Iraqi Journal of Science

استخلاص وتنقية أنزيم Staphylolysin المنتج من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

شيماء سهيل نجم و مي طالب فليح*
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد، العراق.

الخلاصة

عزلت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من عينات سريرية مختلفة تضمنت الادرار، والقشع ، والبراز ، ومسحات الاذن ، والجروح، والحروق. واختبرت قابليتها على انتاج انزيم الستافيلولايسين على وسط ترتبك صويا الصلب + 0.2% (وزن/حجم) من بكتريا*Staphylococcus aureus* المعزولة المقتولة بالحرارة عند درجة 100م. إذ تراوحت أقطار الهالة الشفافة 5-22ملم حيث انتخبت العزلة P_{16} لاستخلاص الستافيلولايسين A (LasA) ، إذ بلغت الفعالية النوعية لها (8.59) وحدة / ملغم بروتين ، والعزلة P_5 لاستخلاص الستافيلولايسين D (LasD)، إذ بلغت الفعالية النوعية لها (0.66) وحدة / ملغم بروتين ،لكونهما الاغزر انتاجا للانزيم . استخلص انزيم الستافيلولايسين بالنبذ المركزي المبرد وتمت تنقيته جزئيا بترسيبه بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 80% ثم بكروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose ، بينت النتائج إن الفعالية الانزيمية الحالة للعنقوديات (Staphylolytic activity) لانزيم الستافيلولايسين A ظهرت في القمة الاولى، وبلغت عدد مرات التنقية 10.74 مرة وبحصيلة انزيمية 14.2%،فيما اظهرت القمة الثانية الفعالية الانزيمية الحالة للعنقوديات لانزيم الستافيلولايسين D بعدد مرات تنقية 9.1 مرة وبحصيلة انزيمية 18.14%.

Extraction and Purification of Staphylolysin enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa*

Shayma'a S.Najim and May T. Flayyih*
Department of Biology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad, Iraq.

Abstract :

Pseudomonas aeruginosa was isolated from various clinical samples included urine, sputum, stool, ear, wound & burn swabs. Detection of the ability of local isolates to produce staphylolysin enzyme was studied, on Tryptic soya agar + 0.2% (wt./vol.) of heat killed *Staphylococcus. aureus* at temperature 100°C. medium and the diameters of lysis zone ranged from 5-22mm, then the isolate P_{16} was chosen to extract staphylolysin A (LasA) and its specific activity reaches 8.59 unit /mg protein, whi1e the isolate P_5 was chosen to extract staphylolysin D (LasD) where it's specific activity reaches 0.66 unit /mg protein since the two isolates were the most production of enzyme. Staphylolysin enzyme was extracted by cooling centrifugation and partially purified by ammonium sulphate precipitation in saturation percentage of 80%, this step was followed by Ion exchange chromatography technique by using DEAE- cellulose column, results showed that the enzymatic activity (Staphylolytic activity) of the staphylolysin A appeared in first peak with purification folds and recovery of 10.74 fold and 14.2% respectively, while the second peak appeared the activity for staphylolysin D with purification folds and recovery of 9.1 fold and 18.14% respectively.

*Email: maytalib@yahoo.com

المقدمة

تعد بكتريا *P. aeruginosa* من الانواع البكتيرية الممرضة واسعة الانتشار في البيئة ، اذ تستطيع النمو في التربة والماء وعلى الانسجة النباتية والحيوانية ،وقد تلاحظ عادة نامية في الماء المقطر مما يدل على احتياجاتها التغذوية المحدودة. ولكون هذه البكتريا من الكائنات الانتهازية (Opportunistic Pathogens) فهي تشكل خطرا حقيقيا للمرضى الراقدين في المستشفيات لاسيما مرضى الحروق والتليف الكيسي وذات الرئة والسرطان والمصابين بنقص المناعة المكتسبة والمثبطين مناعيا وان نسبة الوفيات المرتفعة بسبب اصابات هذه البكتريا تعود الى ضعف الجهاز المناعي للشخص ومقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية فضلاً عن تعدد وشدة عوامل الضراوة التي تمتلكها [2,1].

يعد انزيم الستافيلولايسين (EC3.4.24.B16) من الانزيمات المحللة للجدار الخلوي لخلايا العنقوديات المقتولة حراريا بطريقة تختلف عن انزيم اللايسوزايم وذلك بمهاجمة الاواصر الببتيدية ضمن الجسور العرضية خماسية الكلايسين في طبقة الببتيدوكلايكان ، تنتج بكتريا *P. aeruginosa* نوعين من انزيمات الستافيلولايسين الحالة للعنقوديات: الستافيلولايسين(Las A) A والستافيلولايسين D (Las D).[3] لانزيم الستافيلولايسين A القابلية على تحليل العديد من مكونات الانسجة الرابطة المحتوية على الحامض الاميني الكلايسين فضلا عن قدرته على تحليل الايلاستين والكولاجين[4] ، كما له القابلية على تحليل العديد من البيبتيدات الخماسية المحتوية على الحامض الاميني الكلايسين ووجد ان له القدرة على تحليل 22 نوعا من البيبتيدات الخماسية الموجودة في Tropoelastin البشري[5]. بينما يزيد الستافيلولايسين D من امراضية البكتريا عن طريق تحويل انزيم الستافيلولايسين A من الشكل غير الفعال الى الشكل الفعال[3].

لانزيم الستافيلولايسين A دورا مهما في مرحلة الاستيطان حيث يقوم بتحليل بكتريا الـ *S. aureus* المنافسة لبكتريا *P. aeruginosa*[4]، كما يستعمل الانزيم عاملا علاجيا لالتهاب القرنية المتسبب عن *S. aureus*[6].

الهدف من البحث:

اختبار قابلية العزلات على انتاج انزيم الستافيلولايسين D،A واستخلاص الانزيمين وتنقيتهما بالطرق البايوكيميائية.

طرئق العمل: .

جمع العينات: جمعت العينات السريرية من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى اليرموك التعليمي ومستشفى الطفل المركزي في بغداد أخذت العينات من التهابات المجاري البولية (بجمع الإدرار في حاويات نظيفة ومعقمة) والجروح والحروق والتهاب الأذن والقشع (أخذت مسحات باستخدام swab معقم) وعينات براز تم جمعها في حاويات نظيفة ومعقمة.

عزل وتشخيص البكتريا : زرعت العينات على وسط أكار الماكونكي الأنتقائي (**MacConkey Agar**) كزرع أولي وبعدها تم زرع العينات على اوساط اغنائية وتفريقية لغرض عزل البكتريا اذا استعمل وسط أكار الدم (Blood agar) ووسط اكار السترمايد 0.03% (0.03% cetrimide agar) ووسط kingB, kingA (king A and king B medium) وحضنت الاطباق عند درجة 37م لمدة 18-24 ساعة ثم درست الصفات المظهرية واجريت الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية التي ظهرت من الزرع البكتيري على وسط الاكار المغذي (Nutrient agar) كما ورد في [7،8] ، إذ لوحظ شكل وحجم المستعمرة ولونها وانتاجها للصبغة وحوافها ورائحتها ونوع التحلل الذي احدثته في وسط أكار الدم وشخصت باستخدام كل من اختبارات الاوكسيديز، الكاتاليز، واختبار النمو بدرجة حرارة 42م و 4م واختبار الاندول ، اختبار المثيل الاحمر، اختبار الفوكس بروسكاور، اختبار اختزال السترات ، اختبار النمو في وسط TSI ، اختبار الأكسدة والتخمر، واختبار التحري عن قابلية البكتيريا على الحركة.

اختبار قابلية العزلات على انتاج أنزيم الستافيلولايسين : اختبرت قدرة العزلات على إنتاج إنزيم الستافيلولايسين بمرحلتين الاولى وفيها استخدم وسط تربتك صويا الصلب + 0.2 % (وزن/ حجم) من بكتريا *S. aureus* المعزولة المقتولة بالحرارة [9]. وذلك بتخطيط العزلات على سطح الوسط بشكل خط مستقيم وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م ثم شخصت العزلات المنتجة للإنزيم بتكوينها الهالة الشفافة كما حدد قطر الهالة المتكونة حول النمو.

انتاج انزيم الستافيلولايسين:

حضر مزروع منشط من عزلتي البكتريا قيد الدراسة وذلك بزرعها في وسط نقيع الدماغ والقلب السائل وحضنت عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ثم حضر لكل عزلة بكتيرية 300 مل من وسط الانتاج تربتك صويا السائل الخالي من الدكستروز برقم هيدروجيني 7.3 ووزع على دوارق مخروطية سعة 250 مل لقحت هذه الدوارق بنسبة 1% من المزروع البكتيري بعمر

24 ساعة ، ثم حضنت بحاضنة هزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة وعند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، عرضت المزارع البكتيرية الى النبذ المركزي المبرد بسرعة 20000xg لمدة 60 دقيقة عند درجة 4م [4،10]، اخذ الرائق (Supernatant) الذي يمثل المستخلص الانزيمي الخام (Crude enzyme) وقدرت فعالية انزيمي الستافيلولايسين A,D وتركيز البروتين بطريقة لاوري [11].

تقدير فعالية انزيمي الستافيلولايسين D,A

أ- تحضير خلايا المادة الأساس (مادة التفاعل)

نُميت بكتريا *S. aureus* في وسط مرق نقيع الدماغ والقلب السائل بحجم 30مل بدرجة حرارة 37 م ولمدة 18 ساعة ،ثم غُلي الوسط لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 100 م ،وأجري النبذ المركزي لمدة 10 دقائق عند 3500 دورة / دقيقة وأُخذ الراسب لتحضير العالق البكتيري [9].

ب- تقدير فعالية إنزيم الستافيلولايسين A [10] .

- أضيف 0.05 مل (50 µl) من الإنزيم الى 1 مل من المادة الاساس (عالق خلايا S.aureus المقتولة حرارياً) في انبوبة ابندروف بحجم 1.5 مل .
- مزج محلول التفاعل باستخدام المازج وقيست الأمتصاصية باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 595 نانوميتر.
- قدرت الفعالية استنادا الى المعادلة الآتية :

الفعالية (وحدة/مللتر) =

الامتصاصية 595 نانوميتر × الحجم الكلي في خلية الجهاز(مللتر)

الانخفاض في قراءة جهاز المطياف في الدقيقة الواحدة(0.001)× زمن التفاعل (دقيقة)× حجم الانزيم(مللتر)

عرفت وحدة الفعالية للإنزيم (Unit) أنها كمية الإنزيم التي تسبب انخفاضاً للإمتصاصية عند الطول الموجي 595 نانوميتر مقداره وحدة امتصاصية واحدة بالدقيقة [4].

ج- تقدير فعالية إنزيم الستافيلولايسين D [12]

- أضيف 1 مل من الإنزيم الى 1 مل من المادة الاساس(عالق خلايا S.aureus المقتولة حرارياً)، أي بنسبة 1:1 حجم/حجم
- حضن مزيج التفاعل بدرجة حرارة 37م ولمدة زمنية أكثر من 3 ساعات .
- قيست الأمتصاصية عند الطول الموجي 595 نانوميتر كل 30 دقيقة .
- قدرت الفعالية استناداً الى المعادلة السابقة.

تنقية انزيم الستافيلولايسين :

اجريت عملية التقنية على وفق الخطوات الآتية:

1- الترسيب بكبريتات الأمونيوم Ammonium Sulphate precipitation

أضيفت بلورات كبريتات الأمونيوم الى المستخلص الإنزيمي الخام تدريجياً للحصول على نسبة اشباع 50 % في حمام ثلجي مع التحريك المستمر، ثم ترك المحلول عند درجة حرارة 4 م مع التحريك المستمر لمدة 18 ساعة (Over night) ، ثم نبذ المحلول بسرعة 20000 xg لمدة 60 دقيقة عند درجة 4 م ، فصل الطافي وأضيف اليه كمية أخرى من كبريتات الأمونيوم وبشكل تدريجي أيضاً لتصل نسبة الأشباع 80 % تحت الظروف نفسها ثم نبذ المحلول بسرعة 20000 xg لمدة 60 دقيقة [10،13].

جمع الراسب وأذيب في حجم معين من محلول Tris – Hcl الدارئ (0.02 مولار و pH = 7.5)، وحفظ في الثلاجة وقدرت فعالية الستافيلولايسين A وD وتركيز البروتين والحجم النهائي للمحلول ،كما وقدرت الفعالية النوعية للإنزيمين على وفق المعادلة الآتية :

الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين) =

$$\frac{\text{الفعالية الانزيمية (وحدة / مللتر)}}{\text{تركيز البروتين (ملغم/ مللتر)}}$$

2- الديلزة Dialysis (الفرز الغشائي)

جرت عملية الديلزة لمحلولي الإنزيمين بعد الترسيب بكبريتات الأمونيوم بوضعهما في كيس الديلزة (10-KDa)[10] مقابل دارئ Tris – Hcl (0.02 مولار و pH = 7.5)، وحضن في الثلاجة لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر مع إجراء تبديلات عدة للدارئ خلال مدة الحضن ، ثم قدرت فعالية الإنزيم وتركيز البروتين والحجم النهائي للمستخلص .

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-cellulose

أضيف 5 مل من المستخلص الإنزيمي الخام وبتركيز 2.625 ملغم / مل الى عمود المبادل الأيوني DEAE-Cellulose المحضر الذي سبق غسله وموازنته بدارئ Tris – Hcl (0.02 مولار و pH = 7.5) بسرعة جريان 2 مل / دقيقة[10]. جمعت أجزاء الغسل بواقع 8.7 مل / جزء[13] ، وتم استرداد البروتينات المرتبطة بالعمود باستخدام الدارئ نفسه وبتدرج ملحي من كلوريد الصوديوم 0.4, 0.7, 1 , 1.3

(0 ,0.1 مولار) [10] اجرت خطوات تنقية الإنزيم جميعها في ظروف مبردة ،وتم متابعة تركيز البروتين وفعالية الإنزيم في الأجزاء المنفصلة بقياس امتصاص الضوء عند طول موجي 280 نانوميتر ، ورسم منحنى العلاقة بين الامتصاصية والأجزاء المفصولة من العمود ، وجمعت أجزاء القمم الفعالة وأجري لها تقدير الفعالية النوعية .

في حين أضيف المستخلص الإنزيمي الخام الثاني بحجم 2.4 مل وبتركيز 3.6875 ملغم/ مل في أعلى العمود واتبعت الخطوات ذاتها اعلاه وقيست الامتصاصية للأجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانوميتر ، ورسم منحنى العلاقة بين الامتصاصية والأجزاء المفصولة من العمود ، جمعت أجزاء القمم الفعالة ، وتم التحري عن الفعالية لانزيم الستافيلولايسين D وقياس تركيز البروتين.

النتائج والمناقشة :

عزل وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa*

اظهرت نتائج العزل ان 50 عزلة عائدة لبكتريا ***P.aeruginosa*** شخصت بالاعتماد على الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية المبينة في الجدول (1).

جدول 1- نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة

الاختبارات	النتيجة
وسط الماكونكي	نمو (مستعمرات شاحبة)
وسط السترمايد	نمو
اكار الدم	تحلل تام (β- hemolysis)
النمو عند 42م	(+)
النمو عند 4م	(-)
وسط King A	نمو + افراز صبغة البايوسيانين
وسط king B	نمو + افراز صبغة البايوفريدين
Oxidase	(+) لونه ارجواني
Catalase	(+) ازيز وفقاعات
أختبار الاندول	(-)
المثيل الاحمر	(-)
فوكس بروسكاور	(-)
اختزال السترات	(+)
Tsl	K / K - -
اختبار الاكسدة والاختزال	(+) في الانبوبة المفتوحة
اختبار الحركة	(+)

(+) : تمثل النتيجة الموجبة، (-) : تمثل النتيجة السالبة

قابلية العزلات على انتاج انزيم الستافيلولايسين

أظهرت النتائج ان 18 عزلة من العزلات قيد الدراسة قد انتجت الانزيم اعتماداً على ظهور الهالة الشفافة حول مستعمراتها ، إذ تراوحت اقطار الهالة الشفافة من (5-22) ملم جدول (2) ، فكانت العزلة P_5 أكثر العزلات انتاجاً إذ اعطت منطقة تحلل بقطر بلغ 22 ملم. حيث تبين ان خلو وسط الانتاج من الدكستروز هو الأفضل في انتاج الأنزيم حيث ان وجود مصادر كاربونية سهلة الاستهلاك في وسط انتاج الستافيلولايسين يعمل على تحفيز ظاهرة تثبيط الهدم (Catabolite repression) نتيجة لارتفاع مستوى الادينوسين احادي الفوسفات الحلقي (cAMP) في الخلايا البكتيرية الذي يؤدي بدوره الى تثبيط انتاج الانزيم وعليه فأن البكتريا تعتمد على الببتيدات الموجودة في متحلل الكازائين كمصدراً معقداً للكاربون يحفز انتاج الانزيم ومصدراً للنيتروجين في الوقت نفسه ، كما يحوي الوسط على فوسفات البوتاسيوم احادي الهيدروجين مصدراً للفسفور وتعود اهمية الفسفور لحياة الخلايا البكتيرية لكونه يدخل في تصنيع مركبات خلوية مهمة كالاحماض النووية والدهون الفوسفاتية مما يؤدي الى زيادة الكتلة الحيوية للخلايا وبالتالي زيادة انتاج الانزيم[16] .

جدول 2- اقطار الهالة الشفافة للعزلات البكتيرية المنتجة للستافيلولايسين

رمز العزلة	مصدر العزل	قطر الهالة الشفافة (ملم)
P_5	الحروق	22
P_6	الاذن	16
P_8	الجروح	6
P_{10}	الادرار	8
P_{11}	البلغم	9
P_{14}	الجروح	5.5
P_{15}	الجروح	10
P_{16}	الجروح	16.5
P_{17}	الادرار	18
P_{18}	الادرار	6.3
P_{19}	الاذن	17.5
P_{20}	البلغم	9
P_{24}	الاذن	7.6
P_{28}	البراز	7
P_{34}	البراز	5

P_{37}	الجروح	8
P_{42}	الحروق	8.4
P_{45}	الاذن	7

- **قطر الهالة المتكونة حول النمو < 10 ملم = فعالية واطئة**
- **قطر الهالة المتكونة حول النمو ≥ 10 ملم = فعالية عالية [14]**

الغربلة الكمية للعزلات البكتيرية

ثم غربلت العزلات التي اعطت اوسع تحللا لخلايا بكتريا *S. aureus* (المعزولة المقتولة بالحرارة) فبعد استخلاص انزيم الستافيلولايسين من العزلات المذكورة آنفا بالنبذ المكزي المبرد. قدرت الفعالية الانزيمية للمستخلص الخام (الستافيلولايسين D,A) بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 595 نانوميتر.

حيث تميزت العزلات P_{16} و P_5 بانتاجها العالي للمستخلص الانزيمي الخام الستافيلولايسين D,A على التوالي قياسًا بباقي العزلات جدول (3) ، اذ بلغت الفعالية النوعية لانزيم الستافيلولايسن A لعزلة P_{16} = 8.59 وحدة/ ملغم بروتين ، في حين بلغت الفعالية النوعية لانزيم الستافيلولايسين D لعزلة P_5= 0.66 وحدة/ملغم بروتين.

جدول 3- غربلة العزلات البكتيرية لفعالية انزيم الستافيلولايسين (D,A)

رمز العزلة	الفعالية الانزيمية للستافيلولايسين A(وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية للستافيلولايسن A (وحدة/ملغم)	الفعالية الانزيمية للستافيلولايسن D (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية للستافيلولايسين D (وحدة/ملغم)
P_5	35	5.26	6.65	3.5	5.26	0.66
P_6	30	3.66	8.19	1.56	3.66	0.42
P_{15}	32.5	6.68	4.86	1.06	6.68	0.15
P_{16}	32.5	3.78	8.59	0.13	3.78	0.03
P_{17}	32.5	4.11	7.90	0.36	4.11	0.08
P_{19}	35	5.43	6.44	0.4	5.43	0.07

ويعود التفاوت في انتاج الستافيلولايسين بين العزلات الى ان بعض العزلات على الرغم من امتلاكها الجين المسؤول عن انتاج الانزيم فانها تفشل في التعبير عن الانزيم وذلك لحاجتها الى اشارات اضافية او تفاعلات غير موجودة في الوسط لتسهم في التعبير عن الجين المسؤول عن انتاج الانزيم فضلا عن المصادر المختلفة للعزل[15].

استخلاص انزيم الستافيلولايسين

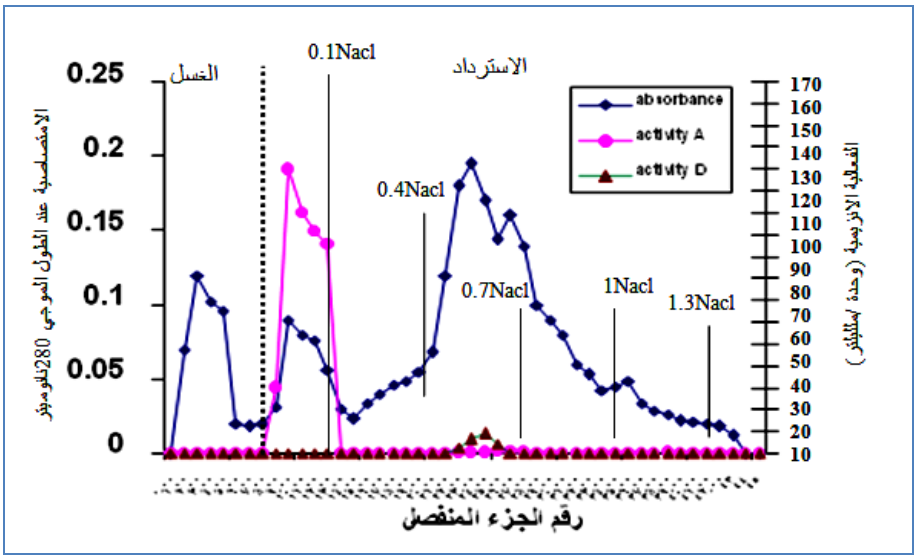
استخلص انزيم الستافيلولايسين بتعريض المزروع البكتيري للعزلتين P_{16} و P_5 للنبذ المركزي المبرد بسرعة 20,000xg لمدة 60 دقيقة وبدرجة 4م ، وقدرت الفعالية النوعية للمستخلص الخام للستافيلولايسين A حوالي 8.59 وحدة/ملغم وللمستخلص الخام للستافيلولايسين D بحوالي 0.66 وحدة / ملغم .

تنقية انزيم الستافيلولايسين

نقي النوعين من الانزيم جزئياً بترسيبهما باستعمال كبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع 80% وتم الحصول على فعالية لانزيم الستافيلولايسين A مقدارها 32.45 وحدة/ملغم بروتين وعدد مرات تنقية 3.77 مرة وحصيلة انزيمية بلغت 28.4%، في حين تم الحصول على فعالية نوعية لانزيم الستافيلولايسين D مقدارها 2.10 وحدة/ ملغم بروتين وعدد مرات تنقية 3.18 مرة وحصيلة انزيمية بلغت 34.92%. اعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم خطوة الديلزة بدارىء Tris-Hcl (0.02مولار ، pH = 7.5) ثم أجريت خطوة كروموتوغرافيا التبادل الايوني بامرار المحلول الانزيمي الناتج من الديلزة خلال عمود المبادل الايوني ثنائي اثيل امينو اثيل سليلوز (DEAE-Cellulose) وبعد جمع الاجزاء النافذة لوحظ انفصال قمم بروتينية عدة مع ظهور فعالية للستافيلولايسين A المنقى من العزلة P_{16} عند القمة المحصورة عند الاجزاء (9-13) .وتم الحصول على عدد مرات تنقية قدرها 10.74 مرة وحصيلة انزيمية بلغت 14.2% شكل (1) وجدول (4) .

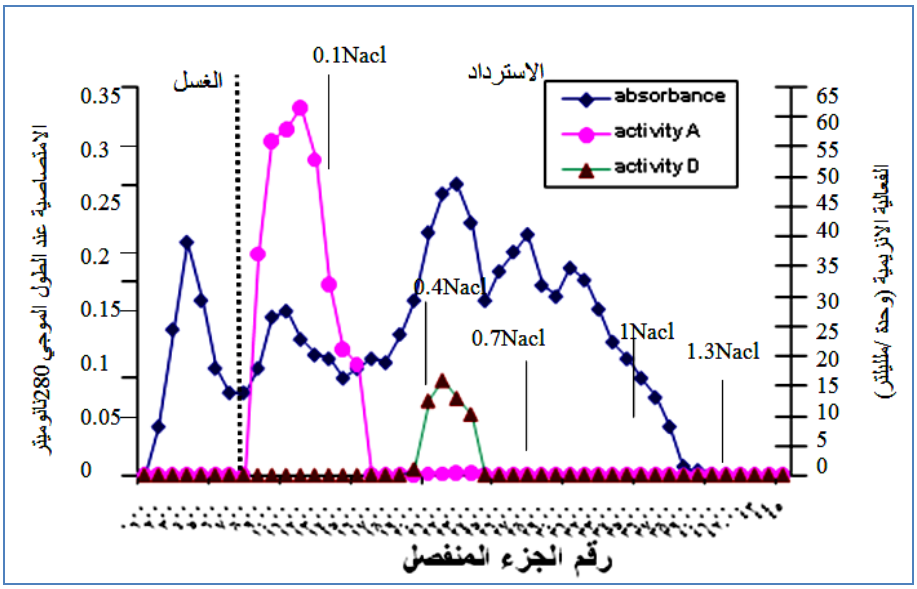
في حين ظهرت فعالية الستافيلولايسين D المنقى من العزلة P5 عند القمة المحصورة عند الاجزاء(21-24). وتم الحصول على عدد مرات تنقية قدرها 9.1 مرة وحصيلة انزيمية بلغت 18.14% شكل (2) وجدول (5).

تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه الباحثين [10، 17] عندما استخدم المبادل DEAE-cellulose ، حيث اظهرت الاجزاء النافذة اولا فعالية لانزيم الستافيلولايسين A (Staphylolytic activity) ، كذلك استخدم من قبل[4] في تنقية الانزيم ونتجت عن ذلك اربع قمم بروتينية ، اظهرت القمة الاولى فعالية لانزيم الستافيلولايسين A ،



شكل 1- تنقية انزيم الستافيلولايسين A من بكتريا P_{16} *P.aeruginosa* بتقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود DEAE-Cellulose بابعاد (3.3×11.6)سم

تم الغسل بمحلول دارىء Tris-Hcl 0.02 مولار ،وبرقم هيدروجيني 7.5 ،والاسترداد بمحلول دارىء Tris-Hcl 0.02 مولار ،وبرقم هيدروجيني 7.5 ،وبتدرج ملحي بمدى 0-1.3 مولار من كلوريد الصوديوم ،وبسرعة جريان 2مل/د. وبواقع 8.7 مل/جزء.



شكل 2- تنقية انزيم الستافيلولايسين D من بكتريا P_5 *P.aeruginosa* بتقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود DEAE-Cellulose بابعاد (3.3×11.6)سم

تم الغسل بمحلول دارىء Tris-Hcl 0.02 مولار ،وبرقم هيدروجيني 7.5 ،والاسترداد بمحلول دارىء Tris-Hcl 0.02 مولار ،وبرقم هيدروجيني 7.5 ،وبتدرج ملحي بمدى 0-1.3 مولار من كلوريد الصوديوم ،وبسرعة جريان 2مل/د. وبواقع 8.7 مل/جزء.

جدول 4- تنقية انزيم الستافيلولايسين A من العزلة المحلية *P.aeruginosa* P_{16}

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (حدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	الحصيلة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	260	32.5	3.78	8.59	8450	100	1
الترسيب بكبريتات الامونيوم (80%)	15	160	4.93	32.45	2400	28.4	3.77
المبادل الايوني	10	120	1.3	92.3	1200	14.2	10.74

جدول 5- تنقية انزيم الستافيلولايسين D من العزلة المحلية *P.aeruginosa* P_5

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (حدة/ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	الحصيلة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	240	3.5	5.26	0.66	840	100	1
الترسيب بكبريتات الامونيوم (80%)	20	14.67	6.97	2.10	293.4	34.92	3.18
المبادل الايوني	12	12.7	2.11	6.01	152.4	18.14	9.1

المصادر

1. Cahan, R. Axelrad, I. Safrin, M. ohman, D.E. and Kessler, E. **2001**. Asecreted Aminopeptidase of pseudomonas aeruginosa. *J. Biol. Chem*. 276, pp: 43645-43652.
2. Todar, K. **2008**. Pseudomonas aeruginosa opportunistic infections. Todar`s online Textbook of Bacteriology.
3. Park, S. and Galloway, D.R. **1998**. Pseudomona aeruginosa Las D processes the inactive LasA precursor to the Active protease form. *Biochem. Biophys*. 357, pp: 8 -12.
4. Kessler, E. Safrin, M. Abrams, W.R. Rosenbloom, J. and ohman, D.E. **1997**. Inhibitors and specificity of Pseudomonas aeruginosa LasA. *J. Biol. Chem*. 272, pp:9884-9889.
5. Vessillier, S. Delorme, F. Bernillon, J. Saulnier, J. and Wallach, J. **2001**. Hydrolysis of glycine-containing elastin pentapeptides by Las A Protease, a metalloelastase from Pseudomonas aeruginosa. Eur. *J. Biochem*. 268, pp:1049-1057.
6. Barequet, I.S. Ben Simon, G.J. Safrin, M. Ohman, D.E. and Kessler, E. **2004**. Pseudomonas aeruginosa Las A protease in treatment of Experimental Staphylococcal keratitis. *Antimicrob. Agents chemother*. 48(5) , pp: 1681-1687.
7. Cruickshank, R. Duguid, J.P. Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. **1975**. The practice of Medical Microbiology. In: Medical Microbiology (12^{th} ed.).Vol.2. Churchill Livingstone, Edinburgh.
8. Collee, J.G. Miles, R.S. and Walt, B. **1996**. Tests for the identification of bacteria. In:

Practical Medical Microbiology 14th ed. (eds. Collee, J.G. Marmion, B.P. Franser, A.G. and Simmons, A.). Churchill Livingstone, New York, pp:132-149.

9. Diggle, S.P. Winzer, K. Lazdunski, A. Williams, P. and Camara, M. **2002**. Advancing the quorum in pseudomonas aeruginosa: mva T and the regulation of N-acetyl homoserine Lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol*. 184 (10) , pp: 2576-2586.
10. Gustin, J.K. Kessler, E. and ohman, D.E. **1996**. A substitution at His-120 in the Las A protease of Pseudomonas aeruginosa Blocks enzymatic Activity without Affecting propertiede processing or Extracellular Secretion. *J.Bacteriol*. 178 (22) , pp: 6608-6617.
11. Stevens, L. **1991**. Buffers and determination of protein concentration. In: Enzyme Assays. (eds. Elsenthal, R. and Danson, M.J.). Oxford University. Press, New York , pp:317 – 335.
12. Folders, J. Tommassen, J. vanloon, L.C. and Bitter, w. **2000**. Identification of a chitin-Binding protein Secreted by Pseudomonas aeroginosa. *J. Bacteriol*. 182 (5) , pp: 1257-1263.
13. Kessler, E. safrin, M. oslan, J.C. and ohman, D.E. **1993**. Secreted LasA protease of Pseudomonas aeruginosa is a staphylolytic protese. *J.Biol. chem*. 268, pp:7503-7508.
14. Lomholt, J.A. Poulsen, K. and Kilian, M. **2001**. Epidemic population structure of Pseudomonas aeruginosa clone that is pathogenic to the Eye and that has a distinct of virulence factors. *J. Infect. Immun*. 69 (10) , pp: 6284-6295.
15. Caballero, A. Thibodeaux, B. Marquart, M. Traidej, M. and Callaghan, R. **2004**. Pseudomonas keratits: Protease IV gene conservation, distribution and production relative to virulence and other pseudomonas protease. *Invest. Ophthalmol.vis. Sci*. 45, pp:522-530.
16. Peters, J.E. Park, J. Darzins, A. Freck, L.C. Saulnier, J.M. Wallach, J.M. and Galloway, D.R. **1992**. Furthur studies on Pseudomona aeruginosa LasA: analysis of soecifity. *Mol. Microbiol*. 6, pp: 1155-1162.
17. Peterson, A.D. Walker, R.D. Bowman, M.M. Schott, H.L. and Roser, J.R. **2002**. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of Staphylococcus intermedius and Pseudomonas aeruginosa isolates from canine skin and ear samples over a 6 – years period (1992-1997). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc*. 38 (5) , pp: 407-420.