی جهت شناخت بهتر عملکرد باکتری حائز اهمیت است. **روش کار:** در این تحقیق از سویه استاندارد III-V مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP) نمونه حاصل از کشت میکروبی پس از استخراج DNA و انجام عملیات PCR جهت ثبوت و تائید باکتری روی ژل آگارز برده شد و میزان پروتئین های تصفیه شده در مایه صاف شده حاصل از محیط کشت میکروبی و همچنین عصاره باکتریایی تعیین مقدار گردیدند. از سوی دیگر الگوی پروتئین های حاصله با استفاده از SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. **نتایج:** الکتروفورز حکایت از حضور آنتی ژن های پروتیئین در محدوده وزن ملکولی KDa ۱۰۰-۱۹ دارد. **نتیجه‌گیری نهایی:** آنتی ژن های تخلیص شده در این مطالعه می تواند جهت انجام مطالعات بیشتر و تولید احتمالی واکسن علیه پاراتوبرکلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی ژن پیکره، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس، الکتروفورز.

مقدمه

بیماری یون (Johne) یا پاراتوبرکلوزیس نوعی آنتریت گرانولوماتوزی مزمن می باشد که توسط باکتری مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*) (MAP) ایجاد می شود(۱۱)، MAP یک باکتری اسیدفست کوچکتر از باسیل سل و بسیار کندرشد (۲،۱۳) است که معمولاً در بافت ها و مدفوع به صورت مجتمع مشاهده می شود و هر توده حاوی تعداد بسیار زیادی از این باکتری می باشد. این وضعیت استقرار به شناسایی باکتری کمک می کند این باکتری به شدت مقاوم به اسید و الکل می باشد و فاقد کپسول یا اسپور بوده و پاتوژن داخل سلولی اختیاری است. خاصیت اسید فست بودن باکتری مربوط به وجود مقدار زیادی لیپید (۶۰٪) در دیواره باکتری است، در لیپید دیواره موم های رقیقی همراه با گلیکولیپیدها وجود دارد. بیماری یون شیوع بالائی در سراسر دنیا دارد و براساس مطالعات انجام گرفته کشور ما نیز در زمره مناطق با شیوع بالاست که منجر به ایجاد هزینه‌های جبران ناپذیر بر وضعیت دامپروری ایران شده است. این بیماری از عوامل مهم مرگ و میر در نشخوارکنندگان به خصوص گاو می باشد (۶،۷). این بیماری در کشورهای در حال توسعه اندمیک است (۴،۵) از زمان آلودگی تا بروز نشانه‌های بالینی مدت زمان قابل توجهی سپری می شود که با زیان های اقتصادی فراوانی چون کاهش شیر، کاهش تولید مثل، کاهش وزن و فراوانی رخداد دیگر بیماریها همراه می باشد. علاوه بر زیان های اقتصادی برخی از محققین معتقدند ارتباط احتمالی بین باکتری عامل بیماری یون و بیماری کرون انسان وجود دارد (۴) اکثر حیوانات در اوایل زندگی آلوده می شوند و راه انتقال عفونت عمدتاً راه مدفوعی، دهانی است. باکتری در مدفوع و شیر گاوهای آلوده دفع می شود. حتی گاوهای آلوده ممکن است از ۱۸ ماه قبل از بروز علائم بالینی باکتری را دفع کننده و گاوهای مبتلا به فرم بالینی می توانند تا ۵×۱۰^{۱۲} مایکوباکتریوم آویوم را از طریق مدفوع دفع کنند (۳،۷) پروتئین های ترشحی مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پارتوبرکلوزیس در فاز اولیه عفونت به عنوان نشانه‌های اصلی ایمنی در نظر گرفته شده است. پروتئین های باکتری در متابولیسم، سنتز دیواره سلولی، ورود و بقاء در ماکروفاژ، بیماریزایی یا ایمنی درگیر می باشند.

تعداد زیادی از آنتی ژن های این باکتری با مایکوباکتریوم آویوم و با واریته مایکوباکتریوم بویس مشترک هستند(۲). این باکتری با سایر گونه‌های مایکوباکتریوم و سایر جنس ها همانند نوکاردیا و کورینه باکتر آنتی ژن مشترک در دیواره سلولی دارد. آنتی ژن A به طور اختصاصی برای (MAP) شناسایی شده و توسط سرم دام‌های آلوده تشخیص داده می شود. در این مطالعه سه روش کشت میکروبی، فراهم کردن مایع

---

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۶-۳۴۵۷۰۰۳۸ - نمابر: ۰۲۶-۳۴۵۵۲۱۹۴ *Email: mr_madani@yahoo.com*

تصفیه شده کشت میکروبی برای تهیه آنتی ژن‌های مایع کشت و آنالیز SDS-PAGE برای استخراج آنتی ژن‌های باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش کار

کشت میکروبی: سویه استاندارد III-V در شرایط استریل به محیط میدل بروک 7H که با ۲ mg/ml مایکوباکتین غنی شده بود تلقیح شد. پس از کشت باکتری در دمای ۳۷^{o}C انکوبه شد سپس جهت عادت دادن باکتری به محیط مایع فاقد پروتئین از محیط دو فازی سیب زمینی و دورس هنلی استفاده شد و پس از ایجاد پرده به آرامی پرده به مایع دورسه هنلی انتقال داده شد. احتمال غرق شدن باکتری زمانی که باکتری مستقیم به محیط مایع انتقال داده می‌شود، افزایش خواهد یافت، بنابراین می توان نتیجه گرفت که انتقال به محیط سیب زمینی احتمال رشد باکتری را به دلیل شناور ماندن پرده رشد یافته از باکتری در سطح بیشتر می‌کند. از باکتری که به رشد ایستایی رسید و پس از تشکیل پرده یکنواخت روی سطح محیط به منظور تولید انبوه در شرایط استریل در ظروف کشت ۱ لیتری فرنباخ حاوی محیط دورسه هنله کشت مجدد تهیه شد و در انکوباتور ۳۷^{o}C به مدت ۳ ماه قرار گرفت. در طی این مدت جهت حصول اطمینان از چگونگی رشد باکتری و حذف محیط های آلوده به شکل منظم مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از اتمام دوره رشد گسترش میکروبی تهیه و توسط رنگ آمیزی ذیل نیلسون اسیدفست بودن و یکنواختی کشت تائید شد و برای تائید باکتری کشت یافته از روش PCR استفاده شد(۸). بدین منظور DNA باکتری به روش ایزوآمیل الکل و کلروفرم استخراج گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: برای تائید قطعه IS900 در ژنوم باکتری مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس رشد یافته از دو پرایمر اختصاصی P90 و P91 با سکانس های زیر استفاده شد.

P90:5'-GTTCGGGGCC GTCGCTTAGG -3'

P91:5'-GAGGTCGATC GCCACGTGA -3'

MgC12 1µl, (PH=8.4) Tris- H Cl 20mM, KCL 50Mm از هر پرایمر، ۲ واحد DNA پلیمر از Taq و DNA100ng الگو و برنامه PCR به شکل زیر اجرا شد:

۹۴^{o}C/۱′ (مرحله واسرشتگی اولیه)، ۳۵ چرخه: ۹۴^{o}C/۴۰′، ۶۵^{o}C/۱′ و ۷۲^{o}C/۱′ (مرحله گسترش نهایی).

پس از اتمام واکنش، محصولات PCR در ژل ۱٪ آگارز الکتروفور شدند و پس از رنگ آمیزی با ایتدیوم بروماید، ژل تحت اشعه UV بررسی شد. اندازه محصول PCR با جفت پرایمر P90/P91 400 جفت باز (bp) می‌باشد. از آب مقطر استریل به جای DNA به عنوان کنترل منفی و از MAP تایید شده به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

فیلتر نمودن مایع کشت باکتریائی: جهت تهیه مایع تصفیه شده کشت میکروبی ابتدا باکتری باید غیر فعال شود که بدین منظور فرن باخ حاوی باکتری رشد یافته در بن ماری ۱۰۰^{o}C به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند.

سپس برای تهیه عصاره سلولی محلول حاوی آنتی ژن‌های باکتری دو بار با محلول نمکی سالین حاوی توئین ۲۰ شستشو داده شدند. در هر مرحله شستشو سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس باکتری‌ها توزین شدند تا به ازای هر گرم باکتری Tris-Hcl ،۱mL (pH=7/5) اضافه شود، باکتری‌ها پس از ۱۰ دقیقه در Tris-Hcl کشته شدند در مرحله بعد به مدت ۱۵ دقیقه سونیکاسیون در دمای ۴^{o}C انجام گرفت و پس از، سونیکاسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲^{o}C، سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ انجام گرفت. محلول حاوی عصاره سلولی از صافی میلی پور ۴۵/۰µ عبور داده شد، در مرحله آخر دیالیز شیرابه استریل برای جداسازی املاح و مولکول های کوچک اضافه و تعویض محیط بافری محلول پروتئینی به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت (۳،۱۱).

الکتروفورز پروتئین: نمونه تهیه شده روی ژل SDS-PAGE ۱۰٪ برده شد و در کنار آن از سایز مارکر prestain ساخت شرکت Biorad جهت تعیین وزن مولکولی استفاده شد(۹،۱۲).

نتایج

نمونه تصفیه شده کشت میکروبی مورد سنجش پروتئینی قرار گرفت، بدین منظور از روش لوری استفاده شد(۱۰). در این روش از یک پروتئین معلوم به عنوان استاندارد استفاده می‌شود و سپس مقادیر پروتئین نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد تعیین می‌گردد. میزان پروتئین تصفیه شده حاصل از کشت میکروبی به روش لوری mg/ml ۳۴/۶۵ بود.

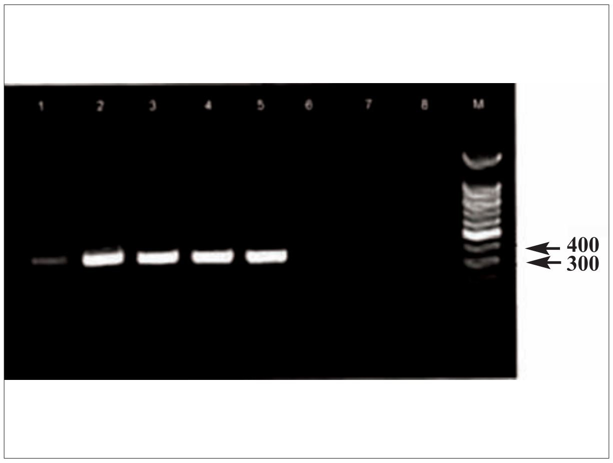
نمونه حاصل از کشت میکروبی پس از استخراج DNA و انجام عملیات PCR جهت ثبوت و تائید باکتری روی ژل آگارز برده شد و پس از رنگ آمیزی با ایتیدیوم تحت لامپ UV مشاهده شدند که نتایج حاصل از محصول PCR در تصویر ۱ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE نمونه پیکره باکتری در تصویر ۲ نشان داده شده است که شامل ۱۲ باند پروتئینی با وزن های kDa ۱۱۵، ۹۸، ۷۷، ۷۵، ۶۹/۵، ۵۳، ۴۷/۵، ۴۵، ۳۵، ۳۴، ۲۵، ۱۷ می‌باشد.

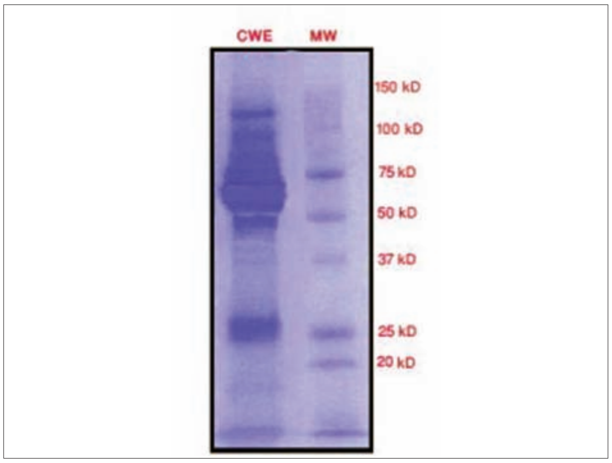
بحث

باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس یک باکتری کند رشد است که عامل بیماری یون می‌باشد، شناسائی آنتی ژن‌های پیکره باکتری و جداسازی آنها می تواند در بهینه‌سازی روش‌های تشخیص بیماری و یا تولید واکسن مناسب کمک کننده باشد.

Gumber و همکاران در سال ۲۰۰۷، پروتئین‌های مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس را با استفاده از بافرهای لیز کننده مختلف جدا نمود و مقایسه‌ای بین روش‌های مختلف انجام دادند و با استفاده از ژل



تصویر۱- تصویر ژل الکتروفورز مربوط به PCR با جفت پرایمرهای P90/P91 در این تصویر ردیف ۱ (از چپ به راست) (سایز مارکر) ۱۰۰bp (به ترتیب از بالا به پایین شامل باندهای با اندازه ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۲۰۰، ۱۰۳۱، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰جفت باز) در همه ردیف‌های محصول ۴۰۰ bp مربوط به جفت پرایمر P90/P91 مشاهده می‌شود.



تصویر۲- عکس از ژل الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) در مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (از راست به چپ) سایز مارکر و نمونه پروتئین پیکره مایکوباکتریوم می‌باشد که پروتئین پیکره شامل باندهای با وزن kDa ۱۱۵، ۹۸، ۷۷، ۶۹/۵،۷۵، ۵۳، ۴۷/۵، ۴۵، ۳۵، ۳۴، ۲۵، ۱۷ می‌باشد.

SDS-PAGE پروتئین‌های جدا شده را با هم مقایسه نمودند(۵).

در سال ۲۰۰۸، ۱۸ پروتئین از مایکوباکتریوم آویوم زیر گونه پاراتوبرکلوزیس توسط P.Bannantine به صورت نوترکیب ساخته شدند و از آن در تهیه کیت الایزا جهت تشخیص استفاده شد(۱).

Gumber و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۵ پروتئین از این باکتری را به روش نوترکیب تهیه نمودند و پروفایل پروتئین‌ها را روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE نشان دادند و از آنها جهت طراحی سیستم الایزا جهت تشخیص بهره گرفتند (۶).

در این تحقیق دیواره باکتری مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس با استفاده از سونیکاسیون تخریب شدند و پس از دیالیز روی ژل ۱۲/۵٪ SDS-PAGE برده شدند و ۱۲ باند پروتئینی پیکره باکتری شناسائی شدند.

در بررسی‌های بعدی می‌توان پروتئین‌های ایمونودومیننت را شناسائی نمود و با جداسازی آنها با روش الکتروالوشن از آنها در تهیه کیت‌های تشخیصی و همچنین تولید واکسن بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از اعضای محترم بخش بیوشمی، پروتئومیکس و بخش توبرکولین موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به سبب همکاری ارزشمندشان تقدیر و تشکر نمایند.

References

1. Bannantine, J.P., Rosu, V., Zanetti, S., Rocca, S., Ahmed, N., Sechi, L.A. (2008) Antigenic profiles of recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 122:116-25.
2. Clarke, C.J. (1997) The pathology and pathogenesis of *paratuberculosis* in ruminants and other species. J. Comp. Pathol. 116: 217-261.
3. De Kesel, M., Gilot, P., Coene, M., Cocito, C. (1992) Composition and Immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. Scand. J. Immunol. 36: 201-12.
4. Dunn, M.J. (2004) Protein purification protocols. Methods mol. biol. 244: 339-343, Doi: 10.1385/1-59252.
5. Gumber, S., Taylor, D.L., Whittington, R.J. (2007) Protein extraction from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Comparison of methods for analysis by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, native PAGE and surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. J. Microbiol. Methods. 68: 115-127.
6. Gumber, S., Taylor, D.L., Whittington, R.J. (2009)

Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection: Implication for pathogenesis and diagnosis. Vet. Microbiol. 137: 290-296.

7. He, Z., De Buck, J. (2010) Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteimic analysis. Proteome Sci. 8: 21-25.
8. Kumanan, V., Nugen, S.R., Baeumner, A.J., Chang, Y.F. (2009) A biosensor assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J. Vet. Sci. 10: 35-42.
9. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
10. Loewry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biochem. Chem. 193: 265-275.
11. Romano, M.I., Amadio, A., Bigi, F., Klepp, L., Etchechoury, I., Noto Liana, M., et al. (2005) Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from south America. Vet. Microbiol. 110: 221-237.
12. Schuhmacher, M., Glocker, M.O., Wunderlin, M., Przybylski, M. (1996) Direct isolation of proteins from sodium dodcsyl sulphate polyacrileamide-gel electrophoresis and analysis by electrospray-ionization mass spectrometry. Electrophoresis. 17: 848-854.
13. Sung, N., Collins, M.T. (2003) Variation of resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environment as a function of culture medium. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6833-6840.

J.Vet.Res. 67,4:381-385,2012

Detection of somatic antigens in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Madani, R.[1*], Azadeh, Sh.[2], Mosavari, N.[3], Jafarpour, M.[2], Golchinfar, F.[1], Emami, T.[1], Keshavarz, R.[3]

[1] *Department of Biochemistry and Proteomics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran.*

[2] *Department of Microbiolology, Islamic Azad University of Tonkabon, Tonkabon- Iran.*

[3] *Department of Tuberculin, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj- Iran.*

(Received 15 February 2012 , Accepted 15 May 2012)

Abstract:

BAKGROUND: Johne's disease or Paratuberculosis as a chronic granulomatosis enteritis in ruminants will be caused by *Mycobacerium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Detecting whole bacterial cell wall antigens would be helpful in potential applications for diagnosis, vaccine production, and elucidation of pathogenesis. **OBJECTIVES:** To determine secreted somatic cell antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis*. **METHODS:** Standard strain (III-V) of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* DNA was extracted from the cultured and gene analysis was done using PCR to confirm bacterial purity. On the other hand, protein concentrations in both media and cell entracts were determined. Furthermore, all proteins pattern were shown by SDS-PAGE. **RESULTS:** Electrophoretic findings showed some somatic antigens in the range of 19-100 KDa. **CONCLUSIONS:** These purified somatic antigens can be used for further study and potential application in vaccine production.

Key words: *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis*, antigen, electrophoresis.

Figure Legends and Tabel Captions

Figure 1. Gel electrophoresis for PCR product Lane1, size marker 100 bp from top to bottom (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400,300, 200 and 100bp). Other lanes show PCR product with 400 bp.

Figure 2. Protein gel electrophoresis (SDS-PAGE) for *Mycobacterium Paratuberculosis*. lane 1, size marker, other lanes show whole cell bacterial proteins (115, 98, 77, 69.75, 53, 47.5, 45, 35, 34, 25 and 17 KDa).

***Corresponding author's email: mr_madani@yahoo.com, Tel: 026-34570038, Fax: 026-34552194**