دانشگاه صنعتی شریف
دانشکده مهندسی شیمی ونفت

متابولومیکس درون سلولی در رده سلولی Bacillus subtilis (ATCC 6633)

حسین صدیقی کمال، رضا روستاآزاد، شهره مشایخان*

تهران، خیابان آزادی، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، کد پستی:۱۴۵۸۸۸۹۶۹۴

چکیده : در این تحقیق، تکنیک‌های مختلف مهار متابولیکی (Quenching) و استخراج برای تعیین کمی متابولیت‌های آمینو اسیدی درون سلولی رده سلولی Bacillus subtilis (ATCC 6633) که تولید کننده سرین پروتئاز قلیایی هست، بررسی شد. حلالهای مختلف، مانند متانول سرد، اتانول سرد، و مخلوط سرد استونیتریل:آب:کلروفرم، به همراه با یک سیستم فیلتراسیون سریع تحت خلاء برای آنالیز متابولوم B. Subtilis مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که متانول سرد، مناسب‌ترین تکنیک برای آنالیز متابولوم B. Subtilis بود. در ادامه با رویکرد هدفمند متابولیتهای درون سلولی آمینو اسیدی کمی گردید و نشان داد که سرین، و گلیسین فراوان ترین متابولیت های درون سلولی در B. Subtilis بودند.

کلمات کلیدی : متابولومیکس، متابولیت درون سلولی، استخراج، مهار متابولیکی.

مقدمه

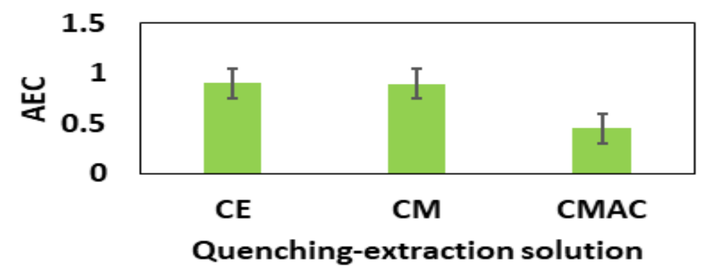
آنزیم سرین پروتئاز قلیایی (Enzyme Commission 3.4.21) با وزن مولکولی ~ ۴۲ کیلو دالتون) نقش مهمی در صنایع مختلف دارد. طبق گزارشها پیش‌بینی می‌شود که بازار جهانی سرین پروتئاز قلیایی تا پایان سال ۲۰۲۴ به ۸۹۵.۶ میلیون دلار برسد و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۳۳ به ارزش ۱.۶ میلیارد دلار برسد. این آنزیم ها پایداری و فعالیت بالایی در سطوح pH قلیایی (pH 8-10) دارند که آنها را برای استفاده در شوینده های قلیایی مناسب می کند [۱]. آنالیز متابولومیکس بر درک فرآیندهای متابولیک در سلول ها و محیط اطراف آن تمرکز دارد. متابولومیک یک بخش از زیست شناسی سیستم ها است که هدف آن بررسی و تعیین کمیت مولکول های کوچک (با وزن مولکولی کمتر از ۱.۵ کیلو دالتون) است که به عنوان متابولیت ها شناخته می شوند [۲]. با مطالعه متابولوم، که مجموعه کاملی از متابولیت‌ها را در یک سیستم بیولوژیکی مشخص نشان می‌دهد، محققان می‌توانند دیدگاه‌های ارزشمندی از مسیرهای بیوشیمیایی و فرآیندهای سلولی که به عملکرد کلی یک ارگانیسم کمک می‌کنند، به دست آورند (Buchholz et al., 2002). در این مطالعه، تکنیک‌های مختلف مهار متابولیک کردن و استخراج را برای تعیین کمی متابولیت‌های آمینو اسیدی درون سلولی رده سلولی Bacillus subtilis (ATCC 6633) برای اثربخشی آنها در استخراج و کمی‌سازی متابولیت‌ها آزمایش و ارزیابی شدند.

روش‌ها

در این مطالعه از سویه B. subtilis (ATCC 6633) استفاده شده است. باکتری‌ها از بانک سلول با دمای زیر ۷۵- درجه سانتی‌گراد در یک فلاسک ارلن مایر در محیط کشت ذوب شدند. هر لیتر محیط کشت شامل ۲.۱۰ گرم $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$، ۲.۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۱۲.۰ میلی گرم EDTA، ۰.۲ گرم $MgCl_2 \cdot 6H_2O$، ۲.۳ میلی گرم $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$، میلی گرم ۱.۵ $CaCl_2 \cdot 3H_2O$، ۴.۰ میلی گرم $FeSO_4 \cdot 5H_2O$، ۰.۱ میلی گرم Na_2MoO_4، ۰.۱۵ میلی گرم $CuSO_4 \cdot 3H_2O$، ۰.۵ میلی گرم $CoCl_2 \cdot 7H_2O$، ۲.۰ میلی گرم $MnCl_2 \cdot 4H_2O$، و ۴.۵۰ گرم گلوکز به عنوان منبع کربن تنظیم شده با pH 0.27±0.5 بود. برای تعیین کمیت غلظت سلولی از یک اسپکتروفتومتر (پرکین المر، ایالات متحده) در چگالی نوری ۶۰۰ نانومتر (OD600) استفاده شد. کشت اولیه بذر با OD600 اولیه ۰.۰۵ به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۳۰۰ دور در دقیقه در ۲۵۰ میلی لیتر شیک فلاسک ارلن مایر بافل در انکوباتور شیکر انکوبه شد تا کشت آماده شود. متابولیت‌های داخل سلولی با استفاده از کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی (LC-MS)، با استفاده از سیستم Waters LC با ستون XSelect HSS T3 اندازه‌گیری شدند. طیف سنجی جرمی در حالت یون منفی با استفاده از یونیزاسیون الکترواسپری با تنظیمات خاص بر روی یک سیستم Qtrap1 5500 AB SCIEX انجام شد.

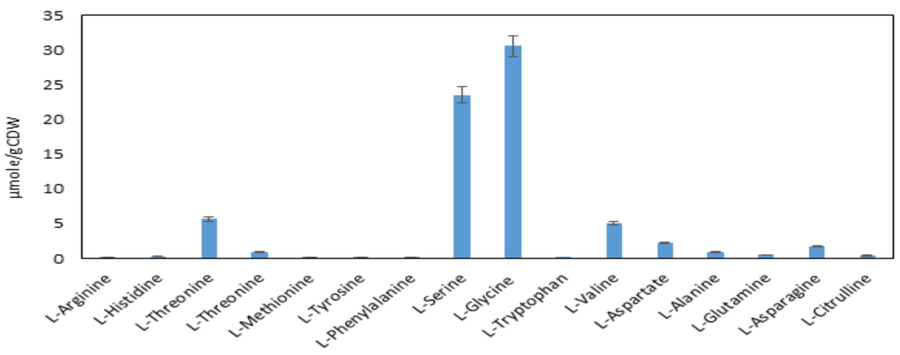
بحث و نتایج

نتایج نشان داد که هر محلول استخراج – مهار کننده متابولولیک دارای مزایا و معایب است که تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها قرار می‌گیرد. در مورد تجزیه و تحلیل متابولومیکس B.subtilis ATCC6633، یک روش فیلتراسیون سریع مبتنی بر فشار و به دنبال آن استخراج متانول سرد به دلیل کارایی و بازدهی قابل قبول در استخراج متابولیت‌های درون سلولی آمینو اسیدی، رویکرد مناسبی به نظر می‌رسد. همچنین براساس این یافته ها متانول سرد در غیرفعال کردن متابولیسم سلولی مطابق با شاخص انرژی ادنیلات (AEC) موفق بودند و آن در محدوده فیزیولوژیکی کنترل شده نگه داشته است(شکل ۱).



شکل ۱: اثر محلول های مختلف بر نسبت انرژی آدنیلات. مخلوط متانول-اتانول- استونیتریل CMAC، متانول سردCM، اتانول سرد:CE

متابولومیکس درون سلولی امینو اسیدی B.subtilis ATCC6633 همچنین مشخص شد که در بین اسیدهای آمینه، گلایسین، سرین و ترئونین دارای بالاترین غلظت درون سلولی هستند (شکل ۲). بیوسنتز سرین، گلیسین و ترئونین اسیدهای آمینه ضروری برای تولید آنزیم های SAP هستند.



شکل ۲: متابولیت های داخل سلولی آمینو اسیدی B.subtilis ATCC6633 در حال کشت در محیط های حداقل حاوی ۴.۵ گرم در لیتر گلوکز.

نتیجه گیری

بر اساس عواملی مانند راندمان خاموش کردن و تکرارپذیری تجربی، سیستم فیلتراسیون سریع تحت فشار همراه با محلول مهار کننده متابولیکی -استخراج متانول سرد به عنوان مناسب‌ترین روش برای انالیز متابولومیکس B. subtilis (ATCC 6633) تعیین شد. اسیدهای آمینه متابولیت های کمی سرین و گلیسین دارای بالاترین غلظت درون سلولی هستند

منابع

[1] Pinu, F.R. and Villas-Boas, S.G., 2017. Extracellular microbial metabolomics: the state of the art. Metabolites, 7(3), p.43.

[2] Paley, S. and Karp, P.D., 2024. The Omics Dashboard for Interactive Exploration of Metabolomics and Multi-Omics Data. Metabolites, 14(1), p.65.