استخلاص وتنقية الببتيدو كلايكان من بكتريا *Staphylococcus saprophyticus*

عذراء صالح فليح ، مي طالب فليح ، حارث جبار فهد المذخوري

ة ا / احاة/جا ة ي داد

المستخلص

من مجموع 300 عينة ادرار تم الحصول على 71 عزلة عائدة لجنس الـ *Staphylococcus* من مريضات مصابات بخمج المجاري البولية واظهر عائدية 16 عزلة للنوع *S. saprophyticus* تم تشخيصها بوساطة الاختبارات الكيموحيوية، استخدمت عملية التكسير الميكانيكي (Mechanical disintegration) بأستخدام المازج (vortex) والحبيبات الزجاجية، والتكسير بأستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية الفائقة لتكسير جدار بروتينية الاخرى ؛ وبذلك تم الحصول على ببتيدوكلايكان نقي خالٍ من الشوائب وهذا ما اكده الفحص بالمجهر الضوئي والالكتروني وقد اظهر الببتيدوكلايكان حزمة بروتينية واحدة عند اجراء الرحلان الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة مقارنة بالجدار الخلوي الخام والذي اظهر عدة حزم بروتينية ؛ مما يدل على كفاءة الطريقة المستخدمة في الاستخلاص. خلية العزلة S67 *S. saprophyticus* والحصول على خلايا متكسرة تمثل الجدار الخلوي الخام ومن ثم استخلاص وتنقية جزيئة الببتيدوكلايكان بالاعتماد على الهضم الانزيمي بوساطة انزيمات الـ DNase وRNase و Pronase وTrypsin فضلاً عن استخدام مركب سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) ومواد كيميائية اخرى لازالة الاغشية السايتوبلازمية والمحتويات

المقدمة

تعد بكتريا *S. saprophyticus* من اهم انواع المكورات العنقودية غير المنتجة للكواكيولير المسببة لخمج المجاري البولية في الاناث الشابات، وتمتاز بمقاومتها للمضاد الحيوي النوفوبايوسين[1] ، كما تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على احداث الاصابة منها الطبقة المخاطية (slime layer) والتي تعد عامل التصاق[2]، وانتاجها انزيم اليوريز (Urease) الذي يعد احد العوامل الهامة في احداث الاصابة بخمج المجاري البولية [3]. يعد الببتيدوكلايكان احد الدعائم الرئيسة وهيكل الجدار الخلوي البكتيري حيث يوجد في كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام كما انه المكون الرئيس للجدران الخلوية للجراثيم الموجبة لصبغة غرام وهو بوليمر يتكون من N-acetylglucosamine و N-acetyl muramic acid المرتبطان بأصرة β- 1,4 glycoside ومن البوليمر يرتبط بدوره بسلسلة ببتيدية قصيرة متكونة من 4 احماض امينية [4]. يمتاز الببتيدوكلايكان المعزول من المكورات Staphylococci بكونه احد المركبات المستضدية المهمة لهذه البكتريا لدوره في تحفيز الاستجابة المناعية مثل تحفيزه للسايتوكينات والمفوكينات[5].لذا هدفت هذه الدراسة الى استخلاص و تنقية هذا المكون المهم من جدار *S. saprophyticu*

المواد وطرائق العمل

عزلت بكتريا *S. saprophyticus* من عينات ادرار ماخوذة من نساء بعمر(15-35) سنة مصابات بخمج المجاري البولية وفق Wallmark وجماعته [6].

الاختبارات التشخيصية للبكتريا: تم تشخيص العزلات البكتيرية اعتمادا على Kloos and Schleifer [7] و Holt *et al.* [8] واجراء الفحوصات المجهرية والكيموحيوية

استخلاص الببتيدوكلايكان

تم استخلاص الببتيدوكلايكان من عزلة S67 *S. saprophyticus* على وفق طريقة De-Jonge [9]

تقدير البروتين

تم تقدير البروتين لعينات الجدار الخلوي الخام (Crude cell wall) وعينة الجدار الخلوي بعد استخدام SDS بتركيز 2% وعينة مستخلص الببتيدوكلايكان باستخدام طريقة Lowry [10].

تقدير الكاربوهيدرات

تم تقدير الكاربوهيدرات لعينات الجدار الخلوي الخام (Crude cell wall) وعينة الجدار الخلوي بعد استخدام SDS بتركيز 2% وعينة مستخلص الببتيدوكلايكان باستخدام طريقة Dubois [11].

ISSN:1814-5922

الفحص المجهري

تم فحص الخلايا المتكسرة مجهريا في كل خطوة من خطوات عزل واستخلاص الببتيدوكلايكان وذلك بوضع قطرة من العالق المتكسر على شريحة زجاجية ، ثم اضيفت قطرة من صبغة البنفسج البلوري (Crystal violet) بعد تغطيتها بغطاء الشريحة الزجاجية (cover slip) وفحصها تحت العدسة الزيتية.

الفحص بالمجهر الالكتروني النافذ:

اتبعت طريقة Horne [12] لصبغ العينة بالصبغة السالبة (Negative stain) (2 % فوسفات التنكستين) وتم فحصها بالمجهر الالكتروني النافذ.

اختبار نقاوة الببتيدوكلايكان بوساطة الرحلان الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة:

تم اختبار نقاوة الببتيدوكلايكان بطريقة الرحلان الكهربائي تبعا للطريقة الموصوفة من قبل Pilijac [13].

النتائج والمناقشة

شخصت 16 عزلة تابعة لبكتريا *S.saprophyticus* بوساطة الاختبارات الكيموحيوية جدول رقم(1).

اذ تميزت العزلات جميعها بكونها مخمرة للكلوكوز، وتقاوم الـ Bacitracin لوجود oligoglycin في الجسور ما بين الببتيدية لجدارها الخلوي التي تعطيها المقاومة لـ Bacitracin [14]، وكانت سالبة لاختبار الاوكسيديز الامر الذي ميزها عن جنس الـ *Micrococcus*. كما اعطت العزلات نتيجة موجبة لاختبار الكتاليز لتمييزها عن كـ *Streptococcus* [15] .

بعد تشخيص العزلات على مستوى الجنس تم تمييزها على مستوى النوع وذلك بالاعتماد على انتاج الكواكيوليز اذ تم تمييزها عن *S. aureus* وباقي الانواع الموجبة للكواكيوليز وبعد اجراء فحص المقاومة للنوفوبايوسين والذي يعد تشخيصا اوليا لبكتريا *S. saprophyticus* [16] وكذلك امتازت العزلات بقابليتها العالية على انتاج انزيم اليوريز الذي يعد عامل ضراوة مهم وبذلك تم تمييزها عن *S. lentus* و *S. cohnii* و *S. sciuri* كما تمكنت العزلات جميعها من النمو عند درجتي حرارة (15 و 45) م فضلا عن تحملها تراكيز قصوى من كلوريد الصوديوم بتركيزي (10 و 15) %. ولم تتمكن العزلات من انتاج DNase ولكنها استطاعت انتاج الاسيتوين وكانت الفحوصات الكيموحيوية الاخرى مطابقة لما اشارت اليه الدراسات العلمية حول صفات هذه البكتريا.

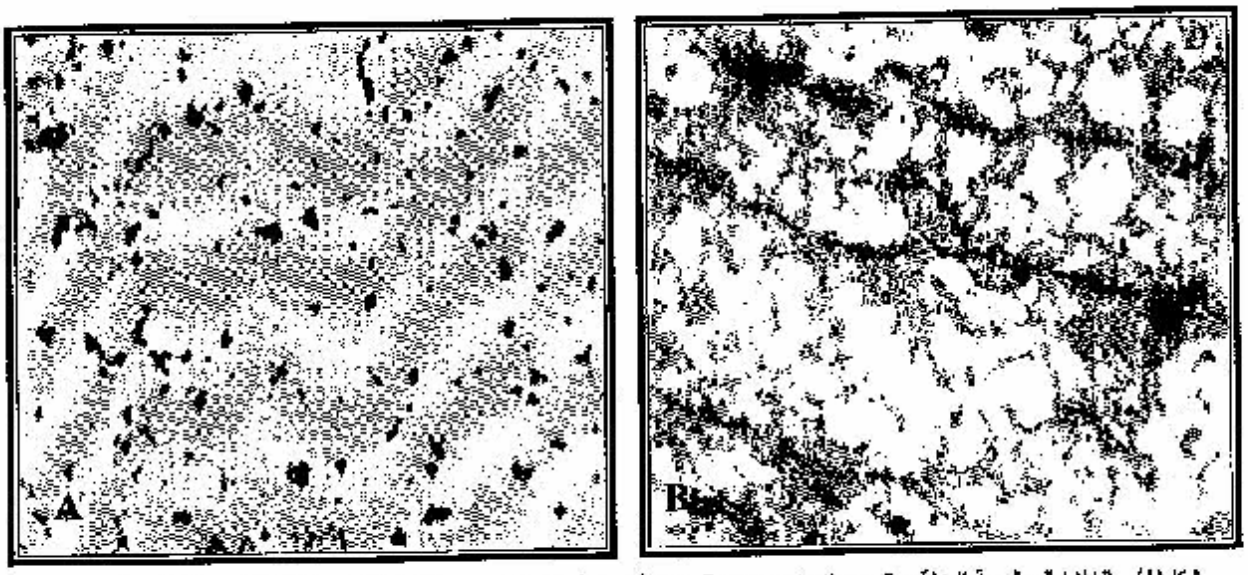
تم استخلاص الببتيدوكلايكان حيث تم تكسير الجدار الخلوي باستخدام طريقتين، طريقة التكسير الميكانيكي باستخدام الحبيبات الزجاجية(glass beads) وجهاز المزج الـ (vortex) المتوافر. وقد اظهرت هذه العملية جودة عالية اذ تم الحصول على عالق من الخلايا المتكسرة فاقد للعكورة وبلون اصفر باهت في ظروف مبردة 4 م وبمدة زمنية قدرها 45 دقيقة ، استخدمت عملية التكسير الميكانيكي من العديد من الباحثين [9, 17,18].

استخدمت طريقة التكسير باستخدام جهاز الموجات الصوتية النافذة (Sonicator)، في تكسير الجدار الخلوي الصلب التابع لـ *S. saprophyticus* ومن ثم استخلاص الببتيدوكلايكان حيث تم الحصول على عالق من الخلايا المتكسرة فاقد للعكرة وذي لون اصفر شفاف بتعريض الخلايا للجهاز بمعدل 15 مرة وبمدة زمنية قدرها 7.5 دقيقة استخدمت هذه الطريقة بنجاح من عدد من الباحثين [19,20] كما بين ذلك الفحص بالمجهر الضوئي حيث ظهرت كتلة شبكية من الخلايا الجرثومية نتيجة خروج البروتينات والاحماض النووية والمحتويات الخلوية الاخرى من خلال الثقب المتكون بجدار الخلية نتيجة عملية التكسير شكل(1).

من الضروري ان تثبت المدة الزمنية 10 دقائق بدون اطالة لان زيادة مدة عملية تكسير الجدران الخلوية باستخدام هذا الجهاز قد يؤدي الى تقليل الفعالية الترسيبية للجدران نتيجة لتكسرها ومن ثم عدم الحصول على كمية كافية من جدران خلوية متكسرة [21].

تم استخلاص وتنقية جزئية للببتيدوكلايكان من جدار خلية الـ *S. saprophyticus* باستخدام الانزيمات الهاضمة والمركبات المختلفة وبالاعتماد على الطريقة التي اتبعها De Jonge وجماعته [9]

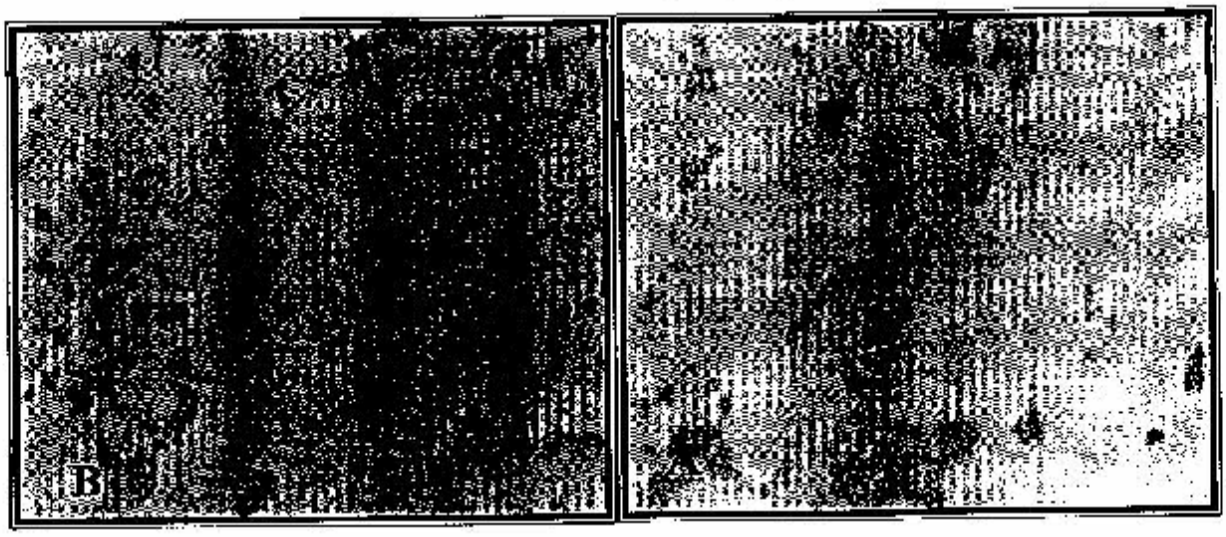
حيث ظهر المستخلص بشكل كتلة بيضاء ناصعة التي مثلت الببتيدوكلايكان المنقى جزئيا ، كما اكد ذلك الفحص بالمجهر الضوئي حيث ظهرت خلايا عصوية ومعينية غير منتظمة.



شكل(1) الخلايا الجرثومية للعزلة S_{67} *S. saprophyticus* مصبغة بصبغة البلور البنفسجي Crystal violet قوة التكبير X40 A – قبل التكسير حيث تترتب الخلايا بشكل عناقيد B– بعد التكسير الميكانيكي حيث تظهر الخلايا بشكل كتلة متشابك

فعالية الطريقة المستخدمة في استخلاص الببتيدوكلايكان حيث استخدم مركب الـ SDS بتركيز 4% و2% و 1% لازالة الاغشية السايتوبلازمية وبعض المواد البروتينية وباستخدام انزيمي الدنيز (DNase) والرنيز (RNase) لتفتيت الاحماض النووية المترسبة بعد عملية التكسير اما استخدام انزيمي التربسين والبرونيز فكان لهظم البروتينات الاخرى المتبقية في الخلية والجدار حيث تعمل هذه الانزيمات على كسر اواصر السلاسل الببتيدية التي تربط الاحماض الامينية المكونة للبروتين بدون احداث تفكك لتركيب الببتيدوكلايكان المكون لجدار الخلية البكتيرية مما ادى الى ظهور خلايا غير منتظمة الشكل وتظهر الفتحة الجدارية بشكل واضح (شكل3) الشكل متكسرة ومحاطة بجدار غير كامل ذي لون بنفسجي شكل (A-2) بعد استخدام محلول الـ SDS 2 % نتيجة تصبيغه بصبغة البلور البنفسجي (Crystal violet) اما داخل الخلية فظهر بلون وردي شفاف مما يدل على خلوها من المكونات الخلوية والبروتينية نتيجة هضمها وتحللها بفعل الانزيمات الهاضمة والمركبات المحللة شكل(B-2)[17] ، هذه النتيجة جاءت مشابهة لما توصل اليه كل من [18,22] .

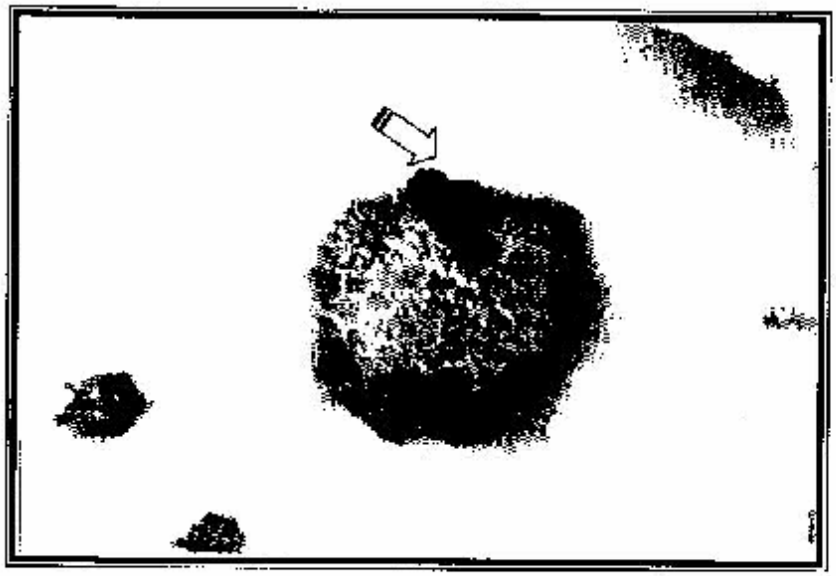
اظهر الفحص بالمجهر الالكتروني النافذ (Transmission Electron Microscope)



شكل(2): خلايا جراثيم *S. saprophyticus* S67

A- بعد استخدام محلول الـ SDS 2% ، وهي إحدى مراحل استخلاص الببتيدوكلايكان مصبغة بصبغة البنفسج البلوري تحت المجهر الضوئي قوة التكبير X40.

B- بعد عملية استخلاص الببتيدوكلايكان وبعد استخدام الانزيمات الهاضمة وتظهر خلوها من المكونات الخلوية والبروتينية مصبغة بصبغة البلور البنفسجي تحت المجهر الضوئي قوة التكبير X100.



شكل (3): الجدار الجرثومي والفتحة الجدارية (⇨) لـ *S. saprophyticus* S67 بعد عملية استخلاص الببتيدوكلايكان ومصبغة بالصبغة السالبة (Negative stain) تحت المجهر الالكتروني مكبرة 64000 مرة

بوصفه مقياساً الببتيدوكلايكان حيث يلاحظ زيادة سكر الكلوكوز بشكل مقارب لما توصل اليه كل من Amako وجماعته[18] و Umeda وجماعته[22].

كما قيس جزء من مستخلص الببتيدوكلايكان عند طول موجي 260 نانوميتروقد كانت القراءة 0.000 ، مما يعني خلوه من الاحماض النووية [24].

استخدم الرحلان الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة للاستدلال على نقاوة مستخلص الببتيدوكلايكان حيث اعطى المستخلص حزمة بروتينية ، في حين اعطت الجدران الخلوية المتكسرة عدة حزم بروتينية ؛ مما يدل على جودة الطريقة المستخدمة في الاستخلاص ، وعلى نقاوة مستخلص الببتيدوكلايكان شكل (4).

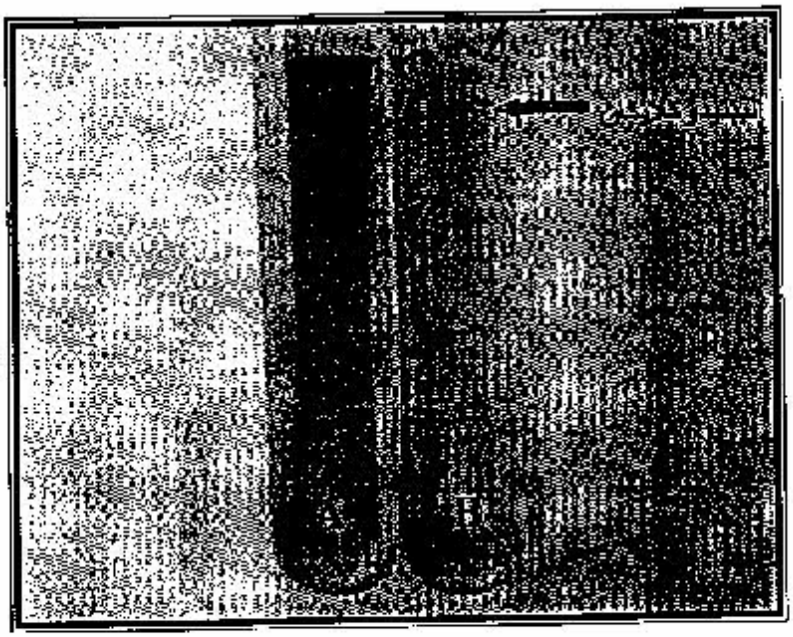
استخدم Umeda وجماعته الرحلان الكهربائي تحت ظروف غير ماسخة لاختبار نقاوة الببتيدوكلايكان المستخلص من بكتريا *S. aureus* اذ لم يعط اية حزم بروتينية وهو دليل على احتوائه على ببتيدات قليلة ؛ مما يؤكد دقة الطريقة المستخدمة في الاستخلاص ، في حين اعطت الجدران المتكسرة التي تدعى (Crude cell wall) حزماً بروتينية تجاوزت الـ (10) حزم قياساً بمستخلص الببتيدوكلايكان [22].

قدرت كمية البروتين لمستخلص الببتيدوكلايكان على وفق طريقة لوري Lowry [10] حيث بلغ تركيز البروتين لعينة الجدار الخلوي الخام 136 مايكروغرام/مليلتر، في حين قلت كمية البروتين بشكل ملحوظ بعد عملية التكسير واستخدام محلول الـSDS 2% اذ بلغت 60 مايكروغرام/مليلتر، وبعد استخدام الانزيمات الهاضمة بلغت نسبة البروتين 6.6 مايكروغرام/مليلتر ؛ مما يعني الحصول على ببتيدو كلايكان نقي خالٍ من البروتينات الخلوية الجدول (2)، وجاءت النتائج مشابهة تقريبا لما توصل اليه كل من [18,22] وهذا يدل على دقة عملية الاستخلاص وايضا فعالية الانزيمات الهاضمة والمواد المستخدمة في الاستخلاص.

قدرت كمية الكاربوهيدرات لمستخلص الببتيدوكلايكان على وفق طريقة حامض الكبريتيك الفينول [11] حيث بلغت نسبة الكاربوهيدرات لعينة الجدار الخلوي الخام 64.4 مايكروغرام/مليلتر، في حين زادت نسبة الكاربوهيدرات في كل من الجدار المعامل بمحلول الـSDS 2% والمعامل بالانزيمات اذ بلغت النسب (101.4، 76) مايكروغرام/مليلتر على التوالي الجدول (2) ، وهي طريقة بديلة عن طريقة Reissing [23] التي يتم فيها تقدير (glucoseamine)

جدول (2): يوضح تركيز البروتين المستخلص الببتيدوكلايكان المنقى المأخوذ من عزلة S_{67} *S. saprophyticus* مقدر بطريقة فولن – لوري و تركيز الكاربوهيدرات مقدر بطريقة حامض الكبريتيك – الفينول لكل مرحلة من مراحل الاستخلاص.

المستخلص	تركيز البروتين (مايكروغرام/مليلتر)	تركيز الكاربوهيدرات (مايكروغرام/مليلتر)
الخام	156.25	64.7
المعامل بالـ SDS %2	60	76.6
المعامل بالتربسين والـ RNase والـ DNase (مستخلص الببتيدوكلايكان)	6.6	101.4



شكل(4): الرحلان الكهربائي للجدران المتكسرة (A) وللببتيدوكلايكان المستخلص من عزلة S_{67} *S.saprophyticus* (B) باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف غير ماسخة

sugars and related substances", Anal. Chem. Vol. 28, No. 3, 1956 , pp.350- 356.

12- R. H. Horn, (1965) "Negative stain method", In: Techniquis for Electron Microscopy, 2nd ed., (Desmond. K. ed.), Blackwell Scientific publication, Oxford. pp. 238-356

13- V. Piljac, G. Piljac, and N. Bozina, "Horizontal electrophoresis". In: Genetic Engineering; Centrifugation and Electrophoresis (V. Piljac and G. piljac, eds). Yougoslavia the TIZ "Zrinski" Cakovec. 1986.

14- S. Bascomb, and M. Manafi, "Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic gram positive cocci" . Clinical microbial. Rev., Vol. 11, No. 2, 1998, pp. 318 – 340.

15- B. Forbes, D. Saham, and A. Weissfeld. "Bailey and Scott's diagnostic microbiology" Mosby, USA, 2006.

16- A. De paulis, S. predari, C.Chazarreta, and J. Santoianni. "Five tests simple scheme for species level identification of clinically significant coagulase negative staphylocci". J.clinic. microbial.

17- P. K. Peterson, B. J. Wilkinson, Y. Kim, and D. Schmeling, "The key role of peptidoglycan in the opsonization of *Staphylococcus aureus*", J. Clin. Invest., Vol. 61, 1978, pp. 597-609.

18- K. Amako, A. Umeda,and K. Murata, "Arrangement of peptidoglycan in the cell wall of *Staphylococcus* spp." J. Bacteriol., Vol. 150, No. 2, 1982 , pp. 844 – 850.

19- L. Räsänen, and H. Arvilommi, "Cell walls, peptidoglycans, and teichoic acids of gram positive bacteria as polyclonal inducers and immunomodulators of proliferative and lymphokine responses of human B and T lymphocytes". Infect. Immu., Vol. 34, No.3, 1981 , pp. 712-717.

20- B. J. Mondino, and K. P. Kowalski, "Phylctenulae and catarrhal infiltrates occurrence in rabbits immunized with staphylococcal cell walls", Arch. Ophthalmol., Vol. 100, No.12 , 1982, pp. 1968-1971.

21- M. R. J. Salton, "The Bacterial Cell Wall" Elsevier publishing company. New York, 1964, p. 44-50.

22- A. Umeda, Y. Ueki, and K. Amako, "Structure of the *Staphylococcus aureus* cell wall determined by the freeze-

References

1- A. N. De paulis, S. C. Predari, C. D. Chazarreta and J. E. Santoianni, "Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci". J. Clin. Microbiol., Vol. 41, No. 3, 2003, pp. 1219-1224.

2- E. Hjelm, and Etherden. I., "Slime production by Staphylococcus saprophyticus", Infect. Immun., Vol. 59, No. 1, 1991 pp, 445-448.

3- M. E. Rupp, D. E. Soper, and G. L. Archer. "Colonization of the female genital tract with Staphylococcus *saprophyticus*", J. Clin. Microbiol., Vol. 30, No. 11, 1992, pp, 2975-2979.

4- G. F. Brooks, J. S. Butel, S. A. Morse, (2001). "Medical Microbiology 22 ed" . Lange medical books, North America.

5- B. Weidemann, H. Brade, E. T. Rietschel, R. Dziarski, V. Bazil, S. Kusumoto and, H. Flad, "Soluble peptidoglycan–induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structure" .Infect .Immun., Vol. 62. No. 11, 1994, pp 4709-4715.

6- G. Wallmark, I. Arremark, and B. Telamder, "Staphylococcus saprophyticus : a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients", J. Infect. Dis., Vol. 138, No. 6, 1978, pp. 791-797.

7- W. E. Kloos, and K. H. Schleifer, "Simplified scheme for rotine identification of human Staphylococcus species", J.Clin.Microb., Vol. 1, No.1, 1975, pp. 82-88.

8- J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, "Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed", Williams and Wilkins, Maryland, USA. 1994

9- B. L. De Jonge, Y. S. Cheng, D. Gage, and Z. A. Tomas, "Peptidoglycan compositionof highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain", J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 16, 1992 , pp. 11248-11254.

10- O. H. Lowry, N. J. Rosebrouch, A. L. Earr. and R. J. Randall, "Protein measurement with the folin phenol reagent", J. Biol. Chem., Vol. 193, 1951, pp. 267-275.

11- N. Dubois, K. A. Gills, and F. Smith, "Colorimetric method for detection of

substitution method" J. Bacteriol., Vol. 169, No. 6, 1987, pp. 2482-2487.

23- J. L. Reissing, J. L. Strominger, and L. F. Lefoir, "A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars", J. Biol. Chem., Vol. 217, 1955, pp. 959- 966.

24 G. Teti, M. S. Chiofola, F. Tomasello, and C. Fava, "Mediation of staphylococcus saprophyticus adherence to uruepithelial cells by lip oteichoic acid" Infect. Immun, Vol 55, No. 3, 1987, pp. 839-842.

Abstract

Seventy one isolates of *Staphylococcus* were obtained from 300 urine specimens isolated from female patients with urinary tract infection. sixteen of these isolates were identified as *S.saprophyticus* by biochemical tests.
Mechanical disintegration method using vortex and glass beeds in addition to Ultrasonicator were used for preparing disintegrated cell walls which represent Crude cell walls, Extraction and partial purification of the peptidoglycan were accomplished by enzymatic digestion using DNase ,RNase ,Pronase and Trypsin in addition to SDS and other chemicals to remove the cytoplasmic membrane and other protein content, so we obtained pure peptidoglycan that was confirmed by light and electron microscope, the partial purified peptidoglycan showed one protein band compared with crude cell walls which showed many protein bands when performed in polyacrylamide gel electrophoresis under non denaturing conditions which approved the efficacy of method that employed in extraction of peptidoglycan.