مجـلهی علمی، پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکـی زنجـان
دورهی ۱۶، شمارهی ۶۲، بهار ۱۳۸۷، صفـحات ۴۵ تا ۵۶

تعیین ایمونوژنهای هلیکوباکترپیلوری با الکتروفورز دوبُعدی و وسترن بلات

الهام ادهم فومنی[۱]، دکتر علی مصطفایی[۲]، دکتر مصطفی رضایی‌طاویرانی[۳]، دکتر سید جعفر نوابی[۴]، شهرام پروانه[۵]

نویسندهی مسئول: کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی amostafaie@kums.ac.ir

دریافت: ۸۶/۱۰/۳۰ پذیرش: ۸۷/۳/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *هلیکوباکترپیلوری از شایعترین باکتریهای بیماریزا در انسان است که معمولا در معده مستقر میشود. این باکتری به عنوان عامل التهاب و زخم معده و دوازده و در مواردی سرطان معده شناخته شده است. بعضی از آنتیژنهای هلیکوباکترپیلوری کـه توسـط سیـستم دفـاعی میزبان شناخته میشوند، از نامزدهای مورد استفاده در تعیین سویهی باکتری، تشخیص بیماری یا تهیهی واکسن علیه آن محسوب میشـوند. ایـن مطالعه به هدف شناسایی ایمونوژنهای هلیکوباکترپیلوری در سه گروه از بیماران مبتلا به التهاب، زخم و سرطان معده انجام گرفت.*

روشبررسی: *هلیکوباکترپیلوری از نمونهی بیوپسی بیماران مبتلا به التهاب معده (۱۳ نفر)، زخم معده (۴ نفر) و سرطان معده (۳ نفر) جدا و کشت داده شد. پروتئینهای پیکرهی باکتری با کمک لیزوزیم، اوره و دترجنت چپس، استخراج و به روش الکتروفورز دوبُعدی تفکیک شدند. بُعد اول الکتروفورز دوبُعدی شامل ایزوالکتریک فوکوسینگ به روش آبگیری مجدد و بُعد دوم شامل SDS-PAGE بود. بعد از الکتروفورز دوبُعدی، پروتئینها به غشای PVDF منتقل و واکنش آنها با ایمونوگلوبولین تخلیص شده از سرم هر گروه از بیماران مبتلا به التهاب، زخم و سرطان معده با روش ایمنوبلاتینگ بررسی شد.*

یافتهها: *الگوی الکتروفورز دوبُعدی هلیکوباکترپیلوری در این مطالعه نشان داد که اغلب پروتئینهای ایـن بـاکتری در دامنـهی وزنـی ۱۰ تـا ۱۰۰ کیلودالتونی و محدودهی pH=۳/۵-۹/۵ قرار دارند. در این الگو ۶ تا ۷ پروتئین پرمقدار که بعضی به صورت گروه چندتایی بودند، قابل تشخیص بود. در ایمنوبلاتینـگ، مجموعـهای از پـروتئینهـا بـا اوزان حـدود ۱۰۰، ۹۶، ۸۵ تـا ۹۰، ۷۰ تـا ۸۰، ۶۰، ۳۰، ۱۸، ۱۴ و ۱۰ کیلودالتـون بـا نقـاط ایزوالکتریک متفاوت با انواعی از سرمها واکنش نشان دادند. گروه ۶ تا ۵ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pH های متفـاوت از ۴/۵ تـا ۵/۵، گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون و pH=۳/۵-۴، پروتئینهای ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون با هر سه سرم واکنش دادند. پروتئینهای ۱۰۲ و ۹۰ کیلودالتونی با سرم بیماران زخم معده واکنشی ندادند. پروتئین ۳۰ کیلودالتـونی فقـط بـا سـرم بیمـاران سـرطان معـده و پـروتئین ۱۸ کیلودالتونی فقط با سرم بیماران مبتلا به التهاب معده واکنش دادند.*

نتیجهگیری: *پروتئینهای با اوزان ۱۰۰، ۹۶، ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون که با سرم هر سه گروه از بیماران واکنش دادند، میتوانند به عنوان نامزد تشخیص طبی مطرح و مورد مطالعه بیشتر قرارگیرند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران سرطان معده و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران مبتلا به التهاب واکنش دادند، میتوانند به عنوان نامزد تشخیص و تمایز این دو دسته از بیماران مدنظر قرارگیرند. به علاوه نتایج نشان داد که آنتیسرم بیماران زخم و سرطان معده الگوی آنتیژنی نسبتا مشابهی را در مقایسه با بیماران التهاب معده شناسایی میکند که به نظر میرسد در شناخت آنتیژنهای مسؤول بیماریزایی و یا تعیین سویهی باکتری مفید است.*

واژگانکلیدی: هلیکوباکترپیلوری، الکتروفورز دوبُعدی، ایمنوبلات، ایمونوژن

۱- کارشناس ارشد سلولیمولکولی، گروه بیولوژی، دانشگاه خاتم
۲- دکترای ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی
۳- دکترای بیوفیزیک، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- متخصص داخلی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۵- کارشناس آزمایشگاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

Archive of SID

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری (*H. pylori*) نوعی باکتری گرم منفی است که در مخاط معده مستقر می‌شود و در ایجاد التهاب مخاط معده، زخم و سرطان معده دخالت دارد (۱). در سال ۲۰۰۰ میلادی سازمان بهداشت جهانی هلیکوباکترپیلوری را به عنوان سرطان‌زای کلاس یک معرفی کرد. عفونت با این باکتری حالت پاندمی دارد و اغلب با شرایط بد اقتصادی-اجتماعی در ارتباط است (۴-۲). در پیکره‌ی هلیکوباکترپیلوری انواعی از آنتی‌ژن‌های پروتئینی، لیپوپروتئینی و لیپوپلی‌ساکاریدی مشاهده می‌شود. این آنتی‌ژن‌ها مربوط به آنزیم‌ها و سموم ترشحی، دیواره‌ی سلولی، غشای پلاسمایی، فضای پری‌پلاسمی و سیتوپلاسم باکتری هستند. تعدادی از آنتی‌ژن‌های هلیکوباکترپیلوری که توسط سیستم دفاعی میزبان شناخته می‌شوند، به عنوان نامزدهای مورد استفاده در تعیین سویه‌ی باکتری، تشخیص بیماری یا تهیه‌ی واکسن علیه آن مطرح شده‌اند. بعضی از آنتی‌ژن‌های نامزد تشخیص طبی و یا تولید واکسن شامل *Hpaa*، *CagA*، *HspA*، *VacA*، *BabA*، *EFs*، *HPNAP*، تاژک، زیرواحد بتای آنزیم اوره‌آز، پروتئین *L7/L12* ریبوزومی و *LPP20* می‌باشند (۳، ۵ و۶).

وسترن‌بلات از روش‌های متداولی است که به طور وسیع در شناخت نامزدهای آنتی‌ژنی تشخیص طبی و واکسن در انواعی از عوامل عفونی به کار می‌رود (۱۰-۷). در این روش ابتدا اجزای پیکره‌ی میکروب با الکتروفورز یک بُعدی یا دوبُعدی در ژل پلی‌اکریل‌آمید تفکیک می‌شود. در مرحله‌ی بعد باندهای پروتئین به صفحات نیتروسلولز یا پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) انتقال می‌یابد و واکنش آن‌ها با آنتی‌بادی یا سرم بیمار مورد مطالعه قرار می‌گیرد. الکتروفورز دوبُعدی (*2DE*) به دلیل قابلیت تفکیک بالا، از کارآمدترین روش‌های الکتروفورز برای مطالعه پروتئین‌های پیکره‌ی میکروب‌هاست. این روش برای مطالعه‌ی پروتئین‌های هلیکوباکترپیلوری از جنبه‌های متعدد از جمله ارزیابی پاسخ‌های استرسی متفاوت، مقایسه‌ی پروتئین‌های سطحی سلول (اشکال اسپریل و کوکویید)، پروتئین‌های شاخص بیماری، نامزدهای واکسن و دسته‌بندی جدایه‌های بالینی به کار گرفته شده است (۹-۷).

با توجه به این که بررسی الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های هلیکوباکترپیلوری به منظور مقایسه‌ی واکنش این پروتئین‌ها با سرم افراد مختلف (بررسی ایمنی هموورال) در داخل ایران انجام نشده، در این مطالعه، به بررسی این واکنش پرداخته شد. بر این اساس در مطالعه‌ی حاضر پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران با کمک لیزوزیم، اوره و دترجنت، استخراج و به روش الکتروفورز دوبُعدی تفکیک شد. سپس واکنش پروتئین‌های تفکیک شده با ایمونوگلوبولین تخلیص شده از سرم بیماران مبتلا به التهاب معده، زخم و سرطان معده با روش ایمنوبلاتینگ بررسی شد. هدف از این مطالعه، یافتن ایمونوژن‌های مشترک و یا متفاوت در سه گروه از بیماران فوق، به ترتیب جهت اهداف تشخیص طبی و شناخت ایمونوژن‌های احتمالی دخیل در القای بیماری‌زایی این میکروب برای مطالعات بعدی است.

روش بررسی

تهیه و کشت باکتری: نمونه‌های بیوپسی، از معده‌ی بیماران مبتلا به انواع ناراحتی‌های معده که به بخش داخلی بیمارستان امام خمینی کرمانشاه مراجعه می‌کردند، تهیه شد. این افراد مبتلا به التهاب معده (خفیف، متوسط و شدید)، بازگشت اسید معده به ابتدای مری (Gastro-Esophageal Reflux Disorder [GERD])، زخم معده یا سرطان معده بودند. روی نمونه‌های بیوپسی ابتدا آزمون اوره‌آز سریع (محیط حاوی اوره و معرف فنل قرمز با pH=۶/۸) انجام گرفت. در صورت مثبت بودن واکنش، نمونه‌ها در محیط انتقال به آزمایشگاه منتقل و کشت داده

Archive of SID

شدند. محیط کشت مورد استفاده برای تکثیر باکتری و کشت انبوه شامل بروسلا آگار بود. در میان بیوپسی‌های گرفته شده از بیماران، از ۴ نمونه‌ی زخم، ۱۳ نمونه‌ی التهاب معده و ۳ نمونه‌ی سرطان معده، هلیکوباکتر پیلوری جدا شد و جهت ادامه‌ی مطالعه مورد استفاده قرارگرفت. باکتری‌های جدا شده بعد از کشت، با بافر فسفات نمکی (*PBS*) استریل شست‌وشو و با سانتریفیوژ رسوب داده شدند. رسوب باکتری در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

نمونه‌های سرم: از بیمارانی که نمونه‌ی کشت آن‌ها مثبت بود (بیماران مبتلا به التهاب، زخم معده و سرطان معده) ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و سرم آن‌ها جدا شد.

تخلیص ایمونوگلوبولین سرم: سرم بیماران در سه گروه التهاب معده (۱۳ نفر)، زخم (۴ نفر) و سرطان معده (۳ نفر) مخلوط شد. به سرم مخلوط شده هر گروه سولفات‌آمونیوم تا غلظت نهایی ۵۰ درصد اضافه شد. مخلوط در $۲۰۰۰۰xg$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب بعد از ۲ بار شست‌وشو با محلول سولفات آمونیوم ۵۰ درصد، در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH =۷/۲ حل و یک شب در مقابل آن دیالیز شد. مرحله‌ی نهایی تخلیص بخش *IgG* سرم‌ها شامل کروماتوگرافی تعویض یون در ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل‌سفارز با سرعت بالا (*DEAE- Sepharose Fast Flow*) (فارماسیا) بود که با بافر فوق به تعادل رسیده بود (۱۱).

استخراج پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری: رسوب باکتری حاصل از کشت انبوه در بافر تریس ۲۵ میلی‌مولار با pH=۷/۲ حاوی دترجنت چپس (*CHAPS*) چهار درصد و *PMSF* یک میلی‌مولار به حالت تعلیق درآمد. سپس لیزوزیم (یک میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک باکتری)، *DNase I* و *RNase A* (۳۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک باکتری) و کلریدمنیزیم (۴ میلی‌مولار) اضافه شد. نمونه یک شب در اتاقک با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفت. سپس اوره ۷ مولار، تیواوره ۲ مولار، دی‌تیوتریتول ۸۰ میلی‌مولار، آمفولین ۰/۶ درصد و اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک‌اسید یک میلی‌مولار اضافه شد. پس از تأثیر مواد فوق، نمونه در $۴۵۰۰۰xg$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و در ظروف درب‌دار تقسیم و تا هنگام الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳،۱۲).

الکتروفورز دوبُعدی: بُعد اول الکتروفورز دوبُعدی شامل ایزوالکتریک فوکوسینگ (*IEF*) به روش آبدهی‌مجدد (Rehydration) بود (۱۴-۱۲). محلول متورم‌سازی شامل تریس ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷/۲)، اتیلن‌گلیکول هفت و نیم درصد (*v/v*)، چپس یک درصد (*w/v*)، اوره چهار مولار، دی‌تیوتریتول ۲۰ میلی‌مولار و آمفولین شش درصد (*v/v*) در دامنه‌ی ۳/۵ تا ۹/۵ بود. پس از متورم‌سازی ژل در طول شب، شرایط الکتروفورز در دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی‌گراد مهیا شد. چند قطره آب دیونیزه روی صفحه‌ی سرامیکی تانک الکتروفورز (فارماسیا) ریخته شد و ژل متورم شده از طرف طلق نگهدارنده روی قطرات آب قرار داده شد، به طوری که حباب هوا تشکیل نشد. سپس الکترودهای کاغذی در لبه‌های ژل قرارگرفت. کاغذهای نمونه‌گذار به فاصله‌ی ۱/۵ سانتی‌متر از کاتد و در فواصل سه تا چهار میلی‌متری از یکدیگر بر روی سطح ژل قرار داده شدند. سپس جریان برق برقرار شد. در ابتدا پیش‌فوکوسینگ در ۷۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه، بدون نمونه انجام شد. پس از پیش‌فوکوسینگ، نمونه‌ها با استفاده از سمپلر بر روی کاغذهای نمونه‌گذار قرار داده شدند. فاز اول مرحله‌ی نفوذپذیری شامل ۱۵۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه و فاز دوم ۵۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه بود.

پس از اتمام فاز دوم جریان قطع شد و کاغذهای نمونه‌گذار با استفاده از پنس برداشته شدند. سپس مراحل جداسازی و نازک شدن باندها به ترتیب در ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ ولت انجام گرفت. پس از *IEF*، نوارهای ژل در دو مرحله در محلول

Archive of SID

متعادل‌کننده‌ی *SDS-PAGE* قرار داده شدند. مرحله‌ی اول متعادل‌سازی به مدت ۲۰ دقیقه در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با *pH* معادل ۸/۸، حاوی *SDS* ۲ درصد (*W/V*)، اوره‌ی ۶ مولار، دی‌تیوتریتول (*DTT*) یک درصد (*W/V*) و گلیسرول ۳۰ درصد (*W/V*) بود. مرحله‌ی دوم متعادل‌سازی به مدت ۲۰ دقیقه‌ی دیگر در همان محلول که حاوی یدواستامید ۵ درصد (*W/V*) به جای *DTT* بود، انجام گرفت. بعد از این مرحله نوارهای *IEF* در بالای ژل آماده شده برای بُعد دوم قرار داده شدند و با محلول آگارز داغ (۰/۵ درصد در بافر تانک) به ژل بُعد دوم متصل شدند. بُعد دوم الکتروفورز دوبُعدی شامل *SDS-PAGE* به روش لاملی در ژل جداکننده‌ی ۱۳/۵ درصد بود (۱۴،۱۳). رنگ‌آمیزی ژل پس از الکتروفورز به روش نقره انجام گرفت.

ایمونوبلات: انتقال پروتئین‌ها از ژل پلی‌اکریل‌آمید به غشای پلی‌وینیلیدین‌دی‌فلورید (فارماسیا) به روش تاوبین انجام گرفت (۱۵). آنتی‌بادی مورد استفاده، *IgG* تخلیص شده از سرم بیماران مبتلا به زخم معده، التهاب و سرطان معده بود. پس از الکتروفورز، ژل ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرارگرفت. سپس غشا با متانول خیس شد و در ظرف حاوی بافر انتقال قرارگرفت.

مجموعه‌ی بلات در قالب پلاستیکی مربوطه محکم شد و در تانک بلات قرارگرفت. انتقال به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی‌آمپر و سپس به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۲۰۰ میلی‌آمپر و دو ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام شد. پس از انتقال، غشا به مدت ۱۵ دقیقه در بافر فسفات نمکی حاوی توین بیست ۰/۵ درصد (*PBS- T1*) قرارگرفت (مرحله‌ی مسدودسازی). سپس ۳ بار با بافر فسفات نمکی حاوی توین بیست ۰/۰۵ درصد (*PBS- T2*) شست‌وشو داده شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی اولیه (*IgG* تخلیص شده از سرم هر گروه از بیماران) قرار گرفت. غشا ۴ بار با *PBS- T2* شسته شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی بزی ضد *IgG* انسانی کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز) قرار گرفت. غشا ۴ بار با *PBS- T2* شسته شد و سپس در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (داکو) و پراکسیدهیدروژن قرارگرفت تا باندها ظاهر شدند.

یافته‌ها

الکتروفورز دوبُعدی پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری: الگوی الکتروفورز دوبُعدی پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری در شکل A-۱ آمده است. همان طوری که در شکل مشخص است، پراکندگی پروتئین‌های باکتری از نظر بار تقریبا از همگونی یکسانی در ژل برخوردار است، اگرچه بیشتر پروتئین‌ها نقطه‌ی ایزوالکتریک کم‌تر از ۷ دارند. در این الگو یک گروه ۵-۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون در محدوده‌ی ۴/۵ تا ۵/۵=*pH*، یک گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون در محدوده‌ی ۴-۳/۵=*pH*، ۸ تا ۱۲ لکه‌ی پروتئینی در محدوده‌ی ۳۰ کیلودالتونی در محدوده‌ی متفاوت *pH* از ۳/۵ تا ۹، یک گروه پروتئینی متشکل از ۶ تا ۷ پروتئین پُرمقدار با وزن حدود ۲۰ کیلودالتون و در محدوده‌ی *pH* از ۴ تا ۵، یک گروه پروتئینی متشکل از ۴ تا ۵ پروتئین پُرمقدار با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون با ۵/۵-۴/۵=*pH*، ۵ تا ۶ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون در محدوده‌ی ۹-۵/۵=*pH*، ۵ لکه در محدوده‌ی وزنی ۱۴ تا ۱۶ کیلودالتون در محدوده‌ی ۹-۷=*pH*، ۳ لکه‌ی پروتئینی در محدوده‌ی وزنی ۱۰ کیلودالتون و محدوده‌ی ۴-۳/۵=*pH* و ده‌ها پروتئین کم‌مقدار با اوزان و (Isoelecteric point [pI]) متفاوت دیده می‌شوند. خلاصه‌ی مطالب فوق در جدول ۱ آمده است.

ایمونوبلات: در آزمون ایمونوبلات پس از تفکیک پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکترپیلوری با روش الکتروفورز دوبُعدی، نقاط پروتئینی به غشای *PVDF* انتقال

Archive of SID

داده شد. سپس واکنش سرم بیماران مبتلا به زخم معده، سرطان و التهاب معده به طور جداگانه با پروتئین‌های تفکیک شده، مورد آزمون و مقایسه قرارگرفت.

جدول۱: محدوده‌ی وزنی و pH *پروتئین‌های پُرمقدار هلیکوباکتر مشاهده شده در الگوی الکتروفورز دوبُعدی*

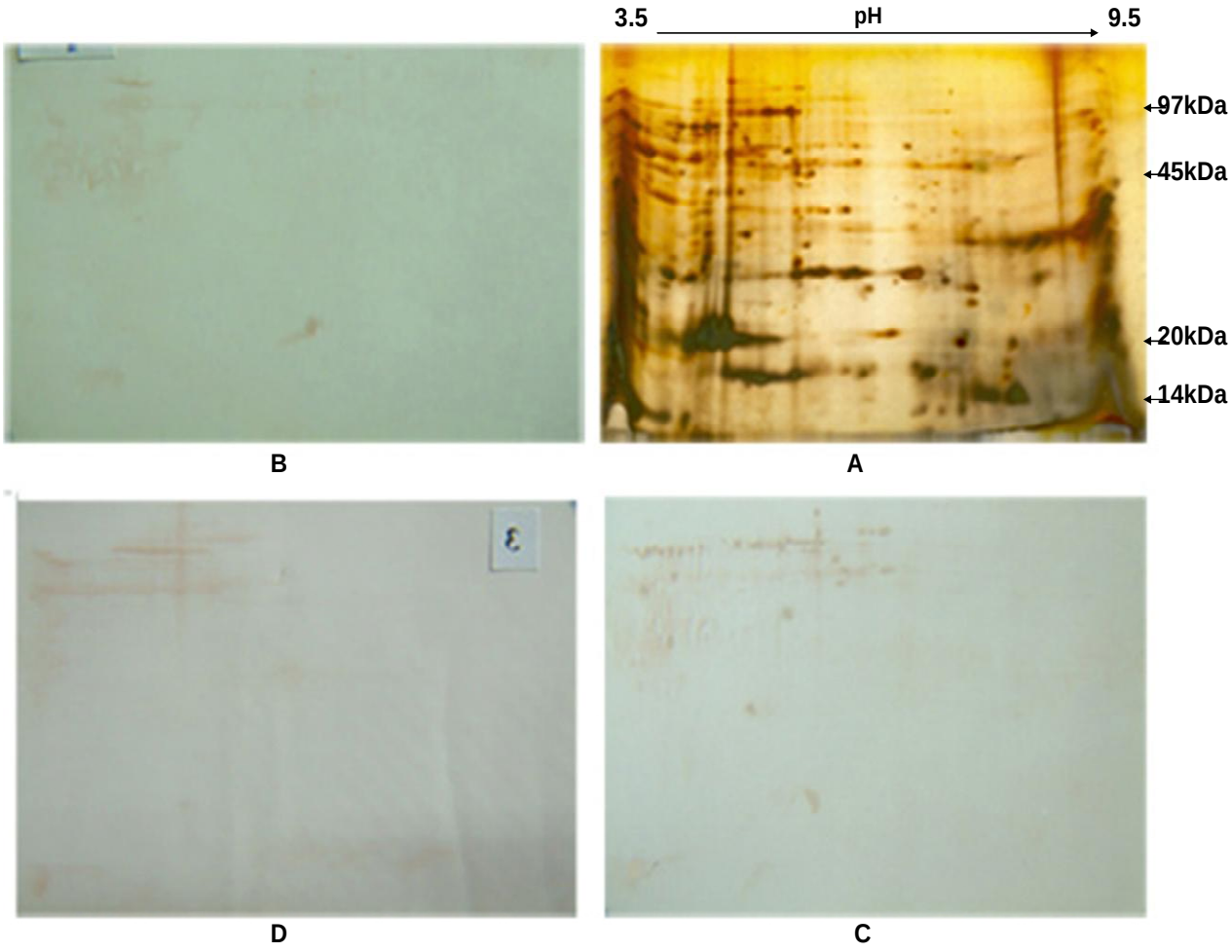
گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی *pH*
گروه ۵–۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۳/۵–۴
۱۲–۸ لکه‌ی پروتئینی	۳۰ کیلودالتونی	۳/۵ تا ۹
گروه ۷–۶ پروتئینی	۲۰ کیلودالتون	۴ تا ۵
گروه ۵–۴ پروتئینی	۱۸ کیلو دالتون	۴/۵–۵/۵
۶–۵ لکه‌ی پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۵/۵–۹
۵ لکه‌ی پروتئینی	۱۶–۱۴ کیلودالتون	۷–۹
۳ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۵–۴

واکنش سرم بیماران با آنتی‌ژن‌های پیکره‌ی هلیکوباکترپیلوری که با الکتروفورز دوبُعدی جدا شده‌اند در شکل ۱ (B تا D) آمده است. شکل B –۱ واکنش سرم بیماران مبتلا به زخم معده را با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکترپیلوری نشان می‌دهد. اشکال C –۱ و D –۱ نیز به ترتیب واکنش سرم بیماران مبتلا به التهاب و سرطان معده را با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکترپیلوری نشان می‌دهد.

واکنش سرم بیماران مبتلا به زخم معده با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکترپیلوری نشان داد که یک گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و *pI* های متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، یک گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با ۴–۳/۵ =*pI*، حداقل ۴ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۸۰ تا ۹۵ کیلودالتون با ۴/۵–۳/۵ =*pI*، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون و۵/۸ =*pI*، ۱تا۲ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰ کیلودالتون و ۳/۷–۳/۵ =*pI* با سرم این بیماران واکنش داده است. در این میان شدت رنگ‌پذیری لکه‌های ۱۰، ۱۸، ۹۶ و ۱۰۰ کیلودالتون از بقیه بیشتر بود.

واکنش سرم بیماران مبتلا به سرطان معده با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان داد که یک گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و *pI*های متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، یک گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با ۴– ۳/۵ =*pI*، یک گروه شامل ۲ تا ۳ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰۵ کیلودالتون و ۶– ۵/۵ =*pI*، ۳ تا ۴ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۹۰ کیلودالتون و ۶– ۵/۵ =*pI*، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون و ۵ =*pI*، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۳۰ کیلودالتون و ۴/۵ =*pI* و سه لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰ کیلودالتون و ۳/۷– ۳/۵ =*pI* با سرم این بیماران واکنش داده است. در این میان شدت رنگ‌پذیری لکه‌های ۱۰۰، ۹۶، ۹۰، ۱۸ و ۱۰ کیلودالتون از بقیه بیشتر بود.

Archive of SID



شکل ۱: الگوی الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری در آمفولین در دامنه‌ی pH= ۳/۵–۹/۵ (A). رنگ‌آمیزی به روش نقره‌ی اسیدی. ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکترپیلوری تفکیک شده با الکتروفورز دوبُعدی با سرم بیماران مبتلا به زخم معده (B)، سرطان معده (C) و التهاب معده (D).

در واکنش سرم بیماران مبتلا به التهاب معده با پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری (D –۱) نیز یک گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pIهای متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، یک گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با pI= ۳/۵–۴، یک گروه شامل ۲ تا ۳ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰۲ کیلودالتون و pI= ۵/۵–۶، حداقل ۵ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۹۰ کیلودالتون و pI= ۳/۵–۵، ۲ تا ۳ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۷۰ تا ۸۵ کیلودالتون و pI= ۳/۵–۳/۷، ۱ تا ۲ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰ کیلودالتون و pI= ۳/۵ ، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون و pI= ۴/۵ و ۱ تا ۲ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۴ کیلودالتون و pI= ۷–۸ رنگ‌آمیزی شدند. در این میان شدت رنگ‌پذیری لکه‌های ۱۰۰، ۹۶، ۹۰ و ۱۰ کیلودالتون از بقیه بیشتر بود. خلاصه‌ی مطالب فوق در جداول ۲ تا ۴ آمده است.

Archive

جدول ۲: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در واکنش با سرم بیماران مبتلا به زخم معده

گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۴-۳/۵
گروه ۴ پروتئینی	۹۵-۸۰ کیلودالتونی	۴/۵-۳/۵
۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۵/۸
۲-۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۷-۳/۵

جدول ۳: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در واکنش با سرم بیماران مبتلا به سرطان معده

گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۴-۳/۵
۳-۲ لکه‌ی پروتئینی	۱۰۵ کیلودالتونی	۶-۵/۵
۴-۳ لکه‌ی پروتئینی	۹۰ کیلودالتون	۶-۵/۵
۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۵
۳ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۷-۳/۵

جدول ۴: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در واکنش با سرم بیماران مبتلا به التهاب معده

گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۴-۳/۵
گروه پروتئین ۳ تایی	۱۰۲ کیلودالتونی	۶-۵/۵
۳-۲ لکه‌ی پروتئینی	۸۵-۷۰ کیلودالتون	۳/۷-۳/۵
۲-۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۵
۲-۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۴ کیلودالتون	۸-۷

Archive of SID

بحث

الکتروفورز دوبُعدی و ایمونوبلاتینگ به طور وسیع در شناخت نامزدهای آنتی‌ژنی به اهداف تشخیص طبی و تهیه واکسن در بیماری‌های عفونی از جمله هلیکوباکتر پیلوری به کار می‌رود (۱۰-۶). در این مطالعه سعی شد که در شناخت ایمونوژن‌های القاکننده‌ی ایمنی هومورال در سه گروه از بیماران دارای التهاب، زخم و سرطان معده، به هدف یافتن ایمونوژن‌های مشترک یا متفاوت جهت اهداف تشخیص طبی و شاخص بیماری، از روش الکتروفورز دوبُعدی و وسترن‌بلات استفاده شود. الگوی پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در ایزوالکتریک فوکوسینگ شامل بخش عمده‌ای از پروتئین‌ها در محدوده‌ی pH اسیدی ($pH<۷$) و

درصد کم‌تری در pH بیشتر از ۷ است. پروتئین‌های هلیکوباکترپیلوری که در محدوده‌ی pH معادل ۳/۵ تا ۶/۵ قرار دارند، بیشترین پروتئین‌های این باکتری را شامل می‌شوند. به علاوه، در الگوی الکتروفورز دوبُعدی نیز روشن شد که اغلب پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری دامنه‌ی وزنی ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتونی دارند. چنین الگوی پروتئینی برای هلیکوباکتر پیلوری در مطالعات دیگران نیز گزارش شده است. چو و همکاران (۹) مک‌آت و همکاران (۶) به ترتیب در سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۲ در مطالعات خود بر روی الگوی دوبُعدی پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری بیان کردند که اغلب پروتئین‌های این باکتری در pH ایزوالکتریک ۳/۵ تا ۸ قرار دارند. تعداد نقاط پروتئینی تفکیک شده در الگوی الکتروفورز دوبُعدی در این مطالعه ظاهرا بیش از نتایج مطالعه چو و همکاران بر روی پروتئین‌های هلیکوباکترپیلوری است (۹). شاید یکی از دلایل این تفاوت در روش لیزکردن باکتری و استخراج پروتئین‌های پیکره‌ی آن باشد. در میان پروتئین‌های تفکیک شده با الکتروفورز دوبُعدی، حضور چند گروه پروتئینی که اجزای آن‌ها اوزان مشابه و نقاط ایزوالکتریک متفاوتی دارند، قابل‌توجه بوده و با مطالعات محققین دیگر (۶، ۱۰) از جمله مطالعه‌ای که توسط مینی و همکاران با الکتروفورز دوبُعدی و اسپکتروسکوپی جرمی در سال ۲۰۰۶ بر روی هلیکوباکتر پیلوری جداشده از بیماران مختلف گوارشی انجام شد، قابل‌مقایسه است (۱۰).

در این مطالعه واکنش پروتئین‌های تفکیک شده با کمک الکتروفورز دوبُعدی پس از انتقال به غشای بلات، با ایمنوگلوبولین خالص شده از سرم بیماران مختلف بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pI متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با pI= ۳/۵-۴، پروتئین‌های ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون با سرم هر سه گروه از بیماران واکنش داده‌اند. لذا این ایمونوژن‌ها را می‌توان به عنوان نامزد تشخیص طبی مطرح نمود و مورد مطالعه بیشتر قرار داد. در مقابل، پروتئین‌های ۱۰۲ و ۹۰ کیلودالتونی با سرم بیماران زخم معده واکنش محسوسی نداده‌اند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی نیز به ترتیب، فقط با سرم بیماران سرطان معده و التهاب معده واکنش داده‌اند. بر این اساس، به نظر می‌رسد که این دو نوع پروتئین نامزدهای مناسبی برای تشخیص و تمایز این دو دسته بیمار هستند، اگرچه احتمال واکنش متقاطع این آنتی‌ژن‌ها با سایر آنتی‌ژن‌های میکروبی غیرمحتمل نیست. به هرحال اثبات چنین فرضیه‌ای نیازمند مطالعات دقیق‌تر و با استفاده از نمونه‌های بیشتر است.

در الگوی ایمنوبلاتینگ پروتئین‌های پیکره‌ی باکتری به نظر می‌رسد که سرم بیماران مبتلا به زخم معده و سرطان نسبت به سرم بیماران مبتلا به التهاب معده شباهت بیشتری به یکدیگر دارند و علیه پروتئین‌های مشابهی عمل می‌کنند. در مطالعات قبلی نیز که در این زمینه صورت گرفته، به اثبات رسیده است که الگوی آنتی‌ژنی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده و سرطان به هم شبیه‌تر هستند و با الگوی آنتی‌ژنی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به التهاب معده تفاوت‌های بیشتری دارد. این موضوع شاید با روند بیماری زخم معده نیز بی‌ارتباط نباشد، زیرا احتمال ابتلا به سرطان معده در بیماران مبتلا به زخم معده درمان نشده خیلی بیشتر از بیماران مبتلا به التهاب خفیف است، به طوری که در حال حاضر از بین بردن عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران یک روش جلوگیری از سرطان محسوب می‌شود (۱۶).

در این مطالعه هم‌چنین مشخص شد که بخشی از آنتی‌بادی‌های ضدهلیکوباکتر پیلوری در هر سه گروه بیمار علیه بخش لیپوپلی‌ساکاریدی (LPS) دیواره‌ی سلولی است. الگوی LPS در ایمونوبلاتینگ شامل یک منطقه با دامنه‌ی وزنی بیش از ۳۰ کیلودالتون در بخش آندی با

Archive of SID

pH= ۳/۵-۴/۵ و مشابه اثر انگشت است. LPS از فراوان‌ترین آنتی‌ژن‌های غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی و از قوی‌ترین عوامل تحریک‌کننده‌ی سیستم ایمنی میزبان محسوب می‌شود (۱۷). LPS به تنهایی به عنوان یک آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس محسوب شده، غالبا تولید آنتی‌بادی از کلاس IgM را القا می‌کند. از آن جایی‌که این آنتی‌ژن با انواعی از پروتئین‌ها در غشای خارجی هلیکوباکتر پیلوری اتصال محکمی دارد، می‌تواند تولید آنتی‌بادی از سایر کلاس‌ها را نیز القا نماید. به رغم وجود آنتی‌بادی ضد LPS در سرم، این آنتی‌ژن ظاهرا نامزد مناسبی برای تشخیص طبی یا شاخص بیماری نیست. شباهت آنتی‌ژنی LPS هلیکوباکترپیلوری با LPS انواعی از باکتری‌های گرم منفی از دلایل عمده این موضوع است (۱۷). با مطالعه‌ی بیشتر بر روی پروتئین‌هایی که در ایمونوبلاتینگ با آنتی‌بادی بیماران مختلف واکنش داده‌اند، می‌توان امکان استفاده از آن‌ها را به عنوان شاخص بیماری یا تشخیص هلیکوباکترپیلوری به روش‌های کمی و حساس مانند الایزا روشن نمود. برای این کار لازم است ابتدا این آنتی‌ژن‌ها خالص و سپس به طور کامل تعیین خصوصیت شوند. به رغم نتایج قابل توجه مطالعه‌ی حاضر در بررسی ایمنوژن‌های هلیکوباکترپیلوری القاکننده‌ی پاسخ ایمنی هومورال در بیماران مختلف و تعیین خصوصیات وزنی و نقطه‌ی ایزوالکتریک این آنتی‌ژن‌ها، به دلیل عدم وجود تکنیک اسپکتروسکوپی جرمی در ایران شناسایی دقیق این آنتی‌ژن‌ها فعلا برای ما میسر نشده است. به علاوه، با توجه به مشکلات جمع‌آوری نمونه به ویژه از بیماران مبتلا به سرطان معده، جداسازی و کشت هلیکوباکترپیلوری و مشکلات الکتروفورز دوبُعدی و وسترن‌بلات به دلیل وقت‌گیر بودن و هزینه‌ی بالا، امکان انجام این مطالعه به طور وسیع و بر روی نمونه‌های زیاد امکان‌پذیر نبود. به هر حال برای تأیید موضوعاتی که در بالا به آن‌ها اشاره شد، لازم است آزمون‌های کمی‌تر و با تعداد نمونه‌های بیشتر بررسی شود.

نتیجه‌گیری

پروتئین‌های با اوزان ۱۰۰، ۹۶، ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون که با سرم هر سه گروه از بیماران واکنش دادند، می‌توانند به عنوان نامزد تشخیص طبی مطرح و مورد مطالعه بیشتر قرارگیرند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران سرطان معده و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران مبتلا به التهاب واکنش دادند، می‌توانند به عنوان نامزد تشخیص و تمایز این دو دسته از بیماران مدنظر قرارگیرند. به علاوه نتایج نشان داد که آنتی‌سرم بیماران زخم و سرطان معده الگوی آنتی‌ژنی نسبتا مشابهی را در مقایسه با بیماران التهاب معده شناسایی می‌کند که به نظر می‌رسد در شناخت آنتی‌ژن‌های مسؤول بیماری‌زایی و یا تعیین سویه‌ی باکتری مفید است.

تقدیر و تشکر

به این وسیله از بیماران به خاطر همکاری در اجازه برای تهیه‌ی بیوپسی، همکاران بخش داخلی بیمارستان امام خمینی(ره) و همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی به خاطر همکاری در مراحل مختلف اجرای این مطالعه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Nilsson IM. Separation and survey of proteins of *Helicobacter pylori*. *J Chromatogr B.* 2002; 773: 63-79.

2- Hass G, Karaail G, Ebermayer K, et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection relation to gastric diseases. *Proteomics.* 2002; 2(3): 313-24.

Archive of SID

3- Bumann D, Holland P, Siejak F, et al. A comparison of murine and human immunoproteomes of *Helicobacter pylori* validates the preclinical murine infection model for antigen screening. *Infect Immun.* 2002; 70(11): 6494-98.

4- Calam J. *Helicobacter pylori* (Review). *Eur J Clin.* 1994; 24: 501-10.

5- Lock RP. Proteom analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2002; 7(3): 175-82.

6- McAtee CP, Lim MY, Fung K, et al. Characterization of *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J Chromatogr Biomed Sci Appl.* 1998; 714: 325-33.

7- Hook-Nikanne J, Prez-perez GI, Blaster MJ. Antigenic characterization of *Helicobacter pylori* strains from different parts of the world. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4: 592-7.

8- Bolin I, Lonroth H, Svennerholm AM. Identification of *Helicobacte pylori* by immunological dot blot method based on reaction of a species-specific monoclonal antibody with a surface-expose protein. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 381-384.

9- Cho MJ, Jeon BS, Park JW, et al. Identifying the major_proteom components of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Electrophoresis.* 2002; 23 (7-8): 1161-73.

10- Mini R, Bernardini G, Salzano AM, et al. Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006; 833: 63-79.

11- Johnsone A, Thrope R. Immunochemistry in practices. 3 ed. Blackwell Sciences ltd, London; 1996, 217-300.

12- Mostafaie A. Protein gel electrophoresis: principles and practice. 2 ed. Yadavaran Pub; Tehran, Iran. 2004, 115-45.

13- Westermeier R. Electerophoresis in practice. 3 ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001, 239-260.

14- Berkelman T, Stenstedt T. 2-D Electerophoresis. principles and methods. *Amersham Pharmacia Biotech.* 1998; 1-44.

15- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electerophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 4350-54.

16- International Agency for research on cancer schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994; 61, Lyon: IARC.

17- Yunoki N, Yokota K, Mizuno M, et al. Antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000; 7(4): 574-7.

Archive of SID

Determination of Helicobacter pylori Immunogenes Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Immunoblotting

Adham Fomani E, Mostafaie A, Rezaie Tavirani M, Navabi J, Parvaneh S

Corresponding Author's Address: Medical Biology Research Center, University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

E-mail: amostafaie@kums.ac.ir

Background and objective: *Helicobacter pylori* is one of the most common infectious agents that colonizes in the mucus layer of stomach. This bacterium has been identified to be the etiologic agent of chronic active gastritis, peptic ulceration and gastric cancer. The present study was aimed to identify *H. pylori* immunogenes for clinical diagnisis of the infection in the above 3 groups of patients.

Materials and Methods: *H. pylori* bacteria isolated from biopsy specimens of patients suffering from gastritis, peptic ulcer and gastric cancer were extracted in an extraction solution containing lysozyme, urea and CHAPS. Two-dimensional gel electrophoresis were performed. The resolved proteins were transferred to PVDF membrane using tank blotting and their reaction with purified IgG fraction of the patients' sera were determined by immunoblotting.

Results: The bacterial extract showed several hundreds of silver-stained spots with molecular weights (MW) ranging from 10 to 100 KDa and isoelectric points (pI) ranging from 3.5 to 9.5. This pattern contained 6-7 major proteins, some of which as protein groups consisted of several spots. The results of immunoblots revealed that several protein spots with different MW and pI, were stained with all three groups of patients' sera but some proteins were stained only with one or two groups of sera.

Conclusion: The protein spot with MW of 30 KDa reacted with sera of only two groups of patients; gastritis and gastric cancer; the protein with MW of 18 KDa reacted only with sera of gastritis patients. These proteins can be potential candidates for recognition of the type of gastric disorder. In addition, the results indicated that protein profiles of *H. pylori*, isolated from gastric cancer and peptic ulcer, are more similar to each other, comparing to that of gastritis patients.

Key worlds: Helicobacter pylori, Two-dimensional gel electrophoresis, Immunoblotting, Immunogens.

Archive of SID