مقاله پژوهشی
 مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و رفتارنگان
 سال دوم، جلد 2، شماره اول، 1381

تهیه، خلیص و شناسایی اجزاء آنتی‌زن‌های دفعی - ترشحی

تاکی زوئیته‌های توسکوپلاسمایکوندی سویه RH

سيد حسن عبداللهی ۱

خلاصه
سابقه و هدف: مطالعات قبلی نشان داده است که آنتی‌زن‌های دفعی - ترشحی (E/SA) تاکی زوئیته‌های توسکوپلاسمایا گوندی می‌توانند نقش مهمی در میزان تبیک‌زایی مسیونت میزان در برابر آلودگی جدید به ایجاد ترشح و افتراق مرحله حاد از مزمن توسکوپلاسموز داشته باشند. برای بررسی دقیق تر موارد فوق به اجزاء ترشح‌شده این آنتی‌زن‌ها یکی از هدف مطالعه حاضر تهیه، تخلیص و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده این آنتی‌زن‌ها و تعیین روش مناسب برای این منظور بود.

مواد و روش: ۱۰۰ تاکی زوئیته توسکوپلاسمایا گوندی در دو میلی لیتر میکت ۱۶۴۰۰ (در لوله های دوب پیچ دار) سوپراساین و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تکان مایل قرار گرفتند. سپس محصولات سوپراساین (۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰) و مایع رویی به عنوان محلول حاوی E/SA سپس تحت فرآیند راکتیفیکی انجام دادند. محلول به طریق کروماتوگرافی زل فیتراسیون با استون زل سفیدکس ۲۰۰ به G-150 ابعاد ۲/۵ سانتی‌متر و خروجی ۱ میلی لیتر مایع با سنتوستر به ابعاد ۱۵۰×۲ مایع سانتی‌متر از زل کرومین متیل پروتونی ۱۰ میلی لیتر در ساعت تحت شیب خظی pH تکثیف گردد. بعد از آن اجزاء حاصل به‌روش Native- PAGE کرومافورز شدند.

پایه‌ها: E/SA در زل فیتراسیون به‌سزایی تکثیف شده، اما از کرومافورز مایعات آن در پیک حاصل شد که پیک دوم در کرومافورز به‌روش Native- PAGE بیشتر باند تجزیه گردید. آنالیز نشان می‌دهد که کرومافورز مایعات به‌روش Native- PAGE تشکیل گیرد. (نتایج نشان می‌دهد که کرومافورز مایعات به‌روش Native- PAGE تشکیل گیرد.

مملوکی پروتونی اجزاء با دوگان خوص بالا به همین نسبتاً زیادی حاصل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: توسکوپلاسمایا گوندی، کرومافورزی، تغییر یافته، آنتی‌زن‌های دفعی - ترشحی، کرومافورز

۱* استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و رفتارنگان (به‌وسیله مسئول)
مقدمه

تک‌پلازوماگوندی اجباری از شاخه ای کمپلکس ما بیشتر انسان از دو طریق اکتسابی و مادرزادی به این انتگن مبتلا می‌شود. سیر بیماری در بدن انسان شامل دو مرحله حاد و مزمن است. اگر عوارض و علائم و همچنین انتقال انتگن از مادر به جنین در مرحله حاد رخ می‌دهد. در این موارد تشخیص و افتراق مرحله حاد از مرحله مزمن تک‌پلازوماگوندی از طریق تعیین نوع و عوار اپیتپومه‌پولی‌های اختصاصی به کمک روش‌های سرولوژی با استفاده از آنتی‌ژن‌های غشاهی و سیتوپلاسمی انجکیو‌کوندی و می‌توان دو نوکلاسی همراه است. عبارت این مطالعه به آنتی‌ژن‌های مورد استفاده نسبت می‌دهد.

یپاسه‌روستوکی روш لانکس آکلوتیماتیسیون در برای مطالعه این آنتی‌ژن‌های زنده در سرم‌های تک‌پلازوماگوندی کردن که از روز 14 آلوژ می‌باشد از تک‌پلازوماگوندی و نسبت دارد. همکاران آنتی‌ژن‌های دنی و تک‌پلازوماگوندی در مرحله حاد به کمک روش کاریاچی (1995) و وجود آنتی‌ژن را تا در این مرحله می‌باشد به فاز حاد غشاهی و آن در این مطالعه برای تشخیص انتقال انتگن در مرحله حاد از طریق پیشنهاد نمودند. (13) محبوب‌زاده و همکاران (1379) نشان دادند که دکستر و همکاران در سال 1988 نشان دادند که آنتی‌ژن‌های دنی و تک‌پلازوماگوندی در انسان‌های آنتی‌ژن‌های سرولوژی‌شناسی انتقال نمی‌دهد. در این مطالعه با استفاده از روش‌های سرولوژی با استفاده از آنتی‌ژن‌های دنی و تک‌پلازوماگوندی در این مطالعه برای تشخیص انتقال انتگن در مرحله حاد و مزمن تک‌پلازوماگوندی روش‌های سرولوژی‌شناسی می‌تواند در مواج‌های همزمان با و تشکیل سیتوپلاسمی انجکیو تک‌پلازوماگوندی.
که روش الایزای نقطه‌ای با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم، مایع صفح موش سوری آکومه شده با سویه تکوسپلاسا گوندی، برای تشخیص تکوسپلاسوم در موش صحراى، در ازاره تشخیص (حساسیت 100\%) و اختصاصیت 88\% بالاى می‌باشد (2) نظر به این که برای فرق دقيق تريندهای مختلف اين آنتى ژنها نياز به اجزای تخلصی شده آنها می‌باشد و در مطالعات قليلى مایع صفح موش آلوهده و یا مایع روئی کشت سلولی تاکى زوئیت‌های تکوسپلاسا به‌صورت تركيب كامل به عنوان E/SA به کار رفته، هدف اين مطالعه ارزیابی روش اصلاح شده انکوباسیون نتاکي زوئیت‌های تکوسپلاسا در محیط کشت غیر سلولی E/SA برای تهیه 

کروموفراگی برای تخلص RPMI اين آنتى ژنها و الکتروفورز زيلى اكيرل آمید برای شناسایی اجزاء حاصل جهت کاربرد در مطالعات بعده وود 

مواد و روش‌ها 

مه‌به آنتى زئگای دفی - ترخشى (E/SA) مایع صفح موش‌های سفید کوچک آزمایشگاه موسورى (که سره روز قبل با 10 تاکى زوئیتى سویه تکوسپلاسا گوندی (نهبه شده از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پيژشكى تهران) به روى تزریق داخل صفح موش شده بودن کشیده و چندين بار از سر سرنگ شماره 27 عبر داهد شنا ماکروفاژها پانورد تاکى زوئیت‌ها آرادن شود. میس در 75 گرم به مدت 10 دقیقه سانتی‌فروژ و رسوب حاصل (تاکى زوئیت‌ها) یكبار با سرم فیزیولوژی و دوبار با محيط کشت (ماخت شرکت سیگما) با دور 75 گرم در مدت 10 دقیقه شرکت سیگما با استفاده از لا نویسار

تکه‌تختيل و شناسایی اجزاء...

نهبه آنتى زئگای دفی - ترخشى: 

به حرش Zril تفکيک انکوباسیون را تکوسپلاسم در محیط کشت غیر سلولی تکوسپلاسیون با استفاده E/SA

1- كروموفراگی زئل فیلتراسیون: G-200 

2- Terypan blue 

3- Fetal Calf Serum 

4- Optical Density

Downloaded from journal.rums.ac.ir at 4:27 +0430 on Sunday May 19th 2019
نتایج

نهایی آنتی-زنده‌های دفعی - ترشحی:

پای روش مورد استفاده در این مطالعه از 20 تا 15 میلی‌گرم E/SA بست‌آمد و جمعاً 15 میلی‌گرم آنتی-زنده‌گردد.

تقسیم آنتی-زنده‌های دفعی - ترشحی:

از کرومومگرافی خاکی فیلتراسیون آنتی-زنده‌های دفعی ترشحی حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیت‌ها در محیط G-SFCS کشت بدون RPMI با 200 سه پیک (شکل 1) و کرومومگرافی تیمپو بیون دو پیک حاصل گردید (شکل 2).

![فرم اصلی](https://example.com/attachment)

شکل: ترکیب پیک‌ها حاصل از کرومومگرافی خاکی فیلتراسیون با 200 سه SFC. آنتی-زنده‌های دفعی ترشحی بست آمد. از انکوباسیون تاکی زوئیت‌های تیمپو‌پایین در محیط کشت غیر سلولی 1640 بدون PRM1-1640 دو پیک

�- ۲- کرومومغراتی بصورت یون

ستون از ذل کربوهی در آلیاژ مس‌گرا استفاده، سپس نمونه‌های اضافه شده به ستون ۳ میلی‌لیتر حاوی ۳ میلی‌گرم پروتئین و سرعت جریان خروجی ۵ میلی‌لیتر در سایت تعیین گردید

جداولی تحت شیب pH (تیف ۳ تا ۱۰) صورت گرفت.

نوبه‌ریز مراحل کار مانند ذل فیلتراسیون انجام شد [۳۲، ۱۸].

شناسایی آنتی-زنده‌های دفعی - ترشحی:

۱- SDS-PAGE

۲۰۰ میکرولیتر ترکیب گاز فراکشن با ۴۰ میکرولیتر بافر نمونه حاوی ۲- مکاپتانت، مول و سدیم دندسیل سولفات مخلوط کرده به مدت ۳ دقیقه در بین ماسی ۱۰۰ درجه حرارت داده شد، سپس به کمک سرینگ سه‌هم‌ساخت سدیم به حرارت‌های تغییر شده در ذل منتقل گردید. درصد برای ذل ممکن‌کننده ۳ و برای ذل جدا کننده ۱۰ درصد، ذل جریان الکتریکی در زمان عبور نمونه‌ها از هر ذل به ترتیب ۱۲۰ و ۶۰ ولت بود. پس از پایان الکتروفورز (رزیدن نمونه‌ها به انتهای ذل) ذل با کوماسی بلو رنگ آمیزی و در مقایسه با پروتئین‌های استاندارد (شکل ۳) وس مولکولی هر چرّه (بازدهی تشکیل شده) تعیین گردید.[۳۲]

۲- Native PAGE

۳۰ میکرولیتر بیشتر کار مانند اصلاح روش کلی کار مانند mi پاپتش با این تفاوت که در این روش از ترکیب

1- Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

2- Native- Polyacrylamide Gel Electrophoresis
شکل ۳: تشخیص و شناسایی اجزای تولقوپلاسما در محیط کشت غیر سلوئی ۱۶۴۰۱ بدون FCS.

شناسایی آنتی‌زناهای دفعی - ترمیمی:

شکل ۳-الگوی الکترورفورز ژل پلی اکریل آمید (۱۰۰۰):

PAGE-SDS

۱- تولقوپلاسما ۲- حاصل از اکتوپاسیون تاکی زووتیه‌ها در E/SA - FCS بدون RPMI ۳- رپوتین استاندارد ۴- شماره ۲ با رقی ۸۴۱۷

۲- تکرار شماره ۲ با رقی ۱۰۰۰-رپوتین استاندارد

شکل ۴: الگوی الکترورفورز اجرا Native-PAGE به روش آمده از کرومئوگرافی زل فیلترپاسیون و مابدیده یون حاصل از اکتوپاسیون تاکی زووتیه‌ها در E/SA بدون RPMI یا ناشان می‌دهد که کرومئوگرافی تشخیص یون سه باند می‌باشد در حالی که از فراکشن دوم تاکی فاکشن یک کرومئوگرافی حاصل از اکتوپاسیون زل فیلترپاسیون به رقی ۲۰۰۰ و یک باند تشکیل داده.

شکل ۲: منحنی فراکشن‌های حاصل از کرومئوگرافی مابدیده یون با زل کربوکسی متل و شیب pH آنتی‌زناهای دفعی. ترمیمی با درس آمده از اکتوپاسیون تاکی زووتیه‌ها تولقوپلاسما در محیط کشت غیر سلوئی ۱۶۴۰۱ بدون FCS.
بحث

در مطالعات قبلی تمایل‌های ازدازی تکنیک سلولی تاکی زوئیت‌ها و یا زمان میزان صفحه موش‌های آلووده به توپوزیولاسها از طریق تزریق داخل صفحه به عنوان استفاده شده است. ولی به عنوان مشکلاتی از جمله E/SA آشکار شده است که به پروتئین‌های صفحه موش E/SA حاضر در بر پرتوپاتیما و فیتلراپون E/SA به تهیه تراکم‌های سلولی E/SA این ابزار می‌باشد. ولی در این مطالعات برش E/SA مشکل‌های بسیاری از ابزار و فیتلراپون E/SA به تهیه تراکم‌های سلولی E/SA این ابزار می‌باشد. ولی در این مطالعات برش E/SA مشکل‌های بسیاری از ابزار و فیتلراپون E/SA به تهیه تراکم‌های سلولی E/SA این ابزار Mورد استفاده قرار گرفت. زیرا در این روش علاوه بر حل مشکل آشکار گردید، زمان مورد نیاز برای تهیه آنتی‌زهایه دفعی- ترشحی به میزان قابل توجه کاهش پیدا می‌کند (21، 9، 8) و لیا ب تشخیص تکنیک حاوی E/SA. غلظت FCS افزایش یافته و میزان نسبتاً زیادی از پروتئین موجود در تکنیک را تشکیل می‌دهد که این موضوع باعث می‌شود نمونه‌های از این تکنیک که در مراحل بعدی به کار می‌رود حاوی مقدار کافی نباشد. این ابزار حاوی جرم نمونه به اساس غلظت پروتئین محاسبه می‌شود. همچنین در این مطالعه در الکتروروز فیتلراپون E/SA آبومین
برای تفکیک E/SA توسکوپلاسمای تهیه شده به روش پیشنهادی می‌باشد. آنلاین و عناصر غیر پلمپرهیز آکریل آمد هستند که در مراحل بعدی مشکلاتی را به دنبال دارد. بنابراین روش کرومانتوگرافی زل فیلتراسیون و مبادله یون بکار برده شد.

کازابونه و همکاران (1994) به روش کرومانتوگرافی زل فیلتراسیون با استفاده از زل سفاید کس G-100 ا ق ام به تخلیص E/SA نمودند و فراکنش‌های با وزن مولکولی 145-188 کیلوdalton را گزارش کردند [4]. ولی با توجه به محدوده جداسازی زل مذکور (150-125) لیت دالتون و احتمال وجود اجزایی با اوزان بالاتر، در مطالعه حاضر از زل G-200 با قدرت تفکیک 500-800 کیلوdalton استفاده شد [7].

در کرومانتوگرافی تجویز پیون با زل مایل E/SA، pH آنیونات سولوئر با شیب غلظت پون و استخراج سلول گردید ولی تحت همین شرایط معنی‌داری موارد آنلاین به توسکوپلاسمای به سه جزء تفکیک شد به نظر رسم مسیر کرومانتوگرافی فعال است. ولی مجموعه‌ای الکتریکی ترکیب مثبت E/SA می‌تواند به روش بوده و با زل فوق که یک میادله کننده بی‌تهابه منفی است قابل تفکیک نباشد. بنابراین کرومانتوگرافی با زل کربنات مایل (میادله کننده بی‌تهابه مثبت) و شیب خفیف pH انجام شود و در یک پیک بدست آمده (شکل 2) که در الکتروفرز زل پلاک آمید از یک پیک دوم تناها یک باند تشکیل گردید. این موضوع هم‌اکنون است زیرا جداسازی فراکشن با یک باند نشانده شده مناسب بود در خروج با الای بی‌خوردار می‌باشد و در برای استفاده در مطالعات الیمپولزی، پاتولوژی و تشخیص بیمار مناسب هستند [13].

بنابراین چنین استنباط می‌شود که کرومانتوگرافی با شرایط مورد استفاده در برسی حاضر، روش مناسب

1- Cazabonne
مقاله


[10] Duquesne V, Claude A, Francoise D, Jean-PD and Andre C: Protection of nude rats against toxoplasma infection by excreted/


Preparation, Purification and Identification of Excreted/Secreted Antigens of Toxoplasma Gondii Tachyzoites

S.H. Abdollahi1*

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Background: The Excreted/Secreted antigens (E/SA) of toxoplasma gondii tachyzoites are thought to play an important role in the pathogenesis of parasite and the hosts’ immunity against infection with this Parasite. These antigens are also useful for diagnosis and differentiation of acute from chronic phase of toxoplasmosis. Therefore the aim of the present study was to detect the best technique for preparation, purification and identification of these antigens.

Materials and Methods: Tachyzoites (2×10⁸) were incubated at 37°C for 1hour under mild agitation in test–tubes containing 2ml of RPMI-1640 culture medium without FCS. After
centrifugation for 15min at 1000g the E/SA containing supernatant were dialyzed and concentrated. E/SA were separated by gel filtration and ion exchange chromatography. Fractions of both chromatography columns were analyzed by Native–PAGE electrophoresis.

Results: E/SA were eluted in three and two Peaks by gel filtration and ion-exchange chromatography respectively. The second peak obtained from ion-exchange chromatography produced one band in native – PAGE.

Conclusion: The result of this experiment showed that ion-exchange chromatography under these conditions is a good tool for purification of E/SA.

Keywords: Toxoplasma Gondii, Excreted/Secreted Antigens, Ion-exchange Chromatography, Electrophoresis

* Corresponding author tel: (391) 5234003-5
Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, 2002, 2(1): 1-9