مقاله پژوهشی

مجله علمی دانشگاه علوم

پزشکی رفسنجان

سال دوم، جلد ۲، شماره اول، ۱۳۸۱

تهیه، تخلیص و شناسایی اجزاء آنتی ژن های دفعی – ترشحی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسماگوندی سویه RH

سید حسین عبداللهی [*۱]

خلاصه

سابقه و هدف: مطالعات قبلی نشان داده است که آنتی ژن‌های دفعی – ترشحی (E/SA) تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی می‌توانند نقش مهمی دربیماری‌زایی, مصونیت میزبان در برابر آلودگی مجدد به انگل, تشخیص و افتراق مرحله حاد از مزمن توکسوپلاسموز 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: ۲×۱۰^{۸} 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 ملایم قرار گرفتند، سپس محتوای هر لوله سانتریفوژ (۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰g) و مایع رویی به عنوان محلول حاوی E/SA دیالیز و تغلیظ گردید. در مرحله بعد این محلول به طریق کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ستون ژل سفادکس G-200 به ابعاد ۲/۵×۴۰ سانتیمتر و خروجی ۱۵ میلی لیتر در ساعت و کروماتوگرافی مبادله یون با ستونی به ابعاد ۱×۱۵ 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.

یافته‌ها: 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.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که کروماتوگرافی مبادله یون با شرایط این مطالعه روشی مناسب برای تفکیک E/SA (تهیه شده به روش پیشنهادی) تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسماگوندی می باشد، زیرا بدون تغییر ساختار مولکولی پروتئین, اجزائی با درجه خلوص بالا و به میزان نسبتاً زیادی حاصل می‌شود.

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

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

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

مقدمه

توکسوپلاسماگوندی[1] تک‌یاخته‌ای درون سلولی اجباری از شاخه اپی‌کمپلکسا[2] می‌باشد. انسان از دو طریق اکتسابی 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 توکسوپلاسموز[3] از طریق تعیین نوع و عیار ایمونوگلبولین‌های اختصاصی به کمک روش‌های سرولوژی با استفاده از آنتی ژن‌های غشایی- سیتوپلاسمی انگل صورت می‌گیرد که معمولاً با نواقص و مشکلاتی همراه است. عمده این مسائل به آنتی ژن‌های مورد استفاده نسبت می‌دهند [۲۰، ۱۶، ۱۴].

بنابراین بررسی‌های زیادی به منظور شناسایی آنتی ژن‌های محافظت کننده و مارکرهای مناسب برای تشخیص و افتراق مرحله حاد از مزمن توکسوپلاسموز صورت گرفته است. نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد که آنتی ژنهای دفعی– ترشحی (E/SA)[4] تاکی زوئیت‌های[5] انگل در رابطه با هدف این مطالعات از اهمیت خاص برخوردار می‌باشند [۲۳، ۲۱، ۶] .

دکوستر[6] و همکاران در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که آنتی ژنهای دفعی – ترشحی توکسوپلاسمادر عفونت‌های انسانی شدیداً ایمنوژن هستند [۹]. دارسی[7] و همکاران در همان سال و دوکوئسنه[8] در سال ۱۹۹۰ با انتقال غیر فعال آنتی بادی و سلولهای T اختصاصی آنتی ژن‌های دفعی – ترشحی سبب محافظت موش‌های فاقد تیموس در مواجهه با دوز بالا و کشنده سویه RH توکسوپلاسما گوندی شدند [۱۰ ، ۸]. رحمان و انور[9] در سال ۱۹۹۲ ثابت کردند که این آنتی ژن‌ها (E/SA) نسبت به آنتی ژن‌های کیست نسجی، سبب تحریک بیشتر پاسخ ایمنی با واسطه سلولی شده و فاکتور مناسبی برای بررسی‌های مربوط به ایمونیزاسیون می‌باشند [۱۷]. زینر[10] و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که آنتی ژن‌های دفعی – ترشحی نسبت به تاکی زوئیت‌های اشعه‌دیده سویه RH و آنتی ژن خام توکسوپلاسما، باعث تحریک و تکثیر بیشتر لنفوسیتهای T می‌گردند [۲۳]. دریانی[11] و همکاران درسال۲۰۰۳ گزارش کردند که E/SA سبب محافظت موشهای سوری در برابر سویه RH توکسوپلاسما می‌شوند [۷].

هم‌چنین با توجه به خصوصیات گزارش شده از E/SA، این آنتی‌ژن‌ها جانشین مناسبی برای آنتی ژنهای غشایی و سیتوپلاسمی در تست‌های سرولوژی طراحی شده به‌منظور تشخیص و افتراق فرم حاد از مزمن توکسوپلاسموزبه نظر می‌رسند. یافته‌های دکوستر و همکاران نشان داد که آنتی ژن‌های دفعی – ترشحی در سرم بیماران مبتلا به فرم حاد و مزمن توکسوپلاسموز متفاوت می‌باشد [۹].

یاسوهیروسوزوکی[12] روش لاتکس آگلوتیناسیون را برای شناسایی این آنتی ژنها در سرم طراحی و گزارش کرد که از روز ۷ آلودگی قابل شناسایی می‌باشند در حالی که در این فاصله آنتی بادی ضد توکسوپلاسما در سرم قابل شناسایی نیست [۲۲]. هافید[13] و همکاران (۱۹۹۵) به کمک روش کاپچر الایزا[14] وجود این آنتی ژن‌ها را تنها در سرم افراد مبتلا به فاز حاد شناسایی و آن را به‌عنوان یک روش افتراق فاز حاد از مزمن پیشنهاد نمودند [۱۳]. محمودزاده و همکاران (۱۳۷۹) نشان دادند

1- Toxoplasma gondii
2- Apicomplexa
3- Toxoplasmosis
4- Excreted/ Secreted Antigens
5- Tachizoites
6- Decoster
7-Darcy
8- Duquesne
9- Rahman and Anwar
10- Zenner
11- Daryani
12- Yasuhiro
13- Hafid
14- Cuptuer ELISA

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

که روش الایزای نقطه ای[1] با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم مایع صفاق موش سوری آلوده شده با سویه RH توکسوپلاسما گوندی، برای تشخیص توکسوپلاسموز در موش صحرایی، دارای ارزش تشخیصی (حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۸۸٪) بالایی می‌باشد [۲].

نظر به این‌که برای بررسی دقیق تر جنبه‌های مختلف این آنتی ژن‌ها نیاز به اجزاء تخلیص شده آن‌ها می‌باشد و در مطالعات قبلی مایع صفاق موش آلوده و یا مایع رویی کشت سلولی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما به‌صورت ترکیب کامل به‌عنوان E/SA به‌کار رفته‌اند هدف این مطالعه ارزیابی روش اصلاح شده انکوباسیون تاکی زوئیت‌های توکسو پلاسما در محیط کشت غیر سلولی RPMI برای تهیه E/SA، کروماتوگرافی برای تخلیص این آنتی‌ژن‌ها و الکتروفورز ژل‌پلی اکریل‌آمید برای شناسایی اجزاء حاصل جهت کاربرد در مطالعات بعدی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتی ژنهای دفعی – ترشحی(E/SA) :

مایع صفاق موشهای سفید کوچک آزمایشگاهی (موش سوری) که سه روز قبل با 10^6 تاکی‌زوئیت سویه RH توکسوپلاسما گوندی (تهیه شده از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران) به روش تزریق داخل صفاقی آلوده شده بودند کشیده و چندین بار از سر سرنگ شماره ۲۷ عبور داده شد تا ماکروفاژها پاره و تاکی زوئیت‌ها آزاد شوند. سپس در ۷۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل (تاکی زوئیت‌ها) یک‌بار 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 نئوبار و رنگ‌ترپان‌بلو[2]، تعداد و درصد زنده بودن تاکی زوئیت‌ها در واحد حجم محاسبه گردید.

در مرحله بعد ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 [در مطالعات قبلی از RPMI حاوی سرم جنین گوساله (FCS)[3] استفاده شده اما به علت بروز مشکلاتی، در مطالعه حاضر با اعمال تغییراتی از جمله کوتاه‌کردن زمان نگهداری، FCS استفاده نشد] حاوی 2×10^8 تاکی زوئیت شسته شده به لوله‌های درپیچدار منتقل و به مدت یک‌ساعت در۳۷ درجه سانتیگراد تحت تکان ملایم انکوبه گردید. سپس محتوای هر لوله به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ و مایع رویی دیالیز (کیسه دیالیز با cut off کمتر از ۱۰ کیلو دالتون شرکت بیوژن)، با قرار دادن در مقابل جریان شدید هوا تغلیظ [۸، ۵]، پس از تعیین غلظت پروتئین آن به روش برادفورد، در ۲۰– درجه سانتیگراد نگهداری شد. مجدداً 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 انکوباسیون تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما در محیط کشت غیر سلولیRPMI به شرح زیر تفکیک گردید:

۱- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون:

ژل فیلتراسیون باستون ژل سفادکس G-200 (سیگما) به ابعاد ۲/۵×۴۰ سانتیمتر انجام شد. حجم نمونه اضافه شده به ستون ۳ میلی‌لیتر حاوی ۳ میلی‌گرم پروتئین و سرعت خروجی ستون ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت تعیین گردید. سه میلی‌لیتر مایع خروجی از ستون در هر لوله جمع‌آوری (جمعاً ۱۰۰ لوله) و میزان جذب نوری (OD) [4]محتوای هر لوله با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و منحنی مربوط به آنها

1- Dot-ELISA

2- Terypan blue
3- Fetal Calf Serum
4- Optical Density

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

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- کروماتوگرافی مبادله یون:

ستونی از ژل کربوکسی متیل سفادکس (سیگما) به ابعاد ۱×۱۵ سانتیمتر استفاده شد. حجم نمونه اضافه شده به ستون ۳ میلی لیتر حاوی ۳ میلی‌گرم پروتئین و سرعت جریان خروجی ۶۰ میلی لیتر در ساعت تعیین گردید جداسازی تحت شیب pH(طیف ۳ تا ۱۰) صورت گرفت. بقیه مراحل کار مانند ژل فیلتراسیون انجام شد [۲۳، ۱۸].

شناسایی آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی :

۱- SDS-PAGE [1]:

۴۰ میکرولیتراز هر فراکشن با ۴۰ میکرولیتر بافر نمونه 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 متراکم‌کننده 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، رنگ‌آمیزی و در مقایسه با پروتئین‌های استاندارد (شکل۳) وزن مولکولی هر جزء (باندهای تشکیل شده) تعیین گردید[۳،۱].

۲- Native PAGE [2]:

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 نمی‌شوند. 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 به‌طور دایم در اطراف صفحه ژل جریان داشت [۱۹ ، ۱۵].

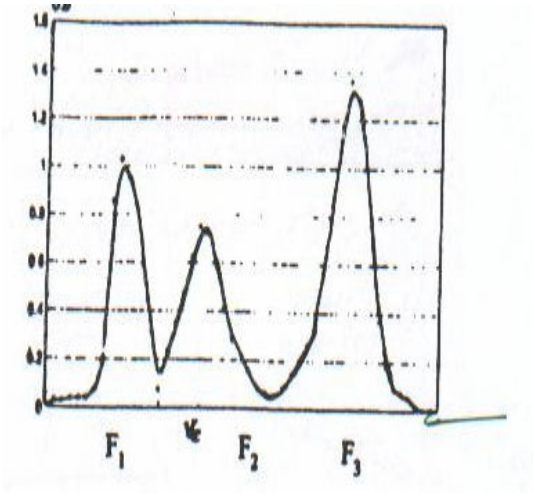
نتایج

تهیه آ نتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی:

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

تفکیک آنتی ژن‌های دفعی – ترشحی:

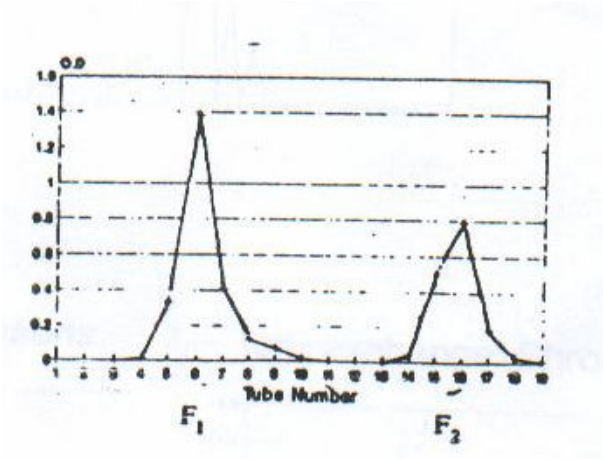
از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیت‌ها در محیط کشت RPMI بدون FCS با ژل سفادکس G-200 سه پیک (شکل ۱) ودر کروماتوگرافی تعویض یون دو پیک حاصل گردید (شکل ۲).



شکل۱: منحنی فراکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با ژل سفادکس 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

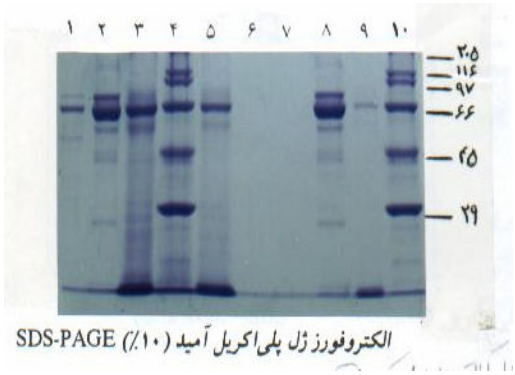
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]



شکل۲: 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:

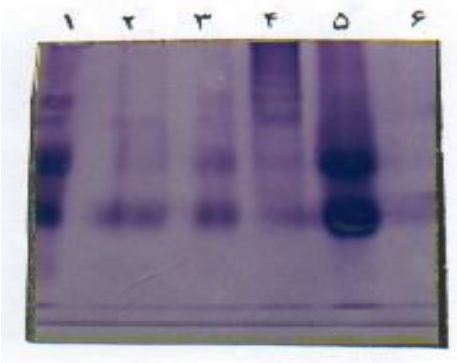
شکل ۳ الگوی الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید مایع صفاق موش سالم, مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلاسما، E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیت‌ها در محیط کشت RPMI بدون FCS, RPMI تغلیظ شده و مایع رویی شستشو بار سوم تاکی زوئیت ها قبل از انکوبه کردن در RPMI را نشان می دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در ستون‌های ۷ و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



شکل ۳: ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید(۱۰٪) -PAGE SDS
۱- مایع صفاق موش سالم ۲- مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلاسما ۳- E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیتها در RPMI بدون FCS ٤- پروتئین استاندارد ٥- شماره ۳ با رقت ۱/۲۰ ٦- RPMI تغلیظ شده ۷- مایع‌رویی شستشوی بار سوم تاکی زوئیتها قبل از انکوبه کردن در RPMI ۸- تکرار شماره۲ ۹- تکرار شماره ۳ با رقت ۱/٤۰ ۱۰-پروتئین استاندارد

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

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]



شکل٤-: الگوی الکتروفورز Native-PAGE فراکشن‌های بدست‌آمده در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تعویض یون E/SAحاصل از انکوباسیون تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما در RPMI بدون FCS. ۱- فراکشن یک کروماتوگرافی تعویض یون ۲- فراکشن دو کروماتوگرافی تعویض یون ۳- ترکیب کامل E/SA ٤- فراکشن یک کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ۵-فراکشن دوم کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون ٦- فراکشن سوم کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

بحث

در مطالعات قبلی معمولاً ازمایع رویی کشت سلولی تاکی زوئیت‌ها و یا مایع صفاق موش سوری آلوده شده به توکسوپلاسما از طریق تزریق داخل صفاقی به عنوان E/SA استفاد شده است. ولی به علت مشکلاتی از جمله آغشته بودن E/SA حاصل به پروتئین‌های مایع صفاق موش یا ترکیبات کشت سلولی, نیاز به مراقبت ویژه و صرف زمان نسبتاً زیاد (۵تا ۷ روز) در این مطالعه برای تهیه E/SA ابتدا روش پیشنهادی دارسی (انکوباسیون تاکی زوئیت‌ها در محیط کشت غیر سلولی RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FCS) مورد استفاده قرار گرفت زیرا در این روش علاوه بر حل مشکل آغشتگی، زمان مورد نیاز برای تهیه آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند [۲۱ ، ۹ ، ۸] ، ولی با تغلیظ ترکیب حاوی E/SA، غلظت FCS افزایش یافته و میزان نسبتاً زیادی از پروتئین موجود در ترکیب را تشکیل می دهد که این موضوع باعث می‌شود نمونه‌هایی از این ترکیب که در مراحل بعدی به کار می‌روند حاوی مقدار کافی E/SA نباشند (زیرا حجم نمونه بر اساس غلظت پروتئین محاسبه می‌شود) هم‌چنین در این مطالعه آلبومین FCS در الکتروفورز به صورت باندهای پهن ظاهر می‌شد و باندهای حاصل از E/SA که غلظت کم داشتند را می‌پوشاند و شناسایی آنها را با مشکل مواجه می‌کرد. حذف آلبومین باعث می‌شد که تعدادی از پروتئین‌ها از جمله برخی اجزا E/SA نیز از ترکیب خارج شوند، نظر به این‌که FCS برای کشت و انکوباسیون‌های طولانی مدت ضروری می‌باشد [۴،۸،۱۰] ما برای رفع مشکلات فوق با تغییراتی از جمله کاهش زمان انکوباسیون, FCS را اضافه نکردیم.

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که روش بکار رفته در این مطالعه, طریقه مناسبی برای تهیه E/SA نسبتاً خالص می‌باشد. زیرا با سه بار شستشوی تاکی زوئیت‌ها (قبل از انکوباسیون) با محیط RPMI, آغشتگی آن‌ها به پروتئین‌های صفاق موش کاملاً برطرف شده و در الکتروفورز مایع رویی حاصل از شستشوی بارسوم تاکی زوئیت ها هیچ باندی مشاهده نگردید (شکل ۳). در شرایط جدید، تاکی زوئیت‌ها نیز لیز نشدند زیرا تعداد و درصد زنده بودن آنها قبل و بعد از انکوباسیون تفاوتی نداشت علاوه بر این با روش اصلاح شده به ازای ۲×۱۰^{۸} تاکی زوئیت حدود ۱۵ میکروگرم آنتی ژن دفعی-ترشحی بدست آمد که با نتایج دارسی و همکاران مطابقت دارد زیرا آن‌ها گزارش کردند برای تهیه ۲۰ میکروگرم E/SA، $۱/۲\times۱۰^{۸}$ 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 ، ۱۲]. علاوه بر این، حجم ترکیب حاوی E/SA بدست آمده در این مطالعه کم و تخلیص آن با روش فوق مشکل بود. برای تهیه اجزاء نسبتاً خالص از یک مخلوط آنتی ژن با حجم کم, جداسازی تجزیه‌ای از جمله الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید نیز ممکن است، ولی در این روش ضمن تغییر ساختار اولیه پروتئین, برای بدست آوردن حجم لازم از هر جزء به چندین بار

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

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 کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و مبادله یون بکار برده شد.

کازابون[1] و همکاران (۱۹۹۶) به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با استفاده از ژل سفادکس G-100 اقدام به تخلیص E/SA نمودند و فراکشنهای با وزن مولکولی ۱۴۵-۲۸ کیلودالتون را گزارش کردند [۴]. ولی با توجه به محدوده جداسازی ژل مذکور (۱۵۰-۴ کیلودالتون) و احتمال وجود اجزائی با اوزان بالاتر, در مطالعه حاضر از ژل G-200 با قدرت تفکیک ۸۰۰-۵ کیلودالتون استفاده شد [۷].

در کروماتوگرافی تعویض یون با ژل‌دی‌اتیل آمینواتیل سلولز با شیب غلظت یون و pH ، E/SA استخراج شده تفکیک نگردید ولی تحت همین شرایط مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلاسما به سه جزء تفکیک شد به نظر رسید ستون کروماتوگرافی فعال است ولی مجموع بارهای الکتریکی ترکیب E/SA مثبت بوده و با ژل فوق که یک مبادله کننده یونهای منفی است قابل تفکیک نبوده، لذا کروماتوگرافی با ژل کربوکسی متیل (مبادله‌کننده یونهای مثبت) و شیب خطی pH انجام شد و دو پیک بدست آمد (شکل۲) که در الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید از پیک دوم تنها یک باند تشکیل گردید. این موضوع حائز اهمیت است زیرا جداسازی فراکشن با یک باند نشان‌دهنده مناسب بودن روش تفکیک می‌باشد هم‌چنین این‌گونه اجزاء از درجه خلوص بالایی برخوردار می‌باشند و برای استفاده در مطالعات ایمونولوژی, پاتولوژی و تشخیص بسیار مناسب هستند [۳،۱۵].

بنابراین چنین استنباط می‌شود که کروماتوگرافی با شرایط مورد استفاده در بررسی حاضر, روشی مناسب برای تفکیک E/SA توکسوپلاسما (تهیه شده به روش پیشنهادی) می‌باشد، زیرا بدون تغییر ساختار مولکولی پروتئین‌ها, اجزائی با درجه خلوص نسبتاً بالا و به میزان لازم حاصل می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های ایمونولوژی، پاتولوژی و به‌خصوص تشخیص و افتراق مرحله حاد از مزمن توکسوپلاسموز، اجزاء E/SA به روش به کار رفته در این مطالعه تهیه، تخلیص و مورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرند.

1- Cazabonne

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

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 برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در رت. مجله علوم پزشکی مدرس ۱۳۷۹, دوره ۳ . شماره یک , صفحات:۵۳-۴۷.

[۳] مصطفایی. ع. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. انتشارات تزکیه، تهران ، چاپ 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 anti-toxoplasma 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.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

[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 compoennts. *Parasite Immunol*. 1999; 21 (5): 261-272.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]

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

S.H. Abdollahi[1]*

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 (2×10^8) 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

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1382.2.1.1.5]