الترحيل الكهربائي للمستضدات المستخلصة حراريا من عصيات الجمرة الخبيثة (عترة ستيرن 34F2)

زاهد سعدون عزيز
كلية التربية- جامعة ميسان

الخلاصة: جرى استخلاص حراري Thermo- extraction لمستضدات عصيات الجمرة الخبيثة (عترة ستيرن 34F2) وهي عترة مضعفة وراثيا تستخدم في إنتاج اللقاح البيطري وحسب تركيز البروتين(ملغم / مل) ثم جرى ترحيل المستضدات المستخلصة كهربائيا باستخدام-Poly `SDS- acrylamide gel electrophoresis (PAGE- SDS) .

بينت النتائج آن المستضدات المستخلصة تحتوي على (7) حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين (15.800) دالتون إلى (125.800) دالتون والتي حسبت بالاعتماد على حركتها النسبية ومقارنتها مع البر وتينات القياسية المستخدمة . أن هذه الدراسة مهمة من ناحية تحديد الطبيعة البروتينية للمستضدات المستخلصة وأهمية ذلك في الفحوصات المصلية والمناعية المختلفة .

المقدمة : يعد مرض الجمرة الخبيثة من الأمراض المشتركة المهمة التي تصيب كل من الإنسان والحيوان (1) وهو أول الأمراض التي اكتشفت أنها مسببة عن الجراثيم (2) . وصف المرض مبكرا 3500 سنة قبل الميلاد واعتقد انه المسؤول عن الوبائين اللذين حصلا في مصر سنة 1491 قبل الميلاد (3) .عرفت البثرات الخبيثة من قبل Meret عام 1759 و Fournier عام 1769 ووصفه Chabert عام 1780 ,وجد Davaine عام 1850 عصيات الجمرة الخبيثة في دم الأغنام واثبت كونها مسببا للمرض عام 1868 وقد شوهدت العصية لاول مرة تحت المجهر الضوئي من قبل Delafond عام 1838(4) .

استطاع كوخ سنة 1877 من أن ينمي الجرثومة في الأنابيب المختبرية واحداث المرض في الحيوانات السليمة بعد حقنها بمستنبت جرثومي نقي ومنها انبثقت فرضيته الشهيرة والتي سميت بفرضية كوخ (Koch's postulate) وفي مثل هذا الوقت ميز John Bell مرض مصنفي الصوف (Wool Sorter's Disease) أو مرض الجمرة الخبيثة الاستنشاقي (5) .

أشار (6) إلى إن المستضدات المستخلصة المنقاة جزئيا (Partially purified extracted anthgen) كانت الأكثر فعالية في كل التفاعلات المصلية والمناعية وأنها أظهرت تفاعلات جلدية مميزة مقارنة مع مستضدات مستخلصة مثل الانثراكسين والمستضدات المقاومة للحرارة المستخدمة في فحص اسكولي (Ascoli test) .

أوضح (7) إن المستضدات المرتبطة بجدار الخلية (Cell-associated antigen) هي مستضدات ذائبة وغير ذائبة وتقع ضمنها المستضدات المستخلصة EA1 و EA2 وتم حساب أوزانها الجزيئية باستخدام الترحيل الكهربائي كما تم الكشف عن مستضدات مستخلصة أخرى مثل

الجدار الخلوي (Cell wall) ومستضد معقد متعدد السكر يد والببتيدو كلايكان Peptido-glycan poly saccharide complex – . كما ان (8) أشارت إلى الطبقة الخارجية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام وان وحداتها متكونة على شكل شبكة بلورية ثنائية الابعاد مكونة من البروتينات او البروتينات السكرية والتي تكافئ طبقة الدهون ومتعدد السكريد Lipopolysaccharide في البكتريا السالبة لصبغة كرام وان وظيفتها هي حماية البكتريا من تاثير الانزيمات المحللة للجدران الخلوية والبكتريا المفترسة Bactriovorus ومنع الاصابة بالعاثيات Phages وتسهل عملية التصاق البكتريا الى مناطق معينة في المضيف.

بين (9) إن كثيرا من الجراثيم تحتوي على بر وتينات سطحية (Surface layer protein) مكونة للغلاف الخارجي للجرثومة وان المستضدات المستخلصة منها ذات طبيعة بروتينية وعند تنمية هذه الجراثيم في وسط غني المحتويات وتحت ظروف هوائية تنتج كميات كبيرة من المستضدات البروتينية المستخلصة منه(EA1) Extracted antigen1 و Extracted antigen2 (EA2) وأنها تمتلك تركيبا غير منتظما وعلى شكل بلورات ثنائية الأبعاد وحددت أوزانها الجزئية باستخدام الترحيل الكهربائي (SDS-PAGE)

المواد وطرائق العمل:

اولا: المو اد

1 . العترة الجرثومية : عترة ستيرن 34F2 المستخدمة في اللقاح البيطري تم الحصول عليها من شركة الكندي لانتاج اللقاحات والادوية البيطرية في ابي غريب وبشكل مجفد (Lyophilized) .

2. الاوساط الزرعية المستخدمة :

2-1 وسط مرق فول الصويا Tryptic soy broth

حضر حسب تعليمات شركة Difco واستخدم في تنشيط الجرثومة وتحضير المستضدات المستخلصة .

2-2 وسط اكار فول الصويا Trypticase soya agar

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة له Oxoid واستخدم في تنمية الجرثومة ودراسة صفاتها المختلفة .

3. الصبغات : استخدمت صبغة كرام(Gram's stain) تم الحصول عليها من معهد المصول واللقاحات /وزارة الصحة .

ثانيا : طرائق العمل

1 – ادامة العترة الجرثومية : بعد ان نقلت الجراثيم بشكل مجفد الى المختبر زرعت على وسط مرق فول الصويا لغرض تنشيطها , بعدها استخدمت في تحضير المستضدات المستخلصة وحسب الطرق المعتمدة .

2- تحضير المستضدات المستخلصة :

أجري حسب طريقة (10) مع بعض التحويرات البسيطة:

1. زرعت الجرثومة في وسط مرق فول الصويا وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة لغرض تنشيطها .

2. أضيفت كمية 2 مل من هذا الوسط إلى 200 مل من وسط مرق فول الصويا وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة .

3. فحص المستنبت للتاكد من خلوه من الملوثات بعمل شريحة زجاجية وصبغها بصبغة كرام وكذلك عمل فحص الحركة لها .

4. قتلت الجراثيم بفعل الحرارة بدرجة 121 م وضغط 15 باوند /انج2 ولمدة15 دقيقة باستخدام جهاز الموصدة (Autoclave) .

5. رشح المستنبت باستخدام مرشحة زايتز (Zeitz filter) وأهمل الراسب .

6. ركز الراشح إلى السبع (1/7) من حجمه باستخدام انبوبة ديلزة (Dialysis tube) وعلقت في الثلاجة لعدة ايام الى ان وصلت الى الحجم المطلوب .

7. جمع المستضد الناتج في قناني معقمة ومحكمة الغلق وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام .

8. حسبت كمية البروتين ملغم / مل باستعمال طريقة البايوريت اذ كانت كمية البروتين المحسوبة هي 50ملغم /مل .

3. الترحيل الكهربائي SDS- Poly-acrylamide gel electrophoresis :

تم إجراء الترحيل الكهربائي لبر وتينات المستضدات وفقا لطريقة (11) باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي المجهز من شركة Pharmacia Fine Chemical السويدية ,اذ جرى فصل البر وتينات اعتمادا على اختلاف أوزانها الجزيئية واستخدام خليط من البر وتينات القياسية منتجة من شركة (Pierce) الأمريكية , فصلت بذات الطريقة أعلاه ثم تم حساب الحركة النسبية للبر وتينات وكما يلي :

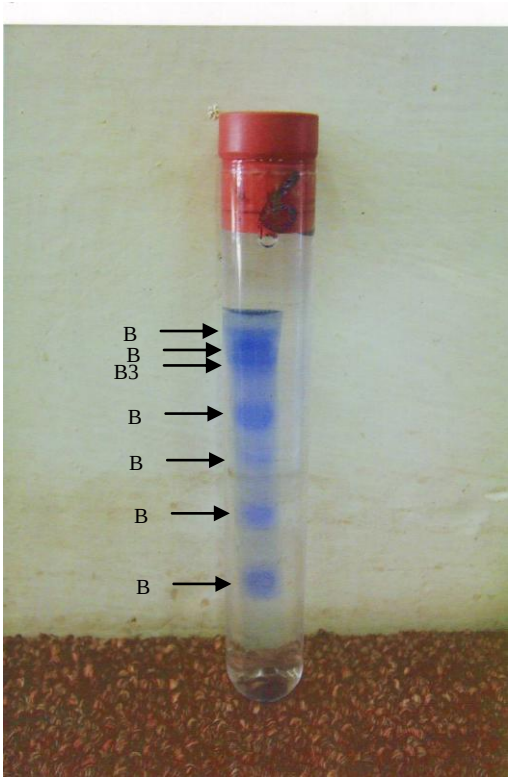
الحركة النسبية = المسافة التي قطعتها الحزمة البروتينية

المسافة التي قطعتها صبغة البرومو فينول

ورسم الخط البياني بين لوغاريتم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية والحركة النسبية لهذه البروتينات وحسبت الاوزان الجزيئية عن طريق مقارنة حركتها النسبية مع الخط البياني للوغاريتمات الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية .

النتائج : أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الترحيل الكهربائي ان المستضدات المستخلصة حراريا تحتوي على7 حزم بروتينية كما في الشكل

(1) وقد تراوحت اوزانها الجزيئية بين 15.800 دالتون إلى 125.800 دالتون كما يوضحه الجدول (1) بالمقارنة مع البروتينات القياسية , الجدول (2).



شكل (1) يبين انفصال الحزم البروتينية للمستضدات المستخلصة من عترة ستيرن 34F2

جدول (1) الأوزان الجزيئية للحزم البروتينية للمستضدات المستخلصة وحسب تسلسل انفصالها بطريقة الترحيل الكهربائي .

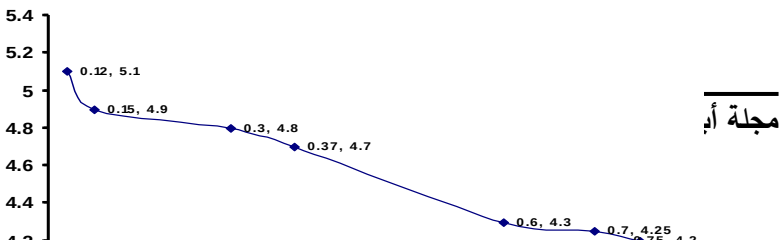
تسلسل الحزم البروتينية	الوزن الجزيئي (دالتون)
B1	125.800
B2	93.300
B3	79.400
B4	50.100
B5	22.400
B6	17.800
B7	15.800

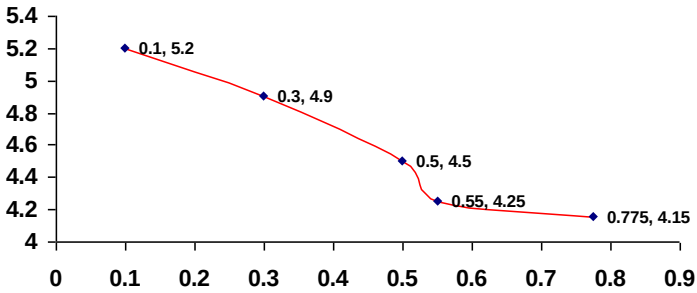
جدول (2) التسلسل والأوزان الجزيئية واسماء البر وتينات القياسية المعتمدة في الدراسة .

تسلسل البروتين	اسم البروتين القياسي	الوزن الجزيئي (دالتون)
1	Lysozyme	14.700
2	Trypsin Inhibitor	25.300
3	Carbonic Anhydrase	53.000
4	Ovatransferin	80.000
5	Gammaglobulin	150.000

الجدول(2) وضح الأوزان الجزيئية للبر وتينات القياسية إذ أن بروتين Lysozyme اقلها وزنا جزيئيا 14.700 دالتون , أما بروتين الكاما كلوبيولين 150.000 دالتون فهو أعلاها وزنا جزيئيا, كما تم حساب الحركة النسبية لكل من بر وتينات المستضدات المستخلصة والبر وتينات القياسية, إذ تمت عملية توزيع نقاط كل حزمة على الخط البياني للبر وتينات القياسية وظهر توزيعها كما في الشكل (2) . إذ وقعت الأوزان الجزيئية لبر وتينات المستضدات المستخلصة ضمن مدى البر وتينات القياسية .

أ- البروتينات المرحلة :





ب- البروتينات القياسية

شكل (2) طريقة حساب الأوزان الجزيئية للبروتينات المرحلة ا مع البر وتينات القياسية ب المرحلة في هلام متعدد الاكريلاميد

المناقشة : تركزت الدراسة الحالية على توصيف جزء بسيط للمستضدات المستخلصة من عصيات الجمرة الخبيثة (عترة ستيرن 34F2) متمثلا بدراسة الطبيعة البروتينية لها باستخدام الترحيل الكهربائي . هذه الدراسة مثلت ترحيلا كهربائيا لمستضدات مستخلصة من جراثيم موجبة لصبغة كرام (جراثيم الجمرة الخبيثة) وهي تشبه دراسات أخرى لتوصيف مستضدات مستخلصة لجراثيم سالبة لصبغة كرام مثل البروسلينات المحضرة من البر وسيلا المجهضة نوع (RB51) و(S19) والعترة (REV1) مع وجود اختلاف في عدد الحزم وفي طريقة الاستخلاص, إذ أن الاستخلاص الذي جرى في هذه الدراسة كن حراريا أما استخلاص البروسلينات فهو كيميائي سواء باستخدام طريقة بيركوفج

(Bercovich) أو طريقة الفينول . أما الاختلاف في عدد الحزم المستخلصة فمثلا تم الحصول على7 حزم بروتينية تراوحت أو زانها الجزيئية من28.000 دالتون إلى 112.000 دالتون عند إجراء الترحيل الكهربائي لمستضدات العترة (S19) المحضرة بطريقة بيركوفج و8 حزم بروتينية أوزانها بين 24.000 دالتون و 98.000 دالتون للمستضدات المحضرة بطريقة الفينول . أما العترة (RB51) فقد تم الحصول على 8 حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين20.000 دالتون و95.000 دالتون للمستضدات المحضرة بطريقة بيركوفج و7 حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 25.000 و89.000 دالتون للمستضدات المحضرة بطريقة الفينول . أما مستضدات العترة (REV1) فان الترحيل الكهربائي لمستضداتها اظهر 8 حزم بروتينية أوزانها بين 28.000- 141.000 دالتون للمستضدات المستخلصة بطريقة بيركوفج و9 حزم بروتينية أوزانها بين 20.000و141.000 دالتون للمستضدات المستخلصة بطريقة الفينول (12) , مقارنة ب7 حزم بروتينية تم الحصول عليها في هذه الدراسة تراوحت اوزانها الجزيئية بين 15800 دالتون و125800 دالتون .

اما (7) فقد أشاروا إلى استخلاص كيميائي لمجموعة من المستضدات من عصيات الجمرة الخبيثة مثل (EA1) و(EA2) واستطاعوا تحديد اوزانها الجزيئية باستخدام الترحيل الكهربائي (SDS- PAGE) اذ كانت (91.000) و(62.000) دالتون على التوالي بالاضافة الى استخلاص مستضدات اخرى مثل الجدار الخلوي و معقد متعدد السكرايد والببتيدوكلايكان ,كما ان (9) أشاروا إلى المستضدات المستخلصة وبينوا طبيعتها البروتينية وإنها مكونة للغلاف الخارجي للعديد من الجراثيم وحددوا اوزانها الجزيئية باستخدام الترحيل الكهربائي (SDS- PAGE) مثلا 95.000 للمستضد المستخلص (EA1) .

إن الاختلاف في عدد الحزم ربما يعود إلى نوع الاستخلاص هل هو حراري او كيميائي وتأثير ذلك على طبيعة المادة البروتينية فالحصول على 7 حزم بروتينية ربما يكون ناتج من عملية الدنترة (Denaturation) الناتجة من عملية الاستخلاص الحراري او من الترحيل الكهربائي والتي حطمت طبقة البروتين السطحية S-layer protein وهذا ما أشاروا اليه (9) والذين بينواايضاً أن استخدام طريقة الاستشراب (Chromatography) قبل اجراء عملية الترحيل الكهربائي واحداث الدنترة تم الحصول على كتلة وزنها الجزيئي 400000 دالتون والتي تتواجد أولاً اثناء عملية الفصل وان استخدام الترحيل الكهربائي ادى الى الحصول على 8 ثمالات (Residues) والمكونة لطبقة البروتين السطحية وبالتالي تأثيره على النتائج المترتبة على استخدام هذه المستضدات في الفحوصات المناعية المختلفة كاستخدامها في الفحوصات الجلدية في تفاعلات فرط الحساسية المتأخرة (DTH) (Delay –type hyper sensitivity) أو استخدامها في تفاعلات التلازن الدموي غير المباشر أو المنفعل Passive or Indirect hemagglutination tests .

المصادر :

1.Friedlander, A. M. (2001). Anthrax .Available at http:// www.chapter22.com .

2. Todar,K.(2000). Bacteriology 330 lecture Topics:Anthrax. Available at:http://www.Bact.Wics.Edul bact 330 home page.

3.Dirchix,J.H.(1981).Virulence of anthrax . Am. J. Dermatopathol. 3:191-195.

4. Lammana,C.(1967).The anthrax question Fedration Proc. 26:1491-149.

5.Shafazand,S.;Doyle,R.;Ruoss,S.;Weinacker,A.andR affin,T.A.(1999).Inhalational anthrax : Epidemiology,Diagnosis, and Management. Chest. 116 (5):1369-76.

6.Shlyakhov,E.V.;Shoenfied,Y.;Gilburd,B.andRubens tien,E.(2004).Evaluation of *Bacillus anthracis* extractable antigen for testing anthrax immunity.Clin.Microbiol.Infect.10(5):421-424.

7. Ezzel,J.W.JR.and Abshire,T.G.(1988).Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*.Infection and Immunity .56(2):349-356.

8 – الخفاجي ، زهرة محمود (2008) . التقنية الحيوية المايكروبية (توجهات جزيئية). معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا. جامعة بغداد.

9. Farchaus ,J.W. ; Ribot, W. J. ; Downs, M. B. and Ezzell, J. W. (1995). Purification and characterization of th major surface array protein from the avirulent *Bacillus anthracis* Delta sterne -1. J.Bacteriol. 177(9):2481-9.

11-الجبوري , أنعام جاسم لفتة (2004). إنتاج المادة التشخيصية لألAnthraxin لتشخيص الإصابة بالجمرة الخبيثة في الحيوانات المختبرية. أطروحة ماجستير/كلية الطب البيطري /جامعة بغداد.

11. Laemmili ,U.K.(1970).Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.Nature (Lond.).227:680-685.

12- الزبيدي , إبراهيم عبد الحسين (2007) . دراسة الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية لبعض المستضدات المستخلصة من بعض عتر البر وسيلا اللقاحية .رسالة دكتوراة /كلية الطب البيطري /جامعة بغداد .

Electrophoresis of Thermo- extracted antigens of *Bacillus anthracis* (Sterne 34F2strain).

Zahid. S.Aziz
College of Education
University of Missan

Abstract: Thermo-extraction of antigens of *Bacillus anthracis* (Sterne 34F2strain) which was genetically attenuated and be used in production of veterinary vaccine had been done. Protein concentration was calcualated (mg/ml),then electophoresis had been done for these extracted antigens by using SDS-Poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).The results revealed that the extracted antigens had 7 protein bands ,it's molecularweight were located between 15.800 to 125.800 Dalton which were estimated according to it's relative movement and compared with standard proteins . The importance of this study reset on the analysis of protein nature of these antigens which in turn very important in many different serological and immunological assays .