مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

جلد پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۵، ۸۸-۸۵

خالص‌سازی و شناسایی باند پروتئینی از سارکوسیستیس گوسفند

دکتر بهرام کاظمی[۱]، دکتر هوشنگ خزان[۲]، دکتر امید عظیم‌زاده[۲]، دکتر میر خسرو صفری[۳]، دکتر فرید تحویلدار بیدرونی[۲]، دکتر سید جواد سید طبایی[۲]، دکتر علی قجری[۲]

دریافت مقاله: ۸٤/۵/۱۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸٤/۱۲/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۵/۵/۱۸ پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۲٤

چکیده

زمینه و هدف: انگل‌های جنس سارکوسیستیس کوکسیدیاهای دو میزبانه‌ای هستند که از عوامل ایجاد کننده بیماری‌های مشترک انسان و دام به حساب می‌آیند. این انگل‌ها در دامداری و دامپزشکی از نظر اقتصادی اهمیت دارند. بهترین راه تشخیص دام‌های آلوده روش سرولوژی می‌باشد. این تحقیق به منظور تهیه آنتی‌ژن مناسب برای تست سرولوژی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها : آنتی‌ژن خام از کیست‌های سارکوسیستیس جدا شده از لاشه گوسفندان آلوده تهیه شد و با غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم رسوب داده شد که در غلظت ۸۰٪ یک باند پروتئین خالص شد و متعاقب آن کروماتوگرافی ستونی انجام گرفت.

یافته‌ها: آنتی‌ژن خام روی ژل‌پلی‌اکریلامید ۱۲٪ الکتروفورز شد و نوارهای متعدد پروتئینی آن بعد از رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو مشخص گردید. از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰٪ سولفات آمونیوم برای رسوب دادن آنتی‌ژن خام استفاده شد و بعد از کروماتوگرافی ستونی روی ژل‌پلی‌اکریلامید یک نوار پروتئینی ۳۵ کیلودالتونی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق یک نوار پروتئینی از مخلوط پروتئین‌های سارکوسیتیس گوسفند شناسایی شد که می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن در تشخیص سارکوسیتوزیس استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن سارکوسیستیس، کروماتوگرافی ستونی، تغلیظ با سولفات آمونیوم

مقدمه

تک یاخته‌های جنس سارکوسیستیس (Sarcocystis) انگل‌هایی با زندگی اجباری داخل سلولی می‌باشند که در سیر تکامل آن‌ها دو میزبان (نهایی و واسط) دخالت دارند [۲-۱]. تکثیر غیرجنسی (Schizogony) انگل در سلول‌های اندوتلیال میزبان واسط (معمولاً سلول‌های اندوتلیال عروق خونی) که یک حیوان علف‌خوار (یا همه چیزخوار) است انجام می‌گیرد. اندوزوئیت‌های (Endozoite) نسل آخر اندوپلی‌ژنی [(Endopolygeny) نوعی تقسیم انگل‌های سارکوسیستیس)] در عضلات مخطط، بافت‌های عصبی و فیبرهای پورکینژ قلب میزبان واسط، کیست سارکوسیست تشکیل می‌دهند [۳]. تقسیم جنسی انگل در سلول‌های اندوتلیال روده کوچک میزبان نهایی (حیوان گوشتخوار) انجام گرفته و به تشکیل

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تلفن: ۲۲۴۲۸۴۳۲-۰۲۱، فاکس: ۲۲۴۲۸۴۳۲-۰۲۱، پست الکترونیکی: bahram_14@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- استادیار گروه آموزشی بهداشت بیماری‌های دام، سازمان دامپزشکی کشور

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.5.2]

اووسیست (Oocyst) منجر می‌شود. اووسیست‌ها در بافت زیرین لایه بازال (Lamina propria) روده کوچک میزبان نهایی اسپوروزوئیت (Sprolation) انجام می‌دهند [۵-۳].

انگل‌های سارکوسیستیس در صنعت دامداری اهمیت زیادی دارند. سارکوسیست‌های این تک‌یاخته موجب افت کمیت و کیفیت گوشت و پشم دام می‌گردند. لاشه‌های آلوده به کیست‌های ماکروسکپی توسط مسئولین بهداشتی کشتارگاه منهدم می‌شوند که این کار نیز از نظر اقتصادی اهمیت دارد. مهم‌ترین راه تشخیص سارکوسیستوزیس روش سرولوژی می‌باشد. موفقیت این روش به در دسترس بودن آنتی‌ژن اختصاصی انگل بستگی دارد. محققین از روش‌های کروماتوفوکوسینگ [۶]، روش نوترکیبی [۸-۷] و ژل کروماتوگرافی [۹] برای جداسازی پروتئین‌های سارکوسیستیس استفاده کرده‌اند. تعدادی از محققین نیز از پیکره انگل به عنوان آنتی‌ژن برای تست‌های سرولوژی استفاده نموده‌اند [۱۰]. هدف این تحقیق خالص‌سازی پروتئین‌های انگل سارکوسیستیس گوسفند توسط کروماتوگرافی به منظور دسترسی به پروتنین اختصاصی انگل برای استفاده در روش سرولوژی و تشخیص بیماری بوده است.

مواد و روش‌ها

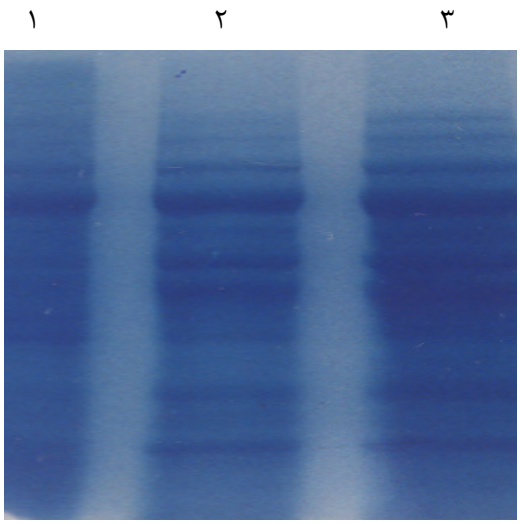
تمام مواد مصرفی و ستون‌های کروماتوگرافی از شرکت سیگما- الدریچ (Sigma -Aldrich) تهیه گردید. در این تحقیق با همکاری سازمان دامپزشکی کشور، احشاء و عضلات لاشه آلوده گوسفندان ذبح شده در کشتارگاه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. کیست‌های سارکوسیستیس توسط تیغ جراحی از احشا آلوده جدا شدند و در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی ریخته و تا هنگام استفاده در فریزر منهای ۲۰ درجه قرار گرفتند. هنگام کار، با ذوب و انجماد مکرر و سپس سونیکاسیون (Sonication) (دوازده دفعه در منهای ۲۰ درجه منجمد شده و در ۳۷ در جه ذوب گردیدند)، کیست‌ها و محتوای سیستوزوئیت آن‌ها خرد شدند و آنتی‌ژن خام (Crude antigene) تهیه گردید. از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰٪ سولفات آمونیوم برای رسوب دادن آنتی‌ژن خام استفاده شد [۱۱]. برای خالص‌سازی باندهای پروتئین از روش کروماتوگرافی ستونی (Size exclusion chromatography) با سفارز G150 و ستون کروماتوگرافی ۲ X ۳۰ سانتی‌متری استفاده گردید [۱۲]. پودر سفارز وزن گردید و در یک بشر حاوی بافر PBS ریخته شد و بعد از حل شدن پودر برای جلوگیری از ورود حباب هوا، به آرامی ژل از روی یک میله شیشه‌ای به داخل ستون ریخته شد و برای بستن (Pack) و آماده شدن ستون، سه برابر حجم ستون بافراز روی آن عبور داده شد [۱۴-۱۳]. پروتئین از یک لایه فیلتر کاغذ واتمن (Wathman) شماره سه عبورداده شد تا ذرات بزرگ آن گرفته شدند و سپس وارد ستون گردید. به آرامی جریان بافر به ستون متصل شد و خروجی ستون طوری تنظیم شد که در هر ۶ ثانیه یک قطره از آن خارج می‌شد [۱۲]. خروجی ستون در حجم‌های یک میلی‌لیتری جمع‌آوری شد (برای جلوگیری از واسرشته شدن (Denaturation) پروتئین، در هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر تریس (Tris) یک مولار با pH 9 اضافه شده بود)] [۱۲]. محتوای پروتئین لوله‌ها که از انتهای ستون کروماتوگرافی جمع‌آوری شده بود با اسپکتروفوتومتر (Spectrophotometre) اندازه‌گیری شد [۱۴] و لوله‌هایی که حاوی پروتئین نبودند از پروسه کار حذف شدند. پروئین‌های خالص‌سازی شده روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲٪ در شرایط ۰/۳ میلی‌آمپر برای هر چاهک و ولتاژ متغیر و در بافر تریس- گلایسین با دستگاه الکتروفورز عمودی الکتروفورز شدند [۱۶-۱۵]. رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی برلیانت بلوآر ۲۵۰ (Coomassei Brilliant Blue R250) انجام گرفت [۱۷].

نتایج

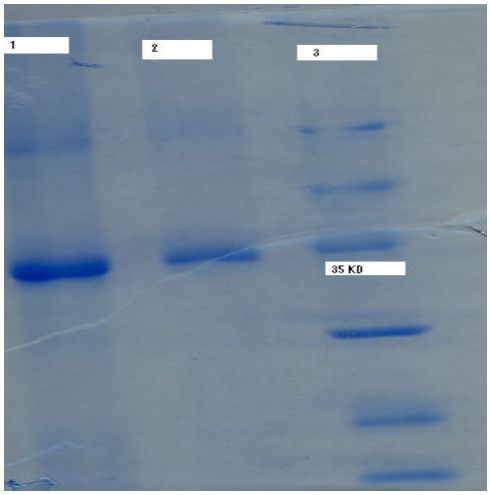
آنتی‌ژن خام تهیه شده روی ژل پلی‌اکریل‌امید ۱۲٪ الکتروفورز شد. نوارهای پروتئینی متعدد آنتی‌ژن مذکور پس از رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی‌بلو در ستون‌های ۲،۱ و ۳ شکل ۱ مشاهده می‌شوند. عمل رسوب‌دهی پروتئین‌ها با غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم انجام شد و رسوب هر مرحله روی ژل پلی‌اکریل‌امید الکتروفورزگردید. با غلظت ۸۰٪ سولفات آمونیوم دونوار پروتئینی مجزا به دست آمد. نوارهای پروتئینی مذکور در ستون‌های ۱ و ۲ و مارکر وزنی پروتئین در ستون ۳ شکل ۲ مشاهده می‌گردند. با روش کروماتوگرافی ستونی یک باند پروتئینی انفرادی با وزن ۳۵ کیلودالتون خالص گردید که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-20]

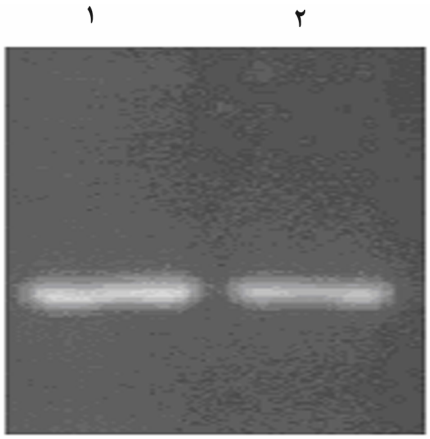
[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.5.2]



شکل ۱- الکتروفورز آنتی ژن‌های خام سارکوسیستیس روی ژل پلی‌اکریلامید
ستون‌های ۱، ۲ ، ۳ – باندهای پروتئینی آنتی‌ژن خام خالص



شکل ۲- رسوب پروتئن‌های سارکوسیستیس با غلظت ۸۰٪ سولفات آمونیوم. ستون‌های ۱ و ۲: آنتی ژن رسوب داده شده
ستون ۳: مارکر وزنی پروتئین



شکل ۳- خالص‌سازی آنتی‌ژنی ۳۵ کیلو دالتونی سارکوسیستیس با روش کروماتوگرافی بعد از رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم.

بحث

مهم‌ترین راه مقابله با سارکوسیستوزیس جلوگیری از تشکیل سارکوسیست در دام می‌باشد. عملاً این کار با واکسیناسیون انجام می‌گیرد و کارهایی نیز در این زمینه انجام گرفته است [۱۸]. اما تشخیص صحیح و به موقع بیماری از اهمیت خاصی برخورداراست. هدف این پروژه دست‌یابی به یک پروتئین خالص سارکوسیتیس به منظور استفاده در روش‌های سرولوژی بوده است. تنتر (Tenter) و همکاران از برادی زوئیت‌های (Bradyzoite) سارکوسیستیس تنلا (Sarcocystis Tenella)، سارکوسیستیس آریاتیکانیس (S.Ariaticanis)، سارکوسیستیس ژیگانته (S. Gygantae.) و سارکوسیستیس موریس (S. Muris) مخلوط پروتئین خام تهیه کردند و با روش کروماتوفوکوسینگ (Chromatofocusing) اجزا این مخلوط پروتئینی را جدا نمودند. آن‌ها معتقدند با این روش آنتی‌ژن اختصاصی هر یک از گونه‌های مذکور تهیه می‌شود و در تست‌های تشخیص اختصاصی بیماری کاربرد دارد [۶]. در تحقیق حاضر تخلیص پروتئین سارکوسیستیس با روش رسوب با سولفات آمونیوم و متعاقب آن کروماتوگرافی ستونی انجام گرفت که پروتئین مورد بحث آماده استفاده در روش‌های سرولوژی مانند الایزا و وسترن بلات می‌باشد. هدف نهایی این کار نیز مانند تحقیقات دیگر محققین در این زمینه می‌باشد. بنتز (Bentz) و همکاران، ساویله (Saville) و همکاران وبلیث (Blyth) و همکاران به وسیله وسترن بلات (Western blot) سارکوسیستیس نرونا (S. Neurona) را در اسب تشخیص دادند [۲۱-۱۹]. لازم به ذکر است که موفقیت در انجام این روش مرهون وجود آنتی‌ژن اختصاصی می‌باشد که خود هدف تحقیق حاضر بوده است. مرتون (Merton) و همکاران یک پروتئین نوترکیب ۴۶ کیلودالتونی از سارکوسیستیس تنلا تهیه کردند و مشخص شد آنتی‌بادی آن یک پلی‌پپتید ۲۵ کیلو دالتونی سارکوسیستیس تنلا را با روش الایزا Enzyme Linled Immuno Surbent Assay (ELISA) شناسایی می‌کند [۷]. مورستی (Morsty) و همکاران سیستوزوئیت‌های سارکوسیستیس را از عضله گاو آلوده جدا کردند و به عنوان آنتی‌ژن در تست الایزا استفاده کردند [۱۰]. سایتو (Saito) و همکاران و ساوینی (Savini) و همکاران از آنتی‌ژن‌های سارکوسیستیس کروزی (S.Cruzi)

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-20]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.5.2]

برای شناسایی گاوهای آلوده به سارکوسیستیس از طریق سرم شناسی استفاده نمودند [۲۳-۲۲]. لازم است در آینده، با آزمایشات بیشتر اختصاصیت و حساسیت پروتئینی که در تحقیق حاضر به دست آمده است به عنوان آنتی‌ژن اختصاصی در کارهای سرولوژی به منظور تشخیص سارکوسیستوزیس مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق یک نوار پروتئینی از مخلوط پروتئین‌های سارکوسیستیس گوسفند خالص‌سازی شد که می‌تواند به عنوان آنتی‌ژن در آزمایش‌های سرم‌شناسی برای تشخیص سارکوسیستوزیس استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با پشتیبانی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و حمایت سازمان دامپزشکی کل کشور انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان از مسئولین مربوطه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

[1] Dubey JP, Saville WJ, Lindsay DS, Stich RW, Stanek JF, Speert CA, et al. Completion of the life cycle of Sarcocystis neurona. *J Parasitol*, 2000; 86(6): 1276-80.

[2] Stanek JF, Dubey JP, Oglesbee MJ, Reed SM, Lindsay DS, Capitini LA, et al. Life cycle of Sarcocystis neurona in its natural intermediate host, the raccoon, Procyon lotor. *J Parasitol*; 2002; 88(6):1151-8.

[3] Fayer R. Sarcocystis spp. in human infections. *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17(4): 894-902.

[4] Dubey JP. A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. *J Am Vet Med Assoc;*1976; 169(10):1061-78.

[5] Erber M. Life cycle of Sarcocystis tenella in sheep and dog. *Z Parasitenkd*, 1982; 68(2): 171-80.

[6] Tenter AM, Zimmerman GL, Johnson AM. Separation of antigens from sarcocystis species using chromatofocusing. *J Parasitology*, 1991; 77(5): 727-36.

[7] Martens CM, Tenter AM, Vietmeyer CE and Johnson AM. Production of a recombinant protein of sarcocystis tenella and evaluation of its diagnostic potential in an ELISA. *Vet Parasitol*, 1996; 65(3-4): 185-97.

[8] Hoane JS, Morrow JK, Saville WJ, Dubey JP, Granstrom DE, Howe DK. Enzyme-Linked lmmunosorbent assays for detection of equine antibodies specific to sarcocystis neurona surface antigens. *Clin Diag Laborat Immunolo*, 2005; 12(9): 1050-6.

[9] Koudela B. Purification of cystozoites of Sarcocystis sp. by the chromatographic gel Spheron. *Folia Parasitol*, 1985; 32(4): 295-302.

[10] Morsy TA, Abdle Mawla MM, Salama MM, Hamdi KN. Assessment of intact Sarcocystis cystozoites as an ELISA antigen. *J Egypt Soc Parasitology*, 1994; 24(1): 85-91.

[11] Hudson L, Hay FC. 3 th ed (1989). Practical immunology.

[12] Fisher L. Experimental technique in column gel filtration chromatography. in Gell filtration chromatography 2nd fully revised ed by Fisher L, Elsevier publication. 1980; pp: 81-137.

[13] Culter P. Size- Exclusion Chromatography. In Molecular Biomethods Handbook. Edited by Rapley R and Walker JM. Humana press, 1998; pp: 451-460.

[14] Scope PK. Protein purification . Principles and practice. 2 nd ed. Springer Verlage. 1987.

[15] Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Methods in Molecular Biology vol 1 Proteins. Edited by Joh. M walker. 1984; pp: 41-55.

[16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of theeriophage bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-85.

[17] Smith BJ. Acetic Acid - Urea Polyacrylamide Gel Electrophoresis of proteins. In Methods in Molecular Biology, vol 1, Proteins. Edited by Joh. M walker. 1984; pp: 63-73.

[18] Fayer R, Dubey JP. protective immunity against clinical sarcocystosis in cattle. *Vet. Parasitol*, 1984; 15(3-4): 187- 201.

[19] Bentz BM, Granstrin DE, Staper S. Seroprevalence of antibodies to sarcocystis neurona in horses residing in a county of southeastern Pennsylvania. *J Am Vet Med Asso*, 1997; 210(4): 517-8.

[20] Blythe LL, Granstrom DE, Hansen DE, Walker LL, Bartlett J, Stamper S. Seroprevalence of antibodies to Sarcocystis neurona in horses residing in Oregon . *J Am Vet Med Asso*, 1997; 210(4): 525-7.

[21] Saville WJ, Reed SM, Granstrom DE, Hinchcliff KW, Kohn CW, et al. Seroprevalence of antibodies to Sarcocystis neurona in horses residing in Ohio . *J Am Vet Med Asso*, 1997; 210(4): 519-24.

[22] Savini G, Dunsmore JD, Robertson ID. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of Sarcocystis cruzi infection in cattle using S. cruzi merozoite antigen. *Vet parasitol,* 1994; 51(3-4): 181-9.

[23] Saito M, Ohuchi Y, Kobayashi M, Haritani M, Itagaki H. Preparation and applicability of Sarcosystis cruzi antigens and their anti-S. cruzi rabbit for serodiagnosis of bovine sarcocystosis. *J Vet Med Sciences*, 1994; 56(3): 589-91.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-12-20]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.5.2]