تهیه و تخلیص آنتی ژن 60(A60) از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس سویه BCG

فاطمه فلاح Ph.D☆، بهرام کاظمی Ph.D*، گیتا اسلامی Ph.D.☆، فرحنوش دوستدار M.Sc.*♦، مونا قاضی M.Sc.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۷۱۹-۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

چکیده

* **هدف:** تهیه و تخلیص آنتی ۶۰(A60) از سیتوپلاسم BCG

* **مواد و روشها:** در این تحقیق از روش کروماتوگرافی حذفی توسط ستون سفارز 4B برای تخلیص A60 از سیتوپلاسم BCG استفاده گردید. برای تایید تخلیص آنتی ژن، تکنیک ایمونوالکتروفوز با استفاده از آنتی بادیهای Anti BCG و Anti A60 به کار گرفته شد. آنتی ژن ۶۰ تخلیص شده با روشهای الکتروفوز در ژل آگارز ۵/ ۰درصد و دبل دیفوژن نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی وجود آنتی ژن از هر دو قسمت سیتوپلاسم و دیواره سلولی باکتری آزمایش دات‌بلات با استفاده از آنتی بادی Anti A60 انجام شد. برای مطالعه ساختاری این آنتی ژن اجزای آنتی ژن در SDS-PAGE تفکیک شدند و به کاغذ نیتروسلولز منتقل شده و آزمایش وسترن بلات با استفاده آنتی بادی Anti A60 انجام شد.

* **یافته‌ها:** آنتی ژن تخلیص شده در ایمونوالکتروفوز متقاطع با استفاده از Anti BCG و Anti A60 به صورت کم حرکت‌ترین جزء سیتوپلاسم نمودار گردید. آنتی‌ژن مذکور در الکتروفوز با ژل آگارز به صورت تک باند مشاهده گردید و در ایمونودیفیوژن در مواجه با Anti BCG دو خط رسوبی تشکیل داد. در بررسی با روش دات بلاتینگ هم سیتوپلاسم و هم دیواره سلولی باکتری با آنتی بادی Anti A60 واکنش مثبت نشان دادند. وقتی اجزای A60 با روش SDS-PAGE تفکیک شدند و وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی Anti A60 انجام شد، اجزای پروتئینی با اوزان ۳۵، ۳۸، ۴۰، ۴۶ و ۶۵کیلو دالتون شناسایی گردید.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده مبین این است که A60 یک ماکرومولکول با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰۰کیلو دالتون در مایکوباکتریوم بویس سویه BCG و دارای اجزای متعدد پروتئینی است. A60 هم در سیتوپلاسم و هم در دیوارهٔ سلولی BCG موجود است و می‌توان آن را با استفاده از کروماتوگرافی حذفی، از سیتوپلاسم واکسن BCGکه خوشبختانه درکشور ما نیز تولید می‌گردد، به راحتی تخلیص نمود.

گل واژگان: آنتی ژن 60(A60)، گروماتوگرافی، BCG، خالص سازی، مایکوباکتریوم بوویس

مقدمه

بیماری سل هنوز هم به عنوان یکی از مشکلات مهم اجتماعی و پزشکی مهم جامعه بشری در دنیا و ایران مطرح است. تشخیص به موقع و سریع سل ریوی و خارج ریوی برای شروع درمان مناسب بسیار ضروری است. روشهای رایج تشخیصی موجود، بسیار زمانگیر، فاقد حساسیت و غیر اختصاصی هستند. تاکنون آنتی ژنهای متعدد مایکوباکتریایی شناسایی شده‌اند که در واکنش با سیستم ایمنی میزبان نقش دارند. شناسایی این آنتی‌ژنها برای تشخیص و حفاظت بر علیه بیماری سل از اهمیت بالایی برخوردار است. A60 آنتی ژن مقاوم به حرارت موجود در سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. با استفاده از این آنتی‌ژن تست الایزایی برای تشخیص سل طراحی شده و با نتایج خوبی همراه بوده است. همچنین در سایر تحقیقات A60 نتایج خوبی را در زمینه ایجاد حفاظت علیه عفونتهای تجربی و اثرات چشمگیری را در زمینه درمان و پیشگیری از پیشرفت سرطان نشان داده است.

بیماری سل در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شیوع فراوانی دارد. تشخیص سریع و به موقع سل ریوی و خارج ریوی برای شروع درمان مناسب بسیار ضروری است. متاسفانه روشهای رایج مورد استفاده برای تشخیص سل مانند بررسی خلط از جهت وجود باسیلهای اسید فست، کشت خلط یا سایر مایعات بدن، تست پوستی توبرکولین و بررسیهای رادیولوژیک به حساسیت تشخیصی لازم دست نیافته‌اند (۱). تاکنون کوششهای فراوانی برای دستیابی به یک روش حساس و اختصاصی برای تشخیص سل صورت گرفته است. این روشها متکی بر شناسایی آنتی‌بادیهای تولید شده بر علیه آنتی‌ژنهای میکروباکتریایی یا شناسایی آنتی‌بادیهای مختلف مایکوباکتریایی در سرم یا سایر مایعات بدن است که با استفاده از روشهای الایزا یا تکنیکهای مولکولی صورت می‌گیرد (۱).

مایکوباکتریومها دارای ترکیبات ایمونولوژیکی فعالی هستند که نقش مهمی در بیماریهای مایکوباکتریایی بازی می‌کنند. یک گروه از این آنتی‌ژنها که مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند، آنتی‌ژنهای درشت مولکول مقاوم به حرارت (TMA) هستند. شناخته شده‌ترین عضو این گروه آنتی ژن 60(A60) مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم توبرکولوزیس است (۲). تستهای سرولوژیکی متعددی متکی بر استفاده از A60 و روش الایزا برای تشخیص سل به کار رفته است (۳).

با تکنیک ایمونوالکتروفورز متقاطع ۳۰ آنتی ژن مایکوباکتریوم بوویس شناسایی شده است و مشخص گردیده که آنتی ژن ۶۰کم حرکت‌ترین آنها است (۴). این ترکیب آنتی ژن اصلی ترکیباتی مانند Old Tuberculin و Purified Protein Drivative (PPD) و مقاوم به حرارت است - این ترکیبات به عنوان معرف در تشخیص بیماری سل استفاده می‌شوند - (۵). آنتی ژن ۶۰ دارای مقادیر مساوی از ترکیبات پروتئینی، لیپیدی و کربوهیدراتی است و نشان داده شده است که این آنتی ژن ایمنی هومورال را نیز مانند ایمنی سلولی القاء می‌کند (۵). ۸۵درصد آنتی بادیهای ضدمایکوباکتریایی در سرم بیماران مبتلا به سل بر علیه A60 است (۶). این ایمنی‌زایی شدید آنتی ژن ۶۰ آن را به عنوان یک کاندیدای مناسب برای تستهای تشخیصی سل معرفی می‌کند (۷، ۸). در مطالعات دیگری که بر روی این آنتی ژن انجام گرفته، اثرات حفاظتی این آنتی‌ژن نشان داده شده است (۹، ۱۰). این آنتی‌ژن همچنین دارای اثرات مفیدی در پیشگیری و در مان سرطان است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). بنابراین در این تحقیق ما بر آن شدیم که با خالص‌سازی آنتی‌ژن ۶۰ و شناسایی اجزای تشکیل دهنده آن راه را برای مطالعات بعدی جهت شناسایی بیشتر خواص این آنتی ژن و اجزای آن و کابردهای آنها هموار سازیم.

مواد و روشها

* باکتری

مایکوباکتریوم بوویس به صورت واکسن BCG Master Seed lot 1173-P2 lot C از انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. باکتریها در فلاسکهای فرن باخ حاوی محیط سوتون کشت داده شد و به مدت سه هفته در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. کلنیهای باکتری از سطح محیط جمع‌آوری و با دستگاه بیرکو متراکم و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

* تهیه هموژن باکتری

باکتریها در بافر PBS(150mM NaCl, 10mM Na phosphate buffer PH=۷/۴) سوسپانسیون شدند و با دستگاه Hyperation hemogenizer (۱۵۰۰۰dar at 4°C) دیواره سلولی باکتریها تخریب شد و به صورت هموژن در آمدند. باکتریهای تخریب نشده با سانتریفوژ از هموژن باکتری جدا شدند (۶۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد). سپس هموژن باکتری در ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد تا سیتوپلاسم در مایع رویی قرا گرفته و دیواره سلولی رسوب داده شود.

* کروماتوگرافی ستونی سیتوپلاسم

سیتوپلاسم از ستون کروماتوگرافی حذفی سفارز 4B (Sigma Chemical company, USA) عبور داده شد (10ml حجم ستون /1ml نمونه) و سپس ستون با بافر PBS شستشو داده شد. فراکشنهای به دست آمده از ستون در چندین لوله جمع آوری شد.

* الکتروفورز

ایمونوالکتروفورز متقاطع مطابق روش ارائه شده توسط Closs و همکاران در سال ۱۹۸۰ انجام گرفت. ابتدا صفحه شیشه‌ای با ابعاد ۱۰×۲ سانتیمتر با لایه‌ای به قطر ۱میلی‌متر از ژل حاوی ۱درصد آگارز در بافر تریس باربیتال (0.014mole barbital, 0.02mole tris 0.02mole sodium barbital) PH=8.6 پوشانده و ۱۰ میکرولیتر نمونه در چاهک ژل ریخته شد و ابتدا در مسیر اول با قدرت ۲۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت در ۱۵ درجه سانتیگراد الکتروفورز شد. ژل حاوی باندها بریده شد و به شیشه دوم با ابعاد ۷×۵ سانتیمتر منتقل شد، به طوری که در جهتی عمود بر جهت الکتروفورز اول قرار

گیرد و حفره حاوی نمونه در گوشه سمت چپ شیشه دوم با فاصله ۰/۵ میلیمتر قرار گیرد. ژل دوم حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آنتی سرم Anti BCG (Dako, Copenhagen, Denmark) بود و الکتروفورز در مسیر دوم با قدرت ۸۰ ولت به مدت ۱۸ ساعت در ۱۵ درجه سانتیگراد انجام شد. در ایمونوالکتروفورز متقاطع با ژل میانی، ژل میانی بین ژل اول و دوم قرار داده شد که حاوی آنتی سرم Anti A60 (anda biological, anda TB Kit, France) بود. پس از پایان الکتروفورز، ژلها شسته شدند و با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی انجام گرفت.

* ایمونودیفیوژن

ابتدا صفحه شیشه‌ای با یک لایه آگارز ۱ درصد در بافر PH=۷/۲ و PBS پوشانده شد. Anti BCG در حفره مرکزی و نمونه‌های سیتوپلاسم و آنتی ژن تخلیص شده در حفره‌های اطراف قرار گرفت. شیشه‌ها در محفظه مرطوب به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس ژلها شسته و با رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شدند.

* دات بلات و وسترن بلات

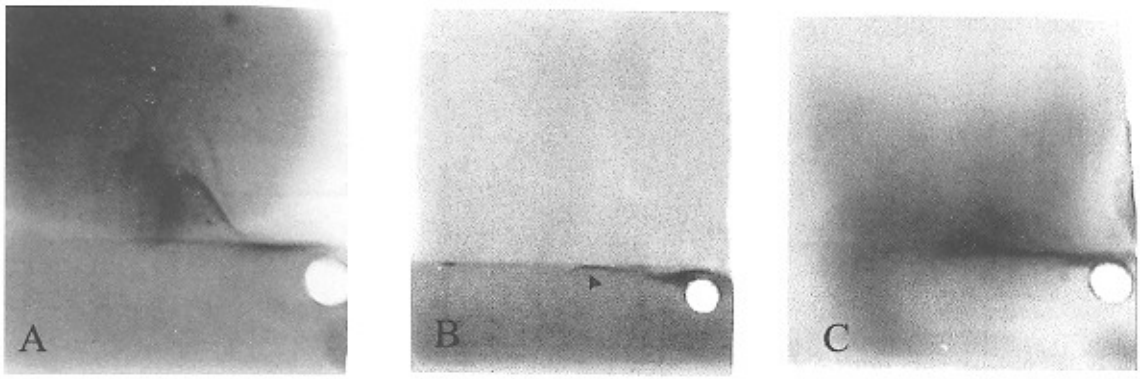
آنتی ژن ۶۰ و سایر اجزای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی روی کاغذ نیتروسلولز قرار داده شدند و با محلول بلاتینگ (PBS PH=۷/۲، 0.5% Tween20) بلوک شد. آنتی سرم (۱/۱۰۰۰dilution) Anti, A60 به مدت ۱ ساعت روی نمونه‌ها ریخته شد و مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. کاغذ حاوی نمونه‌ها در بافر شستشو (PBS, 0.5% Tween20) شسته شدند و در آنتی بادی ثانویه Anti human IgG-HRP (۱/۱۰۰۰dilution) (anda Bological, TB Kit, France) به مدت ۱ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. کاغذ نیتروسلولز با بافر شستشو شسته شد و رنگ‌آمیزی با محلول دی آمینوبنزیدین (DAB) در حضور پراکسید هیدروژن انجام گرفت.

برای وسترن بلات اجزای آنتی ژن ۶۰ و سیتوپلاسم BCG به وسیله الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل با گرادیان ۱۸-۶درصد در حضور سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE) در مقابل مارکر پروتئینی (Sigma chemical company, USA) تفکیک و اجزای تفکیک شده به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند و کاغذ با بافر بلاتینگ بلوک شد و به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی اولیه Anti60 (۱/۱۰۰۰ dilution) در ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه Anti human IgG-HRP (۱/۱۰۰۰ dilution) در دمای محیط انکوبه و پس از شستشو با دی‌آمینوبنزیدین در حضور پراکسید هیدروژن رنگ‌آمیزی شد.

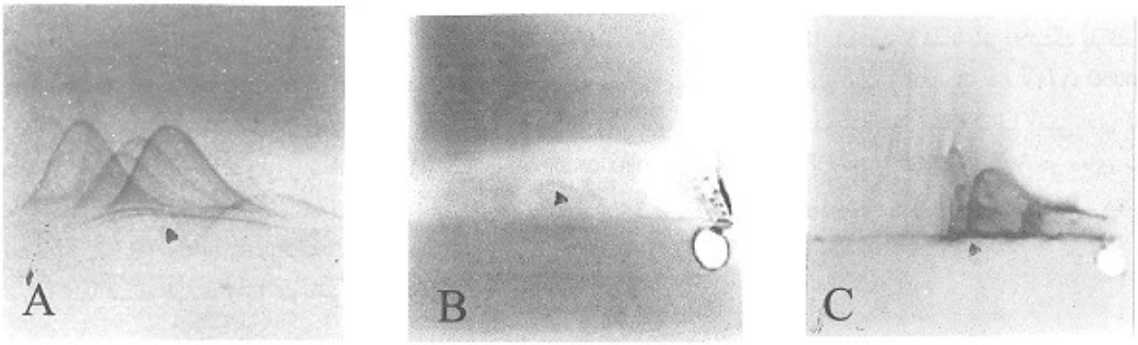
یافته‌ها

در این تحقیق آنتی ژن ۶۰ از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس BCG تهیه شد. به این منظور ابتدا دیواره سلولی به وسیله فشار زیاد تخریب و سیتوپلاسم آن توسط سانتریفوژ جدا شد. اجزای سیتوپلاسم در سیستم ایمونوالکتروفورز متقاطع از یکدیگر جدا شدند. در این روش آنتی ژنها در مسیر اول در ژل آگارز حاوی بافر و در مسیر دوم در ژل آگارز حاوی Anti BCG حرکت کردند رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو حدود ۳۰ آنتی ژن را در سیتوپلاسم نشان داد (شکل A۱) که بر اساس الگوی رفرانس Closs و همکاران در سال ۱۹۸۰ شناسایی شدند. در این الگو خط رسوبی‌ای که نزدیکترین خط به مبدا است مربوط به آنتی ژن ۶۰ و Rf(Relative electriphoretic mobility) کوچکترین Rf در بین اجزای موجود در سیتوپلاسم باکتری است. آنتی ژن ۶۰ با روش کروماتوگرافی حذفی با استفاده از ستون سفارز 4B از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس تخلیص گردید و سپس برای تایید تخلیص آنتی‌ژن ایمونوالکتروفورز متقاطع انجام شد (شکل B۱). الگوی رسوبی جزء جدا شده که تقریباً شامل کلیه آنتی ژن ۶۰ موجود در سیتوپلاسم است را نشان می‌دهد در حالی که در (شکل C۱) که مربوط به اجزای دیگر است، سایر پروتئینهای موجود در سیتوپلاسم نیز مشاهده می‌شوند.

در ایمونوالکتروفورز متقاطع با استفاده از آنتی بادی Anti 60 در ژل میانی در مورد نمونه سیتوپلاسم باندهای متعدد (شکل A۲) و در مورد نمونه آنتی‌ژن ۶۰ خالص شده تنها یک باند در ژل میانی مشاهده شد (شکل B۲). در مورد اجزای دیگر در ژل میانی باندی مشاهده نشد و در ژل دوم حاوی Anti BCG، باندهای متعدد به غیر از باند آنتی ژن ۶۰ مشاهده شد (شکل C۲).

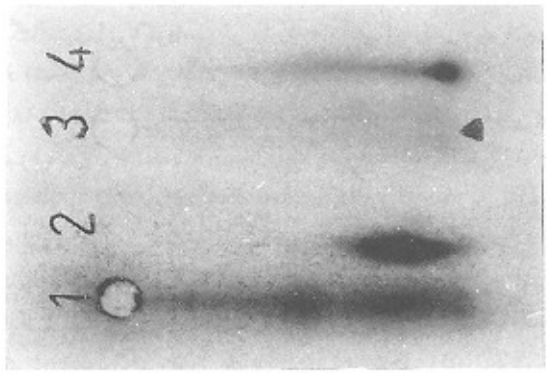


شکل ۱: ایمونوالکتروفورز متقاطع، A: سیتوپلاسم، B: آنتی ژن ۶۰، C: سایر قسمتهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی



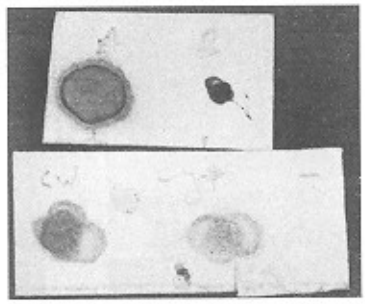
شکل ۲: ایمونوالکتروفورز متقاطع با ژل میانی، A: سیتوپلاسم، B: آنتی ژن ۶۰، C: سایر قسمتهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی

در الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۵ درصد، آنتی ژن ۶۰ به صورت تک باند مشاهده شد در حالی که در نمونه سیتوپلاسم باندهای متعدد مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳: ایمونوالکتروفورز در ژل آگارز ۰/۵ درصد
۱: سیتوپلاسم، ۲: مارکر، ۳: آنتی ژن ۶۰ خالص شده، ۴: مارکر ۱۵۰Kd

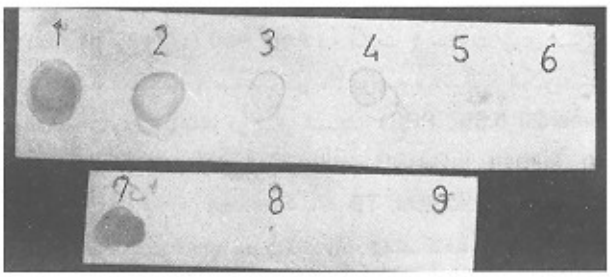
آزمایش دبل دیفیوژن با نمونه سیتوپلاسم و آنتی‌ژن ۶۰ با استفاده از Anti BCG روی ژل آگارز انجام شد. نمونه سیتوپلاسم در مواجه با Anti BCG خطوط رسوبی متعدد و نمونه آنتی ژن ۶۰ دو خط رسوبی تشکیل داد. برای بررسی وجود آنتی ژن ۶۰ در سیتوپلاسم و دیواره سلولی باکتری، آزمایش دات بلاتینگ با استفاده از Anti 60 انجام شد که هر دو جزء باکتری با Anti 60 واکنش مثبت به صورت تشکیل لکه رنگی نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴: دات بلات، ردیف بالا: با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti BCG، ردیف پایین: با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti A60، ۱: سیتوپلاسم، ۲: دیواره سلولی، ۳: کنترل منفی

در بین اجزای جدا شده از ستون کروماتوگرافی اولین اجزای جدا شده از ستون بیشترین واکنش مثبت را در دات بلات با Anti 60 نشان دادند که نشان دهنده وجود آنتی ژن در این اجزا بود (شکل ۵).

برای بررسی اجزای تشکیل دهنده آنتی ژن ۶۰ آزمایش وسترن بلات با استفاده از Anti 60 انجام شد. ابتدا اجزای آنتی ژن ۶۰ با روش SDS-PAGE از یکدیگر تفکیک شدند و پس از انتقال به کاغذ نیتروسلولز و مواجه با Anti 60 باندهای رنگی مربوط به پروتئینهای با اوزان ۳۵، ۳۸، ۴۰، ۴۶، و ۶۵ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۶). این نتایج نشان می‌دهد که آنتی ژن ۶۰ دارای چندین شاخص آنتی ژنیک است که با Anti 60 واکنش می‌دهند.



شکل ۵: دات بلات از فراکنشهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی با استفاده از آنتی‌بادی اولیـــه Anti 60، ۱-۸: فراکنشهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی، ۷: سیتوپلاسم، ۹: کنترل منفی

شکل ۶: وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی اولیه Anti A60، ۱: سیتوپلاسم، ۲: آنتی ژن ۶۰

بحث

مایکوباکتریومها به واسطه داشتن آنتی ژنهای متعدد با سیستم ایمنی میزبان واکنش نشان می‌دهند. شناخت این آنتی‌ژنها در تشخیص و

حفاظت بر علیه این باکتریها نقش اساسی دارد. استفاده از سیستم رفرانس متکی بر تکنیک ایمونوالکتروفورز متقاطع، موجب جداسازی و شناسایی ۳۰ آنتی‌ژن در مایکوباکتریوم بوویس شده است و بررسی سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس، آنتی ژن ۶۰ به صورت کم تحرک‌ترین آنتی ژن در ایمونوالکروفورز متقاطع نشان داده است (۴). تاکنون آنتی ژنهای مایکوباکتریایی متعدد شناخته شده است که بعضی از آنها در تستهای سرولوژیک و پوستی مایکوباکتریومها دارای اهمیت هستند. یکی از مهمترین گروههای این آنتی ژنها آنتی ژنهای TMA(Termostable Macromolecular Antigen) است. وجود آنتی بادیهای ضد این آنتی ژنها در سرم بیماران مبتلا به سل، نشانه نقش ایمونولوژیک مهم این آنتی ژنها است (۲). ۸۵ درصد آنتی بادیهای ضد مایکوباکتریایی در سرم بیماران مبتلا به سل بر علیه آنتی‌ژن ۶۰ است که آنتی ژن TMA مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم توبر کلوزیس است (۶). به دلیل اهمیت بالای این آنتی ژن در بیماری سل، در این تحقیق ما بر آن شدیم تا آنتی ژن را از سیتوپلاسم مایکوباکتریوم بوویس سویه BCG Working seed lot 1173-P2lot تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران را خالص نماییم. (به این منظور از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفارز 4B استفاده شد). برای بررسی خلوص آنتی ژن جدا شده، از روش ایمونوالکتروفورز متقاطع طبق الگوی رفرانس Closs و همکاران در سال ۱۹۸۰ با حضور Anti BCG در ژل دوم استفاده شد و آنتی ژن به دست آمده در اولیه اجزای خروجی ستون کروماتوگرافی به صورت تک باند رسوبی و نزدیک به مبدا مشاهده شد (شکل B۱). همچنین در ایمونوالکتروفورز متقاطع با حضور آنتی بادی Anti 60 در ژل میانی و Anti BCG در ژل بعدی، آنتی ژن خالص شده در ژل میانی به صورت تک باند خالص مشاهده شد (شکل B۲)، که حکایت از کارایی بالای این تکنیک ارزان و سریع در خالص سازی این آنتی ژن دارد. این نتایج حکایت از کارایی بالای این تکنیک ارزان و سریع در خالص‌سازی این آنتی ژن دارد. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده توسط Cocito و همکارانش در سال ۱۹۸۶ است که از ستون سفارز 6B به این منظور استفاده کردند (۵). به دلیل کارایی و سهولت و هزینه مناسب این روش تخلیص، در کارهای جدیدتری که روی خواص و کارایی این آنتی ژن انجام گرفته است (۱۵-۷).

جدا شدن آنتی ژن ۶۰ در اولین اجزای خروجی از ستون کروماتوگرافی نشان دهنده وزن بالای حدود ۱۰۲ دالتون برای جزء اصلی لیپوپلی ساکاریدی مولکول است. واکنش مثبت دیواره سلولی و سیتوپلاسم باکتری با آنتی‌بادی Anti A60 در دات بلاتینگ نشانگر وجود آنتی ژن در هر دو قسمت باکتری است (۵). وجود پروتئینهای ۳۵، ۴۰، ۴۶ و ۶۵ کیلو دالتون در آنتی ژن ۶۰ با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ در حضور Anti A60 واکنش می‌دهد. این یافته مشابه نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی پیرامون ساختمان آنتی ژن ۶۰ است (۶). محل قرار گرفتن آنتی ژن در باکتری، وزن مولکولی بالا و ساختمان پیچیده حاوی ۳۰ پروتئین، پلی ساکارید و لیپید این آنتی ژن ایمنی زایی بالای آن را توجیه می‌کند (۵، ۶، ۷، ۱۶) و آن را به عنوان کاندیدای مناسب برای طراحی روشهای تشخیص ایمونواسی بیماری سل معرفی می‌کند (۳، ۸). اولین بار Bealden و همکارانش در سال ۱۹۹۰ با استفاده از آنتی ژن ۶۰ سیستم Elisa را برای تشخیص سل طراحی کردند که روش مناسبی برای تشخیص بیماری فعال و پی‌گیری مراحل بیماری و کارایی درمان است (۶، ۷). امروزه برای افزایش اختصاصیت تست سعی بر آن است که پروتئینهایی که در آنتی ژن ۶۰ خاصیت آنتی ژنیسیته بیشتری دارند و اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس هستند (مانند پروتئین ۳۸ کیلو دالتون) را با روشهای نوترکیبی تهیه نموده و برای تهیه کیت Elisa جهت تشخیص سل استفاده نمایند. همچنین در تحقیقات قبلی اثرات این آنتی ژن در حفاظت بر علیه غفونتهای تجربی (۸، ۹) و اثرات ایمونوتراپیک آن در جلوگیری از توسعه سرطان به اثبات رسیده است (۱۵-۱۰). در این خصوص نشان داده‌اند که از اجزای آنتی ژن ۶۰ اجزایی با وزن مولکولی ۵۶-۴۴ کیلو دالتون در بیماری سل تولید اینترفرون گاما را القا می‌کند، از این رو به عنوان کاندیدای مناسبی برای تهیه واکسن القاکننده پاسخ ایمنی محافظت مطرح است (۲).

بنابراین تخلیص آنتی ژن ۶۰ و جداسازی اجزای تشکیل دهنده آن و شناسایی خواص آنها پیش نیاز تحقیقات بعدی در مورد کاربرد این آنتی ژن و اجزای تشکیل دهنده آن در تشخیص و حفاظت بر علیه سل و ایمونوتراپی سرطان است و بنابراین با مطالعات دقیق‌تر می‌توان در واکسنهای آینده سل سکانسهایی را که در تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرند، حذف نمود تا از تداخل و ایجاد نتیجه مثبت کاذب ناشی از واکسیناسیون در تشخیصهای ایمونولوژیک سل ممانعت به عمل آید.

نتیجه گیری: آنتی ۶۰ یک کمپلکس لیپو پروتئین پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا در سیتوپلاسم و دیواره سلولی BCG و با استفاده از ستون سفارز 4B از سیتوپلاسم باکتری با درجه خلوص بالا جدا می‌شود.

تقدیر و تشکر

با تشکر از بخش BCG انیستیتو پاستور ایران که در تهیه مواد لازم برای انجام این تحقیق ما را یاری دادند.

References

1. Malati T, Rajani kumari G, Dinakarl: Evaluation of A60 Antibodies in Pulmonary and Neurotuberculosis, Indian J of Clinical Biochem 1995; 10(2): 72-76

2. Gilot P, Coene M: Thermostable Macromolecular Antigens from Mycobacteria, Can J Microbiol 1994; 40 605-611

3. Carlo G: Cocito, Properties of the Mycobacterial Antigen Complex A60 and Its Application to the

Diagnosis and Prognosis of Tuberculosis, Chest 1991; 100(6): 1687-1693
4. Closs O, Harboa M, Axelsen NH, Bunch-Christensen K, Magnusson M: The Antigens of Mycobacterium bovis strain BCG Studied by Crossed immunoelecterophoresis, Scand J Immunol 1980; 12: 249-263
5. Cocito C, Vanlinde F: Preparation and Properties of Antigen60 from Mycobacterium BCG, Clin Exp Immunol 1998; 66: 262-272
6. Coetsier C, Baelden MC, Coene M, Cocito C: Immunological Analysis of the Components of the Antigen Complex A60 of Mycobacterium bovis BCG, Clinical Diagnos Laboratory Immunol 1994; 1(2): 139-144
7. Gevaudan MJ, Bollet C, Charpin D, Mallet MN, Demicco PH: Serological Response of Tuberculosis Patients to Antigen 60 of BCG, Eur J Epidemiol 1992; 8(5): 666-676
8. Zou YL, Zhang JD, Chen MH, Shi GQ, Prignot J, Cocito C: Serological Analysis of Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis with Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Anti A60 Immunoglobulins, Clinical Infectious Diseases 1994; 19: 1084-1091
9. Carlucci S: Mycobacterial Antigen Complex A60-Specific Tcell Repertoire During the Course of Pulmonary Tuberculosis, Infection and Immunity 1993; 61(2): 439-447
10. Beschin A, Brigs L, De Baetselier P, Cocito C: Mycobacterium Proliferation in Macrophages is Prevented by Incubation with Lymphocyte activated in vitro with a Mycobacterial Antigen Complex, Eur J Immunol 1995; 41(1): 53-64
11. Maes H, Taper H, Cocito C: Alteration of the Immune Response During Cancer Development and Preventation by Administration of a Mycobacterial Antigen, Scan J Immunol 1995; 41(1): 53-64
12. Maes H, Taper H, Cocito C: Comparison between Bacillus Calmete-Guerin and A60 Mycobacterium Antigen Complex Used as Cancer Preventive Immunotherapies, J Cancer Res Clin Oncol 1996; 122(5): 296-300
13. Maes H, Cocito C: Cancer Preventation by Adaptive Transfer of A60-activated Immunocomponent Cells, Scan J Immunol 1996; 43(3): 283-188
14. Maes H, Cocito C: Synthesis of Cytokines During Tumor Development in Mice Immunized with the Mycobacterial Antigen Complex A60, Scand J Immunol 1996; 44(4): 369-379
15. Maes H, Cocito C: Immunological Relatedness of the Protective Mechanisms against Tuberculosis and Cancer, Eur J Clin Invest 1998; 28(1): 1-12
16. Maes H, Cocito C: Sub Cellular Localization and Sedimentation Behavior of A60 from BCG, Mfd Microbiol Immunol (BerL) 1988; 177: 15-25