**استخلاص وتنقية البورين من بكتريا *Serratia marcescens***

**وتطبيقه على خطين من الخلايا**

**أسيل شاكر محمود**

*معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد*

**الخلاصة :**

تعد بكتريا *Serratia marcescens* من البكتريا الممرضة للانسان اذ ان لها عوامل ضراوة عديدة, تم عزل عامل ضراوة من البكتريا وهو بروتين الغشاء الخارجي البورين باستعمال الطرائق القياسية المطبقة من قبل العديد من الباحثين . اعتمدت طريقة التنقية بصورة اساسية على الاستخلاص الملحي ثم الترشيح باستعمال كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي Sepharose-6-B. وتم بعد ذلك تعيين الوزن الجزيئي لبروتينات الغشاء الخارجي بأستعمال الترحيل الكهربائي تحت ظروف غير ماسخة للبروتين وكان بوزن 36 و 38 كيلو دالتون على التوالي. وكان التركيز النهائي لبروتينات الغشاء الخارجي (Porins) هو 2.91 ملغم \ مليلتر في المستخلص النهائي . تضمنت الخطوة الاخيرة من الدراسة تطبيق البورينات بتراكيز مختلفة (200,100,50,0 ) مع نوعين من الخلايا الخلايا البلعمية والخلايا اللمفاوية واظهرت بعض النتائج لبعض التراكيز فاعلية البورين على هذه الخلايا بنسبة محددة. اذ اعطى التركيز 200 اعلى فاعلية على الخلايا البلعمية , بينما اعطى التركيزين (200,100) اعلى فاعلية على الخلايا اللمفاوية .

**ABSTRACT**

The bacteria *Serratia marcescens* conseder one from pathogenic humen bacteria have several virulence factors, Was isolated one virulans factor outer membrane protein (Porins) was purified and characterization using standard methods applied by several research. Purification way essentially depended on salting extraction followed by gel filtration using Sepharose -6-B chromatography. Molecular weight of porins was estimated using sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis SDS – PAGE and it appears to be 36 and 38 kDa , respectively . The final prepration contained porins in a final concentration of 2.91 mg / ml. The final part of study involved the application of the extracted porins using defferent concentrations (0,50,100,200 µg/ml) for the selected two cell lines macrophages and lymphocyte cells, and some results showed that some concentration of porin effective in limited ratio on these cells.So (200) concentration That will give a highly effective on macrophage cells , While (100,200) concentrations have given highly effective on lymphocyte cells .

**المقدمة :**

بكتريا السريشيا ( *Serratia macescens*)عصيات مستقيمة ذات قطر يتراوح بين 0.8-0.5 مايكروميترتتميز البكتريا بانتاج صبغة وردية او حمراء اللون في درجة حرارة الغرفة وتوجد هده البكتريا بشكل عام في التربة والماء ,ان العتر البيئية من *S.marcescens* تكون غالبا حمراء اللون بسبب انتاجها لصبغة البروديجوسين

تعد بكتريا السريشيا من البكتريا الممرضة كونها مقاومة للمضادات الحيوية التي تعزى الى نضوحية الغشاء الخارجي المسيطر عليه من قبل بروتينات البورين (Bin *et al*. 2011 ; Helvia *et al* 2010) يعد البورين من بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane protein ويوجد في اغلب انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام. وظيفة هذه البروتينات هي بروتينات ناقلة .ان 50% من الكتلة الجافة للبكتريا السالبة لصبغة كرام تتكون من البروتينات واكثر من 20% منها هي بروتينات الغشاء الخارجي . يعتبر البورين من الانتجينات الكبيرة والتي تلعب دورفي تحفيز الجهاز المناعي في بناء السايتوكاينات مثـل IL-1 ,IL-4 ,IL-6,IL-8 وكـذلك TNF-α وIFN-¥ , Granulocyte , Macrophages وعـامـل (GM-CSF) (Galdiero *et al*.1994; Marion *et al.* 2010) .

يوجد البورين بكميات كبيرة في الغشاء الخارجي ويقسم الى قسمين وهي البورينات غير المتخصصة تسمح لنفوذ جزيئات قطبية صغيرة بصورة عامة . والبورينات المتخصصة تقوم بتسريع النفوذ لجزيئات خاصة فقط , يلعب البورين دورا مهما في في التفاعلات مابين البيئه والبكتريا كذلك يلعب دور مهم في وظائف متعددة للخلية يوجد في بكتريا *S.marcescens* بورين OMPF,OMPC وهذه الانواع موجودة في بقية انواع بكتريا العائلة المعوية Enterobacterial Species ..(Sanela and Elizabeth , 2006)

يعد البورين مقاوم الىLactame- β واكثرانواع البكتريا الحاوية البورين تكون مقاومة لمضادات البيتالاكتام , يزداد انتاج البورين في الاوساط ذات الضغط الازموزي الواطئ بينما يقل في الاوساط ذات الضغط الازموزي العالي. والبورين مقاوم الى مادة (SDS) Sodidodecyl sulphate ، والبورينات هي بروتينات حامضية اذ سجلت له PI 5.0 و 4.8 لبورينات OMPF وOMPC . وهذه البروتينات تحتوي على تركيب Beta- sheet ولا يوجد بها كميات كبيرة من تركيب Alpha – helical . (Amit *et al* .2010) .

 الهدف من الدراسة هو عزل عامل ضراوة من بكتريا *Serratia marcescens* البورين وتنقيته ودراسة تأثيره في نوعين من الخلايا .

**المواد وطرائق العمل**

اتبعت طريقة (Kaneko *et al*. 1984) الاستخلاص الملحي لاستخلاص البورين وذلك بتنمية البكتريا على الوسط المغذي الصلب Nuterient agar للحصول على مستعمرة مفردة في 37 ºم مدة 24 ساعة. ثم لقح 100 مل من وسط اللوريا Luria brothالمضاف له 0.2 % سكرالكلوكوز Glucoseو0.1 % حامض الكازامين Casamino acide مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة Shaiker incubator بسرعة 190 دورة \دقيقة مدة 18 ساعة في 37 م0 .بعدها لقح لتر من وسط اللورياLuria brothوالمذكور سابقا موزعا بدوارق زجاجية ذات حجم 500 مل اذ وضع 100 مل \دورق بنسبة 10 % من اللقاح المحضر في الفقرة السابقة وحضنت في درجة 37 م0 بحاضنة هزازة مدة 18 ساعة .نبذت الخلايا البكترية باستعمال جهاز النبذ المركزي المبرد Cooling centerfuge بسرعة 7000دورة \دقيقة مدة 30 دقيقة في درجة حرارة 4 م0, علق راسب الخلايا بمحلول دارئ الترس حامض الهيدروكلوريك Tris-HCL 0.05 مولر ورقم هدروجيني 7.2 .بنسبة حجم واحد من الخلايا الى 5حجم من المحلول ,كسرت الخلايا البكتيرية باستعمال جهاز الامواج فوق الصوتية لمدة (2) دقيقة بدرجة 4 م0 . ثم طرد مركزيِ 7000 دورهِ\ دقيقة مدة 30 دقيقة , تم فصل بروتينات الغشاء الخارجي عن باقي البروتينات بأضافة محلول Sodidodicylsulphate (SDS) الحاوي على 0.4 مولر كلوريد الصوديوم (NaCl)Sodium chlorid. تمت التنقية باستعمال الترشيح الهلامي على عمود sepharos-6B بحسب تعليمات الشركة المجهزة له ثم عبئ الهلام في عمود زجاجي ليعطي هلاما بابعاد 2×60 سم واجريت عليه الموازنة باستعمال دارئ الموازنة محلول دارئ الترس حامض الهيدروكلوريك Tris-HCLبتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7.2بسرعة جريان 30 مل\ساعة, واستردت بروتينات البورين باستعمال ترس حامض الهيدروكلوريك Tris-HCLبتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7.2 وتمت متابعة الاجزاء بقراءة الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر. جمعت القمم المتكونة والاجزاء القريبة منها حتى اجراء التجارب اللاحقة. حيث تم بعدها اختبار نقاوة البورين بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير الماسخة Poly acrylamide gel electrophoresis under non denaturating condetions , حضر هلام الفصل حسب طريقة (Karen *et al*. 2010) بمزج 7.5مل من اكرالمايد بز اكرلمايد Acrylamid-bisacrylamide و 3.7 مل من محلول هلام الفصل و 17.25 مل من الماء المقطر وتمت ازالة الهواء Degasing من المحلول. واضيف 1.5 مل محلول برسلفات الامونيوم Ammonium presulphateو15 مايكروليتر من التمد TEMED. في انابيب الترحيل الكهربائي . ثم حضر هلام الرص بمزج 2.5 مل من Acrylamid-bisacrylamide مع 5 مل من محلول هلام الرص و10 مل ماء مقطر و 1.5مل محلول Ammonium presulphateو15 ميكروليتر من التمد TEMEDالى الانابيب . ثم حضر النمودج بمزج 0.5 مل من دارئ هلام الرص و 5 مايكروليتر من محلول صبغة الفينول الزرقاء Bromophinol blueو 0.1 غرام من السكروز Sucroseو 0.1 مل البورين المنقى واستخدمت البروتينات القياسية المذكورة في الجدول (1) كدلائل للتعرف على الوزن الجزيئي للبورين. اجري بعدها الترحيل الكهربائي اذ وضع محلول دارئ الاقطاب بالمستودع السفلي والعلوي بحيث يغطي سطح الانابيب ثم اضيف 100 مايكروليتر من النموذج ثم اوصل التيار الكهربائي بقوة 2.5 ملي امبير\انبوب في مرحلة الرص و6 ملي امبير \انبوب في مرحلة الفصل مدة 4 ساعة تقريبا, واستخرج الهلام من الانابيب وغمر في محلول صبغة كومازي الزرقاء Commasi blue لحين ظهور الحزم الزرق بوضوح.

جدول (1)البروتينات القياسية المستعملة في تعيين الوزن الجزيئي بطريقة الترحيل الكهربائي

|  |  |
| --- | --- |
| **البروتين** | **الوزن الجزيئي** |
| Albumin | 67000 |
| Ovalbumin | 43000 |
| Carbonic anhydrase | 30000 |
| Trypsin | 20000 |

**النتائج والمناقشة :**

**استخلاص وتنقــية بروتيــنات الغــشاء الخارجــي لبكتـريا** *Serratia marcescens*

 أعطت طريقة (Kaneko *et al* .1984) لاستخلاص وتنقية بروتينات الغشاء الخارجي باستخدام جهاز الذبذبات فوق الصوتية Sonication لتكسير الخلايا البكتيرية، نسبة عالية من الخلايا المتكسرة بإجراء مسحة Smear وتصبغها بملون غرام وقد ايدت نتائج (Kennel and Holt, 1991) ماتوصلنا اليه.

تم استعمال مادة (SDS) Sodidodecyl sulphate لاستخلاص بروتينات البورين من السريشيا *S.marcescens* يعزى سبب استخدام هذه المادة كونها تذيب هذه البروتينات ولاتعمل مسخ للبورين وكانت نتائج ٍ (Kaneko *et al*.1984) التي عملها على بكتريا السالمونيلا *Salmonella Typhimurium* وبكتريا *Enterobacter cloacae* متوافقة الى حد ما مع نتائجنا .وكذلك متوافقة مع ماتوصل اليه (Malouin *et al* 1990) في استخلاص البورين من بكتريا *S.marcescens* .

بعد التنقية على جل الترشيح الهلامي Sepharose -6-B لوحظ ظهور قمتين بروتينية شكل (1)عند قياس الاجزاء على طول موجي 280 نانوميتر وهذه النتائج جاءت متوافقة مع ماتوصل اليه *.*(Murphy *et al.* 1983) في بروتينات الغشاء الخارجي (البورين) المنقاة من بكتريا *Heamophiluse influenza* .

شكل (1) الترشيح الهلامي لتنقية بروتين البورين المنتج من بكتريا *S. marcescens* بأستعمال عمود Sepharose -6- B (60×2) سم وبسرعة جريان 30 مليلتر/ساعة وتمت الموازنة بدارئ Tris –HCL بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7.2 وجمعت الأجزاء بواقع 3 مليلتر/جزء

**اختبار نقاوة البورين بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة**

استخدم الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة للاستدلال على نقاوة البروتين المنتج من قبل بكتريا *S.marcesens* عند تركيز2.91 ملغم \ مل فظهر البورين كحزمتين بروتينية على الهلام مما يدل على نقاوة البروتين كما موضح في شكل (2). وهذا مطابق لما وجد في البورينات المنقاة من بكتريا *Salmonella* *typhimurium* اذ اعطت حزمتين على الهلام و كذلك البورينات المنقاة من بكتريا *Pseudomonas aerogenosa* (Mejhi *et al* . 1997; Galdiero *et al.* 1994).

الشكل (2) الترحيل الكهربائي للبورين على هلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة لمدة اربع ساعات وفرق جهد 6 ملي امبير \انبوب

**الاختبارات المناعية :**

تأثير بروتينات الغشاء الخارجي المنقاة على عيوشية الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs ) والخلايا اللمفاوية .

بينت النتائج التي تم الحصول عليها بعد معاملة الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى والخلايا اللمفاوية بالتراكيز (200,100,50,0) ملغم / مل لبروتينات الغشاء الخارجي المنقاة من بكتريا *S.marcescens* ولمدة ساعة واحدة والموضحة بالجدول (2) من اجل دراسة موت الخلايا المبرمج Apoptosis المتسببة بفعل البورينات . تبين على ضوء ذلك وجود فرق معنوي على مستوى (p< 0.05) في نسب الاستجابة لتراكيز المستضد حيث سجل التركيز (200) ملغم/مل تأثيرا واضح نظرا لظهور الفعل التثبيطي له بكل وضوح فبعد ان كانت (96.3%) لمعاملة السيطرة انخفضت إلى (93.1) بينما التركيز (100,50) لم تسجل فروق معنوية واضحة على الخلايا البلعمية , لقد ذكر (Song *et al*.,2006) في دراسته ان انتاج البورينات من السريشيا قد اعطى افضل النتائج عند معاملته مع انواع مختلفة من الخلايا داخل وخارج جسم الجرذان وقد ايد هذه النتيجة (Amit,2010) ايضا.

بينما وجدنا اعلى نسبة موت في الخلايا اللمفاوية عند التركيزين (200,100) ملغم/مل على التوالي وعلى مستوى p<0.05 فبعد ان كانت النسبة المئوية للعيوشية (97.41) لمعامل السيطرة انخفضت الى (93.6,94.5) على التوالي ايضا عند المقارنة مع معامل السيطرة وتركيز المستضد 50 ملغم/مل هذا يدل ان التراكيز العالية لها نسبة تأثير اكبر على موت الخلايا . بينت دراسة (Malouin *etal*.,1990) وكذلك (Wai *et al*.,2005) كذلك (Marion et al .,2010) ان البورينات قد احدثت اثرا واضحا على خطوط انواع مختلفة من الخلايا HL-60,NH\3T3 . بالنسبة للفروقات البسيطة لبروتينات الغشاء الخارجي فقد وجد أن بعضا منها لها القابلية على الالتصــاق بالخلايا مما يؤثر على وظائف أغشية هذه الخلايا أوقد يفقـدها النفاذيـة الاختيارية وبالتالي موتها ( Morrison , 1989) .

 جدول (2) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا البلعمية متعددة النوى (PMNs) والخلايا اللمفاوية باستخدام تراكيز مختلفة من بروتينات الغشاء الخارجي المنقاة .

|  |  |
| --- | --- |
| تركيز المستضد(ملغم/مل) | النسبة المئوية للعيوشية (المعدل ±الانحراف المعياري) |
| الخلايا البلعمية متعددة النوى((PMNs | الخلايا اللمفاوية |
| 0 (سيطرة) | 96.3±0.1 a | 0.52±97.42 a |
| 50 | 97 ± 0.75 a | 0.5±96.5 a |
| 100 | 0.8±96 a | 2.00±94.5 b |
| 200 | 1.4±93.4 b | c 1.9±93.6 |

الأحرف المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (p >0.05) /(مقارنة بين المعاملات المختلفة).

**References :**

Amit, K. , Eric H., Paolo R. and Matteo ,C. (2010). Structural and dynamical properties of the porins *OmpF* and *OmpC* insights from molecular simulations . Journal of physics. 22 : 45.

Bin, L., Rong, Y., Baoping, L., Qiaomei, T., Yan, L., Guanlin, X. and Guochang, S. (2011). Characterization and comparison of *Serratia Marcescens* isolated from Edible cactus and from Silk worm for virulence potential and chitosan susceptibility. Barazilian Journal of Microbiology. 42: 96-104.

Galdiero, F., Sommese, L., Scarfogliero, P. and Galdiero, M. (1994). Biological activities: lethality, shwartzman reaction and pyrogenicity of *Salmonella* *typhimurium* porins. Microb. Pathog. 16 : 111-119.

Helvia,W., Casullo, D., Fukushima, K. and Galba, M. (2010). Prodiagnosis production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using Renewable - Resources as low cost substrate. Journal Molecules. 15: 6931- 6940.

Kaneko, M.,Yamaguchi, A. and Sawai, T. (1984). Purification and charactrazation of two kinds of porins from *Enterobacter cloacae* outer membrane. Journal of Bacteriology. 158: 1179- 1181.

Karen, Z., Marie, N., William, S. and Christina, W. (2010). Performance comparison of the experion automated electrophoresis system and SDS- PAGE for protein analysis. Bio- Rad laboratories , Inc. 94547 USA.

Kennell ,W. and holt, S. (1991). Extraction, purification and characterization of major membrain proteins from *Wolinella* *recta* AT CC 33238. Infect. Immun.5 9:10

Malouin, F ., Campbell, G ., Halpenny, M ., Becker, G . and Parr, T . (1990). Outer Membrane and Porin Characteristics of *Serratia marcescens* Grown In Vitro and in Rat Intraperitoneal Diffusion chambers . American Society for Microbiology . No(58). 58: 1247-1253.

Marion, J., Violeta, S., Rolf, T. and Christoph A**.** (2010)**.**  Down regulation of porin M35 in *Moraxella catarrhalis* by aminopenicillins and environmental factors and its potential contribution to the mechanism of resistance to aminopenicillin**s.** Antimicrob Chemother. 65: 2089–2096.

Meghji, S., Henderson, B., Nair, S. and Tufano, M. (1997). Bacterial porins stimulate bone resorption. Infect. Immun. 65: 1313-1361.

Morrison, D. C. (1989). The case for specific lipopolysaccharide receptors expressed on mammalian cell. Micro. Pathogen. 7:389-398.

Murphy, T., Dudas, K., Mylotte, J. and Apicella, M. (1983). Subtyping system for an typable *Haemophilus influenzae* based on outer membrane proteins . Journal Infect. Dis. 147:838-846.

Sanela, B. and Elizabeth A. (2006). Worobec Regulation of *Serratia marcescens ompF* and *ompC* porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. Microbiology 152: 485-491.

Song, M ., Bae, J., Lee, D ., Kim, C., Kim, J. and Hong, S. (2006). Purification and Characterization of Prodigiosin produced by Integrated Bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. Journal Biosci . 101:157-161.

Wai, Y. and Chen, W. (2005). Enhaced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMAR by medium improvement and oil-supplementation strategies . Journal Biosci. Bioeng.99:616-622.