Archive of SID

تهیه و تخلیص آنتی بادی علیه استرپتوکک موتان از زرده تخم مرغ

دکتر مهدی پورامیر*، دکتر سلیمان محجوب*، رمضان رجب نیا**

Production and Purification of immunoglobulin Y Anti – S mutans from egg yolk

[1]Pouramir M. ***PhD.*** [1]Mahjoub S. ***PhD.*** [2]Rajab Nia R. ***MSC.***
[1]Assistant Prof., Dept of Biochemistry - Biophysics, [2]Member of Staff, Dept. of Microbiology – Immunology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol-Iran.

Key words: Immunoglobin Y, Streptococcus mutans, Preparation, Purification.

Purpose: Streptococcus mutans serotype C is thought to be the principal causative bacterium of dental caries in humans. The overal purpose of the present study was to produce and purify the immunoglobulin Y anti – S. mutans from egg yolk.

Methods & Materials: In this experimental laboratory study the S. mutans MT8148 (serotype c) was used as antigen. Hens were immunized with formalin treated whole cells by intramuscular injection. The eggs were collected daily, immunoglobulin Y was purified by water dilution method and ammunium sulfate precipitation followed by T – gel column chromatography. This product was characterized by electrophoresis. The activity of antibody was assessed by ELISA.

Results: The immunoglobulin was observed in the γ - globulin region in electrophoresis. The optimum dilution of IgY was 1:20000 evaluated by ELISA.

Conclusion: Titer of 1:20000 indicates high affinity or concentration of antibody against streptococcus mutans (serotype c). This product will be useful to assay and control the clonization of S. mutans in the oral cavity of human being. ***Beheshti Univ. Dent. J. 2005; 23(2):243-248***

خلاصه

سابقه و هدف: استرپتوکک موتان سروتیپ c عامل باکتریایی اصلی در پوسیدگی دندانهای انسان است. هدف از تحقیق تولید و خالص سازی آنتی بادی علیه استرپتوکک موتان سروتیپ c از زرده تخم مرغ بود.

مواد و روشها: در این تحقیق آزمایشگاهی استرپتوکک موتان **M T 8148** (سروتیپ c) بعنوان آنتی ژن استفاده شد. مرغها با باکتری – کشته شده با فرمالین – از طریق داخل عضلانی ایمونیزه و تخم مرغها روزانه جمع آوری شدند. ایمونوگلوبین Y با روشهای رقیق سازی با آب و رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی ستونی تیوفیلیک (T – gel) خالص گردید. ماهیت این محصول با الکتروفورز و فعالیت آن با **ELISA** ارزیابی گردید.

یافته ها: ایمونوگلوبولین خالص شده در ناحیه گاماگلوبولین در الکتروفورز مشاهده گردید و در روش **ELISA** رقت بهینه آن ۲۰۰۰۰: ۱ بود.

نتیجه گیری: تیتر ۲۰۰۰۰: ۱ نشانگر آفینیته یا غلظت زیاد آنتی بادی ویژه علیه استرپتوکک موتان (سروتیپ c) می باشد. این محصول برای سنجش و کنترل کلونیزاسیون استرپتوکک موتان در حفره دهان انسان می تواند کاربرد داشته باشد.

*استادیار گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
**عضو هیآت علمی گروه میکروبیولوژی - ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

www.SID.ir

Archive of SID

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۳/۱/۱۷ تاریخ تأیید مقاله: ۸۳/۵/۱۳

واژه‌های کلیدی: ایمونوگلوبولین Y، استرپتوکک موتان، تهیه، خالص سازی

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سال ۱۳۸٤؛ جلد(۲)۲۳: صفحه ۲٤۳ الی ۲٤۸

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از شایعترین عفونتهای باکتریایی در انسان است. با وجود اینکه چندین روش نظیر بهداشت دهان و دندان، استفاده موضعی یا سیستمیک از فلوراید و کنترل تغذیه ای در پیشگیری از پوسیدگی دندانها بکار گرفته شده است ولی کارآیی این روشها برای جلوگیری از پوسیدگی دندان در انسانها کافی نیست[۱]. مشکل موجود این است که با روشهای حاضر تشکیل پلاکها و پوسیدگی دندانها هنوز از شایعترین مسائل مبتلا به انسانها می باشد.

در بین باکتریهای دهان، موتانس استرپتوکوکسی‌ها بعنوان عوامل اصلی پوسیدگی دندان مطرح می‌باشند. براساس هومولوژی DNA، موتانس استرپتوکوکسی‌ها به هفت گونه تقسیم می شوند که می‌توان آنها را به هشت سروتیپ h, g, f, e, d, c, b, a دسته بندی کرد[۱،۲]. استرپتوکک موتان و استرپتوکک سوربینوس بعنوان عوامل اولیه اصلی در پوسیدگی دندانهای انسان مطرح می باشند و بویژه سروتیپ C استرپتوکک موتان نقش مهمی در پوسیدگی دندان برعهده دارد[۲،۳].

زرده تخم مرغ سرشار از آنتی بادیهای پلی کلونال است که ایمونوگلوبولین Y (IgY) نامیده می شوند. IgY در تحقیقات علوم پزشکی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها در سالهای اخیر کاربرد گسترده ای یافته است[۴]. مطالعات نشان داده اند که وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک آن با IgG پستانداران متفاوت می‌باشد. همچنین IgY با کمپلمان، رسپتور Fc، فاکتورهای روماتوئیدی و پروتئینهای A استافیلوککی و G استروپتوککی واکنش نمی دهد، در برابر گرما نسبتاً مقاوم می‌باشد، همچنین مقدار آنتی‌بادی بیشتری می‌توان از زرده تخم مرغ – در مقایسه با سرم حیوانات آزمایشگاهی با وزن مشابه – بدست آورد[۵-۷].

ایمونیزاسیون غیرفعال (passive) شامل تحویل آنتی‌بادیهای (IgY) ویژه به میزبان، شیوه ای جالب برای ایمنی حفاظتی در برابر پاتوژنهای میکروبی از جمله استرپتوکک موتان می باشد[۸،۹].

تولید و خالص‌سازی مواد ویژه و سالم - که بطور مستقیم با عوامل ایجاد کننده پلاک و پوسیدگی دندانها مقابله می کنند - نیاز به تحقیق و بررسی بیشتر دارد، بنابراین هدف از انجام این تحقیق تولید ایمونوگلوبولین Y آنتی استرپتوکک موتان سروتیپ C و جداسازی و تخلیص آن از زرده تخم مرغ بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روشها

تهیه آنتی ژن: در این تحقیق آزمایشگاهی استرپتوکک موتان MT8148 (سروتیپ C) اهدایی از طرف دکتر Yutako Sato (دانشگاه توکیو ژاپن) – بعنوان آنتی ژن استفاده شد. این باکتری به مدت ۴۸ ساعت در محیط BHI (Brain Heart Infusion Broth) (شرکت Merck آلمان) دارای ۵٪ (W/V) ساکاروز در ۳۷ °C در شرایط هوازی کشت داده شد. سپس در محیط فرمالین ۰/۵٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و بعد از سانتریفوژ (۱۰۰۰g و ۱۵ دقیقه با دستگاه Clements 2000) رسوب حاصله جمع آوری گردید. رسوب سه بار با سالین استریل دارای فرمالین ۰/۵٪ شستشو شده و مجدداً در سالین استریل سوسپانسیه و هموژنه گردید.

ایمونیزاسیون مرغها: چهار مرغ (۱۵۰ روزه از اتحادیه مرغداران میهن) های لاین با ۲ml از آنتی ژن (دارای 1×10^{9} CFU استرپتوکک موتان کشته شده) بطریق عضلانی ایمونیزه گردیدند. ایمونیزاسیون‌های بعدی با فاصله زمانی یک هفته و چهار بار انجام شد. تخم مرغها روزانه جمع آوری شده و در دمای ۴ °C ذخیره گردید.

خالص سازی ایمونوگلوبولین Y و تأیید فعالیت آن: بعد از شستشو با آب دیونیزه، و خارج کردن غشاء محافظ و عبور از مش نایلونی زرده تخم مرغها جدا شده و فیتلر گردیدند. زرده در محلول اسید کلریدریک (3mM) رقیق شد (۱:۱۰) و بعد از سانتریفوژ (Hettich Universal 32R) در ۱۰۰۰۰g و دمای ۴ °C مایع رویی جدا شد. به ۲۰۰ml از این مایع ۷۳/۲ گرم سولفات آمونیوم در دمای ۰ °C با همزدن مداوم افزوده شد، بعد از سانتریفوژ، رسوب در بافر TBS(PH7/3, 10mM) دارای NaCl (۰/۱۵M) حل شد. کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) براساس روش Scoble و Scops(۱۹۹۶)[۱۰]، با تغییراتی جزئی (که قبلاً توسط مؤلفین گزارش شده است) انجام شد[۱۱]. محلول خروجی از ستون مربوط به فراکسیونهای پیک دوم الکتروفورز شد (سیستم الفور) و فعالیت آن علیه استرپتوکک موتان سروتیپ C با روش ELISA و با استفاده از آنتی بادی متصل به HRP علیه IgY (شرکت Serotec انگلستان) تعیین گردید. در این روش سوسپانسیون سونیکه شده استروپتوکک موتان سروتیپ C را داخل چاهکهای پلیتهای میکروتیتر قرار داده و به ترتیب محصول خالص شده IgY، آنتی بادی نشاندار علیه IgY (Serotec) و سوبسترای TMB (Radim) با رعایت شرایط شستشو و ضربه زدن اضافه شد. با افزودن اسید سولفوریک ۱۲٪ واکنش آنزیمی متوقف شده و جذب نوری در طول موج ۴۵۰nm توسط دستگاه ELISA (Reader Awareness Start Fax – 2100) خوانده شد. برای بررسی پیوندهای غیرویژه در تعدادی از چاهکها به جای نمونه مورد نظر (IgY خالص شده) از IgY نرمال – که از زرده تخم مرغ ایمونیزه نشده جداسازی و خالص گردیده بود – استفاده شد.

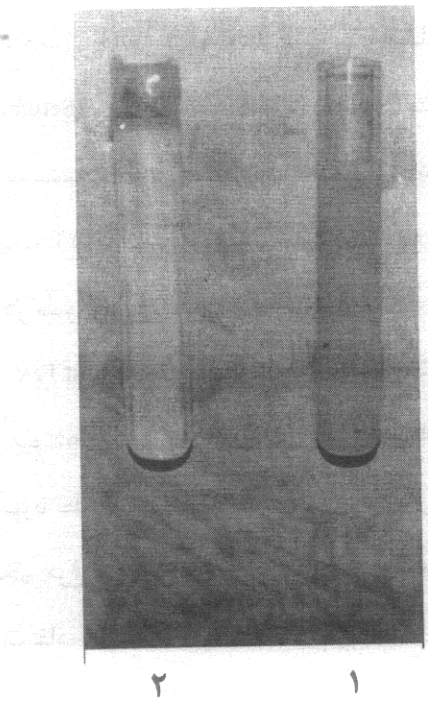
یافته ها

بعد از سانتریفوژ در ۱۰۰۰g و در شرایط اسیدی و در دمای ۴ °C فاز کاملاً شفاف از رسوب جدا شد (شکل ۱)

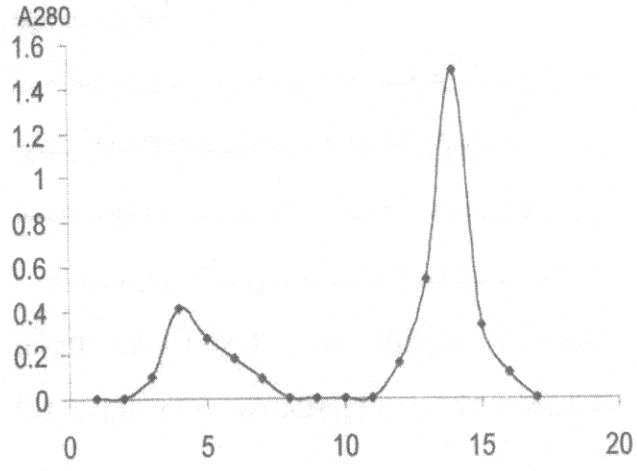
www.SID.ir

Archive of SID

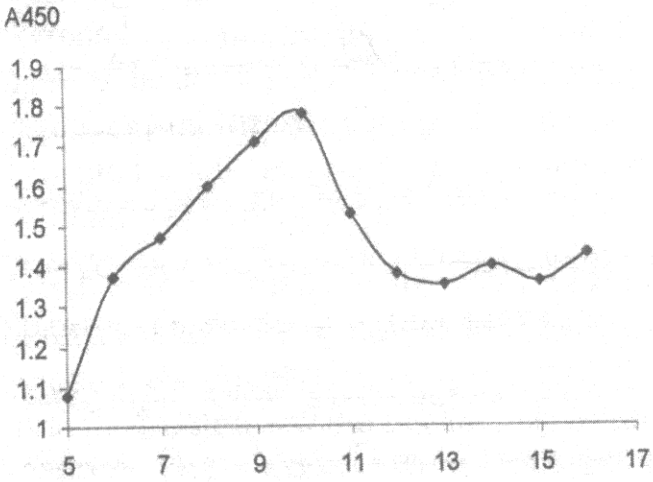
که غنی از پروتئین بود (A_{280}=۱/۹). کروماتوگرام مربوط به محلول خروجی از ستون T – gel نشانگر دو پیک کاملاً مجزا بود (نمودار ۱) که در پیک دوم فعالیت آنتی‌بادی علیه استرپتوکک موتان مشاهده گردید. الکتروفورز مخلوط فراکسیونهای پیک دوم با ژل استات سلولز نشانگر وجود یک باند در ناحیه گاما بود. فعالیت این مخلوط در روش ELISA نشانگر فعالیت بهینه با رقت ۱:۲۰۰۰ (رقت نهایی ۱:۲۰۰۰۰) بود. بیشترین مقدار فعالیت آنتی بادی در هفتهٔ دهم بعد از اولین تزریق مشاهده شد که بعد از آن کاهش یافته و در حد تقریباً ثابتی باقی ماند (نمودار ۲).



شکل ۱- نمونه های زرده قبل از سانتریفوژ (۱) و فاز شفاف سوپرناتانت (۲)



نمودار ۱- کروماتوگرام محلول خروجی از ستون T-gel: پیک دوم دارای IgY می باشد.



نمودار ۲- فعالیت آنتی بادی علیه استرپتوکک موتان سروتیپ C از هفته پنجم تا هفته هفدهم بعد از تزریق ایمونوژن اولیه: جذب نوری ۴۵۰nm در سیستم ELISA می باشد.

بحث

در این تحقیق آنتی بادی علیه استرپتوکک موتان سروتیپ C از زرده تخم مرغ تهیه و تخلیص گردید. در مقایسه با سایر تحقیقات در زمینه جداسازی و

www.SID.ir

Archive of SID

خالص‌سازی IgY علیه استرپتوکک موتان که از روشهای طولانی‌تر، پرهزینه‌تر و یا فقط از مراحل اولیه خالص‌سازی استفاده کرده‌اند تحقیق حاضر با هزینه کمتر و با خالص‌سازی بیشتر و نیز زمان کوتاهتر به تخلیص IgY آنتی استرپتوکک موتان منجر گردید.

Otake و همکاران (۱۹۹۱) پروتئینهای زرده را از لیپیدهای آن جدا کردند ولی IgY آنتی استرپتوکک موتان را از مجموعه پروتئینها جداسازی و خالص نکردند. آنها برای تأیید آزمایشات خود از مجموعه پروتئینهای فاز آبی استفاده کردند[۱۲]. در تحقیق Hatta و همکاران (۱۹۹۷) از روشهای متعدد کروماتوگرافی مبادله یونی، رسوب‌دهی، دیالیز و فیلتراسیون استفاده گردید[۸] که در مقایسه با تحقیق حاضر مراحل بیشتری داشته و زمان بیشتری نیز صرف شده است. در کروماتوگرافی T – gel به دیالیز مقدماتی نیازی نیست، IgY به ستون متصل شده، سایر ترکیبات و نمکهای اضافی خارج می شوند.

با توجه به متراکم شدن IgY در زرده تخم مرغ، روشهای غیرتهاجمی برای جمع آوری نمونه از زرده تخم مرغ، آنتی بادی قابل ملاحظه ای که از یک زرده تخم مرغ بدست می آید و ویژگیهای خاص IgY در مقایسه با IgG پستانداران، رویکرد به تولید دهانشویه‌ها و سایر فرمولاسیون‌های دارویی حاوی IgY آنتی استرپتوکک موتان می‌تواند در ایمونیزاسیون غیرفعال (passive) جهت پیشگیری و درمان پلاکها و پوسیدگی دندانها مؤثر باشد. ماهیت محصول خالص شده که تنها یک باند در الکتروفورز نشان داد و فعالیت آن با رقت بهینه ۱:۲۰۰۰۰، نشان می‌دهد که این محصول با آفینیتهٔ یا غلظت زیاد توانایی اتصال به باکتریهای استرپتوکک موتان سروتیپ C را با قدرت زیاد دارد. کاربرد این محصول و بهینه سازی آن در پیشگیری و درمان پلاک و پوسیدگی دندانها نیاز به آزمایشات دیگر و تحقیق جداگانه ای دارد.

تقدیر و تشکر

از سازمان مدیریت و برنامه ریزی استان مازندران که پشتیبان اجرای این طرح بودند، همچنین از آقایان دکتر محمد جواد رسائی، یاور جعفری و کوروش رسول پور و خانم افسانه سعیدزاده که در اجرای طرح همکاری داشتند تقدیر و تشکر می گردد.

References:

1. Koga T, Oho T, Shimazaki T, *et al*: Immunization against dental caries. *Vaccine* 2002;**20**:2027-44.
2. Loesche WJ: Role of streptoccus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986:**50**:353-80.
3. Hamada S, Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of streptococcus mutans. *Microbiol Rev* 1980; **44**:331-84.

۴. پورامیر - م: ایمونوگلوبین Y زرده تخم مرغ از ساختمان مولکولی تا کاربردهای پزشکی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۸۰؛ ۳: ۵۴-۴۷.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NG: Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods* 1998;**215**:1-7.
6. Warr GW, Magor KE, Higgins DA: IgY, clues to the origions of modern antibodies. *Immunol Today* 1995;**16**:392-8.
7. Larsoon A, Karlsson – Parra A, Sjoquist J: Use of chicken antibodies in enzyme immunoassay to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* 1991;**37**:411-14.
8. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, *et al*: Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to streptococcus mutans. *Caries Res* 1997;**31**:268-74.
9. Smith DJ, King WF, Godiska R: Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to streptococcus mutans glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun* 2001;**69**:3135-42.
10. Scoble JA, Scopes RK: Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions. *J Chromatogr A* 1996;**752**:67-76.
11. Pour Amir M, Rasaee MJ, Qujeq D, *et al*: A simple and echonomical procedures for the purification of immunoglobulin Y (IgY) from egg yolk by T – gel chromatography. *Iranian Asthma Allergy Immunol* 2000;**1**:53-7.
12. Otake S, Nishihara Y, Makimuram M, et al: protection of rats against dental caries by passive immunization with hen – egg – yolk antibody. *J Dent Res* 1991;**70**:162-6.

www.SID.ir