استخلاص وتنقية البروتين المرتبط بالفايبرونكتين من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية

عادل عبيد حسوني السعدي

الكلية التقنية – المسيب

عباس فاضل ، رياض كزار ، جمهوريه سعدي

المعهد التقني المسيب

الخلاصة

تم استخلاص وتنقية البروتين المرتبط بالفايبرونكتين من الجدار الخلوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*). اذ انتخبت ٦ عزلات بكتيرية من مجموع (٣٠) عزلة تم الحصول عليها من مختبرات مدينة الطب ، ومختبر الصحة العامة وقسم التقنيات الأحيائية في كلية العلوم / جامعة بغداد ، وأجريت على هذه العزلات كافة الاختبارات التشخيصية والتأكيدية لغرض التأكد من نقاوتها وقدرتها على انتاج البروتين المرتبط بالفايبرونكتين.

استخلص البروتين بنبذ العالق البكتيري في جهاز المنبذة المبردة (Cooling centrifuge) و تكسير الخلايا البكترية بالموجات فوق الصوتية بوساطة جهاز التكسير الكهربائي (Sonicator) ، ركز المستخلص البروتيني بوساطة كبريتات الأمونيوم ومن ثم بعملية الديلزة والترشيح الفائق لغرض التخلص من أكبر نسبة ممكنة من الأملاح والشوائب الموجودة في المحلول .

نقي المستخلص البروتيني بوساطة كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي على عمود هلام السيفاكريل S-200 إذ انفصلت قمتان بعد قراءة المستخلص الناتج على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر ، تم التأكد من نقاوة بروتين الالتصاق السطحي وذلك بظهور حزمة واحدة عند أجراء الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود المواد الماسخة SDS . وبينت نتائج توصيف البروتين إن الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي و الترحيل الكهربائي على هلام الاكريل امايد المتعدد وبوجود المواد الماسخة للبروتين SDS ومركبتوايثانول فقد قدر الوزن الجزيئي في هذه الحالة بمقدار (٥٩٠٠٠) و (٥٨٠٠٠) دالتون وتبين من خلال مطابقة الوزن الجزيئي للبروتين مع الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية ان البروتين هو البروتين المرتبط بالفايبرونكتين .

Abstract

The extraction and characterization of fibronectin binding protein from cellular wall of *Staphylococcus aureus*, was carried out 6 out of 30 isolates bacterial specimens had been selected which had been get from medical city laboratories , public health laboratory and biotechnology department of college of science / Baghdad university . All diagnostic confirm test had been done in order to be sure of its purity and ability on production of fibronectin binding protein .

Extraction of protein included, bacterial suspension centrifugation by cooling centrifuge followed by bacterial cells destruction by sonicater device , also protein extract had been concentrated by ammonium sulphate , followed by dialysis operation and ultra filtration in order to get ride high percent of salts and reasted which are present in solvent .

protein Purification results were revealed that molecular weight by gel filtration chromatography method , on the other hand electrophoresis method on polyacrylamide gel at present of denatured materials for protein SDS and mercaptoethanol molecular weight was (59000) and (58000) dalton approximately , the protein was afibronectin binding protein via the compared of protein with standerd proteins .

المقدمة

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* العامل الممرض الرئيسي في حالات أمراض المجتمع المكتسبة وأصابات المستشفى ، ويعد التجويف الأنفي الأمامي المخزن الرئيسي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* (Kluytmans *et al* .,1997)

تنتج بكتريا *S. aureus* العديد من السموم التي تتجمع تبعاً لفعالية هذه البكتريا مثل سم–ألفا (α –Toxin) وهو بروتين وزنة الجزيئي 33 كيلو دالتون يسبب حدوث ثقوب وتغيرات ألتهابية في خلايا اللبائن تؤدي الى ضرر متسلسل قد ينتشر ويؤدي الى ظاهره تدعى متلازمه التجرثم الدموي (Javanka *et al*., 2005; Beyan *et al*., 2003) ومستضد الذيفان المقيح تركيبياً يتكون من أحماض أمينية متجانسة ووظائفها هي الأتحاد مع بروتينات الصنف الثاني لمعقد التوافق النسجي Major histocompatapility complex II (MHC II) مسببةُ حث الخلايا التأئية للتضاعف وتحرير السايتوكاين cytokine والبروتينات المناعية(Bhakdi .,1999) جزيئة الذيفان الداخلي المعوي (enterotoxin) مسؤولة عن أحداث مرضين هما متلازمة الصدمة السمية والتسمم الغذائي حيث أن لسموم متلازمة الصدمة السمية الأول تركيباً يماثل الذيفان المعوي C,B والجين المسؤول عن ذيفان متلازمه الصدمه السميه الاول يوجد بنسبة 20% من بكتريا *S. aureus* (Bhakdi *et al* .,1999) .

يتكون جدار بكتريا *S. aureus* من ببتيدوكلايكان peptidoglycan والحامض الدهني Lipoteichoic acid والعديد من النواتج السامة المفرزة والتي من المحتمل أن تشترك في الصدمة السمية بوساطة المكورات العنقودية (Sriskandan and Cohen ,1999) . بينما لاتلاحظ هنالك أعراض للصدمة عندما يكون المصل مركز بعامل التنخر الورمي – ألفا (Tumor Necrosis Factor– α) ألا أنه يعد أحد سايتوكينات الألتهاب الأولي المسؤول عن الصدمة السمية في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، كما ان حث أنتاج عامل التنخر الورمي –ألفا (Tumor Necrosis Factor– α) هوغير كافي للتسبب بأعراض الصدمة في حالة الخمج بالمكورات العنقودية ، لذلك فأن الآلية المؤدية الى الصدمة السمية بالمكورات العنقودية قد تكون متعدده العوامل . (Sriskandan and Cohen ,1999) .

الفايبرونكتين هو عبارة عن بروتين سكري Glycoprotein ذو وزن جزيئي عال يقدر بحوالي ٢٧٠kd (Skorstengaard *et al* ., 1986 ; Ana *et al*.,2002) ويحتوي في تركيبه على اكثر من ٥% كاربوهيدرات مرتبطة مع مستلمات بروتنية تدعى الأنتكرين Integrin ويرتبط ايضا مع مكونات خارج خلوية اخرى مثل الكولاجين Collage والفايبرين Fibrin والهيبارين Heparin . والفايبرونكتين يمكن ان يوجد على شكلين الذائب Soluble globulin الذي يتكون من وحدتين ثانويتين مقدارهما ٢٥٠ كيلودالتون وهاتان الوحدتان ترتبطان مع بعضهما بوساطة أواصر ثنائية الكبريتيد disulfide bonds ويوجد هذا الشكل في بلازما الدم وسوائل الجسم المختلفة مثل سائل النخاع الشوكي والأدرار وعلى العديد من سطوح الخلايا الطلائية وفي الأنسجة الضامة (Yamada & older ,1978) . اما الشكل الآخر للفايبرونكتين فهو الكلوبيولين غير الذائب ويتكون هذا النوع من أرتباط عدة وحدات ثانوية معقدة .

ان التصاق بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بأنسجة المضيف تعتبر الخطوة الأولى لأحداث الأصابات المختلفة ، وقد اثبتت التجارب ان هذه البكتريا لها القابلية على تطوير آليات عديدة لغرض زيادة ضراوتها ، وتأكد بأن للفايبرونكتين الدور الأساس في أمراضيتها من خلال أعتباره حالة وسطية في عملية الألتصاق التي تحصل بين الفايبرونكتين الموجود في خلايا المضيف مع بروتين الالتصاق السطحي المفرز من

الجدار الخلوي للبكتريا (وقد وجد ان البروتين المرتبط بالفايبرونكتين يتألف من وحدتين ثانويتين (A و B) ذات وزن جزيئي يقدر بحوالي (١٢٠٠٠٠ دالتون) و تركيزه يبلغ حوالي ٣.٢ ملغم / مليلتر ورقم هيدروجيني (٧ – ٧.٢ pH) (Proctor *et al* ., 1982) ، ومن ثم أختراق الخلايا المصابة ومنها خلايا اللبائن والتي تشمل الخلايا الطلائية الخارجية والداخلية والليفية بوساطة تكوين جسر بين البروتين المرتبط بالفايبرونكتين في البكتريا وفايبرونكتين الخلية البشرية عن طريق وجود مستلمات خاصة بهذا البروتين تدعى الأنتكرين (Joh *et al*.,1999 ; Van *et al*.,1998, Kusela ,1978) .

ـ المواد وطرائــق العمــل Materials and Methods

جمع العينات

جمعت ٣٠ مسحة سريرية وعزلة من مختبر الصحة العامة المركزي والمختبر التعليمي في مدينة الطب و قسم التقنيات الأحيائية في كلية العلوم / جامعة بغداد ومن أجزاء مختلفة من الجسم (الأنف ، الأذن ، البلعوم ، الجروح ، قرح الجلد ، الإدرار ، المهبل) للفترة من نيسان – حزيران ٢٠٠٦ .

ـ تشخيص العينات

تم تشخيص الجراثيم المعزولة اعتمادا على الصفات الزرعية والفحوصات البايوكيميائية (Cruikshank *et al* .,1975 ; Sneath *et al* .,1986 ; Cowan , 1985; Difco , 1984 ; Baron and Feingold , 1990).

ـ استخلاص البروتين المرتبط بالفايبرونكتين Extraction of fibronectin binding protein.

تم تحضير المستخلص البروتيني حسب ماجاء (Halby , 1975) . اما تقدير تركيز البروتين فقد قدر حسب طريقة براد فورد (Bradford , 1976) وبالاستناد إلى منحني البومين المصل البقري القياسي .

النتائج والمناقشة Result and Discussion

ـ العزل

اوضحت النتائج للتحري عن وجود بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* المسببة للعديد من الإصابات المرضية في ٣٠ عينة لمرضى يعانون من التهابات الجروح والحروق والتهابات البلعوم والأذن والتقيحات الجلدية المختلفة ومن أجزاء أخرى في الجسم وبعد إجراء الاختبارات التشخيصية بلغ عدد االعزلات لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* (٦) من ٣٠ عزلة .

– التشخيص

– الصفات المظهرية

بين الفحص المجهري ان البكتريا موجبة لصبغة غرام ومتجمعة على شكل عناقيد العنب (Sood , 1989) .

– الصفات الزرعية

كانت المستعمرات النامية على وسط الأكار المغذي دائرية وملساء ومرتفعة بصوره قليلة عن سطح الوسط الزرعي ذات لون كريمي معتم ، كما لوحظ تغير لون وسط أكار المانيتول الملحي في المناطق المحيطة بالمستعمرات النامية من اللون الوردي إلى اللون الأصفر، وذلك لوجود كاشف الفينول الأحمر مما يدل على

قابلية هذه البكتريا على تخمر سكر المانيتول . ويعد هذا الوسط من الأوساط التفريقية لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* (Macfadin , 1985) .

- انتاج انزيم الكوكيليز

تم هذا الاختبار بعد اختبار تخمر سكر المانيتول إذ تمكنت قسم من العزلات من تحويل البلازما السائلة إلى بلازما متجلطه وذلك لقدرتها على إنتاج إنزيم الكوكيليز (Coagulase) الذي يقوم بتحويل الفايبرينوجين (Fibrinogen) إلى الفايبرين(Fibrin) (Dickson and Marples ,1986) .

- اختبار انتاج الأسيتوين

أجري هذا الاختبار للعزلات الموجبة لاختبار إنتاج الكوكيليز (Coagulase) وذلك لغرض التفريق بين بكتريا *S. aureus* وبقية العزلات الأخرى الموجبة لاختبار الكوكيليز . إذ تميزت عزلات بكتريا *S. aureus* بكونها موجبة لاختبار إنتاج الأسيتوين من خلال تحول لون الوسط المغذي الحاوي على المزروع البكتيري إلى اللون الوردي (Cruickshank *et al* .,1975) .

- انتاج الانزيم المحلل للدم

اجري هذا الاختبار للعزلات البكترية الموجبة لفحص الكوكيليز والاسيتوين لغرض دراسة نوع التحلل الدموي وانتاج البكتريا لانزيم الهيمولايسين وكانت النتيجة موجبة اذ كان التحلل الدموي من نوع بيتا واضحا حول المستعمرات (Cowan , 1985) .

استخلاص وتنقية البروتين المرتبط بالفايبرونكتين

بعد ان تمت عملية الاستخلاص للبروتين أهمل الراسب المتكون من بقايا الخلايا المتحللة واستخدم الراشح الحاوي على المستخلص البروتيني (Halby , 1975) .

تم تركيز البروتين المرتبط بالفايبرونكتين المنتج من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* للتخلص من نسبة كبيرة من الماء والشوائب للحصول على درجة من النقاوة باستخدام ثلاث طرق الأولى الترسيب بأملاح غير عضوية تمثلت باستخدام كبريتات الأمونيوم والطريقة الثانية التركيز بعملية الديلزة والثالثة التركيز بوساطة الترشيح الفائق (Ultrafiltration) .

نقي البروتين باستخدام عمود هلام Sephacryl S- 200 اذ يمتاز هذا الهلام بعدد من الخصائص الجيدة أبرزها المقاومة للانضغاط وسرعة الجريان التي تساعد على الفصل الجيد والسريع دون الحاجة إلى التقيد بالرقم الهيدروجيني أو التركيز الأيوني فضلا عن سهولة التحضير والثبات لمدة طويلة ، ويمكن بوساطته تقدير الوزن الجزيئي للبروتين سواء كان خاماً أو منقى جزئياً وبغض النظر عن الشحنة التي يحملها أو الوضعية التي يكون فيها إذ يمكن استخدامه لمرات عديدة في فصل البروتينات (Pharmacia , 1985) وقد استخدم هذا الهلام في الدراسة الحالية وذلك لقدرته على الفصل حيث تبلغ حدود الفصل لهذا الهلام بين ١٠٠٠٠ – ١٠٠٠٠٠ دالتون ، مما يكسبه قدرة اكبر على الفصل تسمح بالحصول على درجة نقاوة أعلى , Stellwagen (1990) وقد أدى استخدامنا لهذا الهلام إلى زيادة نقاوة البروتين .

توصيف البروتين

تم حساب الوزن الجزيئي للبروتين المرتبط بالفايبرونكتين والمستخلص من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بطريقتين ، إذ تم حسابه أولا بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام السيفاكريل Sephacryl S – 200 وطريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود SDS (SDS– PAGE) .

واستخدم المنحني القياسي (العلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية (Rm) للبروتينات القياسية في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود الـ SDS عند تقدير الوزن الجزيئي للبروتين المدروس بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة للبروتين في هلام الاكريل امايد المتعدد وبوجود SDS–PAGE S لوحظ ظهور حزمة واحدة على الاكريل امايد المتعدد بتركيز ٥ % وكان وزنها الجزيئي ٥٩٠٠٠ دالتون و ٥٨٠٠٠ دالتون على التوالي . ويتضح من النتائج المستحصلة إن الوزن الجزيئي للبروتين المقدر بطريقة الترشيح الهلامي أعلى من الوزن الجزيئي للبروتين المقدر بالترحيل الكهربائي بما يقارب مرتين وهذا يعود إلى إن البروتين يتألف من أكثر من وحدة وان وجود المواد الماسخة SDS والمختزلة (٢– مركبتوايثانول) أدى إلى اختزال هذه الأواصر وتفكك البروتين إلى وحداته المكونة.

قدر Proctor وجماعته (1982) و (2005) , Kenneth الوزن الجزيئي للبروتين المرتبط بالفايبرونكتين المنقى والمستخلص من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية . فقد تمكنا من عزل هذا البروتين من الجدار الخلوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية باستخدام كروموتوغرافيا الالفه ثم أجروا عملية الترحيل الكهربائي إذ وجدوا إن البروتين يتكون من وحدتين وزنهما الجزيئي ١٢٠٠٠٠ دالتون .

كذلك استطاع الباحثان (1982) , Mogen and Inge عزل البروتين المرتبط بالفايبرونكتين من أغشية الصفيحات الدموية المصابة ببكتريا *S.aureus* وتمكنوا من استخلاص وتنقية هذا البروتين بوساطة كروموتوغرافيا الألفة (Affinity Chromatography) باستخدام عمود السيفاروز (Sepharose) وعند ترحيل المستخلص البروتيني على الهلام بعملية الترحيل الكهربائي وبوجود SDS –PAGE اظهر البروتين حزمة واحدة وقدر وزنه الجزيئي بحوالي ١٢٠٠٠٠ دالتون .

أشار (1982) , Franke & Inge إلى ظهور حزمتين للبروتين المرتبط بالفايبرونكتين المستخلص من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S . aureus* عند ترحيل البروتين على هلام الاكريل امايد المتعدد . الحزمة الاولى تقدر بحوالي ١٩٧٠٠٠ دالتون والتي تمثل البروتين المعزول من البلازما البشري والحزمة الثانية تقدر بحوالي ٦٠٠٠٠ دالتون والتي تمثل البروتين المرتبط بالفايبرونكتين والذي تم استخلاصه من الجدار الخلوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية S .aureus .

References

Ana , M .; Kellie, S .; Elena , L .; Jrina , M .; Dudley , K . and Steven , C . L . (2002) . The low density Lipoprotein receptor Related protein mediates fibronectin Accumulation on cell surfaces J. Biol . chem . 277 : 1660 – 1666 .

Baron, E. T . and Finegold,S . (1990) . Diagnostic microbiology , 8th . ed . Bailey and Scotts , The C .V . Mosloy company .

Beyan , H ., Buckly , L. R. Yonsaf , N. , Londi , M. , and Leslie R. D. (2003) . Arole for innate immunity in type 1 diabetic Diabetes metab . Res . Rev . 19 , 89-100 . doi : 10-1002 (. dmrr . 341) .

Bhakdi S. .; T. Klonisch ; P.Nuber and dw . Fischer.(1991) . Stimalation of morokine production by lipoteichoic acids . Infect .Immun . ،59 :4914 -4620.

Brad Ford **,** M. M. (1976) . Arabid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding . Analyt . Biochem . 72 : 248 – 255 .

Cowan , S. J . (1985) . Cowan and Steel manual for Identification of medical bacteria , (2^{nd} .ed) . Cambridge Univ . Press – U. K .

Cruickshank , R .; Marion , B. P .; Duguid , S . R . and Swain , P. H . A . (1975) . Medical microbiology : The practice of medical microbiology . (12^{th} ed) ,. Curchill Livingstone , Edinburgh, london , Newyork . 2 : 587.

Dickson , J . and Marples , R . (1986) . Coagulase production by strains of *Staphylococcus aureus* resistance charecters : acomparison of tow traditional methods with alatex agglutination system detecting both clumping factor and protein A . J. Clin .Pathol . 39 : 371 – 375.

Difco . (1984) . Difco manual of dehydrated culture media and reagent for microbiology and clinical laboratory procedures . 10^{th} ed . Difco laboratory, Detroit , Michigan , U . S .A .

Eric , B .; Brain, G .; Talbot . and Francosis . (2003) . The fibronectin binding protein of *Staphylococcus aureus* many promote mammary gland colonization in alactating mouse model of mastitis , Infection and immunity . 71 : 2292 – 2295 .

Franke , E . and Inge , C. (1982) . Isolation of fibronectin– binding protein from *Staphylococcus aureus* . J . Infection & Immunity . 37 : 526 – 531 .

Greenberg , R . and Benes , C. (1990) . Time – Kill studies with oxacillin vancomycin and teicoplanin versus *Staphylococcus aureus*. J. Infect . Dis. 161 : 1036 - 1037 .

Halby , N . (1975) . Cross – reaction between *Pseudomonas aeruginosa* and 36 other bacterial species . Scand . J . Immunol . 4 : 187 – 196 .

Humpherys , H . (1997) . Staphylococcus : Skin infections : Osteomylitis : Food poisoning : Foreign body infections : Medical microbiology(5^{th} ed) Churchil . Livingstone.

Irina , S .; Vinograd or , E .; Flahant , S . and Grigoris . (2005) . Extraction and purification of fibronectin *Staphylococcus aureus* , Jour. Infect Immun .73 : 3007 - 3017 .

Javanka , M. V. Keven , R. B, Danial . E .s Adeline R. W . Battouli S . S. Stephen , F . P. (2005) . In sight , in to mechanism used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutphil , 175 : 3907-3919 . The American Journal of medicine .

Jennifer , P . (2004) . Students of fibronectin pathogen intraction using NMR Spectroscopy , Mol . Microbiol . 52 : 631 – 641 .

Joh , D .; Speziale , P .; Gurusiddappa , S .; Manor , J . and Hook , M(1999). Role of fibronectin binding protein in bacterial adherence and entry in to mammalian cells , Matrix . Biol . 18 : 211 – 223 .

Kenneth Todar . (2002) . The bacterial flora of Human , University of Wisconsin – Madison . Department of bacteriology .

Kenneth Todar . (2005) . *Staphylococcus aureus* . Text book of bacteriology , Univercity of Wisconsin , Department of bacteriology .

Kluytmans,J.,A.Vam.Belkum and Verbrag.(1997).Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*; epidemiology,underlyin,Mechanism,and associated risks; clin.Microbial.

Kusela , P . (1978) . Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus* , Nature. (London) . 276 : 718 - 720 .

Lind , L . (1974) . Protein A production in different Strains of *Staphylococcus aureus* under varied growth conditions . Acta path . Microbiol . Scand . S .B . 82 : 821 – 828 .

Macfadin , J . F . (1985) . Biochemical test for Identification , The E test and detection of men A for determination resistance in coagulase negative *Staphylococci* , Eur , J . Clin . Microbial infection disease . 15 : 567 – 573 .

Matthias , G .; Hassain, M .; Petra , B .; Christine , H .; Georg , P . and Bhanu , S . (2004) . Truncation of fibronectin – binding protein in *Staphylococcus aureus* strain newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function .Infection and immunity . 72 : 7155 – 7163 .

Mogen , S . H . and Inge, C. (1982) . Afibronectin – binding protein from human platelet membranes . Biochem. J. 201 : 629 - 633 .

Ozeri , V .; Rosenshine , L .; Mosher , D . F .; Fassler, R . and Hansk , E . (1998) . Role of integrin and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* in to cells via protein F1 , Mol . Microbial . 30 : 625 – 637 .

Pharmacia Laboratory Seperation Division . (1985) . Gel filtration theory and practice and gel filtration calibration kit instruction manual . Uppsala . Sweden .

Proctol , R. A .; Mosher , D . F .; Olbrantz , P. J . (1982) . Fibronectin binding to *Staphylococcus aureus* . J . Biol . Chem . 24 : 788 -794 .

Skorstengaard , K .; Jensen , M . S .; Sahi , P .; Petersen , T . E . (1986) . Fibronectin . Eur . J . Biochem . 161 : 441 – 453 .

Sneath , P . A .; Mair , N . S .; Sharp , M . E . and Hott , J . G .(1986). Bergeys manual of systematic bacteriology : 1013 – 1035 William and wiLkans , U . S .A .

Sood , R . (1989) . Acolor atlas of practical pathology and microbiology. Jaypee brothers .

Sriskandan,S,and Cohen.,J.(1999).Gram-positive sepsis mechanism and differences from .gram-negative sepsis.Infect.Dis.clin.N.Am.13:397-412.

Stellwagen , E . (1990) . Gel filtration . In : Deutscher (ed)methods in enzymology. Guide to protein purification . Academic . Press . San Diego . 182 : 317- 328 .

Van , P .; J . P .; Duensing , T . D . and R . L . (1998) . Entery of opaA gonococci in to HEP-2 cells requires concerted action of glycosaminglycans , fibronectin and integrin receptors ,Mol .Microbial . 29 : 369 – 379 .

Yamada , K . M . and Olden , K . (1978) . Fibronectin adhesive glycoproteins of cell Surface and Blood , Nature (london) . 275 : 179 – 184.