

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

مهدی سلطانی^۱، شلاله موسوی^۲، شفیق شفیعی^۲، محمد طاهری^۳

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

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

۳- کارشناس، آزمایشگاه مرکزی تحقیقات رستگار، دانشکده 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-PAGE انجام شد. الگوی باندها برای پروتئین کل، پروتئین غشای خارجی و لیپوپلی‌ساکارید تمامی جدایه‌ها مشابه بود، به طوری 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 ۲۸-۳۵ کیلو دالتون و یک باند با فاصله ۱۷-۱۰ کیلو دالتون بود و نیز باندهای فرعی با ۷۵-۴۸ و ۲۸-۱۷ کیلو دالتون بود. همچنین الگوی لیپوپلی‌ساکاریدی برای همه جدایه‌ها 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 هتروژنیسیته برخوردارند که زمینه را برای ساخت واکسن تک ظرفیتی مورد نیاز فراهم می‌آورد.

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

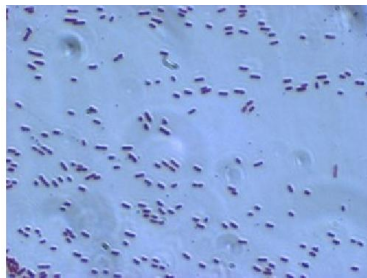
مقدمه

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

یرسینیا راکری عامل بیماری یرسینیوزیس است که یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی با زیان‌های اقتصادی بالا به‌ویژه در صنعت پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در مناطق

مواد و روش کار

در این تحقیق الگوی الکتروفورزی پروتئین کل، پروتئین-های غشای خارجی و لیپوپلی ساکاریدی تعداد ۳۴ جدایه یرسینیا راکری به دست 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 bacterial (iNtRON, SMART™ Protein Extraction Solution kit Korea) بر مبنای توصیه 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.

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; Fouz et al., 2007; Ström-Bestor et al., 2010). مطالعه سلطانی و همکاران بر روی ایزوله‌های ایرانی نشان داد که تمامی آنها متعلق به بیوتیپ یک است (Soltani et al., 2014).

درباره ارزیابی الگوی پروتئینی مربوط به پروتئین-های مختلف باکتری از جمله پروتئین‌های سلول کامل، غشای خارجی و لیپوپلی ساکاریدی، 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. آن‌جایی‌که ارزیابی تعیین الگوی پروتئینی جدایه‌های مختلف به دست آمده از ماهیان مرضی، راهی برای تعیین تنوع هتروژنیتهی جدایه‌های ایرانی است و از طرف دیگر از آنجا که پروتئین‌های غشای خارجی و لیپوپلی ساکارید باکتری از عوامل عمده حدت باکتری محسوب می‌شوند، بنابراین، انجام این نوع مطالعات می‌تواند زمینه‌ساز ساخت واکسن‌هایی با کارایی بالا و فراگیر علیه این بیماری باشد. از این رو، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی الگوی پروتئینی تعداد ۳۴ جدایه این باکتری به دست آمده از مزارع ماهیان قزل‌آلای مرضی در تعدادی از استان‌های کشور انجام شد.

سلول‌های کشت داده شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت، به مدت ۳۰ دقیقه با دور $g \times 5000$ ، سانتریفیوژ شدند. شست‌وشو در ۲۰ میلی‌لیتر بافر تریس هیدروکلراید 20 mM (pH ۷/۲) انجام شد. سپس در ۷ میلی‌لیتر بافر تریس هیدروکلراید حاوی 10 mM EDTA قرار گرفتند. پس از قرار دادن هر نمونه در یخ، سونیکاسیون به مدت 60×4 ثانیه (وات ۱۵۰ MSE) انجام شد. پس از سانتریفیوژ در دور $g \times 5000$ در دمای ۴ 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 (به منظور حل شدن غشای سیتوپلاسمی). سانتریفیوژ با دور $g \times 5000$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. سپس به رسوب باقیمانده میزان $200 \mu\text{l}$ بافر نمونه اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه حرارت داده شد.

۳. استخراج لیپوپلی ساکارید

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، به مدت ۵ دقیقه با دور $g \times 5000$ سانتریفیوژ شدند. رسوب به تیوب جدید انتقال داده شد. مجدد ۴ میلی‌لیتر آب مقطر به تیوب اضافه و رسوب باقیمانده، به تیوب جدید انتقال داده شد. در مرحله بعد، ۱۵ میلی‌لیتر بافر تریس- کلرید سدیم 10 mM ، به تیوب حاوی باکتری افزوده و در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به ترکیبات فوق ۱ میلی‌لیتر پروتئیناز K (Bioflux, Japan) اضافه و در بن‌ماری ۶۵ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. سپس به مدت یک شب در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۲ میلی‌لیتر استات سدیم 3 M و ۴۰ میلی‌لیتر اتانول سرد به ترکیبات فوق افزوده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری شد. سپس سانتریفیوژ با دور $g \times 4000$ به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس از دور ریختن مایع رویی، به ترکیب حاصل ۹ میلی‌لیتر تریس- کلرید سدیم 10 mM ، ۰/۵ میلی‌لیتر (Cinna DNase Gen, Iran)، ۰/۵ میلی‌لیتر (Cinna RNase Gen, Iran) اضافه شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ترکیب در حمام آب ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و برابر حجم فنل ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ درصد اضافه شد. سپس، سوسپانسیون به دست آمده، به وسیله یخ تا دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دور $g \times 6000$ 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 ۶۸ درجه افزوده شد و مراحل بالا (مرحله ۱۲-۱۰) دوباره تکرار شد. فاز آبی جدا شده از مرحله قبلی به همراه فاز آبی جدا شده از مرحله دوم، به کیسه دیالیزی که ذرات کوچک‌تر از 14000 کیلودالتون را عبور می‌داد، انتقال داده شد. فاز آبی، به مدت ۴ 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 لیپوپلی ساکارید در کیسه دیالیز باقی ماند. محتویات کیسه دیالیز به مدت ۴ ساعت در دور $g \times 100000$ سانتریفیوژ (۴ درجه سانتی‌گراد) شد. پس از دور ریختن محلول رویی، رسوب که حاوی درصد بالایی لیپوپلی ساکارید بود، به دست آمد.

الکتروفورز پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE

به منظور الکتروفورز پروتئین‌ها به وسیله SDS-PAGE از روش توصیه شده از سوی Laemmli (1970) و با استفاده از ژل‌های ۱۱ درصد (ژل بالا) و ۴ درصد (ژل پایین)، محلول استوک اکریل آمید ۳۰ درصد و SDS ۱۰ درصد انجام شد. برای انجام SDS-PAGE ابتدا بافر الکتروود به تانک الکتروفورز منتقل شد و سپس به ترتیب ژل‌های پایین و بالا به داخل محفظه 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، شانه داخل آن را برداشته و میزان ۱۵ µl 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 به مدت یک ساعت در محلول تثبیت (اسید استیک ۱۰ درصد به میزان ۲۰ میلی لیتر، متانول ۴۰ درصد به میزان ۱۰۰ میلی لیتر و آب مقطر ۸۰ میلی لیتر) 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 میلی لیتر، متانول ۴۰ درصد به میزان ۴۰۰ میلی لیتر و آب مقطر تا حجم کل ۱۰۰۰ میلی لیتر) و بر روی شیکر منتقل گردید. در مرحله بعد، ژل برای دو تا سه نوبت با آب شست‌وشو داده شد. سپس ژل به مدت ۲-۱ ساعت به محلول رنگ‌زدا (اسید استیک ۱۰ درصد به میزان ۱۰۰ میلی لیتر، متانول ۴۰ درصد به میزان ۴۰۰ میلی لیتر و

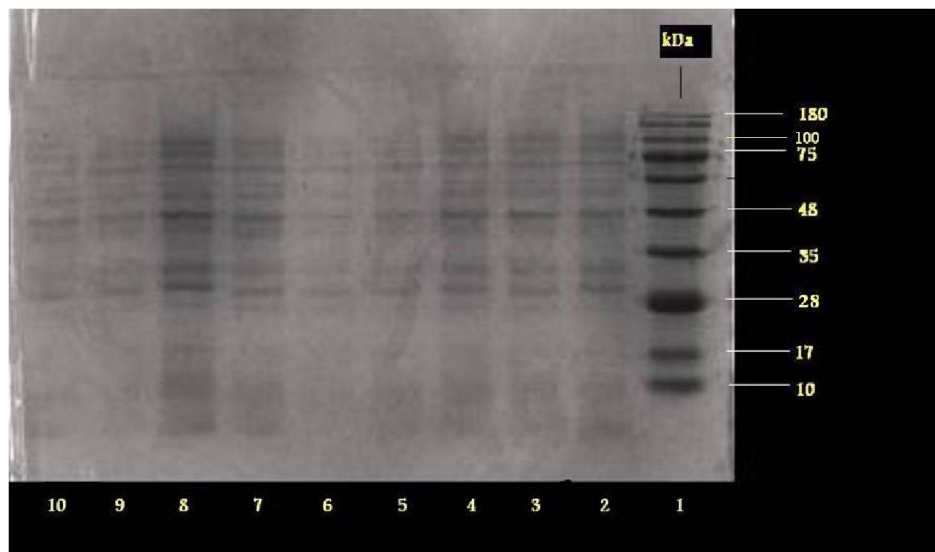
آب مقطر تا حجم کل ۱۰۰۰ میلی لیتر) تا زمان ظهور باندهای پروتئینی منتقل گردید.

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

ژل در محلول تثبیت حاوی اتانول ۴۰ درصد و اسیداستیک ۵ درصد (۲۰۰ میلی لیتر)، به مدت یک شبانه روز قرار داده شد. سپس در محلول اکسیداسیون حاوی پریودیک اسید ۰/۷ درصد، اتانول ۴۰ 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 به مدت ۱۵ دقیقه، به وسیله آب مقطر شست‌وشو شد. در مرحله بعد، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول رنگ تازه (۲ میلی لیتر هیدروکسید آمونیوم، ۲۸ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۵۰/۱ M، ۵۰ میلی لیتر نیترات نقره ۲۰ درصد و ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر) رنگ‌آمیزی شد. ژل مجدد در ۳ نوبت و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه توسط آب مقطر شست‌وشو شد. سپس، به مدت ۵ دقیقه در محلول توسعه‌دهنده حاوی ۵۰ میلی گرم اسیدسیتریک و ۰/۵ میلی لیتر فرم آلدهید ۳۷ درصد و با حجم نهایی ۲۰۰ میلی لیتر 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). به طوری که 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 باندها در این دامنه وزنی کمتر بود (شکل ۲).



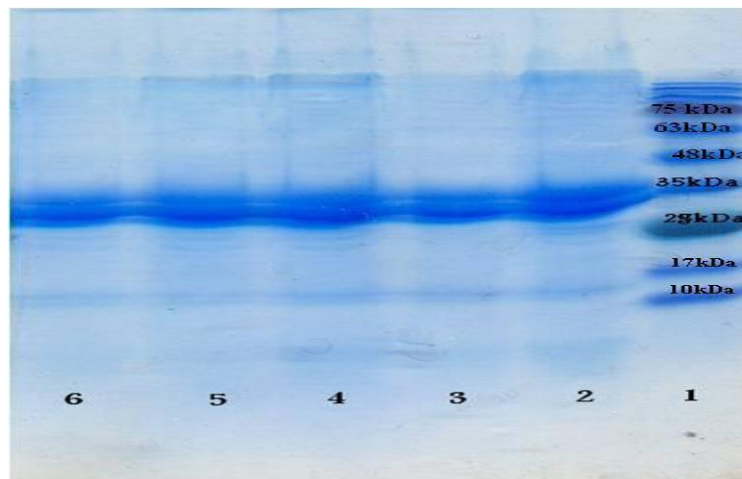
شکل ۲ الگوی الکتروفورزی پروتئین کل سلولی جدایه‌های *یرسینیا راکری*. ستون ۱ مارکر، ستون ۱۰-۲ نمونه‌هایی از جدایه‌های مورد آزمایش از استان‌های تهران، مازندران و زنجان.

۲. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشای

خارجی

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.

نتایج حاصل از مطالعه الگوی پروتئین‌های اصلی غشای خارجی تمام جدایه‌های مورد آزمایش به‌صورت ۲ باند با وزن مولکولی بین ۲۸-۳۵ کیلو دالتون و یک باند

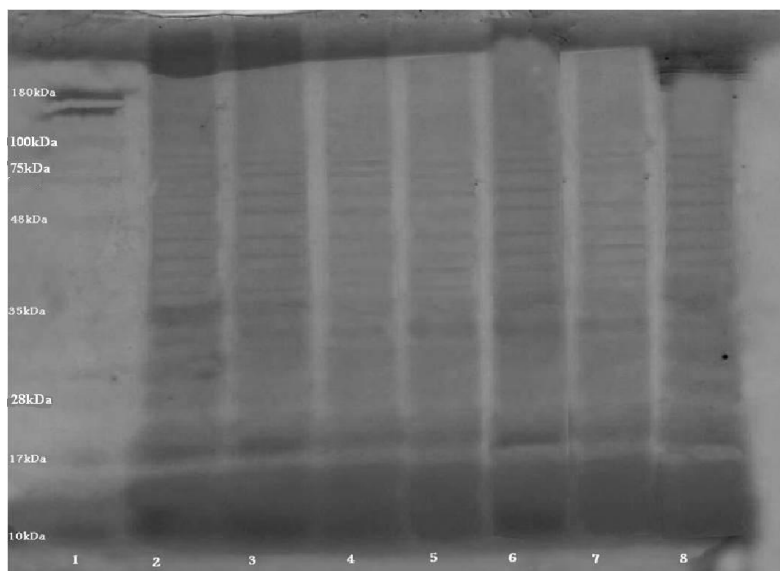


شکل ۳ الگوی پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌های *یرسینیا راکری*. ستون ۱ مارکر، ستون ۶-۲ برخی جدایه‌های مورد آزمایش از استان‌های تهران، مازندران و زنجان.

۳. الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکاریدی

کیلو دالتون برخوردار بودند و بیشترین تراکم بانندی در دامنه ۱۰۰-۲۸ کیلو دالتون قرار داشت. فاصله بین بانندی در وزن بین ۳۵-۱۷ کیلو دالتون بیشتر از فاصله بین بانندی در وزنهای بالاتر بود (شکل ۳).

نتایج الکتروفورز لیپوپلی ساکاریدهای استخراج شده از جدایه‌های یرسینیا راکری نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه دارای الگوی مشابهی بودند (شکل ۴). به طوری که تمامی باندها از وزن مولکولی کمتر از ۱۳۰



شکل ۴ الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکاریدی جدایه‌های یرسینیا راکری. ستون ۱ مارکر، ستون ۲-۸ برخی جدایه‌های مورد آزمایش از استان‌های تهران، مازندران و زنجان

(Soltani et al., 1999; 2014, Akhlaghi., 2008)، بنابراین، این مطالعه به منظور 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 به دست 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،

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). ارائه راهکارهای کتتری و پیشگیری از بروز بیماری‌های عفونی، مستلزم مطالعات تشخیص و اپیدمیولوژیک می‌باشد. از آنجایی که در سال‌های اخیر شمار مزارع با علایم بالینی مشابه یرسینیوزیس رو به افزایش است (Sharifi and

به طوری که الگوی اول در ۱۳ جدایه مشاهده و مشابه الگوی الکتروفورزی سویه مرجع ۱۱/۴ (سروتیپ O_1) بود. الگوی دوم نیز شامل ۱۰ جدایه و مشابه الگوی الکتروفورزی سویه مرجع ۱۱/۴۷ (سروتیپ O_3) بود. تفاوت عمده این دو الگوی در تعداد باندها و فاصله بین باندها بود. همچنین الگوی الکتروفورزی پروتئین های غشای خارجی جدایه ها نشان داد که تمام جدایه های مربوط به سروتیپ های O_1 از الگوی مشابهی برخوردارند. به علاوه به جز یک مورد، سایر جدایه های مربوط به سروتیپ O_3 نیز دارای الگوی پروتئین های غشای خارجی مشابهی بودند. در مطالعه حاضر وزن مولکولی پروتئین های اصلی غشای خارجی در دامنه ۲۴ تا ۴۵ کیلو دالتون بود. از این رو بین الگوی الکتروفورزی جدایه های اسپانیایی مربوط به سروتیپ O_1 و جدایه های ایرانی تشابهی وجود نداشت.

Ström-Bestor و همکاران در سال ۲۰۱۰، برای نخستین بار بیوتیپ ۲ یرسینیا راکری را در فارم های فنلاند شناسایی کردند. در این بررسی ۴۴ جدایه مشکوک به یرسینیا راکری از سال ۲۰۰۷-۱۹۸۶ مورد مطالعات بیوشیمیایی، سرولوژیک و پروتئین های غشای خارجی قرار گرفتند. براساس این مطالعه نوع بیوتیپ جدایه ها، نقشی در الگوی الکتروفورزی پروتئین های غشای خارجی جدایه ها ندارد و مسئله مهم در تعیین الگوی الکتروفورزی، سروتیپ جدایه ها 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 لیپولی ساکاریدهای این جدایه ها مشاهده کردند که مربوط به سروتیپ O_{1a} (۱) جدایه، سروتیپ O_{1b} (۹ جدایه) و سروتیپ O_{2b} (۱)

جدایه) بودند. همچنین پروتئین های غشای خارجی این جدایه ها نیز از ۳ الگوی متفاوت با وزن مولکولی ۳۴-۵۵ کیلو دالتون برخوردار بودند. در مطالعه حاضر، وزن مولکولی تقریبی ۲ باند اصلی پروتئین های غشای خارجی در دامنه ۲۸ تا ۳۵ کیلو دالتون بود. علت تفاوت در وزن مولکولی باندهای اصلی پروتئین های غشای خارجی جدایه های شیلی با جدایه های ایران نیازمند مطالعات بعدی از جمله مطالعات سروتایپینگ این جدایه ها می باشد.

Bastardo و همکاران در سال ۲۰۱۱b، با مطالعه الگوی لیپولی ساکاریدی و پروتئین های غشای خارجی تعداد ۳۰ جدایه یرسینیا راکری در ۴ مزرعه قزل آرای رنگین کمان در پرو متوجه شدند که همگی جدایه ها 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 جدایه های مربوط به یک سروتیپ واجد الگوی الکتروفورزی مشابهی بوده اند و از آنجا که الگوی الکتروفورزی پروتئین های غشای خارجی و لیپولی- ساکاریدی جدایه های ایرانی مطالعه شده در این تحقیق مشابه بوده است، بنابراین احتمال آن می رود که جدایه های ایرانی فاقد تنوع سروتیپی باشند.

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

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, R.L. 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., Fadaei 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

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 لیپولی‌ساکارید و پروتئین‌های غشای خارجی جدایه‌های بررسی شده دارای الگوی مشابهی بودند و هر دوی اینها از عوامل حداث باکتری محسوب می‌شوند، بنابراین در صورت لزوم نتایج این مطالعه می‌تواند راهگشای ساخت واکسن‌های نو ترکیب (با استفاده از این عوامل حداث 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 زمینه 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.

Toback, 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.



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 Mousavi², Shafiqh Shafiei², Mohammad Taheri³

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 Zanzan 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