زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1392

بهبود جداسازی غشای ارغوانی حاوی باکتریورودوپسین از *هالوباکتریوم سالیناریوم*

پریسا قاسمی[1]، رسول خلیل زاده[2*]، محمدرضا معصومیان[3]

1- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
2- استادیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
3- پژوهشیار شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

*** تهران، صندوق پستی 1774- 15875**
khalilzadeh_ r2000@yahoo.com
(دریافت مقاله: 92/10/22 پذیرش مقاله: 93/11/5)

چکیده - امروزه مواد زیستی، کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف پیدا کرده است. در این راستا مولکول‌های زیستی با قابلیت‌های مختلف شناسایی شده‌اند که یکی از آنها باکتریورودوپسین است. باکتریورودوپسین در غشای ارغوانی *هالوباکتریوم سالیناریوم* یافت می‌شود. باکتریورودوپسین به دلیل پایداری و خواص مختلف آن از جمله خاصیت پمپ پروتونی، کاربردهای زیادی در صنایع مختلف دارد. یکی از مهم ترین مراحل تولید صنعتی و نیمه صنعتی باکتریورودوپسین، جداسازی و خالص‌سازی غشای ارغوانی است. در این پژوهش پس از کشت *هالوباکتریوم سالیناریوم*، جداسازی باکتریورودوپسین بر اساس روش یوسل انجام شد. برای تولید باکتریورودوپسین در مقیاس نیمه صنعتی، روش بهبود یافته با جایگزینی روش مکانیکی به جای روش آنزیمی برای تخریب DNA و استفاده از شوک اسمزی به جای عمل دیالیز طراحی و اجرا شد؛ این روش منجر به کاهش زمان و هزینه جداسازی نسبت به روش یوسل گردید. نتایج حاصل از روش بهبود یافته با روش یوسل مقایسه شد. میزان آلودگی غشای ارغوانی به DNA در هر دو روش زیر 5 درصد برآورد شد. درصد خلوص برای روش بهبود یافته، 67±1 و برای روش یوسل 68±4 درصد محاسبه شد که نشان‌دهنده خلوص برابر برای هر دو روش است. میزان باکتریورودوپسین برای روش بهبود یافته به ازای هر لیتر کشت برابر 8/2±0/4 میلی‌گرم و برای روش یوسل 8/1±0/6 میلی‌گرم به‌دست آمد. سنجش میزان فعالیت به روش کویاما نشان داد که برای هر دو روش با مقدار برابر باکتریورودوپسین، تغییر pH به اندازه 1 واحد است. بنابراین روش بهبود یافته در این پژوهش توانسته است با حفظ خصوصیات باکتریورودوپسین زمان و هزینه جداسازی را کاهش دهد.

کلیدواژگان: *هالوباکتریوم سالیناریوم*، غشای ارغوانی، باکتریورودوپسین، پمپ پروتون.

1- مقدمه

هالوباکتریوم سالیناریوم[1] یک آرکئی هوازی، گرم منفی و فوق‌العاده نمک‌دوست[2] است؛ و در شوره‌زارها و نمک‌زارها یافت می‌شود. سطح *هالوباکتریوم سالیناروم*

1. *Halobacterium Salinarium*

2. Halophilic Bacteria

شامل مسیرهای غشایی است که غشای ارغوانی[1] (PM)، نامیده می‌شود. مهم‌ترین پروتئین موجود در غشای ارغوانی باکتریورودوپسین[2] (BR) است. باکتریورودوپسین بهترین پروتئین مطالعه شده در آرکئی باکتری‌هایی است که به طور طبیعی تحت شرایط نوردهی و هوادهی پایین رشد می‌کنند. این پروتئین یک پروتئین غشایی است که دارای هفت هلیکس موجود در عرض غشاست[3]؛ و وزن مولکولی آن 26/8kDa است [2،1].

باکتریورودوپسین در دو دهه اخیر به عنوان یک ماده برای کاربردهای تکنیکی به کار رفته است. خصوصیات فوتوالکتریک، فوتوکرومیک و انتقال پروتون آن به کاربردهای جالبی در صنایع الکتریکی- اپتیکی، نانوتکنولوژی، بیوتکنولوژی، شیمیایی و پزشکی منجر شده است [3]. برای این هدف لازم است که مقدار زیادی از این پروتئین در دسترس باشد. بنابراین رسیدن به مقدار فراوان و خالص از این پروتئین مورد نیاز است.

از آنجایی که تفاوت‌های فیزیکی بین غشای ارغوانی و قطعات غشایی آلوده کننده *هالوباکتریوم سالیناریوم* که حاوی باکتریورودوپسین نیستند کم است؛ بنابراین جداسازی غشای ارغوانی از آلودگی‌ها مسأله مورد توجهی است. در اطراف باکتریورودوپسین موجود در این غشا آلودگی‌های لیپیدی و نمکی و قطعات غشایی حاوی باکتریوروبرین مشاهده می‌شود؛ که برای استفاده کاربردی از این پروتئین، باید این آلودگی‌ها حذف شوند. باکتریوروبرین[4] که یک کاروتینوئید 50 کربنه است، در غشای سلول حضور دارد و موجب ایجاد رنگ صورتی یا قرمز می‌شود. نقش باکتریوروبرین حفاظت سلول از صدمات ناشی از UV است. در نتیجه مسأله خالص‌سازی باکتریورودوپسین امر مهمی است [5،4]. تاکنون روش-های مختلفی برای جداسازی PM صورت گرفته است.

1. Purple Membrane
2. Bacteriorhodopsin (BR)
3. Trans Membrane
4. Bacterioruberin

روش التراسانتریفیوژ همراه با گرادیان ساکارز، کروماتوگرافی، سانتریفیوژ همراه با دیالیز و روش‌های دوفازی همراه با التراسانتریفیوژ، تاکنون روش‌هایی بوده‌اند که برای جداسازی PM استفاده شده‌اند [8-6،4]. استفاده از التراسانتریفیوژ جزء روش‌های آزمایشگاهی گران قیمت است؛ و استفاده از این دستگاه در حجم‌های صنعتی و نیمه صنعتی مقرون به صرف هزینه زیادی است. بنابراین در این پژوهش روش یوسل که از سانتریفیوژ معمولی همراه با دیالیز برای جداسازی PM استفاه کرده بود به عنوان روش پایه انتخاب شد؛ همچنین روش بهبود یافته در این پژوهش برای کاهش زمان و هزینه تخلیص در حجم های صنعتی و نیمه صنعتی بر پایه آن طراحی شد. در روش بهبود یافته برای تخریب دیواره سلولی از شوک اسمزی به جای عمل دیالیز که مستلزم صرف زمان زیادی است؛ استفاده شد. همچنین در این روش برای تخریب رشته‌های DNA آزاد شده ناشی از تجزیه سلولی، روش مکانیکی جایگزین روش آنزیمی تخریب DNA شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد و دستگاه

باکتری *هالوباکتریوم سالیناریوم* سویه *R1* از بانک میکروبی آلمان[5] (DSMZ) با کد 671، آنزیم DNase از شرکت سیگما و سانتریفیوژ 30KS از شرکت سیگما خریداری شدند.

2-2- کشت *هالوباکتریوم سالیناریوم*

از *هالوباکتریوم سالیناریوم* سویه *R1* برای تخلیص و جداسازی استفاده شد؛ زیرا فاقد واکوئل‌های گازی است و مشکل حذف واکوئل گازی طی فرایند جداسازی وجود ندارد [4].

5. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

برای کشت باکتری ابتدا محیط کشت اختصاصی *هالوباکتریوم سالیناریوم* (HS) تهیه شد. محیط کشت HS حاوی:

250g NaCl, 20g $MgSO_4.2H_2O$, 3/64g trisodium citrate $3.H_2O$, 2g KCl and 10g bacteriological peptone L-37

می‌باشد. pH محیط کشت روی 7 تنظیم و پس از استریل شدن، باکتری داخل محیط کشت تلقیح شد؛ سپس به یک شیکر انکوباتور با دمای 39 درجه سلسیوس، دور 150rpm و نور مهتابی با شدت 6300 لوکس منتقل شد [4].

2-3- جداسازی غشای ارغوانی حاوی باکتریورودوپسین

2-3-1- روش یوسل

محتویات کشت *هالوباکتریوم سالیناریوم* به حجم یک لیتر با دور 12000g به مدت 20 دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در 20 میلی‌لیتر محیط کشت پایه نمکی به حالت تعلیق درآمد. تعلیق سلولی در دمای 20°C به حالت ساکن زیر نور ملایم مهتابی به مدت یک شب قرار داده شد. سپس 300 میکرولیتر از محلول آنزیمی DNase به آن افزوده شد. تعلیق سلولی تهیه شده داخل کسیه دیالیز که از قبل آماده شده بود ریخته شد. کیسه دیالیز درون بشر 2 لیتری حاوی 0/1NaCl مولار قرار گرفت. بشر بر روی همزن در دمای 4°C به مدت 3 روز قرار داده شد و بافر آن طی این مدت سه بار تعویض گردید. در پایان دیالیز، محتویات درون کیسه دیالیز داخل فالکون ریخته شده و در دمای 4°C به مدت 20 دقیقه و دور 2500g سانتریفیوژ شد. محلول رویی در دمای 4°C به مدت 60 دقیقه و با دور 38000 g سانتریفیوژ شد. محلول رویی که حاوی باکتریوروبرین است دور ریخته شد و رسوب ارغوانی رنگ با 0/1NaCl مولار چندین بار تحت شرایط مرحله قبل شستشو داده شد. عمل شستشو تا جایی صورت گرفت که محلول رویی بی‌رنگ و رسوب ارغوانی رنگ جدا شد. سپس رسوب حاصل در آب مقطر استریل حل و در دمای 20°C- نگه‌داری شد.

2-3-2- روش بهبود یافته

محتویات کشت با دور 12000g به مدت 20 دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. رسوبات به وسیله 20 میلی‌لیتر آب مقطر به شکل تعلیق تبدیل و به داخل یک فالکون 50 میلی‌لیتری منتقل شد. فالکون حاوی تعلیق سلولی در یک شیکر انکوباتور یخچال‌دار قرار گرفت و با دور 180rpm، دمای 4°C به مدت 48 ساعت همزده شد. تعلیق حاصل برای جداسازی قطعات لیز نشده سلولی در دمای 4°C به مدت 20 دقیقه و دور 2500g سانتریفیوژ شد. رسوب ته فالکون دور ریخته شد و محلول رویی حاوی PM، باکتریوروبرین و دیگر آلودگی‌ها برای مراحل بعد نگهداری شد. محلول رویی قرمز رنگ برای جداسازی باکتریوروبرین و دیگر ناخالصی‌ها در دمای 4°C به مدت 60 دقیقه و با دور 38,000g سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاوی باکتریوروبرین دور ریخته شد. این کار تا جایی ادامه یافت که محلول رویی بی رنگ یا کمرنگ شد. رسوبات ارغوانی جمع‌آوری و در آب مقطر استریل تعلیق و در دمای 20°C- نگهداری شد. از روش یوسل و همکاران نیز برای تخلیص استفاده شده [8] و نتایج حاصل از آن با روش ارائه شده در این پژوهش مقایسه شد.

2-4- محاسبه مقدار باکتریورودوپسین و سایر پروتئین‌های موجود در غشای ارغوانی

مقدار غشای ارغوانی جداسازی شده به وسیله روش اسپکتروفتومتری بیر- لامبرت محاسبه شد. به علت وضعیت چند شکلی باکتریورودوپسین، مقدار ضریب خاموشی[1] یا ε در طول موج‌های مختلف، متفاوت است.

1. Extention Cofficient

مقدار ε در طول موج‌های 280، 568 و 570 به ترتیب برابر (65000، 62800 و 63000) محاسبه شده است [8،6]. از رابطه (1) برای محاسبه مقدار باکتریورودوپسین استفاده شد [9].

$$C_{BR} = (A_{570nm}/\varepsilon_{br}.L) \times Mr_{br} \quad (1)$$

ε_{br} ضریب خاموشی باکتریورودوپسین در 570 نانومتر، L طول مسیر اسپکتروفتومتر نانودراپ و Mr_{br} وزن مولکولی باکتریورودوپسین است؛ که به ترتیب برابر $63000 l.mol^{-1}.cm^{-1}$ ، 1cm و $26800\ g.mol^{-1}$ می‌باشد.

با توجه به اینکه حدود 75 درصد غشای ارغوانی باکتریورودوپسین و 25 درصد آن لیپید می‌باشد مقدار غلظت غشای ارغوانی C_{PM} محاسبه شد. غلظت پروتئین کل از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [10]. غلظت پروتئین‌های همراه غشای ارغوانی به جز باکتریورودوپسین طبق رابطه 2 با تفاضل غلظت باکتریورودوپسین محاسبه شده از رابطه (2) از غلظت پروتئین حاصل با روش برادفورد محاسبه شد.

$$C=C_{bradford}- C_{Beer-Lambert} \quad (2)$$

C غلظت پروتئین‌های همراه باکتریورودوپسین؛ $C_{bradford}$ غلظت کل پروتئین و $C_{Beer-Lambert}$ غلظت پروتئین باکتریورودوپسین است.

2-5- میزان آلودگی PM به DNA

پس از تجزیه سلولی، رشته‌های DNA آزاد می‌شوند. این رشته‌ها به عنوان یک آلودگی محسوب شده و در طول تخلیص باید حذف شوند [7]. با محاسبه نسبت جذب 260 به 280 نانومتر ($A_{260}\backslash A_{280}$) و استفاده از نمودار پروتئین-اسید نوکلئوئیک، میزان آلودگی غشای ارغوانی به DNA مشخص شد [9].

2-6- نحوه محاسبه خلوص BR

برای محاسبه درصد خلوص باکتریورودوپسین از میزان جذب در طول موج‌های 280 و 560 استفاده شد. درصد خلوص از رابطه (3) محاسبه شد:

$$BRpurity(\%)=\frac{(A560/A280)}{0/5}\times 100 \quad (3)$$

جذب در طول موج 280 نانومتر مربوط به کل پروتئین‌ها و طول موج 560 نانومتر مربوط به جذب باکتریورودوپسین است [7]. همچنین از روش الکتروفورز SDS-PAGE 15% نیز برای تعیین میزان خلوص استفاده شد.

2-7- محاسبه فعالیت باکتریورودوپسین به روش تیمار با اسید ضعیف

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت باکتریورودوپسین داخل غشای ارغوانی، 0/5 میلی‌گرم از غشای ارغوانی با سونیکاسیون به صورت ویزیکول در آمد. ویزیکول‌ها با یک اسید ضعیف با pH=3/5-4 به مدت 1 ساعت تیمار شدند و در معرض نوردهی قرار گرفتند و تغییرات pH آن ثبت شد [11].

3- نتایج

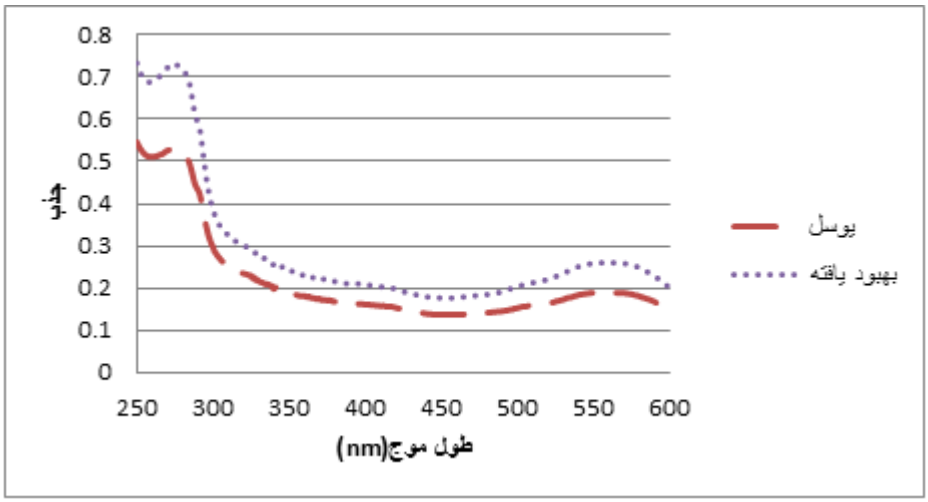
3-1- جداسازی غشای ارغوانی

یک لیتر کشت باکتری *هالوباکتریوم سالیناریوم* با OD_{660}=1/9 در 12000g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد؛ و سلول حاصل برای جداسازی غشای ارغوانی به وسیله روش یوسل و روش بهبود یافته استفاده شد.

3-2- طیف سنجی غشای ارغوانی

پس از اتمام جداسازی برای تعیین میزان خلوص از روش طیف‌سنجی استفاده شد و جذب نوری در نواحی مختلف طیفی اندازه‌گیری و نمودار مربوط رسم شد (شکل 1).

نمودار جذب حاصل از طیف سنجی غشای ارغوانی نشان می‌دهد که بیشینه جذب برای غشای ارغوانی در طول موج 280 و 560 نانومتر رخ می‌دهد. جذب در طول موج 280 نانومتر مربوط به کل پروتئین‌ها و 560 نانومتر مربوط به باکتریورودوپسین است.



شکل 1 نمودار طیف سنجی غشای ارغوانی در دمای محیط و طول نانودراپ 1 سانتی متر

جذب 260 نانومتر مربوط به جذب اسیدهای نوکلئوئیک است؛ هرچه نسبت جذب در 260 نانومتر به جذب 280 نانومتر کمتر از 1 باشد درصد آلودگی به DNA کمتر است. جذب‌های مربوط به طول موج‌های 470 و 498 نانومتر مربوط به آلودگی باکتریوروبرین است [5]، که هرچه این اعداد کوچکتر باشد میزان آلودگی به باکتریوروبرین کمتر است.

3-2-1- تعیین غلظت باکتریورودوپسین

پس از استخراج داده‌های حاصل از اسپکتوفتومتر، غلظت باکتریوردوپسین و غشای ارغوانی طبق رابطه 2 محاسبه شد. نتایج در جدول 1 آورده شده است. سلول *هالوباکتریوم سالیناریوم* علاوه بر باکتریورودوپسین سه پروتئین دیگر متصل به رتینال به نام‌های هالورودوپسین، سنسوری ردوپسین و فوبورردوپسن دارد، بنابراین هنگام تخلیص باکتریورودوپسین ممکن است مقادیری از این پروتئین‌ها نیز همراه غشای ارغوانی باشند که آلودگی پروتئینی محسوب می‌شوند [12].

مقایسه داده‌های جدول 1 برای باکتریورودوپسین نشان می‌دهد که غلظت باکتریورودوپسین برای هر دو روش تقریباً نزدیک به‌هم‌اند؛ یعنی بازیافت پروتئین برابری را نشان می‌دهند. تفاوت‌های جزئی مشاهده شده بخشی می‌تواند مربوط به از دست رفتن باکتریورودوپسین هنگام جداسازی رسوب از محلول رویی باشد [7].

جدول 1 نتایج حاصل از تعیین غلظت باکتریورودوپسین، غشای ارغوانی و پروتئین کل در دمای آزمایشگاه

	روش یوسل (mg/l)	روش بهبود یافته (mg/l)
باکتریورودوپسین	8/1±0/6	8/2±0/4
غشای ارغوانی	10/8±0/8	10/9±0/5
پروتئین کل	13/1±0/2	13/6±0/2
آلودگی پروتئینی	5±0/8	5/4±0/6

داده‌های حاصل از برادفورد نشان دهنده مقدار کل پروتئین است. با مقایسه این مقادیر با مقادیر به‌دست آمده برای غلظت باکتریورودوپسین مقدار و درصد حضور پروتئین‌های دیگر قابل مقایسه است. با توجه به جدول 1 می‌توان مقدار حضور پروتئین‌های دیگر را همراه باکتریورودوپسین تخلیص شده مشاهده کرد. پروتئین‌های همراه باکتریورودوپسین ناخالصی محسوب شده و درصد خلوص را پایین می‌آورند. با مقایسه درصد ناخالصی به پروتئین‌های دیگر برای هر دو روش مشاهده می‌شود که

ناخالصی به پروتئین‌های دیگر برای روش یوسل و روش بهبود یافته تقریباً نزدیک به‌هم است.

3-2-2- سنجش میزان آلودگی غشای ارغوانی به DNA

با آزاد شدن رشته‌های طویل DNA گرانروی محلول بالا رفته و جداسازی را با مشکل رو به رو می‌کند به همین دلیل لازم است تا رشته‌های DNA به قطعات کوچکتر هیدرولیز شود. رشته‌های DNA به روش آنزیمی، شیمیایی و روش مکانیکی قابل تخریب‌اند. در روش یوسل از روش آنزیمی برای هیدرولیز DNA استفاده می‌شود و آنزیم مورد استفاده DNase می‌باشد. این آنزیم رشته‌های DNA را در موقعیت داخلی برش می‌دهد [13]. در حالی که در روش بهبود یافته از روش مکانیکی برای تخریب DNA استفاده شده است. در روش بهبود یافته رشته‌های DNA در اثر تنش مکانیکی ایجاد شده به وسیله همزدن مکانیکی[1] تخریب می‌شوند [15،14]. میزان آلودگی غشای ارغوانی به DNA با اندازه‌گیری نسبت جذب 260 به 280 نانومتر و استفاده از نمودار مربوط به میزان آلودگی پروتئین، محاسبه می‌شود. نتایج در جدول 2 آورده شده است.

جدول 2 نتایج حاصل از درصد آلودگی غشای ارغوانی به DNA

	روش یوسل (روش آنزیمی)	روش بهبود یافته (روش مکانیکی)
A_{260}/A_{280}	~0/96	~0/98
درصد آلودگی (%)	<5	<5

با بررسی نتایج به‌دست آمده از جدول 2 مشاهده می‌شود که درصد آلودگی غشای ارغوانی به DNA در روش آنزیمی نسبت به روش مکانیکی قدری کمتر است (هرچه نسبت A_{260}/A_{280} کمتر باشد، میزان آلودگی به اسید نوکلئوئیک کمتر خواهد بود). با این حال درصد آلودگی برای هر دو روش کمتر از 5% می‌باشد.

3-2-3- تعیین خلوص باکتریورودوپسین با روش اسپکتروفتومتری

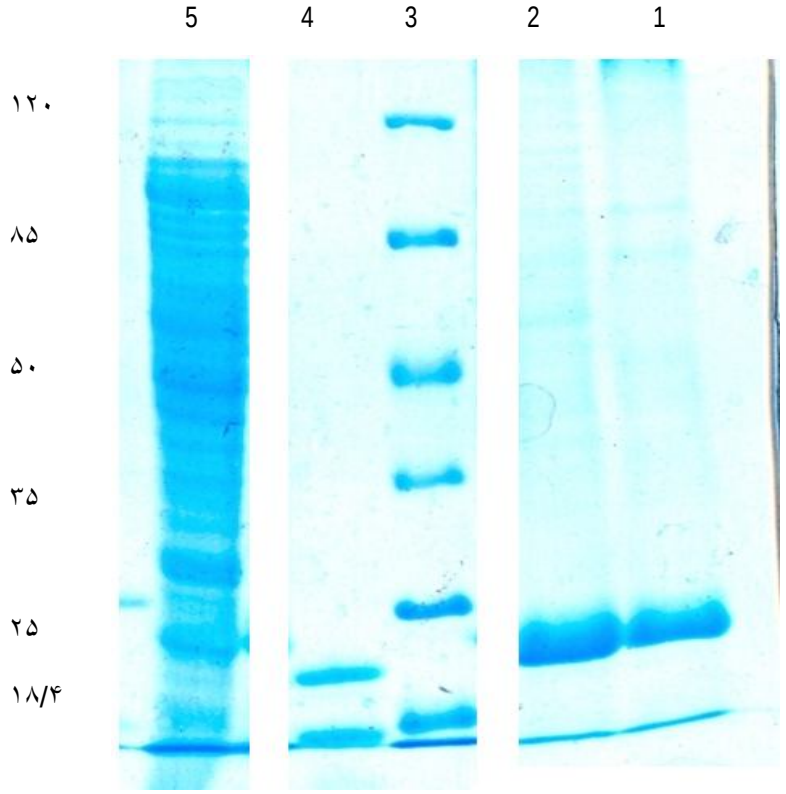
با مشخص شدن مقادیر جذب در 280 و 560 نانومتر و استفاده از رابطه 3 درصد خلوص باکتریورودوپسین محاسبه شد. درصد خلوص برای روش یوسل 4±68 و برای روش بهبود یافته مقدار 1±67 حاصل شد. درصد خلوص‌های محاسبه شده برای هردو روش تقریباً در یک بازه قرار گرفته است که بیانگر خلوص برابر برای هر دو روش است. پس از جداسازی غشای ارغوانی برای تعیین میزان خلوص غشای ارغوانی تخلیص شده برای هر دو روش از الکتروفورز استفاده شده است. برای این منظور 20 میکرولیتر محلول پروتئینی با 20 میکرولیتر بافر نمونه مخلوط شده و 30 میکرولیتر از آن برای ژل استفاده شد (شکل 3).

با توجه به شکل 3 و مقایسه باندهای ظاهر شده برای هر کدام از روش‌ها واضح است که پهنای باندهای ظاهر شده برای هر دو روش و تعداد باندهای ناخالصی آنها نیز یکسان است. بنابراین تخلیص به هر دو روش به طور تقریبی میزان خلوص یکسانی را نشان می‌دهد.

3-3- نتایج تعیین فعالیت غشای ارغوانی

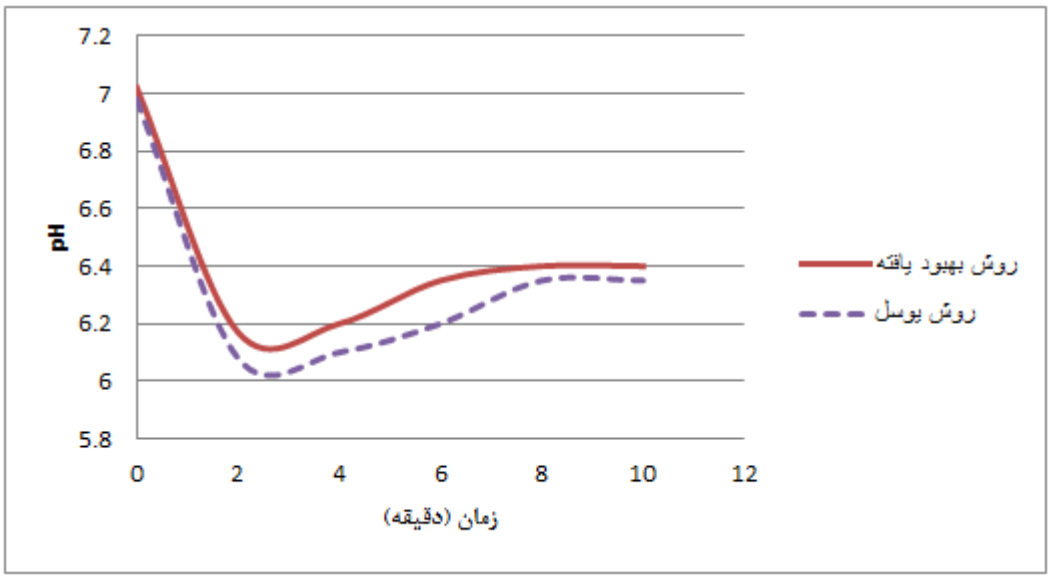
در این تحقیق برای اثبات فعالیت غشای ارغوانی از روش کویاما و همکاران استفاده شد [11]؛ که در طی آن غشای ارغوانی تخلیص شده که به صورت تکه‌های غشایی‌اند؛ ابتدا وزیکوله شده، (تبدیل بسته‌های غشایی) سپس به صورت تیمار با اسید ضعیف مورد پایش قرار گرفتند. با توجه به محدودیت وجود باکتریورودوپسین، 0/5 میلی‌گرم از باکتریورودوپسین تولید شده برای هر کدام از روش‌ها تهیه و پایش انجام و مقایسه گردید. نتایج حاصل از این سنجش در شکل 4 نشان داده شده است.

1. Shaking



شکل 3 ژل الکتروفورز برای تعیین میزان خلوص باکتریورودوپسین

1: روش یوسل، 2: روش بهبود یافته، 3: مارکر وزن مولکولی، 4: باکتریورودوپسین استاندارد، 5: سلول اولیه



شکل 4 نمودار تغییرات pH غشای ارغوانی با استفاده از تیمار اسید ضعیف در دمای محیط

پس از وزیکوله کردن غشای ارغوانی حاصل شده، سنجش میزان فعالیت صورت گرفت. در حقیقت منبع

پروتون آب درون وزیکول‌های غشای ارغوانی است. هنگامی که نور به این وزیکول‌ها تابیده می‌شود، H^+ حاصل از تجزیه آب به محیط بیرون پمپ شده و OH^- داخل وزیکول‌ها باقی‌مانده و pH درونی افزایش پیدا می‌کند، کاتیون‌های دو ظرفیتی منیزیم با OH^- درون ویزیکول‌ها واکنش داده و pH آن را کاهش می‌دهد. pH درونی یک فاکتور مهم در محاسبه فعالیت باکتریورودوپسین است؛ زیرا با افزایش pH درونی به بیش از10 باکتریورودوپسین فعالیت خود را از دست می‌دهد. بنابراین این کاتیون دو ظرفیتی مانند یک بافر در مقابل افزایش pH درونی عمل می‌کند و تغییر pH بیرونی ناشی از نور را افزایش می‌دهد [11].

همان‌طور که در شکل 4 دیده می‌شود در همان دقایق اول پس از اضافه کردن غشای ارغوانی وزیکوله شده همراه با تیمار اسیدی یک تغییر pH شدید رخ می‌دهد. پس از خاموش کردن لامپ، pH دوباره افزایش پیدا می‌کند. بررسی‌های کویاما نشان داد که در این حالت بیشترین تغییر pH، 3/5 واحد است [11]. در پژوهش حاضر مقدار غشای ارغوانی استفاده شده تقریباً 5 برابر کمتر از مقدار بکار رفته به وسیله کویاما و همکاران بوده است. شکل 4 نشان می‌دهد، تغییرات pH هر کدام از روش‌ها نزدیک 1 است؛ که نشان از فعالیت باکتریورودوپسین تخلیص شده دارد و فعالیت غشای ارغوانی حاصل از هر دو روش در یک محدوده می‌باشد.

4- بحث و نتیجه‌گیری

اولین گام در جداسازی غشای ارغوانی، شکست دیواره *هالوباکتریوم سالیناریوم* و آزاد سازی مواد درون سلولی است. از آنجایی که *هالوباکتریوم سالیناریوم* در غلظت‌های نمک کمتر از چهار مولار تجزیه می‌شود؛ بنابراین در این پژوهش از آب مقطر برای لیز سلولی استفاده شده است. در روش یوسل از کاهش تدریجی غلظت نمک با استفاده از دیالیز و تعویض بافر برای لیز سلولی استفاده شده است؛ اما در این پژوهش با تعلیق سلول در آب مقطر و ایجاد گرادیان شدید اسمزی در دو طرف دیواره، لیز سلولی و آزادسازی مواد درون سلولی صورت گرفته است. استفاده از کیسه دیالیز زمان‌بر بوده و در حجم‌های بالاتر نیاز به اولترافیلتراسیون و صرف زمان و هزینه بیشتری دارد.

اسیدهای نوکلئوئیک (DNA)، از موادی محسوب می‌شوند که پس از تجزیه و پاره شدن دیواره سلول به محیط رها می‌شوند. رشته‌های طویل DNA، به افزایش گرانرولی محلول منجر شده و کار جداسازی غشای ارغوانی را با مشکل رو به رو می‌کنند؛ بنابراین گام بعدی در جداسازی غشای ارغوانی تخریب رشته‌های DNA است. رشته‌های DNA، به روش‌های آنزیمی، شیمیایی و مکانیکی قابل تخریب‌اند. در روش یوسل از آنزیم DNase برای تخریب استفاده شده است؛ تهیه این آنزیم در حجم‌های صنعتی و نیمه صنعتی مستلزم صرف هزینه است. از آنجا که رشته‌های DNA نسبت به تنش حساس‌اند؛ در این پژوهش از روش هم‌زدن مکانیکی برای تخریب رشته‌های DNA استفاده شده است. در این مطالعه بررسی نتایج میزان آلودگی پروتئین به اسیدهای نوکلئوئیک نشان داد که درصد آلودگی پروتئین به DNA برای هر دو روش آنزیمی و مکانیکی زیر 5 درصد است. از آنجا که استفاده از آنزیم DNase، در حجم‌های بالا مستلزم صرف هزینه زیادی است؛ بنابراین در روش بهبود یافته از روش مکانیکی به جای روش آنزیمی برای حذف DNA استفاده شده است.

در این پژوهش، پس از تجزیه سلولی، تخریب DNA و آزادسازی مواد درون سلولی از یک سانتریفیوژ معمولی و بادور 38000g برای حذف آلودگی‌های همراه غشای ارغوانی استفاده شده است. روش‌های اولتراسانتریفیوژ و کروماتوگرفی انجام شده تا به امروز درصد خلوص

بالاتری نسبت به روش ارائه شده در این پژوهش دارند؛ اما اولتراسانتریفیوژ و دستگاه کروماتوگرافی جزء دستگاه‌های آزمایشگاهی گران قیمت‌اند و تهیه این دستگاه‌ها به سادگی میسر نیست. در روش ارائه شده در این پژوهش از یک سانتریفیوژ معمولی برای حذف آلودگی‌ها استفاده شده است و درصد خلوص قابل قبولی برای استفاده‌های کاربردی ارائه داده است.

با توجه به نتایج این پژوهش غلظت باکتریورودوپسین محاسبه شده برای روش یوسل و برای روش بهبود یافته به ترتیب عبارت‌اند از: 8/1±0/6 و 8/2±0/4؛ که بیان کننده غلطت برابر برای هر دو روش است. درصد خلوص محاسبه شده برای روش یوسل و روش بهبود یافته به ترتیب عبارت‌اند از 68±4 و 67±1، که ژل الکتروفورز نیز تأیید کننده این مطلب است. با توجه به شکل 4 و مقایسه باندهای ظاهر شده برای هر کدام از روش‌ها واضح است که پهنای باندهای ظاهر شده برای هر دو روش و تعداد باندهای ناخالصی آنها یکسان است. بنابراین تخلیص به هر دو روش تقریباً میزان خلوص یکسانی را نشان می‌دهد.

وزن مولکولی باکتریورودوپسین حدود 26/8 کیلو دالتون است؛ اما در شکل4 مشاهده می‌شود که باند باکتریورودوپسین بین 18/4 و 25 قرار گرفته است. این تفاوت به این دلیل است که وقتی باکتریورودوپسین در ژل الکتروفورز حاوی SDS بارگزاری می‌شود، SDS جایگزین جایگاه‌های آب دوست باکتریورودوپسین می‌شود؛ و حرکت پروتئین غشایی در طول ژل تحت تأثیر جایگزینی SDS در جایگاه‌های آب دوست انتهایی و شکل نهایی مولکول قرار می‌گیرد [9]. همچنین مطالعات میرک و همکاران در سال 1988 نشان داد که باکتریورودوپسین حالت هتروژن داشته که این موضوع به علت تفاوت در تعداد آمینو اسیدهای انتهای آمینی (N-ترمینال) است. در نتیجه وجود باکتریورودوپسین با وزن مولکولی پایین تر از 26800 دالتون به همراه باند اصلی گزارش شده است؛ بنابراین ظهور باند پروتئین در بازه 18/4 و 25 طبیعی است [16].

بنابراین روش بهبود یافته توانست با حفظ فعالیت پروتئین و درصد خلوص مناسب، زمان تخلیص و هزینه جداسازی غشای ارغوانی را در حجم‌های صنعتی و نیمه صنعتی کاهش دهد. در روش بهبود یافته زمان تخلیص از 96 ساعت به 48 ساعت و هزینه‌ای معادل با 120 دلار برای تهیه کیت آنزیم DNase l برای هر لیتر کشت کاهش یافت؛ که این هزینه در حجم های صنعتی و نیمه صنعتی کشت بالای 10 لیتر قابل ملاحظه است. همچنین تلاش برای بهینه سازی دور سانتریفیوژ و ارائه راهکار برای کاهش زمان تخلیص برای جلوگیری از افت فعالیت پروتئین حین تخلیص، می‌تواند در پژوهش‌های بعدی مورد توجه واقع شود.

5- منابع

[1] H.N.C. S.Y. Lee, Y. Soon Um, S. Ho Hong, (1998). Bacteriorhodopsin production by cell recycle culture of Halobacterium halobium, Biotechnology Letters, 20, pp. 763–765.
[2] J.K.L.a.H. Luecke, (2001). Bacteriorhodopsin, Elsevier Science, 11, pp. 415–419.
[3] O.P.C.a.J.G. S. Trivedi, (2011). Different Proposed Applications of Bacteriorhodopsin, Recent Patents on DNA & Gene Sequences, 5, pp. 35-40.
[4] D.O.a. W.Stoeckenius, (1974). Isolation of the cell Membrane of halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrain, Methods Enzymol, 31, pp. 667-678.
[5] B.M.B.a.s.Y. Cassim, (1975). Improved isolation procedures for the purple membrane of halobacterium halobium, Preparative Biochemistry, 5(2), pp. 161-178.
[6] S.N.a.H. Leigeber, (1990). Process for the prepration of purpple membraune containing bacteriorhodopsin, in: U.S. Patent (Ed.), Germany.
[7] Y.-H.J. Pei-Jing Shiu, Hsiu-Mei Chen, Cheng-Kang Lee, (2013). Facile isolation of purple membrane from Halobacterium salinarum via aqueous-two-phase system, Protein Expression and Purification, 89, pp. 219-224.

[8] B.M.Z. Meral Yucel , Inci Eroglu , L. Ttirker, (1995). Kinetic analysis of light induced proton dissociation and association of bacteriorhodopsin in purple membrane fragments under continuous illumination, Journal of Membrane Science, 104, pp. 65-72.

[9] T.W. JIN, (2010). A bacteriorhodopsin/atp synthase liposome system for light-driven atp production, in: yong loo lin school of medicine, National University of Singapore.

[10] M.M. Bradford, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., Anal. Biochem, 72, pp. 248-254.

[11] A.N.-K. TsuToMu Kouyama, and A. Ikegami, Bacteriorhodopsin is a powerful light-driven proton pump, Biophys., 51, pp. 839-841.

[12] J. Lanyi, (1990). Halorhodopsin, a Light-Driven Electrogenic Chloride-Transport System, Physiological Reviews, 70, pp. 319-330.

[13] M. J, (1961). A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro -organisms, J. Mol. Biol, 3, pp. 208-218..

[14] W.C.S.A.W. Szybalski, (1967). &-radiation o$ Deoxyribonucleic Acid in Dilute Solutions, J. Mol. Biol., 26, pp. 107-123.

[15] F.A.P. Garcia, (2002). Cell Disruption and Lysis, John Wiley & Sons, Encyclopedia of Bioprocess Technology.

[16] P.E.R .L. J. W. Miercke, R. M. Stroud, and E. A. Dratz, (1988). Purification of Bacteriorhodopsin and Characterization of Mature and Partially Processed Forms, Journaol of Biological, 264, pp. 7531-7535.