Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 34, No. 2, Summer 2024 ORIGINAL ARTICLE

Comparison of two extraction methods of extracellular vesicles from *Clostridium perfringens*

Soheila Ostadmohammadi[1], Seyed Ali Nojoumi[2], Abolfazl Fateh[3], Seyed Davar Siadat[4], Fattah Sotoodehnejadnematalahi[5]

[1] PhD Student in Microbiology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor of Microbiology, Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Associate Professor of Medical Virology, Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[4] Professor of Medical Bacteriology, Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor of Cellular and Molecular Immunology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]

Abstract

Background: Extracellular vesicles (EVs) are nano- to micron-sized vesicles with the ability to transport bioactive cargos. All types of cells have the ability to release EVs, which have been demonstrated to be involved in a number of essential cell functions. There are various methods for isolating EVs, each with advantages and disadvantages. The purpose of this study was to invistigate at the non-ultra centrifugation method and ultra-centrifugation method for isolating EVs.

Materials and methods: *Clostridium perfringens ATCC*13124 was used in this experimental study. Following culture, EVs were extracted using two methods: Non-Ultra method and Ultra-method. To examine chemical characteristics, the EV protein concentration was measured using a NanoDrop device, and the EV protein pattern was identified using SDS-PAGE. Transmission electron microscopy (TEM) was utilized to examine the EVs' physical properties.

Results: Our results showed that the EVs isolated by the Ultra-method had a higher protein content compared to the Non-Ultra method (3.17 and 1.46 mg/ml, respectively).The Ultra-method isolated more and larger EVs compared to the Non-Ultra method. Also, protein patterns of the EVs by SDS-PAGE method were similar in both methods.

Conclusion: The present study showed that the Ultra-method can be a more efficient and cost-effective way for isolation EVs from *Clostridium perfringens* than the Non-Ultra method.

Keywords: *Clostridium perfringens, Extracellular vesicles, ultracentrifugation, EV extraction methods*.

Cited as: Ostadmohammadi S, Nojoumi SA, Fateh A, Siadat SD, Sotoodehnejadnematalahi F. Comparison of two extraction methods of extracellular vesicles from *Clostridium perfringens*. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(2): **121-128.**

Correspondence to: Seyed Ali Nojoumi
Tel: *+98 9125260854*
E-mail: ali.nojoumi@gmail.com
ORCID ID: 0000-0003-0656-6112
Received: 19 Aug 2023; **Accepted:** 26 Sep 23

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۲۱ تا ۱۲۸

Original Article

مقایسه دو روش استخراج وزیکول‌های خارج سلولی از *Clostridium perfringens*

سهیلا استادمحمدی[۱]، سید علی نجومی[۲]، ابوالفضل فاتح[۳]، سید داور سیادت[۴]، فتاح ستوده نژاد نعمت اللهی[۵]

[۱] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] استادیار میکروبیولوژی، گروه مایکوباکتریولوژی و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳] دانشیار ویروس شناسی پزشکی، گروه مایکوباکتریولوژی و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۴] استاد باکتری شناسی پزشکی، گروه مایکوباکتریولوژی و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۵] استادیار ایمنی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *وزیکول‌های خارج سلولی (EVs)، وزیکول‌هایی با اندازه نانو تا میکرون هستند که می‌توانند محموله‌های زیستی را حمل کنند. همه انواع سلول‌ها می‌توانند EVها را ترشح کنند که مشارکت آنها در مکانیسم‌های حیاتی مختلف سلول مشاهده شده است. روش‌های مختلفی جهت جداسازی EVها وجود دارد که دارای مزایا و معایبی هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی روش غیراولتراسانتریفیوژ و اولتراسانتریفیوژ در جداسازی EVها بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی از Clostridium perfringens ATCC13124 استفاده شد. بعد از کشت، استخراج EVها با دو روش غیراولتراسانتریفیوژ و اولتراسانتریفیوژ انجام شد. برای بررسی خصوصیات شیمیایی از تعیین غلظت پروتئینی EV با استفاده از دستگاه NanoDrop استفاده شد و الگوی پروتئینی EV با استفاده از تکنیک SDS-PAGE انجام شد. میکروسکوپ الکترونی عبوری(TEM) جهت بررسی خصوصیات فیزیکی EVها استفاده شد.*

یافته‌ها: *نتایج ما نشان داد که EVs جدا شده با روش اولتراسانتریفیوژ میزان پروتئین بالاتری در مقایسه با روش غیراولتراسانتریفیوژ (به ترتیب۳/۱۷ و ۱/۴۶ میکروگرم بر میلی لیتر) داشتند. روش اولتراسانتریفیوژ نسبت به روش غیراولتراسانتریفیوژ، EVs بیشتر و بزرگتری را جدا کرده بود. همچنین، الگوی های پروتئینی EVs با روش SDS-PAGE در هر دو روش مشابه بودند.*

نتیجه‌گیری: *نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که جداسازی EVهای حاصل از Clostridium perfringens با روش اولتراسانتریفیوژ می‌تواند روش بهینه‌تر و مقرون به صرفه‌تری نسبت به روش غیراولتراسانتریفیوژ باشد.*

واژگان کلیدی: *Clostridium perfringens ، وزیکول‌های خارج سلولی، اولتراسانتریفیوژ، روش های استخراج EV.*

مقدمه

وزیکول‌های خارج سلولی (Extracellular vesicles :EVs) باکتریایی، اولین بار در دهه ۱۹۶۰ در *Escherichia coli* گزارش شد(۱, ۲)، همچنین برای اولین بار حضور EVs قارچی در سال ۱۹۷۳ تأیید شد (۳). وجود EVهای تولید شده توسط باکتری‌های گرم مثبت تا سال ۱۹۹۰ در مطالعات ذکر نشده بود (۲, ۴). در ابتدا تصور براین بود که عدم وجود EVs در باکتری‌های گرم مثبت، مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها نسبت به باکتری‌های گرم منفی در درجه اول به دلیل دیواره سلولی ضخیم باکتری‌های گرم مثبت، مایکوباکتری‌ها و قارچ‌ها بوده است (۵-۷). در سال ۲۰۰۷، EVها از بیوفیلم‌های *Mycobacterium ulcerans* و پاتوژن قارچی *Cryptococcus neoformans* جدا و مشخص شدند و زمینه را برای مطالعه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه مایکوباکتریولوژی و تحقیقات ریوی، سید علی نجومی (**email**: ali.nojoumi@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0003-0656-6112
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۴

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]

وزیکولوژنز در قارچ‌ها، مایکوباکتریوم‌ها و باکتری‌های گرم مثبت فراهم کردند (۸, ۹).

EVها از دو لایه لیپیدی تشکیل شده‌اند که اجسام کره‌ای حاوی لومن را در اندازه‌های ۲۰ نانومتر تا ۵۰۰ نانومتر تشکیل می‌دهند و توسط یوکاریوت‌ها، آرکئوباکترها و باکتری‌ها تولید می‌شوند و حاوی محتویات سیتوپلاسمی سلول‌های خاص هستند (۱۰). EVهای می‌توانند طیف وسیعی از مواد داخل سلولی از جمله اسیدهای نوکلئیک، پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها را حمل کنند(۱۱-۱۳)، به این معنی است که وزیکول‌ها ممکن است به عنوان یک سیستم صادر کننده مواد عمل کنند. اگرچه مطالعات اولیه نشان داده‌اند که EVها در باکتری‌های گرم مثبت، حاوی DNA نیستند، EVهایی در *Streptococcus mutans* و *C.perfringens* گزارش شده است که حاوی DNA خارج سلولی و DNA کروموزومی بوده‌اند (۱۴, ۱۵).

EVs را می‌توان در محیط اطراف کشت سلولی یا در مایعات بدن مانند خون یافت. فرآیند تشکیل وزیکول و محتوای محموله آن بیشتر انتخابی است (۱۶). از این رو، پیشنهاد شده است که EVها می‌توانند ارتباطات بین سلولی را واسطه کنند و به عنوان عوامل درمانی بالقوه عمل کنند (۱۷, ۱۸). به طوری که، EVها به صورت بی‌خطر و مؤثر به عنوان یک ترکیب اصلی مجاز در واکسن سروگروه B مننگوکوکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۹). علاوه بر این، با توجه به اینکه EVها اثر زیادی بر روی القاء ایمنی با واسطه‌ی سلول و ایمنی در موکوس دارند، به عنوان ادجوانت در واکسن‌های زنده و غیر فعال همچنین آنتی‌ژن‌های خالص شده بررسی شده‌اند و هیچ نوع عارضه‌ی جانبی مرتبط با ادجوانت EV مشاهده نکرده‌اند (۲۰).

یک محدودیت عمده در این رشته در حال تکامل، سختی و فقدان استانداردسازی تکنیک‌های چالش برانگیز برای جداسازی EVها است. پیشرفت‌های فنی در زمینه جداسازی، با بهبود دانش و فن‌آوری‌های نوین از جمله اولتراسانتریفیوژ، میکروسیال‌ها، دانه‌های مغناطیسی و روش‌های جداسازی مبتنی بر فیلتراسیون به دست آمده است (۲۱-۲۳). باتوجه به اهمیت EVها و نقش آن در فرایندهای درمانی آینده، شناخت آنها و روش‌های جداسازی بهینه آنها یک ضرورت است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی روش غیراولتراسانتریفیوژ و اولتراسانتریفیوژ در جداسازی EVها بود، به این امید که این مطالعه بتواند در شناخت روش مناسب‌تر جداسازی EVها از باکتری مفید باشد.

مواد و روشها

تهیه و کشت باکتری

سویه باکتری *C.perfringens* ATCC13124 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون *C.perfringens* ATCC13124 از محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) براث (مرک، آلمان) استفاده شد و ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل به پلیت حاوی محیط بلاد آگار (مرک، آلمان)، اضافه شد. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی (۹۰ درصد N_2، ۵ درصد Co_2 و ۵ درصد H_2) با استفاده از جار بی‌هوازی و دستگاه Anoxomat به مدت ۳- ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (۲۴).

روش های استخراج EVها

استخراج EV از *C.perfringens* به صورت خلاصه به این شرح بود که کشت انبوه باکتری در ۴۰۰ میلی لیتر محیط BHI براث انجام شد و محیط کشت در جار بی‌هوازی (۹۰٪ N_2، ۵ ٪ Co_2، ۵ ٪ H_2) قرار داده شد. OD باکتری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد .بعد ۲۴ ساعت انکوبیشن (۲۴) و رسیدن OD به ۱، محیط کشت روی یخ قرار داده شد (۱۴).

در اولین پروتکل استخراج (روش غیراولتراسانتریفیوژ)، به منظور رسوب گیری، محیط حاوی باکتری در دور g ۶۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و دو بار شستشوی رسوب حاصل با محلول PBS انجام شد. سوسپانسیون غلیظ باکتری با استفاده از کلرور سدیم ۹ درصد ایجاد شد . محلول حاصل برای یک ساعت در دور g ۶۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد.یک سانتریفیوژ متوالی برای استخراج EV انجام شد.در این مرحله ذرات معلق برای ۹۰ دقیقه در g ۲۰۰۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بافر تریس سدیم دزوکسی کولات EDTA استفاده شد و EV استخراج شد و در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد (۲۵, ۲۶).

در دومین پروتکل استخراج (روش اولتراسانتریفیوژ)، همان طور که قبلا شرح داده شد، باکتری‌ها برای ۲۴ ساعت تحت شرایط بی هوازی کشت شدند. جهت استخراج با این روش، محیط کشت حاوی باکتری در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس سوپرناتانت برای استخراج EV استفاده شد. بعد از عبور سوپرناتانت از فیلتر، محلول فیلتر شده با استفاده از اولتراسانتریفیوژ در دور g ۲۰۰۰۰۰ به مدّت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل در محلول

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]

PBS حل شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه نگهداری شدند (۲۷).

غلظت پروتئینی در روش‌های استخراج

تعیین غلظت پروتئینی به عنوان یک شاخص برای ارزیابی کارایی روش های استخراج استفاده شد. به منظور تعیین کمی غلظت پروتئینی وزیکول‌های استخراج شده در این روش‌ها، از دستگاه Nano Drop ND (Thermo Scientific, USA) استفاده شد (۲۸).

تکنیک SDS-PAGE

بعد از استخراج EV، سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل امید ژل الکتروفورز (تکنیک SDS-PAGE) استفاده شد تا وزن پروتئینی وزیکول‌های استخراج شده را از طریق مقایسه کردن انها با یک لدر پروتئینی تعیین کنیم. برای انجام SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) از دستگاه الکتروفورز با ژل عمودی در ابعاد ۱۳/۸×۱۳ سانتی متر و ضخامت ۰/۷ میلی متر استفاده شد. ژل‌های پلی آکریل آمید از ژل انباشته (Stacking) (۵٪) و ژل حل کننده (Resolving) (۱۲٪) تهیه شد. ۱۰ لاندا از نمونه در چاهک ریخته شد و در یکی از چاهک‌ها مارکر استاندارد پروتئین اضافه گردید و سپس الکتروفورز به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت اجرا شد. ژل به مدت یک ساعت در محلول ثابت کننده (۲۰ میلی لیتر اتانول، ۵ میلی لیتر اسید استیک و ۲۵ میلی لیتر Ultra pure water) فیکس شد و پس از دو بار شستشو با اب در محلول ۰/۰۱ درصد کوماسی بلو (Coomassie blue) (R-250 سیگما، ایالات متحده آمریکا)، اسید فسفوریک (۸۵ ٪)، آمونیوم در سولفات (۱۰۰ گرم) و متانول (۴۵ درصد حجمی) به مدت ۲ ساعت رنگ‌آمیزی شد. در نهایت با استفاده از محلول رنگ بر (اسید استیک ۱ درصد حجمی) به مدّت یک ساعت ژل رنگ بری و باندها مشاهده گردید (۲۹).

Transmission electron microscopy (TEM)

جهت بررسی خصوصیات فیزیکی مثل شکل و اندازه EVهای استخراج شده، عکس‌های دیجیتال توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM: Transmission electron microscopy) گرفته شد. به این منظور، EVها بر روی Forward coated copper grids به مدت ۲ دقیقه قرار داده شدند و رنگ‌آمیزی نمونه با رنگ فسفو تنگستیک اسید (PTA) انجام شد (۱۴).

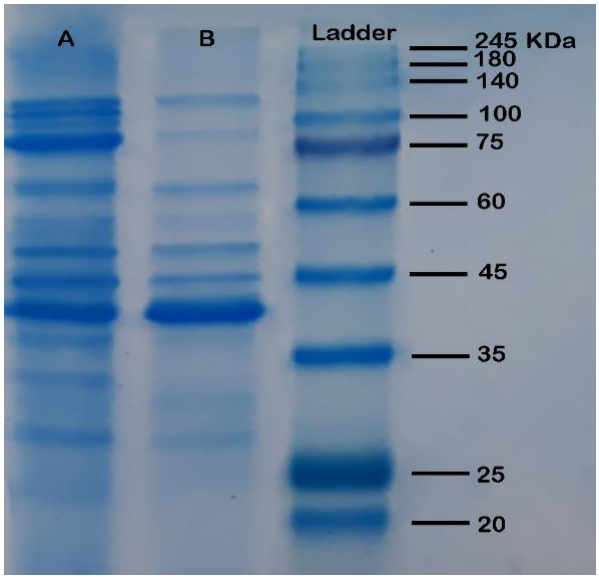
یافته‌ها

غلظت پروتئینی EVهای استخراج شده

نتایج خوانش غلظت پروتئینی EVهای استخراج شده با استفاده از دستگاه NanoDrop نشان داد روش اولتراسانتریفیوژ، وزیکول‌هایی با غلظت پروتئینی بیشتر را در مقایسه با روش غیراولتراسانتریفیوژ باعث شد. به طوریکه روش اولتراسانتریفیوژ توانست وزیکول‌هایی با غلظت پروتئینی ۳/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر تولید کند در حالیکه در روش غیراولتراسانتریفیوژ وزیکول‌هایی با غلظت پروتئینی ۱/۴۶ میکروگرم بر میلی لیتر تولید شد.

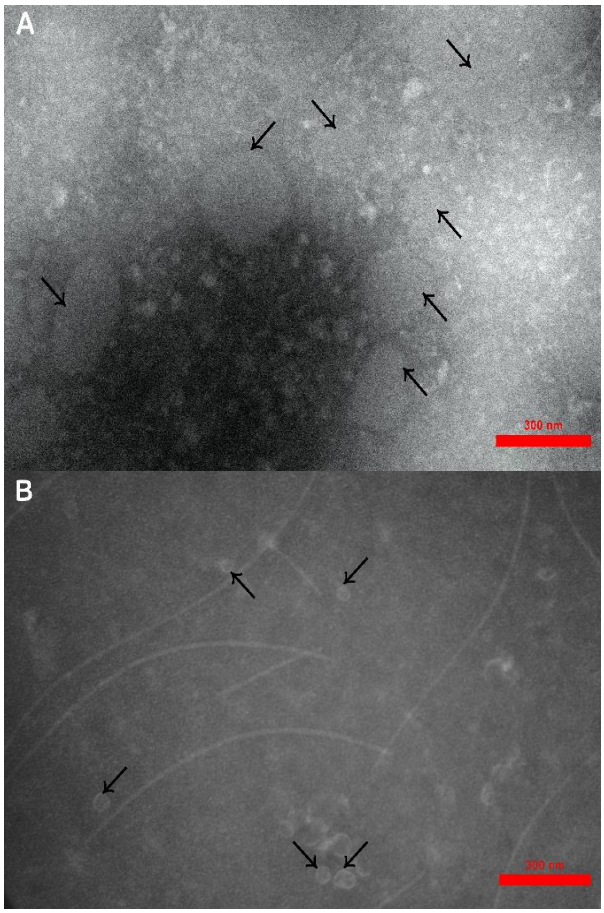
تکنیک SDS-PAGE

تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک SDS-PAGE، باندهای پروتئینی را در محدوده ۲۵ تا حدود ۲۵۰ کیلو دالتون نشان داد (شکل ۱). هر دو روش الگوهای پروتئینی مشابهی را نشان دادند. با این حال باندها در روش غیراولتراسانتریفیوژ در مقایسه با روش اولتراسانتریفیوژ خیلی ضعیف تر بودند.



شکل ۱. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE وزیکول‌های استخراج شده از *C.perfringens* با روش اولتراسانتریفیوژ (A) و روش غیراولتراسانتریفیوژ (B). در هر دو روش باندهای پروتئینی از ۲۵ تا ۲۵۰ کیلو دالتون مشاهده شد. اگرچه هر دو روش الگوهای پروتئینی مشابهی را نشان دادند، با این حال باندهای پروتئینی در روش اولتراسانتریفیوژ در مقایسه با روش غیراولتراسانتریفیوژ، خیلی قوی‌تر بودند که نشان دهنده غلظت پروتئینی کمتر از استخراج به دست آمده از روش غیراولتراسانتریفیوژ است.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]



شکل۲. عکس میکروسکوپ الکترونی TEM از EVهای باکتری *C.perfringens*، برخی از وزیکول‌ها با استفاده از پیکان سیاه رنگ مشخص شده‌اند. وزیکول‌های استخراج شده دارای اشکال کروی و در سایز نانو می‌باشند. بجز در تعداد EVها، بین دو روش استخراج تفاوتی مشاهده نشد.(A) EVهای استخراج شده از *C.perfringens* با روش اولتراسانتریفیوژا (B). EVهای استخراج شده از *C.perfringens* با روش غیراولتراسانتریفیوژ

تجزیه و تحلیل TEM

تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که وزیکول‌های استخراج شده از *C.perfringens* دارای اشکال کروی و در سایز نانو می‌باشند (شکل ۲). بجز در تعداد EVها، بین دو روش استخراج تفاوتی مشاهده نشد.تعداد EVها در روش اولتراسانتریفیوژ نسبت به روش غیراولتراسانتریفیوژ بیشتر بودند. EVها در هر دو روش اشکال کروی داشتند اما تعداد آنها در روش اولتراسانتریفیوژ بیشتر بود.

بحث

مطالعات نشان داده است که در طول رشد باکتری‌ها در شرایط In vivo و In vitro، وزیکول‌های خارج سلولی، به ویژه برای باکتری‌های گرم منفی، تولید می‌شوند (۴, ۳۰). در این مطالعه، *C.perfringens*، یک باکتری گرم مثبت، وزیکول‌های غشایی را در طول رشد و تحت شرایط کشت آزمایشگاهی تولید کرد. نشان داده شد است که در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، تنها تعداد کمی از باکتری‌های گرم مثبت وزیکول‌های غشایی ترشح می‌کنند و اطلاعات بسیار کمتری در مورد مکانیسم‌های تشکیل EVها و روش‌های بهینه جداسازی آنها در باکتری‌های گرم مثبت وجود دارد (۳۱).

از زمان کشف EVs باکتریایی، روش‌های مختلفی برای جداسازی آنها پیشنهاد شده است در این میان، اولترا سانتریفیوژ رایج‌ترین روشی است که برای جداسازی EV ها استفاده می شود.در این روش یک چرخش نهایی با سرعت بالا در g ۱۰۰۰۰۰ EV ها را رسوب می‌دهد (۳۲). به طور کلی، هر روش برخی مزایا و معایب دارد. در مورد معایب روش اولتراسانتریفیوژ، نیاز به تجهیزات گران گزارش شده است. با این حال، این روش برای جداسازی EVs از حجم زیادی از سوپرناتانت، مناسب است ویک روش سریع می‌باشد که زمان جداسازی را کاهش می‌دهد و به علت این مزایا، اولتراسانتریفیوژ هنوز هم روش استاندارد طلایی در نظر گرفته می‌شود که به طور معمول برای جداسازی EVها استفاده می‌شود (۳۳).

در مطالعه حاضر جهت مشاهده شکل و اندازه EVهای ترشح شده در *C.perfringens* از میکروسکوپ TEM استفاده شد. اندازه‌گیری EV با روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد که میکروسکوپ الکترونی TEM یکی از رایج‌ترین روش‌های تشخیص وزیکول‌های خارج سلولی است (۳۳). مشخص است که داده‌های به دست آمده با روش‌های مختلف می‌تواند به طور قابل توجهی متفاوت باشد و حتی تنظیمات دستگاه‌های اندازه‌گیری نیز می‌تواند به طور قابل توجهی بر نتایج مربوطه تأثیر بگذارد (۳۴). در مطالعه jiang و همکارانش (۱۴)، که بر روی وزیکول‌های خارج سلولی *C.perfringens* انجام گرفت، از میکروسکوپ الکترونی TEM جهت بررسی خصوصیات فیزیکی وزیکول‌ها استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از این باکتری دارای حالت کروی بوده و سایز آن‌ها از ۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر متغیر می‌باشد که همسو با مطالعه حاضر بود. در این نظر، kang و همکارانش (۲۰۱۳) وزیکول‌های خارج سلولی را از *Akkermansia muciniphila* به منظور بررسی نقش آنها در پیشرفت کولیت ناشی از سدیم سولفات دکستران، استخراج کردند. شکل کروی وزیکول های خارج سلولی توسط تصاویر TEM تایید شد. اندازه متوسط آنها ۱۹۸/۱۳±۸۷/۷۶ نانومتر گزارش شد (۳۵).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]

علاوه بر این، Li و همکارانش (۲۰۱۷) وزیکول‌های خارج سلولی را از *Lactobacillus plantarum* استخراج کردند. خصوصیات وزیکول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی، اندازه ذرات را ۳۰-۳۰۰ نانومتر نشان داد (۳۶). در سال ۲۰۱۹، Ashrafian و همکارانش اثرات وزیکول های خارج سلولی مشتق شده از *Akkermansia muciniphila* را روی بیان toll-like receptors وtight junction ارزیابی کردند. وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از *A. muciniphila* به صورت بصری توسط SEM مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که EV ها دارای اشکال کروی و اندازه آنها بین ۴۰ تا ۱۵۰ نانومتر متغیر است (۲۷). در سال ۲۰۱۹، در مطالعه دیگری اثر *B.fragilis* و وزیکول های مشتق شده از آن روی بیان ژن TLR و غلظت سایتوکین در cell line Caco2 مورد بررسی قرار گرفت. مورفولوژی و اندازه این وزیکول‌ها توسط SEM بررسی شد. تحقیقات آنها نشان داد وزیکول‌های مشتق شده از *B.fragilis*، کروی شکل و اندازه انها در محدوده۱۱۰-۳۰ نانومتر می‌باشد (۲۶). در تمام موارد ذکر شده مطالعات، اشکال طبیعی EVs کروی بوده و در طول استخراج حفظ شدند که مطابق با نتایج ما هستند.

در مطالعه حاضر از دو روش غیراولتراسانتریفیوژ و اولتراسانتریفیوژ برای مشخص نمودن و تایید EVهای ترشح شده از *C.perfringens* استفاده شد و نشان داده شد که روش اولتراسانتریفیوژ روش بهتری برای استخراج EV می‌باشد. زیرا وزیکول‌های جداسازی شده از نظر اندازه بزرگتر و از نظر مقدار نیز بیشتر بودند. علاوه بر این، در روش اولتراسانتریفیوژ پروتئین بیشتری جداسازی شد.این تفاوت ممکن است به دلیل مواد مختلف مورد استفاده در پروتکل های استخراج باشد. همچنین نیروی چرخش سانتریفیوژ ممکن است اندازه EVهای جدا شده را تحت تاثیر قرار داده باشند.

نتایج به‌دست‌آمده از تکنیک SDS-PAGE نشان داد که هر دو روش دارای الگوهای پروتئینی تقریبا مشابهی بودند.با این حال باندها در روش غیراولتراسانتریفیوژ در مقایسه با روش اولتراسانتریفیوژ خیلی ضعیف‌تر بودند. باندهای ضعیف تر ممکن است به دلیل غلظت پروتئینی کمتر نمونه ها ظاهر شوند که به نوبه خود ناشی از تعداد کمتر EV ها می‌باشد که تعداد کمتر EVها در روش غیراولتراسانتریفیوژ در عکس های TEM مشاهده شد. نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که در روش اولتراسانتریفیوژ نسبت به روش غیراولتراسانتریفیوژ، مقدار EV بیشتر، اندازه بزرگتر و غلظت پروتئینی بیشتر قابل جداسازی می‌باشد. بنابراین، برای جداسازی EVهای حاصل از *C.perfringens* روش اولتراسانتریفیوژ می‌تواند روش بهینه‌تر و مقرون به صرفه‌تری در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کارکنان گروه مایکوباکتریولوژی و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران تشکر کنند.

REFERENCES

1. Bishop D, Work E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. Bioch J 1965;96:567.

2.Bose S, Aggarwal S, Singh DV, Acharya N. Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. Microb Cell 2020;7:312.

3.Takeo K, Uesaka I, Uehira K, Nishiura M. Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vitro as observed by freeze-etching. J Bacteriol 1973;113:1442-8.

4.Dorward DW, Garon CF. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of Gram-negative but not Gram-positive bacteria. Appl Environ Microbiol 1990;56:1960-2.

5.Shockman GD, Barren JF. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. Ann Rev Microbiol 1983;37:501-27.

6.Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003;83:91-7.

7.Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. Adv Genet 2013;81:33-82.

8.Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. Eukaryot Cell 2007;6:48-59.

9.Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. PLoS Pathog 2007;3:e62.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]

10.Van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R. Innovation in detection of microparticles and exosomes. J Thromb Haemost 2013;11:36-45.

11.Biedka S, Eutsey R, Hiller L, Minden JS. Membrane Protein Comparison Between Cell Membranes and ExtracellularVvesicle Membranes of *S. pneumoniae* Provide Insights into Extracellular Vesicle Formation and Shedding. FASEB J 2022;36.

12.Turunen J, Tejesvi MV, Suokas M, Virtanen N, Paalanne N, Kaisanlahti A, et al. Bacterial extracellular vesicles in the microbiome of first-pass meconium in newborn infants. Pediatr Res 2023;93:887-96.

13.Schaack B, Hindré T, Quansah N, Hannani D, Mercier C, Laurin D. Microbiota-Derived extracellular vesicles detected in human blood from healthy donors. Int J Mol Sci 2022;23:13787.

14.Jiang Y, Kong Q, Roland KL, Curtiss III R. Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. Int J Med Microbiol 2014;304:431-43.

15.Liao S, Klein MI, Heim KP, Fan Y, Bitoun JP, Ahn S-J, et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. J Bacteriol 2014;196:2355-66.

16.Ibrahim A, Marbán E. Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. Ann Rev Physiol 2016;78:67-83.

17.Fleury A, Martinez MC, Le Lay S. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. Front Immunol 2014;5:370.

18.Balhuizen MD, Veldhuizen EJ, Haagsman HP. Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development. Front Microbiol 2021;12:629090.

19.Martinón-Torres F, Safadi MAP, Martinez AC, Marquez PI, Torres JCT, Weckx LY, et al. Reduced schedules of 4CMenB vaccine in infants and catch-up series in children: Immunogenicity and safety results from a randomised open-label phase 3b trial. Vaccine 2017;35:3548-57.

20.Lee T-Y, Kim C-U, Bae E-H, Seo S-H, Jeong DG, Yoon S-W, et al. Outer membrane vesicles harboring modified lipid A moiety augment the efficacy of an influenza vaccine exhibiting reduced endotoxicity in a mouse model. Vaccine 2017;35:586-95.

21.Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. Front Physiol 2012;3:162.

22.Cantin R, Diou J, Bélanger D, Tremblay AM, Gilbert C. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. J Immunol Methods 2008;338:21-30.

23.Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. Am J Physiol Renal Physiol 2007;292:F1657-F61.

24.Obana N, Nakao R, Nagayama K, Nakamura K, Senpuku H, Nomura N. Immunoactive clostridial membrane vesicle production is regulated by a sporulation factor. Infect Immun 2017;85:e00096-17.

25.Sharifat Salmani A, Siadat SD, Norouzian D, Izadi Mobarakeh J, Kheirandish M, Zangeneh M, et al. Outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response against the lipopolysaccharide of *Brucella abortus* S99. Ann Microb 2009;59:145-9.

26.Badi SA, Khatami S, Irani S, Siadat SD. Induction effects of bacteroides fragilis derived outer membrane vesicles on toll like receptor 2, toll like receptor 4 genes expression and cytokines concentration in human intestinal epithelial cells. Cell J 2019;21:57.

27.Ashrafian F, Shahriary A, Behrouzi A, Moradi HR, Keshavarz Azizi Raftar S, Lari A, et al. *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles as a mucosal delivery vector for amelioration of obesity in mice. Front Microbiol 2019;10:2155.

28.Rabiei N, Ahmadi Badi S, Ettehad Marvasti F, Nejad Sattari T, Vaziri F, Siadat S. Comparison of two isolation methods for extracellular vesicles from *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165. Vaccine Research 2018;5:27-31.

29.Elhenawy W, Debelyy MO, Feldman MF. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. MBio 2014;5: e00909-14.

30.Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, et al. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. Proteomics 2007;7:3143-53.

31.Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:19002-7.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]
[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]

32.Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach. Int J Mol Med 2015;36:11-7.

33.Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. BioMed Res Int 2018;2018.

34.Maas SL, De Vrij J, Van Der Vlist EJ, Geragousian B, Van Bloois L, Mastrobattista E, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. J Control Release 2015;200:87-96.

35.Kang C-s, Ban M, Choi E-J, Moon H-G, Jeon J-S, Kim D-K, et al. Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. PloS One 2013;8:e76520.

36.Li M, Lee K, Hsu M, Nau G, Mylonakis E, Ramratnam B. Lactobacillus-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. BMC Microbiol 2017;17:1-8.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1403.34.2.3.4]

[DOI: 10.61186/iau.34.2.121]