

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. erfmanmanesh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: وزیکول‌های غشاء خارجی باکتری‌ها نقش مهمی در فیزیولوژی، بیماری‌زایی و تعامل بین میزبان و عامل بیماری‌زا دارند. این وزیکول‌ها به باکتری اجازه می‌دهند 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 می‌شوند، 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 الکتروفوریتیک نشان دهنده باندهای قوی و ضعیف در ناحیه بین ۴۱-۲۲ کیلو دالتون 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: وزیکول‌های ترشحی غشاء خارجی، فیلتراسیون با جریان مماسی، باکتری اشرشیاکلی

مقدمه

یوکاریوت‌ها سازوکار ارتباطی دیگری است که شنا سایی 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 وزیکول‌های غشاء خارجی می‌نامند. وزیکول‌هایی کروی که عمدتاً با غشایی دو لایه از سلول به محیط خارج جوانه می‌زنند (۴). این وزیکول‌های آزادشده از غشاء باکتری‌های گرم منفی، غالباً شامل ترکیباتی

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

اولتراسانتریفیوژها، اولترا فیلترها و رسوب دهی و زیکول‌ها که هر کدام دارای معایب و مزایای خاصی هستند. جنبه‌های پژوهشی و اقتصادی استفاده از روش‌های مذکور مانعی برای صنعتی شدن جداسازی و زیکول‌ها است؛ بنابراین هدف این پژوهش را بر پایه معرفی روشی مناسب برای جداسازی و زیکول‌های غشاء خارجی آزادشده از باکتری اشرشیاکلی به‌عنوان یک مدل از خانواده باکتری‌های گرم منفی قرار دادیم.

روش کار

مشخصات باکتری: باکتری مورد استفاده در این پژوهش سویه‌ای از اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک (Enterotoxigenic - ETEC) *Escherichia coli* با سرو تایپ O101 و فیمبریه K99 بوده که در بخش ایمنی شناسی گروه میکروبی‌شناسی 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 آبگوشت LB در حجم ۱ لیتر اضافه و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه گردید (۶).

جداسازی و زیکول‌های ترش‌ی غشاء خارجی باکتری: پس از ۲۰ ساعت کشت به‌منظور جداسازی و زیکول‌ها، در ابتدا مایع رویی کشت باکتری توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه جدا گردید. برای تشخیص بهترین سرعت سانتریفیوژ از (Centrifuge Refrigerated SIGMA 3-16K) دورهای ۳۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ (g) استفاده شد. سپس سه روش برای جداسازی و زیکول‌ها 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 $20000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.
- ۲- انتقال مستقیم مایع رویی کشت باکتری به

مانند لیپوپولی ساکارید، لیپیدها، مولکول‌های چسبنده، توکسین‌ها و دیگر عوامل حدت‌زا و حتی اسیدنوکلئیک هستند (۴). این و زیکول‌ها غشای خارجی در پاسخ به استرس‌های محیطی، کسب غذا، تولید زیست‌لایه (Biofilm) و بیماری‌زایی نقش دارند. در واقع آزاد شدن این و زیکول‌ها یک پاسخ تطبیقی نسبت به محیط است که حاوی ترکیباتی از دیواره سلولی، فاکتورهای حدت و پادگن‌ها بوده و در موارد بیماری‌زا بودن میکروبی و وظیفه تقابل با دستگاه ایمنی میزبان را بر عهده دارد. از آنجایی که این و زیکول‌ها از تنوع کمی در میان میکروارگانیسم‌ها برخوردارند اعمالی که توسط این ذرات انجام می‌شود نقش مهمی در زندگی یاخته‌بازی می‌کند (۱). اعمالی همانند لانه‌گزینی باکتری، اتصال به سلول‌های اپیتلیال، ایجاد عفونت پایدار، القاء پاسخ‌های التهابی و دست‌رسی باکتری به مناطق دورتر از محل اصلی خود، بدون تحریک سیستم ایمنی (۴)؛ بنابراین با این روش آنزیم‌ها و دیگر ترکیبات ترشح‌شده از باکتری، بدون هیچ گونه تغییری به اهداف خودشان می‌رسند (۵).

باکتری‌های بیماری‌زا باعث ایجاد مخاطرات بهداشتی زیادی در سطح جمعیت‌های انسانی و دامی می‌شوند. ناهمگونی مولکول‌های هدف انتخاب‌شده به‌عنوان واکنش 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 مطالب ذکرشده اهمیت مطالعه بر روی و زیکول‌های ترش‌ی باکتری به‌منظور درک بیشتر واکنش بین میزبان و باکتری افزایش یافته تا جایی که تأثیرات آن بر روی سیستم ایمنی و استفاده به‌عنوان واکنش‌های فاقد جرم (Acellular Vaccines) مورد توجه قرار گرفته است (۷). روشن است که اولین قدم برای مطالعه و استفاده از و زیکول‌ها، جداسازی آن است. تا به امروز روش‌های مختلفی برای تحریک تولید و جداسازی و زیکول‌ها ارائه شده است. روش‌هایی بر پایه استفاده از

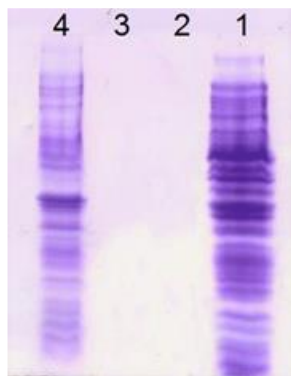
۱۳ درصد الکتروفورز انجام گرفت. به منظور تعیین وزن مولکولی از مارکر استاندارد (سینا ژن) استفاده گردید (۹).

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).

یافته ها

جداسازی وزیکول های ترشحي غشاء خارجي، 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 $10^{10} \times 1/40$ CFU تخمین زده شد. از آنجایی که مایع رویی کشت باید فاقد هرگونه جسم باکتری و کودورتی باشد، از سه سرعت مطرح شده تنها با سرعت $10000 \times g$ این هدف محقق گردید.

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



تصویر ۱- الگوی الکتروفوریک 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 وزیکول ها، (۴) نمونه به دست آمده از روش دوم جداسازی وزیکول ها که بسیار مشابه باکتری کامل است.

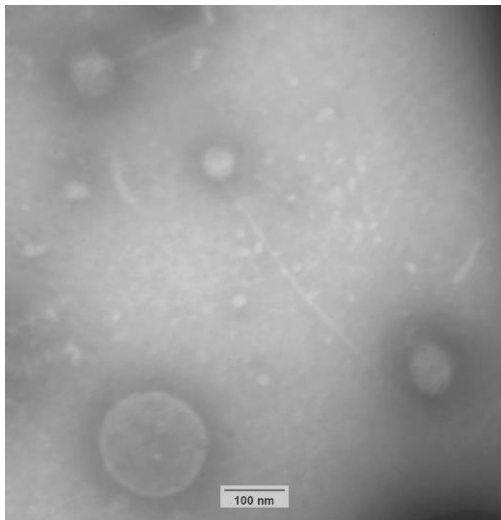
دستگاه Tangential Flow Filtration (TFF) (Millipore, DUOBLOC TM, USA) و سانتریفیوژ مایع باقی مانده در مخزن اصلی دستگاه با دور $20000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

۳- انتقال مستقیم مایع رویی کشت باکتری به دستگاه TFF. مایع باقی مانده در مخزن اصلی دستگاه به ترتیب با فیلترهای ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون، فیلتر شد. سپس مایع فیلتر شده با دور $20000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل از سانتریفیوژ در هر سه مرحله در PBS حل و برای ادامه مراحل در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

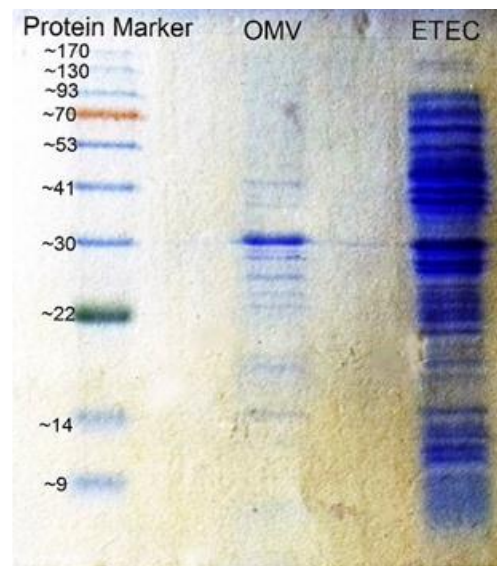
میکروسکوپ الکترونی: به منظور تأیید وزیکول های ترشحي غشاء خارجي از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده گردید. به طور خلاصه، در ابتدا وزیکول ها با PBS ۰/۰۱ مولار یکنواخت شدند. سپس از گرید های نیکلی با مش ۴۰۰ استفاده گردید. این گریدها در ابتدا با فروم وار و بعد با بخار کربن سطحشان پوشش داده شد و به میزان 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 گلو تار آلدئید، به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد فیکس گردید و مجدداً توسط PBS شستشو داده شد. در پایان 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 اکرلامیلا استفاده شد. نمونه OMV در بافر حاوی Tris-HCL ۰/۰۶۲۵ M (۲ درصد)، گلیسرول (۱۰ درصد)، بروموفنول بلو (۰/۰۰۱ درصد) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس با استفاده از ژل پلی آکریل آمید

پس از الکتروفورز نمونه‌های 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 باند‌ها در مقایسه با باکتری کامل مشاهده گردید (تصویر ۱). الگوی حرکتی وزیکول‌های 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 ریخت‌شناسی توسط میکروسکوپ الکترونی و تعیین غلظت پروتئین‌ها استفاده شد. خصوصیات ریخت‌شناسی وزیکول‌های غشاء خارجی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره تأیید و اندازه وزیکول‌ها 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 باکتری‌ها از محیط کشت گردید که با توجه به تصاویر به دست آمده عدم حضور ناخالصی‌هایی مثل قطعات باکتری و فلاژل در محصول به دست آمده مشخص است. تنوع در اندازه وزیکول‌ها، 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.



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

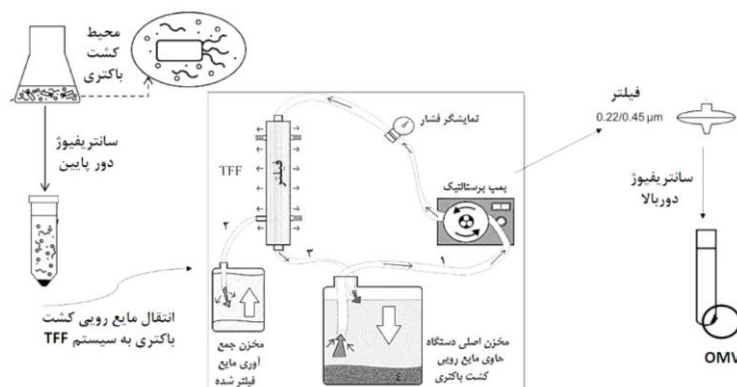


تصویر ۲- الگوی الکتروفوریتیک SDS-PAGE از روش سوم جداسازی وزیکول‌های غشاء خارجی، دامنه باندهای وزیکول‌های غشائی از ۴۱-۱۴ کیلودالتون است.

نگهداری مایع رویی آغاز می‌شود (۸-۶). با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی سه روش برای جداسازی وزیکول‌های ترشحی غشاء خارجی باکتری، می‌توان نتیجه گرفت که روش سوم که ترکیبی از استفاده از سیستم TFF و فیلترهای ۰/۲۲ و ۰/۴۵ 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 اندازه‌های 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

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از وزیکول‌های غشاء خارجی باکتری‌ها، به ویژه باکتری‌های گرم منفی به‌عنوان عوامل تعدیل‌کننده سیستم ایمنی با افزایش رو به رشدی همراه می‌باشد (۱۱-۱۵). از این رو روش‌های گوناگونی برای جداسازی آن‌ها ارائه گردیده است. در مطالعه حاضر همانند دیگر روش‌های ارائه شده تا به امروز، جداسازی وزیکول‌های غشاء خارجی با حذف جسم کامل باکتری از محیط کشت و



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 می‌شود و بخشی از مایع که حاوی ذرات کوچک تر از اندازه فیلتر هستند از فیلتر عبور می‌کند (۲) و بخش دیگر به مخزن اصلی دستگاه بر می‌گردد (۳) و فرآیند تغلیظ شکل می‌گیرد (۴). سپس مایع تغلیظ شده از فیلترهای ۰/۲۲ و ۰/۴۵ میکرون عبور داده می‌شود و به منظور جمع‌آوری OMV به سانتریفیوژ دور بالا منتقل می‌گردد. رسوب به دست آمده پس از سانتریفیوژ حاوی OMV است.

پيچيده ای را برای جداسازی و زیکول‌ها استفاده کرد، مراحلی که این امکان را به ما می‌دهد تا بین پروتئین‌ها تفکیک قائل شویم اما نیازمند صرف زمان و مواد بیشتر است (۷ و ۱۹). این خصوصیت‌ها باعث کاهش استفاده از این روش نسبت به روش‌های یاد شده می‌گردد.

از دیگر مزیت‌های 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. بگونه‌ای 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 الکتروفوریتیک مشابهی با باکتری کامل را نشان داد توصیه نمی‌شود. تغلیظ مایع رویی کشت این امکان را به ما می‌دهد که با توجه به دردسترس نبودن اولتراسانتریفیوژها در اکثر مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی، جداسازی و زیکول‌ها توسط سانتریفیوژهای دور بالا نیز امکان پذیر باشد. در ادامه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، بررسی ریخت‌شناسی و زیکول‌های به دست آمده توسط میکروسکوپ الکترونی (شکل ۳) علاوه بر عدم وجود ناخالصی‌های پروتئینی در محصول به دست آمده، طبیعی بودن شکل فضایی و زیکول‌ها را در مجموع فرآیند جداسازی نشان می‌دهد به طوری که همسان بودن و زیکول‌های جدا شده با مطالعات سایر محققان را تأیید می‌کند. الگوی قرارگیری و زیکول‌ها در ژل الکتروفورز SDS-PAGE، دامنه‌ای از باندها را نشان می‌دهد که از ۱۴ تا ۴۱ کیلودالتون قرار گرفته‌اند. این نتیجه به همراه اندازه و زیکول‌ها (۵۰-۱۰۰ نانومتر) با نتایج به دست آمده از روش‌های دیگر مطابقت دارد (۶، ۸، ۱۹، ۲۰).

از آنجا که دانش فنی جداسازی و زیکول‌های غشای خارجی باکتری‌ها و استفاده از آن‌ها در

غشاء فیلتر عبور می‌کند (Permanent) و بخشی از آن که باقی‌مانده و از فیلتر عبور نمی‌کند (Retentate)، به مخزن اصلی دستگاه بر می‌گردد. این فرآیند دو ویژگی مثبت دارد: اولاً باعث تغلیظ بیشتر پروتئین‌ها 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 و زیکول‌های غشای خارجی باکتری می‌شود.

در روش‌های 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 و زیکول‌ها به سانتریفیوژهای دور بالا ($10000 \times g$) منتقل می‌شد و پس از طی ۲ الی ۴ ساعت رسوبی که حاوی و زیکول‌های غشاء خارجی باکتری است به دست می‌آید (۸-۱۷، ۱۸). به دلیل اینکه حجم و زیکول‌های به دست آمده معمولاً کم است، از این روش نیاز به روش‌هایی مضاعف مثل استفاده از اولترافیلترها (UF)، رسوب‌دهی و یا ترکیبی از همه این موارد برای تغلیظ بیشتر آن‌ها است. (۷). کارکرد اولترافیلترها معمولاً بدین صورت است که با اندازه‌هایی بین ۵۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون، پروتئین‌های غیر OMV را از مایع رویی کشت باکتری جدا می‌کند و همانند سیستم TFF سبب تغلیظ مایع می‌شوند (۱۶). با این وجود استفاده از پمپ‌های فشار برای سرعت بخشیدن به فرآیند جداسازی در اولترافیلترها موجب چسبندگی پروتئین‌ها به غشاء فیلتر و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌گردد. 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 رسوب‌دهی که از آمونیوم سولفات برای رسوب دادن پروتئین‌ها و زیکول‌های غشاء خارجی باکتری استفاده می‌گردد، باید مراحل

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, Ruitkamp N, Wijffels RH, van den Dobbelsteen GP, et al. Improved production process for native outer 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.

پژوهش های مربوط به تولید واکسن ها 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 می تواند زمینه ساز استفاده از آن ها 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 of isolation 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 the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.

10. Ehresmann B, Imbault P, Well J. Spectrophotometric determination of 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.*

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. eftekhari@vet.ac.ir

Ahmad Erfanmanesh, Assistant Professor, Academic Center of Education and Culture and Research-Tehran Branch, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. erfmanmanesh@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*