پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۵ تابستان ۱۳۸۶

مطالعه الگوی الکتروفورتیک پروتئینی *Corynebacterium pseudotuberculosis* جدا شده از موارد لنفادنیت پنیری در گوسفند و گاو

• **حسن ممتاز**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد
• **امیر شاکریان**
گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

تاریخ دریافت: مردادماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: اسفندماه ۱۳۸۵

Email: hamomtaz@yahoo.com

چکیده

به منظور مطالعه الگوی الکتروفورتیک پروتئینی *C. pseudotuberculosis* ، این مطالعه بر روی ۱۶ باکتری جدا شده از ۱۰۰ عقده لنفاوی مبتلا به لنفادنیت پنیری (۷۰ نمونه از گوسفند و ۳۰ نمونه از گاو) در گوسفند و مقایسه آن‌ها با *C. pseudotuberculosis* جدا شده از گاو صورت گرفت. کلیه نمونه‌های میکروبی در حضور مارکر پروتئینی با وزن مولکولی پائین روی سیستم ژل ناپیوسته ۱۰و۵ درصد پلی اکریل آمید به روش SDS-PAGE الکتروفورز گردید. در کل تعداد ۱۷ باند پروتئینی با اوزان ۲۵ تا ۲۲۰ کیلودالتون در باکتری‌های مورد مطالعه مشاهده شد که در این میان پروتئین‌های ۶۸، ۶۴، ۵۳ و ۳۱ کیلودالتون در تمام سویه‌های نیترات مثبت و منفی باکتری، پروتئین‌های ۳۷ و ۳۸ کیلو دالتون در بیوتیپ ۲ نیترات مثبت (جدا شده از گاو) و پروتئین‌های ۱۲۰، ۴۸، ۴۰، ۳۹، ۳۵، ۲۵ کیلودالتون در بیوتیپ ۱ نیترات منفی *C. pseudotuberculosis* (جدا شده از گوسفند) شناسایی گردید.

کلمات کلیدی: *Corynebacterium. pseudotuberculosis*، بیوتیپ ۱ و ۲ نیترات مثبت و منفی، ساختار پروتئینی، SDS-PAGE، گاو، گوسفند

Pajouhesh & Sazandegi: No 75 pp: 46- 50

The study of protein electrophoretic pattern of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from bovine and ovine caseous lymphadenitis case

By: H. Momtaz; Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahr-e-Kord Islamic Azad University, Shahr-e- Kord-IranI

A. Shakerian; Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahr-e-Kord Islamic Azad University, Shahr-e-Kord-Iran

For studying protein electrophoretic pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* , this study was conducted on 16 bacteria isolated from ovine caseous lymphadenitis , and they were compared with *C. pseudotuberculosis* isolated from cattle. All of microbial specimens underwent electrophoresis in SDS – PAGE method in the presence of low molecularly weight (LMWM) protein marker on discrete system gel % 5 – 10 polyacrylamid. Totally 17 protein bands with molecular weight ranging 25- 220 KDA were observed in the understudied bacteria. As a result , the proteins 31, 53, 64, and 68 KDA were identified in all strains of nitrate positive and negative bacteria , proteins 37, 38 KDA in biotype II , nitrate positive (isolated from cattle) and proteins 25, 35, 39, 40, 48 and 120 KDA in biotype I , nitrate negative *C. pseudotuberculosis* (isolated from sheep) .

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis* , Biotype I and II nitrate positive and negative , Protein structure and configuration , SDS-PAGE ,Cattle, Sheep

مقدمه

لنفادنیت پنیری (Caseous Lymphadenitis) یک بیماری مزمن واگیردار در گوسفند و بز است که موجب لاغری و کاهش تولید می‌شـود. بیماری با تورم یک طرفی یا دو طرفی عقده‌های لنفاوی سـطحی مشـخص می‌گردد و ضایعات ناشی از آن قابل سرایت به کلیه ها، ریه ها، کبد و طحال است. بیماری در بیشتر موارد در سلامت عمومی تاثیر سویی نداشته ولی در موارد نادری سیستمیک شده و به مرگ منجر می‌گردد. میزان تلفات ناشی از بیماری خیلی کم اما میزان ابتلا به آن زیاد است (۱، ۹).

بیماری انتشـار جهانی داشـته و از کشورهای مختلف گزارش شده است. بیماری علاوه بر گوسفند و بز در گاو، اسب، شتر، آهو و انسان نیز دیده شده است (۱).

مهمترین عامل مولد لنفادنیت پنیری در گوسفند *Corynebacterium pseudotuberculosis* است اما باکتری‌های دیگری نظیر پاستورلا، *E.coli*، استرپتوکوک، استافیلوکوک و... نیز از جراحات لنفاوی جدا شده است (۸، ۹).

C.pseudotuberculosis علاوه بر لنفادنیت پنیری عامل بیماری‌های دیگری نظیر لنفانزیت ناسـوری در اسـب و گاو، تورم واگیر غده‌های چربی در اسـب، تورم بیضه در قوچ، تورم غیر چرکی مفاصل در بره‌ها اسـت و به نظر می‌رسـد در دام‌های مختلف از پاتوژنز متفاوتی برخوردار باشد (۱).

یکی از بهترین روش‌های مطالعه اجرامی که تنوع زیادی در بیماری‌زایی خود دارند بررسـی سـاختار پروتئینی آن‌ها اسـت که اولین قدم در مطالعه سـاختار پروتئینی و بررسـی عوامل حدت در این اجرام اسـتفاده از ابزارهایی نظیر SDS-PAGE، ایمنوبلات و سکانس کردن پروتئین‌ها می‌باشد (۴، ۷).

مطالعه حاضر نیز با هدف بررسـی الگوی پروتئینی *C.pseudotuberculosis* و مقایسه اختلاف احتمالی این ساختار در دو سویه گاوی و گوسفندی جدا شده از موارد لمفادنیت پنیری صورت گرفته است.

C.pseudotuberculosis یک باکتری گرم مثبت میله‌ای شکل و کوتاه است که واجد دو بیو تیپ I (نیترات منفی) که عمدتا در گوسفند و بز وجود دارد و بیوتیپ II (نیترات مثبت) که از گاو وگاومیش جدا می‌شود می‌باشد (۱، ۸).

مهم‌ترین عوامل حدت دربیماری‌زایی این جرم فسفولیپاز D که اگزوتوکسین پروتئینی باکتری بوده و باعث افزایش نفوذپذیری عروق می‌گردد، عامل چرک‌زایی مقاوم به حرارت که باعث جذب لوکوسیت‌ها به موضع عفونت می‌شود و لیپید موجود در جدار جرم که خاصیت آنتی فاگوستیوز دارد، می‌باشد (۱).

مواد و روش کار

نمونه‌ها

تعداد ۳۰ عدد عقده لنفاوی از گاو و ۷۰ عدد در گوسفند که در طول مدت ۶ ماه به روش نمونه‌گیری تصادفی از کشتارگاه‌های استان تهران تهیه گردید. عقده‌های لنفاوی پیش کتفی، پیش رانی، فوق پستانی و مغابنی که از نظر شکل ظاهری بزرگ و آبسه دار بود انتخاب و در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد.

روش کار

آزمایش‌های مربوط به تحقیق در دو مرحله انجام گرفت:

جداسازی *C. pseudotuberculosis*: نمونه اخذ شده از عقده‌های لنفاوی مشکوک روی محیط آگارخون دار و آگار مغذی کشت داده شد، بعد از ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه روی پرگنه‌های مشکوک به *C. pseudotuberculosis* که در آگار مغذی رشد ضعیفی داشت اما در آگارخون دار پرگنه‌های زرد مات با هاله ضعیفی از همولیز داشت آزمایش کاتالاز و رنگ آمیزی گرم انجام گرفت.

پرگنه‌های کاتالاز مثبت واجد باکتری‌های میله‌ای شکل کوتاه و گرم مثبت جهت خالص سازی در محیط آگارخون دار کشت شده و خصوصیات بیوشیمیایی باکتری از قبیل هیدرولیز اوره و آسکولین و تخمیر قند گلوکز بررسی گردید. پس از اطمینان از خالص بودن *C. pseudotuberculosis* جدا شده، باکتری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه روی محیط آگارخون دار کشت شد و جهت آزمایش های بعدی در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۸).

جهت تعیین بیوتیپ باکتری‌های جدا شده از تست احیای نیترات استفاده شد که سویه‌های جدا شده از گوسفند نیترات منفی و باکتری جدا شده از گاو نیترات مثبت بود (۱).

الکتروفورز باکتری‌های جدا شده به روش SDS- PAGE

مواد: اکریل آمید، بیس اکریل آمید، آمونیوم پرسولفات، سدیم دو دسیل سولفات، تریس بازی، TEMED(N,N,N,N-Tetramethyl ethylene diamon)، برموفنل بلو، کوماسی برلیانت بلو، اسید استیک گلاسیال، متانول، گلیسین، گلسیرین، مرکاتیواتانول و اتانول.

محلول‌ها و بافرها: محلول اکریل آمید ۳۰ درصد، تریس (۵/۱ و ۰/۵ Tris ۰/۱ M)، SDS ۱۰ درصد و آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد.

وسایل: دستگاه الکتروفورز عمودی (Bio-Rad).

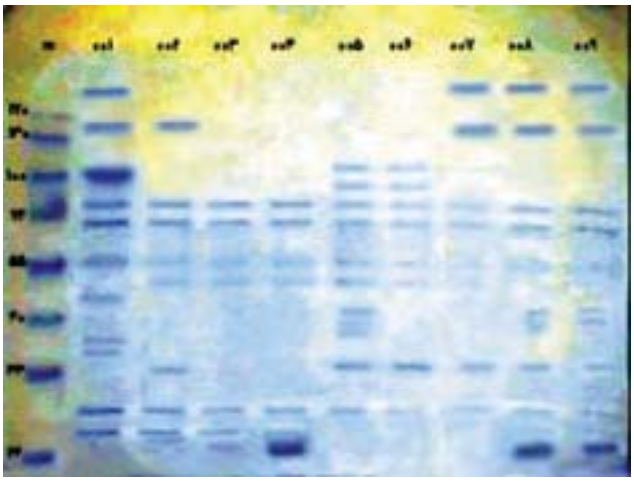
به منظور آماده سازی نمونه‌ها وانجام الکتروفورز از بافر لیزکننده (Tris ۰/۱ M، گلیسرول، SDS، آب مقطر) استفاده شد. باکتری‌های خالص شده به مدت ۲۴ ساعت روی محیط آگار خوندار کشت داده شد. سپس با افزودن محلول PBS (فسفات بافرسالین) روی هر محیط کشت شیرابه ای از باکتری تهیه و ۰/۵ میلی لیتر از شیرابه هر باکتری به ۱ml محلول PBS اضافه و به مدت ۵ دقیقه و در ۱۲۰۰۰ دورسانتریفوژ شد. پس از ۳ نوبت شستشوی نمونه با PBS، به رسوب حاصله ۱ml بافرلیزکننده اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور مایع روئی جهت انجام الکتروفورز انتخاب و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲، ۳).

کلیه نمونه‌های میکروبی در حضور مارکر پروتئینی (فرمنتاس) روی سیستم ژل ناپیوسته ۱۰ و ۵ درصد اکریل آمید به روش SDS-PAGE الکتروفورز گردید.

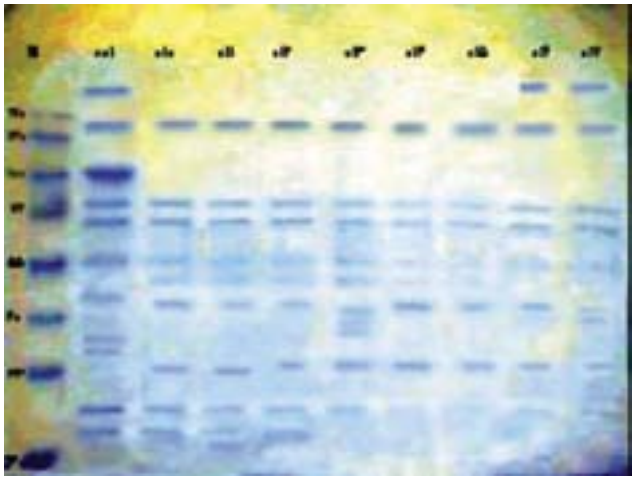
نتایج

از مجموع ۱۰۰ نمونه عقده لنفاوی چرکی گوسفندی و گاوی کشت داده شده تعداد ۱۶ عدد باکتری *C. pseudotuberculosis* نیترات منفی جدا گردید که نمونه‌های میکروبی جدا شده در حضور مارکر پروتئینی و *C. pseudotuberculosis* گاوی نیترات مثبت روی ژل پلی اکریل آمید به روش SDS-PAGE الکتروفورز گردید که نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌ها در تصاویر ۱ و ۲ نشان داده شده است.

در نمونه‌های الکتروفورز شده تعداد ۱۷ باند پروتئینی با اوزان ۲۵ تا ۲۲۰ کیلو دالتون مشاهده گردید که در این میان پروتئین‌های ۳۷ و ۳۸ کیلو دالتون در باکتری جدا شده از گاو اختصاصی بود و در سویه‌های نیترات منفی جدا شده از گوسفند مشاهده نگردید. بالعکس باندهای پروتئینی ۱۲۰، ۴۸، ۴۰، ۳۹، ۳۵ و ۲۵ کیلودالتون مختص سویه‌های گوسفندی بود که در سویه نیترات مثبت جدا شده از گاو مشاهده نشد (ستون ۰۰۱ در تصاویر باندهای پروتئینی ۳۸ و ۳۷ کیلو دالتون در *C. pseudotuberculosis* نیترات مثبت، ستون‌های ۰۰۲ تا ۰۰۷ باندهای پروتئینی ۱۲۰، ۴۸، ۴۰، ۳۹، ۳۵، ۲۵ کیلودالتون



تصویر(۱)-ژل حاصل از SDS-PAGE
***C. pseudotuberculosis*های جدا شده**
(ستون m = مارکر، ستون ۰۰۱ = بیوتیپ ۲
***C. pseudotuberculosis*، ستون‌های ۰۰۲ تا ۰۰۹ = بیوتیپ**
(*C. pseudotuberculosis* ۱



تصویر(۲)-ژل حاصل از SDS-PAGE *C. pseudotuberculosis* های جدا شده (ستون m = مارکر، ستون ۰۰۱ = بیوتیپ ۲ *C. pseudotuberculosis*، ستون های ۰۱۰ تا ۰۱۷ = بیوتیپ ۱ کورینه (*C. pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis نیترات منفی را نشان می‌دهد). باندهای پروتئینی ۲۲۰، ۱۵۰، ۹۰، ۶۸، ۶۴، ۵۳، ۴۳، ۳۱ و ۲۹ کیلو دالتون در کلیه نمونه‌ها تقریباً مشترک بود که در این میان پروتئین‌هایی با اوزان ۶۸، ۶۴، ۵۳ و ۳۱ کیلو دالتون در تمام سویه‌های الکتروفورز شده مشاهده گردید.

بحث

مطالعه الگوی پروتئینی و ساختار پادگنی دخیل در پاسخ ایمنی همورال در اجرام بیماری‌زا و به ویژه اجرامی که دارای تنوع زیادی در بیماری‌زایی می‌باشند از جهات متعددی مورد توجه بوده است. مطالعه ارتباط بین تنوع ساختاری، حدت و ایمنی‌زایی اجرام حاصل یافته‌هایی است که از مطالعه مولکولی ساختار پروتئینی آن‌ها بدست آمده است. شناسایی و ردیابی پادگن محافظت‌کننده Protective antigen، ساختارهای پادگنی ثابت و مطالعه عوامل حدت در باکتری‌ها به ویژه کورینه باکتری‌ها که هم از نظر تنوع توکسین‌های آنتی ژنیک و هم از نظر پاتوژنیسیته به ایجاد چهره‌های متفاوتی از بیماری‌ها در انسان و حیوانات می‌انجامد، فوق العاده اهمیت دارد. در مورد اغلب اجرام عفونی قدم اول در ساختار شناسی و مطالعات واکسن شناسی استفاده از ابزارهایی نظیر SDS-PAGE، ایمنوبلات و سکانس‌کردن پروتئین بوده است. مطالعه حاضر نیز با هدف بررسی ساختار پروتئینی *C. pseudotuberculosis* و مقایسه این ساختار در دو بیوتیپ شناخته شده این جرم (بیوتیپ ۱ نیترات منفی در گوسفند و بیوتیپ ۲ نیترات مثبت در گاو) پایه ریزی شده است. در مطالعات انجام شده توسط بسیاری از محققین پروتئین‌هایی با اوزان ۱۴ تا ۲۰۰ کیلو دالتون در این باکتری معرفی شده است (۴و۵و۶و۷).

در مطالعه انجام شده توسط Braith waite و همکاران (۱۹۹۳) چهار گروه پروتئینی در *C. pseudotuberculosis* شامل پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بیشتر از ۱۱۹ کیلو دالتون، مجموعه سه پروتئینی با اوزان ۸۴، ۶۴ و ۵۸ کیلودالتون، پروتئینی با وزن ۳۰ تا ۳۳ کیلو دالتون و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین بین ۲۰ تا ۲۵ کیلو دالتون نشان داده شد(۴).

Mohan و همکاران، پروتئین‌هایی با اوزان ۲۰۰-۸، ۲۰۰-۲۰ و ۱۹۱-۱۹ کیلودالتون در *C. pseudotuberculosis* جدا شده از بز (بیوتیپ ۱) گزارش کردند که در این میان پروتئین‌های ۳۱/۶ و ۶۸ کیلو دالتون به عنوان سه توکسین اصلی حدت در این جرم معرفی شدند. در این مطالعه پروتئین ۳۱/۶ کیلودالتون به عنوان فسفولیپاز D (اگزوتوکسین) *C. pseudotuberculosis* تشخیص داده شده است(۷).

در تحقیق انجام شده توسط Ellis و همکاران تعداد پروتئین‌هایی به وزن ۲۰ تا ۱۱۲ کیلودالتون در *C. pseudotuberculosis* جدا شده از موارد لنفادنیت پنیری در گوسفند مشخص گردید که در این بین ۶ پروتئین با اوزان ۲۰ تا ۶۸/۱ کیلو دالتون به عنوان توکسین‌های آنتی ژنیک باکتری معرفی شدند (۶).

در مطالعه Ellis و همکاران، ۲۲ باند پروتئینی با اوزان ۲۲ تا ۱۲۰ کیلودالتون در *C. pseudotuberculosis* نیترات مثبت و منفی به روش SDS-PAGE مشخص گردید که پروتئین ۳۱/۵ کیلودالتون به عنوان اگزوتوکسین باکتری در هر دو سروتیپ باکتری مورد مطالعه معرفی گردید(۵).

از مجموع مطالعات انجام شده در خصوص ساختار پروتئینی *C. pseudotuberculosis* و دخالت این پروتئین‌ها در بیماری‌زایی جرم چنین بر می‌آید که ۳ عامل اصلی حدت یعنی فسفولیپاز D(اگزوتوکسین پروتئینی)، عامل چرک‌زایی مقاوم به حرارت و لیپیدهای موجود در جدار جرم در باکتری مورد نظر وجود دارد (۱).

در تحقیق حاضر نیز تعداد ۱۷ باند پروتئینی با اوزان ۲۵ تا ۲۲۰ کیلودالتون در سویه‌های گاوی و گوسفندی *C. pseudotuberculosis* به روش SDS-PAGE مشخص گردید که با مطالعات انجام شده در سایر نقاط همخوانی دارد. در این میان پروتئین‌هایی با وزن ۶۸، ۶۴، ۵۳ و ۳۱ کیلودالتون در هر بیوتیپ ۱ و ۲ باکتری وجود داشت که با توجه به مطالعه محققین دیگر پروتئین ۳۱ کیلودالتون احتمالا همان فسفولیپاز D (اگزوتوکسین) باکتری است. باندهای پروتئینی ۳۷ و ۳۸ کیلودالتون اختصاصاً در *C. pseudotuberculosis* نیترات مثبت گاوی مشاهده شد اما پروتئین‌های ۱۲۰، ۴۸، ۴۰، ۳۹، ۳۵ و ۲۵ کیلودالتون تنها در سویه نیترات منفی گوسفندی وجود داشت که عدم وجود این پروتئین‌ها در سویه گاوی احتمالاً یکی از دلایل بیماریزایی کمتر این جرم در گاو در مقایسه با گوسفند می‌باشد اما در مجموع جهت روشن‌شدن تفاوت‌های ساختار پروتئینی و خصوصاً پادگنی بیوتیپ‌های ۱ و ۲ *C. pseudotuberculosis* بهتر است از آزمون ایمنوبلات با استفاده از آنتی سرم اختصاصی سویه‌های گاوی

و گوسفندی و در صورت امکان از آنتی سرم اختصاصی پروتئین‌های اصلی عامل حدت جرم (خصوصاً پروتئین‌های ۳۱ و ۶۸ کیلودالتون) استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

۱ - حسنی طباطبایی، ع.م. و فیروزی، ر.، ۱۳۸۰، بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۴۹۲، ص ۵۰ تا ۶۰.

۲ - مصطفایی، ع.، ۱۳۷۸؛ الکتروفورز پروتئین در ژل- راهنمای عملی و نظری، ص ۲ تا ۱۲، ۳۳ تا ۳۸، ۵۲ تا ۵۴، ۸۷ تا ۸۹.

3-Bejo,S.K.,1997,SDS-polyacrylamid gel electerophoresis, Institute biosains University Perbanoan Malaysia 43400, Serdong, Selangor.

4-Braithwaite,C.E.,Smith, E.E.,Songer, J.G. and Reine, A.H., 1993, Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium psudotuberculosis*, Vet.Microbiol.,38(1-2): 59-70.

5-Ellis,J.A., Hawk, D.A.,Mills,K.W.and Pratt, D. L.,1991, Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturaly infected sheep with caseous lymphadenitis ,Vet.Immunol. Immunopathol. , 28(3-4):289-301.

6-Ellis, J.A, Hawk,D.A., Mills, K.W.And Pratt, D.L., 1991, Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *corynebacterium pseudotuberculosis* cultured filtrate, Vet. Immunol. Immunopathol.,28(3-4):303-316.

7-Mohan, P.Jayaprakasan, V., Punnoose, K.T. and Mini, M., 2001, SDS-PAGE proteins in *corynebacterium pseudotuberculosis* toxin in goat, Online J.Vet.Res., 5: 245-250

8-Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.and Carter, G.R. , 1994, Clinical veterinary microbiology, Mosby company, pp: 137-143.

9-Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. and Hinchclif, K.W., 2000, Veterinary medicine, 9th edition, W.B. Saunders Company, London, pp:1113-1118.