نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۰، بهار ۱۳۹۰

یک روش ساده، سریع و مقرون بصرفه برای تخلیص تریپسین از پانکراس گوساله

• **بهمن غلامحسین گودرزی** (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش بیوشیمی و پروتئومیکس، کرج
• **محبوبه طالبی**
گروه زیست شناسی- بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران
• **رویا باقریان**
گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
• **رضا حاجی حسینی**
گروه زیست شناسی- بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران
تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۸۹
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۲۵۰۵۶۰
Email: b.goudarzi@rvsri.ir

چکیده

ترپسین از جمله آنزیم هایی است که در فرآیندهای بیوتکنولوژی کاربرد فراوان دارد. در آزمایشگاه کشت سلولی، طی فرآیند پاشاژ سلول ها، تریپسین جهت جدا کردن سلول های چسبیده شده به دیواره ظرف کشت سلولی استفاده می شود. همچنین جهت جدا کردن سلول ها از یک بافت می توان از تریپسین استفاده کرد. تریپسین در فرایند تولید پپتن و پروتئین هیدرولیز شده از کازئین شیر و سویا بطور انبوه و گسترده مورد استفاده قرار می شگیرد(۲۱،۱). تریپسین یک سرین پروتئاز است که در سیستم گوارش اکثر مهره داران یافت می شود ترپسین از جمله آنزیم هایی است که در فرآیندهای بیوتکنولوژی کاربرد فراوان دارد. در این مطالعه با استفاده از روش های رسوب دهی پروتئین ها با سولفات آمونیوم اشباع شده ۳۵ درصد و ۷۵ درصد، رسوب دهی با تری کلرو استیک اسید ۲/۵ درصد وزنی حجمی، رسوب دهی پروتئین ها در pH=۶/۵ و در نهایت با کروماتوگرافی تمایلی تریپسین موجود در پانکراس تخلیص شد. با این روش، از هر کیلو گرم پانکراس گوساله ۲/۸ گرم تریپسین خالص با فعالیت ویژه (U/mg) ۱۵۵ استحصال گردید. نتایج این مطالعه نشان میدهد که با این روش می توان ۲۶ درصد از آنزیم موجود در پانکراس را بدست آورد. در نهایت می توان گفت این روش یک روش ساده، سریع و مقرون به صرفه جهت تولید انبوه تریپسین باشد.

کلمات کلیدی: تریپسین، تخلیص، پانکراس گوساله، روش ساده

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 90 pp: 33-39

A simple, fast and commercial method for trypsin purification from bovine pancreas

By: Goudarzi B.Gh. Razi Vaccine and Serum Research Institute (Corresponding Author; Tel: +989123250560) Talebi, M. Biology Section, Payame noor University, Bagherian R. Biochemistry Section ov Medicine Faculty, Tehran University. HajiHosseini, R. Biology Section, Payame Noor University,

Trypsin is a serine protease found in the digestive system of many vertebrates, where it hydrolyses proteins. Trypsin has been used widely in various biotechnological processes. In this study trypsin was purified using two precipitation cut, 35% and 75% as saturation percent of Ammonium sulfate solutions, TCA precipitation (2.5% W/V), pH precipitation and finally affinity chromatography. This method could be used to obtain 2.8 g purified trypsin with specific activity 155 U/mg and 26% recovery from 1kg bovine pancreas. Therefore, this method is a simple, fast and commercial method for scale-up of trypsin extraction from bovine pancreas.

Key words: Trypsin, Purification, Bovine pancreas, Simple method

مقدمه

تریپسین EC ۳,۴,۲۱,۴ یک سرین پروتئاز است. این آنزیم در سیستم گوارشی اکثر مهره داران وجود دارد که وظیفه آن هیدرولیز پروتئین ها می باشد. در پانکراس، تریپسین به صورت پیش ساز غیرفعال (تریپسینوژن) سنتز شده که با جدا شدن یک هگزا پپتید از آنتهای آمینی آن به تریپسین فعال تبدیل می شود. تریپسین اندوپپتیدآزی است که پیوندهای پپتیدی را از انتهای گروه های کربوکسیل اسیدهای آمینه آرژنین و لیزین هیدرولیز می کند(۱۵،۱۴).

تریپسین عموماً در مطالعات پروتئومیکس برای هیدرولیز پروتئین ها به پپتیدها جهت شناسایی پروتئین ها با استفاده از اسپکترومتری جرمی و یا روش های دیگر مورد استفاده قرار می گیرد. تریپسین را می توان چاقو های دقیق مولکولی دانست که پروتئین ها را از ناحیه گروه کربوکسیل اسیدهای آمینه آرژنین و لیزین برش می دهد. از تریپسین می توان جهت انحلال لخته خون، درمان التهاب و ساخت داروهای التیام بخش نیز استفاده کرد. یکی دیگر از کاربردهای مهم تریپسین در تبدیل انسولین خوکی به انسولین انسانی است که تنها در یک اسید آمینه با یکدیگر تفاوت دارند(۲۲،۹).

عمده مصرف تریپسین در مقیاس صنعتی در صنایع چرم می باشد. در سال ۱۹۸۵، بازار جهانی فروش تریپسین تولید شده از پانکراس حیوانی در زمینه فوق حدود ۱۰ میلیون دلار بود. در مرحله خیساندن چرم در یک مخلوط قلیائی[1] برای تورم زدائی پوست ها[2] و از بین بردن برخی از اجزاء پروتئینی چرم برای نرم سازی آن (برای مرحله بعدی که دباغی است) از این آنزیم استفاده می شود. کاربرد صنعتی دیگر تریپسین در ساخت شوینده های خانگی می باشد. البته با پیشرفت صنعت بیوتکنولوژی استفاده از پروتئآزهای میکروبی در این خصوص رواج بیشتری پیداکرده است. همچنین در بعضی مواقع در صنعت پنیرسازی به عنوان مکمل یا جایگزین رنین از تریپسین استفاده می شود(۱۶،۱۳،۱۰).

از جمله کاربردهای دیگر تریپسین می توان به استفاده از آن در شیمی بالینی به عنوان وسیله ای برای تشخیص بیماری ها، آنالیز مواد غذائی و فعال سازی دیگر زیموژن های موجود در پانکراس نظیر کیموتریپسین اشاره کرد.

با توجه به مصرف و کاربرد زیاد تریپسین، بیش از چندین دهه است که محققین مختلف در سراسر دنیا تلاش می کنند تا با استفاده از روش های مختلف نظیر رسوب دهی پروتئین ها با نمک ها ی معدنی و حلال های آلی، کروماتوگرافی غربالی، کروماتوگرافی تعویض یونی، کرماتوگرافی تمایلی، الکتروفورز و برخی دیگر از روشهای مرسوم در امر تخلیص پروتئین ها یک روش ساده، سریع و ازان قیمت جهت تهیه و تولید تریپسین در مقادیر انبوه طراحی کنند. از طرف دیگر با توجه به اینکه این آنزیم در اکثر موجودات یوکاریوت و پروکاریوت وجود دارد، سعی بر این است تا با استفاده از تکنیک های متداول در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک به منبع مناسبی جهت تولید این آنزیم دسترسی پیدا کنند. لذا مطالعات گسترده ای بر روی تریپسین موجود در گاو، گوسفند، خوک، انسان، بز، بوقلمون، موش صحرائی، اسب، ماهیان ریه دار، میگو، پروانه و میکروارگانیزم ها یی نظیر Streptomyces انجام داده اند. همچنین جهت استفاده بهینه از این آنزیم بر روی خواص فیزیکوشیمیایی آن تحقیقات وسیعی انجام شده و یا در دست اجرا است (۱۰، ۱۴،۱۳).

در این مطالعه با توجه به اینکه پانکراس گوساله سرشار از تریپسین می باشد، سعی شده است که جهت استخراج و تخلیص آنزیم تریپسن، یک روش سریع، ساده و ارزان طراحی و ارائه گردد که از بهره وری بالا و خوبی برخوردار باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری پانکراس

جهت جمع آوری پانکراس مورد نیاز به کشتارگاه زیاران مراجعه شد که پس از ذبح گوساله های ۳ تا ۲۴ ماهه، سریعاً پانکراس آنها جدا و در ظروف حاوی اسید سولفوریک ۰/۲۵ نرمال سرد قرار داده شد. سپس نمونه های جمع آوری شده به آزمایشگاه منقل و پس از زدودن بافت چربی و پیوندی پانکراس ها دوبار چرخ شدند.

هضم اسیدی

به یک کیلو گرم از پانکراس چرخ شده دو لیتر اسید سولفوریک ۰/۲۵ نرمال سرد اضافه کرده و به مدت چهار ساعت در دمای ۴ درجه

سانتی گراد با همزن مکانیکی بخوبی هموژنیزه شد. مخلوط حاصله با تنظیف دو لایه صاف و سپس محلول صاف شده تعیین حجم و در سردخانه نگهداری شد.

رسوب دهی با سولفات آمونیم

جهت رسوب دهی با سولفات آمونیوم اشباع شده ۳۵ درصد، به ازای هر لیتر از محلول صاف شده مقدار ۲۰۸/۴ گرم سولفات آمونیوم بتدریج به آن اضافه و سپس به آرامی همزده شد تا کاملا سولفات آمونیوم حل گردد. سپس به مدت یک ساعت در سردخانه قرار داده شد و بعد بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور g ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول روئی به آرامی تخلیه و پس از تعیین حجم ذخیره و رسوب حاصله نیز دور ریخته شد. جهت رسوب دهی با سولفات آمونیوم اشباع شده ۷۵ درصد، به ازای هر لیتر از محلول روئی مرحله قبل مقدار ۲۷۵ گرم سولفات آمونیوم بتدریج اضافه و به آرامی همزده شد تا سولفات آمونیوم کاملاً حل گردید و سپس به مدت ۳ ساعت در سردخانه قرار داده شد و بعد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور g ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول روئی به آرامی تخلیه و دور ریخته شد. رسوب حاصله در ۱۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل و در نهایت حجم آن با آب دیونیزه به ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

رسوب دهی با تری کلرو استیک اسید(TCA)

به محلول حاصل از مرحله قبل ۴۰۰ میلی لیتر محلول ۵ درصد تری کلرو استیک اسید(W/V) سرد اضافه گردید. بمدت ۳۰ دقیقه به آرامی همزده شد و سپس بمدت ۲۰ ساعت در سردخانه قرار داده شد. پس از سپری شدن این زمان رسوب تولید شده حاوی تریپسینوژن و تریپسین است. جهت جمع آوری رسوب، محلول فوق بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور g ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول روئی که حاوی آلفا-۱- آنتی ترپسین و ریبونوکلئاز است به آرامی تخلیه گردید(۱۳). ۹۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال به رسوب اضافه گردید. پس از حل شدن رسوب حجم آن با اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس به مدت ۲۰ ساعت با پنج لیتر از اسید کلریدریک ۰/۰۰۵ نرمال دیالیز شد.

رسوب دهی با استفاده از pH ایزوالکتریک و فعال کردن تریپسینوژن

با استفاده از سود ۰/۱ نرمال pH محلول حاصل از مرحله قبل به ۵/۶ رسانده و یک ساعت در سردخانه نگهداری شد. سپس بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور g ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول روئی که حاوی تریپسینوژن می باشد، به آهستگی جدا گردید و رسوب حاصله دور ریخته شد. به ازاء هر لیتر از محلول فوق ۱۴/۷ گرم کلرید کلسیم به آن اضافه و حل شد (۰/۱ مولار کلرید کلسیم). سپس pH محلول به ۸/۲ رسانده و بمدت ۲۰ ساعت در سردخانه نگهداری شد. در نهایت با پنج لیتر از اسید کلریدریک ۰/۰۰۱ نرمال دیالیز گردید.

لیوفیلیزاسیون محلول حاوی تریپسین

محلول فوق که حاوی مقادیر نسبتا خالصی از تریپسین است به یک بالن پیرکس مخصوص منتقل و در ۵۰- درجه سانتیگراد فریز شد. سپس با کمک دستگاه فریز- درایر مدل Telstar در شرایط ۵۰- درجه سانتیگراد و فشار ۴۰-۲۰ میلی بار خشک گردید.

کروماتوگرافی تمایلی تریپسین

جهت کروماتوگرافی نمونه خشک شده از رزین پارا آمینو بنزامیدین-آگارز[۳] به عنوان بستر و از بافر تریس (Tris-HCl ۰/۱M, NaCl ۰/۵M pH ۸/۰) به عنوان بافر نمونه[۴] و بافر اتصال دهنده[۵] استفاده شد. طول ستون و قطر ستون استفاده شده بترتیب ۳۰۰ و ۵ میلی متر و حجم رزین ۲۵ میلی لیتر بود.

در این مطالعه ۲۰ میلی گرم از نمونه خشک شده توزین و در ۵ میلی لیتر از بافر نمونه حل گردید و با پیپت به آرامی روی رزین درون ستون ریخته شد. سپس ۳۵ میلی لیتر از بافر تریس از ستون عبور داده شد. اولین بافر شستشو[۶] که سبب جدا شدن تریپسین از رزین می شود، ۴۵ میلی لیتر بافراستات سدیم (AcONa ۰/۱M, NaCl ۰/۵M pH ۴/۰) و دومین بافر شستشو که سبب جدا شدن سایر سرین پروتئازها می شود، ۴۰ میلی لیتر بافر گلایسین (Glycine-HCl ۰/۱M, NaCl ۰/۰۵M pH ۲/۰-۲/۵) بود. سرعت جریان بافر برای بارگذاری[۷] و شستشو بترتیب ۳۰ و ۵۰ میلی لیتر/ سانتیمتر مکعب/ ساعت بود.

در نهایت نمونه های خارج شده از ستون در ۶۰ فراکشن ۲ میلی لیتری جمع آوری و جذب نوری آنها در ۲۸۰ نانومتر قرائت شد (۱۷،۱۲).

استخراج تریپسین به روش Kuntiz و Willomwska

جهت مقایسه روش استخراج تریپسین توسط این مطالعه با روش های ارائه شده توسط Kuntiz و Willomwska، ابتدا اقدام به استخراج تریپسین با روش های گزارش شده توسط این دو محقق شد (۱۳،۱۰،۲) و سپس میزان خلوص و مقدار آنزیم استحصال شده مورد بررسی قرار گرفت.

الکتروفورز SDS-PAGE

در مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان خلوص آنزیم تریپسین تخلیص شده از روش ارائه شده و همچنین مقایسه آن با روش های ارائه شده توسط Kuntiz و Willomwska از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. همچنین از آنزیم کمپانی فلوکا به عنوان استاندارد استفاده گردید.

از ژل پلی آکریل آمید به عنوان بستر الکتروفورز استفاده گردید. برای انجام الکتروفورز، مطابق روش لاملی از سدیم دودسیل سولفات[۹] به عنوان دترجنت در ترکیب ژل، بافر سوبسترا و بافر الکتروفورز استفاده شد(۶). جهت تفکیک و جدا کردن پروتئین ها از ژل متراکم کننده و جداکننده با غلظت های ۳ و ۱۰ درصد بترتیب استفاده گردید. همچنین برای الکتروفورز فوق از جریان الکتریکی ثابت و شدت جریان ۳۰-۲۰ میلی آمپر استفاده شد. پس از خاتمه الکتروفورز جهت تثبیت پروتئین ها از اسید استیک ۳۰ درصد و از کوماسی بلو R-۲۵۰ جهت رنگ آمیزی ژل استفاده گردید. برای ظهور باندها از مخلوط متانول، اسید استیک گلاسیال و آب مقطر (۸:۱:۱) به عنوان رنگ بر استفاده شد(۱۹،۱۱).

تعیین غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم تریپسین

در ایـن مطالعـه غلظـت پروتئیـن نمونـه هـا مطابـق روش برادفورد اندازه گیری شـد و از آلبومین سـرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد اسـتفاده گردید. فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از بنزویل آرژنین پارا نیترو آنیلید[۱۰]) سوبسترای اختصاصی تریپسین مطابق روش Erlanger سنجیده شد(۲،۳).

نتایج

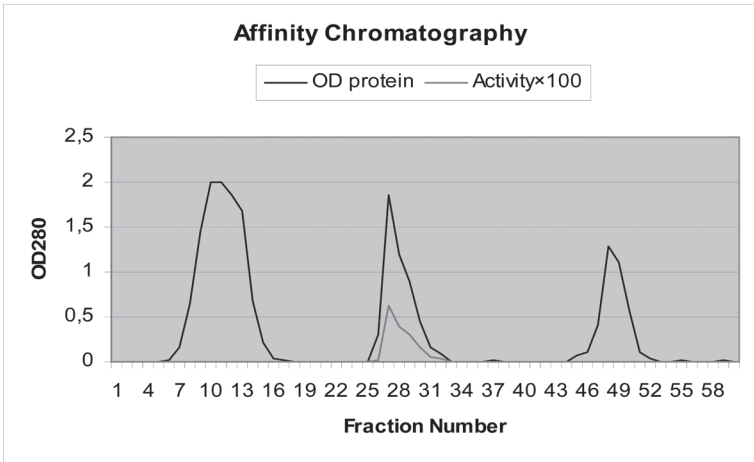
در شـکل ۱ نتایج حاصل از کروماتوگرافی تمایلـی پس از قرائت جذب فراکشـن ها در ۲۸۰ نانومتر و فعالیت آنزیم تریپسـین نشان داده شده است.

نتایج حاصـل از اندازه گیری غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم تریپسـین در مراحل مختلف اسـتخراج و تخلیص آنزیم تریپسین در جدول ۱ نشان داده شده است.

در جدول ۲ فعالیت ویژه، بازده[۱۱] و مرتبه تخلیص[۱۲] پس از محاسـبه نشـان داده شـده است. پس از بررسی های تکرارپذیر بودن نتایج آزمایشات، همان طوری که در جداول ۱ و ۲ مشـهود اسـت. با روش فوق می توان از هر کیلو گرم پانکراس گوسـاله عاری از بافت چربی، بطور متوسط ۲/۸ گرم تریپسین خالص با فعالیت ویژه (U/mg) ۱۵۵ استحصال کرد.

نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE آنزیم تریپسـین اسـتخراج شده توسط روش های ذکر شده در این مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از بررسـی میزان آنزیم اسـتحصال شده توسط روش kuintz نشـان دهنده این است که از هر کیلو گرم پانکراس تمیز شده بطور متوسط مـی توان ۸۲ گرم تریپسـین با فعالیـت ویژه (U/mg) ۲۰ بدسـت آورد. همچنیـن با اسـتفاده از روش Wilimowska از هـر کیلوگرم پانکراس تمیز شـده به طور متوسط ۱/۶ گرم تریپسین با فعالیت ویژه ۷۵ استحصال شـد. در صورتی که نتایج گواه از این دارند که با روش ارائه شده توسط این مطالعـه می توان از هر کیلو گرم پانکراس گوسـاله عـاری از بافت چربی، به طور متوسـط ۲/۸ گرم تریپسـین خالص با فعالیت ویژه (U/mg) ۱۵۵ استحصال کرد.



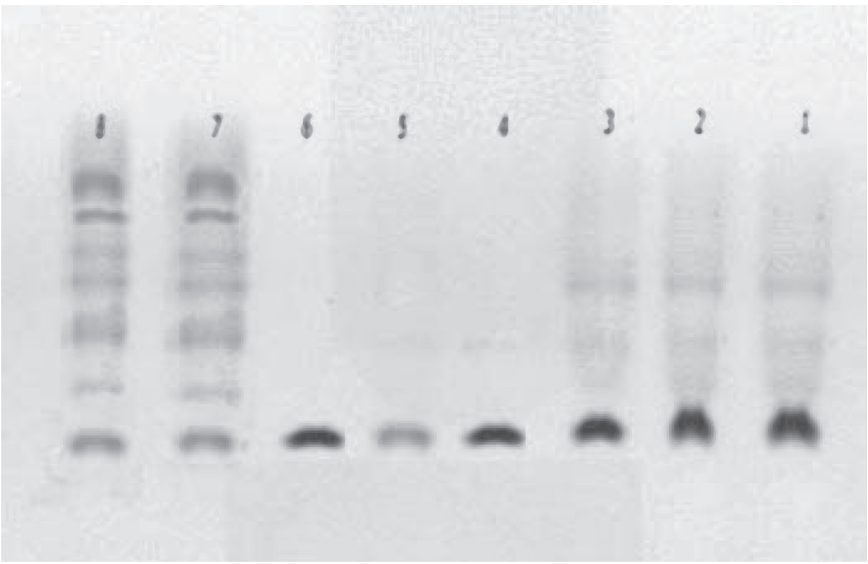
شکل ۱- نتایج قرائت جذب فراکشن های جمع آوری شده در ۲۸۰ نانومتر و فعالیت تریپسین در فراکشن ها پس از کروماتوگرافی تمایلی

جدول ۱- نتایج غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم تریپسین در مراحل مختلف استخراج

شماره	مرحله	حجم (ml)	پروتئین (mg/ml)	پروتئین کل (mg)	فعالیت (U/ml)	فعالیت کل (U)
۱	هضم اسیدی	۲۲۰۰	۲۰۳	۴۴۶۶۰۰	۷۵۶	۱۶۶۳۲۰۰
۲	رسوب دهی با سولفات آمونیم	۲۰۰	۴۴۷/۵	۸۹۵۰۰	۲۵۹۶	۱۲۹۸۰۰۰
۳	رسوب دهی با TCA	۱۰۰	۷۷	۷۷۰۰	۵۲۶۹	۵۲۶۹۰۰
۴	رسوب دهی با pH ایزوالکتریک	۱۱۰	۵۷	۶۲۷۰	۴۲۶۲	۴۶۸۸۲۰
۵	کروماتوگرافی تمایلی	۱۴	۲۰۱	۲۸۱۴	۳۱۱۴۰	۴۳۵۹۶۰

جدول ۲- نتایج حاصل از محاسبات فعالیت ویژه، درصد استحصال و مرتبه تخلیص تریپسین در مراحل مختلف استخراج

شماره	مرحله	فعالیت ویژه (U/mg)	بازده Yield ٪	مرتبه تخلیص (df)
۱	هضم اسیدی	۳/۷۲	۱۰۰	۱
۲	رسوب دهی با سولفات آمونیم	۱۴/۵۰	۷۸/۰۴	۳/۹۰
۳	رسوب دهی با TCA	۶۸/۴۳	۳۱/۶۸	۱۸/۴۰
۴	رسوب دهی با pH ایزوالکتریک	۷۴/۷۷	۲۸/۱۹	۲۰/۱۰
۵	کروماتوگرافی تمایلی	۱۵۴/۹۲	۲۶/۲۱	۴۱/۶۴



شکل۲- ۱، ۲ و ۳ نمونه های تریپسین استحصال شده با روش Wilimowska . ۴و۶ - نمونه های تریپسین تخلیص شده با روش این مطالعه. ۵ نمونه تریپسین کمپانی فلوکا. ۷و ۸ نمونه های تریپسین استحصال شده از روش kuintz

بحث

در اوایل دهه ۱۹۳۰ ، Kuintz برای اولین بار گزارش داد که با استفاده از روش رسوب دهی متوالی با سولفات آمونیوم و منیزیم موفق به تهیه تریپسین از پانکراس گوساله شده است (شماره ۵ منبع). اگرچه تریپسین استخراج شده، از فعالیت ویژه کمی برخوردار بود، ولی از آنجا که ترپسین در صنایع مختلف از جمله پمادهای التیام دهنده زخم ها و صنعت چرم سازی و دیگر صنایع کاربرد چشمگیری پیدا کرد، کار او نقطه شروعی بود برای تخلیص این آنزیم، بطوری که چند سال بعد Northrup با همکاری Kunitz موفق به کریستاله کردن آنزیم تریپسین شد (۱۳). اگرچه آنزیم کریستاله شده آنها بطور کامل خالص بود و فعالیت ویژه بسیار بالایی داشت، ولی میزان استحصال تریپسین توسط روش ارائه شده آنها بسیار اندک در حدود چندین میلی گرم از هر کیلوگرم پانکراس گوساله بود (۱۰، ۱۳).

با پیشرفت علم و تکنولوژی و افزایش چشمگیر مصرف تریپسین در صنایع مختلف، دردهه ۱۹۶۰ مقالات متعددی در ارتباط با روش های استخراج تریپسین و منابع آن منتشر شدند که می توان به استخراج تریپسین از پانکراس خوک (۵)، از پانکراس گوسفند و بز (۴،۳)، از سگ ماهی (۸) و از اسب (۷) اشاره کرد.

با وجود اهمیت تریپسین به عنوان یک ماده مکمل در صنایع مواد غذائی و همچنین به عنوان یک دارو در درمان بیماران پانکراتیک، تحقیقات گسترده ایی بر روی کینتیک آنزیم و بهینه کردن روش استخراج آن انجام شد بطوری که Wilimowska (۱۹۷۸) طی مقاله ایی عنوان کرد که طی دو مرحله هضم پانکراس و رسوب دهی با TCA و همچنین رسوب دهی با تغییرات pH می توان موفق به تخلیص نسبی تریپسین با بازده ۴ درصد شد. او با روش خود موفق به استحصال ۱/۵ گرم تریپسین از هر کیلو گرم پانکراس گوساله شد (۲۰).

Tub´ و همکارانش (۲۰۰۷) استفاده از پلی اتیلن گلیکول و تغییرات pH

در سیســتم های دو فازی مایع را روشی مناســب برای استخراج تریپسین و کیموتریپســین عنوان کردند (۱۸). در همان ســال محققین دیگر پس از رسوب دهی با سولفات آمونیوم، از تیمارهای حرارتی و ژل فیلتراسیون برای اســتخراج تریپسین استفاده کردند که موفق به استحصال تریپسین با بازده ۹ درصد شدند (۹).

در این مطالعه، با روشــی ســاده و کم هزینه موفق به استحصال مقدار ۲/۸ گرم تریپسین خالص با فعالیت ویژه(U/mg) ۱۵۵ از هر کیلو گرم پانکراس گوساله شدیم.

اســاس جداسازی و تخلیص تریپســین در این مطالعه بر پایه رفتار حلالیت پروتئیــن ها اســت. گروه های آب گریز روی ســطح مولکول پروتئین عامل مهمــی در تعیین رفتار حلالیت آن می باشــد. در واقع پایداری پروتئین ها در محلول توســط بر هم کنش های پروتئین - پروتئین، پروتئین - حلال و حلال - حلال تعیین می شوند که تغییر یکی از آنها می تواند حلالیت را به مقــدار زیادی کاهش دهد. از طرفی دیگــر حلال همواره پایه آبی دارد و لذا با تنظیم خــواص حلال آب می توان حلالیت پروتئین ها را تحت تاثیر قرار داد (۱). بنابراین پروتئین ها را می توان توسط عوامل رسوب دهنده متنوعی از جمله حلال های آبی، کاتیون های دوظرفیتی، گرما، اســید و باز (تنظیم pH یا رســوب دهــی ایزوالکتریک)، نمــک ها، پلیمرهای غیــر یونی (مثل پلی اتیلن گلیکول) و پلی الکترولیت ها رسوب داد. متداولترین روش استفاده از نمک های خنثی است که باعث رسوب دهی انتخابی پروتئین ها می شود. در غلظت های بالای نمک، مولکول های پروتئین و نمک برای آبگیری با هم رقابت می کنند، این رقابت ها واکنش پروتئین - پروتئین و عمدتاً واکنش های بین نواحی آب گریز روی ســطح مولکول های پروتئین مجاور هم را افزایش می دهد که این امر بتدریج باعث رسوب دهی پروتئین ها می شود(۱).

نتایج این مطالعه نشــان می دهد که در مرحله رسوب دهی با TCA قریب به ۴۲ درصد از آنزیم اولیه حذف شده است. بعبارت دیگر پس از این مرحله فعالیــت کل از ۱۲۹۸۰۰۰ واحد به ۵۲۶۹۰۰ واحد رســیده اســت. در نگاه اول تصور بر این اســت که مرحله ایی که در آن حدود ۶۰ درصد تریپسین حذف می شــود، نباید مرحله مناســبی باشــد. ولی باید به این نکته توجه داشــته باشیم که پانکراس علاوه بر تریپســین حاوی مقادیر قابل توجهی از آنزیم ها و پروتئین های دیگر از جمله ریبونوکلئاز و آلفا یک آنتی تریپسین می باشــد. از آنجا که آلفا یک آنتی تریپســین یک مهــار کننده قوی برای تریپســین و ســایر ســرین پروتئازهای موجــود در پانکراس اســت، منجر بــه کاهش شــدید فعالیــت و تداخل با تریپســین می گــردد. طی مرحله رســوب دهی با TCA، تریپســین موجود در پانکراس رسوب داده می شود ولی ریبونوکلئاز و آلفا یک آنتی تریپســین در فاز محلول باقی می مانند که طی روش ارائه شده توسط Wilimowska قابل استحصال می باشند.

نتایــج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE نشــان می دهد که تریپســین خالص شــده با روش این مطالعه کاملا خالص و عــاری از هر گونه پروتئین دیگر می باشــد. اگرچه ترپسین خالص شــده با روش Wilimowska از خلوص بیشــتری نسبت به تریپســین روش kuintz برخوردار است. ولی همان طوری که در شکل ۲ مشهود است نسبت به تریپسین استخراج شده با روش ارائه شده خلوص کمتری دارد.

در مجمــوع نتایــج محققین مختلف نشــان می دهد که بهترین و مناســب تریــن منبع اســتحصال تریپســین جهــت اســتفاده در صنایــع مختلف و آزمایشگاه ها، تریپسین پانکراس گوساله و خوک می باشد. با توجه به عدم پرورش خوک در کشورهای اسلامی نظیر ایران، پانکراس گوساله می تواند به عنوان ارزان ترین و مناسب ترین منبع برای تریپسین باشد. همچنین روش استفاده شده در این مطالعه می تواند روشی مناسب برای تولید تریپسین باشد.

پاورقی ها

1- Level of purification (df)
2- Bating
3- Deswelling
4- p-Aminobenzamidine-Agarose
5- Sample buffer
6- Binding buffer
7- Elution Buffer
8- Loading
9- Elution
10- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
11- Benzoyl-DL-Arginine- Para-Nitroa-Anilin (BAPNA)
12- Yield

منابع مورد استفاده

1- Bond, J.S. (1989) *Commercially Available Proteases*, Appendix II. In: Proteolytic Enzymes, A Practical Approach. R.J. Beynon and J.S. Bond, eds., IRL Press, Oxford, U.K.

2- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248– 254.

3- Bricteux, S., Gregoire, G. (1966) Study of trypsinogen and trypsin of sheep pancreas. *BBA*. 127: 277-281.

4- Bricteux, S., Gregoire, G. (1968) Study of trypsinogen and trypsin of goat pancreas. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 76: 571-74.

5- Charles, M. (1963) Extraction and characterization of trypsin from pig pancreas. *BBA*. 69: 115- 121.

6- Erlanager,B., Kokowsky,N., Cohen,W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic stubstrates of trypsin. *Arch Biochem. Biophys*. 95: 271-77.

7- Harvis, I., Hofmann, T. (1969) Isolation and characterization of trypsin from horse pancreas. *Biochim*. J. 114: 82 P.

8- Haynes, R., Winter, W.P. (1968) *Purification and characterization of gar (Dog- Fish) trypsin.* BBA. Personal communication.

9- Jellouli,K., Bougatef,A., Daassi,D., Balti,R., Barkia,A., Nasri,M. (2009) New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. *Food Chemistry* 116: 644–650.

10- Kunitz,M., and Northrop,J. (1936) Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor and an inhibitor-

trypsin compound. *J Gen Physiol.* 19: 991-98.
11- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
12- Layne, E. (1957) Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology* 3: 447-455.
13- Northrop,J., Kunitz,M. (1932) Crystalline trypsin. I. Isolation and tests of Purity. *J Gen Physiol*. 16: 267-75.
14- Polgár,L. (2005) The catalytic triad of serine peptidases. Cell. Mol. *Life Sci*. 62: 2161–72.
15- Rawlings ND, Barrett A.J. (1994) Families of serine peptidases". *Meth. Enzymol*. 244: 19–61.
16- Rice,R.H. (1977) Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation. *Biochem. Biophys. Acta*. 492: 316–21.
17- Stoscheck, CM. (1990) Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69.
18- Tub G., Nerli B., Pic´G. (2007) Partitioning features of bovine trypsin and chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography* B. 852: 244–249.
19- Walker J.M. (1996) *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins.* In the protein protocols hand book. Humana Press. Oxford, U.K, pp28-47.
20- Wilimowska,A., (1978) A simple method for purification trypsin, *Analytical Biochemistry*. 90: 816-20.
21- Wilkinson, J.M. (1986) *Fragmentation of Polypeptides by Enzymic Methods.* I Practical Protein Chemistry: A Handbook. A. Darbre, ed., John Wiley and Sons, New York, N.Y.
22- Woodard,S., Mayor,J., Bailey,M., Barker,D., Love,R.J. (2003) Applications of Proteolytic Enzymes in industrials. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 38: 123-139.