جداسازی وزیکول‌های ترشحی غشاء خارجی باکتری اشرشیاکلی با استفاده از فیلتراسیون با جریان مماسی

بابک بیک زاده: دانشجوی گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. bbeikzadeh@ut.ac.ir
***غلامرضا نیکبخت بروجنی**: استاد، گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). nikbakht@ut.ac.ir
زهره افتخاری: استادیار، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. eftekharivet@gmail.com
احمد عرفانمنش: استادیار، جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. erfanmanesh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: وزیکول‌های غشاء خارجی باکتری‌ها نقش مهمی در فیزیولوژی، بیماری زایی و تعامل بین میزبان و عامل بیماریزا دارند. این وزیکول‌ها به باکتری اجازه می دهند تا آنزیم‌ها و محتویات خود را به شکل محافظت شده منتقل کنند و در زنده ماندن باکتری نقش دارند. از آنجایی که آن‌ها به عنوان نماینده باکتری محسوب می شوند، مطالعه آن‌ها به شناخت بیشتر باکتری‌ها و تعامل آن‌ها با محیط کمک می‌کند. از این رو روش‌های جداسازی این وزیکول‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. لذا، هدف از این پژوهش، معرفی روشی نوین برای جداسازی وزیکول‌های غشاء خارجی باکتری اشرشیاکلی است.

روش کار: در روش شناسی حاضر، باکتری اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک در شرایط استاندارد کشت داده شد. سپس مایع رویی کشت جدا گردید و از فیلتراسیون با جریان مماسی برای تغلیظ وزیکول‌ها و سانتریفیوژ دور بالا برای رسوب‌دهی آن‌ها استفاده شد. وزیکول‌های جدا شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تایید و وزن مولکولی و میزان غلظت پروتئینی مشخص گردید.

یافته‌ها: ریخت شناسی وزیکول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی تایید و اندازه آن‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر تعیین شد. الگوی الکتروفورتیک نشان دهنده باندهای قوی و ضعیف در ناحیه بین ۴۱-۲۲ کیلودالتون بوده و غلظت پروتئین وزیکول‌های تخلیص شده ۵۴۲ میکروگرم مشخص گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در نتیجه استفاده از روش ارائه شده در این مطالعه علاوه بر ارائه محصولی همسان، از بعد اقتصادی و زمانی نسبت به روش‌های رایج مزایای مثبتی دارد و می‌تواند زمینه ساز جداسازی این وزیکول‌ها در سطح صنعتی نیز باشد.

کلیدواژه‌ها: وزیکول های ترشحی غشاء خارجی، فیلتراسیون با جریان مماسی، باکتری اشرشیاکلی

مقدمه

تمامی موجودات زنده برای حفظ بقای خود وابسته به برقراری ارتباط و تقابل با دیگر هم نوعان و محیط اطرافشان هستند. میکروب‌ها نیز از این بابت مستثنی نبوده و تغییرات پویایی در حین رشد و تکثیر در سطوح آن‌ها رخ می‌دهد که برای به دست آوردن غذا و دفاع در برابر دیگر میکروب‌ها و مقاومت در برابر سیستم ایمنی ضروری است (۱). ارتباط بین سلولی از مشخصه‌های اصلی یک ارگانیسم است که لازمه آن می‌تواند تماس بین سلولی و یا انتقال مولکول‌های ترشحی باشد (۲). تولید میکرو وزیکول‌ها از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها سازوکار ارتباطی دیگری است که شناسایی آن به اوایل قرن بیستم برمی‌گردد (۳). براین اساس، میکرو وزیکول‌ها از غشاء پلاسمایی یا لومن سلول منشأ گرفته و شامل محتویات سیتوزول و غشاء می‌شوند (۳). بدین ترتیب در پروکاریوت‌ها (باکتری‌هایی گرم منفی و گرم مثبت) میکرووزیکول‌ها را اصطلاحاً OMV (Membrane Vesicles Outer) یا وزیکول های غشاء خارجی می‌نامند. وزیکول هایی کروی که عمدتاً با غشایی دو لایه از سلول به محیط خارج جوانه می‌زنند (۴). این وزیکول های آزادشده از غشاء باکتری‌های گرم منفی، غالباً شامل ترکیباتی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

مانند لیپوپلی ساکارید، لیپیدها، مولکول های چسبنده، توکسین‌ها و دیگر عوامل حدت زا و حتی ا سیدنوکلوئیک ه ستند (۴). این وزیکول‌ها غ شای خارجی در پاسخ به استرس‌های محیطی، کسب غذا، تولید زیست لایه (Biofilm) و بیماری‌زایی نقش دارند. در واقع آزاد شدن این وزیکول ها یک پاسخ تطبیقی نسبت به محیط است که حاوی ترکیباتی از دیواره سلولی، فاکتورهای حدت و پادگن ها بوده و در موارد بیماری‌زا بودن میکروب، وظیفه تقابل با دستگاه ایمنی میزبان را بر عهده دارد. ازآنجایی که این وزیکول ها از تنوع کمی در میان میکروارگانیسم ها برخوردارند اعمالی که توسط این ذرات انجام می‌شود نقش مهمی در زندگی یاخته بازی می‌کند (۱). اعمالی همانند لانه گزینی باکتری، اتصال به سلول‌های اپیتلیال، ایجاد عفونت پایدار، القاء پا سخ‌های التهابی و د ستر سی باکتری به مناطق دورتر از محل اصلی خود، بدون تحریک سیستم ایمنی (۴)؛ بنابراین با این روش آنزیم ها و دیگر ترکیبات ترشح شده از باکتری، بدون هیچ گو نه تغییری به ا هداف خودشان می‌رسند (۵).

باکتری های بی ماری‌زا با عث ای جاد م خاطرات بهداشتی زیادی در سطح جمعیت‌های انسانی و دامی می‌شو ند. ناهمگونی مولکول های هدف انتخاب‌شده به‌عنوان واکسن و به دنبال آن فقدان حفاظت پایدار و کامل از سوی دستگاه ایمنی از عمده موانعی هستند که در کنترل و ریشه‌کنی اکثر بیماری‌های باکتریایی وجود دارد (۶). با توجه به م طا لب ذکرشده اهم یت م طالعه بر روی وزیکول‌های تر شحی باکتری به‌منظور درک بی شتر واکنش بین میزبان و باکتری افزایش‌یافته تا جایی که تأثیرات آن بر روی سیستم ایمنی و استفاده به‌عنوان واکسن های فاقد جرم (Acellular Vaccines) موردتوجه قرار گرفته است (۷). روشن است که اولین قدم برای مطالعه و استفاده از وزیکول‌ها، جداسازی آن است. تا به امروز روش‌های مختلفی برای تحریک تولید و جدا سازی وزیکول‌ها ارائه شده است. روش‌هایی بر پایه استفاده از اولتراسانتریفیوژها، اولترا فیلترها و رسوب دهی وزیکول ها که هر کدام دارای م عا یب و مزا یای خاصی هستند. جنبه‌های پژوهشی و اقتصادی استفاده از روش‌های مذکور مانعی برای صنعتی شدن جداسازی وزیکول‌ها است؛ بنابراین هدف این پژوهش را بر پایه معرفی روشی مناسب برای جداسازی وزیکول‌های غشاء خارجی آزادشده از باکتری اشرشیاکلی به‌عنوان یک مدل از خانواده باکتری‌های گرم منفی قرار دادیم.

روش کار

م شخ صات باکتری: باکتری مورد استفاده در ا ین پژو هش سویه‌ای از اشرشیا کلی انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic -ETEC Escherichia coli) با سروتایپ O101 و فیمبریه K99 بوده که در بخش ایمنی شناسی گروه میکروب‌شناسی و ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران از گاوداری‌های حومه تهران جدا شده است.

کشت و تعداد کلنی: برای کشت باکتری از محیط آبگوشت Luria–Bertani (LB) استفاده شد، بدین منظور یک کلنی از باکتری به محیط آبگو شت LB در حجم ۱ لیتر ا ضافه و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه گردید (۶).

جداسازی وزیکول‌های ترشحی غشاء خارجی باکتری: پس از ۲۰ ساعت کشت به‌منظور جداسازی وزیکول‌ها، در ابتدا مایع رویی کشت باکتری تو سط سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه جدا گردید. برای ت شخیص بهترین سرعت سانتریفیوژ (Centrifuge Refrigerated SIGMA 3-16K) از دورهای ۳۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ (g) ا ستفاده شد. سپس سه روش برای جداسازی وزیکول‌ها مورد آزمایش قرار گرفت:

۱- فیلتر کردن مایع رویی کشت به ترتیب با فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون و سانتریفیوژ آن با دور g×۲۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

۲- انتقال مستقیم مایع رویی کشت باکتری به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

دستگاه Tangential Flow Filtration(TFF) (Millipore, DUOBLOC TM, USA) و سانتریفیوژ مایع باقی‌مانده در مخزن اصلی دستگاه با دور g×۲۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

۳- انتقال مستقیم مایع رویی کشت باکتری به دستگاه TFF. مایع باقی‌مانده در مخزن اصلی دستگاه به ترتیب با فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون، فیلتر شد. سپس مایع فیلتر شده با دور g×۲۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل از سانتریفیوژ در هر سه مرحله در PBS حل و برای ادامه مراحل در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میکروسکوپ الکترونی: به‌منظور تأیید وزیکول‌های ترشحی غشاء خارجی از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده گردید. به طور خلاصه، در ابتدا وزیکول‌ها با PBS ۰/۰۱ مولار یکنواخت شدند. سپس از گرید های نیکلی با مش ۴۰۰ استفاده گردید. این گریدها در ابتدا با فروم وار و بعد با بخار کربن سطحشان پوشش داده شد و به میزان ۱۵ میکرولیتر از نمونه OMV روی آن ریخته شد. در مرحله بعد گریدها با PBS ۰/۰۱ مولار حاوی ۰/۵ مولار BSA و ۰/۱ درصد ژلاتین شستشو داده شد. نمونه روی گرید با PBS ۰/۰۱ مولار حاوی ۱ درصد گلوتارآلدئید، به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس گردید و مجدداً توسط PBS شستشو داده شد. درپایان گریدها با فسفوتنگستات پتاسیم (رنگ آمیزی منفی) رنگ شده و پس از خشک شدن آماده بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره شدند (۸).

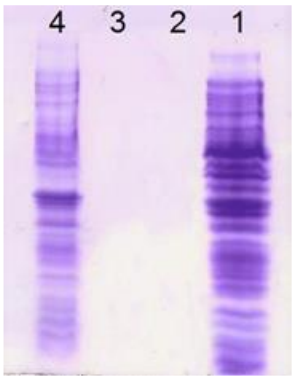
تعیین وزن مولکولی: برای تعیین وزن مولکولی وزیکول های تخلیص شده از سیستم بافری ناپیوسته اکریلامیلا استفاده شد. نمونه OMV در بافر حاوی Tris-HCL ۰/۰۶۲۵ M حاوی سدیم دودسیل سولفات (۲ درصد)، گیلیسرول (۱۰ در صد)، بروموفنول بلو (۰/۰۰۱ در صد) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۳ درصد الکتروفورز انجام گرفت. به‌منظور تعیین وزن مولکولی از مارکر استاندارد (سینا ژن) استفاده گردید (۹).

تعیین غلظت پروتئین: غلظت پروتئین به روش Warburg-christian اندازه گیری شد تا آلودگی های نوکلئوتیدی لحاظ نشود و غلظت پروتئین خالص به دست آید (۱۰).

یافته‌ها

جداسازی وزیکول های ترشحی غشاء خارجی، تعیین وزن مولکولی، پروتئین سنجی و تأیید توسط میکروسکوپ الکترونی: در روش شناسی حاضر، پس از کشت بذر مورد نظر در ۱ لیتر محیط کشت در شرایط استاندارد، پس از ۲۰ ساعت ۳۶/۴ گرم توده سلولی مرطوب حاصل و تعداد باکتری CFU $۱/۴۰ \times ۱۰^{۱۰}$ تخمین زده شد. ازآنجایی‌که مایع رویی کشت باید فاقد هرگونه جسم باکتری و کودورتی باشد، از سه سرعت مطرح شده تنها با سرعت g×۱۰۰۰۰ این هدف محقق گردید.

نتایج به دست آمده از سه روش مذکور برای جداسازی وزیکول‌ها به ترتیب به ما نشان داد که در هر سه روش پس از استفاده از سانتریفیوژ دور بالا رسوبی حاصل شده است اما تفاوت ها آن‌ها

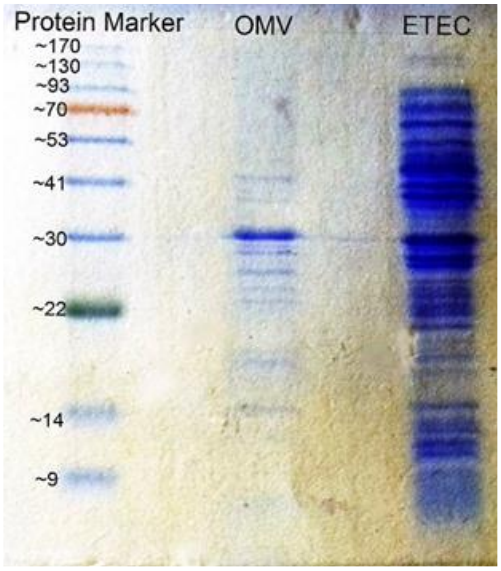


تصویر ۱- الگوی الکتروفورتیک SDS-PAGE، (۱) جرم کامل باکتری ETEC، (۲) مایع رویی کشت باکتری قبل از فیلتر ۰/۴۵ و ۰/۲۲، (۳) نمونه به دست آمده از روش اول جداسازی ویزیکول ها، (۴) نمونه به دست آمده از روش دوم جداسازی وزیکول‌ها که بسیار مشابه باکتری کامل است.

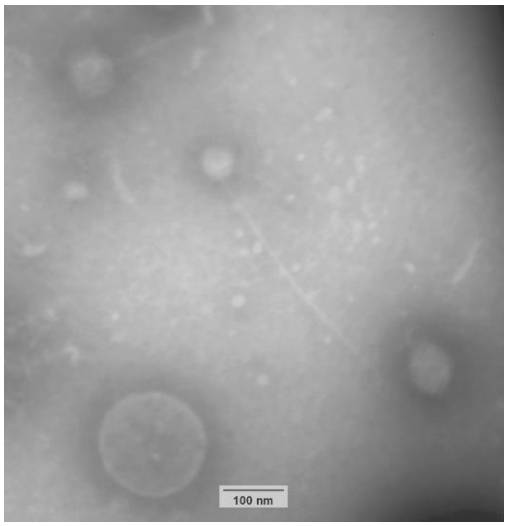
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

پس از الکتروفورز نمونه های رسوبی مشخص گردید. در روش اول، باندی در الکتروفورز مشاهده نشد. در روش دوم، الگوی الکتروفورز حاصله در مقایسه با الگوی الکتروفورز باکتری کامل بسیار مشابه بود و اما در روش سوم الگویی متفاوت از باند ها در مقایسه با باکتری کامل مشاهده گردید (تصویر ۱). الگوی حرکتی وزیکول های غشاء خارجی در SDS-PAGE الکتروفورز ۱۳ در صد در مقایسه با مارکر پروتئینی استاندارد و جرم کامل باکتری ETEC به صورت ترکیبی از باندهای قوی و ضعیف در محدوده ۱۴ تا ۴۱ کیلو دالتون و مشاهده شد (تصویر ۲). علاوه بر این نمونه تهیه شده از مایع کشت باکتری قبل از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون نیز الکتروفورز گردید که به دلیل رقیق بودن و عدم تغلیظ هیچ باندی در الکتروفورز ایجاد نکرد؛ بنابراین رسوب حاصل از روش سوم برای تعیین خصوصیات ریخت شناسی توسط میکروسکوپ الکترونی و تعیین غلظت پروتئین ها استفاده شد. خصوصیات ریخت شناسی وزیکول‌های غشاء خارجی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره تأیید و اندازه وزیکول ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر تعیین گردید (تصویر ۳). انتقال به دستگاه TFF و استفاده از فیلتر ۱۰ کیلودالتون، ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون موجب حذف باقی‌مانده‌های قطعات باکتری ها از محیط کشت گردید که با توجه به تصاویر به دست آمده عدم حضور ناخالصی هایی مثل قطعات باکتری و فلاژل در محصول به دست آمده مشخص است. تنوع در اندازه وزیکول ها، تفاوت در جایگاه باندهای ایجاد شده در الکتروفورز را تأیید می‌کند. برر سی میزان پروتئین طبق روش واربرگ از توده سلولی زنده، ۵۴۲ میکروگرم پروتئین وزیکول ترشحی غشاء خارجی باکتری را نشان می‌دهد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



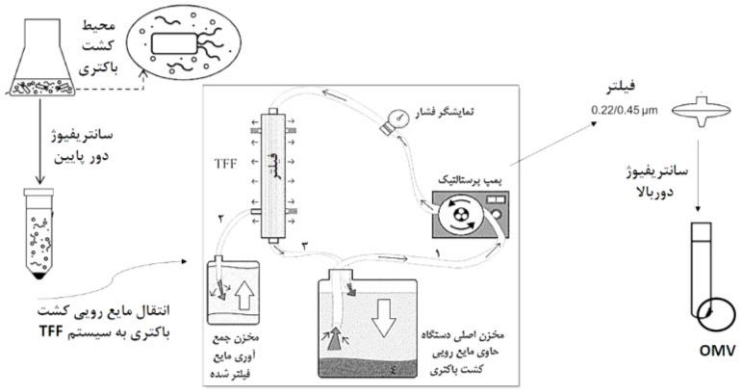
تصویر ۲- الگوی الکتروفورتیک SDS-PAGE از روش سوم جداسازی وزیکول‌های غشاء خارجی، دامنه باندهای وزیکول‌های غشائی از ۴۱- ۱۴ کیلودالتون است.



تصویر ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از OMV باکتری اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک. وزیکول‌ها در اندازه‌های متفاوت دیده می‌شوند.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از وزیکول‌های غشاء خارجی باکتری‌ها، به ویژه باکتری های گرم منفی به‌عنوان عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی با افزایش رو به رشدی همراه می باشد (۱۵-۱۱). از این رو روش های گوناگونی برای جدا سازی آن‌ها ارائه گردیده است. در مطالعه حاضر همانند دیگر روش‌های ارائه شده تا به امروز، جداسازی وزیکول غشاء خارجی با حذف جسم کامل باکتری از محیط کشت و نگهداری مایع رویی آغاز می‌شود (۸-۶). با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی سه روش برای جداسازی وزیکول های ترشحی غشاء خارجی باکتری، می توان نتیجه گرفت که روش سوم که ترکیبی از استفاده از سیستم TFF و فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون است، بهترین محصول را ارائه می‌دهد (تصویر ۴). استفاده از سیستم TFF که یک فیلتراسیون با جریان مماسی است، امکان استفاده از فیلترهایی با اندازه های مختلف و تغلیظ بیشتر پروتئین‌ها را در یک زمان نسبت به استفاده از سانتریفیوژها می‌دهد. به گونه‌ای که مایع رویی جدا شده از کشت باکتری، به صورت موازی از



تصویر ۴- شکلی شماتیک از مراحل جداسازی وزیکول‌های غشاء خارجی. پس از کشت باکتری و جداسازی مایع رویی به وسیله سانتریفیوژ دور پایین، مایع رویی به سیستم TFF (فیلتراسیون با جریان مماسی) منتقل، در آنجا توسط پمپ فشار (۱) از مخزن دستگاه به فیلتر منتقل می شود و بخشی از مایع که حاوی ذرات کوچک تر از اندازه فیلتر هستند از فیلتر عبور می کند (۲) و بخش دیگر به مخزن اصلی دستگاه بر می‌گردد (۳) و فرآیند تغلیظ شکل می گیرد (۴). سپس مایع تغلیظ شده از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون عبور داده می شود و به منظور جمع آوری OMV به سانتریفیوژ دور بالا منتقل می گردد. رسوب به دست آمده پس از سانتریفیوژ حاوی OMV است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

غشاء فیلتر عبور می‌کند (Permanent) و بخشی از آن که باقی‌مانده و از فیلتر عبور نمی‌کند (Retentate)، به مخزن اصلی دستگاه بر می گردد. این فرآیند دو ویژگی مثبت دارد: اولاً باعث تغلیظ بیشتر پروتئین ها می‌شود، ثانیاً حجم مایع مورد استفاده برای تخلیص پروتئین را کاهش می‌دهد (۱۶) که این خود موجب کاهش زمان و هزینه تمام شده در مجموع روش جداسازی ویزیکول‌های غشای خارجی باکتری می‌شود.

در روش های ارائه شده تا به امروز پس از جدا کردن مایع رویی کشت باکتری، ابتدا آن را از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون عبور داده تا قطعات باقی‌مانده از باکتری به طور کامل حذف شوند. سپس مایع فیلتر شده برای تخلیص وزیکول‌ها به سانتریفیوژهای دور بالا (۱۰۰۰۰۰×g) منتقل می شد و پس از طی ۲ الی ۴ ساعت رسوبی که حاوی وزیکول‌های غشاء خارجی باکتری است به دست می آید (۸-۶، ۱۷، ۱۸). به دلیل اینکه حجم وزیکول‌های به دست آمده معمولاً کم است، از این رو نیاز به روش هایی مضاعف مثل استفاده از اولترافیلترها (UF)، رسوب دهی و یا ترکیبی از همه این مواردبرای تغلیظ بیشتر آن‌ها است. (۷). کارکرد اولترافیلترها معمولاً بدین صورت است که با اندازه هایی بین ۵۰ تا ۱۰۰ کیلو دالتون، پروتئین های غیر OMV را از مایع رویی کشت باکتری جدا می‌کند و همانند سیستم TFF سبب تغلیظ مایع می شوند (۱۶). با این وجود استفاده از پمپ های فشار برای سرعت بخشیدن به فرآیند جداسازی در اولترافیلترها موجب چسبندگی پروتئین ها به غشاء فیلتر و اختلال در عملکرد آن‌ها می گردد. در حالی که در سیستم TFF این محدودیت وجود ندارد، مایع تحت یک فشار ملایم به صورت موازی با غشاء فیلتر دستگاه حرکت می‌کند و به همین دلیل از چسبندگی پروتئین‌ها جلوگیری می‌شود (۱۶). از طرفی دیگر در روش‌های رسوب دهی که از آمونیوم سولفات برای رسوب دادن پروتئین ها و وزیکول های غشاء خارجی باکتری استفاده می گردد، باید مراحل پیچیده ای را برای جداسازی وزیکول ها استفاده کرد، مراحلی که این امکان را به ما می‌دهد تا بین پروتئین ها تفکیک قائل شویم اما نیازمند صرف زمان و مواد بیشتر است (۷ و ۱۹). این خصوصیت‌ها باعث کاهش استفاده از این روش نسبت به روش های یاد شده می گردد.

از دیگر مزیت های استفاده از روش ارائه شده، کاهش مایع رویی کشت بعد از خروج از سیستم TFF است. این ویژگی همراه با کاهش استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون نسبت به روش‌های دیگر است. بگونه ای که در روشی که از سیستم TFF استفاده نگردید، به دلیل عدم تغلیظ مایع رویی حتی پس از سانتریفیوژ با دور بالا رسوب قابل توجهی جدا نشد و عدم استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون نیز با وجود اینکه مایع رویی در ظاهر فاقد هرگونه کودورتی بود، اما به دلیل اینکه الگوی الکتروفورتیک مشابهی با باکتری کامل را نشان داد توصیه نمی شود. تغلیظ مایع رویی کشت این امکان را به ما می‌دهد که با توجه به دردسترس نبودن اولتراسانتریفیوژها در اکثر مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی، جداسازی وزیکول‌ها توسط سانتریفیوژهای دور بالا نیز امکان پذیر باشد. در ادامه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، بررسی ریخت شناسی وزیکول‌های به دست آمده توسط میکروسکوپ الکترونی (شکل ۳) علاوه بر عدم وجود ناخالصی های پروتئینی در محصول به دست آمده، طبیعی بودن شکل فضایی وزیکول‌ها را در مجموع فرآیند جداسازی نشان می‌دهد به طوری که همسان بودن وزیکول های جدا شده با مطالعات سایر محققان را تأیید می‌کند. الگوی قرارگیری وزیکول‌ها در ژل الکتروفورز SDS-PAGE، دامنه ای از باندها را نشان می‌دهد که از ۱۴ تا ۴۱ کیلودالتون قرار گرفته اند. این نتیجه به همراه اندازه وزیکول‌ها (۵۰-۱۰۰ نانومتر) با نتایج به دست آمده از روش های دیگر مطابقت دارد (۶، ۸، ۱۹، ۲۰).

از آنجا که دانش فنی جداسازی وزیکول های غشای خارجی باکتری ها و استفاده از آن‌ها در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

پژوهش های مربوط به تولید واکسن‌ها روز به روز گسترش می یابد، نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر معرفی کننده روشی نوین با مزایای اقتصادی و زمانی است که در عین حال ارائه دهنده محصولی همسان نسبت به روش های رایج در خارج از کشور می باشد و می‌تواند زمینه ساز استفاده از آن‌ها در بعد صنعتی باشد.

منابع

1. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. Infect Immun 2012;80(6):1948-57.
2. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. Cell. 2006;25(2):237-46.
3. Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. Cell Microbiol. 2011; 13(1):1-9.
4. Ünal CM, Schaar V, Riesbeck K, editors. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. Semin Immunopathol. 2011: Springer.
5. Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu Rev Microbiol. 2010;64:163.
6. Roy K, Hamilton DJ, Munson GP, Fleckenstein JM. Outer membrane vesicles induce immune responses to virulence proteins and protect against colonization by enterotoxigenic Escherichia coli. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(11):1803-8.
7. Klimentová J, Stulík J. Methods ofisolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. Microbiol Res. 2015;170:1-9.
8. Park K-S, Choi K-H, Kim Y-S, Hong BS, Kim OY, Kim JH, et al. Outer membrane vesicles derived from Escherichia coli induce systemic inflammatory response syndrome. PLoS One. 2010;5(6):e11334.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.
10. Ehresmann B, Imbault P, Well J. Spectrophotometric determinationof protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. Anal Biochem. 1973;54(2):454-63.
11. Amano A, Takeuchi H, Furuta N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host–parasite interactions. Microbes Infect. 2010;12(11):791-8.
12. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(1):81-94.
13. MacDonald IA, Kuehn MJ. Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. Res Microbiol. 2012;163(9):607-18.
14. Berleman J, Auer M. The role of bacterial outer membrane vesicles for intra-and interspecies delivery. Environ Microbiol. 2013;15(2):347-54.
15. Acevedo R, Fernández S, Zayas C, Acosta A, Sarmiento ME, Ferro VA, et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. Front Immunol. 2014;5.
16. Rubin D, Christy C. Selecting the right ultrafiltration membrane for biopharmaceutical applications. Pharm Technol Eur. 2002;14:39–48.
17. Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. Mass Spectrom Rev. 2008;27(6):535-55.
18. Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. Proteomics. 2009;9(24):5425-36.
19. van de Waterbeemd B, Zomer G, Kaaijk P, Ruiterkamp N, Wijffels RH, van den Dobbelsteen GP, et al. Improved production process for nativeouter membrane vesicle vaccine against Neisseria meningitidis. PloS one. 2013;8(5):e65157.
20. Kim OY, Hong BS, Park KS, Yoon YJ, Choi SJ, Lee WH, et al. Immunization with Escherichia coli outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. J Immunol. 2013;190(8):4092-102.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

Isolating *Escherichia coli* secretory outer membrane vesicles by using tangential-trans flow filtration

Babak Beikzadeh, Student at Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. bbeikzadeh@ut.ac.ir
*__Gholamreza Nikbakht Boroujeni__, PhD, Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran (*Corresponding author). nikbakht@ut.ac.ir
Zohre Eftekhari, Assistant Professor, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. eftekharivet@gmail.com
Ahmad Erfanmanesh, Assistant Professor, Academic Center of Education and Culture and Research-Tehran Branch, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. erfanmanesh@yahoo.com

Abstract

Background: Among pathogenic bacteria, Gram-negative bacteria are important. The secreting outer membrane vesicles of the bacteria have important role in physiology, virulence, and the interaction between host and pathogen. These vesicles allow bacteria to transmit enzyme and its contents as conserved form and are involved in their viability. Since they represent bacterial candidate, their study can help us to learn more about bacteria and their interaction with the environment. Therefore, isolation methods of vesicles are important. So, the aim of this study was to introduce a new method for isolation of *Escherichia coli* outer membrane vesicles.

Methods: The bacteria of Enterotoxigenic *Escherichia coli* were cultured under standard conditions. Supernatant was removed and then the tangential- trans flow filtration was used for concentrating vesicles, after which high speed centrifuges were used for obtaining the deposition. Isolated vesicles were confirmed by transmission electron microscopy and molecular weight of the protein concentration was determined.

Results: Vesicle morphology was confirmed by transmission electron microscopy and size of vesicles were determined between 50 to 100 nanometers. Electrophoretic pattern reflects the strong and weak bands in the region between 22-41 kDa and concentration of protein was determined as 542 micrograms.

Conclusion: In the present study these results show that by using this method, in addition to providing the same product, has positive benefits in regard to time and economic point of view in comparison to common procedures and it can also be used for isolating the vesicles at industrial level.

Keywords: Secretory outer membrane vesicles, Tangential- trans flow filtration, *Escherichia coli*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]