

مقایسه واکنش پروتئین های طبیعی و واسرشته پیکره بروسلا آبورتوس (سویه S19) با آنتی بادیهای سرم بیماران با روش کروماتوگرافی جذبی و وسترن بلات

رامین کریمی*، دکتر علی مصطفایی**، دکتر بهمن تبرایی***، یدالله بهرامی****
جلال عبدالعلی زاده*****

چکیده:

ایمونوبلات از روشهایی است که بطور معمول برای مطالعه واکنش بین آنتی بادی و آنتی ژن مورد استفاده قرار می گیرد. واسرشته شدن برخی از پروتئین ها در ایمونوبلاتینگ می تواند تأثیر اساسی روی این واکنش بگذارد. در این پژوهش واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس (S19) با سرم جدا شده از گونه های انسان و بز مبتلا به بروسلوز و خرگوش ایمن شده با بروسلا با روش ایمونوبلاتینگ و کروماتوگرافی جذبی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از کشت انبوه باکتری، استخراج آنتی ژن های پیکره بروسلا آبورتوس با زویترجنت ۱۴-۳ و لیزوزیم انجام گرفت. فراکسیون گاماگلوبولین سرم انسان، بز و خرگوش توسط آمونیوم سولفات رسوب داده شد. پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس از ستون کروماتوگرافی جذبی که لیگاند مورد استفاده در آن فراکسیون گاماگلوبولین انسان، بز یا خرگوش بود، عبور داده شد. برای بررسی واکنش پروتئین های باکتری با سرم ها از دو روش SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ استفاده شد.

SDS-PAGE و ایمونوبلات پروتئین های جذب شده و جذب نشده به ستونهای کروماتوگرافی جذبی حاوی لیگاند گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش نشان داد که آنتی ژن های پیکره بروسلا را از نظر واکنش با آنتی بادی می توان به چهار دسته تقسیم کرد: آنتی ژن هایی که در هر دو حالت طبیعی و واسرشته با آنتی بادی واکنش می دهند. آنتی ژن هایی که در حالت طبیعی با آنتی بادی واکنش می دهند اما در حالت واسرشته واکنشی با آنتی بادی نمی دهند. آنتی ژن هایی که در حالت طبیعی با آنتی بادی واکنش نمی دهند اما در حالت واسرشته با آنتی بادی واکنش می دهند. آنتی ژن هایی که نه در حالت طبیعی و نه در حالت واسرشته با آنتی بادی واکنش نمی دهند. بطور کلی نتایج نشان داد که بررسی واکنش آنتی ژن و آنتی بادی با دو روش کروماتوگرافی جذبی و ایمونوبلاتینگ تفاوت های قابل ملاحظه ای دارند و تفسیر نتایج ایمونوبلاتینگ در خصوص بخشی از پروتئین ها چندان قابل اعتماد نیست.

کلید واژه ها : ایمونوبلات / بروسلا آبورتوس / کروماتوگرافی جذبی

* کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

** استادیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** استادیار گروه واکنش های باکتریایی انستیتو پاستور ایران

**** کارشناس ارشد میکروب شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

***** کارشناس ارشد بیوشیمی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

مقدمه:

روش کار:

تهیه و کشت باکتری: سویه صاف S19 بروسلا آبورتوس که در این مطالعه مورد نیاز بود، از انستیتو پاستور ایران تهیه و تکثیر گردید. محیط کشت مورد استفاده برای تکثیر باکتری و کشت انبوه به ترتیب، بروسلا برات و بروسلا آگار (بکتون دیکینسون) بود. باکتری پس از جمع آوری و سانتریفیوژ با بافر فسفات نمکی (PBS) استریل شستشو داده شد و پس از کشته شدن با استن سرد، در شرایط سرد به محل آزمایش منتقل گردید.

نمونه‌های سرم: ۱۴ نمونه سرم انسانی از بیماران مبتلا به بروسلا که علائم بالینی و آزمایشگاهی آنها توسط پزشک متخصص تایید شده بود، همچنین ۳۴ نمونه سرمی از بزهای مبتلا به بروسلا از آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی استان کرمانشاه جمع آوری شد. این نمونه‌ها دارای تیتراژ لوله‌ای حداقل ۱/۳۲۰ و تیتراژ 2ME حداقل ۱/۱۶۰ بودند. نمونه سرمی خرگوش نیز از خرگوش نیوزیلندی ایمن شده تهیه شد.

ایمن‌سازی خرگوش با بروسلا خردشده: بر اساس متحنی استاندارد مک‌فارلن تعلیقی از بروسلا کشته شده شامل ۹×۱۰^۸ سلول در هر میلی‌لیتر PBS استریل تهیه شد. تعلیق باکتری تحت اثر امواج ماورای صوت با فرکانس خروجی ۲۰ کیلوهرتز خرد شد. یک میلی‌لیتر از این تعلیق بطور درون‌عضلانی و زیرجلدی در چند نقطه از بدن به یک راس خرگوش نیوزیلندی تزریق گردید. چهار تزریق یادآور، اولی به فاصله دو هفته و بقیه به فواصل یک هفته صورت گرفت. پس از رسیدن تیتراژ لوله‌ای به حداقل ۱/۶۴۰ و تیتراژ 2-ME به حداقل ۱/۳۲۰، ۲۰ میلی‌لیتر خون از قلب حیوان گرفته شد و سرم آن جدا گردید.

تهیه فراکسیون گاماگلوبولین سرم‌ها با سولفات آمونیوم: به سرم رقیق شده (حداقل ۲ بار با PBS) سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۵۰ درصد اضافه شد. محلول در ۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. رسوب پس از ۲ بار شستشو با محلول سولفات آمونیوم ۵۰ درصد، در بافر فسفات نمکی حل و یک شب در مقابل این بافر دیالیز گردید.

استخراج پروتئین‌های باکتری با لیزوزیم و زویترجنت ۱۴-۳: محلول لیزکننده برای استخراج پروتئین‌های باکتری حاوی زویترجنت ۱۴-۳ (کلیوکوم) با غلظت ۱ درصد، PMSF (سیگما) یک میلی‌مولار، لیزوزیم (مرک) یک

بروسلاز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که عامل آن معمولاً از حیوانات آلوده و یا فرآورده‌های حیوانی آلوده به انسان منتقل می‌شود (۱). بروسلا انگل اختیاری درون سلولی و جزء باکتری‌های گرم منفی هستند (۲). در این باکتری‌ها انواعی از آنتی‌ژن‌های پروتئینی و پلی‌ساکاریدی در غشای خارجی، غشای داخلی، سیتوپلاسم و فضای پری‌پلاسمیک مشخص شده است. این آنتی‌ژن‌ها بطور عمده با روش‌های الکتروفورز مانند SDS-PAGE، الکتروفورز دوبعدی، ایمونوبلات و الیزا شناسائی شده‌اند (۳-۶). تعدادی از این آنتی‌ژن‌ها در تشخیص بیماری در انسان و حیوانات بکار می‌روند. بعضی دیگر نیز به‌عنوان کاندید تشخیص طبی در روشهای حساس تر همچون الیزا یا طراحی واکسن مطرح شده‌اند (۶-۹).

وسترن بلائینگ یا ایمونوبلائینگ از روش‌هایی است که بطور وسیع در شناخت کاندیدهای آنتی‌ژنی تشخیص طبی و واکسن در انواعی از بیماری‌های عفونی به کار می‌رود (۹-۱۳). در این روش ابتدا اجزای پیکره میکروب با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید (بطور معمول SDS-PAGE) تفکیک می‌گردد. اجزای تفکیک شده در مراحل بعد به صفحات نیتروسولوز یا پلی‌وینیلیدن دی‌فلوراید انتقال می‌یابد و واکنش آنها با آنتی‌بادی یا سرم بیمار مورد مطالعه قرار می‌گیرد. حضور عوامل واسرشته‌کننده همچون SDS، ماده احیاء کننده و حرارت در مرحله الکتروفورز به جداسازی زیر واحدها در پروتئین‌های چندواحدی و تغییر ساختار سه بعدی بخش عمده‌ای از پروتئین‌ها می‌انجامد. بنابراین، به نظر می‌رسد بررسی واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در چنین شرایطی با حالت طبیعی متفاوت باشد. براین اساس در این مطالعه، آنتی‌ژنهای پیکره بروسلا آبورتوس با روشی معتدل (شامل زویترجنت ۱۴-۳ و لیزوزیم) استخراج گردید و واکنش آنها با سرم حاوی آنتی‌بادی ضد این آنتی‌ژن‌ها با دو روش متفاوت وسترن بلائینگ و کروماتوگرافی جذبی بررسی گردید تا تفاوت این واکنش در حالتی که آنتی‌ژن متحمل تغییرات کمتری شده و طبیعی‌تر است، مشخص گردد. هدف دیگر این مطالعه مقایسه کاندیدهای آنتی‌ژنی قابل استفاده در تشخیص بروسلاز به روش حساسی همچون الیزا می‌باشد.

آنتی‌بادی اولیه (گاماگلوبولین انسانی، بزی یا خرگوشی) قرار گرفت. غشا ۵ بار با TBS-T2 شسته شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه با پراکسیداز، شرکت سیگما) قرار گرفت. غشا ۶ بار با TBS-T2 شسته شد و سپس در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین (داکو) و پراکسید هیدروژن قرار گرفت تا باندهای پروتئینی ظاهر شوند.

کروماتوگرافی جذبی: برای هر نمونه، مقدار یک گرم سفارز ۴- بی فعال (فارماسیا) با ۲۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک یک میلی‌مولار متورم گردید. به ژل متورم شده ۸ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ۰/۲ مولار با pH=۹ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار و فراکسیون گاماگلوبولین سرم انسان یا بز مبتلا به بروسلوز و یا خرگوش ایمن شده (با غلظت ۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شد و مدت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق (در حال به هم خوردن) قرار گرفت. سپس به مدت ۳ ساعت با محلول گلیسین ۰/۲ مولار با pH ۸ شستشو داده شد (مرحله مسدودسازی). ژل آماده‌شده به ستون منتقل شد و ۴ بار به‌طور متناوب با بافر استات (۰/۱ مولار و pH ۴) و بیکربنات سدیم (۰/۲ مولار و pH ۸/۵) حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم شستشو داده شد. سپس با PBS به تعادل رسید. نمونه‌های پروتئین باکتری با غلظت ۲ تا ۵ میلی‌گرم پروتئین در هر میلی‌لیتر در بافر فسفات نمکی حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار با pH ۷/۲ با سرعت ۵ میلی‌لیتر در ساعت وارد ستون گردید. سپس ستون با بافر فسفات نمکی شستشو داده شد تا جذب خروجی به کمتر از ۰/۰۱ رسید و با بافر شوینده شامل گلیسین-اسیدکلریدریک (۰/۲ مولار با pH ۲/۳) شسته شد و فراکسیون‌ها در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید.

نتایج:

SDS-PAGE پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس سویه S19
شکل ۱ (الف) الگوی الکتروفورز پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس سویه S19 را که با لیزوزیم و زویترجنت ۱۴-۳ استخراج شده‌است، نشان می‌دهد. در این الگو که حاوی ده‌ها باند پروتئینی است، باندهای محدوده ۲۷ تا ۳۱ و ۳۶ تا ۴۱ کیلودالتون از وضوح و شدت بیشتری برخوردارند و باندهای موقعیت ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۶۰ و ۸۹ کیلودالتون نیز با شدت متوسطی دیده می‌شوند.

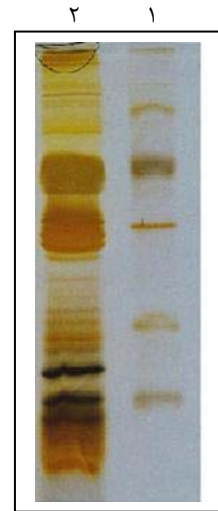
میلی‌گرم به ازای هر صد میلی‌گرم پروتئین باکتری، EDTA (سیگما) یک میلی‌مولار، RNase و DNase (سیگما) سیصد میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک باکتری بود. رسوب باکتری در حجم کمی از بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ به تعلیق درآمد. سپس PMSF، لیزوزیم و EDTA اضافه شد و مخلوط یک شب در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس زویترجنت اضافه شد و ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. تعلیق در دمای نزدیک به صفر، ۳۰ بار هر بار یک ثانیه با فواصل ۱۰ ثانیه‌ای در معرض امواج ماورای صوت با قدرت ۲۰ کیلوهرتز قرار گرفت. سپس RNase و DNase اضافه شد و ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. تعلیق باکتری ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتیفریوز گردید. محلول روئی جدا و مجدداً ۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتیفریوز شد. محلول شفاف روئی که حاوی پروتئین‌های طبیعی باکتری بود در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE): SDS-PAGE براساس روش لاملی (۱۴) با بعضی تغییرات، بسته به هدف آزمایش انجام گرفت. در این آزمایش غلظت ژل بالا ۳ درصد و غلظت ژل پایین ۱۳ درصد و در مواردی نیز دارای شیب غلظت ۱۳ تا ۱۸ درصد بود. رنگ‌آمیزی ژل پس از الکتروفورز به روش نقره انجام گرفت (۱۵).

ایمونوبلاتینگ: انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشای پلی‌وینیلیدن‌دی‌فلورید (فارماسیا) به‌روش تاوین انجام گرفت (۱۶). آنتی‌بادی مورد استفاده، فراکسیون گاماگلوبولین غنی از IgG سرم انسان یا بز مبتلا به بروسلوز و خرگوش ایمن شده بود. پس از الکتروفورز، ژل ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرار گرفت. سپس غشا با متانول خیس گردید و در ظرف حاوی بافر انتقال قرار گرفت. مجموعه بلات در قالب پلاستیکی مربوطه محکم شد و در تانک بلات حاوی بافر انتقال به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی‌آمپر و سپس به مدت دو ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شد. پس از انتقال، غشا به مدت ۱۵ دقیقه در بافر تریس نمکی حاوی توین بیست ۰/۵ درصد (TBS-T1) قرار گرفت (مسدودسازی). سپس ۳ بار با بافر تریس نمکی حاوی توین بیست ۰/۰۵ درصد (TBS-T2) شستشو داده شد و به مدت ۱/۵ ساعت در

گاماگلوبولین بز را نشان می‌دهد. این الگو شامل دو باند پروتئینی قوی در موقعیت های ۱۸ و ۱۹ کیلودالتون، یک گسترده ضعیف و خیلی پهن در محدوده ۲۵ تا ۲۹ کیلودالتون، یک باند قوی در حدود ۵۷ کیلودالتون، یک باند ضعیف در حدود ۶۶ کیلودالتون و یک باند قوی در محدوده ۸۵ تا ۹۰ کیلودالتون می‌باشد. ستون ۴ پروتئین‌هایی که جذب ستون کروماتوگرافی تمایلی حاوی لیگاند گاماگلوبولین بز نشده‌اند را نشان می‌دهد. این الگو شامل یک باند ۱۲ کیلودالتونی ضعیف، یک باند ۱۴ کیلودالتونی، یک باند ۱۶ کیلودالتونی قوی، دو باند ۱۸ و ۱۹ کیلودالتونی نسبتاً ضعیف، چهار باند قوی و چند باند ضعیف در محدوده ۲۷ تا ۳۱ کیلودالتون، یک باند قوی پهن و یک باند نازک نسبتاً ضعیف در حدود ۳۶ تا ۴۰ کیلودالتون، چند باند بسیار ضعیف در محدوده ۴۲ تا ۹۴ کیلودالتون و چهار باند نسبتاً قوی در حدود ۱۱۰ کیلودالتون و بالاتر می‌باشد.

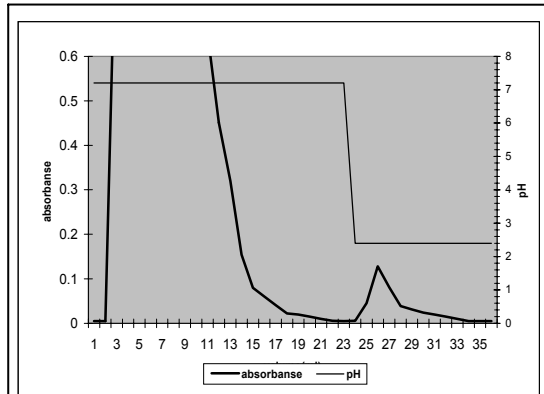
ستون ۸ پروتئین‌های جذب شده به ستون با لیگاند گاماگلوبولین خرگوشی را نشان می‌دهد. این الگو شامل یک باند قوی در حدود ۱۶ کیلودالتون و دو باند ضعیف‌تر در بالا و پائین آن، یک باند در حدود ۱۸ کیلودالتون، یک باند قوی در حدود ۱۹ کیلودالتون، یک باند ضعیف و پهن در محدوده ۲۲ تا ۲۵ کیلودالتون، یک باند نسبتاً قوی در حدود ۲۷ کیلودالتون، چند باند ضعیف در محدوده ۲۶ تا ۳۱ کیلودالتون، یک باند خیلی ضعیف در حدود ۴۰ کیلودالتون، یک باند قوی در ۵۷ کیلودالتون، ۴ تا ۵ باند ضعیف در محدوده ۵۸ تا حدود ۸۰ کیلودالتون، یک باند ضعیف نسبتاً قوی در حدود ۸۵ کیلودالتون، حدود ۷ باند ضعیف و یک باند قوی در محدوده ۹۰ تا بیش از ۱۱۰ کیلودالتون می‌باشد. ستون ۵ پروتئین‌هایی را نشان می‌دهد که جذب ستون کروماتوگرافی با لیگاند گاماگلوبولین خرگوشی نشده‌اند. این الگو شامل باندهای پروتئینی زیر می‌باشد: یک باند ۱۴ کیلودالتونی، ۲ تا ۳ باند ضعیف در موقعیت‌های ۱۵ تا ۱۷ کیلودالتون، یک گروه پروتئینی شامل سه باند قوی و چند باند ضعیف در موقعیت ۲۷ تا ۳۱ کیلودالتون، یک گروه پروتئینی شامل ۲-۳ باند قوی در محدوده ۳۶ تا ۴۱ کیلودالتون و چندین باند بسیار ضعیف در حدود ۵۷ تا ۶۷ کیلودالتون (شکل ۱ ب).



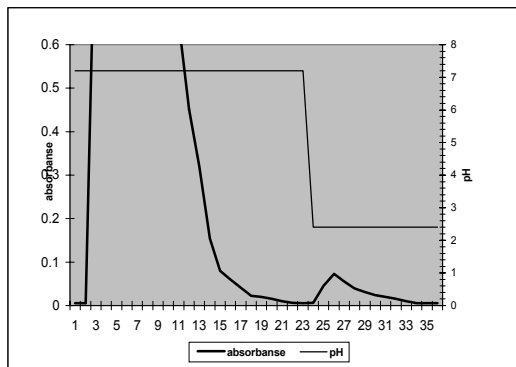
شکل ۱ الف: SDS-PAGE پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورئوس سویه S19 (ستون ۲) استخراج شده با لیزوزیم و زویترجنت ۱۴-۳.

الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های جذب شده و جذب نشده به ستون‌های کروماتوگرافی جذبی حاوی گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش در شکل ۱ (ب) آمده است. در این شکل، ستون‌های ۲ و ۶ پروتئین‌های باکتری متصل شده به ستون حاوی گاماگلوبولین انسانی را نشان می‌دهد. در این الگو دو باند پروتئینی قوی در موقعیت‌های ۱۸ و ۱۹ کیلودالتون، یک لکه رنگی به صورت پهن و کم‌رنگ در محدوده ۲۴ تا ۲۸ کیلودالتون، سه باند ضعیف در حدود ۳۰-۲۸ کیلودالتون، دو باند ضعیف در موقعیت ۳۶ تا ۴۱ کیلودالتون، یک باند پروتئینی قوی در موقعیت حدود ۵۷ کیلودالتون، یک باند ضعیف در موقعیت حدود ۶۵ کیلودالتون و سه باند نسبتاً ضعیف در محدوده ۸۵ تا ۹۱ کیلودالتون قابل مشاهده است. ستون ۳ پروتئین‌های بروسلا را نشان می‌دهد که بدون واکنش با ستون کروماتوگرافی تمایلی حاوی گاماگلوبولین انسانی، خارج شده‌اند. این بخش شامل یک باند نسبتاً قوی در حدود ۱۴ کیلودالتون، سه باند بسیار ضعیف از ۱۴ تا ۲۰ کیلودالتون، حداقل سه باند بسیار قوی در ۲۸ تا ۳۱ کیلودالتون، یک باند قوی در ۳۸ کیلودالتون و یک باند پهن و بسیار قوی در محدوده ۴۱-۳۹ کیلودالتون می‌باشد.

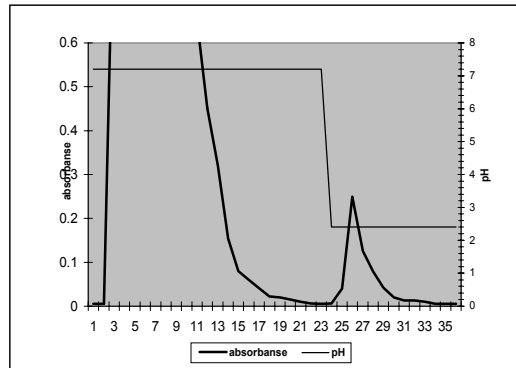
ستون ۷ پروتئین‌های جذب شده به ستون حاوی



الف



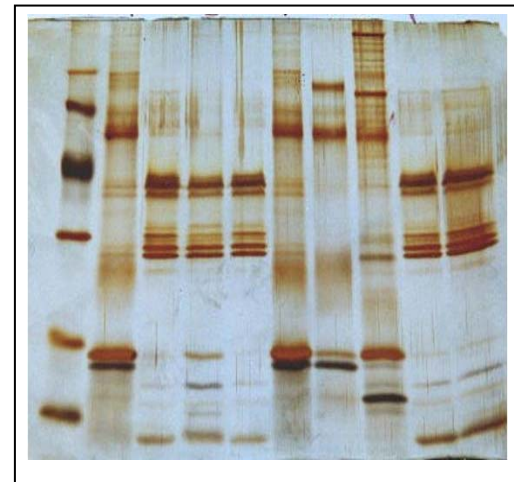
ب



ج

شکل ۲: نمودار کروماتوگرافی تمایلی پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس بر روی ستون سفارز ۴- بی حاوی لیگاند گاماگلوبولین انسان (الف)، بز (ب) و خرگوش (ج)

در آزمون ایمونوبلاتینگ، ابتدا ۶ نمونه پروتئینی جذب شده و نشده به ستون کروماتوگرافی تمایلی در سه گونه پستاندار مورد مطالعه که به آنها اشاره شد و همینطور کل پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا پس از SDS-PAGE به غشای پلی‌وینیلیدن دی‌فلوراید منتقل شدند. سپس واکنش گاماگلوبولین سه گونه مورد بحث با پروتئین‌های بلات‌شده بررسی گردید.

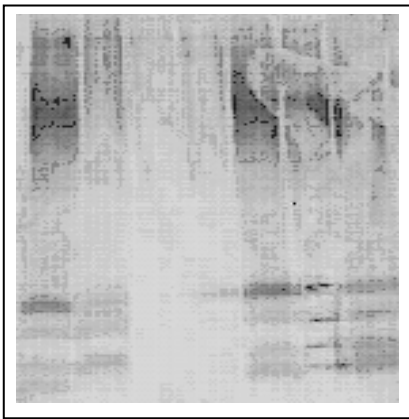


شکل ۱ ب: SDS-PAGE پروتئین‌های بروسلا آبورتوس جذب شده (ستون های ۲ و ۶) و جذب نشده (ستون ۳) به ستون کروماتوگرافی تمایلی با لیگاند گاماگلوبولین انسان، جذب شده و نشده (به ترتیب ستونهای ۷ و ۴) به ستون کروماتوگرافی با لیگاند گاماگلوبولین بز و جذب شده و نشده (به ترتیب ستون های ۸ و ۵) به ستون با لیگاند گاماگلوبولین خرگوش می باشد. ستون ۱ مارکرهای پروتئین با اوزان ۱۴، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۶ و ۹۷ کیلودالتون را نشان می دهد.

نمودار کروماتوگرافی تمایلی پروتئین‌های پیکره بروسلا بر روی ستون سفارز ۴- بی حاوی گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش در شکل ۲ آمده است. جذب لوله های مختلف (OD) در ۲۸۰ نانومتر در سمت راست و pH محلول‌هایی که از ستون عبور داده شده‌اند در سمت چپ نمودارها درج شده‌است. خطوط پررنگ در این نمودارها معرف جذب و خطوط کمرنگتر معرف pH محیط عمل می‌باشد. سطح زیر منحنی میزان پروتئین جذب شده را نشان می‌دهد. هرچه تیترا آنتی‌بادی متصل شده به ستون بیشتر باشد، چون جمعیت IgG های ضد آنتی‌ژن‌های بروسلا در آن بیشتر است، جذب آنتی‌ژن و در نتیجه سطح زیر منحنی نیز بیشتر خواهد بود. با توجه به تیترا ۲- مرکاپتواتانول برای نمونه‌های بز، انسان و خرگوش (به ترتیب ۱/۱۶۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۱۲۸۰)، در عمل نیز نمونهٔ خرگوشی بیشترین جذب و نمونهٔ بزی کمترین جذب آنتی‌ژن‌ها را نشان داد.

شکل ۳(ج) الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین خرگوشی را نشان می‌دهد. در این شکل ستون‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب، پروتئین‌های جذب‌شده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز و انسان، ستون‌های ۵، ۶ و ۷ پروتئین‌های جذب‌نشده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز و انسان را نشان می‌دهند. ستون ۱ نیز ایمونوبلات کل پروتئین‌های پیکره بروسلا را نشان می‌دهد.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷



شکل ۳ ج: الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین خرگوش را نشان می‌دهد.

بحث:

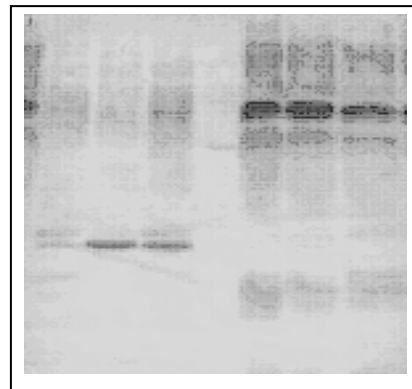
ایمونوبلاتینگ بطور وسیع در شناخت کاندیدهای آنتی‌ژنی تشخیص طبی و واکسن در بیماری‌های عفونی از جمله بروسلوز به کار می‌رود (۱۷، ۱۳-۹). واسرشته‌شدن پروتئین‌ها در طی انجام این روش تأثیر محسوسی بر واکنش آنتی‌ژن‌های میکروب با آنتی‌بادی ضد آنها دارد و از محدودیت‌های آن در تعیین دقیق کاندیدهای آنتی‌ژنی محسوب می‌گردد.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های پیکره بروسلا آورتوس از نظر واکنش با آنتی‌بادی موجود در سرم انسان بیمار، بز مبتلا به بروسلوز یا خرگوش ایمن‌شده را می‌توان به ۴ دسته به شرح زیر تقسیم نمود:

۱- آنتی‌ژن‌هایی که هم در حالت طبیعی (در کروماتوگرافی جذبی) و هم در حالت واسرشته (در وسترن‌بلات) با آنتی‌بادی واکنش می‌دهند. در واقع مراحل الکتروفورز (عمدتاً اثر SDS، 2ME و حرارت) که موجب تغییرات محسوس ساختمان فضایی پروتئین‌ها می‌شود، اثر چندانی

شکل ۳(الف) الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین انسان را نشان می‌دهد. در این شکل ستون‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب، پروتئین‌های جذب‌شده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز و انسان، ستون‌های ۵، ۶ و ۷ پروتئین‌های جذب‌نشده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز و انسان را نشان می‌دهند. ستون ۴ کنترل بلات لیزوزیم با گاماگلوبولین انسان را نشان می‌دهد. این آنزیم در مرحله تخریب باکتری از برای هضم لایه پیتیدوگلیکان اضافه شده است.

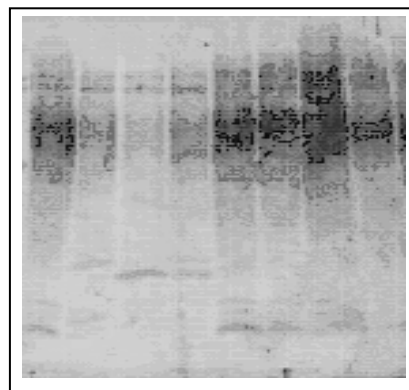
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷



شکل ۳ الف: الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین انسان

شکل ۳(ب) الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین بز را نشان می‌دهد. در این شکل ستون‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب، پروتئین‌های جذب‌شده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز و انسان، ستون‌های ۵، ۶ و ۷ پروتئین‌های جذب‌نشده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز و انسان را نشان می‌دهند. ستون‌های ۱ و ۸ ایمونوبلات کل پروتئین‌های پیکره بروسلا را نشان می‌دهد.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸



شکل ۳ ب: الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین بز را نشان می‌دهد.

واکسن‌های زیرواحد یا تشخیص بروسلوز به روش‌های کمی و حساس روشن نمود. برای این کار لازم است ابتدا این آنتی‌ژن‌ها خالص گردند.

۳- آنتی‌ژن‌هایی که در حالت طبیعی با آنتی‌بادی واکنش نمی‌دهند اما در حالت واسرشته با آنتی‌بادی واکنش می‌دهند. در الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های جذب‌نشده به ستون کروماتوگرافی جذبی حاوی لیگاند گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش (شکل ۱، ستون‌های ۳، ۴ و ۵) در ناحیه ۳۶ تا ۴۰ کیلودالتون یک گروه پروتئینی مشتمل بر ۳ تا ۴ باند قوی دیده می‌شود. تجارب مطالعات گذشته نشان می‌دهد که پروتئین‌های گروه دو غشا خارجی بروسلا در این محدوده وزنی قرار دارند (۱۸،۱۹) پروتئین‌های این گروه در صورتیکه پیش از SDS-PAGE تحت تاثیر حرارت قرار نگیرد در موقعیت حدود ۱۱۰ تا ۱۱۵ کیلودالتون قرار می‌گیرند. پس از حرارت، پروتئین‌های گروه دو در موقعیت ۳۶ تا ۴۰ قرار می‌گیرند و این موضوع نشان می‌دهد که پروتئین‌های این گروه به شکل چند واحدی هستند به همین دلیل در این حالت واکنش قابل توجهی با آنتی‌بادی از خود نشان نمی‌دهند، اما پس از واسرشته‌شدن اپی‌توپ‌های آنها در معرض آنتی‌بادی قرار می‌گیرند و با آنها واکنش می‌دهند.

۴- آنتی‌ژن‌هایی که نه در حالت طبیعی و نه در حالت واسرشته واکنش قابل توجهی با آنتی‌بادی ندارند. در الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های جذب نشده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش، در ناحیه ۲۷ تا ۳۱ کیلودالتون یک گروه پروتئینی مشتمل بر سه تا چهار باند قوی دیده می‌شود (به ترتیب ستون‌های ۳، ۴ و ۵ شکل ۱). این باندها در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل پیکره باکتری که با زویترجنت استخراج شده نیز به وضوح دیده می‌شوند و بخش قابل توجهی از پروتئین‌های باکتری را به خود اختصاص می‌دهند. بررسی مطالعات دیگر محققین نشان می‌دهد، پروتئین‌های گروه سه غشا خارجی که جزو پروتئین‌های عمده غشاء خارجی هستند تقریباً در این محدوده وزنی قرار دارند (۱۸،۱۹). سرم بیماران مبتلا به بروسلوز واکنش ضعیف تا متوسطی علیه این پروتئین‌ها دارند. این پروتئین‌ها پس از بلات اجزای جذب‌نشده به ستون جذبی، در الگوی ایمونوبلات با گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش نیز ظاهر نمی‌شوند (شکل ۳). بنابراین به طور

بر واکنش این دسته از آنتی‌ژن‌ها نداشت. مثال روشن این دسته یک پروتئین ۱۸ کیلودالتونی می‌باشد که با سرم انسان و بز واکنش داده‌است (شکل ۱، ستون‌های ۲، ۶، ۷ و ۸ و شکل ۲الف، ستون‌های ۳ و ۲). در مطالعات گذشته گلدبائوم و همکارانش یک پروتئین ۱۸ کیلودالتونی سیتوپلاسمیک را خالص کردند که ظاهراً به عنوان یک مارکر سرولوژیکی در آلودگی انسان و گاو مبتلا به بروسلوز مطرح شده است (۶). در الگوی ایمونوبلات با گاماگلوبولین خرگوش ایمن شده (شکل ۳ج) و همینطور الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های جذب‌شده به ستون کروماتوگرافی تمایلی با گاماگلوبولین خرگوش ایمن شده (شکل ۱ ب ستون‌های ۲ و ۶) اثر بسیار ضعیفی از این باند دیده می‌شود. این پروتئین که ساختمان چندان متأثر از روش استخراج پروتئین نیست، می‌تواند به عنوان کاندیدی برای تشخیص آلودگی در انسان و بز با روش الایزا مد نظر قرار گیرد.

۲- آنتی‌ژن‌هایی که در حالت طبیعی (در کروماتوگرافی جذبی) با آنتی‌بادی واکنش می‌دهند اما در حالت واسرشته واکنشی با آنتی‌بادی نمی‌دهند و یا واکنش ضعیفی دارند. بخش قابل توجهی از پروتئین‌های پیکره بروسلا جزو این دسته قرار می‌گیرند. در گونه‌های انسان، بز و خرگوش این آنتی‌ژن‌ها تفاوت‌ها و تشابه‌هایی دارند. پروتئین محدوده ۵۵ کیلودالتونی در هر سه گونه جزو این دسته قرار می‌گیرند (شکل ۱، ستون‌های ۲، ۶، ۷ و ۸). پروتئین ۱۹ کیلودالتونی در انسان و خرگوش با شدت بیشتر (شکل ۱، ستون‌های ۲، ۶ و ۸) و در بز با شدت کمتری (شکل ۱، ستون ۷) واکنش می‌دهد. در خرگوش چند پروتئین دیگر در محدوده‌های وزنی ۲۸، ۸۹ و بالاتر از ۱۱۰ کیلودالتون دیده می‌شود که دارای این خصوصیات هستند (شکل ۱، ستون‌های ۲ و ۶). در واکنش با سرم بز نیز پروتئینی با وزن تقریبی ۹۰ کیلودالتون وجود دارد که دارای این خصوصیات می‌باشد (شکل ۱، ستون ۷). در بلات انسان و خرگوش در محدوده ۲۵ تا ۲۸ کیلودالتون یک لکه پهن و کم‌رنگ دیده می‌شود که احتمالاً مربوط به موقعیت لیپوپلی‌ساکاریدها می‌باشند (شکل ۱، ستون‌های ۲، ۶ و ۸). پروتئین‌های این دسته چون در الگوی ایمونوبلات ظاهر نمی‌شوند کمتر به عنوان آنتی‌ژن‌ها در بروسلاها مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. با مطالعه بیشتر بر روی این پروتئین‌ها می‌توان امکان استفاده از آنها را به عنوان

- CA, Kittelberger R, et al. Humoral immune response against lipopolysaccharid and cytoplasmic protein of brucella abortus in cattle vaccinated with B.abortus S19 or experimentally infected with yersinia enterocolitica serotype 0:91. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 7: 472-476.
6. Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA. Characterization of an 18-kDa Brucella cytoplasmic protein which appears to be a serologic marker of active infection of both human and bovin brucellosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2141-2145.
 7. Debbareh SA, Cloeckart A, Bezard G, Dubray G, Zygmunt MS. Enzyme – Linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between brucella melitensis – infected and Brucella melitensis Rev.1-vaccinated sheep. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 7: 305-308.
 8. Vemulapalli R, Cravero S, Calvert CL, Toth TE, Sriranganathan N, Boyle SM, et al. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing and 18KD outer membrane protein of Brucella abortus. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7:114-118.
 9. Oñate AA, Vemulapalli R, Andrews E, Schurig GG, Boyle S, Folch H. Vaccination with live escherichia coli expressing Brucella abortus Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent B. Abortus Infect Immun 1999; 67: 986-988.
 10. Rebecca L, Chirhart-Gillel, Kovack ME, Elzer PH, Stephen R, Roop RM. Identification and characterization of a 14 KD B. abortus protein reactive with antibodies from naturally and experimentally infected hosts and T lymphocytes from experimentally infected BALB/c mice. Infect Immun 1998; 66: 4000-4003.
 11. Tabatabai LB, Pugh GW. Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with Brucella abortus Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. Vaccine 1994; 12: 919-924.

کلی نتیجه گرفته می‌شود که این پروتئین‌ها ایمونوژن‌های ضعیفی هستند و در حالت طبیعی یا واسرشته واکنش بسیار ضعیفی با سرم انسان و بز آلوده به بروسلاز و خرگوش ایمن‌شده با بروسلاز کشته‌شده دارند. مزاحمت فضایی LPS از دلایلی است که باعث ضعف ایمونوژنیسیته این پروتئین‌ها در القای پاسخ‌های هومورال می‌باشد (۲۰).

مطالعه حاضر ظاهراً اولین مطالعه‌ای است که با دو روش متفاوت از نظر تأثیر بر ساختمان طبیعی پروتئین‌ها، به مطالعه واکنش آنتی‌ژن‌های بروسلا آبورتوس و آنتی‌بادی ضد آنها پرداخته است. استخراج پروتئین‌ها در این تحقیق به روشی معتدل و عمدتاً بر پایه قابلیت محلول‌سازی زویترجنت ۱۴-۳ (یک دترجنت آمفوتری) بوده که تغییر محسوسی بر ساختمان طبیعی پروتئین‌ها ندارد. نتایج به‌طور کلی حاکی از آن است که روش ایمونوبات به‌عنوان یک روش متداول، روشی دقیق و قابل اعتماد در شناسایی بخش قابل توجهی از کاندیدهای آنتی‌ژنی مورد استفاده در تشخیص بیماری و واکسن نیست و لازم است نتایج حاصل از آن با روش‌های دیگر مقایسه و ارزیابی شود. دلیل عمده این این موضوع واسرشته‌شدن بسیاری از پروتئین‌ها در مراحل انجام این روش است. به‌هرحال برای تایید این موضوع، لازم است آزمون‌های بیشتر و متنوع‌تری در این زمینه انجام گیرد.

منابع:

1. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 1997; 3: 213-218.
2. Jawets M, Melnick JL, Adelberg EA. Medical microbiology. 20th ed. Los Altos, Calif : Appelton & Lange, 1995: 235-237.
3. Dubray G, Charriaut C. Evidence of three major polypeptide species and of two major polysaccharide species in the Brucella outer membrane. Ann Rech Vet 1983; 14:311-318.
4. Cloeckart A, Wergifosse G, Dubray G, Limet JN. Identification of seven surface-exposed Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. Infect Immun 1990; 58:3980-3987.
5. Baldi PC, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Abdón LF, Velikovsky

12. Teixeira-Gomes A, Cloeckert AP, Bezard G, Bowden RA, Dubray G, Zygmund MS. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electrophoresis* 1997; 18: 1491-1497.
13. Garin BB, Bowden RA, Dubray G, Limet JN. Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2169-2174.
14. Lameli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
15. Hochstrasser DF, Patchornik A, Merrill CR. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Ann Biochem* 1988; 173: 412-423.
16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76:4350-4354.
۱۷. عبدالعلی زاده ج، مصطفایی ع، خرازی ه، نعمان پور ب، نعمانی ح. بررسی ایمونوزن های بروسلا آبورتوس (سویه S19) با الکتروفورز دو بعدی و وسترن بلات. مجله بهبود. سال هفتم، شماره ۱، ۱۳۸۲: ۲۱-۱۱.
۱۸. مصطفایی علی، محمدحسن زهیر، تیرایی بهمن. استخراج و خالص سازی پروتئین های عمده غشای خارجی بروسلا آبورتوس. مجله بهبود. سال چهارم، شماره ۲، ۱۳۷۹: ۳۴-۲۸.
19. Verstrete D, Creasy N, Caveney C, Baldwin M, Balb M, Winter A. Outer membrane protein of *Brucella abortus*: Isolation and Characterization. *Infect Immun* 1983; 35:979-989.
20. Jubier MV, Boigegrain A, Cloeckert A, Gross A, Alvarez MT, Terraza M, et al. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* 2001; 69: 4823 -4830.