مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۵، شماره ۲، تابستان ۹۴، صفحات ۱۱۹ تا ۱۲۴

Original Article

بررسی مقایسه‌ای پروفایل پروتئینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس به روش SDS-page

حانیه صرافی[۱]، احمدرضا بهرمند[۲]، علیرضا هادیزاده تثبیتی[۳]، شمسی یاری[۴]، علی کریمی[۵]، مرتضی معصومی[۶]

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران
[۲] دکترای میکروب‌شناسی، رئیس بخش سل و تحقیقات ریوی ، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران
[۳] کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران
[۴] کارشناس ارشد باکتری شناسی، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران
[۵] دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران
[۶] کارشناس میکروبیولوژی، بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران ، تهران ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *Mycobacterium bovis به عنوان عامل سل گاوی به صورت موردی انسان را درگیر می‌کند و همراه با Mycobacterium tuberculosis به عنوان معضلات بهداشتی با گستره جهانی محسوب می‌شوند. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و مقایسه پروفایل پروتئینی این دو سویه به منظور دستیابی به بیومارکر موثر در تشخیص و ایمونیزاسیون در مطالعات آینده بود.*

روش بررسی: *در ابتدا نمونه‌های بالینی با روش ان استیل- ال سیستئین-هیدروکسید سدیم و در محیط کشت لونشتاین جانسون کشت داده شدند و جهت افتراق سویه‌ها از سایر مایکوباکتریوم‌ها، از تست‌های بیوشیمیایی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده شد. کلونی‌ها در محیط میدل بروک 7H9 کشت داده شدند، سپس به منظور استخراج پروتئین‌های ترشحی و غشایی از روش‌های سونیکاسیون، رسوب دهی با سولفات آمونیوم و الکل استفاده گردید و به وسیله روش برادفورد تعیین غلظت شد و در نهایت مقایسه با روش الکتروفورز تک بعدی انجام پذیرفت.*

یافته‌ها: *از تفاوت‌های عمده باندهای حاصل از تفکیک پروتئین‌های غشایی بین دو سویه M. tuberculosis و M. bovis می‌توان به باندهای ۴۵ و ۶۰ کیلودالتونی و همچنین نواحی بین باندهای ۱۴ تا ۴۵ کیلودالتون در تفکیک حاصل از پروتئین‌های ترشحی بین دو سویه اشاره کرد.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد اختلاف بین باندهای پروتئینی سویه‌های حساس و بوویس می‌تواند به عنوان پروتئین مارکر و یا حتی بیومارکر موثر در تشخیص سویه‌های توبرکلوزیس حساس و بوویس از یکدیگر قابل استفاده باشد و حتی از شباهت‌ها نیز می‌توان در ایمونیزاسیون استفاده نمود.*

واژگان کلیدی: *Mycobacterium tuberculosis، Mycobacterium bovis، SDS-page*

مقدمه

سل بیماری است که از دیرباز در بین جوامع مختلف شیوع داشته است و عامل آن را از اسکلت انسان‌های عصر حجر و استخوان‌های مومیایی شده مصریان باستان جدا کرده‌اند (۱). در سال ۲۰۱۰ میلادی، حدود ۸/۸ میلیون نفر جدید به سل فعال مبتلا شده و حدود ۱/۱ میلیون نفر در اثر این بیماری جان سپردند (۲).

Mycobacterium bovis یکی از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین عامل بیماری سل بین انسان و دام (Zoonoses) و به عنوان یکی از معضلات بهداشتی با گستره جهانی محسوب می‌شود. میزان

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش ریوی، دکتر احمدرضا بهرمند
(**email**: Hany_Sarrafi@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۹/۲۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۲/۲۶

مرگ و میر ناشی از *M. bovis* بیشتر از *Mycobacterium tuberculosis* می‌باشد (۳).

کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB)، شامل *M. tuberculosis*، *M. africanum*، *M. bovis*، *Bovis BCG*، *M. caprae*، *M. microti*، *M. pinnipedii*، *M. dassie bacillus* و *M. canettii*، گرچه خصوصیات فنوتیپی متفاوتی در تست‌های بیوشیمیایی از خود نشان می‌دهند، اما همولوژی بالایی به لحاظ ژنتیکی دارند (۴). افتراق اعضای کمپلکس توبرکلوزیس برای پیشبرد درمان موفق ضروری است، به خصوص در مناطقی که بیماری به صورت اپیدمیک در می‌آید یا تماس انسان و حیوان زیاد است (۵).

روش‌های کلاسیک افتراق *M. tuberculosis* و *M. bovis* و تست‌های حساسیت به دارو بر پایه احیای نیترات، فعالیت آنزیم پیرازینامیداز (Pyrazinamide)، تجمع نیاسین و رشد در محیط تیوفن ۲-کربوکسیلیک اسید هیدرازید استوار است (۶). نظر به اینکه روش‌های افترافی مورد استفاده کنونی با وجود ارزشمند بودن، نیاز به روش‌های سریع تشخیصی را برآورده نمی‌کنند و باتوجه به اینکه تنها راه محافظت از افراد سالم جامعه در برابر سل، ایمنی‌سازی، تشخیص سریع و درمان به موقع و کامل بیماران خواهد بود و نکته قابل توجه اینکه پیدایش سویه‌های *M. tuberculosis* مقاوم به آنتی‌بیوتیک و عدم کارایی واکسن BCG در بزرگسالان، تلاش برای دستیابی و گسترش ابزارهای تشخیص، پیشگیری و درمان سل یک ضرورت جهانی شده است (۷). یکی از راه کارهای مناسب در این زمینه، بررسی پروفایل پروتئینی سویه‌های *M. tuberculosis* و *M. bovis* است، که مطالعه پایلوت را به منظور تفاوت در الگوی پروتئین‌ها بیان می‌کند.

پروتئین‌های ترشحی و سطحی نقش به سزایی در برانگیختن ایمنی سلولی موثر و تشخیص TB را دارند. فیلترهای کشت *M. tuberculosis* حاوی آنتی‌ژن‌های مختلفی می‌باشد. بسیاری از آنها با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال شناسایی شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بسیاری از این آنتی‌ژن‌ها، پروتئین‌های ترشحی موجود دردیواره باکتری و یا پروتئین‌های رها شده از جسم باکتری های مرده هستند که قادر به ایجاد پاسخ ایمنی در مراحل ابتدایی ایجاد عفونت در بیمار می‌باشد (۸).

اگر چه تا به حال اطلاعات کامل ژنومیک و پروتئومیک در مورد *M. tuberculosis* به دست آمده است، ولی متاسفانه هنوز کاندیدهای مناسب واکسن و الگوی پروفایل پروتئینی گویایی از تمایز بین گونه‌ای معرفی نشده است. Ying Xiong و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی پروتئین‌های غشایی سویه *M. tuberculosis H37Rv* به وسیله ژل الکتروفورز تک بعدی و mass spectrometry پرداختند و توانستند ۳۴۹ پروتئین کاملا غشایی اینتگرال را گزارش دهند که ۴۲ پروتئین غشایی برای اولین بار مورد بحث قرار گرفت (۹).

هدف این مطالعه، بررسی تفاوت در الگوی پروتئین‌ها با روش SDS-page است که در ادامه می‌توان با تکنیک‌های مناسب پروتئین‌های اختصاصی باکتری‌ها را معرفی نمود و با مقایسه آن‌ها به روش‌های نوین تشخیصی، درمانی و پیشگیری رسید (۱۰).

مواد و روشها

در مطالعه حاضر که طی فروردین ماه تا آبان ماه سال ۱۳۹۲ انجام پذیرفت، از نمونه‌های ارسالی به بخش مایکوباکتریولوژی انسیتو پاستور، ۱۰۰ نمونه به طور تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفتند؛ همچنین از نمونه‌های سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ نیز به منظور بررسی *M. bovis* استفاده گردید. کلیه مواد شیمیایی مصرفی از شرکت سیگما تهیه گردید.

نمونه‌های دریافتی به روش N– استیلL–سیستئین در محیط کشت انتخابی لوون اشتاین جانسون کشت داده شدند و جهت افتراق *M. bovis* از *M. tuberculosis*، از محیط کشت حاوی تیوفن ۲- کربوکسیلیک اسید هیدرازید نیز استفاده گردید. پس از هشت هفته برای شناسایی سویه‌ها از تست‌های نیاسین، کاتالاز، احیای نیترات (۱۱) و حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده گردید (۱۲). سپس باکتری از محیط کشت جامد به محیط مایع و اختصاصی میدل بروک 7H9 برای رشد خالص مایکوباکتریوم‌ها انتقال داده شد و به مدت ۴ هفته در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. پس از سپری شدن زمان به منظور تائید رشد کشت‌ها، از روش رنگ‌آمیزی ذیل-نلسون استفاده گردید و کشت‌ها یک ساعت با rpm ۳۰۰۰ و دمای ۳ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی را به منظور بررسی پروتئین‌های ترشحی و رسوب حاصله که حاوی کلنی‌های باکتری بوده مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور استخراج پروتئین‌های غشایی به رسوب حاصله، بافر تخلیص اضافه کرده و ۱۰ مرتبه با استفاده از نیتروژن مایع و حمام آب‌گرم (۶۵ درجه سانتی گراد) منجمد و ذوب شد و در نهایت با روش سونیکاسیون باکتری متلاشی گردید. محلول حاصله با rpm ۳۰۰۰ و به مدت یک ساعت و در دمای۳- درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. جهت جداسازی پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت حاصله از روش ترسیب با محلول اشباع سولفات آمونیم ۷۰٪، حجم مایع صاف شده

اندازه‌گیری شده و طبق فرمول 100X=70(sample's volum+X) میزان سولفات آمونیم ۷۰٪ اضافه شونده محاسبه و به آرامی و در دمای صفر درجه به سوپرناتانت اضافه گشت. نمونه‌ها over night داخل یخ و در یخچال قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت و در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد با ۱۴۰۰۰ rpmسانتریفیوژ گردیدند. رسوب حاصله با محلول ۱x PBS حل گردید.

به منظور استخراج پروتئین‌های ترشحی پس از عمل سانتریفیوژ مرحله اول، محلول رویی حاصله با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر گردید. جهت خالص سازی پروتئین از روش ترسیب با الکل ۶۰٪، طبق مراحل ترسیب پروتئین‌های غشایی صورت پذیرفت. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه در فریزر قرار گرفتند سپس با شرایط قبل سانتریفیوژ شد و رسوب حاصله با محلول ۱x PBS حل گردید.

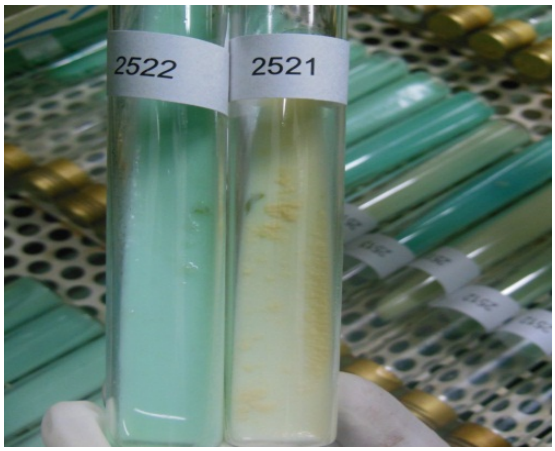
جهت حذف نمک های موجود در محلول‌های پروتئینی از روش دیالیز در محلول ۱x PBS استفاده شد. یک کیسه دیالیز با cut off برابر با ۳ کیلو دالتون به مدت بیست دقیقه در آب مقطر جوشانده شد. محلول‌های پروتئینی را در داخل این کیسه‌های دیالیز ریخته و در محلول ۱x PBS به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (بافر تعویض می‌گشت) (۱۳).

جهت اثبات وجود پروتئین در محلول، طیف جذبی آن توسط اسپکتروفوتومتر در محدوده‌ی UV-visible گرفته شد. همچنین توسط روش پروتئین سنجی برادفورد میزان پروتئین در هر یک از محلول‌های ترسیب شده به دست آمد. در نهایت، پروتئین‌های ترسیب شده توسط روش SDS-PAGE و با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو R-250 و Blue Silver Staining مورد بررسی قرار گرفتند. انجام SDS-PAGE برای پروتئین‌های غشایی با ژل ۱۰٪ و برای پروتئین‌های ترشحی با ژل ۱۲/۵٪ استفاده شد.

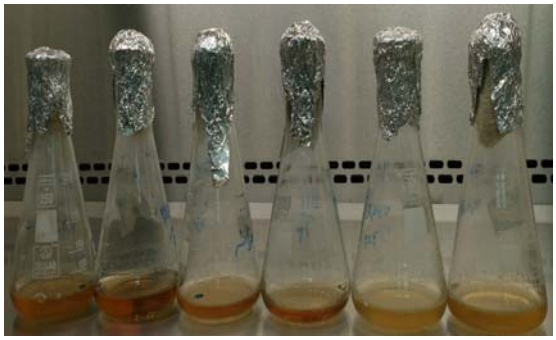
یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه تصادفی انتخاب شده و کشت داده شده در محیط جامد لوون اشتاین جانسون، ۵ نمونه *M. tuberculosis* حساس با روش تست‌های بیوشیمیایی و حساسیت آنتی بیوتیکی انتخاب شدند و به همراه ۵ سویه *M. bovis* در محیط مایع میدل بروک 7H9 به درستی کشت داده شدند.

پس استخراج، پروتئین‌ها با روش برادفورد تعیین غلظت شدند که منحنی استاندارد با ۱ mg/mL پروتئین آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد رسم گردید. غلظت پروتئین‌های غشایی بین ۷۰-۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت پروتئین‌های ترشحی بین ۵-۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.



الف



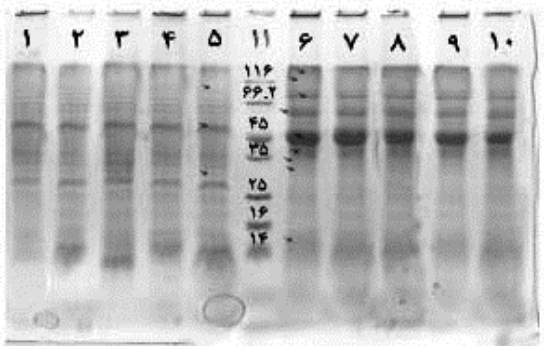
ب

شکل ۱. رشد باکتری‌ها بر روی دو محیط متفاوت. الف: محیط کشت جامد و انتخابی لوون اشتاین جانسون، ب: محیط کشت مایع و اختصاصی میدل بروک 7H9.

انجام SDS-PAGE پروتئین‌های غشایی با ژل ۱۰٪ با دو رنگ آمیزی کوماسی بلو R-250 و Blue Silver Staining انجام پذیرفت که وضوح در رنگ آمیزی Blue Silver Staining به مراتب بیشتر بود و مشخص شد که تمامی سویه‌های *M. bovis* در ۵ بیمار متفاوت، دارای الگوهای پروتئینی یکسان و تمامی سویه‌های *M. tuberculosis* حساس در ۵ بیمار متفاوت نیز دارای الگوهای پروتئینی یکسان می‌باشند.

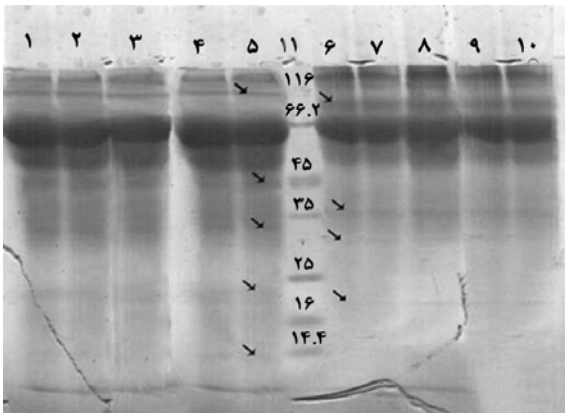
در سویه‌های *M. bovis*، باندهایی از ۱۵ تا ۸۵ کیلودالتون و در سویه‌های *M. tuberculosis* حساس باندهایی از ۱۵ تا ۱۲۰ کیلودالتون مشاهده شد.

اختلافات سویه‌های کاندید *M. tuberculosis* حساس و *M. bovis* در شکل۲ با فلش مشخص شده است که از تفاوتهای عمده بین دو سویه می‌توان به محدوده وزنی باندهای ۴۵ و ۶۰ کیلودالتونی اشاره کرد.



شکل ۲. ژل ۱۰٪ . ستون‌های ۱ تا ۵ پروتئین‌های غشایی سویه های *M. bovis* و ستون‌های ۶ تا ۱۰ پروتئین‌های غشایی سویه‌های *M. tuberculosis* حساس و ستون ۱۱ مارکر. استخراج پروتئین به روش آمونیوم سولفات، رنگ‌آمیزی Blue Silver Staining.

انجام SDS-PAGE پروتئین‌های ترشحی با ژل ۱۲/۵٪ با رنگ آمیزی Blue Silver Staining انجام پذیرفت و در این مورد نیز مشخص شد که تمامی سویه‌های *M. bovis* در ۵ بیمار متفاوت، دارای الگوهای پروتئینی یکسان و تمامی سویه‌های *M. tuberculosis* حساس در ۵ بیمار متفاوت نیز دارای الگوهای پروتئینی یکسان می‌باشند.



شکل ۳. ژل ۱۲/۵٪. ستون‌های ۱ تا ۵ پروتئین‌های ترشحی سویه های *M. bovis* و ستون‌های ۶ تا ۱۰ پروتئین‌های ترشحی سویه‌های *M. tuberculosis* حساس و ستون ۱۱ مارکر. استخراج پروتئین به روش الکل، رنگ‌آمیزی Blue Silver Staining.

در سویه‌های *M. bovis*، باندهایی از ۱۵ تا ۱۱۵ کیلودالتون و در سویه‌های *M. tuberculosis* حساس باندهایی از ۱۸ تا ۱۱۴ کیلودالتون مشاهده شدند. اختلافات سویه‌های کاندید در شکل۳ با فلش مشخص شده است که از تفاوت‌های عمده بین دو سویه می‌توان به محدوده وزنی نواحی بین باندهای ۱۴ تا ۴۵ کیلودالتونی اشاره کرد.

بحث

نظر به آن که روش‌های تشخیصی *M. tuberculosis* اعم از مایکوباکتریوم حساس و مقاوم به دارو و حتی *M. bovis*، مبتنی بر روش‌های میکروبیولوژیک همچون اسمیر مستقیم، کشت و یا PCR می‌باشد، لیکن کشت، همواره روش gold standard محسوب می‌شود، ولی حساسیت پایین برخی از این روش‌ها مثل لام مستقیم و یا طولانی بودن زمان جواب‌دهی به بیماران مشکوک به سل مانند کشت در محیط اختصاصی مایکوباکتریوم، لزوم درمان سریع و تشخیص آسان را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. در این مطالعه سعی شد به کمک روش SDS-PAGE به مقایسه الگوهای وزنی پروتئین‌های غشایی و ترشحی بین سویه‌های کاندید *M. tuberculosis* حساس و *M. bovis* پرداخته شود.

در این مطالعه، جهت بررسی از محیط کشت مایع میدل بروک 7H9 استفاده گردید که علاوه بر امکان بررسی پروتئین‌های ترشحی، این امکان را فراهم می‌آورد تا تمامی باکتری‌ها در یک زمان مشترک رشد (Synchronize) قرار بگیرند و بررسی منطقی‌تری از آنها صورت گیرد. همچنین از مزایای این محیط می‌توان به نمک‌های معدنی، مواد غنی کننده محیط (به عنوان مثال آلبومین)، کاتالاز، دکستروز، کلرید سدیم، گلیسرول و Polysorbate 80 اشاره کرد (۱۴).

برای تعیین مقدار پروتئین از روش برادفورد استفاده شد، زیرا که این روش مناسب برای اندازه گیری مقادیر بیولوژیک در حد میکروگرم و نانوگرم در میلی لیتر و پایین‌تر مناسب می‌باشد.

در سال ۱۹۹۸، Cole و همکاران، به تعیین توالی کامل ژنوم *M. tuberculosis H37Rv* پرداختند و توانستند ۳۹۲۴ ژن منفرد را تعیین توالی کنند و به کمک این اطلاعات ژنتیکی مکمل، آنالیز پروتئوم به کمک ترکیبی از روش‌های الکتروفورز دو بعدی و mass spectrometry صورت گرفت (۱۵). حدود ۸۰۰ پروتئین ترشحی کد شونده توسط ژنوم *M. tuberculosis* شناخته شده است.

در سال ۲۰۰۳ Jens Mattow و همکاران به آنالیز فراگیر پروتئین‌های سوپرناتانت کشت *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* به کمک ترکیب روش‌های الکتروفورز ۲ بعدی، mass spectrometry و تعیین توالی N- terminal پرداختند. با آنالیز ژل الکتروفورز دو بعدی حدود ۱۲۵۰ قطعه پروتئینی از *M. Tuberculosis H37Rv* شناسایی شد. این مطالعه، ۱۳۷ پروتئین مختلف را نشان داد که ۴۲ تای آنها قبلاً به عنوان پروتئین ترشحی توضیح داده شده و مقایسه پروتئوم *M.*

M. Bovis BCG Ccopenhageh و *tuberculosis H37Rv* ضعیف شده ۳۹ قطعه پروتئین مخصوص *M. tuberculosis* را نشان داد که دارای ۲۷ پروتئین مختلف بودند که می‌تواند به عنوان کاندیدی از آنتی‌ژن‌ها برای تهیه واکسنی جدید باشد (۱۶).

Ying Xiong و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی پروتئین‌های غشایی سویه *M. tuberculosis H37Rv* به وسیله ژل الکتروفورز تک بعدی و mass spectrometry پرداختند و توانستند ۳۴۹ پروتئین کاملا غشایی اینتگرال را گزارش دهند که ۴۲ پروتئین غشایی برای اولین بار مورد بحث قرار گرفت (۹).

Malen و همکارانش در مقایسه پروتئین‌های غشایی *M. tuberculosis* سویه *H37RV* و *H37Ra*، خصوصیات بیش از ۱۷۰۰ پروتئین در هر دو سویه را بررسی کردند. در این بررسی، تقریبا اکثر پروتئین‌های تعیین شده (identified) به میزان بسیار زیادی با هم شبیه بودند با این وجود ۲۹ پروتئین غشایی یا متصل به غشا (membrane associated) با ۵ یا بیشتر از آن دارای تفاوت یک سویه با سویه دیگر بودند. ۱۹ پروتئین و لیپوپروتئین در *H37RV* دارای فراوانی حداکثری بودند، در صورتی که ۱۰ پروتئین در سویه *H37Ra* بیشترین تعداد را داشتند. ۶۶ لیپوپروتئین در هر دو سویه مشترک بودند، در حالی که ۷ لیپوپروتئین فقط در *H37Ra* و ۳ لیپوپروتئین در *H37RV* دیده شدند (نشان دهنده اختلاف). این مطالعه از سویه‌های استاندارد ATCC و محیط کشت جامد (7H10) استفاده کرده بود (۱۷).

Singhal و همکارانش (۲۰۱۲)، پروتئین‌های خارج سلولی (Intera cellular)، *M. tuberculosis* از ایزوله‌های بالینی را مورد بررسی قرار دادند. *M. tuberculosis* حساس به دارو (حساس به حداقل ۵ داروی خط اول از خانواده ST11-EA13-IND) و *M. tuberculosis* مقاوم به دارو MDR (مقاوم به ریفامپین-ایزونیازید و استرپتومایسین از خانواده ST288-CAS2) از مرکز بیماری‌های ریوی JALMA (هند) انتخاب گردیدند. از محیط کشت مایع Sautons استفاده شد و باکتری‌ها در فاز Late exponential (هفته سوم) جداسازی شدند. در مقایسه انجام شده با 2DE و MS برخی پروتئین‌ها Upregulate بودند. ۴ پروتئین در هر دو گروه MDR و حساس مشترک بودند و ۳ پروتئین به طور اختصاصی به متابولیسم و زنجیره تنفسی باکتری تعلق داشتند. نتایج نشان داد که عمده پروتئین‌های Upreguale/expresse متعلق به متابولیسم سلولی و تنفسی باکتری است. در این مطالعه همچنین از کشت سلولی ماکروفاژ (THP-1) و آلوده‌سازی سلول با مایکوباکتریوم نیز استفاده شد. روی هم رفته پروتئین‌های تعیین شده (شناخته شده) در اینترافاگوزومال احتمالا در سازگاری باکتری با محیط نقش دارند و درک عمل پروتئین‌های تعیین شده با شرایط ماکروفاژ سازگار است. القا بیان آنها در Invitro احتمالا" به تفسیر استراتژی *M. tuberculosis* در ایجاد عفونت و افزایش بقای سلول TB می‌انجامد. تعیین دقیق این پروتئین‌ها به ما اجازه می‌دهد تا دخالت آنها در عمل ساختاری TB و رشد مایکوباکتری در محیط کمک کند (۱۸).

از مقایسه باندهای سویه‌های *M. tuberculosis* حساس در مطالعه حاضر با باندهای حاصل از پروتئین‌های غشایی *M. tuberculosis H37Rv* در مطالعه Xiong احتمالا می‌توان گفت که نمونه بالینی و سویه استاندارد H37Rv از نظر بیان پروتئین یکسان می‌باشند. از تفاوت‌های عمده مطالعه حاضر و مطالعه Xiong می‌توان به باندهای پروتئینی ۴۵ و ۶۰ کیلودالتون اشاره کرد.

به نظر می‌رسد اختلاف بیان باندهای پروتئینی سویه‌های حساس و *Bovis* شاید در صورت تخلیص جامع‌تر و دقیق‌تر پروتئینی و با به کارگیری روش‌های مناسب به عنوان پروتئین مارکر و یا حتی بیومارکر موثر در تشخیص سویه های *M. tuberculosis* حساس و *M. bovis* از یکدیگر قابل استفاده باشد، چرا که افتراق بین سویه‌های *M. bovis* و *M. tuberculosis* حساس در مواردی که تشخیص بین این سویه‌ها کاملا مشخص نباشد، نیز مهم است. درمان افراد مبتلا به *M. bovis* معمولا مشابه درمان مبتلایان به *M. tuberculosis* حساس است؛ از این رو تفاوت پروفایل پروتئینی در بین این دو گونه منجر به تشخیص زودرس و تفکیک این دو گونه از هم و در نهایت کاهش هزینه‌های درمانی را در بر خواهد داشت. انتخاب پروتئین‌های اختصاصی که تفاوت در سویه‌های حساس و بوویس و یا حتی مقاوم را نشان دهد می‌تواند منجر به تعیین این پروتئین‌ها به عنوان بیومارکر تشخیصی مناسب برای تشخیص زود هنگام باشد. از این منظر مشاهده اختلاف باندهای پروتئین در بررسی حاضر می‌تواند شروعی در انتخاب پروفایل مورد اختلاف و مورد نظر برای تعیین پروتئین کاندید مناسب تشخیصی باشد.

برای اختلاف پروتئین در محدوده‌های وزنی مولکولی مشاهده شده در بررسی حاضر با انجام مطالعات تکمیلی از جمله الکتروفورز دو بعدی و mass spectrometry منجر به خالص‌سازی موثرتر این پروتئین‌ها در آینده می‌گردد و چه بسا که این تفاوت پروتئینی جهت تعیین دقیق ایزوتوپهای موثر در واکنش‌های پاسخ ایمنی میزبان نیز مفید خواهند بود.

تشکروقدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پروژه پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان است. بدین وسیله از حمایت‌های مالی و عملی بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi NM, Wolf H, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. J Clin Microbiol 2003; 41:5350-51.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control; ssurveillance planning, financing. Who Report. Geneva, Switzerland: WHO; 2010.
3. Majoor CJ, Magis-Escurra C, Van Ingen J, Boeree MJ, Van Soolingen D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993–2007. Emerg Infect Dis 2011; 17: 457-63.
4. Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, Kaswa M, Seng Goh K, Rastogi N, et al. Sequencing of the pncA gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: identification of a species-specific pncA mutation in "*Mycobacterium canettii*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. JCM 2007; 45: 595-99.
5. Barouni AS, Augusto CJ, Lopes MT, Zanini MS, Salas CE. A pnca polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes 2004; 18:167–70.
6. Monteros LE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Garcia Marin JF, Martin C, et al. Allele- specific PCR method based on pncA and oxyR sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis* pnca sequence polymorphism. J Clin Microbiol 1998; 36: 239–42.
7. Barker LF, Brennan MJ, Rosenstein PK, Sadoff JC. Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. Curr Opin Immunol 2009; 21:331-38.
8. Sonnenberg MG, Belisle JT. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. Infect Immun 1997; 65:4515-24.
9. Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass 119. spectrometry. J Proteome Res 2005; 4:855-61.
10. Mollenkopf HJ, Grod L, Mattow J, Stein M, Knapp B, Ulmer J, et al. Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. Infect Immun 2004; 72:6471–79.
11. Kubica G, Kent P. Public health microbiology. A guide for the lever laboratory. Atlanta, Georgia: Public Health Service, Genters for Disease Control; 1985.
12. Farnia P, Mohammadi F, Mirsaedi M, Zia Zarifi A, Tabatabee J, Bahadori M, et al. Bacteriological follow-up of pulmonary tuberculosis treatment: a study with a simple colorimetric assay. Microbes Infect 2004; 6: 972-76.
13. Dennison C, ed. A guide to protein isolation. New York: Kluwer Academic Publisher; 2002.
14. Middlebrook G, Cohn ML. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am J Public Health 1958; 48: 844-53.
15. Britton WJ, Hellqvist L, Ivanyi J, Basten A. Immunopuri®cation of 21. radiolabelled antigens of Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis (bacillus Calmette- Guerin) with monoclonal antibodies. Scand J Immunol 1987; 26:149-59.
16. Mattow J, Schable UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, Brestrich G, et al. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. Electrophoresis 2003; 24:3405–20.
17. Malen H, De Suza GA, Pathak Sh, Softeland T, Wiker HG. Comparison of membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra strains. BMC Microbiol 2011;11:1 8.
18. Singhal N, Sharma P, Kumar M, Joshi B, Bisht D. Analysis of intracellular expressed proteins of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Proteome Sci 2012; 10: 14.