مقاله پژوهشی

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 آنتی‌بادی و آنتی‌ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. واسرشته‌شدن برخی از پروتئین‌ها در ایمونوبلاتینگ می‌تواند تأثیر اساسی روی این واکنش بگذارد. در این پژوهش واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس (S19) با سرم جدا شده از گونه‌های انسان و بز مبتلا به بروسلوز و خرگوش ایمن‌شده با بروسلا با روش ایمونوبلاتینگ و کروماتوگرافی‌جذبی مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از کشت انبوه باکتری، استخراج آنتی‌ژن‌های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس با زویترجنت ۱۴-۳ و لیزوزیم انجام گرفت. فراکسیون گاماگلوبولین سرم انسان، بز و خرگوش توسط آمونیوم‌سولفات رسوب داده‌شد. پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس از ستون کروماتوگرافی‌جذبی که لیگاند مورد استفاده در آن فراکسیون گاماگلوبولین انسان، بز یا خرگوش بود، عبور داده‌شد. برای بررسی واکنش پروتئین‌های باکتری با سرم‌ها از دو روش SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ استفاده شد .

SDS-PAGE و ایمونوبلات پروتئین‌های جذب‌شده و جذب‌نشده به ستونهای کروماتوگرافی جذبی حاوی‌لیگاند گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش نشان داد که آنتی‌ژن‌های پیکرهٔ بروسلا را از نظر واکنش با آنتی‌بادی می توان به چهار دسته تقسیم کرد: آنتی‌ژن‌هایی که در هر دو حالت طبیعی و واسرشته با آنتی‌بادی واکنش می‌دهند. آنتی‌ژن‌هایی که در حالت طبیعی با آنتی‌بادی واکنش می‌دهند اما در حالت واسرشته واکنشی با آنتی‌بادی نمی‌دهند. آنتی‌ژن‌هایی که در حالت طبیعی با آنتی‌بادی واکنش نمی‌دهند اما در حالت واسرشته با آنتی‌بادی واکنش می‌دهند. آنتی‌ژن‌هایی که نه در حالت طبیعی و نه در حالت واسرشته با آنتی‌بادی واکنش نمی‌دهند.

بطورکلی نتایج نشان داد که بررسی واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با دو روش کروماتوگرافی جذبی و ایمونوبلاتینگ تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای دارند و تفسیر نتایج ایمونوبلاتینگ در خصوص بخشی از پروتئین‌ها چندان قابل اعتماد نیست.

کلید واژه ها : ایمونوبلات / بروسلا آبورتوس / کروماتوگرافی جذبی

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

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

*** استادیار گروه واکسن 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 :

بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان ودام است که عامل آن معمولاً ازحیوانات آلوده ویا فرآورده‌های حیوانی آلوده به انسان منتقل می‌شود(۱). بروسلاها انگل اختیاری درون‌سلولی 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 الایزا شناسائی شده‌اند(۶-۳). 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 الایزا یا طراحی واکسن مطرح شده‌اند (۹-۶).

وسترن بلاتینگ یا ایمونوبلاتینگ از روش‌هایی است که بطور وسیع در شناخت کاندیدهای آنتی‌ژنی تشخیص طبی و واکسن در انواعی از بیماری‌های عفونی به‌کار می‌رود(۱۳-۹). در این روش ابتدا اجزای پیکره میکروب با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید(بطور معمولSDS-PAGE) تفکیک می‌گردد. اجزای تفکیک‌شده در مراحل بعد به صفحات نیتروسلولز 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 پروتیئن‌ها می‌انجامد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد بررسی واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در چنین شرایطی با حالت طبیعی متفاوت باشد. براین اساس در این مطالعه، آنتی ژنهای پیکرهٔ 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 بلات 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 بروسلوز به‌روش حساسی همچون الایزا می‌باشد.

روش کار:

تهیه وکشت 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 به‌ترتیب، بروسلا براث و بروسلا آگار (بکتون دیکینسون) بود. باکتری پس از جمع‌آوری و سانتریفیوژ با بافر فسفات نمکی(PBS) استریل شستشو داده‌شد و پس از کشته‌شدن با استن سرد، در شرایط سرد به محل آزمایش منتقل گردید.

نمونه‌های سرم: ۱۴ نمونه سرم انسانی از بیماران مبتلا به بروسلوز که علایم بالینی و آزمایشگاهی آنها توسط پزشک متخصص تایید شده‌بود، همچنین ۳۴ نمونه سرمی از بزهای مبتلا به بروسلوز از آزمایشگاه اداره کل دامپزشکی استان کرمانشاه جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها دارای تیتر رایت لوله‌ای حداقل ۱/۳۲۰ وتیتر 2ME حداقل ۱/۱۶۰ بودند. نمونه سرمی خرگوش نیز از خرگوش نیوزیلندی ایمن‌شده تهیه شد.

ایمن‌سازی خرگوش با بروسلای خردشده: بر اساس منحنی استاندارد مک‌فارلن تعلیقی از بروسلای کشته‌شده شامل ۹×۱۰۸ سلول در هر میلی‌لیتر PBS استریل تهیه شد. تعلیق باکتری تحت اثر امواج ماورای صوت با فرکانس خروجی ۲۰ کیلوهرتز خُرد 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 تیتر رایت لوله‌ای به حداقل ۱/۶۴۰ وتیتر 2-ME به حداقل ۱/۳۲۰، ۲۰ میلی‌لیتر خون از قلب حیوان گرفته شد و سرم آن جدا گردید.

تهیه فراکسیون گاماگلوبولین سرم‌ها با سولفات‌آمونیوم: به سرم رقیق‌شده (حداقل ۲بار با PBS) سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۵۰ درصد اضافه‌شد. محلول در ۵۰۰۰×g به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. رسوب پس از ۲بار 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 زویترجنت۱۴-۳ (کلبیوکم) با غلظت ۱درصد، PMSF (سیگما) یک میلی مولار ، لیزوزیم (مرک) یک

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 به‌تعلیق 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 و۲ 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 قرارگرفت. سپس DNase و RNase اضافه شد و ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. تعلیق باکتری ۳۰ دقیقه در g× ۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ گردید. محلول روئی جدا و مجدداً ۳۰ دقیقه در g× ۴۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف روئی که حاوی پروتئین‌های طبیعی باکتری بود در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

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

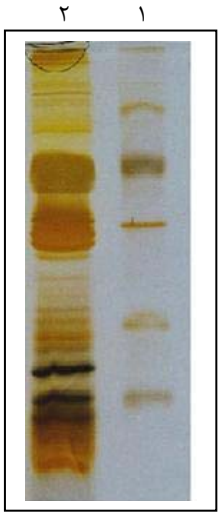
ایمونوبلاتینگ: انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشای پلی‌وینیلیدن‌دی‌فلورید (فارماسیا) به‌روش تاوبین انجام گرفت(۱۶). آنتی‌بادی مورد استفاده، فراکسیون گاماگلوبولین غنی از IgG سرم انسان یا بزمبتلا به بروسلوز و خرگوش ایمن شده بود. پس از الکتروفورز، ژل ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرار گرفت. سپس غشا با متانول خیس گردید ودرظرف حاوی بافر انتقال قرارگرفت. مجموعه بلات در قالب پلاستیکی مربوطه محکم شد و در تانک بلات حاوی بافر انتقال به مدت یک ساعت درشدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی‌آمپر وسپس به مدت دو ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰۰ میلی‌آمپر الکتروفورز شد. پس از انتقال، غشا به مدت ۱۵ دقیقه دربافر تریس نمکی حاوی توین بیست ۰/۵ درصد (TBS-T1) قرارگرفت (مسدودسازی). سپس ۳ بار با بافر تریس نمکی حاوی توین بیست ۰/۰۵ درصد (TBS-T2) شستشو داده‌شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی اولیه (گاماگلوبولین انسانی، بزی یا خرگوشی) قرارگرفت . غشا ۵ بار با TBS-T2 شسته شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه با پراکسیداز، شرکت سیگما) قرارگرفت. غشا ۶ بار با TBS–T2 شسته شد و سپس درمعرض مقدار کافی از محلول سوبسترای دی آمینو بنزیدین (داکو) و پراکسید هیدروژن قرارگرفت 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 ژل‌متورم شده ۸میلی‌لیتر محلول بی کربنات 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 به‌هم خوردن) قرار گرفت. سپس به مدت ۳ساعت با محلول گلیسین۰/۲ مولار با pH ۸ شستشو داده‌شد (مرحله مسدودسازی). ژل آماده‌شده به ستون منتقل شد و ۴ بار به‌طور متناوب با بافر استات (۰/۱ مولار و۴ pH) و بیکربنات سدیم(۰/۲ مولار و۸/۵ pH) حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم شستشو داده‌شد. 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 با۷/۲ pH با سرعت ۵ میلی‌لیتر در ساعت وارد ستون گردید. سپس ستون‌با بافر فسفات‌نمکی شستشو داده‌شد تا جذب‌خروجی به کمتر از ۰/۰۱ رسید و با بافر شوینده شامل گلیسین-اسیدکلریدریک (۰/۲ مولار با pH۲/۳) شسته شد و فراکسیون‌ها در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید.

نتایج :

SDS-PAGE پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس سویه S19:

شکل ۱ (الف) الگوی الکتروفورز پروتئین‌های پیکرهٔ 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 محدودهٔ 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.

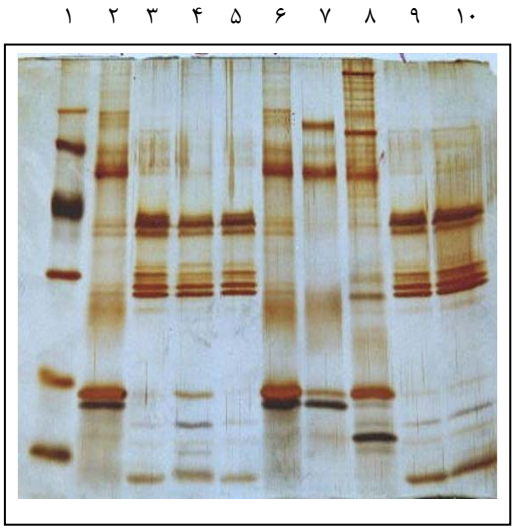


شکل۱الف: SDS-PAGE پروتئن‌های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس سویه S19 (ستون ۲) استخراج شده با لیزوزیم و زویترجنت ۱۴-۳.

الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های جذب‌شده وجذب نشده به ستون‌های کروماتوگرافی جذبی حاوی گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش در شکل۱(ب) آمده است. در این شکل، ستون های۲و۶ پروتئین‌های باکتری متصل‌شده به ستون حاوی گاماگلوبولین انسانی را نشان‌می‌دهد. در این الگو دو باند پروتئینی قوی درموقعیت‌های ۱۸و۱۹کیلودالتون، یک لکهٔرنگی به‌صورت پهن و کمرنگ در محدودهٔ ۲۴ تا۲۸کیلودالتون، سه باند ضعیف در حدود ۳۰-۲۸ کیلودالتون، دو باند ضعیفدر موقعیت ۳۶ تا ۴۱ کیلودالتون، یک باند پروتئینی قوی درموقعیت حدود ۵۷ کیلودالتون، یک باند ضعیف در موقعیت حدود ۶۵ کیلودالتون و سه باند نسبتاً ضعیف در محدودهٔ ۸۵ تا ۹۱ کیلودالتون قابل مشاهده است. ستون۳ پروتئین‌های بروسلا را نشان‌می‌دهد 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 از۱۴ تا ۲۰ کیلودالتون، حداقل سه باند بسیار قوی در ۲۸ تا ۳۱ کیلودالتون، یک باند قوی در۳۸ کیلودالتون و یک باند پهن و بسیار قوی درمحدوده ۴۱- ۳۹ کیلودالتون می‌باشد.

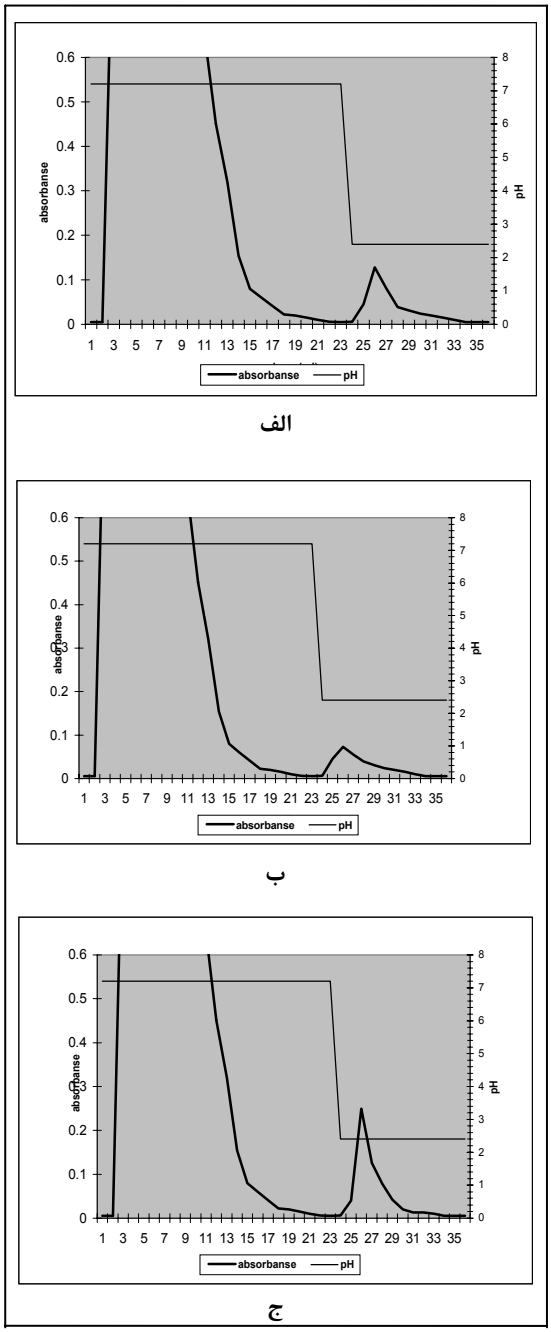
ستون ۷ پروتئین‌های جذب‌شده به ستون حاوی گاماگلوبولین بز را نشان می‌دهد. این الگو شامل دو باند پروتئینی قوی در موقعیت های ۱۸ و ۱۹ کیلودالتون، یک گستردهٔ ضعیف و خیلی پهن درمحدودهٔ ۲۵ تا ۲۹ کیلودالتون، یک باند پهن و قوی در حدود ۵۷ کیلودالتون، یک باند ضعیف در حدود ۶۶ کیلودالتون و یک باند قوی در محدودهٔ ۸۵ تا ۹۰ کیلودالتون می‌باشد. ستون ۴ پروتئین‌هائی که جذب ستون کروماتوگرافی تمایلی حاوی لیگاندگاماگلوبولین بزی 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 محدودهٔ 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 محدودهٔ ۴۲ تا ۹۴ کیلودالتون و چهار باند نسبتاً قوی در حدود ۱۱۰ کیلودالتون و بالاتر می‌باشد.

ستون ۸ پروتئین‌های جذب‌شده به ستون با لیگاند گاماگلوبولین خرگوشی را نشان می‌دهد. این الگو شامل یک باند قوی در حدود ۱۶ کیلودالتون ودو 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 محدودهٔ ۲۲ تا ۲۵ کیلودالتون ، یک باند نسبتاً قوی در حدود ۲۷ کیلودالتون، چند باند ضعیف در محدودهٔ 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 نسبتاً قوی در حدود ۸۵ کیلودالتون، حدود ۷ باند ضعیف و یک باند قوی در محدودهٔ ۹۰ تا بیش از ۱۱۰ کیلودالتون می‌باشد. ستون ۵ پروتئین‌هائی را نشان‌می‌دهد 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 موقغیت‌های 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 ۳-۲ باند قوی در محدودهٔ ۳۶ تا ۴۱ کیلودالتون و چندین باند بسیار ضعیف در حدود ۵۷ تا ۶۷ کیلودالتون (شکل ۱ ب).



شکل۱ ب: SDS-PAGE پروتئین‌های بروسلا آبورتوس جذب شده (ستون های ۲و۶) و جذب نشده (ستون۳) به ستون کروماتوگرافی تمایلی با لیگاند گاماگلوبولین انسان، جذب شده و نشده (به‌ترتیب ستونهای۷ و ۴) به ستون کروماتوگرافی با لیگاند گاماگلوبولین بز و جذب‌شده و نشده (به‌ترتیب ستون‌های ۸ و ۵) به ستون با لیگاند گاماگلوبولین خرگوش می باشد. ستون۱ مارکرهای پروتئین با اوزان۱۴، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۶ و ۹۷ کیلودالتون را نشان می‌دهد.

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 نانومتردر سمت راست و pH محلول‌هایی که از ستون عبور داده‌شده‌اند 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 جذب‌شده را نشان می‌دهد. هرچه تیتر آنتی‌بادی متصل‌شده به ستون بیشتر باشد، چون جمعیت IgGهای ضد آنتی‌ژن‌های بروسلا در آن بیشتر است، جذب آنتی ژن و در نتیجه سطح زیر منحنی نیز بیشتر خواهد بود. با توجه به تیتر 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 آنتی‌ژن ها را نشان داد.

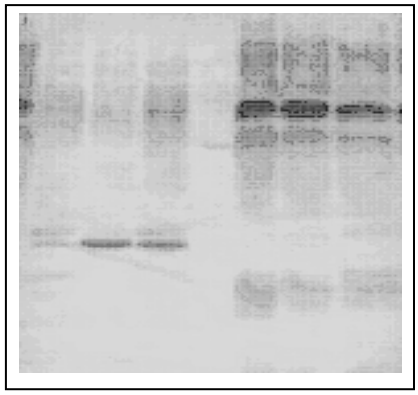


شکل ۲: نمودارکروماتوگرافی تمایلی پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس بر روی ستون سفارز۴- بی حاوی لیگاند گاماگلوبولین انسان(الف)، بز(ب) و خرگوش (ج)

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 پروتئین های 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 ۳(الف) الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین انسان را نشان میدهد.در این شکل ستونهای ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب، پروتئینهای جذب‌شده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین خرگوش، بز وانسان، ستونهای ۵، ۶ و ۷ پروتئین‌های جذب نشده 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 پپتیدوگلیکان اضافه شده است.

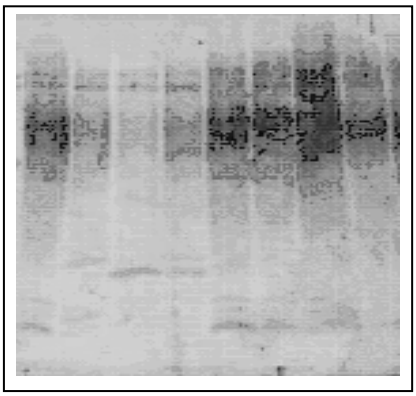
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷



شکل ۳ الف : الگوی ایمونوبلات پروتئین های بروسلا با گاماگلوبولین انسان

شکل ۳(ب) الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین بزی را نشان می‌دهد.در این شکل ستون‌های ۲، ۳ و ۴ به‌ترتیب، 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 ۱و۸ ایمونوبلات کل پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا را نشان می‌دهد.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸



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

شکل ۳(ج) الگوی ایمونوبلات پروتئین‌های بروسلا با گاماگلوبولین خرگوشی را نشان می‌دهد.در این شکل ستون‌های ۲، ۳ و ۴ به‌ترتیب، 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 پیکرهٔ بروسلا را نشان می‌دهد.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷

شکل ۳ ج : الگوی ایمونوبلات پروتئین های 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 به‌کار 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 می گردد.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آنتی ژن های پیکرهٔ بروسلا آبورتوس از نظر واکنش با آنتی بادی موجود در سرم انسان بیمار، بز مبتلا به بروسلوز یا خرگوش ایمن‌شده را می توان 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

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 ۱ب، ستون های ۲، ۶، ۷ و ۸ و شکل ۲الف، ستون های ۲و۳). 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 ایمن‌شده (شکل ۳ج) و همینطور الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های جذب‌شده به ستون کروماتوگرافی تمایلی با گاماگلوبولین خرگوش ایمن شده(شکل۱ ب ستون‌های۲ 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 ویا واکنش ضعیفی دارند. بخش قابل توجهی از پروتئین‌های پیکرهٔ بروسلا جزو این دسته قرار می‌گیرند. در گونه‌های انسان، بز وخرگوش این آنتی‌ژن‌ها تفاوت‌ها و تشابه‌هایی دارند. پروتئین محدودهٔ ۵۵ کیلودالتونی در هر سه گونه جزو این دسته قرار می‌گیرند(شکل۱ب، ستون‌های۲، ۶، ۷ و ۸). پروتئین ۱۹ کیلودالتونی در انسان و خرگوش با شدت بیشتر(شکل۱ب، ستون‌های۲، ۶ و ۸) و در بز با شدت کمتری (شکل۱، ب ستون۷) واکنش می‌دهد. در خرگوش چند پروتئین دیگر در محدوده‌های وزنی ۲۸، ۸۹ و بالاتر از ۱۱۰ کیلودالتون دیده می‌شود که دارای این خصوصیات هستند (شکل۱ب، ستون‌های۲ و ۶). در واکنش با سرم بز نیز پروتئینی با وزن تقریبی ۹۰ کیلودالتون وجود دارد که دارای این خصوصیات می باشد (شکل۱ب، ستون۷). در بلات انسان و خرگوش در محدودهٔ ۲۵ تا ۲۸ کیلودالتون یک لکهٔ پهن و کمرنگ دیده می‌شود که احتمالاً مربوط به موقعیت لیپوپلی‌ساکاریدها می‌باشند(شکل۱ب، ستونهای۲، ۶ و ۸). پروتئین‌های این دسته چون در الگوی ایمونوبلات ظاهر نمی‌شوند کمتر به عنوان آنتی‌ژن‌هادر بروسلاها مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. با مطالعهٔ بیشتر بر روی این پروتئین‌ها می توان امکان استفاده از آنها را به عنوان واکسن‌های زیرواحد یا تشخیص بروسلوز به روش‌های کمی و حساس روشن نمود. برای این کار لازم است ابتدا این انتی‌ژن‌ها 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 ۱ب، ستون های۳، ۴ و ۵) در ناحیهٔ 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 محدودهٔ 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 قابل‌توجهی با آنتی‌بادی ندارند. در الگوی SDS-PGAE پروتئینهای جذب نشده به ستون کروماتوگرافی حاوی لیگاند گاماگلوبولین انسان، بز و خرگوش، در ناحیهٔ ۲۷ تا ۳۱ کیلودالتونی یک گروه پروتئینی مشتمل بر سه تا چهار باند قوی دیده میشود (به ترتیب ستونهای۳، ۴ و ۵ شکل۱ب). این باندها در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل پیکرهٔ باکتری که با زویترجنت استخراج شده نیز به وضوح دیده می‌شوند و بخش قابل توجهی از پروتئین‌های باکتری را به‌خود اختصاص می‌دهند. بررسی مطالعات دیگر محققین نشان می‌دهد، پروتئین‌های گروه سه غشا خارجی که جزو پروتئین‌های عمدهٔ 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 وخرگوش نیز ظاهر نمی‌شوند(شکل۳). بنابراین به طور

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 بروسلوز و خرگوش ایمن‌شده با بروسلای کشته‌شده دارند. مزاحمت فضایی LPS از دلایلی است که باعث ضعف ایمونوژنیسیتهٔ این پروتئین‌ها در القای پاسخ های هومورال می باشد(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 پروتین‌ها ندارد. نتایج به‌طورکلی حاکی از آن است که روش ایمونوبلات به‌عنوان یک روش متداول، روشی دقیق وقابل 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. Cloeckaert 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 CA, Kittelberger R, et al. Humoral immune response againest lipopolysaccharid and cytoplasmic protein of brucella abortus in cattle vaccinated with B.abortus S19 or experimentally infected with yersinia entercolitica 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 apears to be a serologic marker of active infection of both human and bovin brucellosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2141-2145.
7. Debbareh SA, Cloeckaert A, Bezard G, Dubray G, Zygmunt MS. Enzyme – Linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-killodalton 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.

12. Teixera-Gomes A, Cloeckaert 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 bacteruophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
15. Hochstrasser DF, Patchornik A, Merril 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 ایمونوژن های بروسلا آبورتوس (سویه S19) با الکتروفورز دو بعدی و وسترن بلات. مجله بهبود. سال هفتم، شماره۱، ۱۳۸۲: ۲۱-۱۱.
۱۸. مصطفایی علی، محمدحسن زهیر ، تبرایی بهمن. استخراج و خالص‌سازی پروتئین‌های عمده غشای خارجی بروسلا آبورتوس. مجله بهبود. سال چهارم، شماره۲، ۱۳۷۹: ۳۴-۲۸.
19. Verstreate 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, Cloeckaert 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.