

## ارزیابی توانایی پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> بروسلا ملی تنسیس در تکثیر سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده در شرایط آزمایشگاه

دکتر امیر قاسمی<sup>۱</sup>، دکتر محمد حسین سالاری<sup>۲</sup>، دکتر امیرحسین زرنانی<sup>۳</sup>،  
دکتر محمود جدی تهرانی<sup>۴</sup>، دکتر رضا رنجبر<sup>۵</sup>

### 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 واکنش‌هایی برای جلوگیری و کنترل بروسلوز در حیوانات به کار می‌رود. اما به دلیل مشکلات حاصل از این واکنش‌ها، شناسایی کاندیداهای جدید به منظور توسعه‌ی واکنسی زیر باید 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 دست‌نشدن 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 تنسیس می‌باشد. در این مطالعه، تکثیر سلول‌های طحالی موش‌های ایمن شده با پروتئین Omp<sub>31</sub> بروسلا ملی تنسیس با استفاده از دو روش ارزیابی تکثیر بر مبنای استفاده از (Phosphate buffered saline) PBS (۵،۴-Dimethylthiazol-۲-yl)-۵،۳-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) بررسی شد.

**روش‌ها:** موش‌های BalB/c با استفاده از PBS (Phosphate buffered saline)، Omp<sub>31</sub> نو ترکیب و واکنس 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 Omp<sub>31</sub> (۲/۵ و ۵ μg/ml) نو ترکیب قرار گرفتند. میزان تکثیر با اضافه کردن محلول‌های XTT یا MTT اندازه‌گیری و تغییر رنگ حاصل شد.

**یافته‌ها:** لنفوسیت‌های طحال موش‌هایی که با پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> ایمن شدند، 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 داد ( $P < 0/010$ ). علاوه بر این، طحال موش‌های ایمن شده با Rev.۱ در مقایسه با گروه PBS تکثیر بیشتری نشان داد ( $P < 0/010$ ). همچنین سهولت استفاده از آزمایش ارزیابی تکثیر با استفاده از XTT نیز نشان داده شد.

**نتیجه‌گیری:** پروتئین Omp<sub>31</sub> 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:** واکنس، پروتئین نو ترکیب، سلول‌های طحالی، ارزیابی تکثیر

**ارجاع:** قاسمی امیر، سالاری محمد حسین، زرنانی امیرحسین، جدی تهرانی محمود، رنجبر رضا. ارزیابی توانایی پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> بروسلا ملی تنسیس در تکثیر سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده در شرایط آزمایشگاه. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۲): ۱-۱۱

- ۱- استادیار. گروه میکروپ‌شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
  - ۲- استاد. گروه میکروپ‌شناسی، 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). واکنش‌های 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 مفاصل میزبان علیه بروسلا، می‌توان از آنتی‌ژنی که به اندام سیستم ایمنی سلولی از جمله سلول‌های T را تحریک و ایجاد خاطره نماید، جهت ساختن واکنش‌های 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 لئوسیت‌های کشت داده شده در آزمایشگاه در واکنش به در معرض قرارگیری مجدد به وسیله‌ی آنتی‌ژن را نشان می‌دهد (۷).

لئوسیت‌های T در واکنش به پپتیدهای آنتی‌ژنیک قرار گرفته به روی MHC (Major histocompatibility complex) سلول‌های بیان‌کننده‌ی آنتی‌ژن، شروع به تکثیر می‌کنند. تکثیر لئوسیت‌ها 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 میکروارگانیزم حاوی آن آنتی‌ژن بهبود یافته باشد. بنابراین لئوسیت‌های یک میزبان طبیعی نباید در برخورد با آنتی‌ژن خاص تکثیری نشان دهد. تکثیر سلول‌های T که هم می‌تواند CD<sup>4+</sup> و یا CD<sup>8+</sup> 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 <sup>3</sup>H-thymidin می‌باشد. این روش دارای حساسیتی بالا است و جواب به دست آمده قابلیت تکرار پذیری دارد. این روش بر مبنای اندازه‌گیری میزان <sup>3</sup>H-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 سلامتی 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 لئوسیت‌ها توسعه داده شده است. این روش‌ها شامل احیای نمک‌های تترازولیوم از قبیل 5-Carboxanilide-tetrazolium-(2H)-(3,2-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl) Diphentyltetrazolium Bromide) و (XTT) استفاده (MTT) (3-(5,4-Dimethylthiazol-2-yl) از یک آنالوگ پیریمیدین مانند 5-Bromodeoxyuridine و ردیابی آن در ساختار DNAهای تازه تشکیل یافته، اندازه‌گیری میزان تغییرات هگزوآمیندiaz لیروزومی (آزمایش NAG یا

واکسن کشته شده‌ی بروسلا ملی تنسیس Rev.1 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.

### تهیه 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 تهیه 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 بریزی دور ریخته شد و این بار ۵ cc PBS-EDTA به سلول‌ها اضافه و سعی شد با احتیاط سلول‌ها دوباره به حالت سوسپانسیون درآید. با دقت این سوسپانسیون سلول‌ها در محال 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 (Sigma, USA) DMEM

(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 بروسلائی که می‌تواند باعث تکثیر لئوسیت‌های خاطره‌ای شوند، استفاده نشده است. حفاظت نسبی علیه عفونت با بروسلا ملی تنسیس در موش‌های ایمن شده با Omp<sub>31</sub> بروسلا ملی تنسیس نشان داده شده است (۱۱-۱۲) و همچنین آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این آنتی‌ژن می‌تواند حیوان را علیه عفونت با بروسلا ملی تنسیس محافظت نماید (۱۳-۱۴).

همچنین ثابت شده است که پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> می‌تواند با سرم خرگوش ایمن شده با سوش واکسن بروسلا ملی تنسیس واکنش دهد (۱۵). از این رو، در مطالعه‌ی حاضر به بررسی تکثیر لئوسیت‌های موش‌های ایمن شده در مواجهه با پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> با استفاده از دو روش XTT و MTT پرداخته شد.

### روش‌ها

روش ایمن‌سازی موش‌ها با استفاده از آنتی‌ژن نو ترکیب 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 نو ترکیب Omp<sub>31</sub> (۱۷-۱۸)، به گروه B سوش

استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

$$SI = \frac{(\text{mean OD of Stimulated culture} - \text{mean OD of DMEM blank control})}{(\text{mean OD of Unstimulated culture} - \text{mean OD of DMEM blank control})}$$

### 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 تترازولیوم از حل کردن ۵ mg پودر MTT (Sigma) در ۱ ml بسافر PBS به دست آمد. این محلول با عبور از فیلتر  $0.22 \mu\text{m}$  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 Omp<sub>31</sub>، کانکوالین A و PBS (۳ چاهک برای هر کدام) کشت داده شد.  $20 \mu\text{l}$  از محلول آماده‌ی MTT به هر چاهک افزوده شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^\circ\text{C}$  و سانتریفیوژ (۵ دقیقه به دور  $2000 \text{ rpm}$ )، محیط رویی برداشته شد. سپس  $100 \mu\text{l}$  دی‌متیل 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 پیش گفته استفاده شد.

(Dulbecco's modified Eagle's medium) بدون فنل رد در داخل هر چاهک تقسیم شد. تعداد سلول در هر چاهک  $2 \times 10^5$  در  $100 \mu\text{l}$  محیط کشت DMEM بدون فنل رد بود. سعی شد تا حد امکان زنجیره‌ی سرد در مراحل یاد شده رعایت شود ( $4^\circ\text{C}$ ) (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 Omp<sub>31</sub> سلول‌های طحالی به دست آمده از هر گروه بر مبنای زمانی 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  $\text{CO}_2$  در مجاورت Omp<sub>31</sub> ( $2.5 \mu\text{g/ml}$  و  $5 \mu\text{g/ml}$ )، کانکوالین A ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) 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  $50^\circ\text{C}$  درجه DMEM بدون فنل رد به دست آمد. به ۵ cc از این محلول،  $25 \mu\text{l}$  محلول PMS ۵ mM (Phenazine methosulfate) (Sigma) اضافه شد. از این محلول به دست آمده،  $100 \mu\text{l}$  به هر چاهک اضافه گردید. بعد از اضافه کردن محلول XTT-PMS، پلیت‌ها در انکوباتور در دمای  $37^\circ\text{C}$  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

## آنالیز آماری

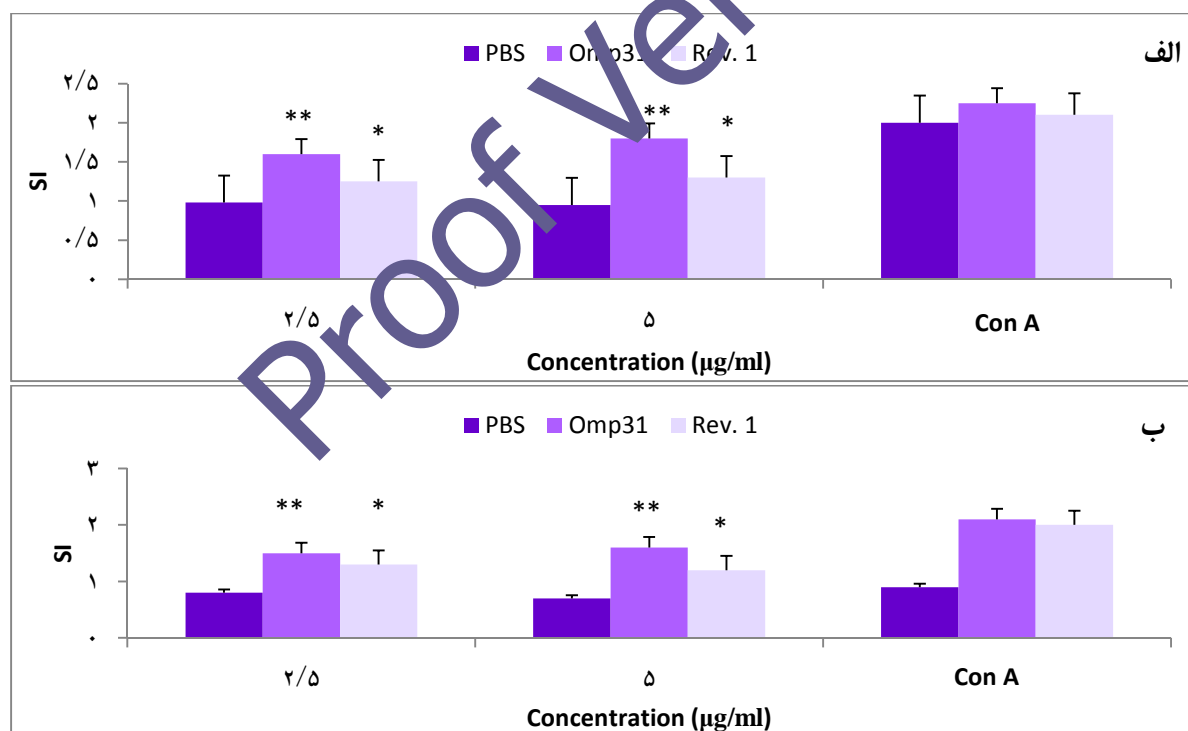
بدین من‌ظور، ۳ گروه موش تعریف شد و هر گروه با Omp<sub>31</sub> (A)، Rev.1 (B) و PBS (C) به ترتیب ایمن شدند.

بعد از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs) طحال و مجاورت دادن آن‌ها با Omp<sub>31</sub>، کانکوالین A و PBS، مشاهده گردید که سلول‌های طحالی جدا شده از موش‌های گروه A و B در پاسخ به تحریک با Omp<sub>31</sub> و کانکوالین 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 ( $P < 0/010$ ) و B ( $P < 0/050$ ) در مقایسه با گروه C دیده شد (شکل ۱ الف و ب).

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  $P < 0/050$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

به منظور بررسی توانایی پروتئین Omp<sub>31</sub> 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 MTT استفاده شد.



شکل ۱. واکنش‌های تکثیری سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با Rev.1، پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> و PBS (Phosphate buffered saline) مجدد با غلظت‌های متفاوت پروتئین نو ترکیب Omp<sub>31</sub> نشان داده شده است.

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

$$P < 0/050 \quad ** \quad P < 0/010 \quad *$$

## 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 سیستم ایمنی هومورال نیز در این زمینه نقش مهمی بر عهده دارد (۳۴-۳۵).

در مطالعاتی که تا کنون با استفاده از پروتئین نو ترکیب Omp ۳۱ صورت گرفته است، توانایی این آنتی‌ژن در تحریک تکثیر سلول‌های طحالی 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 Omp ۳۱ در شرایط آزمایشگاهی شروع به تکثیر می‌کند که این تکثیر، اختلاف معنی‌داری با تکثیر سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با PBS دارد ( $P < 0/050$ ). این یافته نشان دهنده‌ی این است که آنتی‌ژن Omp ۳۱ 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

Omp ۳۱ 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 آنرا 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 بودن کارایی 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 کارایی بالای این

## 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.

آزمایش اشاره کرده‌اند (۴۰-۳۹، ۲۱).

نتایج این مطالعه بر ضرورت استفاده از Omp31 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.

## 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 response following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination. *Vet Microbiol* 1992; 30(2-3): 233-41.
5. Baldi PC, Giambartolomei FH, Goldbaum FA, Abdon LF, Velikovsky A, Mittelberger 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, Park 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* 2002; 17(1): 29-34.
10. Kuhl DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Chahmoun MA. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 506-8.
11. Saieghifard 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, Cloeckart 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, Cloeckart 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. Cloeckart 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, Velikovskiy 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 MITT 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 melitensis* 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. Velikovskiy 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* 2007; 69(8): 4816-22.
  31. Caspary 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. Babatabaee 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, Paronavitana 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, Paul 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, Ghoojani A, Rezaia S, Salari MH, Jeedi-Tehrani M. Identification of a new immunogenic candidate conferring protection against *Brucella melitensis* infection in Mice. *Mol Immunol*. 2014; 62(1): 142-9.

Proof Version

## Study the Potential of Recombinant Omp31 Protein from *Brucella Melitensis* in Inducing the Proliferation of Immunized Mouse Lymphocytes in in Vitro

Amir Ghasemi PhD<sup>1</sup>, Mohammad Hossein Salari PhD<sup>2</sup>, Amir Hassan Zarnani PhD<sup>3</sup>,  
Mahmood Jeddi-Tehrani PhD<sup>4</sup>, Reza Ranjbar PhD<sup>5</sup>

### 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 the identification of new candidates which can induce cell-mediated immunity are demanded. Proliferation assay is one of methods is used to evaluate the potential of an antigen to generate memory Tcell. In the present study, the proliferation of splenocytes obtained from immunized mice was evaluated when they were challenged by recombinant Omp31 (rOmp31) in vitro.

**Methods:** Mice were immunized by PBS, rOmp31 and formalin killed *B. melitensis* Rev.1 with Freund's adjuvant. At day 30 after the last immunization, spleens were removed and homogenized. Purified rOmp31 (2.5 and 5 µg/mL) was added to  $2 \times 10^5$  spleen cell and then the splenocytes were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 48h, XTT and MTT assays were used to show the splenocyte proliferation.

**Findings:** The data showed that splenocytes of mice immunized with rOmp31 or Rev.1 started to proliferate after stimulation by rOmp31. There was a significant difference between SIs obtained from rOmp31 and Rev groups compared to PBS groups ( $P < 0.01$ ) and ( $P < 0.05$ ), respectively.

**Conclusion:** Based on our finding, rOmp31 could generate a good memory cellular immune response. In addition, the method described here to study the splenocyte 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. **Study the Potential of Recombinant Omp31 Protein from *Brucella Melitensis* in Inducing the Proliferation of Immunized Mouse Lymphocytes in in Vitro.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(292): ??.

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, Avicenna Research Institute, AND Immunology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Professor, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, 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