فصلنامه علمی ـ پژوهشی

دورهٔ ۵، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۳۱– ۱۴۰

الگوی الکتروفورزی پروتئین کل، پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی-ساکاریدی باکتری *Yersinia rukeri* جدا شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchys mykiss*) از چند مزرعه کشور

مهدی سلطانی [۱*]، شلاله موسوی [۲]، شفیق شفیعی [۲]، محمد طاهری [۳]

۱- استاد،گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

۲- دانشجوی دکترا، بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

۳- کارشناس، آزمایشگاه مرکزی تحقیقات رستگار، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

دریافت: ۹۴/۰۳/۰۴ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵

*نویسنده مسئول مقاله: msoltani@ut.ac.ir

چکیده:

ویژگی‌های مولکولی باکتری *Yersinia ruckeri* شامل پروتئین سلول کامل، پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی‌ساکاریدی تعداد ۳۴ ایزوله باکتری از مزارع قزل‌آلای استان‌های تهران، مازندران و زنجان با روش SDS-PAGEانجام شد. الگوی باندها برای پروتئین کل، پروتئین غشای خارجی و لیپوپلی‌ساکارید تمامی جدایه‌ها مشابه بود، به‌طوری که وزن مولکولی پروتئین کل برای تمام جدایه‌ها اغلب کمتر از ۱۰۰ کیلو دالتون و تراکم باندها در دامنه وزنی ۱۰۰– ۲۸ کیلو دالتون بود. بعلاوه، الگوی پروتئین‌های اصلی غشای خارجی تمام جدایه‌ها شامل دو باند با فاصله ۳۵–۲۸ کیلو دالتون و یک باند با فاصله ۱۷–۱۰ کیلودالتون بود ونیز باندهای فرعی با ۷۵–۴۸ و ۲۸–۱۷ کیلو دالتون بود. همچنین الگوی لیپوپلی‌ساکاریدی برای همه جدایه ها از وزن مولکولی کمتر از ۱۳۰ کیلو دالتون با بیشترین تراکم باندی در دامنه ۱۰۰–۲۸ کیلو دالتون قرار داشت. بر اساس این مطالعه، جدایه‌های ایرانی از کمترین تنوع هتروژنیسیتی برخوردارند که زمینه را برای ساخت واکسن تک ظرفیتی مورد نیاز فراهم می‌آورد.

کلید واژگان: *Yersinai ruckeri* ، قزل‌آلای رنگین‌کمان ، الگوی پروتئینی، غشای خارجی، لیپوپلی‌ساکارید

مقدمه

یرسینیا راکری عامل بیماری یرسینیوزیس است که یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی با زیان‌های اقتصادی بالا به‌ویژه در صنعت پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در مناطق مختلف دنیا از جمله ایران محسوب می‌شود (Soltani et al, 1999; 2014; Tobbak et al., 2009). این باکتری، میله‌ای، فاقد هاگ، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و متحرک می‌باشد که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند، ولی

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

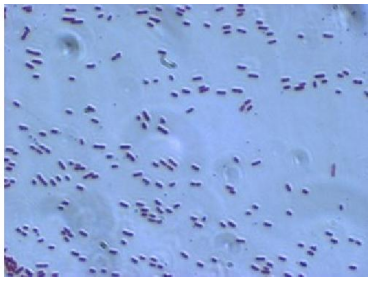
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

قدرت تحرک خود را از دست می‌دهد. تاکنون پنج سروتیپ و دو بیوتیپ از این میکروارگانیسم گزارش شده است (Bestor et al., 2010). بیوتیپ یک، متحرک و لیپاز مثبت است، درحالی‌که بیوتیپ دو، فاقد این دو ویژگی می‌باشد (Bastardo et al., 2011a; Sousa et al., 2001; 2007؛2006؛Ström-Bestor et al., 2010; Fouz et a Arias et al). مطالعهٔ سلطانی و همکاران بر روی ایزوله‌های ایرانی نشان داد که تمامی آنها متعلق به بیوتیپ یک است (Soltani et al., 2014).

دربارهٔ ارزیابی الگوی پروتئینی مربوط به پروتئین‌های مختلف باکتری از جمله پروتئین‌های سلول کامل، غشای خارجی و لیپوپلی‌ساکاریدی، که دو مورد آخر از عوامل اصلی حدت و بیماری‌زای باکتری محسوب می‌شوند (Davies, 1991b; Tobback et al., 2009)، مطالعات اندکی در دنیا انجام شده است. این مسئله مشابه بودن الگوی پروتئینی برای ایزوله‌های آمریکایی و اروپایی را نشان می‌دهد (Sousa et al., 2001; Bestor; et al., 2010; Bastardo et al., 2011a). تاکنون در ایران نیز هیچ مطالعه‌ای در این زمینه انجام نشده است. از آن‌جایی‌که ارزیابی تعیین الگوی پروتئینی جدایه‌های مختلف به‌دست آمده از ماهیان مرضی، راهی برای تعیین تنوع هتروژنیتی جدایه‌های ایرانی است و از طرف دیگر از آنجا که پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی‌ساکارید باکتری از عوامل عمدهٔ حدت باکتری محسوب می‌شوند، بنابراین، انجام این نوع مطالعات می‌تواند زمینه‌ساز ساخت واکسن‌هایی با کارایی بالا و فراگیر علیه این بیماری باشد. از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی الگوی پروتئینی تعداد ۳٤ جدایهٔ این باکتری به‌دست آمده از مزارع ماهیان قزل‌آلای مرضی در تعدادی از استان‌های کشور انجام شد.

مواد و روش کار

در این تحقیق الگوی الکتروفورزی پروتئین کل، پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی‌ساکاریدی تعداد ۳٤ جدایهٔ *یرسینیا راکری* به‌دست آمده از مزارع قزل‌آلای مبتلا در استان‌های تهران، مازندران و زنجان مطالعه شد. پیش از این، این جدایه‌ها طی مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و پس از تعیین توالی با کدهای Ir-MS1 تا Ir-MS33 در بانک جهانی ژن ثبت شده‌اند (Soltani et al., 2014). شکل ۱ فنوتیپ باکتری را نشان می‌دهد.



شکل ۱ فنوتیپ باکتری یرسینیا راکری در رنگ‌آمیزی گرم (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰).

۱. جداسازی پروتئین کل سلولی

برای استخراج و جداسازی پروتئین کل سلولی از cterial (iNtRON, SMART™ Protein Extraction Solution kit (Korea بر مبنای توصیهٔ شرکت سازنده استفاده گردید. پروتئین‌های کل باکتری استخراج شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

۲. جداسازی پروتئین غشای خارجی

جداسازی پروتئین غشای خارجی براساس روش توصیه شده از سوی Daveis (1991a) انجام شد. مراحل انجام به اختصار به شرح زیر بود.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

سلول‌های کشت داده شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت، به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور g × ۵۰۰۰، سانتریفیوژ شدند. شست‌وشو در ۲۰ میلی‌لیتر بافر تریس هیدروکلراید ۲۰ mM (pH ۷/۲) انجام شد. سپس در ۷ میلی‌لیتر بافر تریس هیدروکلراید حاوی ۱۰ mM EDTA قرار گرفتند. پس از قرار دادن هر نمونه در یخ، سونیکاسیون به مدت ٦۰ × ٤ ثانیه (وات ۱۵۰ MSE) انجام شد. پس از سانتریفیوژ در دور g× ۵۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد. این کار مجدد تکرار گردید. به محصول، میزان ۷ میلی‌لیتر سارکوزیل (Sodium N-lauroyl sarcosinate) (Sigma, USA) افزوده شد و برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت (به‌منظور حل شدن غشای سیتوپلاسمی). سانتریفیوژ با دور g× ۵۰۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. سپس به رسوب باقیمانده میزان µl ۲۰۰ بافر نمونه اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه حرارت داده شد.

۳. استخراج لیپوپلی‌ساکارید

جداسازی لیپوپلی ساکارید براساس روش توصیه شده از سوی Apicella (۲۰۰۸) به شرح زیر انجام شد:

سلول‌های کشت داده شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت، به‌مدت ۵ دقیقه با دور g ×۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب به تیوب جدید انتقال داده شد. مجدد ٤ میلی‌لیتر آب مقطر به تیوب اضافه و رسوب باقیمانده، به تیوب جدید انتقال داده شد. در مرحلهٔ بعد، ۱۵ میلی‌لیتر بافر تریس- کلرید سدیم ۱۰ mM، به تیوب حاوی باکتری افزوده و در بن‌ماری ٦۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به ترکیبات فوق ۱ میلی‌لیتر پروتئیناز K (Bioflux, Japan) اضافه و در بن‌ماری ٦۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. سپس به‌مدت یک شب در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۲ میلی‌لیتر استات سدیم M ۳ و ٤۰ میلی‌لیتر اتانول سرد به ترکیبات فوق افزوده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری شد. سپس سانتریفیوژ با دور g ×٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس از دور ریختن مایع رویی، به ترکیب حاصل ۹ میلی‌لیتر تریس- کلرید سدیم ۱۰ mM، ۰/۵ میلی‌لیتر (Cinna DNase Gen, Iran)، ۰/۵ میلی‌لیتر (Cinna Gen, Iran) RNase)، اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ترکیب در حمام آب ٦۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و برابر حجم فنل ٦۵ درجه سانتی‌گراد، ۹۰درصد اضافه شد. سپس، سوسپانسیون به‌دست آمده، به‌وسیلهٔ یخ تا دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور g ×٦۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در این مرحله، در لوله آزمایش ۳ فاز تشکیل شد که شامل فاز آبی، فنلی و رسوب بود که فاز آبی جمع‌آوری شد. به فاز فنلی و رسوب، بار دیگر آب ٦۸ درجه افزوده شد و مراحل بالا (مرحله ۱۲-۱۰) دوباره تکرار شد. فاز آبی جدا شده از مرحلهٔ قبلی به همراه فاز آبی جدا شده از مرحلهٔ دوم، به کیسهٔ دیالیزی که ذرات کوچک‌تر از ۱٤۰۰۰ کیلودالتون را عبور می‌داد، انتقال داده شد. فاز آبی، به‌مدت ٤ روز در داخل آب دیونیزه دیالیز گردید که هر روز آب دیونیزه تعویض شد. در این مرحله فنل و سایر ترکیبات با وزن مولکولی پایین حذف شده و لیپوپلی‌ساکارید در کیسهٔ دیالیز باقی ماند. محتویات کیسهٔ دیالیز به‌مدت ٤ ساعت در دور g ×۱۰۰۰۰۰ سانتریفیوژ (٤ درجه سانتی‌گراد) شد. پس از دور ریختن محلول رویی، رسوب که حاوی درصد بالایی لیپوپلی‌ساکارید بود، به‌دست آمد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

الکتروفورز پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE

به منظور الکتروفورز پروتئین‌ها به‌وسیلهٔ SDS-PAGE از روش توصیه شده از سوی Laemmli (1970) و با استفاده از ژل‌های ۱۱ درصد (ژل بالا) و ٤ درصد (ژل پایین) ، محلول استوک اکریل آمید ۳۰ درصد و SDS ۱۰ درصد انجام شد.

برای انجام SDS-PAGE ابتدا بافر الکترود به تانک الکتروفورز منتقل شد و سپس به‌ترتیب ژل‌های پایین و بالا به داخل محفظهٔ شیشه‌ای دستگاه الکتروفورز تزریق شدند. پیش از اضافه کردن ژل‌های بالا و پایین به هر یک از آنها میزان ۵۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۵ میکرولیتر TEMED اضافه شد. پس از انعقاد ژل، شانهٔ داخل آن را برداشته و میزان µl ۱۵ از هر یک از نمونه‌های پروتئینی حاوی ۱۵ میکرولیتر بافر نمونه و ۷ میکرولیتر مارکر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. عمل الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت و جریان ۱۵ میلی آمپر به مدت حدود ۳ ساعت انجام شد (Laemmli ,1970).

برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌های سلول کامل و غشای خارجی از روش توصیه شده از سوی Laemmli (1970) استفاده شد. در این روش، ابتدا ژل به‌مدت یک ساعت در محلول تثبیت (اسید استیک ۱۰ درصد به میزان ۲۰ میلی‌لیتر، متانول ٤۰ درصد به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر و آب مقطر ۸۰ میلی‌لیتر) قرار داده شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه به ظرف حاوی محلول رنگ (بریلینت کوماسی آبی (Sigma, USA) به میزان ۲/۵ گرم، اسید استیک ۱۰ درصد به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر، متانول ٤۰ درصد به میزان ٤۰۰ میلی‌لیتر و آب مقطر تا حجم کل ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) و بر روی شیکر منتقل گردید. در مرحله بعد، ژل برای دو تا سه نوبت با آب شست‌وشو داده شد. سپس ژل به‌مدت ۲-۱ ساعت به محلول رنگ‌زدا (اسید استیک ۱۰ درصد به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر، متانول ٤۰ درصد به میزان ٤۰۰ میلی‌لیتر و آب مقطر تا حجم کل ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) تا زمان ظهور باندهای پروتئینی منتقل گردید.

برای رنگ‌آمیزی لیپوپلی‌ساکاریدها از روش رنگ‌آمیزی نقره توصیه شده از سوی Tsai و Frasch (1982) به شرح مراحل زیر استفاده شد:

ژل در محلول تثبیت حاوی اتانول ٤۰ درصد و اسیداستیک ۵ درصد (۲۰۰ میلی‌لیتر)، به‌مدت یک شبانه روز قرار داده شد. سپس در محلول اکسیداسیون حاوی پریودیک اسید ۰/۷ درصد، اتانول ٤۰ درصد و اسیداستیک ۵ درصد در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. برای از بین بردن بافر اکسیداسیون، ژل ۳ مرتبه، هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه، به‌وسیلهٔ آب مقطر شست‌وشو شد. در مرحلهٔ بعد، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول رنگ تازه (۲ میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیوم، ۲۸ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم M ۰/۱ ۵ میلی‌لیتر نیترات نقره ۲۰ درصد و ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) رنگ‌آمیزی شد. ژل مجدد در ۳ نوبت و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه توسط آب مقطر شست‌وشو شد. سپس، به‌مدت ۵ دقیقه در محلول توسعه‌دهنده حاوی ۵۰ میلی‌گرم اسیدسیتریک و ۰/۵ میلی‌لیتر فرم آلدهید ۳۷ درصد و با حجم نهایی ۲۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر قرار گرفت. در انتها ژل با آب مقطر شست‌وشو شد.

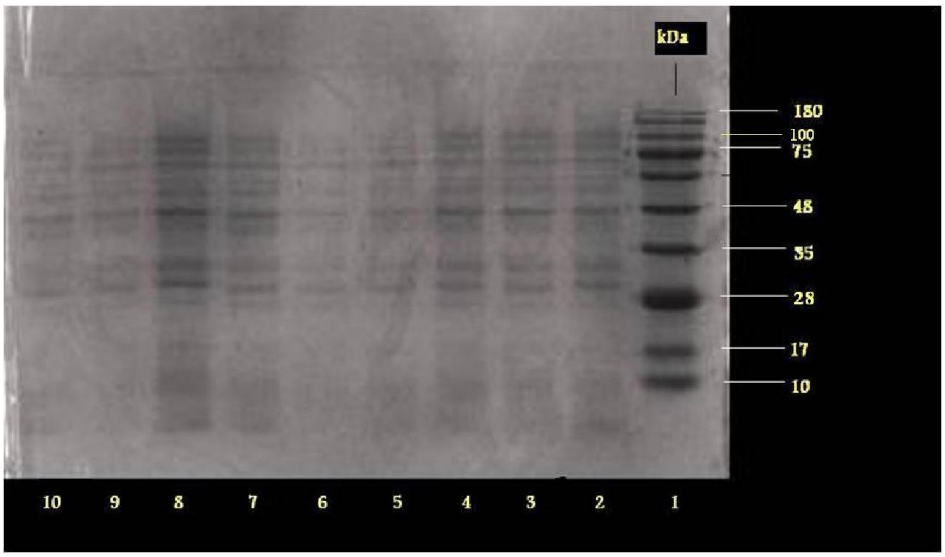
نتایج

۱. الگوی الکتروفورزی پروتئین کل

نتایج الگوی پروتئین‌های کل پیکره ایزوله‌های باکتری در تمام سویه‌های مورد مطالعه یکسان بود (شکل ۱). به‌طوری‌که پروتئین‌های کل باکتری تمام جدایه‌ها اغلب وزنی کمتر از ۱۰۰ کیلو دالتون داشتند و تراکم باندها در دامنه وزنی ۱۰۰- ۲۸ کیلو دالتون و فاصله بین باندی در این دامنه وزنی کمتر بود (شکل ۲).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

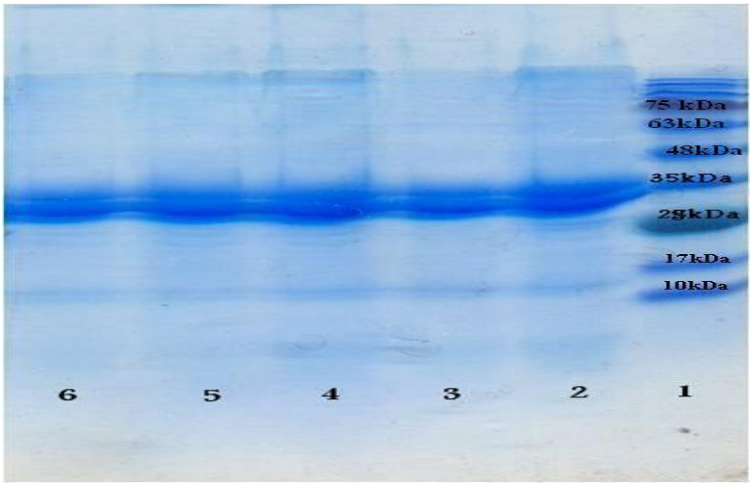
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]



شکل ۲ الگوی الکتروفورزی پروتئین کل سلولی جدایه‌های *یرسینیا راکری*. ستون ۱ مارکر، ستون ۱۰-۲ نمونه‌هایی از جدایه‌های مورد آزمایش از استان‌های تهران، مازندران و زنجان.

۲. **الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی**

نتایج حاصل از مطالعهٔ الگوی پروتئین‌های اصلی غشای خارجی تمام جدایه‌های مورد آزمایش به‌صورت ۲ باند با وزن مولکولی بین ۳۵-۲۸ کیلو دالتون و یک باند پروتئینی نیز با وزن مولکولی بین ۱۷-۱۰ کیلو دالتون بود (شکل ۳). به‌علاوه باندهای فرعی با وزن مولکولی ۷۵-۴۸ کیلو دالتون و ۲۸-۱۷ کیلو دالتون قابل رؤیت بود (شکل ۲) که یکسان بودن سروتیپ سویه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد.



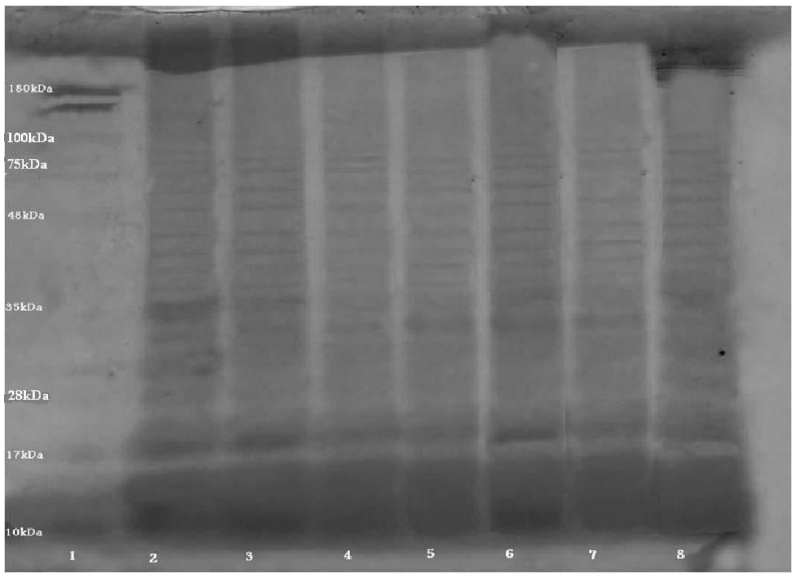
شکل ۳ الگوی پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌های *یرسینیا راکری*. ستون ۱ مارکر، ستون ٦-۲ برخی جدایه‌های مورد آزمایش از استان‌های تهران، مازندران و زنجان.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

۳. الگوی الکتروفورزی لیپوپلی‌ساکاریدی

نتایج الکتروفورز لیپوپلی‌ساکاریدهای استخراج شده از جدایه‌های *یرسینیا راکری* نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه دارای الگوی مشابهی بودند (شکل ٤). به‌طوری‌که تمامی باندها از وزن مولکولی کمتر از ۱۳۰ کیلو دالتون برخوردار بودند و بیشترین تراکم باندی در دامنه ۱۰۰–۲۸ کیلو دالتون قرار داشت. فاصلهٔ بین باندی در وزن بین ۳۵– ۱۷ کیلو دالتون بیشتر از فاصلهٔ بین باندی در وزن‌های بالاتر بود (شکل ۳).



شکل ٤ الگوی الکتروفورزی لیپو پلی‌ساکاریدی جدایه‌های *یرسینیا راکری*. ستون ۱ مارکر، ستون ۸–۲ برخی جدایه‌های مورد آزمایش از استان‌های تهران، مازندران و زنجان

بحث

بیماری باکتریایی یرسینیوزیس، یک بیماری جدی با ضررهای اقتصادی قابل توجه در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلا محسوب می‌شود. شناسایی بیماری و باکتری عامل آن، در کشورهای اروپایی و آمریکایی سال‌ها بررسی شده است (Stevenson and Daly., 1982; Austin et al., 2003; Arias et al., 2007; Bastardo et al., 2011). ارائهٔ راهکارهای کنترلی و پیشگیری از بروز بیماری‌های عفونی، مستلزم مطالعات تشخیص و اپیدمیولوژیک می‌باشد. از آنجایی‌که در سال‌های اخیر شمار مزارع با علایم بالینی مشابه یرسینیوزیس رو به افزایش است Sharifi and (Soltani et al., 1999; 2014 ،Akhlaghi., 2008)، بنابراین، این مطالعه به‌منظور ارزیابی برخی ویژگی‌های مولکولی شامل پروتئین کل، پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی-ساکاریدی یرسینیا راکری که از عوامل حدت و بیماری‌زایی محسوب می‌شوند، انجام شده است و نتایج به‌دست آمده نشان داد که همه جدایه‌ها از الگوی الکتروفورزی مشابهی برخوردارند.

طی مطالعه Sausa و همکاران (۲۰۰۱) بر روی پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی ساکاریدی جدایه-های *یرسینیا راکری* در مزارع ماهیان پرتغال دو الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکاریدی متفاوت نشان داده شد،

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

به‌طوری‌که الگوی اول در ۱۳ جدایه مشاهده و مشابه الگوی الکتروفورزی سویهٔ مرجع ۱۱/٤ (سروتیپ O_1) بود. الگوی دوم نیز شامل ۱۰ جدایه و مشابه الگوی الکتروفورزی سویهٔ مرجع ۱۱/٤۷ (سروتیپ O_3) بود. تفاوت عمدهٔ این دو الگوی در تعداد باندها و فاصلهٔ بین باندی بود. همچنین الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌ها نشان داد که تمام جدایه‌های مربوط به سروتیپ‌های O_1 از الگوی مشابهی برخوردارند. به‌علاوه به جز یک مورد، سایر جدایه‌های مربوط به سروتیپ O_3 نیز دارای الگوی پروتئین‌های غشای خارجی مشابهی بودند. در مطالعه حاضر وزن مولکولی پروتئین‌های اصلی غشای خارجی در دامنه ۲٤ تا ٤۵ کیلودالتون بود. از این‌رو بین الگوی الکتروفورزی جدایه‌های اسپانیایی مربوط به سروتیپ O_1 و جدایه‌های ایرانی تشابهی وجود نداشت.

Ström-Bestor و همکاران در سال ۲۰۱۰، برای نخستین بار بیوتیپ ۲ *یرسینیا راکری* را در فارم‌های فنلاند شناسایی کردند. در این بررسی ٤٤ جدایهٔ مشکوک به *یرسینیا راکری* از سال ۲۰۰۷- ۱۹۸٦ مورد مطالعات بیوشیمیایی، سرولوژیک و پروتئین‌های غشای خارجی قرار گرفتند. براساس این مطالعه نوع بیوتیپ جدایه‌ها، نقشی در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌ها ندارد و مسئلهٔ مهم در تعیین الگوی الکتروفورزی، سروتیپ جدایه‌ها و نه بیوتیپ آنها است. بنابراین برای تعیین بیوتیپ بررسی الگوی الکتروفورزی روش مناسبی نیست.

Bastardo و همکاران در سال ۲۰۱۱a، در شیلی به بررسی سرولوژیکی و مولکولی ۱۱ جدایه از *یرسینیا راکری* در مزارع ماهی آزاد اطلس پرداختند و تعداد ۳ الگوی الکتروفورزی متفاوت در لیپوپلی‌ساکاریدهای این جدایه‌ها مشاهده کردند که مربوط به سروتیپ O_{1a} (۱ جدایه)، سروتیپ O_{1b} (۹ جدایه) و سروتیپ O_{2b} (۱ جدایه) بودند. همچنین پروتئین‌های غشای خارجی این جدایه‌ها نیز از ۳ الگوی متفاوت با وزن مولکولی ۵۵-۳٤ کیلودالتون برخودار بودند. در مطالعه حاضر، وزن مولکولی تقریبی ۲ باند اصلی پروتئین‌های غشای خارجی در دامنه ۲۸ تا ۳۵ کیلو دالتون بود. علت تفاوت در وزن مولکولی باندهای اصلی پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌های شیلی با جدایه‌های ایران نیازمند مطالعات بعدی از جمله مطالعات سروتایپینگ این جدایه‌ها می‌باشد.

Bastardo و همکاران در سال ۲۰۱۱b، با مطالعه الگوی لیپوپلی‌ساکاریدی و پروتئین‌های غشای خارجی تعداد ۳۰ جدایه *یرسینیا راکری* در ٤ مزرعه قزل‌آلای رنگین‌کمان در پرو متوجه شدند که همگی جدایه‌ها از الگوی مشابهی برخوردارند و مشابه یک جدایه *یرسینیا راکری* متعلق به سروتیپ O_{1a} هستند. بنابراین براساس مطالعاتی که در کشورهای مختلف انجام شده است، در اغلب موارد جدایه‌های مربوط به یک سروتیپ واجد الگوی الکتروفورزی مشابهی بوده‌اند و از آنجا که الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی-ساکاریدی جدایه‌های ایرانی مطالعه شده در این تحقیق مشابه بوده است، بنابراین احتمال آن می‌رود که جدایه‌های ایرانی فاقد تنوع سروتیپی باشند.

براساس مطالعاتی که انجام شده است، به‌نظر می‌رسد علت تنوع بیوتیپی و سروتیپی و متعاقب آن، تنوع الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی-ساکارید و بیوتیپ جدایه‌های مربوط به کشورهای اروپایی ناشی از انتقال ماهی بین این کشورها است (**Ström-Bestor, 2010**). از طرفی در مطالعاتی که برای بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای خارجی باکتری *یرسینیا راکری* انجام شده است، پروتئین با وزن مولکولی تقریبی ۳۸ کیلودالتون وجود داشته که تعیین وزن دقیق

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

براساس آزمایش وسترن بلات بوده است (Davies, 1991a). همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، به‌نظر می‌رسد در نمونه‌های ایرانی نیز پروتئین با این وزن وجود دارد که البته برای اطمینان بیشتر نیاز به آزمایش وسترن بلات است.

از آنجا که لیپوپلی‌ساکارید و پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌های بررسی شده دارای الگوی مشابهی بودند و هر دوی اینها از عوامل حدت باکتری محسوب می‌شوند، بنابراین در صورت لزوم نتایج این مطالعه می‌تواند راهگشای ساخت واکسن‌های نوترکیب (با استفاده از این عوامل حدت مشترک بین جدایه‌های ایرانی) در آینده باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد از آنجا که تنوع سروتیپی در بین جدایه‌های به‌دست آمده از مزارع ۳ استان کشور وجود ندارد، ساخت واکسن تجاری برای کنترل بیماری مؤثر خواهد بود. اما از آنجایی که به‌طور مستقیم تعیین سروتیپ برای جدایه‌ها صورت نگرفته و بیماری در سایر استان‌های کشور نیز رو به گسترش است، بنابراین بررسی مستقیم سروتیپ جدایه‌های ایرانی و انجام مطالعات در زمینهٔ بررسی بیماری در سایر استان‌های کشور برای کنترل بهتر بیماری مؤثر خواهد بود.

منابع

Apicella, M.A. 2008. Isolation and characterization of lipopolysaccharides. *Methods in Molecular Biology*, 431: 3-13.

Arias, C.R., Olivares, F., Hayden, K., Shoemaker, C.A., Grizzle, J.M. and Klesius, P.H. 2007. First report of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the USA. *Aquatic Animal Health*, 19(1): 35-40.

Austin, D.A., Robertson, P.A.W. and Austin, B. 2003. Recovery of a new Biogroup of *yersinia ruckeri* from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *System and Applied Microbiology*, 26: 127-131.

Bastardo, A., Bohle H., Ravelo, C., Toranzo, A.E. and Romalde, J.L. 2011a. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* in chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, 93(3):207-214.

Bastardo, A., Sierralta, V., Leon, J., Ravelo, C. and Romalde, J.L. 2011b. Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture*, 317: 229-232.

Davies, R.L. 1990. O-Serotyping of *Yersinia ruckeri* with special Emphasis on European Isolates. *Veterinary Microbiology*, 22:299-307.

Davies, RL. 1991a. Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology*, 26 (1-2): 125-140.

Davies, R.L. 1991b. Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology*, 29:289-297.

Fouz, B., Zarza, C. and Amaro, C. 2006. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Fish diseases*, 29(6):339-46.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.

Ström-Bestor, M., Mustamäki, N., Heinikainen, S., Hirvelä-Koski, V.,Verner-Jeffrey, D. and Wiklund, T. 2010. Introduction of *Yersinia ruckeri* biotype 2 into Finnish fish farms. *Aquaculture*, 308: 1-5.

Sharifi, Y., and Akhlaghi, M.H. 2008. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University*, 9(4): 347-352.

Soltani, M., Fadaii fard, B. and Mehrabi, N.R. 1999. First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 9:173-177.

Soltani, M., Mousavi, Sh., Ebrahimzadeh, M. H., Mirzargar, S.S., Taheri, M.A., Shafiei, Sh., Shohreh, P. and Mohamadian, S. 2014. Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the causative

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Chiers, K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonids fish. *Fish Diseases*, 30: 257-268.

Tsai, C.M. and Frasch, C.E. 1982. A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 119: 115 - 119.

Wang, X. and J.Quinn, P. 2010. Subcellular Biochemistry. 53th ed. Springer's, London, p 405.

agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 10(1): 59-67.

Sousa, A., Magarinos, B., Eiras, J.C., Toranzo, A.E. and Romalde, J.L. 2001. Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *Fish Diseases*, 24:151-159.

Stevenson, R.M.W. and Daly, J.G. 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 39:870-876.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 1, Spring 2016

Electrophoresis pattern of total protein, outer membrane protein and lipopolysaccharide of *Yersinia ruckeri* isolates in some farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran

Mehdi Soltani[1*], Shalaleh Mousavi[2], Shafigh Shafiei[2], Mohammad Taheri[3]

1- Professor, Department of Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

2- PhD Student of Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

3-Rastegar Central Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

Received: 25.05.2015 Accepted: 14.02.2016

*Corresponding author: msoltani@ut.ac.ir

Abstract:

The molecular characteristics of *Yersinia ruckeri* such as total proteins (TP), outer membrane proteins OMP) and lipopolysaccharides (LPS) in 34 isolates from rainbow trout farms in Tehran, Mazandaran and Zanjan provinces were determined, using SDS-PAGE method. The molecular weight (MW) for TP of all bacterial isolates was mostly less than 100 KD with a banding density in range 28 to 100 KD. Also, protein pattern of OMP consisted of three major bands with MW of 28-35 KD (two bands) and 10-17 KD (one band) plus some minor bands with MW of 48-75 KD and 17-28 KD. In addition, the LPS pattern of all bacterial isolates were less than 130 KD with the most band density in range 28-100 KD. These results show that the banding profile of TP, OMP and LPS of all isolates of *Y. ruckeri* were identical, demonstrating minimum heterogeneity among Iranian isolates of *Y. ruckeri*. Therefore, it is feasible for the formulation of a monovalent vaccine to yersiniosis in future.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, Rainbow trout, Protein profile, Outer membrane, Lipopolysaccharide

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-27]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.1.5.0]