تهیه آنتی ژنهای Sm و RNP از تیموس گوساله به منظور تعیین اتوآنتی بادیهای موبوطه در بیماران خود ایمنی

دکتر طاهره موسوی * دکتر عبدالفتاح صراف نژاد * ، ناهید اسدی **

خلاصه :

در تعداد زیادی از بیماران مبتلا به خود ایمنی ، اتوآنتی بادیها بر علیه آنتی ژنها قابل استخراج هسته سلولی (ENA) وجود دارند . دو تا از مهمترین این آنتی‌ژنها عبارتند از ریبونوکلئوپروتئین (RNP) و آنتی ژن Sm .این دو آنتی ژن کمپلکسی از RNA و پروتئین هستند که از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی مانند حساسیت به PH ، دما و آنزیمهایی مثل RNase تفاوتهایی با یکدیگر دارند . در تحقیقی که به منظور تخلیص نسبی دو آنتی ژن فوق انجام گرفت ، ابتدا از تیموس گوساله و خرگوش عصاره آنتی ژنی تهیه شد (TE) . سپس رسوب پروتئینی این عصاره در غلظت بین ۳۰ تا ۶۰ درصد سولفات آمونیم جدا شد که کمپلکس Sm/RNP می‌باشد. در مرحله بعد به کمک آنزیم RNase بخش حساس به آنزیم کمپلکس یعنی RNP را خنثی کرده و آنتی‌ژن Sm را جداگانه بدست آوردیم . برای تهیه RNP نیز کمپلکس فوق را تحت تأثیر مخلوط اوره ودی تایوتریتول (DTT) قرار دادیم تا آنتی ژن Sm که دارای شاخصهای پروتئینی می‌باشد بی‌اثر شود . ویژگی این دو آنتی ژن نیز به کمک سرمهای کنترل مثبت و منفی و با تکنیک کانترایمونوالکتروفورز مورد تأئید قرار گرفت .

واژه‌های کلیدی : ایران ، سرم سازی رازی ، آنتی ژن های Sm , RNP ، تیموس گوساله

مقدمه :

سرم تعداد زیادی از بیماران مبتلا به انواع مختلف بیماریهای رماتیسمی ، بخصوص لوپوس اریتماتوز منتشر (SLE) حاوی اتوآنتی بادیهایی بر علیه ترکیبات هسته و سیتوپلاسم سلول می‌باشد . هر چند منشأ این اتو آنتی بادیها و مکانیسم تولید آنها هنوز ناشناخته است ، ولی تعیین انواع آنها در سرم بیماران یک روش تشخیصی بسیار مفید می‌باشد . از بین آنتی بادیهای مختلف ، آنتی بادیهای ضد Sm و RNP به دلیل ارتباط بسیار نزدیک با بیماریهای خود ایمنی مورد توجه زیادی می‌باشند . حضور آنتی بادیهای ضد RNP با بیماریهایی مثل لوپوس ، اسکلرودرمی پیشرفته ، آرتریت روماتوئید ، لوپوس دیسکوئید و بیماری مختلط بافت پیوندی (MCTD) ، همراه است . هر چند این آنتی بادیها فقط مربوط به یک بیماری به خصوص نمی‌باشند ، ولی تیترهای بالای آنها با برخی از علائم بیماری مثل آلوئولیت فیبروز دهنده ، پدیده رینود ، میوزیت ، و پریکاردیت همراه است . آنتی بادیهای ضد Sm نیز برای بیماری لوپوس ویژه و اختصاصی می‌باشند . علاوه بر این آنتی بادیهای فوق بعنوان مواردی برای شناسایی و مطالعه ساختمانهای سلولی و

* ایمونولوژیست مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی .

** کارشناس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی .

عملکرد آنها ، در شناخت بهتر اتیولوژی و پاتوژنز بیماریهای خود ایمنی استفاده می‌شوند . در واقع سرم این بیمارن ،بخصوص افراد مبتلا به SLE بعنوان پروب در مطالعه انواع آنتی ژنهای هسته به خصوص small nuclear RNP (Sn-RNP) کاربرد دارند . دو تا از شایعترین آنتی ژنهایی که در این بیماران برعلیه آنها اتوآنی بادی ساخته می‌شود عبارتند از ریبونوکلئوپروتئین (RNP) و Sm این دو آنتی ژن کمپلکس RNA و پروتئین هستند که از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی مانند حساسیت به دما ، PH ، و آنزیمهایی مثل RNAse ، با یکدیگر متفاوتند . هر چند محققین بسیاری در سراسر دنیا برای تخلیص و شناسایی کامل این دو آنتی ژن تلاش می‌کنند ولی هنوز در ماهیت پروتئینی آنها بحث وجود دارد (۳و۲و۱). در واقع سلولهای یوکاریوتیک حاوی مقدار زیادی از RNA هسته‌ای هستند که در ساختمان ریبونوکلئوپروتئین آنها بکار رفته است .دسته‌ای از این ریبونوکلئوپروتئینها نقش مهمی در بیان ژنها و همین طور splicing مولکول RNA دارند (۴).این آنتی ژن بصورت باند شده به آنتی ژن Sm در کمپلکس Sm/RNP وجود دارد (۵و۴). آنتی بادیهای ضد Sm سه پلی پپتید هسته‌ای با وزن مولکولی ۱۶،۲۹،۲۸ کیلو دالتون را شناسایی می‌کنند . این پلی‌پپتیدها به RNA های U_1-U_6 وابسته‌اند (۶). آنتی‌ژن Sm احتمالاً نقش مهمی در عملکرد سلولی دارد و از انجاکه به آنزیم RNAse مقاوم است بنظر می‌رسد که RNA در ساختمان آن نقش مهمی از نظر آنتی ژنیسیته نداشته باشد . برای تهیه آنتی ژنهای محلول هسته سلولی ، تعدادی از بافتهای حیوانی و همین طور اعضای انسان پیشنهاد شده است که مناسبترین آنها تیموس گوساله می‌باشد (۷و۸). در این مقاله روش استخراج کمپلکس Sm/RNP از تیموس گوساله توضیح داده شده است . به منظور تفکیک آنتی‌ژنهای Sm و RNP نیز روشهای هضم آنزیماتیک استفاده شده و کاربرد آنها در بررسی آنتی بادیهای مربوطه با روش کانترایمونو الکتروفورز توضیح داده شده است .

مواد و روشها :

سرمها : در این تحقیق سرمهای بیماران مبتلا به بیماریهای خود ایمنی و نمونه های مثبت آنتی نوکلئار آنتی‌بادی از مراجعین به بیمارستان دکتر شریعتی تهران ، نمونه های کنترل مثبت آنتی Sm از آزمایشگاه چیدز تهران ، سرمهای کنترل سالم از اهداء کنندگان خون به مرکز انتقال خون کرج بطور تصادفی انتخاب شدند . تشخیص بیماریهای خود ایمنی از جمله لوپوس در این بیماران توسط پزشکان متخصص روماتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی تأیید شده است .

جدا کردن آنتی‌ژنها عصاره تیموس (TE) ، ریبونوکلئوپروتین (RNP) و Sm :

این آنتی ژنها مطابق با روشهای ذکر شده توسط Russell (۹) و Nuria (۶) با مقداری تغییر تهیه شده‌اند که خلاصه آن بشرح زیر می‌باشد.

تیموس یک گوساله سالم پس از ذبح ، خارج و در ظرف محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل می‌شود. پس از جداکردن بافتهای چربی و پیوندی به قطعات کوچک ($۲mm^3$) تقسیم و با مقدار زیادی آب مقطر خنک شستشو داده می‌شود . حدود ۱۰۰ گرم از این بافت تمیز شده در ظرف محتوی بافر PBS/PMSF خنک (۸۷٪ گرم PMSF + vml ایزوپروپیل الکل در یک لیتر بافر PBS 0.1 M با PH=7.2) مخلوط و با دستگاه هموژنایزر بمدت ده دقیقه هموژنیزه میشود . در این مرحله سلولهای بافت جدا شده و بصورت مخلوط همگنی در می‌آیند . سپس مخلوط فوق توسط سونیکتور مجموعاً به مدت ۵ دقیقه ، سه بار با فواصل زمانی ۳-۲ دقیقه خورد میشود تا سلولهای موجود شکسته شده و هسته آنها آزاد شود . مخلوط فوق به

مدت سی دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفوژ میشود. پس از این مرحله ذرات چربی روی مایع بدقت جدا شده و مایع رویی که همان عصاره آنتی ژنهای تیموس (CTE) می‌باشد جدا و به منظور انجام مراحل بعدی تخلیص و یا انجام تستهای لازم در مقادیر کم تقسیم و در حرارت ۸۰- سانتیگراد گذاشته می‌شود . سپس این عصاره آنتی‌ژنی با روش ذکر شده توسط Patrick (۱۰) به‌کمک سولفات آمونیم رسوب گیری شده و رسوب پروتئینی در غلظت ۶۰ـ۳۰٪ سولفات آمونیم جمع آوری میشود . این رسوب در آب مقطر حل شده و پس از دیالیز بر علیه بافر PBS (PH=7.2 , 0.15M) بعنوان کمپلکس آنتی‌ژنهای Sm/RNP مورد مطالعه بعدی قرا می‌گیرد (۱۱) .

به منظور تهیه آنتی ژن Sm از این کمپلکس ، قسمتی از آن با آنزیم RNase (شرکت سیگما) (50mg/ml) نیم‌ساعت در ۳۷) تیمار میشود تا بخش حساس به آنزیم آن یعنی RNP بی‌اثر شود .

برای بدست آوردن آنتی‌ژن RNP نیز باقیمانده محلول Sm/RNP با اوره (8M) و دی تایوتریتول (DTT 0.1 M) تیمار می‌شود تا آنتی‌ژن Sm بی‌اثر شده و تنها بخش RNP باقی بماند.

SDS ـ پلی آکریل آمیدژل الکتروفورز : این روش با الهام از laemmli (۳) بر روی صفحه‌ای به ابعاد ۱/۵ میلی‌متر × ۳۰ سانتیمتر × ۲۰ سانتیمتر توسط ژل ۱۵٪ پلی آکریل آمید انجام میشود . نمونه‌ها بمدت ۵ ـ ۳ دقیقه در بافر تریس (PH= 6.8 حاوی SDS ۲٪ ، مرکاپتواتانل ۵٪) جوشانده میشود. الکتروفورزبه مدت ۱۸ ساعت در حرارت آزمایشگاه با شدت جریان ۵۰ میلی آمپر انجام شده و در محلول حاوی ۵۰٪ اتانل ، ۱۰٪ اسیداستیک و ۲۵٪ کوماسی بلور رنگ‌آمیزی میشود .

روش کانترایمونوالکتروفورز : این روش به شرح زیر انجام میشود . مقدار ۱۰ میلی لیتر آگارز ۶٪ در بافر باربی تال (PH=806 ,0.25M) تهیه شده و پس از ذوب توسط حرارت ، ژل حاصل روی اسلاید ۷۵×۱۰۰ میلی متر ریخته میشود . پس از بسته شدن ژل ، روی آن دو ردیف حفره به قطر ۴ میلی متر و به فاصله ۳ میلی متر تهیه می‌شود بطوریکه فاصله هر ردیف ۱۱ میلی متر باشد در حفره مربوط به آنتی سرم مقدار ۱۴ میکرولیتر سرم غیر فعال شده با حرارت ریخته شده و نیم ساعت در حرارت آزمایشگاه و محیط مرطوب قرار داده میشود تا سرم در ژل منتشر شود . سپس حفره‌های ردیف مقابل آنها از عصاره آنتی ژن پر میشود . اسلاید بمدت ۴۵ دقیقه با شدت جریان ۱۰ میلی آمپر ، الکتروفورز شده و سپس به مدت یک شب در محیط مرطوب قرار میگیرد . خطوط رسوبی ایجاد شده با چشم قابل رویت می‌باشند در صورت لزوم میتوان ژل را با کوماسی بلو نیز رنگ آمیزی کرد .

نتایج :

انتخاب حیوان و روش مناسب برای تهیه عصاره از بافت تیموس (TE): به منظور تهیه عصاره آنتی ژنی از تیموس ، با توجه به گزارشهای قبلی (۲۰) دو نوع حیوان خرگوش و گوساله انتخاب شد . تیموس حیوان سالم پس از ذبح جدا شده و در ظرف محتوی یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و مراحل عصاره گیری انجام شد . تهیه پودر استونه به روش ذکر شده قبلی (۱۵) می‌باشد مقایسه عصاره‌های بدست آمده از تیموس این دو حیوان و نیز استفاده از بافت تازه در مقایسه با شکل پودر شده آن در جدول شماره یک آورده شده است . بر اساس این نتایج ، بافت تازه تیموس مناسب تشخیص داده شد و برای مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گرفت .

تهیه کمپلکس Sm/RNP از عصاره تیموس و تجزیه و تحلیل آن : پروتئینهای موجود در عصاره تیموس گوساله (CTE) به کمک سولفات آمونیم اشباع در غلظت ۳۰٪ رسوب داده شده و پس از جدا کردن

جدول شماره یک : نتایج حاصل از تهیه عصاره تیموس از خرگوش (RTE) و گوساله (CTE) به دو روش تازه و خشک کردن با استن بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به خود ایمنی

نوع آنتی ژن تهیه شده از ۱۰۰ گرم تیموس	پودراستونه RTE	بافت تازه RTE	پودر استونه CTE	بافت تازه CTE
غلظت پروتئین mg/ml	۱۰	۱۸	۱۵	۲۰
پایداری در دمای ۸۰-	۶ ماه	۵ ماه	۶ ماه	۵ ماه
درصد موارد مثبت با سرم بیماران خود ایمنی (روش ژل دیفوژن دو طرفه)	۳۰	۳۲/۵	۴۹	۵۲/۵

جدول شماره ۲ : نتایج حاصل از بررسی CTE و رسوب ۶۰-۳۰٪ این عصاره (Sm-RNP) بر روی بیماران خود ایمنی به روش کانترایمونوالکتروفورز.

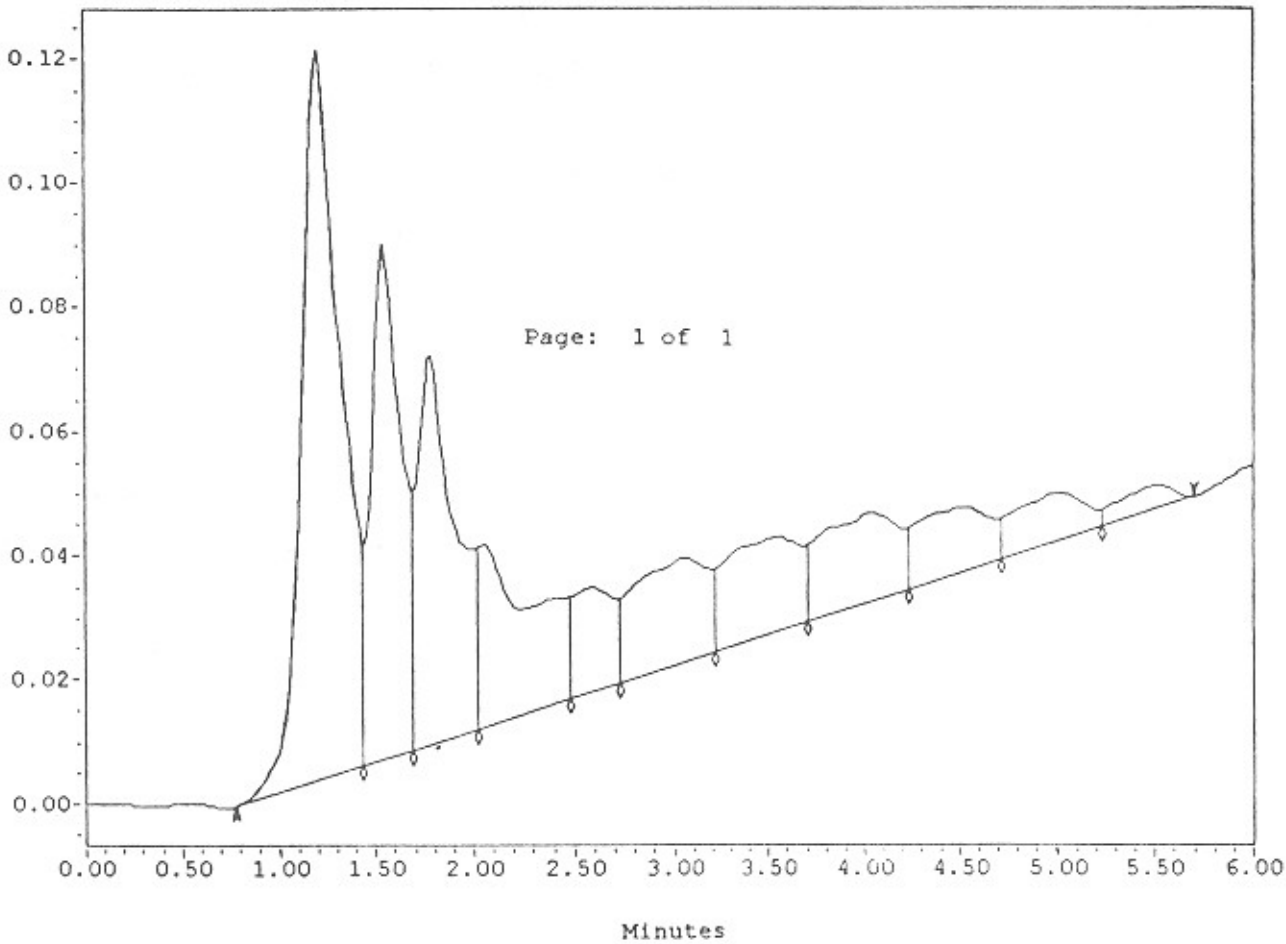
نوع سرم آنتی ژن	بیماران خود ایمنی (۱) n=۲۰	بیماران ANA^+ (۲) n=۱۲	بیماران مبتلا به لوپوس (۳) n= ۱۲ ANA^+ و	بیماران مبتلا به لوپوس (۴) Sm^+
CTE	مثبت = ۱۵ منفی = ۵	مثبت = ۱۰ منفی = ۲	مثبت = ۸ منفی = ۴	مثبت = ۲ منفی = ۰
رسوب ۶۰-۳۰٪ CTE	مثبت = ۴ منفی = ۱۶	مثبت = ۴ منفی = ۸	مثبت = ۷ منفی = ۵	مثبت = ۲ منفی = ۰

(۱) انواع مختلف بیماریهای خود ایمنی (۲) آنتی نوکلئار آنتی بادی به روش فلورسانس (۳) بیماران تشخیص داده شده لوپوس با تست ANA مثبت (۴) بیماران تشخیص داده لوپوس با تست Sm^+ به روش الایزا.

جدول شماره ۳ : تاثیر تیمارهای (Treatment)مختلف برروی کمپلکس Sm/RNP و نتایج آزمون سرمی بیماران مبتلا به‌لوپوس ANA^+ به روش کانترایمونوالکتروفورز.

تعداد خطوط رسوبی شماره بیمار	با Sm/RNP	آنتی‌ژن پس از تیمار با RNase	آنتی‌ژن پس از تیمار بااوره و DTT	آنتی‌ژن پس از تیمار با DNase	آنتی پس از تیمار باپروتیناز K	تست آنتی-Sm به روش الایزا
۱	۲	۱	۱	۲	۲	+
۲	۱	۱	۰	۱	۱	+
۳	۱	۰	۱	۱	۱	-
۴	۱	۱	۰	۱	۱	+

شکل ۱ : طیف HPLC کمپلکس Sm/RNP



رسوب پروتئینی ، بقیه عصاره با افزودن سولفات آمونیم تا غلظت ۶۰٪ رسوب گیری می‌شد . پروتئینهای موجود در غلظت ۶۰ ـ ۳۰ درد سولفات آمونیم جدا و پس از حل شدن در آب مقطر بر علیه بافر PBS دیالیز شد .از محلول پروتئینی فوق برای بررسی اتوآنتی‌بادیهای ضد آنتی‌ژنهای محلول هسته ، در سرم تعدادی از بیماران مبتلا به بیماریهای خود ایمنی (لوپوس ـ آرتریت روماتوئید ـ اسکلرو درمی ـ درماتومیوزیت ...) به روش کانترایمونوالکتروفروز استفاده شد .

نتایج حاصل از این بررسی در مقایسه با نتایج حاصل از تست CTE در جدول شماره ۲ خلاصه شده است . سرمهای فوق با پروتئنهای رسوب داده شده در غلظت‌های کمتر از ۳۰٪ و بالای ۶۰٪ سولفات آمونیم هیچگونه واکنش مثبتی نداشته‌اند.

تیمار کمپلکس Sm/RNP با اوره ودی تایوتریتول (DTT) و آنزیمهای DNase، RNase ، و پروتیناز K : به منظور بررسی بیشتر رسوب پروتئینی ۶۰ـ۳۰٪ ، قسمتی از این محلول ، تحت تأثیر اوره و DTT قرار گرفت تا بخش پروتئین آن دناتوره شود . سپس طیف HPLC این نمونه با تزریق ۳۵ mg پروتئین و با استفاده از گرادیانت ۱۰۰ ـ ۵۰ درصد حلال آب و متانل در دستگاه Waters و ستون Revers phase تهیه شد در این طیف بازده پیک پروتینی دیده میشود که بیشترین مقدار آن در پیکهای اول تا سوم می‌باشد.

علاوه بر این مقداری از کمپلکس مذکور را بطور

جداگانه تحت تاثیر آنزیمهای DNase (۱۰ mg/ml) به مدت دو ساعت در حرارت ۳۷ درجه) ، RNase (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت یکساعت در حرارت ۳۷ درجه) و پروتیناز K (۲۰ میکروگرم در میلی لیتر به مدت سه ساعت در حرارت ۵۰ درجه) قرار داده و حاصل آنها با سرم چهار بیمار مبتلا به لوپوس ارتیماتوز که دارای تست ANA مثبت بوده‌اند به روش کانترایمونوالکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت . این نتایج در جدول شماره ۳ بطور خلاصه نشان داده شده است .

در تجربه دیگری ، از یک نمونه از کمپلکس Sm/RNP و نوع تیمار شده آن با اوره و DTT در کنار ماکرهای پروتئینی ، الکتروفورز SDS تهیه شد که مقایسه نتایج این الکتروفورز نشان دهنده از بین رفتن باندهای کمتر از وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون در نمونه تیمار شده می‌باشد .

بحث :

مطالعه حاضر حاکی از این است که استفاده از تیموس تازه گوساله برای استخراج آنتی ژنهای RNP,Sm و با روشهای معرفی شده در مقاله ، از شکل پودر شده آن مناسب‌تر است . علاوه براین توجه به مدت زمان پایداری عصاره آنتی‌ژنی و غلظت پروتئینهای آن ، تیموس گوساله از خرگوش بهتر می‌باشد (۹) .

CTE مجموعه‌ای از آنتی ژنهای قابل استخراج سلول است که با سرم تعداد زیادی از بیماران مبتلا به بیمارهای خود ایمنی واکنش نشان میدهد . این آنتی ژنها علاوه بر هسته ، در عصاره تام سلولی نیز وجود دارند و برای تهیه آنها نیازی به جدا کردن هسته سلولهای بافت نیست . برای تهیه آنتی‌ژنهای RNP,Sm از این عصاره ، رسوب‌گیری در غلظت ۶۰-۳۰٪ سولفات آمونیم بهترین نتیجه را داشته و انجام آزمون بر روی سرم بیماران خود ایمنی حاکی از این است که غلظت و خلوص کمپلکس Sm/RNP در این بخش از CTE در بالاترین حد است . با توجه به گزارشهای محققین دیگر ، جدا کردن کامل پپتیدهای آنتی‌ژنی Sm و RNP از این کمپلکس ، به کمک ستونهای کروماتوگرافی معمولی و روشهای رسوب گیری امکان پذیر نبوده و موثرترین راه، استفاده از مونوکلونال آنتی بادیهای مربوطه به روش افینیتی کروماتوگرافی است . چون هدف ما در این مطالعه دستیابی به یک روش آسان و ارزان در تخلیص نسبی این دو آنتی ژن بوده است ، لذا از روش هضم آنزیماتیک استفاده کردیم . بی‌اثر بودن آنزیمهای DNase و پروتئیناز K حاکی از این است که شاخص‌های آنتی ژنی با ساختمان DNA و پروتئینهای بزرگ در این کمپلکس وجود ندارد (۱۶) . با استفاده از آنزیم RNase بخش RNP و به کمک تیمار با اوره و DTT بخش Sm کمپلکس Sm/RNP بی‌اثر خواهند شد. از بین رفتن باندهای پپتیدی زیر وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون در SDS-PAGE این مجموعه ، در اثر DTT و اوره مؤید حساس بودن آنتی‌ژن Sm به این نوع تیمار است . به این ترتیب همانطور که نتایج آزمون باسرمهای بیماران مبتلا به لوپوس و سایر خود ایمنی ها نشان میدهد ؛ میتوان با آزمایش نمونه سرم مجهول با هر دو صورت کمپلکس Sm/RNP با روش CIE به ماهیت آنتی‌بادیهای موجود در سرم پی‌برد . یعنی وجود دو باند رسوبی دلیل بر وجود هر دو نوع آنتی‌بادی و از بین رفتن یکی از آنها در نمونه های تیمار شده آنتی‌ژن ، تأیید کننده قطعی آنتی بادیهای ضد Sm یا RNP می‌باشد .

کتابنامه :

1 - David G.willams,1986,Antibodies to la,jo-1,n-RNP and sm detected by muliti - Track immunolotting ,J.Immunological methods,91,65-73.

2 - Yoshihis A Nojima,1989, Identification of an acidic Ribosomal Protein Reactive

3 - James J.1932,characterization of RNP and sm-RNP,Molecular immunology ,Vol .19(6) P.765-77.

4 - David G.williams,1988 Preparative isolation of p67,A,B,B and D from nRNP/sm ,Journal of immunological Methods,113,25×35.

5 - Na Kamura , Rubin,1986,autoantibodies to nuclear antigens,second edition.16.

6 - Nuria Duran , 1984,characterization of antigenic polypetides of the RNP,Sm, from calf thymus, Molecular Immunology Vol.21 No 8,PP.731-739.

7 - Howard Dang,1983 , Molecular and antigenic nature of isolated Sm,the journal of immunology,vol 130.No6 , 2782.

8 - Claira s.Kinlaw,1983,fractionation and characterization of Human small nuclear RNP,the Journal of biological chemistry vol.285,No.11,P.7181.

9 - RussellJ.1989,Detection of antibodies to extractable nuclear antigens Using calf Thymus and rabbit thymus, Journal of Immunological Methods,116 (1989) 53-57.

with anti-sm autoantibody , The Journal of Immanology , vol,143,1915-1920,No.6

10 - Patrick J.W.1983 , Quantitation and detection of isotypes of anti - SSB antibodies,Arthritis and Rheumatism , Vol,146.

11 - Colaco J.D 1986 Detection by ELIZA of antibodies to smal RNA protein J.Trans Assoc.Am. Physicians vol.99 P.167-17.

12 - Methods for cloning and analysis of Eukaryotic genes.(1974) isolation of DNA from Tissues.

13 - Y.H.Inami,1973,Microhemagglutination tests for detection of native and ss-DNA antibodies,J.of Immunological Methods, 3, 287-300.

14 - Rose and friedman 1986 Manual of clinical Immunology.

15 - Cavallaro Y.J.1987, Laboratory Methods for The detection of nuclear antibodies.

16 - Edward L.Treadwell,1991,Extration and differentation of the Sm autoantigens from Calf thymus nuclei,J.of Immunological Methods.142,157-167.