مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۳، ۱۴۶-۱۴۱

تشخیص آنتی‌ژن‌های توموری در عقده لمفاوی گاو مبتلا به لنفوسارکوم ویروسی با روش رسوب ایمنی

غلامرضا نیکبخت بروجنی * سید مهدی امام ندا برجسته

گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۰ خرداد ماه ۱۳۸۵ ، پذیرش نهایی: ۱۶ مرداد ماه ۱۳۸۶)

چکیده

در این مطالعه یک نمونه عقده لمفاوی مبتلا به لنفوسارکوم ناشی از ویروس لکوزگاوی و یک نمونه عقده لمفاوی گاو سالم با سه روش مختلف جهت استخراج پروتئین‌های بافت توموری مورد استفاده قرار گرفت. این روش‌ها شامل فرآوری ساده در PBS، سونیکاسیون و روش فنلی بود. نمونه‌ها به صورت مقایسه‌ای تحت آزمون رسوب ایمنی قرار گرفتند. در آزمون رسوب ایمنی از باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز جهت خالص‌سازی کمپلکس ایمنی استفاده شد. در نهایت الگوی الکتروفورز پروتئین‌های آنتی‌ژنی در شرایط مختلف احیایی و غیر احیایی مورد بررسی قرار گرفتند. در استخراج پروتئین‌های عقده لمفاوی مبتلا با فرآوری ساده در PBS، ۳ آنتی ژن (۳۹، ۳۲ و ۳۰ کیلودالتون)، در نمونه سونیکه ۵ آنتی‌ژن (۷۲، ۴۸، ۴۲، ۳۷ و ۳۲ کیلودالتون) و در استخراج فنلی ۶ آنتی‌ژن (۱۰۴، ۷۷، ۵۴، ۳۲، ۳۰ و ۲۶.۵ کیلودالتون) مشخص شدند. در روش رسوب ایمنی توان تشخیص آنتی ژن‌های توموری به‌شیوه استخراج و تعادل آنتی‌ژن و آنتی‌بادی وابسته است و با ارزیابی کمی رسوب ایمنی به نحو موثری افزایش خواهد یافت. با این روش به خوبی می‌توان آنتی‌ژن‌های توموری را مشخص نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن‌های توموری، لمفوسارکوم، رسوب ایمنی، لکوزگاوی.

مقدمه

تشخیص آنتی‌ژن‌هایی که امکان تفکیک یاخته‌های توموری از یاخته‌های طبیعی را فراهم می‌کنند یکی از چالش‌های عمده در ایمنی شناسی تومورها و ایمونوتراپی است. در خصوص تومورهای ویروسی به‌ویژه این آنتی‌ژن ها در صورت شناسایی قابلیت استفاده در کشف منشا ویروسی تومور و چگونگی شکل‌گیری آن را دارند. خصوصیات مولکولی آنتی‌ژن‌های توموری می‌تواند به تشخیص بیماری (با یا بدون منشا ویروسی)، تهیه واکسن و همچنین درمان، کمک موثری نماید.

آنتی‌ژن‌های مربوط به تومورهای ویروسی را می‌توان به سه دسته تقسیم نمود: ۱- آنتی‌ژن‌های ویروسی، که بیشتر پروتئین‌های ساختمانی یا آنزیمی هستند. ۲- آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور (TSA) که در یاخته‌های توموری تولید شده و در یاخته‌های معمولی وجود ندارند. ۳- آنتی‌ژن‌های همراه با تومور (TAA) که در یاخته‌های معمولی نیز یافت می‌شوند و در بیشتر موارد از اجزای معمولی یاخته‌ای هستند و تولید آنها از تنظیم خارج گشته است (۲،۱۷). شاخص‌های توموری یا آنتی‌ژن‌های پیوندی اختصاصی تومور (TSTA) در گروه دوم یا آنتی‌ژن‌های اختصاصی قرار می‌گیرند. این آنتی‌ژن‌ها محل هدف پاسخ‌های ایمنی می‌باشند. در حال حاضر آنتی‌ژن‌های توموری را بیشتر بر اساس ساختمان ملکولی و منشا آنتی‌ژنی آن‌ها تقسیم بندی می‌کنند (۱،۱۲،۲۲).

رتروویروس‌ها از جمله ویروس‌های تومورزای مهمی هستند که مکانیسم تومورزایی در آنها به خوبی بررسی شده است. ویروس لکوز گاوی (BLV) یکی از اعضای جنس دلتا رتروویروس در خانواده رتروویریده است. این ویروس عامل لمفوسارکوم ویروسی گاو یا لکوز گاوی است (۷،۱۴، ۴). در ابتلا به لکوز ویروسی گاو به طور معمول ۶۰ درصد از گاوهایی که از نظر سرمی مثبت هستند فاقد علامت بالینی، حدود ۳۰ درصد لمفوسیتوز پایدار و بین ۵ تا ۱۰ درصد اشکال کشنده توام با لنفوسارکوم را نشان می‌دهند (۲۰،۱۶، ۱۰،۹). مرحله توموری بیماری مانند دیگر تومورهایی که بوسیله ویروس‌ها ایجاد می‌شوند دارای آنتی‌ژن‌های ویروسی و غیرویروسی است (۱۹،۱۴،۱۲). در گاوهای مبتلا به لکوز به طور معمول آنتی‌ژن‌های ویروسی gp51 و p24 مورد توجه بوده‌اند. آنتی‌بادی‌های ضد gp 51 جهت تشخیص بیماری استفاده می‌شوند (۹). اما بر اساس برخی گزارش‌ها در دام‌های آلوده به طور غالب یا در برخی موارد منحصرا پادتن ضد p24 قابل تشخیص بوده است (۳). تاکنون ارتباط بین بیان gp51 در لمفوسیتوز پایدار و p24 در مرحله لمفوسارکوم در گاو مشخص شده است (۶). تشخیص سایر آنتی‌ژن‌های توموری در مرحله لمفوسارکوم می‌تواند به کشف روند تومورزایی ویروس کمک نماید.

برای مطالعه و جدا سازی آنتی‌ژن‌های توموری می‌توان از روش رسوب ایمنی بهره برد. آزمون رسوب ایمنی با اضافه کردن سرم به بافت توموری آغاز شده و در نهایت کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی از مخلوط خارج و آنتی‌ژن به کمک تغییرات فیزیکی یا شیمیایی از آنتی‌بادی جدا گشته و با روش‌های کمی یا کیفی مثل SDS-PAGE بررسی می‌گردد. در این روش می‌توان از آنتی‌بادی‌های تک بنیانی یا چندبنیانی اختصاصی یک آنتی‌ژن جهت جداسازی یک آنتی‌ژن خاص استفاده کرد (۲،۱۳). در تحقیق حاضر از روش رسوب ایمنی جهت جداسازی و مطالعه آنتی‌ژن‌های موجود در لکوز استفاده شده است. روش رسوب ایمنی در این تحقیق آنتی‌ژن‌هایی که قادر

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: nikbakht@ut.ac.ir

به تحریک پاسخ هومورال و تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه تومور لمفوسارکوم ویروسی گاو هستند را مشخص می‌نماید.

مواد و روش کار

در این تحقیق از یک عقده لمفاوی توموری گاو مبتلا به لکوز و یک عقده لمفاوی غیر توموری استفاده شد. عقده‌های لمفاوی مورد مطالعه مربوط به گاوهایی بودند که ابتلا و یا عدم ابتلا به لکوز در آنها طی آزمون‌های سرمی، آگارژل ایمونودیفوزیون، الیزا و حضور ویروس در بافت با آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند. گاوها از نظر علائم بالینی (بیمار یا به ظاهر سالم)، دوره سنی مشابه، و همچنین توموری یا غیر توموری بودن عقده‌ها انتخاب شده بودند(۱۵). نمونه‌های بافتی در ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

سرم گاو مبتلا به لکوز که در بررسی آنتی‌ژن‌های عقده لمفاوی توموری همان گاو استفاده شده بود علاوه بر تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین‌های ویروسی (p24وgp51) جهت آنتی‌بادی‌های ضد بافتی نیز مورد آزمایش قرار گرفت تا حضور چنین آنتی‌بادی‌هایی علیه بافت عقده لنفاوی مشخص گردد. بررسی بر روی کل بافت احتمال از دست دادن آنتی‌ژن‌های آزاد شده از سلول‌ها را کمتر می‌نماید. همچنین حضور آنتی‌بادی‌های ضد اجزای سلولی (غیر اختصاصی) که در واکسیناسیون با واکسن‌های کشت سلولی در گاو شکل می‌گیرند می‌توانند در تشخیص آنتی‌ژن‌های توموری گمراه کننده باشند. عدم حضور آنتی‌بادی‌های ضد اجزای سلولی با روش الیزا مشخص گردید. به طور خلاصه سرم مذکور در رقت‌های مختلف به گوده‌های پوشیده از آنتی‌ژن ویروسی و پوشیده از عصاره کشت سلول (کنترل) اضافه شدند. پلیت‌های الیزا مربوط به کیت تشخیص سرمی ویروس لکوز گاوی (Biox, France) بوده است . سایر مراحل کار براساس روش استاندارد الیزا صورت گرفت. آزمون الیزا نشان داد که سرم مورد مطالعه فاقد آنتی‌بادی‌های ضد اجزای کشت سلولی است. پس از اطمینان از عدم حضور آنتی بادی‌های غیر اختصاصی از سرم در آزمون رسوب ایمنی استفاده شد.

فرآوری نمونه‌ها: عقده لمفاوی جهت انجام آزمون رسوب ایمنی با سه روش متفاوت فرآوری گردید. در روش اول نمونه در میکسر با حداکثر سرعت در داخل PBS یکنواخت گردیده، سپس قطعات بزرگ و خرد نشده نمونه به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴۵۰۰g و دمای محیط رسوب داده شدند. از محلول یکنواخت رویی به عنوان آنتی‌ژن در آزمون رسوب ایمنی بهره گرفته شد.

در روش دوم ۲۰۰ میلی گرم از نمونه بافت خرد شده با اسکالپل به ۲۰۰µl بافر PBS اضافه شده و در مجاورت یخ توسط دستگاه اولترا سون (Ultraschallprozessor, GmbH) سونیکه گردید. سونیکاسیون سه بار و هر بار ۵ ثانیه با بیشینه قدرت (cycle:1, Amplitude 100% 20kHz) دستگاه انجام شد. سپس مجددا ۵۰۰µl بافر PBS اضافه نموده و پس از مخلوط کردن برای جداسازی قطعات بزرگ و خرد نشده، نمونه به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴۵۰۰g در دمای محیط سانتریفیوژ شد.

در روش سوم، استخراج پروتئین با استفاده از کیت Tripure (محصول شرکت Roch) و بر اساس روش پیشنهادی شرکت تولید کننده کیت صورت گرفت. استخراج پروتئین‌ها در این روش با استفاده از فاز آبی و فنلی (قرمز آلی) صورت می‌گیرد. به طور خلاصه ۱۰۰ میلی گرم بافت خرد شده با ۱ میلی لیتر از محلول تری پیور مخلوط و ۲ دقیقه ورتکس شده (Labnet, USA)، سپس مخلوط در شرایط ۱۲۰۰۰g دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز میانی و قرمز آلی، پس از رسوب دادن DNA، جهت جداسازی پروتئین با ایزوپروپانل استفاده می‌گردید. پروتئین استخراج شده تا زمان انجام آزمون رسوب ایمنی در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

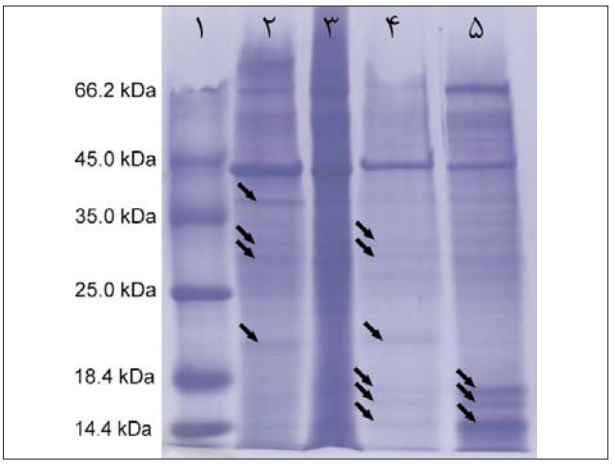
آنتی‌بادی مورد استفاده در آزمون رسوب ایمنی از نمونهٔ سرم گاو مبتلا به لکوز جداسازی گردیده بود. ۴۰ درصد حجم سرم، سولفات آمونیوم اشباع به سرم اضافه شده تا ایمونوگلوبولین‌های آن رسوب داده شود، سپس رسوب در PBS حل شده و سه بار در برابر PBS دیالیز می‌گردید تا کاملا سولفات آمونیوم از ایمونوگلوبولین‌ها جدا شود.

استاندارد سازی آنتی‌ژن: جهت استاندارد سازی آنتی‌ژن غلظت‌های متوالی آنتی‌ژن با مقادیر ثابتی از آنتی بادی مجاور شد. همچنین غلظت‌های متوالی آنتی‌بادی نیز با مقادیر ثابت آنتی‌ژن مجاور گردید. غلظت‌های ۱/۱۰ الی ۱/۲۰۴۸۰ از آنتی‌ژن در مجاورت با غلظت ۱/۱ از آنتی بادی و غلظت‌های ۱/۱۰ الی ۱/۲۰۴۸۰ از آنتی بادی در مجاورت با غلظت ۱/۱ از آنتی‌ژن قرار گرفت. مجموعه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. تمام غلظت‌های فوق در مجاورت با PBS به عنوان شاهد نیز قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت از نمونه‌ها آزمایش نور سنجی با طول موج ۶۳۰ نانومتر به عمل آمده و هر نمونه با نمونهٔ شاهد خود مقایسه گردید تا نقطهٔ هم ارز در بیشترین تفاوت کدورت نمونه و شاهد آن بدست آید. به منظور مقایسه بین دو روش سونیکاسیون و استخراج فنل روش فوق برای هر دو نوع آنتی‌ژن استخراج شده توسط کیت و سونیکاسیون استفاده گردید.

آزمون رسوب ایمنی: در این مرحله پس از ساخت رقت مناسب آنتی‌بادی، که از مرحله قبل بدست آمده بود، ۵۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی با ۵۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن (بر اساس مقادیر مشخص شده در مرحله استاندارد سازی آنتی‌ژن) مجاور گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد، پس از ۲۴ ساعت به نیمی از نمونه‌ها به عنوان شاهد ۲۰۰ میکرولیتر محلول فرمالینه باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز اضافه گردید و برای بار دوم به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. نمونه‌هایی که به آنها باکتری اضافه نشده بود نیز در مجموع ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

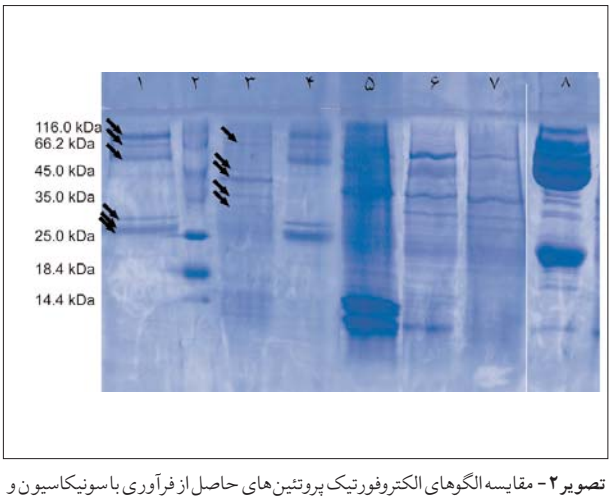
نمونه‌ها پس از خروج از انکوباتور به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g در دقیقه سانتریفوژ شدند، مایع رویی دور ریخته شد و پلت حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS حل گردید.

۲۰ میکرولیتر از محلولی که در مرحله آخر رسوب ایمنی حاصل شده بود



تصویر ۱- نتایج مقایسه الکتروفورز آنتی ژن‌های حاصل از فرآوری ساده، قبل و بعد از آزمون رسوب ایمنی. ۱) مارکر. ۲) رسوب ایمنی عقده لکوزی. ۳) عقده لکوزی. ۴) رسوب ایمنی عقده سالم. ۵) عقده سالم.

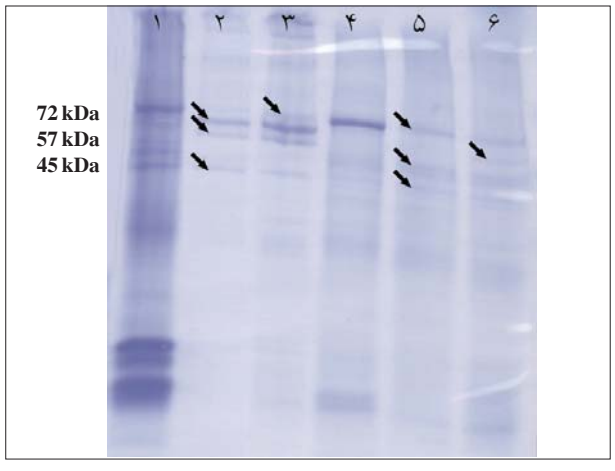
یک باند با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتن در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده بیمار (ستون ۲) وجود دارد که در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده سالم (ستون ۴) وجود ندارد، همچنین دو باند دیگر به اوزان مولکولی ۳۲ و ۳۰ کیلودالتن در هر دو پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی وجود دارد که با تراکم بیشتری در نمونه لکوزی قابل رویت است.



تصویر ۲- مقایسه الگوهای الکتروفورتیک پروتئین‌های حاصل از فرآوری با سونیکاسیون و یا استخراج فنل از نمونه لکوزی با بافر احیایی، قبل و بعد از آزمون رسوب ایمنی. ۱) رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (استخراج فنل). ۲) مارکر ۳) رسوب ایمنی با کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون) ۴) رسوب ایمنی با کمک باکتری (استخراج فنل). ۵) پروتئین حاصل از استخراج فنل. ۶) پروتئین حاصل از فرآوری بوسیله سونیکاسیون. ۷) پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون). ۸) آنتی بادی مورد استفاده در آزمون رسوب ایمنی.

باندهای با اوزان مولکولی ۱۰۴، ۷۷، ۵۴، ۳۲، ۳۰ و ۲۶.۵ در الکتروفورز رسوب ایمنی در نمونه هایی که فرآوری پروتئین در آن بوسیله استخراج فنل انجام شده بودند مشاهده شد (ستون ۱ و ۴). ۴ باند دیگر به اوزان مولکولی ۷۲، ۴۲، ۳۷ و ۳۲ کیلودالتن در پلت‌های حاصل از آزمون رسوب ایمنی نمونه ای که فرآوری پروتئین در آن بوسیله سونیکاسیون انجام شده بود (ستون ۳ و ۷) مشخص گردید. تنها یک باند با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتن منحصرا در نمونه مذکور (ستون ۳) اضافه‌تر نسبت به زمانی که از باکتری استفاده نگردیده بود (ستون ۷) مشاهده گردید.

با ۲۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده احیایی (تریس هیدروکلراید ۰/۱ مول (pH=6)، SDS۴درصد، برم فنل بلو ۰/۲درصد، گلیسرول ۲۰درصد و بتا مرکاپتواتانل ۵درصد) مجاور گردیده و پس از مخلوط کردن به مدت ۳ دقیقه در حمام آبجوش قرار داده شد سپس به مدت کوتاهی سانتریفوژ شده و ۱۵



تصویر ۳- نتایج الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از سونیکاسیون و یا استخراج فنل از نمونه لکوزی با بافر غیراحیایی، قبل و بعد از آزمون رسوب ایمنی. ۱) پروتئین حاصل از استخراج فنل. ۲) پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (استخراج فنل). ۳) پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی باکمک باکتری (استخراج فنل). ۴) پروتئین حاصل از فرآوری بوسیله سونیکاسیون. ۵) پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی بدون کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون). ۶) پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی با کمک باکتری (فرآوری پروتئین بوسیله سونیکاسیون).

۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۵۷ و ۴۵ کیلودالتن در رسوب ایمنی پروتئین هایی که به وسیله فنل استخراج شده بودند مشاهده می‌شود (ستون ۲ و ۳). همچنین یک باند با وزن مولکولی حدود ۷۲ کیلودالتن فقط در نمونه ای دیده می‌شود که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود (ستون ۳). در الکتروفورز رسوب ایمنی که پروتئین‌ها در آن به روش سونیکاسیون استخراج شده بودند ۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۴۷ و ۴۰ کیلودالتن مشخص شدند (ستون ۵ و ۶). یک باند با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلودالتن نیز که منحصرا در نمونه ای که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود قابل مشاهده است (ستون ۶).

میکرولیتر از مایع رو را جهت الکتروفورز در ژل اکریلامید ۱۲ درصد در کنار مارکر وزنی مخصوص پروتئین (Fermentas, Germany) استفاده گردیدند. الکتروفورز نمونه‌ها با ولتاژ ۹۰ در دستگاه Mini Cell (محصول شرکت Rad-Bio) به مدت ۳ ساعت انجام گردید. برای رنگ‌آمیزی ژل اکریلامید پس از پایان الکتروفورز ژل‌ها در ۲۰۰ میلی لیتر از کوماسی بلو ۰/۰۵ درصد به مدت یک شب قرار گرفت. رنگ‌زدایی با اسید استیک ۷ درصد به مدت ۶ ساعت صورت گرفت. نمونه‌ها با بافر دناتوره کننده غیر احیایی که فاقد بتا مرکاپتواتانل بود به مدت ۳ در آب جوش قرار گرفته و بلافاصله بر روی یخ منتقل شدند تا اثر بافر بر روی آنتی‌ژن‌ها نیز مشخص گردد.

تمامی اعمال استخراج پروتئین و الکتروفورز انجام شده جهت بررسی پروتئین‌ها بر اساس روش‌های شرح داده شده توسط Ausubel و همکاران در سال ۲۰۰۲ و استاندارد سازی آنتی‌ژن و رسوب ایمنی بر اساس روش‌های شرح داده شده توسط Hey و همکاران درسال ۲۰۰۲ صورت گرفته است (۲،۱۴).

نتایج

آزمون‌های آگار ژل ایمونودیفوزیون و الیزا بر روی سرم و PCR بر روی عقده لمفاوی توموری مثبت و در مورد عقده لمفاوی سالم منفی بودند.

غلظت ۲۵۶۰ :۱ از سرم گاو مبتلا با آنتی‌ژن‌های سونیکه شده و غلظت

۱:۱۲۸۰ از همان سرم با آنتی‌ژن‌های استخراج شده با روش فنل بیشترین اختلاف کدورت را با نمونه‌های شاهد خود نشان دادند. این غلظت‌ها نمایانگر منطقه هم ارز بوده که در آزمون رسوب ایمنی مورد استفاده قرار گرفتند.

الکتروفورز آنتی‌ژن‌های حاصل از فرآوری ساده عقده سالم و بیمار بعد از انجام آزمون رسوب ایمنی و قبل از آن در تصویر۱ نشان داده شده است. همانگونه که در تصویر ملاحظه می‌شود یک باند با وزن مولکولی ۳۹ کیلو دالتن در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده بیمار (ستون ۲) وجود دارد که در پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی عقده سالم (ستون ۴) وجود ندارد، همچنین دو باند دیگر به اوزان مولکولی ۳۲ و ۳۰ کیلو دالتن در هر دو پلت حاصل از آزمون رسوب ایمنی وجود دارد که با تراکم بیشتری در نمونه لکوزی قابل رویت است.

الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از فرآوری با سونیکاسیون و یا استخراج فنل از نمونه لکوزی قبل از آزمون رسوب ایمنی و پس از انجام آزمون رسوب ایمنی بدون استفاده از باکتری یا همراه با آن در تصویر ۲ آمده است. ۶ باند با اوزان مولکولی ۱۰۴، ۷۷، ۵۴، ۳۲، ۳۰ و ۲۶.۵ در الکتروفورز رسوب ایمنی در نمونه‌هایی که فرآوری پروتئین در آن بوسیله استخراج فنل انجام شده بودند مشاهده شد (ستون ۱ و ۴). ۴ باند دیگر به اوزان مولکولی ۷۲، ۴۲، ۳۷ و ۳۲ کیلو دالتن در پلت‌های حاصل از آزمون رسوب ایمنی نمونه‌ای که فرآوری پروتئین در آن بوسیله سونیکاسیون انجام شده بود (ستون ۳ و ۷) مشخص گردید. تنها یک باند با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتن منحصرا در نمونه مذکور (ستون ۳) اضافه‌تر نسبت به زمانی که از باکتری استفاده نگردیده بود (ستون ۷) مشاهده گردید. اوزان مولکولی باندهای مذکور با وزن مولکولی هیچ یک از باندهای آنتی بادی مورد استفاده یکسان نبوده که نشانگر خاصیت آنتی‌ژنی آن‌هاست.

جهت مقایسه تاثیر استفاده بافرهای احیایی و غیراحیای در نتایج آزمون پروتئین‌های استخراج گردیده به دو روش سونیکاسیون و استخراج فنل، پلت‌های حاصل از مرحله قبل بوسیله بافر غیر احیایی نیز تحت آزمون الکتروفورز قرار گرفتند که نتایج آن در تصویر ۳ ارائه گردیده است. همانگونه که در تصویر مشخص گردیده ۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۵۷ و ۴۵ کیلو دالتن در رسوب ایمنی پروتئین‌هایی که به وسیله فنل استخراج شده بودند مشاهده می‌شود (ستون ۲ و ۳). همچنین یک باند با وزن مولکولی حدود ۷۲ کیلودالتن فقط در نمونه‌ای دیده می‌شود که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود (ستون ۳). در الکتروفورز رسوب ایمنی که پروتئین‌ها در آن به روش سونیکاسیون استخراج شده بودند ۳ باند با اوزان مولکولی حدود ۶۲، ۴۷ و ۴۰ کیلودالتن مشخص شدند (ستون ۵ و ۶). یک باند با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلو دالتن نیز که منحصرا در نمونه‌ای که آزمون رسوب ایمنی در آن به کمک باکتری انجام گرفته بود قابل مشاهده است (ستون ۶).

در استفاده از روش رسوب ایمنی با بافر غیراحیایی باندهای مشخص‌تر و با تراکم بیشتر مشاهده شد. باندهای مذکور (۶۲، ۵۷ و ۴۵ کیلودالتن) به‌ویژه در نمونه‌ها پیش از مواجهه با آنتی بادی اختلاف قابل توجهی را از نظر تراکم نشان داده‌اند.

بحث

Bunger و همکاران در سال ۱۹۹۶ مطالعه‌ای بر روی فرآوری پروتئین‌های عقده لنفاوی با هدف تهیه پادگن‌های ویروس لکوز با روش‌های مختلف انجام دادند. این یکی از معدود مواردی است که مطالعه بر روی پادگن‌های ویروسی در عقده‌های لمفاوی صورت گرفته است (۵).

Tajima و همکاران نیز پروتئین‌های ویروسی را که در یاخته‌های مختلف ترانسفورمه بیان شده بودند را با روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار دادند، این دانشمندان باندهای پروتئینی مهم در پاسخ ایمنی را حداقل به ۶ پروتئین‌های ویروسی نسبت داده‌اند (پروتئین‌های ۷۲، ۷۰، ۵۱، ۴۵، ۳۰ و ۲۴ کیلودالتونی) این پروتئین‌ها همه از اجزای ساختمانی ویروس هستند. لازم به ذکر است که تمامی نتایج بدست آمده فوق در آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم گوسفند آلوده شده با ویروس لکوز گاوی بدست آمده است (۱۸).

Nikbakht نیکبخت و همکاران در سال ۱۳۸۵ در بررسی خود بر روی عقده‌های لمفاوی توموری گاوهای مبتلا به لوکوز با روش وسترن بلاتینگ به حضور ۶ پروتئین آنتی ژنی اشاره کرده‌اند (۱۵). ۴ باند در مجموعه گزارش شده با باندهای بدست آمده در روش استخراج فنل و استفاده از بافر احیایی این تحقیق مشابه است (باندهای ۷۲، ۴۲، ۳۷ و ۲۶/۵ کیلودالتون). ۱ باند با روش استخراج ساده پروتئین در تحقیق حاضر قابل ردیابی بوده است. تشخیص ۵ باند پروتئینی از ۶ باند گزارش شده توانایی بالایی را برای روش رسوب ایمنی نشان می‌دهد به‌ویژه آن که آنتی‌ژن‌های مشخص شده در روش رسوب ایمنی را به سادگی می‌توان بر روی ژل جداسازی و در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار داد. این کار در روش وسترن بلات با مشکلاتی روبرو است (۲).

روش رسوب ایمنی یکی از روش‌های مناسب جهت تشخیص و جداسازی آنتی‌ژن‌هایی است که در بدن علیه آن‌ها آنتی‌بادی ساخته می‌شود. مهمترین این آنتی‌ژن‌ها آنتی‌ژن‌های توموری هستند که در تشخیص و درمان مورد توجه قرار می‌گیرند (۲). از روش رسوب ایمنی جهت جداسازی آنتی‌ژن‌های ویروس لکوز از محیط کشت استفاده شده است ولی آنتی‌ژن‌های توموری در لمفوسارکوم ناشی از این ویروس مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند (۸، ۱۱، ۲۱).

در این مطالعه ۳ آنتی‌ژن در نمونه‌ای که با فرآوری ساده، پروتئین آن استخراج گردیده بود، ۶ آنتی‌ژن در استخراج فنلی و ۴ آنتی‌ژن در نمونه‌ای که پروتئین‌های آن به وسیله سونیکاسیون استخراج گردیده بود مشاهده گردید. نتایج فوق نشانگر تاثیر چگونگی استخراج پروتئین در نتایج بدست آمده است. لازم به ذکر است که پروتئین‌های استخراج شده مربوط به

مجموعه اجزای یاخته‌ای و بافتی عقده لمفاوی بودند. بررسی بر روی کل بافت احتمال از دست دادن آنتی‌ژن‌های آزاد شده از سلول‌ها را کمتر می‌نماید. در این تحقیق به دلیل امکان وجود خاصیت پرتئولیتیک پروتئین‌ها از بافرهای حاوی EDTA و زنجیره سرما در طی مراحل فرآوری استفاده شد.

پروتئینی که با وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتن در تمام نمونه‌های مورد آزمایش اعم از سالم و بیمار مشاهده گردید و پروتئین ۳۰ کیلودالتنی که فقط در نمونه سونیکه دیده نشد احتمالا باندهای آنتی‌ژنیکی از گروه آنتی‌ژن‌های همراه تومور هستند (TAA)، که با تراکم بیشتری در نمونه‌های توموری دیده می‌شوند. این آنتی‌ژن‌ها به علت ترانسفورماسیون یاخته سالم و بروز بیش از اندازه باعث تولید آنتی‌بادی می‌شوند. سرم گاو مبتلا به لنفوسارکوم در این مطالعه، آنتی‌ژن‌های مذکور را در عقده لمفاوی توموری همان گاو مشخص نموده است. آنتی‌ژن‌های دیگری که در این مطالعه به آنها اشاره گردید ممکن است متعلق به گروهی از آنتی‌ژن‌های توموری باشند که در اصطلاح به نام آنتی‌ژن‌های جدید خوانده می‌شوند و در اثر ترانسفورماسیون در سلول توموری آلوده به ویروس ایجاد می‌گردند و یا پروتئین‌های پیش ساز یا کامل ویروس باشند که خاصیت تحریک سیستم ایمنی را دارند (۱۱،۱۷).

همانگونه که در قسمت‌های قبلی اشاره شد، روش رسوب ایمنی دارای توانایی مناسبی در جداسازی آنتی‌ژن‌ها است ولی عوامل مختلفی از جمله چگونگی استخراج پروتئین در نتایج آزمایش موثراست. از سوی دیگر استانداردسازی آنتی‌ژن یا تعیین محدوده‌ای که بیشترین میزان مجموعه آنتی‌ژن - آنتی بادی در آن ایجاد شود از نظر تکنیکی حائز اهمیت است. این موضوع در دفعات مختلف مورد آزمایش قرار گرفت و اثرات آن بر روی رسوب ایمنی مشخص گردید. استفاده از باکتری کامل که پذیرنده‌های آنتی‌بادی‌ها را دارد، در بدست آوردن نتایج بهتر در رسوب ایمنی موثر خواهد بود. نوع بافر مورد استفاده در تعداد و اوزان مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز نیز تاثیر گذار است. اوزان مولکولی باندها به دلیل استفاده از بافر غیر احیایی با اوزان مولکولی بدست آمده با بافر احیایی متفاوت بوده است.

باندهای بدست آمده در روش استخراج فنل و استفاده از بافر غیر احیایی (۶۲ و ۵۷ کیلودالتون) از اهمیت ویژه‌ای بر خوردار است. ساختار آنتی‌ژنی در آن‌ها کمتر تحت تاثیر فرآوری بوده و به ساختار اصلی پروتئین نزدیک‌تر می‌باشند. این پروتئین‌ها که در تحقیق حاضر ویژگی‌های آنتی‌ژنیک را به‌ویژه در اتصال با آنتی‌بادی‌های خودی در رسوب ایمنی نشان می‌دهند می‌توانند مبنایی برای تحقیق‌های گسترده بعدی (تعیین توالی اسید آمینه‌ها، ایمنی‌زایی و تشخیص) قرار گیرند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق بافرهای دناتوره کننده احیایی به علت توانایی بیشتر در جداسازی پلی پپتیدها در هنگام الکتروفورز جهت جدا سازی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک توصیه می‌گردند.

در مجموع چنین به نظر می‌رسد که آزمون رسوب ایمنی برای مشخص نمودن و همچنین جدا سازی آنتی‌ژن‌های توموری ویروسی یا غیرویروسی دیگر، در صورت توجه به شرایط بهبود دهنده، از کارآیی مناسبی بر خوردار است. با این وجود بررسی‌های بیشتری باید صورت گیرد تا ارتباط و نقش این آنتی‌ژن‌ها با بدخیمی یا روند بیماری مشخص شود.

References

1. Abbas, A.K., Lichtman, A. H. (2003) Cellular and Molecular Immunology, Saunders. Philadelphia, USA.p.379-400.
2. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (2002) Short protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. p.10115-10120.
3. Bicka, L., Kuzmak, J., Kozaczynska, B., Plucienniczak, A. and Skorupska, A. (2001) Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. Acta. Biochim. Pol. 48:227-232.
4. Blood, D.C., Radostits, O.M. (2000) Veterinary Medicine. Bailliers Tindal. London, UK, p. 1046-1058.
5. Bunger, I., Khalaf, H., Rimpler, M. (1996) Examination of antigen preparations from the virus of enzootic bovine leukosis with regard to suitability for immunoblotting. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 103:516-519.
6. Burkhardt, H., Ristau, E., Rosenthal, S., Muller, M. (1989) BLV-p24 expression in BLV infected cattle and detection of BLV-p24 receptors in cattle afflicted with tumorous leucosis in vivo. Acta Virol. 33:410-416.
7. Burny, A.F., Cleuter, Y.F., Kettmann, R.F. (1988) Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. Vet. Microbiol. 17:197-218.
8. Boris-Lawrie, K., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L. and Temin, H.M. (1997) In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. J.Virol. 71: 1514-20.
9. Choi, K.Y., Liu, R.B., Buehring, G.C. (2002) Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay,

and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. J. Virol. Methods. 104: 33-39.

10. Dequiedt, F., Cantor, G.H., Hamilton, V.T. (1999) Bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B lymphocytes. J. Virol. 73: 1127-37.
11. Deshayes, L.D., Levy, A., Parodi, L., Levy, J.P. (1977) Proteins of bovine leukemia virus. I. Characterization and reactions with natural antibodies. J. Virol. 21: 1056-1060.
12. Domenech, A., Goyache, J., Llames, L., Jesus, P.M., Suarez, G. and Gomez-Lucia, E. (2000) In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. J .Gen. Virol. 81:109.-18.
13. Hey, C.F., Westwood, O. (2002) Practical Immunology. Blackwell publishing company. UK.
14. Murphy, A., Gibbs, J., Horzinek, C., Studdert, J. (1999) Vetrerinary virology. 3rdEd. Academic Press. USA. p.26-50, 363-383.
15. Nikbakht Brujeni, Gh., Hemmatzadeh,F., Mabbubi, B.(2006) Study on Tumor Antigens of BLV Infected lymph nodes in Comparison with FLK-BLV cell culture. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.61,1:51-55.
16. Rola, M., Kuzmak, J. (2002) The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. J. Virol. Methods. 99:33-40.
17. Tadjbakhsh, H.(1995) Essential Immunology 6thEd., University of Tehran Press, Tehran,Iran. p.325-342.
18. Tajima, S., Aida, Y. (2002) Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. J. Virol. 76:2557-2562.
19. Tajima, S., Ikawa, Y. and Aida. Y. (1998) Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. J. Virol. 72:7569-7576.
20. Trono, K.G., Perez-Filgueira, D.M., Duffy, S., Borca, M.V. and Carrillo, C. (2001) Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. Vet. Microbiol. 26:235-248.
21. Van der Maaten, M.J., Miller, J. M. (1980) Use of a continuous feline cell line for virologic and serologic investigations of bovine leukemia virus infections. Am. J. Vet. Res. 41:1785-1788.
22. Vojgani,M.(2001) Immunology. Jahad Daneshgahi Publication. Iran, Tehran. p.517-542.

J.Vet.Res. 63,3:141-146,2008

DETECTION OF TUMOR ANTIGENS IN BOVINE VIRAL LYMPHOSARCOMA BY IMMUNOPRECIPITATION METHOD

Nikbakht Brujeni, GH.R.*, Emam,M., Barjesteh,N.

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 27 April 2005 , Accepted 27 October 2006)

Abstract:

In this study One lymph node from cow with viral lymphosarcoma and one lymph node from healthy cow were analyzed by three different methods for protein extraction, include simple homogenizing in PBS, sonication and phenol extraction. Tumor antigen detection relies on immunoprecipitation followed by SDS-PAGE. In this experiment Streptococcus pyogenes was used for purification of immune complexes. Eletrophoretic patterns were obtained using reduced and non reduced buffers. In PBS homogenization 3 distinct antigens (39, 32 and 30 kDa) were observed. When sonication or phenol extraction were used, 5 (72, 48, 42, 32 and 30 kDa) and 6 (104, 77, 54, 32, 30 and 26, 5 kDa) distinct antigens were observed, respectively. This study showed that the ability of antigen detection mainly depends on protein extraction procedure and antigen-antibody equilibrium achieved by quantification of precipitins. Immunoprecipitation could be used successfully for study of tumor antigens in bovine leukosis.

Key words: tumor antigens, lymphosarcoma, immunoprecipitation, bovine leucosis.

***Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057, Fax: 021-66933222**