Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
سال دهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۱، ص ٦٩

خالص سازی استرپتولیزین O ازاسترپتوکوک β همولیتیک گروه A (سویه Richard)

دکتر شهره خاتمی [۱] ،دکتر محمد مهدی اصلانی [۲] ، دکتر فاطمه پورفلاح [۳]

چکیده

استرپتولیزین O (SLO) پروتئینی است سیتولیتیک و ایمونولوژیک که به صورت خارج سلولی در محیط کشت همراه با سایر سموم(استرپتولیزین S و توکسین اریتروژنیک) ، ایزوآنزیمها و میتوژنها در حین رشد از اغلب سویه های استرپتوکوکی گروه A و اکثر سوشهای گروههای C و G تولید می شود. استرپتولیزین O دارای وزن مولکولی در حدود ٦٠ الی ٧٠ کیلو دالتون بوده که به اکسیژن حساس و در اثر اکسیداسیون غیرفعال می گردد .SLO آنتی ژنیک است و درخون مبتلایان به بیماری استرپتوکوکی تولید آنتی-استرپتولیزین می کند که در تشخیص سابقه‌ی ابتلای به بیماری در تست ASO مورد استفاده قرار می گیرد. هدف از این مطالعه، نیل به خودکفایی با استفاده از روشی ساده جهت تولید آنتی ژن استرپتولیزین O به منظور تهیه کیت ASO بود. بدین منظور سوش استاندارد ریچارد تهیه شده از انستیتو پاستور پاریس(کد ۷۸- A)در محیط ترکیبی ویل اینفیوژن براث IIکشت داده شد. بعد از انکوباسیون شبانه سانتریفوژ و با استفاده از سولفات آمونیوم رسوب داده شد. رسوب حل شده در آب مقطر بعداز دیالیز از ستونDEAE-Cellulose عبور داده شد و فراکسیون های مختلف ازنظر فعالیت همولیتیک ارزیابی گردیدند. از بین فراکسیونهایی که در آنها فعالیت همولیتیکی مشاهده شده بالاترین فعالیت همولیتیکیU/ml ۵۳۰۰۰ بود .در این فراکسیون درSDS PAGE با رنگ آمیزی نقره سه باند را بین ٦٩ الی ٧٢ کیلو دالتون نشان دادند . در این بررسی آنتی ژن به دست آمده در مقایسه با آنتی ژن SLO تجاری موجود در ایران (Scalvo) از خلوص مطلوبی برخوردار بود و از جانب آزمایشگاه رفرانس نیز مورد تأئید قرار گرفته است.

واژه های کلیدی: استر پتوکوک β همولیتیک گروه A، استرپتولیزین O، DEAE-Cellulose ،کیت ASO

مقدمه

استرپتولیزین O (SLO) پروتئینی است سیتولیتیک و ایمونولوژیک که بوسیلهٔ استرپتوکوک های گروهA و اکثر سویه های گروه های C و G بخصوص انواع بیماریزا برای انسان تولید می شود[۱]. SLO خاصیت آنتی -ژنیک داشته و در خون مبتلایان به بیماری استرپتوکوکی ، آنتی استرپتولیزین O بوجود می آید که در تشخیص سابقه‌ی ابتلای به این بیماری مورد استفاده قرار می گیرد. SLO باعث لیز گلبولهای قرمزخون موجودات مختلف می شود و برای گلبولهای سفید، پلاکتها و سلولهای میوکارد قلب سمی می باشد[۲،۳]. این توکسین به عنوان یکی از عوامل درگیر در بیماری های تب رماتیسمی و رماتیسم قلبی مطرح بوده و همچنین از نظر تشخیص از اهمیت بسزایی

۱ـ استادیار گروه بیوشیمی
۲ـ استادیار گروه میکروب شناسی
۳ـ مربی گروه بیوشیمی
۱و۲و۳ ـ انستیتو پاستور ایران ـ تهران

www.SID.ir

Archive of SID

برخوردار است. افزایش تیتر آنتی بادی علیه SLO یکی از معیارهای آزمایشگاهی برای تعیین سابقه‌ی عفونت استرپتوکوکی می باشد[٥،٤] .Todd حضورآنتی‌استرپتولیزین O (ASO)را در سرمهای افراد مبتلا به عفونتهای استرپتوکوکی از طریق خنثی شدن استرپتولیزین با تیترهای مختلف سریال سرمهای بیماران اثبات نمود[٨،٧،٦] .Aloufدر سال ۱۹۸۰ وزن مولکولی استرپتولیزین O را در حدود ٦٠ الی ۷۰ کیلو دالتون توصیف نمود[٩] .تست آنتی استرپتولیزین O (ASO) روش آزمایشگاهی قابل اعتمادی برای تعیین تیتر آنتی بادی ضد استرپتوکوکی در سرم خون بیماران است و به دلیل اینکه به آسانی قابل انجام و همچنین بصورت تجارتی در دسترس می باشد متداول گردیده است[١٠] . SLOمهمترین جزء کیت تست ASOمی باشد که بصورت آنتی ژن در کیت سرولوژی فوق مورد استفاده قرار می گیرد و سالانه بیش از ٥ میلیون تست در سراسر کشور انجام می پذیرد. این تحقیق روشی ساده جهت خالص‌سازی استرپتو لیزین O در سطح آزمایشگاهی با استفاده از DEAE-Cellulose در یک مرحله معرفی می گردد .

روش بررسی

الف : تهیه استرپتولیزین O:

۱- سویه استاندارد

سویه استاندارد ریچارد(Streptococcus Pyrogenes ، سویه‌ای A- ۷۸روزنباخ ۱۸۸٤، ۷۰/۳ کایو ۱۹۷۰).

سویه‌ی استفاده شده در این تحقیق از انستیتو پاستور پاریس تهیه شده است . سویه‌ی فوق را از حالت لیوفیلیزه خارج نموده و در محیط های مناسب به مقدار زیاد تکثیر و مجدداً سویه ها را به روش دیسک ، لیوفیلیزه نموده و برای هر بار کشت از یک سویه‌ی لیوفیلیزه استفاده گردید[١٣،١٢] .

۲-محیط کشت ترکیبی ویل اینفیوژن براث

(Fresh Veal Infusion broth II) II

انتخاب محیط بعد از مقایسهٔ ۱۱ محیط کشت مختلف که جهت تولید SLO طراحی شده بود انجام گرفت[١٤] . این محیط شامل ۲۵ گرم در لیتر محیط ترکیبی ویل اینفیوژن براثI (دیفکو) همراه با ۲ گرم در لیتر باکتو -دکستروز(دیفکو) و ۱۰ گرم در لیتر پروتئوز پپتون(دیفکو) شماره ۳ به همراه ۰/٤ گرم دی سدیم فسفات در لیتر می باشد . بعد از استریلیزاسیون به ازای هر لیتر محیط ۲۰ میلی لیتر گلوکز (مرک) ۵۰ درصد و ۲۵ میلی لیتر کربنات سدیم (مرک) ۱۰ درصد استریل اضافه می گردد (PH = ۷/۸)[١٤،١٢] .

۳ - کشت سویه‌ی استاندارد :

سویه‌ی مورد نظر که در حالت لیوفیلیزه در یخچال نگهداری شده بود را به دمای آزمایشگاه رسانده و یک دیسک از آن را در ۲ میلی لیتر از محیط برین هارت اینفیوژن (دیفکو) یا آبگوشت ساده (دیفکو) تلقیح گردید . بعد از ۳ الی ٦ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و با مشاهده‌ی کدورت لازم در محیط کشت ، یک لوپ از آنرا درمحیط کشت آگار خون دار پاساژ داده واین محیط به مدت ٢٤ - ١٨ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید[١٥] .

٤-تهیه‌ی بذر و آداپتاسیون محیط کشت :

برای تهیه بذر ۱ الی ۲ کلنی از محیط مذکور در ۲میلی لیتر محیط ترکیبی ویل اینفیوژن براث I تلقیح گردید. بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و ایجاد کدورت لازم آن را به ۲۰ میلی لیتر ازهمان محیط کشت منتقل کرده و به مدت ۱۸ -۱۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید (مرحله آداپتاسیون میکروارگانیسم با محیط کشت) و به عنوان ماده‌ی تلقیحی برای تولید کشت نهایی از آن استفاده گردید[١٥] .

٥-انکوباسیون محیط کشت نهایی :

ماده تلقیحی به محیط کشت ترکیبی (۱۰۰۰ میلی لیتر)افزوده و در انکوباتور شیکردار با دور ۵۰rpm در درجه حرارت۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید[١٣] .

مواردی که می بایست در این مرحله مد نظرباشند، عبارت بودند از :

ـ بعد از مشاهده افت PH محیط کشت (کمتر از ٦/٨)گلوکز استریل (مرک) ۵۰ درصد به میزان یک در صد به محیط کشت نهایی اضافه گردد[١٦،١٢] . چنانچه PH محیط به پایین‌تر از حدود

www.SID.ir

Archive of SID

۷ رسیده باشد با افزودن سود نرمال آن را در حدود ۷/۲ ثابت نگه داشته واز افت بیشتر آن باید اجتناب نمود [۹،۱۲،۱۶،۱۷].

ـ در هر ساعت همراه با کنترل PH ، میزان فعالیت همولیتیک SLO تولید شده به طریقه تیتراسیون کنترل گردد وتا هنگام دستیابی به اوج تولید، انکوباسیون تولیدادامه یابد[۱۶].

٦-تثبیت توکسین :

بعداز اتمام مدت انکوباسیون ،محیط کشت نهایی بمدت یک شب در درجه حرارت ٤ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس آنرا باg ×۷۰۰۰ در٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ نموده وبه مایع رویی آن mM ۱ فنیل متیل –سولفونیل فلوراید (مرک) همراه با EDTA ۱۰mM (مرک) افزوده گردید [۱۶].

۷- تغلیظ :

۱-۷- رسوب گیری با استفاده از سولفات آمونیم:

۵۳ گرم سولفات آمونیم جامد (مرک) به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بدست آمده در ٤ درجه سانتی گراد به آن افزوده و سپس آنرا با g ×۱۷۰۰۰ بمدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژکرده ورسوب حاصل که حاوی استرپتولیزین O می‌باشد در۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید [۹،۱۶].

۲-۷- دیالیز :

نمونه حاصل از مرحله قبل را در کیسه‌ی دیالیزی (توماس) که قبلاً آماده شده ریخته و در برابر۵ لیترآب مقطر حاویmM ۵۰ Naclو EDTA ٤mM (PH =۷) به مدت یک شب در درجه حرارت ٤ درجه سانتیگراد دیالیز کردیم [۱۶].

۸ –خالص سازی:

ـ کروماتوگرافی تعویض یونی :

نمونه دیالیزشده را از ستون حاوی رزین دی اتیل آمینو اتیل سلولز(DEAE -Cellulose واتمن)(با طول ١٤ سانتیمتر وقطر٢/٦ سانتیمتر) عبور داده سپس ۱۱۰ میلی لیتر بافر تریس را با سرعت ۱ میلی لیتر از ستون گذرانده و از همان ابتدا شروع به جمع آوری فراکسیون‌هایی با حجم ۱۰میلی لیترنمودیم .میزان فعالیت همولیتیک در هر فراکسیون ومیزان پروتئین آن ها به روش Lowry اندازه گیری گردید[۱۶،۱۸].

ب-تعیین خلوص و میزان فعالیت همولیتیکی :

۱-فعالیت همولیتیک:

میزان فعالیت همولیتیکی استرپتولیزینO از طریق تیتراسیون در میکروپلیت محاسبه شد . ابتدا باید همولیزین اکسید شده را احیا و یا فعال نمود . برای انجام این عمل همولیزین را در مجاورت یک احیا کننده مانند محلول mM ۱۰ دی‌تیوتریتول (DTT، مرک)مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه نموده تا فعال گردد و سپس با استفاده از یک سوسپانسیون گلبول قرمز خرگوش ($۲/۸ \times ۱۰^{۸}$) تازه شسته شده با PBS، تیتراسیون را انجام می دهیم . در این آزمایشات نشان داده شده که دی تیوترتیول به تنهایی اثر لیز کنندگی بر روی گلبول های قرمز ندارد(شاهد منفی).

برای تعیین فعالیت همولیتیک استاندارد، ۰/۵ میلی لیتر از گلبول قرمز تازه خرگوش ($۲/۸ \times ۱۰^{۸}$) را با ١٤/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۰/۱ درصد لیز کرده و باید جذب نوری آن در طول موج ۰/ ۲۰،٥٤١nm خوانده شود . این محلول استاندارد بوده که می توان با رسم منحنی آن بر حسب جذب نوری و مقدار همولیز در هر میلی لیتر، می‌توان فعالیت همولیتیک توکسین را بر حسب واحد U /ml به دست آورد.یک واحد همولیتیک عبارت است از کمترین مقدار توکسین فعال شده که قادر است ۵ درصد از یک میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبول قرمزخرگوش را لیز کند [۱۲،۱۳،۱۶،۱۹،۲۰].

۲-تعیین وزن مولکولی و درجه‌ی خلوص :

به منظور تعیین وزن مولکولی و درجه خلوص محصول نهایی، الکتروفورز بر روی ژل سدیم پلی آکریلامید ۱۰در صد (SDS-PAGE مرک) انجام گرفت. وزن مولکولی مطابق منحنی استاندارد رسم شده بر اساس میزان تحرک نسبی (Relative Migration ,R_m) تعیین گردید[۱۸].

www.SID.ir

Archive of SID

ج-لیوفیلیزاسیون:

در نهایت پس از تعیین تیترفعالیت همولیتیک استرپتولیزین Oبه منظور حفظ پایداری این فعالیت، ابتدا آن را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد فریز نموده و سپس شیشه حاوی نمونه را بوسیله دستگاه Freeze-Drying به مدت ۲٤ ساعت خشک می نماییم.

نتایج

سویه‌ی مورد استفاده در این بررسی، سویه‌ی استاندارد تهیه شده از انستیتو پاستور فرانسه می باشد که برای تولید استرپتولیزین O مورد استفاده قرار گرفته است [۱۲،۱۳].

از آنجا که عموما" توکسین های خارج سلولی از جمله SLO در مقادیر ناچیزی تولید می شوند لذا کاربرد حجم های بالای محیط کشت جهت تخلیص SLO در سطح آزمایشگاهی ضروری به نظرمی‌رسد [۱۲] از این رو در این مطالعه درسطح آزمایشگاهی هر بار حدود ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت تهیه گردید .

در این بررسی از روش رسوب دادن به وسیله‌ی سولفات آمونیم به عنوان شیوه ای سریع و مؤثر برای تغلیظ پروتئین‌ها [۱٦،۲۱] استفاده شده [۱٦] که با کاربرد آن، نمونه‌ی مورد نظر ۱۸ برابر تغلیظ گردیده است (جدول ۱). میزان پروتئین کل درمایع روی کشت ، رسوب با سولفات آمونیم و نمونه‌ی دیالیز شده در جدول(۱) نشان داده شده است .

میزان فعالیت همولیتیک در محیط کشت ۲۷۰۰۰ U /ml بود که در مراحل تغلیظ و دیالیز میزان آن کاهش یافت . پس از عبور آن از ستونDEAE -Cellulose ۱٤ فراکسیون توسط دستگاه Fraction-Collectorجمع آوری گردید که تنها ٦ فراکسیون حاوی فعالیت همولیتیکی بیش از۵۰۰ واحد بود که یکی از آنها دارای فعالیت همولیتیک قابل توجه۵۳۰۰۰ U/ ml بود(نمودار۱). میزان پروتئین این فراکسیون به روش لوری تقریبا" ۲mg/ml بوده است . جهت تعیین درجه‌ی خلوص و وزن ملکولی نمونه‌ی مذکور بر روی ژل سدیم دودسیل سولفات پلی -اکریلامید الکتروفورز گردید. نتایج حاصل از SDS-Page در شکل (۱) مشاهده می گردد. وزن مولکولی استرپتولیزینO به این ترتیب بین ۳۰۰۰±۶۹۰۰۰ دالتون بدست آمد .

SLOa
SLOb

b a

شکل ۱ : تفکیک باندهای پروتئین در استرپتولیزینO خالص شده به روش SDS-PAGE (۱۰در صد)

a : یک نمونه از مخلوط پروتئین ها با اوزان مولکولی استاندارد

b :دو نمونه از باند های پروتئینی استرپتولیزینO خالص شده

SLOa: c SLOb: d

نمودار ۱: میزان فعالیت همولیتیک استرپتولیزین O در فراکسیونهای بدست آمده با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion Exchange DEAE)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ : مقایسهٔ میزان پروتئین کل ،فعالیت همولتیک ، فعالیت کل همولیتیک و فعالیت مخصوص همولیتیک در مراحل مختلف تخلیص استرپتولیزین O

فراکسیون	حجم (ml)	پروتئین کل (mg/ml)	فعالیت همولیتیک (HU/ml)	فعالیت کل (HU)	فعالیت مخصوص (HU/mg)
مایع روی محیط کشت	۹۰۰	۱۹/۵	۲۷×۱۰^{۳}	۲۵×۱۰^{۶}	۱۳×۱۰^{۵}
رسوب با سولفات آمونیم	۵۰	۱۹/۲	۲۰۵	۱۱×۱۰^{۳}	۵۸۰
نمونه‌ی بعد از دیالیز	۵۰	۱۹	۸۲۰	۴۱×۱۰^{۳}	۲۲۰۰
ستون تعویض یونی	۸	۲/۰۵	۵۳×۱۰^{۳}	۴۳×۱۰^{۴}	۲۲×۱۰^{۴}

بحث

در اولین مرحله به منظور دستیابی به توکسینی با فعالیت همولیتیک قابل توجه ، انتخاب نوع محیط کشت مناسب برای تلقیح میکرو ارگانیسم اهمیت می یابد [۱۷] . منظور از محیط کشت مناسب، محیطی است که علاوه بر فراهم ساختن شرایط رشد مناسب برای میکروارگانیسم ، حاوی محرک مناسبی برای تولید توکسین بوده و همچنین از نظر قدرت بافری بتوانددر مقابل تغییرات ناگهانیPH مقاومت نماید تا در نتیجه محصول (توکسین پروتئین)در اثر عمل پروتئاز فعال شده در محیط تخریب نگردد . در این بررسی برای کشت سویه استاندارد از محیط کشت ترکیبی ویل اینفیوژن براثII که حاصل تحقیقات اولیه این مرکز بود استفاده گردید [۱۴].

اولین مرحله برای خالص سازی توکسین ، تغلیظ می باشد که در این مورد روشهای فیزیکی و شیمیایی متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۲،۹]. از جمله روشهایی که برای تغلیظ SLOمورد استفاده قرار گرفته، رسوب دادن پروتئین از طریق معرفهای شیمیایی مانند سولفات آمونیم [۱۶،۲۲] و کلسیم فسفات [۱۲] بودکه با توجه به رفرانس ها و آزمایشات مقایسه ای اولیه، در این مطالعه از سولفات آمونیم استفاده گردید.

میزان فعالیت همولیتیک مایع روی محیط کشت بعد از افزودن سولفات آمونیم کاهش قابل توجهی را نشان می دهد در حالیکه در میزان پروتئین آن تغییر چندانی به چشم نمی خورد . کاهش در میزان فعالیت همولیتیک می تواند نتیجه دخالت یونهای سولفات و آمونیوم و همچنین تأثیر پلیمریزاسیون پروتئین های توکسین باشد (جدول ۱). این نتایج مشابه نتایجی است که Linder [۲۳] گزارش نموده است . از نظر میزان پروتئین کل، نمونه دیالیز شده با نمونه دیالیز نشده تفاوت چندانی را نشان نمی‌دهد ولی میزان فعالیت همولیتیک آن در واقع نسبت به مرحله قبل از دیالیز تقریباً ٤ برابر افزایش یافته که نشان دهنده‌ی اهمیت انجام فرایند دیالیز می باشد [۱۶،۱۲]. Linder [۲۳] مقدار پروتئین بدست آمده ازنمونه‌ی دیالیز شده را ٤٠ میلی گرم در هر میلی لیتر گزارش نمود که در مقایسه با این مطالعه رقم قابل ملاحظه ای را نشان می دهد .

بعد از عبور نمونه‌ی دیالیز شده از ستون DEAE- Cellulose با توجه به اینکه از میزان پروتئین کل نمونه کاسته شده ولی میزان فعالیت همولیتیک آن به نحو قابل توجهی افزایش حاصل کرده است(جدول ۱) . این ستون تعویض کننده‌ی آنیونی بوده و برای تخلیص SLO توسط چندین محقق مورد استفاده قرار گرفته است [۱۶].

حجم محصول نهایی نسبت به مایع روی محیط کشت تقریباً ۱۱۲ برابر غلیظ تر شده و فعالیت همولیتیک آن تقریباً ٦٥ برابر افزایش داشته است (جدول ۱). میزان فعالیت همولیتیک محصول نهایی از این نظر حائز اهمیت می باشد که سایر محققان در طی هر یک از مراحل تخلیص بتدریج فعالیت توکسین را از دست دادند و همواره این میزان کمتر از میزان اولیه‌ی آن در

www.SID.ir

Archive of SID

محیط تولیدی بوده است [۲۳،۱۶]. Linder [۲۳] برای تخلیص استرپتولیزین O از سولفات آمونیم ۸۰ درصد و کروماتوگرافی (Heterologous Immunoaffinity) استفاده نمود ومیزان فعالیت محصول نهایی خود را ۱۳٤۸۸U/ml گزارش نمود که نسبت به نمونه موجود در مایع روی محیط کشت تقریباً ۱۰ برابر کاهش یافته بود. وی همچنین وزن مولکولی SLO حاصل از طریق SDS-Page را ۵٦۰۰۰ دالتون گزارش نمود[۲۳].

Bhakadi[۱٦] به منظور جدا سازی SLO موجود از محیط کشت BHI، به آن سولفات آمونیم ۵۳ درصد افزوده و پس از کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion Exchange) میزان فعالیت محصول نهایی خود را ۲۰۰ U/ml اعلام نموده که روش اندازه‌گیری فعالیت همولیتیک باروش بررسی نگارنده و مطالعه Linder[۲۳] متفاوت بوده است. او همچنین وزن مولکولی SLO a (توکسین طبیعی) را ۳۰۰۰±٦۹۰۰۰ دالتون گزارش کرد. Alouf[۱۲] بعد از تلقیح سویه استاندارد ریچارد در محیط کشت، میزان فعالیت همولیتیک SLO تولید شده در محیط کشت را در حدود ٦۰۰U/ml-٤۰۰ بدست آورده و بعد از طی مراحل تخلیص فعالیت ویژه محصول نهایی خود را ٦×۱۰^{۵} U/mg گزارش نمود. در این بررسی، با توجه به اینکه با همان سویه در محیطی مشابه این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته بود فعالیت ویژه معادل با ۲۲×۱۰^{٤} u/mg بوده است. از سه باند پروتئینی که به روش SDS-Page تفکیک گردیده بود دو باند آن می تواند نمایانگر SLOa و SLOb باشد. وزن مولکولی استرپتولیزین O خالص به این ترتیب بین ۳۰۰۰±٦۹۰۰۰ دالتون می باشد و این مقدار با مقدار گزارش شده توسط Bhakadi[۱٦] مطابقت دارد که یک باند اضافی آن نتیجهٔ ناخالصی است که در کیت مورد نظر قابل اهمیت نمی باشد.

محصول نهایی بدست آمده از این بررسی با آنتی ژن SLO تجاری (کارخانه Salvo) از نظر میزان پروتئین، فعالیت همولیتیک و درجه خلوص (از نظر تعداد باند در ژل) در جدول (۲) مقایسه شده است. روش مورد استفاده در این بررسی برای تخلیص SLO کوتاه ترین، سریعترین و از نظر اقتصادی با صرفه ترین تکنیک در مقایسه با مطالعات انجام شده در این زمینه می باشد [۲۵،۲٤،۲۳،۱٦،۱۲] و محصول نهایی بدست آمده را درراستای خودکفایی می توان در تهیهٔ کیت تجاری ASO بکار برد.

جدول ۲ : مقایسه‌ی میزان پروتئین، فعالیت همولیتیک و درجه‌ی خلوص محصول نهایی SLO با نمونه‌ی تجاری خارجی

SLO	پروتئین(mg/ml)	فعالیت همو لیتیک(HU/ml)	تعداد باند حاصل در ژل
تخلیص شده	۲/۰۵	۵۳۰۰۰	۳
تجاری	۲/۸۲	۸۲۰	۳

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1-Sierig G. and et al; ***Cytotoxic effects of Streptolysin O and Streptolysin S enhance the virulence of poorly encapsulated group A streptococci***.Infect.Immun.2003,71:446-455.

2- Niedermeyer W: ***Interaction of streptolysin O with biomembranes: Kinetic and morphological studies on erythrocyte membranes*** . Toxicon ,1985, 23 : 425-39.

3-Ginsburg I, Ward P.A.and Varani:.***Can we learn from the pathogenetic strategies of group A hemolytic streptococci how tissues are injured and organs fail in post - infectious and inflammatory sequelae?*** FEMS Immunolo.Med. Microbiol.1999,25: 325-338

4- Pietti R.D.,Drenning S.D , Wald E.R:***Evaluation of a new rapid antigen detection kit for group A beta – hemolytic streptococci*** .Pediat Emerg Care. 1998,14 (6): 396-401.

5-Binso, A. L. Stevens D.L: ***Streptococal infections of skin and soft tissues*** . N .Engl.J. Med . 1996 ,334: 240-245

6 – Gerber M.A, Wright, L.L: ***Streptozyme test for antibodies to group A antigens Pediatr***. Infect . Dis . J,1987,6:36-40

7-Johnson D. R.,Stevens D.L., Kaplan E.l: ***Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with sever systemic infections, rheumatic fever, or uncomplicated pharyngits*** . J.Infect. Dis. 1992,166: 374-382

8- Gerber M A, Randolph M.F: ***Evaluation of a new LA test for detection of ASO***: J.Clinic.Microbiol. 1990, 28:413-15.

9-Alouf J.E Reynaudi M: ***Purification and some properties of SLO*** , Biochimic,1973, 55:1187-1193

10-Schlievert P.M., Assimacopoulos A.P., Cleary P.P: ***Severe invasive group A streptococcal disease: clinical description and mechanisms of pathogenesis***. J.Lab.Clin.Med.1996,127:13-22.

11- Stevens D.L: ***Invasive group A streptococcus infections***. Clin.Infect.Dis. 1992 , 14:2-11

12- Alouf J.E, Geoffroy C: ***Production , purification and assay of Streptolysin O . Microbial toxin*** . Volum III. Published by Academic Press. 1988, 5259

13-Alouf J.e: ***Streptococcal Toxin*** , Pharmac.ther. 1980, 11:661

۱٤- شهرهٔ خاتمی ، زهرا زمانی ، فرزانهٔ حسینی ، مهدی اصلانی . ***مقایسهٔ ۱۱ محیط کشت جهت تولید استرپتولیزین O از استرپتوکوک β همولیتیک گروه A***- مجلهٔ حکیم ۱۳۸۰ ، دورهٔ ٤ شمارهٔ۳.

15-Dassy B, Alouf J: ***Growth of S.pyoges and sterptolysin O production in complex and synthetic*** , media J.Gen.Microbiol .1983,129:643-651.

16-Bhakadi S., Roth M., Sziegoleit A., Tranum Jensen M., ***Isolation and identification of two hemolytic forms of Streptolysin O .*** Infect.Immun. 1984,46: 394-400

17-Alouf J.E, Geoffroy C: ***Selective purification by thioldisulfide interchange chromatography of sulfydryl activated toxin*** .J.Biology .Chem. 1983,258:9968-9927

18-Dwyer L.J: ***Process purification . In protein Biotechnology*** . Published by para Ltd / Cambridge . England . 1993 : 533-572

19-Duncan J.L: ***Effect of Streptolysin O on erythrocytes membranes , liposomes and lipid dispersion .*** J Cell Biol.1975,67:160

20- Alouf J.E., Carvazier R ., Raynaud M: ***Preparation et proprietes des serums de chevauxx antistreptolysin O*** .Annales de l 'Institut Pasteur . 1965 , 108:476-500

21- Erickson K.O***.: In Protein purification*** (lanson and Ayden eds .) ,New York; 1989, 207.

22- Schoel , B., Welzel, M ., and Kaufmann, S.H.E: ***Hic for purification of cytolytic toxins J***. Chrim. A, 1994, 667:131-139

www.SID.ir

Archive of SID

23-Linder, R***, Heterologous immunoaffinity chromatography in the purification streptolysin*** O , Fems.Microbiol., .1979,5:339-42.

24-Kanclerski, K., Mollby R: ***Production and purification of streptococcus pneumoniae hemolysin*** . J. Clin. Microbiol. 1987, 25:222-225.

25- -Alouf ,j.E, Geoffroy,,C., Berche P***: Production of thiol- dependent haemolysins by L. monocytogenes and related species*** J. Gen. Microbiol. 1984,135: 481-487.

www.SID.ir