مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ٤: از ۳۱-۳۸
زمستان ۱۳۸۸

شناسایی بافت‌های موشی بیان‌کننده پروتئین Opticin

زهرا طهماسبی‌فرد[۱]، کاظم پریور[۲]، لیلا برزگریارمحمدی[۳]، محمدمهدی آخوندی[٤]، محمود جدی‌تهرانی[٥]، حجّت‌اله ربانی[٦*]

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- کارشناس ارشد، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی (ابن سینا)، تهران، ایران
۴- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی (ابن سینا)، تهران، ایران
۵- دانشیار، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی (ابن سینا)، تهران، ایران
۶- دانشیار، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی (ابن سینا)، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۵/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: توالی‌های غنی از لوسین (LRR) ناحیه تشخیصی مولکول است که در پروتئین‌هایی که با نقش‌هایی مانند اتصال سلول، انتقال علامت، ترمیم DNA و پردازش RNA دارند، یافت می‌شود. اوپتیسین یکی از اعضای این خانواده است. بیان mRNAی اوپتیسین موشی در چشم، قلب، مغز، بیضه، تیروئید و اپیدیدیم با روش Dot Blot Hybridization شناسایی شده است. در تحقیق حاضر بیان اوپتیسین در سطح mRNA و پروتئین به‌وسیله دو آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده علیه پپتیدهای اوپتیسین انسانی (که در تحقیق دیگری تولید شده بود)، بررسی شد. ساختار اوپتیسین انسانی و موشی با این روش مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: بافت‌های موشی از جمله، کلیه، بیضه، کبد، ریه، قلب، مغز، ماهیچه اسکلتی، طحال و چشم جدا شدد. بیان اوپتیسین در سطوح mRNA و پروتئین به‌ترتیب با روش‌های RT-PCR و وسترن بلات بررسی شد.

نتایج: بررسی PCR نشان داد که mRNAی اوپتیسین در همه بافت‌های مطالعه شده به استثنای ریه بیان می‌شود؛ ولی پروتئین اوپتیسین در همه بافت‌های بررسی شده، شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: بیان پروتئین در بافت‌های بالغ موش، نشان می‌دهد که اعمالی به‌جز نقش شناخته شده آن در تنظیم فیبروژنوسیس کلاژن زجاجیه برای این مولکول وجود دارد.

کلیدواژگان: تکرارهای غنی از لوسین، بافت‌های موشی، اوپتیسین

۱- مقدمه

تکرارهای غنی از لوسین (Leucine-Rich Repeat: LRR) یک بخش ساختاری هستند که اولین بار به‌وسیله پاتی (Patthy) در سال ۱۹۸۷ شناسایی و سپس به‌وسیله کوب (Kobe) و دیسنهوفر (Deisenhofer) در سال ۱۹۹٤ معرفی شد. این توالی‌ها معمولاً در پروتئین‌ها پشت سر هم بوده و تعداد پروتئین‌های حاوی این توالی‌ها رو به افزایش است. به‌همین دلیل آن‌ها را خانواده بزرگ LRR می‌نامند [۱].

پروتئین‌های برون سلولی دارای توالی‌های کوچک غنی از

***نشانی مکاتبه:** تهران، ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی، انتهای بلوار داخل دانشگاه، پژوهشگاه ابن سینا، پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، کدپستی: ۱۹۳٦۷۷۳٤۹۳
Email: hodrab@ki.se

لوسین (Small Leucine-Rich Repeat Proteins: SLRPs)، خانواده‌ای از مولکول‌ها بوده که اعمال متعددی از جمله تنظیم شکل‌گیری ماتریکس، اتصال به عوامل رشد و مهار رشد سلول را بر عهده دارد [۲، ۳]. این پروتئین‌ها دارای تعداد متغیری از LLR با توالی حفظ شده (LXXLXLXXNXL) است که در آن X می‌تواند یکی از آمینواسیدهای، لوسین، ایزولوسین، والین، آسپارژین، سیستئین یا ترئونین باشد [۲]. LRRها معمولاً براساس چهار مولکول سیستئین در انتهای آمینی، دو مولکول سیستئین در انتهای کربوکسیل و توالی حفظ شده LRR بین آن‌ها، به سه کلاس [کلاس I شامل: دیکورین (Decorin)، بیگلایکان (Biglycan) و آسپورین (Asporin)؛ کلاس II شامل: فیبرومودولین (Fibromodulin: FMOD)، لومیکان (Lumican)، کراتوکان (Keratocan)، PRELP (Prolin/arginine-rich end leucin-rich repeat protein) و اوستئوادهرین (Osteoadherin)؛ کلاس III شامل: اوستئوگلایسین (Osteoglycin)، اپیفایکان (Epiphycan) و اوپتیسین (Opticin)] دسته‌بندی می‌شود [٤، ٥]. اوپتیسین یکی از اعضای کلاس III خانواده SLRPs است که به فراوانی در زجاجیه چشم انسان وجود دارد. این پروتئین با دو عضو دیگر این گروه اپیفایکان و اوستئوگلایسین در توالی آمینواسیدی دومین (LRR (Domain، ۷۳ درصد تشابه را نشان می‌دهد که بیانگر تشابه توالی این سه پروتئین است [۲، ٦]. ژن اوپتیسین روی کروموزوم 1q31-32 قرار داشته و یک رونوشت ۱/٦ کیلوبازی از آن در زجاجیه چشم به‌طول ۹۹٦ جفت‌باز شناخته شده است [۷]. پروتئین اوپتیسین ۳۳۲ آمینواسید داشته و همولوژی بالایی را با پروتئین‌های SLRP نظیر اپیفایکان و اوستئوگلایسین نشان می‌دهد [۸].

اوپتیسین یا اوکولوگلایکتان (Oculoglycan) پروتئوگلایکانی با وزن مولکولی ۳۵ تا ٤٥ کیلودالتون است. این پروتئین در انتهای آمینی خود دارای محل‌هایی برای O-گلیکوزیلاسیون است که ظاهراً مختص این پروتئین بوده و در سایر پروتئین‌های LRR برون سلولی دیده نمی‌شود. این مولکول به‌خاطر پردازش‌های گوناگون، تنوع زیادی را از نظر طول رونوشت و وزن مولکولی، در بافت چشم انسان نشان می‌دهد ولی در مورد عملکرد این مولکول‌ها اطلاعاتی وجود ندارد [۳، ۹]؛ مطالعاتی که روی بافت‌های انسان انجام شده، نشان می‌دهد که این مولکول علاوه بر چشم در مغز، غضروف، کبد و پوست نیز بیان می‌شود [۳، ٥]. ساختار ژن اوپتیسین در موش و انسان از نظر توالی و محل قرارگیری (روی کروموزوم ۱ در یک مجموعه ژنی، کنار دو ژن دیگر FMOD و PRELP) مشابه است [۱۰]. طول قطعه قابل ترجمه (Open Reading Frame: ORF) در اوپتیسین انسان ۹۹۹ جفت‌باز و در موش ۹۸٦ جفت‌باز است. از نظر توالی نوکلئوتیدی نیز ۷۷ درصد و از لحاظ آمینواسیدی ۷۳ درصد تشابه دارند [۱۰]. ژن اوپتیسین موشی دارای ۷ اگزون و اوپتیسین انسانی دارای ۸ اگزون است. اگزون ۱ تا ٦ اوپتیسین موشی مشابه انسان بوده ولی اگزون انتهایی کاملاً متفاوت است. اگزون ۸ در اوپتیسین موشی وجود نداشته و اگزون ۷ نیز طویل‌تر است. توالی‌های حفظ شده در مرز بین اینترون و اگزون در هر دو ژن اوپتیسین تشابه دارد [۱۰].

پروتئین‌های SLRP معمولاً پروتئوگلایکان است؛ در حالی‌که اوپتیسین استثنا بوده و به‌جای زنجیره‌های گلیکوزآمینوگلایکان، در بخش انتهای آمینی خود دارای مجموعه‌ای از زنجیره‌های الیگوساکاریدی O-Linked سیالیله است [۱۱، ۱۲]. به‌خاطر گلیکوزیلاسیون متفاوت روی این پروتئین، وزن‌های مولکولی مختلفی از آن شناسایی شده است [۲]. از خصوصیت دیگر این پروتئین، این است که به کمک نواحی LRR در محلول‌ها به شکل دایمر در می‌آید. وزن مولکولی پروتئین دایمر نیز ۷۰ کیلودالتون است [۱۳].

فعالیت زیستی SLRPها در بدن هنوز شناخته نشده است ولی مشخص شده که چندین عضو از این خانواده، به فیبریل‌های کلاژن از طریق توالی‌های غنی از لوسین متصل شده و قطر فیبریل‌ها و فاصله آن‌ها را تنظیم می‌کنند [۱۰، ١٤]. این فرضیه در موش‌های فاقد ژن‌های FMOD، دیکورین یا لومیکان که از اعضای این خانواده است، به اثبات رسیده است

[۱۰]. اشکال نامنظم فیبریل‌های کلاژن سبب ایجاد نشانگان الرس-دانلوس (Ehlers-Danlos syndrome) می‌شود که با بدشکلی‌های شدید زانو، ضعف شدید تاندون‌ها همراهست [۱۵].

توالی اوپتیسین در گونه‌های متفاوت، تنوع زیادی را نشان می‌دهد؛ به‌طوری که در سطح پروتئین، اوپتیسین انسانی با جوجه ۵۳ درصد تشابه و در سطح توالی ژنی بین موش و انسان ۷۵ درصد تشابه دیده می‌شود [٤].

از آن‌جایی که تاکنون مطالعه‌ای برای شناسایی بافت‌های موشی بیان‌کننده اوپتیسین در سطح پروتئین انجام نشده بود، در تحقیق حاضر این موضوع بررسی شد. برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، از پپتیدهایی استفاده شد که براساس ساختار سه‌بعدی شناخته شده از پروتئین اوپتیسین انسانی، در معرض محیط هستند [۱۲]. توالی پپتیدهای طراحی شده، تشابه بالایی بین اوپتیسین انسانی و موشی را نشان می‌دهد. شناسایی اوپتیسین موشی توسط این آنتی‌بادی‌ها، نشان‌دهنده تشابه بالای ساختار سه‌بعدی پروتئین در هر دو گونه است. علاوه بر این، تحقیق حاضر نشان خواهد داد که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده علاوه بر اوپتیسین انسانی، نوع موشی این مولکول را نیز می‌شناسد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی بافت موش

از اندام‌های ۵ موش نر BALB/c برای استخراج RNA استفاده شد. در ابتدا حیوانات با استفاده از کتامین (Ketamine) (۸۰-۱۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) و گزایلازین (۵-۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) بیهوش شده و پس از آن نخاعی شدند. برای ضد عفونی کردن موضع از اتانل ۷۰ درصد استفاده شد. با قیچی استریل، از بافت‌های کلیه، بیضه، کبد، ریه، قلب، مغز، ماهیچه اسکلتی، طحال و چشم به‌صورت جداگانه بریده شد و در یک پلیت استریل حاوی بافر سالین فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) انداخته شد. پس از شستشوی بافت‌ها با PBS سرد، ۵ میلی‌گرم از بافت بلافاصله در یک میلی‌لیتر از RNA Later (Ambian, Austin, TX, USA) غوطه‌ور شد.

۲-۲- استخراج RNA از بافت‌ها

RNA later موجود تا حد امکان برداشته شد و ۱ میلی‌لیتر RNA Bee (TEL Test, Friedswood, Tx. USA) افزوده شد. سپس به کمک دستگاه یکنواخت‌سازنده (Homogenizer) (Sigma, St: Louis, MO, USA) بافت‌ها خرد شد و باقی مراحل استخراج مطابق دستور کار شرکت انجام گرفت. در انتهای کار رسوب RNA موجود در انتهای میکروتیوب در ۳۰-٤۰ میکرولیتر آب دیونیزه تیمار شده با DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) حل شد و RNA تا انجام مراحل بعدی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۲-۳- سنتز cDNA و تکثیر ژن اوپتیسین با روش RT-PCR

برای سنتز cDNA، ۱۰ میکرولیتر RNA تام در یک واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر مخلوط شد. این مخلوط در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ ساعت و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انکوبه شد. برای اطمینان از درستی سنتز cDNA، ژن خانه‌دار (Housekeeping) موشی به‌نام GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) با آغازگرهای (Primers) اختصاصی (جدول ۱) در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری تکثیر شد. آزمون PCR با برنامه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ٦۰ ثانیه برای ۳۱ چرخه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Mastercycler gradiant) (Germany) انجام شد تا قطعه ۳۰۹ جفت‌بازی تکثیر شود.

برای تکثیر اوپتیسین، یک جفت آغازگر مختص اوپتیسین موشی به کمک سایت NCBI (National Center for

(Biotechnology Information) و برنامه Gene Runner طراحی شد و شرایط PCR نظیر غلظت منیزیم و دمای اتصال برای آن بهینه شد. جفت آغازگر اختصاصی اوپتیسین موشی (جدول ۱) قادر به تکثیر قطعه ۵۶۹ جفت‌بازی از رونوشت اوپتیسین بود. مخلوط اصلی PCR شامل بافر ۱۰X، $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مولار، dNTP ۱۰ میلی‌مولار، آغازگر S و آغازگر AS ۱۰ پیکومول، آنزیم Taq پلیمراز و H_2O بود. آزمون PCR با برنامه ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه در ۳٦ چرخه در دستگاه ترموسایکلر انجام شد تا محصول تکثیر شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) در کنار نشانگر اندازه (Size marker) مشاهده شود.

جدول ۱ توالی آغازگرهای ژن GAPDH و اوپتیسین موشی

GAPDH	S: 5´ GAGCGAGACCCCACTA 3´
	AS: 5´ GGCATGGACTGTGGTCATGA 3´
اوپتیسین موشی	S: 5´ ATGAAGTTCCTGGCTTTCCTGAGTCT 3´
	AS: 5´ TGGTGAAGTGGCCCACAGGGAGCCG 3´

۲-٤- آنتی‌بادی‌های مونوکلونال

با توجه به مدل مولکولی پروتئین اوپتیسین، دو توالی پپتیدی از توالی‌هایی که در سطح پروتئین قرار داشتند، انتخاب شد تا علیه آن‌ها در پژوهشگاه ابن‌سینا آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شود [۱۱]. توالی پپتیدی برای بخش انتهای آمینی اوپتیسین (علامت پروتئین) انسانی با طول ۱۹ آمینواسید (MRLLAFLSLLALVLQETGT)، شباهت زیادی با اوپتیسین موشی (MKFLAFLSLLSLVLQKAET) داشت و تنها در ٦ آمینواسید تفاوت داشتند. این آنتی‌بادی به‌نام OPTC-N نام‌گذاری شد. توالی پپتیدی برای بخش انتهای کربوکسیل پروتئین اوپتیسین انسانی با طول ۱۲ آمینواسید (CDPEEHKHTRRQ) در مقایسه با همین توالی در پروتئین اوپتیسین موشی (CDTGEHRHERRQ)، تنها در ٤ آمینواسید تفاوت داشت و به‌نام آنتی‌بادی OPTC-C نام‌گذاری شد.

۲-۵- روش وسترن بلات (Western blot)

بافت‌های مختلف جدا شده از موش، پس از شستشو دادن با بافر PBS سرد، در یک میکروتیوب به همراه ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده سلولی RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) (Abcam, Cambridge, UK) و ۱ درصد مهارکننده پروتئازها (Sigma) با دستگاه یکنواخت‌سازنده (Sigma) خرد و یکنواخت شد. سپس برای لیز شدن کامل به‌مدت ۱ ساعت روی ظرف یخ قرار گرفت. پس از سانتریفوژ شدن با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه، محلول رویی (Supernatant) جمع‌آوری شد و غلظت پروتئین‌های موجود در آن با استفاده از کیت BCA (Thermo, Pierce, USA) تعیین شد.

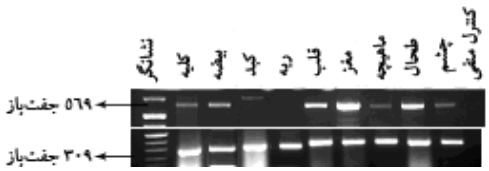
لیزات هریک از بافت‌ها به میزان ٦۰ میکروگرم روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد در شرایط احیا شده الکتروفورز شد. سپس پروتئین‌های الکتروفورز شده به کاغذ PVDF (Polyvinylidene Fluoride) منتقل شد و با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اولیه ضد اوپتیسین (OPTC-N یا OPTC-C) انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه HRP-Rabbit anti mouse (Horseradish peroxidase) (تولید شده در پژوهشگاه ابن‌سینا) بر علیه آنتی‌بادی اولیه (با رقت ۱:۱۰۰۰ در PBS-T) به‌مدت ۱/۵ ساعت روی شیکر (Shaker) انکوبه شد و مجدداً عمل شستشو انجام گرفت.

در نهایت با افزودن سوبسترای کِمی‌لومینسانس ECL (Electrochemiluminescence) (GE Health care, Uppsala, Sweden) به کاغذ PVDF، حضور اوپتیسین در نمونه‌ها بررسی شد. در کنار نمونه‌ها یک نمونه دیگر از لیزات چشم، به‌عنوان کنترل منفی با همان غلظت الکتروفورز شد. شرایط وسترن بلات برای کنترل منفی مشابه سایر نمونه‌ها بود با این تفاوت که این نمونه در مجاورت آنتی‌بادی اولیه قرار نگرفته بود.

۳- نتایج

۳-۱- بررسی cDNA تهیه شده از بافت‌ها

نمونه‌های مناسب برای تکثیر PCR با استفاده از ژن GAPDH که یک ژن خانه‌دار برای موش به‌حساب می‌آید، انتخاب شد. تکثیر موفقیت‌آمیز ژن GAPDH نشان‌دهنده مناسب بودن هر نمونه برای PCR بود. محصول PCR مربوط به این ژن، به‌طول ۳۰۹ جفت‌باز بود که در کنار نشانگر VIII (Roche, Germany) مشاهده می‌شود (شکل ۱).



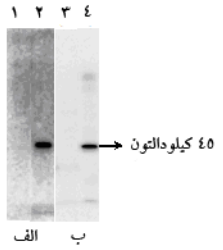
شکل ۱ محصولات PCR اختصاصی GAPDH تکثیر شده از بافت‌های مختلف موش به‌طول ۳۰۹ جفت‌باز و اوپتیسین موشی به‌طول ۵۶۹ جفت‌باز

۳-۲- تکثیر ژن اوپتیسین با استفاده از روش RT-PCR

پس از اطمینان از تکثیر قطعه ژن GAPDH، تکثیر ژن اوپتیسین در نمونه‌ها با استفاده از روش PCR انجام گرفت. برای شناسایی این ژن، جفت آغازگری طراحی شد که قادر به تکثیر قطعه ۵۶۹ جفت‌بازی از ژن اوپتیسین بود. سپس محصول PCR برای هر نمونه به اندازه ۱۰ میکرولیتر، روی ژل ۱/۵ درصد آگارز الکتروفورز شد تا قطعه مورد نظر در کنار نشانگر اندازه VIII (Roche) مشاهده شود. محصولات PCR نشان می‌دهد که به‌جز بافت ریه در بقیه بافت‌ها، باند مورد نظر مشاهده می‌شود. بافت کبد نیز باند ضعیفی را نشان می‌دهد (شکل ۱).

۳-۳- بررسی بیان اوپتیسین با روش وسترن بلات در بافت‌های مختلف موش

برای اطمینان از شناسایی پروتئین اوپتیسین توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه پپتیدهای سنتز شده مطابق با دو توالی موجود در انتهای آمینی و کربوکسیل پروتئین اوپتیسین انسانی، آزمون وسترن بلات روی لیزات سلول SP2/0 بیان‌کننده پروتئین نوترکیب اوپتیسین انسانی و SP2/0 که فاقد ژن اوپتیسین بود، انجام گرفت (این سلول‌ها حاصل تحقیقی دیگر در پژوهشگاه ابن‌سینا بود که ناقل بیان‌کننده ژن اوپتیسین به درون آن‌ها انتقال یافته بود). نتیجه حاصله نشان داد که به‌خوبی این پروتئین توسط آنتی‌بادی‌های تولید شده، در محدوده ۴۵ کیلودالتونی شناسایی می‌شود. نتیجه حاصل از به‌کار بردن آنتی‌بادی مونوکلونال OPTC-C در شکل ۲-الف و نتیجه حاصله از به‌کار گرفتن آنتی‌بادی مونوکلونال OPTC-N در شکل ۲-ب نشان داده شده است.

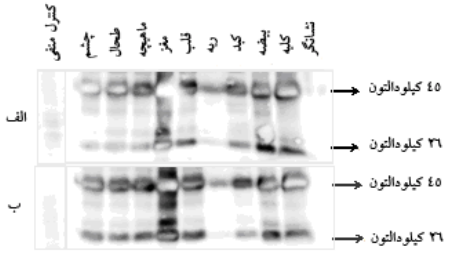


شکل ۲ بررسی واکنش آنتی‌بادی مونوکلونال OPTC-C **(الف)** و OPTC-N **(ب)** با لیزات سلول‌های SP2/0؛ **چاهک ۱، ۳)** سلول SP2/0 فاقد ژن بیان‌کننده پروتئین نوترکیب اوپتیسین، **چاهک ۲، ۴)** سلول SP2/0 بیان‌کننده پروتئین نوترکیب اوپتیسین انسانی

برای بررسی بروز پروتئین اوپتیسین در بافت‌های مختلف، لیزات تهیه شده از بافت‌ها پس از تعیین غلظت پروتئین به کمک کیت BCA (Thermo)، به میزان ۶۰ میکروگرم در شرایط احیا شده روی ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) الکتروفورز شد. پس از انتقال به کاغذ PVDF و آشکارسازی با آنتی‌بادی مونوکلونال OPTC-C دو باند در محدوده ۲۶ و ۴۵ کیلودالتونی آشکار شد (باند سفید نشان‌دهنده غلظت بالای پروتئین است) (شکل ۳-الف).

مجدداً ۶۰ میکروگرم از لیزات‌های تهیه شده در شرایط احیا شده روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد و در

مجاورت آنتی‌بادی مونوکلونال OPTC-N دو باند ۲۶ و ۴۵ کیلودالتونی آشکار شد (شکل ۳-ب).



شکل ۳ بررسی بروز اوپتیسین در بافت‌های مختلف موش؛ مقدار ۶۰ میکروگرم از لیزات بافت‌های تهیه شده از موش به هر چاهک اضافه شد و به کمک روش وسترن بلات با آنتی‌بادی مونوکلونال OPTC-C (الف) و OPTC-N (ب) آشکار شده‌اند. کنترل منفی لیزات چشم بدون تأثیر آنتی‌بادی مونوکلونال بود.

۴- بحث

در تحقیقی که توسط تاکانوسو (Takanosu) و همکارانش انجام گرفت [۱۳] از روش دورگه‌سازی Dot Blot (Dot Blot Hybridization) و توالی cDNA اوپتیسین انسانی (GenBank:AJ133790) برای شناسایی اوپتیسین موشی استفاده شده بود. در این بررسی طول ۸۷۰ جفت‌باز از ژن اوپتیسین انسانی به کمک یک جفت آغازگر تکثیر شد و به‌عنوان پروب (Probe) استفاده شد. نتیجه این بررسی نشان داد که mRNA اوپتیسین در چشم موش بالغ به مقدار زیادی وجود دارد در حالی‌که در بافت‌های دیگر نظیر، قلب، مغز، بیضه، تیروئید و اپیدیدیم علامت ضعیفی مشاهده شد. اما مشخص نشد که این علامت ضعیف به‌خاطر بیان پایین اوپتیسین است یا این‌که واکنش متقاطع با mRNA سایر مولکول‌ها یا سایر اعضای خانواده SLRP دارد.

در تحقیق حاضر ابتدا mRNA از چندین بافت موشی (شامل کلیه، بیضه، کبد، ریه، قلب، مغز، ماهیچه اسکلتی، طحال و چشم) جدا شد و پس از تهیه cDNA از آن‌ها، با آغازگرهای اختصاصی اوپتیسین موشی تکثیر شد. نتیجه نشان داد که تنها در بافت ریه تکثیر ژن اوپتیسین انجام نمی‌گیرد و در بافت‌های مغز، طحال و قلب باندهای قوی‌تری ظاهر می‌شود. تکثیر نشدن ژن اوپتیسین در ریه می‌تواند به‌خاطر حضور ایزوفرمی از ژن باشد که توسط آغازگرهای طراحی شده در این تحقیق قابل شناسایی نیست اما در سطح پروتئینی به‌طور ضعیفی اوپتیسین در بافت ریه آشکار می‌شود (در سایت http://www.PubMed.com دو ایزوفرم اوپتیسین انسانی گزارش شده است).

برای بررسی بیان اوپتیسین در سطح پروتئین، دو پپتید طراحی شد تا آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه آن‌ها تولید شود. پپتید طراحی شده برای تشخیص بخش علامت پروتئین، قادر است پروتئین‌های نابالغ موجود در سلول‌ها را تشخیص دهد (OPTC-N). پپتید دیگر مطابق توالی آمینواسیدی در بخشی از انتهای کربوکسیل اوپتیسین بوده و با توجه به ساختار سه‌بعدی پروتئین، در سطح بیرونی آن قرار دارد (در منبع ۱۱ این توالی تأیید شده است). به‌خاطر تشابه بالای این دو توالی پپتیدی در اوپتیسین موش و انسان، از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد اوپتیسین انسانی، برای تشخیص اوپتیسین در بافت‌های موشی استفاده شد.

درستی عملکرد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده در سلول‌های بیان‌کننده پروتئین نوترکیب اوپتیسین، با روش وسترن بلات تأیید شد. پس از تأیید درستی عملکرد آنتی‌بادی‌ها، از آن‌ها برای تشخیص پروتئین در بافت‌های موشی استفاده شد.

لیزات تهیه شده از بافت‌ها با غلظت ۶۰ میکروگرم در هر چاهک، بررسی شد. نتیجه حاصل نشان داد که این پروتئین در بافت‌های مختلف با شدت کم و زیاد، دو باند ۴۵ و ۲۶ کیلودالتونی را نشان می‌دهد. پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۶ کیلودالتون می‌تواند ایزوفرمی از اوپتیسین یا نوع بریده شده آن (Truncated) باشد (که در سایت NCBI به آن اشاره شده است).

در مورد عملکرد خاص این پروتئین اطلاعات دقیقی وجود ندارد. تنها در یک بررسی انجام شده روی اوپتیسین

انسانی، گزارش شده که به عوامل مختلف رشد متصل شده و در تنظیم رشد و تمایز سلولی دخالت دارد [۹].

بر طبق نتایج به‌دست آمده بیان شدن پروتئین اوپتیسین در بافت‌های مختلف نشان‌دهنده اهمیت این مولکول است. همان‌گونه که اعمال متعدد در مورد خانواده SLRP از جمله نقش داشتن در اتصال سلولی، انتقال علامت، ترمیم DNA و پردازش RNA ذکر شده است [۱۱]؛ این اعمال می‌تواند در مورد اوپتیسین نیز که یکی از اعضای این خانواده است، صدق کند.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و نیز با حمایت مالی پژوهشگاه ابن‌سینا انجام گرفته است. ضمناً از ریاست محترم پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا تهران و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extra-cellular matrix. Matrix Biol 1998; 17(1):1-19.

[2] Le Goff MM, Hindson VJ, Jowitt TA, Scott PG, Bishop PN. Characterization of opticin and evidence of stable dimerization in solution. J Biol Chem 2003; 278(46): 45280-7.

[3] Hobby P, Wyatt MK, Gan W, Bernstein S, Tomarev S, Slingsby C, Wistow G. Cloning, modeling, and chromosomal localization for a small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family member expressed in human eye. Mol Vis 2000; 6: 72-8.

[4] Frolova EI, Fokina VM, Beebe DC. The expression pattern of opticin during chicken embryogenesis. Gene Expr Patterns 2004; 4(3): 335–8.

[5] Reardon AJ, Le Goff M, Briggs MD, McLeod D, Sheehan JK, Thornton DJ, Bishop PN. Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. J Biol Chem 2000; 275(3): 2123–9.

[6] Tasheva ES, Klocke B, Conrad GW. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. Mol Vis 2004; 10: 758-72.

[7] Friedman JS, Ducharme R, Raymond V, Walter MA. Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41(8): 2059-66.

[8] Friedman JS, Faucher M, Hiscott P, Biron VL, Malenfant M, Turcotte P, Raymond V, Walter MA. Protein localization in the human eye and genetic screen of opticin. Hum Mol Genet 2002; 11(11): 1333-42.

[9] Sanders EJ, Walter MA, Parker E, Arámburo C, Harvey S. Opticin binds retinal growth hormone in the embryonic vitreous. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44(12): 5404-9.

[10] Takanosu M, Boyd TC, Le Goff M, Henry SP, Zhang Y, Bishop PN, Mayne R. SStructure, chromosomal location, and tissue-specific expression of the mouse opticin gene. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42(10): 2202-10.

[11] Ramesh S, Bonshek RE, Bishop PN. Immunolocalisation of opticin in the human eye. Br J Ophthalmol 2004; 88(5): 697-702.

[12] Hindson VJ, Gallagher JT, Halfter W, Bishop PN. Opticin binds to heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46(12): 4417-23.

[13] Le Goff MM, Bishop PN. Focus on molecules: opticin. Exp Eye Res 2007; 85(3): 303-4.

[14] Pellegrini B, Acland GM, Ray J. Cloning and characterization of opticin cDNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. Gene 2002; 282(1-2): 121-31.

[15] Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y, Oldberg A, Birk DE, Chakravarti S. A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. J Biol Chem 2002; 277(38): 35532-40.