

# تخلیص و شناسایی برخی خصوصیات ایمونوگلوبولین سرم (*Acipenser persicus*) در تاسماهی ایرانی

محمد رضا کلباسی<sup>(۱)</sup>؛ علی مصطفایی<sup>(۲)</sup> و جعفر مجیدی<sup>(۳)</sup>

Kalbas\_m@modares.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۴۶۴۱۴-۳۵۶

۲- گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، کرمانشاه

صندوق پستی: ۶۷۱۴۵-۱۵۶۸

۳- گروه ایمونولوژی و انکلشناسی، دانشکده پزشکی تبریز، تبریز صندوق پستی: ۵۱۵۷۶-۴۳۱۶۱

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۸۰ تاریخ دریافت: دی ۱۳۸۲

## چکیده

در این مطالعه ایمونوگلوبولین سرم تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) خالص و برخی خصوصیات آن از جمله وزن زنجبیره‌های سبک و سنگین و توزیع مولکولی تعیین گردید. ایمونوگلوبولین تاسماهی ایرانی از مخلوط سرم این ماهی با استفاده از روش‌های ترسیب نمکی، کروماتوگرافی تجویض یون و ژل فیلتراسیون خالص گردید. در کروماتوگرافی تجویض یون و ژل فیلتراسیون پرتریب از ستون دی اتمینو اتیل سفارز و ستون سفارز سی ال - ۶ به استفاده شد. خلوص محصولات، وزن مولکولی زنجبیره‌های سبک و سنگین و توزیع مولکولی ایمونوگلوبولین با روش SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیراحیایی تعیین گردید. ایمونوگلوبولین خارج شده از ستون سفارز سی ال - ۶ به شامل دو بخش تک واحدی با ایمونوگلوبولین با وزن مولکولی پایین (LMW Ig) و چند واحدی یا ایمونوگلوبولین با وزن مولکولی بالا (HMW Ig) بود. این دو بخش در SDS-PAGE احیایی الگوی یکسانی داشتند و محتوای پروتئینی هر یک شامل دو باند ۲۹-۲۷ و ۷۳-۷۵ کیلودالتونی بود. در کروماتوگرافی تجویض یون، ایمونوگلوبولین تاسماهی به صورت سه بخش تقریباً مجزا خارج گردید. در این میان بخش اول منحصر اشامل ایمونوگلوبولین تک واحدی و بخش های دیگر حاوی مخلوطی از ایمونوگلوبولین های تک واحدی و چند واحدی بود. این مطالعه که نخستین گزارش منتشره در خصوص ویژگیهای ایمونوگلوبولین سرم تاسماهی ایران است، حاوی نتایج قابل توجهی در مقایسه با نتایج مطالعات انجام شده بر روی ایمونوگلوبولین سایر گونه های ماهیان است و نشان می دهد که ایمونوگلوبولین تاسماهی از نظر اشکال مولکولی، تنوع نقطه ایزو الکتریک و نوع زنجبیره سبک همگون نیست. چنین تنوع ساختمانی می تواند ناشی از وجود بیش از یک ژن برای تولید زنجبیره سبک و یا سنگین آنتی بادی و یا تغییرات پس از نسخه بداری ژن و یا ترجمه mRNA باشد.

**کلمات کلیدی:** تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus*. ایمونوگلوبولین، تخلیص، سرم

## مقدمه

در سرم ماهی عمدتاً یک کلاس ایمونوگلوبولینی دیده می‌شود (Bourmaud *et al.*, 1995 ; Reinisch & Litman, 1989). برغم مطالعات چندی که در ماهی‌ها صورت گرفته است، هنوز اطلاعات کاملاً روشنی در مورد ساختمان، انواع زنجیره‌ها و توزیع مولکولی ایمونوگلوبولین در بسیاری از گونه‌های ماهی وجود ندارد (Hordvik, 1998 ; Wilson & Warr, 1992). نتایج مطالعات انجام گرفته حاکی از وجود یک کلاس ایمونوگلوبولین شبیه IgM پستانداران در ماهی‌ها است که عمدتاً به صورت چهار واحدی و به میزان کمتر در اشکال سه، دو و تک واحدی دیده می‌شود (Press, 1998 ; Wilson & Warr, 1992). تاس‌ماهی دریایی خزر یکی از گونه‌های ماهیان خاویاری است که به دلیل عدم ارتباط دریایی خزر با سایر آبهای سطح زمین، به این دریا منحصر می‌شود و از نظر فیلوزنی و اقتصادی جایگاه ویژه‌ای دارد. این ماهی به صورت مصنوعی تکثیر گردیده و سالانه میلیونها عدد بچه تاس‌ماهی ۳ تا ۵ گرمی به دریای خزر رها سازی می‌گردد. به منظور کاهش تلفات این ماهی در هنگام پرورش اولیه، اخیراً در خصوص ایمن‌سازی این ماهیان قبل از رهاسازی به دریا مطالعاتی صورت پذیرفته است (کلیاسی، ۱۳۷۹) و در ادامه مطالعات روی این گونه ماهی، ایمونوگلوبولین‌های سرم تخلیص و بعضی از خصوصیات آن از جمله وزن مولکولی زنجیره‌های سبک و سنگین و توزیع مولکولی آنتی‌بادی تعیین گردید.

## مواد و روش کار

نمونه‌های سرم: نمونه‌های سرم مورد استفاده شامل مخلوطی از سرم تاس‌ماهیان نر و ماده سه ساله پرورشی بود که از انسستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری تأمین گردید و تا زمان انجام آزمایشات در دمای  $-2^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند.

جداسازی گلوبولین‌های سرم: سرم دو نوبت با بافر فسفات نمکی (PBS) با  $\text{pH} = 7/2$  رقیق و به هر حجم از آن، یک حجم محلول سولفات آمونیوم اشباع در PBS اضافه گردید. مخلوط مذکور به مدت  $30\text{ min}$  در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ که حاوی بخش ایمونوگلوبولینی سرم ماهی بود، برای مرحله بعد نگهداری گردید.

گروماتوگرافی تعویض یون: رسوب حاصل از مرحله قبل در بافر تریس ۵٪ مولار با  $pH = 7/7$  حل و به مدت یک شب در برابر این بافر دیالیز گردید. محلول دیالیز شده سپس به ستون 16/20 XK حاوی رزین دی اتیل آمینو اتیل سفارز (فارماسیا) که با بافر تریس به تعادل رسیده بود، وارد شد. پس از عبور مقدار کافی بافر از ستون، شبیب پیوسته یا ناپیوسته کلرید سدیم در بافر تریس بر ستون اعمال گردید.

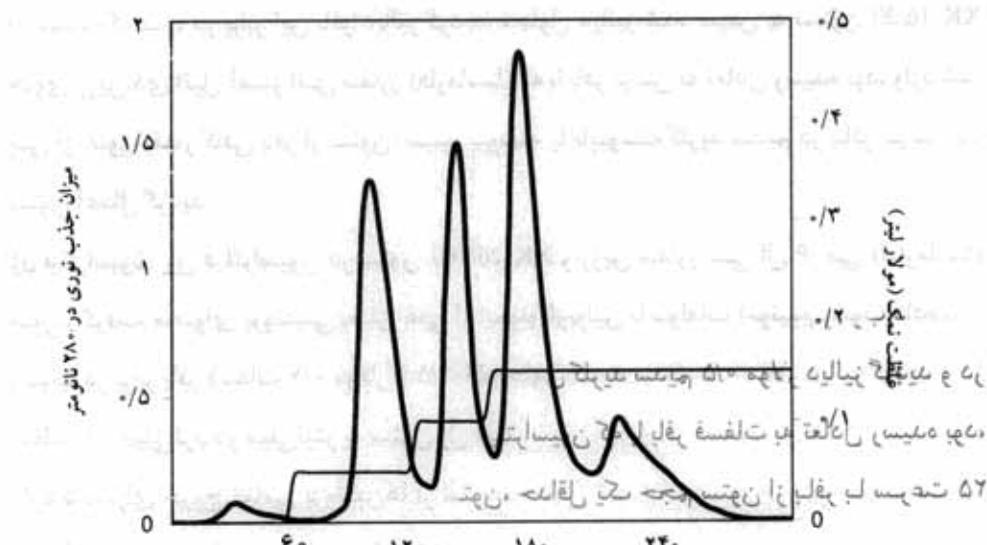
**ژل فیلتراسیون:** ژل فیلتراسیون در ستون ۲۶/۱۰۰ XK و رزین سفارز سی ال ۶-بی (فارماسیا) صورت گرفت. محتوای پروتئینی بخش غنی از ایمونوگلوبولین با سولفات آمونیوم رسوب داده شد. رسوب در برابر بافر فسفات ۱٪ مولار با pH=۷/۵ حاوی کلرید سدیم ۵٪ مولاز دیالیز گردید و در غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به ستون ژل فیلتراسیون که با بافر فسفات به تعادل رسیده بود، وارد شد. برای خروج تمامی پروتئین ها از ستون، حداقل یک حجم ستون از بافر با سرعت ۲۵ میلی لیتر در ساعت از ستون عبور داده شد.

نتایج  
متغیرهای ایجاد کننده میزان پروتئین در سه نمونه میانگین ۲۰٪، ۳۵٪ و ۵۰٪ میانگین مذکور شدند. نتایج آزمایشات ایجاد کننده میزان پروتئین در سه نمونه میانگین ۲۰٪، ۳۵٪ و ۵۰٪ میانگین مذکور شدند.

نتائج

با اعمماً، شب غلظت کلرید سدیم تا ۱۵۰ میلی مولار، بخش عمده ایمونوگلوبولین تاس ماھی

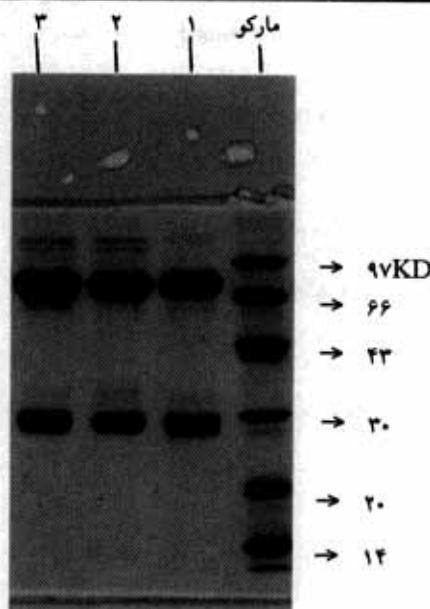
به صورت سه بخش (قله) پروتئینی نسبتاً مجزا از ستون خارج گردید (شکل ۱).



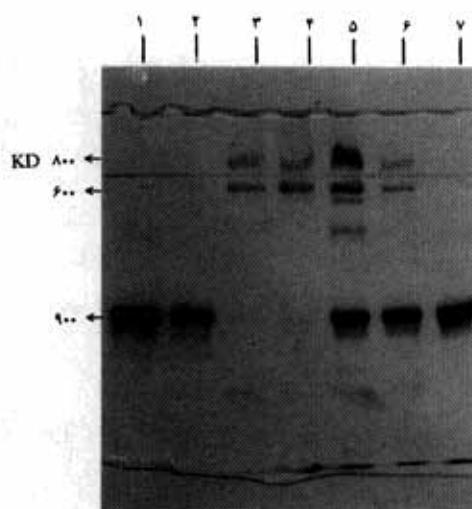
لار، با شکل ۲ اکر و ماتوگرافی تعبیه شوند (شکل ۲).  
بررسی الگوهای کثروفور و این قلمهای دو شرایط احیانی نشان داد که محتوای پروتئینی هر یک  
غمبد ناشامل دو بانده ۷۳ کلو-تار ۵۵ کلو-التونی است که بترتیب موقعیت زنجیرهای سبک  
و سنگین ایمونوگلوبولینی را نشان می‌دهند (شکل ۲). برغم تشابه کلی، موقعیت باندهای پروتئینی  
در این اسپلیت قلمه ایدر، موقعیت از لجنرهای ملیکی قلمه اول، دو باند پروتئینی با اختلاف وزنی جزیی  
مشاهده گردید (ستون ۳ شکل ۲). سنت ۶۵٪ لقتسا (لیسله، ل) ۴۵-۶۰٪ آ.

؛<sup>۳</sup> الگوی اکبر و فتوحهای احیانی قله های ابرو تپه‌ی بخارج شده از سطون یعقوبیه میون در شکل ۲  
({ستونهای هالن) ۷) آمدده استه همانگوته که طاین مشکل نشان می‌آهد، در قله اول یک باند  
پروتئینی در موقعیت وزنی حدود ۱۹۰ کیلو دالتون دیده امی شود. ({ستون ۷)، در قله دوم، سه باند  
(ستون ۶) و در قله سوم، پنج باند پروتئینی دیده می شود (ستون ۵) که عمدترين آنها در  
موقعیت وزنی حدود ۱۹۰ و ۸۰۰ کیلو دالتون قرار دارند.

رەھلەن سەلت نىيابىلە ئۇنىمىا ھىلەمەن شەخىز كاچە بىلەيمى ۵۱۰ لە ھېلىس بىلەن تىلگەدە بىش رەھلەن

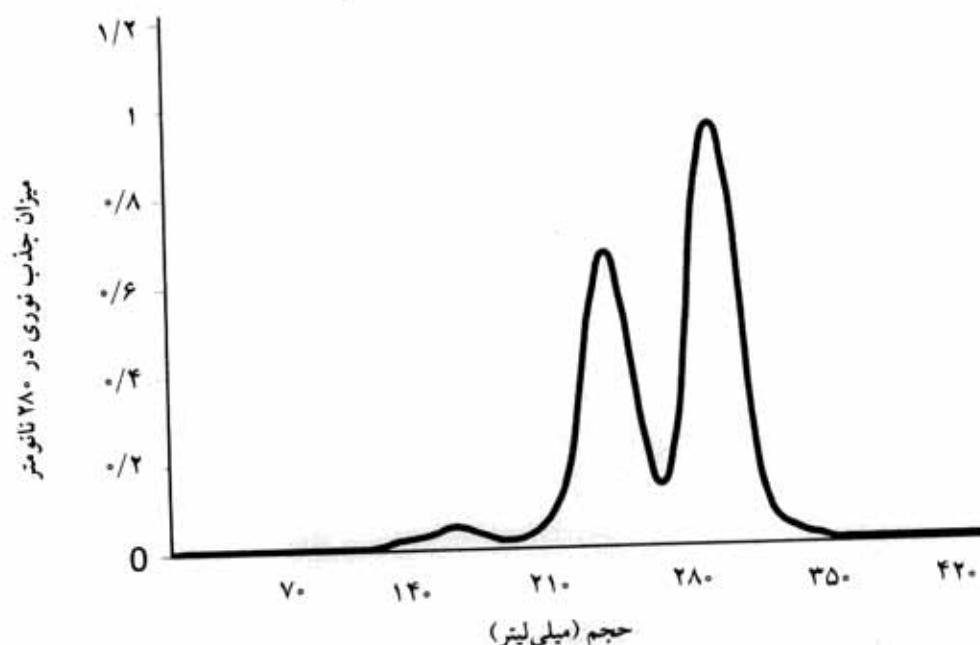


شکل ۲: SDS-PAGE احیایی ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی در ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد. ستون های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب محتوای پروتئین بخش های ۲، ۳ و ۱ جدا شده در ستون تمعیض یون را نشان می دهند. ستون M مربوط به مارکرها با اوزان ۱۴، ۲۰، ۳۰، ۶۶، ۹۷ کیلو دالتون است.

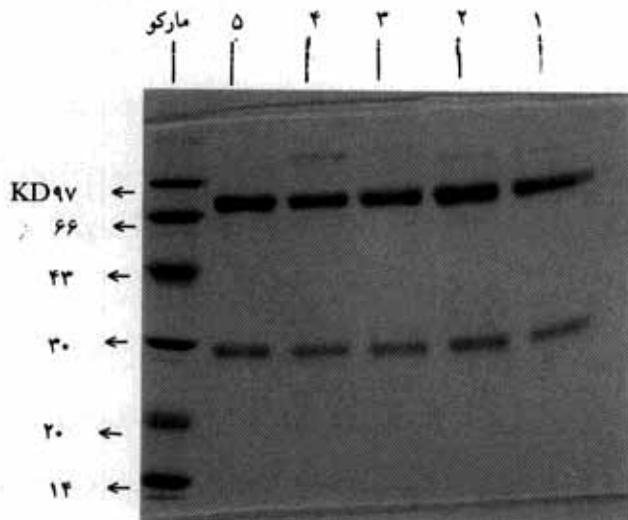


شکل ۳ SDS.PAGE غیر احیایی ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی در ژل پلی اکریل آمید ۴ درصد.

در ژل فیلتراسیون در ستون سفارز سی ال - عبی، ایمونوگلوبولین تاس ماهی به دو بخش پروتئینی تفکیک گردید (شکل ۴). این دو بخش الگوی الکتروفوروزی یکسانی در شرایط احیایی داشتند و درجه خلوص ایمونوگلوبولین بدست آمده در هر یک از آن دو بیش از ۹۵ درصد بود (شکل ۵). در الکتروفوروز احیایی (ستون های ۳ و ۴ شکل ۳) قله اول پروتئینی که کمتر از نیمی از ایمونوگلوبولین سرم تاس ماهی را تشکیل می داد شامل دو باند پروتئینی عمدتاً با وزن مولکولی تخمینی ۶۰۰ و ۸۰۰ کیلودالتون بود. قله دوم که بیش از نیمی از ایمونوگلوبولین را تشکیل می داد، تنها شامل یک باند پروتئینی در موقعیت ۱۹۰ کیلو دالتونی بود (ستون های ۱ و ۲ شکل ۳).



شکل ۴: فیلتراسیون ایمونوگلوبولین تاس ماهی ایرانی در ستون سفارز CL-6B



شکل ۵: احیای ایمونوگلوبولین ناس ماهی ایرانی بعد از ژل فیلتراسیون. ستون‌های ۱ و ۲ بر ترتیب مربوط به نوک و بخش پایین رو قله اول، و ستون‌های ۳ و ۴ به ترتیب مربوط به نوک و بخش پایین رو قله دوم فیلتراسیون است. ستون M شامل مارکرها با اوزان ۹۷، ۶۶، ۴۳، ۳۰، ۲۰، ۱۴ کیلو دالتون است.

## بحث

مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به خالص سازی ایمونوگلوبولین سرم تاس ماهی ایرانی در دریای خزر پرداخته و بعضی از خصوصیات این مولکولها را با نتایج مطالعات مشابه روی سایر گونه‌های ماهی مورد مقایسه قرار داده است. در این مطالعه خالص سازی ایمونوگلوبولین‌های سرم تاس ماهی مبتنی بر جداسازی بخش گلوبولینی سرم با سولفات آمونیوم و تفکیک اجزای آن با دو روش کروماتوگرافی تعویض یون و ژل فیلتراسیون بود. نتایج کروماتوگرافی تعویض یون نشان داد که تا غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم در بافر، بخش عمدی ایمونوگلوبولین خارج می‌گردد و

بخش بسیار کمی از آن در ستون باقی می‌ماند. ایمونوگلوبولین خارج شده از ستون تا غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، بخصوص در بخش اول، از درجه خلوص بالایی برخوردار بود. الگوی الکتروفورز این مولکولها در هر سه بخش شامل دو باند ۲۷ و ۲۹ تا ۷۳ و ۷۵ کیلو دالتونی بود که با نتایج مطالعات دیگران مشابه می‌باشد (Adkison *et al.*, 1996; Partula & Charlemagne, 1993). این دو باند پتریب موقعیت زنجیره‌های سبک و سنگین ایمونوگلوبولین را نشان می‌دهند و از نظر وزنی قابل مقایسه با زنجیره‌های سبک و سنگین IgM در پستانداران هستند (Reinisch & Reinisch, 1989). به همین دلیل، ایمونوگلوبولین‌ها در ماهی به شبه IgM معروفند. برغم تشابه الگوی الکتروفورز سه قله خارج شده از ستون تعویض یون در شرایط احیایی، بررسی این بخش‌ها در SDS-PAGE غیر احیایی نشان داد که قله اول منحصاراً حاوی ایمونوگلوبولین تک واحدی است و در محدوده وزنی ۱۹۰ کیلو دالتون قرار دارد (ستون ۷، شکل ۳). در مقابل، در قله‌های دوم و سوم علاوه بر ایمونوگلوبولین تک واحدی، ۲ تا ۴ باند پروتئینی دیگر در موقعیت‌های وزنی بالاتر دیده شد (ستون‌های ۵ و ۶، شکل ۳). این باندها مربوط به اشکال چند واحدی ایمونوگلوبولین در تاس‌ماهی ایرانی است که در مطالعات Partula و Charlemagne (1993) و همچنین Adkison و همکاران (1996) روی گونه‌های ماهیان خاویاری A. transmontanus و A. baeri نیز گزارش شده است. عمده‌ترین این باندها در موقعیت وزنی ۸۰۰ کیلو دالتون قرار داشت و مربوط به مولکولهای چهار واحدی ایمونوگلوبولین بود. نتایج این بخش از مطالعه حاضر نشان داد که ایمونوگلوبولین تاس‌ماهی ایرانی از نظر میل اتصال به رزین تعویض یون و در نتیجه نقطه ایزوالکتریک همگون نبوده، حداقل دارای سه بخش است. بخش اول که نقطه ایزوالکتریک بالاتری داشت و به صورت یک قله مجزا از ستون خارج گردید، منحصاراً حاوی ایمونوگلوبولین تک واحدی بود. بخش‌های دوم و سوم که در شیب خطی کلرید سدیم نیز به صورت دو قله نسبتاً مجزا خارج می‌شدند، حاوی مخلوطی از اشکال تک واحدی و چند واحدی ایمونوگلوبولین بودند. از دیگر نتایج قابل توجه این مطالعه، وجود دو نوع زنجیره سبک در

ایمونوگلوبولین این گونه ماهی است. این دو نوع زنجیره سبک که تفاوت وزنی بسیار کمی دارند، تنها در ایمونوگلوبولین تک واحدی بخش اول کروماتوگرافی تعویض یون دیده شد (ستون ۳، شکل ۲) و در دیگر بخشها قابل مشاهده نبود. ناهمگونی ایمونوگلوبولین ماهی از نظر نقطه ایزووالکتریک و تفاوت زنجیره سبک در چندین مطالعه روی گونه‌های مختلف ماهی‌های استخوانی گزارش شده است (Acton *et al.*, 1995 ; Bourmand *et al.*, 1995). برای مثال در چند مطالعه روی ماهی‌های استخوانی، وجود حداقل دو فراکسیون ایمونوگلوبولینی با نقطه ایزووالکتریک متفاوت در سرم نشان داده شده (Havarstein *et al.*, 1988) یا به وجود بیش از یک نوع زنجیره سبک اشاره شده است (Partula *et al.*, 1996). با این وجود، تاکنون اطلاعات دقیقی در مورد وضعیت و آرایش ژن‌های ایمونوگلوبولینی و وقایع پس از نسخه‌برداری و ترجمه در ماهی‌های خاویاری در دست نیست.

در این مطالعه همچنین معلوم گردید که ایمونوگلوبولین تک واحدی بیش از نیمی از ایمونوگلوبولین‌های سرم تاس ماهی را شامل می‌شود و شکل چهار واحدی آنتی بادی کمتر از نیمی از محتوای ایمونوگلوبولینی را به خود اختصاص می‌دهد. این نتیجه با نتایج مطالعات انجام گرفته روی گونه‌های دیگر ماهی مشابه نیست، چرا که نتایج این مطالعات حاکی از غالب بودن شکل چهار واحدی ایمونوگلوبولین از نظر مقدار است (Acton *et al.*, ; Adkison *et al.*, 1996). بررسی محتوای پروتئینی هر یک از دو قله خارج شده از ستون سفارز سی ال - ۶ بی نشان داد که الگوی SDS-PAGE آنها در شرایط احیایی کاملاً مشابه و میزان خلوص ایمونوگلوبولین در هر دو بخش نیز بسیار بالا می‌باشد. چنین فرآورده‌های را می‌توان در جهت اهداف مختلفی از جمله تولید Anti-sturgeon IgM (به منظور انجام آزمایشات تشخیصی ایمونولوژیک از قبیل الیزا و غیره)، مطالعات ایمن‌سازی و یا تعیین توالی اسیدهای آمینه به کار برد. در مقابل، در SDS-PAGE غیر احیایی معلوم گردید که بخش اول منحصراً حاوی اشکال چند واحدی (عمدتاً ۳ و ۴ واحدی) ایمونوگلوبولین تاس ماهی و بخش دوم حاوی شکل تک واحدی آنتی بادی است.

در جمع‌بندی نهایی می‌توان اظهار نمود مطالعه حاضر روی ایمونوگلوبولین سرم تاس‌ماهی ایرانی، حاوی نتایجی است که بعضاً در مطالعات مشابه دیده نمی‌شود. در این مطالعه با روشی نسبتاً ساده، ایمونوگلوبولین سرم تاس‌ماهی ایرانی با درجه خلوص بالا بدست آمد و روشی گردید IgM تک واحدی، بخش قابل توجهی از ایمونوگلوبولین سرم را به خود اختصاص می‌دهد. ایمونوگلوبولین چند واحدی نیز از نظر تعداد واحدها توزیع متفاوتی دارد ولی بخش عمدۀ آن به صورت چهار واحدی است. اشکال مولکولی IgM مخصوصاً نوع تک واحدی، رفتار همگونی در کروماتوگرافی تعویض یون ندارد و به ۲ تا ۳ بخش از نظر نقطه ایزوالکتریک قابل تقسیم است و بیش از یک نوع زنجیره سبک در ساختمان ایمونوگلوبولین این گونه از ماهی وجود دارد. این ناهمگونی ساختاری در ایمونوگلوبولین می‌تواند ناشی از وجود بیش از یک ژن برای تولید زنجیره سبک یا سنگین آنتی‌بادی و یا تغییرات پس از نسخه برداری ژن یا ترجمه mRNA باشد که در صورت مطالعات بیشتر می‌توان به روش ساختن بسیاری از نکات آن پرداخت.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله نگارندگان برخود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه ریاست و پرسنل محترم انسستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در اجرای این تحقیق قدردانی نمایند.

## منابع

- کلیاسی، م.ر.، ۱۳۷۹. ایمن‌سازی و مطالعه پاسخ ایمنی در تاس‌ماهی ایرانی. رساله دکترا شیلات دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۸۵ صفحه.
- Acton, R.T. ; Weinheimer, P.F. ; Hall, S.J. ; Niedrmeier, W. ; Sheiton, E. and Bennett, J.C. , 1971. Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 68, pp.107-111.**

- Adkison, M.A. ; Basurco, B. and Hedrick, R.P. , 1996.** Humoral immunoglobulins of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: partial characterization of and recognition with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* Vol. 20, pp.285-298.
- Bourmaud, C.A. ; Romestand, B. and Bouix, G. , 1995.** Isolation and characterization of IgM-Like seabass immunoglobulin. *Aquaculture*, Vol. 132, pp.53-58.
- Bradford, M.M. , 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Vol. 72, pp.248-254.
- Havarstein, L.S. ; Aasjord, P.M. ; Ness, S. and Endersen, C. , 1988.** Purification and partial characterization of an IgM-Like serum immunoglobulin from Atalantic Salmon. *Dev. Comp. Immunol.* Vol. 12, pp.773-785.
- Hordvik, I. , 1998.** The impact of ancestral tetraploidy on antibody heterogeneity in salmonid fishes. *Immunological Rev.*, Vol. 166, pp.153-157.
- Laemmli, U.K. , 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227, pp.680-685.
- Partula, S. and Charlemagne, J. , 1993.** Characterization of serum immunoglobulins in chondrostean fish, *Acipenser baeri*. *Dev. Comp. Immunol.* Vol. 17, pp.515-524.
- Partula, S. ; Schwager, J. ; Timmus, S. and Pilstrom, I. , 1996.** A second immunoglobulin light chain isotype in the rainbow trout. *Immunogenetics*, Vol. 45, pp.44-51.
- Press, C. , 1998.** Immunology of fishes. *Immunoglobulins In: Handbook of*

- vertebrate immunology. (Eds. P.P. Pastoret ; P. Gnebel ; H. Bazin and A. Govaerts). Academic Press, london, UK. pp.16-25.
- Reinisch, C.L. and Litman, G.W., 1989.** Evolutionary immunology. Immunology Today, Vol. 10, pp.287-280.
- Wilson, M.R. and Warr, G.W., 1992.** Fish immunoglobulin and the genes that encode them. Ann. Rev. Fish Dis., Vol. 2, pp.201-221