تقدير البروتينات الكلية لـ*Cryptosporidiumparvum* بتقنية الهجرة الكهربائية

Determination of total protein in *Cryptosporidium parvum* by Electrophoresis technique.

سيناء عبدالله علي الجرجري، بيداء حازم عبد الخياط

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٩ / ١١ / ٢٠١٠ ---- **تاريخ القبول:** ٢٨ / ٦ / ٢٠١١)

الملخص

تضمن البحث الحالي تقدير كمية البروتين بالاعتماد على طريقةLoweryوفصل البروتينات باستخدام تقنية Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Electrophoresis Technique(SDS-PAGE) لعينات براز من اطفال مصابين بداء البويغيات الخبيئة Cryptosporidiosis , وأظهرت نتائج هذا البحث تركيز البروتين عند 30.7مايكرو غرام /سم٣ بالاعتماد على المنحني القياسي للبروتين ،في حين أظهرت نتائج فصل البروتينات ظهور خمس حزم وبأوزان جزيئية تقريبية ١١,٤٠٩، ٢٥,٩٤٣، ٥٠,٨، ٥٨,٩٩٠، ٧٥,٦٦ كيلو دالتون.

المقدمة:

تعد أنواع طفيلي البويغيات الخبيئة من الاوالي الطفيلية التابعة لشعبة المعقدات الفمية Apicomplexaوالتي توجد بصورة عامة في المياه العالمية (١)وتحدث الاصابة للعديد من أصناف الفقريات بما فيها الطيور والأسماك والثدييات والزواحف (٢،٣)وهذه الأنواع تنتقل لامتلاك أكياسها المقاومة ،إذ تصيب القناة المعدية المعوية gastrointestinaltract مسببة داء البويغيات الخبيئة Cryptosporidiosis والمتمثل بالاصابةبالاسهال المائي الحاد أوالإسهال الشحمي steatorrheic مع المغص (٤،٥) وقد يصاحبه الغثيان والآلام بطنية كما تسبب فقدان الشهية وأحيانا حمى خفيفة وغالبا ماينتهي المرض تلقائيا إلا عندذوي النقص المناعي كمرض الايدز حيث تسبب نزلة معوية شديدة تشبه الكوليرا(٦) كما سجلت إصابة القناة التنفسية للعديد من المضائف الفقرية ،تحدث اغلب الاصابات بين البشر anthroponotic (إنسانإلىإنسان) مع حدوث الاصابة عن طريق الحيوان zoonotic (حيوان إلىإنسان)(٧،٨،٩).سجلت الاصابة بطفيل *C.parvum* في ستة قارات وشخص في الأشخاصبأعمار مابين (٣)أيام و(٩٥)سنة (١٠).يعيش الطفيلي لفترة قصيرة في الأشخاص ذوي المناعة التامة ،إذأن المناعة الخلوية والخلطية لها دور كبير في مقاومة الاصابة (١١).ويزداد شدة الخطر عند إصابةالأشخاص ذوي المناعة القليلة كالأطفال الرضع والأشخاص اللذين يعانون من سوء التغذية والأشخاص المصابين بالايدز فضلا عن الأشخاص اللذين يتناولون بعض الأدوية المثبطة للمناعة immunosuppressive therapy ،كل ذلك يؤدي إلى الاصابة المزمنة بداء البويغيات الخبيئة وبالتالي حصول الجفاف وسوء الامتصاص (١٢).في الوقت الحاضر عرف أكثر من ٢٠ نوع لهذا الطفيلي كأنواع سارية من بينها *Crptosporidium parvum* يرتبط مع إصابةالإنسان بداء البويغيات الخبيئة ويضم هذا النوع بدوره ٢٥ نمط وراثي genotype ،إذ يعد كل من *C.hominis* و*C. bovis نمط وراثي* I ونمط وراثي B على التوالي للنوع *C. parvum* (١٣)وقد استخدمت تقنية Two-Dimensional electrophoresis (2-DE) لفصل بروتينات طفيلي البويغيات الخبيئة ،إذ يتم تقدير البروتين عن طريق عدد الحزم الظاهرة في الجيل (١٤).ومن ناحية أخرى استخدمت تقنية denaturing polyacrylamid gel(DPGE) و single strand conformation polymorphism (SSCP) في تشخيص DNA لطفيلي *C. parvum* وتحديد الأنماط الوراثية المختلفة وتصنيفها إلى مستويات تشمل الأنماطالوراثية وتحت الوراثية ،ويمكن اعتماد هذه التقنيات كطرق تشخيصية جزيئية للكشف عن طفيلي *C. parvum* مقارنة بطريقة PCR التي تستغرق وقت أطول ومكلفة ،إذ يمكن تشخيص عدد كبير من العينات بالاعتماد على الاختلافات الجينية genetic variation بدون الحاجة إلى تحليل التسلسل الحامض النووي DNA (١٥).ولأول مرة تطرقنا في هذا البحث لفصل بروتينات أكياس بيض طفيلي *C. parvum* من عينات براز المصابين في محافظة نينوى /العراق.

طريقة العمل:

جمعت عينات لبراز اطفال مصابين بطفيلي C. parvum ثم عزلت أكياس البيض oocyst بالاعتماد على طريقة (١٦) وحفظت الأكياس في محلول دارئ الفوسفات المتعادل phosphate buffer saline(PH 7.2) وبعدد نهائي ١٠×٣ ٤خلية /مل ،حطمت الأكياس باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic Disintegrater بتسليط (١٦٠٠٠)ذبذبة /ثانية لمدة ٣٠ ثانية وباستخدام الحمام الثلجي وكررت العملية ثلاث مرات مع توقف لمدة خمسة دقائق بعد كل مرة لغرض الحفاظ على درجة واطئة للمحلول ،ثم فصل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد بسرعة ١٠٠٠٠ دورة /دقيقة ولمدة نصف ساعة.ومن ثم حددت كمية البروتين الكلي بطريقة(١٧) وأخيرا تم فصل البروتينات بالاعتماد على تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Electrophoresis Technique Gel(SDS-PAGE) حيث يعتمد الفصل بالهجرة

ISSN:1813 –

الكهربائية على نوع الشحنة في البروتينات ونسبها ويمكن إضافة(SDS)لإحاطة الشحنات في المجاميع المختلفة للبروتينات المراد فصلها ويعتمد الفصل بصورة رئيسة على الوزن الجزئي للبروتينات (١٨)واستخدمت طريقة (١٩)في عملية الفصل.

النتائج والمناقشة:

تقدير كمية البروتين

قدر تركيز البروتين الكلي لأكياس بيض طفيلي البويغيات الخبيئة بالاعتماد على المنحني القياسي للبروتين كما موضح بالشكل (١) وتم تقدير تركيز البروتين وثبت عند(٣٠,٧) مايكرو غرام /سم٣.

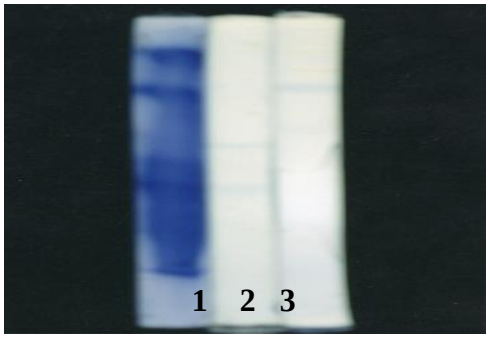
شكل (١): المنحني القياسي لتحديد كمية البروتين فصل البروتينات بتقنية الهجرة الكهربائية

أظهرت نتائج الفصل للطفيلي خمس حزم لبروتينات الطفيلي الكلية ،إذ تم إجراء فصل البروتينات القياسية معلومة الأوزان الجزئية الموضحة في الجدول (١).

الجدول(١)الاوزان الجزيئية والمسافات المقطوعة للبروتينات القياسية

البروتينات	الوزن الجزئي (دالتون)	المسافة النسبية (سم)
Lysozyme	14600	5.9
Trypsin	23000	4.7
Pepsin	36000	3.6

وبقياس المسافة النسبية التي قطعتها حزم البروتينات القياسية والمبينة في الصورة (١) بالاعتماد على الأوزان الجزيئية لهذه البروتينات تم تحديد المنحني لتحديد الوزن الجزئي الموضح في الشكل (٢) وتحديد الأوزان الجزيئية التقريبية للبروتينات المفصولة.وقد أظهرت النتائج الحصول على خمس حزم بروتينية وبأوزانتقريبية ١١,٤٠٩، ٢٥,٩٤٣، ٥٠,٨، ٥٨,٩٩٠، ٧٥,٦٦ كيلودالتون .

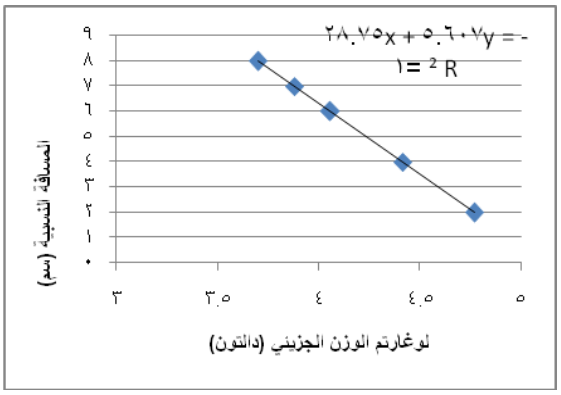


الصورة (١): حزم بروتينات طفيلي البويغياتالخبيئة مع البروتينات القياسية

(١) توضح حزم البروتينات لعزلة الطفيلي

(٢) حزمة البروتين القياسي (بروتين اللايسوزايم)

(٣) حزمة البروتين القياسي (بروتين التريسين + البيسين)



وقد استخدمت تقنية الترحيل الكهربائي لفصل بروتينات العديد من الاوالي من ضمنها طفيلي *Giardia lamblia* فقد أظهرت نتائج الترحيل ظهور أربع حزم تراوح وزنها الجزيئي من ٥٨٠٠٠- ١٦٠٠٠٠ دالتون الأمر الذي يدل على وجود سلالات مختلفة لهذا الطفيلي (٢٠)،وفيما يخص طفيلي المشعرات المهبلية فقد استخدمت هذه التقنية لفصل بروتينات الطفيلي والتي بلغت (١٠)حزم جزيئية تقريبية بين (٥٨-٧٢)كيلودالتون (٢١).من المعروف إن تقنية الهجرة الكهربائية من التقنيات المستخدمة لفصل البروتينات وقد استخدمت هذه التقنية بواسطة (SDS) لتشخيص البروتينات الخاصة بجدار أكياس بيض طفيلي *C. parvum* (٢٢). اذاعتمد على الاختلافات الكبيرة في كلايكوبروتين (جين) للتميز بين النوعين *C. parvum,C.hominis* والذي يؤكد بدوره على ضرورة التقصي عن الاختلافات بين الأنواع التي تصيب الإنسان والحيوان لغرض وضع خريطة للجينات الخاصة بإصابةالإنسان بطفيل البويغيات الخبيئة (٢٣) .وفي دراسة أخرى استخدم فصل الأنماط الجينية المختلفة في التميز بين النوعين *C. parvum,C.hominis* إذ لوحظ وجود ثمانية أنماط جينية للنوع *C. hominis* في حين أظهرت الدراسة وجود ستة أنماط جينية للنوع *C. parvum* .إذتمت المقارنة بين النوعين لاول مرة بالاعتماد على الاختلافات الجينية بينالانواع المتقاربة (٢٤) وفي هذا البحث تم ولاول مرة التطرق الى فصل بروتينات اكياس طفيلي *C.parvum* من عينات براز المصابين في محافظة نينوى/العراق.والتي تضمنت التقصي عن البروتينات الخاصة بطفيلي *C. parvum* اذ تم استخدام عينة واحدة لهذا الغرض ولوحظ وجود اختلافات كما ذكرت في النتائج بين الاوزان الجزيئية لهذه العينة لذلك نوصي باستخدام عينات اكثر من هذا الطفيلي لفصل بروتيناته بطريقة الهجرة الكهربائية ليتسنى لنا التحري عن السلالات الخاصة بهذا النوع .

References

1. Medema, G.Teunis, P., Blokker, M., Deer, D., Davison, A., Charles, P.and Loret,J.F.2006.WHO guide lines for drinking water quality: *cryptosporidium.* who, new york,ny.
2. Fayer, R.2004 .*cryptosporidium:* awater -borne zoonotic parasite.Vet.parasitol.126:37-56.
3. Xiao. Fayer,R., Ryan,U.M. and Upton, S.J.2004. *Cryptosporidium* taxonomy :recent advances and implications for public health. clin. Microbiol. Rev.17:72-97.
4. Chen, X.M., Keithly , J.S., Paya, C.V. and LaRusso, N.F. 2002. Cryptosporidiosis. N. Engl. J. Med. 346:1723-1731.
5. Kosek, M., Alcantara, C., Lima, A.A. and Guerrant, R.L. 2001. Cryptosporidiosisn:an update. Lancet Infect.Dis.1:262-269.
6.Peterson,C.1992. Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis.,15:903-909.
7. Caccio, S.M.2005. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis.Parassitology.47:185-192.
8.Ramirez,N.E.,Ward,L.A.and Sreevatsan.2oo4.Areview of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals.Microbes.Infect.6:773-785.
9.Xiao,L. and Ryan, U.M.2004.Cryptosporidiosis:an update in molecular epidemiology. Curr. Opin. Infect. Dis. 17:483-490.
10. Flanigan, T.P. and Soave, R.1993. Cryptosporidiosis. Prog. Clin.Parasitol.1-20.
11. Riggs, M.W. 2002. Recent advances in cryptosporidiosis:the immune response. Microbes Infect. 4:1067-1080.
12.Hunter,P.R. and Nichols,G.2002.Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients .Clin. Microbiol. Rev. 15:145-154.
13. Satoh ,M. and Nakai ,Y.2007.Discrimination of *Cryptosporidium speciss* by denaturing gradient gel electophoresis.Parasitol.Res.101:463-466.
14. Siddiki ,A.Z.2007.Standardization of sample preparation for two-Dimensional electrophoresis of *Cryptosporidium parvum*sporozoites.Bangladesh J.Microbiol.24(2):119-124.
15. Gasser ,R.B., AbsEL-osta ,Y.G. and Chalmers, R.M.2003.Electrophoretic analysis of genetic variability within *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis in the united kingdom. Appl. Environ. Microbiol.69(5):2719-2730.
16.Freire-Santos,F.,Oteiza-Lopez,A.M.,Vergara-castiblanco,C.A. and Area-Mazas,M.E.1999.Effects of salinity,temperature storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum.Vet.Parasitol.,87:1-7*
17 .*Lowery* ,O.H., Rosebrough, N.J., Farr,A. L. and Randall,R.J.*1951* .Protein measurement with the folin phenol reagent.J.Biol.chem.193:265-275
18.Robyte ,J.E. and White ,B.J.1987.Biochemical techniqes theory and practice. Books/cole publishing company .U.S.A.
19. Laemmli ,U.K.1970.Cleavage 0f structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature.227:680-685.
20.Shnawa ,B.H., Al-Hussan, I.A.andAwad , A.H. 2000. Electrophoretic patterns of *Giardia lamblia*parasite in basrahprovince.Basrah J.Science, 18(2): 43-50.
21. Bonzer,P.1997.Immunological detection and subcellular lacolization of HSP70 and HSP60 homologs in *Trichomonas vaginals.* J. Parasitol., 83 (2): 224-229.
22. Jenkins ,M.C., Trout ,j., Murphy ,C., Harp, J.A., Higgins, J., Wergin ,W. and Fayer ,R.1999.Cloning and expression of a DNA sequence encoding a 41-Kilodalton *Cryptosporidium parvum* oocyst wall protein.Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.6(6):912.
23. J.ex ,A.R. and Gasser ,R.B.2008.Analysis of genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scaning.Electrophoresis,29(20):4119-4129.
24. Jex ,A.R.Pangasa ,A., Campbell, B.E., Whipp. M., Hogg, G., Sinclair, M.I., Sterens,M. and Gasser, R.B.2008.Classification of *Cryptosporidium species* from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence bace multilocus analysis following mutation scaning .Journal of clinical Microbiol., 46(7):2252-2262.

Abstract

The project involves the determination the amount of protein by lowery method and the separation of protein by (SDS-PAGE).for stool samples for child have cryptosporidiosis.The result of this project indicated that the protein concentration is 30.7Mg/cm3 by using the callbration curve for protein and also indicated that the appearance of five bands of protein have molecular weight nearly 58.990,25.943,11.409,75.66,50.8 kilo Dalton.