جداسازی، خالص سازی وتعیین ویژگی یک آنزیم پروتئاز ترموفیل از یک سویه متعلق به جنس سودوموناس ها

احمد آسوده [۱و۲] و حسین محمدیان موسی آبادی

[۱]گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ایران

[۲] مرکز تحقیق و تکنولوژی بیومولکول ها، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ایران

Asoodeh@um.ac.ir (Ahmad Asoodeh)

چکیده

در این مطالعه از فلور میکروبی چشمه آبگرم «دیگ رستم» سویه ای از سودوموناس شناسایی شد که دارای فعالیت پروتئازی است.پس از بهینه سازی شرایط رشد،باکتری به مدت ۷۲ ساعت در محیط اختصاصی رشد داده شد. محتویات محیط کشت با سولفات آمونیوم ۸۵٪ رسوب داده شد و به کمک کروماتوگرافی تبادل یونی(ستون Q-Sepharose) متعادل شده با بافر تریس – HCl ۲۰ میلی مولار با pH = ۸/۵ فراکشن متصل نشده جمع آوری شد که دارای فعالیت پروتئازی بود. مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که این آنزیم دارای وزن مولکولی ۷۸ کیلو دالتون، pH بهینه ی ۷/۵ و دمای بهینه ی ٦۲ درجه سانتی گراد است. مطالعه الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE درشرایط احیایی و غیر احیایی نشان داد که پروتئاز فعال بصورت منومر نبوده و از چند زیر واحد ساخته شده است. بر اساس نتایج زیموگرام می توان گفت که شکل آنزیم در شکل تک زیر واحد فعال نبوده و تنها در حالت اولیگومری فعالیت پروتئولیزی از خود نشان می دهد.

واژگان کلیدی: چشمه آبگرم، پروتئاز، خالص سازی، سودوموناس

مقدمه

پروتئازها (سرین،سیستئین، آسپارتیک و متالو پروتئازها)، از آنزیم های مهم صنعتی محسوب می شوند که در صنایع مختلف کاربرد دارند[Anwar Adil ,۱۹۹۸]. پروتئاز ها، در سنتز پپتید، فرآوری پروتئین ها، صنایع غذایی، صنایع چرم سازی، صنایع دارویی، صنایع لبنی و دترجنت های صنعتی کاربرد فراوانی دارند[Samal Babru۱۹۹۱, ،Shimogaki۱۹۹۱, ،Gupta۲۰۰۲]. در این طرح، از فلور میکروبی چشمه آبگرم سویه ای یاکتری متعلق به جنس سودوموناس (pseudomonas) جداسازی و شناسایی شد که دارای فعالیت ترشح پروتئاز بود. همچنین در ادامه به جداسازی و خالص سازی نسبی آنزیم پروتئاز و تعیین خواص بیوشیمیایی آنزیم ترشح شده پرداخته می شود.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی از قبیل: محیط های کشت(nutrient broth(NB ، سولفات آمونیوم، تریس، سیترات و نمک های بافری دیگر از شرکت Merck تهیه شد. رزین Q- Sepharose، از شرکت فارماسیا تهیه شد. سیستم آمیکون و غشاء های ۱ و ۱۰کیلودالتون از شرکت میلی پور تهیه شد. سایر موارد از نوع آزمایشگاهی استفاده شد.

شرایط رشد و محیط کشت میکروبی

نمونه آب از چشمه آبگرم «دیگ رستم» واقع در مسیر طبس– کرمان در کویر لوت ایران گرفته شد و به آزمایشگاه منتقل شد. از سه نوع کلنی رشد کرده بر روی محیط nutrient agar ، یک کلنی در محیط ژلاتین دار دارای فعالیت بود. سویه باکتری حاصل را که یک سویه تولید کننده پروتئاز خارج سلولی بود در محیط کشت اولیه که شامل: nutrient broth(0.8% w/v),sacrose(1% w/v),yeast extract(0.5% w/v), NaCl(0.5% w/v) ، بود. رشد دادیم. انکوباسیون با تلاطم rpm ۱۲۰ و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۲٤ ساعت انجام شد. برای رشد وتولید پروتئاز از محیطی شامل: Fructose(1% w/v),yeast extract(1%),pepton(0.5%),K_2HPO_4(0.1%), $MgSO_4.7H_2O$(0.01%),$CaCl_2.2H_2O$(0.01%) استفاده شده که pH آن به کمک Na_2CO_3(10% w/v) بر روی pH=7 تنظیم شد. محیط کشت اختصاصی در شرایط استریل با 5% از محیط کشت ۲٤ ساعته اولیه مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و با تلاطم rpm ۱۲۰ برای ۷۲ ساعت قرار گرفت.

تست های بیوشیمیایی شناسایی باکتری

سویه مطلوب از لحاظ خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی و با استناد به باکتریولوژی سیستماتیکBergey's مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز هایی مثل : رنگ آمیزی گرم، حساسیت به KOH ،تست کاتالاز، تست سیترات، تست ژلاتیناز، تست SIM، MR-VP ، تخمیر قند با استفاده از پروتوکل های موجود انجام شد[Gerhardt ,۱۹۹٤].

شناسایی باکتری از طریق توالی یابی 16SrDNA

DNA ژنومی طبق روش sambrook et al استخراج شد[sambrook,۲۰۰۱] و میزان خلوص آن با توجه به مقدار A260/A280 بدست آمد. پرایمر های عمومیforward و reverse برای انجام 16SrDNA PCR که به ترتیب دارای توالی(5´-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) و(GGC/TTACCTTGTTACGACTT- 5´- 3´) بودند را استفاده کردیم [Weisburg ,۱۹۹۱ و Desantis ,۲۰۰۳].

خالص سازی پروتئاز

۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت اختصاصی تلقیح شده به وسیله سولفات آمونیوم رسوب دهی شد(۸۵٪) این عمل تحت شرایط شیک ملایم در دمای ٤ درجه (اتاق سرما) انجام شد. سپس محلول اشباع حاصل را

سانتریفیوژ کرده و رسوب حاصل در بافر 20 mM Tris–HCl, pH 8.5 حاوی$2\ mM\ CaCl_2$، حل شد و در معرض همان بافر به مدت ۱۸ ساعت با ۳ بار تعویض بافر، دیالیز شد. سپس محتویات کیسه دیالیز بر روی ستون Q-sepharose با سرعت جریان 2 ml/min ریخته شد. البته قبل از آن ستون با بافر 20mM Tris–HCl, pH 8.5 به تعادل رسیده بود. آنزیم پروتئاز از فراکشن های متصل نشده و با وجود اعمال شیب غلظت نمکی NaCl (0-.05 M)جداسازی شد. فراکشن های فعال آنزیمی ستونQ-sepharose را ابتدا به کمک اولترافیلتراسیون با غشاء ۱۰ kDa تغلیظ و سپس به وسیله فریز داریر، خشک کردیم. در ادامه از آن، برای تعیین ویژگی های آنزیمی استفاده شد.

سنجش فعالیت پروتئازی

در یک لوله آزمایش، مقدار0.6 ml کازئین 1.5% حل شده در بافر 20 mM Tris–HCl, pH 8.5 را با 100µl از محلول آنزیمی مخلوط شده و مخلوط واکنش در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و سپس با اضافه کردن0.64ml مخلوط TCA (شامل:0.11M TCA, 0.22 M sodium acetate , 0.33M acetic acid)در همان دما و برای۱۰ دقیقه واکنش متوقف شد. سپس مخلوط حاصل را در ۱۲۰۰۰RPM برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد وجذب محلول رویی در ۲۸۰ نانومتر سنجش شد[Eftekhar, ۲۰۰۳]. یک واحد آنزیمی عبارتست از مقدار آنزیمی که قادر است قطعات قابل حل را معادل افزایش جذب ۰.۰۰۱ در ۳۰ دقیقه در شرایط استاندارد، آزاد کند.

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید

االکتروفورزSDS-PAGE بر طبق روش Laemmli [۱۹۷۰, Laemmli] استفاده شد. تعیین حدود وزن مولکولی نیز به وسیله پروتئین های استاندارد شامل: bovin serum albumin (BSA) (66 kDa) وLysozyme(14kDa) انجام شد. آنالیز زیموگرام با اضافه کردن 0.1% کازئین در ژل SDS-PAGE انجام شد. نمونه ها بدون حرارت دهی و درحالت مخلوط با بافر نمونه بدون مرکاپتواتانول داخل ژل بارگیری شدند. بعد از الکتروفورز در دمای ٤ درجه و با ولتاژ ۱۲۰ ، ژل در بافر renaturing (Triton X-100 (2.5% v/v) برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ملایم همزده شد. سپس با بافر ظهور(developing buffer)(Tris 20 mM, NaCl 0.2 mM, $CaCl_2$) جایگزین شد. ژل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ملایم همزده شد، سپس بافر قدیمی را با بافر تازه ظهور تعویض کرده وحداقل به مدت ٤ ساعت آن را در دمای ۳۷ درجه انکوبه می کنیم. ژل را با رنگ(coomasie brilliant blue R-250 (0.5%, w/v برای ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد.

ویژگی آنزیم خالص شده

اثر pH روی فعالیت پروتئاز :فعالیت پروتئاز خالص شده در مقادیرpH مختلف با استفاده از یک بافر مخلوط (mixed buffer) که شامل غلظت 50mM از sodium acetate–acetic acid، Tris و NaOH–Glycin بود در شرایط استاندارد و بر مبنای سوبسترای کازئین سنجش شد[Moradian,۲۰۰۹].

اثر pH روی پایداری آنزیم پروتئاز : پایداری pH پروتئاز با انکوباسیون آنزیم در بافر با pH های مختلف در محدوده ٤ تا ۱۱ برای ٤٨ ساعت در دمای اتاق و سپس سنجش فعالیت باقیمانده آنزیمی تحت شرایط استاندارد صورت گرفت.

اثر دما روی فعالیت پروتئاز: برای تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیمی مخلوط واکنش که شامل کازئین(۲٪) حل شده در بافر Tris-HCl 50mM , pH=7.5 را در طیف دماهای مختلف از ۲۰ تا ۷۰ درجه برای ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس میزان فعالیت براساس شرایط استاندارد اندازه گیری شد.

اثر دما روی پایداری پروتئاز : پایداری دمایی آنزیم با انکوباسیون آنزیم خالص شده در بافر Tris-Cl, 50mM) pH=7.5) در سه دمای ۵۰ و٦۰و ۷۰ درجه انجام شد و فعالیت باقیمانده آنزیم با برداشت مقداری از نمونه اصلی (حاوی آنزیم)و نمونه شاهد(بدون آنزیم) در هر دما و در بازه های زمانی منظم صورت گرفت.

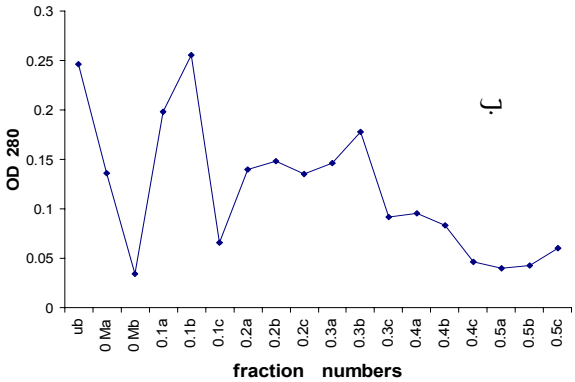
نتایج

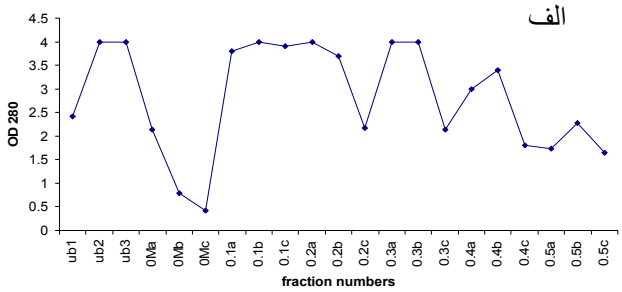
شناسایی میکرواورگانیسم و توالی یابی 16SrDNA

سویه باکتری مورد نظر یک باکتری گرم منفی، میله ای،سیترات مثبت، ژلاتیناز مثبت، فاقدحرکت، بدون تولید گاز بود که براساس اطلاعات مربوط به توالی16SrDNA به همردیفی آن با پایگاه اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) متعلق به جنس سودوموناس است.

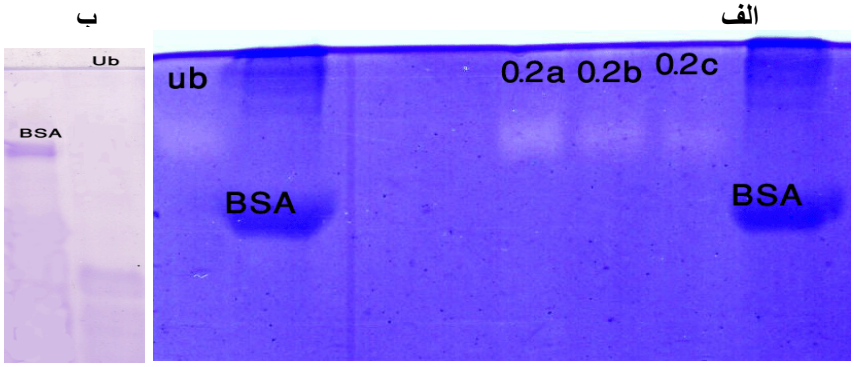
جداسازی و خالص سازی پروتئاز

منحنی کروماتوگرام حاصل از بارگیری محتویات کیسه دیالیز روی ستون Q-sepharose در شکل۱–الف مشاهده می شود. از نقاط قله نمودار تحت شرایط استاندارد تست فعالیت گرفته شد(شکل ۱–ب). شکل۲ الف، آنالیز زیموگرام فراکشن های فعال آنزیمی را نشان می دهد. بر اساس الگوی حرکت در SDS-PAGE وزن مولکولی فراکشن های دارای پروتئاز (طبق زیموگرام) حدود ۷۸ کیلودالتون را نشان می دهد(شکل۳ ب).



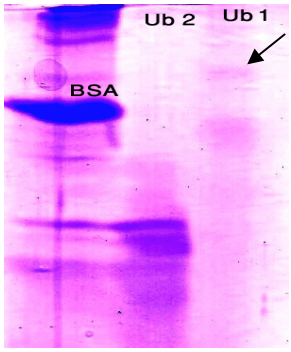


شکل ۱. منحنی کروماتوگرام بر اساس جذب ۲۸۰ nm (الف) و فعالیت آنزیمی (ب).خالص سازی فراکشن ها ی مختلف برروی ستون Q-Sepharose. فراکشن های مربوط به unbound غلظت نمکی ۰.۱(a,b)، ۰.۲ (a,b,c)و۰.۳(a,b) دارای بیشترین فعالیت می باشند.



شکل ۲–آنالیز زیموگرام و SDS-PAGE فراکشن متصل نشده(Ub). (الف)، فعالیت پروتئازی در نمونه متصل نشده وجداشده در محلول های نمکیM ۰/۲ NaCl را نشان میدهد. بدلیل بالا بودن مقدار آنزیم در نمونه متصل نشده ادامه مطالعه بر روی آن متمرکز شده است. BSA آلبومین سرم گاو با وزن مولکولی ٦٦ kDa است. (ب)، ژل SDS-PAGE فراکشن متصل نشده(Ub) را نشان می دهد.

با توجه به نتایج موجود، این فرضیه مطرح شد که آنزیم پروتئاز موجود در آنالیز زیموگرام مونومر نیست و زیر واحد های آن طی فرآیند آماده سازی نمونه برای ژل SDS-PAGE در حضور مرکاپتواتانول وحرارت از هم جدا می شوند. برای اثبات این فرضیه نمونه متصل نشده را یکبار در شرایط احیایی و یکبار در شرایط غیر احیایی آماده سازی کرده و روی یک ژل SDS-PAGE بارگیری کردیم(شکل ۳).



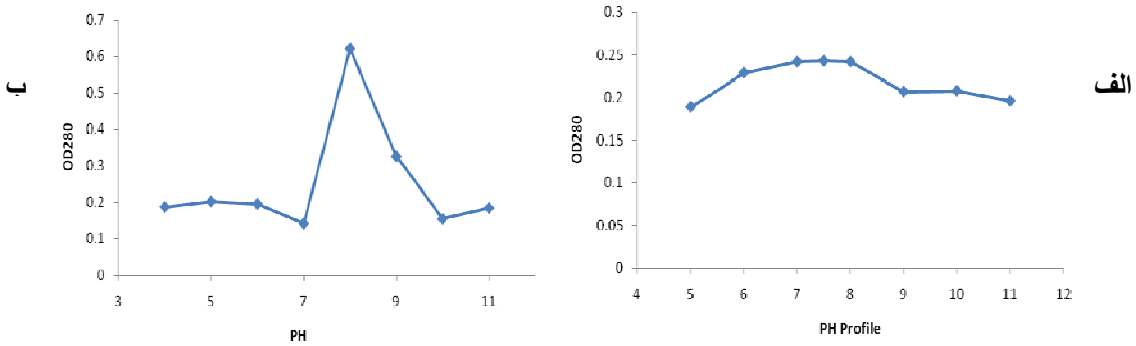
شکل ۳– SDS-PAGE نمونهUb در دو حالت– فرم غیر احیایی (Ub1) و فرم احیایی (Ub2) در حضور BSA به عنوان استاندارد. پیکان محل آنزیم پروتئاز را نشان می دهد.

همانطور که در شکل مشاهده می شود حضور باند اضافی در شرایط غیر

احیایی نسبت به شرایط احیایی، حاکی از وجود بیش از یک زیرواحد در آنزیم پروتئاز است.

منحنی های pH بهینه و پایداری در pH های متفاوت:

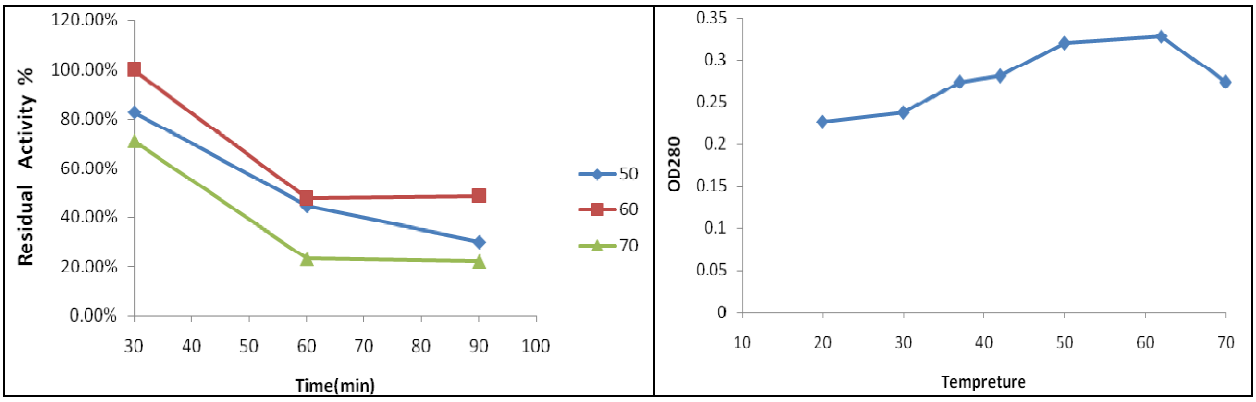
آنزیم مورد نظر در pH=7.5 بیشترین فعالیت را نشان می داد(شکل ٤ الف). پایداری pH آنزیم نیز که با انکوباسیون آنزیم در مقادیر pH مختلف طی ٤٨ ساعت سنجش شده بود، نتایج نشان داد که pH=8 پایدارترین pH برای فعالیت آنزیم است(شکل ٤ ب). بنابراین، پروتئاز جداشده فعالیت گسترده ای در محدوده pH های ۵تا ۱۱ داشته و بیشترین فعالیت را در محدوده۷–۸ دارد از طرفی، فعالیت باقیمانده آن در pH = ۸ بیش از سایر موارد است(شکل ٤ب).



شکل ٤– منحنی pH فعالیت آنزیمی(الف)، آنزیم در pH های خنثی بیشترین فعالیت را نشان می دهد. (ب) منحنی پایداری باقیمانده پس از ٤٨ ساعت در pH های گوناگون.

اثر دما روی فعالیت و پایداری آنزیم:

دمای بهینه فعالیت آنزیم دمای ٦٢ درجه سانتی گراد است که در دو طرف این دما فعالیت به تدریج کم می شد(شکل۵ الف). غیر فعال سازی غیر قابل برگشت پروتئاز نیز در دمای ۵۰ ، ٦۰ و ۷۰ درجه در زمان های مختلف (۳۰ تا۹۰ دقیقه) بررسی شد(شکل۵ ب) و مشخص شد که ناپایداری دمایی در دماهای بالاتر زودتر اتفاق می افتد.



(ب)	(الف)

شکل ۵- اثر دما روی فعالیت آنزیم (الف)، آنزیم در دمای ٦٢ درجه بیشترین فعالیت را نشان می دهد. (ب)، منحنی فعالیت باقیمانده در دماهای مختلف.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه ضمن شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه ای از باکتری سودوموناس موجود در فلور میکروبی چشمه آبگرم دیگ رستم، موفق به جداسازی اولیه یک پروتئاز چند زیر واحدی شدیم که دارای وزن مولکولی در حدود ۷۸ کیلودالتون با pH بهینه برابر ۷/۵ و دمای بهینه ٦٢ درجه سانتی گراد است. نیم عمر آنزیم در دمای ٦٠ درجه سانتی گراد در حدود ۱ ساعت است. با توجه به pH بهینه۷/۵، و مقایسه آن با سایر پروتئاز ها مانند ترپیسن، کیموترپسین که دارای pH بهینه در حدود۷–۸ هستند، پروتئاز جداشده به نظر می رسد که خواص ساختاری و عملکردی مشابه با آنها داشته باشد که نیازمند مطاله بیشتر در این زمینه است.

References

1. Anwar Adil, M Saleemuddin (1998). Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology , 64* (3), 175-183.
2. Desantis, T. Z., Dubosarkiy, I., Murray, S. R., & Andersen, G. L. (2003). Bioinformatics (Oxford,England), 19, 1461–1468.
3. Eftekhar Fereshteh, Jamsheed Fouladi and Mehrzad Faghihi. (2003). Isolation and identification of an alkaline protease producing Bacillus from soil. IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, Vol. 1, No. 3.
4. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., & Krieg, N. R. (1994). Methods for General and MolecularBacteriology, Washington DC, American Society for Microbiology.
5. Gupta.R, Q.K. Beg, P. Lorenz(2002).Bacterial alkaline proteases: molecular approaches
6. and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol ,59,15–32.
7. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
8. Moradian F, K. Khajeh, H. Naderi-Manesh & M. Sadeghizadeh, (2009). Isolation, Purification and Characterization of a Surfactants-, Laundry Detergents- and Organic Solvents-Resistant Alkaline Protease from Bacillus sp. HR-08, Appl Biochem Biotechnol 159:33–45.
9. Samal Babru B, Barbara Karan, Carol Parker and Yitzhak Stabinsky(1991). Isolation and thermal stability studies of two novel serine proteinases from the fungus Tritirachium album Limber. Enzyme and Microbial Technology,13(1),66-70.
10. Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. NewYork: Cold Spring Harbor.
11. Shimogaki H, Takeuchi K, Nishino T, Ohdera M, Kudo T,Ohba K, Iwama M. Irie M. (1991) Purification and properties of a novel surface-active agent and alkaline-resistantprotease from Bacillus sp. Y. Agric. Biol. Chem.55(9): 2251-8.
12. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173, 697-703.