

تعیین ایمونوزن های هلیکوباکتر پیلوری با الکتروفورز دو بُعدی و وسترن بلات

الهام ادهم فومنی^۱، دکتر علی مصطفایی^۲، دکتر مصطفی رضایی طاویرانی^۳، دکتر سید جعفر نوابی^۴، شهرام پروانه^۵

نویسنده مسئول: کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی amostafaie@kums.ac.ir

دریافت: ۸۶/۱۰/۳۰ پذیرش: ۸۷/۳/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری از شایع ترین باکتری های بیماری زا در انسان است که معمولا در معده مستقر می شود. این باکتری به عنوان عامل التهاب و زخم معده و دوازده و در مواردی سرطان معده شناخته شده است. بعضی از آنتی ژن های هلیکوباکتر پیلوری که توسط سیستم دفاعی میزبان شناخته می شوند، از نامزدهای مورد استفاده در تعیین سویه ی باکتری، تشخیص بیماری یا تهیه ی واکسن علیه آن محسوب می شوند. این مطالعه به هدف شناسایی ایمونوزن های هلیکوباکتر پیلوری در سه گروه از بیماران مبتلا به التهاب، زخم و سرطان معده انجام گرفت.

روش بررسی: هلیکوباکتر پیلوری از نمونه ی بیوپسی بیماران مبتلا به التهاب معده (۱۳ نفر)، زخم معده (۴ نفر) و سرطان معده (۳ نفر) جدا و کشت داده شد. پروتئین های پیکره ی باکتری با کمک لیزوزیم، اوره و دترجنت چپس، استخراج و به روش الکتروفورز دو بُعدی تفکیک شدند. بُعد اول الکتروفورز دو بُعدی شامل ایزوالکتریک فوکوسینگ به روش آگیری مجدد و بُعد دوم شامل SDS-PAGE بود. بعد از الکتروفورز دو بُعدی، پروتئین ها به غشای PVDF منتقل و واکنش آن ها با ایمونوگلوبولین تخلیص شده از سرم هر گروه از بیماران مبتلا به التهاب، زخم و سرطان معده با روش ایمونوبلاتینگ بررسی شد.

یافته ها: الگوی الکتروفورز دو بُعدی هلیکوباکتر پیلوری در این مطالعه نشان داد که اغلب پروتئین های این باکتری در دامنه ی وزنی ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتونی و محدوده ی pH=۳/۵-۹/۵ قرار دارند. در این الگو ۶ تا ۷ پروتئین پرمقدار که بعضی به صورت گروه چندتایی بودند، قابل تشخیص بود. در ایمونوبلاتینگ، مجموعه ای از پروتئین ها با اوزان حدود ۱۰۰، ۹۶، ۸۵ تا ۷۰، ۶۰، ۳۰، ۱۸، ۱۴ و ۱۰ کیلودالتون با نقاط ایزوالکتریک متفاوت با انواعی از سرم ها واکنش نشان دادند. گروه ۶ تا ۵ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pH های متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون و pH=۳/۵-۴، پروتئین های ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون با هر سه سرم واکنش دادند. پروتئین های ۱۰۲ و ۹۰ کیلودالتونی با سرم بیماران زخم معده واکنشی ندادند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی فقط با سرم بیماران سرطان معده و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی فقط با سرم بیماران مبتلا به التهاب معده واکنش دادند.

نتیجه گیری: پروتئین های با اوزان ۱۰۰، ۹۶، ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون که با سرم هر سه گروه از بیماران واکنش دادند، می توانند به عنوان نامزد تشخیص طبی مطرح و مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران سرطان معده و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران مبتلا به التهاب واکنش دادند، می توانند به عنوان نامزد تشخیص و تمایز این دو دسته از بیماران مدنظر قرار گیرند. به علاوه نتایج نشان داد که آنتی سرم بیماران زخم و سرطان معده الگوی آنتی ژنی نسبتا مشابهی را در مقایسه با بیماران التهاب معده شناسایی می کند که به نظر می رسد در شناخت آنتی ژن های مسؤول بیماری زایی و یا تعیین سویه ی باکتری مفید است.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، الکتروفورز دو بُعدی، ایمونوبلات، ایمونوزن

۱- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، گروه بیولوژی، دانشگاه خاتم

۲- دکترای ایمونولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

۳- دکترای بیوفیزیک، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- متخصص داخلی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۵- کارشناس آزمایشگاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

مقدمه

هلیکوباکتریپیلوری (*H. pylori*) نوعی باکتری گرم منفی است که در مخاط معده مستقر می‌شود و در ایجاد التهاب مخاط معده، زخم و سرطان معده دخالت دارد (۱). در سال ۲۰۰۰ میلادی سازمان بهداشت جهانی هلیکوباکتریپیلوری را به عنوان سرطان‌زای کلاس یک معرفی کرد. عفونت با این باکتری حالت پاندمی دارد و اغلب با شرایط بد اقتصادی-اجتماعی در ارتباط است (۲-۴). در پیکره‌ی هلیکوباکتریپیلوری انواعی از آنتی‌ژن‌های پروتئینی، لیپوپروتئینی و لیپوپلی‌ساکاریدی مشاهده می‌شود. این آنتی‌ژن‌ها مربوط به آنزیم‌ها و سموم ترشحی، دیواره‌ی سلولی، غشای پلاسمایی، فضای پری‌پلاسمی و سیتوپلاسم باکتری هستند. تعدادی از آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتریپیلوری که توسط سیستم دفاعی میزبان شناخته می‌شوند، به عنوان نامزدهای مورد استفاده در تعیین سویه‌ی باکتری، تشخیص بیماری یا تهیه‌ی واکسن علیه آن مطرح شده‌اند. بعضی از آنتی‌ژن‌های نامزد تشخیص طبی و یا تولید واکسن شامل *EFs*, *BabA*, *VacA*, *HspA*, *CagA*, *HpaA*, *HPNAP*، تاژک، زیرواحد بتای آنزیم اوره‌آز، پروتئین *L7/L12* ریبوزومی و *LPP20* می‌باشند (۳، ۵ و ۶).

وسترن‌بلات از روش‌های متداولی است که به طور وسیع در شناخت نامزدهای آنتی‌ژنی تشخیص طبی و واکسن در انواعی از عوامل عفونی به کار می‌رود (۷-۱۰). در این روش ابتدا اجزای پیکره‌ی میکروب با الکتروفورز یک بُعدی یا دو بُعدی در ژل پلی‌اکریل‌آمید تفکیک می‌شود. در مرحله‌ی بعد باندهای پروتئین به صفحات نیتروسلولز یا پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) انتقال می‌یابد و واکنش آن‌ها با آنتی‌بادی یا سرم بیمار مورد مطالعه قرار می‌گیرد. الکتروفورز دو بُعدی (*2DE*) به دلیل قابلیت تفکیک بالا، از کارآمدترین روش‌های الکتروفورز برای مطالعه پروتئین‌های پیکره‌ی میکروب‌هاست. این روش برای مطالعه‌ی پروتئین‌های

هلیکوباکتریپیلوری از جنبه‌های متعدد از جمله ارزیابی پاسخ‌های استرسی متفاوت، مقایسه‌ی پروتئین‌های سطحی سلول (اشکال اسپریل و کوکویید)، پروتئین‌های شاخص بیماری، نامزدهای واکسن و دسته‌بندی جدایه‌های بالینی به کار گرفته شده است (۷-۹).

با توجه به این که بررسی الکتروفورز دو بُعدی پروتئین‌های هلیکوباکتریپیلوری به منظور مقایسه‌ی واکنش این پروتئین‌ها با سرم افراد مختلف (بررسی ایمنی همورال) در داخل ایران انجام نشده، در این مطالعه، به بررسی این واکنش پرداخته شد. بر این اساس در مطالعه‌ی حاضر پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران با کمک لیزوزیم، اوره و دترجنت، استخراج و به روش الکتروفورز دو بُعدی تفکیک شد. سپس واکنش پروتئین‌های تفکیک شده با ایمونوگلوبولین تخلیص شده از سرم بیماران مبتلا به التهاب معده، زخم و سرطان معده با روش ایمنوبلاتینگ بررسی شد. هدف از این مطالعه، یافتن ایمونوزن‌های مشترک و یا متفاوت در سه گروه از بیماران فوق، به ترتیب جهت اهداف تشخیص طبی و شناخت ایمونوزن‌های احتمالی دخیل در القای بیماری‌زایی این میکروب برای مطالعات بعدی است.

روش بررسی

تهیه و کشت باکتری: نمونه‌های بیوپسی، از معده‌ی بیماران مبتلا به انواع ناراحتی‌های معده که به بخش داخلی بیمارستان امام خمینی کرمانشاه مراجعه می‌کردند، تهیه شد. این افراد مبتلا به التهاب معده (خفیف، متوسط و شدید)، بازگشت اسید معده به ابتدای مری (*Gastro-Esophageal Reflux Disorder [GERD]*)، زخم معده یا سرطان معده بودند. روی نمونه‌های بیوپسی ابتدا آزمون اوره‌آز سریع (محیط حاوی اوره و معرف فنل قرمز با $pH=6/8$) انجام گرفت. در صورت مثبت بودن واکنش، نمونه‌ها در محیط انتقال به آزمایشگاه منتقل و کشت داده

قرارگرفت. سپس اوره ۷ مولار، تیواوره ۲ مولار، دی‌تیوتریتول ۸۰ میلی‌مولار، آمفولین ۰/۶ درصد و اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک‌اسید یک میلی‌مولار اضافه شد. پس از تأثیر مواد فوق، نمونه در $4500 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و در ظروف درب‌دار تقسیم و تا هنگام الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳، ۱۲).

الکتروفورز دو بُعدی: بعد اول الکتروفورز دو بُعدی شامل ایزوالکتریک فوکوسینگ (*IEF*) به روش آبدی مجدد (*Rehydration*) بود (۱۴-۱۲). محلول متورم‌سازی شامل تریس ۱۰ میلی‌مولار ($pH=7.2$)، اتیلن‌گلیکول هفت و نیم درصد (v/v)، چپس یک درصد (w/v)، اوره چهار مولار، دی‌تیوتریتول ۲۰ میلی‌مولار و آمفولین شش درصد (v/v) در دامنه‌ی ۳/۵ تا ۹/۵ بود. پس از متورم‌سازی ژل در طول شب، شرایط الکتروفورز در دمای ۱۶ درجه‌ی سانتی‌گراد مهیا شد. چند قطره آب دیونیزه روی صفحه‌ی سرامیکی تانک الکتروفورز (فارماسیا) ریخته شد و ژل متورم شده از طرف طلق نگهدارنده روی قطرات آب قرار داده شد، به طوری که حباب هوا تشکیل نشد. سپس الکترودهای کاغذی در لبه‌های ژل قرارگرفت. کاغذهای نمونه‌گذار به فاصله‌ی ۱/۵ سانتی‌متر از کاتد و در فواصل سه تا چهار میلی‌متری از یکدیگر بر روی سطح ژل قرار داده شدند. سپس جریان برق برقرار شد. در ابتدا پیش‌فوکوسینگ در ۷۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه، بدون نمونه انجام شد. پس از پیش‌فوکوسینگ، نمونه‌ها با استفاده از سمپلر بر روی کاغذهای نمونه‌گذار قرار داده شدند. فاز اول مرحله‌ی نفوذپذیری شامل ۱۵۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه و فاز دوم ۵۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه بود.

پس از اتمام فاز دوم جریان قطع شد و کاغذهای نمونه‌گذار با استفاده از پنس برداشته شدند. سپس مراحل جداسازی و نازک شدن باندها به ترتیب در ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ ولت انجام گرفت. پس از *IEF* نوارهای ژل در دو مرحله در محلول

شدند. محیط کشت مورد استفاده برای تکثیر باکتری و کشت انبوه شامل بروسلا آگار بود. در میان بیوپسی‌های گرفته شده از بیماران، از ۴ نمونه‌ی زخم، ۱۳ نمونه‌ی التهاب معده و ۳ نمونه‌ی سرطان معده، هلیکوباکتر پیلوری جدا شد و جهت ادامه‌ی مطالعه مورد استفاده قرارگرفت. باکتری‌های جدا شده بعد از کشت، با بافر فسفات نمکی (*PBS*) استریل شست‌وشو و با سانتریفیوژ رسوب داده شدند. رسوب باکتری در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

نمونه‌های سرم: از بیمارانی که نمونه‌ی کشت آن‌ها مثبت بود (بیماران مبتلا به التهاب، زخم معده و سرطان معده) ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و سرم آن‌ها جدا شد.

تخلیص ایمونوگلوبولین سرم: سرم بیماران در سه گروه التهاب معده (۱۳ نفر)، زخم (۴ نفر) و سرطان معده (۳ نفر) مخلوط شد. به سرم مخلوط شده هر گروه سولفات آمونیوم تا غلظت نهایی ۵۰ درصد اضافه شد. مخلوط در $2000 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب بعد از ۲ بار شست‌وشو با محلول سولفات آمونیوم ۵۰ درصد، در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با $pH=7.2$ حل و یک شب در مقابل آن دیالیز شد. مرحله‌ی نهایی تخلیص بخش *IgG* سرم‌ها شامل کروماتوگرافی تعویض یون در ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل‌سفارز با سرعت بالا (*DEAE- Sepharose Fast Flow*) (فارماسیا) بود که با بافر فوق به تعادل رسیده بود (۱۱).

استخراج پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری: رسوب باکتری حاصل از کشت انبوه در بافر تریس ۲۵ میلی‌مولار با $pH=7.2$ حاوی دترجنت چپس (*CHAPS*) چهار درصد و *PMSF* یک میلی‌مولار به حالت تعلیق درآمد. سپس لیزوزیم (یک میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک باکتری)، *DNase I* و *RNase A* (۳۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن خشک باکتری) و کلرید منیزیم (۴ میلی‌مولار) اضافه شد. نمونه یک شب در اتاقک با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد

شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی بز) ضد *IgG* انسانی کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز) قرار گرفت. غشا ۴ بار با *PBS-T2* شسته شد و سپس در معرض مقدار کافی از محلول سوبسترای دی آمینوبنزیلیدین (داکو) و پراکسید هیدروژن قرار گرفت تا باندها ظاهر شدند.

یافته ها

الکتروفورز دو بُعدی پروتئین های پیکره ی هلیکوباکتر

پیلوری: الگوی الکتروفورز دو بُعدی پروتئین های پیکره ی هلیکوباکتر پیلوری در شکل A-۱ آمده است. همان طوری که در شکل مشخص است، پراکندگی پروتئین های باکتری از نظر بار تقریباً از همگونی یکسانی در ژل برخوردار است، اگرچه بیشتر پروتئین ها نقطه ی ایزوالکتریک کم تر از ۷ دارند. در این الگو یک گروه ۵-۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون در محدوده ی ۴/۵ تا ۵/۵ pH ، یک گروه پروتئین ۶ تا ۷ با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون در محدوده ی ۴-۳/۵ pH ، ۸ تا ۱۲ لکه ی پروتئینی در محدوده ی ۴-۳/۵ pH ، ۱۲ تا ۱۶ لکه ی پروتئینی در محدوده ی ۵-۴ pH ، یک گروه پروتئینی متشکل از ۶ تا ۷ پروتئین پرمقدار با وزن حدود ۲۰ کیلودالتون و در محدوده ی ۴ تا ۵ pH ، یک گروه پروتئینی متشکل از ۴ تا ۵ پروتئین پرمقدار با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون با ۵ تا ۶ لکه ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون در محدوده ی ۹-۵/۵ pH ، ۵ لکه در محدوده ی وزنی ۱۴ تا ۱۶ کیلودالتون در محدوده ی ۹-۷ pH ، ۳ لکه ی پروتئینی در محدوده ی وزنی ۱۰ کیلودالتون و محدوده ی ۴-۳/۵ pH و ده ها پروتئین کم مقدار با اوزان و (Isoelectric point [pI]) متفاوت دیده می شوند. خلاصه ی مطالب فوق در جدول ۱ آمده است. **ایمونوبلات:** در آزمون ایمونوبلات پس از تفکیک پروتئین های پیکره ی هلیکوباکتر پیلوری با روش الکتروفورز دو بُعدی، نقاط پروتئینی به غشای *PVDF* انتقال

متعادل کننده ی *SDS-PAGE* قرار داده شدند. مرحله ی اول متعادل سازی به مدت ۲۰ دقیقه در بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH معادل ۸/۸، حاوی *SDS* ۲ درصد (W/V)، اوره ی ۶ مولار، دی تیوتریتول (*DTT*) یک درصد (W/V) و گلیسرول ۳۰ درصد (W/V) بود. مرحله ی دوم متعادل سازی به مدت ۲۰ دقیقه ی دیگر در همان محلول که حاوی یدواستامید ۵ درصد (W/V) به جای *DTT* بود، انجام گرفت. بعد از این مرحله نوارهای *IEF* در بالای ژل آماده شده برای بُعد دوم قرار داده شدند و با محلول آگارز داغ (۵/۰ درصد در بافر تانک) به ژل بُعد دوم متصل شدند. بُعد دوم الکتروفورز دو بُعدی شامل *SDS-PAGE* به روش لاملی در ژل جداکننده ی ۱۳/۵ درصد بود (۱۳، ۱۴). رنگ آمیزی ژل پس از الکتروفورز به روش نقره انجام گرفت.

ایمونوبلات: انتقال پروتئین ها از ژل پلی اکریل آمید به غشای پلی وینیلیدین دی فلورید (فارماسیا) به روش تاوین انجام گرفت (۱۵). آنتی بادی مورد استفاده، *IgG* تخلیص شده از سرم بیماران مبتلا به زخم معده، التهاب و سرطان معده بود. پس از الکتروفورز، ژل ۱۰ دقیقه در بافر انتقال قرار گرفت. سپس غشا با متانول خیس شد و در ظرف حاوی بافر انتقال قرار گرفت.

مجموعه ی بلات در قالب پلاستیکی مربوطه محکم شد و در تانک بلات قرار گرفت. انتقال به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۱۰۰ میلی آمپر و سپس به مدت یک ساعت در شدت جریان ثابت ۲۰۰ میلی آمپر و دو ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰۰ میلی آمپر انجام شد. پس از انتقال، غشا به مدت ۱۵ دقیقه در بافر فسفات نمکی حاوی توین بیست ۰/۵ درصد (*PBS-T1*) قرار گرفت (مرحله ی مسدود سازی). سپس ۳ بار با بافر فسفات نمکی حاوی توین بیست ۰/۰۵ درصد (*PBS-T2*) شست و شو داده شد و به مدت ۱/۵ ساعت در آنتی بادی اولیه (*IgG*) تخلیص شده از سرم هر گروه از بیماران قرار گرفت. غشا ۴ بار با *PBS-T2* شسته

داده شد. سپس واکنش سرم بیماران مبتلا به زخم معده، سرطان و التهاب معده به طور جداگانه با پروتئین‌های تفکیک شده، مورد آزمون و مقایسه قرار گرفت.

جدول ۱: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های پرمقدار هلیکوباکتر مشاهده شده در الگوی الکتروفورز دو بُعدی

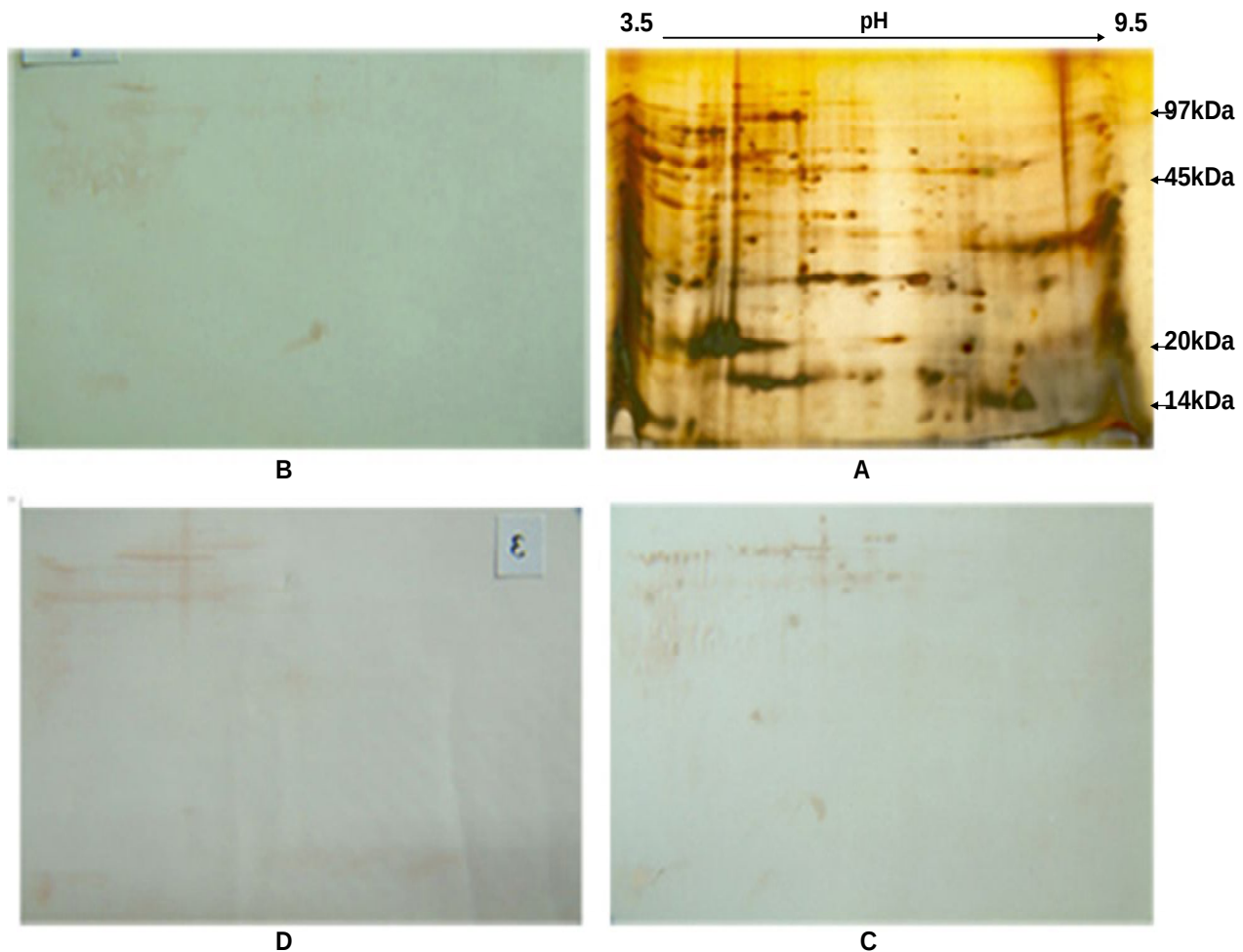
گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۳/۵-۴
۸-۱۲ لکه‌ی پروتئینی	۳۰ کیلودالتون	۳/۵ تا ۹
گروه ۶-۷ پروتئینی	۲۰ کیلودالتون	۴ تا ۵
گروه ۴-۵ پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۴/۵-۵/۵
۵-۶ لکه‌ی پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۵/۵-۹
۵ لکه‌ی پروتئینی	۱۴-۱۶ کیلودالتون	۷-۹
۳ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۵-۴

داده است. در این میان شدت رنگ‌پذیری لکه‌های ۱۰، ۱۸، ۹۶ و ۱۰۰ کیلودالتون از بقیه بیشتر بود.

واکنش سرم بیماران مبتلا به سرطان معده با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان داد که یک گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pI ‌های متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، یک گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با $pI=۳/۵-۴$ ، یک گروه شامل ۲ تا ۳ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰۵ کیلودالتون و $pI=۵/۵-۶$ ، ۳ تا ۴ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۹۰ کیلودالتون و $pI=۵/۵-۶$ ، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون و $pI=۵$ ، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۳۰ کیلودالتون و $pI=۴/۵$ و سه لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰ کیلودالتون و $pI=۳/۵-۳/۷$ با سرم این بیماران واکنش داده است. در این میان شدت رنگ‌پذیری لکه‌های ۱۰۰، ۹۶، ۹۰، ۱۸ و ۱۰ کیلودالتون از بقیه بیشتر بود.

واکنش سرم بیماران با آنتی‌ژن‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری که با الکتروفورز دو بُعدی جدا شده‌اند در شکل ۱ (B تا D) آمده است. شکل B-۱ واکنش سرم بیماران مبتلا به زخم معده را با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان می‌دهد. اشکال C-۱ و D-۱ نیز به ترتیب واکنش سرم بیماران مبتلا به التهاب و سرطان معده را با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان می‌دهد.

واکنش سرم بیماران مبتلا به زخم معده با آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان داد که یک گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pI ‌های متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، یک گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با $pI=۳/۵-۴$ حداقل ۴ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۸۰ تا ۹۵ کیلودالتون با $pI=۳/۵-۴/۵$ ، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون و $pI=۵/۸$ ، ۱ تا ۲ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰ کیلودالتون و $pI=۳/۵-۳/۷$ با سرم این بیماران واکنش



شکل ۱: الگوی الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری در آمفولین در دامنه‌ی $pH=3.5-9.5$ (A). رنگ‌آمیزی به روش نقره‌ی اسیدی، ایمونوبلاتینگ پروتئین‌های پیکره‌ی هلیکوباکتر پیلوری تفکیک شده با الکتروفورز دوبعدی با سرم بیماران مبتلا به زخم معده (B)، سرطان معده (C) و التهاب معده (D).

در واکنش سرم بیماران مبتلا به التهاب معده با پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری (D-1) نیز یک گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pI های متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، یک گروه پروتئین ۶ تا ۷ کیلودالتون با $pI=3.5-4$ ، یک گروه شامل ۲ تا ۳ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰۲ کیلودالتون و $pI=5-6$ ، حداقل ۵ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۹۰ کیلودالتون و $pI=3.5-5$ ، ۲ تا ۳ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۷۰ تا ۸۵ کیلودالتون و

۱ تا ۲ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۰ کیلودالتون و $pI=3.5-4$ ، یک لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۸ کیلودالتون و $pI=4.5$ و ۱ تا ۲ لکه‌ی پروتئینی با وزن حدود ۱۴ کیلودالتون و $pI=7-8$ رنگ‌آمیزی شدند. در این میان شدت رنگ‌پذیری لکه‌های ۱۰۰، ۹۶، ۹۰ و ۱۰ کیلودالتون از بقیه بیشتر بود. خلاصه‌ی مطالب فوق در جداول ۲ تا ۴ آمده است.

جدول ۲: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در واکنش با سرم بیماران مبتلا به زخم معده

گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۳/۵-۴
گروه ۴ پروتئینی	۸۰-۹۵ کیلودالتونی	۳/۵-۴/۵
۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۵/۸
۱-۲ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۵-۳/۷

جدول ۳: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در واکنش با سرم بیماران مبتلا به سرطان معده

گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۳/۵-۴
۲-۳ لکه‌ی پروتئینی	۱۰۵ کیلودالتونی	۵/۵-۶
۳-۴ لکه‌ی پروتئینی	۹۰ کیلودالتون	۵/۵-۶
۱ لکه‌ی پروتئینی	۱۸ کیلودالتون	۵
۳ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۵-۳/۷

جدول ۴: محدوده‌ی وزنی و pH پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در واکنش با سرم بیماران مبتلا به التهاب معده

گروه‌ها یا لکه‌های پروتئینی	محدوده‌ی وزنی	محدوده‌ی pH
گروه ۵-۶ پروتئینی	۱۰۰ کیلودالتون	۴/۵ تا ۵/۵
گروه پروتئین ۶ تایی	۹۶ کیلودالتون	۳/۵-۴
گروه پروتئین ۳ تایی	۱۰۲ کیلودالتونی	۵/۵-۶
۲-۳ لکه‌ی پروتئینی	۷۰-۸۵ کیلودالتون	۳/۵-۳/۷
۱-۲ لکه‌ی پروتئینی	۱۰ کیلودالتون	۳/۵
۱-۲ لکه‌ی پروتئینی	۱۴ کیلودالتون	۷-۸

بحث

الکتروفورز دو بُعدی و ایمونوبلاتینگ به طور وسیع در شناخت نامزدهای آنتی‌ژنی به اهداف تشخیص طبی و تهیه واکسن در بیماری‌های عفونی از جمله هلیکوباکتر پیلوری به کار می‌رود (۱۰-۶). در این مطالعه سعی شد که در شناخت ایمونوژن‌های القاکننده‌ی ایمنی هومورال در سه گروه

از بیماران دارای التهاب، زخم و سرطان معده، به هدف یافتن ایمونوژن‌های مشترک یا متفاوت جهت اهداف تشخیص طبی و شاخص بیماری، از روش الکتروفورز دو بُعدی و وسترن‌بلات استفاده شود. الگوی پروتئین‌های هلیکوباکتر پیلوری در ایزوالکتریک فوکوسینگ شامل بخش عمده‌ای از پروتئین‌ها در محدوده‌ی pH اسیدی ($pH < 7$) و

درصد کمتری در pH بیشتر از ۷ است. پروتئین های هلیکوباکتر پیلوری که در محدوده pH معادل ۳/۵ تا ۶/۵ قرار دارند، بیشترین پروتئین های این باکتری را شامل می شوند. به علاوه، در الگوی الکتروفورز دو بُعدی نیز روشن شد که اغلب پروتئین های هلیکوباکتر پیلوری دامنه ی وزنی ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتونی دارند. چنین الگوی پروتئینی برای هلیکوباکتر پیلوری در مطالعات دیگران نیز گزارش شده است. چو و همکاران (۹) مک آت و همکاران (۶) به ترتیب در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۲ در مطالعات خود بر روی الگوی دو بُعدی پروتئین های هلیکوباکتر پیلوری بیان کردند که اغلب پروتئین های این باکتری در pH ایزوالکتریک ۳/۵ تا ۸ قرار دارند. تعداد نقاط پروتئینی تفکیک شده در الگوی الکتروفورز دو بُعدی در این مطالعه ظاهراً بیش از نتایج مطالعه چو و همکاران بر روی پروتئین های هلیکوباکتر پیلوری است (۹). شاید یکی از دلایل این تفاوت در روش لیز کردن باکتری و استخراج پروتئین های پیکره ی آن باشد. در میان پروتئین های تفکیک شده با الکتروفورز دو بُعدی، حضور چند گروه پروتئینی که اجزای آن ها اوزان مشابه و نقاط ایزوالکتریک متفاوتی دارند، قابل توجه بوده و با مطالعات محققین دیگر (۶، ۱۰) از جمله مطالعه ای که توسط مینی و همکاران با الکتروفورز دو بُعدی و اسپکتروسکوپی جرمی در سال ۲۰۰۶ بر روی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مختلف گوارشی انجام شد، قابل مقایسه است (۱۰).

در این مطالعه واکنش پروتئین های تفکیک شده با کمک الکتروفورز دو بُعدی پس از انتقال به غشای بلات، با ایمنوگلوبولین خالص شده از سرم بیماران مختلف بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که گروه ۵ تا ۶ پروتئینی با وزن حدود ۱۰۰ کیلودالتون و pI متفاوت از ۴/۵ تا ۵/۵، گروه پروتئین ۶ تایی با وزن حدود ۹۶ کیلودالتون با $pI= ۳/۵-۴$ ، پروتئین های ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون با سرم هر سه گروه از بیماران واکنش داده اند. لذا این ایمونوزن ها را می توان به

عنوان نامزد تشخیص طبی مطرح نمود و مورد مطالعه بیشتر قرار داد. در مقابل، پروتئین های ۱۰۲ و ۹۰ کیلودالتونی با سرم بیماران زخم معده واکنش محسوسی نداشته اند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی نیز به ترتیب، فقط با سرم بیماران سرطان معده و التهاب معده واکنش داده اند. بر این اساس، به نظر می رسد که این دو نوع پروتئین نامزدهای مناسبی برای تشخیص و تمایز این دو دسته بیمار هستند، اگرچه احتمال واکنش متقاطع این آنتی ژن ها با سایر آنتی ژن های میکروبی غیر محتمل نیست. به هر حال اثبات چنین فرضیه ای نیازمند مطالعات دقیق تر و با استفاده از نمونه های بیشتر است.

در الگوی ایمونوبلاتینگ پروتئین های پیکره ی باکتری به نظر می رسد که سرم بیماران مبتلا به زخم معده و سرطان نسبت به سرم بیماران مبتلا به التهاب معده شباهت بیشتری به یکدیگر دارند و علیه پروتئین های مشابهی عمل می کنند. در مطالعات قبلی نیز که در این زمینه صورت گرفته، به اثبات رسیده است که الگوی آنتی ژنی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده و سرطان به هم شبیه تر هستند و با الگوی آنتی ژنی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به التهاب معده تفاوت های بیشتری دارد. این موضوع شاید با روند بیماری زخم معده نیز بی ارتباط نباشد، زیرا احتمال ابتلا به سرطان معده در بیماران مبتلا به زخم معده درمان نشده خیلی بیشتر از بیماران مبتلا به التهاب خفیف است، به طوری که در حال حاضر از بین بردن عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران یک روش جلوگیری از سرطان محسوب می شود (۱۶).

در این مطالعه هم چنین مشخص شد که بخشی از آنتی بادی های ضد هلیکوباکتر پیلوری در هر سه گروه بیمار علیه بخش لیپوپلی ساکاریدی (LPS) دیواره ی سلولی است. الگوی LPS در ایمونوبلاتینگ شامل یک منطقه با دامنه ی وزنی بیش از ۳۰ کیلودالتون در بخش آن دی با

هلیکوباکتریلوری و مشکلات الکتروفورز دو بُعدی و سترن بلات به دلیل وقت گیر بودن و هزینه‌ی بالا، امکان انجام این مطالعه به طور وسیع و بر روی نمونه‌های زیاد امکان پذیر نبود. به هر حال برای تأیید موضوعاتی که در بالا به آن‌ها اشاره شد، لازم است آزمون‌های کمی تر و با تعداد نمونه‌های بیشتر بررسی شود.

نتیجه گیری

پروتئین‌های با اوزان ۱۰۰، ۹۶، ۱۰ و ۱۸ کیلودالتون که با سرم هر سه گروه از بیماران واکنش دادند، می‌توانند به عنوان نامزد تشخیص طبی مطرح و مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. پروتئین ۳۰ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران سرطان معده و پروتئین ۱۸ کیلودالتونی که فقط با سرم بیماران مبتلا به التهاب واکنش دادند، می‌توانند به عنوان نامزد تشخیص و تمایز این دو دسته از بیماران مدنظر قرار گیرند. به علاوه نتایج نشان داد که آنتی سرم بیماران زخم و سرطان معده الگوی آنتی ژنی نسبتاً مشابهی را در مقایسه با بیماران التهاب معده شناسایی می‌کند که به نظر می‌رسد در شناخت آنتی ژن‌های مسؤول بیماری‌زایی و یا تعیین سویه‌ی باکتری مفید است.

تقدیر و تشکر

به این وسیله از بیماران به خاطر همکاری در اجازه برای تهیه‌ی بیوپسی، همکاران بخش داخلی بیمارستان امام خمینی (ره) و همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی به خاطر همکاری در مراحل مختلف اجرای این مطالعه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Nilsson IM. Separation and survey of proteins of *Helicobacter pylori*. *J Chromatogr B*. 2002; 773: 63-79.

$pH=3/5-4/5$ و مشابه اثر انگشت است. *LPS* از فراوان‌ترین آنتی ژن‌های غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی و از قوی‌ترین عوامل تحریک‌کننده‌ی سیستم ایمنی میزبان محسوب می‌شود (۱۷). *LPS* به تنهایی به عنوان یک آنتی ژن غیروابسته به تیموس محسوب شده، غالباً تولید آنتی‌بادی از کلاس *IgM* را القا می‌کند. از آن جایی که این آنتی ژن با انواعی از پروتئین‌ها در غشای خارجی هلیکوباکتر پیلوری اتصال محکمی دارد، می‌تواند تولید آنتی‌بادی از سایر کلاس‌ها را نیز القا نماید. به رغم وجود آنتی‌بادی ضد *LPS* در سرم، این آنتی ژن ظاهراً نامزد مناسبی برای تشخیص طبی یا شاخص بیماری نیست. شباهت آنتی ژنی *LPS* هلیکوباکتر پیلوری با *LPS* انواعی از باکتری‌های گرم منفی از دلایل عمده این موضوع است (۱۷). با مطالعه‌ی بیشتر بر روی پروتئین‌هایی که در ایمونوبلاتینگ با آنتی‌بادی بیماران مختلف واکنش داده‌اند، می‌توان امکان استفاده از آن‌ها را به عنوان شاخص بیماری یا تشخیص هلیکوباکتر پیلوری به روش‌های کمی و حساس مانند الایزا روشن نمود. برای این کار لازم است ابتدا این آنتی ژن‌ها خالص و سپس به طور کامل تعیین خصوصیت شوند. به رغم نتایج قابل توجه مطالعه‌ی حاضر در بررسی ایمونوژن‌های هلیکوباکتر پیلوری القاکننده‌ی پاسخ ایمنی همورال در بیماران مختلف و تعیین خصوصیات وزنی و نقطه‌ی ایزوالکتریک این آنتی ژن‌ها، به دلیل عدم وجود تکنیک اسپکتروسکوپی جرمی در ایران شناسایی دقیق این آنتی ژن‌ها فعلاً برای ما میسر نشده است. به علاوه، با توجه به مشکلات جمع‌آوری نمونه به ویژه از بیماران مبتلا به سرطان معده، جداسازی و کشت

2- Hass G, Karaail G, Ebermayer K, et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection relation to gastric diseases. *Proteomics*. 2002; 2(3): 313-24.

- 3- Bumann D, Holland P, Siejak F, et al. A comparison of murine and human immunoproteomes of *Helicobacter pylori* validates the preclinical murine infection model for antigen screening. *Infect Immun*. 2002; 70(11): 6494-98.
- 4- Calam J. *Helicobacter pylori* (Review). *Eur J Clin*. 1994; 24: 501-10.
- 5- Lock RP. Proteom analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2002; 7(3): 175-82.
- 6- McAtee CP, Lim MY, Fung K, et al. Characterization of *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J Chromatogr Biomed Sci Appl*. 1998; 714: 325-33.
- 7- Hook-Nikanne J, Prez-perez GI, Blaster MJ. Antigenic characterization of *Helicobacter pylori* strains from different parts of the world. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997; 4: 592-7.
- 8- Bolin I, Lonroth H, Svennerholm AM. Identification of *Helicobacter pylori* by immunological dot blot method based on reaction of a species-specific monoclonal antibody with a surface-exposed protein. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 381-384.
- 9- Cho MJ, Jeon BS, Park JW, et al. Identifying the major proteome components of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Electrophoresis*. 2002; 23 (7-8): 1161-73.
- 10- Mini R, Bernardini G, Salzano AM, et al. Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006; 833: 63-79.
- 11- Johnsone A, Thrope R. Immunochimistry in practices. 3 ed. Blackwell Sciences Ltd, London; 1996, 217-300.
- 12- Mostafaie A. Protein gel electrophoresis: principles and practice. 2 ed. Yadavaran Pub; Tehran, Iran. 2004, 115-45.
- 13- Westermeier R. Electrophoresis in practice. 3 ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001, 239-260.
- 14- Berkelman T, Stenstedt T. 2-D Electrophoresis. principles and methods. *Amersham Pharmacia Biotech*. 1998; 1-44.
- 15- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4350-54.
- 16- International Agency for research on cancer schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994; 61, Lyon: IARC.
- 17- Yunoki N, Yokota K, Mizuno M, et al. Antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7(4): 574-7.

Determination of Helicobacter pylori Immunogenes Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Immunoblotting

Adham Fomani E, Mostafaie A, Rezaie Tavirani M, Navabi J, Parvaneh S

Corresponding Author's Address: Medical Biology Research Center, University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

E-mail: amostafaie@kums.ac.ir

Background and objective: *Helicobacter pylori* is one of the most common infectious agents that colonizes in the mucus layer of stomach. This bacterium has been identified to be the etiologic agent of chronic active gastritis, peptic ulceration and gastric cancer. The present study was aimed to identify *H. pylori* immunogenes for clinical diagnosis of the infection in the above 3 groups of patients.

Materials and Methods: *H. pylori* bacteria isolated from biopsy specimens of patients suffering from gastritis, peptic ulcer and gastric cancer were extracted in an extraction solution containing lysozyme, urea and CHAPS. Two-dimensional gel electrophoresis were performed. The resolved proteins were transferred to PVDF membrane using tank blotting and their reaction with purified IgG fraction of the patients' sera were determined by immunoblotting.

Results: The bacterial extract showed several hundreds of silver-stained spots with molecular weights (MW) ranging from 10 to 100 KDa and isoelectric points (pI) ranging from 3.5 to 9.5. This pattern contained 6-7 major proteins, some of which as protein groups consisted of several spots. The results of immunoblots revealed that several protein spots with different MW and pI, were stained with all three groups of patients' sera but some proteins were stained only with one or two groups of sera.

Conclusion: The protein spot with MW of 30 KDa reacted with sera of only two groups of patients; gastritis and gastric cancer; the protein with MW of 18 KDa reacted only with sera of gastritis patients. These proteins can be potential candidates for recognition of the type of gastric disorder. In addition, the results indicated that protein profiles of *H. pylori*, isolated from gastric cancer and peptic ulcer, are more similar to each other, comparing to that of gastritis patients.

Key words: *Helicobacter pylori*, Two-dimensional gel electrophoresis, Immunoblotting, Immunogens.