تحسين انتاج انزيم السرابيتيز من بكتريا السراشيا باستخدام اشعة كاما

انتصار حسين علي، شهد جبار علاوي
فرع التقنيات الاحيائية / قسم العلوم التطبيقية / الجامعة التكنولوجية

A r t i c l e i n f o.

تقديم البحث: 2016/5/23
قبول البحث: 2016/6/5

الكلمات المفتاحية:
انزيم السرابيتيز، بكتريا السراشيا، اشعة كاما.

الخلاصة

عزلة البكتريا التي تم الحصول عليها بعد تشخيصها بجهاز (Vitic) اثبتت القدرة على انتاج انزيم (STP)، باستخدام الوسط الزرعي التربتون (Trypton) لكونة وسط مناسب لتنمية البكتريا واستخلاص الانزيم منها. اجريت عمليات تنقية جزئية للانزيم المستخلص من البكتريا باستخدام كبريتات الامونيوم، التبادل الايوني والترشيح الهلامي. وحددت الفعالية الانزيمية لكل خطوة تنقية.

عرضت العزلة البكتيرية لاشعة كاما لغرض تطفيرها ومعرفة تأثير الاشعاع عليها وكان التعريض لأشعة كاما باطوال موجية مختلفة لمعرفة اي طول موجي يؤثر بشكل اقوى على الجين المسؤول عن انتاج الانزيم في البكتريا، وهل هذا التأثير سيزيد من الانتاج الانزيمي ام ينقصه.

فكانت الاطوال الموجية المعرضة بحدود (1000-6000CGY) بأستخدام العنصر المشع CO^{60} وكان افضل طول موجي مؤثر في حدود (3000CGY) لكونه اعطى اعلى فعالية انزيمية للانزيم المستخلص من البكتريا بعد تعريضها للاشعاع .

ABSTRACT

Isolation of the bacteria that have been obtained after the diagnosis device using vitic has shown the ability to produce the enzyme (STP), using trypton because suitable for being the center for the development of bacteria and enzyme extracted from them, Underwent operations partial purification of the enzyme extracted from the bacteria using ammonium sulphate, ion exchange and gel filtration and identified enzyme purification for each step.

Bacterial isolation rays Kama offered for the purpose of cause mutation in the genome of bacteria and see the effect of radiation it, using wavelengths different to see any wavelength stronger impact on the gene responsible for the production of the enzyme in the bacteria, and whether this effect will increase the enzymatic production or decreased.

These wavelengths are limits between (1000-6000 CGY) using the radioactive element CO60 and better wavelength was influential in the range of (3000CGY) for being the highest effective enzyme for the enzyme extracted from the bacteria after mutation.

المقدمة

تضخ عضلة القلب الدم وهو ذلك السائل الذي يتدفق داخل الاوعية الدموية والذي يكون في حالة حركة مستمرة في حالاته الطبيعية اذ يتم ضخ الدم من خلال الشرايين الى اعضاء الجسم المختلفة، اما في الحالات الغير طبيعية فيحدث ضمور في الجدار الداخلي للاوعية الدموية او الشرايين وتتجمع الصفائح الدموية في موقع الاصابة او التلف لتشكل مادة تمنع الدم من ان يتدفق او يحدث نزيف اذ تفرز الصفائح الدموية النشطة مواد كيميائية لتبدأ عملية التجلط من خلال تنشيطها لعوامل عديدة تساعد على التجلط وتكوين بروتين الفايبرين (Fibrin) الذي يؤلف شبكة تظهر في حالات الجلطات الدموية، أن الجلطة الدموية (Thrombus) تحدث كجزء من عملية اعادة البناء في الجسم وأن العواقب تكون ضئيلة للغاية عندما تتكون الجلطة الدموية مع عملية اعادة البناء ولا تكون هنالك ضرر يذكر لها (لاتؤدي وظيفة الاصلاح او اعادة البناء لما تلف او لحق به الاذى او الضرر) ولها مخاطر تهدد حياة الانسان اذا تكونت بشكل كتلة كبيرة من تجلط دموي [1].

يعتبر جسم الانسان معقد حيث يحتوي على العديد من الأجزاء والمواد الكيميائية التي تتفاعل مع بعضها البعض لكي تقوم بمختلف الوظائف الحيوية التي نقوم بها خلال نشاطاتنا المختلفة. أحد هذه المواد المهمة والتي تتواجد في جسم الكائن الحي ومن ضمنها الانسان والتي تعمل على تأدية وظيفة مهمة في الجسم هي الانزيمات اذ انها نوع من أنواع البروتينات التي تقوم بتنظيم التفاعلات الكيميائية و تسريعها في داخل الجسم دون أن تتأثر هذه ألانزيمات فترتبط بالمواد المتفاعله لتحولها الى نواتج يستفيد منها الجسم وتعمل الانزيمات على خفض الطاقة اللازمة لحدوث التفاعل او ما يعرف بطاقة التنشيط [2] .

ويعد أنزيم السرابيتيز (Serrapeptase) من الانزيمات المحلله حيث يعمل على تحليل وأذابة ألانسجة الميتة لذلك يتم أستخدامه وأعطاءه للأشخاص الذين يعانون من الجلطات الدموية حيث يعمل على تحليلها واذابتها وكذلك يتم استخدامه للمرضى الذين يعانون من امراض الشعب الهوائية المزمنة ويحمي الجسم من السكتة الدماغية والسكتة القلبية[3].

المواد وطرائق العمل

تنشيط العزلة البكتيرية

تم الحصول على العزلة البكتيرية (Serratia marscecens) مشخصة من مستشفى الكندي، تم تشخيصها بجهاز (vitic) بنسبة نقاوة 98%. حضر الوسط الزرعي (التربتون) بإذابة 3.9 غم من الوسط الزرعي في 300 مليلتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المنتجة، عقم الوسط في جهاز (Autoclave) بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15، يصب الوسط في انابيب معقمة بمقدار 5 مليلتر لكل انبوب، زرعت الانابيب بالبكتريا وتحت ظروف معقمة، تحضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية في الحاضنة ، يلاحظ النمو للخلايا البكتيرية حيث يكون بشكل منطقة ضبابية.

الظروف المثلى لانتاج الانزيم

1- الرقم الهايدروجيني او الدالة الحامضية المثلى للانتاج:

عدل الدالة الحامضية للوسط الزرعي المستخدم (التربتون) للانتاج وذلك ضمن حدود (4.0، 4.5, 5, 5.5, 6.5) بعدها لقح الوسط الزرعي ببكتريا السراشيا لاستخلاص الانزيم منها وتحضن بدرجة حرارة 32 درجة مئوية لمدة 3 ايام [4] [5].

2- درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم:

لتحديد درجة الحرارة المثلى للانتاج، يحضن الوسط الزرعي المحتوي على الزرع البكتيري بدرجات حرارية مختلفة (30, 32,37, 40, 45)

لمدة 3 ايام، ثم قراءه الفعالية للانزيم المنتج من البكتريا بعد الاستخلاص لمعرفة الدرجة الحرارية المثلى [6] [7].

استخلاص انزيم (STP) من البكتريا

وضع الزرع البكتيري في انابيب اختبار مناسبة ثم استخلصت باستخدام جهاز الطرد المركزي (Centrifuge)، اذ تترسب الخلايا البكتيرية في قعر الانبوبة بينما الراشح يمثل الانزيم، وذلك لان الانزيم يفرز خارج الخلايا البكتيرية (Extracellular enzyme)، لذلك يفصل بسهولة عن الخلايا البكتيرية بالطرد المركزي عند 2000 دوره بالدقيقة لمدة 10 دقائق.

التنقية بالتبادل الايوني

يتم تنقيته الانزيم الخام الناتج بعد عملية استخلاصه بأستخدام اكياس الديلزة والسكروز وذلك بأستخدام عمود المبادل الايوني Ion exchange chromatography حيث يتم استخدام العينة الناتجه من التنقية بأستخدام اكياس الديلزة وذلك بأستخدام Colum DEAE-Cellulose [4].

المواد والمحاليل المستخدمة

هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH) (0.25 M):
يحضر بأذابة 5 غرام من هيدروكسيد الصوديوم NaOH في 100 مليلترمن الماء المقطر (distilled water).

حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid(HCL) (0.25 N):
يحضر بأضافة 10.4 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك (HCL) الى 400 ml من الماء المقطر (distilled water)، ويكمل الحجم الى 500 مليلتر من الماء المقطر.

كلوريد الصوديوم Sodium chloride (NaCL) (0.25M)
هذا المحلول يحضر بأذابة 7.3 مليلتر من كلوريد الصوديوم (NaCL) في 500 ml من الماء المقطر (distilled water).

Tris-HCL buffer (0.02M, ph= 6.0):
يحضر المحلول بأذابة 1.21غرام من Tris-HCL في 400 مليلتر من الماء المقطر وتعدل الدالة الحامضية ph الى 6.0، ثم يكمل الحجم الى 500 مليلتر من الماء المقطر.

تحضير عمود المبادل الايوني (DEAE-Cellulose)

يتم تحضير مادة (DEAE-Cellulose) وفقا للطريقة التي وصفها العالمان Whitaker and Bernhard (1972). خمسة عشر غراما من عينة المبادل الايوني وضعت في لتر من الماء المقطر وتترك في اسطوانة مدرجة (Graduated cylinder) حتى الركود فتنفصل طبقتان ويسحب الراشح الذي يحتوي على الماء المقطر، تكرر هذه العملية عدة مرات لحين الحصول على عالق نقي، يتم ترشيح عينة المبادل الايوني بأستخدام قمع بخنر (Bukhner's funnel)، بعدها يتم وضع عينة المبادل الايوني في 500 ml من محلول 0.25 M (NaCL) كما حضر في الفقرة السابقة ثم يغسل 3-5 مرات بالماء المقطر لمدة 30 دقيقة، بعدها يغسل العالق ب 250ml من حامض الهايدروكلوريك لمدة 30 دقيقة، وغسل العالق بالماء المقطر 3-5 مرات، بعدها يوضع العالق في محلول Tris-HCL(0.02M, ph=6)، يوضع العالق في عمود ذات ابعاد (1.5*10cm) ويترك لحين تماسكه.

فصل الانزيم خلال عمود المبادل الايوني

يمرر 10مل من الانزيم المركز بعد عملية الديلزة عبر عمود المبادل الايوني ببطيء وعلى جدران العمود والذي يحتوي على عالق المبادل الحيوي الذي تم تحضيره في الفقرة السابقة بأستخدام (pasture pipette)، الجزء المفصول يتم جمعة في انابيب مناسبة (Tube) بمعدل جريان 36ml/hr، 3ml لكل جزء، خطوة الغسل (wash step) يتم اجراءها بأستخدام Tris-HCL، بينما خطوة ألاسترداد (Elution) يتم اجراءها بأستخدام تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0.1-1N). أمتصاصية جزء ألبروتين المنفصل يتم قرائتها عند طول موجي 280nm لكل من خطوات ألغسل وألاسترداد. فعالية ألانزيم يتم احتسابها في الجزء الواحد بعدها يتم جمع الاجزاء الفعالة. أخيرا يتم حساب حجم وتركيز البروتين.

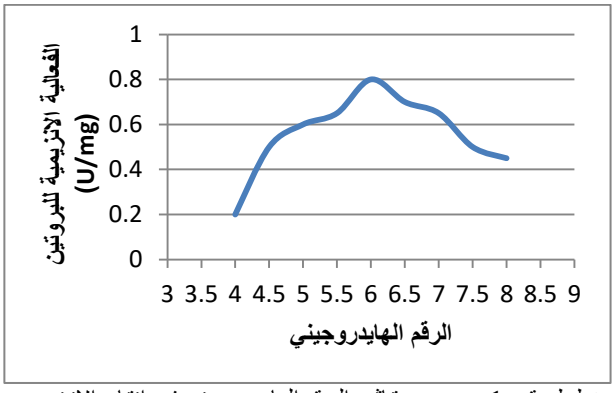
تعريض البكتريا المنتجة للانزيم لاشعة كاما Gamma Irradiation of select isolate

يتم تعريض البكتريا الى اشعة كاما بأستخدام العنصر المشع الكوبلت Co^{60}، في غرفة خاصة لجهاز اشعة كاما، بأطوال موجية مختلفة من (1000-6000 CGY)، وجرى ألتطفير في مستشفى الامل الوطني، اسم جهاز المستخدم في التطفير (Cirus)، وقد تم تصميم الجهاز لضمان التشعيع في ظروف مناسبة، في اسطوانة مجوفة تحتوي على جدران سميكة. تم وضع العينة داخل غرفة المشع في في مكان التشعيع ويتم التحكم في الايعاز عن بعد وذلك عن طريق جهاز تحكم كهروميكانيكي. حيث وضعت العينة تحت الاشعاع بأطول موجية مختلفة والتي كانت موضوعة في انابيب مناسبة ومعقمة (vials) تحتوي على نمو بكتيري.

النتائج والمناقشة

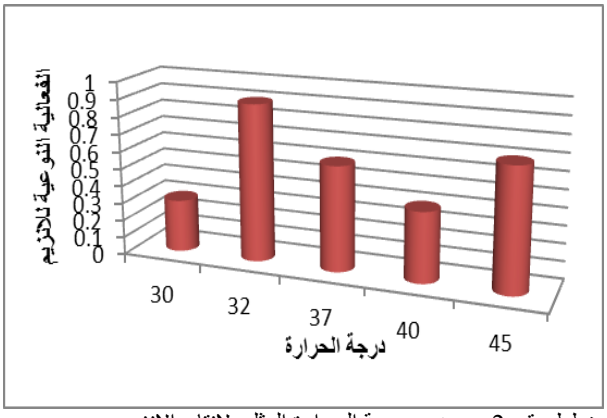
الظروف المثالية لانتاج الانزيم

1- الرقم الهايدروجيني او الدالة الحامضية المثلى للانتاج:
لحساب تأثير الرقم الهايدروجيني في انتاج الانزيم، لوحظ ان افضل رقم هايدروجيني للانتاج الانزيمي هي 6، اذ اعطت اعلى فعالية انزيمية، حيث وصلت الفعالية للانزيم الى 0.42 وحدو/مل. السبب في نقصان معدل النمو عند استخدام ارقام هايدروجينية اخرى يعود الى التغير في التركيب الثلاثي للبروتين. يؤثر الرقم الهايدروجيني في الانتاج الانزيمي من خلال تأثيره على ذوبانية الوسط الزرعي والحالة الايونية للوسط الزرعي وبالاضافة الى فعالية النمو للكائن المراد انتاج الانزيم منه، وهذا يتوافق مع العالمان Braun p and Sutherland j.p في عام (2003) لقياس الرقم الهايدروجيني لانزيم STP وكما في مخطط رقم (1) [8].



مخطط رقم 1 . يوضح تاثير الرقم الهايدروجيني في انتاج الانزيم من العزلة البكتيرية.

2- درجة الحرارة المثلى للانتاج:
تعتبر درجة حرارة الحضن مهمة جدا ومؤثرة على نمو الكائن الحي المنتج للانزيم وكذلك تؤثر على الانتاج الانزيمي من الكائنات الحية. ولمعرفة الدرجة الحرارية المثلى لانتاج الانزيم، استخدمت درجات حرارية مختلفة لحضن الكائن الحي المراد استخلاص الانزيم منه (30, 32, 37, 40, 45)، النتيجة يوضحها مخطط رقم (2) اذ تظهر الدرجة المثلى للانتاج عند 32 درجة مئوية اذ تظهر فعالية الانزيم عند هذه الدرجة 0.64 وحدة/مل. الانخفاض في درجات الحرارة يقلل من فعالية الانزيم لكونها غير مناسبة لنمو الكائن الحي وتعطي انتاج قليل للانزيم، اما الارتفاع في درجات الحرارة يؤدي الى تبخير الماء الموجود في الوسط الزرعي وفقدانه وبذلك يؤثر على نمو الكائن الحي المنتج. لذلك فأن درجة الحرارة المثلى ضرورية لنمو الكائن الحي ولفعالية الانزيم. وهذا يتوافق مع العالمان Al- Haidery and Al- Muslish في عام (1989) عند قياس درجة الحرارة المثلى لانزيم STP [9].



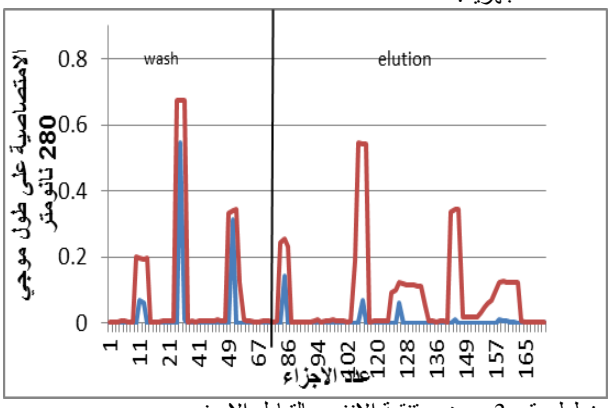
مخطط رقم 2 . يوضح درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم.

التبادل الايوني Ion exchange chromatography

تم تمرير محلول الانزيم المركز بعد خطوة الديلزة خلال مادة (DEAE-Cellulose) (Diethylaminoethyl cellulose) لعمود المبادل الايوني وتم معايرتها مع محلول منظم Tris-HCL (0.02M, PH=8)، النتيجة في مخطط رقم 3 يوضح اربعة قمم للبروتين في خطوة الغسل بينما قمة واحدة لفعالية الانزيم في الجزء.

في خطوة الغسل ظهر ان الانزيم يحمل شحنة موجبة مشابهة لشحنة المادة الموجودة في عمود المبادل الايوني وهي (DEAE-Cellulose) [10]. الفعالية النوعية في هذه الخطوة (6.2 U/mg) والفعالية الكلية لهذه الخطوة (5.4 U) وعدد مرات التنقية (4.4) والانتاج وصل الى (14.6%).

وقد استخدم التبادل الايوني في العديد من دراسات تنقية انزيم (STP) من الكائنات المجهرية.



مخطط رقم 3. يوضح تنقية الانزيم بالتبادل الايوني.

تعريض البكتريا لاشعة كاما (عملية التطفير)

عمليات التطفير اظهرت ان العزلة البكتيرية المعرضة لاشعة كاما بطول موجي 3000CGY اعطت اعلى فعالية للانزيم المستخلص منها بعد عملية الترسيب للخلايا البكتيرية، حيث اعطت فعالية 2.844.

هذا التحسين بواسطة اشعة كاما قد يكون اما زيادة في عدد نسخ الجين او تحسين في التعبير الجيني او كليهما. Al-Delaimy, (2002) ذكر ان عملية التشعيع يمكن ان تؤدي الى تكرار انتاج انزيم في الكائنات الحية الدقيقة او قد تسبب انخفاض في انتاج الانزيم او انتاج مركبات غير مرغوب بها. وجد ان الطول الموجي لاشعة كاما 3000CGY اعطت اعلى فعالية نوعية لانزيم STP، بينما الطول الموجي 6000CGY اعطى اقل فعالية نوعية.

كما ذكر العلماء Mishra,Y..N.et al, (2009) عند استخدام اشعة كاما لتطفير انزيم (STP) المعزل من بكتريا السراشيا باستخدام اشعة كاما ذات عنصر مشع Co^{60} وبأطوال موجية مختلفة.

المصادر

[1] Furie B and Furie BC Thrombus formation in vivo. J. Clin. Invest. 115(12): 3355-62.2005.

[2] Giangrande PLSix characters in search of an author: the history of the nomenclature of coagulation factors. Br. J. Haematol. 212(5): 703-12. 2003.

[3] Bhagat S, Agarwal M and Roy VSerratiopeptidase: a systematic review of the existing evidence. *Int J Surg*.. 28, 350-356.2013.

[4] Ammar M. S., Bayoumi R. A., El-kasaby A. M. H and Soliman A. M. Purification and properties of thermostable protease by B. brevis geltinoamylilyticus using fish wastes (Fi. W.) and poultry wastes (po.w) under solid state fermentation (s.s.f.) conditions. 5 th int. sic. Al-Azhar Univ. fac. Sac. March 25-27, Cario, Egypt. Pp.54.2003.

[5] Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, K and Miyaji, M., Nishimura, K. And de Campos-Takaki, G. M., Production of extracellular protease by Mucor circinelloides using D-glucose as carbon sources/ substrate. Brazilian Journal of Microbiogy, 33: 106-110. 2002.

[6] Berla Thangam E. and Suseela Rajkumar G. purification and characterization of alkaline protease from Alcaligenes faecalis Biotechnol. Appl. Biochem., 53, 149-154.2002.

[7] Boyer, H. W. and Carlton. B. C. Production of two proteolytic enzyme by a transformable strain of *Bacillus subtilis*. Arch. Biochem. Biophys, 128:442-455. (1968).

[8] Whitaker and Bernhard R.A. Experiments for an introduction to enzymology.The whiber press, Davis, California. 17, 882-885.1972.

[9] Daguerre, K. Cuevase, C.M. Mazza, L.A. and Balatti, A.P. Alkaline protease production. Rev. Asoc. Argent.Microbiol, 7(2), 49-55.1975.

[10] Wery N., Gerike U., Sharman A., Chaudhuri J. B., Hough D. W., and Danson M. J. Use of a packed-column bioreactor for isolation of diverse protease-producing bacteria from Antarctic soil Appl. Environ. Microbiol, 69(3): 1457-64, 2003.