فصل وتنقية جزئية لذيفان Vaginolysin من بكتريا Gardnerella vaginalis المعزولة من النساء المصابات بالتهاب المهبل

شيماء جاسم محيميد السلطاني ، فريال جميل عبد

جامعة بابل /كلية العلوم

الخلاصة

انتج ذيفان vaginolysin من بكتريا *G.vaginalis* المعزولة من عينات سريرية لنساء مصابات بالتهاب المهبل البكتيري في وسط زرعي خاص لهذا الغرض ، بعد ذلك نقي الذيفان جزئياً باستخدام (Sephadex G 200) ، تم حساب الفعالية التحليلية للذيفان تجاه كريات الدم الحمراء وكانتت للمستخلص الخام 160 وحدة/مل، بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم 320 وحدة/مل وبعد التنقية بالترشيح الهلامي 160 وحدة/مل والفعالية النوعية للذيفان للمستخلص الخام 10.6وحدة/ملغم ، بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم 29.09 وحدة/ملغم وبعد التنقية بالترشيح الهلامي 94.11 وحدة/ملغم كما تم حساب تراكيز البروتين .

Abstract

The toxin vaginolysin of bacteria *G. vaginalis* which isolated from clinical specimen of women infected with bacterial vaginosis in special culture media for this purpose then toxin was partially purified by sephadex G 200 , then toxin hemolytic activity for crude was found 160 unit/ml , after precipitation with ammonium sulfate 320 unit/mg and after gel filtration was 160 unit/ml specific activity also was found for crude 10.6 unit/mg for precipitation with ammonium sulfate 29.09 unit/mg and for gel filtration was 94.09 unit/mg and after that protein concentrations were found .

المقدمة

شخصت بكتريا *Gardnerella vaginalis* للمرة الاولى من قبل Leopold عام (1953) من مرضى رجال مصابين بالتهاب البروستات ونساء مصابات بالتهاب الرحم .

وفي عام (1955) تمكن العالمان Gardner و Dukes من عزلها على وسط غراء الدم الصلب وليس على الاوساط الزرعية الاخرى وكانا يعتقدان بانها المسؤولة عن الافرازات المهبلية .

ارتبطت بكتريا *G. vaginalis* مع متلازمة المهبل فسميت بالتهاب المهبل الغيرمتخصص (non-specific vaginatis) وذلك بسبب غياب المسببات المعروفة مثل *Trichomonas vaginalis* , *Candida* Spp. وحتى عام 1982 عندما توفي Gardner ظل هذا المصطلح ليشمل فقط الحالات الغير مشخص فيها المسبب (Gardner,1983a; Gardner,1983b) .

ثم بعد ذلك تمت التوصية باستبدال المصطلح السابق التهاب المهبل الغير متخصص بالتهاب المهبل البكتيري (Bacterial vaginosis) (Holmes *et al.*,1981;Cristiano *et al.*,1989) ثم سميت هذه المتلازمة باكثر من 15 اسم اخر(Van der Meijden,1984;Huth,1989).

تتميز بكتريا *G. vaginalis* بكونها عصيات صغيرة ، متعددة الاشكال، متغايرة لصبغة غرام وفقا لنموها ، لاتمتلك اسواط ولا محفظة نموذجية ومكونة للاهداب. (Piot,1991 ; Catlin,1992) .

كما بين الفحص بالمجهر الالكتروني و فقدان البكتريا لمتعدد السكريد الشحمي (Lipopolysasccharide) بان البكتريا تمتلك جدار خلوي موجب لصبغة غرام ، حيث تحتوي على طبقة رقيقة من مادة ببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) مما يجعلها موجبة لصبغة غرام في طور النمو الاسي (Exponential phase) وسالبة لصبغة غرام عندما تكون المزرعة البكتيرية قديمة لان طبقة الببتيدوكلايكان

رقيقة (Sadhu *et al* ., 1989). قسمت بكتريا *G.vaginalis* الى ثمانية انماط وبائية (Biotypes) اعتماداً على قابلية العزلات البكتيرية على تحلل الهيبيورات Hippurate hydrolysis ،امتلاك انزيم Lipase ، وفعالية بيتا كالكتوسيديز (Moncla & Pryke ,2009)

تنتج بكتريا *G.vaginalis* ذيفان محلل للخلايا Cytolysin وزنه الجزيئي 57KD ، هو عبارة عن بروتين ينتمي الى عائلة الذيفانات الخلوية المعتمدة على الكوليسترول، حيث يقوم بتمييز جزيئة المتمم المنتظمة CD59 الموجودة على سطح خلايا الانسان (Randis *et al*. ,2009)

هذا النوع من الذيفانات يتميز بكونه متخصص للانسان لذا فأن دراسة دوره في التهابات المهبل البكتيري وعواقبه على المرضى ماتزال محدودة لغياب الحيوان المختبري المناسب كما انه يعد ذيفان خارج خلوي مكون للثقوب حيث يحلل خلايا الدم البيضاء العدله (Neutrophils) والخلايا الطلائية (Endothelial) كما يحلل كريات الدم الحمراء لذلك سمي سابقا بالذيفان المحلل لكريات الدم الحمر (Hemolysin) (Rottini *et al*.,1990 ; Cauci *et al*., 1993;Gelber *et al*., 2008)

يحث ذيفان Vaginolysin الاستجابة المناعية بانتاج الجسم المضاد والذي يعد مؤشرا مهما للاصابة لالتهاب المهبل البكتيري وكذلك يحث على انتاج Interlukin8 من قبل الخلايا الظهارية للانسان Cauci *et*) (Cauci *et al*.,2002; Cauci *et al*., 2008 . اشار الباحث Zvirbliene وجماعته (2010) الى امكانية انتاج اضداد وحيدة النسيلة تجاه هذا الذيفان وذلك باستعمال طرق الهندسة الوراثية بتصنيع الذيفان والتعبير عنه في بكتريا *E.coli* واختبار الفعالية الحيوية للذيفان خارج الجسم (in vitro) .

الهدف من الدراسة الحالية اجراء التنقية للذيفان Vaginolysin المنتج من بكتريا *G. vaginalis* وذلك لمعرفة تأثير التنقية على فعاليته الحيوية .

المواد وطرق العمل

تحضير الذيفان الحال للمهبل Preparation of vaginolysin

1 انتاج ذيفان vaginolysin

أخذت عزلة بكتيرية لبكتريا *G. vaginalis* المأخوذة من نساء مصابات بالتهاب المهبل بعد اجراء الاختبارات الكيموحيوية ودراسة الخصائص المظهرية والزرعية لها والتاكد من انها منتجة للذيفان ونميت في وسط Trypto–casein –soya broth والمدعم باضافة 2% من بلازما دم انسان مضافاً لها 0.4%من متطلبات النمو الانتقائية الخاصة ببكتريا *G. vaginalis* ثم حضنت في ظروف لاهوائية وبدرجة حرارة 37 مْ لليوم التالي ،بعد ذلك اجريت عملية الزرع الثانوي (subculture) لمدة 36 ساعة لانتاج الذيفان ثم نقلت البكتريا الى دورق بحجم 150مل والحاوي 125 مل من وسط Trypto–casein –soya broth +بلازما الانسان والمضاف له 0.1% نشأ و0.3% من مادة tween 80 وبعد الحضانة اللاهوائية بدرجة 37 مْ تزرع اخيراًعلى وسط كولومبيا اغار وبنفس الظروف اللاهوائية ودرجة الحرارة .(Rottini *et al.*,1990)

2 استخلاص الذيفان الخام Crude vaginolysin

بعد الحضن نبذ المزروع البكتيري بالمنبذة المبردة بدرجة 4مْ وبسرعة 13000دورة/دقيقة لمدة 30دقيقة ، اهمل الراسب واخذ الراشح والذي يمثل المستخلص الخام (Crude) للذيفان بعد هذه الخطوة تم اجراء تقدير فعالية التحلل الدموي للذيفان وتقدير كمية البروتين .(Paraje,2005)

3 ترسيب الذيفان الحال للمهبل بكبريتات الامونيوم

اضيفت بلورات كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة (NH4)2SO4 الى المستخلص الخام للذيفان بشكل تدريجي مع التحريك المستمر بأستخدام المازج المغناطيسي في حمام ثلجي لبلوغ نسبة اشباع تراوحت بين 25- 50% نبذ المحلول بعد كل مرحلة من مراحل الاضافة وتحت درجة حرارة 4 مْ وبسرعة 16000دورة/دقيقة لمدة 30دقيقة ،فصل الرائق وذوب الراسب في اقل كمية من محلول دارئ فوسفات الصوديوم الملحي بتركيز 0.01 مولاري ورقم هيدروجيني 6.8 وتمت ديلزته مقابل دارئ فوسفات الصوديوم الملحي ثم قدر تركيز البروتين والفعالية الحيوية .(Paraje,2005)

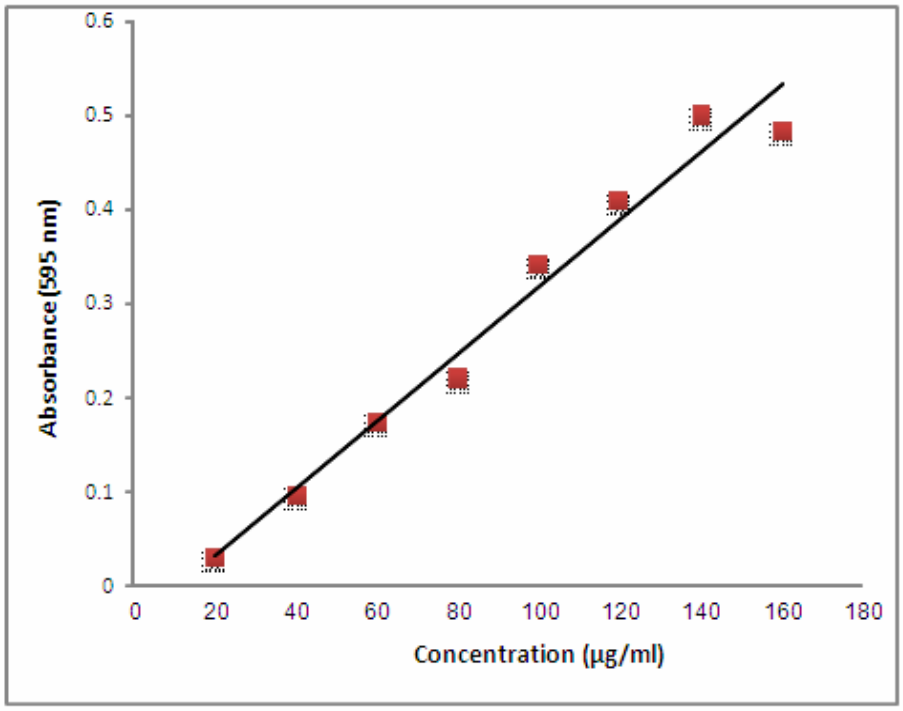
4 تنقية الذيفان باستخدام المرشح الهلامي (SephadexG 200)

حضر الهلام طبقاً لتعليمات الشركة المجهزة فقد علق في محلول دارئ فوسفات الصوديوم 0.01 مولار تمت ازالة الهواء Degassing بمضخة تفريغ (Vacum pump) ، ثم عبئ الهلام في عمود زجاجي ليعطي الابعاد (2×40) سم ، اجريت الموازنة باستخدام دارئ فوسفات الصوديم 0.01مولار برقم هيدروجيني 6.8 اجري الترشيح الهلامي باستخدام عمود SephadexG 200 الذي سبق موازنته وجرى الاسترداد بنفس الدارئ بسرعة جريان 16مل /ساعة وبواقع 3مل للجزء وتمت متابعة تركيز البروتين في الاجزاء المنفصلة بقراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي (280nm) وقدرة فعاليتها الحيوية وجمعت الاجزاء التي اعطت اعلى فعالية تحليلية ضمن القمة الواحدة ثم استخرجت الفعالية النوعية وحدة /ملغم للقمم المدروسة بعد رسم العلاقة الخطية بين رقم الجزء المنفصل حيال كل من الامتصاص الضوئي على طول موجي (280nm) والفعالية الانزيمية ، ثم تلاه عملية تركيز الذيفان المنقى ووزع بانابيب اختبار وحفظ بدرجة حرارة التجميد (Paraje,2005).

تقدير كمية البروتينات

اتبعت طريقة Bradford (1976) لتقدير كمية البروتين

- حُضّرت تراكيز متدرجة من محلول البومين المصل البقري (0، 20، 40، 60، 80،100، 120، 140,160) مايكروغرام/مل .
- اضيف 0.45مل من دارئ الفوسفات الملحي الى 0.05 مل من كل تركيز من تراكيز البومين المصل البقري المحضرة.
- اضيف 2.5 مل من صبغة الكوماسي الزرقاء G-250، مزج الخليط جيدا وترك لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم قرئت الامتصاصية على طول موجي 595 نانومتر.
- للحصول على المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري تم رسم العلاقة البيانية ما بين الامتصاصية على الطول الموجي 595 نانومتر وتراكيز البروتين (مايكروغرام/مل) شكل (1).
- لتقدير تركيز البروتين في مستخلص الذيفان الحال للمهبل أضيف إلى أنبوبة اختبار نظيفة 0.05 مل من النموذج، 0.45مل من دارئ الفوسفات و2.5مل من صبغة الكوماسي الزرقاء G-250، مزج الخليط جيدا وترك لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم قرئت الامتصاصية على طول موجي 595 نانومتر وتم تقدير تركيز البروتين باستخدام الانحدار المستحصل من المنحني القياسي للبروتين.



شكل (1) المنحنى القياسي لبروتين المصل البقري

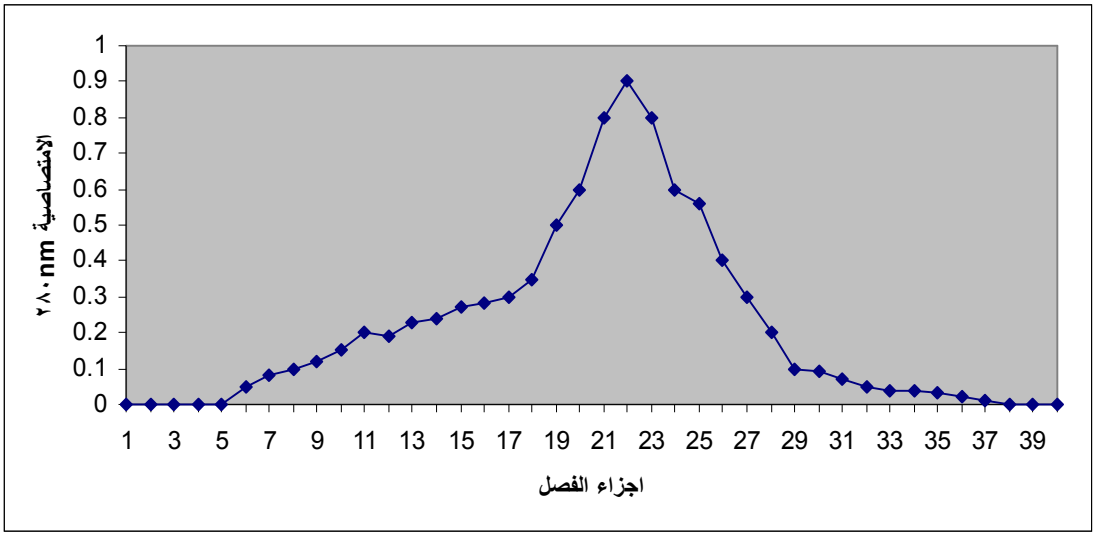
النتائج

يوضح الشكل (2) تنقية ذيفان vaginolysin باستعمال المرشح الهلامي sephadex G200 حيث نتجت عن التنقية قمة واحدة تركزت كما مبين بشكل (2) بالاجزاء 23-19 والتي جمعت بعد ذلك وركزت لحساب الفعالية الكلية للذيفان وتركيز البروتين والفعالية النوعية للذيفان المنقى ٠

جاءت نتائج التنقية الجزئية كما مبين في جدول (1) إذ بلغت الفعالية النوعية للمستخلص الخام للذيفان 10.6 وحدة /ملغم في اول خطوات التنقية ، اما في الخطوة التالية للتنقية الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع (50% - 25%) فقد بلغت الفعالية النوعية 29.09 وحدة / ملغم اما أعلى فعالية نوعية للذيفان المنقى كانت في خطوة التنقية باستعمال المرشح الهلامي sephadex G200 حيث بلغت 94.11 وحدة /ملغم ٠اما بالنسبة لتراكيز البروتين فقد كانت كالآتي في مستخلص الذيفان الخام 15ملغم /مل ،عند الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة تشبع (50% - 25%) كان تركيز البروتين 11ملغم / مل ، اما في خطوة التنقية باستعمال المرشح الهلامي sephadex G200 كان تركيز البروتين هو الاقل 1.7ملغم / مل .

جدول (1) الفعالية النوعية للذيفانvaginolysin من بكتريا *G. vaginalis* تبعاً لخطوات التنقية المستخدمة

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين (ملغم / مل)	الفعالية التحليلية للذيفان (وحدة/مل)	الفعالية الكلية للذيفان(وحدة)	الفعالية النوعية للذيفان (وحدة / ملغم)
المستخلص الخام للذيفان	100	15	160	1600	10.6
الترسيب بكبريتات لامونيوم (25%-50%)	30	11	320	9600	29.09
كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام sephadix G200	10	1.7	160	1600	94.11



الشكل (2) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لذيفان vaginolysin المنقى جزئيا من بكتريا *G. vaginalis* باستخدام sephadex G200 بابعاد(2×40)سم تم الغسل بمحلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (0.01) مولاري وبرقم هيدروجيني (6.8) وبسرعة جريان 16مل/ساعه وبواقع 3مل للجزء الواحد.

المناقشة

اظهرت نتائج تنقية الذيفان الحال للمهبل لبكتريا *G.vaginalis* والذي يتميز بكونه محلل لكريات الدم الحمر والذي يطلق عليه الذيفان الحال لكريات الدم الحمر hemolysin الى امكانية البكتريا على انتاج الذيفان في وسط Trypto–casein –soya broth والمدعم ببلازما دم الانسان وهذا يتفق مع الباحث Rottini وجماعته (1990) .

اضافة الى امكانية تنقية هذا الذيفان من بكتريا *G.vaginalis* بصورة جزئية والحصول عليه كمستخلص خام (crude) باستعمال النبذ المركزي بدرجة 4مْ وكذلك تنقيته باستعمال بلورات الملح الصلبة كبريتات الامونيوم والتي اعطت بدورها فعالية نوعية للذيفان اعلى منها في المستخلص الخام للذيفان وهذا يتفق مع عدد من الباحثين (Rottini *et al.*,1990; Kretzschmar *et al.*, 1991).

ان الاساس في ترسيب الذيفان وتركيزه بفعل كبريتات الامونيوم يعتمد على التمليح الخارجي (Salting out) الذي يتضمن معادلة الشحنات الموجودة على سطح الجزئيات البروتينية بفعل ايونات كبريتات الامونيوم ، والاخلال بطبقة الماء المحيطة بالبروتين مما يؤدي الى خفض ذائبيته و ترسيبه ، ويؤثر حجم البروتين وشكله ووجود مركبات اخرى معه في سرعة ذائبيته اذ يعتمد التركيز بالملح على شحنات البروتين من حيث عددها وتوزيعها ، فضلا عن المجاميع غير الايونية وتوزيع المجاميع الكارهة للماء وعددها (White *et al.*,1973;Scopes, 1987; Janson and Ryden,1998)

استخدم دارئ الفوسفات الملحي في عملية الديلزة والتنقية باستخدام عمود فصل الترشيح بالهلام وهذا يتفق مع عدد من الباحثين (Miyake *et al.*,1988) والذي استخلص الذيفان من بكتريا *Vibrio metschnikovii* وكذلك مع Peters وجماعته (1982) الذي استخلص الهيمولايسين من بكتريا *Vibrio parahaemolyticus* .

استخدم في هذه الدراسة الترشيح بهلام Sephadex G 200 لتنقية الذيفان وقد بين عدد من الدراسات امكانية تنقية الذيفان باستخدام عمود الفصل بالمرشح الهلامي حيث قام الباحث Paraje وجماعته (2005) باستخلاص ذيفان بنفس مواصفات ذيفان Vaginolysin من حيث امتلاكه قابلية تحليل كريات الدم الحمراء واحداث الثقوب للخلايا من بكتريا *Enterobacter cloacae* باستخدام Sephadex G 100 .

كذلك الباحث Peters وجماعته (1982) الذي استخلص الهيمولايسين من بكتريا *Vibrio parahaemolyticus* استخدام Sephadex G 100 لغرض تنقية الذيفان .

References

Bradford ,M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal.Biochem.72:248-254.

Catlin, B. W. (1992). Gardnerella vaginalis: characterisitics, clinical considerations, and controversies. Clin. Microbiol. Rev. 5: 213–237.

Cauci, S.; Monte, R.; Ropele, M.; Missero, C.; Not, T.; Quadrifoglio, F.& Menestrina, G.(1993). Pore-forming and haemolytic properties of the *Gardnerella vaginalis* cytolysin. Mol. Microbiol.9(6):1143-55.

Cauci,S.; Driussi, S.; Guaschino, S.; Isola, M. & Quadrifoglio, F. (2002).Correlation of local interleukin-1b levels with specific IgA response against *Gardnerella vaginalis* cytolysin in women with bacterial vaginosis. Am. J. Reprod. Immunol .47: 257–264.

Cauci, S.; Culhane, J.F.; Di Santolo, M. & McCollum, K. (2008). Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1beta. Am. J. Obstet. Gynecol. 198: 132.e1–7.

Cristiano,L.;Coffetti,N.;Dalvai,G.; Lorusso,L. And Lorenzi,M. (1989).Bacterial vaginosis:prevalence in out patients,association with some micro-organisms and laboratory indices. Genitourin .Med.65:382-387.

Gardner, H. L.; and Dukes, C. D. (1955). Haemophilus vaginalis vaginitis. A newly defined specific infection previously classified “nonspecific” vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 69962-976 .

Gardner,H.L.(1983a).Non specific vaginitis a nonentity.Scand.J.Infect.Dis.40(Suppl.):7-10 .

Gardner,H.L.(1983b).Pathogenicity of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis) .scand.J.Infect.Dis.40(Suppl.):37-40 .

Gelber,S.EAguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ (2008) Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin the human-specific cytolysin from Gardnerella vaginalis. J Bacteriol 190: 3896–3903.

Holmes,K.K.,Spiegel,C.;Amsel,R.;Eschenbach,D.A.;Chen,K.C.S.andTotten,P.(1981). Non specific vaginosis. scand.J.Infect.Dis.26(Suppl.):110-114 .

Huth,E.J.(1989).Style notes:bacterial vaginosis or vaginal bacteriosis? Ann.Intern.Med.111:553-554.

Janson , J.C. & Ryden,L. (1998) . Protein purification principles, high resolution methods, and application.2nd ed.John Wiley & Sons, Inc,pp.695.

Kretzschmar,U.M.; Hammann, R. and Kutzner,H.J.(1991) .Purification and characterization of *Gardnerella vaginalis* Hemolysin. Curre.Microbiol.23:7-13.

Leopold, S.(1953).Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. US. Armed Forces Med. J. 4:263-266.

Miyake,M.; Honda ,T. and Miwatani ,T.(1988). Purification and Characterization of *Vibrio metschnikovii* Cytolysin .Infection and Immunity 56(4):954-960.

Moncla, B.J.& Pryke, K.M.(2009). Oleate lipase activity in *Gardnerella vaginalis* and reconsideration of existing biotype schemes. BMC Microbiol; 9:78-82.

Paraje,M.G.; Eraso,A.J. & Albesa,L.(2005). Pore formation, polymerization, hemolytic and leukotoxic effects of a new *Enterobacter cloacae* toxin neutralized by antiserum.Microbiol.Res.,160(2):203-211.

Peteres,S.; Baross,J.A. and Morita,R.Y.(1982) Partial Purification and Characterization of Hemolysin from a Psychrotrophic Kanagawa-Positive Marine Vibriot .Appl. and Enviro.Microbio.43(1) :39-49.

Piot, P. (1991). *Gardnerella*, *Streptobacillus*, *Spirillum*, and *Calymmatobacterium*, p. 483-487. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Randis, T.M.; Kulkarni, R.; Aguilar, J.L.;Ratner, A.J.(2009). Antibody-based detection and inhibition of vaginolysin, the *Gardnerella vaginalis* cytolysin. PLoS One, 4:e5207.

Rottini, G.; Dobrina, A.; Forgiarini, O.; Nardon, E.; Amirante, G. A. and P. Patriarca.(1990). Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. Infect. Immun. 58:3751–3758.

Sadhu, K.;Domingue, P. A.; Chow, A. W. ; Nelligan, J.; Cheng, N. and Costerton,J. W.(1989). *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. J. Med. Microbiol. 29:229–235.

Scopes,R. K.(1987).Protein purification ,principles and practice 2nd ed a scotrade typesetting Ltd.,Hong kong.

Van der Meijden,W.I.(1984). Clinical aspects of Gardnerella vaginalis- assosciated vaginitis. Scand. J.Urol.Nephrol. 86 (Suppl.):135-141.

White,A.;Handler,P. & Smith,E. (1973). Principles of biochemistry.McGrow-Hill Book Company Ablakiston .Publication New York .

Zvirbliene, A.; Pleckaityte, M.; Lasicklene, R.; Kucinskaite-Kodze, I. and Zvirblis, G. (2010). Production and characterization of monoclonal antibodies against vaginolysin: Mapping of a region critical for its cytotoxic activity. Toxicon, 56 : 19–28.