تنقية وتوصيف انزيم الالاستيز Elastase من حليب الابقار المصابة بالتهاب الضرع

كفاح سعيد دوش عامر محمد علي الشيخ صالح خالدة عبد الرحمن شاكر

الملخص

عزل الالاستيز Elastase من خلايا الدم البيض من نوع متعددة الاشكال النووية Polymorphonuclear Leukocytes المعزولة من حليب ابقار احدث فيها التهاب ضرع مفتعل وتمت تنقيته بعد ترسيبه بملح كبريتات الامونيوم وذلك باستخدام عمود كروماتوكرافي التبادل الايوني السالب DEAE- Cellulose تبع ذلك كروماتوكرافي الترشيح الهلامي خلال عمود Sephadex G-100 وكانت الحصيلة الانزيمية النهائية 18.15%وعدد مرات التنقية 8.06. اجري الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود المواد الماسخة لاختبار نقاوة الانزيم وظهر انه منقى وذلك لظهور حزمة بروتينية واحدة .اظهرت نتائج توصيف الانزيم ان وزنه الجزيئي يقدر بحدود 22500 و 23000 دالتون عند تعيينه بطريقة الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي (SDS – PAGE) بوجود المواد الماسخة . بلغ الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم 8.0 وتراوح المدى الامثل لثباته بين 7.0 - 9.0 وابدى الانزيم اقصى فعالية عند درجة حرارة 40م. اشارت نتيجة دراسة الثبات الحراري الى ان الانزيم كان فعالا في حضنه في مدى درجات حرارة بين 20– 80 م واحتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه في درجات حرارة 30 – 50 م لمدة 30 دقيقة . كما وجد ان الانزيم قيد الدراسة لم يتأثر بكل من كلوريد الزئبق والكالسيوم وتثبط بنسبة 50% بكلوريد النحاس و10% بكلوريد الصوديوم وعند معاملته بالكواشف المثبطة والمنشطة وجد ان الانزيم لم يتأثر بالعوامل المثبطة للبروتييزات المعدنية والاسباريتية والسيستينية بل تثبط بالكامل عند معاملته بالمثبط المتخصص بالبروتييزات السيرينية Phenyl methyl sulfonyl floride (PMSF)هذا مما يدل على ان الانزيم قيد الدراسة يعود الى مجموعة البروتييزات السيرينية.

المقدمة

يوصف مرض التهاب الضرع بأنه التهاب معقد ناجم عن تلوث مايكروبي يصيب الغدة اللبنية مما ينجم عنه زيادة نفاذية أنسجة الغدة اللبنية وهجرة كريات الدم البيض من الدم إلى مواقع الضرر في الضرع لمهاجمة وبلعمة المسببات المرضية المايكروبية الذي يؤدي بدوره إلى ارتفاع أعداد الخلايا الجسمية في الحليب (6، 15). ان أعداد الخلايا الجسمية في الحليب والتي تعد الحد الفاصل بين حالة الضرع المصاب والسليم هو 1×10^5خلية /مل حليب (18) . تصنف خلايا الدم البيض إلى ثلاثة أنواع هي الخلايا اللمفاوية وخلايا البلعم الكبير (احادية النواة) والخلايا المحببة (متعددة الانوية). تشمل الخلايا المحببة الخلايا العدلة والحامضية والقاعدية، تحتوي الخلايا العدلة على نواة ذات فصوص متعددة وتسمى غالبا بالخلايا المتعددة الأشكال النووية polymorphonuclear cell (PMN) (14). عند اصابة الابقار بالتهاب الضرع تحرر خلايا PMN العديد من انزيماتها المحللة للبروتين والتي تهاجم نسيج الغدة اللبنية وكذلك بروتينات الحليب (13،16). تحتوي خلايا PMN المعزولة من حليب الأبقار المصابة بالتهاب الضرع على العديد من البروتييزات تشمل البروتييزات السيرينية مثل Elastase وبروتييزات معدنية وسيستينية واسباريتية وتعد هي المسؤولة عن هدم نسيج الغدة اللبنية وبروتينات الحليب خلال الإصابة بالتهاب الضرع.

كلية الزراعة– جامعة بغداد –بغداد– العراق.

يوجد Elastase في خلايا PMN وبالتحديد في الحبيبات الازيروفيلية وله القابلية على تحليل العديد من المواد الأساس والتي تشتمل على جميع المكونات الخارج الخلية وكذلك بروتينات متنوعة مثل عوامل التخثر والمكملات وبروتينات المناعة كما ويؤدي الانزيم دورا مهما في تخثر بروتينات الحليب و في زمن التخثر وخاصة عندما يضاف كأنزيم خارجي exoenzyme اذ ان للانزيم قابلية على شطر الكابا كازين (في او بالقرب) من موقع الاصرة - Meth 106) (Phe 105 وهي الاصرة التي تهاجم من قبل انزيم الكايموسين عند تخثر الحليب (1،3،4) كان اهتمام بهذا الأنزيم من قبل الباحثين في المجال الطبي (21،22) عندما لاحظوا أن هناك بعض الأمراض الوراثية التي لها علاقة بانزيم Elastase مثل مرض نقص مضاد التربسين antitrypsin deficiency وهونقص في (المثبط) المنظم لعمل Elastase الذي يؤدي نقصه إلى مزيد من التحلل في الأنسجة الرابطة والجدار الفاصل بين الخلايا بفعل هذا الانزيم مما جعل البعض يعتقد أن الضرر الناجم عن هجرة خلايا PMN من الدم وإنتاجها لهذا الأنزيم من اجل بلعمة المسببات المرضية يفوق الفائدة المتوخاة منه والذي له دور مهم في الأذى النسيجي الالتهابي.

نظراً الى محدودية الدراسات المتعلقة بعزل وتنقية الالاستيز من الحليب ودراسة دوره في عملية التخثر خلال تصنيع الجبن أو في انضاج الاجبان وكذلك مدى خطورة تناول حليب يحتوي على تراكيز عالية من هذا الانزيم لذا اجريت هذه الدراسة لمحاولة عزل الانزيم وتنقيته من حليب ابقار احدث فيها التهاب ضرع مفتعل ودراسة تحمله الحراري وبعض صفاته المهمة الاخرى .

المواد وطرائق البحث

مصدر الانزيم

حقنت اضرع ابقار سليمة تابعة لحقل قسم الثروة الحيوانية –كلية الزراعة– جامعة بغداد بمقدار 2 مللتر من محلول الذيفان الداخلي لبكتريا *Escherichia coli* وبتركيز 2 مايكروغرام /مل تمت اذابته في دارئ الفوسفات الملحي والمجهز من شركة Sigma لغرض احداث التهاب ضرع مفتعل حسب المذكور من قبل Mathieu وجماعته (13) جمع الحليب لمدة ثلاثة ايام، عزلت منه الخلايا المتعددة الاشكال النووية PMN باستخدام تقنية التدرج Ficoll المذكورة من قبل الباحث ذاته، عرضت هذه الخلايا الى عملية تجنيس باستخدام مجنس يدوي زجاجي وفي درجة حرارة 4م ثم اجريت للمجنس عملية نبذ مركزي (250 g) مبرد في نفس درجة الحرارة لمدة 10 دقائق للتخلص من جدران الخلايا وعد الراشح الرائق مستخلصاً للانزيم الخام لاجل خطوات التنقية والتوصيف اللاحقة كما تم قياس حجمه وفعاليته التحللية.

1 - فعالية الانزيم: قدرت فعالية Elastase وذلك بأستخدام Elastin كمادة خاضعة تبعا للطريقة المذكورة من قبل Shtoon(20).

2 - تقدير تركيز البروتين : اتبعت طريقةBradford و Heath(1) في تقدير البروتين باستخدام Elastin كمادة اساس.

3 - تنقية الانزيم: نقي Elastase بترسيب الانزيم الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 20 – 90 % تبعتها خطوة استخدم فيها عمود التبادل الايوني السالب DEAE- Cellulose ذي الابعاد 26 2.4 × سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 6.0 بسرعة جريان 36مل /ساعة وبواقع 3مل /انبوبة واستردت الاجزاء المرتبطة بالمبادل باستخدام اسلوب التدرج الملحي الخطي لكلوريد الصوديوم وبالتركيز 0 -1 مولار في محلول فوسفات الصوديوم الدارئ . جمعت الاجزاء التي أحتوت على الفعالية الانزيمية

وجرت عملية التنافذ الغشائي مقابل عدة تبديلات من محلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.01 مولار في درجة حرارة 4م ثم قيس حجمه، قدرت فعالية الانزيم وحدد تركيز البروتين فيها. ثم ركز المحلول الانزيمي باستخدام مادة البولي اثيلين كلايكول PEG-10000 تلتها خطوة تنقية اضافية متمثلة باستخدام عمود الترشيح الهلامي-Sephadex G 100 بابعاد 2 × 65 سم وذلك بامرار المحلول الانزيمي المركز بعد اذابته في محلول الموازنه حيث تمت موازنة العمود والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز0.1 مولار-كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار برقم هيدروجيني 6.0، جمعت الاجزاء بحجم 3مل / انبوبة وبسرعة جريان 21مل /ساعة، جرى قياس الامتصاص الضوئي على 280 نانومتر للاجزاء المستردة مع قياس فعالية الانزيم فيها . جمعت الاجزاء التي ظهرت فيها الفعالية وتمت عملية التنافذ الغشائي تجاه محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.01 مولار في درجة حرارة 4م، قيس الحجم وتركيز البروتين والفعالية، ركز المحلول الانزيمي بأستخدام PEG-10000 ثم حفظ بالتجميد (–15°م) لحين استخدامه في الفحوص اللاحقة .

4– تعيين نقاوة الانزيم : اتبعت طريقة Laemmli (9) في تعيين نقاوة الانزيم بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة SDS .

5– توصيف الانزيم: شمل اجراء الاختبارات الاتية:

1– تقدير الوزن الجزيئي لانزيم Elastase : تم بطريقة الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS حيث حضرت محاليل البروتينات الأتية بتركيز 4 ملغم/مل مذابة في محلول الفوسفات الدارئ بتركيز0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6 كلتكون بروتينات قياسية بأوزان جزئية معلومة (كيلودالتون): Lysozyme، Pepsin، Ovalbumin، Bovine serum albumin، Collagenase(A,B)، Transferrin، γ - Globulin ذات اوزان جزيئية تبلغ 14.4 ,35 , 43 , 67 , (65 و 105) , 80 و 150 على التوالي.

2- تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم التحللية وثبات الانزيم: لتعيين الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية الأنزيم التحللية وثبات الأنزيم استخدمت ثلاثة أنواع من المحاليل الدارئة بتركيز 0.2 مولار وهي محلول خلات الصوديوم الدارئ ، محلول فوسفات الصوديوم الدارئ ، محلول Tris-HCL حيث قيست فعالية الأنزيم في قيم مختلفة من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين 2.0–10.0 وذلك بتحضين محلول Elastin المستخدم عادة كركيزة لعمل الأنزيم مع المحاليل الدارئة المذكورة لمدة نصف ساعة في حمام مائي في درجة حرارة 37م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي واستخدم كركيزة لقياس فعالية الأنزيم التحللية حسب المذكور في الفقرة (1) ثم رسمت العلاقة بين الفعالية التحللية للأنزيم والرقم الهيدروجيني لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم.

3- تعين درجة الحرارة المثلى والثبات الحراري للانزيم: قدرت فعالية الأنزيم في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20 -80 م عند الرقم الهيدروجيني الأمثل للتفاعل.

4- تقدير المحتوى الكربوهيدراتي: تم بأستخدام الطريقة المذكورة من قبل Dubiose وجماعته (5).

5- دراسة تأثير الأيونات الفلزية وبعض الكواشف المنشطة والمثبطة في فعالية الأنزيم: حضرت محاليل كلوريدات الكالسيوم والزئبق والنحاس والصودبوم بتراكيز تراوحت بين 5 - 50 ملي مولار، حضن الأنزيم مع محاليل هذه الكلوريدات بدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة ثم قدرت الفعالية التحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل كما حضرت محاليل الكواشف الأتية:

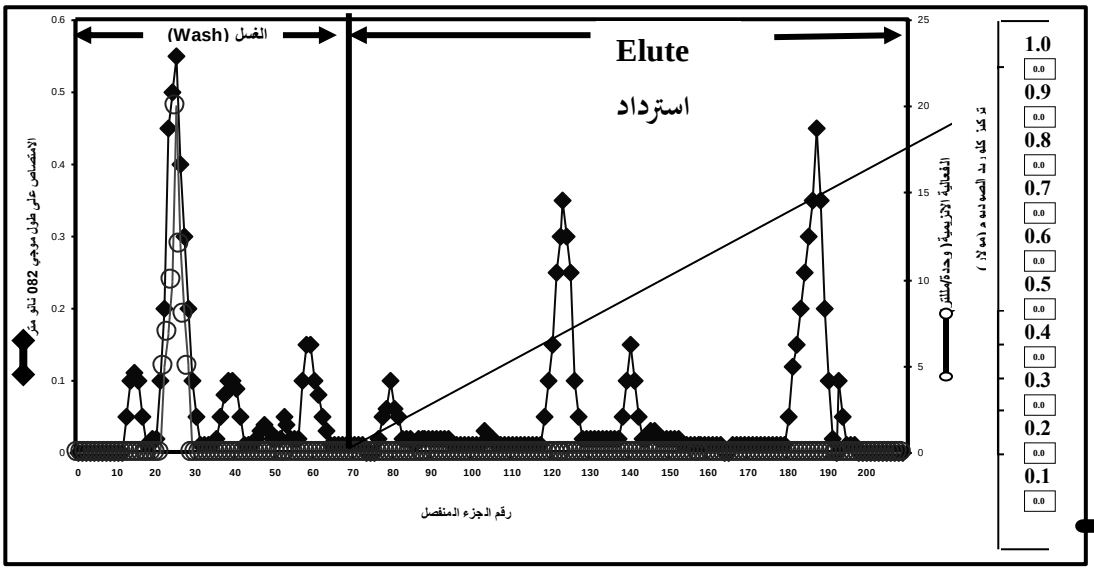
Pepstatin A (1mM); 1, 10- phenanthroline (10mM); cysteine (10mM); Ethylene DiamineTetraacetic Acid (EDTA) (2mM) ; 2-Mercaptoethanol (10mM); DiThioTheretol (DTT) (10 mM); Phenyl Methyl Sulphonil Fluoride (PMSF)(1mM)) ; Iodo Acetic Acid (IAA)(0.1 mM) ;

Soybean trypsin inhibitor(SBTI) (0.125- 0.250 mg/ml); 6-Amino Hexanoic Acid(6-AHA) (120mM).

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

النتائج والمناقشة

استخلص الانزيم الخام من خلايا كريات الدم البيض من نوع متعددة الاشكال النووية **PMN** فقط المعزولة من خلايا الدم البيض الكلية باستخدام تقنية التدرج **Ficoll** ويعود السبب في دراسة بروتييزات هذا النوع من الخلايا لكونها تشكل اكبر نسبة من اعداد خلايا الدم البيض عند اصابة الابقار بالتهاب الضرع، اذ بلغت اعداد الخلايا الجسمية الكلية واعداد **PMN** المعزولة من حليب ابقار احدث فيها التهاب ضرع مفتعل لاغراض الدراسة **4.2×10^6و3.5×10^6**خلية/مل حليب على التوالي وهذا يشير إلى أن خلايا **PMN** شكلت اكثر من **70%** من اعداد خلايا الدم البيض الكلية وعند مقارنة هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة أجريت حول الموضوع نفسه وجد أن هذه النتيجة تتفق مع ما وجده **Kelly** و**Fox** (7)، **Moussaoui** وجماعته (**17**)، **Owen** وجماعته (**19**). يلخص جدول **(1)** طريقة التنقية بخطواتها ونتائجها والتي تضمنت تركيز الانزيم الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت **20-90%**واتضح من النتائج ان نسبة الاشباع **90%** اعطت اعلى فعالية انزيمية ثم تلتها خطوة استخدم فيها المبادل الايوني السالب **DEAE- Cellulose** ونتيجة لهذه الخطوة من التنقية تم الحصول على عدة قمم بروتينية (شكل **1**) ظهر قسم منها في جزء الغسل والقسم الاخر في الاجزاء المستردة بالتدرج الملحي بملح كلوريد الصوديوم **(0-1)** مولار وكان البعض من هذه القمم يمتلك فعالية انزيمية. تتفق نتيجة هذه الخطوة من التنقية مع ماوجده كل من **Mehrazad** وجماعته (**15**)، **Moussaoui** وجماعته (**18**) اللذان وجدا عند دراستهما لفعالية التحلل البروتيني في مجنس عالق خلايا **PMN** المعزولة من حليب ابقار مصابة بالتهاب الضرع ان هناك فعالية تحلل بروتيني عالية تعود الى **Elastase** بالدرجة الاولى والى بروتييزات اخرى بالدرجة الثانية. بعد ان تم الحصول على العديد من القمم البروتينية من خطوة المبادل الايوني السالب **DEAE- Cellulose** تم البحث عن فعالية **Elastase** في القمم المفصولة واتضحت ان الفعالية وجدت في الانابيب **(22 -28)** في جزء الغسل (شكل **1**) وكانت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية بعد خطوت التنقية بالمبادل الايوني السالب **DEAE- Cellulose** هي **21.0%** و **3.20** مرة على التوالي (جدول **1**).

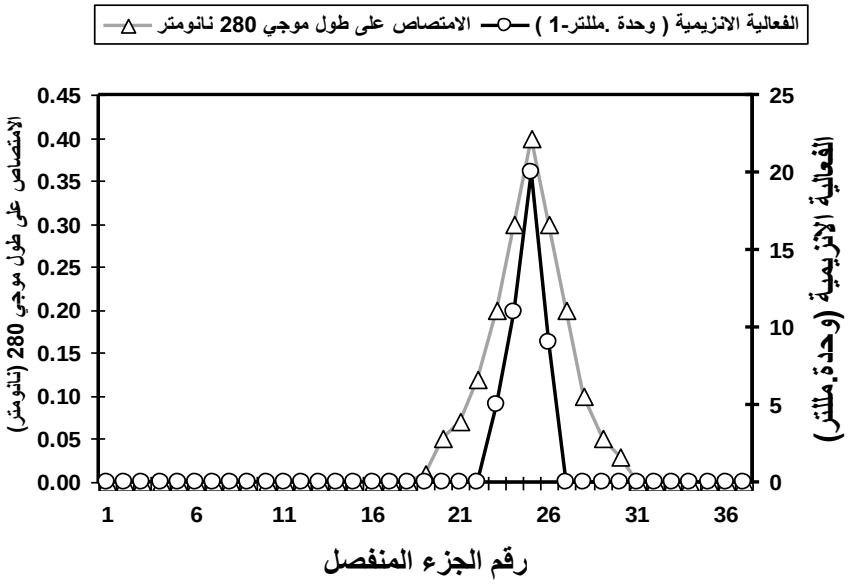


شكل 1: كروماتوكرافي التبادل الأيوني لتنقية Elastase من مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب الضرع المصاب، باستخدام عمود المبادل ألايوني DEAE-cellulose (2.4× 26)سم تمت الموازنة باستخدام محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 6.0،استردت الأجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوي على تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم تراوحت 0-1 مولار وبسرعة جريان 36 مل /ساعة وبواقع 3 مل للجزء الواحد.

جدول 1:خطوات تنقية Elastase المعزول من الخلايا PMN المعزولة من حليب ابقار احدث 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 الانزيمية (%)
المستخلص الخام	80	10.00	0.20	50.00	800	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 90%	20	33.00	0.22	150.00	660	3.00	82.50
التبادل الايوني السالب DEAE-cellulose	21	8.00	0.05	160.00	168.00	3.20	21.00
الترشيح الهلامي SephadexG-100	12	12.10	0.03	403.33	145.2	8.06	18.15

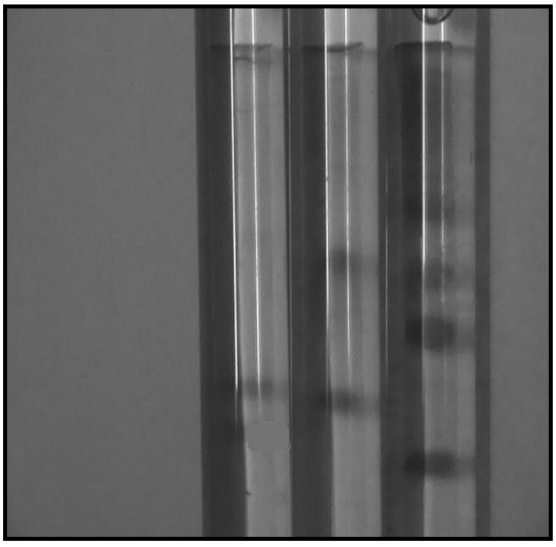
اكملت خطوة تنقية الانزيم بأمرار المحلول الانزيمي المنقى من الخطوة السابقة بعد ديلزته ثم تركيزه باستخدام PEG-10000في عمود الترشيح الهلامي Sephadex G-100 فظهرت قمة بروتينية واحدة وقمة فعالية واحدة متناسقة معها (شكل 2) وكانت الحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية هي % 18.15و 8.06على التوالي .



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

اختبار نقاوة الانزيم

اشارت نتائج الترحيل الكهربائي لانزيم **Elastase** خلال مراحل التنقية الى ان الانزيم الذي تمت تنقيته على عمود المبادل الايوني السالب **DEAE- Cellulose** لايزال حاويا على كمية قليلة من البروتينات الملوثة (هلام رقم **2**) ولوحظ ظهور حزمة بروتينية واحدة بعد اجراء التنقية باستخدام الترشيح الهلامي في عمود **Sephadex G-100** (هلام رقم **3**) واعد ذلك دليلا على ان الانزيم نقي شكل (**3**).



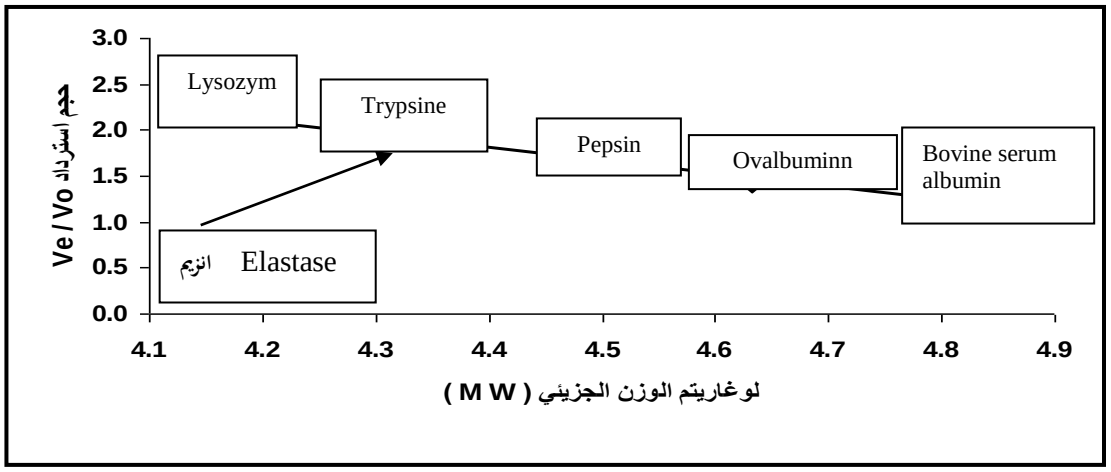
شكل3: الترحيل الكهربائي لأنزيم **Elastase** المنقى من خلايا **PMN** المعزولة من حليب الضرع المصاب في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين إذ يمثل:**1-** المستخلص الأنزيمي الخام.

2- الأنزيم المسترد بعد خطوة التبادل الأيوني بوساطة (DEAE - Cellulose).3- الأنزيم المسترد بعد خطوة الترشيح الهلامي بوساطة (Sephadex G -100).

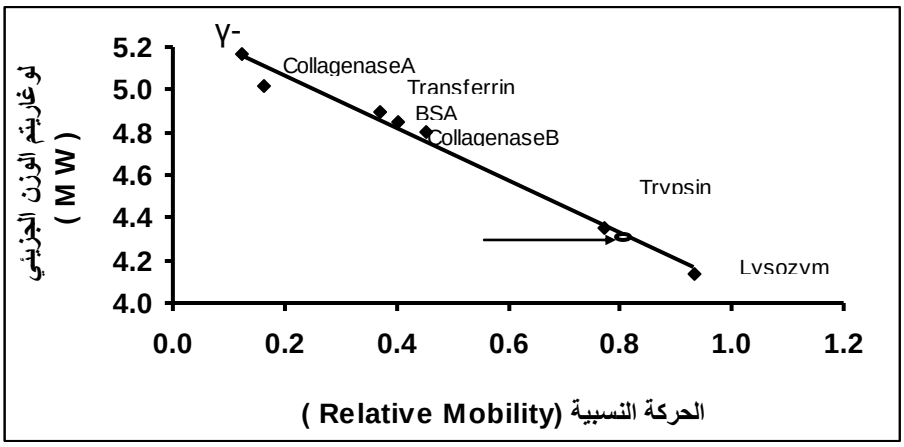
توصيف الانزيم

تقدير الوزن الجزيئي

قدر الوزن الجزيئي لانزيم Elastase بطريقة الترشيح الهلامي فبلغت قيمته 22500 دالتون (شكل 4) كما امكن ايجاد الوزن الجزيئي للانزيم قيد الدراسة بطريقة الترحيل الكهربائي فكان 23000 دالتون (شكل 5) وجاءت هذه النتيجة ضمن المديات التي وجدت سابقاً (11، 12، 20) واشارت الى الوزن الجزيئي لانزيم Elastaseالمعزول من مصادره المختلفة يتراوح بين 22-28 كيلودالتون



شكل4: المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم Elastase المنقى من خلايا PMN بطريقة الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-100.



شكل5: المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي Elastaseالمنقى من خلايا PMN بطريقة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين.

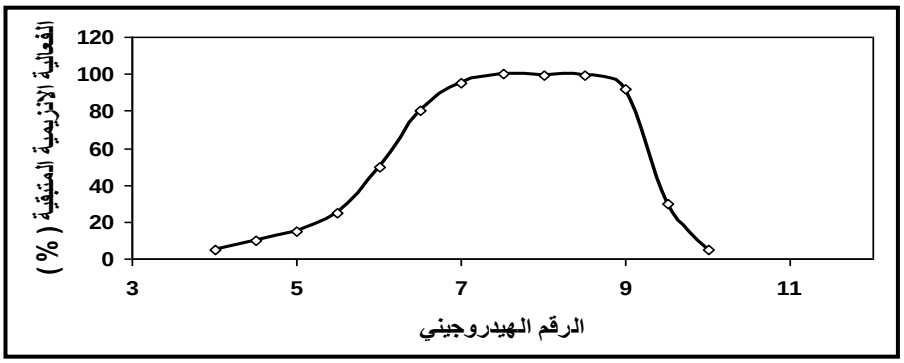
تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم

بينت النتائج الموضحة في الشكل (6) ان افضل رقم هيدروجيني لفعالية Elastase هو8.0 وفقد الانزيم

90 و 80% من فعاليته عند الارقام الهيدروجينية المتطرفة (**4.0 و10.0**). تتوافق نتيجة هذه الدراسة مع ما وجده **Mandle** (**11**) عند دراسته للرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم **Elastase** البنكرياسي والبالغ **8.0** ومقاربة الى الرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم **Elastase** البكتيري والبالغ **7.5** (**12**).

شكل6: منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية **Elastase** المعزول من خلايا **PMN**.

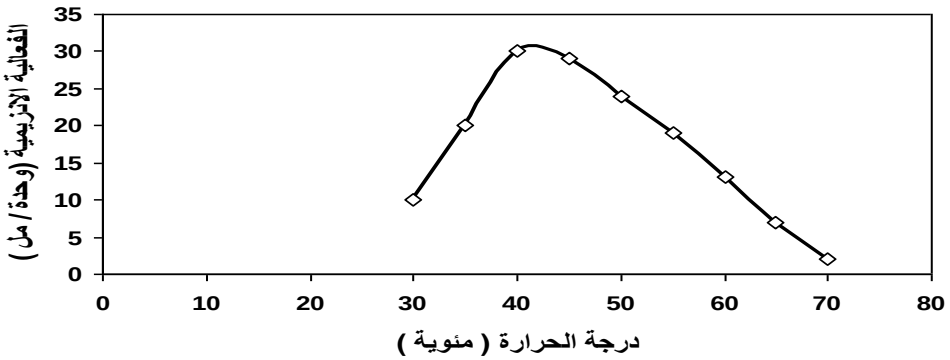
ويوضح شكل (**7**) ثبات الانزيم تجاه الارقام الهيدروجينية المختلفة اذ امتلك ثباتا واسعا في مدى من قيم الارقام الهيدروجينية يقع بين **7.0- 9.0** اذ احتفظ الانزيم بنسبة **95 -100%** من فعاليته التحللية عند حضنه في الارقام الهيدروجينيه المذكورة لمدة **30** دقيقة في درجة حرارة **37**م، ويقع هذا ضمن المديات التي حددتها دراسات سابقة حول ثبات **Elastase** من مصادره المختلفة (**10**، **12**) كما احتفظ الانزيم قيد الدراسة بنسبة **20%**من فعاليته عند ارقام هيدروجينية اعلى من **9.0** واقل من **6.0**.



شكل7: منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات **Elastase** المعزول من خلايا **PMN**.

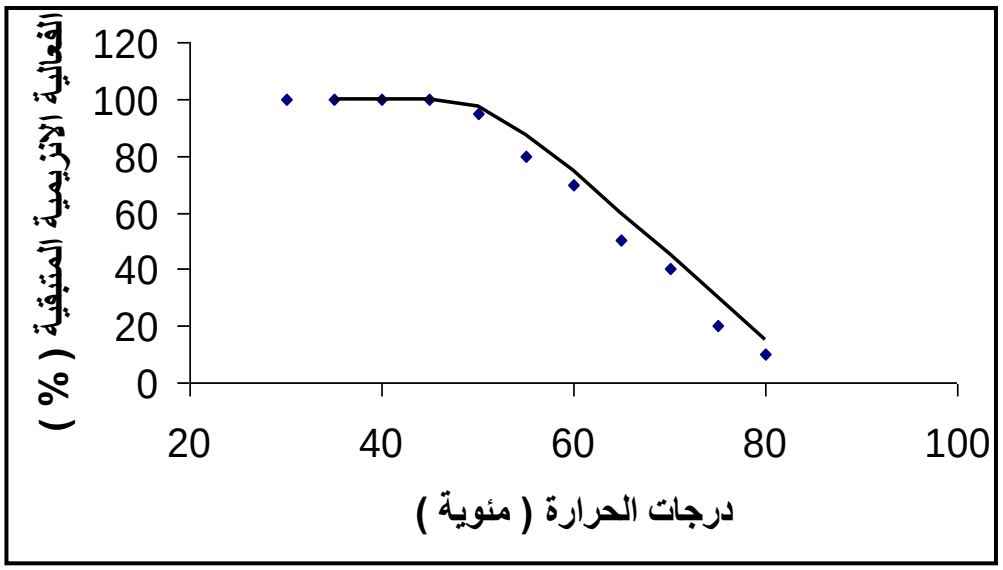
تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم

وجد ان درجة الحرارة المثلى لفعالية **Elastase** كانت **40**م عند الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم (شكل **8**) . ان هذه النتيجة تتوافق مع ماوجده **Mehrazad** (**14**)، **Moussaoui** (**16**) من ان اعلى فعالية اظهرها **Elastase** الموجود في مجنس عالق خلايا **PMN** المعزولة من حليب ابقار احدث فيها التهاب ضرع مفتعل كانت تقع بين **40 – 45** ^{o}م كذلك مشابه الى فعالية **Elastase** البنكرياسي والبالغة **40**م (**12**) كذلك مقاربة الى **Elastase** المعزول من خلايا **PMN** المعزولة من دم الانسان والبالغة **45**م (**19**، **22**).



شكل 8: منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية Elastase المعزول من خلايا PMN.

اما بالنسبة للثبات الحراري للانزيم فظهر من الشكل (9) ان الانزيم يكون ثابت في مدى حراري (30-50)م حيث احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه بتلك الدرجات من الحرارة لمدة 30دقيقة . انخفضت بعدها الفعالية انخفاضا تدريجيا بزيادة درجات الحرارة وتجدر الاشارة الى ان الانزيم قيد الدراسة لم يثبط بالكامل عند درجات الحرارة المدروسة وتعد هذه النتيجة دليلا على ان الانزيم يبدي ثباتاً حرارياً عالياً عندما تم قياس فعاليته عند الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم اذ احتفظ الانزيم بنسبة 85% من فعاليته عند معاملته بدرجة حرارة 55 °م و 80% عند معاملته بدرجة حرارة 65م و 50% عند معاملته بدرجة حرارة 70 °م و 10% عند معاملته بدرجة حرارة 80 ° م لمدة 30 دقيقة للمعاملات الحرارية السابقة كافة وهذا يشير الى انه لايمكن القضاء على الانزيم قيد الدراسة بدرجة حرارة البسترة المستخدمة عادة في صناعة الالبان ولهذا السبب يجب ان يعار اهتمام كبير بهذا الانزيم قدر تعلق الامر بتصنيع الالبان في الوقت الحالي.



شكل9: تأثير درجة المعاملة الحرارية في الفعالية التحللية لـ Elastase لدى حضنه لمدة 30 دقيقة في محلول فوسفات الصوديوم الدارئ 0.01 مولار برقم هيدروجيني 8.0.

المحتوى الكربوهيدرتي للانزيم

بلغت النسبة المئوية للسكريات في انزيم Elastase 20% وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره كل من Owen

(19)، Shotton (20)، Starkey (21) كما اشاروا الى ان Elastase من مصادره المختلفة هو من النوع كلايكوبروتين.

تأثير العوامل المنشطة والمثبطة في فعالية الانزيم

لم يتأثر الانزيم قيد الدراسة عند معاملته بالعوامل المثبطة للبروتييزات المعدنية مثل EDTA و 1,10-Phnanthrolin كذلك لم يتاثر الانزيم بالمثبطات المتخصصة بالبروتييزات الاسباريتية الحامضية مثل Pepstatin–A ولا بالكواشف الخاصة بالبروتييزات السيستينية مثل Mercaptoethanol ، Dithiotheritol ،Cysteine و Iodo Acetic Acid وهذا يدل على ان الانزيم قيد الدراسة لا يعود الى مجموعة البروتييزات المعدنية ولا الاسباريتية ولا السيستينية بل تثبط الانزيم بالكامل عند معاملته بالمثبط المتخصص بالبروتييزات السيرينية (جدول 2) ethyl sulfonyl floride (PMSF) بتركيز (1mM) وهذا يدل على ان الانزيم قيد الدراسة يعود الى مجموعة البروتييزات السيرينية كما وجد ان الانزيم لم يتثبط بالمثبط Soybean trypsin inhibitor (SBTI) بتركيز 0.125 و 0.250 مل / ملغرام المثبط المتخصص بالانزيمين السيرينين التربسين والكيموتربسين وكذلك لم يتثبط بالمثبط المتخصص بانزيم البلازمين السيريني المسمى 6- Amino Hexanoic Acid (6- AHA) اذا من المحتمل ان يكون الانزيم قيد الدراسة هو Elastase.

جدول 2: تأثير بعض الكواشف في فعالية الالاستيز المنقى من خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار مصابة بالتهاب الضرع

	المادة الكيميائية	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية (%) الالاستيز
	أنزيم غير معامل	–	100
1	Pepstatin A	1mM	100
	PMSF	1mM	0
	6- AHA	120mM	100
3	Iodo acetic acid	0.1mM	100
	Soybeantrypsin inhibitor(SBTI)	0.125 mg/ml	100
		0.250 mg/ml	100
5	EDTA	2mM	100
6	DTT	10mM	100
7	1,10-Phenathroline	10mM	100
8	2- Mercapto ethanol	10mM	100
9	Cysteine	10mM	100
10	$CaCl_2$	10mM	100
11	$CaCl_2$	50mM	100
12	$CuCl_2$	5mM	50
14	$HgCl_2$	2mM	112
15	$HgCl_2$	5mM	110
17	NaCl	10mM	99
18	NaCl	50mM	90

كما وجد ان الانزيم لم يتاثر بكل من كلوريد الزئبق والكالسيوم وتثبط بنسبة 50% بكلوريد النحاس و10% بكلوريد الصوديوم . ومن خلال دراسة باقي صفات الانزيم منها صافي الشحنة الموجبة التي يحملها والتي جعلته لايرتبط بالمبادل الايوني السالب وكذلك من خلال الرقم الهيدروجيني الامثل ودرجة الحرارة المثلى والوزن الجزيئي المطابق جدا

لانزيم Elastase المعزول في دراسات سابقة من حليب ابقار مصابة بالتهاب الضرع ولكن باستخدام تقنيات اخرى مختلفة مثل تقنية الترحيل الكهربائي المنمع وتقنية Elisa ومن مجمل هذه الادلة يمكن القول ان الانزيم المفصول من المحتمل ان يكون Elastase.

خلصت الدراسة الى ان وجود فعالية تحلل بروتيني عالية تم تشخيصها في خلايا الدم البيض من نوع متعددة الاشكال النووية PMN المفصولة من حليب ابقار احدث فيها التهاب ضرع مفتعل ومن خلال بعض الاختبارات اتضح ان هذه الفعالية تعود الى انزيم Elastase والذي امتاز بكونه مقاوم للمعاملة الحرارية المكافئة لعملية البسترة وان مثل هذه الانزيمات يعار لها اهتمام كبير قدر تعلق الامر بصناعة الالبان.

المصادر

1- Bradford, J .A. and E. C. Heath (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.
2- Considine T.; A. Healyn; A. L. Kelly and P. L. H. McSweeny (1999). Proteolytic specificity of elastase on bovine B-CN. Food Che. 66:463 – 470.
3- Considine , T. (2000). Role of somatic cell count and proteinases in dairy product quality. Ph .D.thesis .University Collage Cork, Ireland.
4- Considine, T.; A. Healyn; A. L. Kelly and P. L. H. McSweeny (2000). Proteolytic specificity of elastase on as1-CN. Food Chem. 69:19 -26.
5- 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.
6- Kelly, A. L. (1998). Role of Somatic Cell Count in milk quality. Ph. D. thesis National University of Ireland Cork.
7- Kelly, A. L. and P. F. Fox. (2006). Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements .Int Dairy J.,10:1016 -1018.
8- Kelly, A. L.; F. O 'Flaherty and P. F. Fox (2006). Indigenous enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. Int Dairy J.,10:19-22.
9- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature., 227:680 – 690.
10- Larsen, L. B.; P. L. H. McSweeney; M. G. Hayes; J. B. Andersen; K. L. Ingvartsen and A. L. Kelly (2006). Variation in activity and heterogeneity of bovine milk protease with stage of lactation and somatic cell count. Int Dairy. J., 17:1-8.
11- Mandle, I. (1962). Pancreatic elastase In "Methods in Enzymology" Vol XIX Proteolytic Enzymes (Ed by: G. E. Perlmann and L. Lorand). Academic Press. New York.
12- Mandle, I. and B. Cohen (1960). Bacterial elastase 1- isolation, purification and properties. Arch. Bioch Bioph., 91:47-49.
13- Mathieu, C.; Y. LeRoux; G .C. Faure; F. Laurent; M. C. Bene and F. Moussaoui (2002). Enzymatic activities of Bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunolgy. J., 9:812-817.
14- Mehrazad, J. (2002). Respiratory burst activity and viability of bovine blood and milk neutrophils during different stages of lactation and mastitis. Ph.D .thesis Ghent University, Belgium.ISBN: 90. 5864 -027-2.
15- Mehrazad, J.; G. Desrosiers; K. Lauzone; G. Robitaille; X. Zahao and P. Lacasse (2005). Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin - induced mastitis in dairy cows. J Dairy Sci., 88:211-222.
16- Moussaoui, F; L. Michelutti; Y. LeRoux and F. Laurent (2002). Mechanisms involved in milk endogenous proteolysis induced by lipopolysaccharide experimental mastitis. J Dairy Sci., 85:2562 -2570.

17- Moussaoui, F.; F. Laurent; J. M. Girardet; G. Humbert; J. L. Gaillard and Y. LeRoux (2003). Characterization and proteolytic origins of specific peptides appering during lipopolysaccharide experimental mastitis. J Dairy Sci., 86:1163-1170.
18- Moussaoui, F.; F. Vangroenweghe; K. Haddadi; Y. LeRoux; F. Laurent and L. Duchateau (2004). Proteolysis in milk during Experimental *Escherichia coli* mastitis. J Dairy Sci., 87:2923 -2931.
19- Owen, C. A.; M. A. Campbell; S. Boukedes and J. E. Campbell (1997). Cytokines regulate membrane bound leukocyte Elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. Am. J. Phys., 16: L325- L393.
20- Shotton, D. M. (1970). Elastase. In "Methods in Enzymology" Vol XIX Proteolytic Enzymes (Ed by: G. E. Perlmann and L. Lorand). Academic Press. New York.
21- Starkey, P. M. (1977). Elastase and cathepsin G the serine proteinases of human Neutrophil leukocytes and spleen. In: "Proteinases in Mammalian cells and tissues" (A .J. Barrett. ed) p57. North-Holland. New York.
22- Warren, L. L. and J. E. Gregory (2001). Leukocyte elastase. Am. J. Respi. Crite. Care Med., 5:896 - 904.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ELASTASE FROM LEUKOCYTES CELLS ISOLATED FROM MASTITIS MILK

K. S. Doosh A. M. A. Salih K. A. Shaker

ABSTRACT

Elastase was isolated from polymorphonuclear leukocytes and purified by the Ion-exchange column Diethyl amino ethyl Cellulose (DEAE-Cellulose), followed by gel filtration on Sephadex G-100 column, purification folds and the enzyme yield was 8.06 and 18.15% respectively. The burity of obtained enzyme was tested by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyle sulfate and indicated that it has been purified to homogeneity by giving a single band. The results of enzyme characterization showed that the molecular weights were 22500 and 23000 Daltons as determined by gel filtration and electrophoresis in the presence of SDS .The optimum pH for the enzyme activity was 8.0 and was stable at pH values ranged between 7.0-9.0. The enzyme exhibited the maximum activity at 40ºC. The study of heat stability pointed out that the enzyme retained entire activity over 30 min. incubation at 30 - 50 Cº and remained active even when incubated at 20-80ºC. It was noticed that the addition of each of CaCl2, HgCl2 didn't affect enzyme activity while CuCl2, NaCL reduced enzyme activity by 50 and 10 % respectively. However the other reagent which were specific inhibitors for cysteine, aspartic, metallo protease didn't affect enzymo activity, mean while the enzyme completely inhibited by PMSF (specific serin protease inhibitor) so enzyme could be identify as serine proteases (Elastase).

College of Agric. –Univ. of Baghdad- Baghdad,Iraq.