مقاله پژوهشی مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان سال دوم، جلد ۲، شماره اول، ۱۳۸۱

هیه، تخلیص و شناسایی اجزاء آنتی ژن های دفعی -ترشحی تاکی زوئیتهای توکسوپلاسماگوندی سویه RH

سيد حسين عبداللهي "*

خلاصه

سابقه و هدف: مطالعات قبلی نشان داده است که آنتی ژنهای دفعی – ترشحی (E/SA) تاکی زوئیتهای تو کسوپلاسما گوندی می توانند نقش مهمی دربیماریزایی, مصونیت میزبان در برابر آلودگی مجدد به انگل, تشخیص و افتراق مرحله حاد از مزمن تو کسوپلاسموز داشته باشند. برای بررسی دقیق تر موارد فوق نیاز به اجزاء تخلیص شده این آنتی ژنها می باشد. بنابراین هدف مطالعه حاضر تهیه, تخلیص و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده این آنتی ژنها و تعیین روش مناسب برای این منظور بود.

مواد و روشها: ۱۰۰٪ تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی در دو میلی لیترمحیط کشت RPMI-1640 (در لوله های درب پیچ دار) سوسپانسیون و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تکان ملایسم قرار گرفتند، سپس محتوای هر لوله سانتریفوژ (۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۶) و مایع رویی به عنوان محلول حاوی E/SA دیالیز و تغلیظ گردید. در مرحله بعد این محلول به طریق کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون با ستون ژل سفاد کس G-200 به ابعاد ۱۰۲۸ سانتیمتر و خروجی ۱۵ میلی لیتر در ساعت و کروماتو گرافی مبادله یون با ستونی به ابعاد ۱۰۵۱ سانتیمتر از ژل کربوکسی متیل با خروجی ۶۰ میلی لیتر در ساعت تحت شیب خطی pH تفکیک گردید. بعد از آن اجزاء حاصل به روش Native-PAGE الکتروفورز شدند.

یافته ها: E/SA در ژل فیلتراسیون به سه جزءتفکیک شد، اما از کروماتوگرافی مبادله یونی آن دو پیک حاصل شد که پیک دوم در الکتروفورز Native-PAGE به یک باند تجزیه گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که کروماتو گرافی مبادله یون با شرایط این مطالعه روشی مناسب بــرای تفکیــک E/SA (تهیه شده به روش پیشنهادی) تاکی زوئیتهای توکسوپلاسماگوندی می باشد، زیرا بــدون تغییــر ســاختار مولکولی پروتئین, اجزائی با درجه خلوص بالا و به میزان نسبتاً زیادی حاصل می شود.

واژههای کلیدی: توکسوپلاسماگوندی, کروماتوگرافی تعویض یون, آنتی ژنهای دفعی – ترشحی, الکتروفورز

۱-* استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان (نویسنده مسئول)

مقدمه

تو کسوپلاسما گوندی این کمپلخسای درون سلولی اجباری از شاخه اپی کمپلکسا میباشد. انسان از دو طریق اجباری و مادرزادی به این انگل مبتلا میشود. سیر بیماری در بدن انسان شامل دو مرحله حاد و مزمن است. اکثر عوارض و علائم و همچنین انتقال انگل از مادر به جنین در مرحله حاد رخ میدهد[۱۸٬۱۱]. در اکثر موارد تشخیص و افتراق مرحله حاد از مزمن تو کسوپلاسموز آاز طریق تعیین نوع و عیار ایمونو گولبولینهای اختصاصی به کمک روشهای سرولوژی با استفاده از آنتی ژنهای خشایی - سیتوپلاسمی انگل صورت می گیرد که معمولاً با نواقص و مشکلاتی همراه است. عمده این مسائل به آنتی ژنهای در نهای مورد استفاده نسبت میدهند [۲۰، ۱۶، ۱۶].

بنابراین بررسیهای زیادی به منظور شناسایی آنتی ژنهای محافظت کننده و مارکرهای مناسب برای تشخیص و افتراق مرحله حاد از مرزمن توکسوپلاسموز صورت گرفته است. نتایج این بررسیها نشان می دهد که آنتی ژنهای دفعی – ترشحی $(E/SA)^{\dagger}$ تاکی زوئیتهای انگل در رابطه با هدف این مطالعات از اهمیت خاص برخوردار می باشند [۲۳، ۲۱، ۶].

د کوستر و همکاران در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که آنتی ژنهای دفعی — ترشحی تو کسو پلاسمادر عفونتهای انسانی شدیداً ایمنو ژن هستند [۹]. دارسی و همکاران در همان سال و دو کوئسنه در سال ۱۹۹۰ با انتقال غیر فعال آنتی بادی و سلولهای T اختصاصی آنتی ژنهای دفعی — ترشحی سبب محافظت موش های فاقد تیموس در مواجهه با دوز بالا و کشنده سـویه RH تو کـسویلاسما گونـدی

شدند [۱۰]. رحمان و انـور در سال ۱۹۹۲ ثابـت کردند که این آنتـی ژنها (E/SA) نـسبت بـه آنتـی ژنهای کیست نسجی، سبب تحریک بیشتر پاسخ ایمنـی با واسطه سلولی شده و فاکتور مناسبی برای بررسیهای مربوط به ایمونیزاسیون میباشند [۱۷]. زینر ۱۰ و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند کـه آنتـی ژنهای دفعـی – ترشحی نسبت به تاکی زوئیتهای اشعهدیده سویه RH و آنتی ژن خام تو کسوپلاسما، باعـث تحریـک و تکثیـر آیتی ژن خام تو کسوپلاسما، باعـث تحریـک و تکثیـر بیـشتر لنفوسـیتهای T مـی گردنـد [۲۳]. دریـانی ۱۱ و همکاران درسال ۲۰۰۳ گزارش کردند کـه E/SA سبب محافظـت موشـهای سـوری در برابـر سـویه RH با و کسوپلاسما می شوند [۷].

هم چنین با توجه به خصوصیات گزارش شده از E/SA این آنتی ژنهای خشایی و سیتوپلاسمی در تستهای سرولوژی طراحی غشایی و سیتوپلاسمی در تستهای سرولوژی طراحی شده به منظور تشخیص و افتراق فرم حاد از مزمن تو کسوپلاسموزبه نظر می رسند. یافته های د کوستر و همکاران نشان داد که آنتی ژنهای دفعی – ترشحی در سرم بیماران مبتلا به فرم حاد و مزمن تو کسوپلاسموز متفاوت می باشد [۹].

یاسوهیروسوزو کی 11 روش لاتکس آگلوتیناسیون را برای شناسایی این آنتی ژنها در سرم طراحی و گزارش کرد که از روز 11 آلودگی قابل شناسایی میباشند در حالی که در این فاصله آنتی بادی ضد تو کسوپلاسما در سرم قابل شناسایی نیست [۲۲]. هافید 11 و همکاران (۱۹۹۵) به کمک روش کاپچر الایزا 11 وجود این آنتی ژنها را تنها در سرم افراد مبتلا به فاز حاد شناسایی و آن را به عنوان یک روش افتراق فاز حاد از مرمن پیشنهاد نمودند [۳۳]. محمودزاده و همکاران (۱۳۷۹) نشان دادنید

⁹⁻ Rahman and Anwar

¹⁰⁻ Zenner

¹¹⁻ Daryani

¹²⁻ Yasuhiro

¹³⁻ Hafid

¹⁴⁻ Cuptuer ELISA

¹⁻ Toxoplasma gondii

²⁻ Apicomplexa

³⁻ Toxoplasmosis

⁴⁻ Excreted/ Secreted Antigens

⁵⁻ Tachizoites

⁶⁻ Decoster

⁷⁻Darcy

⁸⁻ Duquesne

كه روش الايزاي نقطه اي ' با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم مایع صفاق موش سوری آلوده شده با سویه RH زوئیتها در واحد حجم محاسبه گردید. در مرحله بعد ۲ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 تو کسو پلاسما گوندی، برای تشخیص تو کسو پلاسموز در موش صحرایی، دارای ارزش تشخیصی (حـساسیت ۱۰۰٪

و اختصاصیت ۸۸٪) بالایی میباشد [۲]. نظر به این که برای بررسی دقیق تر جنبه های مختلف این آنتی ژنها نیاز به اجزاء تخلیص شده آنها میباشد و در مطالعات قبلی مایع صفاق موش آلوده و یا مایع رویی كشت سلولي تاكي زوئيتهاي توكسوپلاسما بهصورت تركيب كامل به عنوان E/SA به كار رفته اند هـدف ايـن مطالعه ارزيابي روش اصلاح شده انكوباسيون تاكي زوئیتهای توکسو پلاسما در محیط کشت غیر سلولی RPMI برای تهیه E/SA، کروماتو گرافی برای تخلیص این آنتی ژنها و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید برای شناسایی اجزاء حاصل جهت کاربرد در مطالعات بعدی

مواد و روشها

تهیه آنتی ژنهای دفعی – ترشحی (E/SA):

مایع صفاق موشهای سفید کوچک آزمایشگاهی (موش سوری) که سه روز قبل با ۱۰۶ تاکیزوئیت سویه RH تو كـسويلاسما گونـدى (تهيـه شـده از دانـشكده بهداشت دانشگاه علوم یزشکی تهران) به روش تزریق داخل صفاقی آلوده شده بودند کشیده و چندین بار از سر سرنگ شماره ۲۷ عبور داده شد تــا ماکروفاژهــا يــاره و تاکی زوئیتها آزاد شوند. سیس در ۷۵۰g به مــدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل (تاکی زوئیتها) یک بار با سرم فیزیولوژی و دوبار با محیط کشت RPMI-1640 (ساخت شرکت سیگما) با دور ۷۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و با استفاده از لام نئوبـــار

و رنگ ترپانبلـو ، تعـداد و درصـد زنـده بـودن تــاکی

[در مطالعات قبلي از RPMI حاوي سرم جنين گوساله (FCS) استفاده شده اما به علت بروز مشكلاتي، در مطالعه حاضر با اعمال تغییراتی از جمله کوتاه کردن زمان نگهداری، FCS استفاده نشد] حاوی ۲×۱۰ تاکی زوئیت شسته شده به لولههای درپیچدار منتقل و به مدت یکساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تکان ملایم انکوبه گردید. سپس محتوای هر لوله به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ و مایع رویـی دیـالیز (کیـسه دیالیز با cut off کمتر از ۱۰ کیلو دالتون شرکت بيوژن)، با قرار دادن در مقابل جريان شديد هـوا تغلـيظ [٨، ۵]، پــس از تعيــين غلظــت پــروتئين آن بــه روش برادفورد، در ۲۰– درجه سانتیگراد نگهداری شد. مجــدداً تعداد و درصد زنده بودن تاکی زوئیتها محاسبه و با قبل از انکوباسیون مقایسه گردید [۱۸].

تفکیک آنتی ژنهای دفعی – ترشحی:

E/SA حاصل از انكوباسيون تـاكي زوئيـتهـاي تو كسو پلاسما در محيط كشت غير سلولي RPMI به شرح زیر تفکیک گردید:

۱ - کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون:

ژل فیلتراسیون باستون ژل سفاد کس G-200 (سیگما) به ابعاد ۲/۵×۴۰ سانتیمتر انجام شد. حجم نمونه اضافه شده به ستون ۳ میلیلیتر حاوی ۳ میلی گرم پروتئین و سرعت خروجی ستون ۱۵ میلی لیتر در ساعت تعیین گردید. سه میلیلیتر مایع خروجی از ستون در هر لوله جمع آوری (جمعاً ۱۰۰ لوله) و میزان جذب نوری (OD) أمحتواي هر لوله با استفاده از اسيكتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و منحنی مربوط به آنها

²⁻ Terypan blue

³⁻ Fetal Calf Serum

⁴⁻ Optical Density

رسم گردید. سپس محتوای لوله های مربوط به هر پیک با هم مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافر تریس با pH=۸/۲ (در تمام مدت بافر دیالیز توسط همزن الکتریکی مخلوط و چهار بار تعویض گردید) دیالیز، پس از تغلیظ (مانند مرحله قبل)، میزان پروتئین آن تعیین و در ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲- کروماتو گرافی مبادله یون:

ستونی از ژل کربوکسی متیل سفادکس (سیگما) به ابعاد 1×10 سانتیمتر استفاده شد. حجم نمونه اضافه شده به ستون 1×10 سین گیرم پروتئین و سرعت جریان خروجی 1×10 میلی لیتر در ساعت تعیین گردید جداسازی تحت شیب 1×10 طیف 1×10 صورت گرفت. بقیه مراحل کار مانند ژل فیلتراسیون انجام شد 1×10 .

شناسایی آنتی ژنهای دفعی - ترشحی : SDS-PAGE - ۱

۴۰ میکرولیتراز هر فراکشن با ۴۰ میکرولیت با نموند میکرولیت بافر نموند حاوی ۲ – مرکاپتواتانول و سدیم دئودسیل سولفات مخلوط و به مدت ۳ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه حرارت داده شد، سپس به کمک سرنگ هامیلتون به حفرههای تعبیه شده در ژل منتقل گردید. درصد SDS برای ژل متراکم کننده ۴ و برای ژل جداکننده ۱۰درصد، شدت جریان الکتریکی در زمان عبور نمونهها از هر ژل به ترتیب ۱۲۰ و ۶۰ ولت بود. پس از پایان الکتروفورز رسیدن نمونه ها به انتهای ژل)، ژل باکوماسی بلو، رنگ آمیزی و در مقایسه با پروتئین های استاندارد (شکل ۳) وزن مولکولی هر جزء (باندهای تشکیل شده) تعیین گردید[۳۱].

: Native PAGE -Y

اصول و روش کلی کار مانند SDS-PAGE میباشد با این تفاوت که در این روش SDS از ترکیب

تمام محلولها حذف و نمونهها حرارت داده نمی شوند. در این مطالعه غلظت ژل پلی اکریل آمید ۷/۵ درصد انتخاب و به منظور برطرف شدن اثر حرارت روی نتایج الکتروفورز، درطول مدت الکتروفورز، آب سرد به طور دایم در اطراف صفحه ژل جریان داشت [۱۹، ۱۵].

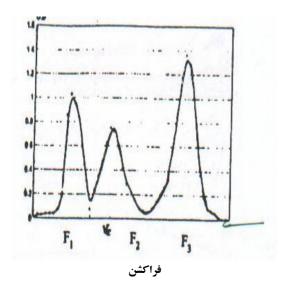
نتايج

تهیه آ نتی ژنهای دفعی - ترشحی:

با روش مورد استفاده در این مطالعه از ۲×۱۰^۸ تاکی زوئیت حدود ۱۵ میکروگرم E/SA بدست آمد و جمعــاً ۱۵ میلیگرم آنتی ژن تهیه گردید.

تفکیک آنتی ژنهای دفعی – ترشحی:

از کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون آنتی ژنهای دفعی – ترشحی حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیتها در محیط کشت RPMI بدون FCS با ژل سفاد کس G-200 سه پیک (شکل ۱) ودر کروماتو گرافی تعویض یون دو پیک حاصل گردید (شکل ۲).



شکل ا: منحنی فراکشنهای حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ژل سفاد کس G200. آنتیژنهای دفعی-ترشحی بدست آمده از انکوباسیون تاکی زوئیتهای توکسوپلاسما در محیط کشت غیر سلولی PRMI-1640 بدون FCS.

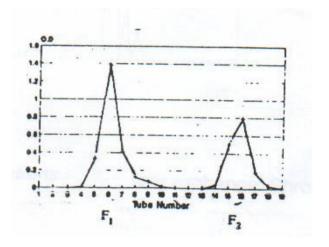
¹⁻ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

²⁻ Native- Polyacrylamide Gel Electrophoresis



شکل ۳: ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید(۱۰٪) -PAGE SDS

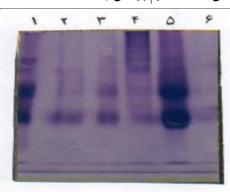
شکل ۴ الگوی الکتروفورز Native-PAGE اجزاء بدست آمده از کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون و مبادله یون E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیتها در RPMI بدون FCS را نشان می دهد از فراکشن یک کروماتو گرافی تعویض یون سه باند بدست آمد در حالی که از فراکشن دوم تنها یک باند ظاهر شد. فراکشن های (سه فراکشن) حاصل از کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون به ترتیب سه, دو و یک باند تشکیل دادند.



شکل ۲: منحنی فراکشنهای حاصل از کروماتوگرافی مبادله یون با ژل کربوکسی متیل و شیب PH آنتیژنهای دفعی- ترشحی بدست آمده از انکوباسیون تاکی زوئیتهای توکسوپلاسما در محیط کشت غیر سلولی PRMI-1640 بدون FCS.

شناسایی آنتی ژنهای دفعی – ترشحی:

شکل ۳ الگوی الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید مایع صفاق موش سالم, مایع صفاق موش آلوده به توکیسوپلاسما، E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیتها در محیط کشت RPMI بدون RPMI بدون RPMI بخلیظ شده و مایع رویی شستشو بار سوم تاکی زوئیت ها قبل از انکوبه کردن در RPMI را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود در ستونهای ۷ و ۶ که به ترتیب حاوی RPMI تغلیظ شده و مایع رویی شستشوی بار سوم تاکی زوئیت های قبل از انکوبه کردن می باشد. باندی ظاهر نگردید که نشان دهنده عدم حضور آنتی ژنها باندی ظاهر نگردید که نشان دهنده عدم حضور آنتی ژنها باشد.



شكل٤-: الكوى الكتروفورز Native-PAGE فراكشنهاي بدستآمده در كروماتو گرافى ژل فيلتراسيون و تعويض يون E/SAحاصل از انكوباسيون تاكىزوئيتهاى توكسوپلاسما در RPMI بدون FCS. ١-فراکشن یک کروماتوگرافی تعویض یون ۲- فراکشن دو كروماتو گرافى تعويض يون ٣- تركيب كامل E/SA ٤- فراكشن يك كروماتو گرافى ژل فيلتراسيون ٥-فراكشن دوم كروماتو گرافى ژل فیلتراسیون ٦ - فراکشن سوم کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون

بحث

در مطالعات قبلي معمولاً ازمايع رويي كشت سلولي تاکی زوئیتها و یا مایع صفاق موش سوری آلوده شــده به توكسوپلاسما از طريق تزريق داخل صفاقي به عنـوان E/SA استفاد شده است. ولي به علت مشكلاتي از جملـه آغشته بودن E/SA حاصل به پروتئینهای مایع صفاق موش یا ترکیبات کشت سلولی, نیاز به مراقبت ویــژه و صرف زمان نسبتاً زیاد (۵تا ۷ روز) در این مطالعه بــرای تهیه E/SA ابتدا روش پیشنهادی دارسی (انکوباسیون تاكى زوئيتها در محيط كشت غير سلولي -RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FCS) مورد استفاده قرار گرفت زیرا در این روش علاوه بر حل مشکل آغشتگی، زمان مـورد نیاز برای تهیه آنتی ژنهای دفعی - ترشحی به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می کند [۲۱، ۹، ۸]، ولی با تغلیظ تركيب حاوى E/SA، غلظت FCS افرايش يافته و میزان نسبتاً زیادی از پروتئین موجود در ترکیب را تشكيل مي دهد كه اين موضوع باعث مي شود نمونههايي از این ترکیب که در مراحل بعدی به کار می روند حاوی مقدار کافی E/SA نباشند (زیرا حجم نمونه بر اساس غلظت پروتئین محاسبه می شود) هم چنین در این مطالعه آلبومین FCS در الکتروفورز به صورت باندهای یهن

ظاهر می شد و باندهای حاصل از E/SA که غلظت کم داشتند را می پوشاند و شناسایی آنها را با مـشکل مواجـه می کرد. حذف آلبومین باعث می شد که تعدادی از پروتئینها از جمله برخی اجـزا E/SA نیــز از ترکیــب خارج شوند، نظر به این که FCS برای کشت و انکوباسیونهای طولانی مدت ضروری میباشد [۴۸،۱۰] ما برای رفع مشکلات فوق با تغییراتی از جمله کاهش زمان انكوباسيون, FCS را اضافه نكرديم.

با توجه به نتایج بدست آمده می تـوان گفـت کـه روش بكار رفته در اين مطالعه, طريقه مناسبي براي تهيـه E/SA نسبتاً خالص مى باشد. زيرا با سـه بـار شستـشوى تاكى زوئيتها (قبل از انكوباسيون) بـا محـيط RPMI, آغشتگی آنها به پــروتئینهــای صــفاق مــوش کــاملاً برطرف شده و در الکتروفورز مایع رویسی حاصل از شستشوى بارسوم تاكي زوئيت ها هيچ باندي مشاهده نگردید (شکل ۳). در شرایط جدید، تاکی زوئیتها نیز ليز نشدند زيرا تعداد و درصد زنده بودن آنها قبل و بعد از انکوباسیون تفاوتی نداشت علاوه بر این با روش اصلاح شده به ازای ۱۰۰×۲ تاکی زوئیت حدود ۱۵ میکروگرم آنتی ژن دفعی-ترشحی بدست آمــد کــه بــا نتایج دارسی و همکاران مطابقت دارد زیرا آنها گزارش کردند برای تهیه ۲۰ میکروگرم E/SA، ۱/۲×۱۰٬ تاکی زوئیت مورد نیاز میباشد [۸].

در اکثر مطالعات قبلی برای تخلیص E/SA از سولفات آمونیوم با درجات مختلف اشباع استفاده شده است ولی فراکشنهای حاصل, از خلوص کافی برخوردار نبوده اند [۲۱، ۲۱]. علاوه بر این، حجم ترکیب حاوی E/SA بدست آمده در این مطالعه کم و تخلیص آن بــا روش فوق مشكل بود. براى تهيه اجزاء نسبتاً خالص از یک مخلوط آنتی ژن با حجم کم, جداسازی تجزیــهای از جمله الكتروفورز ژل پلى اكريل آميد نيز ممكن است، ولى در اين روش ضمن تغيير ساختار اوليـه پـروتئين, برای بدست آوردن حجم لازم از هر جزء به چندین بار

الکتروفورز نیاز میباشد، علاوه بر این، اجزاء بدست آمده با این روش حاوی SDS و عناصر غیر پلیمریزه آکریل آمید هستند که در مراحل بعدی مشکلاتی را به دنبال دارد، بنابراین روش کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون و مبادله یون بکار برده شد.

کـــازابون و همکـــاران (۱۹۹۶) بـــه روش کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از ژل سفاد کس کروماتو گرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از ژل سفاد کس G-100 اقدام به تخلیص E/SA نمودند و فراکشنهای با وزن مولکولی TA-150 کیلودالتون را گــزارش کردنــد [۶]. ولی با توجه به محدوده جداسازی ژل مذکور (TA-150). و احتمال وجود اجزائی با اوزان بالاتر, در مطالعه حاضر از ژل TA-150 با قــدرت تفکیــک TA-150 کیلودالتون استفاده شد TA-150

در كروماتو گرافي تعويض يون با ژلدي اتيل آمینواتیل سلولز با شیب غلظت یون و E/SA ، pH استخراج شده تفکیک نگردید ولی تحت همین شرایط مایع صفاق موش آلوده به توکـسوپلاسما بـه سـه جـزء تفکیک شد به نظر رسید ستون کروماتوگرافی فعال است ولى مجموع بارهاى الكتريكي تركيب E/SA مثبت بوده و با ژل فوق که یک مبادله کننـده یونهـای منفـی است قابل تفكيك نبوده، لذا كروماتو گرافي با ژل کربوکسی متیل (مبادله کننده یونهای مثبت) و شیب خطی pH انجام شد و دو پیک بدست آمد (شکل ۲)که در الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید از پیک دوم تنها یک باند تشكيل گرديد. اين موضوع حائز اهميت است زيـرا جداسازی فراکشن با یک باند نشاندهنده مناسب بودن روش تفکیک می باشد هم چنین این گونه اجزاء از درجه خلوص بالایی برخوردار می،باشند و برای استفاده در مطالعات ایمونولوژی, یاتولوژی و تشخیص بسیار مناسب هستند [۳،۱۵].

بنابراین چنین استنباط می شود که کروماتوگرافی با شرایط مورد استفاده در بررسی حاضر, روشی مناسب

برای تفکیک E/SA تو کسوپلاسما (تهیه شده به روش پیشنهادی) میباشد، زیرا بدون تغییر ساختار مولکولی پروتئینها, اجزائی با درجه خلوص نسبتاً بالا و به میران لازم حاصل میشود. بنابراین پیشنهاد میشود در بررسیهای ایمونولوژی، پاتولوژی و به خصوص تشخیص و افتراق مرحله حاد از مرزمن تو کسوپلاسموز، اجزاء E/SA به روش به کار رفته در این مطالعه تهیه، تخلیص و مورد بررسی دقیق تر قرار گیرند.

¹⁻ Cazabonne

منابع

[۱] عبدل تهرانی ح. و مصباح ع: الکتروفورزژل پلی اکریل آمید. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس, تهران چاپ دوم، ۱۳۷۵. [۲] محمودزاده ع. عبداللهی ح.دلیمی ع.زواران ا: ارزیابی Dot-ELISA با استفاده از آنتی ژنهای دفعی - ترشحی بسرای تشخیص تو کسوپلاسموزیس در رت. مجله علوم پزشکی مدرس ۱۳۷۹, دوره ۳. شماره یک , صفحات:۲۵-۴۷.

[۳] مصطفایی. ع. راهنمای نظری و عملـی الکتروفـورز پـروتئین در ژل. انتـشارات تزکیــه، تهــران ، چــاپ اول، ۱۳۷۸

- [4] Cazabonne P, Bessieres MH and Seguela JP: Kinetics study and characterization of target excreted secreted antigens of immunoglobulin G, M, A and E antibodies from mice infected with different strains of toxoplasma gondii. *Parasitol. Res.*, 1994; 80 (1): 58-63.
- [5] Cazabonne P, Bessieres MH, Pipy B and Segula JP: Failure of mouse peritoneal macrophage activation by the purified excreted secreted antigens of toxoplasma gondii microbial. *Immunol*, 1996; 38(11): 909-913.
- [6] Cesbron Delauw MF: Excreted/ Secreted antigens of toxoplasma gondii. Their origin and role in the host-parasite interaction. *Res. Immunol*, 1993; 144 (1):41-4.
- [7] Daryani A, Hosseini AZ, Dalimi A: Immune responses against excreted/secreted antigens of toxoplasma gondii tachyzoites in the murine model. *Vet. Parasit*, 2003; 113(2): 123-134
- [8] Darcy F, Deslee D, Santoro F, Decoster A, Duquesne et al: Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from toxoplasma gondii. *Parasite Immunol*, 1988;10 (5):553-567.
- [9] Decoster A, Francoise D and Capron A:
 Recognition of toxoplasma gondii excreted/
 secreted antigens by human sera from
 acquired and congenital toxoplasmosis:
 Identification of marker of acute and chronic
 - infection. Clin Exp Immunol. 1988; 73 (3): 376-382.
- [10] Duquesne V, Claude A, Francoise D, Jean-PD and Andre C: Protection of nude rats against toxoplasma infection by excreted/

- secreted antigens-specific helper T clells. *Infect. Immun*, 1990; 58: 2120-2126.
- [11] Dubey JP: Advances in the life cycle of toxoplasma gondii. *Inter J parasitol*, 1998; 28(7): 1019-1024.
- [12] Godard I, Darcy F, Deslee D, Dessaaint JP and Capron A: Isotypic profiles of antibody responses to toxoplsam gondii infection in rats and mice: kinetic study and characteriz_ation of target antigens of immun_ oglobulin A antibodies. *Infect Immun*, 1990; 58(8):2446-2451.
- [13] Hafid J, Tran MS, Raberin H, Akono ZY, Pozzetto B and Jana M: Detection of circulating antigens of toxoplasma gondii in human infection. *Am.J. Trop. Med.Hyg*, 1995; 52(4): 336-339.
- [14] Jenum PA, Stray- pedersen B. Gundersen AG: Improved diagnosis of primary toxoplasma gondii infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G. Avidity. *J Clin Microbiol*, 1997; 35(8): 1972-1977.
- [15] Johnstone A and Thorpe R. Immunochemis_ try in practice, 3th edition, Black well Scien_ ce, 1996.
- [16] Lisenfeld O, Cynthia P, Jose GM, RAJ G and Judith L: False-Positive results in immunog_lobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the
 - platelia toxo IgM test. J. Clin Microbiol, 1997; 35(1): 174-175.
- [17] Rahman N and Anwar KA: Comparison of three forms of antigens in the demonstration of cell-mediated immune response in murine toxoplasmosis. *Biochem Biol Res*.1992; 189(2): 640-644.

- [18] Smith JE: A Ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of toxoplasma gondii. *Inter J Parasitol*, 1995; 25(11): 1301-1309.
- [19] Walker JM: The protein protocols hand book first edition, Humana press, totown New Gersey, 1996.
- [20] Wilson M and James BM: Laboratory diagnosis of toxoplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicin*, 1991; 11(4): 923-939.
- [21] Yamamoto YL, Mineo JR, Meneghiss CS and Kawarabayashi M: Detection in human sera of IgG, IgM and IgA to excreted secereted antigens toxoplasma gondii by use of dot-

- ELISA and immunoblot assay. *Ann Trop Med Parasitol*, 1998; 92(1): 23-30.
- [22] Yasuhiro S and Akio K: Presence of high concentration of circulating toxoplasma antigens during acute toxoplasma infection in athymic nude mice *Infect Immun*, 1987; 55(4): 1017-1018.
- [23] Zenner L, Estaquier J, Darcy F, et al: Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of a excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol*. 1999; 21 (5): 261-272.

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 electropho_resis.

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 chromatograp_hy produced one band in native – PAGE.

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

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

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