مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۱، ۶۴- ۵۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 71,1:57-64, 2016

جداسازی، تخلیص و بررسی خاصیت باکتری کشی کال پروتکتین از نوتروفیل‌های خون گاو

مهدی ایمانی[1*] امیر توکمه‌چی[2]
۱) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران

(دریافت مقاله: ۲ دی ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۳۱ بهمن ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: نوتروفیل‌های گاو پپتیدهای یاخته‌کشی تولید می‌کنند که باعث از بین بردن میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی از جمله عامل ماستیت می‌شوند. **هدف:** استخراج و تخلیص پروتئین P۲۳/P۷ گاوی و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* بود. **روش کار:** ابتدا یاخته‌های نوتروفیل گاو توسط روش رسوب‌دهی با دکستران و سانتریفیوژ روی فایکول از سایر یاخته‌های خون سالم جداسازی گردیدند. سپس زنده‌مانی آنها با کمک تریپان بلو تعیین و پس از خرد کردن آنها با سونیکاتور مقدار پروتیئن‌های تام سیتوزولی توسط سانتریفیوژ جداسازی شد. در مرحله بعد، پس از جداسازی به منظور تخلیص ابتدا دیالیز و سپس کروماتوگرافی تعویض یونی دو مرحله‌ای صورت گرفت. بررسی فعالیت ضد یاخته‌ای آن، با روش‌های تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی، حداقل غلظت کشندگی و آزمون انتشار در آگار بررسی شد. **نتایج:** یاخته‌های نوتروفیل با زنده‌مانی بیشتر از ۹۵٪ جداسازی شدند. نتایج کروماتوگرافی و الکتروفورز ژل پروتئین نشان داد که پروتئین هترودیمر P۲۳/P۷ با موفقیت طی دو مرحله تخلیص شده است (مرحله اول حدود ۶۰٪ و در مرحله دوم با خلوص بیشتر از ۹۵٪). وزن مولکولی هر کدام از منومرهای کوچک و بزرگ به ترتیب ۷kDa و ۲۳ تعیین شد. پروتئین تخلیص شده دارای فعالیت باکتری کشی بوده و تأثیر آن بر یرسینیا روکری (۶۴ µg/ml) بیش‌تر از دو باکتری دیگر بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** پروتئین تخلیص شده در طی فرایند تخلیص فعالیت خود را حفظ می‌کند. به علاوه فعالیت ضد باکتریایی نوتروفیل می‌تواند ناشی از پروتئین P۲۳/P۷ باشد.

واژه‌های کلیدی: ضد یاخته، کال پروتکتین، جداسازی، نوتروفیل

مقدمه

پستانداران دارای انواع پپتیدهای ضد میکروبی هستند که به عنوان سدی در برابرهای عفونت‌های میکروبی عمل می‌کنند. آنها در بسیاری از سلول‌ها از جمله نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، و سلول‌های اپیتلیال بیان می‌شوند. به طور کلی آنها به دفنسین‌ها و کاتلیسیدین معروف هستند و پپتیدهایی کاتیونی با فعالیت وسیع ضد میکروبی هستند (۱۲). تحقیقات نشان داده است که نوتروفیل‌های گاو دارای پپتیدها و پروتئین‌هایی می‌باشند که اثر ضدیاخته‌ای داشته و باعث از بین بردن میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شوند.

Vignais و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که S۱۰۰A۸/۹ گاوی و انسانی در ساختار اول هومولوژی بسیار بالایی دارند و آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه ویژه S۱۰۰A۸/۹ انسانی با گاوی واکنش متقاطع دارد (۳). به هترودیمر S۱۰۰A۸/۹ کال‌پروتکتین (CP) نیز می‌گویند زیرا مشاهده شده است که این پروتئین توانایی اتصال به یون کلسیم و فعالیت ضد باکتریایی را دارد. ساختار این پروتئین همانند سایر اعضای خانواده S۱۰۰ از دو موتیف اتصال شونده به کلسیم بنام EF-hand تشکیل شده که در واقع یک هلیکس-لوپ-هلیکس می‌باشد که کلسیم را در بر می‌گیرد و وجود کلسیم برای فعالیت آن ضروری می‌باشد (۴).

بررسی‌ها نشان داده است که پروتئین به نام P۲۳ که در ژل SDS-PAGE وزن مولکولی ظاهری آن ۲۳ کیلودالتون است به مقدار فراوان در سیتوزول نوتروفیل‌های گاو حضور دارد (۳). به علاوه، این پروتئین به صورت متصل به اسکلت سلولی نیز است. P۲۳ در حین تخلیص به پروتئینی کوچک به نام P۷ با وزن مولکولی ۷kDa متصل است. بررسی‌های ساختاری نشان داده است که این دو پروتئین هومولوگ دو پروتئین انسانی به نام‌های S۱۰۰A۸ و S۱۰۰A۹ هستند. این پروتئین‌ها در سیتوزول نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای انسانی به خصوص در شرایط التهابی به مقدار بیشتر یافت می‌شوند. همچنین، P۲۳ و P۷ با آنتی‌بادی‌های ویژه S۱۰۰A۸ و S۱۰۰A۹ واکنش متقاطع می‌دهند (۱۸).

تاکنون مطالعات زیادی پیرامون پروتئین هترودیمر S۱۰۰A۸/۹ انسانی انجام شده است بطوری که فعالیت یاخته‌کشی S۱۰۰A۸/A۹ انسانی علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و یاخته‌های یوکاریوتی بررسی شده است (۲۱). مکانیسم فعالیت یاخته‌کشی آن به واسطه القا آپوپتوزیس و تا حدودی حبس یون روی می‌باشد (۱۱). اما در مورد همتای گاوی آن و سایر حیوانات مطالعات زیادی صورت نگرفته است. قابل ذکر است که فعالیت ضد باکتریایی عضوی از خانواده S۱۰۰، به نام S۱۰۰A۷ یا پسوریازین در آماس غدد پستانی گاوی مطالعه شده است (۱۳). با وجود این، گزارشی از فعالیت ضد باکتریایی

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۲۶۱۰ نمابر: ۰۴۴-۳۲۷۷۱۹۲۶ Email: m.imani@urmia.ac.ir

P۲۳/P۷ گاوی وجود ندارد. تاکنون مطالعات عملکردی، پروتئومیکسی و ژنومیکسی متعددی پیرامون نوتروفیل‌های انسانی انجام گرفته است اما در ارتباط با نوتروفیل‌های سایر موجودات زنده مطالعات موردی می‌باشد.

از آن جایی که پروتئین هترودیمر P۲۳/P۷ گاوی همتای پروتئین S۱۰۰A۸/A۹ انسانی می‌باشد ویژگی یاخته‌کشی قوی دارد. به همین دلیل هدف از مطالعه حاضر استخراج و تخلیص P۲۳/P۷ یا کال پروتکتین گاوی و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری‌های عامل ماستیت *Staphylococcus aureus*، *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* بود. در واقع پژوهش حاضر روی فعالیت یکی از مولکول‌های پروتئینی نوتروفیل‌های گاوی متمرکز شده است.

مواد و روش کار

مواد مورد نیاز: ستون‌های Q-Sepharose (Q۱۱۲۶) و(S۱۷۹۹) Sp-Sepharose، تریسین (T۵۸۱۶)، آلبومین سرم گاوی (A۲۱۵۳)، دکستران T۵۰۰ (۳۱۳۹۲)، PMSF (P۷۶۲۶)، کیسه دیالیز (D۲۲۷۲)، فایکول‌هایپک (F۵۴۱۵) و دی-تیوتریتول (D۹۷۷۹) (DTT) از شرکت سیگما (آمریکا)، و سایر مواد لازم برای الکترفورز ژل پروتئین از شرکت مِرک (آلمان) خریداری شد.

جداسازی نوتروفیل: جداسازی نوتروفیل‌ها بر اساس روش Skoog و همکاران در سال ۱۹۵۶ با کمی تغییرات انجام شد (۱۷). به طور خلاصه، ۴۰۰ml خون تازه از گاو نر دو ساله سالم نژاد هولشتاین از کلینیک دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و به آزمایشگاه بیوشیمی منتقل شد. برای حذف گلبول‌های قرمز از روش رسوب‌دهی با دکستران T۵۰۰ استفاده شد، برای این کار خون به نسبت ۱ به ۱ در فالکون‌های۵۰ml با دکستران ۶٪ دارای ۰/۹٪ NaCl مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا گلبول‌های قرمز کاملاً ته نشین شوند. فاز شفاف بالایی که شامل پلاسما و گلبول‌های سفید می‌باشد جمع آوری و با دور g× ۱۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا پلاسمای آن حذف شود. در مرحله بعد به منظور جدا کردن نوتروفیل‌ها از سایر گلبول‌های سفید از روش سانتریفوژ بر روی فایکول استفاده شد.

رسوب‌دهی با دکستران همه گلبول‌های قرمز را حذف نمی‌کند بنابراین به منظور حذف باقیمانده آنها در این مرحله از روش لیز هیپوتونیک استفاده گردید به این صورت که به مدت ۳۰ ثانیه آب مقطر سرد به مخلوط گلبول‌های قرمز و نوتروفیل‌ها اضافه شد و بعد از ۳۰ ثانیه با افزودن PBS محیط به حالت ایزوتونیک اولیه برگشت این عمل تا حذف کامل گلبول‌های قرمز ادامه یافت. گلبول‌های قرمز به دلیل نداشتن اسکلت یاخته‌ای در برابر محیط هیپوتونیک سریعاً متلاشی می‌گردند در حالی که نوتروفیل‌ها مقاوم هستند. بعد از جداسازی نوتروفیل‌ها زنده‌مانی آنها با استفاده از تریپان بلو ۰/۴٪ در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

استخراج پروتئین تام سیتوزولی نوتروفیل‌های گاو: بعد از جدا کردن نوتروفیل‌های گاو از خون محیطی و شستشوی آنها با PBS، لیز آنها با محلول شامل ۰/۲mol سوکروز، EDTA (۱mmol)، DTT (۱mmol) و PMSF (۰/۵mmol) انجام گرفت. در مرحله بعد خرد کردن نوتروفیل‌ها در حضور یخ سه بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه به کمک سونیکاتور انجام گرفت. بعد از اتمام سونیکاسیون به منظور حذف قطعات یاخته‌ای به مدت ۱۵ دقیقه با دور g×۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و عصاره سیتوزولی برداشته و رسوبات قطعات یاخته‌ای دور ریخته شد. در این مرحله غلظت پروتئین تام بدست آمده به روش برادفورد سنجیده شد. در این روش از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد (۱).

تخلیص پروتئین هترودیمر P۲۳/P۷ از عصاره سیتوزولی: تخلیص پروتئین هترودیمر P۲۳/P۷ طی دو مرحله با روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد. در مرحله اول کروماتوگرافی تعوض کننده آنیونی Q-Sepharose استفاده شد. این رزین در سطح خود دارای گروه عاملی $CH_2N^+(CH_3)_3$ می‌باشد که به آن بار مثبت می‌بخشد. بنابراین پروتئین‌های دارای بار منفی به آن خواهند چسبید. قبل از کروماتوگرافی، محتویات سیتوزولی توسط کیسه دیالیز با منافذ ۱۲۰۰Da با شماره کاتالوگ D۲۲۷۲ در بافر۱ یعنی تریس با pH=۸ دیالیز شدند تا نمک‌ها و سایر املاح از محلول پروتئینی حذف شوند.

کروماتوگرافی: ابتدا ستون کروماتوگرافی با سه برابر حجم ستون با آب مقطر شسته شد تا الکل آن حذف گردد. سپس ستون با بافر دیالیز به تعادل رسانده شد و نمونه پروتئینی روی آن بارگذاری گردید. سرعت خروجی ستون، ۱ml/min و بعد از بارگذاری و اتصال پروتئین‌ها، ستون با بافر دیالیز شسته شد تا پروتئین‌های که به صورت سست و ضعیف متصل شده‌اند شسته و حذف شوند. برای خارج کردن پروتئین‌های چسبیده به ستون از شیب نمک NaCl ۰-۰/۵mmol استفاده شد. حجم فراکش‌های جمع‌آوری شده ۳ml بود. بعد از جمع آوری فراکشن‌ها، کروماتوگرام آنها رسم گردید. به منظور تعیین حضور پروتئین در فراکشن‌ها و تعیین خلوص آنها از ژل الکتروفورز پروتئین Tricin-SDS PAGE (T=۱۶/۵ و C=۳ ٪) استفاده شد (۱۵). فراکشن‌های حاوی پروتئین برای تخلیص بیشتر توسط ستون بعدی یعنی SP-sepharose انتخاب شدند. بعد از انتخاب فراکشن‌ها، آنها در بافر ۲ یعنی استات سدیم با pH برابر با ۴/۵ دیالیز شدند و همانند روش ذکر شده برای ستون Q-sepharose تحت کروماتوگرافی قرار گرفتند. بعد از هر مرحله از الکتروفورز درصد خلوص پروتئین توسط نرم‌افزار توتال لب بصورت دانسیتومتری آنالیز می‌شد.

منحنی استاندارد با مارکرهای پروتئینی دارای وزن مولکولی پایین: برای تعیین وزن مولکولی نسبی پروتئین تخلیص شده، ابتدا منحنی کالیبراسیون از روی تحرک الکتروفورتیکی پروتئین استاندارد با وزن مولکولی پایین بر اساس لگاریتم آنها در مقابل میزان حرکت نسبی آنها در

ژل ترسیم گردید. سپس به کمک معادله خطی بدست آمده وزن مولکولی نسبی آنها محاسبه گردید.

تهیه باکتری و کشت آنها: در این مطالعه از باکتری‌های (ATCC ۶۵۳۸)، *Staphylococcus aureus* (BCC/LMG ۳۷۴۰ و ۳۲۷۹) *Aeromonas hydrophila* (BCC/LMG ۳۲۷۹) *Yersinia ruckeri* استفاده شد. ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت آبگوشت BHI (مرک، آلمان) و در شرایط هوازی، دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از رشد هر کدام از باکتری‌ها به کمک سرم فیزیولوژی استریل دو مرتبه شستشو داده شده و در نهایت تراکم ثابتی از آنها برابر با نیم مک فارلند تهیه گردید.

تست‌های تعیین حساسیت میکروبی: از آزمون‌های زیر جهت ارزیابی خاصیت ضد میکروبی پروتئین تخلیص شده استفاده گردید:

الف) آزمون رقیق سازی در محیط آبگوشت: با این آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی پروتئین (Minimal Inhibition Concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal Concentration) تخلیص شده سنجیده شد (۱۴). به طور خلاصه، ابتدا رقت‌های سریال از پروتئین تخلیص شده در مبنای ۲ (۱:۲ تا ۱:۸۱۹۲) در محیط کشت آبگوشت مولر هینتون و پلیت ۹۶ خانه‌ای تهیه گردید. در مرحله بعد تراکم ثابتی از باکتری معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) به همه چاهک‌های میکروپلیت افزوده شده تا در نهایت تراکم باکتری در هر چاهک برابر با $۱۰^{۵}$ CFU/well تنظیم و پلیت به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C و شرایط هوازی گرمخانه گذاری گردید. لازم به ذکر است که این آزمون سه بار تکرار گردید و از جنتامایسین و سرم فیزیولوژی به عنوان شاهد دارو و حلال استفاده گردید. جهت محاسبه حداقل غلظت کشندگی (MBC) محتویات چاهکی که در آن هیچگونه رشدی مشاهده نشد، بر روی محیط آگار خوندار و در شرایط هوازی و دمای ۳۷°C کشت داده شد.

ب) آزمون انتشار در آگار: به کمک این آزمون قطر منطقه مهار رشد (Zone of Inhibition) پروتئین تخلیص شده برای هر کدام از باکتری‌ها به طور جداگانه تعیین گردید. برای این کار ابتدا ۱۰ml محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) مذاب با دمای ۵۵°C-۵۰ با ۱۰۰µl کشت ۲۴ ساعته باکتری-ها با تراکم نیم مک فارلند مخلوط و در یک پلیت استریل ۱۰cm ریخته شد. سپس توسط پانچر استریل حفراتی (۶ mm) به فاصله ۳cm از یکدیگر در آگار ایجاد و مقدار ۵۰µl از پروتئین تخلیص شده پس از رقیق سازی به آنها افزوده شد، سپس پلیت‌ها با همان شرایط ذکر شده گرمخانه گذاری شدند. در نهایت پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت قطر منطقه مهار رشد با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شدند (۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرم افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

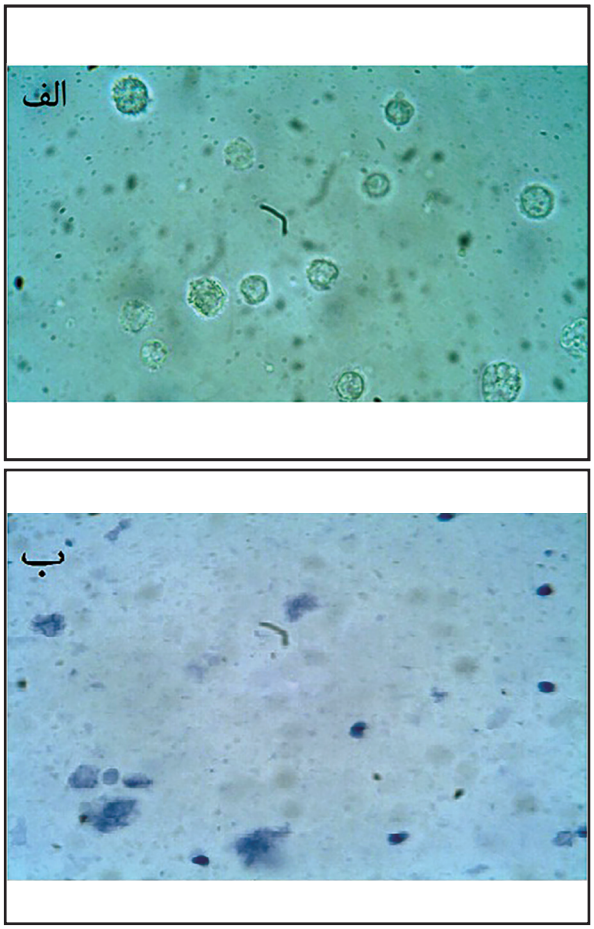
نتایج

جداسازی نوتروفیل‌ها: جداسازی لوکوسیت‌ها و زیرمجموعه‌های آنها شامل لنفوسیت‌ها، منوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها از یکدیگر و سایر یاخته‌ها در بسیاری از مطالعات و تحقیقات بالینی و پایه ضروری می‌باشد. در این مطالعه از یک روش ساده و کارآمد بنام رسوب دهی با دکستران برای جداسازی نوتروفیل‌ها استفاده شد. اساس این روش حذف گلبول‌های قرمز توسط دکستران T۵۰۰ و در نهایت جمع‌آوری لوکوسیت‌ها توسط فایکول-هایپک بر مبنای چگالی از یکدیگر است. این شیوه یک روش بسیار کارآمد و با راندمان بالا می‌باشد، طوری که مقادیر بیشتری نوتروفیل از خون بدست می‌آید. بعد از جداسازی نوتروفیل‌ها تعداد آنها توسط لام هموسیتومتر بعد از بررسی زنده‌مانی در زیر میکروسکوپ نوری ۴۱۲۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر خون برآورد گردید. از آنجایی که مقدار خون مورد استفاده ۴۰۰ml بود، تعداد کل نوتروفیل‌های جداسازی شده حدود ۱۶۴ میلیون سلول محاسبه گردید. به منظور بررسی وضعیت زنده‌مانی نوتروفیل‌های جداسازی شده از روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو استفاده شد. تصویر ۱ زنده‌مانی نوتروفیل‌های جداسازی شده توسط رنگ‌آمیزی با تریپان بلو در زیر میکروسکوپ معمولی را نشان می‌دهد. سلول‌های زنده بیرنگ (تصویر ۱ الف) و سلول‌های مرده بدلیل جذب رنگ بصورت آبی رنگ مشاهده می‌شوند. تعداد سلول‌های شمارش شده ۵۴۸ عدد بود که تعداد ۵۱۱ تا از آنها رنگ جذب نکرده بودند و به عنوان زنده در نظر گرفته شدند. با تقسیم سلول‌های زنده به کل سلول‌ها درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. محاسبه زنده‌مانی نوتروفیل‌ها نشان داد که حدود ۹۵٪ سلول‌ها بعد از جداسازی زنده مانده‌اند. بعد از سونیکاسیون به منظور حصول اطمینان از عمل سونیکاسیون، سلول‌ها دوباره در زیر میکروسکوپ از نظر زنده‌مانی بررسی شدند. همان گونه که در تصویر ۱ ب قابل مشاهده است غشائ سلولی آنها کاملاً تجزیه شده است و رنگ آبی را کاملاً جذب کرده‌اند.

جداسازی P۲۳/P۷ توسط ستون Q-Sepharose: بعد از دیالیز ۱۵ml پروتئین تام مستخرجه از سلول‌های نوتروفیل حجم آن به دلیل جذب آب ۲/۵ml افزایش یافته بود و به ۱۷/۵ml رسیده بود. غلظت پروتئین دیالیز شده توسط روش برادفورد سنجیده شد و ۱/۱mg/ml محاسبه گردید. برآورد شد. به طور کلی ۱۹/۲۵mg پروتئین به روی ستون اول برده شد. جذب ۵۹۵nm فراکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون تعویض کننده آنیونی Q-sepharose مطابق تصویر ۲ ترسیم گردید. همانطور که در شکل ملاحظه می‌شود حداکثر میزان پروتئین در فراکشن‌های ۱۶ و ۱۷ خارج می‌شود. محاسبه غلظت پروتئین‌های حاصله از ستون فوق

جدول ۱. بررسی خاصیت باکتری کشی کال پروتکتین جدا شده از نوتروفیل‌های گاو. (*) داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. (**) غلظت‌ها بر حسب میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد.

	حداقل غلظت مهار رشد(**)	حداقل غلظت باکتری کشی(**)	منطقه مهار رشد (mm)
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲۸ ^{b}	۲۵۶ ^{c}	۱۷ ± ۲/۳ ^{c}
آئرومونا‌س هیدروفیلا	۱۲۸ ^{b}	۲۵۶ ^{c}	۱۸ ± ۳/۱۲ ^{bc}
یرسینیا روکری	۶۴ ^{a}	۶۴ ^{b}	۲۳ ± ۲/۵۹ ^{a}
جنتامایسین	۶۴ ^{a}	۳۲ ^{a}	۱۹ ± ۳/۹۸ ^{b}



تصویر ۱. بررسی زنده مانی سلول‌های نوتروفیل جداسازی شده با رنگ آمیزی تریپان بلو. الف) سلول‌ها بعد از جداسازی و قبل از شکست غشائ سلولی توسط سونیکاسیون ب) سلول‌ها بعد از سونیکاسیون.

نشان داد که در فراکشن‌های ۱۶ و ۱۷ در مجموع مقدار ۵/۹mg با غلظت ۰/۸mg/ml پروتئین موجود می‌باشد. بعد از استخراج پروتئین مورد نظر توسط ستون Q-Sepharose، به منظور رویت پروتئین‌های خارج شده، الکتروفورز ژل پروتئین انجام شد (تصویر ۳). نتایج الکتروفورز ژل پروتئین نشان داد که پروتئین به میزان قابل توجهی تخلیص شده است اما هنوز دارای ناخالصی‌های قابل مشاهده است (تصویر ۳). با محاسبه وزن مولکولی نسبی مونومرهای تخلیص شده توسط مقایسه با نمودار کالیبراسیون مارکر وزن مولکولی (داده‌ها نمایش داده نشده است)، مشخص شد که دو باند پر رنگ و مشخص در موقعیت ۷kDa و ۲۳ وجود دارد.

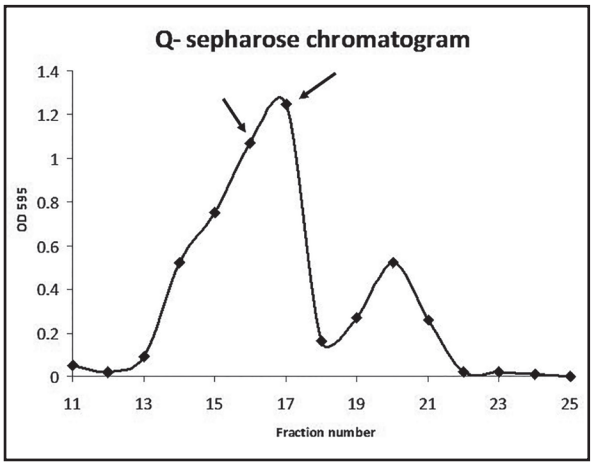
تخلیص P۲۳/P۷ توسط ستون SP-sepharose: به منظور تخلیص بیشتر، فراکشن‌های ۱۶ و ۱۷ مخلوط شدند و بعد از سه بار دیالیز در بافر ۲ به روی ستون دوم یعنی SP-sepharose منتقل شدند تا بیشتر تخلیص شدند. مقدار پروتئینی که روی ستون فوق بارگذاری شد ۵/۹mg/ml بود. جذب ۵۹۵nm فراکشن‌های جمع‌آوری شده از ستون تعویض کننده آنیونی SP-Sepharose مطابق تصویر ۴ ترسیم گردید. به منظور حصول اطمینان از حضور پروتئین در این مرحله، بعد از خوانش جذب فراکشن‌های پروتئین، فراکشن‌های شماره ۳ و ۴ به روی ژل الکتروفورز پلی آکریلامید برده شدند (تصویر ۵). تصویر ۵ نشان می‌دهد در هر مسیر الکتروفورز، تنها دو باند برجسته وجود دارد که با تخمین وزن مولکولی آن بر مبنای منحنی کالیبراسیون می‌توان به وزن مولکولی آنها پی برد که برای زیر واحد بزرگ و کوچک به ترتیب ۲۳kDa و ۷ می‌باشد. محاسبه غلظت و مقدار پروتئین بدست آمده نشان داد که غلظت پروتئین تخلیص شده ۰/۹۵mg/ml و مقدار کل آن ۱/۹mg می‌باشد.

نتایج بررسی‌های باکتری شناسی: به منظور بررسی فعالیت باکتری‌کشی پروتئین تخلیص شده از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، یرسینیا روکری و آئرومونا‌س هیدروفیلا استفاده شد. نتایج آزمون تعیین MIC و MBC در جدول ۱ آورده شده است. بررسی‌های باکتری‌کشی نشان داد که این پروتئین سبب مهار رشد هر سه باکتری می‌شود، طوریکه حداقل غلظت لازم آن برای مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس، آئرومونا‌س هیدروفیلا و یرسینیا روکری به ترتیب برابر با µg/ml ۱۲۸، ۱۲۸ و ۶۴ بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تأثیر کال پروتکتین بر یرسینیا روکری به طور معنی‌داری ($p<0/05$) بیش‌تر از دو باکتری دیگر بود. همچنین بیش‌ترین منطقه مهار رشد در آزمون انتشار در آگار برای باکتری یرسینیا روکری بدست آمد که برابر با ۲۳/۵۹mm بود و دارای اختلاف آماری معنی‌دار با دو باکتری دیگر و حتی جنتامایسین بود.

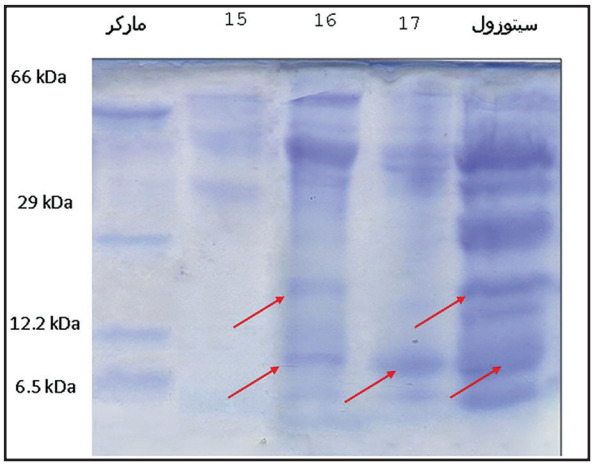
بحث

با وجود مطالعاتی که در مورد گرانول‌های نوتروفیل‌های گاوی انجام شده است اما تاکنون مطالعه‌ای پیرامون پروتئین‌های سیتوزولی آنها انجام نشده است (۶). همچنین، مطالعات بسیاری در مورد S۱۰۰A۸/A۹ انسانی انجام شده ولی پیرامون همتای گاوی آن و سایر حیوانات تحقیقات چندانی صورت نگرفته است. شناسایی و مطالعه این پروتئین تنها محدود به چند گونه از قبیل انسان (۱۰)، رت (۲۰)، موش (۱۹)، خوک (۲)، سگ (۸) و تا حدودی گاو (۵) بوده است، بنابراین، مطالعه حاضر جداسازی، تخلیص و مطالعه اولیه فعالیت یاخته کشی کال پروتکتین (P۲۳/P۷) گاوی را مورد بررسی قرار می‌دهد.

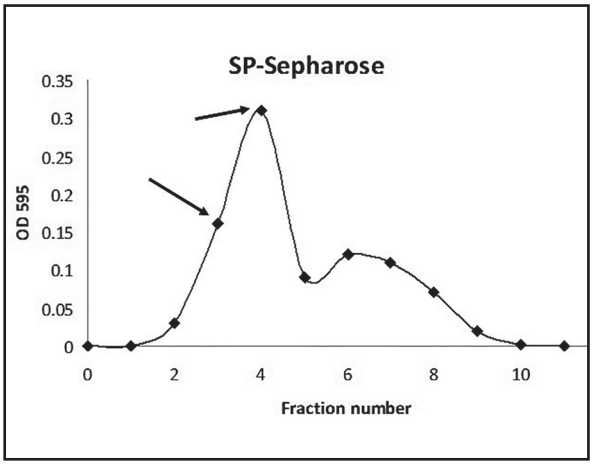
بیان کال پروتکتین در نوتروفیل‌ها به سیتوزول و گرانول‌های ثانویه محدود شده مشخص شده است که در مراحل اولیه تمایز مونوسیت‌ها نیز



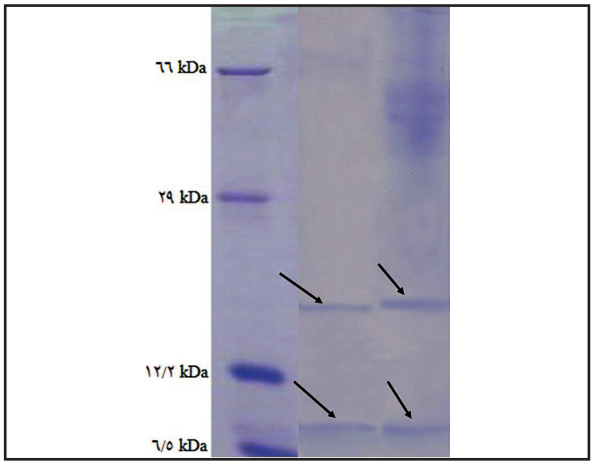
تصویر ۲. کروماتوگرام حاصل از ستون Q- Sepharose (ستون اول). فلش‌ها جذب ۵۹۵nm پروتئین‌های فراکش‌های ۱۶ و ۱۷ را نشان می‌دهند.



تصویر ۳. ژل تریسین SDS-PAGE پروتئین‌های جدا شده از ستون کروماتوگرافی تعویض کننده آنیونی. در هر مسیر حرکت پروتئین‌ها، فلش‌های بالا باند پروتئینی ۲۳kDa و فلش‌های پایینی باند پروتئینی ۷ kDa را نشان می‌دهد.



تصویر ۴. کروماتوگرام حاصل از ستون SP- Sepharose (ستون دوم). فلش‌ها جذب ۵۹۵nm پروتئین‌های فراکش‌های ۳ و ۴ را نشان می‌دهند.



تصویر ۵. آنالیز محتویات پروتئینی فراکشن‌های ۳ و ۴ با ژل الکتروفورز پلی آکریلامید. در هر مسیر، فلش‌های بالا باند پروتئینی ۲۳kDa و فلش‌های پایینی باند پروتئینی ۷kDa را نشان می‌دهد.

این پروتئین در آن یاخته‌ها بیان می‌شود. به علاوه مطالعات انجام گرفته نشان داده است که محتویات نوتروفیل‌های گاوی پس از لیز شدن فعالیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای نسبت به نوتروفیل‌های انسانی در شرایط مشخص دارد (۷). فاکتورهای ضد باکتریایی موجود در نوتروفیل‌های گاو محدود به گرانول‌های بزرگ و کوچک و سیتوزول شده است و فعالیت آنها در دامنه وسیعی از pH می‌باشد ولی pH ایده‌آل ۷ و ۸ می‌باشد. زمانی که نوتروفیل‌های گاو زیر محرک‌های محلول یا ذره‌ای قرار می‌گیرند گرانول‌های درون آنها محتویات خود را هم به خارج یاخته و هم به درون فاگوزوم‌ها تخلیه می‌کنند. محتویات واکوئل‌های فاگوسیتوزی ایزوتونیک می‌باشد که بعد از فاگوسیتوز بازی می‌شوند. بنابراین فاکتورهای پروتئینی موجود در گرانول‌ها نقش و مکانیسم مهمی در سرکوب رشد باکتری‌ها بر عهده دارند (۶). در این بررسی پروتئین هترودیمر ۷kDa و ۲۳ سیتوزول نوتروفیل گاوی بنام P۲۳/P۷ با یک روش ساده کروماتوگرافی دو مرحله‌ای تخلیص شدند و خاصیت آنتی باکتریایی آنها بر علیه باکتری‌های عامل ماستیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

در تخلیص پروتئین مورد نظر توسط کروماتوگرافی تعویض یونی Q-sepharose مشخص شد که آن در مقایسه با سایر پروتئین‌های نوتروفیل به‌صورت محکم به ستون چسبیده است به طوری که در غلظت نمکی بالا از ستون جدا می‌شود (تصویر ۲ فراکشن ۱۶ و ۱۷). در مرحله دوم تخلیص، از روش کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی SP-sepharose استفاده شد به طوری که طی آن پروتئین با خلوص بیشتر از ۹۵٪ بدست آمد (تصویر ۵). نتایج حاصل از تخلیص پروتئین P۲۳/P۷ از سلول‌های نوتروفیل گاو سالم نژاد هولشتاین نشان داد که الگوی الکتروفورتیکی پروتئین مورد نظر با الگوی پروتئین تخلیص شده توسط Vignais و همکاران در سال ۲۰۰۱ سازگار است به طوری که با محاسبه وزن مولکولی نسبی مونومرهای تخلیص شده توسط مقایسه با نمودار کالیبراسیون مارکر وزن مولکولی (داده نمایش داده نشده است)، مشخص شد که دو باند پر رنگ و مشخص در موقعیت ۷kDa و ۲۳ وجود دارد که کاملاً با مطالعات قبلی (۵) سازگار است

و حاکی از این اســت کــه در نوتروفیل‌های گاو مورد مطالعه پروتئین مورد نظر به مقدار زیاد یافت می‌شود (تصویر ۳،۵). نتایج تخلیص پروتئین نشان داد کــه تخلیص پروتئین P۲۳/P۷ توســط دو نوع کروماتوگرافی فوق یک روش ساده و سریع برای بدست آوردن مقادیر کافی پروتئین برای تحقیقات بیشتر می‌باشد.

فعالیت یاخته‌کشــی پروتئین حاصل از استخراج نوتروفیل‌های سگ بر روی باکتری *E. coli* BL۲۱ انجام شــده است و نتایج حاصله نشان داده اســت که آن به طور مؤثری فعالیت ضد باکتری دارد (۸). علاوه بر این، در مطالعه مذکور نشان داده شده است که فعالیت ضد باکتری کال‌پروتکتین نوتروفیلی ســگ بــا افزودن یون روی معکوس می‌شــود. در این بررســی فعالیت ضد باکتری پروتئین مورد نظر بر علیه باکتری‌های استافیلو کوکوس اورئوس (عامل ماســتیت گاوی)، آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری بررسی گردید.

نتایــج موجود در جدول ۱ نشــان می‌دهد کــه حداقل غلظت لازم آن برای مهار رشد اســتافیلو کوکوس اورئوس و آئروموناس هیدروفیلا ۱۲۸ و یرسینیا روکری ۶۴μg/ml می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تأثیر کال پروتکتین بر یرســینیا روکری به طور معنی‌داری بیش‌تر از دو باکتری دیگر می‌باشد.

نتایج مطالعات ما نشان داد که کال‌پروتکتین گاوی نیز همانند پروتئین انسانی و سگی توانایی مهار رشد باکتری را دارد. همچنین این یافته‌ها نشان می‌دهند که پروتئین تخلیص شــده در طی فرایند تخلیص ساختار فضایی خود را حفظ کرده است و می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد.

به طــور کلی برای از بیــن بردن عوامل و یاخته‌های مهاجم توســط نوتروفیل‌ها مکانیســم‌های متعددی مطرح شده است اما دو مکانیسم رایج وجود دارد: مکانیسم اکسیداتیو و غیر اکسیداتیو. در مکانیسم اکسیداتیو یک آنزیم چند بخشی به نام NADPH اکسیداز در تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه از بین بردن میکروارگانیسم‌ها نقش اساسی دارد در حالی که در مکانیسم غیر اکسیداتیو عقیده بر این است پپتیدها و پروتئین‌های موجود در ســیتوزول و گرانول‌های نوتروفیل‌ها بــه عنوان عامل یاخته‌کش عمل می‌کنند و با مکانیسم‌های متفاوتی باعث از بین بردن میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شوند (۷). پروتئین هترودیمر P۲۳/P۷ تخلیص شده از سیتوزول نوتروفیل‌های گاوی متعلق به سیستم دفاعی غیراکسیداتیو سلول‌های نوتروفیل می‌باشد که در از بین بردن عامل مهاجم نقش اساسی بــازی می‌کنــد. نتایج حاصل از این پژوهش نشــان می‌دهــد که پروتئین P۲۳/P۷ تخلیص شــده از نوتروفیل گاوی توانایی یاخته‌کشی دارد، لذا بر اساس یافته‌های باکتری شناسی در این تحقیق می‌توان گفت که پروتئین مورد مطالعه دارای خواص ضد باکتریای علیه باکتری‌های استافیلو کوکوس اورئوس، آئروموناس هیدروفیلا و یرســینیا روکری است. برای شناسایی و مطالعه پروتئین مذکور از دیدگاه‌های مختلف مثل ســاختاری و عملکردی نیاز به مطالعات بیشــتر می‌باشد. هنوز فعالیت کامل کال‌پروتکتین گاوی و تنظیم آن توسط یون‌های فلزی موجود در سرم نیاز به آشکار شدن دارند.

تشکر و قدردانی

نویســندگان این مطالعه مراتب تقدیر و تشــکر خود را از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشــگاه ارومیه ابراز می‌دارند (شماره طرح ۰۰۱/د/۹۰).

References

1. 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.
2. Dell'Angelica, E.C., Schleicher, C.H., Simpson, R.J., Santome, J.A. (1996) Complex assembly of calgranulins A and B, two S100-like calcium-binding proteins from pig granulocytes. Int J Biochem Cell Biol. 28: 53-62.
3. Dianoux, A.C., Stasia, M.J., Garin, J., Gaqnon, J., Viqnais, P.V. (1992) The 23-kilodalton protein, a substrate of protein kinase C in bovine neutrophil cytosol is a member of the S100 family. Biochem. 31: 5898-5905.
4. Donato, R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Res. 1450: 191-231.
5. Doussiere, J., Bouzidi, F., Vignais, P.V. (2002) The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. Europ J Biochem. 269: 3246-3255.
6. Gennaro, R., Dolzani, L., Romeo, D. (1983) Potency of bactericidal proteins purified from the large granules of bovine neutrophils. Infect Immun. 40: 684-690.
7. Grieve, P.A., Mattila T. (1989) Non-oxidative antibacterial activity of bovine neutrophil granule proteins towards mastitis pathogens. J Vet Med. 36: 500-508.
8. Heilmann, R.M., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M. (2008) Purification and partial characterization of canine calprotectin. Biochim. 20: 1306-1315.
9. Katircioglu, H.Y.B., Aslim, B., Yüksekdag, Z., Atic, T. (2005) Screening for Antimicrobial

Agent Production of SomeFreshwater. Internet J Microbiol. 2: 123-131.

10. Liu, J.Z., Jellbauer, S., Poe, A.J., Ton, V., Pesciaroli, M., Kehl-Fie, T.E., Restrepo, N.A., Hosking, M.P., Edwards, R.A., Battistoni, A., Pasquali, P., Lane, T.E., Chazin, W.J., Vogl, T., Roth, J., Skaar, E.P., Raffatellu, M. (2012) Zinc Sequestration by the Neutrophil Protein Calprotectin Enhances Salmonella Growth in the Inflamed Gut. Cell Host Microbe. 11: 227-239.
11. Loomans, H.J., Hahn, B.L., Li, Q.Q., Phadnis, S.H., Sohnle, P.G. (1998) Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin. J Infect Dis. 177: 812-814.
12. Mark, T., Quinn, F.R.D., Gary M.B. (2007) Neutrophil Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). (1st ed.) Humana Press Inc, New Jersy, USA.
13. Regenhard, P., Leippe, M., Schubert, S., Podschun, R., Kalm, E., Grötzinger, J., Looft, C. (2009) Antimicrobial activity of bovine psoriasin. Vet Microb. 136: 335-340.
14. Qaiyami, S. (2007) Macro and microdilution methods of antimicrobial susceptibility testing. In: Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodvin, A.C. (eds.). (1st ed.). Taylor and Francis Group, New York, USA. p. 75-79.
15. Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. Nat Prot. 1: 16-22.
16. Schleicher, C.H., Dell'Angelica, E.C., Santome, J.A. (1993) Isolation and N-terminal sequence of two low molecular weight calcium-binding proteins from pig granulocytes. Int J Biochemi. 25: 1251-1256.
17. Skoog, W.A., Beck, W.S. (1956) Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. Blood. 11: 436-454.
18. Stasia, M.J., Dianoux, A.C., Vignais P.V. (1989) A 23-kDa protein as a substrate for protein kinase C in bovine neutrophils. Purification and partial characterization. Biochem. 28: 9659-9667.
19. Yang, T.H., Tzeng, S., Cheng, I., Burnett, M.G., Yoshizawa, Y., Fukoyama, K., Lee, S.C., Epstein, W.L. (1997) Identification of the mouse calcium-binding proteins, MRP 8 and MRP 14, in Schistosoma mansoni-induced granulomas: biochemical and functional characterization. J
20. Leukoc Biol. 61: 258-266.
    Yui, S., Mikami, M., Yamazaki, M. (1995) Purification and characterization of the cytotoxic factor in rat peritoneal exudate cells: its identification as the calcium binding protein complex,
21. calprotectin. J Leukoc Biol. 58: 307-316.
    Yui, S., Nakatani Y., Mikami M. (2003) Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. Biol Pharma Bull. 26: 753-760.

Isolation, purification and anti-bacterial property of calprotectin from bovine neutrophil

Imani, M.[1*], Tukmechi, A.[2]

[1]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran*
[2]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran*
(Received 23 December 2015, Accepted 20 February 2016)

Abstract:

BACKGROUND: It is believed that bovine neutrophils contain several peptides and protein which exhibit antimicrobial activity against microorganisms such as fungi and bacteria. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to isolate and purify a potential antibacterial protein from bovine neutrophil and test its anti bacterial activity. **METHODS:** Neutrophils were isolated from bovine blood using dextran sedimentation and centrifugation on Ficoll-Hypaqe. Cell viability is examined by trypan blue dye exclusion method. Protein extract was then dialyzed and applied onto ion exchange chromatography for further purification, and its potential cytostatic activity was examined against *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia ruckeri*. **RESULTS:** Viability of isolated neutrophil was over 95%, chromatographic results and SDS-PAGE analysis exhibited that neutrophil cytosolic proteins were fractionated so that the purification of P7/P23 was almost 60% in the first step and purification was completed in the second phase. Using calibration curve according to molecular mass markers, the relative molecular mass of P7 and P23 determined as 7 kDa and 23 kDa, respectively. Also, results showed that this protein has antibacterial activity and has higher bactericidal activity against *Y. ruckeri*. **CONCLUSIONS:** It could be concluded that purification of P7/P23 sustains its biological activity and has wide range antibacterial activity. Moreover, taking all data into account may suggest that the cytostatic activity of neutrophil, to some extent, results from P7/P23 protein which is abundant in the cytosole.

Keyword: antibacterial activity, isolation, neutrophil, P7/P23

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Antibacterial property of Calprotectin isolated from bovine neutrophil.

Figure 1. Examination of neutrophil cell viability by trypan blue exclusion test.

Figure 2. Chromatogram obtained from Q-Sepharose column (First Column).

Figure 3. SDS-PAGE for isolated proteins from ion exchange column.

Figure 4. Chromatogram obtained from Q-Sepharose column (Second Column).

Figure 5. SDS-PAGE analysis of Fractions 3 and 4 eluted from SP-Sepharose.

***Corresponding author's email: m.imani@urmia.ac.ir, Tel: 044-31942610, Fax: 044-32771926**