

## تهیه و تخلیص آنتی ژن 60(A60) از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس سویه BCG

فاطمه فلاح Ph.D.\*، بهرام کاظمی Ph.D.\*، گیتا اسلامی Ph.D.\*، فرحناوش دوستدار M.Sc.\*، مونا قاضی M.Sc.\*

✉ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

\* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

♣ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی

شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

### چکیده

✱ هدف: تهیه و تخلیص آنتی 60(A60) از سیتوپلاسم BCG

✱ مواد و روشها: در این تحقیق از روش کروماتوگرافی حذفی توسط ستون سفارز 4B برای تخلیص A60 از سیتوپلاسم BCG استفاده گردید. برای تایید تخلیص آنتی ژن، تکنیک ایمونوالکتروفوز با استفاده از آنتی بادیهای Anti BCG و Anti A60 به کار گرفته شد. آنتی ژن 60 تخلیص شده با روشهای الکتروفوز در ژل آگارز 5/0 درصد و دبل دیفوزن نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی وجود آنتی ژن از هر دو قسمت سیتوپلاسم و دیواره سلولی باکتری آزمایشات بلات با استفاده از آنتی بادی Anti A60 انجام شد. برای مطالعه ساختاری این آنتی ژن اجزای آنتی ژن در SDS-PAGE تفکیک شدند و به کاغذ نیتروسولوز منتقل شده و آزمایش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی Anti A60 انجام شد.

✱ یافته‌ها: آنتی ژن تخلیص شده در ایمونوالکتروفوز متقاطع با استفاده از Anti BCG و Anti A60 به صورت کم حرکت‌ترین جزء سیتوپلاسم نمودار گردید. آنتی ژن مذکور در الکتروفوز با ژل آگارز به صورت تک باند مشاهده گردید و در ایمونودیفیوژن در مواجهه با Anti BCG دو خط رسوبی تشکیل داد. در بررسی با روش بلاتینگ هم سیتوپلاسم و هم دیواره سلولی باکتری با آنتی بادی Anti A60 واکنش مثبت نشان دادند. وقتی اجزای A60 با روش SDS-PAGE تفکیک شدند و وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی Anti A60 انجام شد، اجزای پروتئینی با اوزان ۳۵، ۳۸، ۴۰، ۴۶ و ۶۵ کیلو دالتون شناسایی گردید.

✱ نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده مبین این است که A60 یک ماکرومولکول با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ کیلو دالتون در مایکوباکتریوم بوویس سویه BCG و دارای اجزای متعدد پروتئینی است. A60 هم در سیتوپلاسم و هم در دیواره سلولی BCG موجود است و می‌توان آن را با استفاده از کروماتوگرافی حذفی، از سیتوپلاسم واکسن BCG که خوشبختانه در کشور ما نیز تولید می‌گردد، به راحتی تخلیص نمود.

گل واژگان: آنتی ژن 60(A60)، کروماتوگرافی، BCG، خالص سازی، مایکوباکتریوم بوویس

## مقدمه

عنوان یک کاندیدای مناسب برای تستهای تشخیصی سل معرفی می‌کند (۷، ۸). در مطالعات دیگری که بر روی این آنتی ژن انجام گرفته، اثرات حفاظتی این آنتی ژن نشان داده شده است (۹، ۱۰). این آنتی ژن همچنین دارای اثرات مفیدی در پیشگیری و در مان سرطان است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). بنابراین در این تحقیق ما بر آن شدیم که با خالص سازی آنتی ژن ۶۰ و شناسایی اجزای تشکیل دهنده آن راه را برای مطالعات بعدی جهت شناسایی بیشتر خواص این آنتی ژن و اجزای آن و کاربردهای آنها هموار سازیم.

## مواد و روشها

## \* باکتری

مایکوباکتریوم بویس به صورت واکسن BCG Master Seed lot C 1173-P2 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. باکتریها در فلاسکهای فرن باخ حاوی محیط سوتون کشت داده شد و به مدت سه هفته در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. کلنیهای باکتری از سطح محیط جمع آوری و با دستگاه بیرکو تراکم و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

## \* تهیه هموزن باکتری

باکتریها در بافر 150mM NaCl, 10mM Na phosphate buffer PH=۷/۴ (۱۵۰۰۰ dar at 4°C) Hyperation hemogenizer دیواره سلولی باکتریها تخریب شد و به صورت هموزن در آمدند. باکتریهای تخریب نشده با سانتریفوژ از هموزن باکتری جدا شدند (۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد). سپس هموزن باکتری در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد تا سیتوپلاسم در مایع رویی قرا گرفته و دیواره سلولی رسوب داده شود.

## \* کروماتوگرافی ستونی سیتوپلاسم

سیتوپلاسم از ستون کروماتوگرافی حذفی سفارز 4B (Sigma Chemical company, USA) عبور داده شد (10ml حجم ستون 1ml نمونه) و سپس ستون با بافر PBS شستشو داده شد. فراکشنهای به دست آمده از ستون در چندین لوله جمع آوری شد.

## \* الکتروفورز

ایمونوالکتروفورز متقاطع مطابق روش ارائه شده توسط Closs و همکاران در سال ۱۹۸۰ انجام گرفت. ابتدا صفحه شیشه‌ای با ابعاد ۲۰×۱۰ سانتیمتر با لایه‌ای به قطر ۱ میلی‌متر از ژل حاوی ۱ درصد آگارز در بافر تریس باربیتال 0.02mole tris (0.014mole barbital, 0.02mole sodium barbital) PH=8.6 پوشانده و ۱۰ میکرولیتر نمونه در چاهک ژل ریخته شد و ابتدا در مسیر اول با قدرت ۲۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت در ۱۵ درجه سانتیگراد الکتروفورز شد. ژل حاوی باندها بریده شد و به شیشه دوم با ابعاد ۵×۷ سانتیمتر منتقل شد، به طوری که در جهتی عمود بر جهت الکتروفورز اول قرار

بیماری سل هنوز هم به عنوان یکی از مشکلات مهم اجتماعی و پزشکی مهم جامعه بشری در دنیا و ایران مطرح است. تشخیص به موقع و سریع سل ریوی و خارج ریوی برای شروع درمان مناسب بسیار ضروری است. روشهای رایج تشخیصی موجود، بسیار زمان گیر، فاقد حساسیت و غیر اختصاصی هستند. تاکنون آنتی ژنهای متعدد مایکوباکتریایی شناسایی شده‌اند که در واکنش با سیستم ایمنی میزبان نقش دارند. شناسایی این آنتی ژنها برای تشخیص و حفاظت بر علیه بیماری سل از اهمیت بالایی برخوردار است. A60 آنتی ژن مقاوم به حرارت موجود در سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبریکولوزیس است. با استفاده از این آنتی ژن تست الایزایی برای تشخیص سل طراحی شده و با نتایج خوبی همراه بوده است. همچنین در سایر تحقیقات A60 نتایج خوبی را در زمینه ایجاد حفاظت علیه عفونتهای تجربی و اثرات چشمگیری را در زمینه درمان و پیشگیری از پیشرفت سرطان نشان داده است.

بیماری سل در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شیوع فراوانی دارد. تشخیص سریع و به موقع سل ریوی و خارج ریوی برای شروع درمان مناسب بسیار ضروری است. متأسفانه روشهای رایج مورد استفاده برای تشخیص سل مانند بررسی خلط از جهت وجود باسیلهای اسید فست، کشت خلط یا سایر مایعات بدن، تست پوستی توبرکولین و بررسیهای رادیولوژیک به حساسیت تشخیصی لازم دست نیافته‌اند (۱). تاکنون کوششهای فراوانی برای دستیابی به یک روش حساس و اختصاصی برای تشخیص سل صورت گرفته است. این روشها متکی بر شناسایی آنتی بادیهای تولید شده بر علیه آنتی ژنهای میکوباکتریایی یا شناسایی آنتی بادیهای مختلف مایکوباکتریایی در سرم یا سایر مایعات بدن است که با استفاده از روشهای الایزا یا تکنیکهای مولکولی صورت می‌گیرد (۱).

مایکوباکتریومها دارای ترکیبات ایمونولوژیکی فعالی هستند که نقش مهمی در بیماریهای مایکوباکتریایی بازی می‌کنند. یک گروه از این آنتی ژنها که مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند، آنتی ژنهای درشت مولکول مقاوم به حرارت (TMA) هستند. شناخته شده‌ترین عضو این گروه آنتی ژن A60/60 مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبریکولوزیس است (۲). تستهای سرولوژیکی متعددی متکی بر استفاده از A60 و روش الایزا برای تشخیص سل به کار رفته است (۳).

با تکنیک ایمونوالکتروفورز متقاطع ۳۰ آنتی ژن مایکوباکتریوم بویس شناسایی شده است و مشخص گردیده که آنتی ژن ۶۰ کم حرکت‌ترین آنها است (۴). این ترکیب آنتی ژن اصلی ترکیباتی مانند Old Tuberculin و Purified Protein Derivative (PPD) و مقاوم به حرارت است - این ترکیبات به عنوان معرف در تشخیص بیماری سل استفاده می‌شوند - (۵). آنتی ژن ۶۰ دارای مقادیر مساوی از ترکیبات پروتئینی، لیپیدی و کربوهیدراتی است و نشان داده شده است که این آنتی ژن ایمنی همورال را نیز مانند ایمنی سلولی القاء می‌کند (۵). ۸۵ درصد آنتی بادیهای ضد مایکوباکتریایی در سرم بیماران مبتلا به سل بر علیه A60 است (۶). این ایمنی زایی شدید آنتی ژن ۶۰ آن را به

گردد و حفره حاوی نمونه در گوشه سمت چپ شیشه دوم با فاصله ۵/۰ میلیتر قرار گیرد. ژل دوم حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آنتی سرم Anti BCG (Dako, Copenhagen, Denmark) بود و الکتروفورز در مسیر دوم با قدرت ۸۰ ولت به مدت ۱۸ ساعت در ۱۵ درجه سانتیگراد انجام شد. در ایمونوالکتروفورز متقاطع با ژل میانی، ژل میانی بین ژل اول و دوم قرار داده شد که حاوی آنتی سرم Anti A60 (anda biological, anda TB Kit, France) بود. پس از پایان الکتروفورز، ژلها شسته شدند و با کوماسی بلو رنگ آمیزی انجام گرفت.

## یافته‌ها

در این تحقیق آنتی ژن ۶۰ از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بویس BCG تهیه شد. به این منظور ابتدا دیواره سلولی به وسیله فشار زیاد تخریب و سیتوپلاسم آن توسط سانتریفیوژ جدا شد. اجزای سیتوپلاسم در سیستم ایمونوالکتروفورز متقاطع از یکدیگر جدا شدند. در این روش آنتی ژن‌ها در مسیر اول در ژل آگارز حاوی بافر و در مسیر دوم در ژل آگارز حاوی Anti BCG حرکت کردند و رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو حدود ۳۰ آنتی ژن را در سیتوپلاسم نشان داد (شکل A۱) که بر اساس الگوی رفرانس Gloss و همکاران در سال ۱۹۸۰ شناسایی شدند. در این الگو خط رسوبی‌ای که نزدیکترین خط به مبدا است مربوط به آنتی ژن ۶۰ و Rf (Relative electrophoretic mobility) و کوچکترین Rf در بین اجزای موجود در سیتوپلاسم باکتری است. آنتی ژن ۶۰ با روش کروماتوگرافی حذفی با استفاده از ستون سفارز ۴B از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بویس تخلیص گردید و سپس برای تایید تخلیص آنتی ژن ایمونوالکتروفورز متقاطع انجام شد (شکل B۱). الگوی رسوبی جزء جدا شده که تقریباً شامل کلیه آنتی ژن ۶۰ موجود در سیتوپلاسم است را نشان می‌دهد در حالی که در (شکل G۱) که مربوط به اجزای دیگر است، سایر پروتئینهای موجود در سیتوپلاسم نیز مشاهده می‌شوند. در ایمونوالکتروفورز متقاطع با استفاده از آنتی بادی Anti 60 در ژل میانی در مورد نمونه سیتوپلاسم باندهای متعدد (شکل A۲) و در مورد نمونه آنتی ژن ۶۰ خالص شده تنها یک باند در ژل میانی مشاهده شد (شکل B۲). در مورد اجزای دیگر در ژل میانی باندی مشاهده نشد و در ژل دوم حاوی Anti BCG، باندهای متعدد به غیر از باند آنتی ژن ۶۰ مشاهده شد (شکل C۲).

ابتدا صفحه شیشه‌ای با یک لایه آگارز ۱ درصد در بافر  $\text{PH}=7/2$  و PBS پوشانده شد. Anti BCG در حفره مرکزی و نمونه‌های سیتوپلاسم و آنتی ژن تخلیص شده در حفره‌های اطراف قرار گرفت. شیشه‌ها در محفظه مرطوب به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس ژلها شسته و با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند.

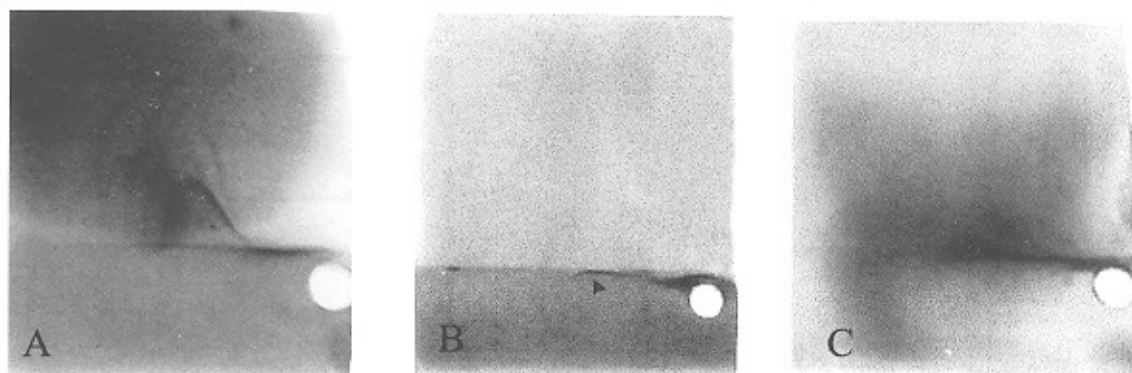
## \* ایمونودیفیوژن

ابتدا صفحه شیشه‌ای با یک لایه آگارز ۱ درصد در بافر  $\text{PH}=7/2$  و PBS پوشانده شد. Anti BCG در حفره مرکزی و نمونه‌های سیتوپلاسم و آنتی ژن تخلیص شده در حفره‌های اطراف قرار گرفت. شیشه‌ها در محفظه مرطوب به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس ژلها شسته و با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند.

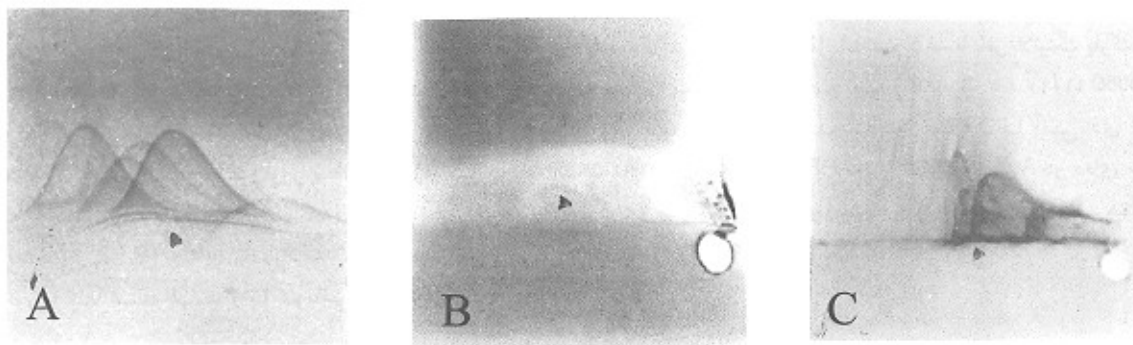
## \* دات بلات و وسترن بلات

آنتی ژن ۶۰ و سایر اجزای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی روی کاغذ نیتروسولوز قرار داده شدند و با محلول بلاتینگ (PBS  $\text{PH}=7/2$ , Tween20 0.5%) آنتی سرم (Anti, A60  $1/1000$  dilution) به مدت ۱ ساعت روی نمونه‌ها ریخته شد و مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. کاغذ حاوی نمونه‌ها در بافر شستشو (Tween20 0.5%, PBS) شسته شدند و در آنتی بادی ثانویه Anti human IgG-HRP ( $1/1000$  dilution) (anda Biological, TB Kit, France) به مدت ۱ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. کاغذ نیتروسولوز با بافر شستشو شسته شد و رنگ آمیزی با محلول دی آمینوبنزیدین (DAB) در حضور پراکسید هیدروژن انجام گرفت.

برای وسترن بلات اجزای آنتی ژن ۶۰ و سیتوپلاسم BCG به وسیله الکتروفورز در ژل پلی آکریل با گرادیان ۱۸-۶ درصد در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) در مقابل مارکر پروتئینی



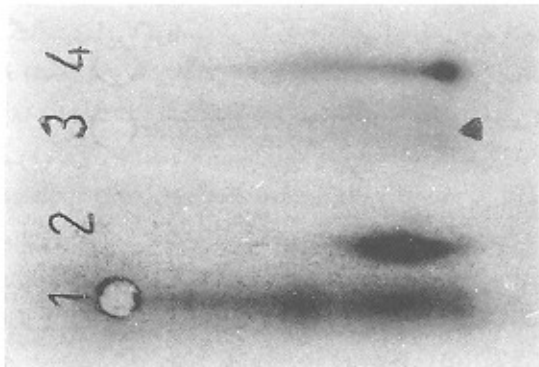
شکل ۱: ایمونوالکتروفورز متقاطع. A: سیتوپلاسم، B: آنتی ژن ۶۰، C: سایر قسمتهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی



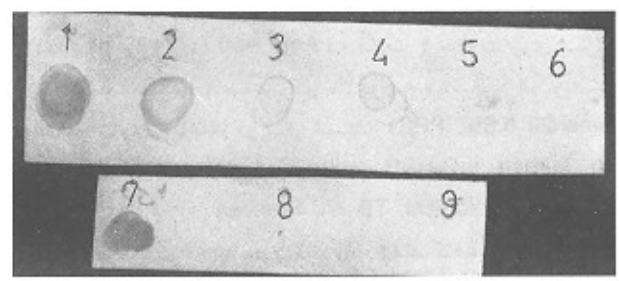
شکل ۲: ایمونوالکتروفورز مقاطع با ژل میانی، A: سیتوپلاسم، B: آنتی ژن ۶۰، C: سایر قسمتهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی

در بین اجزای جدا شده از ستون کروماتوگرافی اولین اجزای جدا شده از ستون بیشترین واکنش مثبت را در دات بلات با Anti 60 نشان دادند که نشان دهنده وجود آنتی ژن در این اجزا بود (شکل ۵). برای بررسی اجزای تشکیل دهنده آنتی ژن ۶۰ آزمایش وسترن بلات با استفاده از Anti 60 انجام شد. ابتدا اجزای آنتی ژن ۶۰ با روش SDS-PAGE از یکدیگر تفکیک شدند و پس از انتقال به کاغذ نیتروسولوز و مواجهه با باندهای رنگی مربوط به پروتئینهای با اوزان ۳۵، ۳۸، ۴۰، ۴۶، ۶۵ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۶). این نتایج نشان می دهد که آنتی ژن ۶۰ دارای چندین شاخص آنتی ژنیک است که با Anti 60 واکنش می دهند.

در الکتروفورز در ژل آگارز ۵/۰ درصد، آنتی ژن ۶۰ به صورت تک باند مشاهده شد در حالی که در نمونه سیتوپلاسم باندهای متعدد مشاهده شد (شکل ۳).

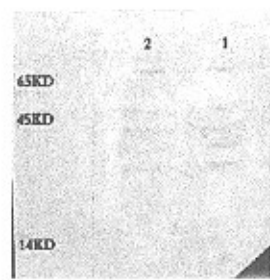


شکل ۳: ایمونوالکتروفورز بر ژل آگارز ۰/۵ درصد  
۱: سیتوپلاسم، ۲: مارکر، ۳: آنتی ژن ۶۰ خالص شده، ۴: مارکر ۱۵۰Kd

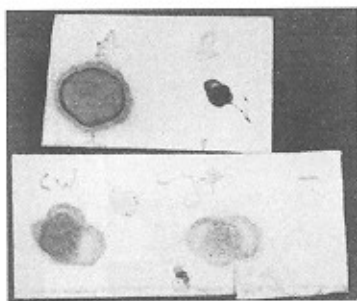


شکل ۵: دات بلات از فراکشنهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti 60. ۱-۸: فراکشنهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی، ۷: سیتوپلاسم، ۹: کنترل منفی

آزمایش دیل دیفیوژن با نمونه سیتوپلاسم و آنتی ژن ۶۰ با استفاده از Anti BCG روی ژل آگارز انجام شد. نمونه سیتوپلاسم در مواجهه با Anti BCG خطوط رسوبی متعدد و نمونه آنتی ژن ۶۰ دو خط رسوبی تشکیل داد. برای بررسی وجود آنتی ژن ۶۰ در سیتوپلاسم و دیواره سلولی باکتری، آزمایش دات بلاتینگ با استفاده از Anti 60 انجام شد که هر دو جزء باکتری با Anti 60 واکنش مثبت به صورت تشکیل لکه رنگی نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۶: وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti A60، ۱: سیتوپلاسم، ۲: آنتی ژن ۶۰



شکل ۴: دات بلات، ردیف بالا: با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti BCG، ردیف پایین: با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti A60، ۱: سیتوپلاسم، ۲: دیواره سلولی، ۳: کنترل منفی

**بحث**

مایکوباکتریومها به واسطه داشتن آنتی ژنهای متعدد با سیستم ایمنی میزبان واکنش نشان می دهند. شناخت این آنتی ژنها در تشخیص و

۱۵۴

۳۵، ۴۰، ۴۶ و ۶۵ کیلو دالتون در آنتی ژن ۶۰ با استفاده از تکنیک وسترن بلائینگ در حضور Anti A60 واکنش می‌دهد. این یافته مشابه نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی پیرامون ساختمان آنتی ژن ۶۰ است (۶). محل قرار گرفتن آنتی ژن در باکتری، وزن مولکولی بالا و ساختمان پیچیده حاوی ۳۰ پروتئین، پلی ساکارید و لیپید این آنتی ژن ایمنی زایی بالای آن را توجیه می‌کند (۵، ۶، ۷، ۱۶) و آن را به عنوان کاندیدای مناسب برای طراحی روشهای تشخیص ایمنونواسی بیماری سل معرفی می‌کند (۳، ۸). اولین بار Bealden و همکارانش در سال ۱۹۹۰ با استفاده از آنتی ژن ۶۰ سیستم Elisa را برای تشخیص سل طراحی کردند که روش مناسبی برای تشخیص بیماری فعال و پی‌گیری مراحل بیماری و کارایی درمان است (۶، ۷). امروزه برای افزایش اختصاصیت تست سعی بر آن است که پروتئینهایی که در آنتی ژن ۶۰ خاصیت آنتی ژنی بیشتری دارند و اختصاصی مایکوباکتریوم تویرکولوزیس هستند (مانند پروتئین ۳۸ کیلو دالتون) را با روشهای نو ترکیبی تهیه نموده و برای تهیه کیت Elisa جهت تشخیص سل استفاده نمایند. همچنین در تحقیقات قبلی اثرات این آنتی ژن در حفاظت بر علیه عفونتهای تجربی (۸، ۹) و اثرات ایمنوتراپیک آن در جلوگیری از توسعه سرطان به اثبات رسیده است (۱۵-۱۰). در این خصوص نشان داده‌اند که از اجزای آنتی ژن ۶۰ اجزایی با وزن مولکولی ۵۶-۴۴ کیلو دالتون در بیماری سل تولید اینترفرون گاما را القا می‌کند، از این رو به عنوان کاندیدای مناسبی برای تهیه واکنش الفاکتنده پاسخ ایمنی محافظت مطرح است (۲).

۱۵۵

بنابراین تخلیص آنتی ژن ۶۰ و جداسازی اجزای تشکیل دهنده آن و شناسایی خواص آنها پیش نیاز تحقیقات بعدی در مورد کاربرد این آنتی ژن و اجزای تشکیل دهنده آن در تشخیص و حفاظت بر علیه سل و ایمنوتراپی سرطان است و بنابراین با مطالعات دقیق‌تر می‌توان در واکنشهای آینده سل سکانهایی را که در تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرند، حذف نمود تا از تداخل و ایجاد نتیجه مثبت کاذب ناشی از واکنش‌های سل در تشخیصهای ایمنولوژیک سل ممانعت به عمل آید.

نتیجه‌گیری: آنتی ۶۰ یک کمپلکس لیپو پروتئین پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا در سینوپلاسم و دیواره سلولی BCG و با استفاده از ستون سفارز 4B از سینوپلاسم باکتری با درجه خلوص بالا جدا می‌شود.

### تقدیر و تشکر

با تشکر از بخش BCG انیستیتو پاستور ایران که در تهیه مواد لازم برای انجام این تحقیق ما را یاری دادند.

حفاظت بر علیه این باکتریها نقش اساسی دارد. استفاده از سیستم فرانس متکی بر تکنیک ایمنوالکتروفورز متقاطع، موجب جداسازی و شناسایی ۳۰ آنتی‌ژن در مایکوباکتریوم بوویس شده است و بررسی سینوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس، آنتی ژن ۶۰ به صورت کم تحرک‌ترین آنتی ژن در ایمنوالکتروفورز متقاطع نشان داده است (۴). تاکنون آنتی ژنهای مایکوباکتریایی متعدد شناخته شده است که بعضی از آنها در تستهای سرولوژیک و پوستی مایکوباکتریومها دارای اهمیت هستند. یکی از مهمترین گروههای این آنتی ژنها آنتی ژنهای TMA (Thermostable Macromolecular Antigen) است. وجود آنتی بادهای ضد این آنتی ژنها در سرم بیماران مبتلا به سل، نشانه نقش ایمنولوژیک مهم این آنتی ژنها است (۲). ۸۵ درصد آنتی بادهای ضد مایکوباکتریایی در سرم بیماران مبتلا به سل بر علیه آنتی‌ژن ۶۰ است که آنتی ژن TMA مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم تویر کلوزیس است (۶). به دلیل اهمیت بالای این آنتی ژن در بیماری سل، در این تحقیق ما بر آن شدیم تا آنتی ژن را از سینوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس سویه BCG Working seed lot' 1173-P2lot تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران را خالص نماییم. (به این منظور از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفارز 4B استفاده شد). برای بررسی خلوص آنتی ژن جدا شده، از روش ایمنوالکتروفورز متقاطع طبق الگوی فرانس Class و همکاران در سال ۱۹۸۰ با حضور Anti BCG در ژل دوم استفاده شد و آنتی ژن به دست آمده در اولیه اجزای خروجی ستون کروماتوگرافی به صورت تک باند رسوبی و نزدیک به مبدا مشاهده شد (شکل B۱). همچنین در ایمنوالکتروفورز متقاطع با حضور آنتی بادی Anti 60 در ژل میانی و Anti BCG در ژل بعدی، آنتی ژن خالص شده در ژل میانی به صورت تک باند خالص مشاهده شد (شکل B۲)، که حکایت از کارایی بالای این تکنیک ارزان و سریع در خالص سازی این آنتی ژن دارد. این نتایج حکایت از کارایی بالای این تکنیک ارزان و سریع در خالص سازی این آنتی ژن دارد. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده توسط Cocito و همکارانش در سال ۱۹۸۶ است که از ستون سفارز 6B به این منظور استفاده کردند (۵). به دلیل کارایی و سهولت و هزینه مناسب این روش تخلیص، در کارهای جدیدتری که روی خواص و کارایی این آنتی ژن انجام گرفته است (۱۵-۷).

جدا شدن آنتی ژن ۶۰ در اولین اجزای خروجی از ستون کروماتوگرافی نشان دهنده وزن بالای حدود ۱۰۰ دالتون برای جزء اصلی لیپولی ساکاریدی مولکول است. واکنش مثبت دیواره سلولی و سینوپلاسم باکتری با آنتی‌بادی Anti A60 در دات بلائینگ نشانگر وجود آنتی ژن در هر دو قسمت باکتری است (۵). وجود پروتئینهای

### References

- Malati T, Rajani kumari G, Dinakarl: Evaluation of A60 Antibodies in Pulmonary and Neurotuberculosis, Indian J of Clinical Biochem 1995; 10(2): 72-76
- Gilot P, Coene M: Thermostable Macromolecular

- Antigens from Mycobacteria, Can J Microbiol 1994; 40 605-611
- Carlo G: Cocito, Properties of the Mycobacterial Antigen Complex A60 and Its Application to the

- Diagnosis and Prognosis of Tuberculosis, Chest 1991; 100(6): 1687-1693
4. Closs O, Harboa M, Axelsen NH, Bunch-Christensen K, Magnusson M: The Antigens of Mycobacterium bovis strain BCG Studied by Crossed immunoelectrophoresis, Scand J Immunol 1980; 12: 249-263
5. Cocito C, Vanlinde F: Preparation and Properties of Antigen60 from Mycobacterium BCG, Clin Exp Immunol 1998; 66: 262-272
6. Coetsier C, Baelden MC, Coene M, Cocito C: Immunological Analysis of the Components of the Antigen Complex A60 of Mycobacterium bovis BCG, Clinical Diagnos Laboratory Immunol 1994; 1(2): 139-144
7. Gevaudan MJ, Bollet C, Charpin D, Mallet MN, Demicco PH: Serological Response of Tuberculosis Patients to Antigen 60 of BCG, Eur J Epidemiol 1992; 8(5): 666-676
8. Zou YL, Zhang JD, Chen MH, Shi GQ, Prignot J, Cocito C: Serological Analysis of Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis with Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Anti A60 Immunoglobulins, Clinical Infectious Diseases 1994; 19: 1084-1091
9. Carlucci S: Mycobacterial Antigen Complex A60-Specific Tcell Repertoire During the Course of Pulmonary Tuberculosis, Infection and Immunity 1993; 61(2): 439-447
10. Beschin A, Brigs L, De Baetselier P, Cocito C: Mycobacterium Proliferation in Macrophages is Prevented by Incubation with Lymphocyte activated in vitro with a Mycobacterial Antigen Complex, Eur J Immunol 1995; 41(1): 53-64
11. Maes H, Taper H, Cocito C: Alteration of the Immune Response During Cancer Development and Prevention by Administration of a Mycobacterial Antigen, Scan J Immunol 1995; 41(1): 53-64
12. Maes H, Taper H, Cocito C: Comparison between Bacillus Calmete-Guerin and A60 Mycobacterium Antigen Complex Used as Cancer Preventive Immunotherapies, J Cancer Res Clin Oncol 1996; 122(5): 296-300
13. Maes H, Cocito C: Cancer Prevention by Adaptive Transfer of A60-activated Immunocomponent Cells, Scan J Immunol 1996; 43(3): 283-188
14. Maes H, Cocito C: Synthesis of Cytokines During Tumor Development in Mice Immunized with the Mycobacterial Antigen Complex A60, Scand J Immunol 1996; 44(4): 369-379
15. Maes H, Cocito C: Immunological Relatedness of the Protective Mechanisms against Tuberculosis and Cancer, Eur J Clin Invest 1998; 28(1): 1-12
16. Maes H, Cocito C: Sub Cellular Localization and Sedimentation Behavior of A60 from BCG, Mfd Microbiol Immunol (BerL) 1988; 177: 15-25

