Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره دوم، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۹: ۱۵۳-۱۴۳

بررسی فعالیت داکسی ریبونوکلئازی در باکتری *استافیلوکوکوس پاستوری*

امین البرزیان ده شیخ[1*] و رامین حسینی[2]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)-قزوین، قزوین، ایران

۲- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)-قزوین، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: ٦ شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۲۹ آبان ۱۳۹۲

چکیده

تمام موجودات زنده آنزیم‌های نوکلئاز دارند. داکسی ریبونوکلئازها (DNase) گروهی از آنزیم‌ها هستند که قادرند پیوندهای فسفودی استر مولکول DNA را بشکنند. باکتری Staphylococcus pasteuri با استفاده از نشانگر 16S rRNA و آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی و با شماره دسترسی KC170006 در بانک ژن پایگاه NCBI/EMBL به ثبت رسید. فعالیت آنزیم‌های داکسی ریبونوکلئاز در باکتری S. pasteuri بدست آمده، با سه روش اسپکتوفوتومتری، فعالیت آنزیم روی DNA خطی و حلقوی، بررسی شد. اثر تیمارهای pH، غلظت NaCl و کاتیون‌های Mg^{2+}، Ca^{2+}، Mn^{2+} و Mg^{2+}-Ca^{2+} نیز روی فعالیت آنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم DNase حاصل از باکتری S. pasteuri قادر به برش یگانه مولکول DNA حلقوی است. بررسی‌های آنزیمی در برش DNA حلقوی نشان داد که این آنزیم بصورت اختصاصی عمل می‌کند، به طوری که در آزمایش برش پلاسمید pET-21a (+) این آنزیم تنها یک نقطه را برش داد. این آنزیم DNase توانایی برش مولکول DNA دو رشته را ندارد. این اولین گزارش مربوط به آنزیم‌های DNase در باکتری S. pasteuri است. بیشترین فعالیت آنزیم در حضور NaCl با غلظت ۰/۶ مولار، pH ۵/۵ و در حضور هم زمان کاتیون‌های Mg^{2+}-Ca^{2+} با غلظت ۱ mM، مشاهده شد.

کلمات کلیدی: *باکتری Staphylococcus pasteuri، فعالیت DNase، 16S rRNA*

* نویسنده مسئول: امین البرزیان ده شیخ

آدرس: گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)-قزوین، قزوین، ایران. تلفن: ۳۳۹۰۱۱۶۰-۰۲۸

پست الکترونیک: aminalborzian@yahoo.com

مقدمه

چسنیو و همکاران در سال ۱۹۹۳ گونه *Staphylococcus pasteuri* را از هفت سویه *Staphylococcus* شناسایی کردند. جنس *استافیلوکوکوس* دارای ۲۹ گونه است. سلول‌های این باکتری غیر اسپورزا، غیرمتحرک، کوکسی، گرم مثبت، بصورت فرد، جفت و چهار تایی، در دماهای ۱۵-۴۵°C درجه رشد می‌کند. کاتالاز و اوره‌آز مثبت، اکسیداز منفی است و در مصرف قندهای گلوکز، ساکارز و فروکتوز اسید تولید می کند (۸).

آنزیم‌های داکسی ریبونوکلئاز (DNase) اولین بار در سال ۱۹۶۹ بصورت بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند (۳). آنزیم‌های اندونوکلئاز اختصاصی از اهمیت ویژه‌ای در کلونینگ DNA برخوردار هستند و تا کنون حدود ۲۸۰ توالی برشی متمایز یافت شده است (۳۴). نوکلئازها در گیاهان ذرت و جو مطالعه شده‌اند (۱۰ و ۲۹). ریبونوکلئاز II از ریشه‌های برخی انواع ذرت جدا و به طور نسبی خالص گردید. این نوکلئاز در pH بهینه ۵/۴ تا ۷/۰ فعالیت نشان داد. یک آنزیم دیگر از هموجنت ریشه ذرت با وزن مولکولی ۳۱ هزار دالتون بدست آمد. این آنزیم در pH ۶/۲ فعالیت بهینه نشان داد و قادر به هیدرولیز رشته‌های RNA و DNA بود (۱۰). انکوبه کردن بذر نصف شده جو با ژیبرلیک اسید فعالیت ریبونوکلئاز و داکسی ریبونوکلئازها را در بافت آلورن افزایش داد. این واکنش‌ها در دمای ۵۵ درجه و pH ۶ به حد بهینه خود رسید (۲۹). قارچ خوراکی *Lentinus edodes* نیز دو نوکلئاز Le1 و Le3 تولید می‌کند، این آنزیم‌ها با برش رشته DNA یک انتهای گوانین مونو فسفات (5-GMP) تولید می‌کنند (۱۸). نوکلئازهای دیگری در قارچ *Rhizoctonia stolonifer* بررسی شده است که تحت تأثیر یون‌های فلزی قرار می‌گیرد، این آنزیم از نوع برون سلول است (۳۲). نوکلئازها در حشرات نیز بررسی شده‌اند. یک فعالیت نوکلئازی با pH بهینه ۱۰/۵ در محتوای لارو حشره *Spodoptera litura* در دمای ۵۵ درجه شناسایی شد (۲). آنزیم‌های DNase تنوع بسیار بالایی نشان می‌دهند، برای مثال آنزیم DNase بدست آمده از باکتری *Micrococcus pyogenes* از سایر DNaseها بسیار متفاوت است. این آنزیم برای فعالیت به یون Ca^{2+} و pH ۸/۶ نیاز دارد و بطور قابل ملاحظه‌ای به دماهای بالا مقاومت است (۹). تا کنون تنها یک ژن نوکلئاز در گونه *S. aureus* بررسی شده و در باکتری *E. coli* کلون شده است (۲۳).

ژن مربوط به RNA ریبوزومی حفاظت شده‌ترین ژن درون هر سلول است (۳۶). ژن rRNA توالی‌یابی نوکلئوتیدی شده از موجودات مختلف به طور قابل توجهی شباهت نشان می‌دهند. این به این معنی است که توالی‌های بدست آمده از موجودات مختلف می‌توانند با هم مقایسه شده و به صورت گسترده‌ای برای تعیین تاکسونومی، فیلوژنیک و تخمین تنوع بین باکتری‌ها استفاده شود. بنابراین توالی 16S rRNA می‌تواند روابط تکامل بین میکروارگانیسم‌ها را نشان دهد. توالی 16S rRNA هزار باکتری محیطی و پزشکی در سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) موجود است. توالی مورد نظر ۱۵۰۰ نوکلئوتید طول دارد (۳۶).

هدف تحقیق حاضر بررسی فعالیت داکسی ریبونوکلئازی (DNase) باکتری خاکزی *Staphylococcus pasteuri* است. این اولین گزارش در مورد فعالیت داکسی ریبونوکلئازی در این گونه باکتری است.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه خاک و جداسازی باکتری

نمونه‌های ۱۰ گرمی خاک سطحی تا عمق ۱۰ سانتی متری برداشته شد. با روش رقیق سازی سریالی در آب استریل غلظت یک در میلیون بدست آمد که به منظور کشت باکتری مناسب است. یک میلی لیتر از این محلول بر روی محیط کشت LB آگار (Luria Bertani Broth, Miller, HIMEDIA, M1245) کشت و در دمای ۳۷ درجه به مدت یک هفته انکوبه شد. بعد از گذشت یک هفته، کلونی‌های مختلف بدست آمده از نظر صفات مورفولوژیکی مانند تست گرم و شکل باکتری بررسی شدند. باکتری‌های گرم مثبت و کروی شکل (احتمالا *Staphylococcus*) به منظور رسیدن به خلوص حداکثر تا ۴ نسل در شرایط مشابه واکشت شدند (جدول ۱).

استخراج DNA و انجام واکنش PCR برای تکثیر قطعه 16S rRNA

برای استخراج DNA از باکتری‌ها از روش نیومن و همکاران استفاده شد (۲۸). برای این منظور یک میلی لیتر از سوسپانسیون سلول باکتریایی در ۸۰۰۰ g برای دو دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از حذف مایع روی سلول‌ها با ۴۰۰ میکرولیتر بافر STE (۱۰۰ mM NaCl، mM ۱۰Tris/HCl و ۱ mM EDTA و pH:8) دوبار شسته شدند. سپس سلول‌ها در ۸۰۰۰ g به مدت دو دقیقه رسوب داده شدند. مایع رویی حذف گردید و رسوب‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris/HCl، ۱ mM EDTA و pH:8) حل شدند. سپس، ۵۰ میلی گرم گلوله شیشه ای با اندازه ۴۲۵-۶۰۰ میکرومتر به رسوب‌ها اضافه شد و ۱۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده با Tris-HCl اضافه شد و در نهایت این محلول به مدت ۶۰ ثانیه ورتکس شد. بعد از این مرحله نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ g برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شدند و ۱۶۰ میکرولیتر از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شدند. مقدار ۴۰ میکرولیتر بافر TE به آن اضافه و حجم به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول اضافه شده و سپس محلول در ۱۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شدند. ۱۵۰ میکرولیتر از مایع رویی بعنوان DNA خالص برای آزمایش‌های بعدی جدا گردید و در دمای ۲۰- درجه نگه داری شد. با طیف سنجی A_{260}/A_{280} خلوص و کمیت DNA تعیین شد.

با استفاده از آغازگرهای جهانی (۳۸) 27F و 1525R (27F 5-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3 و 1525R 5-AAGGAGGTGATCCAACC-3) (شرکت Bioneer کشور کره جنوبی)، برای تکثیر قطعه 16S rRNA، شرایط واکنش PCR مطابق زیر تعیین شد. دمای واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، دمای واسرشته سازی چرخه‌ها ۹۴ درجه و به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۴ درجه و به مدت ۶۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه و به مدت ۱۰ دقیقه، تعداد چرخه‌های واکنش ۳۵ بود. در هر تیوب واکنش مواد زیر بکار رفت: ۵۰ ng DNA الگو، ۲۰ pmol آغازگر رفت، ۲۰ pmol آغازگر برگشت، ۷ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰ میکرولیتر مستر کیت PCR (حاوی ۵۰ mM KCl، ۱۰ mM Tris-HCl با pH ۹، ۲ mM $MgCl_2$، ۱٪ (v/v) تریتون X-۱۰۰، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP) (شرکت سیناژن، ایران). برای تایید عدم آلودگی، کنترل + (حاوی تمام ترکیبات واکنش به غیر از DNA الگو) و کنترل – (شامل تمام ترکیبات به غیر از آغازگرها) در هر سری واکنش انجام شد. پس از تکثیر

قطعه مورد نظر در حجم مناسب، و خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت خالص سازی Accuprep (ساخت شرکت Bioneer)، برای توالی یابی به شرکت تکاپو زیست ارسال شدند. محصول بدست آمده حدود ۱۵۰۰جفت باز طول داشت. توالی‌های خوانده شده با استفاده از پایگاه داده NCBI مورد بررسی قرار گرفته و جنس و گونه باکتری‌ها مشخص گردید. تست‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک تست گرم، شکل باکتری، کاتالاز و تحمل درصد نمک در محیط کشت برای تایید نهایی انجام شد (جدول ۱).

استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین از باکتری‌ها از روش بهادری ۱۹۸۳، استفاده شد (۴). برای استخراج پروتئین از باکتری‌ها طبق مراحل زیر عمل شد:

ابتدا محیط کشت LB آگار (Luria Bertani Broth, Miller, HIMEDIA, M1245) استریل تهیه شد. باکتری‌ها از استک ذخیره شده در فریزر با دمای ۸۰- روی آن‌ها کشت شده و در دمای ۳۷ درجه و تاریکی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس از باکتری رشد یافته، یک تک کلون با استفاده از لوپ استریل برداشته و در محیط LB مایع کشت شد. به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر با دمای ۳۷ درجه، تاریکی و شیکر با دور ۱۱۰ rpm انکوبه شد. سپس ۱۰ میلی لیتر باکتری رشد یافته، با استفاده از میکروسانتریفیوژ با دمای ۴+ درجه و دور ۱۴۰۰۰ rpm برای ۲ دقیقه، رسوب داده شد. مایع رویی دور ریخته شد و پلت تهیه شده در ۱ میلی لیتر بافر TE حاوی (۵۰ mM Tris-HCl و ۲۵ mM Na-EDTA هر کدام pH ۸) با استفاده از ورتکس شدید حل گردید. مجددا برای رسوب باکتری سانتریفیوژ با دمای ۴+ درجه و ۱۴۰۰۰ rpm برای ۱ دقیقه، انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد. پلت باکتری حاصل، در ۱ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) با ورتکس شدید حل شد. مجددا سانتریفیوژ با دمای ۴+ درجه و ۱۴۰۰۰ rpm برای ۱ دقیقه، انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد. پلت‌های حاصل در ۱۰ میلی لیتر استون خالص سرد حل شده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدید انجام شد. سپس سانتریفیوژ با دمای ۴+ درجه و ۱۴۰۰۰ rpm برای ۳ دقیقه، انجام شد. مایع رویی به آرامی دور ریخته شد و پلت‌ها در معرض هوا خشک شدند. ۱ میلی لیتر محلول SDS ۱٪ (و یا محلول فسفات بافر ۲۰۰ mM) به پلت باکتریایی خشک اضافه شد. ورتکس شدید به مدت ۲۰ ثانیه انجام شده و محلول به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق ذخیره شد. مجددا سانتریفیوژ با دمای ۴+ درجه و ۱۴۰۰۰ rpm برای ۵ دقیقه، انجام شد. مایع رویی به عنوان پروتئین استخراج شده با دقت به تیوب استریل جدید منتقل شد و با استفاده از استک گلیسرول ۵۰٪ (افزودن ۱/۳ حجم از استک گلیسرول به پروتئین)، استک پروتئین حاوی ۱۲/۵٪ گلیسرول تهیه شد و جهت ذخیره سازی به فریزر ۲۰- منتقل شدند.

تعیین کمیت و کیفیت پروتئین

بررسی غلظت پروتئین‌های استخراج شده با روش بردفورد صورت گرفت (۷). دستگاه اسپکتروفوتومتر UV ساخت شرکت Labomed در جذب ۵۹۵ nm انجام شد. از نمونه حاوی ۲۰ µl بافر استخراج به عنوان نمونه صفر استفاده شد. رسم نمودار استاندارد با استفاده از مقادیر مختلف سرم آلبومین گاوی (شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) انجام شد.

بررسی کیفیت پروتئین‌های استخراج شده، به وسیله الکتروفورز عمودی روی ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) انجام شد (۲۰).

بررسی آنزیم داکسی ریبونوکلئاز روی ژل آگارز

اجرای این آزمایش طبق روش شرح داده توسط کوین و همکاران ۱۹۹۸ انجام شد (۱۶). در این روش از پروتئین استخراج شده بدون SDS (محلول فسفات بافر ۲۰۰ mM به جای SDS در مرحله استخراج) استفاده شد، زیرا SDS باعث غیر فعال شدن آنزیم‌ها می‌گردد. در این آزمایش DNA خطی و پلاسمید pET-21a (+) در حضور و غیاب ۱ میلی‌مولار کاتیون‌های دو ظرفیتی Ca^{2+}، Mn^{2+} و Mg^{2+} هضم شدند تا کوفاکتورهای آنزیم‌ها معرفی گردند (۳۹). پلاسمیدهای سری pET-21a (+) در واقع جهت کلونینگ و سطح بالای بیان توالی‌های پپتیدی متصل شده به دنباله پلی هیستیدینی طراحی شده اند. این پلاسمید دارای یک محل تجمع جایگاه‌های برشی است. اندازه این پلاسمید ۵۴۴۳ جفت باز است و به دو دلیل در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، ۱. دارای جایگاه برشی برای انواع زیاد آنزیم برشی ۲. اندازه متوسط برای کاربرد آسان و جلوگیری از برش-های تصادفی. در هر تیوب واکنش ۱۰۰ mM سدیم استات با pH ۴/۶، ۴۰ µg DNA ژنومی باکتری *E. coli* و یا ۴۰ µg پلاسمید pET-21a(+) (دو تیمار مختلف)، ۱ mM از کاتیون‌های Ca^{2+}، Mn^{2+} و Mg^{2+} به عنوان تیمارهای مختلف و ۵ µl نمونه آنزیمی وجود داشت. حجم نهایی واکنش، ۲۵ µl بود. تیوب‌ها در دمای ۳۷°C برای یک ساعت انکوبه شدند. برای هر تیمار ۳ تیوب به عنوان تکرار، بررسی شد. پس از اتمام، ۱۰ µl از هر نمونه به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی شد.

بررسی آنزیم داکسی ریبونوکلئاز با استفاده از اسپکتروفوتومتر

آزمایش طبق روش کوین و همکاران ۱۹۸۸ انجام شد (۱۶). در این آزمایش نیز از پروتئین فاقد SDS استفاده شد. حجم واکنش ۱ ml و شامل ۴۰ µg DNA تیموس گاوی تک رشته شده محلول در آمونیوم استات ۵۰ mM، کاتیون‌های Ca^{2+}، Mn^{2+}، Mg^{2+} و Mg^{2+}- Ca^{2+} با غلظت ۱ mM و ۱ mM EDTA با pH ۵/۵ به اضافه ۲۰ µl عصاره آنزیمی بود. پس از اضافه نمودن عصاره آنزیمی ورتکس شدید انجام شده و تیوب‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. هر تیمار شامل ۳ تکرار بود.

پس از اتمام گرما گذاری، ۱ ml پرکلریک اسید ۵٪ به محلول واکنش روی یخ اضافه شد تا واکنش متوقف شود. محلول بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه تحت g ×۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی لیتر از محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد. نمونه صفر حاوی تمام مواد بجز عصاره آنزیمی بود که تمام مراحل را مانند نمونه‌های آزمایش طی کرد. طبق نتایج کوین و همکاران (۱۶)، هر اختلاف ۰/۰۰۱ بر دقیقه، در جذب معادل یک واحد آنزیم بر غلظت پروتئین است.

غلظت عصاره آنزیمی (mg/ml) / زمان (min) /Δ۲۶۰= (U/ml) واحد آنزیمی

برای بررسی‌های آنزیمی‌با استفاده از اسپکتروفوتومتر در تمام آزمایش‌ها از قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. در تحلیل واریانس تمام نتایج از ضریب اطمینان ۹۹٪ استفاده شد.

جدول ۱: مقایسه پاسخ‌های باکتری *Staphylococcus pasteuri* **شناسایی شده در آزمایش با ۷ استرین از این باکتری (۸).**

تست باکتری	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
اوره‌آز	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی	+	+	+	+	+	+	+	+
قطر کلونی > ٥ mm	+	-	+	-	-	-	-	-
رنگیزه*	+	+	+	+	+	-	+	-
مالتوز	+	-	+	+	+	+	+	+
مانیتول	+	+	-	+	+	+	+	+
اکسیداز	-	-	-	-	-	-	-	-

۱. *S. pasteuri* BM9357 ۲. *S. pasteuri* BM9359 ۳. *S. pateuri* BM9363 ۴. *S. pasteuri* BM10507 ۵. *S. pasteuri* BM10425 ۶. *S. pasteuri* BM10426 ۷. *S. pasteuri* BM10427 ۸ نتایج باکتری *S. pasteuri* شناسایی شده. * به معنای **pigment** باکتری. -: نتیجه منفی +: نتیجه مثبت.

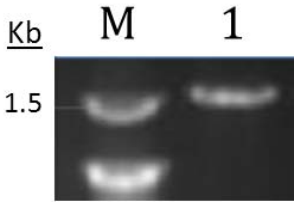
نتایج

شناسایی باکتری

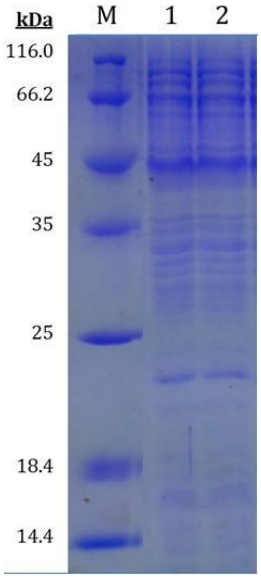
باند تکثیر شده از ژن 16S rRNA به صورت واضح بدست آمده و اندازه آنها با اندازه مورد انتظار یعنی ۱۵۰۰ جفت باز مطابقت داشت (شکل ۱). پس از توالی یابی قطعات تکثیری توالی‌ها در پایگاه داده NCBI/EMBL مورد بررسی و همردیف شدند. در نهایت جنس *Staphylococcus* و گونه *pasteuri* به عنوان نزدیک ترین باکتری طبق نتایج همردیفی توالی 16S rRNA بدست آمد. باکتری گرم مثبت، کوکسی شکل، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بود و تا ۱۵ درصد نمک را تحمل نمود (جدول ۱). یک شاخص مهم در *Staphylococcus*، تحمل ۱۵ درصد نمک در محیط کشت است (۸). ژن 16S rRNA باکتری *S. pasteuri* در پایگاه NCBI/EMBL با شماره KC170006 ثبت گردید.

نتایج بررسی آنزیم‌های DNase روی ژل آگارز

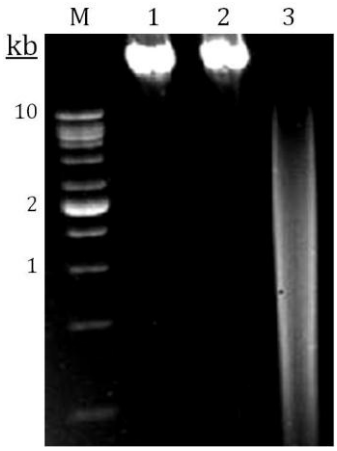
پروتئین‌های استخراجی باکتری *S. pasteuri* روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ کیفیت خوبی نشان داد (شکل ۲). غلظت پروتئین بدست آمده طبق نتایج اسپکروفوتومتر ۴۵۸/۱۴۸ µg/ml بود. نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های DNase روی DNA خطی در شکل ۳ دیده می‌شود. همانطور در شکل دیده می‌شود، هیچ گونه برشی در مولکول DNA دو رشته ایجاد نشده است. بررسی هضم DNA پلاسمیدی با استفاده از پلاسمید pET-21a (+) انجام شد. بررسی‌های هضم آنزیمی پلاسمید در شکل ۴ دیده می‌شود. هضم یا برش پلاسمید با تیمارهای مختلف کاتیونی برای تعین کوفاکتور اختصاصی آنزیم برشی صورت گرفت، اما در نهایت هیچ اختلافی در برش با کوفاکتورهای مختلف مشاهده نشد. عصاره آنزیمی باکتری *S. pasteuri* باعث افزایش غلظت حالت برش تک رشته از پلاسمید شده که این بدلیل وجود آنزیم نیکاز است (شکل ۴). در حضور تمام کاتیون‌ها نیز این برش دیده شد. با توجه به تعداد بالای تکرار آزمایش و نیز آزمون سه کاتیون مختلف، می‌توان آنزیم‌های باکتری‌های *S. pasteuri* را از نوع نیکاز دانست. نیکازها برش دهنده اختصاصی، یک کلاس جدید از آنزیم‌ها هستند که جایگاه برشی را روی مولکول DNA تشخیص می‌دهند و تنها یک رشته از DNA را برش می‌دهند. از این دسته از آنزیم‌ها تعداد بسیار کمی کشف شده است (۴۲).



شکل ۱: باند مورد انتظار ژن ۱۶S rRNA با استفاده از آغازگرهای 27F و 1525R. M. مارکر ۱ kb DNA ۱. *S. pasteuri*.



شکل ۲: عصاره پروتئینی استخراج شده از باکتری *S. pasteuri* روی ژل SDS-PAGE. M. مارکر مولکولی ۱ و ۲ الگوی باندی پروتئینی باکتری *S. pasteuri* (دو تکرار).

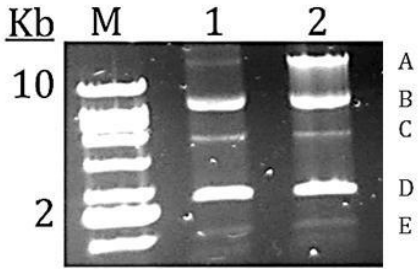


شکل ۳: هضم مولکول DNA خطی با آنزیم‌های DNase از باکتری *S. pasteuri*، M. مارکر DNA.

۱. مولکول **DNA** دو رشته بدون آنزیم

۲. مولکول **DNA** دو رشته در حضور عصاره پروتئینی باکتری ***S. pasteuri***

۳. مولکول **DNA** دو رشته در حضور آنزیم **EcoRI**.



شکل ٤: هضم مولکول DNA پلاسمید pET-21a (+) با آنزیم‌های DNase از باکتری *S. pasteuri*.

۱. پلاسمید بدون آنزیم

۲. پلاسمید در حضور عصاره پروتئینی باکتری ***S. pasteuri***

M. مارکر **DNA**.

A. پلاسمید برش خورده با آنزیم نیکاز

B. پلاسمید حلقه باز

C. پلاسمید خطی (برش یافته)

D. پلاسمید سوپرکویل

E. پلاسمید حلقه‌ای تک‌رشته.

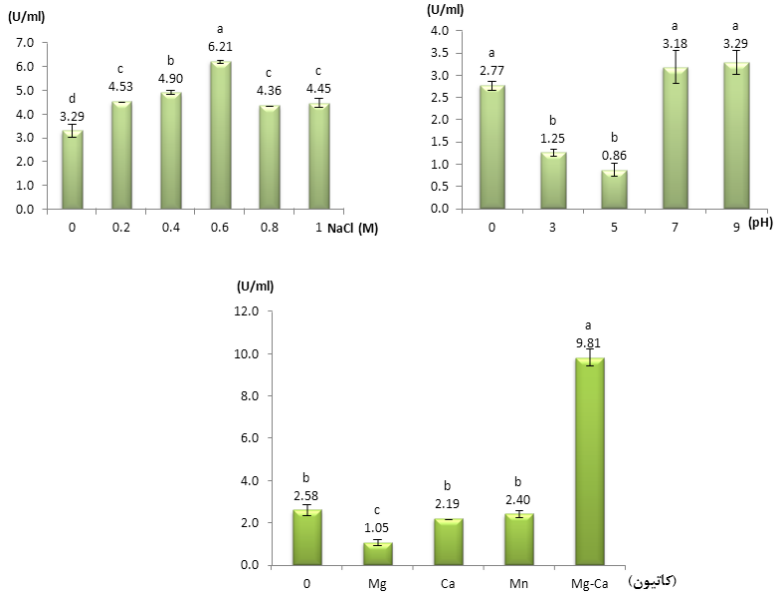
نتایج حاصل از اسپکتروفوتومتری

فعالیت آنزیم DNase عصاره باکتری *S. pasteuri* در حضور کاتیون‌های منیزیم بصورت معنی دار کاهش یافت. در حضور کاتیون‌های کلسیم و منگنز فعالیت آنزیمی تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۱). با اعمال تیمار Mg^{2+}-Ca^{2+} در غلظت ۱ mM، فعالیت آنزیم تا چهار برابر افزایش نشان داد. غلظت‌های مختلف نمک فعالیت آنزیم DNase این باکتری را بطور معنی‌دار در سطح ۹۹٪ افزایش داد. غلظت ۰/۶ مولار نمک باعث بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم DNase شد. فعالیت آنزیم DNase بطور معنی‌دار تحت تاثیر pH نیز قرار گرفت. فعالیت آنزیم در pHهای ۷ و ۹ تغییری نشان نداد. در حالی که در pHهای ۳ و ۵ فعالیت آنزیم DNase با اطمینان ۹۹٪ کاهش پیدا کرد.

بحث

باکتری *Staphylococcus pasteuri* از خاک سطحی جدا و خالص سازی شد. این باکتری با شماره

دسترسی KC170006 در پایگاه NCBI/EMBL به ثبت رسید. آنزیم DNase باکتری *S. pasteuri* قادر به برش رشته DNA یگانه است. این آنزیم احتمالا جز آنزیم‌های نیکاز است. بررسی‌های آنزیمی در برش DNA حلقوی نشان می‌دهد که این آنزیم بصورت اختصاصی عمل می‌کند، به طوری که در آزمایش برش پلاسمید pET-21a (+) این آنزیم تنها یک نقطه را برش داد. این آنزیم DNase توانایی برش مولکول DNA دو رشته را ندارد. این اولین گزارش مربوط به آنزیم‌های DNase در باکتری *S. pasteuri* است. بیشترین فعالیت آنزیم در حضور NaCl با غلظت ۰/۶ مولار، pH ۵/۵ و در حضور هم زمان کاتیون‌های Mg^{2+}-Ca^{2+} با غلظت ۱ mM، مشاهده شد.



نمودار ۱: نمودارهای نتایج تیمارهای مختلف pH، NaCl و کاتیون روی عصاره آنزیمی باکتری *S. pasteuri*

منابع

1. Abdurashitov, M.A., Belitchenko, O.A., Shevchenko, A.V., Degtiarev, S. (1996). N.BstSE- a site-specific nickase from *Bacillus stearothermophilus* SE-589. *Journal of Molecular Biology* **30**: 1261-7.
2. Ahmad, N.S., Hadi, S.M. (1983). Purification and properties of a glycoprotein alkaline nuclease from the larvae of the army worm. *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry* **13**: 391-401.
3. Bernard, E.A. (1969). Ribonucleases. *Annual Review of Biochemistry* **38**: 677-82.
4. Bhaduri, S., Paul, H.D. (1983). Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 941-3.
5. Bickle, T.A., Krüger, D.H. (1993). Biology of DNA restriction. *FEMS Microbiology Reviews* **57**: 434-50.
6. Bourniquel, A.A., Bickle, T.A. (2002). Complex restriction enzymes: NTP-driven molecular motors. *Biochimie* **84**: 1047-59.
7. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-54.
8. Chesneau, O., Morvan, A., Grimont, F., Labischinski, H., El Solh., N. (1993). *Staphylococcus pasteuri* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. *International Journal of Systematbica Cteriologay* **43**: 237-44.

9. Cunningham, L., Laskowski, M. (1953). Presence of two different por desoxyribonucleode polymerases in veal kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* **11**: 590-1.
10. Curtis, M.W. (1968). Plant nucleases I separation and purification of two ribonucleases and one nuclease from corn. *Plant Physiology* **43**:1332-8.
11. Desreux, V., Hacha, R., Fredericq, E. (1962). Activation of deoxyribonucleases by divalent cations. *Journal of General Physiology* **45**: 93-102.
12. Feinstein, R. N. (1960). Activation of the neutral deoxyribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry* **235**: 731-3.
13. Goedken, E.R., Marqusee, S. (2001). Co-crystal of *Escherichia coli* RNase HI with Mn^{2+} ions reveals two divalent metals bound in the active site. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 7266-71.
14. Higgens, L.S., Besnier, C., Kong, H. (2001). The nicking endonuclease N.BstNBI is closely related to type IIs restriction endonucleases MlyI and PleI. *Nucleic Acids Research* **29**: 2492-501.
15. Keck, J.L., Goedken, E.R., Marqusee, S. (1998). Activation/attenuation model for RNase H. A one-metal mechanism with second-metal inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 34128-33.
16. Kevin, P.B., Will, F., Baron, W., Henzel, J., Steven, A.S. (1998). Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II. *Gene* **215**: 281-9.
17. Kobayashi, H., Fumi, K., Tadashi, I., Takashi, K., Norio, I. (2000). Nuclease Lel 1 and 2 Study. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **64**: 948-57.
18. Koerner, J.F., Sinsheimer, R.L. (1957). Deoxyribonuclease from calf spleen. I. Purification and properties. *The Journal of Biological Chemistry* **228**: 1039.
19. Kunitz, M. (1940). Crystalline ribonuclease. *The Journal of General Physiology* **24**: 15-30.
20. Laemmli, U.K., Favre, M. (1973). Gel electrophoresis of protein. *Journal of Molecular Biology* **80**: 575-99.
21. Lai, B., Li, Y., Cao, A., Lai, L. (2003). Metal ion binding and enzymatic mechanism of *Methanococcus jannaschii* RNase HII. *Biochemistry* **42**: 785-91.
22. Laskowski, M. (1959). Enzymes hydrolyzing DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* **81**: 776-83.
23. Lin, L.F., Posfai, J., Roberts, R.J., Kong, H. (2001). Comparative genomics of the restriction-modification systems in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 2740-5.
24. McCleland, S.E., Sczcelkun, M.D. (2004). The type I and III restriction endonucleases: structural elements in molecular motors that process DNA. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **14**: 111-35.
25. Morgan, R.D., Calvet, C., Demeter, M., Agra, R., Kong, H. (2000). Characterization of the specific DNA nicking activity of restriction endonuclease N.BstNBI. *The Journal of Biological Chemistry* **381**: 1123-5.
26. Murray, N.E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 412-34.
27. Neumann, B., Pospiech, A., Schairrer, H.U. (1992). Rapid isolation of genomic DNA from gram-negative bacteria. *Trends in Genetics* **8**: 332-3.
28. Patel, J.B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Journal of *Molecular Diagnostics* **6**: 313-21.
29. Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingouda, V., Wende, W. (2005). Type II restriction endonucleases: structure and

mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**: 685-707.

30. Raleigh, E.A., Brooks, J.E. (1998). Restriction modification systems: where they are and what they do. *Bacterial Genomes* 78-92.
31. Rangrajan, S., Shankar, V. (1999). Extracellular nuclease from *Rhizopus stolonifer* purification and characteristics of single strand preferential deoxyribose nuclease activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**: 293-304.
32. Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J. et al. (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* **31**: 1805-12.
33. Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. (2005). REBASE restriction enzymes and DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Research* **33**: 230-2.
34. Shimomura, M., Laskowski, M. (1957). Purification of deoxyribonuclease II from spleen. *Biochimica et Biophysica Acta* **26**: 198.
35. Torsvik, V., Jostein, G. (1990). High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 782-7.
36. Van Etten, J.L. (2003). Unusual life style of giant *chlorella* viruses. *Annual Review of Genetics* **37**: 153-95.
37. Virginia, W., Campbell, D., Jackson. A. (1980). The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. *Journal of Biologic Chemistry* **255**: 3726-35.
38. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane. D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.
39. Wiberg, J.S., (1958). On the mechanism of metal activation of deoxyribonuclease I. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **73**: 337.
40. Xia, Y.N., Morgan, R., Schildkraut, I., Van Etten, J.L. (1988). A site-specific single strand endonuclease activity induced by NYs-1 virus infection of a Chlorella-like green alga. *Nucleic Acids Research* **16**: 9477-87.
41. Zhang, Y., Nelson, M., Nietfeldt, J., Xia, Y., Burbank, D., Ropp, S., Van Etten, J.L. (1998). *Chlorella* virus NY-2A encodes at least 12 DNA endonuclease/methyltransferase genes. *Virology* **240**: 366-75.
42. Zheleznaya, L.A., Perevyazova, T.A., Zheleznyakova, E.N., Matvienko, N.I. (2002). Some properties of site-specific nickase bspD6I and the possibility of its use in hybridization analysis of DNA. *Biochemistry* **67**: 498-502.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 2, 2014

A Study on the *Staphylococcus pasteuri* Deoxyribonuclease Activity

Alborzian-Deh-Sheikh, A.*[1], Hosseini, R.[2]

1- MSc of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University- Qazvin, Qazvin, Iran
2- Faculty member of Agricultural Biotechnology, Imam Khomeini International University- Qazvin, Qazvin, Iran

Received Date:29 August 2013 *Accepted Date: 16 November 2013*

Abstract: *All organisms have nuclease. Deoxyribonucleases (DNase) are from enzyme group that are able to hydrolase phosphodiester bounds of DNA molecule bonds. Staphylococcus pasteuri identified by 16S rRNA marker and biochemical tests, and submitted to GenBank/EMBL with KC170006 accession number. The activity of DNase enzyme was detected through three spectrophotometric, detection of DNase activity on circular and double strand DNA molecule on agarose gel methods. The effects of pH, NaCl and cations like Mg2+, Ca2+,Mn2+andMg2+-Ca2+ treatments were considered. S. pasteuri DNase was able to cut single strand of circular DNA. S. pasteuri DNase was able to cut single strand DNA. Studies on circular DNA showed that the enzyme may nick specifically, whereas pET-21a (+) was restricted to one point. The DNase does not cut double strand DNA. This is the first report about S. pasteuri DNase activity. The most important activity of enzyme was observed in the presence of 0.6 M NaCl, 1mM Mg2+-Ca2+ and pH 5.5.*

Keywords: *Staphylococcus pasteuri, DNase activity, 16S rRNA.*

**Corresponding author: Alborzian-Deh-Sheikh, A.*
Address: Imam Khomeini International University- Qazvin, Qazvin, Iran. Tel: 028-33901160
Email: aminalborzian@yahoo.com