بررسی خصوصیات پاسخ شوک حرارتی در بروسلاملی‌تنسیس و واکنش پروتئین شوک حرارتی با سرم افراد بیمار و کنترل

*دکتر نور امیرمظفری I

دکتر فریده قاضی II

دکتر امرا... مصطفی‌زاده III

دکتر علی مصطفائی IV

دکتر رمضان رجب‌نیا V

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز، یکی از مهمترین بیماریهای مشترک بین انسان و دام است که بر اثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا(بخصوص بروسلاملی‌تنسیس) به وجود می‌آید. وقتی بروسلا در معرض افزایش درجه حرارت قرار می‌گیرد، پروتئین‌های شوک حرارتی سنتز می‌کند. در این مطالعه، بروسلاملی‌تنسیس تحت شوک حرارتی در حرارتهای مختلف قرار می‌گیرد که تحت این شوک‌ها، Heat Shock Protein(hsp)ها سنتز می‌شوند. سپس با استفاده از روش SDS-PAGE، الگوی سنتز hspها بررسی می‌شود. با استفاده از روش وسترن بلات، ایمونوژنیسیته hsp(hsp60) در مقابل سرم انسان بیمار و کنترل، مورد بررسی قرار می‌گیرد. هدف از این پژوهش، بررسی خصوصیات پاسخ شوک حرارتی در بروسلاملی‌تنسیس پس از شوک در حرارتهای مختلف است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی می‌باشد. ۵ باکتری بروسلاملی‌تنسیس از انسان جدا شد. سپس باکتری‌ها تحت شوک‌های حرارتی در ۳۹، ۴۰ و ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. استخراج پروتئین‌های بروسلا با سدیم دود سیل سولفات و لیزوزیم انجام شد. الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم دود سیل سولفات(SDS-PAGE) براساس روش لامی با بعضی تغییرات انجام گرفت. در نهایت با استفاده از روش وسترن‌بلات، ایمونوژنیسیته hsp(hsp60) در مقابل سرم انسان بیمار(مبتلا به بروسلوز) و کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج SDS-PAGE نشان داد که باندهای پروتئینی در محدوده وزنی ۱۰۰-۱۰ کیلودالتون قرار داشتند. عمده‌ترین باندهای پروتئینی، در محدوده وزنی ۷۵-۴۵ و ۳۰-۲۰ و ۲۰-۱۴ کیلودالتون قرار دارند. در باکتری‌های کنترل در محدوده ۶۰ کیلودالتون، باندی مشاهده می‌شود که hsp60 می‌باشد که در حالت طبیعی(کنترل) مقدار آنها کم بود ولی در باکتری‌های شوک دیده، مقدار تولید آنها افزایش قابل چشمگیری داشته است. در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده با سرم افراد بیمار با وسترن بلات، چندین باند پروتئینی دیده می‌شود که در واکنش با سرم افراد کنترل، دیده نمی‌شود و در محدوده ۱۰، ۶۰ و ۱۰۰ کیلودالتون می‌باشد. در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده با سرم افراد بیمار، چندین باند پروتئینی دیده می‌شود که در واکنش پروتئین‌های با سرم افراد کنترل دیده نمی‌شود. نکته قابل توجه در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده با سرم افراد بیمار، وجود باند در ناحیه ۶۰ کیلودالتونی در تمام نمونه‌هاست که این باند در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده با سرم افراد بیمار، در بعضی نمونه‌ها دیده نمی‌شود یا ضعیف‌تر می‌باشد. در شوک‌های حرارتی ۴۰ و ۳۹ درجه سلسیوس، اختلافی در باندهای پروتئینی در SDS-PAGE در مقایسه با کنترل مشاهده نشده است.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ پروتئین‌های باکتری شوک دیده با سرم افراد بیمار و کنترل، نشان‌دهنده افزایش سطح تولید hspها در شرایط شوک و ایمونوژن بودن آنها به خصوص hsp60 می‌باشد و بیانگر واکنش سرولوژیک بدن انسان در مقابل hsp60 می‌باشد. احتمالاً می‌توان از hsp60 به عنوان آنتی‌ژن در تست الایزا یا در طراحی واکسن‌های زیرواحد استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – بروسلاملی‌تنسیس ۲ – شوک حرارتی ۳ – پروتئین

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۲۷، تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۱۰

I) دانشیار و PhD میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

II) دانشیار و PhD بیولوژی ملکولی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

III) استادیار و PhD ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی بابل، بابل، ایران.

IV) دانشیار و PhD ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

V) استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی بابل، بابل، ایران.

مقدمه

بروسلوز، یک از مهمترین بیماریهای مشترک بین انسان و دام است که بر اثر آلودگی با باکتری‌های جنس بروسلا به وجود می‌آید. بروسلاملی تنسیس و بروسلا آبورتوس عمده‌ترین گونه‌های عامل بروسلوز در انسان و دام هستند.[۱و ۲]

بروسلاملی‌تنسیس پاتوژنیسیته بیشتری نسبت به بروسلا آبورتوس دارد. بروسلاها، کوکوباسیل‌های گرم منفی داخل سلولی اختیاری هستند که سلولهای بیگانه خوار و غیربیگانه خوار را آلوده می‌سازند.[۳و ٤] این باکتری‌ها اسپور و اگزوتوکسین مشخصی ندارند.[٥] ویرولانس بروسلا، نتیجه یک پدیده چندفاکتوری است. شرایط محیطی و داخل سلولی باکتری‌ها، موجب تغییراتی در مقدار بیان پروتئین‌ها می‌شود. واکنشهای متقابل میزبان ـ پاتوژن در طول عفونت، باکتری‌ها را در معرض استرس‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی مختلف قرار می‌دهد[٦] و باکتری‌های داخل سلولی به تغییرات در محیط اطراف سازش می‌یابند. این امر، مانع از بین رفتن باکتری‌ها توسط سیستم‌های دفاعی سلول میزبان می‌شود. یکی از این شرایط، شوک حرارتی است که وقتی بروسلا در معرض افزایش درجه حرارت قرار می‌گیرد، پروتئین‌های شوک حرارتی(Heat Shock Protein) سنتز می‌شوند که احتمالاً یکی از فاکتورهای پاتوژنز در این باکتری‌ها می‌باشد. پاسخهای شوک حرارتی در سطح بالایی محافظت شده است و احتمالاً به ارگانیسم‌ها این اجازه را می‌دهد که به محیط‌های استرس‌زا سازش یابند و شانس زنده‌ماندن باکتری و انتشار آن افزایش یابد.[٦]

بعضی از hspها(اعضای خانواده Gro EL)، در طول عفونت به شدت توسط سیستم ایمنی میزبان شناسایی می‌شوند و پاسخ ایمنی بر علیه این پروتئین‌ها احتمالاً می‌تواند، ایمنی محافظت کننده در میزبان ایجاد کند. مهمترین عضو خانواده Gro EL، پروتئین شوک حرارتی ٦٢ کیلودالتونی(hsp62) می‌باشد.[٦] هدف از این پژوهش، بررسی خصوصیات پاسخ شوک حرارتی در بروسلاملی‌تنسیس پس از شوک در حرارتهای مختلف می‌باشد.

روش بررسی

این نوع مطالعه از نوع توصیفی ـ تحلیلی می‌باشد. در این مطالعه، ٥ سویه باکتری بروسلاملی‌تنسیس از انسان جدا شد. برای تهیه نمونه بالینی از بیماران مشکوک به بیماری بروسلوز مراجعه کننده به آزمایشگاه یا بستری در بیمارستان، با رعایت شرایط استریل مقدار ٥ میلی‌لیتر خون گرفته شده و به محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن براث منتقل و محیط مذکور مدت چهار هفته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. همچنین، مقداری از خون بیمار به لوله آزمایش برای جداسازی سرم اضافه شد. در خلال این چهار هفته، مقداری از محیط BHI برداشته و بر روی پلیت محتوی محیط بروسلا آگار حاوی ٥ درصد خون گوسفند، کشت داده شد. سپس پلیت‌های مذکور به جار Co2 منتقل و گرم‌خانه‌گذاری(مدت زمان ۷۲-٤۸ ساعت، حرارت ۳۷ درجه سلسیوس) گردید. پس از این مدت، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری و خصوصیات کلنی کنترل و بررسی شدند.[۱] سرانجام پس از رشد باکتری از کلنی‌های تک ایزوله شده، لام رنگ‌آمیزی گرام تهیه می‌گردید. سپس تست‌های بیوشیمیایی(MR، VP و TSI، اوره، اکسیداز و کاتالاز) انجام می‌شد. جهت بررسی رشد باکتری، در حضور رنگ از محیط کشت واجد کلنی تک در زیر هود آزمایشگاهی کلاس II کنار شعله بر روی محیط محتوی غلظتهای مختلف از رنگ فوشین و تیونین کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌های مذکور به مدت ۷۲-٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در حضور Co2 گرم‌خانه گذاری گردید.[۲]

شوک‌های حرارتی: ابتدا باکتری‌ها در محیط بروسلا آگار کشت داده شده و ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در جار Co2 قرار می‌گرفتند. بعد از آن، از محیط کشت بروسلا آگار به محیط کشت بروسلا براث کشت داده شدند. از هر باکتری، در دو محیط کشت بروسلا براث ۰/٥ لیتری کشت داده شدند. محیط بروسلا براث در دمای ۳۷ درجه سلسیوس اتووگذاری می‌شدند تا زمانی که OD600nm محیط کشت به ۱ برسد[۷](کدورت آن با کدورت استاندارد ۷ مک فارلند برابر شود). سپس باکتری‌ها تحت شوک‌های

حرارتی در ۳۹، ۴۰ و ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند.[۷] بدین ترتیب که از دو محیط کشت مربوط به هر باکتری، یکی به عنوان کنترل ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس باقی می ماند و محیط دیگر ۳ ساعت در شرایط شوک قرار می‌گرفت.[۷]

در این تحقیق، هر باکتری در سه درجه حرارت(۳۹، ۴۰، ۴۲ درجه سلسیوس) مورد شوک حرارتی قرار گرفته و برای هر مرتبه هم لوله کنترل در نظر گرفته شد. پس از آن، ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰xg سانتریفوژ گردیدند. بعد از دورریزی مایع رویی، رسوب ۲ بار با سرم فیزیولوژی شستشو گردیده و بار سوم با بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ شستشو گردید. در نهایت، برای کشتن باکتری‌ها، رسوب در ۲میلی‌لیتر از بافر فوق به تعلیق در آمده و ۵ برابر حجم آن، استن سرد اضافه شد و به مدت ۷-۵ روز در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. باکتری‌ها با سانتریفوژ در ۵۰۰۰xg به مدت ۳۰ دقیقه رسوب داده شدند و پس از تبخیر استن، در فریزر نگهداری شدند.

استخراج پروتئین‌های بروسلا با سدیم دود سیل سولفات و لیزوزیم: اساس انجام این آزمایش، روش رزنباخ با بعضی تغییرات بود. در این روش، اکثر پروتئین‌های پیکره باکتری استخراج می‌شود. این موضوع، عمدتاً به دلیل تاثیر سدیم دودسیل سولفات(SDS) در حل کردن بخش‌های آب گریز و اثر لیزوزیم در هضم لایه پپتید و گلیکان است.[۸]

ابتدا باکتری‌ها، ۲ مرتبه با بافر تریس نمکی TBS(محلول ۲۰ میلی‌مولار تریس و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl با pH=۷/۵) شستشو داده شدند سپس ۰/۱۶ گرم باکتری تر در ۶۴۰ میکرولیتر TBS به تعلیق در آمد. فنیل متیل سولفونیل فلورید(PMSF) و اتیلن دی‌آمین تترااستات(EDTA) هر یک در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه شد. ۴/۸ میلی‌لیتر بافر تخریب کننده(بافر تریس باز ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ حاوی دو درصد محلول SDS، گلیسرول ۱۰ درصد و ۲-ME ۰/۷ مولار) اضافه گردید، سپس باکتری ۴ ساعت در حمام ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از خنک شدن محلول، لیزوزیم(یک میلی‌گرم بازاء هر ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک باکتری) اضافه گردید و یک شب در گرم‌خانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس محلول، ۱۰ دقیقه در ظرف آب جوش قرار گرفت و سپس ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰۰xg سانتریفوژ شد. مایع رویی در حجم‌های کوچک تقسیم و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. سپس، کلیه نمونه‌ها مورد الکتروفورز توسط SDS-PAGE قرار گرفته و الگوی پروتئینی در باکتری‌های کنترل و شوک دیده بررسی شدند. الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دود سیل سولفات(SDS-PAGE:(SDS-PAGE براساس روش لاملی با بعضی تغییرات، بسته به هدف آزمایش انجام گرفت.[۸]

صفحات شیشه‌ای با کمک فاصله اندازها و گیره‌های مربوط، روی هم سوار شدند. ۰/۲ میلی‌لیتر محلول آگارز داغ چندین بار در کناره‌های قالب شیشه‌ای چرخانده شد. حجم مورد نیاز از ژل جداکننده(ژل پایین) با مخلوط کردن اجزای آن تهیه گردید. اجزای ژل پایین و حجم مورد نیاز آنها برای تهیه ۸ میلی‌لیتر شامل ۲ میلی‌لیتر بافر ژل پایین، ۳/۵۶۵ میلی‌لیتر استوک اکریل آمید، ۲/۳۳۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۰۵ میلی‌لیتر پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد و ۰/۰۵ میلی‌لیتر TEMED ۱۰ درصد بوده است. سپس، ژل در حد فاصل صفحات شیشه‌ای تا ارتفاع مناسب ریخته شد. ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به آرامی از کناره شیشه روی سطح ژل اضافه گردید. پس از انعقاد ژل پایین، ۳ میلی‌لیتر ژل بالا با غلظت ۵ درصد(شامل ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر ژل بالا، ۰/۴۹ میلی‌لیتر استوک اکریل آمید، ۱/۷۶ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۰۵ میلی‌لیتر پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد و ۰/۰۵ میلی‌لیتر TEMED ۱۰ درصد) اضافه گردید. آب روی ژل پایین، تخلیه و تا ارتفاع مناسب از ژل بالا در حد فاصل شیشه‌ها ریخته شد. شانه مربوطه، در ژل بالا فرو برده شد. پس از انعقاد ژل بالا، شانه و فاصله انداز پایین جدا شدند و کاست شیشه‌ای به تانک الکتروفورز متصل شد. یک حجم بافر نمونه به یک حجم نمونه اضافه شد و ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه با سرنگ هامیلتون درون چاهک‌ها ریخته شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۵۰ ولت تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل بالا و سپس با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت تا

رسیدن رنگ نشانگر به چند میلی‌متری انتهای ژل پایین صورت گرفت. رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید با کوماسی آبی R-250 رنگ‌آمیزی شدند.[۸] ژل SDS-PAGE در اسید استیک ۱۰ درصد نگهداری شد.

ایمونوبلاتینگ(وسترن بلات): در این مطالعه، ۱۰ نمونه سرم انسانی از بیماران مبتلا به بروسلوز دارای کشت مثبت بروسلا مراجعه کننده به آزمایشگاه جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها، دارای تیتر رایت لوله‌ای حداقل ۱:۳۲۰ و تیتر 2-ME رایت حداقل ۱:۱۶۰ بودند. بلاتینگ با روش انتقال در تانک صورت گرفت. این روش، به طور معمول در بافر تریس گلیسین که ابتدا توسط Towbin ارائه شد، انجام گرفت.[۹]

انتقال در تانک: مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر انتقال(شامل تریس ۲۵ میلی‌مولار، گلیسین ۱۹۲ میلی‌مولار با pH=۸/۳، حاوی متانول ۱۵ درصد) در یک ظرف شیشه‌ای تمیز ریخته شد. بخش متراکم کننده ژل بریده شد و ژل ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرار گرفت. یک ورقه از کاغذ پلی‌وینیلیدن دی فلورید (PVDF) به اندازه ژل بریده شد. کاغذ PVDF با متانول خیس گردید و در ظرف حاوی بافر انتقال قرار گرفت. چندین لایه کاغذ صافی با ابعاد متناسب با ژل تهیه و همراه اسفنج‌ها در بافر خیس شد. سپس ژل پلی‌اکریل‌آمید و ورقه PVDF به صورت ساندویچ بین ۳ لایه کاغذ واتمن و یک لایه اسفنج در هر طرف قرار داده شدند. مجموعه بلات در قالب پلاستیکی مربوطه محکم شد و در تانک بلات حاوی بافر انتقال قرار گرفت.

انتقال به مدت نیم ساعت در شدت جریان ثابت ۷۵ میلی‌آمپر، سپس به مدت نیم ساعت در شدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی‌آمپر، پس از آن یک ساعت و نیم در شدت جریان ۲۰۰ میلی‌آمپر و نهایتاً یک و نیم ساعت در شدت جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر انجام گرفت.

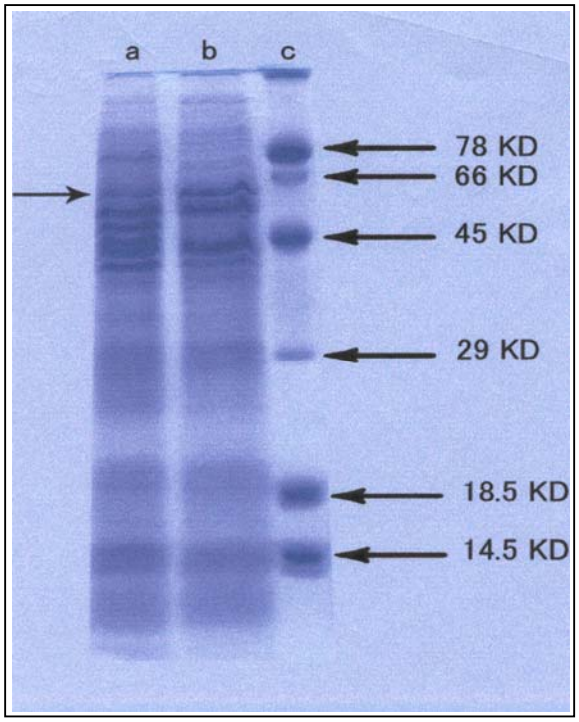
مرحله تشخیص با کمک آنتی‌بادی: پس از انتقال، غشاء به مدت ۱۰ دقیقه در بافر فسفات نمکی حاوی توئین ۰/۵ درصد(PBS-T1) قرار گرفت. سپس ٤ بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی توئین ۰/۰۵ درصد(PBS-T2) شستشو شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی اولیه انسانی قرار گرفت. غشا ٤ بار و هر بار ۵ دقیقه با PBS-T2 شستشو شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه(کونژوگه با پراکسیداز) قرار گرفت. غشا ٦-۵ بار و هر بار ۵ دقیقه با PBS-T2 شستشو شد و سپس در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترا(دی‌آمینو 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.[۹]

یافته‌ها

در این مطالعه، ۵ سویه بروسلا ملی‌تنسیس از انسان جدا شد. تست‌های تشخیصی لازم برای تشخیص نهایی این باکتری‌ها انجام گردید. همه باکتری‌ها تحت شوک حرارتی در ۳۹، ٤۰ و ٤۲ درجه سلسیوس قرار گرفتند. یک سویه از هر باکتری بدون شوک به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس پروتئین باکتری، استخراج شده و SDS-PAGE صورت گرفت. الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده در ٤۲ درجه سلسیوس و کنترل در شکل شماره ۱ نشان داده شده است(سمت راست مارکر پروتئینی، سمت چپ باکتری شوک ندیده و باند وسط باکتری شوک دیده). باندهای پروتئینی در محدوده وزنی ۱۰۰-۱۰ کیلودالتون قرار دارند.

عمده‌ترین باندهای پروتئینی در محدوده وزنی ۷۵-٤۵ و ۳۰-۱٤ کیلودالتون قرار دارند. در بروسلاملی‌تنسیس‌های شوک دیده شده در ٤۲ درجه سلسیوس، بعضی پروتئین‌های جدیدی ظاهر شدند و همچنین بعضی از پروتئین‌ها مقدار تولیدشان افزایش یافت.

در کنترل، یک باند در محدوده ۷۸ و یک باند در محدوده ٤۵-٤۰ کیلودالتون وجود دارد که در شوک دیده مشاهده نمی‌شود. همچنین، در باکتری‌های کنترل، در محدوده ٦۰ کیلودالتون باندی مشاهده می‌شود که hsp60 می‌باشد که در حالت طبیعی(کنترل)، مقدار آنها کم بوده؛ ولی در باکتری‌های شوک دیده شده، مقدار تولید آنها افزایش قابل چشمگیری داشته است.



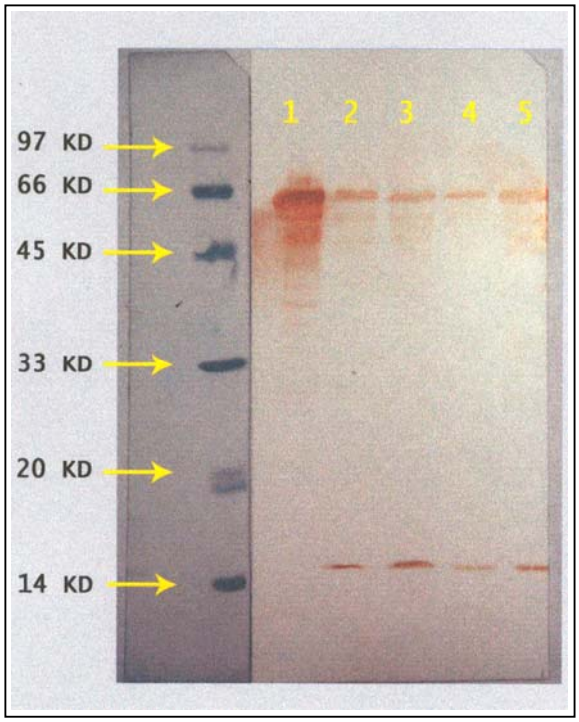
شکل شماره ۱– الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده و شوک دیده در ٤٢ درجه سلسیوس. a باکتری شوک ندیده(فلش در این ردیف محل hsp60 را نشان می‌دهد)، b باکتری شوک دیده و c مارکر پروتئینی با وزن‌های مولکولی مختلف بر حسب کیلو دالتون را نشان می‌دهد.

ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده در ٤٢ درجه سلسیوس و شوک ندیده با سرم افراد بیمار و سالم: در این مطالعه، ابتدا hsp60 مربوط به اشریشیاکلی و آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد آن از شرکت Stress gene خریداری شده و جهت اثبات وجود hsp60 در باکتری‌های مورد نظر، بلات گذاشته شد.

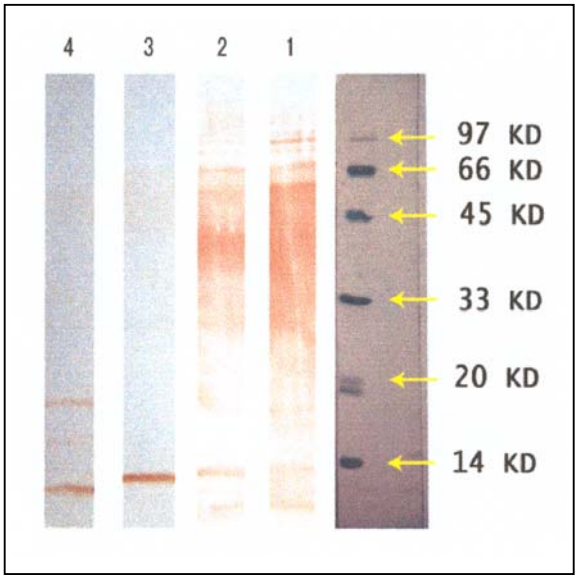
Hsp60 به عنوان کنترل و همچنین نمونه‌های بروسلای شوک دیده و ندیده در تکنیک بلاتینگ با آنتی‌بادی ضد hsp60 مجاور شدند که نتیجه آن در شکل شماره ۲ آمده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود آنتی‌بادی پلی‌کلونال با hsp60 بروسلاملی‌تنسیس واکنش داده شده است.

آنتی‌بادی ضد hsp60 با یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ١٤ کیلودالتون واکنش داده شده است.

پس از تفکیک پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده در ٤٢ درجه سلسیوس و کنترل به روش SDS-PAGE، باندهای پروتئینی به صفحات PVDF انتقال داده شدند(بلاتینگ). سپس، واکنش سرم انسان بیمار و سالم با پروتئین‌ها مورد آزمون و مقایسه قرار گرفت که نتیجه آن در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این دو شکل مشاهده می‌شود در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی تنسیس شوک دیده با سرم افراد بیمار، چندین باند پروتئینی دیده می‌شود(نوارهای شماره ۱ و ۲) که در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده با سرم افراد کنترل دیده نشد(نوارهای شماره ۳ و ٤) و در محدوده ۱۰، ٦۰ و ۱۰۰ کیلو دالتون می‌باشد. الگوی رنگ اسمیر مانندی که در قسمت بالا و بخش میانی ستون‌ها مشاهده می‌شود، مربوط به آنتی‌بادی‌های ضد LPS بروسلا است. یک باند ١٤ کیلو دالتونی نیز در همه نمونه‌ها(بیمار و کنترل) مشاهده می‌شود.



شکل شماره ۲– واکنش hsp60 بروسلاملی‌تنسیس و بروسلا آبورتوس با آنتی‌بادی ضد hsp60 اشریشیاکلی: سمت چپ مارکر پروتئینی ۱=hsp60 تهیه شده از شرکت stress gene کانادا ۲= باکتری شوک دیده بروسلاملی‌تنسیس ۳= باکتری شوک ندیده بروسلاملی‌تنسیس



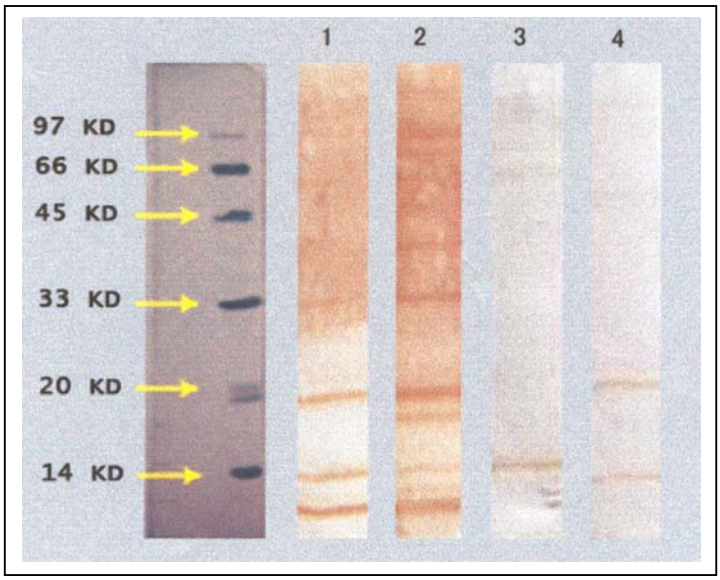
شکل شماره ۳- واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده در ٤٢ درجه سلسیوس با سرم افراد بیمار(نوارهای شماره ۱و ۲) و سالم(نوارهای شماره ۳و ٤)

پروتئینی دیده می‌شود که در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی تنسیس شوک ندیده با سرم افراد کنترل(نوارهای شماره ۳و ٤) دیده نمی‌شود.

نکته قابل توجه در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده با سرم افراد بیمار وجود باند در ناحیه ٦٠ کیلو دالتونی در تمام نمونه‌ها است، که این باند در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده با سرم افراد کنترل، در بعضی نمونه‌ها دیده نمی‌شود یا ضعیف‌تر می‌باشد.

بحث

علاوه بر آنتی‌ژن‌های دیواره سلولی به خصوص غشای خارجی که عمده‌ترین آنتی‌ژن تحریکی هستند[۲]، چندین نوع پروتئین دیگر نیز به عنوان اجزای ایمونولوژیک مهم در بروسلا مطرح شده‌اند. چنین آنتی‌ژن‌هایی کاندیدهای مهمی



شکل شماره ۴- واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده با سرم افراد بیمار(نوارهای شماره ۱و ۲) و سالم(نوارهای شماره ۳و ٤)

واکنش سرم انسان بیمار و سالم با پروتئین‌های پیکره بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده در شکل شماره ٤ نشان داده شده است.

در واکنش پروتئین‌های پیکره بروسلاملی تنسیس شوک ندیده با سرم افراد بیمار(نوارهای شماره ۱ و ۲)، چندین باند برای تهیه واکسن‌های زیر واحد و نیز تشخیص طبی خواهند بود.[۱۰] تلاشهای زیادی برای تهیه این آنتی‌ژن‌ها انجام شده است.[۱۱]

پروتئین‌های شوک حرارتی، دسته‌ای از پروتئین‌ها هستند که در شرایط شوک حرارتی، میزان سنتز آنها در بروسلا

افزایش می‌یابد[۱۲] و قسمتی از پاسخ بدن علیه این باکتری را به خود اختصاص می‌دهد. آزمونهای سرولوژیکی رایجی که در تشخیص بروسلوز گاوی و انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند، براساس تعیین آنتی‌بادی‌های ضد لیپوپلی‌ساکاریدی است. این آنتی‌بادی‌ها، حتی بعد از اینکه بیماران از بیماری بهبودی حاصل می‌کنند، در تیتر بالایی باقی می‌مانند.[۸]

از طرف دیگر، این تستها واکنش‌های متقاطع قابل توجهی با دیگر باکتری‌های گرم منفی دارند.[۸] از این رو از مدتها قبل، تلاش‌ها معطوف به یافتن پروتئین‌های عاری از LPS شده تا بتوان از آنها در تشخیص دقیق‌تر بیماری استفاده نمود.

بررسی الگوی پروتئین‌های شوک حرارتی بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده و شوک ندیده با استفاده از تکنیک SDS-PAGE و همچنین، بررسی ایمونوژنسیته این پروتئین‌ها به خصوص hsp60 در مقابل سرم انسان بیمار و سالم با استفاده از تکنیک وسترن بلات به هدف یافتن کاندیدهای آنتی‌ژنی جهت استفاده بعدی از آنها در تشخیص بروسلوز با روشهایی همچون الایزا و نیز امکان استفاده از این ایمونوژن‌ها در واکسن‌های زیر واحد از اهداف این مطالعه بوده است، همان طوری که Gomez از hsp60 به عنوان واکسن استفاده کرده است.[۱۳]

در این مطالعه، خصوصیات پروتئین‌های شوک حرارتی بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده در ۳۹، ۴۰ و ۴۲ درجه و باکتری شوک ندیده انجام شد. اختلاف عمده بین الگو الکتروفورز در شوک ۴۲ درجه سلسیوس، یک افزایش در تولید بعضی پروتئین‌ها به خصوص پروتئین ۶۰ کیلودالتونی بوده است که در باکتری شوک دیده شده، باند ضخیم‌تری مربوط به hsp60 در مقایسه با باکتری شوک ندیده مشاهده شده است(شکل شماره ۱).

همچنین در کنترل، دو باند در محدوده‌های ۷۸ و ۴۵-۴۰ کیلودالتون وجود دارد که در باکتری شوک دیده مشاهده نمی‌شود.

این نتایج، با مطالعه Jyhshium Lin همخوانی دارد.[۶] در آن مطالعه نیز که روی بروسلا آبورتوس انجام شده است، یک افزایش تولید پروتئین 60KDa در باکتری‌های شوک دیده، مشاهده شده است.

در مطالعه حاضر، در شوک‌های حرارتی ۴۰ و ۳۹ درجه سلسیوس اختلافی در باندهای پروتئینی در SDS-PAGE در مقایسه با کنترل مشاهده نشده است.

در مطالعه Jyhshium Lin نیز، تولید hspها در حرارت ۴۶-۴۲ درجه سلسیوس در بیشترین حد خود بود. همچنین، مدت زمان شوک حرارتی در این مطالعه ۳ ساعت بود که بر طبق مطالعه Jyhshium Lin، حداکثر پاسخ شوک حرارتی در ۳-۲ ساعت گزارش شده است.[۶]

در این مطالعه، hsp60 مربوط به اشریشیاکلی و آنتی‌بادی پلی کلونال ضد آن از شرکت Stress gene خریداری شده و جهت اثبات وجود hsp60 در باکتری‌های مورد نظر، بلات گذاشته شد.

پروتئین خالص hsp60، به عنوان کنترل و همچنین نمونه‌های بروسلای شوک دیده و ندیده در تکنیک بلاتینگ با آنتی‌بادی ضد hsp60 مجاور شدند که نتیجه آن در شکل ۲ آمده است.

همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود، آنتی‌بادی پلی کلونال با hsp60 بروسلاملی‌تنسیس واکنش داده است که شدت باند مشاهده شده در بلاتینگ در باکتری شوک دیده و کنترل، متفاوت بوده؛ یعنی باند مشاهده شده در برابر hsp60 بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده ضخیم‌تر بوده است(در مقایسه با باکتری کنترل) که این نشان‌دهنده افزایش سنتز hsp60 در شرایط شوک حرارتی می‌باشد. همچنین، آنتی‌بادی ضد hsp60 با یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۱۴ کیلودالتون واکنش داده است که احتمالاً چون آنتی‌بادی ضد hsp60، پلی کلونال می‌باشد با یک پروتئین دیگر واکنش متقاطع نشان داده است.

برای بررسی واکنش پروتئین‌های بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده و ندیده با سرم افراد بیمار و سالم، ابتدا بلاتینگ از نمونه‌های SDS-PAGE، به روش انتقال در تانک انجام گرفت[۸] و سپس وسترن بلاتینگ و ایمونوبلاتینگ در مقابل

سرم انسانی صورت گرفت. مقایسه واکنش پروتئین‌های بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده و ندیده با سرم افراد بیمار و کنترل در شکلهای ۳ و ٤ آمده است.

در بلاتینگ پروتئین‌های باکتری شوک دیده با سرم افراد بیمار، چندین باند به خصوص در نواحی ۱۰، ٦۰ و ۱۰۰ کیلودالتونی مشاهده شده است که این باندها در واکنش با سرم افراد کنترل مشاهده نمی‌شود. این نشان‌دهنده ایمونوژن بودن hsp60 و واکنش بدن انسان در مقابل hsp60 می‌باشد. همچنین، در بلاتینگ پروتئین‌های باکتری شوک ندیده با سرم افراد بیمار نیز چندین باند در نواحی ۱۰، ۲۰، ۳۳و ٦۰ کیلودالتونی مشاهده شده است که این باندها در واکنش با افراد کنترل دیده نمی‌شود.

نتایج این قسمت با تحقیقات Jyhshium Lin[٦] و Ana PT[۷] نیز همخوانی داشته و بنابراین می‌توان از hsp60 به عنوان آنتی‌ژن احتمالی در تست الایزا استفاده کرد. همچنین، در وسترن بلاتینگ پروتئین‌های باکتری شوک دیده با سرم افراد بیمار و کنترل چندین باند مشاهده می‌شود که این باندها در واکنش با سرم افراد کنترل مشاهده نمی‌شود.

نکته قابل توجه دیگر در این دو شکل، در مقایسه واکنش پروتئین‌های بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده و ندیده با سرم افراد بیمار این است که در واکنش پروتئین‌های بروسلاملی‌تنسیس شوک دیده با سرم افراد بیمار، وجود باند در ناحیه ٦۰ کیلو دالتونی در تمام نمونه‌هاست که این باند در واکنش پروتئین‌های بروسلاملی‌تنسیس شوک ندیده با سرم افراد بیمار، ضعیف‌تر بوده و یا در بعضی نمونه‌ها دیده نمی‌شود. این نشان‌دهنده افزایش سطح آنتی‌بادی در بدن، در اثر افزایش سطح hsp60 توسط باکتری می‌باشد.

در یکی از این مطالعات که توسط جلال عبدالعلی‌زاده و همکاران انجام شده، واکنش بین ایمونوژن‌های بروسلا آبورتوس با سرم انسان، بز و خرگوش با استفاده از تکنیک ایمونوبلاتینگ انجام شده است.[۸] همچنین، در مطالعه‌ای دیگر که توسط دکتر علی مصطفایی و همکاران انجام شد[۹] واکنش پروتئین‌های عمده غشاء خارجی بروسلا آبورتوس(سویه S19) و بروسلاملی‌تنسیس(سویه 16M) با سرم بیماران با وسترن بلات بررسی شد. همچنین، در بررسی دیگر توسط دکتر علی مصطفایی و همکاران[١٤]، واکنش LPS باکتری با سرم انسان بررسی گردید.

در مطالعات ذکر شده، قسمتهای مختلف باکتری بروسلا با سرم واکنش داده شد، ولی ظاهراً تاکنون واکنش hsp60 باکتری‌های شوک دیده نسبت به سرم انسان بیمار و سالم برای بروسلاملی‌تنسیس انجام نشده و ظاهراً این اولین کار در این زمینه می‌باشد. همچنین در یک تحقیق، از واکسن DNA کد کننده سوپراکسید دیسموتاز از بروسلا آبورتوس در موش استفاده شده که باعث ایمنی محافظت کننده شده است.[۱۰]

این نتایج می‌تواند زمینه‌ساز بستری مناسب برای شناخت پروتئین‌های 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 می‌توان از hsp60 به عنوان آنتی‌ژن در تست الایزا استفاده کرد و یا مشابه کار Naoko[۱۵]، می‌توان از آنتی‌بادی ضد hsp60 برای تشخیص اولیه بیماری استفاده کرد که البته این موارد مستلزم کارهای تحقیقاتی بیشتر در این زمینه‌ها می‌باشد.

امروزه روشهای متداول تشخیص بروسلوز عمدتاً بر پایه یافتن آنتی‌بادی 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.[۸] برای حل این مشکل، بخش عمده‌ای از تحقیقات متوجه یافتن آنتی‌ژن‌های پروتئینی اختصاصی‌تر است.[۸]

همان گونه که نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد hsp60 می‌تواند به عنوان نامزد پروتئینی تشخیص بیمار در انسان و حتی حیوانات از جمله بز و گوسفند، مد نظر قرار گیرد.

فراوانی مقدار نسبی hsp60 در پیکره باکتری از مزیت‌های این نامزد آنتی‌ژنی برای روش‌های دقیق‌تری همچون الایزا و یا استفاده از hsp60 به عنوان واکسن زیر واحد محسوب می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده در SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ پروتئین‌های باکتری شوک دیده با سرم افراد بیمار و کنترل، نشان‌دهنده افزایش سطح تولید hspها در شرایط شوک و ایمونوژن بودن آنها به خصوص hsp60 می‌باشد و بیانگر واکنش سرولوژیک بدن انسان در مقابل hsp60 می‌باشد. احتمالاً می‌توان از hsp60 به عنوان آنتی‌ژن در تست الایزا یا در طراحی واکسن‌های زیرواحد استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران(دانشکده پزشکی)، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، کارکنان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل(بخصوص خانم محمدی)، آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر فیروزجایی، بیمارستان میلاد و مرکز طبی کودکان که همکاری صمیمانه‌ای داشته‌اند.

فهرست منابع

1- Yang EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect dis 1995; 3: 213-218.

2- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect dis 1997; 3: 213-218.

3- Lin J, Ficht TA. Protein synthesis in brucella abortus induced during macrophage infection. Infect Immun 1995; 63: 1409-1414.

4- Price RE, Templeton JW, Adams LG. Survival of smooth, rough and transposon mutant strain of brucella abortus in bovin mammary macrophage. Vetenary Immunopath 1990; 26: 252-365.

5- Jawets E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical microbiology. 23 rd ed. United States: Lange; 2003. p. 245-50.

6- Jyhshium L, Adams LG, Ficht TA. Characterization of the Heat shock Response in brucella abortus and Isolation of the Genes for GroE heat shock Proteins. Infect Immun 1992; 60(6): 2425-2431.

7- Ana PT, Axel A, Michel SZ. Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in Brucella melitensis. Infect Immun 2000; 68: 2954-2961.

۸- عبدالعلی‌زاده جلال. تفکیک پروتئین‌های 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، سال ۱۳۸۱، صفحات ۸۵-۶۷.

۹- مصطفایی علی. خالص‌سازی و مقایسه آنتی‌ژن‌های عمده غشاء خارجی بروسلا آبورتوس و بروسلاملی‌تنسیس و بررسی واکنش آن با سرم بیماران با وسترن بلات و الایزا: پایان‌نامه دکتری تخصصی، دانشگاه تربیت مدرس، سال ۱۳۷۸، صفحات ۷۹-۷۰.

10- Angel A, Sandra C, Alex C, Rodelfo R, Andres G, Garola M, et al. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of brucella abortus induces protective immunity in BALB/c Mice. Infect Immun 2003; 71: 4857-4861.

11- Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD. Snellings NJ, Rubin FA, Vandeverg LL, et al. Cloning of Brucella melitensis group 3 antigen gene encoding omp28. Infect Immun 1996; 64: 2490-2499.

12- Kaufmann SHE. Heat Shock Proteins and the immune response. Immunol Today 1990; 4: 129-131.

13- Gomez FJ, Alllendoerfer R, Deepe Jr. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from histoplasma capsulatum protects mice against pulmonary histoplasmosis. Infect Immun 1995; 63: 2587-2595.

۱٤- مصطفایی علی، زهیر محمدحسن، تبرایی بهمن. استخراج و خالص‌سازی لیپوپلی‌ساکارید بروسلا، مجله پزشکی کوثر، سال ۱۳۷۹، جلد ۵، شماره ۱، صفحات ۲٦-۲۱.

15- Naoko Y, Kenji Y, Motowo M, Yoshiro K, Masayasu A, Hiroyuki O, et al. Antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of Helicobacter pylori eradication Treatment. Clin Lab Immunol 2002; 7(4): 574-577.

Characterization of Heat Shock Response in Brucella melitensis and Interaction of Heat Shock Protein with Sick and Healthy Sera

*N. Amir Mozaffari, PhD [I] F. Ghazi, PhD [II] A. Mostafazadeh, PhD [III]
A. Mostafaii, PhD [IV] R. Rajabnia, PhD [V]

Abstract

Background & Aim: Brucella is one of the most important zoonotic diseases and is caused by the members of Brucella genus especially B. melitensis. The bacteria begin to synthesize heat shock proteins(hsp) when facing elevated temperatures. In this investigation, clinical isolates of B. melitensis were subjected to heat shocks and the hsp_s produced were surveyed by SDS-PAGE electrophoresis. The immunogenicity of hsp-60 was then investigated in both sick and healthy sera by Western blot.

Material and Method: In this analytical descriptive study, five B. melitensis isolated from sick people were cultured. The bacterial isolates were subjected to 39, 40, and 42˚C heat shocks and after lysing the cells by lysozome, cell proteins were extracted by SDS(sodium dodecyl sulfate). The extracted proteins were exposed to electrophoresis in SDS-PAGE followed by staining with Coomasie Blue. Finally, antibodies against hsp-60 in control as well as sick sera were surveyed by Western blot.

Results: SDS-PAGE gels revealed protein bands mainly in the range of 10-100 KDa. The major protein groups were in the range of 45-75, 20-30, and 14-20 KDa. The amount of 60 KDa protein band(hsp-60) was significantly enhanced following heat shock in comparison to unheated cells. The sera from Brucellosis patients reacted with several of these cell-derived protein bands in Western blots, none of which were reactive with the sera from healthy individuals. These reactive proteins were in the range of 10, 60, and 100 KDa. The 60 KDa band was the most significant one and showed strong reactions with all Brucellosis serum samples. Significant differences in protein bands were detected by the electrophoresis of the cells subjected to 39 and 40˚C heat shocks in comparison to unheated bacteria.

Conclusion: The SDS-PAGE results indicated that Brucella melitensis begins to synthesize heat shock proteins when facing elevated temperatures. The Western blot protein bands of the heat shocked bacteria incubated with sera from sick and healthy individuals showed striking differences. This observation points to the immunogenic properties of hsp_s, especially the overwhelming response to hsp-60. Therefore, hsp-60 can be a good antigen candidate for ELISA test development as well as for engineering subunit vaccine against Brucella.

Key Words: 1) Brucella melitensis 2) Heat Shock 3) Protein

*I) Associate Professor of Microbiology. Microbiology Department. Faculty of Medicine. Shahid Hemmat Expressway. Shahid Chamran Crossroad. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
II) Associate Professor of Molecular Biology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.
III) Assistant Professor of Immunology. Babol University of Medical Sciences and Health Services. Babol, Iran.
IV) Associate Professor of Immunology. Kermanshah University of Medical Sciences and Health Services. Kermanshah, Iran.
V) Assistant Professor of Microbiology. Babol University of Medical Sciences and Healh Services. Babol, Iran.