SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

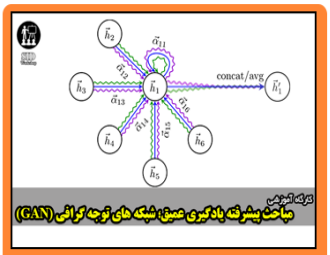
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)

چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤

مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته و علوم محيطي
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

تخليص وتعيين ويژگيهاي آنزيم اوره آز توليد شده توسط آسپرژيلوس نايجر PTCC 5011

محمد رضا بختياري[1] ، محمد فائزي قاسمي*[2] ، مسعود فلاح پور [1] ، زهره عميدي [1]**
۱- عضو هيات علمي سازمان پژوهشهاي علمي وصنعتي ايران
۲- عضو هيات علمي دانشگاه آزاد اسلامي واحد لاهيجان

E-mail: Bakhtiari@irost.ir

تلفن: ۸۸۳۸۳۵۰ــ۰۲۱ فاكس: ۰۲۱۸۸۳۸۳۵۰

چكيده

در اين بررسي آنزيم اوره آز توليد شده توسط آسپرژيلوس نايجر PTCC5011 طي دو مرحله با كمك سولفات آمونيوم و كروماتوگرافي تعويض يوني ۱۳۵/۲ برابر تخليص شد. فعاليت اختصاصي آنزيم معادل ۱۸٤٥ ميكرومول به ازاي ميلي گرم پروتيين است. در الكتروفورز به كمك ژل پلي آكريل آميد يك زير واحد مربوط به آنزيم اوره آز با وزن ملكولي در حدود ۸٥۰۰۰ دالتون مشخص گرديد. Km براي اوره معادل ۲/٤٤ بدست آمد. نتايج نشان داد كه اضافه كردن نمك كلريد سديم قبل از شروع پروسه خالص سازي نقش موثري در حفظ فعاليت آنزيم دارد. مطالعات نشان داد وجود دو مركاپتواتانل و EDTA نيز نقش مهمي در حفظ پايداري آنزيم دارد و حذف آنها از بافرها موجب كاهش شديد فعاليت آنزيم طي پروسه تخليص مي شود. پس از خالص سازي درحدود ٤٤ درصد فعاليت اوليه آنزيم حفظ شد كه اين ميزان نسبت به مطالعات اسميت وهمكاران درحدود۲٥ درصد بيشتر است.

كلمات كليدي: آسپرژيلوس نايجر PTCC 5011، اوره آز ، تخليص، كروماتوگرافي تعويض يوني

Purification and characterization of urease from *Aspergillus niger* PTCC5011

Bakhtiari, M.R.[1*], Faezi, G.M.[2], Fallahpour, M.[1] and Amidi, Z.[1]
1-Department of Biotechnology, Iranian Organization for Science and Technology
2-Department of Microbiology, Lahijan Azad University, Lahijan, Iran
E-mail: Bakhtiari@irost.ir Tel: 021-8838350 Fax: 021-8838350

Abstract

Urease was purified (135/2-fold) from *Aspergillus niger* PTCC5011 with a specific activity of 1845 µmol min^{-1} (mg protein) in two stage. One species of urease was detected after poly acryl-amide gel electrophoresis a bout 85000 Dalton with Km=2/44. The results showed that adding sodium chloride before purification retains enzyme activity. Also EDTA and 2-mercaptoethanol have preservative effects on urease activity. In this study urease retained 44 percent its activity after purification about 25 percent greater than previous study by Smith.

مقدمه

اوره آز (اوره آميدو هيدرولاز، EC.3.5.1.5)يك آنزيم حاوي نيكل است كه هيدروليز اوره به آمونياك و دي اكسيد كربن را كاتاليزه مي كند (Mobley,et al 1995). مصارف صنعتي اوره آز زياد است. بطور مثال در كيت هاي تشخيص اوره خون، در صنعت نوشابه سازي براي پايين آوردن ميزان الكل و در بيوسنسور سيستم هاي همودياليز براي تعيين اوره خون استفاده دارد(Smith,et al 1993). در ميان قارچ هاي رشته اي آسپرژيلوس نايجر براي توليد بسياري از آنزيم ها مانند پكتيناز، گلوكز اكسيداز، گلوكز آميلاز،همي سلولاز، گلوكاناز، اسيد پروتئينازو كاتالازاستفاده شده است

(Archer&Peberdy,1997; Aguilar&Huitron 1993 and Liu et al 1999)

مطالعات نشان داد كه جايگاه آنزيم دراين قارچ داخل سلولي است. از آنجائيكه مي توان مقادير زيادي از ميسليوم هاي اين قارچ را مي توان توليد كرد. فعاليت اين آنزيم در آسپرژيلوس نايجر براي اولين بار در سال ۱۹۰۳ گزارش گرديد. براي اولين بار اسميت وهمكاران ويژگيهاي آنزيم اوره آز جدا شده از آسپر ژيلوس نايجر003 NRRLراگزارش كردند. مطالعات مختلفي در زمينه تخليص آنزيم اوره آز ميكرو ارگانيزم هاي مختلف به خصوص قارچها انجام پذيرفته است. لوبرس وهمكاران در سال ۱۹۹٦ اين آنزيم را از شيزوساكارومايسس پومبه خالص كردند. ميربدوهمكاران اين آنزيم را از يك قارچ بيماريزا بنام كوكسيديوايدس ايميتيس خالص كردند. مطالعات تخليص اوره آزدرباكتريهايي مانندداستافيلوكوكوس زايلوسوس،هليكوباكترپيلوري و پروتئوس ميرابيليس انجام پذيرفته است. در اين بررسي آنزيم اوره آز توليد شده توسط آسپرژيلوس نايجر PTCC 5011 پس از بهينه سازي ومقايسه فعاليت درفراكسيونهاي مختلف سلولي دردومرحله به كمك سولفات آمونيوم و كروماتوگرافي تعويض يوني خالص سازي شد.

مواد وروش ها

ميكروارگانيزم ومحيط كشت

سويه قارچ آسپرژيلوس نايجر بدست آمده از مركز كلكسيون قارچها وباكتريهاي صنعتي عفوني ايران
براي مطالعه تخليص آنزيم استفاده شد. محيط كشت مورد استفاده پس بهينه سازي توسط متد آرايه هاي متعامد داراي تركيبات ذيل به ازاي ليتراست: سوكروز ۲۰ ، اوره ۰/۸۵ ، عصاره مخمر ۳/٤ ،سولفات آمونيوم ۰/۰۳ ، سولفات منيزيم۰/۵ ، كلريد كلسيم۰/۰٤ ، پتاسيم دي هيدروژن فسفات ۰/۳۵ و دي پتاسيم هيدروژن فسفات ۰/۳۵
سوسپانسيون كنيدي ها براي توليد به ميزان ۱۰ ° عدد به ازاي هر ميلي ليتر در فلاسك هاي ارلن ۲۵۰ ميلي ليتري حاوي ۵۰ ميلي ليتر محيط كشت تلقيح شد. فرمانتاسيون در C ۳۰° به مدت٤۸ ساعت با سرعت ۱۸۰دوردقيقه انجام پذيرفت

استخراج آنزيم

پس از انكوباسيون پلت هاي قارچ به كمك كاغذ صافي جدا وسه مرتبه با بافر فسفات شستشو گرديدند. پلت ها در اونC ۵۵°تا C ٦۰° به مدت چهارروز خشك و پس از توزين توسط بلندر بطور كامل پودر شده وبه نسبت حجمي/وزني(W/V) ۱/۳۰ با بافر فسفات (pH=7) مخلوط گرديدند. سوسپانسيون پلت هاي پودر شده در بافر به مدت ٤۵دقيقه جهت استخراج آنزيم روي شيكر در يخچال C ° ٤ مخلوط شدند. از عصاره خام بدست آمده جهت سنجش نمونه برداري ومابقي آن به مدت نيم ساعت در ۱۲۰۰۰ دور در دقيقه وC ° ٤ سانتريفوژ گرديد تاسوپرناتانت از باقيمانده سلولي جدا شود. سوپرناتانت جهت شفاف سازي يك مرحله باكاغذ صافي Wattman 1 فيلتر گرديد. نمك كلريد سديم به ميزاني به مجموعه اضافه شد تا غلظت آن ۲۰۰ ميلي مولار باشد.

سنجش آنزيم وتعيين ميزان پروتئين

فعاليت آنزيم در هر مرحله با روش Weatherburn اندازه گيري شد. براي اندازه گيري پروتئين كل از روش فولين-لوري (Folin-Lowry) استفاده شد. منحني استاندارد روش لوري با كمك پروتئين BSA رسم شد.

رسوب دهي با نمك سولفات آمونيوم

غلظت هاي۱۰۰ ،٤۰،۲۰،۸۰،٦۰ در صد اشباع نمك سولفات آمونيوم به سوپرناتانت فيلتر شده پس از استخراج اضافه شد. در طي اضافه شدن مجموعه در C ° ٤ به مدت ٤۵ دقيقه هم خورد تا ذرات پروتئيني آگلوتينه شوند. سپس مجموعه به مدت ۳۰ دقيقه در ۱۲۰۰۰ دور دقيقه جهت جداسازي رسوبات سانتريفوژشد.رسوب ايجاد شده هر مرحله در بافر فسفات حل شد و فعاليت آن مورد سنجش قرار گرفت. براي حذف سولفات آمونيوم از محلول پروتئيني تهيه شده از مرحله قبل، دياليز نمونه در C ° ٤ انجام شد ووجود يون آمونيوم در بافر فسفات توسط معرف نسلر ارزيابي شد.

كروماتوگرافي تعويض يوني

دراين مرحله براي تخليص ازستون حاوي DEAE-sepharose (Fsat flow) استفاده شد. قطر وارتفاع ستون مورد نظر به ترتيب ۱٦ و۱/۵ سانتيمتربود كه ۱٤ سانتي متر آن بارزين پر شد. شيب غلظتي نمك كلريد سديم
۰/۰۵ تا ۱ مولار بافر فسفات همراه با نگهدارنده از ستون عبور داده شدو جريان خروجي از ستون در ٦۵ فراكسيون باحجم ۲ ميلي ليتر (۵۸ قطره به مدت ۳ دقيقه) در نظر گرفته و به اين ترتيب شدت جريان عبوري از ستون۰/٦٦ ميلي ليتردردقيقه بود. تمام فراكسيون ها از نظر وجود آنزيم مورد بررسي قرار گرفتندوفراكسيونهاي كه فعاليت آنزيم قابل توجه اي داشتند، مقدار پروتئين آنها باروش لوري سنجش شد. شرايط در طول كار ٤ درجه سانتيگراد بودوفراكسيونها پس از جمع آوري به يخچال منتقل مي شدند.

نتايج وبحث

نمودار ۱-۱ نشان مي دهد كه آنزيم اوره آز در ٤۰ در صد اشباع سولفات آمونيوم رسوب كرده و بالاترين فعاليت را نشان مي دهد. آنزيم در ٦۰ در صد اشباع اين نمك فعاليتي نشان نداد پس قسمت اعظم آن در٤۰ در صد رسوب مي نمايد. لوبرس وهمكاران در مرحله دوم تخليص اين آنزيم از شيزوساكاروميسس پومبه توانستند در ۳۵ تا٤۵ در صد اشباع سولفات آمونيوم آنزيم را رسوب دهند با توجه به بالا بودن وزن ملكولي آنزيم رسوب آن در محدوده ۳۵ تا٤۵ درصد اشباع اين نمك اتفاق مي افتد. يافته هاي اين تحقيق با كارهاي انجام شده قبل مطابقت دارد.

نمودار ۲-۱ جذب اشعه ماوراء بنفش فراكسيونهاي جمع آوري شده پس از كروماتوگرافي تعويض يوني را نشان مي دهد. در مجموع ٦٥ فراكسيون جمع آوري شد. فراكسيون هاي ۸-۱۰ داراي فعاليت آنزيمي بود كه اندازه گيري مقدار پروتيين با طول موج اشعه ماوراء بنفش مطابقت دارد. پروتيين هاي نامطلوب تاحدود زيادي جدا شده اندوپيك اصلي مربوط به آنزيم است. نتايج نشان داد اضافه كردن ۲۰۰ ميلي مولار نمك كلريد سديم قبل از شروع مراحل تخليص نقش موثري در حفظ پايداري آنزيم دارد اين نتيجه با نتايج بدست آمده توسط اسميت وهمكاران مطابقت دارد. لي وهمكاران در سال۱۹۹۷ براي تخليص اين آنزيم از يك كوكسي بيماريزا از محلول سولفات نيكل ۱۰۰ ميكرومولار استفاده كردند. در اين بررسي مشاهده شد حضور اين نمك تاثيري در افزايش فعاليت آنزيم نداشته اما به علت نقش يون نيكل در جايگاه فعال آنزيم واينكه حذف آن به خصوص در مراحل تخليص وشستشو هنگام استفاده از حجم هاي زياد بافر ممكن است موجب كاهش فعاليت شود در مرحله تخليص با ستون كروماتوگرافي بافرها داراي غلظت ۱۰۰ميكرومولارسولفات نيكل بودند. مطالعات نشان داد وجود دو مركاپتواتانل و EDTA نيز نقش مهمي در حفظ پايداري آنزيم دارد و حذف آنها از بافرها موجب كاهش شديد فعاليت آنزيم طي پروسه تخليص مي شود. لي تاي هو وموبلي (۱۹۹۰), بريتن باخ و هاسينگر (۱۹۸۸), كريستيانس وهمكاران (۱۹۹۱), ميربد و همكاران (۲۰۰۲) لوبرس وهمكاران (۱۹۹٦) به ترتيب براي مراحل تخليص اين آنزيم ازهليكو باكتر پيلوري, پرتئوس ميرابيليس, استافيلوكوكوس زايلوسوس, كوكسيديوايدس ايميتيس وشيزو ساكاروميسس پومبه از دو مركاپتواتانل و EDTA جهت حفظ و پايداري آنزيم استفاده كردند باشد. مطالعات ليو و همكاران در سال ۱۹۹۸ نشان داد كه فعاليت پروتئازي در آسپرژيلوس نايجر در كشت‌هاي غوطه ور از ساعت ٤۸ به بعد افزايش مي يابدبه همين خاطر مي بايست از نگهدارنده‌هاي نظير 2-ME و باز دارنده‌هايي مانند EDTA استفاده كرد نتايج نشان داد در انجام تخليص آنزيم در هنگام عدم وجود اين تركيبات افت فعاليت زيادي داشت.

جدول۱-۱ پارامترهاي پروسه تخليص آنزيم اوره آز را نشان مي دهد. پس از كروماتوگرافي تعويض يوني آنزيم به ميزان ۱۳۵/۲برابر خالص و فعاليت اختصاصي آنزيم معادل ۱۸٤٥ ميكرومول به ازاي ميلي گرم پروتيين و Km براي اوره معادل ۲/٤٤ است. در الكتروفورز به كمك ژل پلي آكريل آميد يك زير واحد مربوط به آنزيم اوره آز با وزن ملكولي در حدود ۸٥۰۰۰ دالتون مشخص گرديد. فعاليت باز يافت شده حدود ٤٤ است اين ميزان نسبت به مطالعات قبلي توسط اسميت وهمكاران در حدود ۲٥ در صد بيشتر است.

منابع

1- Archer, D. B and Peberdy, J. F.1997 The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. Crit. Rev. Biotechnol 17: 273-306

2-Lubbers, M. W., Rodriguez, S.B., Honey, N. K. and Thornton, R.J. 1996 Purification and characterization of urease from ***Schizosaccharomyces pombe***. Can. J. Microbiol. 42: 132-140

3- Mobley, H. L. T., Island, M. D. and Hausinger, R. P. 1995 Molecular biology of microbial urease. Microbiol Rev 59: 451-480

4-Smith, P., King, J. R. and Goodman, N. 1993 Isolation and character zation of urease from ***Aspergillus niger*** J. Gen. Microbiol 139:957-962

5-Breitenbach, J. M., and Hausinger R.P. 1988 Proteus ***mirabilis*** Urease partial purification and inhibition by boric acid and bronic acids. Biochem. J. 250: 917-920

6- Christians, S., Jose, J. Schafer, U. and Kaltwasser, H. 1991 Purification and subunit determination of nickel dependent ***staphylococcus xylosus*** urease. FEMS Microbiol. Lett. 80: 271-276

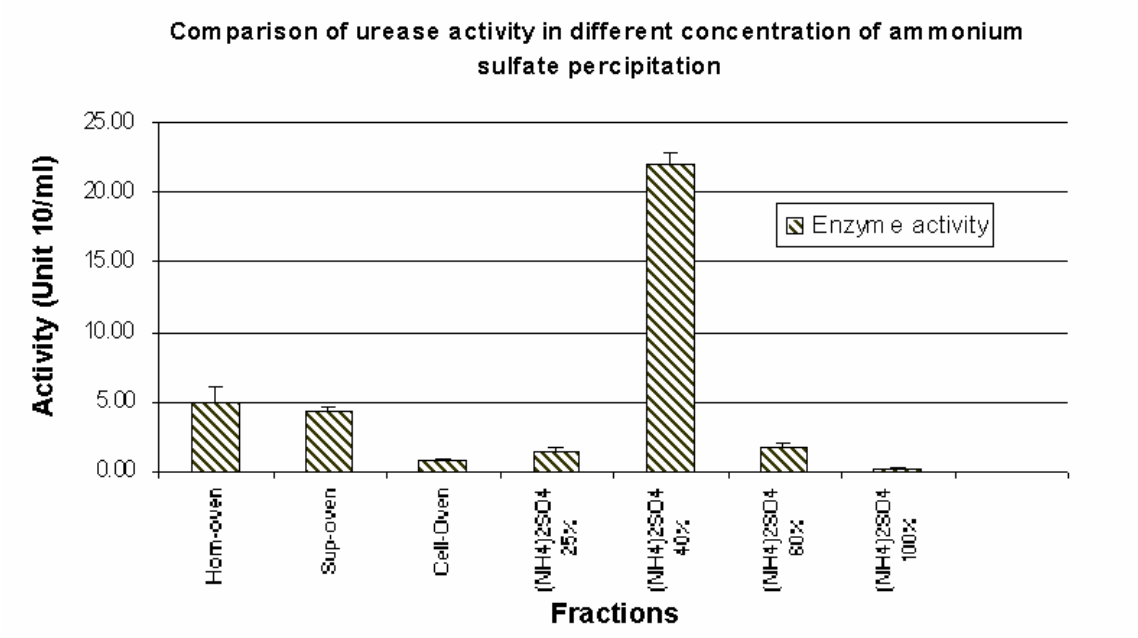
7- Mirbod, F., Schaller, R. A., and Col, G. T. 2002 Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic coccidioides immitis. Med. Mycol. 40:35-44

8- Lee, S. G., and Calhoun. H. 1997 Urease from a potentially pathogenic coccoid isolate: Purification, characterization, and comparison to other microbial ureases. Infect Immun, 65(10): 3991-3996

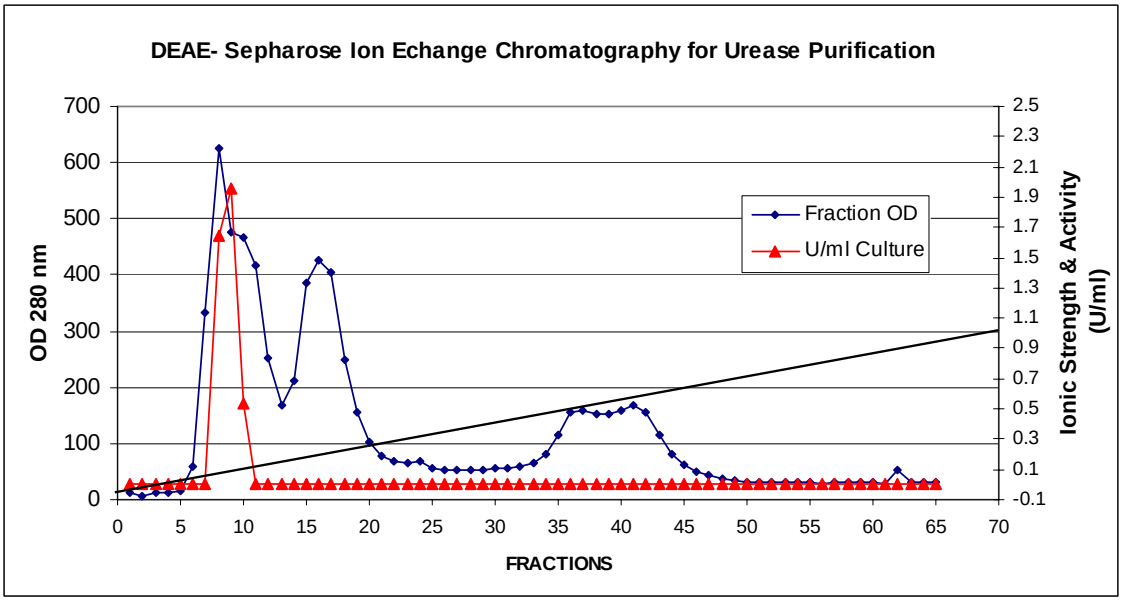
9- Weatherburn, M.W. 1967 Phenol- hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39: 971-974

جدول (۱-۱)- مقايسه پارامترهاي مربوط به خالص سازي آنزيم طي مراحل مختلف

مرحله خالص سازي	Total activity ($\mu mol\ min^{-1}$)	Total proteins (mg)	Specific activity [µmol min]	Purification (fold)	Activity recovered (%)
Crude extract	5038	2840	1.77	1	100
Amonium Sulfate	3165	232	13.64	7.70	62.8
DEAE Sepharose	2215	1.2	1845	135.2	43.9



نمودار (۱-۱) مقايسه فعاليت آنزيم در درصدهاي اشباع سولفات آمونيوم را نشان مي دهد



نمودار (۲-۱) جذب UV فراکسیون هاي جمع آوري شده وفعاليت آنزيم رانشان مي دهد

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

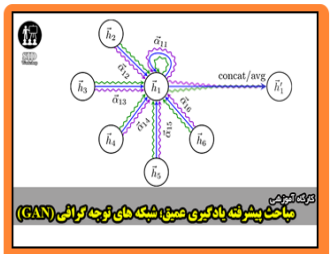
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)