شناسایی و تخلیص شاخصهای آنتی ژنی هلیکو باکتر پیلوری

*دکتر مهرانگیز خواجه کرم الدینی، **مهرداد غلامزاد، ***دکتراحمدزاده هاشمی ،دکتر عباس فومنی،
دکترمحمدباقر ابراهیمی پور
*گروه میکروبشناسی ،دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**گروه تکنولوژی علوم آزمایشگاهی ،دانشکده پیراپزشکی و بهداشت،دانشگاه علوم پزشکی مشهد
***بیمارستان ۱۷ شهریور، مشهد

خلاصه

هلیکوباکتر پیلوری یك عامل مهم در ایجاد عفونت مزمن مخاط معده، گاستریت مزمن، زخمهای پپتیك و سرطان معده در انسان است. این میکروارگانیسم گرم منفی به شکل S و میکروائروفیل بوده دارای آنزیم اوره آز قوی می باشد. پس از ورود به معده به سطوح اپی‌تلیوم مخاط معده چسبیده وکلونیزه می‌شود و به دنبال آن آسیبهای فیزیولوژیك و سیتولوژیك عارض می گردد. روشهای مختلفی برای شناسایی این باکتری وجود دارد از جمله کشت باکتری ، اوره آز تنفسی و روشهای سرولوژیك. روشهای سرولوژیك به واسطه سهولت در انجام آن و سرعت در پاسخدهی از اهمیت ویژه ای برخوردار است .

در این تحقیق سعی شد تا با جداسازی باکتری از بیوپسی افراد آلوده آنتی ژنهای اختصاصی این باکتری شناسایی و تخلیص شود. به این منظور پس از کشت باکتری، سوسپانسیون کلنی های خالص آن تهیه و به کمك امواج اولتراسونیك دیواره باکتری لیز شد. پس از تعیین الگوی الکتروفورزی پروتئینهای آن به روش SDS-PAGE ، با تکنیك کروماتوگرافی پروتئینهای موجود در سوسپانسیون باکتری لیز شده بر اساس وزن مولکولی از یکدیگر تفکیك و در نتیجه ۱۱ فراکشن به دست آمد. پس از تعیین وزن مولکولی این فراکشنها به کمك روش SDS-PAGE واکنش آنها با سرم افراد کشت مثبت به روش DOT-Blotting بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تمام فراکشنهای به دست آمده از باکتری با آنتی بادیهای موجود در نمونه سرم افراد کشت مثبت و همچنین سرم افراد کشت منفی واکنش می‌دهد وتنها شدت پاسخ در این دو گروه متفاوت است. همچنین مقایسه الگوی پاسخ فراکشنها در این دو گروه نشان داد که دو فراکشن پاسخ متمایزی نسبت به سایر فراکشنها ایجاد می نماید. یکی از این فراکشنها حاوی پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۲۸/۱ و دیگری کمتر از ۱۴ کیلو دالتون بود. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد استفاده از این دو فراکشن در تهیه کیتهای ELISA بتواند تا حدود زیادی مشکل جوابهای غیر اختصاصی حاصل از کیتهای موجود را که در آن از تمامی پروتئینهای باکتری جهت تشخیص آنتی بادی ضد آن استفاده می شود، مرتفع نماید.

کلمات کلیدی:هلیکوباکتر پیلوری، آنتی ژن، روشهای سرولوژیك، Dot-Blotting .

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری را اولین بار در سال ۱۸۹۳ دانشمندی به نام Bizzozero از بدن سگها جداسازی و معرفی نمود و در سال ۱۹۰۶ دانشمند دیگری به نام Krientz باکتری مشابهی را در بدن انسان نشان داد(۱۸). سپس به مدت ۳۰ سال وجود ویبریون‌های گرم منفی و میکروآئروفیل در معده مبتلایان به اولسر پپتیك از قسمت‌های مختلف جهان به طور پراکنده گزارش گردید(۱۹).

ساختمان دیواره سلولی هلیکوباکترپیلوری دارای نقشه عمومی باکتریهای گرم منفی است. اسیدهای چرب موجود در آن مشخص و با طرح کامپیلوباکتر متفاوت است. خصوصیات

Archive of SID
www.SID.ir

دیواره سلولی توسط اسیدهای چرب با زنجیره طولانی به وجود می‌آید که شامل تترادکانوئیك و ۱۹ سیکلوپروپان می‌باشد. اسیدهای چرب با مقادیر کمتر شامل هگزادکانوئیك، اُکتا دکانوئیك، لینولئیك، اُکتادکنوئیك بوده و فسفولیپیدهای با سرقطبی شامل ۷۹٪ فسفاتیدیل اتانل آمین، ۱۶٪ لیزوفسفاتیدیل اتانل آمین و ۲٪ فسفاتیدیل کولین می‌باشد (۱۹، ۲۱).

اسیدهای فسفولیپید شامل ۵۳٪ اسید فسفوتیدیك و۴۷٪ فسفاتیدیل سرین است (۱۹، ۲۱). هلیکوباکترپیلوری درون خود ترموپلاسماکونیون مشابه گونه‌های کامپیلوباکتر ندارد. غشای خارجی چهار پروتئین با وزن‌های مولکولی ۴۸ تا ۶۷ کیلو دالتون دارد که موجب ایجاد منافذی در سطح باکتری می‌شوند. در الکتروفورز نقشه دیواره سلولی و پروتئین غشاء خارجی متفاوت از Campilobacter Fetus و Campylobacter jejuni است (۱۹).

هر چند تفاوت‌های قابل تشخیص دیگری بین گونه‌های هلیکوباکتر وجود دارد. در بین این سه گونه باندهای پروتئینی مشترك وجود دارد که این پروتئینها در فلاژل می‌باشند. این پروتئین‌ها با وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون با آنتی سرم به دست آمده علیه فلاژل C. jejuni واکنش می‌دهند(۵، ۱۹). چندین قطعه ویژه پروتئین غشاء خارجی شامل یك قطعه ۱۹ کیلو دالتون و یك قطعه ۲۶ کیلو دالتون و یك قطعه از غلاف ژل با وزن ۲۹ کیلو دالتون وجود دارد (۱۹،۵). آنزیم فومارات ردوکتاز با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون به عنوان پروتئین ایمونوژن معرفی شده است (۳).

لیپوپلی ساکارید H. pylori یك ساختمان غیر معمول با اسیدهای چرب دارد. این اسیدهای چرب شامل لیپید A هیدروفوب و ۳-هیدروکسی اکتادکانوئیك اسید می‌باشند. این اسید چرب در بروسلا وفرانسیزلا و اکتینوباکتر مشاهده شده است. لیپید A موجود در LPS نسبت به LPS دیگر باکتریهای روده‌ای فعالیت بیولوژیکی پایین‌تری دارد. بعضی از انواع H. pylori دارای LPS با زنجیره جانبی نردبانی شکل مشابه انتروباکتریاسه‌های با LPS صاف بوده ولی گونه‌های C. jeiuni تیپ مشابه باکتریهای با LPS خشن دارند. به طور کلی پس از کشت در محیط جامد LPS تغییر می‌نماید و لیکن در محیط کشت مایع این تغییر قابل برگشت است (۱۹،۸).

آنتی ژنهای هسته LPS عمومی‌تر بوده ولی آنتی ژنهای زنجیره جانبی ویژه نوع می‌باشند. توزیع آنتی ژن LPS در گونه‌ها متفاوت از آنتی ژنهای پروتئینی است. اختلافات آنتی ژنیك LPS گونه‌های مختلف به وسیله آزمون ایمنوبلاتینگ شناسایی می‌شود. در بدن، H. pylori باعث تولید آنتی بادیهایی می شود که با موکوس معده انسان واکنشی متقاطع می‌دهند (۴). روشهای مختلفی مانند تست اوره آز تنفسی،کشت بیوپسی به دست آمده از معده فرد و همچنین روشهای سرولوژیك جهت تشخیص آلودگی افراد با این باکتری وجود دارد. تستهای سرولوژیك به واسطه سهولت در انجام آزمایش و همچنین زمان کوتاه پاسخدهی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. پایه آزمایشات سرولوژیك ردیابی آنتی بادیهای ضد باکتری در سرم افراد آلوده می باشد.

آنتی بادی سیستمیك علیه H. pylori غالباً از نوع IgG است که در بیماران مبتلا به زخم اثنی‌عشر IgG_2 بیشتری در مقایسه با بیماران گاستریت فعال مزمن بدون زخم اثنی‌عشر وجود دارد. در سطح مخاط، پاسخ ایمنی از نوع IgA کمتر اتفاق می‌افتد ولی در صورت مشاهده شدت التهاب را نشان می‌دهد. IgM به ندرت در سرم این بیماران یافت می‌شود و به نظر می‌رسد که از اهمیت کمتری برخوردار باشد(۱۴).

آنتی ژن اوره‌آز،تاژك و پروتئین‌های H. pylori مهمترین قسمت‌های ایمونوژن آن می‌باشند(۲۰). آنتی بادیهای ویژه این باکتری توسط روشهای زیر شناسایی می‌شوند(۲۳،۲۴،۶):

Agglutination – ELISA – Complement Fixation – Immunoblot – EIA – IF – Pyloriset – Malakit test – GAP IgG –Passive hemagglutination

هدف از این تحقیق شناسایی آنتی ژنهای اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری جهت استفاده در طراحی تستهای سرولوژیك برای شناسایی این باکتری می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

روش کار

جمع‌آوری باکتری: نمونه‌های بیوپسی معده طبق دستورالعمل(۱) جهت انجام کشت و رنگ آمیزی توسط محیط انتقالی استوارت به آزمایشگاه ارسال و بلافاصله در دمای ۴° C نگهداری شد. همراه هر نمونه بیوپسی یك نمونه خون ارسال شد که سرم آن جدا شده و در فریزر نگهداری شد. برای آماده سازی نمونه مورد آزمایش، از بیوپسی بافت معده توسط تیغ بیستوری استریل یك سوسپانسیون هموژن در سرم سالین تهیه شد. مقداری از بافت هموژن جهت آزمون اوره‌آز در یك میلی لیتر محیط استریل اوره قرار گرفت و در گرمخانه ۳۷ °C جهت مشاهده تغییر رنگ از زرد به ارغوانی نگهداری شد. تغییر رنگ طی ۳۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت بررسی شد. از سوسپانسیون هموژن بر روی لام استریل گسترش تهیه و پس از ثابت کردن به وسیله حرارت به روش گرم رنگ آمیزی شد. در شرایط استریل مقداری از سوسپانسیون بافت هموژن بروی محیط کشت کلمبیا آگار و BHI (Brain-Heart Infusion Media) حاوی ۵٪ خون تازه گوسفند یا انسان، سرم جنین گاو، سیستین، تری متوپریم، آمفوتریسین B، سیکلو دکسترین، وانکومایسین، پلی میکسین B کشت شد. انکوباسیون در شرایط میکروآئروفیلیك و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۷ روز انجام شد(۱).

پس از گذشت این مدت و مشاهده کلنی‌ها تست های تاییدی روی آنها انجام شد. این تستها شامل تست کاتالاز ، تست اکسیداز، تست اوره آز و همچنین بررسی لام رنگ آمیزی شده بود (۲۷).

تهیه سوسپانسیون باکتری : کلنی‌های خالص H. pylori پس از انجام تست‌های تاییدی شناسایی و در بافر PBS استریل سوسپانسیون گردید. سوسپانسیون حاصل در طی ۴ مرحله و هر بار به مدت ۱۵ ثانیه با فواصل ۳۰ ثانیه با امواج اولترا سونیك سونیکیت شد.

شناسایی و تفکیک پروتئینهای باکتری: برای شناسایی پروتئینهای موجود از نظر وزن مولکولی و خلوص، الکتروفورز روی ژل آکریل آمید ۱۲/۵٪ با سیستم ناپیوسته تحت شرایط دناتوره کننده(SDS-PAGE) انجام شد و جهت مشاهده باندها از روش نیترات نقره و کوماسی برلیانت بلو جهت رنگ آمیزی استفاده شد(۱۲).

جهت تفکیك پروتئینهای موجود در سوسپانسیون حاصل، از ستون کروماتوگرافی حاوی ژل سفارز 4B به طول ۱۴۵ cm و قطر ۱/۶ cm با حجم ستون ۲۹۱/۵ میلی‌لیتر استفاده شد. سوسپانسیون سونیکیت شده باکتری به حجم۳ میلی‌لیتر به ستون تلقیح شد. سرعت عبور حلال (بافرPBS) ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم فراکشنهای جمع آوری شده ۳ میلی لیتر بود. پس از جمع آوری فراکشنها جذب آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

پس از تغلیظ فراکشنها برای ردیابی و شناسایی دقیق نمونه‌ها از روش الکتروفورز SDS-PAGE و جهت رویت باندها از رنگ آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد. پس از محاسبه میزان حرکت پروتئینهای موجود در استاندارد وزن مولکولی، نمودار عددRF در برابر لگاریتم وزن مولکولی برای این مارکرهای وزن مولکولی رسم و پس از محاسبه RF پروتئینهای موجود در فراکشنهای به دست آمده و به کمك نمودار رسم شده، وزن مولکولی پروتئینهای خالص شده به دست آمد (منحنی۲).

بررسی واکنش پروتئینهای به دست آمده با آنتی بادی موجود در نمونه سرم افراد کشت مثبت: جهت بررسی واکنش آنتی بادیهای موجود در نمونه سرم افرادی که کشت آنها مثبت شده بود با پروتئینهای به دست آمده در هر فراکشن از روش دات بلاتینگ استفاده شد. برای این کار آنتی ژن روی کاغذ نیترو سلولز نمونه گذاری شد و نقاط خالی کاغذ با آلبومین گاوی(BSA) اشباع شد. سپس مخلوط سرمی (serum pool) افراد کشت مثبت با آن مجاورشد. درمرحله بعد آنتی IgG متصل به آنزیم HRP (Horse Radish Peroxidase) اضافه و پس از انکوباسیون مناسب و شستشو، واکنش‌گر رنگ زا افزوده شد. در دو مقطع این آزمایش انجام گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

یکبار با استفاده از باکتری کامل و نمونه شاهد منفی و یکبار دیگر پس از کروماتوگرافی که ۱۱ نمونه به دست آمده از ستون کروماتوگرافی و باکتری کامل در مجاورت کنترل منفی و کنترل مثبت انجام شد. نیترو سلولز به دقت در اندازه مناسب به وسیله قیچی و بدون تماس پوست دست بریده شد. از هر نمونه به کمك میکروسرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتر برداشته و قطرات به تدریج پس از خشك شدن قطره قبلی بر روی آن اضافه گردید. پس از نمونه گذاری، کاغذ در محلول BSA ۱٪ شناور شده و به مدت ۴۵ دقیقه به آرامی‌تکان داده شد. سپس کاغذ در سرم بیماران مبتلا به عفونت H. pylori شناور شد.

بنابراین آنتی بادی‌های موجود در سرم به آنتی ژنهای ایمونوژن مستقر روی کاغذ می‌چسبند. این مرحله ۹۰ دقیقه همراه تکان بود. سپس کاغذ سه بار با PBS حاوی توین هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شد.

آنتی IgG از حیوان بز متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) به کاغذ افزوده و ۶۰ دقیقه به آرامی‌تکان داده شد. سپس سه بار با PBS حاوی توین هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شد. واکنش‌گر رنگ زا به عنوان سوبسترای این آنزیم عمل کرده و به طریقه زیر آماده گردید: ۰/۱ میلی‌لیتر ۴ کلرو ۱ آلفانفتول به ۱۰ میلی‌لیتر بافرتریس ۰/۰۵ مولار با pH =۷/۶ افزوده پس از صاف کردن با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ بـه آن ml ۰/۰۱ آب اکسیژنه ۳۰٪ اضافه شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی جهت توقف واکنش به آن آب مقطر اضافه شد.

نتایج

تهیه سوسپانسیون باکتری و سونیکیت کردن آن

برای جمع‌آوری باکتری از سطح پلیت می‌توان از محلول NP4o یا از محلول PBS استفاده کرد. در صورت مصرف NP4o عمل لیز باکتری تواماً انجام می‌گیرد. در این تحقیق جمع‌آوری با PBS و لیز کردن به روش سونیکیت انتخاب شد که تحت تاثیر آن بدنه حساس و ضعیف باکتری شکسته و لیز شد. سه نکته در اینجا مهم است: شدت امواج، زمان موج، تعداد تکرار موجها.

مطابق آنچه در مقالات آمده (۷، ۱۶،۹) و تجربه حاصل از مطالعات مشابه الگوی زیر به عنوان بهترین روش انتخاب شد. شدت هر موج Multitoud۵۰، زمان هر موج ۱۵ ثانیه که برای ۴ بار تکرار شد. اگر فاکتورهای فوق افزایش یابند درجه حرارت در محیط بالا می‌رود که باعث دناتوره شدن پروتئین‌های موجود می‌گردد. الکتروفورز سوسپانسیون حاصل نشان دهنده شکستن پروتئینهای بزرگ سازنده باکتری بود(شکل۲).

نتایج ژل فیلتراسیون

از آنجا که پیش بینی می‌شد باکتری سونیکیت شده دارای فراکشن‌های زیادی باشد، سعی شد تا حد ممکن ارتفاع ستون بلندتر انتخاب شود، از طرفی قطر آن نیز مسئله مهمی‌بود چون قطر بیشتر ستون امکان نمونه گذاری بیشتر را فراهم می‌آورد. سرعت جمع‌آوری فراکشن‌ها به حداقل ممکن تقلیل داده شد تا جداسازی باندها از یکدیگر بهتر صورت گیرد. در نهایت پس از جمع‌آوری ۱۱۵ فراکشن از ستون، غلظت پروتئین نمونه ها به روش جذب نوری در ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد.

پس از رسم نمودار حدود ۱۱ پیك افزایش جذب در ۲۸۰ نانومتر را نشان داد که در بعضی موارد پیکها نزدیك هم بودند. سعی شد تا حد امکان قلـــه پـیکها بـرای کارهای بعدی انتخاب شود تا حداقل آلودگی با پروتئین‌های مجاور را داشته باشند(نمودار۱). ۱۱ نمونه جمع‌آوری شده از قله پیکها جهت کارهای بعدی انتخاب و جدا شدند.

رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره

علیرغم اینکه فراکشن‌های به دست آمده از ستون کروماتوگرافی تا حد زیادی تغلیظ شد (حدود ۱۰۰٪) اما در نمونه‌های اولیه SDS-PAGE که ژل به کمك کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی شد باند مشخصی برای فراکشنها به دست نیامد. از این رو در ادامه کار از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد (شکل۳). این روش رنگ آمیزی حساسیت بسیار بالاتری نسبت به کوماسی بلو داشته به حدی که حضور ng ۱ پروتئین در باند را مشخص می‌نماید(۱۲).

Archive of SID

www.SID.ir

حساسیت بسیار بالای این روش رنگ آمیزی علاوه بر مزایای مورد نیاز معایبی دارد از جمله اینکه باید در مقدار نمونه‌گذاری دقت بسیار شود چرا که تفاوت در مقادیر پروتئین‌های موجود در هر فراکشن باعث خواهد شد بافر حاوی پروتئین بیشتر ژل را کاملاً سیاه نموده در حالی که فراکشن دیگر لکه مشخصی ایجاد ننموده است. از این رو برای به دست آوردن رنگ آمیزی مناسب باید مقادیر پروتئین‌ها به دقت کنترل شود. حساسیت بالای این روش باعث می‌شود تا تماس کوچك پوست بدن انسان یا حتی ترشحات فرد آزمایش کننده (مانند بزاق و عرق بدن) موجب ایجاد لکه‌ای واضح بر روی ژل شود و نتیجه آزمایش را مخدوش نماید. از طرفی حضور مقادیر بسیار جزیی ناخالصی در پروتئین جدا شده باعث تشکیل باندهای بی‌شمار می‌گردد لذا رسیدن به یك تك باند از پروتئین خالص به کمك روش نیترات نقره کاری دشوار است و در صورت حصول این نتیجه نشان دهنده جداسازی خوب و خلوص بالای پروتئین جدا شده می‌باشد.

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های جدا شده به روش SDS-PAGE

در طی مراحل مختلف برای بررسی خلوص و شناسایی پروتئین‌های جدا شده و همچنین تعیین وزن مولکولی آنها از روش الکتروفورز عمودی روی ژل آکریل آمید با درصدهای مختلف تحت شرایط دناتوره کننده استفاده شد. برای تعیین وزن مولکولی باندهای حاصل از استاندارد وزن مولکولی با دامنه گسترده استفاده شد. این استاندارد وزن مولکولی شامل ۱۳ پروتئین با وزنهای مولکولی ۶/۵، ۱۴/۲، ۲۰، ۲۴، ۲۹، ۳۶، ۴۵، ۵۵، ۶۶، ۸۴، ۹۷، ۱۱۶، ۲۰۵ کیلو دالتون می‌باشد. SDS- PAGE با ژل ۱۲/۵٪ انجام و RF پروتئین‌های استاندارد وزن مولکولی از رابطه زیر محاسبه شد:

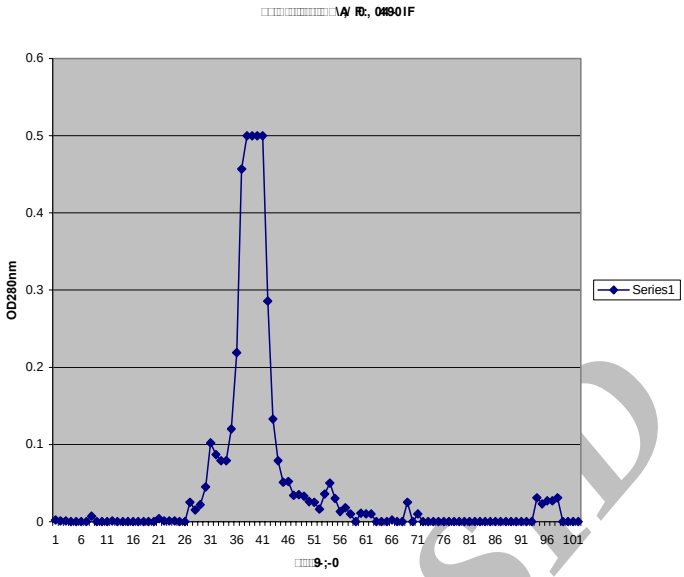
$$RF = \frac{\text{مسافت طی شده توسط پروتئین}}{\text{مسافت طی شده توسط رنگ}}$$

در هر درصد از ژل آکریل آمید، لگاریتم وزن مولکولی در گستره خاصی با RF ارتباط خطی دارد. بنابراین منحنی استاندارد لگاریتم وزن مولکولی در برابر RF برای ژل ۱۲/۵٪ در گستره خطی رسم و با استفاده از آن وزن مولکولی باندهای مربوط به هر فراکشن پروتئینی محاسبه شد. جدول۱ RF پروتئین‌های استاندارد را در ژل ۱۲/۵٪ نشان می‌دهد. پس از رسم نمودار RF در برابر log MW با محاسبه RF باندهای موجود در فراکشن و به کمك نمودار رسم شده وزن مولکولی آنها به دست آمد (جدول ۲).

لازم به توضیح است که در SDS- PAGE همیشه باندهای واضح مشاهده نمی‌شود. این امر به دو دلیل می‌تواند باشد: اول اینکه گلیکوپروتئینها به واسطه قند موجود در ساختمانشان رفتار متفاوتی را در این روش نشان می‌دهد. از طرفی درصد ژل نیز برای تشکیل باند واضح نقشی اساسی دارد. پروتئین‌های با وزن مولکولی کمتر در ژلهای با درصد بالاتر ایجاد باند واضح می‌نمایند. وقتی برای همین نمونه درصد ژل کاهش می‌یابد، آن باند محو شده و به واسطه پخش شدن گاهی قابل مشاهده نمی‌باشد. نکته مهم دیگر وجود چند باند با وزن مولکولی متفاوت در یك فراکشن است. باتوجه به مطالب تئوری ذکر شده قابل پیش بینی است که در روش ژل فیلتراسیون پروتئین‌های با وزن مولکولی مشابه، با هم حرکت کنند. چون تفاوت در وزن مولکولی آنها باعث جداسازی و اختلاف سرعت در نتیجه دو بانده شدن می‌گردند. بنابراین وجود دو باند با وزن مولکولی متفاوت در یك فراکشن گمراه کننده به نظر می‌رسد. واقعیت این است که چند باند در یك فراکشن ممکن است مربوط به یك پروتئین بوده که تحت شرایط دناتوران زنجیره‌های آن از یکدیگر جدا شده است. باید به خاطر داشت که SDS - PAGE الکتروفورز تحت شرایط دناتوران می‌باشد ولی روش کروماتوگرافی بر روی ساختمان فضایی مولکول نقشی ندارد. از این رو پروتئین جدا شده از ستون کروماتوگرافی ممکن است در روش SDS- PAGE به زنجیره‌های پروتئینی تشکیل دهنده آن تجزیه شود و ایجاد چند باند مشخص نماید کما اینکه احتمال آلودگی فراکشن پروتئینی را نیز باید درنظر داشت.

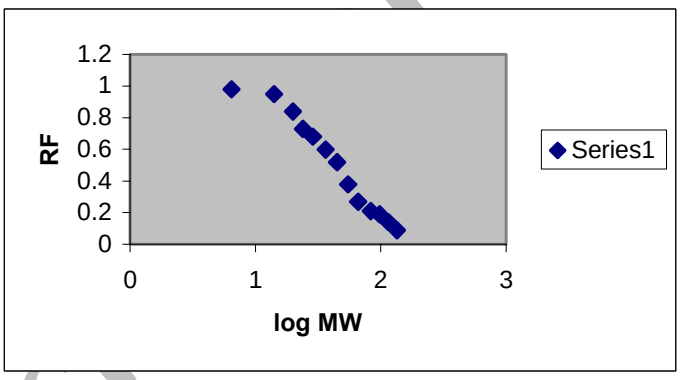
Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: منحنی جذب نوری فراکشن های به دست آمده از ستون در طول موج ۲۸۰nm.

مشخصات ستون : ژل سفارز 4 B طول ستون ۱۴۵ cm ، حجم ستون ۲۹۱/۵ ml ، سرعت عبور نمونه ۰/۱۲۵ میلی لیتر در دقیقه.



منحنی ۲: منحنی لگاریتم وزن مولکولی پروتئین های استاندارد در مقابل RF در ژل ۱۲/۵ درصد.

جدول ۱ : لگاریتم وزن مولکولی هر پروتئین استاندارد و RF مربوط به آن در ژل ۱۲/۵ درصد.

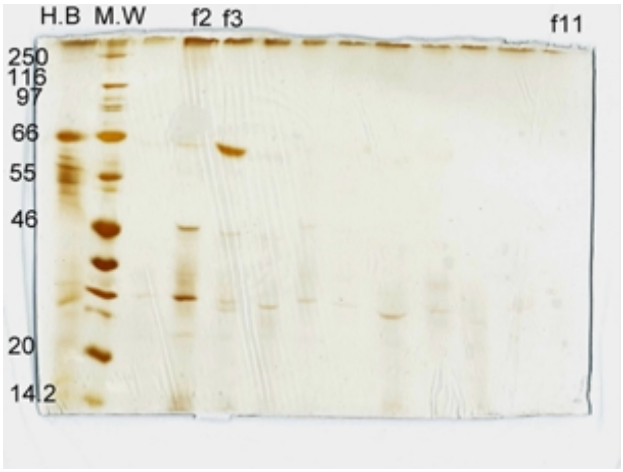
وزن مولکولی	۲۰۵	۱۱۶	۹۷	۸۴	۶۶	۵۵	۴۵	۳۶	۲۹	۲۴	۲۰	۱۴/۲	۶/۵
لگاریتم وزن مولکولی	۲/۱۳	۲/۰۶	۱/۹۹	۱/۲۹	۱/۸۲	۱/۷۴	۱/۶۵	۱/۵۶	۱/۴۶	۱/۳۸	۱/۳۰	۱/۱۵	۱/۸۱
RF در ژل ٪۱۲/۵	۰/۰۹	۰/۱۴	۰/۱۹	۰/۲۱	۰/۲۷	۰/۳۸	۰/۵۲	۰/۶۰	۰/۶۸	۰/۷۳	۰/۸۴	۰/۹۵	۰/۹۸

جدول ۲: وزن مولکولی فراکشنهای بدست آمده از ستون کروماتوگرافی.

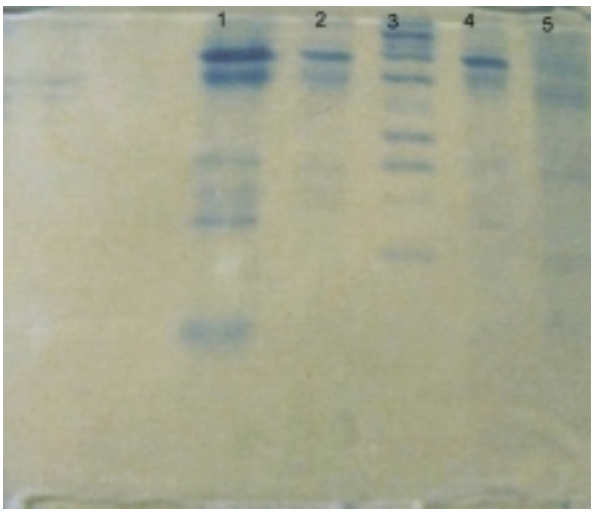
فراکشن های حاصل از ژل فیلتراسیون	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
وزن مولکولی (کیلودالتون)	–	۴۰/۷ ۲۴	۶۵/۴ ۲۳/۴	۲۸/۱	۲۴/۵	۲۱/۴	۱۹/۹	۱۹/۶	–	–	–

www.SID.ir

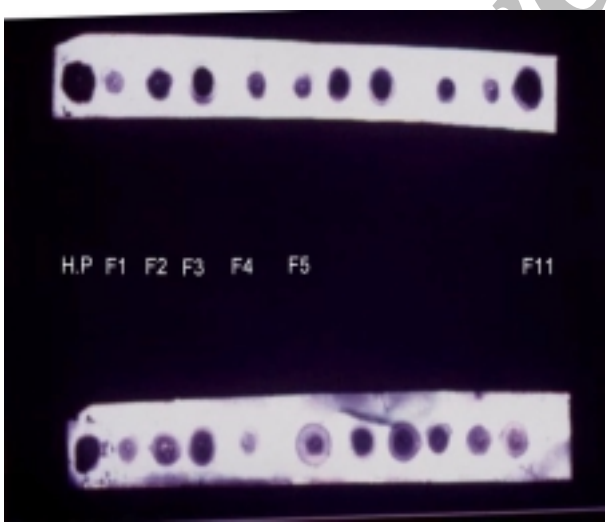
تصویر ۱: کلنی هـــای H. pylori روی محیط کلمبیاخوندار- بیمـــارستان قائم (عج).



تصویر ۳-SDS-PAGE نمونه های به دست آمده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون در ژل ۱۲/۵٪ . H.B = باکتری کامل ، MW = استاندارد وزن مولکولی، f_1 تا f_{11} به ترتیب فراکشن های ۱ تا ۱۱ به دست آمده از ستون کروماتوگرافی



تصویر ۲ : SDS-PAGE روی ژل ۱۲/۵ درصد برای بررسی اثر روشهای مختلف تهیه سوسپانسیون باکتری برروی الگوی الکتروفورزی.
۱- سوسپانسیون باکتری کامل درPBS ، ۲- باکتری لیزشده باNP40
۳- استانداردوزن مولکولی، ۴- باکتری سونیکیت شده بازمانهای کوتاه، ۵- باکتری سونیکیت شده بازمانهای بلند



تصویر ۴: نتایج حاصل از دات بلاتینگ پروتئین های به دست آمده با سرم کنترل های مثبت (بالا) و سرم کنترل های منفی (پایین). از نمونه شماره ۱۰ در این تست استفاده نشده است.

www.SID.ir

دات بلاتینگ

در ادامه کار جهت شناسایی پروتئینهای جدا شده از روش دات بلاتینگ استفاده شد. این روش امکان واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی و ردیابی آن را با حساسیت بالایی فراهم می‌آورد. ضمن اینکه سادگی روش کار و امکان برطرف نمودن تداخلات موجود این روش را به عنوان یك روش تحقیقاتی مهم مطرح می‌کند.

از فراکشن‌های به دست آمده با مقادیر یکسان بر روی کاغذ نیترو سلولز نمونه گذاری شد تا شدت پاسخهای به دست آمده با یکدیگر قابل مقایسه باشد. هدف از انجام این کار مشخص نمودن تفاوت پاسخ آنتی بادی به آنتی ژنهای به دست آمده بود تا بتوان بدین وسیله به آنتی ژنی دست یافت که در موارد کشت مثبت باکتری پاسخ آنتی بادی با ارزشی ایجاد نماید.

به این منظور از دو مخلوط سرمی(serum pool) مثبت و منفی استفاده گردید. در کنترل سرمی‌مثبت از نمونه افرادی که کشت باکتری آنها مثبت شده بود، استفاده گردید. در سرم کنترل منفی افرادی که کشت باکتری منفی داشتند، انتخاب شدند.پس از طی مراحل مختلف آزمایش مطابق روش ذکر شده در روش کار، نتایج حاصله نشان دهنده تفاوت جزیی پاسخ ایجاد شده در هر دو نمونه سرم بود(شکل ۴).

برای حصول اطمینان از نتایج به دست آمده آزمایش چند بار تکرار شده و هر بار همین نتایج به دست آمد. همانطور که درشکل۴ دیده می‌شود، تنها در فراکشن ۴ و ۱۱ شدت پاسخ ایجاد شده با فراکشن‌های دیگر تفاوت دارند.

اولین نتیجه این آزمایش بیان کننده مشکل موجود کیت‌های ELISA در تشخیص H. pylori می‌باشد. این کیت‌ها در افراد مثبت و منفی از نظر کشت پاسخهای مثبت مشابه می‌دهد از این رو در مواردی که از باکتری کامل جهت طراحی کیت استفاده می‌شود، این مشکل به نحو بارزی خود را نشان می‌دهد. از طرفی، نتیجه مهم دیگری که برای رسیدن به آن فرضیات این تحقیق طراحی شده بود این است که می‌توان از بعضی قسمت‌های باکتری جهت تشخیص سرولوژیك آن استفاده نمود. همانطور که در تصویر دات بلات (شکل۴) دیده می‌شود فراکشن ۴ و ۱۱ به واسطه تفاوت بارزی که در پاسخ دارند، می‌توانند کاندید مناسبی برای این منظور باشند.

احتمالاً در این فراکشن‌ها پروتئینی از باکتری وجود دارد که تنها در موارد حضور باکتری در بدن پاسخ آنتی بادی علیه آن ایجاد می‌شود و از این آنتی بادی‌ها می‌توان برای تشخیص عفونت حاد و مزمن از یکدیگر استفاده نمود. با مراجعه مجدد به تصویر SDS – PAGE به طور مقایسه‌ای می‌توان مشاهده نمود که این دو فراکشن از لحاظ مقدار پروتئینی نسبت به بعضی از باندهای دیگر بسیار کمتر می‌باشد ولی با این حال پاسخ ایجاد شده به طور واضحی قابل تمایز می‌باشد.

بحث

هلیکوباکترپیلوری عامل ایجاد کننده گاستریتهای نوعB بوده و ارتباط قوی بین عفونت با این باکتری و گاستریتهای نوع B ودئودنیت و زخمهای دئودنال وجود دارد(۱۶). بنابراین با تشخیص این باکتری در این نوع از عفونتها می توان به راحتی اقدام به درمان آن باکمك آنتی بیوتیکها نمود. از این رو روشهای مختلفی برای بررسی عفونت با این باکتری معرفی شده که از آن جمله به روش استفاده از اوره نشاندار (۲۷)،کشت بیوپسی به دست آمده از ناحیه آزرده در معده فرد مبتلا (۲۷)، کشت مدفوع افراد آلوده(۲۵)، روشهای سرولوژیك(۹) و استفاده از تکنیك PCR (۱۳) می توان اشاره کرد. در بین روشهای یاد شده روش استفاده از اوره آز تنفسی تکنیکی با حساسیت بالا می باشد (۲۷) و روش کشت بیوپسی نیز دارای اختصاصیت بسیار خوبی است. اما به علت اینکه در بسیاری از موارد عدم رشد باکتری موجود در بیوپسی تهیه شده از معده گزارش گردیده است، این روش نسبت به سایر روشها حساسیت کمتری دارد، چرا که شرایط انتقال بیوپسی و همچنین شرایط کشت می تواند بر روی رشد باکتری اثر بگذارد(۱۱). ولی نکته اساسی در روشهای اوره نشاندار و تهیه بیوپسی برای کشت و PCR این است که این روشها آزاررسان بوده و بعضا" تحمل شرایط آزمایش برای بیمار بسیار دشوار

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشد. از این رو روشهای سرولوژیك به عنوان روشی سریع و از لحاظ تکنیکی ساده مورد بررسی فراوان قرار گرفته است. زیرا عمده افرادی که با این باکتری آلوده می شوند پاسخ ایمنی نسبتا" قوی علیه آن ایجاد می‌نمایند. از این رو می‌توان از روشهای سرولوژیك برای تشخیص آلودگی با این باکتری استفاده کرد و همین مسئله باعث شده تا تحقیقات فراوانی در خصوص ردیابی حضور این باکتری در فرد آلوده با کمك نمونه سرم(۶، ۷، ۱۵) و حتی نمونه ادرار (۲) ترتیب داده شود. برای بالا بردن اختصاصیت روشهای سرولوژیك از آنتی ژنهای مختلفی از این باکتری جهت کاربرد در روشهای آزمایشگاهی استفاده شده که می توان به موارد ذیل اشاره نمود: whole cell(۲۳)،Crude bacterial extract(۲۶،۲۲،۱۷)، Outer membrane preparation(۲۰)، Partially purified antigens (۱۰،۲) و آنتی ژنهای تهیه شده با لیز سلولی باکتری به کمك Glass Bead (۲). در تحقیق حاضر نیز سعی شده تا با تخلیص آنتی ژنهای به دست آمده از این باکتری به کمك امواج اولتراسونیك، پاسخ آنها در برابر سرم افراد آلوده با باکتری H.pylori بررسی گردد.

ابتدا لازم بود تا از افراد مشکوك به آلودگی به این باکتری بیوپسی تهیه گردد، همزمان از این افراد مقداری نمونه خون جمع آوری شد تا سرم آن مورد ارزیابی سرولوژیك قرار گیرد. پس از کشت باکتری و جداسازی کلنی آن و اطمینان از حضور این باکتری در بیوپسی تهیه شده، سرم فرد به عنوان سرم مثبت در نظر گرفته شد و در مقابل آن از سرم افرادی که کشت بیوپسی رشد مشخصی از باکتری نشان نداده بود به عنوان سرم منفی استفاده شد. از آنجا که احتمال رشد نکردن باکتری موجود در بیوپسی داده می شد برای کاهش خطا و بالا بردن دقت مراحل کشت نمونه بیوپسی پس از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ یررسی و همچنین تست اوره آز نیز بر روی آن انجام شد.آزمایش دات بلاتینگ به کمك نمونه های سرمی مثبت و منفی برروی آنتی ژنهای باکتری کاملH. pylori نشان دهنده یکسان بودن پاسخ در هر دو گروه بود که خود مبیین این امر بود که استفاده از تمام آنتی ژنهای باکتری جهت ارزیابی سرولوژیك مناسب نمی باشد. پس از لیز باکتری به کمك امواج اولتراسونیك و جداسازی اجزای باکتری به کمك روش ژل فیلتراسیون تعداد ۱۱ فراکشن حاوی اجزای باکتری به دست آمد. پاسخ بیشتر این فراکشنها در برخورد با سرم مثبت و سرم منفی تقریبا" یکسان بود و فقط تا حدودی شدت پاسخ آنها متفاوت بود و در این میان دو فراکشن یکی با وزن مولکولی ۲۸/۱ و دیگری وزن کمتر از ۱۴ کیلو دالتون به طور بارزی در این دو آزمایش متفاوت بود. از آنجا که تفاوت افراد سرم مثبت با افراد سرم منفی در جداسازی باکتری از نمونه بیوپسی آنها بود احتمال می‌رود که شاخصهای آنتی ژنی فوق در زمان حضور باکتری به میزان زیاد یافت شده و در نتیجه باعث ایجاد آنتی بادی ضد آن در بدن می گردد. از طرفی پاسخ یکسان فراکشنهای به دست آمده شاید دلیلی بر واکنش متقاطع باشد. در مطالعه ای مشابه از اجزای آنتی ژنی با وزنهای۱۴ ،۳۰، ۶، ۵۸، ۸۴ و ۱۲۰ کیلودالتون در تست وسترن بلاتینگ برای ارزیابی سرم افراد کشت مثبت وکشت منفی استفاده شد(۲)که نتایج نشاندهنده پاسخ یکسان بعضی از آنتی ژنها اشاره شده در واکنش با سرم افراد کشت مثبت و کشت منفی بود. نکته مهمی که در این تحقیق مشاهده شد در خصوص باند حاوی آنتی ژن ۶۵/۳ بود. این آنتی ژن اگرچه در مراحل خالص سازی به مقدار زیادی حاصل می‌گردد ولی به عنوان یك آنتی ژن مناسب در تشخیص افراد کشت مثبت از کشت منفی کاربرد ندارد زیرا به طور بارزی در هر دو گروه پاسخ مشابه ای ایجاد می نماید. از این رو با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد استفاده از دو آنتی ژن موجود در فراکشن ۴و۱۱ در طراحی تستهای ELISA بتواند تا حدی اختصاصیت روشهای سرولوژیك را افزایش دهد .

منابع

۱. ساروی، میترا، انتخاب بهترین محیط کشت هلیکوباکتر پیلوری، دانشکده داروسازی،مشهد، پایان نامه برای دریافت درجه دکترای داروسازی، ۱۳۷۶ ، ۲۴-۲۲.

Archive of SID
www.SID.ir

2. Alemohamad M. M., Foleg J. T., Cohen H., 1993, Detection of immunoglobulin G to Helicobacter pylori in urine by an enzyme immunoassay method, J. Clin. Microbiol., 31(8):2174-2177.
3. Birkholz S., Khipp E., 1994, Fumarate reductase of Helicobacter pylori an immunogenic protein, J. Med. Microbiol., 41:56-62.
4. Dulciene M. M., *et al.*,1999, Serological and direct diagnosis of Helicobacter pylori in gasteric carcinoma:A case-control study, J. Med. Microbiol., 48:501-506.
5. Ernest P. B., Michette P., Smith P. D., The immunobiology of H. pylori, Lippincott-Raven,New York, 1997, 2-9.
6. Evans D. G., Graham D. Y., 1989, A Sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infections, Gastroenterology,96:986-989
7. Evans D. J., Evans D. G., Graham D. Y., Klein P. D., 1989, A sensitive and specific serologic test for detection of Campylobacter pylori infection, Gasteroenterology,96:1004-1008.
8. Glupczynski Y., Infection with helicobacter, in: Leslie C, Balows A. Sussman M.(eds),Topley and wilson`s Microbiology and Microbial Infection. Oxford University Press, 9th ed, vol3, London, 1998, 581-589.
9. Hirsch A. M., Pletschette M., Hischl M. H., Berger J., Stanek G., Rotter M. L., 1988, Comparison of different antigen preparations in an evaluation of the immune response to Campylobacter pylori, Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7:570-575.
10. Hirschl A. M., Pletschette M.,Hirschl M. H, 1988, Comparison of different antigen preparations in an evaluation of the immune response to Campylobacter pylori, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7:570-575.
11. Huaxiang Xia. *et al.*,1994, Transportation of Helicobacter pylori cultures by optimal systems, J. Clin. Microbiol., 32:3075-3077.
12. Johanstone A., Thorpe R., Specific Detection of Antigens Separated by polyacrylamid gel Electrophoresis, in: Johnstone A., Thorpe R., Immunochemistry in practice,Blackwell Scientific Publications, London,1987,p183-198.
13. Judith W. *et al.*,1994, Comparison of P.C.R. and other diagnostic techniques for detection of Helicobater Pylori infection in dyspeptic Patients, J. Clin. Microbiol., 32:1663-1668.
14. Kagnoff M. F., Kiyono H., Essentials of mucosal immunology, Academic Press,New York,1996,399-403.
15. Krsti K., Maria H., 1996, IgG Immune response to Helicobacter pylori antigens in patients with gasteric cancer, J. Cancer, 67:1-5.
16. Lelwala G. J., Nilsson I., Ljungh A., Wadstrom T., 1992, Cell surface proteins of Helicobacter pylori as antigens in an ELISA and a Comparison with three commercial ELISA, Scand. J. Infect. Dis., 24:457-465.
17. Lelwala-Guruge J., Schalen C., Nilsson I., Ljungh A., Tyszkiewiez T., 1990, Detection of antibodies to Helicobacter pylori surface antigens, Scand. J. Infect. Dis., 22:457-465.
18. Malfercheiner P., Michett P., Price A.P,Helicobacter pylori an atlas, Science Press Ltd.,London,1996,1-2.
19. Nachamkin I., Skirrow M. B., Campylobacter, Arcobacter and Helicobaster,in:Leslie C., Balows A. and Sussman M.(eds),Topley and Wilson`s Microbiology and Microbial Infection, Oxford University Press,London, 9th ed., Vol3, 1998, 1247-1252.
20. Newell D. G., 1987, Human serum antibody response to the surface protein antigens of Compylobacter Pyloridis, Serodiag. Immunother., 1:209-217.
21. Omarian C. A., Keane C. T., 1994, Culture of Helicobacter pylori under aerobic conditions on solid media, J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13:406-409.
22. Przyklenk B., Bauernfeind A., Bornchein W., 1990, Evaluation of an IgG-ELISA-Kit for diagnosing Helicobacter pylori associated gasteroduodenal disease, Serodiagn. Immunother. Infect. Dis., 4:263-269.
23. Schaber E., Umlauft F., Stoffler G., Aigner F., 1989, Indirect immunofluorescence test and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Compylobacter pylori, J. Clin. Microbiol., 27:327-330.
24. Sugiyama T. *et. al.*, 1991, A novel enzyme immunoassay for serodiagnosis of Helicobater pylori infection, Gasteroentrology,401:7-83.
25. Thomas J. E., Gibson G. R., 1992, Isolation of Helicobacter pylori from human faeces, Lancet,340:1194-1195.
26. Von Wulffen H., Grote H. I., 1988, Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin A and G antibodies to Campylobacter pylori, Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.,7:559-565.
27. Williams C. L., 1997, Helicobacter Pylori: bacteriology and laboratory diagnosis, J. Infection, 34:1-5.

Archive of SID
www.SID.ir