Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره نهم، شمارهٔ ٦، بهمن - اسفند ١٣٨٦، صفحه ٢٢-٢٨
دریافت: ٨٦/٤/٣، ارسال جهت اصلاح: ٨٦/٨/٢، پذیرش: ٨٦/٨/١٢

بررسی خصوصیات پروتئین های شوک حرارتی در بروسلا آبورتوس و واکنش این پروتئین ها با سرم افراد بیمار و کنترل

رمضان رجب نیا*[1]، نورامیر مظفری[2]، فریده قاضی[3]، امراله مصطفی زاده[1]، علی مصطفائی[4]

۱- استادیار گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشیار گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران ۳- دانشیار گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی ایران ۴- دانشیار گروه میکروب و ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

سابقه و هدف: وقتی بروسلاها در معرض افزایش درجه حرارت قرار می گیرند پروتئین های شوک حرارتی (hsp) (Heat shack proteen) سنتز می کنند. بعضی از این پروتئین ها در طول عفونت به شدت توسط سیستم ایمنی میزبان شناسایی می شوند. هدف از این مطالعه تعیین الگوی سنتز hsp در بروسلا آبورتوس تحت شوک های حرارتی مختلف و آنتی ژنسیته آنها در مقابل سرم افراد بیمار و سالم بوسیله ایمونو بلاتینگ می باشد.

مواد و روشها: در یک کارآزمایی تجربی، ٥ باکتری بروسلا آبورتوس از گاو جدا شده و تحت شوک های حرارتی در ٣٩، ٤٠ و٤٢ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس پروتئین های باکتری استخراج شده و الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) انجام گرفت و بدین ترتیب انواع پروتئین های شوک حرارتی، از جمله hsp60 بررسی شدند. در نهایت با استفاده از روش ایمونو بلات، آنتی ژنسیته پروتئین های شوک حرارتی (hsp60) در مقابل سرم افراد بیمار (مبتلا به تب مالت) و سالم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در SDS-PAGE عمده ترین باندهای پروتئینی درمحدوده وزنی ٧٥- ٣٠ و ٢٠-١٤ کیلودالتون قرار داشتند. درباکتری های شوک ندیده درمحدوده ٦٠ کیلودالتون باندی مشاهده گردید (hsp60) که مقدار آنها کم بود ولی درباکتری های شوک دیده مقدار تولید آنها افزایش چشمگیری داشته است. در واکنش پروتئین های پیکره این باکتریها با سرم افراد بیمار در ایمونوبلاتینگ چندین باند پروتئینی دیده می شود که در واکنش با سرم افراد سالم دیده نمی شود. نکته قابل توجه در واکنش پروتئین های پیکره باکتری با سرم افراد بیمار وجود باند قوی تر در ناحیه ٦٠ کیلو دالتونی در تمام نمونه هاست.

نتیجه‌گیری: باکتری بروسلا آبورتوس در مقابل شوک حرارتی، با تولید پروتئین های جدید و یا افزایش تولید بعضی از پروتئین ها (hsp60) پاسخ می دهد. سرم مبتلایان به بیماری تب مالت بطور قابل توجهی با hspها از جمله hsp60 واکنش نشان می دهد. این نشان دهنده آنتی ژنیسیته پروتئین های شوک حرارتی به خصوص hsp60 می باشد. نتایج این مطالعه می تواند زمینه مطالعات بعدی در استفاده احتمالی از hsp60 به عنوان نامزد آنتی ژنی مناسب در طراحی کیت الایزا برای تشخیص بروسلوز و یا طراحی واکسن های زیر واحد باشد .

واژه های کلیدی: *بروسلا آبورتوس، پروتئین شوک حرارتی، تب مالت.*

مقدمه

بروسلوز یکی از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و دام است که بر اثر آلودگی با باکتری های جنس بروسلا بوجود می آید. بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس عمده ترین گونه های عامل بروسلوز در انسان و دام هستند (١و٢). بروسلاها کوکوباسیل های گرم منفی داخل سلولی اختیاری هستند که سلولهای بیگانه خوار و غیر بیگانه خوار را آلوده می سازند (٣و٤). این باکتری ها اسپور و اگزوتوکسین مشخصی ندارند (٥). ویرولانس بروسلا نتیجه یک پدیده چند فاکتوری است. شرایط محیطی و داخل سلولی باکتری ها، موجب تغییراتی در مقدار بیان پروتئین ها می شود. واکنش های متقابل میزبان- پاتوژن در طول عفونت،

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری ها را در معرض استرس های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی مختلف قرار می دهد (۶) و باکتری های داخل سلولی به تغییرات در محیط شان سازش می یابند. این امر مانع از بین رفتن باکتری ها توسط سیستم های دفاعی سلول میزبان می شود. در معرض گرما قرار گرفتن سلول یا ارگانیسم باعث القای پاسخ فیزیولوژیکی گردیده که پاسخ شوک حرارتی نامیده می شود. این پاسخ با سنتز پروتئین های خاصی مرتبط است که به پروتئین های شوک حرارتی معروفند (۷). این پروتئین ها در شرایط فیزیولوژیک نیز توسط سلول سنتز می گردند (۸و۹). Hsp60 از نظر فیلوژنی شدیداً محافظت شده است (۱۰).

Hsp60 میکروبی آنتی ژن هدف در دفاع بر علیه عوامل عفونی می باشد (۸). پاسخ ایمنی برعلیه این پروتئین ها احتمالا می تواند ایمنی محافظت کننده در میزبان را ایجاد کند (۶). بر اساس وزن مولکولی، پروتئین های شوک حرارتی به چهار خانواده اصلی تقسیم می شوند. پروتئین با وزن ملکولی ۶۰، ۷۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون و پروتئین های با وزن ملکولی کم که اعمال فیزیولوژیک مختلفی از قبیل پیچ و تاب خوردن پروتئین (Protein folding)، انتقال پیام سلولی (Cellular signaling) و تجزیه پروتئین را به عهده دارند (۱۱). بعضی از پروتئین های شوک حرارتی به دیگر پروتئین های سلول متصل شده و آنها را در مقابل دناتوره شدن محافظت می کنند (Chaperones) (۹).

هدف از این پژوهش، بررسی خصوصیات پاسخ شوک حرارتی در بروسلا آبورتوس (سویه های جدا شده از گاو) پس از شوک در حرارت های مختلف می باشد که تحت این شوکها، پروتئینهای شوک حرارتی سنتز شده سپس با استفاده از روش SDS-PAGE، سنتز hsp ها در سویه های شوک دیده و شوک ندیده بررسی می شوند و بدین ترتیب الگوی تولید hsp ها در این دو حالت به دست آمده و با هم مقایسه میشوند. بااستفاده از روش ایمونوبلات، آنتی ژنیسیته پروتئین های شوک حرارتی (hsp60) در مقابل سرم افراد مبتلا به بروسلوز و سالم مورد بررسی قرار می گیرد. نتایج این مطالعه ممکن است زمینه مطالعات بعدی در استفاده از hsp60 به عنوان نامزد مناسب در طراحی کیت الایزا برای تشخیص بروسلوز و یا طراحی واکسن های زیر واحد باشد.

مواد و روشها

در یک کارآزمایی تجربی ۵ سویه باکتری بروسلا آبورتوس از گاو جدا شد. نمونه‌های مذکور از دام های مشکوک به بیماری بروسلوز، که توسط مهندس دامپروری شناسایی می‌شدند، گرفته می‌شد. سپس نمونه‌ها به دانشگاه علوم پزشکی بابل منتقل گردیده و در شرایط استریل به محیط کشت برین هارت اینفیوژن براث منتقل و محیط مذکور مدت چهار هفته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری می شد. در خلال این چهار هفته از محیط BHI مقداری برداشته و بر روی پلیت محتوی محیط بروسلا آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند کشت داده شد. سپس پلیت های مذکور به جار Co2 منتقل و گرم خانه گذاری (مدت زمان ۷۲–۴۸ ساعت، حرارت ۳۷ درجه سلسیوس) می گردید. پس از این مدت پلیت‌ها از نظر رشد باکتری و خصوصیات کلنی کنترل و بررسی شدند (۱). سرانجام پس ازرشد باکتری از کلنی‌های تک ایزوله شده لام رنگ آمیزی گرم تهیه و تست های بیوشمیایی (TSI ,VP،MR، اوره، اکسیداز و کالاتاز) جهت تشخیص نهایی انجام می شد (۲).

شوک های حرارتی: ابتدا باکتری ها در محیط کشت بروسلا براث کشت داده شده (از هر باکتری در دو محیط کشت داده شدند) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس اتوو گذاری می‌شدند تا زمانی که OD600nm محیط کشت به ۱ برسد (۱۲) (کدورت آن با کدورت استاندارد ۷ مک فارلند برابر شود). سپس باکتری ها تحت شوکهای حرارتی در ۳۹، ۴۰ و۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بدین ترتیب که از دو محیط کشت مربوط به هر باکتری، یکی به عنوان کنترل ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس باقی می‌ماند و محیط دیگر ۳ ساعت در شرایط شوک قرار می‌گرفت (۱۲). ۳۰ دقیقه در xg ۵۰۰۰ سانتریفوژ شده و بعد از دورریزی مایع رویی، رسوب ۲ مرتبه با سرم فیزیولوژی و یک بار با بافر تریس ۱۰ میلی مولار با pH=۷/۵ شستشو گردید. در نهایت باکتری ها با استن سرد کشته شدند (۱۳). باکتری ها با سانتریفوژ در 5000xg به مدت ۳۰ دقیقه رسوب داده شدند و پس از تبخیر استن، در فریزر نگهداری شدند.

استخراج پروتئین های بروسلا: اساس انجام این آزمایش، روش رزنباخ با بعضی تغییرات بود. در این روش اکثر پروتئین‌های پیکره باکتری استخراج می‌شود. این موضوع عمدتا به دلیل تاثیر سدیم دودسیل سولفات (SDS) در حل کردن بخش‌های آب‌گریز و اثر لیزوزیم در هضم لایه پپتید و گلیکان است (۱۳). مقدار ۰/۱۶ گرم باکتری، پس از دو مرتبه شستشو با بافر تریس نمکی(TBS) ۲۰ میلی مولار با pH=۲/۷، در ۶۴۰ میکرو لیتر از از این بافر به تعلیق در آمد. سپس

www.SID.ir

Archive of SID

فنیل‌متیل‌سولفونیل فلورید(PMSF) و اتیلن دی‌آمین تترااستات(EDTA) هر یک با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار و ۴/۸ میلی لیتر بافر تخریب‌کننده (بافر تریس باز شامل ۲٪ SDS، ۱۰٪ گلیسرول و۰/۷ مولار 2ME) اضافه گردیدند. باکتری ۴ ساعت در حمام ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و لیزوزیم (یک میلی گرم بازاء هر ۱۰۰ میلی گرم وزن خشک باکتری) اضافه گردید و یک شب در گرم خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. محلول ۱۰ دقیقه در ظرف آب جوش قرار گرفته و سپس ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰۰ xg سانتریفوژ شد. مایع رویی در حجم‌های کوچک تقسیم و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

الکتروفورز: SDS-PAGE در ژل جدا کننده ۱۳/۵٪ و ژل Stacking ۵٪ بر اساس روش لاملی(lammli) با بعضی تغییرات انجام گرفت (۱۳). الکترو فورز با ولتاژ ثابت ۵۰ ولت تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل Stacking و سپس با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت صورت گرفت. رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با کوماسی آبی R-250 صورت گرفت (۱۳). ژل SDS-PAGE در اسید استیک ۱۰ درصد نگهداری شد.

نمونه های سرم برای انجام وسترن بلاتینگ: در این مطالعه ۱۰ نمونه سرم انسانی از افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه، با تیتر رایت لوله‌ای حداقل ۱:۳۲۰ و تیتر 2-ME رایت حداقل ۱:۱۶۰ جمع آوری شد. همچنین از ۱۰ فرد سالم نیز نمونه سرم گرفته شد.

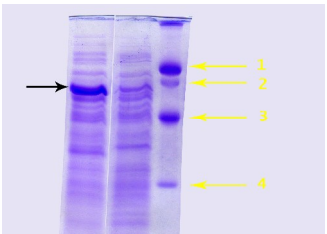
ایمونوبلاتینگ(وسترن‌بلات): بلاتینگ با روش انتقال در تانک صورت گرفت. این روش بطور معمول در بافرتریس – گلیسین که ابتدا توسط Towbin ارائه شد، انجام گرفت (۱۴). این مرحله شامل الکتروفورز به مدت نیم ساعت در شدت جریان ثابت ۷۵ میلی‌آمپر، نیم ساعت در شدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی آمپر، یک ساعت و نیم در شدت جریان ۲۰۰ میلی آمپر و نهایتا یک و نیم ساعت در شدت جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. پس از انتقال، غشاء PVDF به مدت۱۰ دقیقه در بافر فسفات نمکی حاوی توئین ۰/۵٪ (PBS-T1) قرار گرفت. سپس ۴ بار، هر بار بمدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی توئین ۰/۵۰٪ (PBS-T2) شستشو شد و به مدت ۱/۵ ساعت در مجاورت سرم افراد بیمار و سالم قرار گرفت. غشا ۴ بار و هر بار ۵ دقیقه باPBS-T2 شستشو شد و به مدت ۱/۵ ساعت در مجاورت آنتی بادی ثانویه (آنتی هیومن کونژوگه با پراکسیداز) قرار گرفت. غشا ۶-۵ بار و هر بار ۵ دقیقه با PBS-T2 شستشو شد و سپس در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترا (دی آمینو بنزیدین) قرار داده شد. باندهای پروتئینی در عرض ۱۰-۵ دقیقه ظاهر شدند سپس غشاها در آب مقطر زیاد شستشو شده، خشک گردیده، در محل تاریک نگهداری شدند (۱۴).

یافته ها

الگوی SDS-PAGE پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده در ۴۲ درجه سلسیوس و کنترل در شکل ۱ نشان داده شده است. باندهای پروتئینی در محدوده وزنی ۱۰۰-۱۰ کیلو دالتون قرار دارند. عمده ترین باندهای پروتئینی در محدوده وزنی ۷۵-۳۰ و ۲۰-۱۴ کیلودالتون قرار دارند. در بروسلا آبورتوس های شوک دیده در ۴۲ درجه سلسیوس پروتئین های جدیدی ظاهر شدند و هم چنین بعضی از پروتئین ها مقدار تولیدشان افزایش یافته است. در باکتری شوک ندیده یک باند در محدوده ۴۰ کیلودالتون وجود دارد که در باکتری شوک دیده مشاهده نمی شود ولی در عوض، در باکتری شوک دیده در نزدیکی همان محدوده باند جدیدی ظاهر شده است. هم چنین درباکتری های شوک ندیده در محدوده ۶۰ کیلودالتون باندی مشاهده می شود که احتمال می رفت hsp60 باشد که در باکتری شوک ندیده (کنترل) مقدار آنها کم بوده ولی در باکتریهای شوک دیده مقدار تولید آنها افزایش قابل توجهی داشته است.

ایمونو بلاتینگ پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده در ۴۲ درجه سلسیوس و شوک ندیده با سرم افراد بیمار و سالم: در این مطالعه ابتدا hsp60 مربوط به اشریشیا کلی و آنتی بادی پلی کلونال ضد آن از شرکت Stress gene کانادا تهیه و جهت اثبات وجود hsp60 در باکتریهای مورد مطالعه، ایمونوبلات انجام شد. hsp60 به عنوان کنترل آنتی ژن و هم چنین نمونه های بروسلای شوک دیده و شوک ندیده در تکنیک ایمونو بلاتینگ، با آنتی بادی ضد hsp60 مجاور شدند (شکل ۲).

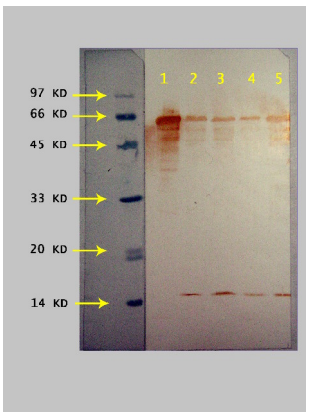
همان گونه که در شکل دیده می شود آنتی بادی پلی کلونال با hsp60 بروسلا آبورتوس واکنش داده است. هم چنین این آنتی بادی با پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۱۴ کیلو دالتون نیز واکنش داده است.



www.SID.ir

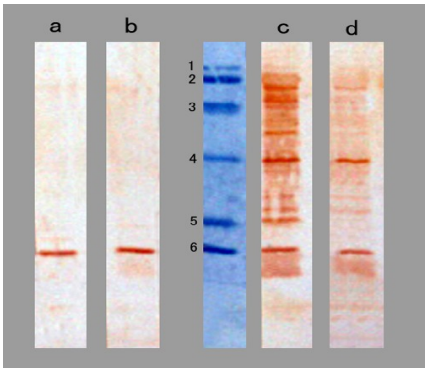
Archive of SID

شکل ۱. الگوی SDS-PAGE پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس کنترل و شوک دیده در ۴۲ درجه سلسیوس. سمت راست مارکر پروتئینی با وزن های مولکولی مختلف بر حسب کیلو دالتون (۷۸=۱، ۶۶=۲، ۴۵ =۳، ۲۹=۴، ۱۸/۵=۵، ۱۴/۵=۶)، سمت چپ باکتری شوک دیده(فلش در این ردیف محل hsp60 را نشان میدهد) و باند وسط باکتری شوک ندیده را نشان می دهد.



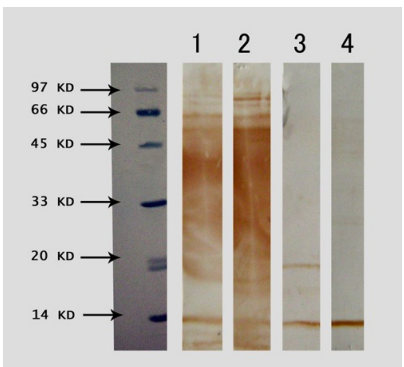
شکل ۲. واکنش hsp60 بروسلا و آنتی بادی ضد hsp60 اشریشیا کلی سمت چپ مارکر پروتئینی ۱= hsp60 تهیه شده از شرکت stress gene ۴ = باکتری شوک ندیده ، ۵= باکتری شوک دیده

پس از تفکیک پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده در ۴۲درجه سلسیوس و باکتری کنترل به روش SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به صفحات PVDF انتقال داده شدند (بلاتینگ). سپس واکنش سرم افراد بیمار و سالم با پروتئین های انتقال یافته بررسی و مقایسه شد (شکل ۳). همان گونه که در این شکل مشاهده می شود در واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده با سرم افراد بیمار چندین باند پروتئینی در محدوده ۱۴، ۲۹ و۶۰ کیلو دالتون دیده شده (نوارهای c وd) که در واکنش با سرم افراد سالم دیده نمی شود (نوارهای a وb). الگوی رنگ اسمیر مانندی که در قسمت بالا و بخش میانی ستون ها مشاهده می شود مربوط به آنتی بادی های ضد لیپوپلی ساکارید (LPS) بروسلا است. یک باند ۱۴ کیلو دالتونی نیز در همه نمونه ها (بیمار و سالم) مشاهده می شود.



شکل ۳. واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده در ۴۲ درجه سلسیوس با سرم افراد بیمار (نوارهای c وd) و سالم (نوارهای a وb) و مارکر پروتئینی با وزن های مولکولی مختلف بر حسب کیلو دالتون در وسط (۷۸=۱، ۶۶=۲، ۴۵ =۳، ۲۹=۴، ۱۸/۵=۵ ، ۱۴/۵=۶)

واکنش سرم افراد بیمار و سالم با پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک ندیده در شکل ۴ نشان داده شده است. در واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک ندیده با سرم افراد بیمار (نوارهای ۱ و ۲) چندین باند پروتئینی دیده می شود که در واکنش با سرم افراد سالم (نوارهای ۳ و ۴) دیده نمی شود. نکته قابل توجه در واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده با سرم افراد بیمار وجود باند در ناحیه ۶۰ کیلو دالتونی در تمام نمونه هاست که این باند در واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک ندیده با سرم افراد بیمار، ضعیف تر می باشد.



شکل ۴. واکنش پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک ندیده با سرم افراد بیمار (نوارهای۱و۲) و سالم (نوارهای۳ و۴)

بحث و نتیجه گیری

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج الکتروفورز و بلاتینگ پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس شوک دیده و ندیده با سرم افراد بیمار و سالم، نشان دهنده تولید و افزایش سطح hsp ها در شرایط شوک حرارتی و خاصیت آنتی ژنیسیته آنها بخصوص hsp60 می باشد. علاوه بر آنتی‌ژن‌های دیواره سلولی بخصوص غشای خارجی که عمده‌ترین آنتی‌ژن تحریکی هستند (۲)، چندین نوع پروتئین دیگر نیز بعنوان اجزای ایمونولوژیک مهم در بروسلا مطرح شده‌اند (۱۵). چنین آنتی‌ژن‌هایی کاندیدهای مهمی برای تهیه واکسن‌های زیر واحد و نیز تشخیص طبی خواهند بود (۱۶).

پروتئین های شوک حرارتی دسته ای از پروتئین ها هستند که در شرایط شوک حرارتی میزان سنتز آنها در بروسلا افزایش می یابد (۶) و قسمتی از پاسخ بدن علیه این باکتری را به خود اختصاص می دهد. آزمون های سرولوژیکی رایجی که در تشخیص بروسلوز گاوی و انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند، بر اساس تعیین آنتی‌بادی‌های ضد لیپوپلی ساکاریدی است. این آنتی بادی ها حتی بعد از این که بیماران از بیماری بهبودی حاصل می‌کنند در تیتر بالایی باقی می‌مانند (۱۳). از طرف دیگر این تست‌ها واکنش‌های متقاطع قابل توجهی با دیگر باکتریهای گرم منفی دارند (۱۳)، از اینرو از مدت‌ها قبل تلاش‌ها معطوف به یافتن پروتئین‌های عاری از LPS شده تا بتوان از آنها در تشخیص دقیق‌تر بیماری استفاده نمود. بررسی الگوی پروتئین های شوک حرارتی بروسلا آبورتوس شوک دیده و شوک ندیده با استفاده از تکنیک SDS-PAGE و هم چنین بررسی آنتی ژنیسبته این پروتئین‌ها بخصوص hsp60 در مقابل سرم افراد بیمار و سالم با استفاده از تکنیک وسترن بلات به هدف یافتن کاندیدهای آنتی‌ژنی احتمالی جهت استفاده بعدی از آنها در تشخیص بروسلوز به روش هایی همچون الایزا و نیز امکان استفاده از این آنتی ژن ها در واکسن‌های زیر واحد از اهداف این مطالعه بوده است، همانطوریکه Gomez از hsp60 به عنوان واکسن استفاده کرده است (۱۷).

در این مطالعه خصوصیات پروتئین های شوک حرارتی بروسلا آبورتوس شوک دیده در ۳۹، ۴۰ و ۴۲ درجه و باکتری شوک ندیده بررسی شد. اختلاف عمده بین الگوی الکتروفورز در شوک ۴۲ درجه سلسیوس بوده است. در باکتری شوک دیده شده باند بسیار ضخیم‌تری مربوط به hsp60 در مقایسه با باکتری شوک ندیده مشاهده شده است (شکل۱). در مطالعه ای که توسط Lin روی بروسلا آبورتوس انجام شده بود افزایشی در تولید پروتئین 60KDa در باکتریهای شوک دیده مشاهده شده بود که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد (۶). در مطالعه حاضر در شوک‌های حرارتی ۳۹ و ۴۰ درجه سلسیوس اختلافی در باندهای پروتئینی در مقایسه با کنترل مشاهده نشده است که در مطالعه lin نیز تولید hsp ها در حرارت ۴۶-۴۲ درجه سلسیوس در بیشترین حد خود بود. همچنین مدّت زمان شوک حرارتی در این مطالعه ۳ ساعت بوده که بر طبق مطالعه Lin حداکثر پاسخ شوک حرارتی در ۳-۲ ساعت گزارش شده بود. همانگونه که در شکل ۲ می بینید آنتی بادی پلی کلونال با hsp60 بروسلا آبورتوس واکنش داده است که شدت باند مشاهده شده در ایمونو بلاتینگ در باکتری شوک دیده و کنترل متفاوت بوده یعنی باند مشاهده شده در برابر hsp60 بروسلا آبورتوس شوک دیده ضخیم‌تر بوده است (در مقایسه با باکتری کنترل) که این نشاندهنده افزایش سطح آنتی بادی در بدن در نتیجه افزایش سنتز hsp60 می باشد. همچنین آنتی بادی ضد hsp60 با یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۱۴ کیلو دالتون واکنش داده است که احتمالا چون آنتی بادی ضد hsp60، پلی کلونال می باشد با یک پروتئین دیگر واکنش متقاطع نشان داده است.

در ایمونو بلاتینگ پروتئین های باکتری شوک دیده با سرم افراد بیمار و کنترل اختلافات زیادی مشاهده شده است که این باندها در واکنش با سرم افراد کنترل مشاهده نمی‌شود. یک باند در محدوده ۶۰ کیلو دالتونی مشاهده می شود که این نشان دهنده نقش آنتی ژنیک hsp60 و واکنش بدن انسان در مقابل آن می باشد. نتایج این قسمت با تحقیقات Lin و Teixeira (۱۲) هم‌خوانی دارد. در مطالعه عبدالعلی‌زاده، واکنش بین ایمونوژن‌های بروسلا آبورتوس با سرم انسان، بز و خرگوش با استفاده از تکنیک ایمونو بلاتینگ انجام شد (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط مصطفایی و همکاران انجام شد (۱۴) واکنش پروتئین‌های عمده غشاء خارجی بروسلا آبورتوس (سویه S19) و بروسلا ملی تنسیس (سویه 16M) با سرم بیماران به روش وسترن بلات بررسی شد. در تحقیق دیگر توسط مصطفایی و همکاران (۱۸)، واکنش LPS باکتری با سرم انسان مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعات، واکنش قسمتهای مختلف باکتری بروسلا با سرم بررسی شد ولی تاکنون واکنش hsp60 باکتری‌های شوک دیده نسبت به سرم بیماران مبتلا به بروسلوز و افراد سالم مورد مطالعه قرار نگرفته است. همچنین در

www.SID.ir

Archive of SID

یک تحقیق از واکسن DNA کد کننده سوپراکسید دیسموتاز از بروسلا آبورتوس در موش استفاده شده که باعث ایمنی محافظت کننده شده است (۱۵). نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز بستری مناسب برای شناخت پروتئین های آنتی‌ژنی بروسلا و استفاده از آن‌ها در جهت تشخیص دقیق‌تر بیماری در انسان و دام و تشخیص حیوانات آلوده از واکسینه شده باشد که در پیشگیری و کنترل بیماری در دام اهمیت بسزایی دارد. برای مثال می توان از hsp60 بعنوان آنتی ژن در طراحی کیت الایزا استفاده کرد و یا مشابه کار Yunoki (۱۹) می توان از آنتی بادی ضد hsp60 برای تشخیص اولیه بیماری استفاده کرد که البته این موارد مستلزم کارهای تحقیقاتی بیشتر در این زمینه می باشد.

امروزه روش های متداول تشخیص بروسلوز عمدتاً بر پایه یافتن آنتی بادی ضد LPS استوار است که به دلیل تشابه ساختمانی LPS بروسلا با LPS سایر گونه‌های باکتریهای گرم منفی از جمله یرسینیا و اشریشیاکلی از حساسیت بالایی برخوردار نبوده و محدودیت‌های متعددی دارند (۱۳). برای حل این مشکل بخش عمده‌ای از تحقیقات متوجه یافتن آنتی‌ژن‌های پروتئینی اختصاصی‌تر است (۱۳). همان گونه که نتایج مطالعه ما نشان داد hsp60 می‌توانند به عنوان نامزد احتمالی در تشخیص بیماری در انسان و حتی حیوانات از جمله گاو مد نظر قرار گیرد. فراوانی hsp60 در این باکتری میتواند از مزیت‌های این آنتی‌ژن برای روش‌های دقیق‌تری همچون الایزا باشد. همچنین از این آنتی ژن (hsp60) می توان در طراحی و ساخت واکسن زیر واحد استفاده نمود، که برای رسیدن به اهداف مذکور، کارهای تحقیقاتی بیشتری لازم می باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران (دانشکده پزشکی)، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، خانم مریم محمدی، آقای دکتر فیروزجایی، بیمارستان میلاد و مرکز طبی کودکان تهران، تشکر و قدردانی می شود.

****

References

1. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995; 21(2): 283-9.

2. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 1997; 3(2): 213-21.

3. Lin J, Ficht TA. Protein synthesis in brucella abortus induced during macrophage infection. Infect Immun 1995; 63(4): 1409-14.

4. Price RE, Templeton JW, Adams LG. Survival of smooth, rough and transposon mutant strain of brucella abortus in bovine mammary macrophages. Vet Immunol Immunopath 1990; 26(4): 353-65.

5. Jawets E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical microbiology, 23rd ed, United States, Lange 2001; pp: 246-9.

6. Lin J, Adams LG, Ficht TA. Characterization of the heat shock response in brucella abortus and isolation of the genes the GroE heat shock proteins. Infect Immun 1992; 60(6): 2425-31.

7. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. Immunol Today 1990; 11(4): 129-36.

8. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60 KDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system. J Immunol 1999; 162(6): 3212-19.

9. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. Trends Immunol 2001; 22(12): 665-9.

10. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of human heat shock protein 60 (hsp60) and anti-hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. Cell Stress Chaperones 1999; 4(1): 29-35.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۱. مصطفی زاده ا. تعیین سایتوکاینهایTh1 وTh2 در دیابت ملیتوس نوع ۱: پایان نامه تخصصی ایمنی شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۱۳۸۱.

12. Teixeira Gomes AP, Cloeckaert A, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative and acid stress responses in brucella melitensis. Infect Immun 2000; 68(5): 2954-61.

۱۳. عبدالعلی زاده ج. تفکیک پروتئین های پیکره بروسلا آبورتوس (سویه S19) با الکتروفورز دو بعدی و تعیین ایمونوژنهای آن با وسترن بلات: پایان نامه تحصیلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران ۱۳۸۱.

١٤. مصطفایی ع. خالص سازی و مقایسه آنتی ژنهای عمده غشاه خارجی بروسلا آبورتوس (سویه S19) و بروسلا ملی تنسیس (سویه 16M) و بررسی واکنش آن با سرم بیماران با وسترن بلات و الایزا، پایان نامه دکتری تخصصی (PhD)، دانشگاه تربیت مدرس ۱۳۷۸.

15. Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, et al. Cloning of brucella melitensis group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. Infect Immun 1996; 64(7): 2490-9.

16. Onate AA, Cespedes S, Cabrera A, et al. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice. Infect Immun 2003; 71(9): 4857-61.

17. Gomez FJ, Allendoerfer R, Deepe GS Jr. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from histoplasma capsulatum protects mice against pulmonary histoplasmosis. Infect Immun 1995; 63(7): 2587-95.

۱۸. مصطفایی ع، زهیر م ح، تبرایی ب. استخراج و خالص سازی LPS بروسلا. مجله پزشکی کوثر ۱۳۷۹؛ ۵(۱): ۲۱-٦.

19. 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 2002; 7(4): 574-7.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه ایمونولوژی. ٤-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱.

Ramazan69@yahoo.com

www.SID.ir