------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 10، خاص بعلوم الحياة, ص43-57، 2006 ------

فعالية وخواص أنزيم الديوكسي رايبونيوكليز في بكتريا الزوائف الزنجارية

خنساء محمد الطائي قصي عبد القادر ألجلبي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/11/27 , تاريخ القبول 2006/4/13)

الملخص

تضمن البحث دراسة فعالية وخواص أنزيم الديوكسي رايبونيوكليز DNase الخارج خلوي في رائق الوسط ألزرعي لنمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (الزوائف الزنجارية) وكذلك فعالية الأنزيم في مستخلص هذه البكتريا.

أعطى الأنزيم أفضل فعالية في خليط التفاعل الذي يحتوي على 18-24 مايكروغرام من محلول الأنزيم و 5 مايكروليتر من 0.1 مولاري من $CaCl_2$ و100 مايكروليتر من محلول المادة الأساس المتكون من (DNA 0.18mg/ml في 8 ملي مولار صوديوم بوريت pH 8.4 يحتوي على 10 ملي مولار كلوريد الصوديوم) و100 مايكروليتر من 8 ملي مولار من المحلول المنظم صوديوم بوريت pH 8.4 .حضن الخليط بدرجة 37 ^{o}م ولمدة 30 دقيقة حيث كانت فعالية الأنزيم 0.32 ±4.52 وحدة أنزيمية/سم^3 في رائق الوسط الزرعي، وكانت قيمة ثابت ميكيلس – منتن (Km) مساوية إلى 1.68×10^{-4} μM ووجد ان الانزيم أعطى فعالية بوجود الـ RNA ، حيث كانت نسبة الفعالية عندما يكون الـ RNA مادة أساس هي 82% في رائق وسط نمو البكتريا و75% في رائق المستخلص الخلوي لبكتريا*Pseudomonas aeruginosa* بالمقارنة مع الفعالية عندما يكون الـ DNA المادة الأساس. كذلك وجد ان الوزن الجزيئي الظاهري لأنزيم DNase بتقنية الترشيح الهلامي تتراوح بين 36000 و48000 دالتون وان الوزن الجزيئي لـ RNase 17000 دالتون.

Activity and Properties of Deoxyribonuclease in the Bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

Khansaa M. AL-Taee **Kusai A. AL-Chalabi**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The present research includes a study of the activity and properties of the extracellular enzyme DNase in the cultural supernatant of the growth of *P.aeruginosa* and in the cellular extract .

Maximum activity of the enzyme was obtained in a reaction mixture containing 18-24 μg of enzyme extract, 5 μl of 0.1 M $CaCl_2$, 100 μl of substrate (0.18 mg/ml^{-1} DNA in 8 mM sodium borate (pH 8.4) containing 10 mM sodium chloride) and 100 μl of 8 mM sodium borate buffer (pH 8.4). The reaction mixture was incubated at 37ºC for 30 min. The enzyme activity was 4.52±0.32 units/cm^3 in the cultural supernatant. The Michaelis constant (Km) value was 1.68×10^{-4} μM and the enzyme hydrolyzes RNA in addition to DNA. When RNA was used as a subtrate,the activity of DNase enzyme was 82% in culture supernatant and 75% in cell extract in comparison with the activity when DNA was the substrate.

The molecular weight obtained using gel filtration was 36000 and 48000 dalton for DNase and 17000 dalton for RNase.

المقدمة

النيوكليز مجموعة من الإنزيمات تقع ضمن المجموعة الثالثة من أصناف الإنزيمات الستة حسب التصنيف العالمي للإنزيمات (Lehninger, 1982) وتضم إنزيمات التحلل المائي Hydrolyses التي تعمل على انشطار الاواصر بادخال جزيئة ماء. ولهذه الانزيمات القابلية ايضا على شطر أواصر الفوسفيت ثنائية الاستر بين وحدات النيوكليوتيدات المتعاقبة للاحماض النووية، منها ما يعمل على الـ DNA وتسمى DNase ومنها ما يعمل على الـ RNA وتسمى Rnase ومنها ما يعمل على النوعين من الاحماض النووية (الجلبي، 1991)، توجد هذه الانزيمات في معظم الانظمة الحيوية وذات وظائف بايولوجية مهمة منها المشاركة في التجديد والشيخوخة وموت الخلايا المبرمج (Fraser, 1994) Apoptosis cells والعديد من الوظائف الخلوية مثل تضاعف وتكرار الـ (DNA replication) DNA(Ceska and Sayers, 1998) والتحولات الطبيعية Natural transformation (Dubnau,1999) وكذلك أنظمة اصلاح الخلل في DNA (Nishino and Morikawa, 2002) والحماية ضد الفايروسات بمعنى اخر القطع او التقييد Restriction (Perona, 2002) وفضلا عن

الوظائف البايولوجية المهمة فلقد اثبت الدراسات ان هذه المجموعة من الانزيمات ذات اهمية كبيرة في البحوث والتقنيات الحيوية والوراثية (Jaffe and Bush, 2001).

نظرا لعدم وجود دراسة تفصيلية سابقة لانزيم الـ DNase والذي يعتبر أحد أنزيمات عوامل الضراوة الذي يساعد على انتشار المرض لدى البكتريا المرضية من خلال تسهيل حركة الكائن الممرض وانتشاره من خلال تحليل وتميع القيح المتكون عند الإصابة لذلك تم اختيار بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الممرضة انتهازيا إذ من الممكن ان تسبب إصابات الجهاز البولي والتنفسي والتليف الكيسي والتهابات العظام والمفاصل وعدد من الإصابات الأخرى مصدرا لإنزيم DNase لدراسة فعاليته وخواصه في البحث الحالي.

المواد وطرائق العمل

1. أنواع الكائنات المستخدمة:

- *Pseudomonas aeruginosa* : تم عزلها وتنقيتها من عينة قيح من مرضى التهابات الجهاز التنفسي من مستشفى السلام والمشخصة حسب نظام Analytical Profile Index (API20).
- *Staphylococcus aureus*: تم الحصول على هذه الكائنات من فرع الاحياء المجهرية /قسم علوم الحياة،وتم التأكد من نقاوة كل من نوعي البكتريا باجراء الاختبارات الشكلية البايوكيميائية (Atlas et al., 1995).

2. استخلاص وقياس فعالية أنزيم الديوكسي رايبونيوكليز DNase

1- الاستخلاص

A- تحضير المعلق البكتيري

تم تحضير المعلق البكتيري بتلقيح 200 سم^3 من المرق المغذي Nutrient Broth المعقم بالموصدة بدرجة 121^{o}م ولمدة 15 دقيقة في دوارق معقمة سعة كل منها 250 سم^3 بـ 8 سم^3 لكل دورق من بكتريا *P. aeruginosa* في الطور اللوغارتمي وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 37^{o}م لمدة 18 ساعة في حاضنة هزازة على سرعة 140 دورة/دقيقة.

أما بالنسبة لبكتريا *Staph. aureus* فلقد كررت الخطوات السابقة نفسها لتحضير رائق المزارع البكتيرية الخالي من الخلايا (CFCS) ورائق الخلايا المتكسرة (LS) وبإستخدام أوساط الاكار المغذي (Nutrient Agar) والمرق المغذي (Nutrient Broth).

B- تحضير رائق المزرعة البكتيرية الخالي من الخلايا

Cell Free Culture Supernatant (CFCS)

رسبت الخلايا البكتيرية من المعلق البكتيري الذي حضر في الفقرة السابقة بإستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد عند سرعة (10000 xg) لمدة نصف ساعة وبدرجة 4 ^{o}م، تم اخذ الرائق ورشح خلال غشاء ترشيح دقيق (Millipore 0.22 μm) وأطلق عليه رائق الخلايا البكتيرية الخالي من الخلايا.

C- تحضير رائق الخلايا المتكسرة (Lysate Supernatant) (LS)

أخذ راسب الخلايا الذي تم الحصول عليه في الفقرة السابقة وغسلت الخلايا مرتين بـ 6 سم^3 من محلول الفوسفات المنظم Phosphate Buffer بتركيز 0.02 مولار ورقم هيدروجيني 7.4 والمعقم بالموصدة وبإستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد. ثم تم تعليق الخلايا في 3 سم^3 من محلول الصوديوم بوريت بتركيز 10 ملي مولار وأس هيدروجيني 9 حطمت بعد ذلك الخلايا البكتيرية بإستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Ultrasonic PG1545 بتسليط 20000 ذبذبة/ثانية لمدة 30 ثانية كررت هذه العملية ثلاث مرات مع فترات توقف لمدة 40 ثانية بعد كل مرة لتبريد المحلول وللحفاظ على درجة 4 $^oم$ في حمام ثلجي، وهكذا تم الحصول على مستخلص الخلايا الخام.فصل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد Cooled Centrifuge بسرعة (10000 xg) ولمدة نصف ساعة ، رشح الرائق خلال غشاء ترشيح دقيق (Milliproe 0.22μm) وضع الرائق الذي أطلق عليه رائق الخلايا المتكسرة في التبريد إلى حين الاستخدام.

قياس فعالية أنزيم الديوكسي رايبونيوكليز Enzyme Assay Of Deoxyribonuclease

تم قياس فعالية الأنزيم حسب الطريقة المتبعة من قبل الباحثين (Udou and Ichikawa, 1980)التي تعتمد على قياس الامتصاصية للنيوكليوتيدات الحامضية الذائبة المتحررة من المادة الأساس الـ DNA نتيجة لكسر الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر واستخدم الطول الموجي 260 نانوميتر لهذا الغرض . في التجارب التمهيدية استخدم محلول المادة الأساس الـ DNA (Calf thymus DNA) [3 mg /ml^{-1} من الـ DNA في 10ملي مولار من المحلول المنظم الصوديوم بوريت pH 9 الذي يحتوي على 10 ملي مولار من كلوريد الصوديوم].يتكون خليط التفاعل من 10 مايكروليتر من محلول الأنزيم (رائق الوسط الزرعي) و5 مايكروليتر من 0.1 مولار من $CaCl_2$ و100 مايكروليتر من محلول المادة الأساس و100 مايكروليتر من 8 ملي مولار من المحلول المنظم صوديوم بوريت pH 9، ثم حضن الخليط عند 37$^oم$ ومبدئياً لمدة 30 دقيقة. بعدها تم إيقاف التفاعل بإضافة 0.5 سم^3 من (W/V) 10% حامض البيركلوريك المبرد، ثم وضعت الأنابيب بعد ذلك في حمام ثلجي لمدة 15 دقيقة مع التحريك بين مدة وأخرى وأضيف بعد ذلك 0.5 سم^3 من الماء المقطر لكل أنبوبة اختبار وعرضت إلى الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة عند السرعة 1000 xg لإزالة الحامض النووي غير المتحلل. قدرت شدة تحلل المادة الأساس DNA بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميتر. تم التعبير عن الفعالية بوحدة الأنزيم الواحدة (One Unit) والتي هي عبارة عن كمية الأنزيم التي تعطي زيادة في الامتصاصية مقدارها 0.2 عند الطول الموجي 260 نانوميتر.

3. تقدير كمية البروتين الكلي Estimation Of Total Protein

استخدمت طريقة لاوري (Lowry et al., 1951) لتحديد كمية البروتين في رائق الوسط الزرعي لنمو بكتريا *P. aeruginosa*، الشكل(1).

الشكل1: المنحني القياسي للبروتين

4. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Get Filtration Chromatography

تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي ديوكسي رايبونيوكليز حسـ ـ ـب طريقة (Andrews, 1965) من خلال المقارنة بين حجم استرداد النيوكليز وحجوم استرداد مركبات قياسية معلومـة الـوزن الجزيئـي. واستخدمت مادة الهلام من نوع (Ultragel AcA34) وعمود الفصـل 100 × 2 سم لفصل وتقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم النيوكليز.

النتائـج والمناقشـة

شُخصِت كل من بكتريا *P.aeruginosa* وبكتريا *Staph.aureus* والتي تم عزلهـا وتنقيتهـا مـن عينات مرضية اعتمادا على الاختبارات الـشكلية والبايوكيميائيـة التـي تـستخدم لغـرض تـشخيص كل مـن نـوعي البكتريـا وكانـت النتـائج مطابقـة لمـا ورد فـي أنظمـة التـشخيص المعتمـدة (Holt et al., 1994; Koneman et al., 1997).

تم مبدئياً تقدير فعالية أنزيم DNase في رائق الوسط الزرعي والمستخلص الخام لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* وبكتريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* حسب طريقـة (Udou and Ichikawa, 1980)، والتي استخدمت لقياس فعالية الأنزيم لرائق الوسط الزرعي لبكتريا المكـورات

العنقودية الذهبية *Staph. aureus* والتي تعتمد على قياس الامتصاصية للنيوكليوتيدات الذائبة الناتجة عن تحلل الحامض النووي DNA عند الطول الموجي (260) نانوميتر، وأظهرت النتائج الأولية وجود فعالية لأنزيم DNase في رائق الوسط الزرعي والمستخلص الخام لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* وبكتريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* الجدول (1). وقد استخدمت بكتريا *S. aureus* للمقارنة فقط إذ في البداية تم العمل عليها أولاً وثبت وجود الأنزيم بها وهذا ما أكدته الدراسات البحثية السابقة (Udou and Ichikawa, 1980) مما يدل على ان الطريقة التمهيدية المستخدمة لقياس فعالية الأنزيم صحيحة والتي تشير إلى احتواء هذه البكتريا على أنزيم DNase الداخل خلوي وكذلك الخارج خلوي وهذا يتفق مع ما وجده الباحثون ان الأحياء المجهرية تحتوي على أنزيمات النيوكليز داخل خلوية والبعض الآخر لها قابلية على إفراز الأنزيمات خارج الخلية إلى الوسط الموجودة فيه (Prescott et al., 1993) . بعدها تم العمل على بكتريا *P. aeruginosa* فقط كمصدر لأنزيم DNase.

الجدول 1 :تعيين فعالية انزيم الـ DNase في كل من رائق الوسط الزرعي والمستخلص الخام لبكتريا *S. aureus* وبكتريا *P. aeruginosa*.

البكتريا	مصدر الانزيم	فعالية الانزيم (*وحدة انزيمية) (سم^3)
Staph. aureus	رائق الوسط الزرعي	7.15±0.35
	المستخلص الخام للخلايا	6.19±0.31
P. aeruginosa	رائق الوسط الزرعي	3.37±0.21
	المستخلص الخام للخلايا	2.71±0.3

* الوحدة الانزيمية لفعالية النيوكليز هي كمية الانزيم الازمة لزيادة الامتصاصية 0.2 عند الطول الموجي(A260) في الدقيقة.

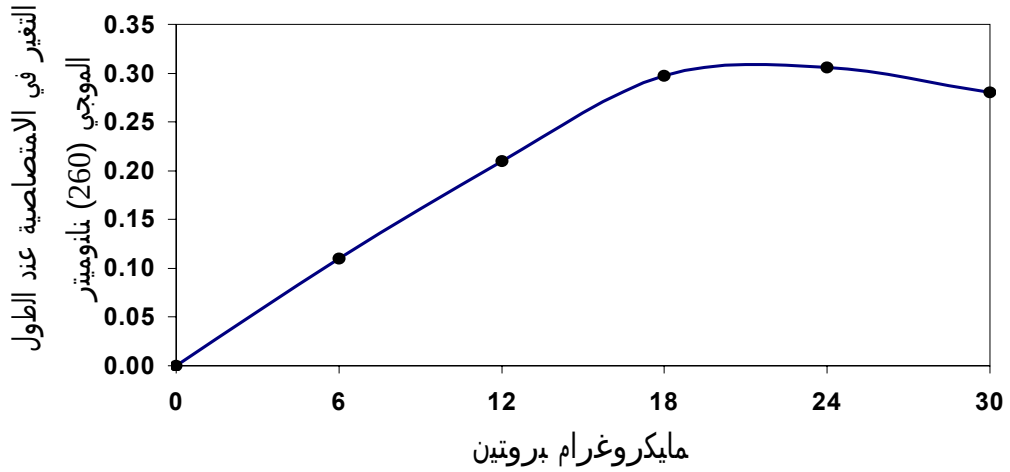
وبما ان الدراسة الحالية تؤكد على ان أنزيم DNase موجود في رائق الوسط الزرعي لنمو بكتريا *P. aeruginosa* ولذلك يمثل عاملاً من عوامل الضراوة الخارج خلوية (Frobisher et al., 1974) أو الاستفادة من تحليل الأحماض النووية في الوسط لغرض الحصول على المصادر الأولية لبناء النيوكليوتيدات، لذا تمت دراسة الظروف المثالية لقياس فعالية الأنزيم في رائق الوسط الزرعي (أي بشكله الضاري الخارج خلوي) فأجريت عدد من التجارب المتتابعة لتحديد هذه الظروف.

الظروف المثلى لفعالية الأنزيم:

- **العلاقة بين المحتوى البروتيني لرائق الوسط الزرعي وفعالية الانزيم:**

تم قياس فعالية انزيم DNase بوجود تراكيز مختلفة للبروتين لرائق الوسط الزرعي لبكتريا *P.aeruginosa* تراوحت بين 10-50 مايكروليتر (كل 10 مايكروليتر يحتوي على6 مايكروغرام بروتين)،

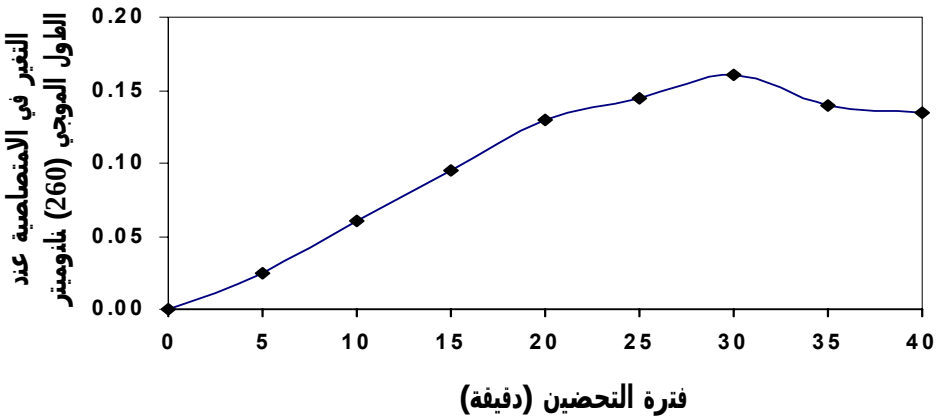
واشارت النتائج إلى ان فعالية الأنزيم تزداد وتتناسب طردياً مع زيادة كمية مستخلص البروتين (الأنـزيم) وإلى حدود 18-24 مايكروغرام (الشكل 2) وهذا يعطي دلالة على ان الإزالة الأنزيمية للـ DNase هو نتيجة البروتين (الأنزيم) الموجود في رائق الوسط الزرعي للبكتريا وهذه نتيجة يمكن ان تقارن مـع مـا توصل إليه الباحثان (Nestle and Roberts, 1969) في زيادة فعالية الأنزيم لتحلـل الـ DNA والـ RNA طردياً مع زيادة كمية البروتين (الأنزيم) وإلى حدود 40µg بالنسبة لأنزيم النيوكليز الخارج خلوي لبكتريا *Serratia marcescens*.



الشكل 2: تأثير التراكيز المختلفة من الانزيم (رائق الوسط الزرعي) في فعالية انزيم الـ DNase في بكتريا *P. aeruginosa*

- **مدة التحضين:**

بينت نتائج البحث ان فعالية أنزيم DNase تزداد خطياً مع زيادة مدة التحضين حيث يشير الـشكل (3) إلى وجود زيادة في الفعالية إبتداءاً من زمن الصفر وإلى مدة 30 دقيقة ومن ثم تبدأ الفعالية الأنزيمية بالانخفاض عند زيادة مدة التحضين وتم اختيار مدة 25-30 دقيقة هي المدة الزمنية المثلى لتحضين خليط التفاعل الأنزيمي لأنزيم DNase وهذه المدة الزمنية التي تم الحصول فيها على زيادة خطية هي أطـول من تلك التي أشار إليها الباحثون (Brown et al., 1984) من ان المدة الزمنية 4-3 دقـائق هـي المـدة الزمنية التي يعمل بها أنزيم DNase I المستخلص من البنكرياس، وكذلك تكون أطول بقليل مـن المـدة الزمنية التي أشار إليها الباحثان (Nestle and Roberts, 1969) فان انزيم DNase المستخلص في بكتريا *Serratia marcescens* وهي20 دقيقة.

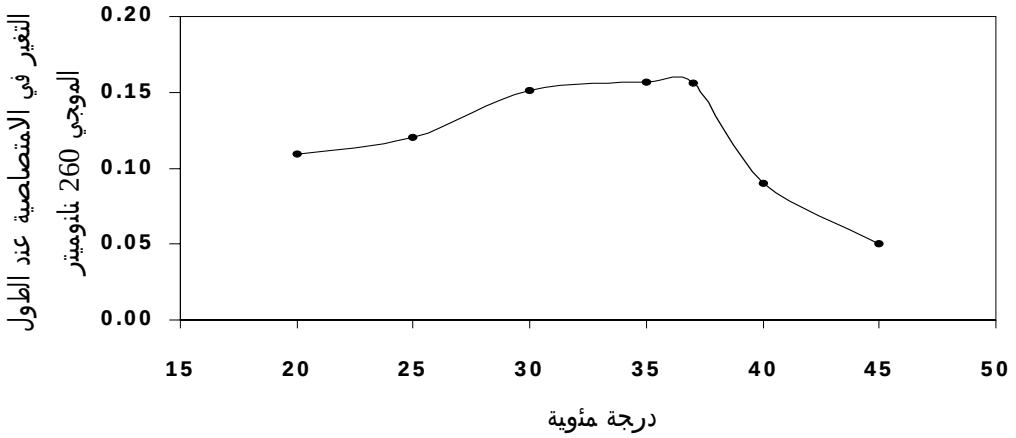


الشكل 3 : تأثير الزمن (فترة تحضين الانزيم) في فعالية انزيم DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa*

- **تاثير درجة الحرارة في فعالية الانزيم:**

عند دراسة تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية الأنزيم يلاحظ ان الشكل (4) ان التفاعل يـزداد بالارتفاع لدرجة الحرارة حتى تصل درجة الحرارة 30 إلى 37 ^{o}م حيث تكون أعلاها ثم تبدأ بالانخفـاض التدريجي بعد درجة 37 ^{o}م، (الشكل 4) وتم اختيار درجة 37 ^{o}م هي الدرجة الحرارية المثالية لقياس فعالية الأنزيم وبذلك يكون الأنزيم من الأنزيمات التي تعمل في درجات حرارية معتدلة، وهذه النتيجة تطابق ما أشار إليه كل من الباحثين (Nestle and Roberts, 1969) لأنـزيم DNase المـستخلص مـن بكتريـا *Serratia marcescens*، ولقد أشار الباحثون (Wu et al., 2001) إلى ان أنزيم DNase المـستخلص من بكتريا *Vibrio vulnificus* يعمل في درجة حرارية 50^{o} م.

كذلك تشير نتائج البحث الحالي الشـ ـ ـكل (.4) ان الأنزيم غير ثابت حرارياً حيث يفقد الفعاليـة بسرعة عند تعريضه لدرجة حرارة أعلى من 40 ^{o}م، وهذه النتيجة تتفق مع الدراسـات الأخـرى حـول خصائص الـ DNase حيثُ ذكِر نوعان من الأنزيم الأول ثابت بالحرارة والثاني غير ثابـت بـالحرارة (Macfaddin, 1985).



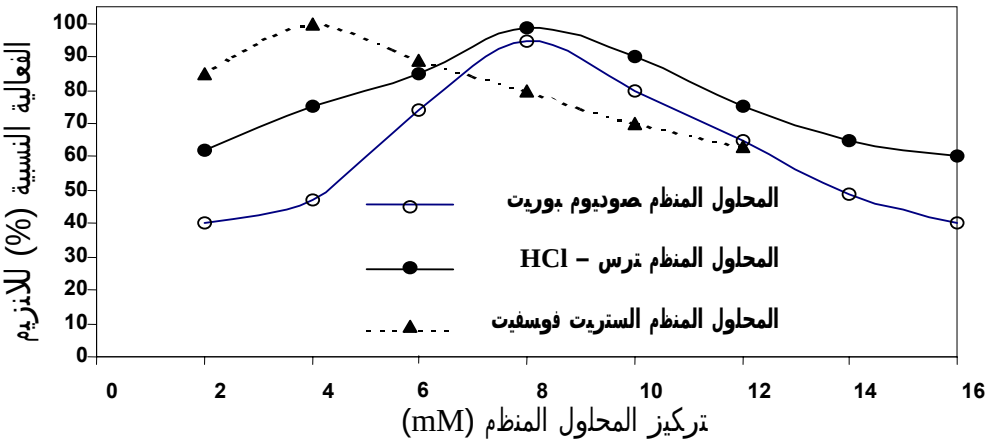
الشكل 4 : تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية انزيم الـ DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa*.

***المحاليل المنظمة Buffer Solution**

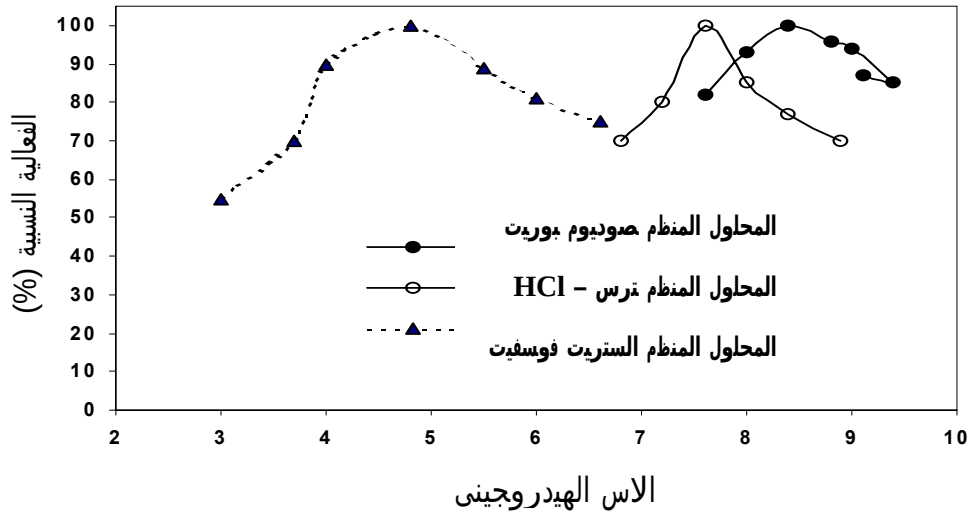
لأجل دراسة الأس الهيدروجيني الأمثل في البحث الحالي ،فقد تم تحليل الـ DNA في قيم (pH) مختلفة، فتم قياس فعالية أنزيم DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa* في ثلاثة انواع من المحاليل المنظمة وبتراكيز متدرجة لكل من هذه المحاليل. إن المحاليل التي استخدمت هي المحلول المنظم صوديوم بوريت(Sodium borate) والمحلول المنظم ترس (Tris-HCl) HCl – والمحلول المنظم ستريت فوسفيت (Citrate phosphate). يوضح الشكل (5) الفعالية النسبية (باعتبار أعلى امتصاصية تمثل 100% لكل محلول منظم) لأنزيم DNase في التراكيز المختلفة لكل محلول منظم. ويلاحظ من الشكل أن أعلى فعالية بالنسبة للمحلول المنظم صوديوم بوريت والمحلول المنظم ترس HCl هو 8 ملي مولار، اما بالنسبة للمحلول المنظم ستريت فوسفيت فقد كان 4 ملي مولار، ويتضح من الشكل (6) ان مدى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم يتراوح بين 4.8-8.4 في المحاليل المنظمة المستخدمة وُوجد انخفاض ملحوظ في فعالية الأنزيم خارج هذا المدى من الاس الهيدروجيني الأمثل. وبمقارنة فعالية الأنزيم في المحاليل المنظمة عند التراكيز والأس الهيدروجيني الأمثل وكما مبين في الجدول (2) يتبين ان أعلى فعالية تم الحصول عليها في كل من المحلول المنظم صوديوم بوريت بتركيز 8 ملي مولار واس هيدروجيني 8.4 والمحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 8 ملي مولار واس هيدروجيني 7.6 وكانت الفعالية اقل في المحلول المنظم الستريت بتركيز 4 ملي مولار واس هيدروجيني 4.8، وبما ان الفعالية النسبية كانت متقاربة بدرجة كبيرة في كل من المحلول المنظم صوديوم بوريت وTris-HCl، فلقد تم الاعتماد على المحلول المنظم صوديوم بوريت بتركيز 8 ملي مولار واس هيدروجيني امثل 8.4 في الدراسة الحالية، وهذه النتيجة مقاربة مع ما أشار إليه الباحثون (Gray et al.,

1975) إلى ان أنزيم DNase المستخلص من بكتريا *Pseudomonas* BAL 31.1 يعمل عند أس هيدروجيني 8.1 وبإستخدام المحلول المنظم Tris-HCl .

وتختلف مع ما أشار الباحثون (Salikhova *et al.*, 2004) إلى ان أنزيم DNase المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis* له أُس هيدروجيني امثل عند 10.4-10.6 باستخدام المحلول المنظم الاسيتيت.



الشكل 5 :تأثير تراكيز المحاليل المنظمة في فعالية انزيم الـ DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa*.



الشكل 6 :تأثير الاس الهيدروجيني (pH) في فعالية انزيم الـ DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa* في المحاليل المنظمة المختلفة.

الجدول 2 : مقارنة لفعالية الـ DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa* في المحاليل المنظمة المختلفة في التراكيز المولارية و الـ pH الامثل.

المحلول المنظم	التركيز الامثل mM	pH الامثل	التغير في الامتصاصية 260 nm	الفعالية النسبية*
صوديوم بوريت	8	8.4	0.29	99
ترس-HCl	8	7.6	2.95	100
ستريت فوسفيت	4	4.8	0.210	49

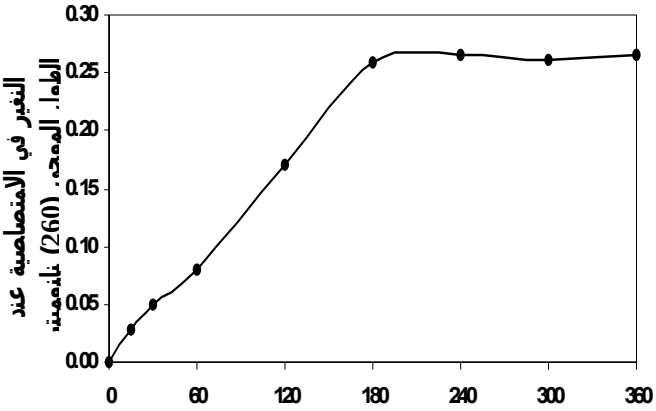
*احتسبت نسبة الفعالية على أساس أعلى امتصاصية تمثل 100% وكان عدد المكررات (6).

- **العلاقة بين فعالية أنزيم DNase وتركيز المادة الأساس:**

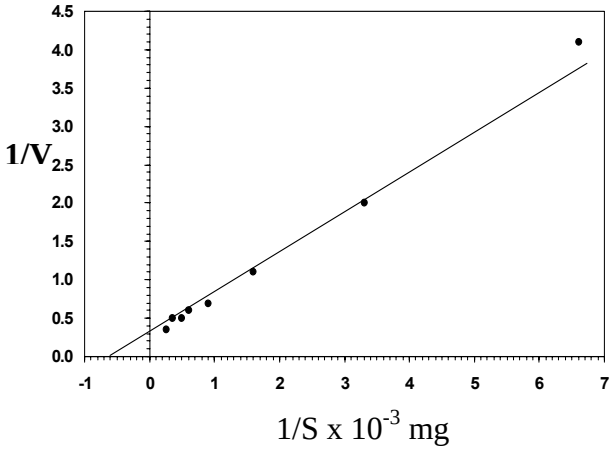
إن العلاقة بين فعالية أنزيم DNase وتركيز المادة الأساس (DNA) قد تمت دراستها في البحث الحالي من خلال استخدام تراكيز مختلفة من المادة الأساس في خليط التفاعل تراوحت بين 360 -15 مايكروغرام من الـ DNA الشكل (7)، وأظهرت النتائج ان تشبع الأنزيم بالمادة الأساس كان عند تركيز 180 مايكروغرام من الـ DNA. وان ثابت ميكياس–منتن (Km) الذي تم الحصول عليه باستخدام طريقة لاينويفر-برك Lineweaver – Burk مساوية 1.68×10^{-4} µM الشكل (8) وهي قيمة اقل من قيمة (Km) في بكتريا *Fibrobacter Succinogenes* حيث بلغت 61µM (Maclellan and Forsberg.,2001). يتضح مما سبق التعرف على الظروف المثالية لعمل إنزيم DNase في رائق الوسط ألزرعي لبكتريا *P.aeruginosa* و كما موضح في الجدول (3).

الجدول 3 :الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم الديوكسي رايبونيوكليز(DNase) لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

ت	الظروف المستخدمة	القيمة المثلى
1	تركيز البروتين (المستخلص الانزيمي)	18-24 مايكروغرام
2	المحلول المنظم	صوديوم بوريت
3	تركيز المحلول المنظم	8 ملي مولار
4	الاس الهيدروجيني للمحلول المنظم	8.4
5	تركيز المادة الاساس (DNA)	180 مايكروغرام
6	مدة التحضين	25-30 دقيقة
7	درجة الحرارة	35-37 درجة مئوية



الشكل 7 :تأثير تركيز المادة الاساس (DNA) في فعالية انزيم DNase في رائق الوسط الزرعي لبكتريا *P. aeruginosa*.



الشكل 8 :رسم لاينوفر-برك لتوضيح ثابت ميكيلس منتن للمادة الاساس DNA .

- **خصوصية الانزيم للمادة الاساس:**

لوحظ من خلال مراجعة البحوث ان انزيمات النيوكليز يعمل البعض منها بشكل غير متخصص على الـ DNA أو الـ RNA مثال ذلك انزيم الـ DNase المستخلص من بكتريا *Bacillus subtilis* (Boyer, 1971) وانزيم DNase المستخلص من بكتريا *Erwinia chrysanthem* (Moulard et al., 1993)، كذلك تشير بحوث اخرى الى ان انزيم DNase غالباً ما يكون ملوثاً او مرتبطاً بفعالية انزيم RNase (Fleischer and Fleischer, 1983) كما ان المصدر الانزيمي في البحث الحالي هو مصدر خام غير نقي كل هذه النقاط يجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار عند ملاحظة نتائج البحث الحالي التي تبين ان انزيم الـ DNase اعطى فعالية بوجود المادة الاساس RNA حيث يوضح الجدول (3) ان نسبة الفعالية عندما يكون الـ RNA مادة أساس هي 82 % بالمقارنة مع الفعالية عند وجود الـ DNA كمادة أساس في رائق وسط نمو البكتريا كذلك يشير الجدول إلى أن الـ RNA يتعرض للتحال كما في الـ DNA عندما يكون المصدر الأنزيمي رائق المستخلص الخلوي لبكتريا *P. aeruginosa* وكانت الفعالية 75 % بالمقارنة مع الفعالية عند تواجد الـ DNA كمادة أساس وهذه النتيجة تطابق ما أشار اليه الباحثان (Udou and Ichikawa, 1980) على قدرة تحليل DNA وRNA بوساطة انزيم النيوكليز المستخلص من بكتريا *Staph. aureus*.

الجدول 4 :فعالية انزيم النيوكليز في رائق مزرعة نمو ورائق مستخلص الخلايا لبكتريا *P. aeruginosa* تجاه المادة الاساس البديلة الحامض النووي الرايبوزي (RNA).

المادة الأساس	*النسبة المئوية لفعالية الانزيم في رائق مزرعة النمو	*النسبة المئوية لفعالية الانزيم في رائق مستخلص الخلايا
DNA	100	100
RNA	82	75

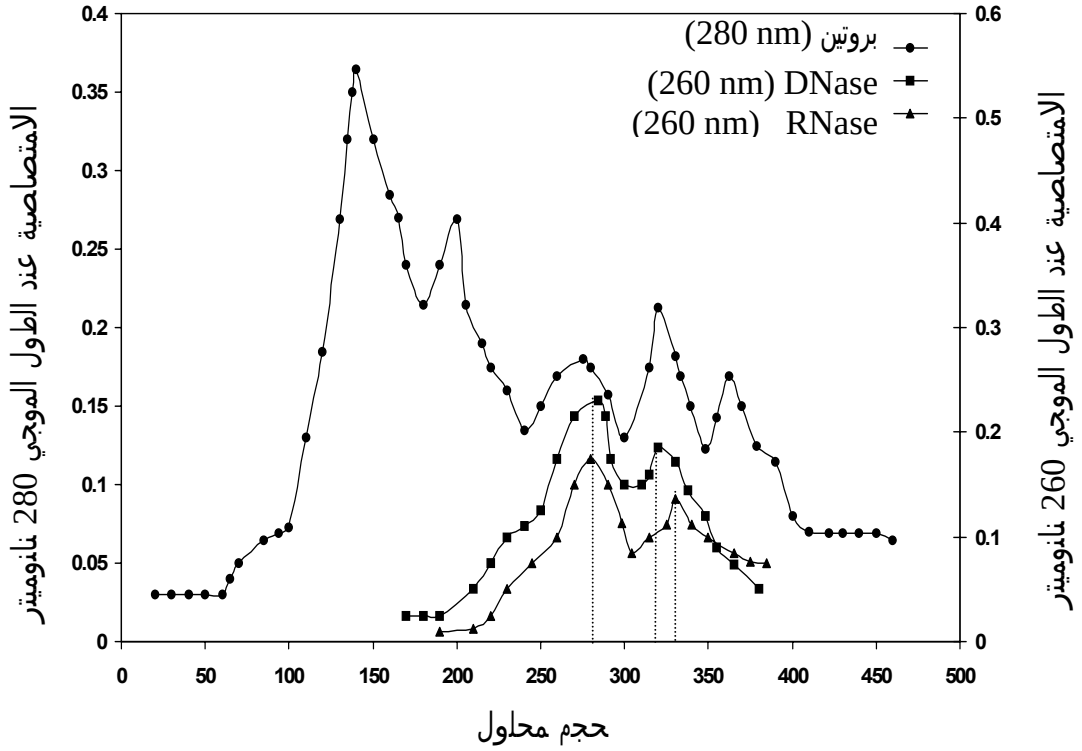
*احتسبت نسبة الفعالية على اساس ان الفعالية النسبية للمادة الاساس DNA هي 100%.

- **التقنية الجزئية للانزيم:**

تم تقدير الوزن الجزيئي الظاهري لانزيم الديوكسي رايبونيوكليز DNase والرايبونيوكليز RNase في رائق الوسط الزرعي لنمو بكتريا *P. aeruginosa* بإستخدام عمود الفصل الكروماتوكرافي الذي يحتوي على الهلام Ultragel AcA34. ولقد اوضحت النتائج, الشكل (9) وجود قمتين لانزيم DNase ومن خلال العلاقة الخطية بين حجم استرداد المركبات القياسية واوزانها الجزيئية المعلومة لغرض تقدير الوزن الجزيئي التقريبي ظهر ان القمة الاولى لانزيم DNase اعطت وزناً جزيئياً بحدود48000 دالتون والقمة الثانية اعطت وزناً جزيئياً تقريبي 36000 دالتون وقد يكون سبب وجود القمتين لانزيم DNase هو وجود اكثر من نوع واحد من هذا الانزيم، او انها وحدتان ثانويتان لانزيم واحد وهناك حاجة الى دراسة تفصيلية اوسع باستخدام الهجرة الكهربائية للتأكد من ذلك، وعند مقارنة الاوزان الجزيئية التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية مع البحوث الاخرى يتبين ان نتائج البحث الحالي تكون متقاربة او اعلى قليلاً مع ما اشار اليه (Adams et al., 1981) من ان الوزن الجزيئي لانزيم DNase I المعزول من البنكرياس هو 31000 دالتون في حين أن DNase II المعزول من الطحال 40000 دالتون وكذلك لما اشار اليه (Perez-Amador et al., 2000) بالنسبة لانزيم نيوكليز I في النباتات والذي قدر بمدى يتراوح 31000-42000 دالتون.

وعند تحديد الوزن الجزيئي بإستخدام المادة الأساس RNA أشارت النتائج إلى ان القمة الأولى تشابه باستخدام انزيم DNase والتي أعطت الوزن الجزيئي 00048 دالتون، اما القمة الثانية فقد أعطت وزناً جزيئياً قدر بـ 17000 دالتون.

ولغرض التأكد من ان وجود انزيم DNase وانزيم Rnase كوحدة واحدة أو انزيمين منفصلين وكذلك من اجل التأكد من وجود نوع واحد او اكثر لانزيم DNase فقد كان هناك حاجة إلى استخدام خطوات تنقية أخرى مثل استخدام تقنية الهجرة الكهربائية Electrophoresis.



الشكل 9: المظهر الجانبي لروغان رائق الوسط الزرعي لبكتريا*Pseudomonas aeruginosa* باستخدام الهلام Ultragel AcA34 وفعالية إنزيم الـ DNase والـ RNase.

المصادر العربية

الجلبي، قصي عبدالقادر, 1991. الأحماض النووية. دار الكتب للطباعة والنشر, جامعة الموصل.

المصادر الاجنبية

Adams, R.L.P., Burdon, R.H., Campbell, A.M., Leader, D.P. and Smellie, R.M.S., 1981. The Biochemistry of the Nucleic Acids. 9th ed., Chapman and Hall, London, pp.141-171.

Atlas, R.M., Brown, A.E. and Parks, L.C., 1995. Eperimental microbiology: Laboratory manual, Mosby-year. Book., Inc. pp.413-419.

Andrews, P., 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. J. Biol. Chem. 95: pp.595-600.

Boyer, P.D., 1971.The ensymes: Hydrolysis. 3rd ed., by Academic press,Inc., pp.374-430.

Brown, G., Karpetsky, T., Rictor, K. and rahman, A., 1984. Characterization of deoxyribonuclease activities derived from control and inflammation associated mouse perioneal macrophages, J. Biochem.,pp. 220: 561 p.

Ceska, T.A. and Sayers, J.R., 1998. Structure-specific DNA cleavage by 5` nucleases. Trends Biochem. Sci., 23: pp.331-336.

Dubnau, D., 1999. DNA uptake in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 53: pp.217-244.

Fleischer, S. and Fleischer, B., 1983. Methods in Enzymology: Biomembranes. 5th ed., by Academic press, Inc., pp.70-74.

Fraser, M.J., 1994. The physiological level of ionic strength protects cellular DNA from endodeoxyribonuclease degradiation. Bio Essays., 16: pp.761-766.

Frobisher, M., Hinsdill, R.D., Crabtree, K.T. and Goodheart, C.R., 1974. Fundamentals of microbiology. 9th ed. W.B. Saunders company, London, pp.115-117.

Gray, H.B., Ostrander, J.D., Hodnett, J., Legerski, R. and Robberson, D., 1975. Extracellular nucleases of pseudomonas BAL 31.1. characterization of single strand-specific deoxyriboendonuclease and double-strand deoxyriboexonuclease activities. Nucleic Acids Res., 2(9): pp.1459-1492.

Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, T.T. and Williams, S.T., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins, pp.151-157.

Jaffe, A. and Bush, A., 2001. Cystic fibrosis: review of the decade. Monaldi Arch. Chest Dis., 56, pp.240-247.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janada, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C., 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., J.B. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A., pp.253-274.

Lehninger, A.L., 1982. Lehninger principles of Biochemistry. 6th ed., Worth publishers, Inc., pp.183-248 .

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the follin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: pp.265-275.

Macfaddin, J.F., 1985. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed., Waverly Press, Inc., Baltimore, U.S.A., pp.94-113.

Maclellan, S.R. and Forsberg, C.W., 2001. Properties of the major non-specific endonuclease from the strict anaerobe Fibrobacter succinogenes and evidence for disulfide bond formation *in vivo*. Microbiol., 147: pp.315-323.

Moulard, M., Condemine, G. and Robert-Baudovy, J., 1993. Characterization of the nuclease gene coding for a nuclease of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthem*. Mol. Microbio., 8: pp.685-695.

Nestle, M. and Robert, W.K., 1969. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. J. Bio. Chemis., 244(19): pp.5213-5218.

Nishino, T. and Morikawa, K., 2002. Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. Oncogene, 21, pp.9022-9032.

Perez-Amador, M.A., Abler, M.L., DeRocher, E., Thompson, D.M., Hoff, A.V., LeBrasseur, N.D., Lers, A. and Green, P.J., 2000. Identification of BFN1, a Bifunctional Nuclease Induced during Leaf and Stem Senescence in Arabidopsis. Plant Physio., 122: pp.169-179.

Perona, J.J., 2002. Type II restriction endonucleases. Methods, 28, pp.353-364.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klien, D.A., 1993. Microbiology. 2nd ed., W.M.C. Brown Communication, Inc., England,pp. pp.183-205.

Salikhova, Z., Safina, D.R., Sokolova, R.B. and Iusupova, D.V., 2004. Biosynthesis of deoxyribonuclease of proteus micrabilis. Kazan State university, Russia, 1 p.

Udou, T. and Ichikawa, Y., 1980. Effect of Sodium Chloride on the Activity and Production of Staphylococcal Exonuclease .J.General Microbio.,116: pp.69-74.

Wu, H., Song, Z., Givskov, M., Doring, G., Worlitzsch, D., Mathee, K., Rygaard, J. and Hiby, N., 2001. *pseudomonas aeruginosa* mutations in *IasI* and *rhII* quorum sensing systems result in milder chronic lung infection. Microbiology., Socirty for General Microbiology. 147: pp.1105-1113.