جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

استخراج لیپو پلی ساکارید LPS از دیواره E.coil و ارزیابی قابلیت میتوژنی آن بر لنفوسیتهای B با استفاده از سنجش MTT

جلیل توکل افشاری[1]*، علی صادقیان[2]، میترا خلیلی[3]

۱- استادیار گروه آلرژی و ایمنولوژی،تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
۳- کارشناس گروه بیولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

چکیده

هدف: لیپوپلی ساکارید (LPS)[1]، ترکیب مهمی از دیواره باکتریهای گرم منفی و اندوتوکسین آنهاست. LPS به عنوان یک میتوژن باعث القای تکثیر سلولی در لنفوسیتهای B، ترشح سایتوکاینهایی مانند فاکتور تکروز دهنده تومور (TNF) و اینترلوکین یک (IL-1) در ماکروفاژها وو بیگانه خوارهای تک هسته‌ای می‌شود. در این طرح هدف از استخراج LPS، استفاده از آن به عنوان میتوژن به منظور القای پرولیفراسیون سلولی در لنفوسیتهای B بود.

مواد و روشها: پس از تولید انبوه باکتری E.coil در محیط کشت نوترینت براث (NB) به وسیله دو روش متفاوت، با استفاده از فنل کلروفرم- اتریترولیوم (PCP) و متانول – کلروفرم (MC) ، LPS استخراج شد. برای سنجش تکثیر سلولی، سلولهای لایه مونونوکلئار (MNL) خون تام به وسیله فایکول جداسازی و در محیط کشت RPMI ۱٦٤۰ تکمیل شده، کشت داده شد. سپس رقتهای مختلف از PCP-LPS، MC-LPS و LPS استاندارد سیگما به محیط کشت افزوده شد. میزان تکثیر سلولی، در پلیت ماکروتیتراسیون ٦ خانه به وسیله آزمون ارزیابی تعداد سلولهای زنده[2] با رنگ تریپان بلو و در پلیتهای میکروتیتراسیون ۹٦ خانه به وسیله سنجش MTT ارزیابی شد.

نتایج و بحث: در روش متانول-کلروفورم، هنگامی که باکتریها با استن یا اتانول شسته شدند، LPS استخراج شده به صورت توده ای چسبناک و در صورت شسته نشدن با این مواد، به صورت مایع روغنی شکل ظاهر شد. اما LPS حاصل از روش فنل- کلروفرم- اتریترولیوم به صورت رسوب به دست آمد. در آزمون ارزیابی سلولهای زنده، میزان پرولیفراسیون سلولهای تحریک شده با LPS به دست آمده از روشهای استخراج متانول- کلروفرم (MC-LPS) و فنل- کلروفرم- اتریترولیوم (PCP-LPS) بیشتر از گروه کنترل (سلولهای بدون LPS) بود. در سنجش MTT، LPS به دست آمده از روش استخراج فنل- کلروفرم- اتریترولیوم

*نشانی مکاتبه: مشهد، میدان فردوسی، میدان بوعلی، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد. E-mail:Jtavakol@Yahoo.com

1. Lipopolysaccharide(LPS)
2. Viability test

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(PCP-LPS) نسبت به LPS به دست آمده از روش استخراج متانول- کلروفرم (MC- LPS) پرولیفراسیون سلولی بیشتری نشان داد.

نتیجه گیری: این نتیجه نمایانگر این است که LPS استخراج شده از روش فنل- کلروفرم- اترپترولیوم (PCP) قابلیت میتوژنی بیشتری نسبت به LPS استخراج شده از روش متانول- کلروفرم (MC) دارد.

همچنین در مقایسه LPS استخراج شده از روش فنل- کلروفرم- اترپترولیوم با LPS استاندارد سیگما به وسیله سنجش MTT، PCP-LPS در رقتهای مختلف (۱/۸، ۱/٤ و ۱/۲) دارای جذب نوری یکسانی با LPS استاندارد در غلظتهای مختلف (μg/ml ۸۰ و ٤۰، ۲۰) بود و نمودار مربوط به PCP-LPS در جذبهای نوری مختلف بر نمودار LPS استاندارد منطبق شد.

کلید واژگان: لیپوپلی ساکارید (LPS)، استخراج، خالص سازی، سنجش MTT.

۱- مقدمه

لیپوپلی ساکارید (LPS) سطحی ترین دیواره باکتریهای گرم منفی و اندوتوکسین آنهاست [۱، ۲]. از استخراج LPS به طور وسیع برای تحقیق در زمینه‌های مختلف استفاده می‌شود. LPS به عنوان یک ترکیب میتوژنی برای لنفوسیتهای B، تکثیر این لنفوسیتها را به صورت غیر اختصاصی و پلی‌کلونال موجب می‌شود [۳]. این ترکیب ترشح سایتوکاینهایی از قبیل فاکتور تکروز دهنده تومور (TNF)و اینترلوکین یک (IL-۱) را در ماکروفاژها و بیگانه‌خوارهای تک‌هسته‌ای القا می‌کند؛ این فاکتورها در درمان سرطان و سایتوکاین‌تراپی کاربرد دارند[۳]. همچنین استخراج و خالص سازی LPS برای تحقیق روی ساختمان شیمیایی، نحوه بیوسنتز این مولکول و درجه سمیت آن و بررسی اثرات LPS بر متابولیسم و سیستم ایمنی بدن استفاده می‌شود [٤]. برای بررسی پاسخ دفاعی میزبان به LPS، از ترکیب آن با فلورسین ایزوتیوسیانات(FITC) یا ۲-٤-٦ تری نیترو بنزن سولفونیک اسید استفاده می‌شود [٤]. LPS از لحاظ ساختمانی از ۳ ناحیه که به صورت کووالانت به هم متصلند تشکیل شده است. ناحیه لیپید A یا اندوتوکسین A: این ناحیه در غشا خارجی مانند لنگری هیدروفوبیک عمل می‌کند و دارای فعالیت توکسینی است. ناحیه هسته: الیگوساکاریدی فسفریله شده است و در برابر آنتی بیوتیکها در غشا خارجی به عنوان سد عمل می‌کند. ناحیه پلیمری آنتی‌ژن O: الیگوساکاریدی ایمونوژیک است که از واحدهای قندی تکرار شونده تشکیل شده است؛ این واحدها در گونه‌های مختلف و نیز از سویه‌ای به سویه دیگر متفاوتند [۱]. ناحیه لیپید A در تمام باکتریهای گرم منفی یکسان است یا تفاوت اندکی دارد؛ ناحیه درونی هسته، در محدوده وسیعی از گونه‌های باکتریایی یکسان است و در مواردی درجات محدودی از تمایز را نشان می‌دهد. اما ساختمان آنتی ژن O به طور قابل توجهی در باکتریهای گرم منفی متفاوت است که پایه مهمی برای تشخیص و تعیین تیپ گونه و سویه‌های باکتریهای گرم منفی است [۵]. کلنی باکتریهای گرم منفی بر حسب شکل ظاهری خود به دو فرم زبر (R)[1] و نرم (S)[2] تقسیم می‌شوند. در فرم S مولکول LPS به طور کامل بروز می‌کند در صورتی که در فرم R، مولکول LPS فاقد آنتی‌ژن O به طور کامل است و بیشتر فرم S را نشان می‌دهد. اما سویه‌های آزمایشگاهی E.coil K۱۲ اشکال R را نشان می‌دهند [٤]. بر حسب R یا S بودن LPS، روش استخراج آن متفاوت است [۵]. شرایط محیطی مانند ترکیب هیدروکربنی محیط کشت، کشت مکرر باکتری، دما و فضای رشد بر نحوه بروز مولکول LPS موثرند [۵،٦]. در این مطالعه هدف از استخراج LPS از باکتری E.coil استفاده از آن به عنوان میتوژن برای لنفوسیتهای B در محیط کشت سلولی بود.

1. Rough
2. Smooth

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲- روش کار

۲-۱- کشت و استخراج باکتری

باکتری مورد استفاده در این پروژه E.coil پاتوژن بود که از بخش میکروب‌شناسی بیمارستان قائم (عج) مشهد تهیه شد. باکتری پس از چندین بار کشت در محیط EMB، سرانجام در یک لیتر محیط کشت نوتریشت براث[1] در شیکرانکوباتور[2] به مدت ۲٤ ساعت با سرعت ۱۵۰-۲۰۰rpm و دمای ۳۷°C کشت داده شد. باکتریها به وسیله دستگاه سانتریفیوژ[3] با سرعت ۲۰۰۰rpm-۱۵ و به مدت ۲۰min از محیط کشت جداسازی شدند. به منظور آماده سازی باکتریها برای عمل استخراج، باکتریها چندین بار با استن یا اتانول[4] شسته شدند تا مقدار زیادی از فسفولیپیدهای غشا و چربی دیواره خارج شود [۷،۸].

سپس باکتریها همراه با مقدار کمی EDTA[5] به وسیله دستگاه Ultra turax homogenisator[6] به مدت ۲-۱۰min، Sonicate شدند که بدین وسیله اجزای دیواره باکتری تا حد امکان از هم جدا شد.

۲-۲- عمل استخراج

LPS به وسیله دو روش متفاوت، با استفاده از فنل- کلروفرم- اتر پترولیوم (PCP) و متانول- کلروفرم (MC) استخراج شد.

۲-۲-۱-روش استخراج با فنل- کلروفرم- اترپترولیوم[7] [۷]

مخلوط استخراج فنل، کلروفرم و اتر (مرک) به ترتیب به نسبتهای ۸:۵:۲ (۱۰cc فنل، ۲۵cc کلروفرم، ٤۰cc اتر) تهیه شد. به طوری که به ازای هر ۵gr باکتری، ۲۰cc مخلوط استخراج، مصرف شد. در تهیه مخلوط استخراج ابتدا فنل جامد به وسیله حرارت به مایع تبدیل شد و با افزودن آب، فنل اشباع تهیه شد. باید توجه داشت که این مخلوط باید مونوفازیک و شفاف باشد. در صورت کدر و ابری بودن در حضور آب می‌توان مقادیر بیشتری فنل جامد به آن افزود تا شفاف شود. باکتریها همراه با مخلوط استخراج به مدت ۲ دقیقه به وسیله دستگاه هموژنیزاتور به طور کامل همگن شدند. طی این عمل دما بین ۱۰°C-۵ حفظ شد. سپس باکترها حدود ۵ دقیقه با دستگاه شیکر همگن شدند و مخلوط حاصل سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، ۳ لایه تشکیل شد که در لایه وسط توده باکتریها و در لایه بالایی و زیرین مخلوط استخراج قرار داشت. محلول رویی حاوی LPS، جمع آوری و فیلتر شد. عمل استخراج در توده باکتری ۳ بار تکرار شد. به منظور خروج گازهای اتر و کلروفرم موجود در محلول رویی از ایجاد خلأ در دمای ۰°C استفاده شد. پس از خروج گازها، محلول باقیمانده که شامل فنل و LPS بود فریز شد تا LPS رسوب کند؛ در صورت کریستاله شدن فنل باقیمانده، با افزودن آب به صورت قطره قطره می‌توان موجب رسوب LPS شد. رسوب حاصل چندین بار با اتر و آب مقطر استریل برای حذف فنل شسته شد و سپس در مقدار کمی آب مقطر استریل، سوسپانسیون شد.

۲-۲-۲- روش استخراج با متانول- کلروفرم[8] [۹]

در این روش بعد از جداسازی باکتریها از محیط کشت، باکتریها در محلول EDTA با PH=۷ به صورت سوسپانسیون درآمدند. نسبت باکتری به محلول EDTA ۱gr/ml بود. باکتریها به وسیله دستگاه homogenizer به مدت ۱۰ دقیقه Sonicate شدند. سپس باکتریها به وسیله دستگاه شیکر، همگن شدند (۲۰۰rpm-۱۵۰ به مدت ۲ ساعت). سه لایه تشکیل شد: لایه وسط توده باکتریها، لایه زیرین کلروفرم اشباع شده با متانول و لایه بالایی حاوی متانول اشباع شده با کلروفرم بود. هر دو لایه بالایی و زیرین جمع آوری شد و پس از تبخیر محلول استخراج، نمونه LPS جمع آوری و ارزیابی شد.

۲-۳- ارزیابی LPS به‌وسیله سنجش میزان پرولیفراسیون لنفوسیتهای B

در این بخش، میزان پرولیفراسیون سلولی حاصل از تحریک لنفوسیتهای B به وسیله LPS اندازه گیری شد. بدین ترتیب که

1. MERK, Germany
2. NEW BRUNSWICK SCIENTIFIO INC., UK
3. BECKMAN, USA
4. MERCK, Germany
5. (MERCK, Germany)اتیلن دی آمین تتراستیک اسید
6. JAKE & KUNKEL IKA- Labortechnik, USA
7. PCP method
8. MC method

ابتدا مقدار ۱۰cc خون تام حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA) با ۱۰cc سرم فیزیولوژی رقیق شد و به آرامی به ٤ لوله حاوی ۳cc فایکول (بیوژن، مشهد، ایران) اضافه شد؛ خون رقیق شده دقیقاً روی فایکول قرار گرفت . بعد از سانتریفوژ (۲۰۰۰rpm ، ۲۰min) سه لایه تشکیل شد. لایه زیرین گلبولهای قرمز، لایه وسط فایکول و لایه بالایی شامل پلاسما بود. سلولهای لایه منونوکلئار که به صورت لایه ای ابری در حد فاصل پلاسما و فایکول قرار داشت، جمع آوری شد و پس از ۲ بار شستشو با سرم فیزیولوژی با محلول Hanks (بیوژن، مشهد ایران)، در۰/۵cc از محلول Hanks پانسیون شد. مقدار ۲۰µl از سلولهای چند هسته‌ای این سوسپانسیون با ۲۰µl تریپان بلو ۲۰٪w/v مخلوط شد و درصد سلولهای زنده با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. سپس سلولها در محیط کشت RPMI 1640 (بیوژن، مشهد ایران) تکمیل شده با ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (جابربن حیان، تهران، ایران)، ۱۰۰ul/ml پنی‌سیلین (جابربن حیان، تهران، ایران)، ۱۰۰ µg/ml آمفوتریسین، نمک بیکربنات سدیم (NaHCO) به مقدار لازم و ۲۰FCS٪ (بیوژن) سوسپانسیون شد.

۲-۳-۱- ارزیابی اثرات مورفولوژیکی MC-LPS بر لنفوسیتهای B و دستیابی به مناسبترین رقت برای آن

مقدار ۲cc از سوسپانسیون سلولهای مونونکلئار خون تام با غلظت $۲/۵\times۱۰^{۶}$cell/ml به هر چاهک پلیت ٦ خانه [1] افزوده شد و مقدار۵۰µl از رقتهای مختلف MC-LPS($۱/۲۰$ ، $۱/۱۰$ ، $۱/۵$ و Naet) نیز به هر چاهک اضافه شد؛ سپس در انکوباتور ۳۷°C و مرطوب با ۵٪CO2 [2] به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید و اثرات مورفولوژیکی انواع رقتهای MC-LPS بر لنفوسیتها مشاهده شد.

۲-۳-۲- مقایسه میزان پرولیفراسیون سلولی حاصل از PCP-LPS و LPS استاندارد

مقدار ۱۰µl از LPS استاندارد (سیگما) با غلظت ٤۰µg/µl و مقدار ۱۰µl و ۲۰µl از PCP-LPS به هر چاهک از پلیت ٦ خانه حاوی $۲/۵\times۱۰^{۵}$cell/ml به محیط کشت افزوده شد؛ بعد از ۷۲ ساعت به وسیله آزمون ارزیابی سلولهای زنده با رنگ تریپان بلو نتایج با هم مقایسه شد. نمونه کنترل فاقد LPS و فقط حاوی سلول بود.

۲-۳-۳- مقایسه انواع LPS استخراج شده با LPS استاندارد با استفاده از کیت سنجش تکثیر سلولی MTT [۱۳-۱۰]

MTT نمک تترازولیوم محلول در آب است. هنگامی که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد[3] یا با فر PBS آماده سازی می‌شود ترکیب زرد رنگی ایجاد می‌کند. حلقه MTT حل شده در میتوکندری سلولهای زنده، به کمک آنزیم دهیدروژناز شکسته شده و به فورمازان[4] نامحلول تبدیل می‌شود؛ فورمازان به وسیله حلالهای نظیر DMSO یا ایزوپروپانول اسیدی حل می‌شود و رنگ بنفشی را ظاهر می‌نماید. جذب نوری رنگ حاصل در طول موج ٦۲۰nm به وسیله الایزا[5] اندازه‌گیری می‌شود. در این پژوهش مقدار ۲۰۰µl از سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱×۱۰^{٦}cell/ ml به هر چاهک از پلیت میکروتیتراسیون ۹٦ خانه منتقل شد و مقادیر ۱۰µl و ۲۰µl از تمام نمونه ها ی استخراج شده (Standar–LPS و PCP-LPS و MC-LPS) به صورت سه تایی[6] به چاهکها افزوده شد. غلظت LPS استاندارد µg/ µl ٤۰ بود. پلیتها به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس به هر چاهک ۲۰µl از رنگ MTT با ۵mg/ml افزوده شد و مجدداً ۴۷ ساعت انکوبه گردید. در این مرحله ۲۰۰µl از محلول دی متیل سولفواکسید (DMSO) و ۲۵µl با فر گلایسین و Nacl به هر چاهک افزوده شد. در اثر افزودن این بافر لیزکننده رنگ بنفش در محیط ظاهر شد؛ جذب نوری چاهک با دستگاه ELISA plate reader در طول موج ٦۲۰nm اندازه گیری شد و نمودار خطی مربوط به هر نمونه، بر حسب مقدار و جذب نوری ترسیم شد.

1. NUNC, Denmark
2. LEEC, UK

3. Phenol red
4. Formazan
5. FAX ELISA plate Instrument; USA
6. Triplicate

۲-۳-٤- مقایسه رقتهای مختلف PCP-LPS با LPS استاندارد

ابتدا رقتهای مختلف PCP-LPS ($\frac{1}{8}$ و $\frac{1}{4}$، $\frac{1}{2}$)، LPS استاندارد (۸۰μg/ml و ٤۰، ۲۰) و سوسپانسیون سلولی با غلظت 1×10^{6}cell/ml تهیه شد و مقدار ۲۰μl از هر رقت به صورت سه تایی به هر چاهک حاوی 2×10^{5}cell افزوده شد و به مدت ٤۸ ساعت انکوبه گردید؛ مراحل بعد مشابه آزمایش سوم تکرار گردید.

۳- نتایج

هدف از این مطالعه استخراج لیپوپلی ساکارید (LPS) و استفاده از آن به عنوان میتوژن در پرولیفراسیون لنفوسیتهای B بود. در روش کشت E.coil متوسط باکتری به دست آمده، ٥gr در هر لیتر محیط کشت بود. از نظر شکل ظاهری، LPS حاصل از باکتریهایی که با استن یا اتانول شسته نشدند به صورت مایع و روغنی بود و تبخیر محلول استخراج بسیار کند صورت گرفت. اما در صورت شستشو با استن، بعد از تبخیر سریع گازها توده‌ای چسبنده در ته لوله ظاهر شد. ارزیابیها (آزمایش اول) نشان داد که پرولیفراسیون سلولی در غلظتهای $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ نسبت به دیگر رقتها بیشتر بود و بعد از گذشت ۷ روز، سلولها از نظر مورفولوژی نرمال و دارای غشا صاف و مدور بودند؛ اما در کنترل، سلولهای گرانوله با دیواره مضرس دیده شد که نشان دهنده حضور یک میتوژن در محیط کشت سلولها بود. در آزمایش دوم در همه چاهکها توده سلولی [1] و لنفوبلاستهای در حال تقسیم مشاهده شد که بیانگر پرولیفراسیون سلولی است (جدول ۱). در آزمایش سوم، نمودار ۱ و جدول ۲، میزان پرولیفراسیون حاصل از فنل-کلروفرم-اترپترلیوم (PCP_LPS) بیشتر از MC-LPS و در روش متانول- کلروفرم (MC) میزان پرولیفراسیون مایع رویی [2] بیشتر از لایه زیرین بود اما جذب نوری LPS استاندارد (St-LPS) کمتر از PCP-LPS به دست آمد. در آزمایش چهارم، جدول ۳، جذب نوری (OD) LPS استاندارد در غلظتهای مختلف (٤۰μg/ml و ۲۰،۱۰) به ترتیب مشابه با رقتهای مختلف ($\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$، $\frac{1}{8}$) PCP-LPS به دست آمد. در مرحله ارزیابی LPS استخراج شده به وسیله سنجش پرولیفراسیون سلولی (آزمون ارزیابی سلولهای زنده) در تمام آزمایشها حضور یک میتوژن در محیط کشت- که باعث پرولیفراسیون سلولی و تشکیل توده سلولی شده بود- مشاهده شد.

جدول ۱ سنجش پرولیفراسیون سلولی ۷۲ ساعت بعد از افزودن انواع LPS با استفاده از آزمون ارزیابی سلولهای زنده (viability test)

نوع LPS	تعداد اولیه سلولها	تعداد سلولها بعد از ۷۲ ساعت
LPS- استاندارد	$2/8\times10^{5}$	$2/9\times10^{5}$
PCP-LPS (۱۰ μl)	$2/8\times10^{5}$	$3/0\times10^{5}$
PCP-LPS (۲۰ μl)	$2/8\times10^{5}$	$4/0\times10^{5}$
CTL	$2/8\times10^{5}$	$1/5\times10^{5}$

در آزمایش اول، پرولیفراسیون در رقتهای ($\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{10}$) می‌تواند به علت رقیق شدن هرچه بیشتر کلروفرم و متانول باقیمانده با LPS باشد. بدین ترتیب در رقتهای پایین اثر آنها بر سلولها کمتر است یا این که غلظت بالای LPS ($\frac{1}{5}$، $\frac{1}{2}$) برای پرولیفراسیون سلولی، بیش از حد لازم است. در آزمایش دوم غلظت ٤۰μg/μl از LPS استاندارد برای پرولیفراسیون سلولی غلظت بالایی است و بر سلولها اثر توکسیسیتی دارد، به همین دلیل در این غلظت سلول کمتری شمارش شد. بهترین غلظت به دست آمده برای LPS استاندارد، حدود ٤۰-٤٥μg/ml است (جدول ۳). در آزمایش سوم در روش MC، پرولیفراسیون سلولی در هر دو لایه زیرین و بالایی مشاهده شد. از آنجا که در فاز پایین کلروفرم اشباع با متانول و در فاز بالا متانول اشباع با کلروفرم قرار می‌گیرد، فرم RLPS و مولکول لیپید A بیشتر در فاز کلروفرمی و فرم S LPS – به دلیل قطبیت بیشتر در واحدهای پلی‌ساکارایدی- در فاز متانول ظاهر می‌شود. بنابراین در صورتی که مخلوطی از باکتریهای زیر یا نرم داشته باشیم بهتر است هر دو لایه را جمع آوری و بررسی کنیم. همچنین مشاهده شد که PCP-LPS نسبت به MC-LPS میتوژن بسیار بهتری است. بنابراین روش استخراج فنل- کلروفرم- اترپترولیوم (PCP) نسبت به کلروفرم- متانول (MC) روش بهتری است. در آزمایش

1. clump
2. Supernant

چهارم، جدول ۳، PCP-LPS در رقتهای مختلف ($^1/_2$ و $^1/_4$، $^1/_8$) و LPS استاندارد، جذب نوری یکسانی دارند. بنابراین با استفاده از تساوی جذب نوری LPS استاندارد و PCP-LPS می‌توان غلظت مربوط به هر رقت از PCP-LPS را به دست آورد و میانگین آن را محاسبه نمود.

N=Neat PCP-LPS

ST-LPS= Standard LPS

OD($^1/_2$N) =OD(۴۰μg/ml of st-LPS)

OD($^1/_4$N) =OD(۲۰μg/ml of st-LPS) ⟶ PCP-LPS

غلظت نهایی = ۸۰ μg/ml

OD($^1/_8$N) =OD(۱۰μg/ml of st-LPS)

از آنجا که در هر دو آزمایش (سوم و چهارم) جذب نوری کنترل، بالاتر از جذب نوری میتوژنها و حتی بالاتر از LPS استاندارد است می‌توان نتیجه گرفت که: تعداد زیادی سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ($2/5\times10^5$)، کمبود محیط کشت مناسب در مدت زیاد انکوباسیون برای تعداد زیادی سلول، فضای محدود و مدت زیاد انکوباسیون بعد از افزودن رنگ (۱۷ ساعت) باعث مرگ سلولی بعد از تکثیر سلولی می‌شود. این میزان به حدی است که حتی در غلظت پایین LPS استاندارد، جذب نوری پایین‌تر از جذب نوری گروه کنترل است. کورشی[1] در سال ۱۹۸۸ با کشت E.coil D31M4 در محیط LB در فرمانتور ۲۸ لیتری و روش استخراج PCP، مقدار ۱/۷gr، crude R-LPS به دست آورد. او محصول خود را با روش MC خالص نمود و مقدار ۱/۳۸gr، R-LPS خالص به دست آورد [۸]. در پژوهش حاضر با روش PCP، از یک لیتر محیط کشت .N.B و حدود ۵gr باکتری مخلوط از فرم S و R، حدود ۸۰μg/ml، LPS خالص به دست آمد.

٤- بحث

لیپوپلی‌ساکارید میکروبها یک میتوژن مؤثر برای تحریک لنفوسیتهای B است. ارزیابی سیستم ایمنی سلولی (CMI) به روشهای گوناگون امکان‌پذیر است [١٤]. پرولیفراسیون لنفوسیتی با استفاده از لکتینها یکی از روشهای آسان و متداول برای ارزیابی سیستم ایمنی سلولی است. در سال ۱۹٦۰ نوول[2] به وسیله لکتین استخراج شده از لوبیای جک[3]، که فیتوهماآگلوتینین (PHA) نام گرفت، در کشت سلولی لنفوسیتهای نرمال انسانی را به لنفوسیتهای پرولیفریت[4] تبدیل کرد [۱۵]. از آن پس، تست ترانسفورماسیون لنفوسیتی (LTT) یک ابزار با ارزش در ارزیابی سیستم ایمنی سلولی محسوب شد. از LPS به عنوان اندوتاکسین و ترکیب مهمی از دیواره باکتریهای گرم منفی و میتوژنی برای ترانسفورماسیون لنفوسیتهای B به منظور ارزیابی سیستم ایمنی استفاده می شود. همچنین LPS با تحریک ماکروفاژها، در ترشح سیتوکاینهایی از قبیل فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)، اینترلوکین ۱ (IL-۱) و اینترلوکین ٦ (IL-٦) موثر است [۱۷،۱٦].

جدول ۲ جذب نوری حاصل از مقادیر مختلف انواع LPS در طول موج ٦۲۰nm

LPS استخراج شده به روشهای مختلف	جذب نوری (OD) در ٦۲۰nm	
	۱۰μl	۲۰Ml
الف	۱/۰۳	۱/۲۲
ب	۱/۲٦	۱/۵۰
ج	۱/٦۲	۲/۱۲
د	۱/۷٤	۱/۷۰

الف MC-LPS (لایه زیرین) ب MC-LPS (supernant I) ج PCP-LPS و د standard-LPS

در این تحقیق ما با استفاده از دو روش فنل- کلروفرم-اترپترولیوم (PCP) و متانول- کلروفرم (MC)، اندوتوکسین LPS را از دیواره میکروبی E.Coil برای ارزیابی پرولیفراسیون لنفوسیتی استخراج نمودیم [۱۹،۱۸]. تا کنون روشهای متفاوتی برای استخراج LPS به کار گرفته شده است [۲۱،۲۰].

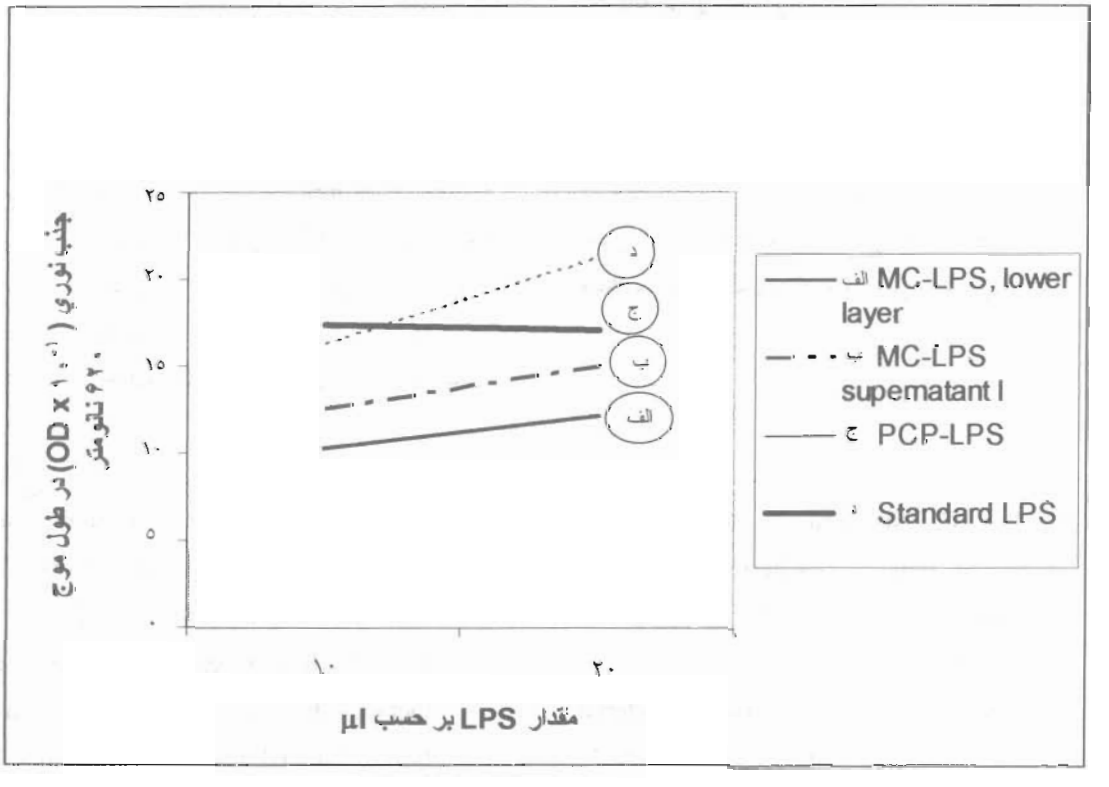
1. Qureshi

2. Nowell
3. Jack beans
4. Proliferate Lynphocytes

یاک و همکاران در سال ۲۰۰۰ با به کار گیری کیتهای استخراج RNA توانستند LPS را از دیواره میکروبهای گرم منفی

جدول ۳ جذب نوری حاصل از رقت و غلظتهای انواع LPS در طول موج ٦٢٠nm
PCP-LPS(Phenol-Chloroform-Petroleum ether) , Standard-LPS (Sigma)

رقت LPS	Neat	۱/۲	۱/٤	۱/۸
OD در PCP-LPS ٦٢٠nm	-	۰/٦۰٤	۰/۵۰۰	۰/٤۳٦
غلظت LPS	۸۰µg/ml	٤۰µg/ml	۲۰µg/ml	۱۰µg/ml
OD در ٦٢٠nm Standard-LPS	۰/٤۸۲	۰/٦۱۸	۰/٤۸۲	۰/٤۳۲



MC-LPS: Methanol Chloroform extraction for LPS

PCP-LPS: Phenol cholofoform-petroleum ether extraction for LPS

Standard LPS from Sigma co.

نمودار ۱ مقایسه میزان تکثیر سلولی حاصل از مقادیر مختلف LPS در طول موج ٦٢٠ نانومتر

استخراج کنند [۲۲]. آنها با استفاده از تیوسایانیت گوانیدین[1] که در کیت استخراج RNA به کار می‌رود، دیوار میکروبها را تخریب نمودند؛ با این روش، کاربرد روشهای تخریبی مکانیکی یا استفاده از حرارت دادن میکروبها لازم نبود. LPS استخراج شده با استفاده از فنل موجود در کیت استخراج RNA در مقایسه با روشهای متداول مانند فنل- آب و متانول- کلروفرم، از نظر خصوصیات فیزیکی- شیمیایی (ارزیابی Lipid A و انجام SDS-PAGE) بهتر و موثرتر بوده است. اما در مورد ترانسفورماسیون لنفوسیتی تحقیق انجام نشده است. گیل سرانو[2] در سال ۱۹۹۹ با استفاده از روش فنل-آب (۱:۱V/V) LPS را از رسوب میکروبی HH۱۰۳sinorhizobium fredii استخراج کرد. پس از آنالیز LPS استخراج شده، با استفاده از روش SDS-PAGE سه فراکسیون به دست آمد؛ در ارزیابی پرولیفراسیون لنفوسیتی، بیشترین ترانسفورماسیون مربوط به فراکسیون سوم با وزن مولکولی ۲٦KD بود [۲۳]. کن ایچی[3] در سال ۲۰۰۱ پس از استخراج LPS از باکتریFlavobacterium meninigiosepticum به روش فنل- کلروفرم- اتربترولیوم (PCP) با نسبت ۲:۵:۸ (V/V/V)، میتوژنیسیتی آن را با LPS استخراج شده از میکروب Salminella eneterica بر روی سلولهای طحال موش- با به کار گیری روش [3H]Thymidine- مقایسه کرد؛ نتایج تحقیق او نشان داد که اولا میزان میتوژنیسیتی LPS استخراج شده میکروب Flavobacterium ۱۰ برابر کمتر از میکروب Salmonella بود و ثانیا میتوژنیسیتی وابسته به مقدار LPS بود (وابسته به دوز بود)[4] [۲٤]. میزان LPS به کار گرفته شده µg/ml ۳۳/۳- ۳/۷ بود.

با توجه به تحقیقات انجام شده و نتایج به دست آمده از این تحقیق، می توان به قابلیت میتوژنیسیتی LPS استخراج شده در این تحقیق پی برد و از آن به عنوان یک فعال کننده لنفوسیتی[5] استفاده کرد. این روش می‌تواند در مقیاس نیمه صنعتی یا صنعتی استفاده شود.

۵-تقدیر و تشکر

این پروژه با پشتیبانی مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. از همکاران محترم مرکز تحقیقات ایمونولوژی، بخش ایمونوبیوشیمی- پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، سرکار خانم دکتر مریم هاشمی، و همچنین بخش ژنتیک، آقای مهران غلامین که در اجرای این پروژه همکاری داشتند، کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

٦-منابع

[1] Fredeic C, Neidhard T. Cellular and molecular biology; Escherichia coil and salmonella. Washington D.C: ASM Press; 1995, 1035-1058.

[2] Abigail AS, Dixle DW. Bacterial pathogenesis; A molecular approach. Washington D.C: ASM Press; 1994, 937-949.

[3] Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia London New York: W.B. Saunders company; 2000, 204-205.

[4] Towner KJ, Cockayne A. Molecular methods for microbial identification and typing. First ed; London: Chapman & Hall; 1993, 131- 150.

[5] Mecrino S, Alvarez D, Cllart MA, Baeuerle P. Effect of growth temprature on complement-mediated killing of mesophilic aeromonans spp. FEMS Microbiol Lett 1994;118: 163-6.;

1. Guanidinium thiocyanate
2. Gil-Seruano
3. Ken-Ichi

4. dose dependent
5. Mitogen- induced lymphocyte raectivity

[6] Galanos C, Luderitz O, Westphal O, Fenselau C.A nee method for the extracting of R lypopolysaccharids. European J Biochem 1969; 9: 245- 249.

[7] Qureshi N, Takayama K, Heller D, Fenselau C. Complete structural determination of lypopolysaccharids obtained from deep rough mutant of Escherchia coil. J Biol Chem 1988; 263(24): 11971-11976.

[8] Qureshi N, Takayama K, Todd R, Sievert CL, Manthey SN. Novel method for the purification and characterization of lipopolisaccharide from Escherishia coil D31m3. Bacterial endotoxine: Lipopolysaccharide from gene to therapy. First ed, New York: Wiley-Liss Inc.; 1995, 151-160.

[9] Mossman T. Rapid colorimetric assey for growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Meth 1983; 65: 55- 63.

[10] Rapaport L, Robinson C. Cell titer 96 and cell titer 96 AQ, non radioactive cell prolifration assay. Promega Notes 1993; 46-47.

[11] Rubmann E, Sieber K, Geng Y. Cell prolifration kits 1 (MTT) and (XTT). Boehringer Mannhein Maga 1993; 4: 12-13.

[12] Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol meth 1986; 84: 271-277.

[13] Darveau F, Hanco RE. Procedure for isolating of bacterial lipopolysaccharids from both smooth and rough *Pseudomonas aeroginosa and Salmonella thyphimurium* strains. J Bacteriol 1983; 155: 831- 838.

[14] Delahooke DM, Barklay GR, Poxton IR. A re-Appraisal of the biological activity of bacteroides LPS. J Med Microbiol 1995; 42: 102- 112.

[15] Eidhin DN, Mouton C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from bacteroides Porphyromans and Prevotella. FEMS Microbiol Lett 1993; 110: 133- 138.

[16] Marolda C, Shakhov AN, Jongeneel CV. Mini lysate procedure for LPS using proteinase K. J Bacteriol 1990; 172: 3590-3596.

[17] Nurminen m, Vara M. Methanol extracts LPS from deep rough bacteria. Biochem Biophys Res Commun 1996; 219: 441-444.

[18] Severinson E, Larsson EL. Lynphocyte response to polyclonal B and T cell activators. J Immunol Meth 1986; 59: 237- 245.

[19] Takaymama k, Din Z, Mukerjee P. Physical state of biologically active lipopolysaccharide bacterial endotoxine. First ed, Wiley- Liss, Inc.; 1995, 183-193.

[20] westphal OL, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide: Extraction with

phenol- water and further application of procedure. Meth Carbohydrate Chem 1965; 5: 83- 91.

[21] Ken- Ichi T, Hitomi K, Yuji H, Satoki A. Biological properties of lipid a isolated from Flavobacterium meningosepticum. Clin Diag Lab Immonul 2001; 8: 522-527.

[22] Yi EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram- negative bacteria. Analyst 2000; 125: 651- 656.

[23] Gil- Serrani AM, Rodriguez- Carvajal MA, Tejero- Mateo P, Espartero JL, Corzo J. Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9- tetradexoxy-7-(3-hydroxybutyramido)- L- glycerol-l manno- nonulosonic acid containing homopolysaccharide isolated from sinorhibizobium fredii hh103. Biochem J 1999; 342: 527- 535.

[24] Nowell PC. Phytohemagglutinin= An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res 1960; 290:462-466.