Iraqi Journal of Science

تنقية البلورات البروتينية المنتجة من بكتريا *Bacillus thuringiensis* باستخدام الانظمة ثنائية الطور المائية

محمد عادل جعفر ، عبد الكريم عبد الرزاق القزاز ، علي صادق محمد

قسم التقنيات الاحيائية ، كلية العلوم ، جامعة بغداد، بغداد، العراق.
.mohammad_biotechnology2@yahoo.com

الخلاصة

تم تنقية البلورات البروتينية من بكتريا *Bacillus thueringiensis* المعزولة محليا باستخدام طريقة الانظمة ثنائية الطور المائية حيث تمت التنقية بمرحلتين الاولى تم فيها فصل البلورات البروتينية والابواغ من باقي المخلفات الخلوية وباستخدام نظام مكون من بوليمر [PEG 6000 [Polyethylene Glycol 6000 وملح $[NH_4]_2SO_4$ وبتراكيز بلغت ٤% غرام/مليليتر و ١٤% غرام/مليليتر على التوالي و برقم هيدروجيني ٧ و زمن فصل قدره ٣٠ دقيقة وبحصيلة نهائية بلغت ٩٤% ، بعدها تم فصل البلورات البروتينية عن الابواغ البكتيرية باستخدام نظام ثنائي مكون من بوليمر PEG 6000 وبوليمر Dextran 60000-90000 بتراكيز بلغت ٩% غرام/مليليتر و ٨% غرام/مليليتر على التوالي وبرقم هيدروجيني قدره ٧ وزمن فصل ٢.٥ ساعة بحصيلة نهائية مقدارها ٧٠.٦% وبنقاوة وصلت الى ٩٢% .

Purification of Crystals Protein by Aqueous Two Phase System from *Bacillus thuringiensis* Local Isolate

Mohammad Adil Jaafar, Abdul Karrm Al-Kazaz, Ali Sadiq Mohammad
Department of Biotechnology, Science Collage, Baghdad University,Baghdad.Iraq.

Abstract

The crystals protein of local isolate *Bacillus thuringiensis* were purified by using aqueous two phase system method in two steps ; the first 94% of crystals protein and spores were separated from cell dibbers by using 14% g/ml ammonium sulphate and 4% g/ml of Polyethylene glycol 6000 at pH=7 with separation time of 30 min. While in the second step, crystals protein were purified from spores by using a system consisted of 8% g/ml Dextran 60000-90000 and 9% g/ml of Polyethylene glycol 6000 at pH=7 with separation time of 2.5 h. the a final yield was 70.6% with purity of 92% .

Keywords: Bt,Aqueous,two phase system,Protein Purification.

المقدمة

توجد بكتريا *Bacillus thuringiensis* بشكل طبيعي في البيئة ، اذ عزلت من التربة ومن اوراق النباتات ومن غبار الحبوب المخزونة وكذلك من المخلفات النباتية والحشرات الميتة [1,2,3] ، كما عزلت لأول مرة في العراق من اليرقات الميتة لفراشة اللهانة [4] . وهي بكتريا موجبة لصبغة غرام ، مكونة للأبواغ و هوائية الا انها تتميز بامتلاكها القدرة على تكوين الجسيمات المحاذية للأبواغ Parasporal bodies أو ما يعرف بالبلورات البروتينيةCrystal Protein خلال مرحلة تكوين الابواغ [5] (**الشـــكل-١**)

(**الشكل-١**): **بكتريا** ***B. thuringiensis***

و التي تكون مسؤولة عن صفة السمية للحشرات . وتؤلف البلورات البروتينية حوالي 20 - 30% من الوزن الجاف للخلية البوغية [6] . تكون البلورات البروتينية ذات تأثير سام للحشرات . ان هضم وتحلل هذه الجسيمات بوساطة الانزيمات المحللة للبروتين يؤدي الى تحرر جزء بروتيني ذو تأثير سام يعرف بـendotoxin-δ ويرمز له *cry*، وهذا السم متغاير بين السلالات العائدة لبكتريا *B. thuringiensis* لكن في الغالب تنتج عزلات هذه البكتريا بلورات مؤلفة من خليط من δ- endotoxin . ويختلف تأثير الذيفان الداخلي ومدى فعاليته فمنه السام للحشرات وبشكل متخصص لرتب حشرات معينة اذ تتضمن عزلات ذات تأثير متغاير لأنواع من الحشرات ، فمنها ما هو قاتل لحشرات رتبة حرشفية الاجنحة واخرى ذات تأثير قاتل لحشرات رتبة ثنائية الاجنحة ، وعزلات اخرى ذات تأثير قاتل لحشرات رتبة غمدية الاجنحة ، ومنه ما يمتلك تأثيراً ساماً للحشرات والخلايا السرطانية [7] ، حيث شخص ما يقارب 170 جين مشفر للـ *endotoxin*-δ [8] . ونتيجة لامتلاكها هذه الخاصية فقد ركزت البحوث عليها لأجل استخدامها في مجال السيطرة البيولوجية بوصفها مبيداً للآفات الزراعية . اذ اصبحت تمثل 90% من المبيدات الحشرية المستعملة في الولايات المتحدة وغيرها من دول العالم نظرا لعدم وجود اي تأثير سام لها على الخلايا الحيوانية حسب ما جاء في اصدار وكالة حماية البيئة الامريكية [9]. تعتبر عملية تنقية البلورات البروتينية ذات اهمية لأستخدمها في المجالات البحثية أو التطبيقية حيث ان المزروع البكتيري بعد انتاج البلورات البروتينية يكون عبارة عن خليط من البلورات و الأبواغ ومخلفات خلوية اخرى لذلك ظهرت تقنيات عديدة لأجل تنقية البلورات البروتينية والحصول عليها بأعلى درجة من النقاوة ، فقد استغلت قابلية نمو الابواغ الى خلايا خضرية للحصول على البلورات البروتينية بشكل نقي الى حد ما [10] ، وهناك العديد من الطرائق استخدمت لأجل تنقية البلورات ، ومنها تلك التي تعتمد على الطرد المركزي متدرج الكثافة Density gradient centrifugation باستخدام كلوريد السيزيوم [11] ، أو بروميد الصوديوم NaBr [12] أو متدرج السكروز [13] ، الا ان هذه الطرائق تحتاج الى وقت ، فضلاً عن قلة الحصيلة للبلورات البروتينية ، وهذا يعود بسبب التشابه بين الحجم والكثافة وبعض الخصائص الفيزيائية للبلورات مع الابواغ ، مما يؤدي الى صعوبة في عملية تنقية البلورات وفصلها. ومن الطرائق المستخدمة الاخرى في تنقية البلورات البروتينية هي الانظمة ثنائية الطور المائية Aqueous Two Phase Systems ATPS . تعد الانظمة ثنائية الطور المائية من الطرائق الشائعة الاستخدام في مجال الكيمياء الحياتية والتقنيات الأحيائية لأجل تنقية البروتينات [14] وكذلك في تنقية عدد من الانزيمات ذات المصادر الميكروبية [15] ، والمضادات الحيوية [16] وكذلك الاحماض النووية [17] و استخدمت ايضا في استرداد الابواغ بشكل نقي من المخلفات الخلوية والخلايا الخضرية لعدد من الانواع العائدة لجنسي Clostridium و Bacillus [18] ، ونتيجة للأهمية العلمية و التطبيقية للبلورات البروتنية العائدة لبكتريا *B. thuringiensis* فأن الدراسة التالية تهدف الى تنقيتها باكبرى حصيلة و أعلى نقاوة بأستخدام الانظمة ثنائية الطور المائية .

المواد و طرائق العمل

تم اعتماد طريقة التنقية باستخدام الانظمة ثنائية الطور المائية الموصوفة من قبل [19] مع اجراء التحويرات اللازمة

١- العزلات البكتيرية و ظروف النمو

استخدمت العزلة المحلية *B. thuringiensis* المنتجة للبلورات البروتينية المعزولة من دراسة سابقة [12] . نمي المزروع البكتيري في 100 مليلتر من وسط Glucose-Yeast Salt medium(GYS) [20] و حضن بالحاضنة الهزازة بدرجة 30 م° وبسرعة 120 دورة / دقيقة لمدة 48 – 72 ساعة.

٢- تحديد التراكيز المثلى للنظام ثنائي الطور

A- تحديد تراكيز مكونات النظام الاول

المحاليل المستخدمة

استعملت تراكيز عديدة من كل من بوليمر PEG 6000 وملح كبريتات الامونيوم لأجل تحديد التركيز الامثل لكل من المادتين . و(**الجدول-١**) يبين تراكيز المادتين المستعملة .

(الجدول-١) تراكيز كل من بوليمر PEG 6000 وملح كبريتات الامونيوم في محلول النظام الاول للفصل

Con. $[NH_4]_2SO_4$% غرام/مليليتر	Con. PEG 6000% غرام/مليليتر
١٧.٥	1.0
١٦.٥	1.5
١٦.٠	2.0
١٥.٥	2.5
15.0	3.0
14.5	3.5
14.0	4.0
13.5	4.5
13.0	5.0

اذيبت المكونات في ٤٠ مليليتر من الماء المقطر المعقم

طريقة العمل

سحب 50 مليلتر من المزروع البكتيري ووضع في قمع الفصل واضيف اليه 40 مليلتر من محلول النظام الاول المحضر (**جدول -١**) مزجت المكونات جيدا بالرج ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7 واكمل الحجم الى 100 مليلتر بالماء المقطر المعقم ، رج قمع الفصل لمدة 20 ثانية و ترك لمدة 30 دقيقة لحين انفصال الطورين . سحب الطور السفلي بهدوء مع مراعاة عدم المساس بالطبقة الفاصلة بين الطورين. نقل الطور العلوي والطبقة الفاصلة بين الطورين الى انبوبة جديدة . رسبت المكونات بنبذها مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة . غسل الراسب بالماء المقطر المعقم ومن ثم رسب بنبذه بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمرتين ، بعد ذلك علق الراسب بـ 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم . احتسب عدد البلورات والابواغ بعد تصبيغها حسب الطريقة الموصوفة من قبل[21] باستخدام طريقة العد المباشر [22] كالاتي

عدد الجسيمات /مليلتر = معدل عدد الجسيمات في عشرة حقول X 5000 X معكوس التخفيف X 100

احتسبت حصيلة البلورات و الابواغ في الطور العلوي والطبقة الفاصلة بين الطورين حسب المعادلة الموصوفة من قبل [19] وكالاتي

الحصيلة للطور العلوي والطبقة = [١ – عدد الجسيمات في الطور السفلي/ الفاصلة بين الطورين عدد الجسيمات المضافة]x ١٠٠%

B- تحديد تراكيز مكونات النظام الثاني

المحاليل المستخدمة

استعملت أيضا وصفات عديدة من كل من بوليمر PEG 6000 وبوليمر Dextran 60000 – 90000 لأجل تحديد التركيز الامثل لكل من المادتين ، و(**الجدول-٢**) يبين تراكيز المادتين في الوصفات المستعملة.

(الجدول-٢) تراكيز كل من بوليمر PEG 6000 وبوليمر Dextran في محلول النظام الثاني المستعملة في الفصل

Con. Dextran% غرام/مليليتر	Con. PEG 6000% غرام/مليليتر
7.5	6.0
7.0	6.5
6.5	7.0
6.0	7.5
5.5	8.0
5.0	8.5
4.5	9.0
4.0	9.5

اذيبت كل مادة في 20 مليلتر من الماء المقطر المعقم على حدة ، ثم مزجت معاً

طريقة العمل

سحب 50 مليلتر من المزروع البكتيري المنمى في وسط GYS لمدة ٤٨-٧٢ ساعة ووضع في قمع الفصل واضيف اليه 50 مليلتر من محلول النظام الاول المكون من PEG 6000 و $NH_4(_2SO_4$) . مزج المحلول جيدا بالرج ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7 و ترك لمدة 30 دقيقة لحين انفصال الطورين . سحب الطور السفلي بهدوء مع مراعاة عدم المساس بالطبقة الفاصلة بين الطورين. نقل الطور العلوي والطبقة الفاصلة بين الطورين الى انبوبة جديدة . رسبت المكونات

بنبذها مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة . غسل الراسب بالماء المقطر المعقم ومن ثم رسب بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمرتين . بعد ذلك علق الراسب بـ 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم . اضيف 40 مليلتر من محلول النظام الثاني الى معلق البلورات والابواغ في قمع الفصل . مزج المحلول بالرج جيدا وبعد ذلك عدل الرقم الهيدروجيني الى 7 واكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر بالماء المقطر المعقم . اعيد مزج المحلول وبذلك تكون التراكيز النهائية لكل من PEG 6000 و Dextran 60000-90000 في 100 مليلتر ثم ترك قمع الفصل لمدة 2.5 ساعة ، سحب الطور السفلي بهدوء و رسبت مكوناته بالنبذ المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة . غسل الراسب بالماء المقطر المعقم ومن ثم رسب بسرعة 10000 دورة / دقيقة ، كررت العملية مرتين . و ثم علق الراسب بـ 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم . احتسبت حصيلة البلورات والابواغ ونقاوة البلورات حسب المعادلات الموصوفة من قبل [19] وكالاتي

حصيلة الابواغ في الطور العلوي=(عدد الابواغ في الطور العلوي / عدد الابواغ المضافة الى النظام) x 100%

حصيلة البلورات في الطور السفلي =(عدد البلورات في الطور السفلي / عدد البلورات المضافة الى النظام)x ١٠٠%

نقاوة البلورات = (عدد البلورات في الطور السفلي / (عدد البلورات + عدد الابواغ) للطور السفلي) x 100%

٣- تحديد المدة الزمنية الملاءمة لتنقية البلورات البروتينية

اختيرت فترات زمنية مختلفة لأجل تحديد المدة الزمنية الملاءمة لفصل البلورات عن الابواغ ، اذ بعد الانتهاء من تجارب تحديد التراكيز المثلى لمواد محلولي النظام الاول والثاني ، حضرت مكررات واتبعت الخطوات السابقة ، اذ تركت مكررات قمع الفصل لفترات زمنية مختلفة هي ٠.٥ ، ١، ١.٥، ٢، ٢.٥، ٣، ٣.٥، ٤، ٤.٥ ساعة لأجل انفصال طوري النظام الثاني. اكملت الخطوات اللاحقة حسب ما مذكور في الفقرة اعلاه .

٤- تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لتنقية البلورات

بعد الانتهاء من تحديد المدة الزمنية المناسبة لعملية التنقية ، اختبرت سلسة من الأرقام الهيدروجيني وذلك لأجل تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لمحلول النظام الثاني ، بعد تحضير مكررات لقمع الفصل ، عدل الرقم الهيدروجيني الى القيم التالية 3 , 5 , 7 , 9 , 11، ثم اكملت الخطوات اللاحقة

النتائج و المناقشة

استعملت الانظمة ثنائية الطور المائية Aqueous two phase system(ATPS) لأجل فصل الجسيمات البيولوجية التي تتشابه بالحجم والكثافة وغيرها من الخصائص الفيزيائية [23,19] .

تضمنت عملية تنقية البلورات البروتينية خطوتين ، الاولى تم فيها فصل البلورات البروتينية والابواغ عن بقية المخلفات الخلوية المكونة من الاحماض النووية والبروتينات والجدران الخلوية والخلايا الخضرية،في حين تم في الخطوة الثانية تنقية البلورات البروتينية من الابواغ .

استخدم في الخطوة الاولى نظام مكون من بوليمر PEG 6000 وملح$(NH_4)_2SO_4$ لأجل فصل الابواغ والبلورات عن بقية المكونات الاخرى،اذ تجمعت البلورات والابواغ في طور PEG العلوي.تم تحديد التركيز الامثل لكل من PEGو $(NH_4)_2SO_4$، اذ وصلت الحصيلة لكل من البلورات والابواغ في الطور العلويوالطبقة الفاصلة بين الطورين($Y_{top + Interface}$) الى اعلى قيمةوهي94%عندالتراكيز4%و14%لكل من الPEGو$(NH_4)SO_2$على التوالي كمامبين في الجدول-٣وهذه الحصيلةمقاربة لما حصل عليه [19]

(الجدول-٣)العلاقة بين تركيز كل من PEG وملح $[NH_4]_2SO_4$ في 100 مليلتر ، والحصيلة النهائية للبلورات والابواغ في الطور العلوي والطبقة الفاصلة بين الطورين(الرقم الهيدروجيني للنظام 7 وزمن الفصل 30 دقيقة)

$[Y_{top + Interface}]$	Con. $(NH_4)_2SO_4$% غرام/مليليتر	Con. PEG 6000% غرام/مليليتر
68.7	١٧.٥	1.0
67.2	١٦.٥	1.5
73.5	١٦.٠	2.0
84.3	١٥.٥	2.5
86.2	15.0	3.0
91.3	14.5	3.5
94.0	14.0	4.0
77.4	13.5	4.5
75.8	13.0	5.0

ان نتائج الخطوة الاولى من عملية التنقية التي تضمنت فصل البلورات البروتينية والابواغ في طور PEG عن المخلفات الخلوية التي تجمعت في طور كبريتات الامونيوم ، تتفق مع نتائج سابقة اشارت الى امكانية فصل الاجسام الضمنية Inclusion bodies مثل الابواغ والبلورات البروتينية وبعض البروتينات عن الخلايا الخضرية والمخلفات الخلوية ، بتقنية الانظمة ثنائية الطور المائية عند استخدام نظام مكون من

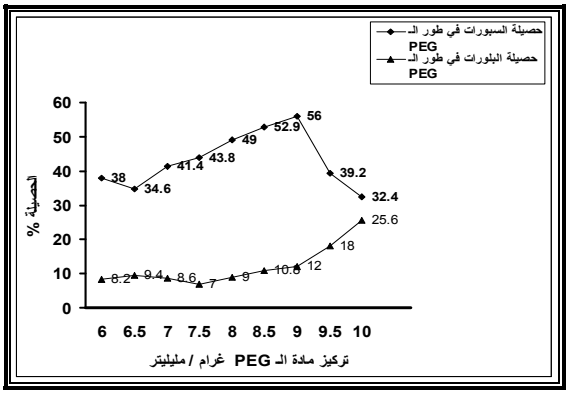
بوليمر PEG في الغالب وملح [23 , 18] ، اذ يبين الجدول [٣] ارتفاع حصيلة الابواغ والبلورات بزيادة تركيز PEG وهذا يفسر على اساس زيادة استيعاب طور PEG العلوي لكميات اكبر من المواد المراد فصلها مع زيادة التركيز [24]، لحين الوصول الى حالة الاشباع والتي كانت عند التركيز 4% غرام / مليلتر. تم في الخطوة الثانية فصل البلورات البروتينية عن الابواغ باستخدام نظام مكون من بوليمر PEG 6000 وبوليمر Dextran 60000 – 90000 ، اذ تم تحديد عدد من المتغيرات عند التنقية بهذا النظام منها تركيز كل من Dextran وPEG وتحديد الزمن و الرقم الهيدروجيني الامثل للنظام ، اذ تم تحديد تركيز Dextran أولاً ، و يبين **(الجدول-٤)** العلاقة بين زيادة تركيز مادة Dextran و خفض تركيز PEG من جهة و حصيلة البلورات والابواغ في طور Dextran السفلي من جهة اخرى ، اذ نلاحظ ان حصيلة البلورات البروتينية $Y_{crystal}$ تزداد بازدياد تركيز Dextran الى ان بلغت اعلى قيمة عند التركيز 8% غرام / مليلتر وكانت 80.3% ، في حين نلاحظ ارتفاع في قيمة حصيلة الابواغ Y_{spore} في طور Dextran بانخفاض تركيز PEG .

(الجدول-٤) العلاقة بين تركيز كل من Dextran و PEG في 100 مليلتر ، وحصيلة البلورات والابواغ في طور Dextran السفلي (الرقم الهيدروجيني للنظام 7 و زمن الفصل 2.5 ساعة) .

Y_{spore} %	$Y_{crystal}$ %	Con. Dextran% غرام/مليليتر	Con. PEG 6000% غرام/مليليتر
53.4	54.2	7.5	6.0
56.7	67.8	7.0	6.5
61.0	76.4	6.5	7.0
63.2	74.0	6.0	7.5
66.4	80.3	5.5	8.0
70.2	78.1	5.0	8.5
68.6	71.0	4.5	9.0
74.1	56.3	4.0	9.5

بعدما تم تحديد التركيز الامثل لمادة Dextran . تم تحديد تركيز PEG الملاءم لعملية التنقية و يبين **(الشكل-٢)** العلاقة بين تركيز PEG والحصيلة لكل من البلورات والابواغ في طور PEG العلوي ، اذ كان التركيز 9% هو التركيز الامثل بحصيلة تصل الى 56% بالنسبة للأبواغ وحصيلة بلورية بقيمة 12% . إذ نلاحظ ارتفاع حصيلة الابواغ بزيادة تركيز PEG لحين الوصول الى تركيز 9% بعد ذلك بدأت بالانخفاض ، في حين نلاحظ ارتفاع حصيلة البلورات البروتينية بزيادة تركيز PEG .

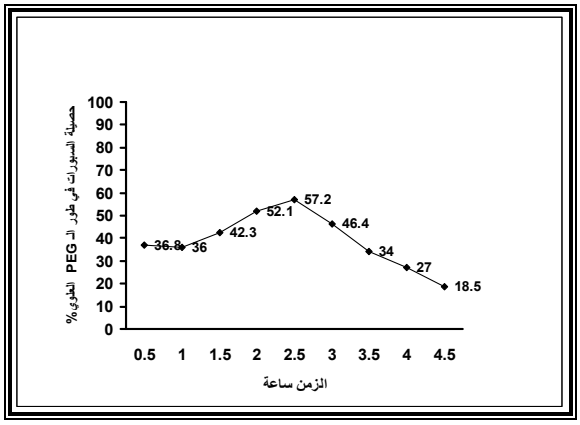
يتبين من **(الجدول-٤)** و**(الشكل-٢)** ان افضل تركيز لكل من مادتي PEG و Dextran كان 9% و 8% على التوالي ، مقارنة بالتراكيز التي تم استخدامها في الطريقة المعتمدة في [19] والتي كانت 6 لمادة PEG و 7.5 Dextran ، اذ نلاحظ ان تركيز Dextran اعلى من تركيز PEG ، في حين بينت النتائج التجريبية ان قيمة تركيز PEG اعلى من قيمة تركيز Dextran،والسبب قد يعود الى استخدام مادة Dextran بوزن جزيئي 60000-90000 مقارنة مع Dextran ذو الوزن الجزيئي 60000 المستخدم من قبل [19] ، اذ ان زيادة الوزن الجزيئي للبوليمرات يترافق معه زيادة في عدد الجزيئات المرتبطة بها ، لذلك استوجب زيادة تركيز مادة PEG نتيجة تغير تركيب النظام Phase Composition وبالتالي تغير توزيع الجسيمات البيولوجية في الطورين [25,15]



(الشكل-٢) العلاقة بين تركيز PEG وحصيلة كل من الابواغ والبلورات في طور PEG العلوي [الرقم الهيدروجيني للنظام 7 ، زمن الفصل 2.5 ساعة ، تركيز الـ Dextran 8%]

بعد ما تم تحديد تركيب النظام المتمثل بالتركيز الامثل لكل من PEG و Dextran ، تم تحديد الزمن الملاءم لعملية تنقية البلورات عن الابواغ و**(الشكل-٣)** يوضح العلاقة بين كل من الزمن وحصيلة الابواغ في طور PEG العلوي . اذ يتبين ارتفاع حصيلة الابواغ بشكل تدريجي مع زيادة المدة الزمنية لحين الوصول الى الزمن 2.5 ساعة اذ كانت حصيلة الابواغ بأعلى قيمة وهي 57.2% ، بعد ذلك بدأت بالهبوط بشكل تدريجي مع زيادة المدة الزمنية لحين الوصول الى اوطأ قيمة والتي كانت 18.5% عند المدة الزمنية 4.5 ساعة . ان هذه النتائج تتفق مع نتائج سابقة اشارت الى ان الزمن 2.5 ساعة

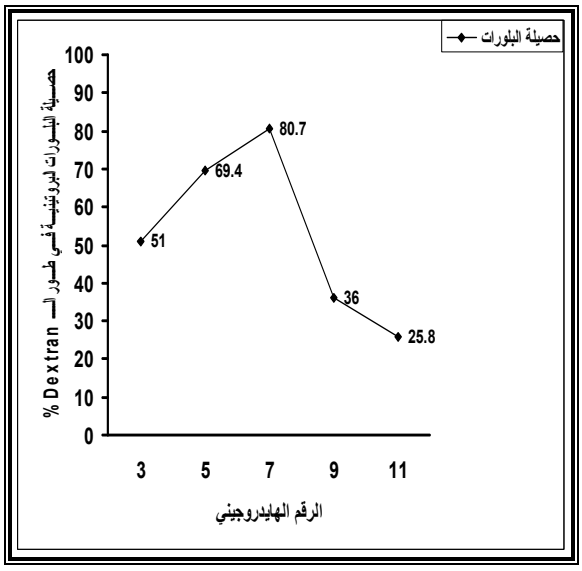
هو الزمن المناسب للحصول على اعلى قيمة من الحصيلة البوغية في طور PEG والذي يتزامن معه نقاوة عالية للبلورات البروتينية في طور Dextran السفلي . ان تعليل انخفاض حصيلة الابواغ بزيادة المدة الزمنية عن 2.5 ساعة هو تجمع الابواغ فيما بينها في طور PEG مما يؤدي الى زيادة معدل ترسيبها ومن ثم نزولها الى طور Dextran السفلي وبذلك تنخفض قيمة حصيلتها [19] .



(الشكل-٣)العلاقة بين الزمن وحصيلة الابواغ في طور PEG العلوي (الرقم الهيدروجيني للنظام 7 ، تركيز كل من Dextran و PEG 8% و 9% على التوالي)

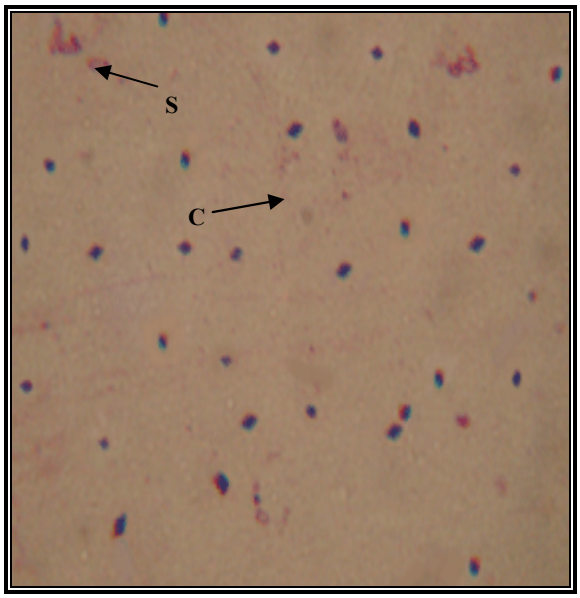
بعد تحديد الزمن الملائم لعملية التنقية تم تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لأجل فصل البلورات البروتينية عن الابواغ و(**الشكل-٤**) يبين العلاقة بين الرقم الهيدروجيني للنظام وحصيلة البلورات في طور Dextran السفلي . اذ نلاحظ ان القيمة المتعادلة للرقم الهيدروجيني هي المثلى لتنقية البلورات البروتينية التي تكون مساوية لقيمة نقطة التعادل الكهربائية PI للبلورات [26] ، اذ كانت الحصيلة 80.7% مقارنة بالحصيلة المتزامنة مع القيم الحامضية والقاعدية ، اذ تذوب البلورات البروتينية في قيم الرقم الهيدروجيني القاعدية المتطرفة 9 – 12 [27] .

بعدما تم تحديد التراكيز المثلى لكل من Dextran و PEG وتحديد الزمن والرقم الهيدروجيني للنظام والتي اعطت حصيلة بلورية وصلت الى 80 – 82% بقيت نقاوة البلورات منخفضة حيث كانت 60 – 70% . ولغرض زيادة نقاوة البلورات وذلك بالتخلص من اكبر



(الشكل-٤) العلاقة بين الرقم الهيدروجيني وحصيلة البلورات البروتينية في طور Dextran السفلي [زمن الفصل 2.5 ساعة ، تركيز كل من Dextran و PEG 8% و 9% على التوالي]

قدر ممكن من الابواغ ، و تم ذلك من خلال سحب طور PEG العلوي واستبداله بحجم مماثل من محلول PEG بتركيز 9% وبتكرار العملية مرتين تم الحصول على نقاوة تصل الى 92% ، كما موضح في (**الشكل-٥**)وبحصيلة نهائية تصل الى 70.6% .ان انخفاض قيمة الحصيلة يعزى الى ان سحب الطور العلوي واضافة محلول جديد من الطور العلوي سوف يؤدي الى سحب الابواغ المتبقية في الطور السفلي وهذا سوف يزيد من نقاوة البلورات البروتينية ، و يتزامن مع ذلك سحب الطور العلوي الى جزء من البلورات البروتينية من الطور السفلي . وهذا يؤدي الى انخفاض في الحصيلة النهائية للبلورات البروتينية وبالتالي فإن نقاوتها تتناسب عكسيا مع قيمة حصيلتها ، وهذه النتيجة تتفق مع قيمة الحصيلة البلورية التي تم الحصول عليها من قبل [19]والتي كانت 83% وبنقاوة 91% عند استخدامه نظامين ، يتكون الاول من PEG 6000/$SO_4(NH_4)$ والثاني PEG/Dextran 60000- 90000 . و في دراسات اخرى كانت الحصيلة للبلورات 42% بنقاوة تصل الى 97% عند استخدام نظام مكون من PEG/Potassium Phosphat [28] و 20% وبنقاوة 99.94% عند استخدام نظام مكون من PEG/sodium dextran sulphate 500 [29] .



(الشكل-٥)البلورات البروتينية المنقاة المستحصل عليها من طور Dextran السفلي قوة التكبير 400X بعد تصبيغها بصبغة Naphthol blue black و Carbol fuchsin (S=Spore , C=Crystal)

ان قيم المتغيرات التي تمت دراستها في الخطوة الثانية من عملية التنقية التي تم فيها فصل البلورات البروتينية عن الابواغ [تركيز PEG ، تركيز Dextran ، الرقم الهيدروجيني ، الزمن] كانت مختلفة عن تلك القيم التي تم الحصول عليها في الدراسة التي قام بها [19] ما عدا متغير الزمن فربما بسبب استخدام Dextran 60000 – 90000 بدلا عن Dextran 60000 وايضا اختلاف السلالة البكتيرية المستخدمة في الدراسة ، إن طريقة التنقية الناجحة في تنقية البلورات البروتينية لسلالة او تحت النوع العائد لبكتريا *B.* thuringiensis ليست بالضرورة أن تكون ملاءمة لسلالات اخرى للبكتريا نفسها [28 , 30]

References

[1]Delucca, A. J.; Simonson, J. G. and Larson, A. D. **1981.** *Bacillus thuringiensis* distribution in soil of the United States. Can. *J. Microbiolo*. **27:** 865-870.

[2]Carozzi, N. B.; Kramer, V. C.; Warren, G. W.; Evola, S. **1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strain by *polymeras chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microb*. **57:** 3057-3061.

[3]Kaline, P.; Morel, P. and Gadani, F. **1994.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* [F] *Appl. Environ. Microbiolo*. **60:** 19-25.

[4]ملكونيان ، اليس كريكور ١٩٧٦. دراسة في بكتريا*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* الضارة بحشرة *Pieris rapae* كوسيلة للسيطرة البايلوجية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

[5]Agaisse, H. and Lereclus, D. **1995.** How does *Bacillus thuringiensis* produce so mach insecticidal crystal protein?. *J. Bacterio*. **177:** 6027-6032.

[6]Kronsted, J. W.; Shnepff, H. E. and Whiteley, H. R. **1983.** Diversity of location for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriolo*. **154:** 419-428.

[7]Mizuki, E.; Ohba, M.; Akao, T.; Yamashita, S.; Saitoh, H. and Park, Y.S. **1999.** Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells *J. Appl. Microbiolo*. **86:** 477-486.

[8]Crickmor, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; VanRie, J.; Lereclus, D.; Baum, J. and Dean, D. H. **1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiolo*. *Molecu. Biolo. Rev*. **62:** 807-813.

[9]Environmental Protection Agency (EPA). **1998.** EPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis* US.EPA, preventation pesticides and toxic substance, EPA 738-R-98-004, 19P.

[10]Hannay, C. L. and James, P. F. **1955.** The protein crystal of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Canad. *J. Microbio***. 1:** 694-710.

[11]Fast, P.G. **1972.** The δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III: A rapid method for separating parasporal bodies from spores *J. Invert. Pathol*. **20:** 139-140.

[12]Ang, B. J. and Nickerson, K. W. **1978.** Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiolo*. **36:** 625-626.

[13]Cheung, P. Y. K. and Hammock, B. D. **1985.** Separation of three biological distinct activities from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis. Curr. Microbio*. **12:** 121-126.

[14]Balasubramaniam, D.; Wilkinson, C.; Cott, K. V. and Zhang, C. M. **2003.** Tobacco protein

[25]Tanuja, S.; Srinivas, N. D.; Raghava, K. R.; Gowthaman, M. K. **1997.** Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. *Process Biochem*. **32:** 635-641.
[26]Bulla, L. A.; Kramer, K. J.; Cox, D. J.; Jonsen, B. L.; Davidson, L. I. and Lookhart, G. L. **1981.** Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biologic. Chem*. **256:** 3000-3004.
[27]Huber, H. E.; Luthy, P.; Ebersold, H. R. and Cordier, J. L. **1981.** The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* size, linkage and toxicity. *Arch. Mikrobiol*. **129:** 14-18.
[28]Guereca, L.; Bravo, A. and Quintero, R. **1994.** Design of an aqueous tow –phase system for the purification of ICP from *Bacillus thuringiensis. process. Biochem*. **29:** 181-185.
[29]Goodman, N.S.; Gottfried, R.J. and Rogoff, M.H. **1967.** Biphasic system for separation of spores and crystal of *Bacillus thuringiensis J. Bacteriolo*. **94:** 485.
[30]Cooksy, K. E. **1971.** The protein crystal toxin *Bacillus thuringiensis* : biochemistry and mode of action . In Burges, H. D. and Hussey, N. W. [ed]. Microbial control insects and mites, p. 248 Academic Press, London.
Separation By aqueous two-phase system extraction. *J. Chromato. A*, **989:** 119-129.
[15]Ying, X.; Guo-qing, H. and Jing-jun, L. **2005.** Effective extraction of elastase from *Bacillus* sp. Fermantion broth using aqueous two-phase system. *J. Zhejiang Univ. SCI*. 11: 1087-1094.
[16]Yang, W. Y.; Lin, C. D.; Chu, I. M. and Lee, C. J. **1994.** Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. *Biotechnol. Bioeng*. **35:** 439-445.
[17]Kimura, K. **2000.** Simultaneous accumulation of low-molecular-mass RNA at the interface along with accumulation of high-molecular-mass RNA on aqueous tow-phase system partitioning. *J. Chromato*. B, **743:** 421-429.
[18]Sacks, L.E. and Alderton, G. **1961.** Behavior of bacterial spores in aqueous polymer tow-phase system. *J. Bacteriolo*. **82:** 331-341.
[19]Lin, D. Q.; Yao, S. J.; Mei, L. H. and Zhu, Z. Q. **2003.** Collection and purification of parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis* by aqueous tow- phase extraction . *Separation Science and Technology*. **38:** 1665-1680.
[20]Norris, J. R. **1971.** The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* : Biosynthesis and physical structure In : Microbial control of insect and mites [eds. Burger, H. D. and Hussey, N. W.] p. 229-246 Academic Press. New York.
[21]Smirnoff, W. A. **1962.** A staining method for differentiating spores , crystals and cells of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect. Patholo*. **4:** 384-386.
[22]Benson, H. J. **2002.** Microbiology of milk and food products In: Microbiological applications, Laboratory manual in general microbiology 8th ed. p. 231-233 McGrow-Hill Companies.
[23]Walker, S. G. and Andrew, L. **1998.** Aqueous tow phase system as an alternative process route for the fractionation of small inclusion bodies. *J. Chromato. B*. **711:**185-194.
[24]Zhang, Y.; Mao, H. and Cremer, P. S. **2003.** Probing the mechanism of Aqueous Tow-Phase system formation for α-Elastin On-Chip. *J. Am. Chem. Soc*. **125:** 15630-15635.