مطالعه‌ی واکنش پروتئین A هم‌جوش با پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP-Protein A) با ایمونوگلوبولین برخی گونه‌های حیوانی

مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۱*]، داریوش غریبی[۲]، مسعود قربانپور[۱]، سارا یعقوبی[۳]، پژمان محمودی[۴]، الهام رضایی[۳]، محمد رشنو[۵] و ندا مهرآور[۶]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۲

چکیده

پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* که در دیواره‌ی سلولی این باکتری قرار دارد، متعلق به گروهی از پروتئین‌های باکتریایی با ویژگی اتصال به ملکول IgG می‌باشد. اخیراً ما با موفقیت پروتئین A را به صورت هم‌جوش با پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP-Protein A) در *E.coli* بیان نموده، سپس آن را با پراکسیداز نشان‌دار کردیم. هدف از مطالعه‌ی حاضر ارزیابی واکنش این پروتئین A نوترکیب با ایمونوگلوبولین‌های برخی گونه‌های حیوانی است. بر اساس آزمایش‌های الیزا یا ایمونودات، پروتئین A نشان‌دار به خوبی قادر به شناسایی IgG گربه و سگ بود. واکنش این پروتئین با IgG گاو و اسب ضعیف و با IgG گوسفند بسیار ضعیف بود. این پروتئین هیچ واکنشی با IgG مرغ نداشت. در این تحقیق هم‌چنین قابلیت استفاده از پروتئین A در الیزای غیرمستقیم برای جستجوی پادتن ضد *E.coli* در سرم گربه و سگ نشان داده شد. بنابراین، این پروتئین نوترکیب از نظر بیولوژیکی فعال است و می‌تواند حداقل برای برخی گونه‌های حیوانی در آزمایش‌های ایمنی‌شناسی استفاده گردد.

کلمات کلیدی: پروتئین A، *E.coli*، پراکسیداز، IgG

مقدمه

پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۴۲ کیلودالتون است که در دیواره‌ی سلولی این باکتری قرار دارد (Duggleby and Jones 1983, Langone 1987, Uhlen et al. 1984). این پروتئین متعلق به گروهی از پروتئین‌های باکتریایی با ویژگی اتصال به ملکول IgG است. ظاهراً برخی استافیلوکوک‌های دیگر مانند *استافیلوکوکوس هایکوس* نیز دارای پروتئینی مشابه با پروتئین A می‌باشند (Rosander et al. 2011). پروتئین A در واقع به عنوان یک فاکتور حدت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* محسوب می‌گردد، زیرا با استفاده از این پروتئین، باکتری قادر است ملکول‌های IgG چندین گونه‌ی حیوانی را از طریق قسمت FC به خود جذب کرده و ضمن فرار از پاسخ ایمنی، در برابر فاگوسیتوز نیز مقاومت نماید.

توانایی بالقوه و اتصال اختصاصی و انتخابی پروتئین A به بخش FC ایمنوگلوبولین G در میان نواحی CH2 و CH3 (Janeway et al. 2001) باعث شده است که این پروتئین در موارد بسیاری در آزمایش‌های کیفی و کمی

[۱*] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: masoudrs@scu.ac.ir

[۲] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[۵] دانشجوی دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۶] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز

ایمنولوژیکی مورد توجه محققین قرار گیرد. از جمله موارد کاربرد مهم پروتئین A می‌توان به استفاده از این پروتئین در تشکیل رسوب‌های ایمنی و خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال اشاره نمود. هم‌چنین پروتئین A را می‌توان به مولکول‌های گزارش‌گر نظیر رنگ‌های فلورسنت (Aoki et al. 1996)، نشان‌گرهای آنزیمی، بیوتین، ذرات کلوییدی طلا و ید رادیواکتیو متصل و از این ترکیب بدون این که تأثیری بر جایگاه اثر آنتی‌بادی داشته باشد؛ در مواردی نظیر ایمنوهیستوشیمی، وسترن بلاتینگ و الایزا استفاده نمود (Compton et al. 1989). به طور کلی موارد کاربردی پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* به ویژه در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی فراوان است. برای مثال، یاماموتو و همکاران (Yamamoto et al. 1985) نشان دادند که با استفاده از پروتئین A متصل شده به سفاروز می‌توان IgG سرمی حیواناتی مانند سگ، گربه و خوک را به سهولت و با بازده‌ی بالا با کروماتوگرافی افینیتی خالص نمود. هم‌چنین، الاین و همکاران (Tuomanen and Powell 1980) با توجه به خصوصیت جذب IgG انسان توسط پروتئین A، IgG مادری را از سرم نوزادان جدا کردند و به این نتیجه رسیدند که جذب سطحی IgG سرم جنینی با استفاده از پروتئین A *استافیلوکوکوس*، تشخیص سرولوژیکی عفونت‌های جنینی را تسهیل می‌کند. با این روش، ردیابی IgM باقی‌مانده در سرم جنین با روش‌های سرولوژیکی معمول جهت تشخیص عفونت‌های جنینی تسهیل می‌گردد.

در آزمایش‌های ردیابی آنتی‌بادی، پروتئین A با آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز یا آلکالاین فسفاتاز نشان‌دار شده و به جای آنتی‌بادی کنژوگه استفاده می‌شود. با توجه به مطالعات اولیه در دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که منجر به بیان پروتئین A هم‌جوش با پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP-Protein A) در *E.coli* و سپس خالص‌سازی و نشان‌دار کردن آن با آنزیم پراکسیداز گردید، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی فعال بودن پروتئین MBP-Protein A نشان‌دار شده با آنزیم پراکسیداز برای اتصال به ایمونوگلوبولین‌های برخی گونه‌های حیوانی می‌باشد.

مواد و روش کار

خالص‌سازی IgG از سرم‌های اسب، گاو، گربه و مرغ

خالص‌سازی IgG از سرم‌های مورد نظر با استفاده از اسید کاپریلیک و سولفات آمونیوم طبق روش Bhanushali و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام شد. بدین منظور ۱۰ میلی‌لیتر سرم با ۴۰ میلی‌لیتر بافر استات ۶۰ میلی‌مولار با pH ۴ رقیق و pH آن با استفاده از سود ۱ نرمال روی ۴/۵ تنظیم شد؛ سپس اسید کاپریلیک به نسبت ۲۵ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر از سرم رقیق شده به آرامی افزوده و این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با قدرت g×۱۰۰۰۰، مایع رویی از یک کاغذ صافی عبور داده شد و به نسبت ۱/۱۰ حجم PBS 10X (حاوی ۸۰ گرم NaCl، ۲ گرم KCl، ۱۱/۵ گرم Na_2HPO_4 و ۲۰ میلی‌لیتر EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار در هر لیتر با pH ۷/۴) به آن افزوده شد. با سود ۵ نرمال pH محلول روی ۷/۴ تنظیم شد و برای دومین مرحله رسوب دهی سولفات آمونیوم به نسبت ۰/۲۷۷ گرم بازای هر میلی‌لیتر افزوده شد. مجدداً پس از ۳۰ دقیقه نگهداری روی هم‌زن مغناطیسی ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با قدرت g×۱۰۰۰۰ انجام شد و رسوب در یک میلی‌لیتر PBS 1X محلول و به مدت یک شبانه روز در بافر PBS 1X، با حداقل دو بار تعویض بافر در طی این مدت، با استفاده از لوله دیالیز ۲۵ میلی-متری با cut off ۱۴۰۰۰ دالتون (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) دیالیز شد. IgG خالص شده جهت بررسی خلوص مورد آزمایش الکتروفورز قرار گرفت. هم‌چنین برای سنجش مقدار IgG خالص شده از روش براد فورد استفاده شد.

بررسی واکنش MBP-Protein A نشان‌دار با IgG اسب، گاو، گربه و مرغ در الیزا

در این آزمایش، رقت‌های مختلف از IgG خالص شده از نمونه‌های سرم اسب، گاو، گربه و مرغ در بافر پوشاننده الیزا تهیه شد و برای پوشاندن حفرات پلیت الیزا در مقادیر مختلف در هر حفره مورد استفاده قرارگرفتند. پس از یک شب نگهداری در یک محفظه‌ی مرطوب در یخچال، بافر پوشاننده حاوی IgG تخلیه و حفرات ۳ بار با PBST (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توئین) شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد، در تمام حفرات ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBST حاوی ۱ درصد پودر آلبومین تخم‌مرغ (Merck، آلمان) به عنوان بلوک کننده افزوده شد. مرحله‌ی بلوک به مدت ۳ ساعت و در دمای محیط انجام شد. پلیت الیزا مجدداً مانند مرحله‌ی فوق شسته شد و سپس یک رقت ثابت ۱/۵۰۰۰ از MBP-Protein A نشان‌دار در بافر PBST، در تمام حفرات افزوده شد. پس از ۴۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، حفرات تخلیه و سه بار با PBST شسته شدند. در مرحله‌ی بعد به هر یک از حفره‌ها ۵۰ میکرولیتر مخلوط سوبسترا (H_2O_2)- کروموژن (TMB) به حفره‌ها اضافه و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در مرحله‌ی آخر، ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش (اسید کلریدریک ۰/۱ مولار) افزوده شد و پلیت با استفاده از دستگاه قرائت کننده‌ی الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی واکنش MBP-Protein A نشان‌دار با IgG سرمی سگ، گوسفند، گربه و مرغ با آزمایش ایمونودات

نمونه‌های سرمی تهیه شده از گربه، سگ، گوسفند و مرغ به نسبت ۱/۱۰ در بافر PBS رقیق شدند و ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به صورت لکه‌ای روی یک قطعه غشای نیتروسلولز در کنار یکدیگر قرار داده شدند. پس از آن که قطرات مایع کاملاً جذب غشا و خشک شد، غشا به مدت ۲ ساعت در بافر PBS حاوی ۰/۲ درصد توئین ۲۰ بلوک گردید؛ سپس غشا یک بار با PBST و یک بار با PBS (هر بار به مدت ۵ دقیقه) شسته شد. پس از این مرحله غشا به مدت ۱ ساعت در بافر PBST حاوی رقت ۱/۲۰۰ از پروتئین A نشان‌دار قرار داده شد. متعاقباً غشا دو بار با PBST و یک بار با PBS شستشو داده شد. پس از شستشو، غشا در محلول ظهور قرار داده شد تا واکنش MBP-Protein A نشان‌دار شده با IgG سرمی گربه، سگ، گوسفند و مرغ ظاهر گردد. محلول ظهور از مخلوط کردن دو محلول A (۶ میلی‌گرم کروموژن کلرونفتول در ۲ میلی‌لیتر متانول سرد) و B (۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد در ۱۰ میلی‌لیتر PBS) قبل از مصرف تهیه شد (Harlow and Lane 1988).

بررسی ممانعت از اتصال پروتئین MBP-Protein A نشان‌دار به IgG گربه با استفاده از پروتئین‌های غیرنشان‌دار MBP و MBP-Protein A در الیزای رقابتی

در این آزمایش ابتدا در هر یک از حفره‌های پلیت الیزا ۱ میکروگرم IgG گربه (در ۵۰ میکرولیتر بافر پوشاننده) افزوده شد و پلیت به مدت یک شبانه روز در محفظه‌ی مرطوب در یخچال نگهداری شد. پس از تخلیه‌ی حفره‌ها و ۳ بار شستشو با PBST، حفره‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر PBST دارای ۱ درصد پودر آلبومین تخم‌مرغ (مرک- آلمان) به مدت ۳ ساعت در دمای محیط بلوک شدند. پس از تخلیه‌ی پلیت و سه بار شستشو با PBST، ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی (رقت ۱/۵ تا ۱/۱۶۰) MBP و MBP-Protein A در PBST، هر رقت در دو حفره، اضافه گردید. در ۸ حفره نیز به عنوان شاهد تنها PBST ریخته شد. پس از ۱ ساعت نگهداری در دمای محیط، ۵۰ میکرولیتر MBP-Protein A نشان‌دار، با رقت ۱/۱۰۰ در PBST، به هر حفره به جز چهار حفره از حفرات شاهد افزوده شد و پلیت به مدت ۱ ساعت دیگر

در دمای محیط نگهداری شد. پس از ۴ بار شستشو با PBST مراحل ظهور و توقف واکنش مانند روش قبل انجام و نتایج با استفاده از دستگاه قرائت کننده‌ی الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر مورد قرائت قرار گرفت.

بررسی قابلیت استفاده از MBP-Protein A نشان‌دار در الیزای غیرمستقیم جهت جستجوی آنتی‌بادی ضد *E. coli* در سرم‌های گربه، سگ و مرغ

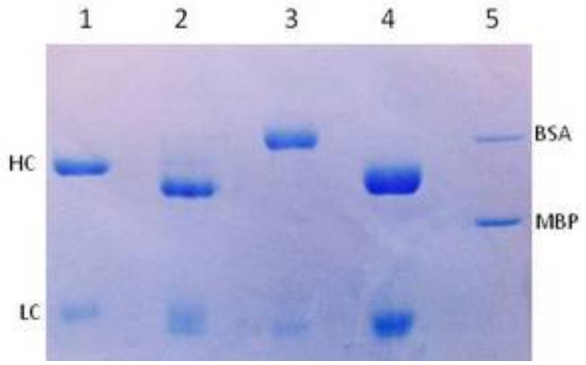
بدین منظور، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت شبانه‌ی باکتری *E. coli* سویه‌ی TG1، با قدرت g×۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. باکتری‌های رسوب داده شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر پوشاننده مخلوط شدند و مورد سونیکاسیون قرار گرفتند؛ سپس مجدداً سانتریفیوژ با قدرت g×۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد و مایع روی رسوب به عنوان آنتی-ژن‌های محلول *E. coli* در الایزا استفاده شد. حفره‌های پلیت الیزا به مدت ۱ شب در یخچال با ۵۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰ از این آنتی‌ژن در بافر پوشاننده پوشش داده شدند. سپس بافر پوشاننده، تخلیه و حفره‌ها ۳ بار با PBST شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد در تمام حفره‌ها ۳۰۰ میکرولیتر بافر PBS حاوی ۰/۲ درصد توئین ۲۰ به عنوان بلوکر ریخته شد و پلیت ۳ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. پلیت الیزا مجدداً مانند روش فوق شسته شد و سپس رقت ۱/۲۰۰ از سرم‌های مورد نظر، هر یک در ۴ حفره (دو حفره حاوی آنتی‌ژن *E. coli* و دو حفره‌ی فاقد آنتی‌ژن)، افزوده شدند. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای محیط و سپس ۳ بار شستشو با PBST ، رقت ۱/۴۰۰ پروتئین A در بافر PBST، در تمام حفرات افزوده شد. پس از ۴۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، حفرات تخلیه و سه بار با PBST شسته شدند. ظهور واکنش و قرائت نتایج مانند آزمایش الیزای قبلی انجام شد.

نتایج

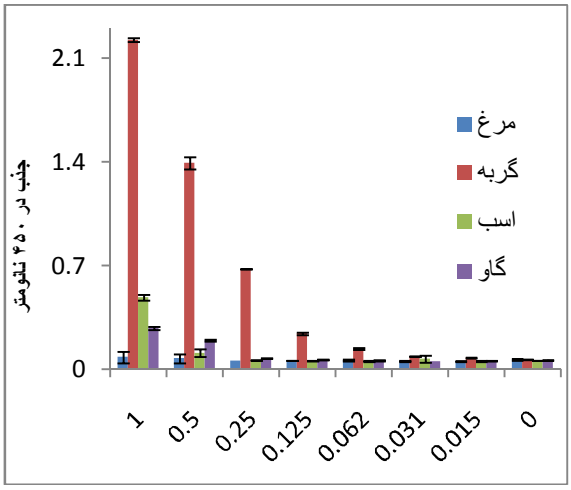
مقایسه‌ی واکنش MBP-Protein A نشان‌دار با IgG اسب، گاو، گربه و مرغ در الیزا

میزان OD حاصل از واکنش یک رقت ثابت پروتئین A با مقادیر مختلف IgG گونه‌های حیوانی مختلف (تصویر ۱) در الیزا در شکل ۲ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، پروتئین A بیش‌ترین واکنش را با IgG گربه نشان داد. IgGهای اسب و گاو تنها تا میزان ۰/۵ میکروگرم در حفره توسط پروتئین A قابل شناسایی بودند، در حالی که IgG گربه تا ۰/۰۶۲ میکروگرم قابل شناسایی بود. در این آزمایش هیچ‌گونه واکنش مشخصی با IgG مرغ مشاهده نشد.

داده‌های به دست آمده به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون آماری One-Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میزان جذب پروتئین A به ایمونوگلوبولین گربه (تا مقدار ۰/۰۶۲ میکروگرم) به شکل معنی‌دار ($P<0/05$) بیش از میزان جذب این پروتئین به ایمونوگلوبولین سایر گونه‌های حیوانی بود.



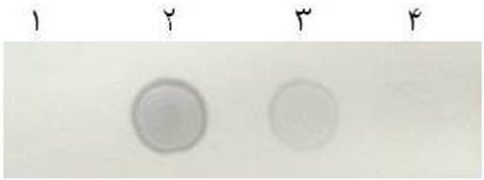
تصویر ۱: IgG خالص شده از سرم‌های گربه (۱)، اسب (۲)، مرغ (۳) و گاو (۴). ستون ۵ حاوی دو پروتئین آلبومین سرم گاو (BSA 66kDa) و پروتئین باند شونده به مالتوز (MBP 42.5 kDa) به عنوان استاندارد می‌باشد. HC و LC به ترتیب نشان‌گر زنجیرهای سنگین و سبک ایمونوگلوبولین می‌باشند.



تصویر ۲: مقایسه‌ی واکنش پروتئین A نشان‌دار با IgG اسب، گاو، گربه و مرغ در الیزا. محورهای افقی و عمودی به ترتیب نشان‌گر میزان IgG پوشش داده شده در هر حفره پلیت الیزا و میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌باشند.

واکنش پروتئین A نشان‌دار با IgG سرمی سگ و گوسفند با آزمایش ایمونودات

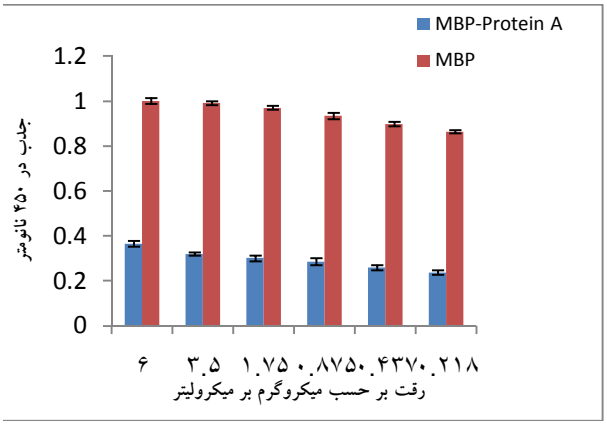
با توجه به عدم خالص‌سازی IgG از سرم‌های سگ و گوسفند، واکنش پروتئین A با IgG این گونه‌های حیوانی با استفاده از نمونه‌های سرمی این حیوانات و آزمایش ایمونودات بررسی شد، بنابراین نمونه‌های سرمی تهیه شده از این حیوانات پس از رقیق‌سازی برای لکه‌گذاری غشای نیتروسلولز استفاده شدند. در این آزمایش از سرم-های گربه و مرغ نیز به ترتیب به عنوان شاهد مثبت و شاهد منفی استفاده شد. بر اساس نتایج این آزمایش (تصویر ۳)، پروتئین IgG A سرمی سگ را نیز شناسایی نمود، اما واکنش آن در مقایسه با IgG گربه ضعیف‌تر بود. در این آزمایش واکنش بسیار ضعیفی نیز با سرم گوسفند مشاهده شد.



تصویر ۳: بررسی واکنش پروتئین MBP-Protein A نشان‌دار شده با IgG سرمی گوسفند (۴) و سگ (۳) در آزمایش ایمونودات. لکه‌های ۱ و ۲ به ترتیب حاوی سرم‌های مرغ (شاهد منفی) و گربه (شاهد مثبت) بوده‌اند.

بررسی تأثیر پروتئین‌های غیرنشان‌دار MBP و MBP-Protein A در جلوگیری از اتصال MBP-Protein A نشان‌دار به IgG گربه

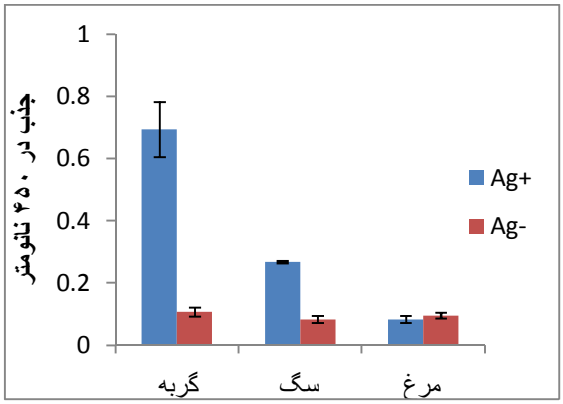
نتایج این آزمایش که در قالب یک الیزای رقابتی صورت گرفت، در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این آزمایش، به خوبی مشخص گردید که پروتئین MBP-Protein A غیرنشان‌دار در تمام رقت‌های مورد آزمایش مانع از اتصال MBP-Protein A نشان‌دار به IgG گربه می‌گردد، اما MBP فاقد چنین تأثیری بود.



تصویر ۴: نتایج الیزای رقابتی با استفاده از پروتئین‌های غیرنشان‌دار MBP و MBP-Protein A برای جلوگیری از اتصال پروتئین نشان‌دار MBP-Protein A به IgG گربه. محورهای افقی و عمودی به ترتیب نشان‌گر میزان پروتئین-های غیرنشان‌دار MBP و MBP-Protein A و میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌باشند.

استفاده از پروتئین A در الیزای غیرمستقیم برای جستجوی پادتن ضد *E. coli*

با توجه به پراکندگی وسیع *E. coli* در محیط و تماس گونه‌های حیوانی مختلف با این باکتری، در این بخش از تحقیق پس از پوشاندن حفره‌ها پلیت الیزا با آنتی‌ژن‌های محلول *E. coli* از سرم‌های گربه و سگ به عنوان آنتی‌بادی اولیه و از پروتئین A به عنوان ردیاب نشان‌دار استفاده شد. سرم‌های مورد استفاده هر یک در رقت ۱/۲۰۰ در ۴ حفره (۲ حفره دارای آنتی‌ژن *E. coli* و ۲ حفره فاقد آنتی‌ژن) افزوده شدند و سپس از رقت ۱/۴۰۰ پروتئین A به عنوان ردیاب استفاده گردید. هم‌چنین در این آزمایش از سرم مرغ به عنوان شاهد منفی استفاده شد. مقادیر OD واکنش‌ها در شکل ۵ نشان داده شده است . در این آزمایش با استفاده از پروتئین A وجود آنتی‌بادی ضد *E. coli* در سرم‌های گربه و سگ نشان داده شد.



تصویر ۵: بررسی قابلیت استفاده از پروتئین A در الیزای غیرمستقیم برای جستجوی پادتن ضد *E.coli* در سرم‌های گربه، سگ و مرغ (شاهد منفی).

بحث

یکی از مشکلات در تشخیص‌های سرولوژیک بیماری‌های عفونی در گونه‌های مختلف حیوانی، دشوار بودن تهیه‌ی آنتی‌گلوبولین‌های کونژوگه اختصاصی برای هر گونه از حیوانات می‌باشد . در مقابل، پروتئین‌های باکتریایی متصل شونده به ایمونوگلوبولین‌ها از جمله پروتئین A می‌توانند در شناسایی ایمونوگلوبولین‌های گونه‌های مختلف حیوانات که ممکن است آنتی آنتی‌بادی کونژوگه‌ای جهت شناسایی آن‌ها وجود نداشته باشد، سودمند واقع شوند. در این زمینه، در مطالعه‌ی Bhide و همکاران در سال ۲۰۰۴ امکان استفاده از الیزای طراحی شده بر اساس پروتئین A/G، جهت تشخیص آنتی‌بادی در آهو، قوچ کوهی و هم‌چنین سگ‌های شکاری بررسی و مشخص شد که این نوع الایزا، یک ابزار تشخیصی مهم و حساس در تشخیص سرولوژیکی بیماری لایم در حیوانات است و می‌تواند به طور مؤثر در بررسی‌های سرولوژیکی در پستانداران وحشی مختلف استفاده شود.

با توجه به سودمند بودن این نوع پروتئین‌ها، در مطالعات پیشین در دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق فناوری DNA نوترکیب و با استفاده از پلاسمید بیانی pMALc2x (New England biolabs, USA) به صورت هم‌جوش با MBP تولید و با آنزیم پراکسیداز نشان‌دار گردید. در ادامه‌ی این مطالعات، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی فعالیت این پروتئین برای اتصال به IgG گونه‌های مختلف حیوانات طراحی و اجرا گردید.

به طور مقایسه‌ای، چگونگی واکنش این پروتئین در یک رقت ثابت ۱/۵۰۰۰ با مقادیر متفاوت IgG گربه، گاو، اسب و مرغ از طریق آزمایش الیزا بررسی گردید. همان گونه که انتظار می‌رفت این پروتئین هیچ واکنشی با IgG مرغ نداشت، اما قادر به شناسایی IgG گاو، اسب و نیز گربه بود (Harlow and Lane 1988) . از میان ایمونوگلوبولین‌های گونه‌های حیوانی آزمایش شده، این پروتئین بیش‌ترین تمایل را برای IgG گربه نشان داد (شناسایی تا ۰/۰۶۲ میکروگرم IgG در هر حفره). واکنش مطلوب پروتئین A با IgG گربه پیش از این توسط یاماموتو و همکاران نیز نشان داده شده بود (Yamamoto et al. 1985). در این آزمایش IgGهای تهیه شده از گاو و اسب تنها در مقادیر بالا (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در حفره) قابل شناسایی بودند. به عبارت دیگر، واکنش پروتئین

MBP-Protein A با این IgGها بسیار ضعیف بود. این یافته با اطلاعات ارائه شده توسط Lane و Harlow در سال ۱۹۸۸ که واکنش پروتئین A با این IgGها را درحد متوسط (++) ذکر می‌کند کمی متفاوت است. اگر چه این تفاوت ممکن است ناشی از تأثیر MBP بر عملکرد صحیح پروتئین A باشد، اما اطلاعات جدیدتر ارائه شده در کاتالوگ برخی شرکت‌های تجاری تولید کننده‌ی پروتئین A (مانند شرکت Pierce) با نتایج این تحقیق هم-خوانی دارد.

به دلیل در اختیار نداشتن IgG خالص شده گوسفند و سگ، واکنش پروتئین A با IgG سرمی این حیوانات در آزمایش ایمونودات بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده واکنش پروتئین A با IgG گوسفند بسیار ضعیف یا تا حدی منفی بود، اما IgG سگ در مقایسه با IgG گربه تا حد مطلوبی توسط پروتئین A قابل شناسایی بود. نتایج این آزمایش‌ها با اطلاعات ارائه شده توسط شرکت Pierce که پروتئین A را بیش‌تر برای شناسایی IgGهای انسان و خوک و نیز گربه و سگ مناسب می‌داند هم‌خوانی دارد.

با توجه به تولید پروتئین A به صورت متصل به MBP جهت اطمینان از این که اتصال این پروتئین نوترکیب به IgG از طریق قسمت Protein A و نه MBP بوده است با استفاده از پروتین‌های غیرنشان‌دار MBP یا MBP-Protein A یک آزمایش الیزای رقابتی انجام گردید. علت این آزمایش این بود که در صورت اتصال MBP-Protein A نشان‌دار به IgG هدف از طریق بخش Protein A، MBP به تنهایی مانع از این اتصال نخواهد شد، اما ساختار MBP-Protein A غیرنشان‌دار دارای توانایی جلوگیری از اتصال ساختار نشان‌دار خواهد بود. با توجه به نتایج این آزمایش (جلوگیری از واکنش پروتئین MBP-Protein A نشان‌دار به IgG گربه با استفاده از پروتئین MBP-Protein A غیرنشان‌دار) به خوبی مشخص گردید که اتصال از طریق بخش پروتئین A انجام می‌شود و نه MBP و به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین A تولید شده به صورت هم‌جوش برای اتصال به IgG فعال است.

در ادامه این تحقیق به منظور بررسی قابلیت استفاده از فرآورده‌ی تهیه شده در آزمایش‌های روزمره‌ی ایمنی‌شناسی، آزمایشی دیگر انجام شد. در این آزمایش با این فرض که گونه‌های حیوانی مختلف با احتمال بالا دارای آنتی‌بادی ضد *E. coli* می‌باشند، از هر یک از گونه‌های حیوانی سگ، گربه و مرغ یک نمونه سرمی تهیه و در آزمایش الیزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن *E. coli* بررسی شدند. نتایج به دست آمده در خصوص گونه‌های حیوانی نشان داد که گربه و سگ دارای آنتی‌بادی ضد *E. coli* بودند، اما واکنش سرم مرغ با این آنتی‌ژن قابل شناسایی نبود. در پایان می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که فرآورده‌ی ارزیابی شده در این تحقیق (پروتئین A متصل به پروتئین باند شونده به مالتوز) از قابلیت کافی برای استفاده در برخی آزمایش‌های ایمنی‌شناسی برخوردار است و بالقوه می‌تواند جایگزین برخی اقلام تجاری گردد. با این حال برای افزایش هر چه بیش‌تر کارایی این فرآورده و به ویژه گسترده نمودن قابلیت شناسایی IgG گونه‌های حیوانی، باید تلاش بیش‌تری صورت گیرد. جهت تکمیل این طرح، بررسی چگونگی تأثیر محیط‌های بافری متفاوت بر واکنش پروتئین A با IgG گونه‌های حیوانی مختلف و نیز افزودن پروتئین G *استرپتوکوکوس* به پروتئین نوترکیب MBP-Protein A مدنظر قرار دارد.

منابع

Bhanushali, J.K.; Gilbert, J.M. and McDougald, L.R. (1994). Simple method to purify chicken immunoglobulin G. Poultry Science, 73: 1158-1161.

Aoki, T.; Takahashi, Y.; Koch, K.S.; Leffert, H.L. and Watabe, H. (1996). Construction of a fusion protein between protein A and green fluorescent protein and its application to Western blotting. FEBS Letters, 384: 193-197.

Bhide, M.R.; Curlik, J.; Travnicek, M. and Lazar, P. (2004). Protein A/G dependent ELISA a promising diagnostic tool in Lyme disease seroprevalence in game animals and hunting dogs. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 27: 191-199.

Compton, B.J.; Lewis, M.; Whigham, F.; Gerald, J.S. and Countryman, G.E. (1989). Analytical potential of protein A for affinity chromatography of polyclonal and monoclonal antibodies. Analytical Chemistry, 61: 1314-1317.

Duggleby, J.C. and Jones, A.S. (1983). Cloning and expression of the *Staphylococcus aureus* protein A gene in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research, 11(10): 3065-3076.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, USA, PP: 348, 148-242.

Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M. and Shlomchik, M.J. (2001). Immunobiology: the immune system in health and disease, 5th edition, New York: Garland Science, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27106/.

Langone, J.J. (1987). [^{125}I] Protein A: a tracer for general use in immunoassay. Journal of Immunological Methods, 24: 269-285.

Rosander, A.; Guss, B. and Pringle, M. (2011). An IgG-binding protein A homolog in *Staphylococcus hyicus*. Veterinary Microbiology, 149(1-2): 273-276.

Tuomanen, E.I.; Powell K.P. (1980). Staphylococcus protein A adsorption of neonatal serum to facilitate early diagnosis of congenital infection. The Journal of Pediatrics, 2: 238-243.

Uhlen, M.; Guss, B.; Nilsson, B.; Gatenbeck, S.; Philipson, L. and Lindberg, M. (1984). Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. Journal of Biological Chemistry, 259(3): 1695-1702.

Yamamoto, S.; Omura, M. and Hirata, H. (1985). Isolation of porcine, canine and feline IgG by affinity chromatography using protein A. Veterinary Immunology and Immunopathology, 9(2): 195-200.

Study on the reaction of maltose binding protein-protein A (MBP-Protein A) fusion protein with the immunoglobulin of some animal species

Seyfi Abad Shapouri, M.R.[1]; Gharibi, D.[2]; Ghorbanpoor, M.[1]; Yaghoobi, S.[3]; Mahmoodi, P.[4]; Rezai, E.[3]; Rashno, M.[5] and Mehravar, N.[6]

Received: 27.01.2014 Accepted: 23.11.2014

Abstract

Staphylococcus aureus protein A, as a cell wall protein of the bacterium, belongs to a group of bacterial proteins with binding specificity for the IgG molecule. Recently, we cloned and expressed the protein A gene of *Staphylococcus aureus* in *E.coli*, as a fusion protein with maltose binding protein (MBP-Protein A). After purification, the expressed protein was also labeled with peroxidase. The aim of this study was to evaluate the reaction of this recombinant protein A with the immunoglobulin of some animal species. Based on the results of ELISA and immunodot, the labeled protein A was able to bind cat and dog IgGs. The reactivity of the protein with cattle and horse IgGs was weak and it reacted poorly with sheep IgG. This protein did not react with chicken IgG. In this study, the ability of the expressed protein A labeled with peroxidase, for detection of *E.coli* specific antibodies in cat and dog sera was demonstrated by indirect ELISA. In conclusion, the recombinant MBP-protein A is biologically active and could be used in immunological assays at least for certain animal species.

Key words: Protein A, *E.coli*, Peroxidase, IgG

1- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Para-Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
5- DVSc Student of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
6- MSc Graduated of Microbiology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Seyfi Abad Shapouri, M.R., E-mail: masoudrs@scu.ac.ir