

الحزم البروتينية لبشرة القراد باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي

ليان ياسين خليل

فرع الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الإستلام ٣٠ كانون الثاني ٢٠١١؛ القبول ٢٨ شباط ٢٠١٣)

الخلاصة

في هذه الدراسة تم عزل الحزم البروتينية المختلفة لبشرة كل من نوعي اناث القراد المحتقنة *Hyalomma anatolicum anatolicum* و *Boophilus microplus* باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي. أوضحت الدراسة وجود ست حزم بروتينية باوزان جزيئية (١٨٢، ٦٨، ٦٧، ٦٦، ٥٧، ٥٦ KDa) بالنسبة للقراد *H. anatolicum anatolicum* في حين تنفصل أي حزمة من حزم البروتينات للنوع *B. microplus* لأنها سريعة الذوبان في محلول الترحيل الكهربائي. كانت عملية تحديد البروتينات البشرية للنوعين *H. anatolicum anatolicum* و *B. microplus* اعلاه هي ٤,٧ ملغم /مل، ١,٣ ملغم / مل على التوالي. لذا فبالإمكان ان نستنتج انه يمكن اعتماد الحزم البروتينية للبشرة كأحد معايير التصنيف في القراد.

Protein bands of the cuticle of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus* using electrophoresis technique

L.Y. Khalil

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

In this study by using SDS-PAGE electrophoresis different bands of cuticular proteins of engorged female ticks, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus*, was clarified six different bands of proteins with molecular weights (182, 68, 67, 66, 57, 56 KDa) of *H. anatolicum anatolicum* while any band of proteins in *Boophilus microplus* was not separated because it dissolved quickly in electrophoresis solution. The cuticular protein determinants of *H. anatolicum anatolicum* and *B. microplus* were 4.7 mg/ml, 1.3 mg/ml, respectively. It may be concluded that protein bands of cuticle could be used as one of taxonomic parameters of ticks.

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

المقدمة

لهذا السكر المتعدد والذي هو عبارة عن بوليمر Polymer ان يتواجد في كل الاغلفة الخارجية لمفصليات الارجل (٢). ان معظم مفصليات الارجل بما فيها القراد تقوم بتخزين الماء والمحافظة على مستويات الماء داخل اجسامها بوساطة الخاصية التي تتمتع بها هذه الكائنات من نضوحية البشرة للسوائل بفضل مساماته الموجودة على السطح وتحديدا في طبقة الشمع waxy layer وتفقد هذه الميزة او الخاصية عند تعرض البشرة الى أي أذى خارجي (٣).

وتجدر الاشارة الى ان تقنية الترحيل الكهربائي باستخدام الهلام gel electrophoresis تعد احد اهم التقنيات التحليلية الناجحة لغرض عزل وتمييز انواع البروتينات (٤). لذا كان الهدف

هناك القليل من الاهتمام الذي تم تكريسه من قبل العلماء في حقل دراسة بايولوجية القراد فما يتعلق بوظيفة وتركيب بشرة الجسم، اذ لا توجد أية تقارير تأخذ بنظر الاعتبار وبمستوى عالي من الاهمية تشكيل البشرة الخارجي لجسم القراد وعلاقته المباشرة بعملية التغذية (١).

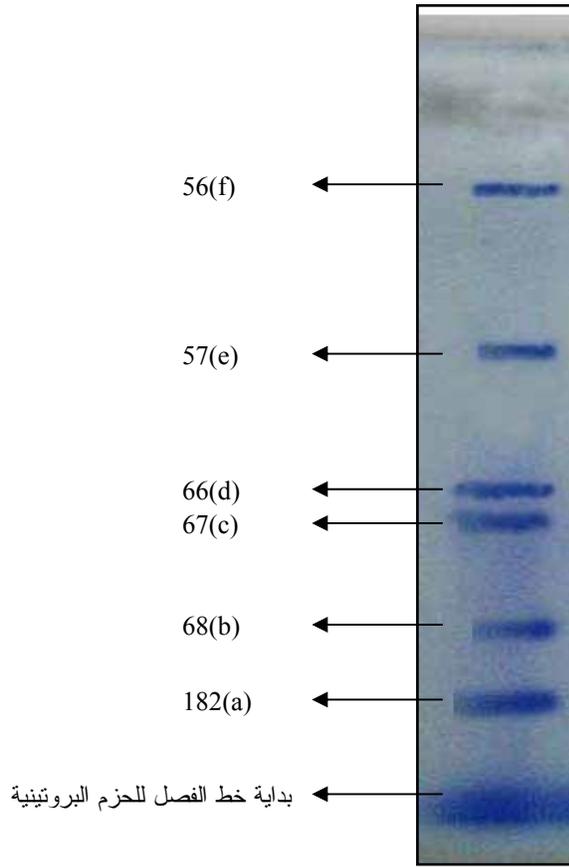
ويتميز البشرة في اجسام القراد بانه احد اهم العناصر الكارهة للماء hydrophobic ويحوي على ٩,٩% من الكايتين والذي يتالف من الياف من سكر متعدد polysaccharide fibers وممكن

الكلوكوز اوكسيديز واليومين مصّل البقر والالفا امابليز (glucose oxidase, Bovine serum albumin and α -amylase) (٩).

النتائج

تقنية الترحيل الكهربائي لفصل البروتينات البشرية

بينت هذه الدراسة وجود ست حزم بروتينية في مستخلص البشرة والذي بدأ بلون احمر غامق وذائب بالماء لاناث قراد النوع *H.anatolicum anatolicum* المحتقنات بالدم (a,b,c,d,e,f) والتي اوزانها الجزيئية (56,57,66,67,68,182 KDa) على التوالي وكما هي موضحة بالشكل ١.



الشكل ١: الحزم البروتينية في مستخلص البشرة للقراد من نوع *H.anatolicum anatolicum* مفصولة بواسطة صفائح الهلام الاكريلاميدي ٧%، الارقام على جهة اليسار تمثل الاوزان الجزيئية بالكيلودالتون.

في حين كان من الصعب عزل بروتينات مستخلص البشرة لاناث قراد *B.microplus* المحتقنة بالدم بواسطة هذه التقنية.

الاساسي المرجو من القيام بهذه الدراسة هو التعرف على بعض المعايير التصنيفية بين نوعي اناث القراد الصلب *H.anatolicum* و *anatolicum* المحتقنة بالدم عن طريق تحديد الاوزان الجزيئية للحزم البروتينية للبشرة كلا النوعين بتقنية الترحيل الكهربائي.

المواد وطرائق العمل

القراد

تم تغذية حوريات القراد *H.anatolicum anatolicum* و *B.microplus* على الارانب ثم نقلت الى الحاضنة في درجة حرارة ١٨م و رطوبة نسبية ٨٥% لغرض الانسلاخ والتطور، وبعد انتهاء عملية التطور الى اناث القراد البالغ غذيت على الارانب لحين الوصول الى درجة الاحتقان بالدم وهيئت هذه الاناث لغرض التشريح ونزع البشرة (٥).

البشرة

شُرحت اناث القراد البالغ المحتقنة بالدم عن طريق عمل شق دائري على طول محيط الجسم باستخدام مشروط نظيف ومعقم وتحت المجهر التشريحي الجسم Stereoscopic dissection microscope وتم تفريغ كل المحتويات من الاعضاء الداخلية للحصول على طبقتي البشرة الظهري والبطني، غسل بعد ذلك البشرة المنزوع بالماء المقطر وبعناية كبيرة ثم جُوسَ باستخدام جهاز المجانسة الكهربائي Toflen homogenizer (٦,٥).

تحديد بروتينات البشرة

باستخدام تقنية فولن - لوري المحورة Foilin-lowry technique (٧) وكما يلي:

تقنية الترحيل الكهربائي باستخدام الهلام: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE)

تم غلي عينات البشرة لفترة ٥ دقائق مع حجم متساوي من المحلول الدائري الخاص بتقنيه بالترحيل الكهربائي. (Tris-HCl buffer pH 6.8 containing 5% SDS, 30 μ EDTA, 25% glycerol and 2.5% mercaptoethanol). تجري عملية الترحيل الكهربائي باستخدام الهلام وعدد من محاليل الدائري (٤) بتركيز كلي (bisacrylamide CT ٤,٥%) مؤلف من (bisacrylamide ٤,٥%) و بمسافة ١٩ سم (c), 2.6%, 0.1% SDS, 0.125 μ Tris-HCl; pH6.8) من هلام الفصل (T,7C0; C.2.6%; 0.1% SDS, 0.375m Tris-HCl, pH8.8). (٨).

تعيين الحزم البروتينية باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي

تظهر حزم البروتين باستخدام صبغة Comassie blue بتركيز ٠,١%، اذ يستخدم مزيج من محلول البروتينات القياسي مثل

الاحماض والكحول الا انه لم يتم التعرف على المكونات الدقيقة الاخرى المكون لهذه الطبقة.

وقد ظهرت فوارق واضحة بين نتائج هذه الدراسة فيما يتعلق بالقراد من نوع *B. microplus* ونتائج دراسة (١٤) لقراد النوع *I. ricinus* والذي يحوي على جزيئات من البشرة غير ذؤوبة تتحول الى ذائبة فقط عندما تتفكك الى سلاسل ببتيدية صغيرة وسكريات متعددة استيالية acetyled polysaccharide (١٥).

نستنتج من هذه الدراسة بان كل نوع من انواع القراد الصلب له بروتينات بشرية خاصة به تكون ذات فائدة كبيرة في الدراسات التصنيفية المعتمدة على تحليل بروتينات الجسم.

المصادر

1. Kaufman WR, Flynn PC, Reynolds SE. Cuticular plasticization in the tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae): Possible roles of monoamines and cuticular pH. *J Exper Biol*. 2010; 213(16): 2820-2831.
2. Hackman RH and Goldberg M. The expanding alloscutal cuticle in adults of the argasid tick *Argas* (Persicargas) *robertsi* (Acari : Ixodoidea). *Inter J Parasitol*. 1985;15:249-254.
3. Lees AD. Transpiration and the structure of the epicuticle in ticks. *J Exper Biol*. 1947; 23 : 379-410.
4. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins *J Biol Chem*. 1975;250:4007.
5. Walker AR, Fletcher JD, Mckellar SB, Bell LJ, Brown CGD. The maintenance and survival of *Theileria annulata* in colonies of *H. anatolicum anatolicum* *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 1987;79:199.
6. Bradford MA. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248.
7. Schacterle GR and Pollack RL. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal Biochem*. 1973;51:651-655.
8. Gill HS, Boid R, Ross CA. Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Parasitol Immunol*. 1986; 8:11-25.
9. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem*. 1981;117:307.
10. Rutti B and Brossard M. Vaccination of cattle against *Rhipicephalus appendiculatus* with detergent solubilized tick tissue proteins and purified 20 KDa protein. *Ann Par Hum Comp*. 1992; 67:50-54.
11. Zhu XX, Oliver JH, Dotson EM. Epidermis as the source of ecdysone in an argasid tick. *Development Biol*. 1991;88:3744-3747.
12. Jones DK. Tick paralysis, in JD Stewart Memorial course for veterinarians : Proceedings 149: Emergency Medicine and critical care, the post Graduate committee in Veterinary science, University of Sydney, 1991.
13. Gilby AR. Studies of cuticular lipids of arthropods III. The chemical composition of the wax from *Boophilus microplus*. *Arch Biochem Biophys*. 1957; 67: 320-324.
14. Olav AS and Peter R. The extensible alloscutal cuticle of the tick *Ixodes ricinus*. *Ins. Biochem. Molec Biol*. 2005;35:1181-1188.
15. Vincent JFV. Arthropod cuticle : a natural composite shell system. *Compos part A*. 2002;33:1311-1315.

كما تم تحديد تركيز البروتين باستخدام طريقة فولن- لوري المحورة في مستخلص البشرة لكلا النوعين ٤,٧ ملغم/مل و ١,٣ ملغم/مل في *H. anatolicum anatolicum* و *B. microplus* على التوالي بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد.

المناقشة

اشارت نتائج هذه الدراسة الى وجود ست حزم بروتينية في مستخلص البشرة للقراد الاناضولي *H. anatolicum anatolicum* و باوزان جزيئية (56,57,66,67,68,128 كيلودالتون) في حين لم يكن بالامكان فصل هذه البروتينات في النوع *B. microplus* لذوبانها في المحاليل المستخدمة في تقنية الترحيل الكهربائي وربما كان السبب في ذلك هو ان المكون الرئيسي لبروتينات طبقة البشرة في النوع *B. microplus* عبارة عن وحدات بنائية صغيرة مؤلفة من احماض امينية ذات اوزان جزيئية واطئة جدا سريعة الذوبان في المحاليل الدائرية (٢).

ان عملية فصل البروتينات في مستخلصات البشرة التابعة لانواع مختلفة من القراد فائدة كبيرة في تصنيف هذه الانواع مثل النوع *Rhipicephalus appendiculatus* والنوع *Ixodes ricinus*، ٢٥ و ٢٠ كيلودالتون على التوالي (١٠).

كما ان عدم ظهور أي اوزان جزيئية لبروتينات المستخلص البشرية التابع للنوع *B. microplus* يعزى الى ذوبان هذه البروتينات في المحاليل الدائرية كما تمت الاشارة اليه سابقا، اذ تكون على الاغلب مؤلفة من بروتينات تسمى ecdysone proteins ومنها البروتين الاساسي 20-hydroxyecdysone والذي يزداد تكونه بصفة طردية مع عملية انفصال طبقة البشرة القديمة عن الجديدة خلال عملية انسلاخ القراد بعملية تسمى Polysis واطافة بروتينات جديدة للبشرة الجديد (١١).

تبين في هذه الدراسة ايضا ان لون مستخلص البشرة يميل الى الاحمر الغامق وذو طبيعة ذائبة في الماء وهو مشابه تماما لما وصفه (١٢) في دراسته من ان المستخلصات البشرية للنوع *Ixodes holocyclus* وتحديد الاناث المحققة بالدم و باوزان جزيئية

٦ كيلودالتون كانت بلون احمر غامق وذائبة في الماء.

تتخفف اوزان اجسام القراد في الفترة من ٦ ساعات الى ٩ ايام وان الهبوط في اوزان الجسم هذه يزداد في المراحل المبكرة من انتاج البيض في اناث القراد لتصل الى ذروتها في اليوم الرابع بعد سقوطها من على المضيف (١٣)، وباستخدام تقنيات مختلفة مثل تقنية المسحات السطحية احادية الجزيئية lecular surface films والمجهر المجسم بالأشعة فوق الحمراء infra-red spectroscopy.

فقد تم الاستنتاج بان الطبقة الشمعية في بشرة النوع *B. microplus* مؤلفة بشكل اساسي من الاستر لسلسلة طويلة من