# استخلاص وتنقية عديد السكريد الشحمي LPS من العزلة المحلية *E. coli* O157:H7

# Extraction and partial Purification of ipopolysaccaride (LPS) from *E. coli* O157:H7 isolate

**أشواق باسم جاسم الهاشمي ، عصام فاضل الجميلي ، آمنه نعمة الثويني ، هيثم عزت باقر العمري***

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد
* قسم التشخيص / مختبر الصحة المركزي

**Ashwak B. J. Al-Hashimi , Essam F. A. Al-Jumaily , Amina N. Al-Thiwini , Hitham A. Al-Omari***

Genetic engineering and Biotechnology Institute for graduate studies / Baghdad University
* Central Public Health Laboratory

---

**المستخلص :**

**تم تنقية عديد السكريد الشحمي جزئياً من العزلة المحلية *E. coli* O157: H7 باستعمال كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود السيفاروز –4B بعد ان تم استخلاصه بواسطة خليط الفينول والكلوروفورم والايثر البترولي ، اذ تم الحصول على قمتين للبروتين في حين تم الحصول على قمة واحدة للكاربوهيدرات عند اختبارها بطول موجي 490 نانوميتر ولم يلاحظ أي وجود للاحماض النووية . عند الترحيل الكهربائي فقد ظهرت حزمة واحدة كبيرة وواضحة إذ بلغ الوزن الجزيئي لها 69000 دالتن .**

**Abstract**

**Lipopolysaccharide (LPS) was partially purified from *E. coli* O157:H7 local isolate by Sepharose –4B gel filtration chromatography, after extraction by phenol-chloroform –petroleum ether mixture. The results show the presence of two peaks of proteins; while one peak of carbohydrates when tested at wave length 490nm. Nucleic acids were not found in the sample after partial purification. Electrophoresis pattern shows one large band with a molecular weight of 69000 Daltons.**

---

**المقدمـــة :**

يكون عديد السكريد الشحمي معظم الطبقة الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة غرام ، فهو يقوم بحمايتها من المؤثرات والعوامل الخارجية والتي تؤثر فيها بطريقة او باخرى بامتلاكه تاثيرات مهمة في الجهاز المناعي [1] . فضلا عن ذلك فهو يعد من الاسباب الرئيسة لظهور الاعراض المرضية ولذلك سمي بالذيفان الداخلي (Endotoxin) [2] . يتكون عديد السكريد الشحمي من جزء محب للماء وهو عديد السكريد (polysaccharide) وجزء كاره للماء هو الشحم -أ- (Lipid-A) ، وبصورة عامة فهو يتكون من ثلاثة مناطق اساسية وهي السلسلة النوعية الجانبية -o- (o-specific side chain) [3] ومتعدد السكريد اللب (Core polysaccharide) والشحم -أ- (Lipid-A) [4]. ويقسم عديد

السكريد الشحمي بالاعتماد على التركيب الكيميائي وما يعكسه على شكل الخلايا الى نوعين هما عديد السكريد الشحمي الاملس (SLPS) وعديد السكريد الشحمي الخشن (RLPS) [5].

تستخدم عدة طرق لاستخلاص عديد السكريد الشحمي من سلالات بكتريا *E. coli* منها طريقة ثلاثي كلوروحامض الخليك (TCA) ، وطريقة الماء الساخن في درجة حرارة (6-12) م . واستخدم [5] طريقة الفينول الساخن لتحضير عديد السكريد الشحمي النقي من البروتين والذي يحوي جميع الخصائص السمية للسم الداخلي . اما [6] فقد استخلص LPS من سلالات *E. coli* الطافرة وباستخدام خليط الاستخلاص من الفينول والكلوروفورم والايثر البترولي ، ونظراً لاحتوائها على عديد السكريد الخشن المحب للدهون RLPS فانه يذوب بصورة كلية على عكس الاحماض النووية والبروتينات . أستخدمت طريقة الفينول - ماء لاستخلاص عديد السكريد الشحمي من سلالات بكتريا *E. coli* الملساء ذات عديد السكريد الشحمي الاملس SLPS ، من قبل [9,8,7] كان الناتج غير محفز للجهاز المناعي (Non-immunogenic) . وتوجد عدة طرائق تستخدم الايثر المائي باستخلاص LPS [11,10] حيث يكون الناتج فيها محتوي على مستوى عالي من النايتروجين يتراوح بين 3-9% حيث يؤدي الفينول الى مسخ عديد السكريد الشحمي . تهدف الدراسة الحالية الى استخلاص وتنقية عديد السكريد الشحمي من العزلة المحلية *E. coli* O157:H7 وامكانية استخدامه كطريقة تشخيصية لقياس الاستجابة المناعية .

**المواد وطرائق العمل:**

**تنمية الخلايا :-** حضر لقاح من العزلة المحلية لبكتريا *E. coli* O157:H7 بتنميتها في وسط المرق المغذي ، حضنت عند درجة حرارة 37م ولمدة 18 ساعة . لقح 20 دورق زجاجي ذو سعة 250 مليليتر وبواقع 20 مليليتراً من وسط المرق المغذي لكل دورق ، ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة 100 دورة / دقيقة عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ، نبذت الخلايا بسرعة 6000 دورة / دقيقة عند درجة حرارة 4م لمدة 15 دقيقة . غسلت الخلايا بالماء المقطر ثم بالكحول والايثر وجففت باستخدام المجفف الدوار بدرجة 30-40 م .

تم استخلاص عديد السكريد الشحمي LPS من الخلايا وفق الطريقة الموصوفة من قبل[6] وذلك باستخدام المحلول المتكون من ( الفينول والكلوروفورم والايثر البترولي) وبنسبة (2:5:8) على التوالي اضيف الى الخلايا الجافة بنسبة (4:1) ، نبذ الخليط مركزياً بسرعة 6000 دورة / دقيقة ، جمع الراشح ، الراسب اعيدت عملية الاستخلاص له مرة آخرى وجمع الراشح الثاني مع الاول وتم التبخير باستخدام المجفف الدوار بدرجة 30-40 م . اذيب الناتج بكمية قليلة من الماء المقطر ونقل الى انابيب زجاجية ثم اضاف الماء المقطر الى ان تم ترسيب عديد السكريد الشحمي خلال مدة 1-2 دقيقة ، نبذ الخليط مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة ، غسل الراسب ثلاث مرات بمحلول 80% فينول والايثر ، اضيف للراسب كمية من الماء المقطر وسخن الى درجة 45 م مع الرج بلطف ، نبذ المحلول مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة ونقل الراشح الذي يمثل عديد السكريد الشحمي الى انبوبة زجاجية نظيفة.

**التنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي :-**

أستخدم عمود هلام السيفاروز –4B بابعاد (2×47 سم) وتم موازنة العمود بمحلول الفوسفات الملحي ذو تركيز 0.2 مولر وبرقم هيدروجيني 7.2 وتم استرداد البروتين باستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي برقم هيدروجيني 7.2 وبسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة . وجمعت الاجزاء المتدفقة بحجم 3 مللتر / جزء . تم قياس الامتصاصية للاجزاء المنفصلة عند طول موجي 280 نانوميتر .

تم تقدير محتوى الكاربوهيدرات وفق الطريقة الموصوفة من قبل Dubois *et al.,* [12] . اما محتوى البروتين فقد تم تقديره حسب الطريقة الموصوفة من قبل [13] .

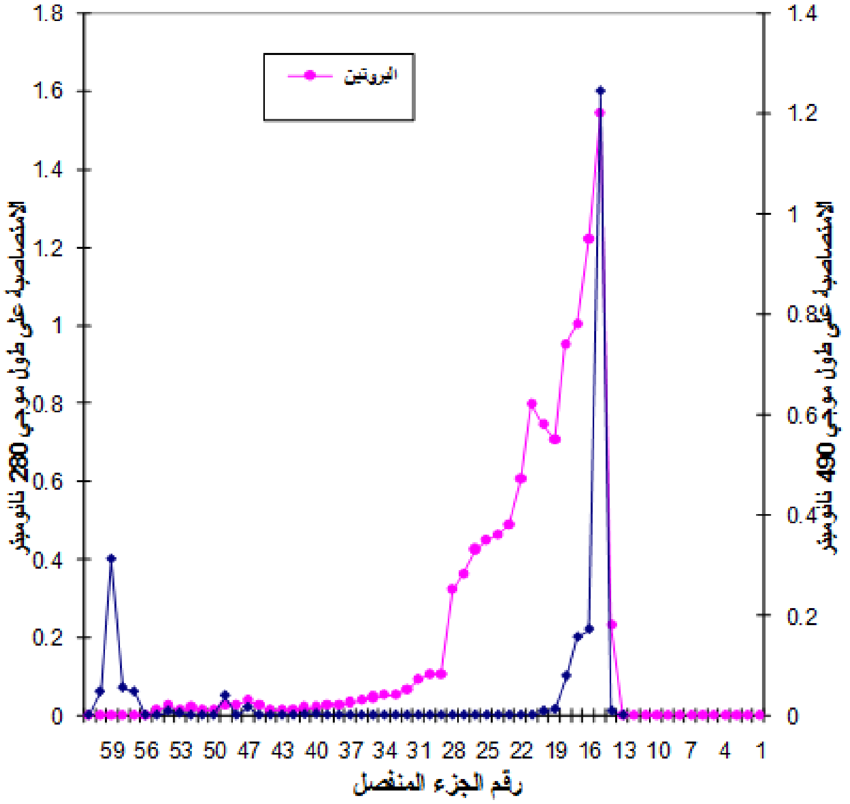
استخدمت طريقة [14] في عملية الترحيل الكهربائي لعديد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة (SDS-PAGE) وبتركيز 7.5% وباستخدام البروتينات القياسية ذات الوزن الجزيئي الواطئ وهي (α -lactoalbumin 144000; Trypsin inhibitor 20000, Carbonic anhydrase 30000; Ovalbumin 43000; albumin 67000 ; Phosphorlyase b 94,000 Daltons.)

**النتائج والمناقشة:**

نميت العزلة *E. coli* O157:H7 في وسط المرق المغذي وباستخدام الحاضنة الهزازة للحصول على كتلة من الخلايا البكتيرية في طور النمو اللوغارتمي إذ تم استخلاص عديد السكريد الشحمي منها وفق طريقة [6] باستخدام خليط الاستخلاص من الفينول المائي والكلوروفورم والايثر البترولي ، تعد هذه الطريقة فضلا عن كونها تعطي مستخلص نقي خالي من المكونات الاخرى كالبروتينات والاحماض النووية فهي تعد من الطرائق المستخدمة لاستخلاص عديد السكريد الشحمي من الطفرات (R mutant) للبكتريا . وبما ان السلالات البرية (Wild strains) للعائلة المعوية وبضمنها *E. coli* تحتوي على اكثر من شكل لعديد السكريد الشحمي في آن واحد والتي تتضمن المحبة للدهون

والمحبة للماء فعليه ان خليط الاستخلاص يتيح الفرصة لجزيئات (LPS) التي فيها المستضد (O) غير متكامل التكوين نتيجة لعدم اضافته بواسطة انزيمات Glycosyltransferase أن تذوب فيه بوصفها مستضداً مهماً ومسؤولاً عن تحديد الصفات المستضدية لعديد السكريد الشحمي [16] .

تمت التنقية الجزئية لعديد السكريد الشحمي (LPS) باستخدام طريقة الترشيح الهلامي على عمود هلام Sepharose-4B ، ( الشكل 1) اذ ظهر وجود قمتان للبروتين في الاجزاء النافذة بقياس الامتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر ، تمثلت القمة الاولى بالاجزاء (14-17) والثانية متمثلة في الاجزاء (57-60) في حين ظهرت قمة واحدة للكاربوهيدرات متمثلة بالاجزاء (14-30) وذلك عند قياس تركيز الكاربوهيدرات في الاجزاء منفصلة من العمود جاءت هذه النتائج متفقة مع [16] .

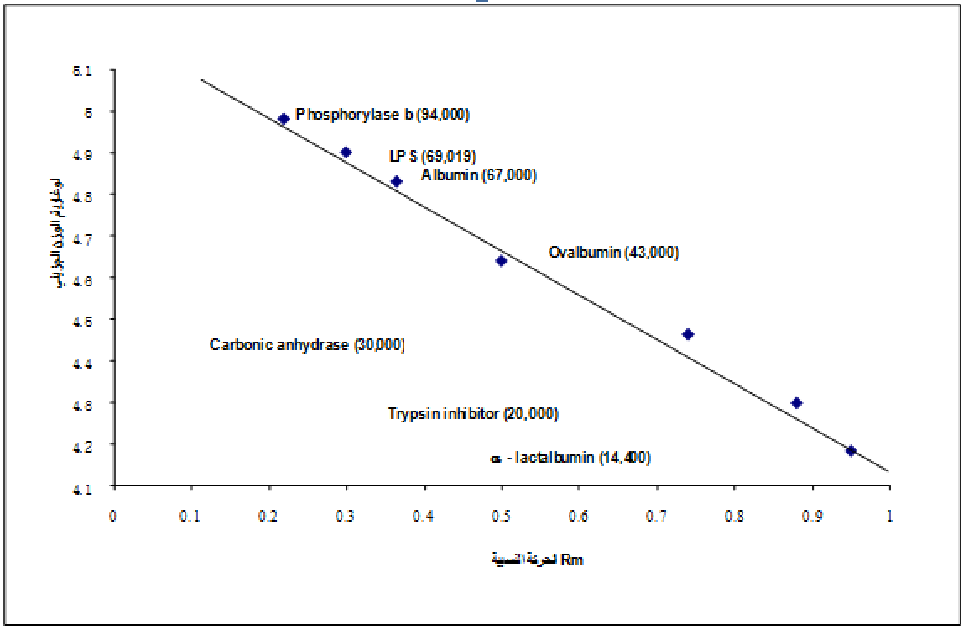



**الشكل (1) : كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي لـ LPS الخام المستخلص من العزلة المحلية *E. coli* 0157 باستخدام عمود Sepharose-4B بابعاد (2 × 47 سم) ، غسل العمود بدارئ الفوسفات وبتركيز 0.2 مولر قدر محتوى البروتينات والكاربوهيدرات في الاجزاء النافذة وبمعدل 3 مللترا لكل جزء وبسرعة جريان 60 مللتر / ساعة .**

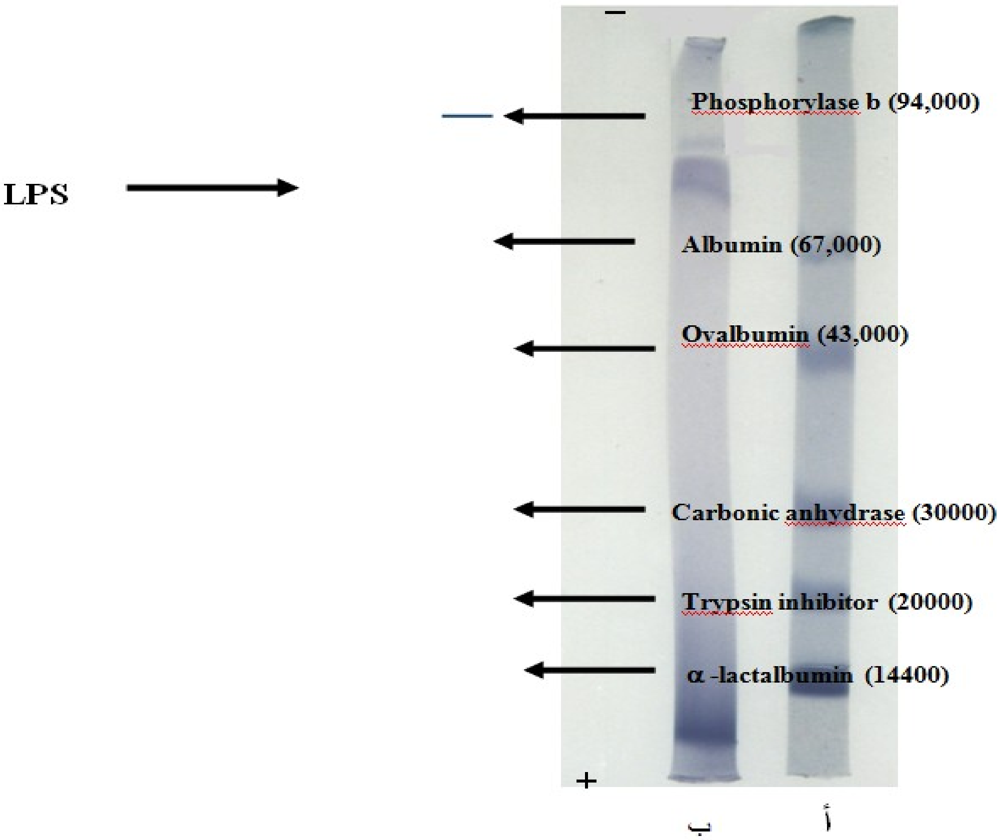
تم قياس النسبة المئوية للبروتينات المرافقة لكل من عديد السكريد الشحمي الخام والمنقى جزئياً و عديد السكريد الشحمي التجاري باستخدام طريقة Laemmli and Favre [14] وقد وجد بان النسبة المئوية كانت 0.88% و 0.39% و0.23% على التوالي ، وهذه النتيجة تدل على ان التنقية التي اجريت على النموذج كانت جزئية مقارنة بالنموذج القياسي وان طريقة واحدة للتنقية لاتكفي للتخلص من البروتينات المرافقة لـ LPS .

اما النسبة المئوية للكاربوهيدرات في كل من المستخلص الخام والمنقى جزئياً فكانت 12.55% في حين لم تلاحظ أي نسبة للاحماض النووية في عديد السـكريد الشحمي الخام والمنقى جزئياً . جاءت هذه النتائـج مطابقة للعديد من الدراسات التي اجريت في العراق ودول اخرى لاستخلاص LPS من بكتريا *E. coli* وغيرها من الانواع البكتيرية والتي اشارت الى عدم وجود قراءات للاحماض النووية في المستخلص الخام والمنقى جزئيا [15,11,10] .

اشارت نتائج الترحيل الكهربائي باستخدام عديد الاكريل امايد وبوجود المواد الماسخة الى وجود حزمة واحدة لعديد السكريد الشحمي المنقى جزئيـا وبوزن جزيئي مقداره 69000 دالتن الشكل (2) في حين لم تظهر أي حزمة لـ LPS التجاري عند امرارها على هـلام الاكريل امـايد وذلك لكونه عالي النقاوة ولايوجد أي بروتين ملوث له الشكل( 3 ) .




**الشكل (2) : تعيين الوزن الجزيئي لـ LPS المنقى جزئياً من بكتريا*E. Coli* 0157:H7 بطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود المواد الماسخة للبروتين SDS و مركبتوايثانول .**




**الشكل (3) : الترحيل الكهربائي بوساطة هلام الاكريــل أمايد بوجود المواد الماسخة SDS ومركبتوايثانول للعزلة المحلية *E. coli* O157:H7**

**أ- البروتينات القياسية　　　　ب- LPS**

**المصادر**


**1.** Moran, A.P. (1997). Structure and conserved characterization of compylobacter jejuni lps. *J. Infect. Dis*. 176 (5): 115-121.

**2.** Hitchcoch, P.J.; Leive, L.; Makela, P.H.; Rietsches, E.T.and Morrison, D.C. (1986). Lipopolysaccharide nomenclature-past, present and future. *J. Bacteria*l.; 166 (3): 699-705.

**3.** Carol,G.; Currie,K.; Callum,I. and Poxton,R. (2001). Mucosal and systemic antibodies responses to LPS of *E. coli* O157 in healthy and disease. *J. Med. Microbiology*; 50: 345-354.

**4.** Cohen, J.I.; Bartlett,J.A. and Corey,G.P. (1997). Extra intestinal manifestation of *Salmonella infection.*Medicine (Baltimore)66: 349.

**5.** Bayston, K.F. and Cohen, I. (1990). Bacterial endotoxin and current concept in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *J.Med. Microbiol*.; 31 (2): 73-83.

**6.** Galanos, C.; Luderitz, O. and Westphal, A. (1969). New method for the extraction of R-lipopolysaccharide. Eur. *J. Biochem*.9: 245-249.

**7.** Milner, K.C. (1973). Pattrens of tolerance to endotoxin. *J. Infect. Dis*. 128 (suppl.): 5237.

**8.** Ribi, E.; Anacker, R.L.; Brown, R. and Haskins, W.T. (1966). Reaction of endotoxin and surfactants. Physical and biological prpperties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. *J. Bacter*. 92: 99.

**9.** Nanalue, N.A.; Nasserkhan, G. and Mustafa, N. (1999). Crossreactivity between six enterobacteriacea complete lipopolysaccharide core chemotypes. *J. Med. Microbiology*. 48: 433-441.

**10.** الاحمر ، سيف داود (2000) . دراسة وراثية وكيموحيوية لبكتريا *Shigella* وعلاقتها بصبغة الكونغو . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد .

**11.** الغراوي ، جميلة غضبان (1998) . دراسة عن استخدام عديد السكريد الشحمي لمعالجة وقائية من اخماج الجهاز البولي في الجرذان . اطروحة دكتوراة . كلية العلوم . جامعة بغداد .

**12.** Dubois, N.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Coloerimetric method for the detection of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 28 (3): 350-356.

**13.** Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilize the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*.; 72: 248-254.

**14.** Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973). SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Mol. Biol*. 80, 573-599.

**15.** Carol, G.; Gurrie, K.; Callum, I. And Poxton, R. (2001). Mucisal and systemic antibodies responses to LPS pf *E. coli* :O157 in healthy and disease . *J. Med. Microbiology*. 50: 345-354.