استخراج و شناسایی پروتئین‌های غشاء خارجی هلیکوباکترپیلوری بدست آمده از بیماران ایرانی با استفاده از SDS-PAGE

دکتر محمود دوستی ـ گروه بیوشیمی ـ دانشکده پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر هنردخت شیروانی ـ گروه بیوشیمی ـ دانشکده پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران

Isolation and Identification of Outer Membrane Proteins of Helicobacter Pylori of Iranian Patient by SDS-PAGE

ABSTRACT

The function of Helicobacter pylori (H.pylori) is confirmed as one of the factors which motivates gastric and duodenal ulcer and gastritis. Various methods are used to diagnose the infection. Serological tests are the easiest and most harmless for the patients. Probably, H.pylori strains in Iran are different from the strains in other countries. Hence, it seems neccessary to design a specific serological test to recognize and identify different strains of bacterial antigenic proteins of Iranian patients.

Since the most manifest and specific to these bacterial antigens are the "Outer Membrane Protein" (OMP), therefore, the first necessary step is to separate and purify H.pylori OMP and then to identify antigenic proteins.

In this study, we received bacteria colony that belonged to 15 patients with gastric or duodenal ulcer, which had been growed in blood agar or brucella broth. After processing such as washing, freezing and defreezing, sonicating, centrifugation with high speed (10,000 g) and treatment with sarcosyl, the sarcosyl insoluble fraction was extracted. Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was preformed. From all 15 OMP specimens, we isolated protein bands.

The first two bands with higher MW, were major bands and the two lighter bands were the minor bands. Approximate MW of these 4 proteins are equal to 67000, 61000, 30000 and 17000 dalton.

چکیده

نقش هلیکوباکترپیلوری (H.Pylori) به عنوان یکی از عوامل ایجادکنندهٔ زخمهای معده و دوازدهه و ورم معده ثابت شده است. برای تشخیص این عفونت، روشهای [illegible] به کار می‌رود که ساده‌ترین و بی‌خطرترین آنها برای بیماران، تست سرولوژیک می‌باشد. احتمال دارد گونه‌های موجود در ایران از گونه‌های کشورهای دیگر متفاوت باشد، لذا برای طراحی تست سرولوژی خاص بیماران ایران، شناسایی گونه‌ها و پروتئینهای آنتی‌ژنیک باکتریهای بدست آمده از این بیماران ضروری است.

از آنجایی که بارزترین و شاخص‌ترین پروتئینهای آنتی‌ژنیک این باکتری مربوط به غشاء خارجی آن می‌باشد، و مطالعات مختلف پروتئینهای متفاوتی را گزارش کرده‌اند، در ابتدا بایستی پروتئینهای دیوارهٔ خارجی استخراج و تخلیص گردد و سپس پروتئینهای دارای خاصیت آنتی‌ژنیک تعیین شود.

در این مطالعه کلنی‌های باکتری بدست آمده از بیوپسی ۱۵ بیمار مبتلا به زخم معده یا دوازدهه که در محیط کشت جامد (Blood Agar) یا مایع (Brucella Broth) کشت یافته بود، برای بررسی و شناسایی پروتئینهای غشاء خارجی مورد آزمایش قرار گرفت. پس از طی مراحل شستشو، یخ زدن، سونیکه کردن، سانتریفوژ با دور بالا (۱۰۰۰۰۰ g) و مجاورت با دترجنت سارکوزیل، جزء نامحلول در سارکوزیل یا پروتئینهای غشاء خارجی (OMP یا Outer Membrane Protein) استخراج گردید.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) پروتئینهای غشاء خارجی از هم تفکیک گردید. از هر ۱۵ نمونهٔ OMP چهار باند پروتئینی بدست آمد که دو باند اول پررنگ‌تر و دو باند دوم کمرنگ‌تر بودند. وزنهای مولکولی تقریبی این چهار پروتئین عبارتند از: ۶۷۰۰۰، ۶۱۰۰۰، ۳۰۰۰۰، ۱۷۰۰۰ دالتون.

کلمات کلیدی : هلیکوباکترپیلوری، OMP, SDS-PAGE

مقدمه

زخمهای پپتیک ضایعات التهابی مزمنی هستند که در معده و دوازدهه مشاهده می‌شوند. تخمین زده می‌شود که حدود ۱۰٪ از مردم دنیا در طول عمرشان به این بیماری مبتلا می‌شوند(۱). در اوایل قرن بیستم استرس و رژیم غذایی را در پاتوژنز زخمهای پپتیک مؤثر می‌دانستند. تا بیش از ۳۰ سال گزارش‌های پراکنده‌ای مبنی بر وجود میکروارگانیسمهای خمیده شکلی در معدهٔ بیماران مبتلا به زخم معده می‌رسید(۲)، تا اینکه در سال ۱۹۸۳، دو دانشمند استرالیایی به نامهای Marshal B.J. و Warren J.R. موفق به شناسایی و نامگذاری هلیکوباکترپیلوری گردیدند(۳).

این باکتری فنری شکل گرم‌منفی نیمه‌هوازی با کمک تاژکهای متعدد و با تشریح اوره‌آز و آنزیمهای دیگر فرصت می‌یابد در سطح مخاط معده، به سلولهای اپی‌تلیال چسبیده و یا در لابه لای پرزهای معده رشد و تکثیر نماید(۴). برجسته‌ترین خاصیت بیوشیمیایی این باکتری، تولید مقدار فراوان آنزیم اوره‌آز است که اوره را به آمونیاک و دی‌اکسید کربن هیدرولیز می‌کند(۵).

آمونیاک به صورت هاله‌ای در اطراف باکتری، اسید معده را خنثی نموده و به باکتری اجازه زنده ماندن در مخاط معده را می‌دهد. در ضمن، آمونیاک در غلظتهای بالا در داخل سلول حفراتی ایجاد می‌کند و باعث می‌شود باکتری در طولانی‌مدت، سطح مخاطی را سوراخ کرده و در محیط قلیایی مستقر شود(۶). یکی از مهمترین عوامل پاتوژنیسیتهٔ هلیکوباکترپیلوری، سیتوتوکسین واکوئله کننده است. ژن پروتئین سیتوتوکسین VacA (Vacuolating CytotoxinA) نامیده می‌شود و به وسیلهٔ Tummurn و همکاران کلون شده است(۷). پروتئین دیگری به نام Cag A (Cytotoxin associated gene A) یا سیتوتوکسین مرتبط با ژن A موجود است که علامتی برای اثر توکسین واکوئله کننده است .آنتی‌بادی نسبت به توکسین تقریباً در همهٔ بیماران مبتلا به زخم دوازدهه موجود است و از نظر تئوری فقدان آنتی‌بادی CagA بیان کنندهٔ عدم وجود زخم دوازدهه است(۶). مطالعات، وجود این باکتری را در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به زخم دوازدهه در ۹۰ تا ۱۰۰٪ موارد، زخم معده در ۷۰٪ موارد، گاستریت مزمن مخاط ناحیهٔ آنتر معده در ۸۰٪ موارد و بیماران مبتلا به سوءهاضمه بدون زخم در ۵۰٪ موارد ثابت نموده‌اند(۶،۸).

شواهد نشان می‌دهد که هلیکوباکترپیلوری علت اصلی گاستریت مزمن فعال تیپ B است و در ضمن تنها باکتری شناخته شده‌ای است که در ایجاد نوعی سرطان معده دخیل است(۹). تشخیص این باکتری به وسیلهٔ نمونه‌برداری از معده و سپس کشت باکتری در محیطهای افتراقی و تستهای بیوشیمیایی امکان‌پذیر است. این روشها هزینه‌بر و تهاجمی هستند. اخیراً از روشهای غیرتهاجمی از قبیل تست تنفس اوره‌آز و تستهای سرولوژیکی برای تشخیص عفونت استفاده می‌شود(۱۰). عفونت با هلیکوباکترپیلوری سبب پاسخ‌های ایمنی موضعی از قبیل تجمع نوتروفیلها، مونونوکلئرها، لنفوسیت‌ها و پلاسموسیت‌ها می‌شود. پاسخ ایمنی سیستمیک شامل وجود آنتی‌بادیهای IgG و IgA در خون می‌باشد(۱۱). یکی از موضوعات مورد توجه محافل علمی جهان، ابداع روشهای مختلف برای تشخیص و اندازه‌گیری این آنتی‌بادیها و در نتیجه تشخیص غیرتهاجمی عفونت، نوع ضایعه، پیگیری درمان بیماران و همچنین شناسایی حاملین می‌باشد.

از بررسی مطالعات و تجربیات مختلف به نظر می‌رسد که گونه‌ها و پروتئین‌های آنتی‌ژنیک این باکتری در مناطق و کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد(۱۲ تا ۲۰). از این جهت جداسازی گونه‌های مربوط به ایران و شناسایی پروتئینهای آنتی‌ژنیک اختصاصی آن و طراحی تست سرولوژیک برای افراد ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه در دیوارهٔ خارجی این باکتری پروتئینهای بزرگی (از نظر کمّی و کیفی) وجود داشته که دارای خاصیت آنتی‌ژنیک می‌باشند، در این مطالعه سعی شده است با جداسازی و شناسایی این پروتئینها گامی در جهت تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری از طریق تستهای سرولوژی برداشته شود.

روش و مواد

الف ـ تهیه باکتری : پس از انجام اندوسکوپی و نمونه‌برداری از معده یا دوازدهه ۱۵ بیمار مبتلا به زخم معده یا دوازدهه از بخش اندوسکوپی بیمارستان شریعتی، نمونه‌ها به گروه میکروب‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران انتقال داده شد. نمونه‌ها در محیط

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

کشت جامد (Blood agar) و یا محیط کشت مایع (broth) (Brucella کشت داده شده، پس از خالص‌سازی و آزمایشات تشخیص اختصاصی بر روی باکتری تحت شرایط استریل، کلنی‌های باکتری از روی پلیت محیط کشت جامد جمع‌آوری و با آب مقطر استریل سوسپانسیون گردید. غلظت سوسپانسیون 10^9 CFU/ml(Colony Forming Unit) تنظیم گردید(۲۱). در صورتی که باکتری در محیط کشت مایع، کشت شده بود، بعد از طی مراحل شستشو که توضیح داده خواهد شد، توسط اسپکتروفوتومتر (LKB. Novas pec II ساخت شرکت Pharmacia)) جذب نوری (O.D.) آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر تا ٪۲۶ = T (درصد عبور نور) تنظیم شد(۲۲).

ب ـ شستشوی باکتری: سوسپانسیون حاوی باکتری رشد یافته در محیط کشت جامد یا مایع یک دفعه در ۵۰۰۰ g و در $4^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه سانتریفوژ Refrigerated Centrifuge مدل DAMON ساخت .Soofer Co) رسوب داده شد. مایع شفاف رویی که حاوی آب یا اضافات محیط کشت بود، دور ریخته شد، سپس به رسوب به مقدار تقریبی ۵-۴ برابر حجم آن، بافرتریس (شرکت SIGMA، Tris Hydroxymotyl Amicoethane) ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۴ افزوده و دوباره در ۵۰۰۰ g در $4^{\circ}C$ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب در فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری شده تا دیوارهٔ سلولی در اثر یخ زدن پاره شود.

ج ـ خرد کردن سلولی: باکتریهای یخ زده پس از تغییر از حالت انجماد با همان‌تریس سوسپانسیون گردید. سوسپانسیون باکتری توسط دستگاه اولتراسوند (.LABSONIC L ساخت شرکت B.BRAUN SWISS) روی یخ سونیکه گردید، با این شرایط که ۴ الی ۵ مرتبه، هر مرتبه ۳۰ ثانیه و LT ۴۰ سونیکه شده و یک دقیقه استراحت داده می‌شد. قبل و بعد از سونیکه کردن از باکتری لام تهیه شد و زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی X ۴۰ تغییر شکل باکتری از باسیل به صورت گرد و کوکوئید مشاهده شد که نشانهٔ خرد شدن دیوارهٔ سلولی است.

د ـ استخراج پروتئینهای غشاء خارجی: پس از سونیکه کردن، باکتریهای خرد شده را یکبار در ۵۰۰۰ g و در $4^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه اولتراسانتریفوژ (مدل Optima TL شرکت Beckman) رسوب داده تا اجزاء سنگین‌تر سلول جدا شود. آنگاه مایع شفاف رویی در ۱۰۰۰۰۰ g و $4^{\circ}C$ به مدت یک ساعت سانتریفوژ گردید. این بار رسوب را که شامل فرآورده‌های غشاء است، برداشته و محلول سارکوزیل ۱٪ در EDTA (Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid) (شرکت SIGMA) و N-Laureyl Sarcosine (شرکت Ciba Geigy) مخلوط غشاء با سارکوزیل به مدت ۲۰ دقیقه در گرمخانه $37^{\circ}C$ قرار داده شد تا سارکوزیل، پروتئینهای محلول را به خوبی در خود حل کند. سپس این سوسپانسیون در ۱۰۰۰۰۰ g و $4^{\circ}C$ به مدت دو ساعت سانتریفوژ گردید. مایع شفاف رویی که حاوی جزء محلول در سارکوزیل بود، برای مطالعه پروتئینهای غشاء پلاسمایی کنار گذاشته شد و رسوب را در بافر تریس با مشخصات ذکر شده سوسپانسیون کرده و در ۱۰۰۰۰۰ g و $4^{\circ}C$ به مدت دو ساعت سانتریفوژ کرده تا باقیمانده دترجنت (سارکوزیل) کاملاً شسته شود. آنگاه رسوب که جزء نامحلول در سارکوزیل یا همان پروتئینهای غشاء خارجی بود، در $-10^{\circ}C$ نگهداری شد(۲۲).

هـ ـ شناسایی و تعیین وزن مولکولی پروتئینهای غشاء خارجی (OMP): برای تفکیک و تعیین وزن مولکولی پروتئینهای غشاء خارجی الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) در سیستم ناپیوسته و روی ژل مسطح عمودی طبق روش Laemmli انجام شد(۲۳). مواد الکتروفورز از دو شرکت SIGMA و MERCK بدست آمد و دستگاههای مورد استفاده برای الکتروفورز از قبیل تانک الکتروفورز، Power Supply و ترموستات ساخت شرکت Pharmacia LKB بود. ژلها با غلظت ٪۴/۵ ژل متراکم کننده و ٪۱۰ ژل جداکننده تهیه شدند. کلیهٔ نمونه‌ها قبل از تزریق درون ژل، در بافر رقیق کنندهٔ نمونه شامل ٪۵ SDS، ٪۰/۱ سرم فنل بلو، ٪۲۰ گلیسرول، ٪۱۰ ۲-مرکاپتواتانل در بافرتریس ۰/۱۲۵ مولار با pH = ۶/۸ حل شدند و در $100^{\circ}C$ برای ۵-۳ دقیقه حرکت داده شد تا ۲-مرکاپتواتانل پیوندهای دی‌سولفیدی پپتیدها را احیا کند و SDS بار منفی یکسانی در سطح کلیهٔ مولکولها ایجاد نماید. ۴۰-۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به داخل هر خانهٔ ژل تزریق شد. SDS-PAGE با شدت جریان ۶۰ میلی‌آمپر، دمای $8^{\circ}C$ و مدت زمان متوسط ۵ ساعت انجام شد. نمونه‌ها با کوماسی بلورنگ آمیزی شدند(۲۲). وزنهای مولکولی تقریبی پروتئینهای غشاء خارجی با مقایسه منحنی استاندارد شامل پروتئینهای زیر محاسبه شد:

Bovin phosphorylase b (۹۴۰۰۰ D.)، serum Albumin(۶۷۰۰۰ D.)، Ovalbumin (۴۳۰۰۰ D.)، Carbonic Anhydrase (۳۰۰۰۰ D.)، Sey Bean Trypsin Inhibitor (۲۰۱۰۰ D.) و α-Lactalbumin (۱۴۴۰۰ D.).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

نتایج

پروفایل جزء نامحلول در سارکوزیل یا پروتئینهای غشاء خارجی هلیکوباکترپیلوری بدست آمده از بیوپسی معده یا دوازدهه ۱۵ بیمار ایرانی با میانگین سنی ۶ ± ۳۰ سال که به طور متوسط ۳ سال سابقهٔ زخم معده یا دوازدهه داشتند، مورد بررسی قرار گرفت.

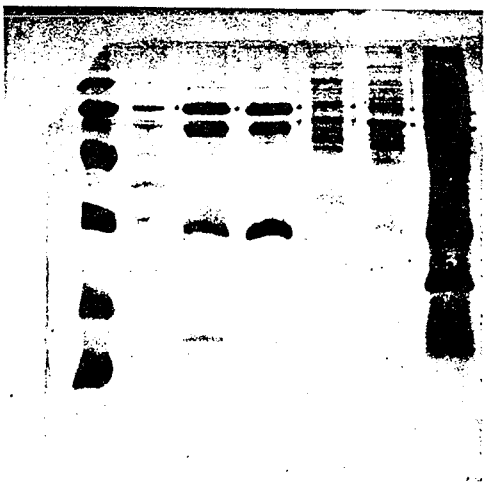
برای ۱۵ نمونه OMP، ۶ صفحه الکتروفورز شد و برای اثبات تکرارپذیری الکتروفورز چند تا از نمونه‌ها به طور همزمان و با شرایط یکسان و یا در زمانهای مختلف تکرار گردید و هر بار نتایج یکسان بدست آمد. در آزمایشات اولیه برای بررسی اثرات حاصل از عملیات انجماد و ذوب شدن، سونیکه کردن، سانتریفوژ با دور بالا و دترجنت روی ساختمان و وزن مولکولی پروتئین آلبومین صورت گرفت. با مقایسه باند الکتروفورزی این آلبومین با باند آلبومینی که این مراحل روی آن صورت نگرفت، این نتیجه حاصل شد که عملیات مذکور تغییر چندانی در ساختمان پروتئین، لااقل در شکل و وزن مولکولی آن ایجاد نمی‌کند. قابل ذکر است که در این مطالعه پروتئینهای غشاء خارجی تنها از نظر کیفی مورد بررسی قرار گرفت و حدود نسبی وزن مولکولی آنها تعیین شد.

وزن مولکولی تقریبی پروتئینهای تفکیک شده در مقایسه با منحنی استاندارد به شرح زیر بدست آمد :

الف ـ خصوصیات OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۱ و ۲ بوسیله SDS - PAGE:

ژلهای شماره ۱ و ۲ همزمان الکتروفورز شد (شکلهای ۱ و ۲). نمونه‌های ردیف ۱ تا ۳ در هر دو ژل مشابه بوده و برای اثبات تکرارپذیری در هر دو ژل الکتروفورز شده‌اند و همان طوری که از شکلها مشخص است، باندهای بدست آمده در هر دو ژل بر هم منطبق هستند.

شکل ۱ـ ژل شماره ۱: OMP SDS-PAGE هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۱ و ۲



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷

ردیف ۱ مربوط به پروتئینهای استاندارد و ردیف‌های ۲ و ۳ به ترتیب مربوط به بیماران شماره ۱ و ۲ می‌باشد. از OMP هلیکوباکترپیلوری هر دو بیمار ۱ و ۲، چهار باند پروتئینی بدست آمد که دو باند اول قوی‌تر (Major) و دو باند دوم کمرنگ‌تر (Minor) هستند. پس از محاسبهٔ RF و مقایسه با منحنی استاندارد وزن ملکولی تقریبی این چهار پروتئین به ترتیب ۶۷۰۰۰، ۶۱۴۲۱، ۳۰۲۵۸ و ۱۷۲۴۰ دالتون بدست آمد.

ب ـ خصوصیات OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ۷ بوسیله OMP SDS-PAGE: ژلهای شکل شماره ۳ و ۴ همزمان الکتروفورز شد (شکلهای ۳ و ۴). نمونه‌های ردیف ۱ تا ۳ در هر دو ژل متشابه بوده و برای اثبات تکرارپذیری در هر دو ژل الکتروفورز شده‌اند و همان‌طوری که از شکلها مشخص است، باندهای بدست آمده در هر دو ژل بر هم منطبق هستند.

ردیف‌های ۱ تا ۳ در هر ژل به ترتیب مربوط به بیماران شماره ۳ تا ۵ و ردیف ۴ در ژل شماره ۴ و ردیف ۵ در ژل شماره ۳ مربوط به پروتئینهای استاندارد می‌باشد. ردیفهای ۴ و ۶ در ژل شمارهٔ ۳ به ترتیب مربوط به بیماران شماره ۶ و ۷ می‌باشد و ردیف ۷ در همین ژل تکرار ردیف ۴ می‌باشد.

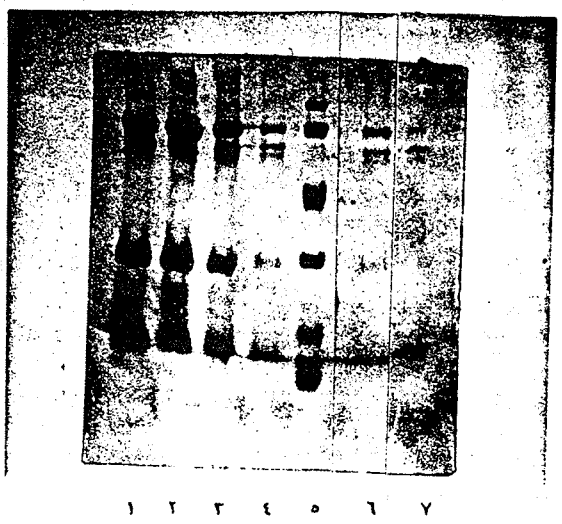
همانطوری که از شکلها مشخص است، از OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ۷، هر کدام چهار باند پروتئین تفکیک شده که در ردیفهای ۱ و ۲ ژلهای شماره ۳ و ۴ دو باند پروتئینی اول و دوم، به علت غلیظ بودن نمونه، تقریباً در هم فرو رفته‌اند. پس از محاسبهٔ RF و مقایسه با منحنی استاندارد، وزن مولکولی تقریبی این چهار پروتئین به ترتیب ۶۷۰۰۰، ۶۰۵۸۷، ۲۹۸۴۷ و ۱۷۳۷۰ دالتون می‌باشد.

شکل ۲ـ ژل شماره ۲ : تکرارپذیری OMP SDS-PAGE هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۱ و ۲

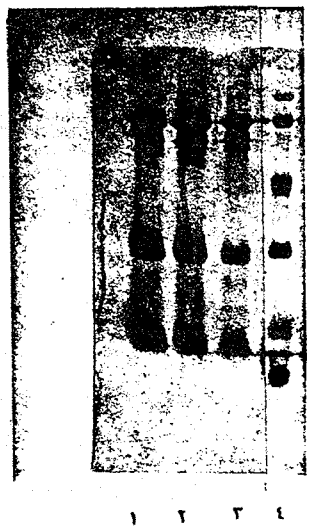
۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

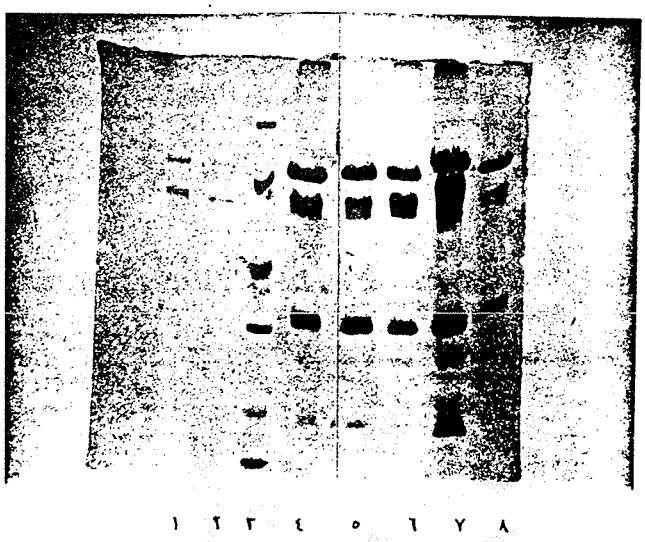
شکل ۳ ـ ژل شماره ۳ : OMP SDS-PAGE هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ۷



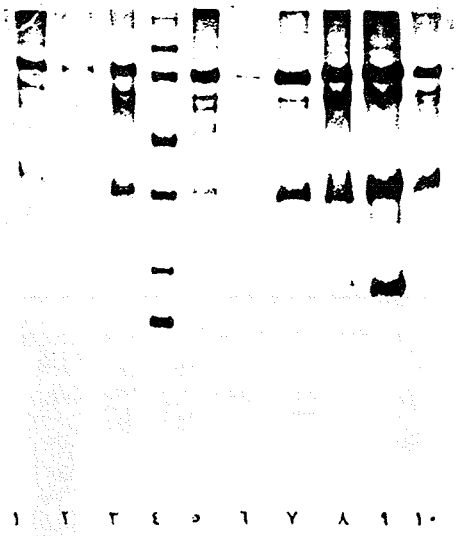
شکل ٤ـ ژل شماره ٤ : تکرارپذیری OMP SDS-PAGE تکرارپذیری OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ٥



شکل ٥ ـ ژل شماره ٥ : OMP SDS-PAGE هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۸ تا ١٤



شکل ٦ـ ژل شماره ٦ : تکرارپذیری SDS-PAGE برای OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ٥ و ۱۰ تا ١٤



ج ـ خصوصیات OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۸ تا ۱۴ بوسیله SDS-PAGE:

در ژل شمارهٔ ٥ (شکل ٥)، ردیفهای ۱ و ۲ مربوط به OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شاره ۸ و ۹ می‌باشد که به علت رقیق بودن نمونه، باندهای پروتئینی کمرنگی حاصل شده است. ردیف ۳ مربوط به پروتئینهای استاندارد با مشخصات ذکر شده و ردیفهای ۴

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

تا ۸ به ترتیب مربوط به OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۱۰ تا ۱۴ می‌باشد.

از کلیهٔ این نمونه‌ها، چهار باند پروتئینی واضح تفکیک شده است که پس از محاسبه RF و مقایسه با منحنی استاندارد، وزن مولکولی تقریبی این چهار پروتئین ۶۶۳۲۳، ۶۰۴۹۸، ۳۰۳۶۴ و ۱۷۲۵۲ دالتون می‌باشد.

د ـ تکرارپذیری SDS-PAGE برای OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ۵ و ۱۰ تا ۱۴:

در ژل شماره ۶ (شکل ۶) ردیفهای ۱ تا ۳ مربوط به OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۳ تا ۵، ردیف ۴ شش پروتئین استاندارد ردیف ۵ OMP هلیکوباکترپیلوری شماره ۱۰، ردیف ۶ OMP هلیکوباکتر پیلوری بیمار شماره ۱۵ که در این ژل نمونه جدیدی است. ردیفهای ۷ تا ۱۰ OMP هلیکوباکترپیلوری بیماران شماره ۱۱ تا ۱۴، همان چهار باند پروتئین واضح در کلیهٔ این نمونه‌ها دیده می‌شود پس از محاسبهٔ RF و مقایسه با منحنی استاندارد، وزن مولکولی این چهار پروتئین به ترتیب ۶۷۰۰۰، ۶۱۱۶۷، ۳۰۰۰۰ و ۱۷۳۷۸ دالتون می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی و بحث

وزن‌های مولکولی تقریبی OMP هلیکوباکترپیلوری بدست آمده از ۱۵ بیمار که در روی ۶ ژل الکتروفورز شده بودند، محاسبه گردید و در جدول ۱ با هم مقایسه شده و میانگین وزن مولکولی هرپروتئین محاسبه گردید.

جدول ۱ـ میانگین وزن مولکولی OMP هلیکوباکترپیلوری کلیه نمونه‌های مورد آزمایش

میانگین (دالتون)	۶ (دالتون)	۵ (دالتون)	۳ و ۴ (دالتون)	۱ و ۲ (دالتون)	شماره ژل / شماره باند
۶۶۸۳۰	۶۷۰۰۰	۶۶۳۲۳	۶۷۰۰۰	۶۷۰۰۰	باند اول
۶۰۹۱۸	۶۱۱۶۷	۶۰۴۹۸	۶۰۵۸۷	۶۱۴۲۱	باند دوم
۳۰۱۱۷	۳۰۰۰۰	۳۰۳۶۴	۲۹۸۴۷	۳۰۲۵۸	باند سوم
۱۷۳۱۰	۱۷۳۷۸	۱۷۲۵۲	۱۷۳۷۰	۱۸۲۴۰	باند چهارم

مطالعهٔ باندهای پروتئینی OMP هلیکوباکترپیلوری هر ۱۵ بیمار نتایج مشابهی را نشان داد. جزء نامحلول در سارکوزیل یا OMP شامل دو پروتئین قوی با وزنهای مولکولی تقریبی ۶۷۰۰۰ و ۶۱۰۰۰ دالتون و دو پروتئین ضعیف‌تر با وزنهای مولکولی تقریبی ۳۱۰۰۰ و ۱۷۰۰۰ دالتون می‌باشد.

در مورد علت استفاده از سارکوزیل به عنوان دترجنت انتخابی، Fillip C و همکاران در سال ۱۹۷۳ اثرات چند دترجنت یونی و غیریونی را روی غشاء داخلی و خارجی E.coli در حضور یا عدم حضور Mg^{2+} با هم مقایسه کردند. طبق نتایج بدست آمده پیشنهاد کردند که غشاء خارجی به حل شدن توسط سارکوزیل ۰/۵٪ مقاوم است. اساس این مقاومت شناخته نشده است، در حالیکه سارکوزیل پروتئینهای غشاء داخلی را انتخابی حل می‌کند، یک دترجنت دیگر مثل SDS همهٔ پروتئینهای غشاء را حل می‌کند. همچنین نشان دادند که غشاء تمایلی برای کریستالهای Mg^{2+} Sarcosinate دارد(۲۴).

به منظور مقایسه نتایج بدست آمده از این تجربه، تعدادی دیگر از تجربیات استخراج و جداسازی پروتئینهای غشاء خارجی مورد بررسی قرار می‌گیرد:

Drouet E.B. و همکاران با استفاده از دترجنت سارکوزیل و SDS-PAGE پروتئینهای ۱۹، ۳۰،۵۴ و ۶۱ کیلودالتونی را از غشاء خارجی هلیکوباکترپیلوری جدا کردند و پس از آزمایشات ایمونولوژیکی، پاسخ آنتی‌بادی نسبت به پروتئین ۱۹ کیلودالتون را در سرم انسان مشاهده نمودند(۲۱).

Kostrzynska M. و همکاران نیز با استفاده از روش Drouet E.B. و همکاران(۲۱) با استفاده از سارکوزیل و SDS-PAGE با ژل ۱۵٪، یک پروتئین ۲۰ کیلودالتونی را از غشاء هلیکوباکترپیلوری جدا کردند(۱۲).

Apel I. و همکاران پروتئینهای بین ۲۵ تا ۱۲۰ کیلودالتونی از کمپیلوباکترپیلوری جدا کردند که خاصیت آنتی‌ژنیک داشتند و پاسخهای آنتی‌بادی علیه پروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی را در ۵۲ تا ۶۳ بیمار مورد مطالعه یافتند. پس از انجام SDS-PAGE و آزمایشات دیگر تعیین کردند که این پروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی مربوط به سطح غشاء خارجی باکتری است(۱۳).

Gerstenecker B. و همکاران با استفاده از کروماتوگرافی در حضور SDS و استفاده از دترجنت CHAPS و سپس SDS-PAGE توانستند یک پروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی را که مرتبط با غشاء هلیکوباکترپیلوری بود، خالص‌سازی نموده و از Enzyme Immunosorben Assay برای ردیابی آنتی‌بادیهای IgG خاص هلیکوباکترپیلوری (علیه این پروتئین) در سرم بیماران استفاده نمایند(۱۴).

Trust T. و Doig P. با استفاده از سارکوزیل و SDS-PAGE شش پروتئین با وزنهای مولکولی ۸۰، ۶۰، ۵۰، ۴۸ و ۳۱ کیلودالتون را که خاصیت آنتی‌ژنیک داشتند از غشاء خارجی هلیکوباکترپیلوری جدا کردند و بیان داشتند سه پروتئین ۸۰،۶۰ و ۵۱ کیلودالتون وابسته به سوش بوده ولی سه پروتئین دیگر در همه سوشهای هلیکوباکترپیلوری یافت می‌شوند. همچنین توضیح دادند که پروتئینهای ۵۱، ۴۸ و ۳۱ کیلودالتون در برابر حرارت ناپایدار بوده و ممکن است پورین باشند(۱۵).

Werst D.J. و همکاران با استفاده از SDS-PAGE و کروماتوگرافی، پروتئینهای ۷۷، ۵۰ و ۴۸ کیلودالتون را از غشاء خارجی هلیکوباکترپیلوری جدا کردند(۱۶).

Bazillou M. و همکاران پاسخ آنتی‌بادی نسبت به اجزاء آزاد شده و سطح شش سوش هلیکوباکترپیلوری را توسط ELISA اندازه‌گیری کردند. این اجزاء سطحی شامل ۱۰ باند پروتئینی بود که

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

آنتی‌ژنهای عمده عبارت بود از ۵۷،۶۸ و ۲۳/۵ کیلودالتون(۱۷).

Dunne B.E. و همکاران آنتی‌ژنهای مرتبط با فلاژل، پروتئینهای غشاء خارجی، پروتئینهای کل سلول و همچنین اوره‌آز نیمه‌خالص شده کمپیلوباکترپیلوری را به وسیله [Two (2DGE) Dimensional Gel Electrophoresis] آنالیز کردند و بیان داشتند تفاوت بارز C.Pylori با سایر گونه‌های کمپیلوباکتر، فقدان پروتئینهای غشاء خارجی با وزن مولکولی بین ۴۵-۴۱ کیلودالتون است. همچنین این محققین دو پروتئین ۶۶ و ۶۳ کیلودالتون را از C.Pylori جدا کردند و متوجه شدند که این دو پروتئین از اجزاء (Subunit) اوره‌آز هستند و به این نتیجه رسیدند که اوره‌آز ممکن است در ارتباط با غشاء خارجی C.Pylori باشد. در ضمن پس از آزمایشات ایمونولوژی دریافتند که پروتئین ۶۶۰۰۰ دالتون که در خرگوش آنتی‌بادی تولید می‌کند منحصراً مربوط به OMP کمپیلوباکترپیلوری است(۱۸).

Newell D.G. مشاهده نمود که پروتئینهای غشایی نامحلول در سارکوزیل، پروتئینهای استخراج شده توسط اسید و همچنین فلاژل نیمه خالص شده C.Pylori توسط SDS-PAGE شامل باندهای پروتئینی بزرگی در ۵۴،۶۱ و ۳۱ کیلودالتون می‌باشد(۱۹).

بالاخره Perez-Perez G. و Blaser M.J. از کل سلول سونیکه شده C.Pylori با استفاده از SDS-PAGE با ژل ۱۰٪ و رنگ‌آمیزی نیترات نقره، باندهای پروتئینی قوی را در ۶۳، ۵۳،۵۷، ۴۵، ۳۱ و ۱۷ کیلودالتون پیدا کردند(۲۰).

مطالعه بیوشیمیایی هلیکوباکترپیلوری از سه نظر قابل اهمیت می‌باشد :

۱- به علت اینکه یکی از عوامل مهم بیماریهای قسمت فوقانی دستگاه گوارش (معده و دوازدهه) می‌باشد.

۲- به علت اینکه درصد بالایی (۷۰-۱۰ درصد) در مناطق مختلف دنیا به آن مبتلا هستند.

۳- به علت اینکه بعضی از پروتئینهای غشاء خارجی آن دارای خاصیت آنتی‌ژنیک بوده و در بدن برعلیه آنها آنتی‌بادی تولید می‌گردد.

لذا می‌طلبد غشاء خارجی استخراج گردیده و از نظر کمّی و کیفی پروتئینهای آن تعیین گردند، و سپس از بین آنها پروتئینهای آنتی‌ژنیک شناخته شده، تا بتوان به وسیله آن یک روش سرولوژیک برای تشخیص آن بوجود آورد. مشکل اصلی بر سر راه، متفاوت بودن گونه‌های باکتری می‌باشد که مطالعات انجام شده تاکنون موفق به شناخت یک پروتئین شاخص آنتی‌ژنیک نشده است. امید است بتوان با روشهای خیلی دقیق، یک پروتئین همگانی در گونه‌های. ختلف را بدست آورد.

در این مقاله ۱۵ نمونهٔ بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند که خوشبختانه چهار پروتئین غشاء خارجی این باکتری بدست آمد که تفاوت فاحشی با یکدیگر نداشتند. لذا باید بر روی این نمونه‌ها مطالعات ایمونولوژیک صورت گرفته و پروتئین دارای خاصیت آنتی‌ژنیک تعیین گردد که این کار تحقیقی در دستور کار مطالعات بعدی می‌باشد.

منابع

1. Graham D.Y. Helicobacter pylori: It's epidemiology and it's role in duodenal ulcer disease. J. Gastroentrol. Hepatol. 1991(6), 105-113.

2- Doenges J.L. Spirochetes in the gastric glands of macacus thesus and humans without definite history of related disease. Prog. Soc. Exp. Med. Biel. 1983 (38), 536-538.

3- Warre J.R., Marshall B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (Letter). Lancet 1985 (I), 1273-5.

4- Mc Nulty C.A. Wise R. Rapid diagnosis of Campylobacter - associated gestriris (Letter). Lancet 1985 (I), 1443-1444.

5- Owen R.J., Martin S.R., Borman P. Rapid Urea hydrolysis by gastric Campylobacter (Letter). Lancet 1985 (I), 111-112.

6- Marshall B.J. Helicobacter pylori. Am. J. Gastroentero. 1994 (89), No, 8 S 116- S 127.

7- Tummurn M.K, Cover T.L., Blaser M.J. Cloning and expression of a high molecular - mass major antigen of helicobacter pylori. Evidence of linkage to cytotoxin production. Infect. & Immun. 1993 (61), 1799-1809.

8- Lee. A. Review in depth Helicobacter pylori: recent developments. Europ. J. Gastroenterol. Hepatol. 1995 (7), No, 4, 303-310.

9- Sippenen P. Kosunen T.U, Valle J. et al. Helicobacter pylori infection and chronic gastritis in gastric cancer. J. Clin Pathol. 1992 (45), 319-323.

10- Glupczynski Y. Methodological aspects of serology for diagnosis of Helicobacter pylori infection. Eur. J. Gastroentrol. Hepatol 1993 (5) (Suppl 2). 550-553.

11- Cever T.L, Dooley C.P., ad Blaser M.J. Characterization of and human serologic response to proteins in Helicobacter pylori broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity, Infect. & Immun. 1990 (58), 603-610.

12- Kestryzins Ka M., O' toole P.W., Taylor and Trust T.J. Molecular characterization of a conserved 20- nkilodalton membrance associated lipoprotein antigen of Helicobacter pylori. J. Bacteriol. 1994 (176), No, 19, 5930-5948.

13- Apel I., Jacebs E., Kist M., Bredt W. Antibody response of patiets against a 120 KD surface protein of Compylobacter pylori. Zbl. Bakt. Hyg. 1988 (A 268): 271-276.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

14- Gerstencker B., Eschweiler B., Vegele H., et al. Serodiagnosis of Helicobacter pylori infections with an enzyme Immunoassay using the chromatographically purfied 120 kilodalton protein. Eur. J. Clin. Mierobiol. Infect. Dis. 1992. (II), Ne, 7, 595-601.

15- Deiog P., Trust T. J. Identification of surtace exposed outer membrane antigens of Helicobacter pylori. Infect. & Immune. 1994 (62), o, IO, 4526-4533.

16- Worst D.J., Otto B.R., and de - Graff. Iron repressible outer membrane proteins of Helicobacter pylori involved in heme uptake. Infect. & Immun. 1995 (63), No, IO, 4161-4165.

17- Bazillou M., Fendri C., Castel O., et al. Serum antibody responses to the superficial and released componenits of Helicobacter pylori. Cli. diagn. Lab. Immunol. 1994, I(3), 310-317.

18- Dunn B. E., Perez - Perez G. I., and Blaser M.J. Two - dimensional gel electrophoresis and immunebloting of Camplebacter pylori proteins. Infect. & Imune. 1989 (57), No. 6, 1825-1833.

19- Newell D.G. Identification of the outer membrance proteins of campylobacter pylori and antigenic cross - reactivity between C. pyloridis and C. jejuni. J. Gen. Microbiol. 1987, (133), 163-170.

20- Perez - Pereze G. I. & Blaser M. J. Conservation and diversity of C. pyloridis major antigen. Infect. & Immune. 1987 (55), 1256-1263.

21- Drouet E.D., Denoyel G. A., Boude M., et al. Characterization of an immunoreactive species-specific 19-Kilodaltion outer membrance proteins from Helicobacter pylori by using a monoclonal antibody. J. Clin Microbiol. 1991. (Aug.), 1620-1624.

22- Blaser M. J., Hopkine J.A., Berka R. M., et al. Identification and characterization of Campylobacter jejuni outer membrance protein. Infect. & Immune. 1985 (Ot.), 276-284.

23- Laemmli U.K. Cleavage of strutural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (London) 1970 (227), 680-685.

24- Fillip C. Flectcher G., Wulff J. L., and Earhart C.F. Soulubilization of the cytoplasmic membrane of Echerichie coli by the ionic detergent Sodium - Lauryl Sarcosinate. J. Bacteriol. 1973 (Sept.) 717-722.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]