فصل جزئي ودراسة بعض الصفات الحركية لإنزيم كلوتاثايون S-ترانسفيريز من السائل الامنيوني

طارق يونس احمد ، لؤي عبد الهلالي ، فرح يونس ملا علو *

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

*البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث.

(تاريخ الاستلام: ١٨ / ٤ / ٢٠١١ ---- **تاريخ القبول:** ٢٧ / ٩ / ٢٠١١)

الملخص

عزل إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز من السائل الامنيوني لامرأة حامل في الأسبوع الـ ٤٠ من الحمل ودراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية الإنزيم فضلا عن تحديد وزنه الجزيئي. إذ تم فصل أربع حزم رئيسة بتقنية الترشيح الهلامي للراشح البروتيني الناتج من الترسيب بكبريتات الامونيوم بعد عملية الفرز الغشائي (الديلزة)، وأظهرت الحزمة الثالثة فعالية عالية للإنزيم، بعدها قدر الوزن الجزيئي للإنزيم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي التي كانت بحدود ٢٢٧٨٧ دالتون.

وكما تم دراسة الظروف المثلى لقياس فعالية الإنزيم المنقى من السائل الامنيوني وأظهرت النتائج ان الظروف المثلى لعمل الإنزيم عند تركيز ٤٠ مايكروغرام/مل باستخدام المحلول المنظم الفوسفات بتركيز ٠,٠٩ مول/لتر عند أس هيدروجيني ٦,٤ وزمن التفاعل ١٤ دقيقة ودرجة حرارة ٢٥°م و ١٣,٥ ملي مول/لتر من مادة الأساس ١–كلورو ثنائي نايترو بنزين (CDNB) وباستخدام رسم لاين ويفر–برك تم إيجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت مكيلس (K_m) وكانت مساوية لـ ٠,٧٦ مايكرومول/دقيقة و ١٣,٣ ملي مول/لتر على التوالي. كذلك تمت دراسة تأثير بعض المثبطات على فعالية الإنزيم، وبينت النتائج أن كلوريد البنزيل كان من نوع التثبيط غير التنافسي عند تركيز ٣٠ ملي مول /لتر.

الكلمات الدالة: عزل، إنزيم كلوتاثايون S–ترانسفيريز، السائل الامنيوني، حمل.

المقدمة

يعرف السائل الامنيوني بأنه عبارة عن سائل شفاف ذي لون مائل للاصفرار يحيط بالجنين ويكون موجوداً في كيس الامنيوني Amniotic sac حول الجنين، وان اكبر كمية من السائل الامنيوني يكون في الأسبوع الـ 34 من مدة الحمل اذ يكونّ ما يقارب حوالي ٨٠٠ مل وتكون كميته في الأسبوع الـ ٤٠ عندما ينمو الجنين بصورة كاملة تقريبا ٦٠٠ مل [١].

اكد الباحث Janet واخرون [٢] وجود مركبات أصناف الأوكسجين الفعالة ومضادات أكسدة في السائل الامنيوني اذ تتغير تراكيزها بتغير العمر الحملي، خاصة في المدة الثانية وصعوداً من الحمل اذ تبدأ زيادة قدرة مضادات الأكسدة في السائل الامنيوني مع زيادة عمر الجنين ووزنه وتحاول مضادات الأكسدة حماية أغشية الخلايا من التأثيرات الضارة للجذور الحرة الموجودة في مراحل مختلفة من الحمل خاصة في حالة وجود مشاكل مع الحمل مثل مرض داء السكر او تأخير النمو الجنيني او كون الأم مستمرة بالتدخين، ومن جهة أخرى عَدَّ الباحثون بأن السائل الامنيوني لا يحتوي على العوامل الوقائية فقط ولكن قد يحتوي على عوامل خطرة ذات إشارة بيئية خطرة، وهذا ما أكده الباحثون الكنديون عن وجود المركبات السامة التي يمكن ان تؤثر على النمو العصبي والمناعي للطفل [٣].

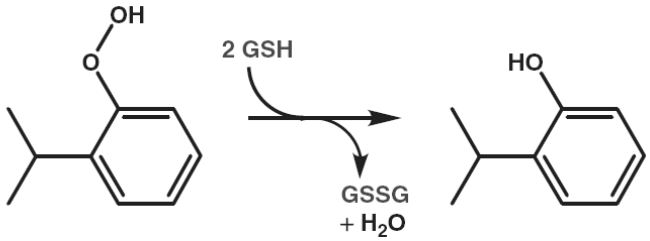
إنزيم كلوتاثايون S–ترانسفيريز (GST) (EC 2.5.1.18) عبارة عن بروتين ثنائي الوحدات يوجد في السايتوبلازم ويقسم الى أربعة أنواع وهي alpha, mu, pi, theta [٤]، ويعمل على أيض العديد من مركبات الغريبة Xenobiotics من ضمنها المركبات السرطانية [٥، ٦] اذ يلعب دوراً اساسياً في عمليات ازالة التسمم (على سبيل المثال المركبات السامة والتي قد تؤثر على نمو الجنين) [٧] ويعد ناقلاً حيوياً لعدد من مركبات المحبة للدهون Lipophilic [٤].

يحفز إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز الاضافة النيوكلوفيلية لكلوتاثايون على المركبات الكتروفيلية [٤] اذ تعد مجموعة الثايول Sulfhydryl group هي المجموعة الفعالة لGSH التي تسمح للهجوم النيوكلوفيلي لكلوتاثايون على المركبات الكتروفيلية R-X (كما في المعادلة ادناه) والمراكز الالكتروفيلية يمكن ان تكون كاربوناً او نيتروجيناً او كبريت [٨]

$$GSH + R\text{-}X \longrightarrow GSR + HX$$

على الرغم من ان المركبات الأساسية لكلوتاثايون S–ترانسفيريز الموجودة في الثدييات لم توضح بصورة جيدة إلا انه هناك إثباتات تبين دور α-GST ضد الكرب التأكسدي عن طريق تثبيط وإزالة سمية النواتج الفعالة الناتجة من بيروكسدة الدهن [٩]. فعلى سبيل المثال يلاحظ للإنزيم ان له دوراً مضاداً للأكسدة من خلال اختزال البيروكسيدات ليكون الكحول والماء وكلوتاثايون مؤكسداً كما في المعادلة الآتية:

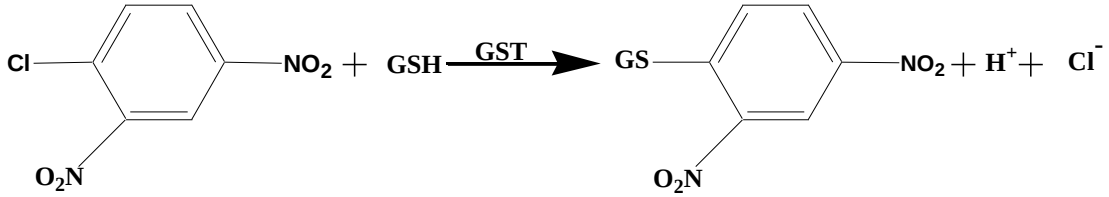
ISSN:1813 –



مشتق الكحول (الفينول) مشتق البيروكسيد

المواد وطرائق العمل

تم تقدير فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز حسب الطريقة المتبعة من قبل الباحث Habig واخرون [١٠]، يحفز إنزيم GST ارتباط المركبات التي تحتوي على المجاميع المحبة للالكترونات وخاصة الحلقات الاروماتية مثل المركب١–كلورو – ٤،٢ – ثنائي نايتروبنزين (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)) التي تعد مادة الأساس للإنزيم مع مجموعة الثايول(SH-) للكلوتاثيون المختزل (GSH) وبذلك يعمل على معادلة المواقع المحبة للالكترونات لينتج المركب Dinitrophenyl thioether وايون الكلور كما موضح في المعادلة أدناه:



تحضير الكواشف Preparation of Reagents

١. محلول الفوسفات المنظم بتركيز ٠,١١ مول/ لتر pH 6.25

٢. محلول الكلوتاثيون بتركيز (29.93 mM).

٣.محلول ١–كلورو–٢،٤– ثنائي نايتروبنزين بتركيز (22.463 mM) (CDNB).

طريقة العمل Procedure

تم وضع طريقة العمل لتقدير فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز كما في الجدول الآتي:

المحاليل	محلول البلانك	محلول الاختبار
محلول الفوسفاتي المنظمpH 6.25	2.7 ml	2.7 ml
المصل	-	100µl
ماء مقطر	100µl	-
محلول ١–كلورو–٢،٤– ثنائي نايتروبنزين	100µl	100µl
بعد مرور ٣ دقائق أضف محلول الكلوتاثيون	100µl	100µl

مزجت الأنابيب ثم قرأت الامتصاصية بعد الدقيقة الأولى والدقيقة العاشرة عند طول موجي 340 نانوميتر.

الحسابات Calculations

فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز (وحدة عالمية/لتر) تحسب اعتمادا على المعادلة الآتية :

$$\frac{\Delta A \times V_t \times 1000}{\varepsilon_o \times V_s \times d}$$

إذ أن:

الامتصاصية عند الدقيقة العاشرة– الامتصاصية عند الدقيقة الأولى.ΔA:

حجم الكلي.Vt:

حجم العينة. Vs:

معامل الامتصاص المولاري(٩,٦ ملي مول$^{-1}$).E_o :

طول الخلية (١سم).d:

تنقية إنزيم كلوتاثيون S-ترانسفيريز من السائل الامنيوني

Purification of glutathione-S-transferase (GST) from amniotic fluid

تم تنقية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز من السائل الامنيوني المأخوذ من امرأة حامل سليمة عمرها ٢٧ سنة وفي أسبوعها الـ٤٠ وزنها

ISSN:1813 –

٧٠,٥ كغم وطولها ١٥٥ سم (قيمة منسب كتلة الجسم Body mass index (BMI) تساوي ٢٩,٣ كغم/م^2) وفي الحمل الثالث اذ أجريت خطوات التنقية كالأتي :

١. الترسيب بكبريتات الامونيوم أو الإزاحة الملحية

تعد عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم من المراحل الأولى للتنقية والتي يتم خلالها ترسيب البروتينات الموجودة في المستخلص اعتماداً على درجة تشبع المستخلص بكبريتات الامونيوم [١١]، اذ تم إضافة كبريتات الامونيوم إلى المستخلص الإنزيمي بحالتها الصلبة وبتشبع كامل (75%)، وكانت إضافة كبريتات الامونيوم بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك الكهربائي لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 4°C، ومن ثم ترك المحلول ليستقر لمدة (24 ساعة) عند درجة حرارة 4°C لكي يتم ترسيب البروتينات بصورة كاملة.

بعد ذلك فصل الراسب عن السائل الرائق بجهاز الطرد المركزي بسرعة (9000 x g) ولمدة 40 دقيقة، بعد هذه العملية تم الحصول على راسب واحد أذيب في اقل كمية من الماء المقطر، ثم حسب حجم محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق الناتج وقدرت كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة Modified Lowry method [١٢] والمحورة لدى الباحثين Schacterle and Pollack [١٣].

وقيست فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز في محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق قبل إجراء خطوات التنقية اللاحقة. ثم حفظ محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق في درجة حرارة 20°C– لحين استخدامه مرة أخرى.

٢. الفرز الغشائي (الديلزة)

تمت عملية الفرز الغشائي في محلول بيكاربونات الامونيوم (NH_4HCO_3) بتركيز (0.1M) [١٤]، وأجريت عملية الفرز الغشائي عند درجة حرارة (4 C°) في الغرفة المبردة (Cold room) (في قسم العلوم الحياة /كلية العلوم/جامعة الموصل) مع التحريك بالمحرك المغناطيسي، واستمرت عملية الفرز الغشائي لمدة (٤٨ ساعة) مع مراعاة تبديل محلول الفرز الغشائي كل(١٢ ساعة).

٣. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (100 × 1.8 سم) والذي يحتوي على هلام السفيدكس من نوع (Sephadex G-75) على ارتفاع (85 سم) الذي يفصل المركبات ذات الأوزان الجزئية لغاية (70000 دالتون). واعتماداً على حجم العمود الذي يساوي 370 مل تم وضع الهلام على ارتفاع (85 سم) وذلك بسكب الهلام على جدران عمود الفصل (بهدوء وبشكل مائل لمنع تكون الفقاعات) وذلك بعد وضع قطعة مناسبة من صوف الزجاج.

كما تم تحديد حجم الروغان للمواد القياسية التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود وإيجاد منحني قياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي (للحزم البروتينية الناتجة من حقن المواد في عمود الفصل والتي تم تحديد حجوم روغانها أيضاً) من خلال رسم العلاقة الخطية بين حجوم رواغنها ولوغاريتم أوزانها الجزيئية المعلومة .

المواد والمحاليل المستخدمة في عمود فصل :

١. الماء المقطر
٢. المحلول البروتيني (السائل الرائق) الناتج من الخطوة ٢.
٣. الحامض الاميني التريتوفان (.Trp) لحساب الحجم الداخلي للعمود Internal volume (V_i).
٤. الدكسترات الأزرق Blue dextran لحساب الحجم الخارجي للعمود Void volume (V_o).
٥. ألبومين مصل البقر Bovine serum albumin (BSA).
٦. ألبومين البيض Egg albumin.
٧. الببسين Pepsin .
٨. البابين Papain.

تمت عملية حقن المواد المذكورة آنفاً بحجم ٢ مل في عمود الفصل بشكل دائري وعلى جدران عمود الفصل تبعها الغسل بالماء المقطر والذي استخدم أيضاً كمحلول روغان Elution solution . وتمت عملية الجمع بمعدل جريان (60 مل /ساعة) وبمعدل(5 دقائق) لكل جزء من جهاز جامع الأجزاء الذي يعمل بنظام الدقائق. كما تمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس الامتصاصية للأجزاء المفصولة عند طول موجي 280 نانوميتر في جهاز المطياف الضوئي. فضلاً عن ذلك تمت متابعة فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز في كل جزء من الأجزاء المفصولة عند حقن المواد في عمود الفصل لغرض متابعة فعالية الإنزيم خلال عملية الفصل، ليتم بعد ذلك جمع الأجزاء البروتينية الحاوية على الفعالية الإنزيمية.

٤. تقنية التجفيد (التجميد والتجفيف) Lyopholizer

تم تجفيد الحزمة البروتينية الثالثة الناتجة من عمود الفصل والحاوية على فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز، بعد ذلك تمت دراسة الظروف المثالية على فعالية الإنزيم لغرض تحديد الظروف المثلى لعمل الإنزيم: تركيز الإنزيم، زمن التفاعل، التركيز والأس الهيدروجيني للمحلول المنظم المستخدم في قياس الفعالية، درجة حرارة التفاعل وتركيز مادة الأساس.

النتائج والمناقشة

توضح النتائج الآتية إن فعالية الإنزيم تتركز في الراشح الناتج من الترسيب وقد يعود السبب كون العينة الاصلية كانت مخففة بالسوائل مختلفة التركيب اذ يشكل الماء فيها العنصر الأساسي والمكون الرئيس للسائل الامنيوني اذ تبلغ النسبة ما يقارب ٩٨% والتركيب الكيميائي قد يتفاوت حسب مدة الحمل [١] ، أظهرت عملية الفرز الغشائي للراشح الناتج من عملية الترسيب زيادة في فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز وذلك بسبب خروج المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزئية الصغيرة (التي تقل عن 14000 دالتون) [١٥]، وكما هو موضح في الجدول (١).

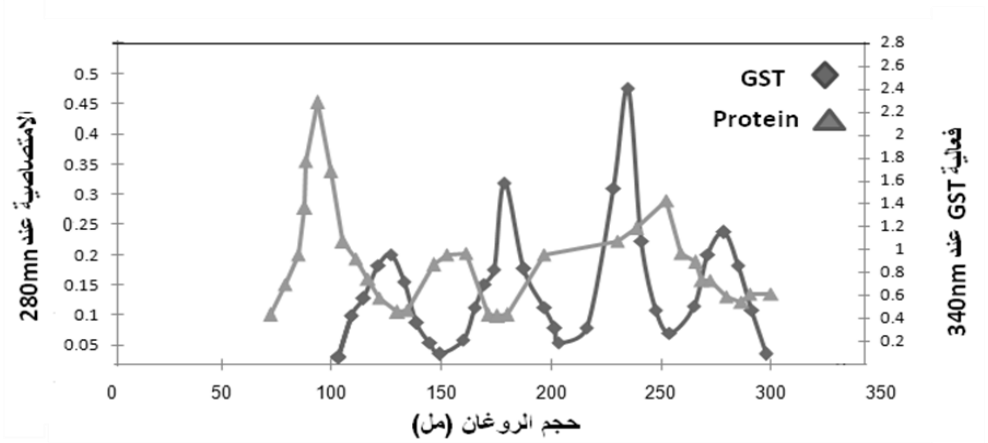
الجدول ١: خطوات تنقية الإنزيم كلوتاثايون S–ترانسفيريز من السائل الامنيوني.

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين الكلي (ملغم/مل)	الفعالية (وحدة إنزيم/مل)	الفعالية الكلية (*وحدة إنزيم)	الفعالية النوعية (وحدة إنزيم /ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
السائل الامنيوني	100	3.2	0.06	6	0.0187	1.0	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم	35	5.06	0.014	0.49	0.0028	0.14	8
الراشح	75	0.53	0.06	4.55	0.113	6.1	76
الديلزة	80	0.441	٠,٠٥٢	٤,١٦	0.117	6.3	69
الترشيح الهلامي G-75							
القمة A	37.5	0.159	0.019	0.71	0.119	6.4	12
القمة B	23.4	0.093	0.02	0.47	0.235	11.5	8
القمة C	30	0.178	0.081	2.43	0.45	24.3	41
القمة D	29.5	0.081	0.014	0.413	0.172	9.2	7

*وحدة الإنزيم: هي عبارة عن كمية كلوتاثايون S–ترانسفيريز التي تحول مايكرومول واحد من ١–كلورو ٤،٢– ثنائي نايتروبنزين الى ناتج لكل دقيقة لكل مليليتر تحت الظروف المحددة للقياس.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

استخدمت هذه التقنية في عملية فصل المركبات البروتينية التي تم الحصول عليها من الترسيب بكبريتات الامونيوم (بعد أن اجري عليها عملية الفرز الغشائي). وقد استخدم فيها عمود الفصل الحاوي على هلام نوع Sephadex G-75، إذ أن روغان المحاليل البروتينية الناتجة من عملية الفرز الغشائي أعطى اربع حزم بروتينية (لكلوتاثايون S– ترانسفيريز) تابعة للمحلول البروتيني للسائل الامينوني (الشكل ١) وكانت حجوم روغانها لقمة الحزم الأولى والثانية والثالثة والرابعة (120.2 مل) و(175.5 مل) و(235.1 مل) و(280.6 مل) على التوالي ومن خلال متابعة فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز وجد أن فعالية الإنزيم تتركز بشكل اكبر في الحزمة الثالثة (قمة C)، كما يلاحظ في الجدول (١) والشكل (١).



الشكل ١ : المظهر الجانبي لروغان الحزم البروتينية لإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز الناتجة من عمود الفصل والعائدة لسائل الامنيوني بوساطة تقنية الترشيح الهلامي.

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي :

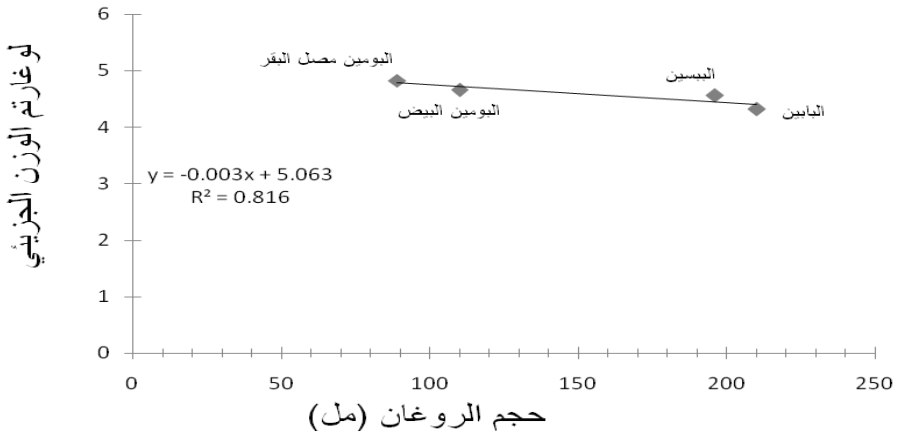
تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الثالثة الحاوية على فعالية الإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز للمحلول البروتيني للسائل الامنيوني والناتج من عمود الفصل باستخدام تقنية الترشيح الهلامي، اذ تم إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي والتي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (٢٠٤ – ٢٠٠٠٠٠٠ دالتون) على عمود الفصل الأول لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (V_i) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (V_o) والجدول (٢) يبين المواد التي تم إمرارها على عمود الفصل الحاوي على هلام (Sephadex G-75) مع أوزانها الجزيئية وحجوم روغانها.

الجدول ٢: الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفيدكس Sephadex G-75.

أسم المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (مل)
الدكستران الازرق Blue dextran	2000000	٨٥,١
ألبومين مصل البقر Bovine serum albumin	67000	95.2
ألبومين البيض Egg albumin	45000	110.6
الببسين Pepsin	36000	196.1
البابين Papain	٠٠٠٢٣	210.4
التربتوفان Tryptophan	204	275.7
المجهول(قمة C)	٢٢٧٨٧	*235.1

* اخذت هذه القيمة من الشكل (١) الذي يظهر فيه حجوم روغان القمم المفصولة بوساطة تقنية الترشيح الهلامي.

عند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي يظهر خط مستقيم كما في الشكل (٢) الذي حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز والناتجة من عمود الفصل في تقنية الترشيح الهلامي والذي اعطى بقيمة 22787 دالتون للقمة C التي أظهرت فيها أعلى فعالية للإنزيم وهذا يتفق مع الأدبيات والمستحصل عليها من الانسجة المختلفة [١٦،١٧،١٨، ١٩ ،٢٠].



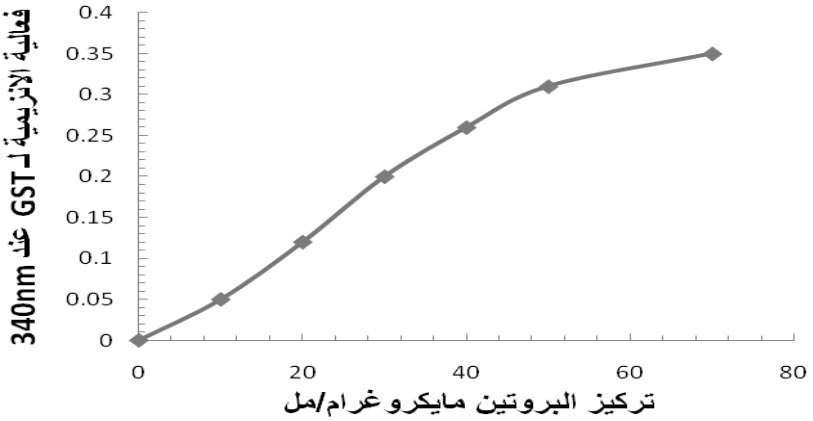
الشكل ٢ : المنحنى القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل (Sephadex G-75).

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز المفصول من السائل الأمنيوني:

تكون التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات حساسة للظروف الخارجية مثل كل التفاعلات الكيميائية، وهكذا فان تركيز الإنزيم وتركيز المادة الأساس ودرجة الحرارة والاس الهيدروجيني(الدالة الحامضية)(pH) تؤثر على معدل سرعة التفاعل الإنزيمي لان جميع هذه العوامل تؤثر على الموقع الفعال للإنزيم وتؤثر على تكوين معقد الإنزيم والمادة الأساس [١٥]. ولغرض التعرف على فعالية الإنزيم بصورة دقيقة يكون من الواجب دراسة العوامل المؤثرة على فعالية الإنزيم وإيجاد الظروف المثلى التي يعمل بها إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز. واستخدمت الحزمة البروتينية الثالثة (قمة C) مصدراً لإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز في إيجاد الظروف المثلى.

١. تأثير تركيز الإنزيم:

تم قياس فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز بوجود تراكيز مختلفة من الإنزيم المنقى جزئيا من السائل الامنيوني تتراوحت بين (10-80 مايكروغرام/مل) مع ثبوتية تركيز مادة الأساس التي يعمل عليها الإنزيم ويبين الشكل (٣) العلاقة بين فعالية الإنزيم وتركيز الإنزيم بثبوت العوامل الأخرى، اذ يلاحظ أن سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز الإنزيم، واستخدم تركيز (40 مايكروغرام/مل) من الإنزيم تركيزاً ثابتاً في جميع التجارب اللاحقة .



الشكل ٣ : تأثير التراكيز المختلفة من إنزيم GST على الفعالية الإنزيمية.

٢. تأثير المحلول المنظم :

١,٢. تركيز المحلول المنظم :

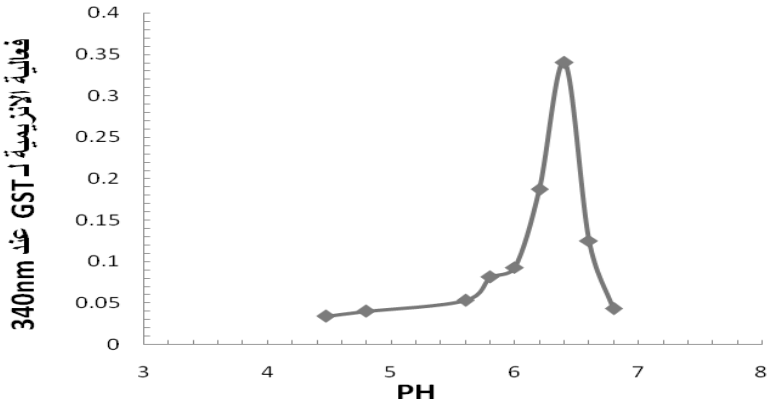
تمتاز المحاليل المنظمة بكونها مقاومة للتغير في تركيز ايون الهيدروجين عند إضافة كميات قليلة من حامض أو قاعدة إلى المحلول، وتعد معرفة تركيز المحلول المنظم ضرورية لقياس فعالية الإنزيمات. وتم استخدام تراكيز مختلفة من المحلول المنظم الفوسفات وبمدى (0.05-0.17 مول/لتر) وبأس هيدروجيني مقداره (٦,٤)، اذ بينت النتائج أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند تركيز (0.09 مول/لتر) كما هو مبين في الجدول (٣).

الجدول ٣ : تأثير التراكيز المختلفة للمحلول الفوسفات المنظم على فعالية إنزيم كلوتاثايون S- ترانسفيريز.

تركيز المحلول المنظم الفوسفاتي (مول/لتر)	فعالية الإنزيم كلوتاثايون S- ترانسفيريز (وحدة عالمية/مل)
0.05	2.0
0.07	0.25
0.09	**0.3**
0.11	0.26
0.14	0.22
0.17	0.106

٢,٢. الأس الهيدروجيني للمحلول الفوسفات المنظم:

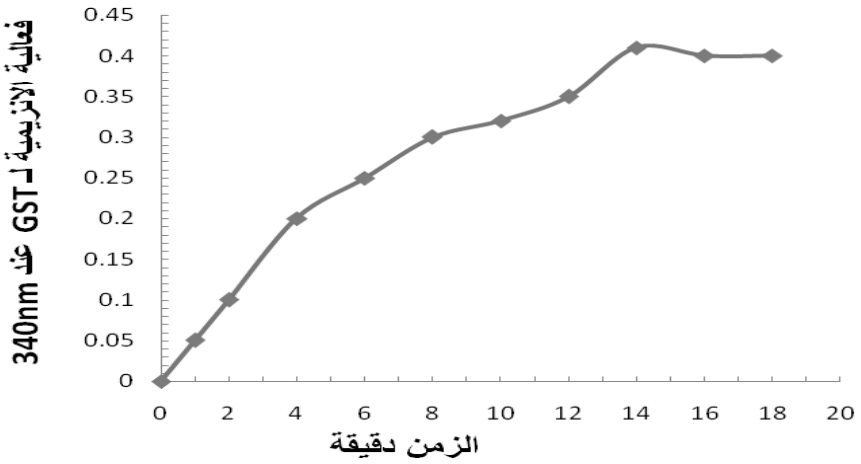
إن لكل إنزيم أس هيدروجيني (pH) معين يظهر عنده الإنزيم أعلى فعالية له تسمى بالأس الهيدروجيني الأمثل (Optimum pH) ولقد لوحظ أن استخدام أس هيدروجيني عالٍ جداً أو واطئ جداً يؤدي إلى حدوث تشوه في طبيعة الإنزيم مما يسبب ذلك فقدان فعاليته وتم قياس فعالية إنزيم كلوتاثايون S-ترانسفيريز في محلول منظم (0.09 مول/لتر) مع تغير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم لغرض أيجاد أعلى فعالية للإنزيم، وتشير النتائج الموضحة في الشكل (٤) إلى أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند أس الهيدروجيني ٦,٤.



الشكل ٤: تأثير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم على فعالية إنزيم GST.

٣. زمن التفاعل :

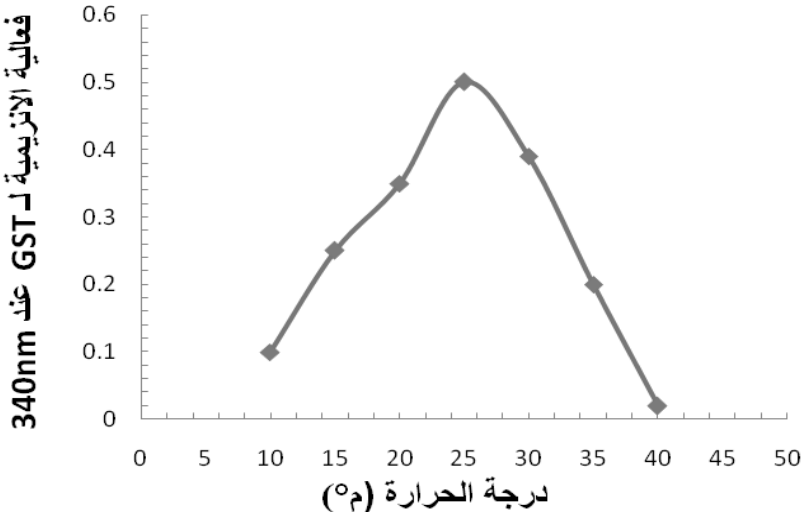
تمت دراسة زمن التفاعل لاختيار المدة الزمنية المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل (٥) أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند (14 دقيقة) ولذلك تم اختيارها لقياس فعالية الإنزيم في جميع التجارب اللاحقة .



الشكل ٥: العلاقة بين فعالية إنزيم GST وزمن التفاعل.

٤. تأثير درجة الحرارة:

التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات تتأثر بدرجة الحرارة كما هو الحال مع كل التفاعلات الكيميائية لكن بسبب الحساسية العالية للإنزيمات نحو التغيرات الحرارية بسبب طبيعتها البروتينية تتحدد درجة نشاط الإنزيمات في مجال ضيق من درجة الحرارة، ولذلك يلاحظ ازدياد معدل سرعة التفاعل المحفز بالإنزيم كلما ازدادت درجة الحرارة وعند استخدام درجات حرارة أعلى من درجة الحرارة المثلى Optimum temperature (وهي درجة الحرارة التي يبدي عندها الإنزيم أقصى فعاليه له) يحصل انخفاض في معدل سرعة التفاعل بسبب حصول مسخ Denaturation في طبيعة الإنزيم نتيجةً لتفكك الأواصر الهيدروجينية والقوى الأخرى المسؤولة عن المحافظة على التركيب الثلاثي للبروتين ومن ثم فقدان الإنزيم لفعاليته[١٥] ولذلك تم إجراء قياس فعالية الإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز في درجات حرارية مختلفة وكما هو موضح في الشكل (٦).



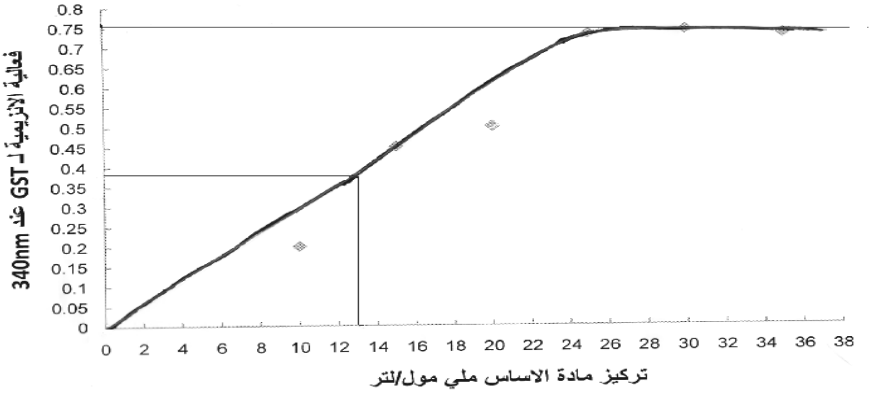
الشكل ٦ : تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية إنزيم GST.

إذ يلاحظ من الشكل أعلاه أن الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي إلى رفع فعالية الإنزيم تدريجياً إلى حد (25°C) يحصل بعدها انخفاض واضح في فعالية الإنزيم، ولقد تم اختيار درجة حرارة (25°C) لقياس فعالية الإنزيم في جميع التجارب اللاحقة.

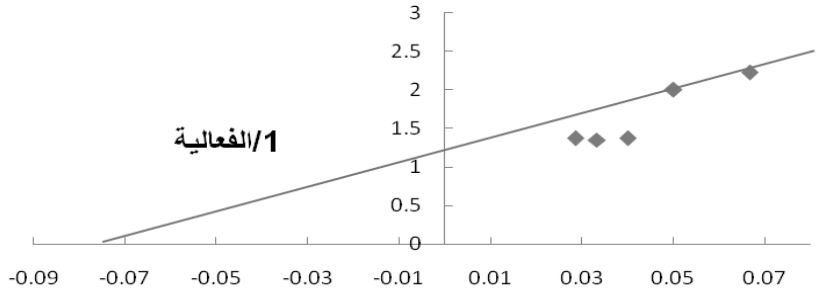
٥. تأثير تركيز مادة الأساس:

ISSN:1813 –

عندما يكون تركيز الإنزيم في خليط التفاعل ثابتاً فان الزيادة في تركيز مادة الأساس تتسبب في البداية بارتفاع كبير في معدل سرعة التفاعل الإنزيمي، لكن الاستمرار بزيادة تركيز المادة الأساس يؤدي إلى حصول انخفاض في مقدار الزيادة الحاصلة في معدل سرعة التفاعل الإنزيمي إلى أن تصبح السرعة ثابتة مهما زاد تركيز المادة الأساس، ويطلق على السرعة عند أعلى تركيز للمادة الأساس بالسرعة القصوى للإنزيم (V_{max}) [٢١]. ولمعرفة العلاقة بين إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز وتركيز المادة الأساس ١–كلورو ثنائي نايترو بنزين (CDNB) تم قياس فعالية الإنزيم بوجود تراكيز مختلفة من مادة الأساس تتراوح بين (١٠–٣٥ ملي مول/لتر) والشكل (٧) يبين أن زيادة تركيز مادة الأساس يعمل على زيادة سرعة التفاعل الإنزيمي حتى تصل إلى قيمة لا تحدث بعدها زيادة في سرعة التفاعل الإنزيمي وبذلك يمكن تحديد تركيز مادة الأساس اللازمة لحصول السرعة القصوى (V_{max}) للإنزيم، وهذا مطابق لما أثبته العالمان ميكيلس ومنتن اذ أوضحا أن استخدام تراكيز واطئة من مادة الأساس يجعل المواقع الفعالة للإنزيم غير مشبعه بمادة الأساس وعليه فان سرعة التفاعل الإنزيمي تعتمد على تركيز مادة الأساس، لكن عند زيادة تركيز مادة الأساس المستخدمة بشكل كبير بحيث تصبح المواقع الفعالة للإنزيم مشبعة بالمادة الأساس فان سرعة التفاعل الإنزيمي تكون غير معتمدة على تركيز المادة الأساس [١١] ويبين الشكل(٧) أن تشبع الإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز بمادة الأساس كان عند تركيز (20 ملي مول/لتر) من CDNB، وباستخدام رسم لاينويفر-برك (Lineweaver-Burk plot) وجد أن قيمة السرعة القصوى(V_{max}) وثابت ميكيلس (K_m) لإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز GST هي (٠,٧٦ مايكرومول/دقيقة) و(١٣,٣ ملي مول/لتر) على التوالي وكما موضح في الشكل التالي (٨).



الشكل ٧ : تأثير تراكيز مختلفة من مادة الأساس (CDNB) على فعالية إنزيمية.



الشكل ٨ : رسم لاينويفر– برك لتوضيح قيمتي ثابت ميكيلس والسرعة القصوى.

٦. تأثير المثبطات على فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز:

يوجد عدد من المركبات التي تعمل على تثبيط فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز وتقلل من سرعة التفاعل الإنزيمي وتم استخدام نوعين فقط من المثبطات لتوفرهما:

١,٦. ترانس ٤–فينايل ٣–بيوتين ٢–ون Trans-4-phenyl-3-buten-2-one

إن استخدام ترانس ٤– فينايل ٣– بيوتين ٢– ون مثبطاً للإنزيم إذ لوحظ انه يتفاعل مع الإنزيم بشكل سريع جداً ومن ثم يتنافس مع المادة الأساس ١–كلورو ثنائي نايترو بنزين (CDNB) من خلال تكوينه مركب S-(-2-Chloro-4-nitrophenyl)glutathione ليقلل من سرعة التفاعل الإنزيمي وهذا يتفق مع الباحثين Habig واخرون [١٠].

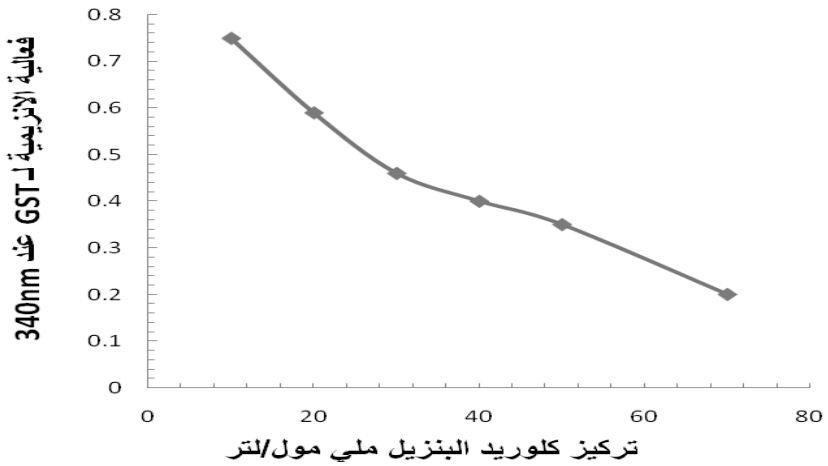
ISSN:1813 –

الجدول ٤ : فعالية الإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز بوجود المثبط ترانس ٤– فينايل ٣– بيوتين ٢– ون.

تركيز المثبط (ملي مول/لتر)	فعالية الإنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز (وحدة عالمية/مل)
10	٦-0.00
20	١٨-0.0
30	٢٨-0.0
40	٣١-0.0
50	٣٤-0.0
70	٠٥-0.

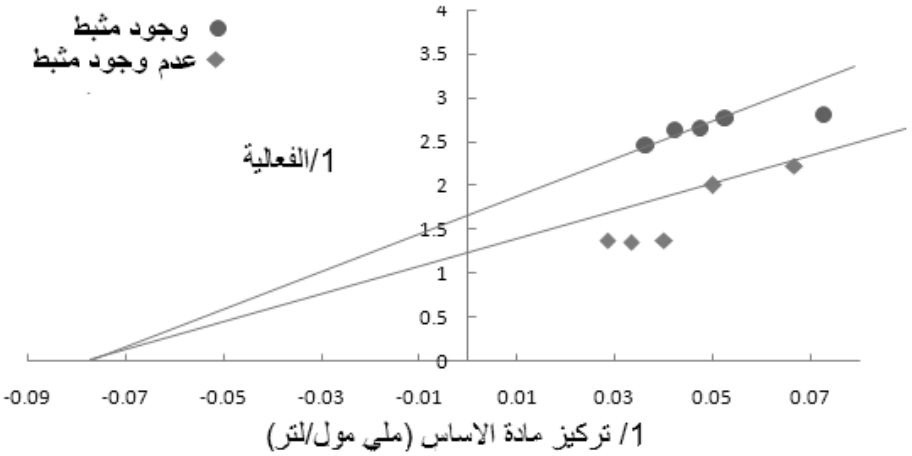
٢,٦. كلوريد البنزيل Benzyl chloride

استخدام كلوريد البنزيل مثبطاً للإنزيم اذ وجد انه يتفاعل مع الإنزيم المنقى ويكون مركبS-benzyl glutathione الذي يقلل من فعالية الإنزيم بزيادة تركيزه، ويوضح الشكل (٩) سلوك مركب بنزيل كلوريد كمثبط للإنزيم كلوتاثايون S–ترانسفيريز.



الشكل ٩ : تأثير تراكيز المختلفة مادة كلوريد البنزيل على فعالية إنزيمية.

وعند استخدم رسم لاينويفر– برك لايجاد نوعية عمل المثبط كلوريد البنزيل بينت النتائج ان التثبيط من نوع غير التنافسي والذي يطابق ما وجده الباحث Al-Helaly [٢٠] وكما هو موضح في الشكل (١٠)



الشكل ١٠ : رسم لاينويفر–برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام المثبط كلوريد البنزيل.

ملخص الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز:

إن الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم كلوتاثايون S– ترانسفيريز المنقى من السائل الامنيوني موضحة في الجدول (٥).

الجدول ٥ : الظروف المثلى للإنزيم المنقى.

تركيز الإنزيم (مايكروغرام/مل)	زمن التفاعل (دقيقة)	الأس الهدروجيني	التركيز للمحلول المنظم الفوسفاتي (مول/لتر)	درجة الحرارة (م°)	تركيز مادة الأساس (ملي مول/لتر)
٤٠	١٤	6.4	٠,٠٩	25	١٣,٣

المصادر

1-Modena, A. B. and Fieni, S. 2004. Amniotic fluid dynamics. *Acta. Bio. Med. Aten. Par*. 75 Suppl. 1: 11-13 .

2-Janet, M., Burlingame, M. D. and Navid, E. D.V.M. 2003.Total antioxidant capacity and reactive oxygen species in amniotic fluid. *Obst. Gyne*. 4: 756-61.

3-Benassi, B., Accorsi, F., Marconi, L. and Benassi, G. 2004. Psychobiology of the amniotic environment. *Acta. Bio. Med. Aten. Parm*. 75(1): 18-22 .

4-Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., De Bruyn, M. A., Knapen, M. F. C., Merkus, H. M. W. and Steegers,E. A. P. 1999. Glutathione S-transferase isoenzymes in decidua and placenta of preeclamptic pregnancies. *Obst. Gyne*. 94(6): 1033-1038.

5-Habdous,M., Vincent-Viry,M., Visvikis,S. and Siest, G. 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Elsev. Sci*. B.V. 326(1-2) :131-142.

6-Jurczuk, M., Jakoniuk, M. J. and Rogalska, j. 2006. Glutathione-related enzyme activity in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Polish. J. Envi. Stud.* 15(6): 861-868.

7-Raijmakers, M. T. M., Steegers, E. A. and Peters, W. H. M. 2001. Glutathione S- transferase (GST) and thiol concentrations in embryonic and early fetal tissues. *Hum. Repr*. 16(11): 2445-2450.

8-Stipanuk, M. H.2000. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. W.B. Saunders Company. USA. p.910.

9-Singhal, S. S., Saxena M., Ahmad, H., Awasthi, S., Haque A. K. and Awasthi, Y. C. 1992. Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of thea-class isozymes against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*.299: 232–241.

10-Habig, W. H. , Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biochem*. 249(22):7130-7139.

11-Robyt, F. J. and White, J. B. 1987. Biochemical Techniques Theory and Practice. Books / Cole Publishing Com., USA.

12-Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 . Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biochem*., 193: 265-275 .

13-Schacterle, G. R. and Pollack, R. L. 1973. Asimplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. *Anal. Biochem*. 51: 654-655.

14-Plummer, T. D. 1978. An introduction to practical biochemistry. 2nd ed., McGraw - Hill Book Comp., U. K.

١٥- احمد، طارق يونس و الهلالي، لؤي عبد، ٢٠١٠. الكيمياء الحياتية، الجزء الاول، دار ابن الاثير للطباعة والنشر، موصل/ العراق. ص ٢٩٢،٣٨٣،٣٩٣،٤٠٣.

16-Gronwald, J. W. and Plaisance, K.L. 1998. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plan. Phys*. 117: 877–892.

17-Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M. and Girard, J.P. 2001. Differential induction of glutathione S-transferases in the clam Ruditapes decussatus exposed to organic compounds. *Envi. Toxi. Chem*. 20(3): 523-529.

18-Goughlin, S. S. and Hall, I. J. 2002. Genetics in medicine: Glutathione –S- transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer. *Atla*. 4(4):250-257.

19-Baraczyk-Kuoma, A., Kuoma, M., Gutowicz, M., Kaomierczak, B. and Sawicki, J. 2004. Glutathione S-transferase π as a target for tricyclic antidepressants in human brain. *Acta. Biochem. Polo*..51(1):207–212.

20-Al-Helaly, L. A. A. 2007. Partial separation and some kinetic studies of glutathione S-transferrase (GST) in human serum. *J. Raf. Sci*. 18(2):

21-Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2007. Biochemistry. W. H. Freeman and Company. New York, USA. pp. 138,139,145,146,149, 687.

Partial Separation and Some Kinetic Studies of Glutathione S-transferase (GST) in Amniotic fluid

Tareq Y. Ahmad , Luay A. Al-Helaly , Farah Y. Mla-Alw
Department of Chemistry , College of Science , Mosul University , Mosul , Iraq
(**Received:** 18 / 4 / 2011 ---- **Accepted:** 27 / 9 / 2011)

Abstract

The research includes the isolation of glutathione S-transferase from the amniotic fluid of normal pregnancy at 40 week, studying the factors effecting the activity of the enzyme and determination of its molecular weight. Four bands components had been isolated by gel filtration chromatography from the proteinous supernatant produced by ammonium sulfate saturation after dialysis. It was found that the third peak had a high activity for the enzyme. The apparent molecular weight of the isolated enzyme using gel filtration chromatography was (22787) Dalton.

The results also showed that the optimum conditions of glutathione S-transferrase were obtained at (40µg/ml) of enzyme concentration using (13.5 mmol/l) of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate, phosphate buffer (0.09 mol/l) as a buffer at pH (6.4) for (14) minutes at (25°C). Using lineweaver–Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were (0.76 µmol/ min) and (13.3 mmol/l) respectively. The study showed the effect of some inhibitors on the enzyme activity. Benzyl chloride possessed a noncompetitive inhibition for the enzyme at a concentration of (30 mmol/l).

Keywords: Separation, Glutathione S-transferase, Amniotic fluid, Pregnancy.