عزل وتنقية وتوصيف بروتييز حامضي من حليب الابقار المصابة بالتهاب الضرع

كفاح سعيد دوش عامر محمد علي صالح خالدة عبد الرحمن شاكر

الملخص

عزل بروتييز حامضي من خلايا الدم البيض المتعددة الاشكال النووية 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 في عمود Sephadex G-100 فكانت الفعالية النوعية والحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية هي 156.30 وحدة /ملغرام و22.65% و6.04 مرة على التوالي. درست بعض من صفات الانزيم اذ بلغ الوزن الجزيئي له 31.622 و33.113 كيلو دالتون عند تعيينه بطريقتي الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي على التوالي. بلغت قيمة رقم الهيدروجين الامثل لفعالية الانزيم 3.5 وتراوح المدى الامثل لثباته بين 2.5 - 5.0 . وابدى الانزيم اقصى فعالية في درجة حرارة 50 ^{o}م. ووجد ان الانزيم لم يتأثر في العوامل المثبطة للبروتييزات المعدنية والسيرينية والسيستينية بل تثبط بالكامل عند معاملته بالمثبط المتخصص بالبروتييزات الاسبارتية (الحامضية) Pepstatin A، هذا مما يدل على ان الانزيم يعود الى مجموعة البروتييزات الاسبارتية ووجد عند دراسة تأثير NaCl و$CaCl_2$ على فعالية الانزيم أن NaCl ليس له تأثيراً مثبطاً اما $CaCl_2$ فقد كان له تأثير منشط في فعالية الانزيم. بلغت قيمة Km، Vmax وKcat للأنزيم 13.40 ملغم/مل و156.05ملي مول/دقيقه، 1560.50 دقيقه$^{-1}$على التوالي.

المقدمة

يوصف مرض التهاب الضرع بأنه التهاب معقد ناجم عن تلوث مايكروبي يصيب الغدة اللبنية مما ينجم عنه زيادة نفاذية أنسجتها وهجرة كريات الدم البيض من الدم إلى موقع الضرر في الضرع لمهاجمة وبلعمة المسببات المرضية المايكروبية الذي يؤدي في جانبه إلى ارتفاع أعداد الخلايا الجسمية في الحليب (17،18).صنفت خلايا الدم البيض إلى ثلاثة أنواع هي الخلايا اللمفاوية وخلايا البلعم الكبير (احادية النواة) والخلايا المحببة (متعددة الانوية). تشتمل الخلايا المحببة على الخلايا العدلة والحامضية والقاعدية، تحتوي الخلايا العدلة على نواة ذات فصوص متعددة وتسمى (غالبا) بالخلايا المتعددة الأشكال النوويـــة (polymorphonuclear cell, PMN) (15،19). لوحظ عند اصابة الابقار بالتهاب الضرع تزداد اعداد خلايا PMN بشكل كبير اذ تقوم بتحرير العديد من انزيماتها المحللة للبروتين والتي تهاجم نسيج الغدة اللبنية وكذلك بروتينات الحليب ومنها البروتييزات الاسبارتية مثل كاثبسين D (CTP D) والسيرينية مثل انزيم اللاستيز والمعدنية مثل انزيم الكولاجنيز والسيستينية مثل كاثبسين B (CTPB) وتعد هي المسؤولة عن هدم نسيج الغدة اللبنية وبروتينات الحليب اثناء الإصابة بالتهاب الضرع (2). يطلق مصطلح على الأنزيمات المحللة للبروتين والتي تظهر فعاليتها في محيط حامضي وتسمى Acid proteases. يعد Cathepsin CTPD من البروتييزات الأسبارتية الداخل خلوية Intracellular ينتج في داخل لايسوزومات خلايا الدم البيضاء وكذلك شخص وجوده في أنسجة العديد من الكائنات الحية مثل الفقريات والنباتات والفطريات والفيروسات، وأخيرا تم عزله من بعض أنواع البكتريا (4).تضم العائلة الأسبارتية أربعة إنزيمات رئيسة هي Pepsin، Gastricsin، Chymosin وCathepsin D. نالت هذه العائلة على الرغم من قلة عدد أفرادها اهتمام العديد من الباحثين

جزء من اطروحة دكتوراة للباحث الاول.

*كلية الزراعة– جامعة بغداد– بغداد، العراق.

وما زال البحث والتحري عن ماهية هذه الأنزيمات من أولويات الأبحاث التي تجرى بصدد أنزيمات البروتييز وذلك للعمل الفسلجي والمرضي المهم الذي تؤديه والذي له علاقة بكل تفاصيل الحياة فهي المسؤولة عن هدم بروتين الخلية وتخثر الدم وتنشيط سوابق الأنزيمات وإطلاق الهورمونات (3). شخص وجوده في الحليب ألبقري لأول مرة من قبل **Kaminogawa** و**Yamauchi** (7) اذ تم عزله من الحليب باستخدام تقنية التجزئة بكبريتات الأمونيوم ثم التبادل الأيوني السالب باستخدام عمود **DEAE-Cellulose** تلتها خطوة استخدم فيها عمود التبادل الايوني **CM-Sephadex** وكانت الحصيلة النهائية للأنزيم هي 10% أطلق عليه في حينها بروتييز الحليب الحامضي لتمييزه من أنزيم البلازمين القاعدي، والذي شوهد فيما بعد أنه يمتلك خصائص تشابه **CTP D** الموجود في أنسجة اللبائن وفي حينها أدخل إلى مؤتمر الكيميائيين الحياتيين للتسميات وأعطي أسم **CTP D** (16)، وذكر المصدر نفسه أن **CTP D** له القابلية على الاندماج مع خثرة الجبن أثناء صناعته ويعمل بشكل مضاهي لعمل الكايموسين أثناء الإنضاج. كما استطاع **Larsen** وجماعته (10) من تنقية **CTP D** من الشرش الحامضي **acid whey** بواسطة الترسيب بأملاح الأمونيوم بنسبة إشباع 90% ثم تلتها خطوة التبادل ألايوني استخدم فيها عمود **DEAE-Sepharose** على رقم هيدروجين 5.5 واتبعتها خطوة تنقية متمثلة باستخدام كروماتوكرافي الميل أوالألفة **pepstatinyl-Sepharose affinity chromatography** وكانت الحصيلة النهائية للانزيم 20%. كما تمكن **Hurley** وجماعته (6) من عزل وتقدير الوزن الجزيئي للهيئة **ProCathepsin D** من الجبن باستخـــدام طريقـــة الترحيـــل الكهربائي المنبع**Immunoblotting electrophoresis** باستخدام أجسام مضـــــادة متخصصـــة لانزيم **CTP D** تم عزلها من دم أرنب حقن مسبقا بالإنزيم .درس **Larsen** وجماعته (12) تأثير**CTP D** في التحلل البروتيني لجبن **Feta** المصنع من حليب ذي محتوى عالٍ من **SC**، كما ودرس **Hurley** وجماعته (6،7) تاثيره في جبن **quarg** وتبين إن لانزيم **CTP D** عملا مهما اثناء إنضاج الأجبان ويمتاز من البروتييزات ذات الثبات الحـــراري العالـــي **(Heat stable)** ويؤدي عملا في إنضاج الأجبان التي يستخدم في تصنيعها درجات حرارة عالية. نظرا لندرة الدراسات التي اجريت سواء داخل العراق ام على صعيد الوطن العربي والعالم بصدد موضوع عزل وتنقية وتوصيف انزيم **CTP D** من حليب الابقار المصابة بالتهاب الضرع ودراسة عمله في التحلل البروتيني الحاصل اثناء انضاج بعض انواع الاجبان لذا اجريت الدراسة الحالية.

المواد وطرائق البحث

مصدر الانزيم

حقنت اضرع ابقار سليمة تابعة لحقل قسم الثروة الحيوانية – كلية الزراعة– جامعة بغداد بمقدار 2 مللترمن محلول الذيفان الداخلي لبكتريا *Escherichia coli* وبتركيز 2 مايكروغرام/مل تمت اذابته في دارئ الفوسفات الملحي المجهز من شركة **Sigma** لغرض احداث التهاب ضرع مفتعل حسب المذكور من قبل **Mathieu** وجماعته (15). جمع الحليب لمدة ثلاثة ايام، عزلت منه الخلايا المتعددة الاشكال النووية **PMN** باستخدام تقنية التدرج **Ficoll** المذكورة من قبل الباحث انفا وذلك بعمل ثلاث تراكيز هي 7، 16 و45%، ووضع بشكل متعاقب 10، 10 و3 مل من كل من التراكيز في أعلاه في أنبوب النبذ المركزي وأضيف راسب الخلايا البيضاء بعد تعليقه في 4 مل من دارئ الفوسفات الملحي على سطح طبقات مادة **Ficoll** تم نبذ الانابيب بسرعة 4500 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة وعلى حرارة 10م^{o}. بعد انتهاء عملية النبذ المركزي يلاحظ تكون ثلاث طبقات من الخلايا بين طبقات **Ficoll** سحبت الطبقة السفلى التي تمثل الخلايا المحببة،عرضت هذه الخلايا الى عملية تجنيس باستخدام مجنس يدوي زجاجي وفي درجة حـــرارة 4^{o}م ثم اجريت للمجنس عملية نبذ مركزي 2500 دورة/دقيقة مبرد في درجة الحرارة نفسها لمدة 10 دقائق

للتخلص من جدران الخلايا وعد الراشح مستخلصاً للانزيم الخام لاجل خطوات التنقية والتوصيف اللاحقة، كما تم قياس حجمه وفعاليته التحللية.

فعالية الانزيم: قدرت فعالية الانزيم بطريقة Murachi (20) وذلك بأستخدام الكازين كمادة خاضعة.

تقدير تركيز البروتين: اتبعت طريقة Bradford (1) في تقدير البروتين.

تنقية الانزيم: نقي الانزيم الخام بترسيبه باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 20-90 % تبعتها التنقية باستخدام عمود التبادل الايوني السالب DEAE- cellulose ذي الابعاد 2.4× 26 سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجيني 6.0 بسرعة جريان 36 مل/ ساعة وبواقع 3 مل / انبوبة واستردت الاجزاء المرتبطة بالمبادل باستخدام اسلوب التدرج الملحي الخطي لكلوريد الصوديوم وبالتركيز 0.0 - 1.0مولار في محلول فوسفات الصوديوم الداري. جمعت الاجزاء المحتوية على الفعالية الانزيمية وجرت عملية التنافذ الغشائي مقابل تبديلات عدة من محلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.01 مولار في درجة حرارة 4 °م ثم قيس حجمه، قدرت فعالية الانزيم وحدد تركيز البروتين فيه. 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 إذ تمت موازنة العمود والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.1 مولار- كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار برقم هيدروجيني 6.0، جمعت الاجزاء بحجم 3 مل/ انبوبة وبسرعة جريان 21 مل/ساعة، جرى قياس الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتر للاجزاء المستردة مع قياس فعالية الانزيم فيها. جمعت الاجزاء التي ظهرت فيها الفعالية وتمت عملية التنافذ الغشائي إتجاه محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.01 مولار في درجة حرارة 4 °م، قيس الحجم وتركيز البروتين والفعالية، ركز المحلول الانزيمي بأستخدام PEG-10000 ثم حفظ بالتجميد (-18°م) لحين استخدامه في الاختبارات اللاحقة.

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

توصيف الانزيم: شمل اجراء الاختبارات التالية للانزيم المنقى:

آ–تقدير الوزن الجزيئي لانزيم Cathepsin D بطريقة الترشيح الهلامي Gel filtration: استخدم عمود هلام Sephadex G-100 بابعاد 2× 65 سم المهيأ اساساً لتنقية الانزيم في تقدير الوزن الجزيئي، تمت موازنة العمود والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الداري بتركيز 0.1 مولار-كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولار برقم هيدروجين 6.0 المحتوي على 0.02% أزيد الصوديوم. قدر حجم الفراغ (Vo) للعمود بإمرار محلول الدكستران الأزرق بتركيز

(4 ملغم/ مللتر) وأحتسبت 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 الملليترات النازلة من عمود الترشيح الهلامي وإلى منتصف قمة المادة المفصولة بعد قراءة الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانومتر استخرج الوزن الجزيئي للأنزيم من خلال رسم العلاقة الخطية بين نسبة حجم استرداد كل بروتين قياسي إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) مقابل لوغاريتم وزنه الجزيئي حضرت محاليل البروتينات التالية بتركيز4 ملغم/مل مذابة في محلول الفوسفات الداري بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجين 6.0 كبروتينات قياسية بأوزان جزيئة معلومة (دالتون):

،(35000،Pepsin) ،(43000،Ovalbumin) ،(67000،Bovine Serum Albumin) (23000،Trypsin)، (14400،HEW Lysozyme) حسب الطريقة التي ذكرها Mathieu وجماعته (15).

ب- تقدير الوزن الجزيئي لانزيم Cathepsin D بطريقة الترحيل الكهربائي: اتبعت طريقة Laemmli (9) لاجراء الترحيل الكهربائي للانزيم المنقى ومحاليل البروتينات القياسية التي شملت كل من (Trypsin ،Lysozyme ، Ovalbumin، Bovine serum albumin Collagenase (A,B)، Transferring، -γ Globulin) ذات اوزان جزيئية تبلغ14.4 ، 2 ، 67،43، (65 و105)، 80 و 150 كيلو دالتون على التوالي.

جـ- تعيين رقم الهيدروجين الامثل لفعالية الانزيم التحللية: لتعيين ارقام الحموضة المثلى لفعالية الأنزيم التحللية وثبات الأنزيم استخدمت ثلاثة أنواع من المحاليل الدارئة بتركيز 0.2 مولار وهي محلول خلات الصوديوم الداريء وبأرقام هيدروجين 2.0، 2.5، 3.0، 3.5، 4.0، 4.5، 5.0 و5.5 ومحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بأرقام هيدروجين (6.0، 6.5، 7.0، 7.5 و8.0هـ ومحلول Tris-HCL الداريء وبارقام هيدروجين 8.5 و9.0. إذ قيست فعالية الأنزيم حسب الطريقة التي ذكرها Murachi (20) في قيم ارقام الهيدروجين المذكورة إذ استخدام الكازين كمادة للتفاعل بدرجة حرارة 37 ^{o}م لمدة 10 دقائق ثم رسمت العلاقة بين الفعالية التحللية للانزيم ورقم الهيدروجين لتعيين رقم الحموضة الامثل لفعالية الانزيم.

د- تعيين دالة الحموضة المثلى لثبات الانزيم: حضن حجم معين من الانزيم المنقى في حجم مساو له من المحاليل الدارئة ذات قيم ارقام هيدروجين مختلفة تراوحت بين 2.0-9.0 المذكورة في الفقرة آنفاً في انابيب اختبار لمدة 30 دقيقة في حمام مائي في درجة حرارة 37 م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي وبعدها جرى قياس فعالية الانزيم التحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الانزيم غير المعامل ثم رسمت العلاقة بين الفعالية التحللية للأنزيم ورقم الهيدروجين ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الانزيمية المتبقية (%) مقابل ارقام الهيدروجين لمحلول الانزيم لتحديد رقم الهيدروجين الامثل لثبات الانزيم.

هـ-تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم: قدرت فعالية الأنزيم في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20-80 م عند رقم الهيدروجين الأمثل للتفاعل حسب ما ذكره Moussaoui (18).

و- دراسة الثبات الحراري للانزيم: حضن الانزيم في حمام مائي في درجات حرارة مختلفة تراوحت بين 20-80 م لمدة 30 دقيقة ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي واضيف لها محلول التفاعل (الكازين) برقم الهيدروجين الامثل وجرى تقدير الفعالية الانزيمية المتبقية ورسمت العلاقة الخطية بين الفعالية الانزيمية المتبقية (%) إتجاه درجات الحرارة المختلفة لتعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم.

ز- 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 التالية Pepstatin A (1mM); 1,10- phenanthroline: (10mM); cysteine 10mM); 2-mercaptoethanol(10mM); Dithiotheretol (DTT) (10 mM);Phenyl Ethylene Diamine Tetra acetic Acid (EDTA)(2mM) ; Methyl sulphonil fluoride (PMSF) (1mM), Iodo acetic acid (IAA)(0.1mM) ; Soybean trypsin inhibitor(SBTI) (0.125- 0.250 mg/ml);6-Amino hexanoic Acid(6-AHA) (120mM). حضن الأنزيم مع المحاليل المذكورة في37^{o}م مدة 30 دقيقة ثم قدرت فعاليته التحللية المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الأنزيم غير المعامل.

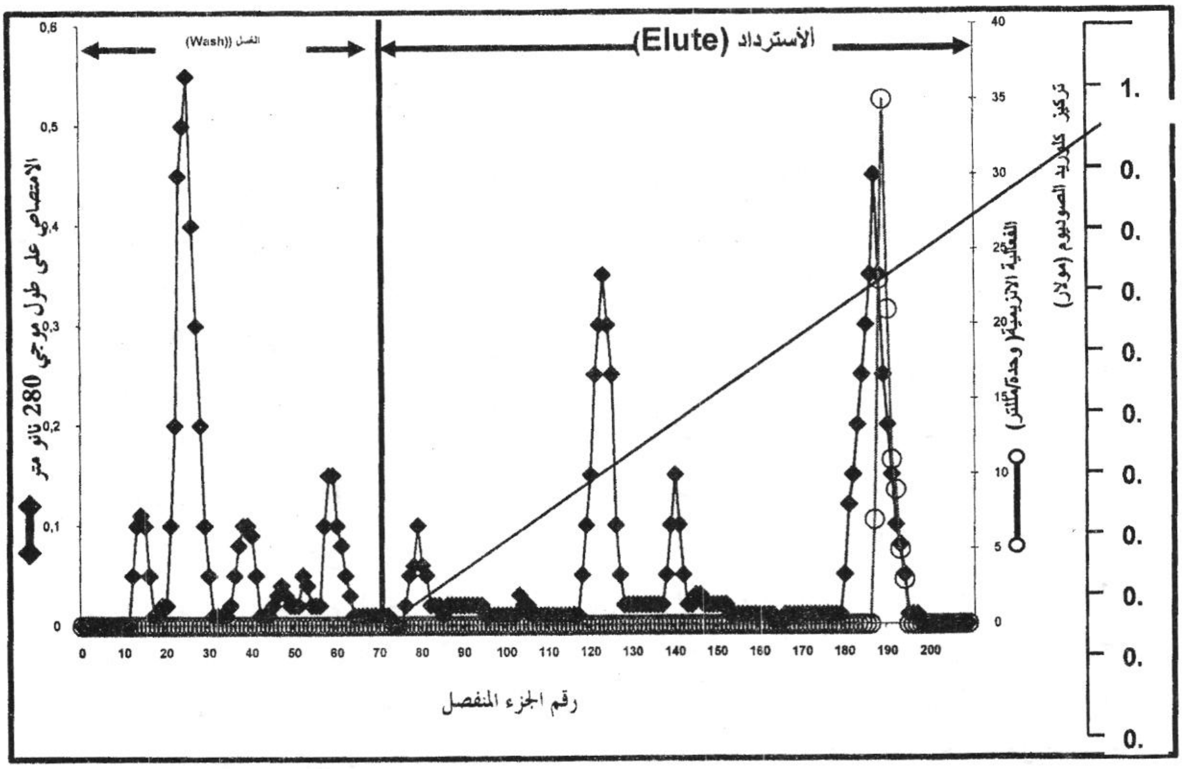
النتائج والمناقشة

استخلاص الانزيم

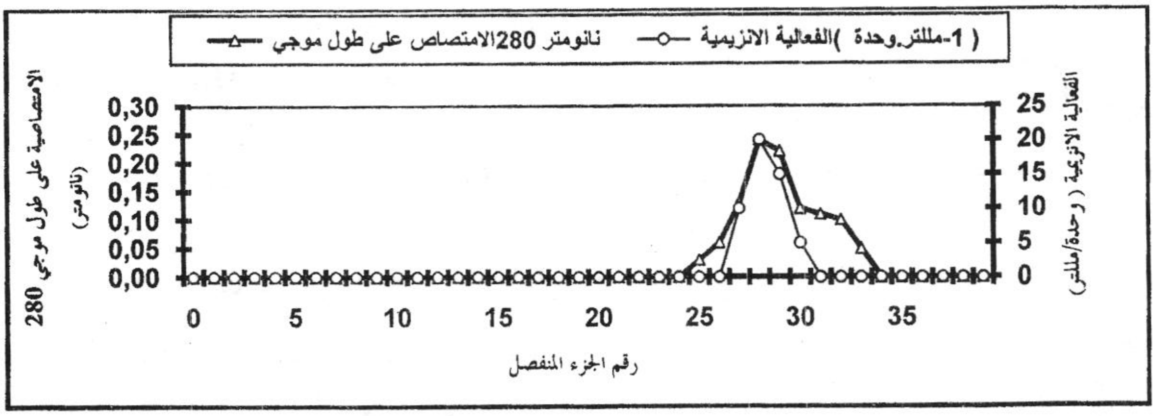
استخلص الانزيم الخام من خلايا كريات الدم البيض من أنواع متعددة الاشكال النووية PMN فقط المعزولة من خلايا الدم البيض الكلية باستخدام تقنية التدرج Ficoll، ويعود السبب في دراسة بروتييزات هذا النوع من الخلايا لانها تمثل اكبر نسبة من اعداد خلايا الدم البيض عند اصابة الابقار بالتهاب الضرع، اذ بلغت اعداد الخلايا الجسمية الكلية واعداد PMN المعزولة من حليب ابقار التي احدث فيها التهاب ضرع مفتعل لاغراض الدراسة و4.2×10^6 و3.5×10^6 خلية/مل حليب على التوالي، ويشير هذا إلى أن خلايا PMN مثلث اكثر من 70% من اعداد خلايا الدم البيض الكلية وعند مقارنة هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة أجريت بصدد الموضوع نفسه جاءت هذه النتائج متفقة مع ما ذكر في Moussaoi وجماعته (18). جدول (1) يلخص طريقة التنقية بخطواتها ونتائجها التي تضمنت تركيز الانزيم الخام باستخدام ملح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 20–90% واتضح من النتائج ان نسبة الاشباع 90% اعطت اعلى فعالية انزيمية مما يدل على استخلاص الانزيم بشكل كامل. ثم تلتها خطوة استخدم فيها المبادل الايوني السالب DEAE- Cellulose ونتيجة لهذه الخطوة من التنقية فعلاً تم الحصول على قمم بروتينية عدة (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 (17)، Moussaoui وجماعته (18) اللذان وجدا عند دراستهم لفعالية التحلل البروتيني في مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب ابقار مصابة بالتهاب الضرع ان هناك فعالية تحلل بروتيني عالية تعود الى Cathpsin D 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 Cathpsin D في القمم المفصولة واتضحت ان الفعالية وجدت في الانابيب 187– 194 في جزء الاسترداد (شكل1) وكانت الفعالية النوعية والحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية بعد خطوت التنقية بالمبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose هي 76.58 وحدة/ملغم و26.63% و2.96 مرة على التوالي. اكملت خطوة تنقية الانزيم بأمرار المحلول الانزيمي 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 الفعالية النوعية والحصيلة الانزيمية وعدد مرات التنقية هي 156.30وحدة /ملغم و22.65% و6.04 مرة على التوالي.

جدول1: خطوات تنقية أنزيم Cathepsin D المنقى من مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب أبقار أحدث فيها التهاب ضرع مفتعل

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	100	8.28	0.32	25.87	828	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 20-90 %	20	36.10	0.42	85.95	722	3.32	87.19
التبادل الايوني السالب DEAE- cellulose	24	9.19	0.12	76.58	220.56	2.96	26.63
الترشيح الهلامي SephadexG-100	12	15.36	0.10	156.30	187.65	6.04	22.65



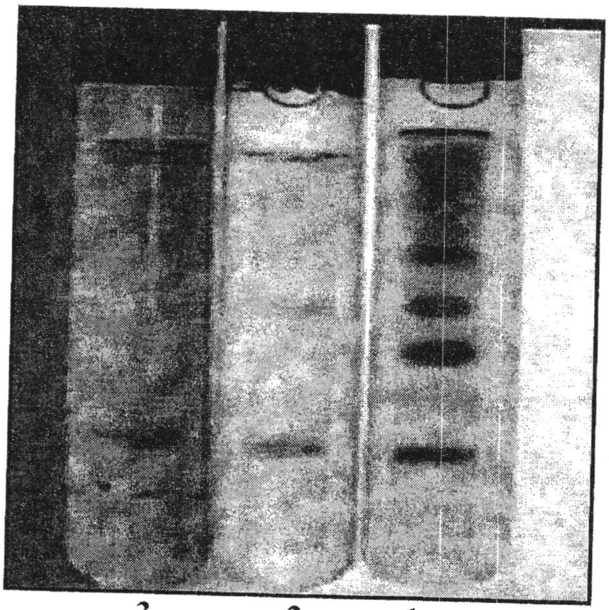
شكل 1: كروماتوكرافي التبادل الأيوني لتنقية Cathepsin D من مجنس عالق خلايا PMN المعزولة من حليب الضرع المصاب، باستخدام عمود المبادل الايوني DEAE-cellulose 26×2.4 سم تمت الموازنة باستخدام محلول الفوسفات الداري بتركيز 0.01 مولار ورقم هيدروجين 6.0، استردت الأجزاء المرتبطة بالمبادل بمحلول الموازنة نفسه والمحتوى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



شكل 2: كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-100 بأبعاد 2×65سم لتنقية أنزيم Cathepsin D تمت الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات الصوديوم الداريء بتركيز 0.1 مولار وبرقم هيدروجين 6.0 والمحتوى على 0.2 مولار كلوريد الصوديوم بسرعة جريان 21 مل/ساعة بواقع 3 مل للجزء الواحد.

اختبار نقاوة الانزيم

اشارت نتائج الترحيل الكهربائي لانزيم Cathepsin D أثناء مراحل التنقية الى ان الانزيم الذي تمت تنقيته على عمود المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose ما يزال محتوياً 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) شكل (3) واعد ذلك دليلاً على ان الانزيم نقي.



3 2 1

شكل 3: الترحيل الكهربائي لأنزيم Cathepsin D 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 و(3) الأنزيم المسترد بعد خطوة الترشيح الهلامي.

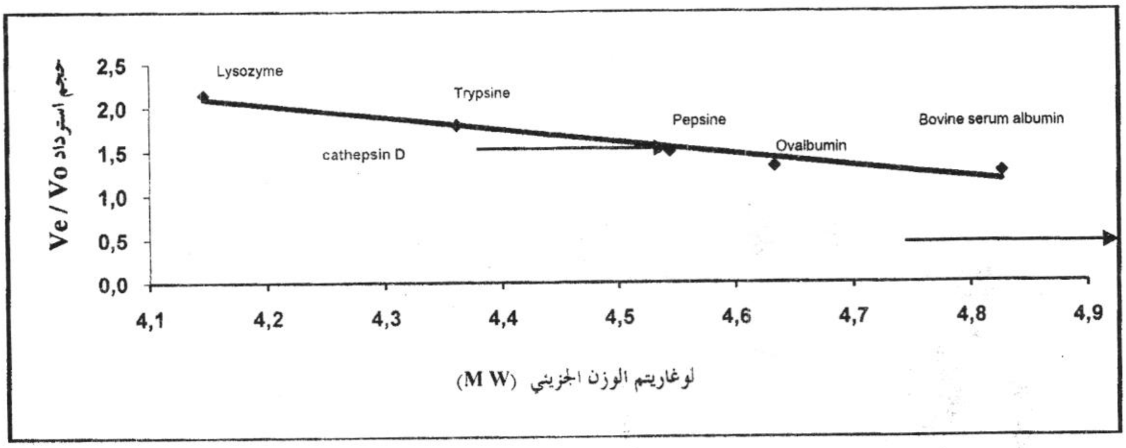
جاءت النتيجه مشابهة إلى ما توصل اليه Larsen وPetersen (11) اذ حصل على حزمة بروتينية واحدة عند استخدام طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للتأكد من نقاوة CTP D المعزول من الحليب البقري، ان الحصول على حزمة بروتينية واحدة في هلام الفصل دلالة على وصول الأنزيم إلى درجة عالية من النقاوة.

توصيف الانزيم

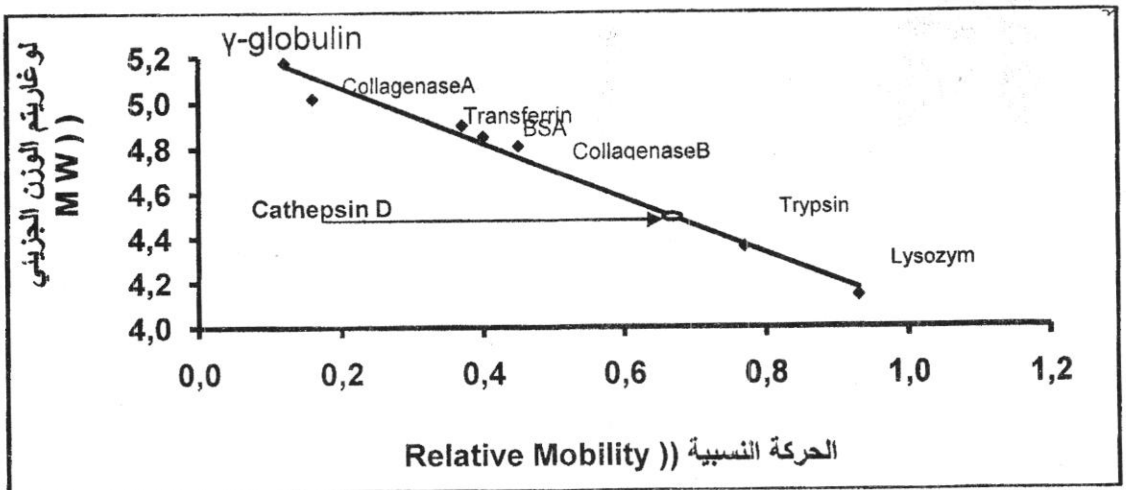
تقدير الوزن الجزيئي

قدر الوزن الجزيئي لانزيم Cathepsin D بطريقة الترشيح الهلامي وبلغت قيمته 31.622 كيلو دالتون (شكل 4) وكانت النتيجة مقاربة إلى ما ذكره Kaminogawa وYamauchi (8) والبالغة 36 كيلو دالتون للهيئة الفعالة للأنزيم المعزول من حليب الأبقار باستخدام طريقة الترشيح الهلامي، في حين أشار Larsen وPetersen (11) إلى أن الوزن الجزيئي CTP D المعزول من حليب الأبقار والمقدر بطريقة الترشيح الهلامي هو 42 كيلو دالتون للهيئة غير النشطة للأنزيم و36 كيلو دالتون للهيئة النشطة للأنزيم. كما امكن ايجاد الوزن الجزيئي للانزيم قيد الدراسة بطريقة الترحيل الكهربائي فكان 33.113 كيلو دالتون (شكل 5). وهي مقاربة للنتيجة التي توصل لها Hurley وجماعتـــه (6) من ان الوزن الجزيئي CTP D المعزول من نماذج جبن الكوارج المصنع من حليب أبقار

مصابة بالتهاب الضرع باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي الممنع يختلف باختلاف الهيئة التي يوجد فيها الأنزيم فهو 45 كيلو دالتون لسوابق الأنزيم ProCathepsin D و30 كيلودالتون للهيئة النشطة أحادية السلسلة و31 كيلودالتون للهيئة Heavy chain mature cathepsin D.



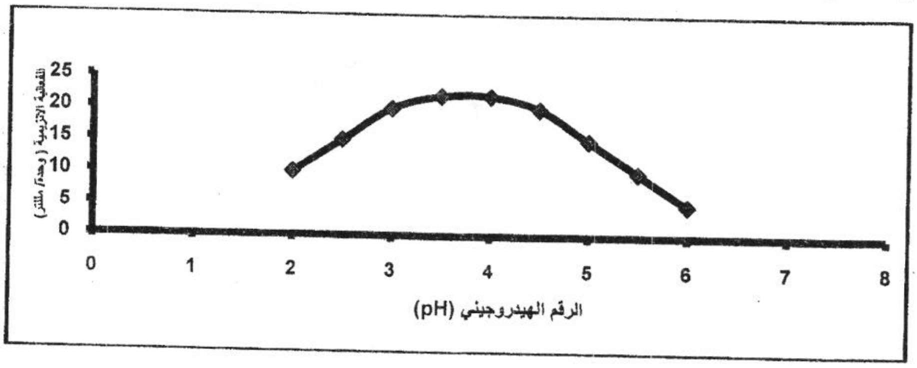
شكل 4: المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم Cathepsin D المنقى من خلايا PMN المعزولة من حليب الضرع المصاب بطريقة الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-100.



شكل 5: المنحنى القياسي لتقدير الوزن ألجزيئي لأنزيم Cathepsin D المنقى من حليب ابقار احدث فيها التهاب ضرع مفتعل بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة للبروتين.

تعيين رقم الهيدروجين الامثل لفعالية وثبات الانزيم

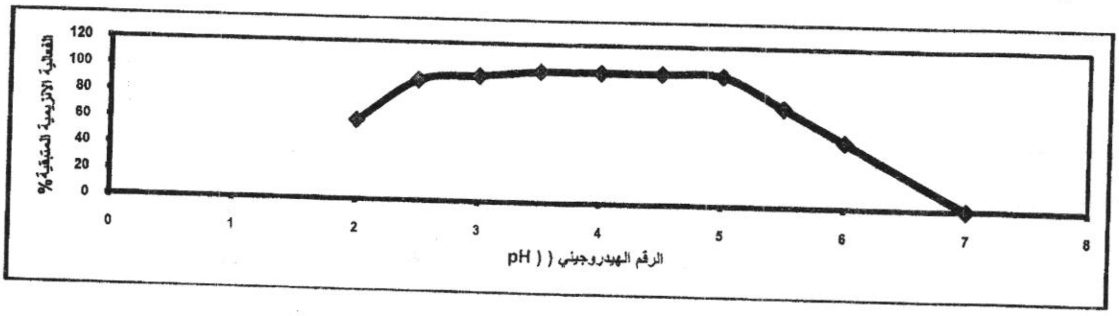
يلاحظ من الشكل (6) أن رقم الحموضة الامثل لفعالية أنزيم CTP D اتجاه، ألبومين المصل البقري هي 3.5 هذا مما يدل على أن الأنزيم يعود إلى مجموعة البروتييزات الحامضية ويلاحظ انخفاض الفعالية الأنزيمية كلما ارتفع رقم الهيدروجين كذلك شهدت الفعالية انخفاضاً مقداره 60% عند رقم هيدروجين 2.0 و70% عند رقم هيدروجين 6.0. تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Kaminogawa وYamauchi (8) الذي أشار إلى أن فعالية CTP D المعزول من حليب الأبقار تكون عند قمتها في رقم حهيدروجين مقداره 4.0. ووجد Larsen وPetersen (11) أعلى فعالية تحللية لانزيم CTP D المعزول من حليب الابقار المصابة بالتهاب الضرع اتجاه BSA كانت عند رقم هيدروجين 3.2.



شكل 6: منحنى رقم الهيدروجين الامثل لفعالية أنزيم Cathepsin D باستعمال BSA كمادة أساس.

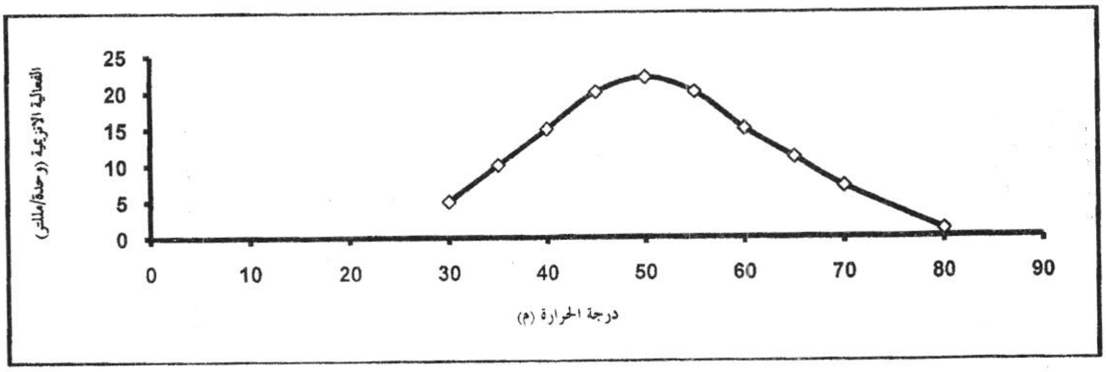
ويوضح شكل (7) ثبات CTP D إتجاه ارقام هيدروجين مختلفة. إذ أظهر الانزيم ثباتاً بمدى من قيم ارقام هيدروجين بين 5.0-2.5 بعد حضنه مدة 30 دقيقة على 37 ^{o}م بفعالية تراوحت 91.9-100%، ثم اخذت بالانخفاض وهذا يعني أن الأنزيم يكون ثابتاً في الأوساط الحامضية وان هذه الخاصية تساعد في تحديد ظروف خزن الأنزيم للحفاظ عليه لأطول مدة زمنية ممكنة. ويلاحظ من الشكل ذاته أن الفعاليـــة المتبقيـــة عنـــد رقـــم هيدروجين 6.0 هـــي فقـــط 50% من الفعالية الكلية.

اما عند رقم الهيدروجين 7.0 فقد الأنزيم كامل فعاليته ويعود هذا الانخفاض في ثبات الانزيم إلى تأثير رقم الهيدروجين في تركيب جزيئية الأنزيم بتغييره للتركيب الثالثي والثانوي للبروتين مما قد يحدث مسخاً لارجوعياً للأنزيم في المحاليل شديدة الحامضية أو القاعدية (21).

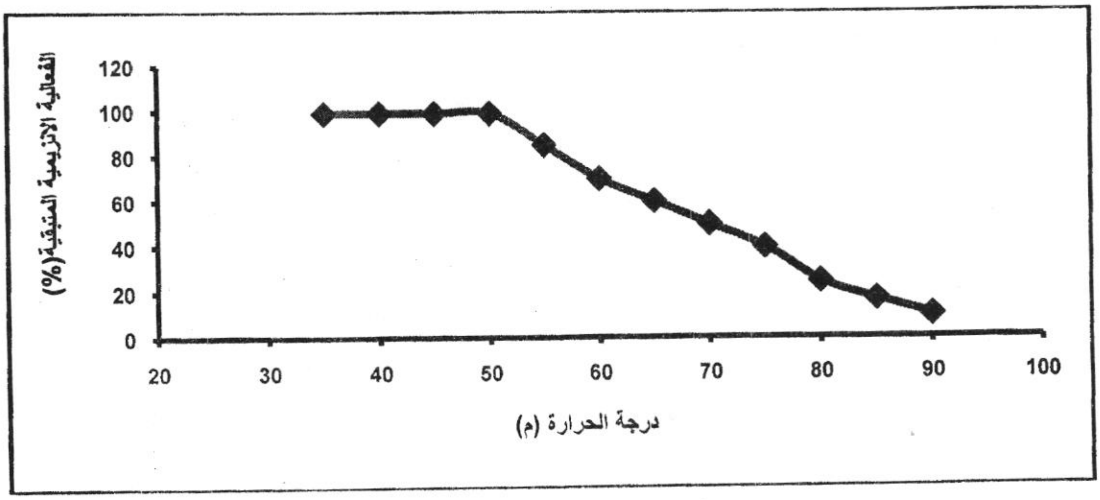


شكل 7: منحنى رقم الهيدروجين الامثل لثبات أنزيم Cathepsin D بقيم تراوحت بين 2.0-8.0 وفي درجة حرارة 37 ^{o}م ولمدة 30 دقيقة.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم: يوضح شكل (8) فعالية أنزيم CTP D إتجاه BSA كمادة خاضعة إذ يلاحظ حصول زيادة واضحة في الفعالية الأنزيمية بارتفاع درجة حرارة التفاعل لتصل أقصاها عند درجة حرارة 50 ^{o}م ثم انخفضت بشكل تدريجي لتصل إلى 20% من قيمتها القصوى عند درجة حرارة 70^{o}م و10% عند درجة حرارة 80^{o}م. تتفق النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع ما توصل إليه Kaminogawa وYamauchi (8) من أن أعلى فعالية أنزيمية يظهرها CTP D المعزول من حليب الأبقار إتجاه BSA هي عند درجة حرارة 50 ^{o}م .اوضحت نتائج حضن CTP D بدرجات حرارة 30-90 ^{o}م لمدة 30 دقيقة (شكل 9) أن الأنزيم يحتفظ بكامل فعاليته 99-100% بين درجة حرارة 30-50 ^{o}م ومن ثم انخفضت الفعالية تدريجياً لتصل إلى 50% عند درجة حرارة 70 ^{o}م و30% عند درجة حرارة 80 ^{o}م و10% عند درجة حرارة 90^o م. ويعد CTP D من البروتييزات ذات الثبات الحراري العالي جدا فقد وجد Larsen وPetersen (11) فعالية واضحة للأنزيم في، إنموذج حليب تم رفع درجة حرارته تدريجياً ليصل إلى 99 ^{o}م.



شكل 8: درجة الحرارة المثلى لفعالية أنزيم **Cathepsin D** المنقى من خلايا **PMN** المعزولة من حليب الضرع المصاب باستخدام **BSA** كمادة أساس بتركيز1% في محلول خلات الصوديوم الداري برقم هيدروجين **3.5**



شكل 9: تأثير درجة الحرارة في الفعالية التحللية لأنزيم **Cathepsin D** لدى حضنه لمدة **30** دقيقة في محلول خلات الصوديوم الداريء **0.01** مولار برقم هيدروجين **3.5**.

تقدير الثوابت الحركية للأنزيم

بلغت معدل قيم **Kcat, Vmax, Km** لأنزيم **CTP D 13.40**ملغم / مل و**156.05**ملي مول/ دقيقة و**1560.50** دقيقة–[1]. وعند مقارنة نتيجة هذه الدراسة مع نتائج دراسات سابقة وجد أن هناك صعوبة في مقارنة النتائج وذلك لاستخدام مواد أساس تختلف عن المادة الأساس المستخدمة في هذه الدراسة هذا فضلاً عن اختلاف مصدر الأنزيم.

تأثير العوامل المنشطة والمثبطة في فعالية الانزيم

عند دراسة تأثير بعض الكواشف في فعالية أنزيم **CTP D** اتضح من جدول (**2**) أن الفعالية الأنزيمية لم تتأثر في كل من **PMSF** و**SBTI** المثبطين المتخصصين للبروتييزات السيرينية إذ احتفظ الأنزيم بكامل فعاليته التحللية هذا مما يدل على إن الأنزيم لا ينتمي إلى مجموعة البروتييزات السيرينية، كما يلاحظ أن مثبطات البروتييزات المعدنية مثل **EDTA** و**1,10-Phenanthroline** لم تؤثر في فعالية الأنزيم قيد الدراسة مما يدل على أن الأنزيم لا يعود إلى مجموعة البروتييزات المعدنية (**Metallo proteinases**) بل وجد هناك تأثير لبعض المثبطات السيستينية في فعالية هذا الأنزيم، وهذا يتفق مع ما ذكره **Magboul** وجماعته (**13**) إن هناك علاقة معقدة بين **CTP B** و**CTP D** أية

علاقة معقدة بين البروتييزات السيستينية والأسبارتية إذ يعمل CTP D كمنشط لانزيم CTP B في حين يعمل CTP B كمثبط CTP D لذلك فإن الكواشف التي تنشط CTP B مثل DTT وMercaptoethanol تعمل على تثبيط عمل CTP D وهذا ما تمت ملاحظته إذ بلغت الفعالية الأنزيمية نتيجة لتأثيرهما 60 و80% على التوالي.

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

المادة الكيميائية	التركيز (ملي مولار)	الفعالية المتبقية (%)
أنزيم غير معامل	–	100
Pepstatin A	1ملي مول	0
PMSF	1ملي مول	95
Iodo acetic acid	0.1 ملي مول	100
Soy bean trypsin inhibitor	0.125 ملغم/مل	100
EDTA	2ملي مول	100
DTT	10ملي مول	60
1,10-Phenanthroline	10ملي مول	100
2- Mercapto ethanol	10ملي مول	80
Cysteine	10ملي مول	100
$CaCl_2$	10ملي مول	153
$CaCl_2$	50ملي مول	200
$CuCl_2$	5 ملي مول	100
$CuCl_2$	10ملي مول	100
$HgCl_2$	2ملي مول	70.30
$HgCl_2$	5 ملي مول	42.53
$HgCl_2$	10ملي مول	20.14
NaCl	10ملي مول	100
NaCl	50ملي مول	98.50
$ZnCl_2$	1ملي مول	48

في حين لم يكن IAA المثبط المتخصص للبروتييزات السيستينية أي تأثير في فعالية الأنزيم قيد الدراسة من هذا يمكن القول أن الأنزيم لا يعود إلى مجموعة البروتييزات السيستينية في حين لوحظ أن المثبط Pepstatin A المتخصص للبروتييزات الاسبارتية عمل على تثبيط فعالية الأنزيم بالكامل من هذا يمكن القول أن الأنزيم قيد الدراسة يحتمل أن يكون من البروتييزات الاسبارتية (الحامضية) ولا تحتوي خلايا PMN التي مصدرها دم الإنسان أو الحيوان إلا على أنزيم بروتييز حامضي واحد فقط يعود إلى مجموعة البروتييزات الاسبارتية وهو CTP D ومن خلال دراسة سلوكه مع المثبطات اتفقت نتيجة هذه الدراسة مع ما ذكره Fox (5) من أن CTP D يتثبط بفعل Pepstatin A بشكل كامل ولا يتأثر في كل من EDTA1 و10-Phenathroline وIAA. كما أفاد Mary (14) أن CTP

D المعزول من أنسجة اللبائن يثبط بشكل فعلي بكل من Dithioerythritol و Phenylpyruvic acid و Pepstatin A ولا تتأثر فعالية الأنزيم في ايونات Na^{+}، Fe^{2+} و Mg^{2+}. ومن خلال مراجعة صفات الأنزيم الأخرى التي تمت دراستها (حالياً) نجد أن النتائج جاءت مكملة لبعضها من حيث الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الأنزيم البالغ 3.5 هذا مما يدل على الأنزيم هو بروتييز حامضي كذلك درجة الحرارة المثلى والوزن الجزيئي الذي يتفق مع نتائج الدراسات السابقة التي أجريت عن CTP D، ومن مجمل هذا الكلام يمكن القول أن الانزيم المعزول من المحتمل ان يكون Cathepsin D.

المصادر

1- Bradford, J.A. (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. (2000). Role of Somatic Cell Count Proteinases in Dairy Product Quality. PhD. Thesis, University Collage Cork, Ireland.

3- Dash,C.; A. Kulkarni; B. Dunn and M. Rao (2003). Aspartic peptidase inhibitors implications in drug development.Critical Reviews in Bioch and Mole Biol., 2: 89-119.

4- Foltmann, B. (1970). Prochymosin (prorennin and rennin). In "Methods Enzymology", Vol.19 (ed. by G.E.Perlmann and L. Lorand) Academic press, New York.

5- Fox, P.F. (1981). Proteinases in dairy technology. Neth. Milk Dairy J., 35: 233 - 253.

6- Hurley, M.J.; L.B. Larsen; A.L. Kelly and P.L.H. McSweeney (2000 a). Cathepsin D activity in quarg. Int .Dairy. J., 10: 453-458.

7- Hurley, M.J.; L.B. Larsen; A.L. Kelly and P.L.H. McSweeney (2000b). The milk acid proteinase Cathepsin D: A review: Int. Dairy. J., 10: 673-681.

8- Kaminogawa, S. and K. Yamauchi (1972). Acid protease of bovine milk. Agric. Biol. Chem., 36: 2351-2356.

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; A. Boison and T.E. Petersen (1993). Procathepsin D cannot auto activate to cathepsin D at acid pH. FEBS., 319: 54-58.

11- Larsen, L.B. and T.E. Petersen (1995). Identification of five molecular forms of cathepsin D in bovine milk, in "In Aspartic proteinase: structure, function". Biol. and Biomedical Application, PP 279-283. (Ed. K .Takahashi), Plenum Press .New York.

12- Larsen, L.B.; H. Wium; C. Benfeldt; C. Heegaard; Y. Ardo; K. Quist; and T.E. Petersen (2000). Bovine cathepsin D: presence and activity in heated milk and extracts of rennet free UF.Feta. Int. Dairy J., 10: 67-74.

13- Magboul, A.A.; L.B. Larsen; P.L.H. McSweeney and A.L. Kelly (2001). Cysteine protease activity in bovine milk. Int. Dairy. J., 11: 865 - 872.

14- Mary, J.M. (1970). Cathepsin. In "Methods in Enzymology", Vol XIX Proteolytic Enzymes (ed.by G. E. Perlmann and L. Lorand). Academic Press. New York.

15- 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. Immun. J., 9: 812-817.

16- McSweeney, P.L.H.; P.F. Fox and N. Olson (1995). Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D:Preliminary observation and comparison with chymosin. Int. Dairy.J., 5: 321-336.

17- Mehrazad, J.; G. Desrosiers; K. Lauzone; Robitaille, G.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.

18- 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.

19- 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.

20- Murachi, T. (1970). Bromelain enzymes In "Methods in Enzymology" Vol.19 (ed. by G.E. Perlmann and L. Lorand). Academic press. New York.

21- Whitaker, J.R.; P.E. Granum (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. J. Anal. Biochem., 109: 156-159.

ISOLATION,PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACID PROTEASES FROM LEUKOCYTES CELLS ISOLATED FROM MASTITIS BOVINE MILK

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

ABSTRACT

Acid proteases was isolated from Polymorph nuclear leukocytes and purified by the Ion-exchange column DEAE-Cellulose, followed by gel filtration on Sephadex G-100 column, Specific activity, purification folds and the enzyme yield were 156.30 unit/mg, 6.04 and 22.65% respectively. The purity of obtained enzyme was tested by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate and indicated that it had been purified to homogeneity by giving a single band. The results of enzyme characterization showed that the molecular weights were 31.6 and 33.113 Kd as determined by gel filtration and electrophoresis. The optimum pH for the enzyme activity was 3.5 and was stable at pH values ranged between 2.5-5.0. The enzyme exhibited the maximum activity at 50°C. The study of heat stability revealed that the enzyme was retained active even when incubated over 30 min at 30-50° C. The carbohydrate content was 22.5%. When enzyme treated with some activator and inhibitors It was observed that the enzyme activity wasn't effected by inhibitors specific for metallo, serine and cysteine protease but it was completely inhibited by inhibitor specific for aspartic protease (Pepstatin A) thus it could be identify as aspartic proteases. It was observed that the addition of NaCl hadn't effect enzyme activity mean while CaCl2 activated the Km, Vmax and Kcat values were 13.40 mg/ml, 156.50mM/min, 1560.04min^{-1}, respectively.

Part of PhD. thesis of the first author.
College of Agric.- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.