بررسی ایمونوژن های بروسلا آبورتوس(سویهS19) با الکتروفورز دو بعدی و وسترن بلات

جلال عبدالعلی زاده*؛ علی مصطفایی*؛ هادی خرازی**؛ بیژن نعمان پور* ؛ حمید نعمانی**

چکیده :

سابقه و هدف: *بروسلوز از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که براثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا به‌وجود می‌آید. لیپوپلی‌ساکاریدها، پروتئین‌های غشای خارجی و چندین نوع پروتئین ریبوزومی و سیتوزولی به‌عنوان اجزای ایمونوژنیک مهم در بروسلا مطرح شده‌اند. این مطالعه با هدف شناسایی ایمونوژن‌های بروسلا آبورتوس و مقایسه این ایمونوژن‌ها در سه گونه انسان ، بز و خرگوش انجام گرفت.*

مواد و روش‌ها: *سویه S19 بروسلا آبورتوس از انستیتو پاستور ایران تهیه و در آنجا کشت انبوه داده شد و به‌صورت کشته‌شده به این مرکز منتقل گردید. پروتئین‌های پیکره باکتری با کمک لیزوزیم، اوره و CHAPS استخراج و به روش الکتروفورز دوبعدی تفکیک گردید. بعد از الکتروفورز دوبعدی، پروتئین‌ها به غشای نیتروسلولز منتقل و واکنش آن‌ها به‌روش ایمونوبلاتینگ در مقابل نمونه‌های سرم انسانی، بزی و خرگوشی بررسی گردید.*

یافته‌ها: *نتایج الکتروفورز دوبعدی نشان داد که پروتئین‌های این سویه عمدتاً pI اسیدی دارند و در دامنه وزنی۱۰۰-۱۰ کیلودالتون قرار دارند. فراوان‌ترین پروتئین پیکره این سویه یک گروه ۶-۵ پروتئینی با وزن ۳۴ -۳۲ کیلو دالتون و۵/۷- pI۴/۵ بودکه در خرگوش و بز ایمونوژن بودند، ولی در سرم انسان واکنشی درمقابل آن‌ها دیده نشد. درمقابل در سرم انسان بیمار علیه یک مجموعه ۵-۴ پروتئینی با وزن ۴۴ کیلو دالتون و pI معادل ۵/۵ -۴/۵ و چندین پروتئین کم‌وزن آنتی بادی وجود داشت. به‌علاوه واکنش سرم انسان، بز و خرگوش با تعدادی از آنتی‌ژن‌های پیکره بروسلا مشابه بود.*

بحث : *اگرچه LPS در هر سه گونه انسان، بز و خرگوش یک ایمونوژن قوی محسوب می‌شود، این آنتی‌ژن، ظاهراً نامزد مناسبی برای تشخیص نیست. در مقابل، یک گروه پروتئینی۳۴-۳۲ کیلو دالتونی با ۵/۷-۴/۵ pI و دو پروتئین ۲۰-۱۸ کیلو دالتونی با ۷-۶ pI می‌توانند به‌عنوان نامزد پروتئینی در تشخیص بیماری در بز و حتی سایر گونه‌های دامی از جمله گاو مدنظر قرار گیرند. در مقابل، در انسان گروه پروتئینی موقعیت وزنی ۴۵ کیلودالتون با ۵/۵ -۴/۵ pI و چند پروتئین با اوزان کمتر از ۲۰ کیلو دالتون می‌توانند به عنوان نامزد آنتی‌ژنی در تشخیص دقیق‌تر، سنجش کلاس‌های آنتی‌بادی(IgG و IgM) وحتی تمایز بروسلوز فعال از غیرفعال مطرح باشند.*

کلیدواژه‌ها : *بروسلا آبورتوس ، الکتروفورز دو بعدی ، وسترن بلات ، ایمونوژن .*

---

* مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

** گروه بیوشیمی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

* **عهده‌دار مکاتبات** : کرمانشاه ، باغ‌ابریشم ، سرخه‌لیژه ، دانشکده پزشکی ، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی . تلفن : ۱۴-۴۲۲۹۴۰۹ .

مقدمه:

بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که براثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا به‌وجود می‌آید. بروسلا آبورتوس و بروسلاملی‌تنسیس عمده‌ترین گونه‌های عامل بروسلوز در انسان و دام هستند(۱و۲). بروسلاها کوکوباسیل‌های داخل سلولی اختیاری هستند که سلول‌های بیگانه‌خوار(نظیر نوتروفیل و ماکروفاژ) و غیربیگانه‌خوار را آلوده می‌سازند(۳). این باکتری‌ها فاقد اسپور، پلاسمید، تاژک، پیلی و اگزوتوکسین مشخص‌هستند(۴). تاکنون لیپوپلی‌ساکاریدها(LPS)، پروتئین‌های غشای خارجی و چندین نوع پروتئین ریبوزومی و سیتوزولی به‌عنوان اجزای ایمونوژن مهم در بروسلا مطرح شده‌اند. لیپو پلی‌ساکاریدها از فراوان‌ترین آنتی‌ژن‌های غشای خارجی بروسلاها هستند که بخش عمده‌ای از پاسخ هومورال بدن را علیه این باکتری‌ها به‌خود اختصاص می‌دهند(۵). آزمون‌های رایج سرولوژیک که درتشخیص بروسلوز در انسان و دام مورد استفاده قرار می‌گیرد، عمدتاً آنتی‌بادی‌های ضد لیپوپلی‌ساکارید را می‌سنجند. این آنتی‌بادی‌ها واکنش متقابل قابل‌توجهی با لیپو پلی‌ساکارید بعضی از باکتری‌های گرم‌منفی دیگر همچون ایشریشیاکولی و یرسینیا دارند. از طرف دیگر در بسیاری از موارد حتی بعد از بهبود بروسلوز، درتیتر بالایی باقی می‌مانند(۶). به‌علاوه آنتی‌بادی‌های ضد LPS نمی‌توانند دام آلوده به بروسلا را از دام واکسینه متمایز نمایند(۷). بدین‌لحاظ از مدت‌ها پیش تلاش‌های زیادی برای یافتن پروتئین‌هایی که مشکلات فوق را نداشته باشند، معطوف شده است. همچنین برای دست‌یابی به واکسن زیرواحد علیه بیماری بروسلوز که مشکلات واکسن‌های فعلی را نداشته باشد نیز مطالعات مختلفی روی پروتئین‌ها صورت گرفته‌است.

در این مطالعه، ابتدا با استفاده از روش الکتروفورز دوبعدی که از پیشرفته‌ترین تکنیک‌ها در تحقیقات مولکولی است، پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس (سوش S19) تفکیک گردید. سپس با کمک وسترن‌بلات، ایمونوژنیسیته پروتئین‌های پیکره این باکتری درمقابل سرم انسان‌بیمار، بز بیمار و خرگوش ایمن‌شده با بروسلای کشته‌شده، مورد بررسی قرارگرفت. یافتن ایمونوژن‌های عمده پروتئینی بروسلا و مقایسه این ایمونوژن‌ها درسه گونه انسان، بز و خرگوش با هدف یافتن نامزدهای آنتی‌ژنی جهت استفاده از آن‌ها در تشخیص بروسلوز با روشی همچون الایزا و یا طراحی واکسن‌های زیرواحد از اهداف عمده این مطالعه بوده‌است.

مواد و روش‌ها:

- تهیه باکتری : سویه S19 بروسلا آبورتوس از انستیتو پاستور ایران تهیه و در آنجا کشت انبوه داده شد. باکتری پس از جمع‌آوری با سانتریفوژ و شستشو با بافرفسفات‌نمکی (PBS) استریل، با استون سرد کشته شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به محل آزمایش منتقل گردید.
- آماده‌سازی نمونه برای الکتروفورز دوبعدی: مقدار ۰/۲۵ گرم باکتری، پس ازشستشو با بافرتریس۲۰ میلی‌مولار با pH ۷/۲، دریک میلی‌لیتر از این بافر به‌تعلیق درآمد. سپس PMSF و EDTA (مرک) هریک با غلظت نهایی یک میلی‌مولار و لیزوزیم(مرک) (۱ میلی‌گرم

به ازای ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک باکتری) اضافه گردید. تعلیق باکتری به مدت یک شب درگرمخانه ۳۷ درجه قرارگرفت. سپس اوره با غلظت نهایی ۹ مولار، CHAPS با غلظت ۴ درصد، آمفولیت ۰/۸ درصد (آمفولین ۶-۴ و فارمالیت ۸ -۵ به‌نسبت مساوی) وDTT با غلظت نهایی ۶۵ میلی‌مولار اضافه شد و حجم نهایی آن با بافر تریس به ۲ میلی‌لیتر رسانده‌شد. محلول به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرارگرفت. سپس با دور g×۵۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی در حجم‌های کوچک تقسیم ودر ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

• نمونه‌های سرم: نمونه سرم انسانی شامل مخلوطی از ۱۴ سرم بیمار مبتلا به تب مالت با تیتر حداقل ۱:۳۲۰ و ۱:۱۶۰ برای آزمون‌های رایت و ۲- مرکاپتواتانل(2-ME) بود. نمونه سرم بز شامل مخلوطی از ۳۴ سرم بز مبتلا به بروسلوز با تیتر حداقل ۱:۳۲۰ و ۱:۱۶۰ برای آزمون‌های رایت و 2-ME بود. نمونه خرگوشی شامل سرم دو سر خرگوش نیوزیلندی بود که با تزریق زیرجلدی و درون‌ماهیچه‌ای بروسلا آبورتوس خردشده (طی دوماه و۴ بار تزریق) ایمن شده‌بود و تیتر 2-ME آن حداقل ۱:۳۲۰ بود.

• الکتروفورز دوبعدی: بعد اول الکتروفورز شامل ایزوالکتریک فوکوسینگ(IEF) بود که به روش آب‌گیری مجدد با کمی تغییرات صورت گرفت(۸). برای این‌کار ابتدا ژل پلی آکریل‌آمید با غلظت ۴/۰۵ درصد روی طلق قابل اتصال به ژل(Gel Bond) (فارماسیا) تهیه و پس از شستشو در آب بدون‌یون، خشک و در فریزر نگهداری شد. در زمان استفاده اندازه معینی از ژلIEF در بافر حاوی: اوره ۸ مولار، چپس ۲ درصد، آمفولیت ۶ درصد (آمفولین۶-۴ و فارمالیت ۸-۵ به‌نسبت‌مساوی)، DTT ۱۸ میلی‌مولار و اتیلن گلیکول ۷/۵ درصد در طول یک شب متورم گردید. نمونه پروتئینی نیز به محلول متورم‌کننده اضافه‌شد. IEF در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد در دستگاه مالتی‌فورII (فارماسیا) انجام گرفت. مراحل IEF شامل مرحله پیش‌فوکوسینگ به مدت ۲۰ دقیقه در۷۰۰ ولت، مرحله نفوذپذیری در شیب ولتاژ۵۰۰ -۰ ولت به مدت یک ساعت، مرحله جداسازی در دو مرحله، ابتدا در شیب ولتاژ ۲۵۰۰-۰ ولت به مدت ۱۵ دقیقه و سپس در ولتاژ ثابت ۲۵۰۰ ولت به مدت شش ساعت انجام گرفت. مرحله نازک‌شدن باندها نیز در ولتاژ ثابت ۳۰۰۰ ولت به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس از اتمام ایزوالکتریک فوکوسینگ، ژل به نوارهایی به عرض ۸-۵ میلی‌متر بریده‌شد و به‌مدت ۲۵ دقیقه در داخل بافر متعادل‌کننده (شامل تریس-HCl۵۰ میلی‌مولار با ۸/۸ pH، گلیسرول۳۰ درصد، SDS دو درصد، برموفنل بلو۰/۰۱ درصد و DTT به مقدار۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر۱۰ میلی‌لیتر محلول) قرارگرفت. سپس نوارهای مزبور روی ژلSDS-PAGE قرار داده شد. SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۳ درصد به روش لاملی (۹) انجام گردید. پس از الکتروفورز بسته به هدف آزمایش (رنگ‌آمیزی یا بلاتینگ) ژل در داخل محلول رنگ‌آمیزی یا بافر انتقال قرارگرفت. رنگ‌آمیزی ژل با روش نقره آمونیاکی انجام‌گرفت که شکل تغییریافته‌ای از روش هوکستراسر(۱۰) بود.

• وسترن بلات: بلاتینگ با روش انتقال درتانک صورت

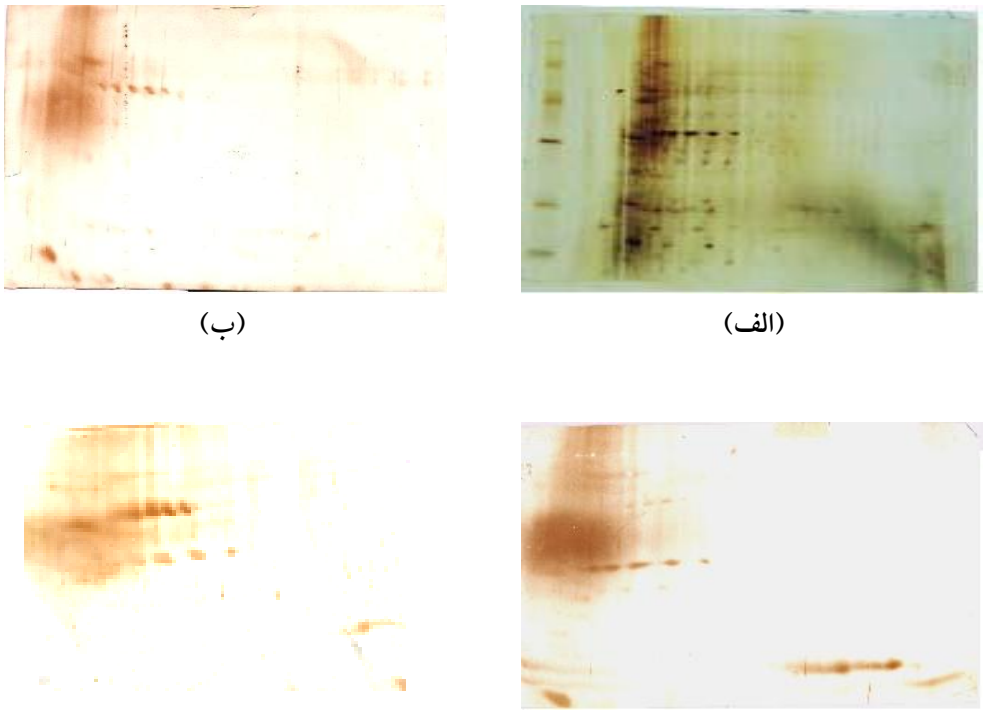
گرفت(۱۱). این مرحله شامل الکتروفورز به مدت یک ساعت در شدت جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر و دو ساعت در شدت جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر بود. پس از انتقال، غشای نیتروسلولز (فارماسیا) مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس نمکی، حاوی توین ۰/۵ درصد قرار گرفت. سپس ۳ بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر تریس نمکی حاوی توین ۰/۰۵ درصد(TBS-T) شسته شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی اولیه (انسانی، بزی یا خرگوشی، به ترتیب با رقت ۱:۵۰، ۱:۳۰ و ۱:۲۰۰) قرار گرفت. غشا ۴ بار و هربار ۵ دقیقه با TBS-T شسته شد و به‌مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی ضد IgG انسانی، بزی یا خرگوشی کونژوگه با پراکسیداز به‌ترتیب با رقت ۱:۵۰۰، ۱:۵۰۰ و ۱:۳۰۰۰) قرارگرفت. غشا ۶-۵ بار وهر بار ۵ دقیقه باTBS – T شسته شد و سپس در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (داکو) و پراکسید هیدروژن قرارداده‌شد. پس از ظهور نقطه‌های پروتئینی در عرض ۱۰ -۵ دقیقه غشاها درآب مقطر زیاد شسته شدند.

یافته‌ها :

نقطه ایزوالکتریک(pI) پروتئین‌های سویهS19 بروسلا آبورتوس عمدتا اسیدی بود و اغلب آن‌ها در محدوده pH۴/۵-۶ قرارداشت(قسمت الف، شکل۱). پروتئین‌های این سویه که از نظر وزنی در دامنه ۱۰۰-۱۰ کیلو دالتون قرارداشتند، دارای مقادیر متفاوتی بودند. درصد قابل توجهی از این پروتئین‌ها به‌صورت چند گروه پروتئینی با تفاوت‌های محسوس pI دیده می‌شدند. برای مثال، یک گروه ۶ – ۵ پروتئینی با وزن مشابه ۳۴ -۳۲ کیلو دالتون و pI متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۷ از پرمقدارترین پروتئین‌های پیکره این سویه بود.

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده‌شد، پس از تفکیک پروتئین‌های پیکره بروسلا به‌روش الکتروفورز دوبعدی و انتقال آن‌ها به صفحات نیتروسلولز، واکنش این آنتی‌ژن‌ها با سرم سه گونه پستاندار، مورد آزمون و مقایسه قرارگرفت. در واکنش سرم بیماران انسانی با آنتی‌ژن‌های پیکره بروسلا آبورتوس (قسمت ب، شکل۱) حداقل یک لکه پروتئینی در محدوده وزنی ۶۵-۶۰ کیلودالتون با pI ۵-۴ ، ۶-۵ لکه در محدوده وزنی حدود ۴۴ کیلو دالتون با pI ۵/۵-۴/۵ ، یک لکه در محدوده وزنی ۳۲ کیلودالتون با pI ۴/۸، ۲ لکه در محدوده وزنی ۳۰-۲۸ کیلودالتون با ۵/۵ -۴/۵ pI، حدود۳ لکه درمحدوده وزنی ۱۸ کیلو دالتون با pI ۷-۴/۵ و حداقل ۷ لکه در محدوده وزنی ۱۴ وکمتر از۱۴ کیلودالتون با pI ۷-۴/۵ ظاهرگردید. در این میان شدت رنگ‌پذیری ۵ لکه پروتئینی محدوده وزنی ۴۴ کیلودالتون و ۵ لکه پروتئینی محدوده وزنی ۱۴ و کمتراز ۱۴ کیلودالتون بیشتر بود.

واکنش سرم خرگوش ایمن‌شده با پروتئین‌های پیکره بروسلا در قسمت ج شکل۱ آمده است. همان‌گونه که در این شکل مشخص است، ۴ لکه در محدوده وزنی حدود ۵۵-۵۰ کیلودالتون با ۵/۵-۴/۵ pI، حداقل۶-۵ لکه در محدوده وزنی ۳۴-۳۲ کیلو دالتون با ۵/۷-۴/۵ pI، دو لکه در محدوده وزنی۲۸-۲۶ کیلودالتون و ۵/۵-pI۵، حداقل ۲ لکه در



شکل۱- (الف) الگوی الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های پیکره بروسلاآبورتوس در دامنه pH۴-۸، ستون M مارکرهای وزنی از بالا به‌پایین به‌ترتیب:۹۴، ۶۷، ۴۵، ۳۰، ۲۰ و ۱۴ کیلودالتون می‌باشد. رنگ آمیزی ژل به روش نقره انجام گرفته است. ایمونو بلاتینگ پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس با سرم انسان مبتلا به بروسلوز(ب)، خرگوش ایمن شده با باکتری کشته شده و خرد شده(ج) و بز مبتلا به بروسلوز(د) بود.

محدوده وزنی ۲۰-۱۸ کیلودالتون با pI ۶/۵-۸ و چندین لکه در محدوده وزنی کمتراز ۱۸ کیلودالتون با pI ۴-۵ وpI۷/۵-۸ دیده می‌شود. شدت رنگ‌پذیری لکه‌های محدوده وزنی ۳۴-۳۲ و دو لکه در محدوده وزنی ۱۸ و زیر ۱۸ کیلو دالتون بیشتربود. واکنش سرم بزهای مبتلا به بروسلوز با پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس در قسمت د شکل۱ نمایش داده شده است. در این شکل یک لـــکه پروتئینی در محدوده وزنی ۶۵-۶۰ کیلودالتون با pI ۴/۵-۵/۵، ۶-۵ لکه درمحدوده وزنی حدود۴۵ کیلو دالتون بک pI ۴/۵- ۵/۵، ۶-۵ لکه در محدوده وزنی ۳۴-۳۲ کیلودالتون با pI ۴/۵-۵/۷ و حدود ۴ لکه در محدوده وزنی کمتراز ۲۰ کیلودالتون با pI ۶/۵-۷/۵ دیده می‌شود. شدت رنگ‌پذیری لکه‌های پروتئینی محدوده وزنی ۴۵ و ۳۴-۳۲ کیلودالتون و ۳ لکه محدوده وزنی کمتر از۲۰ کیلودالتون بیشتر بود.

در ایمونوبلات‌های مورد مطالعه، آنتی‌بادی علیه LPS بروسلا به‌صورت یک لکه بزرگ و مشابه اثر انگشت در یک دامنه وزنی بیش از ۲۰ کیلودالتون و pH ۴-۵ دیده‌شد. این الگو در ایمونوبلاتینگ با سرم خرگوش

از شدت رنگ‌پذیری بیشتری نسبت به نمونه انسان و بز برخوردار بود.

بحث:

درمیان پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس که شامل صدها نوع پروتئین در الگوی الکتروفورز دوبعدی است، حضور چندگروه پروتئینی که اجزای آن‌ها اوزان مشابه و نقاط ایزوالکتریک متفاوتی دارند، قابل توجه است. عمده‌ترین گروه پروتئینی در الگوی الکتروفورز دوبعدی یک مجموعه ۶-۵ پروتئینی است که اوزانی مشابه (۳۴-۳۲ کیلو دالتون)، ولی pI متفاوتی(از ۴/۵ تا ۵/۷) دارند. این مجموعه، پرمقدارترین پروتئین پیکره باکتری در سویه مورد مطالعه(سویه S19) را تشکیل می‌دهد. این گروه که شاید جزو پروتئین‌های گروه سوم غشای خارجی بروسلا باشد(۱۲)، در مطالعات دیگران بر بروسلا اویس وملی‌تنسیس گزارش نشده است (۱۳و۱۴). وجود چنین گروه پروتئینی پرمقداری در سویه مورد مطالعه ما (سویه S19) شاید به‌دلیل خصوصیات این سویه و یا سازش با شرایط کشت باشد. سویه S19 بروسلا آبورتوس ده‌ها سال است که به هدف منبع آنتی‌ژنی برای تشخیص پزشکی و تهیه واکسن گاوی مورداستفاده قرار می‌گیرد(۱۵). از دیگر گروه‌های پروتئینی در الگوی الکتروفورز دوبعدی می‌توان به یک مجموعه ۵-۴ پروتئینی با وزن حدود ۴۷ کیلودالتون و۵/۲-۴/۷ pI، یک گروه ۴-۳ پروتئینی با وزن حدود ۴۹ کیلودالتون و۵/۵-۵ pI اشاره کرد.

نتایج آزمایش ایمونوبلاتینگ که درآن واکنش سرم انسان، بز وخرگوش با پروتئین‌های تفکیک‌شده باکتری با الکتروفورز دوبعدی مورد مطالعه قرار گرفت، حاوی نکات قابل‌توجهی بود که عمده‌ترین آن‌ها به قرار ذیل است:

۱- بخش عمده‌ای از آنتی‌بادی ضد بروسلا در هر سه گونه مورد مطالعه، علیه بخش لیپو پلی‌ساکاریدی (LPS) دیواره سلولی است. الگوی LPS در ایمونوبلاتینگ، شامل یک منطقه وسیع با دامنه وزنی بیش از ۲۰ کیلودالتون در بخش میانی ژل با دامنه pI ۵-۴ است. این الگو که مشابه اثر انگشت است، درایمونوبلاتینگ با سرم خرگوش (قسمت ج شکل۱) که تیتر آنتی‌بادی ضد بروسلا در آن بسیار بالاتر از انسان و بز است، مشهودتر می‌باشد. الگوی خاص LPS از نظر تنوع وزن و بار که ظاهراً تنها در این مطالعه نشان داده شده‌است، ناشی از تفاوت تعداد واحدهای الیگوساکاریدی انتهایی تکراری است (۱۶). الگوی وزنی LPS بروسلا آبورتوس در مطالعه دیگران نیز آمده است(۵و۶). مصطفایی وهمکاران (۵) نشان داده‌اند که LPS خالص‌شده بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس در SDS-PAGE با الگوی خاص نردبانی در یک محدوده وزنی پهن (بیش از ۳۰ کیلودالتون) دیده می‌شود. به‌رغم وجود آنتی‌بادی ضد LPS بروسلا آبورتوس در انسان و حیوان بیمار و یا واکسینه‌شده با بروسلا که در نتایج این مطالعه و مطالعات سایر محققین (۱۶و ۷-۵) آمده است، LPS ظاهرا نامزد مناسبی برای تشخیص بروسلوز و یا ساخت واکسن علیه این بیماری نیست. شباهت آنتی ژنی LPSبروسلا با LPS انواعی از باکتری‌های گرم‌منفی از جمله یرسینیا و ایشریشیاکلی از دلایل عمده این موضوع است(۱۷و۱۸).

۲- تفاوت عمده ایمونوبلات پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس با سرم سه گونه پستاندار مورد مطالعه، در واکنش سرم با گروه‌های پروتئینی است. عمده‌ترین این تفاوت‌ها، وجود آنتی‌بادی در سرم بز بیمار وخرگوش ایمن‌شده، علیه گروه پروتئینی موقعیت ۳۴-۳۲ کیلو دالتونی با دامنه۵/۷-۴/۵ pI است (قسمت ج و د شکل۱). این مجموعه که شامل ۶-۵ لکه پروتئینی است، پرمقدارترین پروتئین پیکره باکتری است. وجود آنتی‌بادی علیه تمام اجزای این گروه در خرگوش و بز و عدم وجود آنتی‌بادی علیه هیچکدام از اجزای آن در سرم انسان، مطرح‌نمودن آن‌ها به عنوان یک گروه پروتئینی به‌رغم تفاوت‌های قابل‌توجه pI را منطقی می‌سازد. این گروه که درصد قابل توجهی از پروتئین‌های پیکره بروسلا را تشکیل می‌دهد، می‌تواند به‌عنوان یکی از ایمونوژن‌های مهم در بز و خرگوش مطرح باشد. قابلیت این پروتئین‌ها دراستفاده از آن‌ها به‌عنوان آنتی‌ژن تشخیصی در بروسلوز دام و طراحی واکسن زیرواحد، نیازمند مطالعات تکمیلی است. این گروه پروتئینی که ظاهراً اطلاعاتی درمورد آن‌ها وجودندارد، شاید جزء پروتئین‌های گروه سوم غشای خارجی بروسلا باشند (۱۲). Teixera gomes و همکاران(۱۳) نیز در مطالعه خود روی پروتئین‌های ایمونوژن بروسلا اویس، ۳ پروتئین ۳۳-۳۲ کیلو دالتونی با ۶/۲ ، ۵/۹ و ۵/۲ pI را گزارش‌کرده‌اند. به‌هر حال تعداد این گروه با نتایج مطالعه حاضر که شامل ۶-۵ پروتئین است، متفاوت است.

۳- تفاوت دیگر ایمونوبلات پروتئین‌های پیکره بروسلا با سرم سه گونه مورد مطالعه، وجود آنتی‌بادی درسرم انسان و بـــزعلیه گروه پروتئینی موقعیت ۴۴ کیلودالتونی با دامنه ۵/۵-۴/۵ pI و عدم وجود آنتی‌بادی علیه این پروتئین‌ها در سرم خرگوش ایمن شده است(قسمت ب، ج و د شکل۱). این گروه که شامل ۶-۵ پروتئین است، می‌تواند به‌عنوان یکی از ایمونوژن‌های مهم در انسان و بز مطرح باشد. Teixera-Gomes و همکاران (۱۳) نیز وجود آنتی‌بادی در سرم گوسفند علیه ۲ پروتئین ۴۵ کیلودالتونی با ۵/۴ و ۵/۱ pI از بروسلا اویس را گزارش کرده‌اند. این گروه پروتئینی ظاهراً متفاوت از پروتئین‌های گروه دوم غشای خارجی هستند که وجود آنتی‌بادی علیه اشکال خالص آن‌ها را در بعضی از گونه‌های پستاندار نشان داده‌اند(۱۹). عدم وجود آنتی‌بادی در سرم خرگوش علیه این گروه پروتئینی شاید به این دلیل باشد که بر خلاف انسان و بز، این حیوان با شکل کشته‌شده بروسلا ایمن شده‌است.

۴- در ایمونوبلات پروتئین‌های پیکره بروسلا با سرم سه گونه مورد مطالعه، در سرم انسان بیمار آنتی‌بادی‌های بیشتری در مقابل پروتئین‌های با وزن کمتر از۲۰ کیلودالتون، نسبت به سرم بز بیمار و خرگوش ایمن‌شده وجود دارد، به طوری که در سرم انسان علیه حدود ۱۲ پروتئین زیر۲۰ کیلودالتونی با ۷-۴/۵ pI آنتی‌بادی وجود دارد. این تعداد در مورد سرم بز بیمار به حدود۴ پروتئین با ۷/۵-۶ pI و در سرم خرگوش ایمن‌شده به حدود۵ پروتئین با ۸-۴pI می‌رسد. Zygmunt و همکاران(۲۰) یک پروتئین ۲۰-۱۸ کیلودالتون با ۴/۹ pI از بروسلا ملی‌تنسیس جدانموده‌اند که در حیوانات ایمونوژن است.

همچنین Goldbaum و همکاران (۲۱) یک پروتئین ۲۰-۱۸ کیلودالتونی با pI ۵/۶ از بروسلا آبورتوس جدا نموده‌اند که ظاهراً نشانه خوبی برای تفکیک بروسلوز فعال از غیرفعال است. Bricker (۲۲) نیز یک پروتئین ۲۰-۱۸ کیلودالتونی با pI ۸/۶ از بروسلا آبورتوس جدا کرده است که قادر است موش را در برابر بروسلا آبورتوس ویرولانت محافظت کند. Rebecca و همکاران(۲۳) یک پروتئین ۱۴ کیلودالتونی ازبروسلا آبورتوس گزارش کرده‌اند که قادر به القای پاسخ هومورال و سلولی در موش است. بخش عمده‌ای از پروتئین‌های با اوزان کمتر از ۲۰ کیلودالتون در پیکره بروسلا، پروتئین‌های ریبوزومی و سیتوزولی هستند که امکان استفاه از آن‌ها در تشخیص بروسلوز ویا تشخیص دام آلوده از واکسینه‌شده نیازمند مطالعات بیشتر است.

تاکنون چندین مطالعه مختلف برای شناسایی ایمونوژن‌های بروسلا آبورتوس در انسان و دام به روش ایمونوبلاتینگ صورت گرفته، ولی در تمام این مطالعات پروتئین‌های پیکره این باکتری به روشSDS- PAGE تفکیک شده‌اند(۲۵و۲۴). مطالعه حاضر ظاهراً اولین مطالعه‌ای است که برای تفکیک پروتئین‌های پیکره بروسلا آبورتوس و شناسایی ایمونوژن‌های آن از الکتروفورز دوبعدی استفاده نموده‌است. نتایج این مطالعه حاوی اطلاعات جدیدتر وکامل‌تری در مورد ایمونوژن‌های بروسلا در سه گونه انسان، بز و خرگوش در مقایسه با مطالعات دیگران است. این نتایج می‌تواند زمینه‌ساز بستری مناسب برای شناخت پروتئین‌های آنتی‌ژنی بروسلا و استفاده از آن‌ها در جهت تشخیص دقیق‌تر بیماری در انسان و دام وتشخیص گاوهای آلوده از واکسینه‌شده باشد که در پیشگیری و کنترل بیماری در دام اهمیت بسزایی دارد(۷). امروزه روش‌های متداول تشخیص بروسلوز عمدتاً بر پایه یافتن آنتی‌بادی ضد LPS استوار است که به دلیل تشابه ساختمانی LPS بروسلا با LPS سایر گونه‌های باکتری‌های‌گرم‌منفی ازجمله یرسینیا و ایشریشیاکولی، دقیق نبوده و محدودیت‌های متعددی دارند(۱۷). برای حل این مشکلات بخش عمده‌ای ازتحقیقات متوجه یافتن آنتی‌ژن‌های پروتئینی اختصاصی‌تر است(۲۳ و ۳۰-۲۶). همان‌گونه که نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، گروه پروتئینی ۳۴-۳۲ کیلودالتونی با pI ۴/۵-۵/۷ و یا دو پروتئین ۲۰-۱۸ کیلودالتونی با pI ۶-۷ می‌توانند به عنوان نامزد پروتئینی تشخیص بیماری در بــز و حتی سایر گونه‌های دامی از جمله گاو (درصورت انجام مطالعات مشابه) مدنظر قرار گیرند. فراوانی مقدار نسبی گروه پروتئینی ۳۴-۳۲ کیلودالتونی در پیکره باکتری از مزیت‌های این نامزد آنتی‌ژنی از نظر تخلیص و به‌کارگیری آن در روش‌های دقیق‌تری همچون الایزا محسوب می‌گردد. در مقابل، در انسان که الگوی پاسخ ایمنی هومورال آن تفاوت قابل‌توجهی با دوگونه حیوانی بز وخرگوش دارد، گروه پروتئینی با وزن ۴۴ کیلودالتون و pI ۴/۵–۵/۵ و چند پروتئین با اوزان کمتر از ۲۰ کیلودالتون می‌توانند به عنوان نامزد آنتی‌ژنی در تشخیص دقیق‌تر بیماری بروسلوز، سنجش اختصاصی کلاس‌های آنتی‌بادی(IgG وIgM) و حتی تمایز بروسلوز فعال و غیرفعال مطرح‌باشند. به‌هرحال برای تأیید چنین فرضیه‌هایی لازم است اولاً تشابه

آنتی‌ژنی این پروتیئن‌ها در سایر گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زا در انسان مورد بررسی قرار گیرد و ثانیاً واکنش این آنتی‌ژن‌ها در اشکال خالص‌شده با سرم انسان یا دام مبتلا به بروسلوز به روش‌های کمی‌تر و دقیق‌تر همچون الایزا مورد آزمایش قرارگیرد. ذکر این نکته در پایان بحث ضروری است که انجام الکتروفورز دوبعدی برپایه ایزوالکتریک فوکوسینگ به‌روش آب‌گیری مجدد که ظاهراً در کشور ما برای اولین بار در این مرکز عملی شده و این پژوهش نیز سهم قابل‌توجهی در بسط وگسترش آن داشته‌است، می‌تواند زمینه‌ساز انجام مطالعات دقیق‌تر و کمی‌تر در تفکیک پروتئین‌های سلول، شناخت عوامل ایمونوژن و پاتوژن میکروبی، خالص‌سازی پروتئین در مقادیر کم و پروتئومیکس به عنوان دریچه‌ای نو و رهگشا در علوم سلولی و مولکولی باشد.

تشکر و قدردانی:

با تشکر از آقایان دکتر بهمن تبرائی و رامین کریمی به‌خاطر تهیه و کشت انبوه باکتری و کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی در کمک به اجرای این پروژه .

References:

1. Yang EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 283-287.

2. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 1997; 3:213-218.

3. Lin J, and Ficht TA. Protein synthesis in Brucella abortus induced during macrophage infection. Infect Immun 1995; 63:1409-414.

4. Jawets E, Melnick JL and Adelberg EA. Medical Microbiology. 20th ed. McGraw-Hill; 1995.

۵. مصطفائی ع، حسن م ز، تبرائی ب. استخراج وخالص‌سازی لیپوپلی‌ساکارید بروسلا. مجله پزشکی کوثر، سال ۱۳۷۹، جلد۵، شماره۱، صفحات ۲۱-۲۶.

6. Pellicer T, Arizo J, Foz A, Pallares and Gudiol F. Spesific antibodies detected during replace of human brocellosis. J Infect Dis 1988 ; 157: 918-924.

7. Subcommittee on brocellosis research. An evaluation report on the subcommittee on brocellosis research. National Academy of Science; Washington, DC: National Academy Press; 1997.

8. Westermeier Reiner. Electrophoresis in practice. 3rd ed. Wiley-VCH. Weinheim, Germany; 2001.

9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature 1970; 227:680-685.

10. Hochstrasser DF, Patchornik A, and Merril CR. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. Anal Biochem 1988; 173:412-423.

11. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci (USA) 1979; 76:4350-54.

12. Sowa BA. Membrane proteins of Brucella spp: In: Adams LG, editor. Advances in brucellosis research. Texas A & M University, College Station; 1993, pp. 89-105.

13. Teixera-Gomes A, Cloeckaert AP, Bezard G, Bowden RA, Dubray G, and Zygmund MS. Identification and characterization of Brucella ovis immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. Electrophoresis 1997; 18:1491-1497.

14. Teixera-Gomes AP, Bezard G, Dubray G and Zygmund MS. Mapping and identification of Brucella melitensis proteins by two-dimensional electrophoresis and microsequencing. Electrophoresis 1997; 18:156-162.

15. Nicoletti P. Bovine brucellosis in :international symposium on brucellosis. Istanbul Pendic Anim Dis Cntr Res Ins Pub 1989; No 9.

16. Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysacchrides in bacterial adherence. Trends Microbiol 1996; 4:408-410.

17. Corbel MJ, Stuart FA, and Brewer RA. Observations on serological cross-reaction between smooth Brucella species and organisms of other genera. Dev Biol Stand 1883; 56:341-363.

18. Perry MB, and Bundle DR. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of Brucella: In: Adams LG, editor. Advances in brucellosis research. 1990, pp. 76-88.

۱۹. مصطفایی ع، حسن مز، تبرائی ب. استخراج وخالص‌سازی پروتئین‌های عمده غشای خارجی بروسلاآبورتوس. مجله علمی پژوهشی بهبود، سال چهارم، شماره چهارم، سال ۳۷۹، صفحات ۳۴-۲۸.

20. Zygmunt MS, Gilbert FB, and Dubray G. Purification, characterization and seroactivity of a 20-kilodalton Brucella protein antigen. J Clin Microbiol 1992; 30:2662-2667.

21. Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, and 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.

22. Bricker BJ, Tabatabai LB, Judge BL, Deyoe BL, and Mayfield JE. Cloning, expression and occurrence of the Brucella Cu-Zn superoxide dismutase. Infect Immun 1990; 58:2935-2939.

23. Chirhart-Gillel RL, Kovach ME, Elzer PH, Jennings SR, and 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.

۲۴. مصطفایی ع. خالص‌سازی و مقایسه آنتی‌ژن‌های عمده غشای خارجی بروسلا آبورتوس(سویه19) و بروسلا ملی‌تنسیس(سویه 16 M) و بررسی واکنش آن باسرم بیماران با وسترن بلات والایزا. پایان نامه دکترای تخصصی(ph.D)، دانشگاه تربیت مدرس، سال,۱۳۷۸

25. Garin-Bastuji B, Bowden RA, Dubray G, and 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.

26. Oliveira Sc, Zhu Y, and Splitter GA. Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gramma – irradiated brucella abortus induce a T-helper 1 subset response from murine $CD4^+$ T cells. Immunology 1994; 83: 659-664.

27. Carlos AV, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Silvia E, Bowden RA, Bruno L, Fassati CA, and Spitz M. DNA vaccine encoding lumazine synthase from B.abortus induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun 2002; 70:2507-2511.

28. Baloglu ST, et al. Humoral immune response of BALB/c mice to a vaccine virus recombinant expressing Brucella abortus GroEL does not correlate with protection against a B.abortus challenge. Vet Microbiol 2000; 76:193-199.

29. Gracia MSR, Myioshi A, Azevedo V, Splitter GA, and Olivera SC. Molecular and immunological characterization of recombinant B abortus glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase, a T and B cell reactive protein that induces partial protection when co-adminstrated with an interleukin-12–expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. Med Microbiol 2002; 15:661-671.

30. Tabatabai LB, and 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.