جامعة الموصل

كلية العلوم

تنقية إنزيم اللايكيز من النوع البكتيري *Staphylococcus aureus* واستخدامه في ربط شظايا DNA

رفل مهيدي يونس الصوفي

رسالة ماجستير

علوم الحياة

أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور سعد غانم صالح محمود الياسين

1433هـ **2012م**

University of Mosul

College of Science

الخلاصة

استخدم في هذه الدراسة النوع البكتيري *Stphylococcusaureus* sub sp. *aureus* المعزولسابقاً والذي يعد مصدراً لانزيماللايكيز الذي تم عزله ودراسة فعاليته وقياس تركيزه والذي بلغ (1.4) ملي غرام/مليليتر بعد تنقيته بطريقة الالفةAffinity, واستخدام الانزيم المنقى لدراسة الميكانيكية الحركية.

وبينت نتائج دراسة فعالية الانزيم ان الانزيم يكون فعالاً في الراشح في حين لم تظهر أية فعالية في الراسب ، كما اظهر الانزيم فعالية عند التنقية بطريقة الآلفة حيث تكونت حزمة واحدة للـ DNA على هلام الأكاروز ، في حين فقدت الفعالية عند التنقية بطريقة الترسيب بكبريتات الامونيوم ولكل درجات التشبع المستخدمة وبقيت حزم الـDNA كما هي .

وبينت نتائج دراسة الميكانيكية الحركية للأنزيم ان افضل حرارة للربط هي (42) °م حيث تكونت حزمة واحدة جيدة للـ DNA اما عند استخدام الحرارة (32) °مأظهرت (3) حزم للـ DNA في حين تكونت حزمتان عند استخدام الحرارة (36)°م بينما كونت الحرارة (45) °م حزمة واحدة وعند دراسة تأثير الدالة الحامضية اتضح ان افضل pH هو (8) باستخدام المحلول المنظم(Tris-EDTA (TE حيث تكونت حزمة واحدة جيدة للـDNA في حين تكونت حزمتان عند (7) pHوتكونت حزمة واحدة اقل وضوحاً عند (7.5) pHوتكونت حزمتان عند (8.5) pH . وبينت نتائج دراسة تأثير المعادن ان افضل فعالية للانزيم كانت عند استخدام كبريتات الامونيوم حيث تكونت حزمة واحدة جيدة للـ DNA اما عند استخدام خلات الخارصين فلم تلاحظ أية حزمة في حين تكونت حزمتان عند استخدام كبريتات البوتاسيوم وكلوريد النحاس اما عند استخدام كلوريد المغنيسيوم وكلوريد الصوديوم فقد تكونت حزمة واحدة اقل وضوحاً، اما نتائج دراسة تأثير تركيز الانزيم فقد بينت ان حزم الـDNA المتكونة في كل التراكيز المستخدمة جيدة وقد تم اختيار التركيز (10) مايكروليتر كأفضل تركيز ، كما بينت نتائج دراسة تأثير تركيز المادة الاساس (DNA) ان جميع التراكيز المستخدمة قد كونت حزماً جيدة وواضحة واعتمد التركيز (10) مايكروليتر كتركيز اساسي، في حين بينت نتائج دراسة تأثير الزمن ان افضل زمن للتفاعل هو (30) ثانية لمرحلة المسخ و(2) دقيقة لمرحلة الارتباط و (1) دقيقة لمرحلة الاستطالة حيث تكونت حزمة واحدة جيدة للـDNA , اما عند استخدام الزمن (3) دقائق لكل مرحلة من مراحل التفاعل فقد تكونت حزمة واحدة ضعيفة .

وبينت نتيجة دراسة خصوصية الانزيم ان افضل طريقة لتنقية الانزيم هي باستخدام طريقة الألفة، وان افضل درجة استرجاع لفعالية الانزيم هي (0.3) عندما يكون تركيز المادة الاساس هو (5) مايكروليتر .

Purification of Ligase from *Staphylococcuaureus*and it's Using in Joining DNA Fragments

RafalMheidyYouniss Al-Sofy

Ms.cThesis

in

Biology/Microbiology

Supervised by

Asst. Prof.

Dr. Sa'adGhanimSalihMahmmod Al-Yassin

2012 A.D. **1433 A.H**

Abstract

In this study *Staphylococcus aureus*sub sp. *aureus* was used previously isolated in our department to extract it's ligase which be used to study it's activity and concentration which is (1.4)mg/ml after purified it by affinity chromatography, also the enzyme was examined to study it's mechanism.

The results revealed that the enzyme activity was highly in the filtrate part of homogenized cell than in the precipitate, also the activity was higher when using affinity chromatography purification method which produced one band of DNA on the agarose gel while this activity lost when using fractionation with ammonium sulphate.

The kinetic studies show that the best temperature for annealing is (42)°C which produced one band of DNA, while (32)°C gave three bands of DNA and two bands at (36)°C, while (45)°C produced one band. The pH effect shows the best activity of enzyme at pH (8) using (TE) buffer which gave one band of DNA and two bands of DNA produced at pH(7) and pH(8.5) while more scattered band produced at pH(7.5).

The metal ions study marks that ammonium sulphate has better effect on activation of enzyme which produced one band and no band formedby using zinc acetate, while two bands produced by using potassium sulphate and cupric chloride and one unclear band produced by using magnesium chloride and sodium chloride. The study of enzyme concentration shows that all concentration use have similar effect on ligasing DNA, Thus we be used (10)µl in all following experiments, also the study of substrate concentration (DNA) shows that all concentration gave one band, thus we have used (10)µl for the following experiment, finally, the result of study time effect proved that (30)sec. for denaturation, (2)min. for annealing and (1) min for elongation was the

best time for PCR which produced one band compared with (3) min. for all stages of the reaction.

The specificity experiment proves that the enzyme purified by affinity chromatography and highest degree of the recovery of enzyme activity is (0.3) when the concentration of substrate was (5) µl.