الاستخلاص والتنقية الجزئية لبروتين الالتصاق FimH من خمل النمط الاول لبكتريا *E. coli* المعزولة من اخماج الجهاز البولي

*اليس كريكور** *مروج عبد الستار**

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

الخلاصة

استخلص خمل النمط الاول من عزلة لبكتريا الـ *E.coli* معزولة من دراسة سابقة حسب طريقة Brinton المحورة والتي امكن من خلالها الحصول على 2.8 ملغرام خمل / 10 غم بكتريا ، اتبعت طريقة الاذابة واعادة البلورة ، واستعمال سلسلة من المحاليل التي ساعدت على عملية اذابة الشوائب المرافقة لبروتينات الخمل لغرض التنقية وكان ناتج عمليات التنقية الجزئية هذه الحصول على 2.1 ملغم/10غم بكتيريا . استخلص بروتين الالتصاق FimH وتنقيته جزئيا باستعمال كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي .فوجد ان تركيز بروتين الالتصاق كان 250 مايكروغرام / مل ،في حين بلغ تركيز بروتين الخمل 50.6 مايكرومايكوغرام / مل . ومن خلال تقنية الترحيل الكهربائي باستعمال عديد الاكريل امايد بوجود المادة الماسخة SDS ، تم تحديد الوزن الجزيئي لبروتين الالتصاق وبروتين الخمل حيث بلغ 28300 ، 17500 دالتن على التوالي عند المقارنة بمنحنى البروتينات القياسية .

الكلمات المفتاحيه: بوتين اللتصاق ، خمل النمط ، *E. coli*

المقدمة :

تعد اللواصق Adhesions للبكتريا المرضية احد عوامل الفوعة ففي العديد من الاخماج التي تصيب الجهاز التنفسي ، البولي ، الهضمي تشكل اللواصق الخطوة الاولى في تموقع البكتريا وتمركزها ومن ثم تكاثرها وبالتالي احداث الاصابة [1] . ففي بعض الاحيان هناك لاصق واحد يظهر ويكون له الدور المهم في عملية حدوث المرض ، وفي احيان اخرى فان العديد من الممرضات البكتيريه تظهر قابليتها على انتاج العديد من اللواصق المختلفة ، وعلى مراحل مختلفة من عملية الاصابة ، وهذا يعد مهما في بيان فوعة البكتريا . ان الغاء قابلية البكتريا المرضية على التماس ومن ثم التموضع على النسيج الخاص لاحتوائه على المستقبل الخاص باللاصق البكتيري يعد كافيا لجعل البكتريا غير ضارية [2]. فالدراسات حول بكتريا *E.coli* التي تصيب المسالك البولية والمحتوية على اللاصق FimH الحساس للمانوز في خمل النمط الاول له الدور في امراضية هذه البكتريا في المسالك البولية [3] .مما يبين ان مشتقات FimH لعزلة الـ *E.coli* التي تصيب المسالك البولية من الانواع المصلية H7:K1:O1 تعمل على اختزال البقاء والقابلية والقابلية على توليد الالتهاب في المسالك البولية في الفئران . خمل النمط الاول عبارة عن تراكيب شعرية بطول 1 مايكروميتر وبقطر 7 مايكروميتر تبرز من السطح الخارجي للبكتريا ، وتتميز بقدرتها على الالتصاق بالمستقبلات نوع الحساسة للمانوز ، فهذا النمط من المستقبلات موجود في انواع عديدة من الخلايا حقيقية النواة [4]. فهذا النمط من العضيات اللاصقة موجود في العديد من الاحياء المجهرية السالبة لملون غرام والتابعة للعائلة المعوية [5] . ومن خلال تجارب الهندسة الوراثية التي اجريت على هذه البكتريا والحاوية على هذه العضيات ومن خلال افقاد هذه الصفة لدى هذه البكتريا وجد ان البكتريا ان البكتريا الفاقدة لهذه العضيات غير قادرة على احداث خمج السبيل البولي . ولأهمية هذا الجزء الحيوي (اللاصق) ودوره في احداث الاصابة ارتأينا اجراء عملية استخلاص وتنقية جزئية له .

المواد المستعملة : استعملت بكتريا *E.coli* معزولة من دراسة سابقة من احد المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية وشخصت اعتمادا على مصنف بركي [6]. اختبرت درجة حساسيتها لثلاث مضادات حياتية شائعة الاستعمال في علاج التهابات المسالك البولية هي امبسلين ، الجنتامايسين ، السبروفلوكساسين . اختبرت العزلة لفحص التلازن للكشف عن وجود خمل النمط الاول باستعمال 2% من محلول كريات الدم الحمراء لخنازير غينيا والمغسولة عدة مرات بوساطة داريء BSA-PBS لغرض منع الارتباطات اللانوعية التي ممكن ان تحصل بين RBC والبكتريا ، وان فترة الاختبار (حصول التلازن) تتراوح بين 30 – 60 ثانية ، وحدوثها يدل على وجود خمل النمط الاول لهذه البكتريا [7] .

* كلية العلوم/قسم التقنيات الاحيائية

الاستخلاص والتنقية الجزئية للاصق FimH :
حضر وسط واطيء الكلوكوز من (سترات الصوديوم 1 غم ، ديكستروز 2غم ، فوسفات البوتاسيوم احادي الهيدروجين 7 غم ، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 3 غم ، كبريتات الامونيوم 1 غم ، كبريتات المغنيسيوم المائية 0.1 غم ، اغار 20 غم ، ماء مقطر 1 لتر مع ضبط قيم pH 7.2 ودرجة الحرارة – المستلزمات والظروف السابقة الذكر جميعا لها الدور في انتاج خمل النمط الاول المتخصص وبالتالي انتاج اللاصق المطلوب [8] .

استخلاص وتنقية خمل النمط الاول جزئيا :اتبعت طريقة برنتون [9] والمحورة من قبل مارك وجماعته [10] لغرض استخلاص وتنقية خمل النمط الاول من بكتريا *E.coli* موضوع الدراسة باستعمال داريء Tris HCl (pH 7.4) وعيارية 10 ملي مولر . ومواد الترسيب والتنقية الجزئية (كلوريد المغنيسيوم اللامائي ،وكبريتات الامونيوم ، وداريء التنقية الجزئية ذو pH 7.2 و داريء Tris ذو pH 0,1 مولار والمحضر من Tris base 0,61 غم / 50 مل ، و EDTA 0,75 غم / 50 مل . ومادة Triton x-100 .

مواد ومحاليل تنقية بروتين الخمل وبروتين الالتصاق : استعمل داريء تنقية بروتين الخمل ذو pH 8 وعيارية 0,01 مولار ويتكون من (SDS 4غم ، و 2B-Mercaptoethanol (1مل) ، Tris base (1,2 غم)) / 100 مل ، ومحلول SDS 4% ومحلول حامض الفورميك 40% و n-butanol .

مواد كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي : حضر عمود الهلام على وفق طريقة تايموك وجماعته [11] وتم قياس الامتصاصية للاجزاء النافذة على طول موجي 600 نانوميتر ، واستعمل هلام Sephadex -100

مواد المنحنى القياسي : حضرت باستعمال تراكيز مختلفة من BSA (100 ، 200، 300 ، 400، 500 ،600) مايكروغرام / مل وقيست التراكيز باستعمال طريقة برادفورد ليكون كمرجع .

مواد ومحاليل الترحيل الكهربائي في الهلام(SDS-PAGE): استعملت طريقة الترحيل الكهربائي على وفق طريقة لاملي [12] وحضرت المحاليل الخزينة وفق [13] ، حضرت مادة اكريل امايد- بس اكريل امايد بتركيز 30 % .

البروتينات القياسية : استعملت بروتينات BSA 67000 دالتون ، Ovalbumin 43000 دالتون ، αs-Casein 25000 دالتون ، β- Lactoglobulin 18400 دالتون ، اذيبت هذه البروتينات بـ 0.2 مل من الداريء الخزين للانموذج .

المواد وطرائق العمل :
اختيرت مستعمرات البكتريا المنماة على وسط الكلوكوز الواطيء ذات الحدود الدائرية الكاملة بعد فترة حضانة لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 40م ، وللتاكد من ان البكتريا المنتخبة منتجة لخمل النمط الاول ، اجري اختبار التلازن الدموي باستعمال دم خنازير غينيا ، اذ سحب 0.5 مل دم ومزجت بـ (1 مل) من مادة EDTA عيارية 20 ملي مولار (كمضاد للتخثر) بعدها غسلت الـ RBC بداريء الفوسفات الملحي ذي pH 7.2 لمرتين مع الترسيب في كل مرة باستعمال المنبذ وبسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة ، ثم غسل الراسب بداريء الفوسفات الملحي الممزوج مع البومين المصل البقري BSA بتركيز 1% ، ثم علقت الخلايا بالداريء الاخير مع ضبط تركيز الخلايا لتكون 2% ، ومن ثم اجري اختبار التلازن الدموي للبكتريا على شريحة زجاجية نظيفة ، بمزج حجم متساوي من 2% RBC مع البكتريا المحضرة . بعد التاكد من ان البكتريا منتجة لخمل النمط الاول اختيرت المستعمرات بالمواصفات المطلوبة ونقلت الى اطباق حاوية على وسط Z بعد استبدال مادة التربتون بمادة ماء التربتون ، ونشرت على الاطباق بطريقة التخطيط ووضعت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 37 م ولمدة 18 – 24 ساعة ، ثم تحصد البكتريا باستعمال داريء الفوسفات الملحي pH 7.2 ، ورسبت باستعمال المنبذ المبرد وبسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة ، اعيد الغسل لمرتين وباستعمال نفس الداريء ثم علق الراسب البكتيري باستعمال داريء الترس – حامض الهيدروكلوريك pH 7.2 وعيارية 10 ملي مولار .

تحضير خمل النمط الاول: علق 50 غم من الراسب البكتيري الذي تم جمعه سابقا بداريء Tris HCl ذو pH 7.4 ، ووضع في الخلاط وعلى السرعة القصوى لمدة 5 دقائق ، وبعدها نبذ باستعمال المنبذ المبرد وعلى سرعة 10000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 4م ،ومن ثم جمع الراشح من كافة الخطوات ويضاف من ثم كلوريد المغنسيوم اللامائي بصورة تدريجية الى الراشح مع الخلط المستمر ليصبح التركيز العياري النهائي 0.1 مولاري وبظروف تبريد مناسبة لمنع المسخ البروتيني ولمدة 15 دقيقة ، ومن ثم ترك الراشح بالثلاجة وعند درجة حرارة 4 م ولمدة 18 ساعة لغرض تكوين بلورات ابرية باحجام مختلفة ، وذات لون ابيض غير شفاف ، نبذ الراشح باستعمال منبذ مبرد وعلى سرعة 15000 دورة / دقيقة ولمدة ساعة ، ومن ثم جمع الراسب البلوري وعلق باستعمال داريء الترس هايدروكلورايد pH 7.4 ووضع في انابيب معقمة ذات سداد معدني . ومن ثم اذيبت البلورات باستعمال نفس الداريء واعيد

ترسيبها بعملية اعادة البلورة باستعمال كلوريد المغنيسيوم ولثلاث او اربع مرات لحين الحصول على خمل بدرجة نقاوة 96 % [10]. حضنت بلورات الخمل بدرجة حرارة 4 م لمدة 18 ساعة بعدها اضيف Triton X-100 ليصل التركيز النهائي له 0.2 % ، مزج الناتج لمدة ساعة مع المحافظة على درجة حرارة 4 م ، ثم اضيف ملح كبريتات الامونيوم بنسبة تشبع نهائية قدرها 45% مع استمرار المزج لمدة ساعة ولنفس درجة الحرارة السابقة لحين الحصول على بلورات بيضاء شفافة .

فحص خمل النمط الاول المنقاة جزئيا باستعمال المجهر الالكتروني النافذ ، والمصطبغة بالصبغة السالبة Negative stain .

تنقية بروتين الالتصاق FimH : اخذت 40 ملغم من البلورات (الخطوة السابقة) وعلق بـ (5 مل) من داريء التنقية الجزئية ، ووضع الخليط على المحرك الدوار وباستعمال المحرك المغناطيسي لمدة ساعة وبدرجة حرارةالغرفة لغرض التخلص من الشوائب المرافقة للخمل ، ثم رسب الخمل باستعمال المنبذ وعلى سرعة 15000 دورة / دقيقة ولمدة 30 دقيقة ، ثم اخذ الراسب واهمل الراشح ، مزج الراسب بمحلول 4% SDS وبكمية 10 مل ووضع في حمام مائي وعلى درجة 50 م وبقى على هذه الحالة لمدة 5 دقائق لاذابة البروتينات الاخرى المرتبطة ببروتين الخمل ثم نبذ المحلول باستعمال المنبذ الفائق المبرد وبسرعة 50000 دورة/ دقيقة ولمدة ساعة وبدرجة حرارة 10 م وليس اقل من ذلك لمنع ترسيب SDS ، الراسب الناتج يعد بروتين الخمل. اخذ الراشح من الخطوة السابقة والحاوي على مكونات مختلفة من بروتينات الخمل ومن ضمنها بروتين FimH ، ركز الراشح باستعمال اكياس الديلزة الى خمس الحجم الاصلي ليصبح حجم الراشح المركز 2 مل ثم اضيف 6 مل من n-Butanol للتخلص قدر الامكان من الـ SDS ، ثم نبذ باستعمال المنبذ المبرد على سرعة 6000 دورة/دقيقة وعلى درجة حرارة 10 م ولمدة 15 دقيقة لكي تتكون الاطوار التي يمكن من خلالها فصل الطور العلوي الذي يحتوي على n-Butanol بالاضافة الى الـ SDS ، اما الطور السفلي فقد يحتوي على كميات قليلة جدا من بروتين الخمل متخذا شكل تكتلات في الراشح لذلك يصار الى ترشيح الراشح باستعمال مرشحات دقيقة بقطر 0.45 و 0.2 مايكروميتر على التوالي لكي يتم التخلص من التكتلات الكبيرة لبروتين الخمل اما القطع الصغيرة فيتم التخلص منها لاحقا .اما البروتينات الاخرى المرافقة لبروتين الخمل فقد تم ترسيبها بوضع الراشح في انابيب زجاجية واستعمل 19 حجم من مزيج المواد الاتية (اسيتون – ثلاثي اثيل امين – حامض الخليك) وبكمية (5:5:85)على التوالي وعند درجة حرارة 4 م ، ثم نبذ على 50000 دورة/ دقيقة ولمدة 30 دقيقة . ثم اخذ الراسب واهمل الراشح وللتخلص من مادة ثلاثي الاثيل امين وحامض الخليك المتبقيان غسل الراسب بالاسيتون ومن ثم ترك ليجف بالهواء ، ثم اضيف للراسب حامض الفورميك 40%وبكمية 1-2 مل / ملغم بروتين وترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة لغرض ترسيب بروتين الالتصاق FimH ثم نبذ باستعمال المنبذ الفائق السرعة 50000 دورة/ دقيقة ولمدة ساعة ، اخذ الراسب وغسل بالاسيتون وجفف الراسب الناتج والذي يعد غنيا ببروتين الالتساق ، ثم علق بداريء PBS ذو pH 7,2 . ومن ثم نقى بروتين FimH باستعمال تقنية كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي وفق طريقة تايموك وجماعته[11] باستعمال هلام Sephadex G-100 ، وبعمود حجم 2,5 ×100 سم .

الترحيل الكهربائي PAGE : اجري الترحيل حسب طريقة لاملي [12] من خلال تحضير هلام الفصل بتركيز 10 % وبقدرة 5 ملي امبير/ عمود هلام لمدة 30 دقيقة في مرحلة الرص ومن ثم رفعت قدرة التيار الى 10 ملي امبير / عمود هلام في مرحلة الفصل واستمرت عملية الترحيل لمدة 8 ساعات مع المحافظة على درجة الحرارة على 10 م . واستخرجت قيمة الحركة النسبية Rm لكل بروتين حسب المعادلة التالية :

الحركة النسبية = المسافة التي قطعها البروتين / المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الازرق .

تحضير الانموذج : علق 1 ملغم من الانموذج بـ 0.02 مل من داريء Tris Hcl ذو 6.8 pH و 0.05 مل من محلول 1% SDS و 0.01 من ميركبتوايثانول ووضع في حمام مائي وعلى درجة حرارة 50 م لمدة دقيقتين ، ومن ثم مزجه مع الكليسيرول وبكمية 0.016 مل وبروموفينول الازرق 0.25 %بكمية 5 مايكروليتر .

تحضير البروتينات القياسية : محلول البروتينات القياسية استعملت لمعايرة بروتينات الانموذج المحضر وذلك باذابة البروتينات القياسية المجفدة بـ0.2 مل من المحلول الداريء الخزين للانموذج .

ومن معرفة الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية الموجودة في المحلول وقيمة الحركة النسبية لكل منها رسمت العلاقة بين الـ Rm ولوغارتيم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية ، وبعد استخراج قيمة Rm لبروتين FimH و الـ Fimbrin واسقاطها على المنحنى القياسي امكن تقدير الوزن الجزيئي للبروتينات المطلوبة .

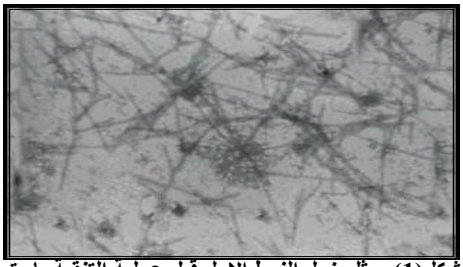
النتائج والمناقشة :

اختبار التلازن الدموي للبكتريا المختارة : اظهرت نتائج الاختبار باستعمال 2% من RBC لخنزير غينيا حدوث التلازن الدموي خلال 30-60 ثانية دليل على احتواء البكتريا على خمل النمط الاول التي لها قابلية الارتباط حصرا واحداث عملية التلازن الدموي فقط دونا عن باقي انواع الخمل الاخرى الموجودة على السطح الخارجي للبكتريا وهذا الاختبار يعد تشخيصيا لغرض التاكد من وجود هذا النوع من الخمل[11,14] .

الاستخلاص والتنقية الجزئية للاصق FimH

انتاج خمل النمط الاول المتخصص:ان انتاج خمل النمط الاول المتخصص يعد من اهم النقاط الرئيسة لتكوين اللاصق المطلوب ، فان تكوينه يعتمد بشكل كبير على مكونات الوسط المستعمل ، فوسطي الكلوكوز الواطيء و Z مع ضبط الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة ، جميعا لها الدور الرئيس في انتاج خمل النمط الاول وبالتالي انتاج اللاصق FimH [8,15] ، فقد بينت نتائج الادبيات العلمية بالنسبة لاستعمال اوساط معقدة مثل الوسط الزرعي المغذي ومرق التربتكيز الصويا فانهما يجعلان البكتريا فانهما يجعلان البكتريا غير قادرة على انتاج خمل النمط الاول المتخصص او انتاجها بشكل واطيء بسبب وجود الحامض الاميني L-alanine يعمل على تثبيط انتاج الاصق FimH لذا تعد الاوساط المستعملة في الدراسة هي المفضلة لانتاج هذا النوع من الخمل المتخصص ، وقد تم الحصول على ما يقارب (4.5 غم) وزن جاف من الخلايا لكل لتر من الوسط الزرعي الصلب Z [16].

استخلاص وتنقية خمل النمط الاول جزئيا : اتبعت طريقة برنتون [9] والمحورة من قبل مارك وجماعته [10] لغرض استخلاص وتنقية خمل النمط الاول من البكتريا موضوع البحث ، فهي طريقة مناسبة سمحت بالحصول على كمية من خمل النمط الاول الذي بلغ 2.8 ملغم / 10 غرام بكتريا ، والتي اظهرت فعالية تلازن دموي ، ان عملية الاذابة واعادة البلورة للخمل ساعد في عملية الحصول على كم من الخمل خالية قدر الامكان من المواد غير الخملية والتي تمثل المرحلة الاولىمن عملية التنقية ،وعادة قابلية التلازن الدموي تكون مرتبطة بالخمل وليس مع الجزيئات والشوائب الذائبة فبعدعمليات اعادة البلورة فان كميات قليلة من ملوثات جدار الخلية البكتيرية ظهرت موجودة ومتكتلة مع الخمل شكل (1) ،



شكل(1) يمثل خمل النمط الاول قبل عملية التنقية باستعمال مجهرالالكتروني قوة 50000 x

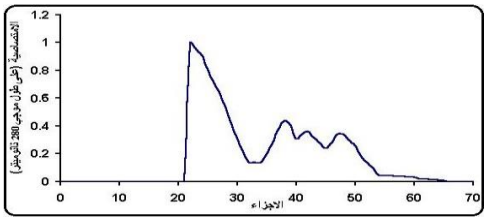
وامكن التخلص منها بمعاملة الخمل بمحلول Triton-EDTA وذلك لان مكونات هذا المحلول لها القابلية على تخليص الخمل من ملوثات الجداروالغشاء الخلوي العالق بها ، لذا فمكونات الجدار والغشاء تبقى طافية في المحلول بعد ترسيب الخمل باستعمال كبريتات الامونيوم ، ولغرض زيادة نسبة نقاوة راسب الخمل فانه عومل مع محلول (2β-Mercaptoethanol – SDS) كل منهما يعدان من المواد الماسخة للبروتينات ، نتج عن هذه الخطوة بعد عملية الترسيب 2,1 ملغم / 10 غم وزن بكتيري جاف والتي تمثل المرحلة الثانية عملية التنقية الشكل (2) وهذا لا يتفق مع دراسة [17] اذ بلغ الوزن الذي حصل عليه 4.3 ملغم /10 غم وزن بكتيري جاف وهذا متوقع لكون البكتريا المستخدمة لديه مهندسة وراثيا لانتاج هذا النوع من الخمل .

شكل(2) يمثل خمل النمط الاول بعد عملية التنقية باستعمال المجهر الالكتروني قوة 50000x

فصل مكونات خمل النمط الاول : ان استعمال محلول SDS 4% مع حرارة تصل اى درجة 50 م ، ادت الى فصل البروتينات المرافقة لبروتين الخمل وهي الـ FimH وكل من بروتيني 16500 ، و 14500 دالتن جزئيا عن باقي المكونات . وللتخلص من مادة الـ SDS بشكل نهائي ، عومل الانموذج الناتج بمزيج من المواد (اسيتون – ثلاثي اثيل امين – حامض الخليك)، فبالاضافة للهدف السابق ، فان المحلول عمل على تركيز البروتينات المرافقة لبروتين الخمل وترسيبها من خلال عملية النبذ ، لان معظم البروتينات تترسب عند استعمال المذيبات العضوية كالاسيتون وثلاثي اثيل امين [17] وللحصول على بروتين الالتصاق عومل الرايب بمحلول حامض الفورميك تركيز 40% ، وبدرجة حرارة الغرفة لغرض اجراء عملية فك بلمرة بروتين الخمل وذوبانه مع البروتينات المرافقة بشكل جزئي في الحامض عدا بروتين

الالتصاق FimH الذي يكون معظمه غير ذائب وهذا يعني ان بروتين FimH قد وصل الى نقطة من درجة الرقم الهيدروجيني التي يكون فيها البروتين غير ذائب ، والتي عندها يكون البروتين غير حامل لاية شحنة ، مما يؤدي الى تصادم اليكتروستاتيكي بين جزيئات البروتين ، لذلك يتجه نحو الترسيب ، لكون اذابة البروتينات في المحاليل تتاثر بصورة كبيرة بدرجة الرقم الهيدروجيني والقوة الايونية ودرجة الحرارة وثابت العزل الحراري للمذيب [18]

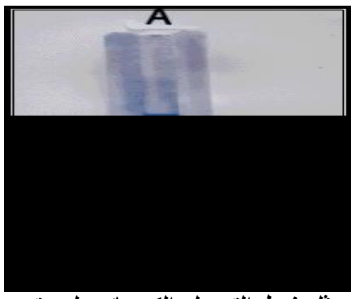
التنقية الجزئية لبروتين الالتصاق FimH : تمت تنقية بروتين FimH باستعمال كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي [19] ، مرر محلول الدكستران الازرق خلال العمود وجمعت الاجزاء النافذة بسرعة جريان 12 مل/ ساعة وبواقع 3 مل / انبوب وقيست الامتصاصية على طول موجي 600 نانوميتر ، ولتنقية بروتين الـ FimH ، فقد استرد بنفس ظروف استرداد الدكستران الازرق، وتم تتبع وجود بروتين الالتصاق ، والمكونات البروتينية الاخرى المرافقة كبروتين الخمل والبروتينات ذات الاوزان الجزيئية 16000 ، 14500 دالتن في كل جزء من الاجزاء النافذة ومن خلال (الشكل3)



شكل(3) يمثل المنحنى الناتج من عملية الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100 وبعمود قياس 2.5 x 100

النتائج فقد جمعت الاجزاء (25-37),(40-44) التي تمثل الاجزاء الحاوية على بروتين FimH وبروتين الخمل على التوالي ، وركزت باستعمال اكياس الديلزة ، ليكون الحجم النهائي لكل مجموعة 5 مل ، ولتعين تركيز البروتين في مركز الاجزاء التي جمعت استعملت طريقة [20] ، واعتمادا على المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري كمرجع تم معرفة تركيز الاجزاء وكانت (250، 50.6) مايكروغرام/ مل لكل من بروتيني FimH وبروتين الخمل على التوالي ، وهذا يدل على ان طريقة التنقية المتبعة قد نجحت في عملية فصل المكونات البروتينية عن بعضها ولو بشكل جزئي وهذا يتفق مع [21] في حصول عملية الفصل الجزئي للمكونات البروتينية للخمل في منطقة الحجم الخالي بالنسبة لبروتين FimH مما قد يدل على حصول عملية بلمرة لوحدات البروتين ادى الى انفصاله في هذه المنطقة ، ولكنها لاتتفق بنتائج الحاصل البروتيني بالنسبة لبروتين الالتصاق في دراستهم والبالغ 645 مايكروغرام / مل ، وقد يعود ذلك لنفس السبب السابق من ان البكتريا المستعملة مهندسة وراثيا لهذا الغرض بالاضافة الى استعمال اجهزة اكثر دقة وقدرة من الاجهزة المستعملة لدينا

الترحيل الكهربائي SDS-PAGE: تعد هذه الطريقة احدى الطرائق المستعملة لمعرفة درجة نقاوة الانموذج ولتقدير الاوزان الجزيئية للبروتينات بوساطة حركتها الانتقالية في هلام عديد الاكريل امايد الحاوي على المادة الماسخة SDS التي تعمل على مسخ البروتين نتيجة التاثيرات الهايدروفوبية التي تعملها مع البروتين مانحا اياه شحنة سالبة ، اما مادة 2-β-mercaptoethanol مع الحرارة فتعمل على اختزال اصرة S-S الى S-H وبالتالي تحلل البروتين الى وحداته التحتية ان وجدت [22]. اظهرت نتائج الترحيل لبروتين الخمل وبروتين الالتصاق المنقاة جزئيا ، وباستعمال المنحنى القياسي ومن خلال العلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية للبروتينات القياسية في نفس الهلام امكن حساب الوزن الجزيئي للبروتينات المطلوبة والتي بلغت 17500 و 28300 دالتن لكل من بروتيني الخمل وبروتين الالتصاق FimH على التوالي وكما مبين في الشكل 6 . النتيجة هذه تتفق مع [23] بالنسبة لبروتين FimH وذلك لان مدى الوزن الجزيئي للبروتين يتراوح بين 28000 – 30000 دالتن ، واما ما يخص بروتين الخمل فانه مقارب للدراسات العالمية والبالغ 17000 دالتن وان الزيادة القليلة في الوزن الجزيئي التي ظهرت في بروتين الخمل في دراستنا قد تعود الى وجود بعض المكونات البروتينية الاخرى التي قد تداخلت معه، هذا من ناحية ومن ناحية اخرى ان انفصال حزمة واحدة بالنسبة لبروتين الالتصاق على الرغم من استعمال المواد الماسخة يدل على انه متكون من وحدة واحدة وليس من وحدات تحتية مختلفة او متكون من وحدات متعددة ذات وزن جزيئي واحد انفصلت الى حزمة واحدة في هلام الترحيل ، وان الراي الثاني هو اكثر تاييدا وكما جاء في دراسة [23] الذي بين ان بروتين الالتصاق ممكن ان يتكون من 8 – 10 وحدات تحتية / خمل ، فبالاضافة الى ما تقدم من معرفة الوزن الجزيئي للبروتينات بهذه الطريقة فان ظهور حزمة واحدة يؤكد تجانس المستحضر البروتيني المنقى جزئيا وكما مبين في الشكل 4 .



شكل(4) يمثل نمط الترحيل الكهربائي لبروتين الالتصاق والخمل المستخلص والمنقى جزئيا في هلام عديد الاكريل امايد بتقنية SDS-PAGE (A-يمثل البروتينات القياسية ،B-بروتين الخمل ذو الوزن الجزيئي 17500 دالتن ،C-بروتين الالتصاق ذو الوزن الجزيئي 28300 دالتن)

المصادر:

1. Wult,B:G.Bergsten;H.Connell;P.Rollano. 2000 . P-fimbriae enhance the early establishment of E.coli in the human urinary tract .Mol.Miccrobiol.38:456-464 .
2. De Graaf, F.K and Gasstra W. 1994.Fimbriae of enterotoxigenic E.coli In:fimbriae , adhesion , genetics , biogenesis and vaccines PP.53-83.CRC.Press,BocaRaton
3. Connel H.Agace, W.:Klemm P.; Schemberi ,M.;Marlids,S.1996 .Type 1 fimbriae expression enhances E.coli Virulance for the urinary tract PNAS.Vol.93.Issue 18 . 9827-9832, september3.
4. Sokurenko,E.V.; Courtney,H.S.; Maslow, J.1995. Quantitative differences in adhesives of type-1 fimbriated E.coli due to structure differences in FimH genes. J.Bacteriol.177,3680-3636.
5. Kuehn,M.J.;J.Heuser;S.Normark;and .Hultgren J.1992.P pili in uropathogenic Ecoli are composite fibers with distinct fibriller adhesive tips .356:252-255.
6. Holt,J.G.;Krieg ,N.R.;Sneath ,P.H.A.;Staley,J.T.1994.Bergeys Mnnual of determinative bacteriology .9 th (ed)Awaverly company.
7. Hopkins ,WJ.;Reznikoff CA;Oberley ,TD .; Uehling , DT.1990 Adherance of uropathogenic E.coli to differentiated human uroepithelial cells grown in vitro. J.urol.143(1):146-9.
8. Jones,C.H.;Pinkner,J.S;Roth,R.:He user,J.1993.FimC is a periplasmic PapC like chaperone that direct assembly of type -1 pili in bacteria .Proc.Natl . Acad. USA.90,8397-8401.
9. Brinton , C.Jr.1965. The structure , Function,Synthesis ,and genetic control of bacterial pili and a model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria . Trans.N.Y.Acad.Sci 27:1003-1054.
10. Mark,S.Hanson;Jone,H.&Brinton J.R.1988Purification of E.coli type-1 pilin and minor pilus proteins & partial characterization of the adhesion protein .J.of Bacteriology.Aug.P.3350-3358.
11. Timok, K.;Eeva L.;Helena R.;&CatharinaS.1980.Newmethod for Isolation of immunologically pure pili from E. coli . Infect. And Immun. Feb. PP. 569-575.
12. Laemmli, U.K. 1970.Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4 . Nature 227:680-5.
13. Smith,H.W and Lingood,M.A 1971.Observation on the pathogenic properties of the K88,HLY and ENT plasmids of E.coli With particular reference to porcine diarrhea, J.Med.Microbiol. 4:467-485.
14. Salit,IE and Gotschlich,EC.1977. Heamagglutination by purified type-1 E.coli pili.J.of Exp.Med .146:1169-1181.
15. Jones,C.H.;J.S. pinkner;R.Roth ;J.Heuser1995.FimHadhesion of type-1 pili is assembled in to a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. Proc,Natl.Acad.Sci.USA 92:2081-2085.

fimbriae are adhesions. Infect. Immun. ; Apr.1;70(4):1694-1702.

20-Bradford ,M.M.1976.A rapid and Sensitive method for the Quantitation of microorganisms quantities of protein utilize the principle of protein dye binding. Anal. Biochem.72:248-54.

21-Schembri,M.A and P.Klemm, 1988. Heterobinary adhesions based on the E.coli FimH. Fimbriae protein. Appl. Envir. Microbiol.May 1 ; 64(5):1628-1633.

22-Mathews,C.K. and Vonltolde, K.E.1990. Biochemistry.the Bengamine/ Cummings Publishing Co ., Inc.

23- Schembri, M.A. and P. Klemm, 2001. Biofilm formation in hydrodynamic Environment by Novel FimH variants and Rami-Fication for virulence. Infect. Immune. 1;69(3) : 1322-1325.

16-Frits,K.DE GRaaf and Ingrid Roorda.1982.Production,Purificatio n and characterization of the fimbrial adhesive antigen f41 isolated from calf enteropathogenic E.coli strain B41M,Infect.& Immun.May:P.751-758.

17-Krishman,T.;Bereneice, M.;Teruo,I.;Ravi,M.1997. ocalization of domain is the FimH adhesion of E.coli type-1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain –specific Antibody to confer protection against experimental urinary tract infection.The Am.Soc.For.Clin .Invest.100(5)Sept.:1123-36.

18-المظفر، سامي عبد المهدي. الكيمياء الحياتية . الكتاب الاول. الطبعة الثانية. دار الحكمة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد/ كلية العلوم .

19-Vanloy,C.P.;E.V.Sokurenko; and S.L.Mosely2002.The major structure subunits of Dr and F1845

Extraction and partial purification for adhesive protein FimH from type-1 pili which isolated from uorpathogenic *E.coli*

Alice K.M. *** ***Mouruj A.alaubydi*

*Collage of sciences/Biotech. Dept.

Abstract:

Type-1 fimbriae have been extracted from *E.coli* which was previously isolated, the yield was 2.8 mg fimbriae/10 g bacteria , the crude fimbriae was partially purified by several solubilization and recrystilization methods using a series of buffer and solutions to decrease the impurities, the yield of fimbriae from all these steps was 2.1 mg fimbriae / 10 g bacteria.

Adhesive protein FimH was extracted from fimbriae by separation then partially purified by Gel-chromatography sephadex G-100, the yield of FimH was 250 µg/ml, while fimbriae protein was 50.6 µg/ml. The partially purified FimH revealed one clear band in SDS-PAGE, as well as protein fimbriae with molecular weight (28300,17500) Dalton respectively, when compared with standard protein curve.