استخراج و خالص سازی کپسول استافیلوکوک اورئوس Smith diffuse (Typ 2)

دکتر سید اصغر هوایی [1] ،تقی ناصرپور فریور[2] ، محمود صفاری[3]

خلاصه

سابقه و هدف : جداسازی و استخراج کپسول پلی ساکاریدی اولین قدم در راه تهیه و ساخت واکسن های جلوگیری کننده در عفونت های حاصل از سوش های کپسول دار استافیلوکوک اورئوس می باشد . این تحقیق به منظور استخراج و تهیه کپسول استافیلوکوک اورئوس typ 2 انجام گرفت .

مواد و روش ها: تحقیق به روش توصیفی از نوع اکتشافی است. باکتری استافیلوکوک اورئوس سویه Smith diffuse (ICH 70) بر روی محیط BHI (broth) در انکوباتور شیکردار در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و rpm =۲۰۰ و رسیدن آن به مرحلهٔ رشد نهایی ، کپسول باکتری با روش اسید رقیق شده و حرارت استخراج گردید . سپس در طول شب در مقابل آب مقطر در ٤ درجه سانتی گراد دیالیز شده و آن گاه لیوفیلیزه گردید . پودر لیوفیلیزه شده با استفاده از یک ستون DEAE سلولز به ابعاد cm ۲/۶×۵۰ با روش گرادیانت از بافرهای M ۰/۰۱ تا M ۱ بیکربنات آمونیوم با سرعت ۶۰mt/h کروماتوگرافی تعویض یون Ion Exchange chromatography گردیده و تخلیص شد . پلات طیف جذبی پلی ساکارید به دست آمده و کپسول خالص (استاندارد) با روش کالیمتری توسط اسپکتروفوتومتر اسکن دار رسم گردید .

یافته ها: پلی ساکارید کپسولی از سلول کامل در انتهای فاز رشد نهایی باکتری در HCL ۰/۱ در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به متراکم شود. پلات های مربوط به طیف جذبی پلی ساکاریدهای حاصل و استاندارد با استفاده از روش کالریمتری H2SO4/galcial acetic acid assay در فاصلهٔ ۶۲۰-۳۵۰ نانومتر رسم گردید و نشان داد که کروماتوگرامهای حاصل از اتی ژن تخلیص شدهٔ قبلی و پلی ساکارید جدا شده در این تحقیق تطابق کامل دارد و مؤید صحت کربوهیدرات کپسولی استخراج و تخلیص شده می باشد.

نتیجه گیری و توصیه ها : استخراج و خالص سازی کپسول استافیلوکوک اورئوس Typ 2 مقدور است و تحقیق برای ساخت واکسن های جلوگیری کننده را توصیه می نماید.

واژگان کلیدی : استافیلوکوک اورئوس ، کپسول پلی ساکاریدی ، فاز رشد نهایی ، آنتی ژن تخلیص شده

۱-دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- گروه میکروب شناسی
۲-دانشگاه علوم پزشکی زاهدان- گروه میکروب شناسی
۳-دانشگاه علوم پزشکی کاشان- گروه میکروب شناسی

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس از نظر کپسول پلی ساکاریدی به ۱۱ سر و تیپ مجزا تقسیم می شوند(۱). استافیلوکوک typ 2 دارای کپسول ضخیم بوده و اولین بار از استئومیلیت بیمار جدا گردید .باکتریهای کپسول دار را می توان به فراوانی در نمونه های انسانی و حیوانی مشاهده نمود همچنین ثابت شده است که استافیلوکوک اورئوس کپسول دار عامل ماستیت گاوی می باشد (۲) .شواهد موجود نقش کپسول استافیلوکوک دارای آنتی ژنهای protective بوده و این آنتی ژنهاسبب مقاومت باکتری از عمل فاگوسیتوز می شود و همچنین حضور آنتی بادی اختصاصی ضد کپسول، فاگوسیتوز استافیلوکوک های کپسول دار را تسهیل می نماید (۳،٤) . از طرفی دیگر کپسول این باکتری معمولا فعال شدن راه آلترناتیو کمپلمان را نیز محدود می کند .

علی رغم این که کپسول استافیلوکوک اورئوس با اتصال محکمی (به طور کووالان) به سطح سلول اتصال دارد و حتی با شستشو با عوامل جدا کننده نیز قابل جدا سازی نمی باشد(۵).با این وجود، جداسازی کپسول پلی ساکاریدی از مایع کشت باکتری های کپسول دار در حال رشد امکان پذیر می باشد(٦). این آزادسازی CPS محلول ، کاربرد کلی در پاتوژنز باکتری دارد، زیرا می تواند به آنتی بادی های ضد کپسولی متصل شود (۷). از آنجایی که جداسازی و استخراج پلی ساکارید های کپسولی از مهمترین مراحل تهیه واکسن های ضدکپسولی در باکتریهای کپسول دار است. بنابراین در این تحقیق استخراج وجداسازی استافیلوکوک دارای کپسول ضخیم (typ 2) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش توصیفی از نوع اکتشافی انجام گرفت . استافیلوکوک اورئوس Smith diffuse (ICH 70) را بر روی محیط BHI مایع به طور هوازی در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده و از آنجایی که CPS طی فاز رشد نهایی و یا بعد از آن سنتز می شود در مورد سوش Smith نیز CPS در این مرحله از رشد با استفاده از منحنی رشد در مرحله بعد از مرحلهٔ رشد نهایی باکتریها جمع آوری و سانتریفوژ و در مرحلهٔ استخراج مورد استفاده قرار گرفته است .

استخراج کپسول و تخلیص پلی ساکارید کپسولی :

در ارلن که هر کدام محتوی ۵۰ ml محیط کشت مایع BHI بودند، مقادیر مساوی باکتری تلقیح گردید و سپس هر دو ارلن در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و از یکی از این ارلن ها برای رسم منحنی رشد استفاده گردید تا زمان رسیدن به فاز رشد نهایی مشخص گردد . سپس از ارلن دوم برای تلقیح به۳ لیتر محیط مایع BHI که برای ایزولاسیون کپسول مورد نظر بودند استفاده گردید آنگاه این محیط های کشت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد با rpm=۲۰۰ قرار داه شد و در زمان رسیدن به مرحلهٔ رشد نهایی برای جداسازی کپسول سانتریفوژ گردید .

سلولها را با سانتریفوژ کردن در دور بالا (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری و سپس با ٤۰۰ml سوسپانسون (۰/۰۱ مولار) Hcl در ٤ درجه سانتی گراد از طریق سانتریفوژ کردن شسته و در ۱۰۰ ml از محلول (۰/۱ مولار) Hcl مخلوط نموده و سوپرناتانت را با استفاده از محلول ۱ مولار سود خنثی نموده به طور هم حجم

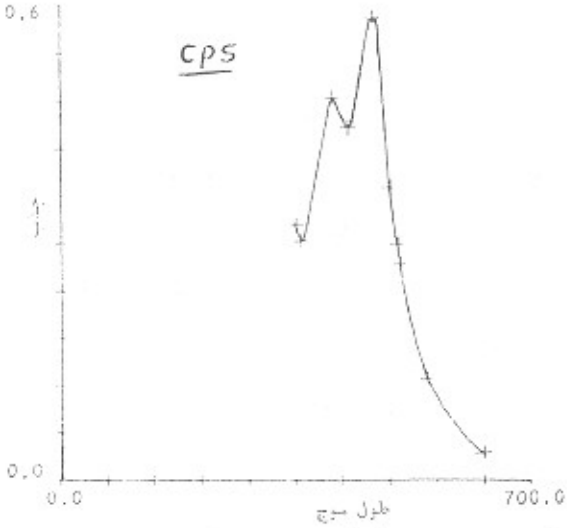
محلول حاصل ازمحلول یک حجم اتانل و ۷/۵ حجم استون را سوپرناتانت خنثی شده افزوده ، سپس پلی ساکارید رسوب شده را با سانتریفوژ جمع آوری کرده و رسوب حاصل را در ۱۰۰ ml آب مقطر حل کرده و در اول شب در مقابل آب مقطر در ٤ درجه سانتیگراد دیالیز و سپس با استفاده از انجماد لیوفیلیزه شدند .

برای انجام کروماتوگرافی تعویض یونی ابتدا پودر لیوفیلیزه پلی ساکارید تهیه شده را در ۵ ml آب مقطر حل نموده و پس از آماده نمودن ستون DEAE سلولز (۲/٦cm × ۵۰cm) و کالیبره نمودن آن توسط بافر بیکربنات آمونیوم در سرعت جریان ٦۰ ml/h در گرادیان ۰/۰۱M تا ۱M از بافر مذکور با حجم ۵۰۰ ml شستشو شد و به صورت فراکشن های ٦ ml در لوله های آزمایش جمع آوری می گردد. لوله ها به صورت یک در میان از نظر وجود پلی ساکارید کپسولی با استفاده از روش اسید استیک H2SO4 مورد بررسی قرار گرفتند و چگونگی شستشوی یک پیگامن زرد که در ٤۷۰ nm جذب می شود به عنوان یک نشانگر قراردادی (۸،۹) مورد استفاده قرار گرفت و الگوی جذبی از ٦۵۰-۳۱۰ nm رسم شدند. لوله های حاوی پلی ساکارید پس از دیالیز در آب مقطر جمع آوری و لیوفیلیزه شدند .

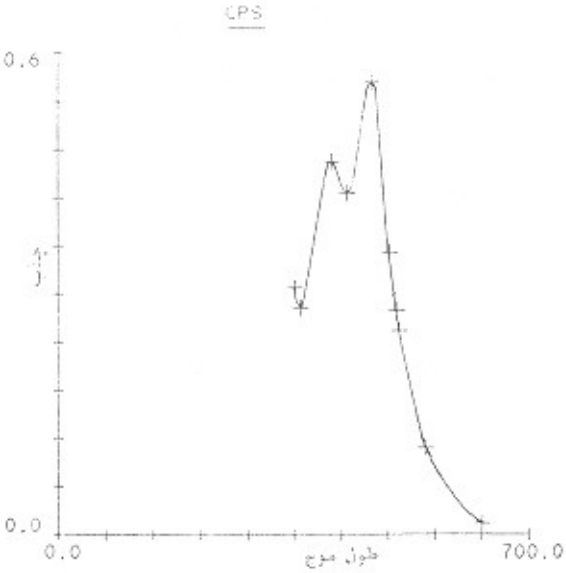
یافته‌ها

مشاهده گردید که پلی ساکارید کپسولی از سلول کامل در انتهای فاز رشد نهایی باکتری در ۰/۱ مولار Hcl در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد . سوش به کاررفته سوش Smith بوده و استخراج و جداسازی با روش های گوناگونی امکان پذیر گردید .

با استفاده از روش کالریمتری galcial acetic acid / H2SO4 assay ، پلات طیف جذبی آنتی ژن جدا شده را از ۳۵۰ تا ٦۲۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفوتومتر اسکنردار رسم نموده (نمودار۱) و با نتایج ارایه شده قبلی (۹) و نتایج حاصل از آنتی ژن تخلیص شدهٔ قبلی (۱۰) (نمودار۲) ارایه گردید و نشان می دهد که منحنی های کربوهیدرات کپسولی استخراج شده با شکل منحنی کربوهیدرات های کپسولی استخراج شده قبلی مطابقت دارد .



نمودار ۱- منحنی مربوط به کربوهیدرات های کپسولی استخراج شده و تخلیص شده S.aureus (Smith diffuse)



نمودار ۲- منحنی مربوط به کربوهیدرات های کپسولی استخراج و تایید شده S.aureus (Smith diffuse) به عنوان استاندارد

تحقیق همچنین نشان داد که نحوه اتصال کپسول پلی ساکاریدی ، پپتیدوگلیکان می باشد و وزن مولکولی کپسول استخراج شده در روش های اسید رقیق و مایع کشت باهم اختلاف دارند . میزان جذب منحنی با تحقیقات قبلی متفاوت بوده و کمتر می باشد و رنگ حاصل برای پلی ساکارید کپسولی ، مشابه تیپ Smith و مقدار پلی ساکارید کپسولی ایزوله شده و میزان جذب در ٤٧٠ نانومتر برابر مقدار اعلام شده COX بود .

بحث

تحقیق نشان داد که استخراج و خالص سازی کپسول استافیلوکوک اورئوس Typ2 مقدور بوده است و نحوه اتصال پپتیدوگلیکان بود . تاکنون نحوهٔ اتصال کپسول پلی ساکاریدی باکتریهای گرم مثبت به دیوارهٔ سلولی به طور کامل مشخص نشده است (٧). در استافیلوکوک اورئوس اتصال کپسول به باکتری بسیار محکم بوده و آن را با سانتریفوژ کردن یا شستشو با دترژانت ها نمی توان از باکتری جدا کرد . به علاوه به نظر می رسد که کپسول مانن تیکوئیک اسید و پروتئین A به طور کووالان به پپتید و گلیکان متصل باشد(٧).

کپسول به دست آمده با روش Turnover باکتری نیز (که در آن آنزیم آمیداز باعث جدا شدن زنجیر تتراپپتیدی جانبی از محل N استیل مورامیک اسید پپتیدوگلیکان می شود) همچنان به پپتیدوگلیکان متصل می باشد (٧). از طرفی، باید توجه داشت که در کپسول پیوند فسفات دی استری بین N استیل گلوکزآمین و N استیل مورمیک اسید ، حساس ترین پیوند به اسید رقیق می باشد (١١) و همین پیوند باعث اتصال کپسول به پپتیدوگلیکان است . اسید رقیق از طریق دیگری نیز در شکستن کپسول و قطعه قطعه شدن زنجیره پلی ساکاریدی آن و در نتیجه آزاد شدن آن از باکتری عمل می کند . در این مکانیسم اثر، اسید رقیق باعث شکستن پیوند اتصالی Gluc NAC-Glu NAC در پلی ساکارید کپسولی باکتری شده و زنجیره های کوچک پلی ساکارید به وجود می آورد(١١).

با توجه ماهیت اسیدی آن ، این پلی ساکارید را می توان از محلول های آبی حاوی آن با استفاده از نمک آمونیوم نوع چهارم رسوب داد و جذب نموده و با کروماتوگرافی تعویض یونی سلولز مثل DEAE سلولز از ستون خارج نمود . علت انتخاب روش انجام شده در این بررسی سازش پذیری بیشتر آن برای تهیه مقدار زیاد کپسول و قابلیت کاربرد آن برای منابع مختلف گوناگون دیگر است. از خصوصیات فیزیکی آنتی ژن جداسازی و استخراج شده، بی رنگی آن و حلالیت آزاد نمک های آن در آب می باشد . پلی ساکارید بدون اسید نیز در آب حل می گردد، چرا که هیچ رسوبی در اثرکاربرد محلول غلیظ نمکی حاصل از آنتی ژن و اسیدسولفوریک رزین کروماتوگرافی تعویض یونی یا اسیدهای معدنی به وجود نمی آید . آنتی ژن ، به راحتی از محلول های نمکی رقیق توسط اتانل رسوب نمی کند . این خصوصیات که بستگی به غلظت آنتی ژن دارد ، اساس جداسازی کارآیی ناخالصی هایی مثل اسید تیکوییک (٨) و اسید نوکلئیک در فرآیند تخلیص با اتانل می باشد. انجام ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی کپسول استخراج شده به روش های اسید رقیق (pH=٤)

تخلیص با اتانل می باشد. انجام ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی کپسول استخراج شده به روش های اسید رقیق (pH=٤) و مایع کشت (حاصل از Turn over) اختلاف چشمگیری را در وزن مولکولی کپسول اسخراج شده با دو روش مذکور نشان می دهد(۱۰). همچنین الکتروفورز به عمل آمده از دو نمونهٔ مذکور این اختلاف وزن مولکولی آنها را مورد تایید قرار داده و نتایج الکتروفورز انجام شده مؤید اتصال پپتیدوگلیکان می باشد(۱۰).

در این تحقیق کروماتوگرام حاصل از اسکن ۳۵۰-۶۳۰ نانومتری کربوهیدرات های کپسولی استخراج شده درمطالعات قبلی (۱۰) و همچنین نمونهٔ جداسازی شده دراین بررسی از نظر شکل منحنی مربوط به مطالعهٔ COX (۱۱) مطابقت دارد. میزان جذب منحنی هوایی و همکارانش (۱۲،۱۰) از نظر میزان جذب با منحنی تحقیق COX (۱۱) مطابقت دارد . اما میزان جذب در منحنی مربوط به نمونه این بررسی علی رغم تطابق شکلی آن با منحنی مطالعه COX (۱۱) و هوایی و همکارانش (۱۰) کمتر می باشد که نشان دهندهٔ غلظت کمتر کربوهیدرات های کپسولی جدا شده در این بررسی است و آن هم احتمالا به خاطرمیزان کمتر باکتری کشت شدهٔ اولیه بوده است . نتاج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصله از تحقیق (۸) Haskell & Hannesian ازنظر رنگ حاصل برای پلی ساکارید کپسولی تیپ Smith مطابقت دارد(۸). ارتباط بین مقدار پلی ساکارید کپسولی ایزوله شده و میزان جذب در ٤٧٠ نانومتر که در دو منحنی این تحقیق دیده می شود که مشابه همان رابطه ای است که توسط COX (۱۱) ارایه گردیده است .جداسازی و استخراج و خالص سازی این کپسول تقدمی برای تهیه و ساخت واکسن های جلوگیری کننده در عفونت های حاصل از سوش های کپسول دار استافیلوکوک باشد که انجام این مهم را توصیه می نماید

References:

۱. هوایی س ا . بررسی خواص مولکولی کپسول استافیلوکوک اورئوس . دومین کنگرهٔ سراسری میکروبیولوژی (خلاصه مقالات)؛ ۱۳۷۵ .

2. Johne BJ. Haaheim LR. Staplylococcus aureus exopoly saccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electrpm microscopy . J clin Microbiol.1984; 27: 1631-1635.
3. Karakawa WW, Sutton A, Schneerson R, Karpas A, Vann WF. Capsular antibodies induce type – specitic phagocytosis of capsulated Staphtylococcus aureus by human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun.1988; 56, 1090-5.
4. Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasits. Ann Rev Microbiol.1988;42: 201-230.
5. Wilknson BJ, Peterson PK, Quie PG. Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of Stphylococcuse aureus capsule: Model for the

antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers. Infect Immun.1979; 23:502-508.

6. Karakawa. WW, kane JA. Immunochemical analysis of a smih – like antigen isolated from two human strains of Staphylococcuse auueus. J Immunol.1975; 115: 564-568.
7. Hancock Cox CM. Turnover of cell surface – bound capsular polysaccharide in Staphylococcuse arueus . FEMS Microbiol.1991; 77:25-30.
8. Haskell TH, Hanessians. The purification and characterization o a new active immunology polysaccharid prepared from Staphylococcuse arueus . Biochem Biophyys ACAT 1964;83:35-41.
9. Hanessian S. Haskell TH. Structural studied on Staphylococcal polysaccharide antigen Biol. Chem.1964; 239:2758-?764.
10. Havaei SA, Hancock IC. The capsular Turnover product of Staphylococcuse arueus strain Smith. FEMS Microbiology.1994; 118:38-44.
11. Cox CA. Biosynthesis of exracillular polysaccharides in Staphylococcuse arueus.Ph.D Thesis:The University of Newcastle Upon type, Uk;1989.
12. Havaei SA. Bilchemical and Immunological studies of staphylococcus aureus capsular polysaccharides. ph.D. Thesis: The univesity of Newcastle upon tyne, UK;1994.