مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۲۱/هفته سوم اسفند ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲

مقایسه‌ی پروفایل پروتئینی آنتی‌ژن‌های انگل‌های کشته شده (KLM) و اتوکلاو شده (ALM) به روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید

رضا ارجمند[۱]، سیمین‌دخت سلیمانی‌فرد[۱]، صدیقه صابری[۱]، دکتر سپیده طلوعی[۲]، دکتر علی خامسی‌پور[۳]، دکتر سید حسین حجازی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تا کنون انواع مختلف واکسن Leishmania در نقاط مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته، اما فقط تعداد اندکی از نسل اول این واکسن‌ها به کارآزمایی بالینی انسانی رسیده است. انگل‌های کشته‌شده به وسیله‌ی Thimerosal همراه با انجماد و ذوب مجدد (Killed L. major یا KLM) و انگل‌های اتوکلاو شده (Autoclaved L. major یا ALM) در افراد داوطلب مناطقی از کشور و خارج از کشور بررسی شده‌اند. در این مطالعه، محتوای پروتئینی دو واکسن ذکرشده با پروماستیگوت‌های تازه کشت‌شده‌ی کامل L. major به روش سدیم دودسیل‌سولفات ژل الکتروفورز بررسی شد.

روش‌ها: سویه‌ی MRHO/IR/75/ER از L. major از موش Balb/c که پیش از آن آلوده شده بود، گرفته و به محیط کشت NNN اصلاح‌شده تلقیح گردید و سپس در محیط مایع RPMI 1640 غنی‌شده با FCS ۲۰ درصد کشت مجدد داده شد. آنتی‌ژن‌های ALM و KLM در مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید. الکتروفورز آنتی‌ژن‌های تهیه‌شده از دو روش فوق به همراه پروماستیگوت‌های تازه کشت‌شده‌ی کامل انجام شد. محتوای پروتئینی آنتی‌ژن‌ها به روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis یا SDS-PAGE) مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج الکتروفورز، باندهای زیادی از مولکول‌های سنگین بیش از ۱۰۰ کیلودالتون تا مولکول‌های کوچک کمتر از ۱۰ کیلودالتون را نشان داد. مشخص گردید که باندهای حاصل از KLM مشابه L. major کامل بودند؛ به جز ۲ باند ۵۷ و ۲۴ کیلودالتونی که چنین شباهتی را نشان ندادند. ALM نیز دارای ۲ باند بسیار نزدیک به هم ۷۱ کیلودالتونی بود که در KLM و L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل دیده نشد.

نتیجه‌گیری: جهت تولید واکسن‌های مؤثر، شناسایی و تخلیص ایمونوژن‌های محافظتی موجود در آنتی‌ژن‌های خام و تعیین پایداری آن‌ها بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: لیشمانیا، لیشمانیا ماژور کشته شده، لیشمانیا ماژور اتوکلاو شده، الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید

ارجاع: ارجمند رضا، سلیمانی‌فرد سیمین‌دخت، صابری صدیقه، طلوعی سپیده، خامسی‌پور علی، حجازی سید حسین. **مقایسه‌ی پروفایل پروتئینی آنتی‌ژن‌های انگل‌های کشته شده (KLM) و اتوکلاو شده (ALM) به روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۲۱): ۲۴۶۰-۲۴۶۶

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای تخصصی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی دکتری،گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های پوست و سالک صدیقه‌ی طاهره (س) و گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکترسید حسین حجازی
Email: hejazi@med.mui.ac.ir

مقدمه

لیشمانیوز از بیماری‌های گرمسیری است که به وسیله‌ی تک یاخته‌ی انگلی متعلق به جنس Leishmania ایجاد می‌گردد (۱). این بیماری در مناطق مختلفی از جهان شامل بخش هایی از آفریقا، شبه جزیره‌ی هند، خاورمیانه، جنوب اروپا و آمریکای جنوبی به صورت اندمیک وجود دارد و می‌تواند باعث ایجاد طیف وسیعی از علایم شامل زخم‌های خود محدودشونده‌ی جلدی تا ضایعات جلدی مخاطی و حتی بیماری کشنده‌ی احشایی شود (۲). فرم جلدی لیشمانیوز بیشترین فراوانی را دارد و تخمین زده می‌شود که هر ساله ۱/۵ میلیون مورد ابتلای جدید توسط گونه‌های مختلف Leishmania در مناطق آندمیک جهان رخ دهد (۳). این شکل از بیماری می‌تواند ضایعات بدشکل ایجاد نماید که در بسیاری از موارد موجب اثرات روانی و اقتصادی می‌شود. انگل Leishmania به وسیله‌ی نیش پشه‌ی خاکی آلوده، به میزبان پستان‌دار منتقل و باعث ایجاد بیماری می‌گردد (۴).

با توجه به این که گونه های مختلف انگل دارای ناقل، میزبان و مخزن اختصاصی خود می‌باشند، کنترل عفونت های لیشمانیایی بسیار مشکل است و طرق مختلف حمله به چرخه‌ی انگل در عمل میسر نیست. از سوی دیگر، درمان‌های شیمیایی این بیماری می‌تواند پرهزینه، کم‌اثر و تهاجمی باشد (۵). طی دو دهه‌ی اخیر نیز موارد متعددی از مقاومت دارویی در این انگل گزارش شده است (۶). مشاهداتی مبنی بر ایجاد مصونیت در مقابل عفونت مجدد پس از بهبود عفونت طبیعی یا لیشمانیزاسیون مؤید این نکته است که کنترل لیشمانیوز به وسیله‌ی ایمن‌سازی، یک امر ممکن می‌باشد. از این رو، در سال‌های اخیر سازمان جهانی بهداشت کنترل این بیماری را از طریق ایمن سازی از اولویت‌های تحقیقاتی اعلام نموده است (۷).

امروزه مشخص شده است که فعال شدن بازوی سلولی سیستم ایمنی می‌تواند نقش مهمی در حفاظت و بهبود زخم‌های لیشمانیایی داشته باشد که این امر ممکن است توسط واکسیناسیون تحقق یابد (۸). برای ایجاد ایمنی در میزبان های حساس، سیستم ایمنی باید به گونه‌ای تحریک گردد که پاسخ اختصاصی سلول‌های T منجر به تکامل پاسخ‌های حفاظتی گردد (۹). با این دیدگاه، در این مطالعه سعی شد تا تفاوت‌های پروفایل پروتئینی انگل گونه‌ی Leishmania major (L. major) در حالت‌های خام و کشته‌شده با استفاده از حرارت اتوکلاو و Thimerosal و پروماستیگوت‌های تازه کشت‌شده‌ی کامل، مقایسه گردد. نتایج این مطالعه می‌تواند در به کارگیری شکلی از واکسن خام که از نظر نگهداری و پتانسیل آنتی‌ژنی دارای شرایط بهینه باشد، به محققین و مسؤولین بهداشتی کمک نماید.

روش‌ها

کشت انگل

جهت اجتناب از کار با انگل های حاصل از پاساژ های متعدد در محیط کشت، انگل سویه‌ی MRHO/IR/75/ER از L. major که به صورت Cryopreserved در تانک ازت نگهداری می‌شد، پس از کشت انبوه در فاز ایستا به قاعده‌ی دم موش های Balb/c تلقیح شد. پس از گذشت مدت زمان مناسب (حدود ۴ هفته) در محل تلقیح، زخم لیشمانیوز ایجاد شد. جهت کشت انگل از بافت های درگیر موش مثل

غدد لنفاوی، کبد و طحال و تلقیح آن‌ها در محیط کشت Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) اصلاح شده و قرار دادن آن در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد. پس از رشد، پروماستیگوت‌ها از این محیط به محیط کشت ۱۶۴۰ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) غنی‌شده با Fetal calf serum (FCS) ۲۰ درصد انتقال داده شد. پس از رسیدن به مرحله‌ی ایستا، ارگانیسم‌ها ۳ مرتبه با بافر Phosphate buffered saline (PBS) شستشو داده شد و رسوب حاصل جمع آوری گردید.

آماده‌سازی آنتی‌ژن‌های انگلی

واکسن‌های Thimerosal همراه با انجماد و ذوب مجدد (Killed L. major یا KLM) و انگل‌های اتوکلاو شده (Autoclaved L. major یا ALM) در مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی زیر نظر بخش تحقیقات گرمسیری سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization-Tropical Disease Research) تهیه گردید. برای تهیه‌ی ALM پروماستیگوت‌های فاز ایستا پس از برداشت از محیط کشت و شستشو های لازم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد اتوکلاو، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه‌ی KLM پس از برداشت انگل در فاز ایستا و شستشوهای لازم، پروماستیگوت‌ها با Thimerosal غیر فعال شدند و تحت عمل ذوب و انجماد پی در پی قرار گرفتند و سپس در ویال‌های مخصوص در تانک ازت به صورت منجمد نگهداری شدند (۱۰).

الکتروفورز آنتی‌ژن‌های تهیه‌شده از انگل Leishmania

برای تعیین و مقایسه‌ی محتوای پروتئینی ALM، KLM و L. major تازه کشت شده‌ی کامل از روش الکتروفورز ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE یا Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) استفاده شد. این روش یک ابزار قدرتمند برای جداسازی و تعیین خصوصیات پروتئین‌ها است و استفاده‌های وسیعی دارد. مراحل SDS-PAGE به روش Laemmli انجام شد (۱۱). در این روش از محلول بافر نمونه که حاوی بافر تریس اسید کلریدریک ۰/۱۲۵ مولار، Bromophenol blue ۰/۲ درصد، ۲- مرکاپتو اتانل (2ME) و سوکروز یا گلیسرول همراه با SDS ۵ درصد بود استفاده شد. از هر یک از نمونه های ALM، KLM و انگل کامل به مقدار مساوی و به طور جدا گانه برداشت شد و با بافر نمونه مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ تا ۷ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه ی سانتی گراد قرار داده شد تا عمل Denaturation پروتئین ها و احیای باند های دی سولفیدی صورت گیرد. در این سیستم، SDS دارای عملکرد هم بار کردن منفی آنتی‌ژن‌های سه گانه و گسستن پیوندهای هیدروژنی بود.

در مرحله‌ی بعد، آماده سازی ژل های Resolving و Stacking، پر نمودن تانک بالایی و پایینی از بافر و نمونه‌گذاری به مقادیر ۲۰ میکرو لیتر در چاهک‌های ژل انجام شد. اولین چاهک ژل برای بارگذاری پروتئین استاندارد مولکولی در نظر گرفته شد. جریان الکتروفورز ابتدا روی ۶۰ ولت و پس از نفوذ نمونه به درون Stacking gel، روی فشار ۱۲۰ ولت تنظیم و با رسیدن رنگ نشانه به لبه ی پایینی ژل، جریان قطع شد. پس از خروج ژل از دستگاه الکتروفورز، در محلول ثابت‌کننده‌ی رنگ قرار گرفت. این کار سبب تثبیت باندهای پروتئینی و آب‌گیری از ژل می‌شود. سپس ژل

با استفاده از رنگ R-250 Coomassie Blue ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شد. این روش رنگ‌آمیزی باعث مشخص شدن باندهای پروتئینی تا ۱ میکروگرم می‌شود. برای رنگ‌بری و از بین بردن رنگ‌های اضافه، از محلول اسید استیک ۵ درصد استفاده شد. میزان تحرک نسبی (Relative mobility) از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید و با استفاده از باندهای مربوط به پروتئین استاندارد و رسم منحنی کالیبراسیون، وزن مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز نمونه‌ها به دست آمد.

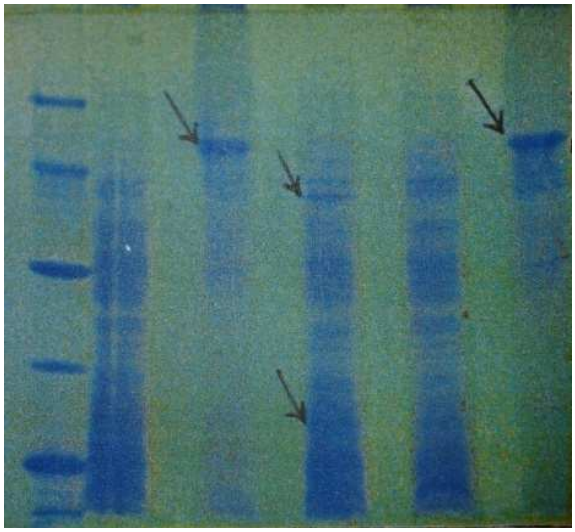
$$Rm = \frac{\text{فاصله‌ی طی شده‌ی پروتئین از مبدأ}}{\text{فاصله‌ی نقطه‌ی مرجع از نقطه‌ی مبدأ}}$$

یافته‌ها

پس از الکتروفورز آنتی ژن های ALM و KLM در کنار لیشمانیای تازه کشت‌شده‌ی کامل، باندهای زیادی از مولکول‌های سنگین بیش از ۱۰۰ کیلودالتون تا مولکول های کوچک کمتر از ۱۰ کیلودالتون به دست آمد. نتایج در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود.

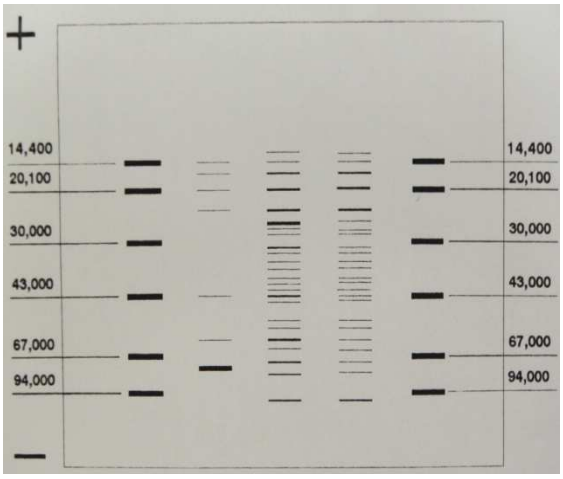
از نظر مقایسه‌ای، KLM (ستون‌های ۲ و ۵) در دیدی کلی به استثنای ۲ باند، آیینه ی تمام نمای L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل است. این دو باند در نواحی ۲۴ و ۵۷ کیلودالتون قرار دارند که در مقایسه با KLM بسیار قوی‌تر هستند. بقیه‌ی باندها در ستون‌های ۲ و ۵ با ستون ۴ مشابه هستند.

در ALM (ستون‌های ۳ و ۶) دو باند فشرده و قوی در ناحیه ی ۷۱ کیلودالتون نزدیک به همدیگر مشاهده شد که در KLM و L. major تازه کشت شده ی کامل وجود نداشت. همچنین از نظر مقایسه‌ای در نواحی ۷۱ کیلودالتون تا ۴۳ کیلودالتون و از ۴۳ تا ۱۴ کیلودالتون باندهای سست و ضعیف مشاهده شد و یا این که باندی وجود نداشت. این وضعیت در دو حالت KLM و L. major تازه کشت شده‌ی کامل مشاهده نشد.



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶

شکل ۱. مقایسه‌ی محتوای پروتئینی ALM، KLM و L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل به روش SDS-PAGE
ستون ۱: مولکول‌های استاندارد، ستون ۳ و ۶: ALM، ستون ۲ و ۵: KLM، ستون ۴: L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل



۱ ۲ ۳ ۴ ۵

شکل ۲. مقایسه‌ی باندهای پپتیدی ALM، KLM و L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل به روش SDS-PAGE
ستون ۱ و ۵: مولکول‌های استاندارد، ستون ۲: ALM، ستون ۳: L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل، ستون ۴: KLM

بحث

در سال‌های اخیر مطالعات مرتبط با واکسن لیشمانیوز حجم بزرگی از تحقیقات را به خود اختصاص داده است. یکی از زمینه های اصلی تولید واکسن استفاده از آنتی‌ژن‌های انگلی می‌باشد که در این راه، استفاده از آنتی ژن های خام انگلی سالیان درازی مورد توجه بوده است (۱۲). این آنتی‌ژن‌ها تا حد امکان استاندارد شده‌اند، اما برای تعیین اختصاصات آن‌ها نیاز به بررسی‌های مختلف و چند گانه می‌باشد.

در مطالعه ی حاضر از روش SDS-PAGE برای انجام بخش‌های اصلی تحقیق استفاده شد. از مزایای این روش استفاده از مقادیر اندک آنتی ژن در هر بار آزمایش و به دست آوردن باند های مربوط به اجزای پروتئینی آن است. مشخص شده است که روش SDS-PAGE در تفکیک اجزای آنتی‌ژن انگل Leishmania بازده بسیار بالایی دارد؛ به طوری که می‌توان هر یک از اجزای حاصل از روش کروماتوگرافی آنتی ژن خام را با انجام الکتروفورز ژل پلی اکریلامید به زیر واحد های تشکیل دهنده تفکیک نمود (۱۳). به این ترتیب هر یک از باندهای حاصل در این روش، زیر واحدهای خالص‌تر آنتی‌ژن را تشکیل می‌دهند.

هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی پپتیدهای به دست آمده از سه نوع آنتی‌ژن تولید شده از انگل L. major بود. روش SDS-PAGE به منظور مقایسه‌ی محتوای پروتئینی انگل L. major و L. gerbili توسط حجازی و همکاران با موفقیت به کار برده شد و تفاوت‌ها و اشتراکات آنتی‌ژنی این دو گونه انگل مشخص و گزارش گردید (۱۴). در این مطالعه، الگوی الکتروفورزی در هر سه شکل آنتی‌ژن انگلی جز در موارد محدودی یکسان بود. نکته ای که در مورد باند ۷۱ کیلودالتونی ALM می‌توان به آن اشاره کرد این که، ممکن است این باند تجمعی از پروتئین ها باشد که طی فرایند حرارت دهی ایجاد شده است. از سوی دیگر، نواحی خالی در ستون مربوط به الکتروفورز ALM در مقایسه با KLM و L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل نشان می‌دهد که یکی از این تغییرات مهم خرد شدن توالی‌های پپتیدی بزرگ می‌باشد.

در بررسی های ایمنی‌شناسی مشخص شده است که نواحی مشخصی از آنتی‌ژن دارای ویژگی ایمونوژنیسیتی هستند. این بخش‌ها اغلب در نواحی قابل دسترس و در سطوح خارجی آنتی ژن، به ویژه مناطقی که قوس های پلی پپتیدی فاقد یک ساختمان سوم و محکم هستند، وجود دارند (۱۵). در مطالعات گذشته مشخص شده بود که پاسخ های آنتی‌بادی و واکنش‌های ایمنی سلولی علیه جایگاه های متفاوتی در یک آنتی ژن ایجاد می‌شود (۱۵). با توجه به بحث بالا به نظر می‌رسد که خرد شدن توالی های پروتئینی در اثر روند اتوکلاو در ALM در پردازش بعدی آن ها توسط سیستم اثر خواهد گذاشت و سیستم ایمنی را به سمت یک پاسخ ایمنی سودمند سوق خواهد داد.

نکته‌ی دیگر، فعالیت‌های آنزیمی است که در KLM می‌تواند از پتانسیل کامل در مقایسه با فرم ALM برخوردار باشد. نتیجه‌ی این فعالیت‌های آنزیمی تجزیه‌ی مولکول‌های ایمونوژنی موجود در این فرم از واکسن می‌باشد. چنین فعالیت هایی در ALM به دلیل غیر فعال شدن آنزیم‌ها در اثر حرارت بسیار محدود است. در نتیجه با توجه به الگوی

یکسان الکتروفورزی ALM با KLM و L. major تازه کشت‌شده‌ی کامل و با توجه به روش ساده‌ی نگهداری و حمل، استفاده از این فرم واکسن می‌تواند جایگزین اشکال مختلف فیزیکی واکسن کامل Leishmania باشد. تحقیقات بیشتر در شرایط درون‌تنی می‌تواند این نظریه را تأیید نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مؤلفین این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات بیماری های پوستی و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران که این طرح را مورد حمایت مالی قرار دادند، اعلام می‌دارند.

References

1. Tanaka AK, Gorin PA, Takahashi HK, Straus AH. Role of Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. Braz J Med Biol Res 2007; 40(6): 799-806.
2. Esmaeili J, Mohebali M, Edrissian GH, Rezayat SM, Ghazi-Khansari M, Charehdar S. Evaluation of miltefosine against Leishmania major (MRHO/IR/75/ER): in vitro and in vivo studies. Acta Medica Iranica 2008; 46(3): 191-6.
3. WHO/CDS/NTD/IDM. Cutaneous leishmaniasis. Geneva, Switzerland: WHO; 2007.
4. John DT, Petri WA, Markell JrEK, Voge M. Markell And Voge's medical parasitology. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2006.
5. Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. Trop Med Int Health 2001; 6(11): 928-34.
6. Chawla B, Madhubala R. Drug targets in Leishmania. J Parasit Dis 2010; 34(1): 1-13.
7. Modabber F. Leishmaniasis. Tropical disease research. 12th program report of UNDP/World Bank/WHO. Special program for research and training in tropical disease. Geneva, Switzerland: WHO; 1995. p. 135-46.
8. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine 2008; 26(14): 1709-24.
9. Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. Indian J Exp Biol 2009; 47(6): 412-23.
10. Hashemi-Fesharki R, Ale-Agha S, Habibi GR, Manhouri H, Esmail-Nia H, Mohammadi AA, et al. Production of inactivated wet rural leishmania vaccine against leishmania major. Iran J Med Sci 1998: 23(3-4); 74-80.
11. Chakavarti B, Chakavarti D. Electrophoretic separation of proteins. J Vis Exp 2008; 16: 758.
12. Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga R, Shaw JJ, Quinnell RJ, et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of Leishmania of the subgenera Leishmania and Viannia. Parasite Immunol 1998; 20(1): 19-26.
13. Ogunkolade BW, Monjour L, Vouldoukis I, Rhodes-Feuillette A, Frommel D. Inoculation of BALB/c mice against Leishmania major infection with Leishmania-derived antigens isolated by gel filtration. J Chromatogr 1988; 440: 459-65.
14. Hejazi SH, Soleymanifard S, Yousefi HA. Investigation and comparison of L.major and L.gerbilli protein content by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J Isfahan Med Sch 2000; 17(56): 14-7.
15. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology. 7th ed. New York, NY: Mosby-Elsevier; 2006. p. 207-27.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 30, No. 221, 3rd Week, March 2013

Received: 02.11.2012

Accepted: 21.01.2013

Comparison of Protein Profile of Killed and Autoclaved Leishmania Major Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Reza Arjmand MSc[1], Simindokht Soleimanifard MSc[1], Sedigheh Saberi MSc[1], Sepideh Tolouei PhD[2], Ali Khamesipour PhD[3], Seyed Hossein Hejazi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: *Leishmania* is a genus of trypanosomatid protozoa which causes a wide spectrum of diseases ranging from a self-healing cutaneous lesion to a vital visceral form of the disease. Although various experimental *Leishmania* vaccines have been prepared in different parts of the world, only a few of first generation vaccines have reached to human trials. Killed *Leishmania major* (KLM) and autoclaved *Leishmania major* (ALM) have been tested in human volunteers in Iran and other countries. We evaluated protein contents of KLM and ALM and fresh *Leishmania major* using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Methods: *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) was isolated from infected BALB/c mice and cultured in Novy-MacNeal-Nicolle medium. It was then subcultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplemented with fetal calf serum 20%. ALM and KLM were prepared by Razi Vaccine and Serum Institute of Iran. Electrophoresis of the two antigens and freshly cultured *Leishmania major* promastigotes was performed and their protein contents were compared using SDS-PAGE.

Findings: The results of electrophoresis showed numerous bands from more than 100 kilodalton (kD) to less than 10 kD. KLM bands were found to be similar to freshly cultured intact *Leishmania major* (except for 57 and 24 kD bands). ALM contained two very close bands (71 kD) which were not seen in KLM or fresh *Leishmania major*.

Conclusion: Identification and purification of protective immunogens in crude antigens and detection of their stability are essential in production of an effective vaccine.

Keywords: Leishmania, Killed Leishmania major, autoclaved Leishmania major, Polyacrylamide gel electrophoresis

Citation: Arjmand R, Soleimanifard S, Saberi S, Tolouei S, Khamesipour A, Hejazi SH. **Comparison of Protein Profile of Killed and Autoclaved Leishmania Major Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(221): 2460-6

* This paper is derived from a PhD thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- PhD Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Center for Research and Training in Skin Disease and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Skin Disease and Leishmaniasis Research Center AND Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.mui.ac.ir