استخراج و جداسازی LPS غشاء خارجی H.pylori با استفاده از SDS-PAGE و رنگ آمیزی نیترات نقره

جواد زواررضا[۱]
محمود دوستی*[۱]
شهرناز آریا برزین[۱]
صدیقه سلیمانی[۱]
فریده سیاوشی[۲]
صادق مسرت[۳]

۱. گروه بیوشیمی پزشکی
۲. گروه میکروب شناسی
۳. مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: *Helicobacter pylori (H.pylori)* باکتری گرم منفی، مارپیچی شکل، میکروآئروفیلیک، تولیدکننده اوره آز و متحرک بوده که به pHهای اسیدی مقاوم می‌باشد. از مشخصات این باکتری لیپوپلی ساکاریدهای یا LPS (Lipopolysaccharids) منحصر به‌فرد آن است. LPS این باکتری مسئول مقاومت زیاد آن در پایداری به اسید معده و فرار آن از سیستم ایمنی بدن می‌باشد، که آن را هدفی مهم برای اهداف مطالعاتی یا تشخیصی قرار داده است. برای انجام این قبیل مطالعات نیاز به استخراج و جدا سازی LPS از غشاء خارجی می‌باشد.

روش بررسی: LPS از غشاء خارجی یا پوشش H. pylori حاصل از کشت نمونه معده بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده و سرطان معده استخراج گردید. استخراج LPS در این تحقیق با استفاده از دو روش Proteinase K و Hot-Phenol انجام شده و الگوی الکتروفورتیکی آن بوسیله SDS-PAGE و با رنگ‌آمیزی نقره بدست آمد و بالاخره با الگوی الکتروفورتیکی LPS نمونه E.coli سوش $O111: B_4$ و سالمونلاسوش ATCL 14028 مقایسه گردید.

یافته‌ها: **الکتروفورز** LPS استخراج شده یک الگوی نردبانی را نشان داد. باندهای بدست آمده در سه دسته با وزن مولکولی بالا، متوسط و پایین قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: یکی از عوامل مهم در بیماری زائی این باکتری LPS آن است .به‌دلیل تعداد متفاوت زنجیره‌های اولیگوساکاریدی، الگوی الکتروفورزی به‌دست‌آمده بصورت نردبانی است. باندهای با وزن مولکولی بالا S-LPS و باندهای با وزن مولکولی پایین R-LPS (بدون زنجیره جانبی) را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: Proteinase K، H.pylori، SDS-PAGE، LPS.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی پزشکی، تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۴
email: doostimd@sina.tums.ac.ir

مقدمه

لیپوپلی ساکاریدها (LPS) یا آندوتوکسین‌ها، خانواده‌ای از گلیکو لیپیدهای فسفریله می‌باشند که در پوشش باکتریهای گرم منفی از جمله، *Helicobacter pylori (H.pylori)* وجود دارند. LPS آنتی‌ژن اصلی سطح این باکتریها بوده و برای یکپارچگی فیزیکی و عملکرد غشاء خارجی لازم می‌باشند.[۱] LPS از نظر ساختاری از سه قسمت تشکیل شده است که از خارج به داخل عبارتند از پلی ساکاریدهای خارجی (o-chain) که از واحدهای تکراری هفت قندی تشکیل شده‌اند و در آنتی ژنیسیته باکتری دخالت دارند، هسته مرکزی (core)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

که از ۱۵–۱۰ قند تشکیل شده و در نفوذپذیری غشاء مهم می‌باشد و بالاخره لیپید A که لنگر LPS روی غشاء بوده و دارای خصوصیت ایمونولوژیک می‌باشد.[۲]

بطور معمول LPS توسط تمام باکتریهای گرم منفی بیان شده و سطح غشاء خارجی را می‌پوشاند، که بعنوان یکی از اهداف اولیه سیستم ایمنی پستانداران عمل می‌نماید. شناسایی وجود LPS توسط سلولهایی مانند مونوسیت‌ها و ماکروفاژها سبب شناسایی سریع و واکنش ایمنی بر علیه عفونت باکتریهای گرم منفی می‌شود.[۳و۴] LPS دارای جایگاه اتصال بر روی آنتی بادی بوده و توانایی فعال‌سازی لنفوسیت‌ها، ماکروفاژ و گرانولوسیت‌ها را دارا می‌باشد. گذشته از اهمیت LPS در آنتی ژنیسیته باکتری، LPS موجود در H.pylori دارای خواص منحصر به‌فردی مانند تحریک پپسینوژن، گاسترین، هیستامین و غیره می‌باشد.[۵] در مورد ناهمگون بودن LPS غشاء خارجی H.pylori، E.coli سوش $O111:B_4$ و سالمونلا سوش ATCL 14028، مطالعات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بسیاری انجام شده است و این مطالعات مبتنی بر استخراج، جداسازی و خالص‌سازی این ماده از باکتری می‌باشد. روشهای مختلفی برای استخراج، جداسازی و خالص‌سازی LPS وجود دارد که می‌توان به روش استخراج با Hot– Phenol[۶]، بوتانل[۷]، EDTA[۸]، اتر[۹] و Proteinase K[۱۰] اشاره نمود. در بین این روشها، Proteinase K و Hot– Phenol بیشتر مرسوم می‌باشند.

روش Hot– Phenol برای استخراج تجاری و مقادیر بالای LPS بکار می‌رود و نیز به‌علت اینکه فنل خاصیت سرطان‌زایی داشته و می‌تواند باعث مسمومیت گردد، از روش Proteinase K استفاده می‌شود که به‌علت سادگی نسبی و زمان‌بری کم و درصد خلوص بالا برای مقادیر کم باکتری مناسب می‌باشد. بررسی LPS استخراج شده توسط این روش با استفاده از الکتروفورز حاکی از کارآیی این روش است.

روش بررسی

نمونه‌های بیوپسی گرفته شده از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده و سرطان را که به مرکز بیماریهای گوارش و کبد بیمارستان شریعتی مراجعه کرده و تست اوره آز آنها مثبت بود، بر روی محیط کشت اختصاصی Brucella Blood Agar کشت وارد و در انکوباتور با دمای ۳۷^{oC} و غلظت CO_2، ۱۰٪ به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد، برای اطمینان از آلوده نبودن محیط کشت و اینکه محیط تنها حاوی H.pylori است، از قسمتهای مختلف هر پلیت یک یا چند لام تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. بعد از حصول اطمینان از نوع باکتری، باکتریها در لوله‌های اپندورف حاوی استون کشته شده و نگهداری گردید.

استخراج LPS، بعد از حذف استون از محیط، باکتریها در۱۰ml بافر فسفات سالین Cold Dulbeco PBS با pH=۷/۲ هموژنیزه گردید. ۱/۵ ml از این محلول به‌مدت ۱/۵ دقیقه با ۱۰۰۰g در دمای ۴^{oC} سانتریفوژ شد، ته نشست در ۵۰ ml از بافر لیزکننده که حاوی ۲٪ = SDS، ۴٪ = 2- Mercapo Ethanol و گلیسرول ۱۰٪، Tris –HC با غلظت با pH=۶/۸ و بروموفنل بلو بود، حل گردید. در مرحله بعد ۲۵ µg از Proteinase K در ۱۰ ml از محلول Lysing Buffer حل شده و به هر لوله اضافه گردید و به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۶۰^{oC} انکوبه شد. بازای هر لوله نمونه، یک لوله نمونه بدون Proteinase K بعنوان کنترل در نظر گرفته شد.[۱۰]

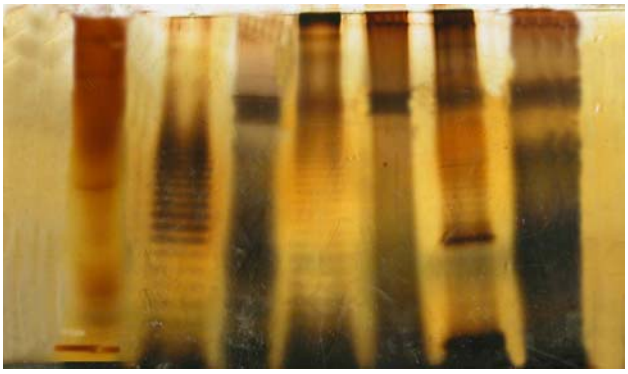
برای جداسازی LPS استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل اکریل آمید همراه با SDS[۱۱] استفاده شد که شامل ژل جداکننده ۱۲ تا ۱۵٪ و ژل متراکم‌کننده ۵٪ می‌باشد.[۱۱] ژل جداکننده حاوی یک مول Tris-HCl با pH= ۸/۸، آمونیوم پرسولفات ۱۰٪، سدیم دودسیل‌سولفات SDS ۱۰٪، TEMED ۱٪، اکریل آمید ۳۰٪ و بیس اکریل آمید ۰/۸٪ و ژل متراکم‌کننده حاوی یک مول Tris-HCl با pH=۶/۸، آمونیوم پرسولفات ۱۰٪، SDS ۱۰٪، TEMED ۱٪، اکریل آمید ۳۰٪ و بیس اکریل آمید ۰/۸٪ بود. در SDS-PAGE روی ژل متراکم‌کننده ۵۰V و برای ژل جداکننده ۹۰V–۷۰ بمدت ۴–۳ ساعت عمل جداسازی صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی ژل‌ها با روش نیترات نقره آمونیاکی که اولین بار توسط Tsai-Frach ارائه گردید انجام گرفت.[۱۲]

یافته‌ها

در شکل شماره۱ باندهای جداسازی‌شده LPS بر روی ژل SDS-PAGE با نیترات نقره که با روش، Proteinase K استخراج شده مشاهده می‌شود. در هر چاهک ۶ µg از نمونه‌های مختلف ریخته شده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]



۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱

شکل-۱: باندهای جداشده LPS گونه‌های مختلف بوسیله SDS-PAGE ،رنگ‌آمیزی نقره باندهای ۵و۳و۲و۱ مربوط به LPS، H.Pylori، باند ۴ سالمونلاتیفی موریوم سوش ATCL 14028، ،باند ۶ E.coli سوش O111:B، باند ۷، مارکر می‌باشند.

بحث

باکتری H.pylori سبب عفونت مزمن مخاط معده در انسان شده و عامل اصلی سرطان، گاستریت و زخم معده می‌باشد. از لحاظ ساختاری LPS موجود در H.pylori بخوبی شناسایی شده است.[۱] LPS به دو نوع خشن (Rough) R-LPS که چهار اسید چرب دارد و نوع صاف یا S-LPS که دارای شش اسید چرب است تقسیم می‌شود.

زنجیره اسیدهای چرب موجود در LPS در H.pylori بلندتر از زنجیره اسیدهای چرب LPS موجود در مقایسه با E.coli هستند و بطور متوسط ۱۸-۱۶ اتم کربن دارند. بعلاوه فسفاتِ موقعیت چهار از قند توسط یک اتانول امین جایگزین می‌شود.[۱] بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که این تغییرات سبب می‌شود که لیپید LPS A این باکتری دارای خواص آندوتوکسیک کمتری نسبت به LPS سایر باکتریها باشد.[۱و۲] Moran، نشان داده شده است که خواص میتوژنیک LPS این باکتری ۱۰۰۰ برابر کمتر از LPS باکتری سالمونلا تیفی موریوم است و مقدار کشندگی آن در موش ۵۰۰ برابر کمتر است و نیز در آزمون LAL، ۵۰۰-۱۰۰ برابر فعالیت کمتری از خود نشان می‌دهد.[۱] آنچه بسیار مهم است این که O-chain، H.pylori می‌تواند به آنتی‌ژنهای گروههای خونی y و Lewis x شباهت داشته باشد. بنابراین با وجود این شباهت می‌توان حدس زد که این ساختارها، ساختارهای موجود بر سطح سلولهای میزبان را تقلید نموده و مانع حمله سیستم ایمنی میزبان به باکتری شوند.[۱۲] جداسازی و بررسی خصوصیات LPS بدست آمده از هفت سویه H.P که توسط S.Mills انجام پذیرفت،[۱۵] هتروژنیسیته زیاد را در LPS، موجود در ساختمان H.pylori نشان داده است. آنان در مطالعه خود LPS را با استفاده از دو روش Hot-phenol و پروتئیناز K استخراج کردند. الگوی بدست آمده توسط S.mills و همکارانش بسیار شبیه به الگوی بدست آمده در مطالعه انجام شده می‌باشد.[۱۵] این هفت سویه الگوی متفاوتی از LPS را نشان دادند و دو نوع S-LPS و R-LPS در مطالعه اخیر شناسایی گردید. در استخراج LPS موجود در H.pylori نشان داده شده است که در قسمت بالای ژل یک‌سری از باندهای وزن ملکولی زیاد بصورت نردبانی مربوط به LPS واجد زنجیره O (S-LPS) و یک یادوباند در قسمت پائین ژل مربوط به LPS فاقد زنجیره O می‌باشند (R-LPS). در این مطالعه دو بیمار مبتلا به سرطان معده، دو بیمار مبتلا به زخم معده و دو بیمار مبتلا به گاستریت مورد بررسی قرار گرفتند و الگوی الکتروفورزی شامل یک باند با حرکت سریع با وزن ملکولی در انتها، یک باند پهن با حرکت متوسط با وزن ملکولی در انتها، یک باند پهن با حرکت متوسط با وزن ملکولی دالتون در میانه ژل و یک باند با حرکت آهسته با وزن ملکولی دالتون در بالای ژل مشاهده گردید. در باند مربوط به E.coli و سالمونلا طرحی نردبانی مشاهده شد که هریک از خطوط پائین‌تر احتمالاً دارای یک واحد الیگوساکاریدی تکراری بیشتر است،[۱۶] که بیانگر حفظ ساختار LPS در مراحل مختلف استخراج آن بوده است و باند سریع به احتمال زیاد شامل LPS و الیگوساکارید مرکزی می‌باشد.[۱۷] به‌علت اهمیتی که LPS در پاتوژنز بیماریهای دستگاه گوارش دارد و روز به روز اهمیت آن برای تشخیص و درمان افزایش می‌یابد، انتظار می‌رود که با تغییر در روشهای موجود بتوان به روش آسان، سریع و ارزان دست یافت. به همین دلیل طرح تحقیقاتی فوق که عمدتاً روش استخراج و جدا سازی LPS از H.pylori بوده و مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. برای رسیدن به این نتیجه حداقل ۵۰ ژل با شرایط متفاوت گذاشته شد تا بتوان یک روش قابل اعتماد برای استخراج، جداسازی و رنگ‌آمیزی LPS در نمونه H.pylori بدست آورد.

سپاسگزاری: از سرکار خانمها: راضیه آبفت، ملیحه شکوه فرد و ساناز ذبیحی‌نیا که در این طرح ما را یاری کرده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

References

1. Moran AP. Helicobacter pylori: Physiology and Genetics. 2nd ed. Washington DC: ASM Press: 2001.
2. Moran AP. The role of lipopolysaccharide in Helicobacter pylori pathogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 1996, 10: 39-50.
3. Young GO, Brown S, Stemmet N, Lastovica AJ, Marks IN, Modlin IM, et al. The pepsinogen releasing effect of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Helicobacter* 2002; 7: 30-8.
4. Kidd M, Miu K, Tang LH, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sandor A, et al. Helicobacter pylori lipopolysaccharide stimulates histamine release and DNA synthesis in rat enterochromaffin-like cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 1110-7.
5. Peterson WL. Gastrin and acid in relation to Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther* 1996, 10: 97-102.
6. Westphal O, Jann K Bacterial Lipopolysaccharides: extraction with Phenol-Water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr Chem* 1965; 5: 83-91.
7. Morrison DC, Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from Escherichia coli O111:B4 prepared by two extraction procedures. *J Biol Chem* 1975; 250: 2911-19.
8. Goldman RC, Leive L. Isolation of lipopolysaccharides by EDTA treatment of Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 21: 290-9.
9. Ribi E, Haskins WT, Landy M, Milner KC. Preparation and host-reactive properties of endotoxin with low content of nitrogen and lipid. *J Exp Med* 1961; 114: 647-63.
10. Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 1983 ;154: 269-77.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
12. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982; 119: 115-9.
13. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002; 4: 837-51.
14. Appelmelk BJ, Negrini R, Moran AP, Kuipers EJ. Molecular mimicry between Helicobacter pylori and the host. *Trends Microbiol* 1997; 5: 70-3.
15. Mills SD, Kurjanczyk LA, Penner JL, et al. Antigenicity of Helicobacter pylori lipopolysaccharides. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3175-80.
16. Yokota SI, Amano KI, Shibata Y, Nakajima M, Suzuki M, Hayashi S, et al. Two distinct antigenic types of the polysaccharide chains of Helicobacter pylori lipopolysaccharides characterized by reactivity with sera from humans with natural infection. *Infect Immun* 2000; 68: 151-9.
17. Poxton I. Antibodies to lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* 1995; 186: 1-15.
18. Goldstein J, Hoffman T, Frasch C, Lizzio EF, Beining PR, Hochstein D, et al. Lipopolysaccharide (LPS) from Brucella abortus is less toxic than that from Escherichia coli, suggesting the possible use of B. abortus or LPS from B. abortus as a carrier in vaccines. *Infect Immun* 1992; 60: 1385-9.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 1, Apr 2007: 19-23

Extraction and separation of lipopolysaccharide from outer membrane of *Helicobacter pylori*

Zavarreza J[1]
Doosti M[1*]
Ariabarzin Sh[1]
Soleymani S[1]
Siavoshi F[2]
Maserrat S[3]

1- Department of Medical Biochemistry
2- Department of Microbiology
3- Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital

Tehran University of Medical Science

* Corresponding author: Depart of Medical Biochemical, School of Medicine, Poursina Ave., Tehran.
Tel: +98-21-88953004
email: doostimd@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is one of the major causes of peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. This bacterium has a special lipopolysaccharide (LPS), which is responsible for its pathogenesis and its high resistance against gastric acid and escape from the human immune system. This property makes it a target for further research and diagnostic goals. In this study, the extraction of the LPS and separation from the outer membrane is required.

***Methods*:** The LPS was extracted from the outer membrane, or envelope, of *H. pylori* obtained from patients suffering from gastritis, gastric ulcer and gastric cancer. LPS extraction was performed using the proteinase K method. SDS-PAGE and silver staining were applied to investigate the electrophoretic pattern of the LPS. This pattern was compared with that of E. coli serotype O111:B4 and Salmonella serotype ATCC 14028.

***Results*:** The extracted LPS has a ladder-shaped electrophoretic pattern and the bands are located in three groups: high, medium and low molecular weights.

***Conclusion*:** The distribution of the bands of the ladder-shaped electrophoretic pattern is caused by the different number of oligosaccharide chains associated with the LPS. The high molecular weight bands represent S-LPS and the low molecular weight bands represent the R-LPS, which lacks the O-chain.

Keywords: Proteinase K, *H. pylori*, SDS-PAGE, LPS.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]