Archive of SID

مقاله پژوهشی

تفکیک و تخلیص آنتی ژنهای سفیده تخم مرغ

فروغه دین محمد پوری *، دکتر محمد پزشکی **

چکیده:

تخم‌مرغ یکی از مهمترین مواد غذایی است که آلرژی یا ازدیادحساسیت‌فوری نسبت به پروتئینهای آن در جوامع مختلف و سنین متفاوت مشاهده می‌گردد . با توجه به تعدد موارد آلرژی به پروتئینهای سفیدهٔتخم‌مرغ و نیاز به جداسازی اجزاء آلرژن این ماده برای بکارگیری آنها در تشخیص و درمان افراد مستعد از نظر ژنتیکی یا Atopic ، این پژوهش انجام گردید .

تحقیق حاضر در آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران به روش توصیفی از نوع اکتشافی انجام گردید.در ابتدای کار سوسپانسیونی از عصارهٔ خام سفیدهٔتخم‌مرغ تهیه شد و میزان پروتئین توتال آن اندازه‌گیری گردید ، سپس با استفاده از کروماتوگرافی تعویض‌یونی ، ایمونوالکتروفورز و SDS-PAGE اجزای آلرژن سفیدهٔتخم‌مرغ تفکیک و تخلیص گردیدند.

با استفاده از کروماتوگرافی تعویض‌یونی سه جزء به نامهای F1 ، F2 و F3 در pH های مشخص از یکدیگر تفکیک شدند . به منظورارزیابی خلوص این اجزا ، از آزمون ایمونوالکتروفورز و SDS-PAGE استفاده گردید . در هردو آزمون ، F1 باندهای متعدد پروتئینی ، F2 فقط یک باند پروتئینی و F3 یک باندمشخص و یک باند ضعیف ایجاد کردند . از روش SDS-PAGE همچنین برای تعیین وزن ملکولی پروتئینهای مختلف سفیدهٔ تخم‌مرغ در مقایسه با استاندارد استفاده گردید و نتایج این آزمون مشخص نمودکه F2 اوترانسفرین وF3 اوآلبومین می‌باشند.

نتیجهٔ نهائی این پژوهش نشان داد که اوترانسفرین بدست آمده از درجه خلوص بالایی برخوردار است ولی اوآلبومین حاوی بخش خیلی کمی ناخالصی است .

کلیدواژه ها: اوآلبومین / اوترانسفرین / سفیده تخم مرغ

مقدمه:

آلرژی یا ازدیادحساسیت فوری نسبت به مواد غذایی ، مسئول بروز علائم بیماری مانند درماتیت اتوپیک(اگزما)، کهیرحاد ، شوک آنافیلاکسی ، ناراحتیهای گوارشی، رینیت آلرژیک و آسم آلرژیک میباشند(۱) .آلرژی غذایی در آمریکا حدود ۱۰٪ - ۵٪ افراد اتوپیک را در بر می گیرد(۲).

در ایران در تحقیقی که در مورد آلرژی غذایی صورت گرفته نشان می‌دهد تخم‌مرغ دومین مادهٔ غذایی است که باعث تظاهر علائم آلرژیک می‌شود(۳) . ازدیاد حساسیت فوری به پروتئینهای سفیدهٔتخم‌مرغ در ۰/۵ درصد کودکان بطورتصادفی و در ۵ درصد اطفال اتوپیک مشاهده میگردد (۴) .

* کارشناسی ارشد آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** استادیار گروه ایمنی شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir

Archive of SID

در تحقیقات متفاوت مشخص نموده‌اند که بین ۴۰ پروتئین مختلف سفیدهٔتخم‌مرغ فقط ۴ آلرژن عمده به نامهای اوآلبومین ، اوترانسفرین ، اوموکوئید و لیزوزیم وجود دارند(۸-۵).

با توجه به این موضوع که درمان و تشخیص افراد اتوپیک ، نیاز به اجزای آلرژنیک سفیدهٔ تخم مرغ دارد ، از این‌رو در تحقیق حاضر که در آزمایشگاه بخش ایمنی‌شناسی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت با استفاده از کروماتوگرافی تعویض‌یونی و SDS-PAGE این آلرژنها از یکدیگر تفکیک و سپس شناسایی گردیدند.

روش کار:

به منظور تفکیک و تخلیص آلرژنهای سفیدهٔتخم‌مرغ ، ابتدا سفیدهٔ تخم‌مرغ با حجم مساوی از سالین نرمال مخلوط شد ، سپس این مخلوط بمدت ۴ ساعت در دمای C ° ۴ هم زده شد ، پس از آن محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای C ° ۴ سانتریفوژ گردید و محلول رویی ،که عصارهٔ خام سفیدهٔتخم‌مرغ بود ، جدا شد (۹).

میزان پروتئین عصارهٔ خام با روش Lowry اندازه‌گیری گردید(۱۰) و در ویالهایی جمع‌آوری و سپس در دمای C ° ۲۰ - تا انجام مراحل بعدی آزمایش بر روی آن ذخیره گردید.

به منظور تفکیک اجزای آنتی‌ژنیک سفیدهٔتخم‌مرغ ، از روش کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده گردید (۱۱،۱۲) ، با مراجعه به پژوهشهای انجام شدهٔ قبلی (۱۲،۱۳) ، در این تحقیق از تعویض کنندهٔ کاتیونی کربوکسیل متیل سفادکس در بافر فسفات (NaH2Po4 / Na2HPo4) ۰/۱ مولار با pH : ۴/۳ وبافراستات آمونیم (CH3COOH / NH4OH) ۰/۱ مولار با pH : ۳/۹ استفاده شد .

ستون کروماتوگرافی تعویض یونی به ارتفاع ۱۵ سانتیمتر و قطر ۱/۵ سانتیمتر در جایگاه خود مستقر گردید و ژل کربوکسی متیل سفادکس آماده شده داخل آن ریخته شد، بعد از چندین بار شستشو با بافرفسفات (pH : ۴/۳) یا بافر استات آمونیم (pH : ۳/۹) به منظور متراکم شدن کامل ژل ، ستون آماده گردید.

قبل از اضافه نمودن عصارهٔ خام به ستون ، آنرا در کیسهٔ دیالیز از جنس سلوفان در بافرفسفات(pH : ۴/۳) یا بافر استات آمونیم (pH : ۳/۹) ، دیالیز نموده ، سپس این محلول سانتریفوژ شد و به مقدار ۱ میلی‌لیتر به کمک پمپ پریستالتیک روی ستون برده شد (میزان پروتئین این نمونه ۵۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود) ، و جریان بافر با سرعت ۱-۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بر قرار گردید.

pH های استفاده شده در مورد بافر فسفات ۰/۱ مولار بترتیب : ۴/۳-۴/۷-۴/۹-۵/۲-۶/۰-۶/۸-۷/۶ و در مورد بافر استات آمونیم ۰/۱ مولار بترتیب : ۳/۹-۴/۰-۴/۲-۴/۳-۴/۴-۴/۵-۴/۶-۴/۸-۵/۰-۵/۲-۵/۴-۹/۳ بودند.

محلول خروجی از ستون به میزان ۲-۱/۵ میلی‌لیتر در لوله‌های متعدد جمع‌آوری گردید، سپس جذب نوری(OD) آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت ، برای رسم منحنی ، شمارهٔ لوله‌ها در محور افقی و مقدار جذب نوری محلول محتوی لوله‌ها در محور عمودی قرار گرفته و منحنی مربوط در مورد استفاده از بافر فسفات و بافر استات آمونیم رسم گردید. بدین ترتیب اجزای پروتئینی سفیدهٔ تخم‌مرغ بر اساس pH ایزوالکتریک خود همراه با بافر بطور مجزا از ستون خارج گردیدند .

پس از آن محتویات لوله‌های هر قله یکی شدند و چون این اجزای پروتئینی بدلیل داشتن مقدار زیادی بافر ، رقیق بودند با استفاده از کیسهٔ دیالیز و پلی‌اتیلن گلیکول(کربوواکس ۲۰۰۰۰) در C ° ۴ تغلیظ شدند . سپس محتوی کیسهٔ دیالیز در مقابل سالین نرمال دیالیز شدومیزان پروتئین اجزای تفکیک شده با روش Lowry اندازه‌گیری گردید و در ویالهایی در C ۲۰° - ذخیره شد.

به منظور ارزیابی خلوص و تعیین وزن ملکولی اجزای حاصل از کروماتوگرافی ، آزمون SDS-PAGE (روش اصلاح شدهٔ Laemmli) (۱۰،۱۴) با استفاده از ژل صفحه‌ای انجام گردید . لازم به یادآوری است که به منظور تسهیل مشاهدهٔ نقطهٔ پایانی حرکت الکتروفورتیک اجزای پروتئینی ، به نمونه‌های مورد آزمایش یک قطره محلول رنگ ردیاب (برمو فنل بلو) اضافه گردید . بعد از اتمام الکتروفورز ، ژل در محلول کماسی بریلیانت بلو رنگ‌آمیزی شد . سپس حرکت نسبی (Rm) باندهای تفکیک شدهٔ محلول

www.SID.ir

Archive of SID

استاندارد طبق فرمول زیر تعیین گردیده ، در محور افقی و لگاریتم وزن ملکولی اجزا ی پروتئینی محلول استاندارد ، در محورعمودی نوشته شد(جدول۱) و به این ترتیب منحنی استاندارد وزن ملکولی ترسیم شد و از روی این منحنی و با در دست داشتن حرکت نسبی اجزای پروتئینی نمونه‌های مورد آزمایش ، وزن ملکولی آنها محاسبه گردید.

$$Rm = \frac{\text{مسافت طی شده توسط نمونه}}{\text{مسافت طی شده توسط رنگ}}$$

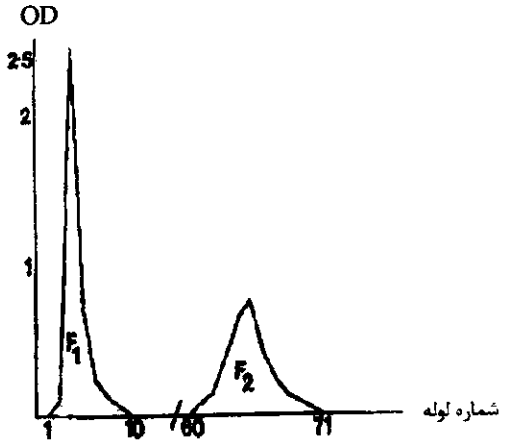
جدول۱: مواد مختلف استاندارد وزن مولکولی و میزان مهاجرت آنها در ژل

نام ماده	وزن مولکولی (دالتون)	لگاریتم وزن مولکولی	حرکت نسبی (Cm)
Cytochrom-c	۱۲۳۰۰	۴/۰۹	۰/۹۲
Carboamydrase	۳۰۰۰۰	۴/۴۸	۰/۶۳
Ovalbumin	۴۲۷۰۰	۴/۶۳	۰/۵
Albumin	۶۶۲۵۰	۴/۸۲	۰/۳۶
Ovotransferrin	۷۸۰۰۰	۴/۸۹	۰/۲۹

به منظور بررسی خلوص و ایمونوژنیسیتهٔ اجزای تفکیک شدهٔ سفیدهٔتخم‌مرغ از روش ایمونو - الکتروفورز استفاده شد . بدین منظور مقدار معینی از عصارهٔ خام بعد از استریل کردن ، با ادجوانت کامل‌فروند مخلوط گردید و سپس ۴ تزریق زیرجلدی به فواصل ۱۵ روز به دو خرگوش انجام شد (۹،۱۵). ۱۰ الی ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق از خرگوشها خونگیری کرده ووجود آنتی‌بادی علیه پروتئینهای سفیدهٔ تخم‌مرغ با استفاده ازآزمون ایمونودیفیوژن دوبعدی تعیین شد . از این آنتی‌سرم در آزمون ایمونوالکتروفورز استفاده گردید و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

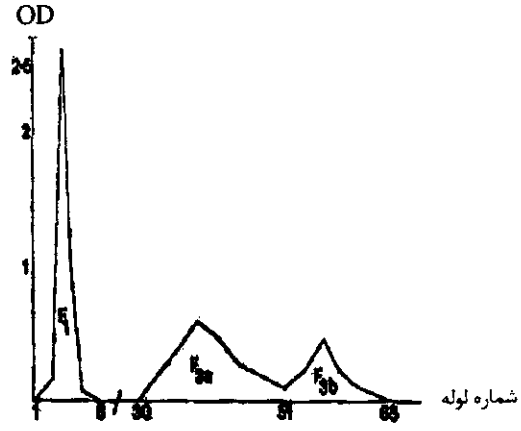
نتایج:

نتایج آزمون کروماتوگرافی تعویض یونی و منحنی مربوطه در مورد استفاده از بافر فسفات و بافر استات آمونیم در دو نمودار نشان داده شده‌اند. در نمودار ۱ ، اجزای پروتئینی F1 , F2 جدا شده با استفاده از بافر فسفات در pH ۴/۳ و ۶/۰۳ مشاهده می‌گردند با توجه به pH ایزوالکتریک پروتئینهای مختلف سفیدهٔ تخم مرغ ، جزء F2 به نام اوترانسفرین شناسایی شد .



نمودار ۱: تفکیک آنتی ژن های سفیده تخم مرغ به روش کروماتوگرافی تعویض یونی (بافر فسفات)

در نمودار ۲ ، اجزای پروتئینی F1 , F3a , F3b با استفاده از بافر استات آمونیوم در pH ۳/۹ ، ۴/۶ و ۴/۸ مشاهده می‌گردندبا توجه به pH ایزوالکتریک پروتئینهای مختلف سفیدهٔ تخم مرغ ، اجزای F3b, F3a هردو به نام اوآلبومین شناسایی شدند.



نمودار ۲ : تفکیک آنتی ژن های سفیده تخم مرغ به روش کروماتوگرافی تعویض یونی(بافر استات)

در آزمون SDS-PAGE ، محلول استاندارد وزن ملکولی ایجاد ۵ باند باریک را نمود ، نتایج بدست آمده در مقایسه با استاندارد نشان داد که وزن ملکولی اجزای تفکیک شدهٔ سفیدهٔ تخم مرغ بترتیب ۱۴۷۰۰، ۳۱۶۰۰ ، ۴۴۶۰۰ ، ۵۴۹۰۰ ، ..... می‌باشند(جدول۲) .

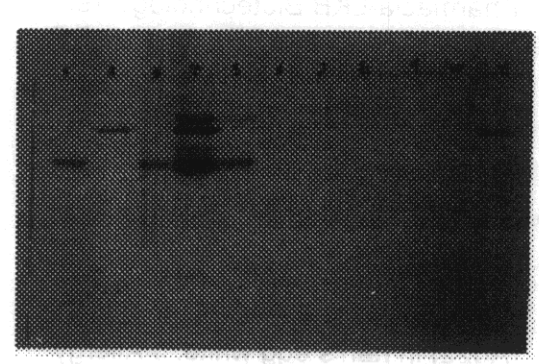
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: وزن مولکولی اجزای تفکیک شده سفیده تخم مرغ در آزمون SDS-PAGE

نمونه‌های مورد آزمایش	حرکت نسبی (Cm)	لگاریتم وزن مولکولی	وزن مولکولی (دالتون)
عصاره خام	۰/۸۵	۴/۱۷	۱۴۷۰۰
	۰/۵۹	۴/۵۰	۳۱۶۰۰
	۰/۴۷	۴/۶۵	۴۴۶۰۰
	۰/۴۰	۴/۷۴	۵۴۹۰۰
	۰/۳۰	۴/۸۷	۷۴۱۰۰
	۰/۲۶	۴/۹۲	۸۳۱۰۰
	۰/۲۳	۴/۹۶	۹۱۲۰۰
	۰/۱۹	۵/۱۰	۱۲۵۸۰۰
F1	۰/۵۹	۴/۵۰	۳۱۶۰۰
	۰/۴۷	۴/۶۵	۴۴۶۰۰
	۰/۲۶	۴/۹۲	۸۳۱۰۰
F2	۰/۳۰	۴/۸۷	۷۴۱۰۰
F3a	۰/۴۷	۴/۶۵	۴۴۶۰۰
F3b	۰/۴۷	۴/۶۵	۴۴۶۰۰

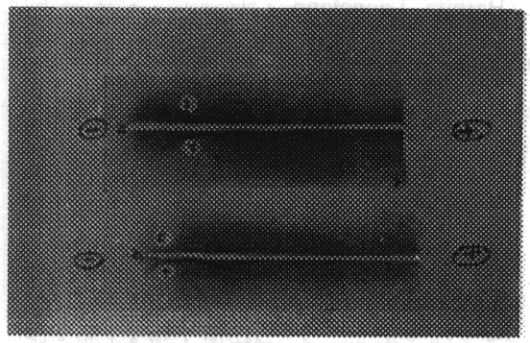
نتایج آزمون SDS-PAGE در تصویر ۱ مشاهده می‌گردند، استاندارد وزن ملکولی (ستون ۹و۱۰) ۵ باندباریک ، عصارهٔ خام (ستون ۴) ۸ باند، جزء F1 (ستون ۵) ۳ باند ، جزء F2 (ستون ۲و۱۱) یک باند و اجزای F3b , F3a (ستون ۱و۳) هر کدام یک باند مشخص و یک باند ضعیف ایجاد کرده‌اند. این نتایج نشان داد که اجزاء F3a و F3b دارای حرکت کاملاً یکسان در ژل پلی‌آکریل‌آمید می‌باشند و با توجه به وزن ملکولی پروتئینهای مختلف سفیدهٔ تخم‌مرغ اوآلبومین می‌باشند . همچنین با توجه به وزن ملکولی پروتئینهای مختلف سفیدهٔ تخم‌مرغ جزء F2 اوترانسفرین بود.



تصویر ۱: نتایج آزمون SDS-PAGE (ژل آکریل آمید ۱۲٪)

ستون ۱: جزء F3a ستون ۲: جزء F2 ستون ۳: جزء F3b
ستون ۴: عصاره خام ستون ۵: جزء F1
ستون ۹ و ۱۰ : استاندارد وزن مولکولی

بررسی خلوص و ایمونوژنیسیتهٔ اجزای تفکیک شدهٔ سفیدهٔ تخم مرغ در مقایسه با عصارهٔ خام در تصویر۲ نشان داده شده است ، همانطور که مشاهده می‌گردد عصارهٔ خام(حفرهٔ ۱) ۵ باند رسوبی ، F1 (حفرهٔ ۲) ۳ خط رسوبی ، F2 (حفرهٔ ۳) یک باند و F3 (حفرهٔ ۴) یک باند رسوبی مشخص و یک باندضعیف را ایجاد کرده‌اند.



تصویر ۲: نتایج آزمون ایمونوالکتروفورز

۱ - عصارهٔ خام سفیدهٔ تخم مرغ ۲ - جزء F1
۳ -جزء F2 یا اوترانسفرین ۴ - جزء F3 یا اوآلبومین
۵- آنتی‌سرم تهیه شده در خرگوش بر علیه عصارهٔ خام سفیدهٔ تخم‌مرغ

بحث:

کروماتوگرافی تعویض یونی عصارهٔ خام سفیده تخم‌مرغ با استفاده از بافر فسفات و بافر استات ۴ جزء مختلف (F3b , F3a , F2 , F1) ایجاد نمود . این نتایج گواه آنند که جزءF1 در هر دو بافر در pH اولیه (۳/۹و ۴/۳) از اجزای دیگر سفیدهٔتخم‌مرغ تفکیک شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE مشخص نمود که این جزء خالص نمی‌باشد و از ۳ پروتئین با اوزان ملکولی متفاوت تشکیل شده است . Rhodes و همکارانش نیز جزء F1 را در pH اولیه جدا نمودند و به این نتیجه رسیدند که این جزء دارای ناخالصی است اما آنان توانستند با استفاده از کروماتوگرافی مجدد این جزء در ژل کربوکسی متیل سلولز دو پروتئین اوموکوئید و فلاووپروتئین را از یکدیگر تفکیک نمایند(۱۲). در حالیکه در پژوهش حاضر که از ژل کربوکسی متیل سفادکس برای کروماتوگرافی جزء F1 استفاده گردید دو پروتئین یادشده از یکدیگر تفکیک نگردیدند . این عدم تفکیک ممکن است به دلیل استفاده از ژل سفادکس بجای ژل

www.SID.ir

Archive of SID

سلولز باشدکه مشخص می‌کند احتمالاً ژل سلولز از قدرت تفکیک بیشتری در مورد گلیکوپروتئینی مانند اوموکوئید که حدود ۲۰ در صد کربوهیدرات دارد (۷) برخوردار باشد . نتایج آزمون ایمونوالکتروفورز نیز نشان داد که جزء F1 ناخالص می‌باشد ، این مورد با نتایج تحقیق Langeland (۸،۹) همخوانی داشت .

نتایج بدست آمده از مطالعهٔ حاضرمشخص نمود که جزء F2 اوترانسفرین می‌باشد. Langeland وHarbitz نیز اوترانسفرین را با استفاده از ژل کربوکسی متیل سفاروز ، بطور خالص جدا نمودند(۱۳) که این نتایج با تحقیق حاضر مطابقت دارد ، این امر گواه آن است که نوع ژل مورد استفاده درکروماتوگرافی تعویض یونی تاثیری بر جداسازی اوترانسفرین ندارد.

نتایج بدست آمده از مطالعهٔ حاضر نشان داد که اجزاء F3a و F3b اوآلبومین می‌باشند که با تحقیق Rhodes و همکارانش (۱۲) مطابقت دارد . آنها با استفاده از ژل کربوکسی متیل سلولز اوآلبومین را به دو جزء در pH ۴/۶ و ۴/۸ تفکیک کردند که هر دو جزء در SDS-PAGE حرکت یکسان در ژل پلی‌آکریل‌آمید، را نشان دادند. این امر گواه آن است که نوع ژل مورد استفاده درکروماتوگرافی تعویض یونی مانند اوترانسفرین تاثیری بر جداسازی اوآلبومین ندارد.

نتایج حاصل در پژوهش حاضر نشان می‌دهد ، استفاده از محیط نگهدارنده در روش کروماتوگرافی تعویض یونی نقش تعیین کننده‌ای در تفکیک اجزای پروتئینی سفیدهٔتخم‌مرغ دارد.

منابع:

1. Roitt I , Brostoff J , Male D (eds). Immunology . London: Mosby ,1996.
2. Sloan AE , Powers ME. A perspective on popular perceptions of adverse reactions to food . J Allergy Clin Immunol 1986; 78:127-133 .

۳. پورپاک زهرا . بررسی آلرژی غذایی در کودکان با استفاده از تستهای Prick و RAST . پایان‌نامهٔ دکتری ایمونولوژی ، دانشکدهٔ بهداشت ، دانشگاه علوم‌پزشکی تهران ، ۷۴-۱۳۷۳.

4. Ford RPK , Taylor B. Natural history of egg hypersensitivity. Arch Dis Child 1982; 57 : 649-652 .
5. Elasayed S , Hammer ASE , Kalvenes MB , et al. Antigenic and allergenic - determinants of ovalbumin. Int Archs Allergy Appl Immunol 1986 ; 79 : 101-107 .
6. Haffman DR . Immunochemical identification of the allergens in egg white. J Allergy Clin Immunol 1983 ; 71 : 481-486.
7. Holen E , Elsayed S. Characterization of four major allergens of hen egg white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE immuno - autoradiography . Int Arch Allergy Appl Immunol 1990 ; 91 : 136-141 .
8. Langeland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white - 3 - allergens in hen's egg white studied by crossed radio- immunoelectrophoresis (CRIE) . J Allergy 1982; 37 : 521-530 .
9. Langeland T. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white - 2 - antigens in hen's egg white studies by crossed immuno electrophoresis(CIE) . J Allergy 1982 ; 37 : 323-333 .

۱۰. خرمی‌زاده محمدرضا . جداسازی آنتی‌ژنهای فاسیولا هپاتیکا و بررسی نقش ایمونولوژیک آنها. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشدانگل‌شناسی پزشکی ، دانشکدهٔ بهداشت. دانشگاه علوم پزشکی تهران ، ۷۱-۱۳۷۰.

11. Ion exchange chromatography principles and methods . Sweden : Pharmacia-LKB Biotechnology 1991.
12. Rhodes MB , Azari PR , Feeney RE. Analysis fractionation and purification of egg white proteins with cellulose cation exchanger. J Biol Chem 1958; 23 : 239-408
13. Langeland T , Harbitz O. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white - 5 - Purification and identification of a major allergen (Ag22) in hen's egg white. J Allergy 1983; 38 : 131-139 .
14. Lefkovits I , Pernis B (eds). Immunological methods , New York : Academic Press , 1979.
15. Weir DM (ed). Handbook of experimental immunology. London : Blackwell , 1986 .

www.SID.ir