

## تشخیص آنتی ژن های توموری در عقده لمفاوی گاو مبتلا به لنفوسارکوم ویروسی با روش رسوب ایمنی

غلامرضا نیکبخت بروجنی \* سید مهدی امام ندا برجسته

گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۰ خرداد ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱۶ مرداد ماه ۱۳۸۶)

### چکیده

در این مطالعه یک نمونه عقده لمفاوی مبتلا به لنفوسارکوم ناشی از ویروس لکوز گاوی و یک نمونه عقده لمفاوی گاوسالم با سه روش مختلف جهت استخراج پروتئین های بافت توموری مورد استفاده قرار گرفت. این روش ها شامل فرآوری ساده در PBS، سونیکاسیون و روش فنلی بود. نمونه ها به صورت مقایسه ای تحت آزمون رسوب ایمنی قرار گرفتند. در آزمون رسوب ایمنی از باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز جهت خالص سازی کمپلکس ایمنی استفاده شد. در نهایت الگوی الکتروفورز پروتئین های آنتی ژنی در شرایط مختلف احیایی و غیر احیایی مورد بررسی قرار گرفتند. در استخراج پروتئین های عقده لمفاوی مبتلا با فرآوری ساده در PBS، آنتی ژن (۳۲، ۳۹) و (۳۰ کیلودالتون)، در نمونه سونیکه (۵، ۷۲، ۴۸، ۴۲، ۳۷ و ۳۲ کیلودالتون) و در استخراج فنلی (۶ آنتی ژن (۱۰۴، ۷۷، ۵۴، ۳۲، ۳۰ و ۲۶ کیلودالتون) مشخص شدند. در روش رسوب ایمنی توان تشخیص آنتی ژن های توموری به شیوه استخراج و تعادل آنتی ژن و آنتی بادی وابسته است و با ارزیابی کمی رسوب ایمنی به نحو موثری افزایش خواهد یافت. با این روش به خوبی می توان آنتی ژن های توموری را مشخص نمود.

واژه های کلیدی: آنتی ژن های توموری، لنفوسارکوم، رسوب ایمنی، لکوز گاوی.

است. این ویروس عامل لنفوسارکوم ویروسی گاو یا لکوز گاوی است (۷، ۱۴). در ابتلا به لکوز ویروسی گاو به طور معمول ۶۰ درصد از گاوهایی که از نظر سرمی مثبت هستند فاقد علامت بالینی، حدود ۳۰ درصد لمفوسیتوز پایدار و بین ۵ تا ۱۰ درصد اشکال کشنده توام با لنفوسارکوم را نشان می دهند (۱۶، ۲۰). (۹، ۱۰). مرحله توموری بیماری مانند دیگر تومورهایی که بوسیله ویروس ها ایجاد می شوند دارای آنتی ژن های ویروسی و غیر ویروسی است (۱۲، ۱۴، ۱۹). در گاو های مبتلا به لکوز به طور معمول آنتی ژن های ویروسی gp51 و p24 مورد توجه بوده اند. آنتی بادی های ضد gp 51 جهت تشخیص بیماری استفاده می شوند (۹). اما بر اساس برخی گزارش ها در دام های آلوده به طور غالب یاد برخی موارد منحصرا پادتن ضد p24 قابل تشخیص بوده است (۳). تاکنون ارتباط بین بیان gp51 در لمفوسیتوز پایدار و p24 در مرحله لنفوسارکوم در گاو مشخص شده است (۶). تشخیص سایر آنتی ژن های توموری در مرحله لنفوسارکوم می تواند به کشف روند تومورزایی ویروس کمک نماید.

برای مطالعه و جدا سازی آنتی ژن های توموری می توان از روش رسوب ایمنی بهره برد. آزمون رسوب ایمنی با اضافه کردن سرم به بافت توموری آغاز شده و در نهایت کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی از مخلوط خارج و آنتی ژن به کمک تغییرات فیزیکی یا شیمیایی از آنتی بادی جدا گشته و با روش های کمی یا کیفی مثل SDS-PAGE بررسی می گردد. در این روش می توان از آنتی بادی های تک بنیانی یا چند بنیانی اختصاصی یک آنتی ژن جهت جداسازی یک آنتی ژن خاص استفاده کرد (۲، ۱۳). در تحقیق حاضر از روش رسوب ایمنی جهت جداسازی و مطالعه آنتی ژن های موجود در لکوز استفاده شده است. روش رسوب ایمنی در این تحقیق آنتی ژن هایی که قادر

### مقدمه

تشخیص آنتی ژن هایی که امکان تفکیک یاخته های توموری از یاخته های طبیعی را فراهم می کنند یکی از چالش های عمده در ایمنی شناسی تومورها و ایمونوتراپی است. در خصوص تومورهای ویروسی به ویژه این آنتی ژن ها در صورت شناسایی قابلیت استفاده در کشف منشأ ویروسی تومور و چگونگی شکل گیری آن را دارند. خصوصیات مولکولی آنتی ژن های توموری می تواند به تشخیص بیماری (با یا بدون منشأ ویروسی)، تهیه واکسن و همچنین درمان، کمک موثری نماید.

آنتی ژن های مربوط به تومورهای ویروسی را می توان به سه دسته تقسیم نمود: ۱- آنتی ژن های ویروسی، که بیشتر پروتئین های ساختمانی یا آنزیمی هستند. ۲- آنتی ژن های اختصاصی تومور (TSA) که در یاخته های توموری تولید شده و در یاخته های معمولی وجود ندارند. ۳- آنتی ژن های همراه با تومور (TAA) که در یاخته های معمولی نیز یافت می شوند و در بیشتر موارد از اجزای معمولی یاخته ای هستند و تولید آنها از تنظیم خارج گشته است (۲، ۱۷). شاخص های توموری یا آنتی ژن های پیوندی اختصاصی تومور (TSTA) در گروه دوم یا آنتی ژن های اختصاصی قرار می گیرند. این آنتی ژن ها محل هدف پاسخ های ایمنی می باشند. در حال حاضر آنتی ژن های توموری را بیشتر بر اساس ساختمان مولکولی و منشأ آنتی ژنی آن ها تقسیم بندی می کنند (۱، ۱۲، ۲۲).

رتروویروس ها از جمله ویروس های تومورزای مهمی هستند که مکانیسم تومورزایی در آنها به خوبی بررسی شده است. ویروس لکوز گاوی (BLV) یکی از اعضای جنس دلتا رتروویروس در خانواده رتروویروئید



به تحریک پاسخ هومورال و تولید آنتی بادی های اختصاصی علیه تومور لمفوسارکوم ویروسی گاو هستند را مشخص می نماید.

## مواد و روش کار

در این تحقیق از یک عقده لمفاوی توموری گاو مبتلا به لکوز ویک عقده لمفاوی غیر توموری استفاده شد. عقده های لمفاوی مورد مطالعه مربوط به گاوهایی بودند که ابتلا و یا عدم ابتلا به لکوز در آنها طی آزمون های سرمی، آگار ژل ایمونودیفوزیون، الیزا و حضور ویروس در بافت با آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند. گاوها از نظر علائم بالینی (بیمار یا به ظاهر سالم)، دوره سنی مشابه، و همچنین توموری یا غیر توموری بودن عقده ها انتخاب شده بودند (۱۵). نمونه های بافتی در ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

سرم گاو مبتلا به لکوز که در بررسی آنتی ژن های عقده لمفاوی توموری همان گاو استفاده شده بود علاوه بر تشخیص آنتی بادی های ضد پروتئین های ویروسی (p24 و gp51) جهت آنتی بادی های ضد بافتی نیز مورد آزمایش قرار گرفت تا حضور چنین آنتی بادی هایی علیه بافت عقده لنفاوی مشخص گردد. بررسی بر روی کل بافت احتمال از دست دادن آنتی ژن های آزاد شده از سلول ها را کمتر می نماید. همچنین حضور آنتی بادی های ضد اجزای سلولی (غیر اختصاصی) که در واکنش با واکنش های کشت سلولی در گاو شکل می گیرند می توانند در تشخیص آنتی ژن های توموری گمراه کننده باشند. عدم حضور آنتی بادی های ضد اجزای سلولی با روش الیزا مشخص گردید. به طور خلاصه سرم مذکور در رقت های مختلف به گوده های پوشیده از آنتی ژن ویروسی و پوشیده از عصاره کشت سلول (کنترل) اضافه شدند. پلیت های الیزا مربوط به کیت تشخیص سرمی ویروس لکوز گاوی (Biox, France) بوده است. سایر مراحل کار بر اساس روش استاندارد الیزا صورت گرفت. آزمون الیزا نشان داد که سرم مورد مطالعه فاقد آنتی بادی های ضد اجزای سلولی است. پس از اطمینان از عدم حضور آنتی بادی های غیر اختصاصی از سرم در آزمون رسوب ایمنی استفاده شد.

**فرآوری نمونه ها:** عقده لمفاوی جهت انجام آزمون رسوب ایمنی با سه روش متفاوت فرآوری گردید. در روش اول نمونه در میکسر با حداکثر سرعت در داخل PBS یکنواخت گردیده، سپس قطعات بزرگ و خرد نشده نمونه به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴۵۰۰g و ۴۵۰۰g دمای محیط رسوب داده شدند. از محلول یکنواخت رویی به عنوان آنتی ژن در آزمون رسوب ایمنی بهره گرفته شد.

در روش دوم ۲۰۰ میلی گرم از نمونه بافت خرد شده با اسکالپل به ۲۰۰µl در بافر PBS اضافه شده و در مجاورت یخ توسط دستگاه اولترا سون (GmbH, Ultrashallprozessor) سونیکه گردید. سونیکاسیون سه بار و هر بار ۵ ثانیه با بیشینه قدرت (cycle: 1, Amplitude 100% 20kHz) دستگاه انجام شد. سپس مجدداً ۵۰۰µl بافر PBS اضافه نموده و پس از مخلوط کردن برای جداسازی قطعات بزرگ و خرد نشده، نمونه به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴۵۰۰g

در دمای محیط سانتر فیوژ شد.

در روش سوم، استخراج پروتئین با استفاده از کیت Tripure (محصول شرکت Roch) و بر اساس روش پیشنهادی شرکت تولید کننده کیت صورت گرفت. استخراج پروتئین ها در این روش با استفاده از فاز آبی و فنلی (قرمز آلی) صورت می گیرد. به طور خلاصه ۱۰۰ میلی گرم بافت خرد شده با ۱ میلی لیتر از محلول تری پیور مخلوط و ۲ دقیقه ورتکس شده (Labnet, USA)، سپس مخلوط در شرایط ۱۲۰۰۰g دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتر فیوژ گردید. از فاز میانی و قرمز آلی، پس از رسوب دادن DNA، جهت جداسازی پروتئین با ایزوپروپانل استفاده می گردید. پروتئین استخراج شده تا زمان انجام آزمون رسوب ایمنی در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

آنتی بادی مورد استفاده در آزمون رسوب ایمنی از نمونه سرم گاو مبتلا به لکوز جداسازی گردیده بود. ۴۰ درصد حجم سرم، سولفات آمونیوم اشباع به سرم اضافه شده تا ایمونوگلوبولین های آن رسوب داده شود، سپس رسوب در PBS حل شده و سه بار در برابر PBS دیالیز می گردید تا کاملاً سولفات آمونیوم از ایمونوگلوبولین ها جدا شود.

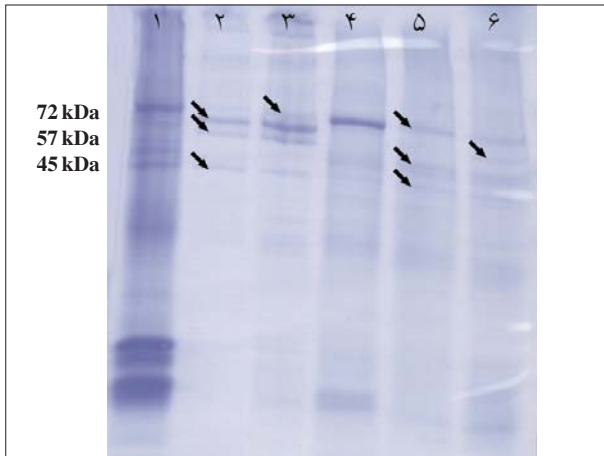
**استاندارد سازی آنتی ژن:** جهت استاندارد سازی آنتی ژن غلظت های متوالی آنتی ژن با مقادیر ثابتی از آنتی بادی مجاور شد. همچنین غلظت های متوالی آنتی بادی نیز با مقادیر ثابت آنتی ژن مجاور گردید. غلظت های ۱/۱۰ الی ۱/۲۰۴۸۰ از آنتی ژن در مجاورت با غلظت ۱/۱ از آنتی بادی و غلظت های ۱/۱۰ الی ۱/۲۰۴۸۰ از آنتی بادی در مجاورت با غلظت ۱/۱ از آنتی ژن قرار گرفت. مجموعه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. تمام غلظت های فوق در مجاورت با PBS به عنوان شاهد نیز قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت از نمونه ها آزمایش نورسنجی با طول موج ۶۳۰ نانومتر به عمل آمده و هر نمونه با نمونه شاهد خود مقایسه گردید تا نقطه هم ارز در بیشترین تفاوت کدورت نمونه و شاهد آن بدست آید. به منظور مقایسه بین دو روش سونیکاسیون و استخراج فنل روش فوق برای هر دو نوع آنتی ژن استخراج شده توسط کیت و سونیکاسیون استفاده گردید.

**آزمون رسوب ایمنی:** در این مرحله پس از ساخت رقت مناسب آنتی بادی، که از مرحله قبل بدست آمده بود، ۵۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی با ۵۰۰ میکرولیتر از آنتی ژن (بر اساس مقادیر مشخص شده در مرحله استاندارد سازی آنتی ژن) مجاور گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد، پس از ۲۴ ساعت به نیمی از نمونه ها به عنوان شاهد ۲۰۰ میکرولیتر محلول فرمالینه با کتری استرپتوکوکوس پیوز ن اضافه گردید و برای بار دوم به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. نمونه هایی که به آنها با کتری اضافه نشده بود نیز در مجموع ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

نمونه ها پس از خروج از انکوباتور به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g در دقیقه سانتر فیوژ شدند، مایع رویی دور ریخته شد و پلت حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS حل گردید.

۲۰ میکرولیتر از محلولی که در مرحله آخر رسوب ایمنی حاصل شده بود





تصویر ۳- نتایج الکتروفورز پروتئین های حاصل از سونیکاسیون و با استخراج فنل از نمونه لکوزی با بافر غیراحیایی، قبل و بعد از آزمون رسوب ایمنی (۱. پروتئین حاصل از استخراج فنل. ۲. پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (استخراج فنل). ۳. پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی با کمک باکتری (استخراج فنل). ۴. پروتئین حاصل از فرآوری بوسیله سونیکاسیون. ۵. پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون). ۶. پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی با کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون).

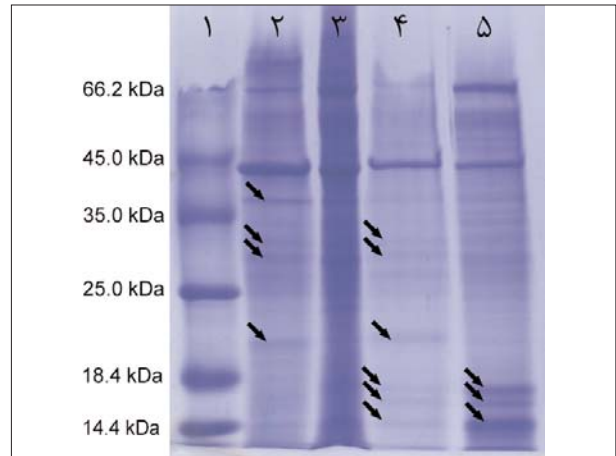
۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۵۷ و ۴۵ کیلو دالتن در رسوب ایمنی پروتئین های که به وسیله فنل استخراج شده بودند مشاهده می شود (ستون ۲ و ۳). همچنین یک باند با وزن مولکولی حدود ۷۲ کیلو دالتن فقط در نمونه ای دیده می شود که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود (ستون ۳). در الکتروفورز رسوب ایمنی که پروتئین ها در آن به روش سونیکاسیون استخراج شده بودند ۲ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۴۷ و ۴۰ کیلو دالتن مشخص شدند (ستون ۵ و ۶). یک باند با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلو دالتن نیز که منحصرا در نمونه ای که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود قابل مشاهده است (ستون ۶).

میکرولیتر از مایع رورا جهت الکتروفورز در ژل اکرلامید ۱۲ درصد در کنار مارکر وزنی مخصوص پروتئین (Fermentas, Germany) استفاده گردیدند. الکتروفورز نمونه ها با ولتاژ ۹۰ در دستگاه Mini Cell (محصول شرکت Rad-Bio) به مدت ۳ ساعت انجام گردید. برای رنگ آمیزی ژل اکرلامید پس از پایان الکتروفورز ژل هادر ۲۰۰ میلی لیتر از کوماسی بلو ۰/۰۵ درصد به مدت یک شب قرار گرفت. رنگ زدایی با اسید استیک ۷ درصد به مدت ۶ ساعت صورت گرفت. نمونه ها با بافر دناتور کننده غیر احیایی که فاقد بتا مرکاپتواتانل بود به مدت ۳ در آب جوش قرار گرفته و بلافاصله بر روی بیخ منتقل شدند تا اثر بافر بر روی آنتی ژن ها نیز مشخص گردد.

تمامی اعمال استخراج پروتئین و الکتروفورز انجام شده جهت بررسی پروتئین ها بر اساس روش های شرح داده شده توسط Ausubel و همکاران در سال ۲۰۰۲ و استاندارد سازی آنتی ژن و رسوب ایمنی بر اساس روش های شرح داده شده توسط Hey و همکاران در سال ۲۰۰۲ صورت گرفته است (۲، ۱۴).

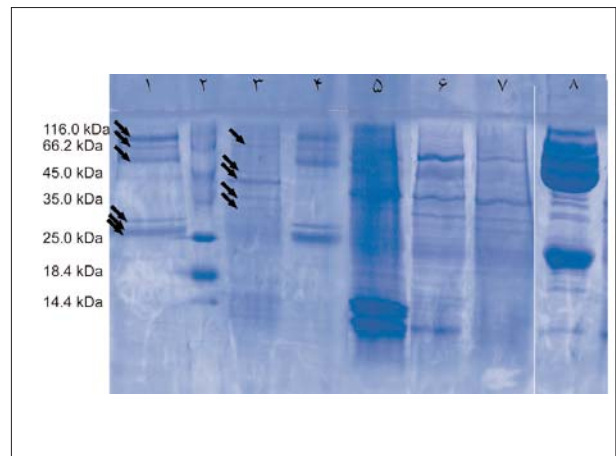
### نتایج

آزمون های آگار ژل ایمونودیفوزیون و الیزا بر روی سرم و PCR بر روی عقده لمفاوی توموری مثبت و در مورد عقده لمفاوی سالم منفی بودند. غلظت ۲۵۶۰: ۱ از سرم گاو مبتلا با آنتی ژن های سونیکه شده و غلظت



تصویر ۱- نتایج مقایسه الکتروفورز آنتی ژن های حاصل از فرآوری ساده، قبل و بعد از آزمون رسوب ایمنی. (۱. مارکر. ۲. رسوب ایمنی عقده لکوزی. ۳. عقده لکوزی. ۴. رسوب ایمنی عقده سالم. ۵. عقده سالم).

یک باند با وزن مولکولی ۳۹ کیلو دالتن در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده بیمار (ستون ۲) وجود دارد که در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده سالم (ستون ۴) وجود ندارد. همچنین دو باند دیگر به اوزان مولکولی ۳۲ و ۳۰ کیلو دالتن در هر دو پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی وجود دارد که با تراکم بیشتری در نمونه لکوزی قابل رویت است.



تصویر ۲- مقایسه الگوهای الکتروفورز تیپ پروتئین های حاصل از فرآوری با سونیکاسیون و با استخراج فنل از نمونه لکوزی با بافر احیایی، قبل و بعد از آزمون رسوب ایمنی. (۱. رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (استخراج فنل). ۲. مارکر. ۳. رسوب ایمنی با کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون). ۴. رسوب ایمنی با کمک باکتری (استخراج فنل). ۵. پروتئین حاصل از استخراج فنل. ۶. پروتئین حاصل از فرآوری بوسیله سونیکاسیون. ۷. پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون). ۸. آنتی بادی مورد استفاده در آزمون رسوب ایمنی).

باند های با اوزان مولکولی ۱۰۴، ۷۷، ۵۴، ۳۲، ۳۰ و ۲۶ کیلو دالتن در الکتروفورز رسوب ایمنی در نمونه های که فرآوری پروتئین در آن بوسیله استخراج فنل انجام شده بودند مشاهده شد (ستون ۱ و ۴). باند دیگر به اوزان مولکولی ۷۲، ۴۲، ۳۷ و ۳۲ کیلو دالتن در پلت های حاصل از آزمون رسوب ایمنی نمونه ای که فرآوری پروتئین در آن بوسیله سونیکاسیون انجام شده بود (ستون ۳ و ۷) مشخص گردید. تنها یک باند با وزن مولکولی ۴۸ کیلو دالتن منحصرا در نمونه مذکور (ستون ۳) اضافه تر نسبت به زمانی که از باکتری استفاده نگردیده بود (ستون ۷) مشاهده گردید.

با ۲۰ میکرولیتر بافر دناتور کننده احیایی (تریس هیدروکلراید ۰/۱ مول (pH=6)، SDS ۴ درصد، برم فنل بلو ۰/۲ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد و بتا مرکاپتواتانل ۵ درصد) مجاور گردیده و پس از مخلوط کردن به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد سپس به مدت کوتاهی سانتریفوژ شده و ۱۵



با تراکم بیشتر مشاهده شد. باندهای مذکور (۶۲، ۵۷ و ۴۵ کیلودالتن) به ویژه در نمونه‌ها پیش از مواجهه با آنتی‌بادی اختلاف قابل توجهی را از نظر تراکم نشان داده‌اند.

### بحث

Bunger و همکاران در سال ۱۹۹۶ مطالعه‌ای بر روی فرآوری پروتئین‌های عقده لنفاوی با هدف تهیه پادگن‌های ویروس لکوز با روش‌های مختلف انجام دادند. این یکی از معدود مواردی است که مطالعه بر روی پادگن‌های ویروسی در عقده‌های لنفاوی صورت گرفته است (۵).

Tajima و همکاران نیز پروتئین‌های ویروسی را که در یاخته‌های مختلف ترانسفورمه بیان شده بودند را با روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار دادند، این دانشمندان باندهای پروتئینی مهم در پاسخ ایمنی را حداقل به ۶ پروتئین‌های ویروسی نسبت داده‌اند (پروتئین‌های ۳۰، ۴۵، ۵۱، ۷۰، ۷۲ و ۲۴ کیلودالتون) این پروتئین‌ها همه از اجزای ساختمانی ویروس هستند. لازم به ذکر است که تمامی نتایج بدست آمده فوق در آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم گوسفند آلوده شده با ویروس لکوز گاوی بدست آمده است (۱۸).

Nikbakht و همکاران در سال ۱۳۸۵ در بررسی خود بر روی عقده‌های لنفاوی توموری گاوهای مبتلا به لکوز با روش وسترن بلاتینگ به حضور ۶ پروتئین آنتی ژنی اشاره کرده‌اند (۱۵). ۴ باند در مجموعه گزارش شده با باندهای بدست آمده در روش استخراج فیل و استفاده از بافر احیایی این تحقیق مشابه است (باندهای ۳۷، ۴۲، ۷۲ و ۲۶/۵ کیلودالتون). ۱ باند با روش استخراج ساده پروتئین در تحقیق حاضر قابل ردیابی بوده است. تشخیص ۵ باند پروتئینی از ۶ باند گزارش شده توانایی بالایی را برای روش رسوب ایمنی نشان می‌دهد به ویژه آن که آنتی‌ژن‌های مشخص شده در روش رسوب ایمنی را به سادگی می‌توان بر روی ژل جداسازی و در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار داد. این کار در روش وسترن بلات با مشکلاتی روبرو است (۲).

روش رسوب ایمنی یکی از روش‌های مناسب جهت تشخیص و جداسازی آنتی‌ژن‌هایی است که در بدن علیه آن‌ها آنتی‌بادی ساخته می‌شود. مهمترین این آنتی‌ژن‌ها آنتی‌ژن‌های توموری هستند که در تشخیص و درمان مورد توجه قرار می‌گیرند (۲). از روش رسوب ایمنی جهت جداسازی آنتی‌ژن‌های ویروس لکوز از محیط کشت استفاده شده است ولی آنتی‌ژن‌های توموری در لمفوسارکوم ناشی از این ویروس مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند (۸، ۱۱، ۲۱).

در این مطالعه ۳ آنتی‌ژن در نمونه‌ای که با فرآوری ساده، پروتئین آن استخراج گردیده بود، ۶ آنتی‌ژن در استخراج فنلی و ۴ آنتی‌ژن در نمونه‌ای که پروتئین‌های آن به وسیله سونیکاسیون استخراج گردیده بود مشاهده گردید. نتایج فوق نشانگر تاثیر چگونگی استخراج پروتئین در نتایج بدست آمده است. لازم به ذکر است که پروتئین‌های استخراج شده مربوط به

۱:۱۲۸۰ از همان سرم با آنتی‌ژن‌های استخراج شده با روش فنل بیشترین اختلاف کدورت را با نمونه‌های شاهد خود نشان دادند. این غلظت‌ها نمایانگر منطقه هم ارز بوده که در آزمون رسوب ایمنی مورد استفاده قرار گرفتند.

الکتروفورز آنتی‌ژن‌های حاصل از فرآوری ساده عقده سالم و بیمار بعد از انجام آزمون رسوب ایمنی و قبل از آن در تصویر ۱ نشان داده شده است. همانگونه که در تصویر ملاحظه می‌شود یک باند با وزن مولکولی ۳۹ کیلو دالتن در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده بیمار (ستون ۲) وجود دارد که در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده سالم (ستون ۴) وجود ندارد، همچنین دو باند دیگر به اوزان مولکولی ۳۲ و ۳۰ کیلو دالتن در هر دو پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی وجود دارد که با تراکم بیشتری در نمونه لکوزی قابل رویت است.

الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از فرآوری با سونیکاسیون و یا استخراج فنل از نمونه لکوزی قبل از آزمون رسوب ایمنی و پس از انجام آزمون رسوب ایمنی بدون استفاده از باکتری یا همراه با آن در تصویر ۲ آمده است. ۶ باند با اوزان مولکولی ۱۰۴، ۷۷، ۵۴، ۳۲، ۳۰ و ۲۶.۵ در الکتروفورز رسوب ایمنی در نمونه‌هایی که فرآوری پروتئین در آن بوسیله استخراج فنل انجام شده بودند مشاهده شد (ستون ۴). ۴ باند دیگر به اوزان مولکولی ۷۲، ۴۲، ۳۷ و ۳۲ کیلو دالتن در پلت‌های حاصل از آزمون رسوب ایمنی نمونه‌ای که فرآوری پروتئین در آن بوسیله سونیکاسیون انجام شده بود (ستون ۳ و ۷) مشخص گردید. تنها یک باند با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتن منحصر در نمونه مذکور (ستون ۳) اضافه تر نسبت به زمانی که از باکتری استفاده نگردیده بود (ستون ۷) مشاهده گردید. اوزان مولکولی باندهای مذکور با وزن مولکولی هیچ یک از باندهای آنتی بادی مورد استفاده یکسان نبوده که نشانگر خاصیت آنتی‌ژنی آن‌هاست.

جهت مقایسه تاثیر استفاده بافرهای احیایی و غیر احیایی در نتایج آزمون پروتئین‌های استخراج گردیده به دو روش سونیکاسیون و استخراج فنل، پلت‌های حاصل از مرحله قبل بوسیله بافر غیر احیایی نیز تحت آزمون الکتروفورز قرار گرفتند که نتایج آن در تصویر ۳ ارائه گردیده است. همانگونه که در تصویر مشخص گردیده ۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۵۷ و ۴۵ کیلو دالتن در رسوب ایمنی پروتئین‌هایی که به وسیله فنل استخراج شده بودند مشاهده می‌شود (ستون ۲ و ۳). همچنین یک باند با وزن مولکولی حدود ۷۲ کیلودالتن فقط در نمونه‌ای دیده می‌شود که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود (ستون ۳). در الکتروفورز رسوب ایمنی که پروتئین‌ها در آن به روش سونیکاسیون استخراج شده بودند ۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۴۷ و ۴۰ کیلودالتن مشخص شدند (ستون ۵ و ۶). یک باند با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلو دالتن نیز که منحصر در نمونه‌ای که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود قابل مشاهده است (ستون ۶).

در استفاده از روش رسوب ایمنی با بافر غیر احیایی باندهای مشخص ترو



نمودن و همچنین جدا سازی آنتی ژن های توموری ویروسی یا غیر ویروسی دیگر، در صورت توجه به شرایط بهبود دهنده، از کار آیی مناسبی برخوردار است. با این وجود بررسی های بیشتری باید صورت گیرد تا ارتباط و نقش این آنتی ژن ها با بد خیمی یا روند بیماری مشخص شود.

## References

1. Abbas, A.K., Lichtman, A. H. (2003) Cellular and Molecular Immunology, Saunders. Philadelphia, USA.p.379-400.
2. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (2002) Short protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. p.10115-10120.
3. Bicka, L., Kuzmak, J., Kozaczynska, B., Plucienniczak, A. and Skorupska, A. (2001) Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. Acta. Biochim. Pol. 48:227-232.
4. Blood, D.C., Radostits, O.M. (2000) Veterinary Medicine. Bailliers Tindal. London, UK, p. 1046-1058.
5. Bunger, I., Khalaf, H., Rimpler, M. (1996) Examination of antigen preparations from the virus of enzootic bovine leukosis with regard to suitability for immunoblotting. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 103:516-519.
6. Burkhardt, H., Ristau, E., Rosenthal, S., Muller, M. (1989) BLV-p24 expression in BLV infected cattle and detection of BLV-p24 receptors in cattle afflicted with tumorous leucosis in vivo. Acta Virol. 33:410-416.
7. Burny, A.F., Cleuter, Y.F., Kettmann, R.F. (1988) Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. Vet. Microbiol. 17:197-218.
8. Boris-Lawrie, K., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L. and Temin, H.M. (1997) In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. J. Virol. 71: 1514-20.
9. Choi, K.Y., Liu, R.B., Buehring, G.C. (2002) Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay,

مجموعه اجزای یاخته ای و بافتی عقده لمفاوی بودند. بررسی بر روی کل بافت احتمال از دست دادن آنتی ژن های آزاد شده از سلول ها را کمتر می نماید. در این تحقیق به دلیل امکان وجود خاصیت پرتئولیتیک پروتئین ها از بافر های حاوی EDTA و زنجیره سرما در طی مراحل فرآوری استفاده شد.

پروتئینی که با وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتن در تمام نمونه های مورد آزمایش اعم از سالم و بیمار مشاهده گردید و پروتئین ۳۰ کیلو دالتنی که فقط در نمونه سونیکه دیده نشد احتمالاً باند های آنتی ژنیکی از گروه آنتی ژن های همراه تومور هستند (TAA)، که با تراکم بیشتری در نمونه های توموری دیده می شوند. این آنتی ژن ها به علت ترانسفورماسیون یاخته سالم و بروز بیش از اندازه باعث تولید آنتی بادی می شوند. سرم گاو مبتلا به لنفوسارکوم در این مطالعه، آنتی ژن های مذکور را در عقده لمفاوی توموری همان گاو مشخص نموده است. آنتی ژن های دیگری که در این مطالعه به آنها اشاره گردید ممکن است متعلق به گروهی از آنتی ژن های توموری باشند که در اصطلاح به نام آنتی ژن های جدید خوانده می شوند و در اثر ترانسفورماسیون در سلول توموری آلوده به ویروس ایجاد می گردند و یا پروتئین های پیش ساز یا کامل ویروس باشند که خاصیت تحریک سیستم ایمنی را دارند (۱۱،۱۷).

همانگونه که در قسمت های قبلی اشاره شد، روش رسوب ایمنی دارای توانایی مناسبی در جدا سازی آنتی ژن ها است ولی عوامل مختلفی از جمله چگونگی استخراج پروتئین در نتایج آزمایش موثر است. از سوی دیگر استاندارد سازی آنتی ژن یا تعیین محدوده ای که بیشترین میزان مجموعه آنتی ژن - آنتی بادی در آن ایجاد شود از نظر تکنیکی حائز اهمیت است. این موضوع در دفعات مختلف مورد آزمایش قرار گرفت و اثرات آن بر روی رسوب ایمنی مشخص گردید. استفاده از باکتری کامل که پذیرنده های آنتی بادی ها را دارد، در بدست آوردن نتایج بهتر در رسوب ایمنی موثر خواهد بود. نوع بافر مورد استفاده در تعداد و اوزان مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز نیز تاثیر گذار است. اوزان مولکولی باندها به دلیل استفاده از بافر غیر احیایی با اوزان مولکولی بدست آمده با بافر احیایی متفاوت بوده است.

باندهای بدست آمده در روش استخراج فنل و استفاده از بافر غیر احیایی (۶۲ و ۵۷ کیلو دالتون) از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ساختار آنتی ژنی در آن ها کمتر تحت تاثیر فرآوری بوده و به ساختار اصلی پروتئین نزدیک تر می باشند. این پروتئین ها که در تحقیق حاضر ویژگی های آنتی ژنیک را به ویژه در اتصال با آنتی بادی های خودی در رسوب ایمنی نشان می دهند می توانند مبنایی برای تحقیق های گسترده بعدی (تعیین توالی اسید آمینه ها، ایمنی زایی و تشخیص) قرار گیرند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق بافر های دناتور کننده احیایی به علت توانایی بیشتر در جدا سازی پلی پپتیدها در هنگام الکتروفورز جهت جدا سازی پروتئین های آنتی ژنیک توصیه می گردند.

در مجموع چنین به نظر می رسد که آزمون رسوب ایمنی برای مشخص



- and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J. Virol. Methods.* 104: 33-39.
10. Dequiedt, F., Cantor, G.H., Hamilton, V.T. (1999) Bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B lymphocytes. *J. Virol.* 73: 1127-37.
11. Deshayes, L.D., Levy, A., Parodi, L., Levy, J.P. (1977) Proteins of bovine leukemia virus. I. Characterization and reactions with natural antibodies. *J. Virol.* 21: 1056-1060.
12. Domenech, A., Goyache, J., Llames, L., Jesus, P.M., Suarez, G. and Gomez-Lucia, E. (2000) In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J. Gen. Virol.* 81:109-18.
13. Hey, C.F., Westwood, O. (2002) *Practical Immunology.* Blackwell publishing company. UK.
14. Murphy, A., Gibbs, J., Horzinek, C., Studdert, J. (1999) *Veterinary virology.* 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press. USA. p.26-50, 363-383.
15. Nikbakht Brujeni, Gh., Hemmatzadeh, F., Mabbubi, B. (2006) Study on Tumor Antigens of BLV Infected lymph nodes in Comparison with FLK-BLV cell culture. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 61,1:51-55.
16. Rola, M., Kuzmak, J. (2002) The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Methods.* 99:33-40.
17. Tadjbakhsh, H. (1995) *Essential Immunology* 6<sup>th</sup> Ed., University of Tehran Press, Tehran, Iran. p.325-342.
18. Tajima, S., Aida, Y. (2002) Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. *J. Virol.* 76:2557-2562.
19. Tajima, S., Ikawa, Y. and Aida, Y. (1998) Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J. Virol.* 72:7569-7576.
20. Trono, K.G., Perez-Filgueira, D.M., Duffy, S., Borca, M.V. and Carrillo, C. (2001) Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 26:235-248.
21. Van der Maaten, M.J., Miller, J. M. (1980) Use of a continuous feline cell line for virologic and serologic investigations of bovine leukemia virus infections. *Am. J. Vet. Res.* 41:1785-1788.
22. Vojgani, M. (2001) *Immunology.* Jahad Daneshgahi Publication. Iran, Tehran. p.517-542.



# DETECTION OF TUMOR ANTIGENS IN BOVINE VIRAL LYMPHOSARCOMA BY IMMUNOPRECIPITATION METHOD

Nikbakht Brujeni, G.H.R. \*, Emam, M., Barjesteh, N.

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

(Received 27 April 2005 , Accepted 27 October 2006)

---

## Abstract:

In this study One lymph node from cow with viral lymphosarcoma and one lymph node from healthy cow were analyzed by three different methods for protein extraction, include simple homogenizing in PBS, sonication and phenol extraction. Tumor antigen detection relies on immunoprecipitation followed by SDS-PAGE. In this experiment *Streptococcus pyogenes* was used for purification of immune complexes. Electrophoretic patterns were obtained using reduced and non reduced buffers. In PBS homogenization 3 distinct antigens (39, 32 and 30 kDa) were observed. When sonication or phenol extraction were used, 5 (72, 48, 42, 32 and 30 kDa) and 6 (104, 77, 54, 32, 30 and 26, 5 kDa) distinct antigens were observed, respectively. This study showed that the ability of antigen detection mainly depends on protein extraction procedure and antigen-antibody equilibrium achieved by quantification of precipitins. Immunoprecipitation could be used successfully for study of tumor antigens in bovine leukosis.

**Key words:** tumor antigens, lymphosarcoma, immunoprecipitation, bovine leukosis.

\*Corresponding author's email: [nikbakht@ut.ac.ir](mailto:nikbakht@ut.ac.ir), Tel: 021-61117057, Fax: 021-66933222

