**خلاصه پایاننامه سودابه حیدری**

**شناسايي پروتئين هاي ايمونودومينانت پروماستیگوت های لیشمانیا اینفانتوم (سويه ايران) با استفاده از تكنيك های پروتئومیکس و ايمنوبلاتينگ و ارزیابی پروتئین شاخص جهت تشخیص لیشمانیوز احشایی**

**مقدمه و هدف:** لیشمانیوز احشایی، بیماری انگلی کشنده ای است که عامل آن در منطقه مدیترانه از جمله ایران، لیشمانیا اینفانتوم می باشد. بیماری در شمال غربی، جنوب غربی و جنوب و اخیراً شمال شرقی ایران بصورت آندمیک است. هدف از مطالعه حاضر شناسایی پروتئین های شاخص ایمنی پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم (سویه بومی ایران) با استفاده از تکنیک های ایمنوپروتئومیکس و تهیه آنتی ژن نوترکیب بمنظور ارتقاء روشهای سرولوژی تشخیص لیشمانیوز احشایی در انسان می باشد.

**روش کار:** پروتئین های پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم با روش تری کلرو استیک – استون استخراج و با استفاده از ژل الکتروفورز دو بعدی (2-DE) جداسازی شدند.

تکنیک ایمنوبلاتینگ بمنظور شناسایی پروتئین های واکنش گر ایمنی با استفاده از 6 مخلوط سرمی از افراد مبتلا به کالاآزار با تیترهای متفاوت سرولوژی با استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) در مقایسه با نمونه های کنترل منفی انجام شد. 6 مخلوط سرمی شامل 3 مخلوط سرمی با تیتر پایین (1:3200 تا 1:6400) و 3 مخلوط سرمی با تیتر بالای (1:12800 تا 1:102400) آنتی بادی اختصاصی علیه لیشمانیا اینفانتوم بودند و از کانون های آندمیک بیماری (اردبیل، آذربایجان شرقی و فارس) جمع آوری گردیده بود. نمونه های کنترل منفی شامل 3 مخلوط سرمی از افراد فاقد آنتی بادی علیه لیشمانیا اینفانتوم از منطقه غیر آندمیک بیماری (تهران) بود.

 تعدادی از پروتئین های واکنش گر ایمنی با روش طیف سنجی جرمی(MALDI-TOF/TOF) شناسایی شدند. اپیتوپ های خطی و فضایی سلول B برخی از پروتئین های واکنش گر ایمنی با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک جهت طراحی پروتئین نوترکیب شناسایی گردید.

 ژن پروتئین نوترکیب طراحی شده در وکتور PGHکلونو در وکتور بیانی pET28-a ساب کلون گردید و در میزبان بیانی (DE3) *E. coli* BL21، پروتئین نوترکیب بیان و سپس تخلیص گردید. آنتی ژن نوترکیب جهت تشخیص لیشمانیوز احشایی در انسان مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت ارزیابی آنتی ژن نوترکیب در مقایسه با آنتی ژن خام انگل با روش الایزای غیرمستقیم، نمونه های سرمی مورد بررسی قرار گرفتند. 34 نمونه سرم از افراد دارای علائم بالینی لیشمانیوز احشایی که با تستDAT  دارای تیتر آنتی بادی 1:3200≤ بودند از نظر بیماری مذکور مثبت در نظر گرفته شدند. همچنین تعداد 107 نمونه سرم شامل 90 نمونه سرم افراد فاقد علائم بالینی لیشمانیوز احشایی و 17 نمونه سرم بیمار مبتلا به سایر بیماری های عفونی انسانی مانند لیشمانیوز جلدی (4 نمونه)، توکسوپلاسموزیس (2)، مالاریا (1)، هیداتیدوزیس (3)، استرونژیلوئیدیازیس (2)، فاسیولیازیس (3)، توبرکلوزیس (1) و سیفلیس (1) به عنوان نمونه های کنترل منفی لیشمانیوز احشایی در نظر گرفته شدند.

نتایج روش های الایزای غیرمستقیم با استفاده از آنتی ژن نوترکیب و آنتی ژن خام و روش DAT با یکدیگر مقایسه شدند و توسط نرم افزار های آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته ها:** در پروفایل پروتئین پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم سویه بومی ایران حدوداً تعداد422 و 933 لکه پروتئين در محدوده pH ایزوالکتریک 7-4 بترتیب در ژل الکتروفورز دو بعدی رنگ آمیزی شده با کوماسی کلوئیدال و نیترات نقره شناسایی شدند.

پس از انجام روش ایمنو بلاتینگ، حدود 125 لکه پروتئینی واکنش گر ایمنی شناسایی گردید، که از این میان تعداد 68 لکه (4/54%) روی ژل 2-DE رنگ آمیزی شده با رنگ کوماسی کلوئیدال قابل تشخیص بودند. تعدادی از پروتئین های واکنش گر ایمنی با روش طیف سنجی جرمی شناسایی شدند که شامل: Glucose-regulated protein 78، Ubiquitin-conjugating enzyme E2، Calreticulin، Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor، i/6 autoantigen-like protein، Pnitrophenylphosphatase ، Heat shock protein 70-related protein، ATPase beta subunit،Proteasome alpha (1,3,5 subunit) ، Beta tubulin، hypothetical conserved  بودند.

مناطق اپیتوپ خطی و فضایی سلول B آنتی ژن های glucose-regulated protein 78 و Heat shock 70-related protein 1 (پیش ساز میتوکندریال)، ubiquitin-conjugating enzyme E2 انتخاب شدند و سپس سازه پروتئین نوترکیبGRP-UBI-HSPساخته شد.

میزان حساسیت و اختصاصیت تست ELISA با استفاده از آنتی ژن نوترکیب GRP-UBI-HSP در نمونه های سرم انسانی جهت تشخیص لیشمانیوز احشایی بترتیب 6/70% و 1/84% و با آنتی ژن خام انگل بترتیب 18/91% و 5/92% تعیین گردید.

**نتیجه گیری:** این مطالعه اولین گام در زمینه کاربرد ایمونوپروتئومیکس و معرفی یک سازه پروتئینی نوترکیب جدید در جهت تشخیص بیماری لیشمانیوز احشایی می باشد که بنظر می رسد در گام های بعدی با ارتقاء کیفیت تکنیک ها می توان از آن در تفکیک نمونه های بالینی و تحت بالینی به خوبی استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** تشخیص؛ لیشمانیوز احشایی؛ پروتئومیکس؛ پروتئین واکنش گر ایمنی؛ پلی پپتید مولتی اپیتوپ