چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

تعيين پروتئينهاي ايمني زا مايع هيداتيد و تگومنت كيست هيداتيد در گاوهاي مبتلا به هيداتيدوز

دكتر غلامرضا هاشمي تبار*. دكتر غلامرضا رزمي. و سميه فهيمي نيا
گروه پاتوبيولوژي دانشكده دامپزشكي، دانشگاه فردوسي مشهد ، مشهد ، ايران.

چكيده :
هيداتيدوز، يكي از بيماريهايي مشترك بين انسان و دام است كه انتشار جهاني داشته وساليانه خسارتهاي اقتصادي وبهداشتي فراواني بوجود مي آورد. اين بيماري ناشي ار ابتلا به مرحله لاروي انگل اكينوكوكوس گرانولوزوس مي باشد. اين لارو در بدن ميزبان واسط در طي مراحل تكامل باعث تحريك سيستم ايمني وتوليد آنتي بادي مي شود. اين مطالعه با هدف شناسايي آنتي ژنهاي مايع هيداتيد وتگومنت كيست هيداتيد، برروي ۳۰ نمونه كبد وريه گاو مبتلا به كيست هيداتيد انجام شد. پس از آسپيره كردن مايع هيداتيد وجدا كردن تگومنت ها از كيستهاي هيداتيد در شرايط استريل، غلظت اين پروتئينها بر اساس روش برادفورد تعيين شد. سپس وزن مولكولي پروتئين هاي تغليظ شده با روش SDS-PAGE و سيستم ناپيوسته تعيين گرديد. جهت وجود خصوصيت آنتي ژنيسيته پروتئينها، آزمايش Western blotting نيز انجام شد. در الكتروفورز مايع هيداتيد غليظ شده باندهايي با وزنهاي ملكولي ٣٦ و ٥٠ و ٦٤-٩٨ كيلو دالتوني مشخص گرديد كه باندهاي ٣٦ و ٦٤-٩٨ كيلو دالتوني در آزمايش وسترن بلات غالب بودند. در تگومنت نيز باندهايي با وزنهاي ملكولي ٢٢و ٣٦ و٦٤-٩٨ كيلو دالتون مشخص شد وباند ٦٤- ٩٨ كيلو دالتوني تگومنت خاصيت آنتي ژنيسيته داشته ولي ساير باندها نتوانستند در آزمايش وسترن بلات ايجاد كمپلكس رنگي نمايند..
كلمات كليدي: هيداتيدوز, مايع هيداتيد, تگومنت, گاو.

Detection of immunogen proteins of tegument and hydatid fluid in cattle with Hydatidosis

Hashemitabar*, G.R., Razmi, G.R., Fahiminia, S.

Pathobiology Department, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Summary
Hydatidosis is a widespread disease, which has huge economic and health impacts. The disease is one of the zoonoses caused by Metacestode of Echinococcus granulosus. This larvae during developing in the intermediate host activates immune system and produce antibody.
This study was conducted on 30 samples of liver and lung of infected cows by hydatidosis. The aim of this project was to detect hydatid fluid (HF) and tegument 's antigens. The hydatid fluid and teguments were isolated in sterile condition. Samples were prepared to obtain polypeptide profile and fractions using SDS-PAGE. Then western blotting test was conducted to detect the antigenic characteristics of proteins.
Three fractions were observed in HF polypeptide profile.
The results were shown that the molecular weight of these fractions was 36, 50 and 64-98 KDa. The 36 and 64-98 fractions were obviously dominant in western blotting test. The molecular weight of fractions of tegument was 22, 36 and 64-98. The 64-98 fraction from tegument showed antigenic activity in western blotting.
Keywords: *hydatidosis, hydatid fluid, tegument, cattle*

مقدمه:
سستود اكينوكوكوس گرانولوزوس، عامل هيداتيدوز است كه متاسستود انگل سبب ايجاد كيست‌هاي تك حفره‌اي در اندام‌هاي داخلي بدن ميزبان‌هاي واسط مي‌گردد.بدليل اهميت همه‌گيرشناسي تفاوت موجود بين جمعيتهاي اكينوكوكوس بخصوص اكينوكوكوس گرانولوزوس، چنين جمعيتهاي متفاوتي در قالب سويه‌هاي متفاوتي بررسي مي‌شوند. در گونه اكينوكوكوس گرانولوزوس، مدارك قوي براي وجود حداقل ۹ سويه سازگاري يافته با ميزبان وجود داردكه اكثريت آنها بطور وسيعي از نظر جغرافيايي پراكنده هستند(۱). مطالعات انجام شده در كشورهاي مختلف بيانگر تفاوت در ماهيت پروتئين‌هاي سويه‌هاي مختلف مي‌باشد. تنوع سويه‌هاي اكينوكوكوس گرانولوزوس در كنترل هيداتيدوز- اكينوكوكوز در يك كشور يا منطقه اهميت فوق العاده زيادي دارد. زيرا ممكن است سويه‌ها بر الگوهاي انتقال آلودگي تأثير بگذارند.

مواد و روش‌ها:
الف: جداسازي مايع هيداتيد و تگومنت ها
بعد از انتقال كبد و ريه‌هاي آلوده به آزمايشگاه دانشكده دامپزشكي، پس از استريل كردن سطح كيست‌ها بوسيله يك صفحه داغ يا تيغه داغ و بعد از زدن چند ضربه به كيست جهت معلق شدن تگومنت‌ها، مايع داخل كيست‌ها بوسيله يك سرنگ استريل (سرسرنگ گيج ۱۸) خارج گرديد . محتويات كيست‌هاي هر نمونه به لوله فالكون دربدار استريل مجزايي انتقال يافتند. جهت جداسازي تگومنت‌ها، مايعات اخذ شده با ۳۰۰۰ دور در دقيقه و به مدت ۱۵ دقيقه سانتريفوژ شدند. مايع رويي (مايع هيداتيد) با انتقال به لوله فالكون استريل در فريزر ۲۰- درجه سانتيگراد نگهداري گرديد. تگومنت ها پس از جداسازی بامحلول PBS (PH=7.3) سه بار شستشو داده شد و در همين بافر نگهداري گرديدند. با توجه به يكسان بودن الگوي پروتئيني HF كه بيانگر يكسان بودن سويه گاوی اكينوكوكوس گرانولوزوس مي‌باشد، نمونه‌هاي تگومنت بصورت مجموع تهيه شد و در ۲۰- درجه سانتيگراد نگهداري شدند.
ب: تهيه پروتئين خام از نمونه‌هاي تگومنت جدا شده

در ابتدا نمونه تگومنت با مخلوط کن يكنواخت و سپس بوسيله ازت مايع و بن ماري ۳۷ درجه سانتي‌گراد، سه بار انجماد و ذوب و در ادامه نمونه هموژن و سونيكيت گرديد(110V, 170W, 2X15sec)و بعد از انتقال به لوله فالكون(۵۰ سي‌سي)، در دماي اتاق سانتريفوژ شد(4000 rpm,15min) و محصول نهايي به تيوب‌هاي اپندرف منتقل و در فريزر۲۰- درجه سانتيگرادنگهداري گرديد. براي اطمينان از ايجاد باند و تخمين حجم نمونه مورد استفاده براي الكتروفورز، غلظت پروتئين نمونه‌ها به‌روش برادفورد اندازه‌گيري شد.

ج: تعيين الگوي پروتئيني نمونه ها به روش SDS-PAGE

براي تعيين الگوي پروتئيني، الكتروفورز نمونه‌ها روي ژل پلي‌اكريل‌آميد ۱۲/۵% همراه با سديم دودسيل‌سولفات (SDS-PAGE) تحت شرايط دناتوره كننده با سيستم ناپيوسته انجام شد(۲). جهت تعيين وزن ملكولي باندهاي جداشده از استاندارد وزن ملكولي با محدوده وسيع استفاده شد.

نتايج و بحث

در الكتروفورز مايع هيداتيد غليظ شده باندهايي با وزنهاي ملكولي ۳٦ و ۵۰ و ٦٤-۹۸ كيلو دالتوني مشخص گرديد (شكل ۱) كه باندهاي ۳٦ و ٦٤-۹۸ كيلو دالتوني در آزمايش وسترن بلات غالب بودند (شكل ۲). در تگومنت نيز باندهايي با وزنهاي ملكولي ۲۲و ۳٦ و٦٤-۹۸ كيلو دالتون مشخص شد (شكل ۱) وباند ٦٤- ۹۸ كيلو دالتوني تگومنت خاصيت آنتي ژنيسيته داشته (شكل ۲) ولي ساير باندها نتوانستند در آزمايش وسترن بلات ايجاد كمپلكس رنگي نمايند. تا كنون الگوي پروتئيني مشخصي براي مايع هيداتيد سويه گاوي ذكر نشده است و فقط در يك مورد باندهاي ۳۸ و ۱۱٦ كيلو دالتوني جدا شده است. در مطالعه انجام شده بوسيله كانوار و همكاران (۱۹۹٤)در گوسفند به‌وجود يك آنتي‌ژن ۸ كيلودالتوني اشاره شده است كه علاوه بر HF در تگومنت‌ها وجود دارد (۳) . وولارد و همكاران(۱۹۹۸) باندهايي با وزن ملكولي٦، ۱۲، ۱۳، ۲۱-۲۲ و ۲٤ كيلودالتون را در نمونه گوسفندي جدا نمودند (٤) . فو و همكاران (۱۹۹۹) نشان دادند كه يك آنتي‌ژن ٦٦ كيلودالتون در تگومنت، پارانشيم زير تگومنت، لايه زاياي كيست تگومنت وجود دارد(۱). وجود يك آنتي‌ژن ۲۹ كيلودالتوني جديد(P-29)، توسط گانزالز و همكاران(۲۰۰۰) در تگومنت، روستلوم تگومنت‌ها و لايه زاياي كيست به اثبات رسيده است كه در HF و عصاره كرم بالغ وجود ندارد(۲).

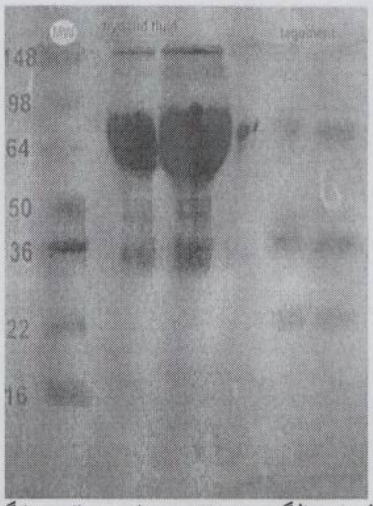
References:

Fu Y, Martinez C, Chalar C, etal; A new potent antigen from Echinococcus granulosus associated with muscle and tegument; *Mol Biochem Parasitol* (1996); 102(1):43-52.

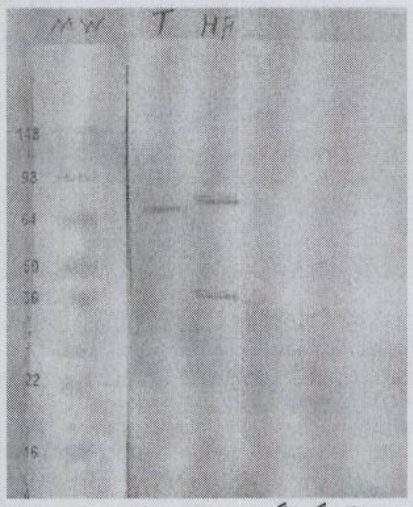
Gozalez G, Spinelli P, Lorenzo C, etal; Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of echinococcus granulosus which is immunologicaly related to, but distinct from, antigen 5; *Mol Biochem Parasitol* (2000); 105(2): 177-84.

Kanwar JR, Kanwar R; Purification and partial immunochemical characterization of a low molecular mass, diagnostic echinococcus granulosus immunogen for sheep hydatidosis; *FEMS Immunol Med Microbiol* (1994); 9(2):101-7.

Woollard DJ, Gauci GG, Heath DD, Lightowlers MW; Epitope specification and antibody response to the EG95 hydatid vaccine; *Parasite Immunol* (1998); 20:535-540.



شكل ۱ : الگوي پروتئيني مايع هيداتيد و تگومنت



شكل ۲ : وسترن بلاتينگ تگومنت (T)و مايع هيداتيد (HF)