عزل وتنقية وتوصيف بعض البروتييزات السيستينية من حليب الأبقار المصابة بالتهاب الضرع

Isolation, Purification, And Characterization Of Some Cystein Proteases From Bovine Mastites Milk

كفاح سعيد عباس دوش
قسم علوم الاغذية والتقانة الاحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

K.S. Doosh
Dept. of Food Science and Biotechnology / College of Agriculture/ University of Baghdad

المستخلص :

درست فعالية أنزيمات البروتييز السيستينية في حليب الأبقار المصابة بالتهاب الضرع ووجد ان هناك أربع قمم بروتينية F4, F3, F2, F1 تمتلك فعالية أنزيمية تم فصلها بطريقة كروماتوكرافي التبادل ألايوني السالب باستخدام عمود DEAE- Cellulose وأتضح من استخدام المواد المنشطة والمثبطة إنها تعود إلى مجموعة البروتييزات السيستينية . تم اختيار القمة الرئيسة منها المتمثلة بالقمة الرابعة F4 والتي أجريت عليها خطوة تنقية أخرى بطريقة كروماتوكرافي الترشيح الهلامي وذلك بامرارها من خلال عمود Sephadex G-100 إذ بلغت الحصيلة الأنزيمية النهائية وعدد مرات التنقية لها 31.81 % و 46.66 مرة على التوالي . اجري الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة لاختبار نقاوة الأنزيم وظهر انه منقى لحد التجانس وذلك لظهور حزمة بروتينية واحدة . أظهرت نتائج توصيف الأنزيم ان وزنه ألجزيئي يقدر (31000 و 30000) دالتون عند تعينه بطريقة الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي بوجود المواد الماسخة SDS – PAGE (SDS) . بلغ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم 6.0 وتراوح المدى الامثل لثباته بين 4.5 – 6.5 واظهر الأنزيم أقصى فعالية عند درجة حرارة 45 م . أشارت نتيجة دراسة الثبات الحراري إن الأنزيم كان فعالا عند حضنه في مدى درجات حرارة بين(20–80) م واحتفظ الأنزيم بكامل فعاليته عند حضنه بدرجات حرارة(30– 50) م لمدة 30 دقيقة و 50 و 20 و 10% من فعاليته عند حضنه بدرجة حرارة (60 ، 70 ، 80) م لمدة 30 دقيقة على التوالي . كما وجد ان الأنزيم لم يتأثر بالعوامل المثبطة للبروتييزات المعدنية والاسبارتية والسيرينية بل تثبط بالكامل عند معاملته بالمثبط المتخصص بالبروتييزات السيستينية مثل IAA و PCMB وتنشط بفعل كل من Mercaptoethanol، Dithiotheritol، Cysteine ومن مجمل النتائج التي تم التوصل لها يستنتج انه من المحتمل ان يكون الأنزيم قيد الدراسة هو Cathepsin B .

Abstract

Proteolytic activity of cysteine proteases were studied in bovine mastitis milk, four fractions designated as F1,F2,F3,F4 with cysteine protease activity were separated from leukocytes cell by ion- exchange Chromatography through DEAE-Cellulose The most active fraction F4 was selected for further purification utilizing gel filtration Chromatography on Sephadex G-100 column it has been found that F4 most likely being cathepsin B. purification folds and the enzyme yield was 46.66 and 31.81% respectively . polyacrylamide gel electrophoresis test indicated that the enzyme has been purified to homogeneity by giving a single band . The results of enzyme characterization showed that the molecular weights were 31000 and 30000 Daltons as

determined by gel filtration and electrophoresis methods in present of reducing agent SDS- PAGE respectively. The optimum pH for the enzyme activity was 6.0 and it was stable at pH values ranged between 4.5 - 6.5 .The enzyme exhibited the maximum activity at 45?C and the enzyme retained its entire activity over 30 min incubation at 30 -50 C and it retained (50, 20, 10) % of its entire activites over 30 min incubation at (60, 70, 80) C respectively. From this results and results observed from the effect of inhibitor and activator reagents we suggest that enzyme F4 possibly belonged to cathepsin B.

المقدمة :

أشارت الدراسات السابقة ان هناك العديد من الأنزيمات المحللة للبروتين قد تم تشخيصها في حليب الأبقار[1، 2 ، 3] . إذ تلعب هذه الأنزيمات دورا مهما في صناعة الألبان ولعل أول أنزيم قد تم تشخيصه هو أنزيم البلازميين الذي حظي باهتمام واسع من قبل العديد من الباحثين [4 ،5] وذلك للدور الكبير الذي يبديه في تحليل البروتينات اثناء إنضاج الاجبان ويعد البلازميين البروتييز الرئيس الموجود في الحليب الطبيعي إلا أن فعالية تحلل بروتيني تعود إلى بروتييزات أخرى في حليب الأبقار ظلت غير معروفة لغاية عام 1972 إذ استطاع [6] ولأول مرة من تشخيص فعالية تحلل بروتيني تعود إلى أنزيم بروتييز أخر أطلق عليه في حينها اسم بروتييز الحليب ألحامضي وذلك لتمييزه عن بلازمين الحليب القاعدي وبعد استكمال البحث حول طبيعة هذا البروتييز [3] . كما أثبتت الدراسات اللاحقة وجود فعالية عالية لأنزيمين أخرين من مجموعة البروتييزات السيستينية تم عزلها من الشرش ألحامضي باستخدام طرق الفصل الكروماتوكرافي تعود احدهما إلى Cathepsin B (CTP B) [7] . وتمكن[8] من عزل وتنقية CTP B من حليب ألأبقار باستخدام الشرش الحامضي كمادة خام لبدء عمليات العزل إذ شخصت خمس قمم تمتلك فعالية أنزيمية تعود إلى مجموعة بروتييزات السيستين رمز لها F V, F IV, F III, F II, F I على ضوء استردادها من عمود الفصل Q-Sepharose . وأخيرا تم إثبات وجود فعالية عالية لأنزيم الالاستيز والكولاجينيز في حليب الأبقار تتناسب طردياً مع أعداد الخلايا الجسمية وحالة الضرع الصحية [9 ،10 ، 11] وتشير العديد من الدراسات الحديثة إن هناك العديد من البروتييزات في الحليب لازالت غير مكتشفة لحد ألان [3، 12] .

انطلاقا من أهمية ألانزيمات المحللة للبروتين في صناعة الألبان وخصوصاً أثناء الخزن ونظراً لندرة الدراسات التي أجريت حول موضوع عزل وتنقية وتوصيف الكاثبسينات من حليب الأبقار داخل القطر وحتى على مستوى العالم لذا اجريت هذه الدراسة للوقوف على طبيعة هذه الأنزيمات وأعدادها ودراسة بعض خصائصها التي لها علاقة بصناعة الألبان .

المواد وطرق العمل :

مصدر الأنزيم :حقنت اضرع أبقار سليمة تابعة لحقل قسم الثروة الحيوانية – كلية الزراعة– جامعة بغداد بمقدار 2 مللتر من محلول الذيفان الداخلي لبكتريا *Escherichia. coli* وبتركيز 2 مايكروغرام /مل المذاب في دارئ الفوسفات الملحي والمجهز من شركة Sigma لغرض إحداث التهاب ضرع مفتعل وفقاً لما ذكره [10] . جمع الحليب لمدة ثلاثة أيام متعاقبة ، عزلت منه الخلايا المتعددة الأشكال النووية (PMN) باستخدام تقنية التدرج باستعمال Ficoll المذكورة من قبل الباحث ذاته ، عرضت هذه الخلايا لعملية تجنيس باستخدام مجنس يدوي زجاجي وعلى درجة حرارة 4 م ثم اجريت للعالق المجنس عملية نبذ مركزي مبرد على نفس درجة الحرارة المذكورة أعلاه للتخلص من جدران الخلايا وعد الراشح مستخلص للأنزيم الخام لاجل خطوات التنقية والتوصيف اللاحقة .

1. **فعالية الأنزيم :** قدرت فعالية الأنزيم تبعا لـ [13] وذلك بإضافة 0.1 مل من المحلول الأنزيمي إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 0.95 مل من محلول سستين بتركيز 20 ملي مولار وEDTA بتركيز 4 ملي مولار (المحضر أنيا بإذابة 0.06 غم من السستين و 0.037 غم من EDTA في محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.1 مولار ذو الرقم الهيدروجيني 6.0) حضن المزيج بدرجة حرارة 35م لمدة 3 دقائق ثم أضيف إليه 0.95 مل من محلول الكازين بتركيز 1% وحضن المزيج بدرجة حرارة 35م لمدة 10دقائق . أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول 5 %حامض ألخليك الثلاثي الكلور (TCA) وترك المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 60 دقيقة بعدها نبذ المزيج بسرعة 3000g لمدة 20 دقيقة وفصل الرائق بهدوء . قيس الامتصاص الضوئي للرائق على طول موجي 280 نانوميتر . حضر محلول الكفء (Blank)بإتباع الخطوات المذكورة أعلاه باستثناء إضافة TCA إلى محلول التفاعل قبل إضافة الأنزيم . تعرف وحدة

الفعالية التحللية بأنها كمية الأنزيم التي تزيد الامتصاصية وحدة واحدة بطول موجي 280 نانوميتر في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة .

2. **تقدير تركيز البروتين** :اتبعت طريقة Bradford [14] في تقدير البروتين.
3. **تنقية الأنزيم** : رسب الأنزيم الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب إشباع تراوحت بين 20 – 90 % تبعتها خطوة استخدم فيها عمود التبادل ألايوني السالب DEAE-Cellulose ذي الأبعاد 2.4 × 26 سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 6.0 بسرعة جريان 36مل /ساعة وبواقع 3مل/ أنبوبة واستردت الأجزاء المرتبطة بالمبادل باستخدام أسلوب التدرج الملحي الخطي لكلوريد الصوديوم وبالتركيز (0 -1) مولار في محلول فوسفات الصوديوم الدارئ . جمعت الأجزاء المحتوية على الفعالية الأنزيمية وجرت عملية التنافذ الغشائي مقابل عدة تبديلات من محلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.01 مولار بدرجة حرارة 4 م ثم قيس حجمه ، قدرت فعالية الأنزيم وحدد تركيز البروتين فيها ثم ركز المحلول الأنزيمي باستخدام مادة البولي اثيلين كلايكول PEG-10000 ثم تلتها خطوة تنقية أضافية متمثلة باستخدام عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 بأبعاد 2 × 65 سم وذلك بامرار المحلول الأنزيمي المركز (القمة الأنزيمية الرئيسة) حيث تمت موازنة العمود والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.1 مولار-كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار برقم هيدروجيني 6.0 ، جمعت الأجزاء بحجم 3مل/ أنبوبة وبسرعة جريان 21 مل /ساعة ، جرى قياس الامتصاص الضوئي على 280 نانومتر للأجزاء المستردة مع قياس فعالية الأنزيم فيها . جمعت الأجزاء المحتوية على الفعالية وتمت عملية التنافذ الغشائي تجاه محلول الفوسفات الداري بتركيز 0.01 مولار بدرجة حرارة 4 م ، قيس الحجم وتركيز البروتين والفعالية ، ركز المحلول الأنزيمي باستخدام البولي اثلين كلايكول ثم حفظ بالتجميد لحين استخدامه في الفحوصات اللاحقة .
4. **تعيين نقاوة الأنزيم** : اتبعت طريقة Laemmli [15] في تعيين نقاوة الأنزيم بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة SDS .
5. **توصيف الأنزيم** : شمل إجراء الاختبارات التالية للأنزيم المنقى :

1. تقدير الوزن ألجزيئي لأنزيم بروتييز القمة F4 بطريقة الترشيح الهلامي Gel filtration استخدم عمود هلام السيفادكس Sephadex G-100 بأبعاد 2 × 65 سم المهيأ أساسا لتنقية الأنزيم في تقدير الوزن ألجزيئي. تمت موازنة العمود بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار- كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار المحتوي على 0.02% أزيد الصوديوم. قدر حجم الفراغ (Vo) للعمود بإمرار محلول الدكستران الأزرق بتركيز (4ملغم/ مللتر) واحتسبت مجموع حجوم الأجزاء المنفصلة من بداية إمرار محلول الدكستران إلى قمة امتصاصه على طول موجي 600 نانومتر أما حجوم الاسترداد (Ve) للبروتينات القياسية والأنزيم فقد قدرت بحساب عدد المللترات النازلة من عمود الترشيح الهلامي وإلى منتصف قمة المادة المفصولة بعد قراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتراً استخرج الوزن ألجزيئي للأنزيم من خلال رسم العلاقة الخطية بين نسبة حجم استرداد كل بروتين قياسي إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) مقابل لوغاريتم وزنه ألجزيئي. شملت البروتينات القياسية كل من Lysozyme، Trypsin ، Pepsin، Ovalbumin، Bovine serum albumin ذات أوزان جزيئية تبلغ (23,14.4, 35, 43, 67) كيلودالتون على التوالي .
2. **تقدير الوزن ألجزيئي لأنزيم بروتييز القمة F4 بطريقة الترحيل الكهربائي** اتبعت الطريقة [15] لإجراء الترحيل الكهربائي لإنزيم البروتييز المنقى و محاليل البروتينات القياسية والتي شملت كل من (Lysozyme ، Trypsin، Bovine serum albumin، Collagenase(A,B)، Transferrin، γ-Globulin) ذات أوزان جزيئية 14.4, 23, 67, 65 ، 105 , 80 , 150 KD على التوالي . وبعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي قيست المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الزرقاء كما قيست المسافات التي قطعتها حزم الأنزيم والبروتينات القياسية المنفصلة واستخرجت قيمة الحركة النسبية Relative mobility(Rm) لكل واحدة منها وتم تقديرالوزن ألجزيئي للإنزيم المنقى من رسم العلاقة الخطية بين لوغاريتم الوزن ألجزيئي للبروتينات القياسية مقابل الحركة النسبية لها .
3. **تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم بروتييز القمة F4** : لتعيين الأرقام الهيدروجينية لفعالية الأنزيم التحللية استخدمت ثلاثة أنواع من المحاليل الدارئة بتركيز 0.2 مولار بغية الحصول على قيم مختلفة للأرقام الهيدروجينية وهي محلول خلات الصوديوم الدارئ وبأرقام هيدروجينية تراوحت (2.0-5.5) ، محلول فوسفات الصوديوم أحادي وثنائي الهيدروجين بأرقام هيدروجينية تراوحت (6.0 -8.0) ومحلولTris-HCL الدارئ وبأرقام هيدروجينية (8.5-9.0). حيث تم قياس فعالية الأنزيم في قيم مختلفة من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (9.0-

2.0) باستخدام الكازين كمادة للتفاعل بدرجة حرارة 37 م لمدة 10 دقائق وحسب [13] ثم رسمت العلاقة بين الفعالية التحللية للأنزيم والرقم الهيدروجيني لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم.

4. **تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم** حضن حجم معين من الأنزيم المنقي في حجم مساو له من المحاليل الدارئة ذات قيم أرقام هيدروجينية مختلفة (2.0-9.0) المذكورة في الفقرة 5 -3 في أنابيب اختبار لمدة نصف ساعة في حمام مائي بدرجة 37 م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي وبعدها جرى قياس فعالية الأنزيم التحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الأنزيمية المتبقية (%) مقابل الأرقام الهيدروجينية لمحلول الأنزيم لتحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الأنزيم .
5. **تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم** قدرت فعالية الأنزيم التحللية على درجات حرارة مختلفة قدرها (20، 25،30،35،40،45، 50، 55،60،65، 70، 75، 80) م؟ باستخدام الكازين المذاب في دارئ الفوسفات ذو رقم هيدروجيني 6 كوسط للتفاعل وحسب [13] .
6. **دراسة الثبات الحراري للأنزيم:** حضن الأنزيم في حمام مائي في درجات حرارية مختلفة قدرها (20، 25،30،35،40،45، 50، 55،60،65، 70، 75، 80)م لمدة 30 دقيقة ثم بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي وأضيف لها محلول التفاعل (الكازين) بالرقم الهيدروجيني الأمثل وجرى تقدير الفعالية الأنزيمية المتبقية[13] ورسمت العلاقة الخطية بين فعالية الأنزيم المتبقية (%) تجاه درجات الحرارة المختلفة لتعين درجة الحرارة المثلى لثبات الإنزيم .
7. **تقدير المحتوى الكربوهيدراتي :** تم باستخدام طريقة الفينول - حامض الكبريتيك المذكورة من قبل [16]
8. **دراسة تأثير الأيونات الفلزية وبعض الكواشف المنشطة والمثبطة في فعالية الأنزيم :**

حضرت محاليل كلوريدات الكالسيوم والزنك والمغنسيوم والمنغنيز والنحاس والصوديوم بتراكيز تراوحت بين 50 5 - ملي مولار، حضن الأنزيم مع محاليل هذه الكلوريدات بدرجة حرارة 37م مدة 30 دقيقة ثم قدرت الفعالية التحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل كما حضرت محاليل الكواشف الآتية:

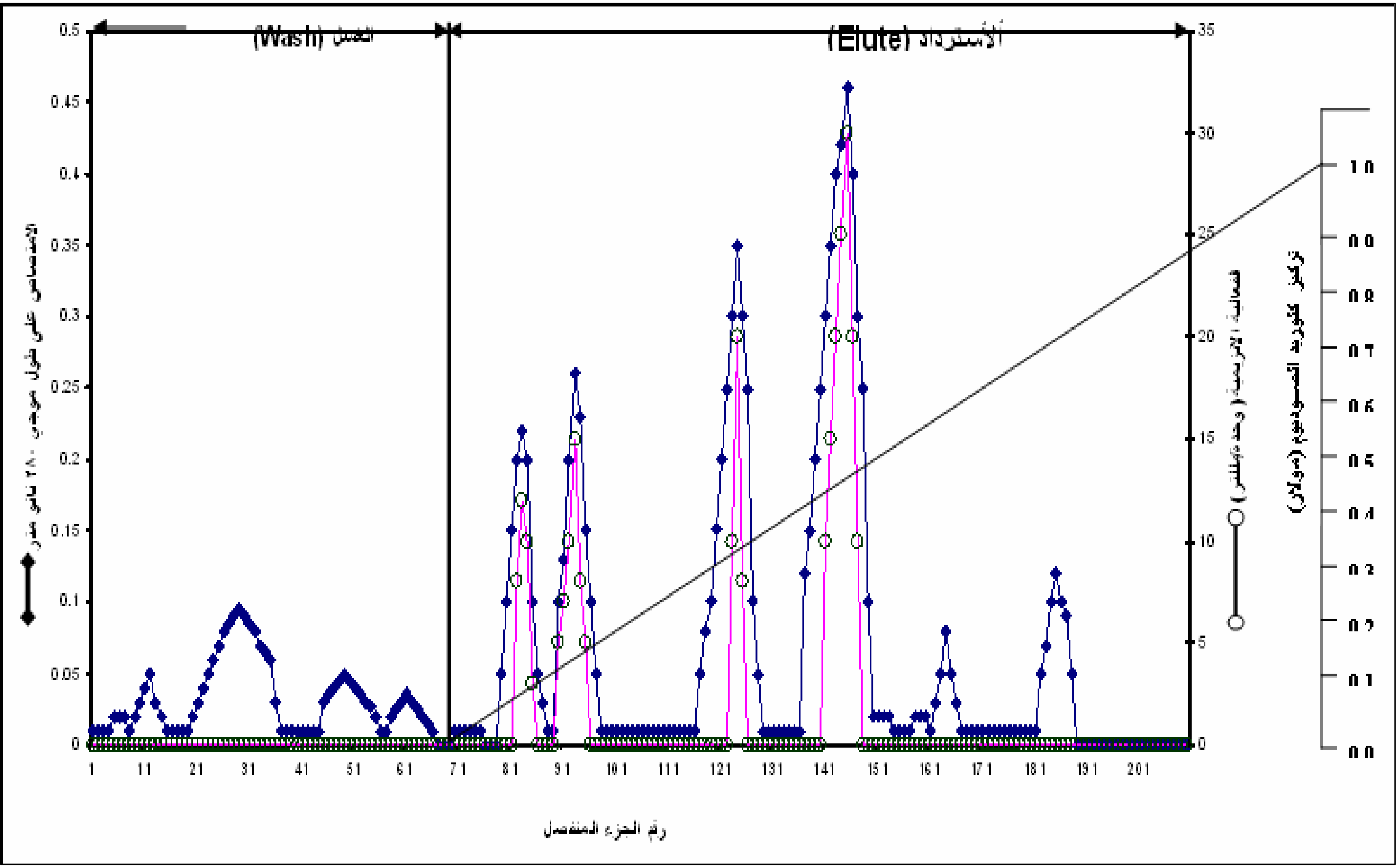
Pepstatin A (1mM);1,10- phenanthroline (10mM); Cysteine (10mM); Ethylene DiaminTetraacetic Acid (EDTA) (2mM) ; 2-Mercaptoethanol (10mM); Dithiotheritol (DTT)(10mM);Phenyl Methyl Sulphonil Fluoride (PMSF) (1mM); Iodo Acetic Acid (IAA)(0.1mM); Soybean trypsin inhibitor(SBTI) (0.125- 0.250 mg/ml); 6-minoHexanoic Acid (6-AHA) (120mM) ; P-chloromercurbenzoate (PCMB) (1mM).

حضن الأنزيم مع المحاليل المذكورة أعلاه بدرجة حرارة 37م مدة 30 دقيقة ثم قدرت فعاليته التحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل .

النتائج والمناقشة :

يلخص الجدول (1) طريقة التنقية بخطواتها ونتائجها والتي تضمنت ترسيب الأنزيم الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب إشباع تراوحت بين(20- 90)% إذ يتضح من النتائج ان نسبة الإشباع 90% أعطت أعلى فعالية أنزيمية تلتها خطوة استخدام فيها المبادل ألايوني السالب DEAE- Cellulose إذ تم الحصول على عدة قمم بروتينية في الأجزاء المستردة بالتدرج الملحي بملح كلوريد الصوديوم (0 - 1) مولار أظهرت أربعة منها فعالية بروتييزات سيستينية والتي تم إثباتها من خلال الفحوصات التأكيدية اللاحقة باستخدام العوامل المنشطة والمثبطة للبروتييزات السيستينية (شكل(1) . تتفق نتيجة هذه الخطوة من التنقية مع ما وجده [8] عند تشخيصه لفعالية البروتييزات الموجودة في الشرش ألحامضي المحصل عليه من حليب أبقار مصابة بالتهاب الضرع ان هناك خمس قمم بروتينية تمتلك فعالية بروتييزات سيستينية كما وتتفق النتيجة مع [4] الذي استخدام تقنية Zymograph لتشخيص فعالية التحلل ألبروتيني في مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار أحدث فيها التهاب ضرع مفتعل من ان الفعالية الأنزيمية الرئيسة تعود إلى العديد من أنزيمات البروتييز منها الالاستييز والكاثبسينات مثل كاثبسين D الاسباريتي و كاثبسين B السيستيني . بعد ان تم الحصول على العديد من القمم البروتينية التي تمتلك فعالية بروتييزات سيستينية من خطوة المبادل ألايوني السالب DEAE- Cellulose تم اختيار القمة الرئيسة المتمثلة بالقمة الرابعة (F4) حسب زمن استردادها من عمود التبادل ألايوني السالب والمتمثلة بالأنابيب (141-147) حيث كانت الحصيلة الأنزيمية وعدد مرات التنقية بعد خطوة التنقية بالمبادل ألايوني السالب DEAE- Cellulose لهذه القمة هي 35.79 % و 20 مرة على التوالي جدول(1).يجب الإشارة إلى أن القمم التي تحمل على سطحها شحنات مخالفة لشحنة المبادل ألايوني السالب DEAE-Cellulose تزداد قدرتها على الادمصاص على سطح المبادل المخالف لها بالشحنة وقد يكون الارتباط شديد بحيث يصعب فصلها لذا فإن زيادة تركيز

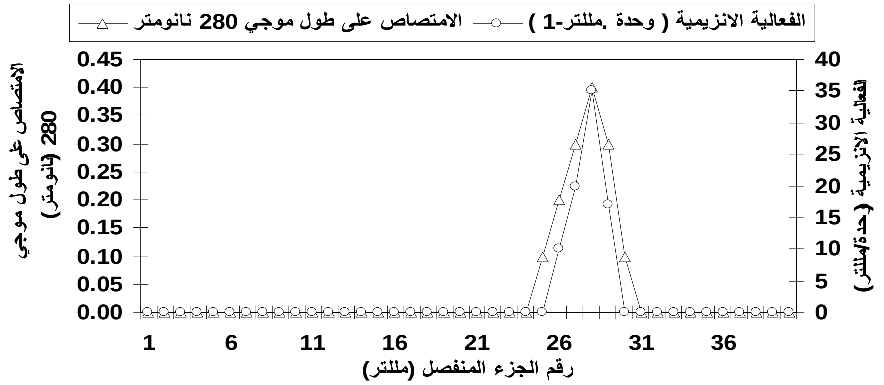
الملح في دارئ الاسترداد ساعد في عملية فصل مثل هذه البروتينات. وتعد طريقة التبادل الأيوني من الطرق الملائمة في الفصل الحيوي إذ يمكن بواسطتها تمييز نوعين من البروتينات، الفرق بينهما حامض أمين واحد . استكملت خطوة تنقية أنزيم القمة الرابعة F4 بأمرار المحلول الأنزيمي المنقى من الخطوة السابقة بعد ديلزته ثم تركيزه باستخدام PEG-10000 في عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 فظهرت قمة بروتينية واحدة وقمة فعالية واحدة متناسقة معها شكل(2) وكانت الحصيلة الأنزيمية وعدد مرات التنقية هي 31.81% و 46.66 مرة على التوالي . من خلال مراجعة الأدبيات التي نشرت سابقا بخصوص موضوع الدراسة أتضح أن هناك دراسات محدودة جدا تناولت موضوع عزل و تنقية أنزيمات البروتييز من خلايا الدم البيضاء المعزولة من حليب أبقار مصابة بالتهاب الضرع ومع ذلك لم تستخدم التقنيات نفسها التي استخدمت في الدراسة الحالية لذلك من الصعب مقارنة نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسات أخرى استخدمت فيها تقانات فصل متخصصة جدا وفي الأغلب في عزل وتنقية أنزيم واحد فقط من أنزيمات PMN ومن ثم دراسة صفاته حيث اتفقت نتيجة هذه الدراسة مع ما وجده [5] إذ استطاع أن يشخص فعالية عالية جدا CTP B في مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار أحدث فيها التهاب ضرع مفتعل وعلى مدى 72 ساعة من حصول الإصابة وذلك باستخدام وسط صناعي متخصص لعمل الأنزيم المدروس وهو عبارة عن ببتيدة سباعية كما وتتفق النتيجة مع ما توصل له [18] الذي شخص فعالية عالية للبروتييزات السيستبنية في الشرش ألحامضي المعزول من حليب ذو محتوى عالي من خلابا الدم البيضاء ولاحظ إن هذه الفعالية ترتبط بشكل معنوي مع ارتفاع أعداد خلايا الدم البيضاء في الحليب أي مع حالة الإصابة بالتهاب الضرع .



شكل (1) : كروماتوكرافي التبادل الأيوني لتنقية أنزيم cathepsin B من مجنس عالق خلايا PMNالمعزولة من حليب الضرع المصاب، باستخدام عمود المبادل ألايوني DEAE- Cellulose بابعاد 2.4 ×26سم تمت الموازنة باستخدام محلول الفوسفات الدارئ بتركيز0.01 مولار ورقم هيدروجيني 6.0،استردت الأجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوي على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت 0-1 مولار وبسرعة جريان 36 مل /ساعة وبواقع 3 مل للجزء الواحد

جدول (1) : خطوات تنقية انزيم البروتييز للقمة F4 المعزول من خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار أحدث فيها التهاب ضرع.

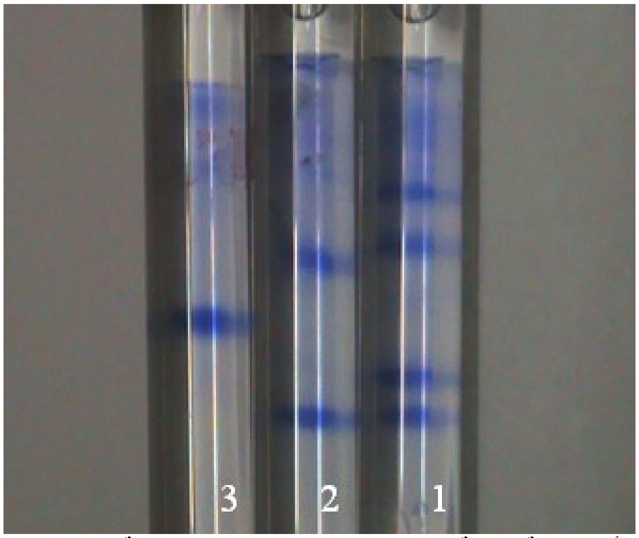
خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الأنزيمية (%)
المستخلص الخام	88	12	0.40	30.00	1056	1.00	100.00
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 90%	22	36	0.35	102.85	792	3.42	75.00
التبادل ألايوني السالب DEAE- cellulose لأنزيم بروتييز القمةF4	21	18	0.03	600.00	378	20.00	35.79
الترشيح الهلامي SephadexG-100 لأنزيم بروتييز القمةF4	12	28	0.02	1400.00	336	46.66	31.81



شكل (2) : كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-100 بأبعاد 2 ×65 سم لتنقية أنزيم القمة الرابعةF4 تمت الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار وبرقم هيدروجيني 6.0 والمحتوي على 0.2 مولار كلوريد الصوديوم وبسرعة جريان 21 مل/ساعة بواقع 3 مل للجزء الواحد

اختبار نقاوة الأنزيم

.أشارت نتائج الترحيل الكهربائي لأنزيم القمة الرابعة F4 خلال مراحل التنقية إلى إن الأنزيم الذي تمت تنقيته على عمود المبادل الأيوني السالب DEAE- Cellulose لا يزال محتويا على كمية قليلة من البروتينات الملوثة ولوحظ ظهور حزمة بروتينية واحدة بعد أجراء التنقية باستخدام الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-100 هلام رقم (3) واعتبر ذلك أحدى الأدلة على نقاوة الأنزيم شكل (3) .



شكل(3) : الترحيل الكهربائي أنزيم القمة الرابعة F4 المنقى من خلايا PMN المعزولة من حليب الضرع المصاب في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين إذ يمثل:

1-المستخلص الأنزيمي الخام

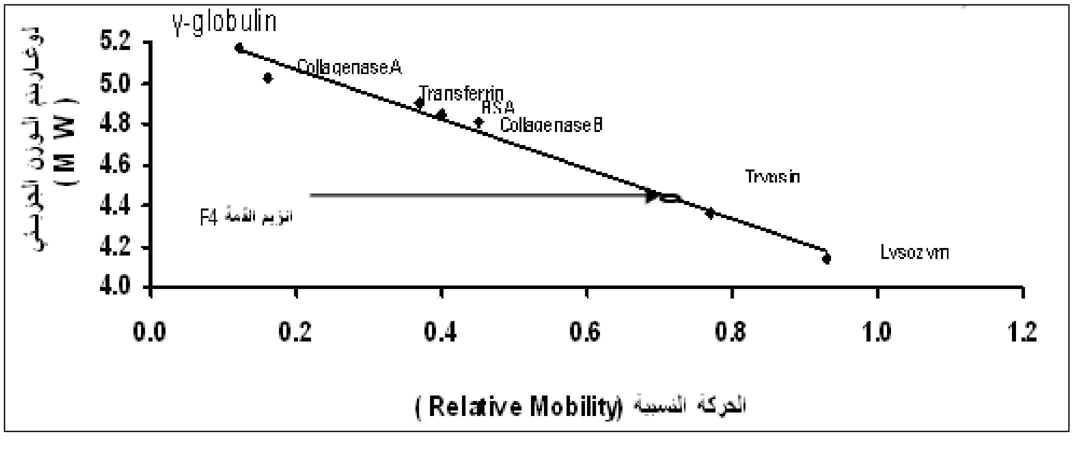
2-الأنزيم المسترد بعد خطوة التبادل الأيوني بوساطة (DEAE - Cellulose)

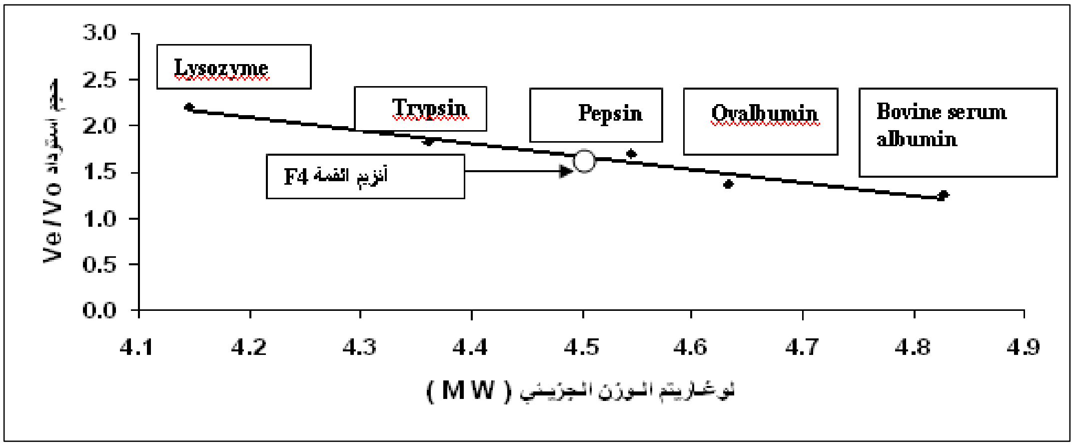
3-الأنزيم المسترد بعد خطوة الترشيح الهلامي بوساطة (Sephadex G -100)

توصيف الأنزيم

1. تقدير الوزن الجزيئي :

قدر الوزن ألجزيئي لأنزيم القمة الرابعة F4 بطريقة الترشيح الهلامي فبلغت قيمته 31000 دالتون شكل (4) كما أمكن أيجاد الوزن ألجزيئي للأنزيم المدروس بطريقة الترحيل الكهربائي فكان 30000 دالتون شكل (5) وجاءت هذه النتيجة ضمن المديات التي أشارت لها الدراسات السابقة حول البروتييزات السيستينية والتي تتراوح من 270000 -50000 دالتون اعتمادا على مصدره والهيئة التي يتواجد فيها الأنزيم [19] . وكانت هذه النتيجة متطابقة مع ما ذكره [20] من ان البروتييزات السيستينية تخلق على شكل proenzyme يقدر وزنها ألجزيئي بين (37-55) كيلودالتون تتحول بعدها الى الهيئة النشطة أو الفعالة التي يصبح عندها الوزن ألجزيئي 27-30 كيلودالتون. كما وتتفق نتيجة هذه الدراسة مع ماوجده [8] لأنزيم Cathepsin B المعزول من حليب الأبقار المقدر باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي الممنع والبالغ 31 كيلودالتون .

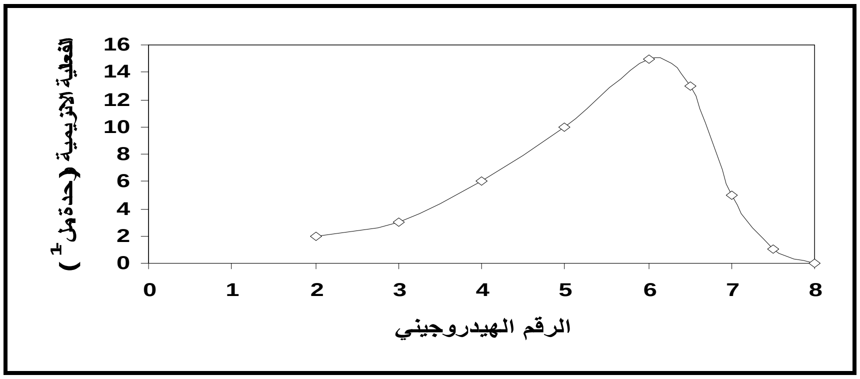




شكل(5) : المنحنى القياسي لتقدير الوزن ألجزيئي لأنزيم القمة الرابعة F4 المنقى من خلايا PMN بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين

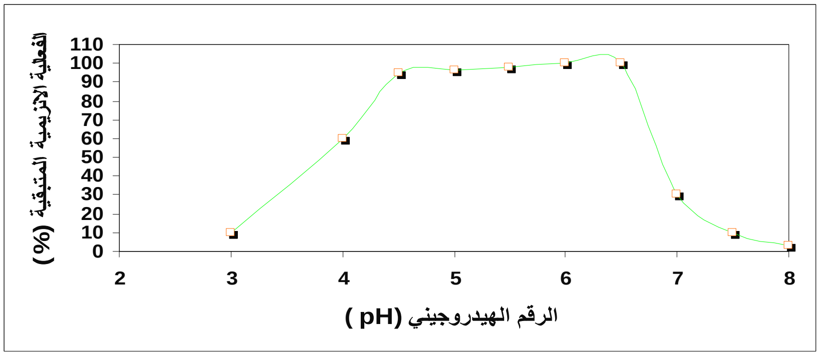
2.تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الأنزيم :

بينت النتائج الموضحة في الشكل (6) إن أفضل رقم هيدروجيني لفعالية أنزيم القمة الرابعة F4 هو 6.0 وفقد الأنزيم 85 و90 % من فعاليته عند قيم الأرقام الهيدروجينية 2.0 و 7.0 جاءت النتائج متوافقة مع ماوجده [19] عند دراسته للرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم CTP B البنكرياسي والبالغ 6.0 كذلك مقاربة الى النتيجة التي وجدها [8] الذي أشار إلى إن أعلى فعالية أنزيمية أظهرها CTP B المعزول من حليب الأبقار كانت عند رقم هيدروجيني تقع قيمته بين 5.5 -6.0 كما وجاءت النتيجة ضمن المدى الذي ذكره [7] للبروتييزات السيستينية في الحليب ألبقري والذي يقع بين 5.0 – 7.0.



شكل (6) : منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم القمة الرابعة F4 المعزول من خلايا PMN.

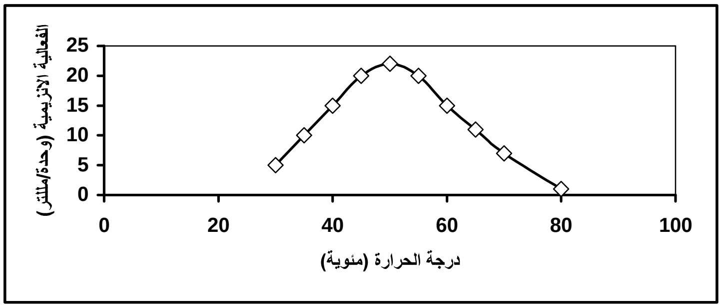
ويوضح الشكل (7) ثبات الأنزيم تجاه الأرقام الهيدروجينية المختلفة إذ امتلك الأنزيم ثباتا واسعا في مدى من قيم الأرقام الهيدروجينية يقع بين (4.5-6.5) إذ احتفظ الأنزيم 95-100% من فعاليته التحللية عند حضنه على الأرقام الهيدروجينية المذكورة لمدة 30 دقيقة على درجة حرارة 37م ، ويقع هذا ضمن المديات التي حددتها دراسات سابقة حول ثبات أنزيم CTP B من مصادره المختلفة [7، 21، 22] كما احتفظ الأنزيم قيد الدراسة 30% من فعاليته عند رقم هيدروجيني 7.0 و10%عند رقم هيدروجيني 3.0 .



شكل(7) : منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم القمة الرابعة F4 المعزول من خلاياPMN

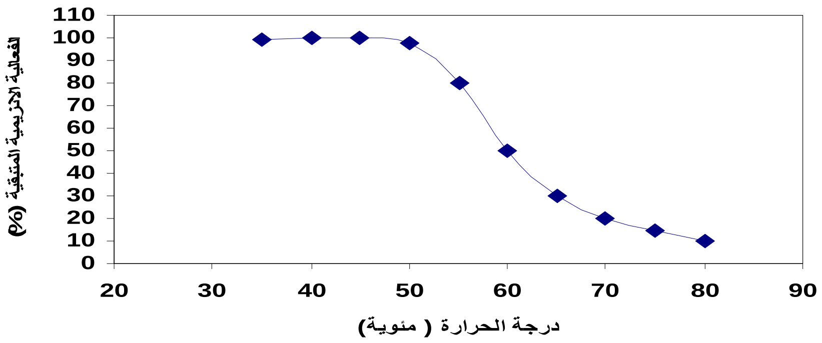
3. تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الأنزيم

وجد إن درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم CTP B كانت 45 م عند الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم شكل(8) إن هذه النتيجة تتوافق مع ماوجده [5] من أن أعلى فعالية أظهرها CTP B الموجود في مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار أحدث فيها التهاب ضرع مفتعل كانت تقع بين 40-45 م وكذلك مشابه الى فعالية أنزيم CTP B المعزول من البنكرياس والبالغة 40 م [9 ، 19 ، 20] كذلك مقاربة الى أنزيم CTP B المعزول من حليب الأبقار والبالغة 45 م [8] .



شكل (8) : منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم القمة الرابعة F4 المعزول من خلاياPMN

أما بالنسبة للثبات الحراري للأنزيم فظهر في الشكل (9) إن الأنزيم يكون ثابت في مدى حراري 30-50 م حيث احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه بتلك الدرجات الحرارية لمدة 30 دقيقة . انخفضت بعدها الفعالية انخفاضا تدريجيا بزيادة درجات الحرارة إذ احتفظ الأنزيم 50% من فعاليته عند معاملته بدرجة حرارة 60 م و 40% عند درجة حرارة 65 م و 20% عند درجة حرارة 70 م و10 % عند درجة حرارة 80 م لمدة 30 دقيقة لكافة الدرجات الحرارية المستعملة ويشير هذا إلى انه لا يمكن تثبيط الأنزيم قيد الدراسة بدرجة حرارة البسترة المستخدمة عادة في صناعة الألبان ولهذا السبب يجب ان يكون هناك اهتمام كبير لهذا الأنزيم قدر تعلق الأمر بتصنيع الألبان في الوقت الحالي . كانت النتائج مقاربة للنتيجة التي توصل لها [8] والتي تشير الى إن الأنزيم احتفظ 20 % من فعاليته عند معاملته بدرجة حرارة 72 م لمدة 30ثانية والتي استنتج منها الباحث إن الأنزيم يقاوم درجة الحرارة المستخدمة في معاملة البسترة التجارية HTST .



شكل (9) : تأثير درجة المعاملة الحرارية في فعالية انزيم القمة الرابعة F4 المعزول من خلايا PMN .

4. المحتوى الكربوهيدراتي للأنزيم :

بلغت النسبة المئوية للسكريات في أنزيم القمة الرابعة (F4) 10 % وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره العديد من الباحثين الذين أشاروا الى إن أنزيم CTP B من مصادره المختلفة يكون كلايكوبروتين [11،19 ،20] .

5. تأثير العوامل المنشطة والمثبطة في فعالية الأنزيم :

يتضح من نتائج جدول (2) ان أنزيمات البروتييز المعزولة من خلايا PMN والمنقاة باستخدام عمود التبادل ألايوني السالب DEAE- Cellulose لم تتأثر عند معاملتها بالمثبط المتخصص للبروتييزات المعدنية 1,10-Phenathroline كذلك لم تتأثر بالمثبطات المتخصصة بالبروتييزات الاسبارتية الحامضية مثل Pepstatin – A ولا بالمثبطات المتخصص بالبروتييزات السيرينية PMSF و SBTI وAHA -6 هذا مما يدل على ان الأنزيمات قيد الدراسة لا تعود الى مجموعة البروتييزات المعدنية ولا الاسبارتية ولا السيرينية ولكنها تثبطت بالكامل بالكواشف الخاصة بالبروتييزات السيستينية مثل IAA و PCMB وتنشطت بفعل كل من Mercaptoethanol بمقدار يتراوح من(8-9) مرات وDithiotheritol بمقدار (10-12) مرة و Cysteine بمقدار (3.0-4.5) مرة هذا مما يدل على ان الأنزيمات قيد الدراسة تعود الى مجموعة البروتييزات السيستينية كما وجد ان الأنزيمات لم تتأثر بكل من كلوريد الكالسيوم والنحاس وتثبطت بنسبة قاربت 50 % بفعل أملاح المغنسيوم والزنك والمنغنيز و10 % بفعل كلوريد الصوديوم . ومن خلال دراسة صفات أنزيم القمة الرابعة بشكل خاص على أساس انه يمثل القمة الرئيسة وجد ان فعاليته تأثرت بمقدار20 % بفعل Pepstatin A المثبط المتخصص بالبروتييزات الاسبارتية والتي جاءت مشابهه للنتيجة التي توصل لها [8] عند معاملت Cathepsin B المعزول من الشرش ألحامضي لحليب الأبقار و Cathepsin B التجاري بالمثبط Pepstatin A واستنتج الباحث من ذلك ان هناك علاقة معقدة بين البروتييزات السيستينية والاسبارتية وان Pepstatin A يعمل كمثبط تنافسي لفعالية Cathepsin B ويعتقد ان Cathepsin D يعمل كمنشط لفعالية Cathepsin B . ومن خلال دراسة باقي صفات الأنزيم منها صافي الشحنة السالبة التي يحملها والتي جعلته يرتبط بالمبادل ألايوني السالب وكذلك من خلال الرقم الهيدروجيني الامثل ودرجة الحرارة المثلى والوزن ألجزيئي المطابق جدا لأنزيم CTP B المعزول من حليب أبقار مصابة بالتهاب الضرع في دراسات سابقة [5،7 ،10، 18] ومن مجمل الأدلة يمكن القول أن الأنزيم المفصول في القمة الرابعة قد يكون CTP B .

جدول (2) : تأثير بعض الكواشف في فعالية البروتييزات السيستينية المنقاة من خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار مصابة بالتهاب الضرع

	المادة الكيمياوية	التركيز(ملي مولار)	الفعالية المتبقية (%)			
	أنزيم غير معامل	–	100			
	رقم الأنزيم المفصول		F1	F2	F3	F4
1	Pepstatin A	1mM	100	100	100	80
2	PMSF	1mM	110	100	100	95
3	6- AHA	120 mM	100	100	100	100
4	Iodo acetic acid	0.1mM	0	0	0	0
5	PCMB	1mM	0	0	0	0
6	SBTI	0.125 mg/ml	100	100	100	100
		0.250 mg/ml	100	100	100	100
7	EDTA	2mM	105	110	140	170
8	DTT	10mM	1100	1010	1000	1210
9	1,10-Phenathroline	10mM	100	103	107	100
10	2- Mercaptoethanol	10mM	800	950	813	900
11	Cysteine	10mM	350	400	312	465
12	ZnCl	25mM	50	59	55	55
13	$CaCl_2$	50mM	100	100	100	100
14	$CuCl_2$	5mM	100	100	100	100
15	$MgCl_2$	25mM	47	50	55	49
16	$MnCl_2$	25mM	59	60	58	60
17	NaCl	10mM	99	95	93	100
18	NaCl	50mM	90	90	90	90

المصادر:

1. Considine , T. 2000. Role of somatic cell count and proteinases in dairy product quality. Ph. D. thesis .University Collage Cork, Ireland.
2. Fox, P. F; Kelly, A. L. (2006a). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects-Part 1. Int Dairy. J .10: 19-22.
3. Fox, P. F ; Kelly, A . L. (2006b) . Indigenous enzymes in milk: Overview and historical spects-Part 2. Int. Dairy J .10: 551-559.
4. Mehrazad, J. ; Desrosiers , G . ; Lauzone, K . ; Robitaille , G .; X . Zahao ,X. and Lacasse , P . 2005. Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin - induced mastitis in dairy cows. J Dairy Sci .88:211 -222.
5. Moussaoui, F ; Michelutti ,L. ; LeRoux, Y. and Laurent, F . 2002. Mechanisms involved in milk endogenous proteolysis induced by lipopolysaccharide experimental mastitis. J Dairy Sci .85:2562 -2570.
6. Kaminogawa, S.; Yamauchi, K . (1972). Acid protease of bovine milk. Agric. Biol Chem. 36: 2351 -2356.
7. Suzuki, J. and Katoh, N. 1990. Cysteine protease in bovine milk capable of hydrolyzing casein as the substrates and elevation of the activity during the course of mastitis. Jap J Vet Sci. 52: 947 - 954.
8. Magboul, A. A.; Larsen, L.B. ; McSweeney, P.L.M. and Kelly, A.L. (2001). Cysteine protease activity in bovine milk. Int. Dairy. J. 11: 865 - 872.

9. Haddadi, K. ; Mathieu, P. ; Moussaoui, F.; Fauren, G.; Vangroen, F. and Burvenich, F. G. (2006) . PMN and *E.coli*: Proteases involved in proteolysis of casein during experimental *E.coli* mastitis. Int Dairy. J .10:1016 -1022.

10. Mathieu, C. ; LeRoux,Y. ; Faure, G.C. ; Laurent, F. ; Bene,M.C. and Moussaoui , F. 2002. Enzymatic activities of Bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.

11. Somers, J.; O'Brien, B.; Menney, w. and Kelly, A. L.2003. Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. J Dairy Res. 70: 45 -50.

12. International Dairy Federation. (2005) . Somatic Cell Count in milk. Their significance and recommended methods for counting. symposium on indigenous enzyme in milk , Cork , Ireland ,20 -22 April ,2005 .

13. Aworth, O.C. and Nakai, S. (1986). Extraction of milk clotting enzyme from Sodom Apple *(Calotropis procera*) . J . Food Sci .51 (6) 1569-1570.

14. Bradford, M .M. 1976 . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Analytical Bioch. 72:248 -254.

15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature .227: 680 – 690.

16. Dubiose, M. ; K. A. Gilles; J. K. Hamiton ; P. A. Robers and F. Smith. 1956 . Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem.228:350 -356.

17. Pharmacia Fine Chemical AB Publication. (1980). Ion - exchange chromatography. Principle and methods. Uppsala.

18. O'Driscoll, B. M.; Rattray, F. P.; McSweeney, P .H. L. and Kelly, A. L. (1999). Protease activites in raw milk determined using synthetic heptapeptides substrate. J. Food Sci. 64:606 -611.

19. Kirschke, H.; Barrett, A. J. and Rawling, N. D.(1998). Lysosomal cysteine proteinases. , 2nd ed, Oxford University press.

20. Katunuma, N. and Kominani, E. (1983) . Structure and function of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitors Curr.Top.Cell .Regel .27:345.

21. Bird, J .W. C.; Carter, J.; Triemer, R. E.; Brooks, R .M. and Spnier, A. M. (1980). Proteinases in cardiac and skeletal muscle .Fed .Proc. Fed .Am Soc Exp Biol .39:20 -25.

22. Larsen, L. B.; McSweeney, P.L.H. ; Hayes, M.G. ; Andersen, J.B. ; Ingvartsen, K.I. and Kelly, A.L. 2006 . Variation in activity and heterogeneity of bovine milk protease with stage of lactation and somatic cell count. Int Dairy. J .17:1-8.