---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 20، العدد 1، ص81-92، 2009 ----

تنقية جزئية لمتناظرات انزيم 5´-نيوكليوتايديز من امصال المصابين بفقر الدم

فراح غالي الصالحي *قسم الكيمياء* *كلية التربية للبنات* *جامعة تكريت*

إسراء إسماعيل ياسين *قسم الكيمياء* *كلية التربية للبنات* *جامعة تكريت*

صباح حسين خورشيد *قسم الكيمياء* *كلية العلوم* *جامعة تكريت*

(تاريخ الاستلام 2008/3/19 ؛ تاريخ القبول 2008/9/8)

الملخص

تضمن البحث فصل و تنقية جزئية لمتناظرات انزيم 5´-Nucleotidase من امصال دم المصابين بفقر الدم، حيث شملت التنقية عدة خطوات بدءا بالترسيب بإضافة كبريتات الامونيوم والفـرز الغـشائي (الديلزة) ثم فصل متناظرات انزيم 5´-NT من الجزء البروتيني المفصول من كيس الديلزة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني (DEAE-Cellulose A-50) حيث تم الحصول على ثـلاث متنـاظرات لـ 5´-NT وبدرجات نقاوة متفاوتة بلغت اعلاها للمتناظر III (22.13مرة).

وشمل البحث ايضا الدراسات الحركية للمتناظرات المفصولة اعلاه والمتـضمنة تـأثير التراكيـز المختلفة للمادة الاساس 5´-AMP وتعيين قيم الثابت Km للمتناظرات الثلاث المنقـاة مـن امـصال دم المصابين بفقر الدم حيث بلغت 14.08 ، 12.98 و 8.4 ملي مولار على التوالي مقارنة بالاصحاء حيث بلغت 13.0 ، 14.08 و 15.6 ملي مولار.

كلمات المفتاح: (5´- نيوكليوتايديز، تنقية جزئية، فقر الدم).

Partial Purification of 5´-Nucleotidase Isoenzymes from Blood Sera of Anemic Patients

Ferah G. Al-Salihi *Department of Chemistry* *College of Education for Girls* *Tikrit University*

Asra'a I. Yaseen *Department of Chemistry* *College of Science* *Tikrit University*

Sabah H. Khorsheed *Department of Chemistry* *College of Science* *Tikrit University*

ABSTRACT

In this study, 5´-Nucleotidase isoenzymes were partially purified from blood sera of anemic patients, through different steps including: Protein precipitation with ammonium

sulfate and dialysis. Three isoenzymes were isolated from dialyzed protein fraction by using Anion-exchange chromactography (DEAE-Cellulose A-50), with maximum purification folds (22.13) for isoenzyme III.

In addition, the kinetic studies for the isolated isoenzymes were carried out, which included the effect of different substrate (5′- AMP) concentration and determination their Km values: 14.08, 12.98 and 8.4 (mM) respectively compared to normal; 13.0, 14.08 and 15.6 (mM).

المقدمـــة

يعد انزيم 5′-نيوكليوتايديـز (5′-NT) من أنزيمات الفوسفاتيز التي تعمـل علـى النيوكليوسـيدات 5′-احاديـة الفوسفـات مثـــل الادينوسين 5′- احادي الفوسفـات؛ إذ يعمل على إزالة الفوسفات غير العـضوي (Pi) المتأستر مع ذرة كاربون رقـم (5′) لـسكر الرايبـوز أو الديوكـسي رايبـوز لجزيئـات النيوكليوتيـد (Zimmermann, 1992).

وهو بصورة عامة يقسم إلى نوعين من المتناظرات، المتناظر السايتوبلازمي (ذائب فـي الـسايتوبلازم) Cytoplasmic والمتناظـر المرتبط بالجدار Membrane bound isoenzyme، وهذا التصنيف يستند إلـى وجود الأنزيم ضمن الخلية. يلاحظ ان المتناظر المرتبط بالجدار والذي يسمىEcto- 5′-Nucleotidase (eN) يكون مرتبطـــا بالسطح الخارجي للخلية، يـدخل في عمليـة الايـــض الخلوي للنيوكليوتيـــدات كأنـــزيم خارجي ecto-enzyme (Bianchi and Spychala, 2003).

أما دور 5′-نيوكليوتايديز السايتوبلازمي فانه يرتبـــط مع تحلل ATP داخل الخلية عن طريـق AMP إلى الادينوسين أو عن طريق الاينوسين احادي الفوسفات Inosine monophosphate (IMP) إلى الاينوسـين (Hokari and Sakagishi, 1992 ; Fritzson, 1991). ويعد أنزيم 5′- نيوكليوتايديز من الأنزيمات الواسعة الانتشار في الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية وكذلك بعض أنواع الابتدائيات والطفيليات وانه موجود فـي العديد من أنسجة جسم الإنسان (Zimmermann, 1992 ; Tietz, 1987).

لقد شملت الدراسات السابقة تنقية هذا الانزيم من المصادر المختلفة ودراسة خواصه بالتفـصيل، فقـــد استطـــاع الباحثـــان (Song and Bodansky, 1966) من تنقيته من الكبد. ولوجوده في أنـواع مختلفـــة من البكتـريا فقـد استطاع (Dovorak *et al*., 1966) من تنقيتـــه مـــن البكتريـا (E-coli) ووضـع (Sulkowski *et al*., 1963) طريقة لتنقيته من سـم Bothrops atrox، وتمـت تنقيتـه مـن سـم الكـوبرا (Itoh *et al*.,) Sakhibov *et al*., 1970). واستطاع (Ipata, 1967) من تنقيته من مخ الخروف. والباحـث (1978) قام بتنقية الأنزيم المأخوذ من خلايا كبد الدجاج واثبت وجوده في السايتوبلازم. وتمكن (Itoh, 1981) من دراسة 5′- نيوكليوتايديز في سايتوبـلازم خلايا كبـد الفئران ووجد فعاليته في سايتوبلازم كبد الـدجاج أعلـى منها في سايتوبلازم كبد الفئران، في حين تمكن الباحث (خورشيد، 1995) من تنقية الأنزيم من كبد الأغنام.

لانزيم 5′-نيوكليوتايديز استخدامات مهمة في المجالات الطبية فقد لوحظ ارتفاع مستوى الأنزيم في مصل الدم بأمراض الكبد المختلفة، مثال ذلك مرض الكبد الصفراوي (اليرقـان) وخـصوصا اليرقـان ألانسدادي، وكان نشاطه مساويا للنتائج المستحصلة من دراسة أنزيم الفوسفاتيـــز القاعدي. وأنـزيم 5′-

Nucleotidase لا يتأثر بأمراض العظام مثل مرض paget's وغيره أذ يبقى محافظا على مستواه الطبيعي (Dixon and Purdon, 1952 ; Yonng, 1958). كما لوحظ انخفاضاً في فعالية أنزيم 5´- نيوكليوتايديز عند المرضى المصابين بمتلازمة العوز المناعي المكتسب AIDS مقارنة بالأصحاء (Murry *et al*., 1984)، وكذلك يزداد 5´- نيوكليوتايديز في بعض الامراض السرطانية Malignancy خصوصا التي تؤدي إلى حدوث انسداد في القناة الصفراوية (Kaplan and Pesce, 1989). فضلا عن ذلك وجد ارتفاع مستوى فعالية الأنزيم في مصل دم المصابات بسرطان المبيض مقارنة بالأصحاء وأورام المبيض الحميدة (Pragathi *et al*., 2005).

وقد درس أنزيم بريميدين 5´- نيوكليوتايديز في كريات الدم الحمر للإنسان فلوحظ انخفاضاً فعاليته في الأشخاص المصابين بفقر الدم Anemic patients والذي يؤدي إلى تكدس كميات هائلة من نيوكليوتيدات اليوريدين والسايتدين في دمهم (Peglia *et al*., 1984).

وفي سايتوبلازم خلايا طحال الفئران المصابة بفقر الدم Anemic rats الناتج عن إعطائهم مادة الفينايل هيدرازين درس أنزيم 5´- نيوكليوتايديز إذ سببت زيادة في الفعالية بمقدار ثلاثة أضعاف قيمتها الطبيعية (Hokari and Sakagishi, 1988). في حين توصلنا بدراسة سابقة الى انخفاض فعالية انزيم 5´- نيوكليوتايديز في امصال دم مرضى فقر الدم مقارنة بالاصحاء (Yassen *et al*., 2007).

وبسبب قلة الدراسات المتعلقة بتنقية متناظرات انزيم 5´- نيوكليوتايديز في الامراض المختلفة فقد ارتأينا ان تشمل دراستنا الحالية فصل وتنقية متناظرات انزيم 5´- نيوكليوتايديز من امصال دم مرضى فقر الدم ودراسة خواصها الحركية وذلك للدور الرئيس الذي يلعبه هذا الانزيم في المحافظة على مستويات النيوكليوسيدات 5´- فوسفات داخل الخلايا وكذلك مستويات الادينوسين خارج الخلايا.

المواد وطرائق العمل

العينات

تم تنقية انزيم 5´-NT من امصال دم مرضى فقر الدم والتي جمعت من (54) عينة مرضية لحالات مختلفة من فقر الدم جمعت من مستشفى تكريت التعليمي بعد اجراء التشخيص من قبل اطباء اختصاصيين وشملت (22) ذكور و (32) اناث وتراوحت اعمارهم (7-85) سنة ومقارنتها مع الحالات الطبيعية التي شملت (56) عينة (31 ذكور و 25 اناث). تراوحت اعمارهم بين (18-62) سنة.

تحضير مصل الدم

تم سحب الدم من الوريد ووضع في أنابيب بلاستيكية disposable tubes ثم حفظت العينة في درجة حرارة الغرفة لحين تخثر الدم بعدها تم وضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة خمس عشرة دقيقة ليتم فصل المصل، وقد أُجري قياس نشاط الأنزيم على مصل الدم المفصول، وعند الحاجة إلى الاحتفاظ بمصل الدم فيفضل تجميده للمحافظة على فعالية الأنزيم.

التنقية الجزئية لأنزيم 5´-نيوكليوتايديز من مصل الدم

تم تنقية أنزيم 5´-نيوكليوتايديز من مصل الدم باستخدام الخطوات آلاتية:

1. إضافة كبريتات الامونيوم :

رسبت جميع البروتينات في مصل الدم بواسطة 70% من كبريتات الامونيوم. إذ تم إضـافة (3.5) غرام من كبريتات الامونيوم إلى (5) مللتر من مصل الدم وقد كانت فترة الإضافة تتراوح مـابين (90 - 120) دقيقة مع التحريك المستمر، بعدها أُخذ الراسب وذوب بـ (2) مللتر من المحلـول المـنظم Tris-HCl بتركيز (50mM و7.2 pH).

2. الفرز الغشائي (الديلزة) Dialysis :

تعد طريقة الفصل الغشائي واحدة من اهم واقدم الطرق المستخدمة في تنقية الانزيمات، وتهدف الى ازالة المتبقي من كبريتات الامونيوم المضافة لترسيب البروتينات. وتلخص طريقة العمـل علـى النحـو التالي: تم وضع البروتين المذاب في الخطـوة (1) في كيس الفرز الغشائي (dialysis bag) وذلك بعـد قياس فعالية أنزيم 5´- نيوكليوتايديز، ثم وضع الكيس في المحلول المنظم Tris-HCl بأُس هيـدروجيني 7.2 لفترة 24 ساعة وتم تغيير المحلول المنظم اربع مرات خلال هذه الفترة وذلك للتخلص مـن امـلاح كبريتات الامونيوم المفروزة من كيس الديلزة والمتجمعة في المحلول المنظم، وأجريـت عمليـة الفـصل الغشائي في الثلاجة ، للحفاظ على نشاط الأنزيم. بعد انتهاء الفرز الغشائي تم قياس نـشـاط الأنـزيم فـي الجـزء ألبروتينـي المفصـول مـن كيـس الديلـزة بطريقـة الكاشـف Fisk and Subbarow (Fisk and Subbarow, 1925) والمحـورة مـن قبل (Leloir and Cardini, 1957).

3. كروماتوغرافيا التبادل الايـوني Ion exchange chromatography :

تم استخدام تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني لغرض تنقية الأنزيم من الجزء ألبروتيني المفصول من كـيس الديلزة وفصل متناظراته باستخدام عمود راتنج DEAE Cellulose A-50وبطريقة الروغـان التدريجي باستعمال محاليل Tris-HCl المنظمة الحاوية على تراكيز تصاعديـة من كلوريد الـصوديوم (0.4M-0.02M)، علمـا إن عمليـة الفصل تمـت بدرجات حرارية منخفضة (10 – 15)°م.

طريقة قياس متناظرات أنزيم 5´-نيوكليوتايديز

تم قياس نشاط متناظرات الأنزيـم بواسطـة طريقـة الكاشف Fisk and Subbarow (Fisk and Subbarow, 1925) والمحورة من قبل (Leloir and Cardini, 1957) والتي تستند على تقدير عدد مايكرومولات الفوسفات اللاعضوي الناتجة من اختزال المادة الاساس 5´-AMP في وسـط التفاعـل ذو pH=7.2 ودرجة حرارة 37°م باستخدام الكاشف Fisk and Subbarow المتكون من كبريتيت الصوديوم Na_2SO_3 وثايوكبريتيت الصوديوم $Na_2S_2O_3.H_2O$ و1-امينو-2-نفثول-4-حامض الكبريتـوز، وقـرأت الامتصاصية للمتناظرات الثلاث بعد ساعة عند الطول ألموجي 660nm.

قياس تركيز البروتين لأنزيم 5´-نيوكليوتايديز المنقى جزئيا

تم تقدير البروتين الكلي في مصل الدم باستخدام عدة التحليل الجاهز من شركة Biocon الألمانية المعتمدة على طريقة البايوريت التي تتضمن التفاعل بين البروتين في مصل الدم ومحلول ترتارات بوتاسيوم النحاسيك القاعدية (ايونات Cu^{+2} في المحيط القاعدي)، ليعطي معقد ذي لون بنفسجي شدته تعتمد على عدد الاواصر الببتيدية في البروتين والذي يمكن قياس شدة امتصاصه عند طول موجي (nm 530) (Peters, 1968).

الخواص الحركية لمتناظرات أنزيم 5´-نيوكليوتايديز

تعيين التركيز الامثل للمادة الأساس 5´-AMP

تم تغيير تركيز المادة الأساس 5´-AMP لإيجاد تركيز المادة الأساس الامثل لعمل المتناظرات I وII وIII لأنزيم 5´-نيوكليوتايديز، فقد احتوى خليط التفاعل على 780µl (50mM) من المحلول المنظم (Tris-HCl) و100µl (40mM) من كلوريد المغنيسيوم و100µl من 5´-AMP بالتراكيز (10، 15، 20، 25، 30، 40، 50، 60) ملي مولار ومن رسم العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز 5´-AMP تم حساب التركيز الامثل حيث تصل عنده سرعة التفاعل قيمتها القصوى.

تعيين قيم ثابت ميكاليس – منتن (Km)

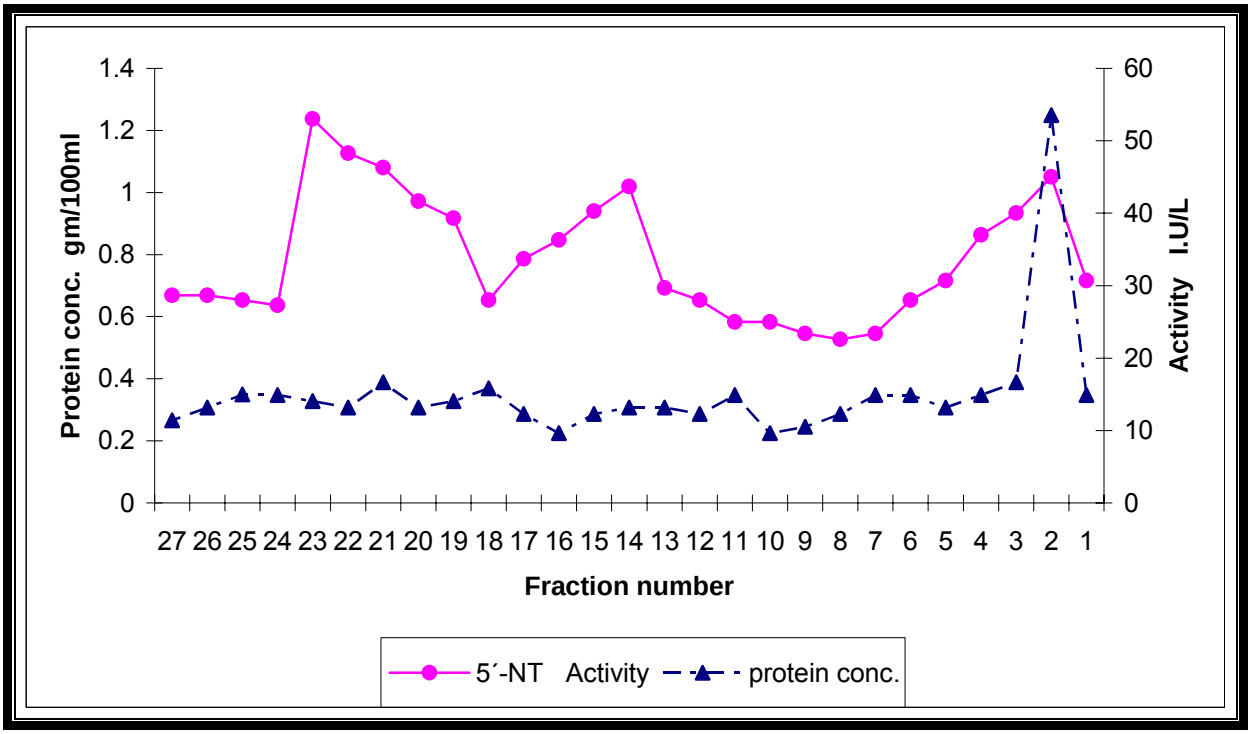
لتعيين قيم الثابت Km للمادة الاساس المستعملة (5´-AMP) استعملت الطريقة نفسها المتبعة في الفقرة اعلاه، وتم الحصول على قيم الثابت Km باستعمال الطرق البيانية التالية:

1. طريقة لينويفر – بيرك (1/v vs. 1/[s]).
2. طريقة هانس – وواف ([s]/v vs. [s]).

النتائج والمناقشة

فصل متناظرات 5´-NT وتنقيتها جزئياً من أمصال مرضى فقر الدم

تعد طريقة كروماتوغرافيا التبادل ألايوني باستخدام محاليل متدرجة من كلوريد الصوديوم إحدى الطرائق المتبعة لفصل وتنقية متناظرات الأنزيمات والتي تعتمد على مبدأ اختلاف الشحنة للمتناظرات. إذ تم الحصول على ثلاثة متناظرات أنزيمية (I، II ، III) لأنزيم 5´-NT ومن خلال تقنية كروماتوغرافيا التبادل ألايوني باستخدام الراتنج المبادل الأيوني DEAE-Cellulose A-50 كما موضح في الشكل (1) وبدرجات نقاوة متفاوتة، اذ بلغت درجة التنقية للمتناظر I (4.94) مرة والمتناظر II (19.49) مرة أما المتناظر III فقد بلغت تنقيته (22.13) مرة وكما موضح في الجدول (1).



الشكل 1: فصل وتنقية متناظرات انـزيم 5´-NT مـن امـصال دم مرضـى فقـر الـدم باسـتعمال كروماتوغرافيا التبادل الايوني

ومن خلال الشكل (1) تظهر ثلاث قمم للمتناظرات الثلاث للأنزيم.ولوحظ نزول المتناظر I التـي تشير له القمة الأولى خلال عملية الروغان Elution بالمحلول المنظـم في بداية عملية الفصل خـلال DEAE-Cellulose A-50 وهـذا يـدل علـى ان المتناظـر I يحمـل شحنـة موجبـة (Zeffren and Hall, 1973).

الجدول 1: تنقية متناظرات5´-NT من أمصال مرضى فقر الدم

Step	Elute (ml)	5´-NT Activity (I .U/L)	Total 5´-NT Activity (I .U/L)	Protein conc. (gm/100ml)	Total protein (gm)	Specific activity* (I.U/gm)	Degree of purification ** (Fold)	yield *** %
crude serum	5	43	215.0	5.877	29.385	0. 73	-	100
Ammonium sulfate	5	41.67	208.35	4.587	22.935	0.91	1.24	97
Dialysis	2	45	90.0	2.785	5.57	1.61	2.2	42
DEAE-Cellulose A-50								
Isoenzyme I	10	45	450.0	1.249	12.49	3.60	4.94	21
Isoenzyme II	10	43.67	436.7	0.307	3.07	14.22	19.49	20
Isoenzyme III	10	53	530.0	0.328	3.28	16.16	22.13	25

** Specific activity (I.U/gm) =5´-NT Activity (I .U/L) / Protein conc. (gm/100ml)*
*** Degree of purification (Fold)=Specific activity of purefied sample / Specific activity of crude serum*
**** Yield =Total protein of purefied / crude serum*

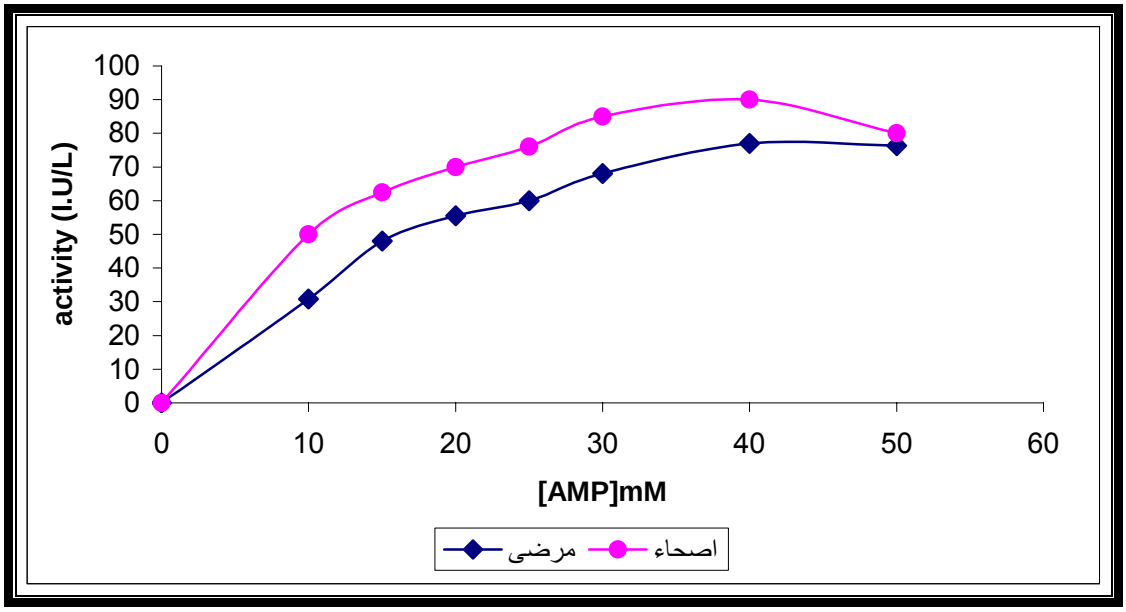
وباستمرار عملية الفصل ظهر المتناظرΠ بعد بدء الروغان التدريجي بالمحلول المنظم الحاوي على تراكيز تصاعدية من NaCl، وعند التراكيز النهائية للمحلول الملحي ظهر المتناظر III، إذ كانت فعاليته أعلى من المتناظرين I وΠ بينما المتناظر Π كان ذا فعالية اقل من المتناظرين I وIII. والحصول على المتناظرين I وIII جاء مطابقا لدراسة الباحث (احمد، 1977) وبالمواقع نفسها أما المتناظر Π فلم تشر إلى وجوده أيا من الأدبيات السابقة في مصل الدم البشري.

إن أهم الإشكالات التي تواجه المهتمين بدراسة أنزيم 5´-NT وتنقيته تعود الى ارتباطه بالغشاء السطحي للخلايا ووجوده بتراكيز واطئة والى تلوثه بالطبقة الدهنية للغشاء الخارجي، لذا لابد من إيجاد أفضل الطرائق لتخليصه من هذه التداخلات وبالتالي يلعب نوع الراتنج دورا مهما في ذلك من خلال الفته إلى جزيئات الأنزيم (خورشيد، 1995) وقد يعزى ظهور المتناظر Π في مصل الدم بطريقة الفصل المستخدمة في هذا البحث الى استخدام الراتنج المبادل الأيوني DEAE-Cellulose A-50 لأول مرة وحساسية الطريقة المستخدمة لقياس فعالية أنزيم 5´-NT.

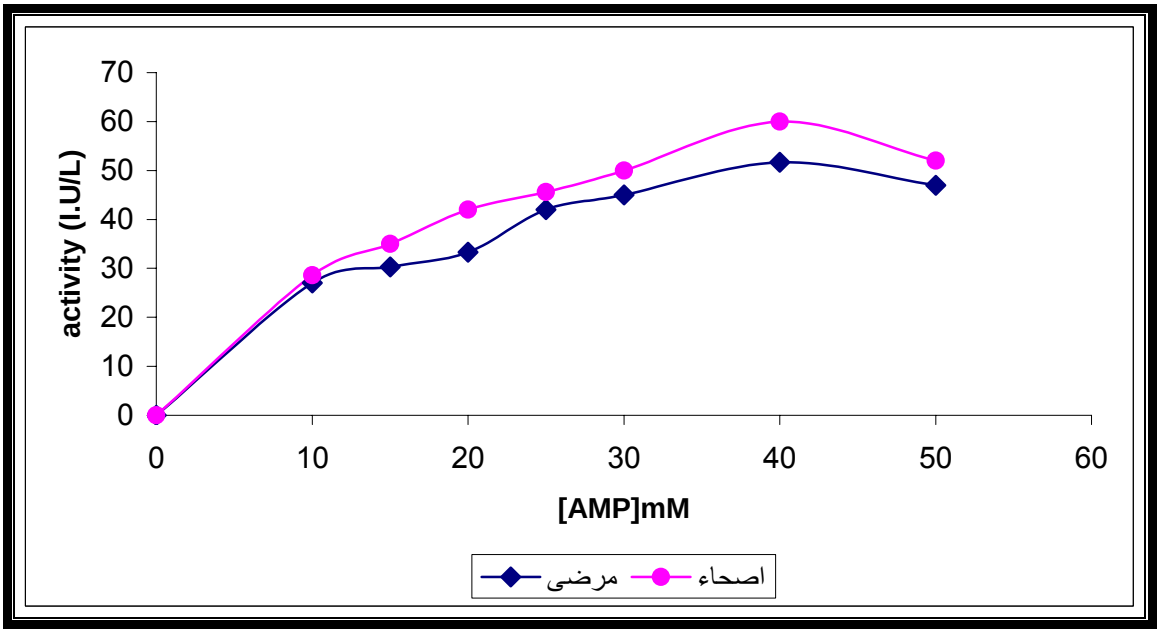
تعيين التركيز الامثل للمادة الأساس 5´-AMP

تبين الاشكال (2)، (3)، (4) و(5) تأثير تركيز الاينوسين أحادي الفوسفات 5´-AMP على سرعة التفاعل الانزيمي لـ 5´-NT في مصل الدم والمتناظرات I وΠ وIII المنقاة من امصال دم الاصحاء ومرضى فقر الدم، ونلاحظ من الاشكال اعلاه ارتفاع سرعة التفاعل لـ5´-NT في المصل ومتناظراته I وΠ وIII بزيادة تركيز 5´-AMP الى حد الوصول الى السرعة القصوى عند التركيز (40mM) لـ5´-NT في مصل الدم ومتناظرات الثلاث. ومن ثم تبدأ سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية (50mM فما فوق) لحدوث التثبيط، وقد لوحظ في الاشكال اعلاه ان المنحني يكون زائدي المقطع لانزيم 5´-NT في مصل الدم والمتناظرات الثلاث.

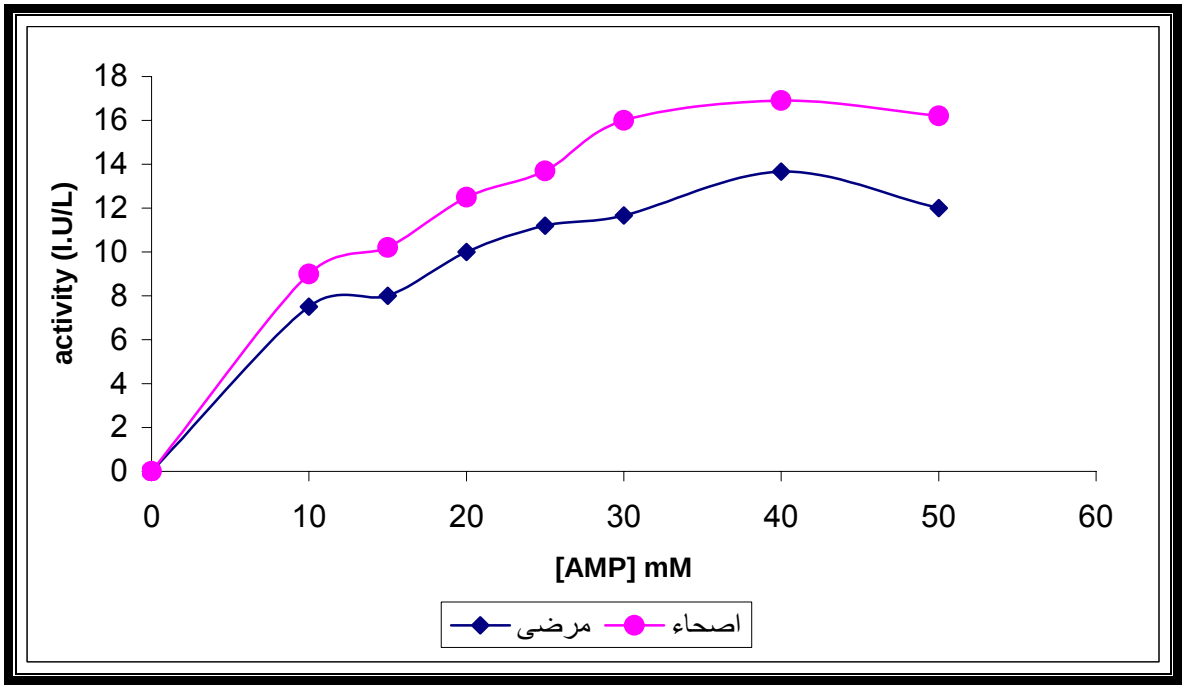
ان ماتم التوصل اليه من نتائج تتطابق مع ماتوصل اليه كل من (الطائي، 2000) من نتائج حول انزيم 5´-NT من مصل الدم البشري و(خورشيد، 1995) حول انزيم 5´-NT المنقى من كبد الاغنام، وتتعارض مع ماتوصل اليه الباحث (احمد، 1977) بان متناظرات انزيم5´-NT مصل الدم البشري الطبيعي لاتخضع لمعادلة ميكايلس – منتن.



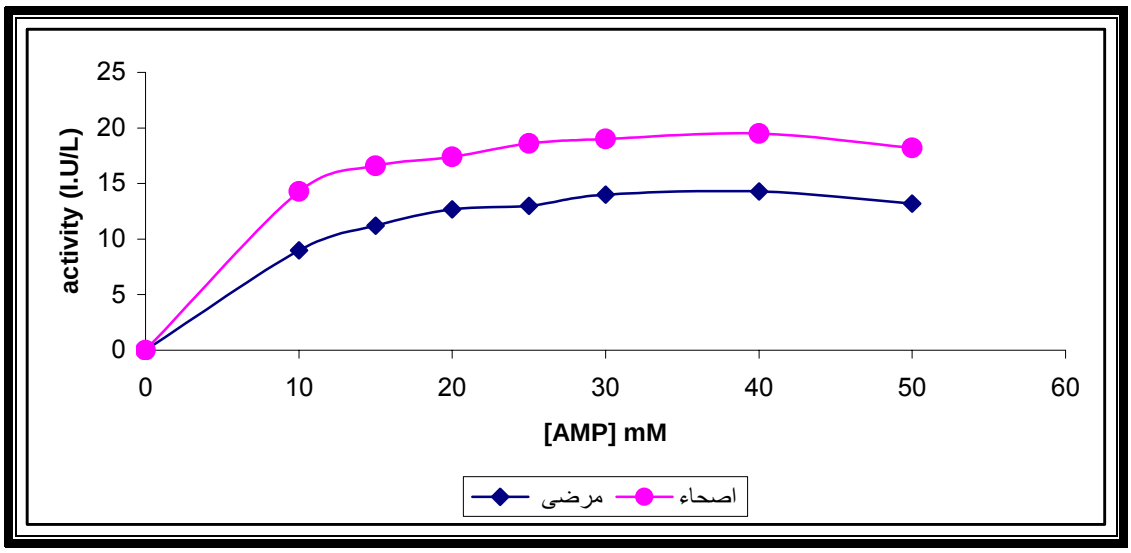
الشكل 2: التركيز الامثل لـ 5′-AMP على سرعة تفاعل انزيم 5′-NT في مصل دم الاصحاء ومرضى فقر الدم.



الشكل 3: التركيز الامثل لـ 5′-AMP على سرعة تفاعل انزيم 5′-NT للمتناظرI للاصحاء ومرضى فقر الدم.



الشكل 4: التركيز الامثل لـ 5´-AMP على سرعة تفاعل انزيم 5´-NT للمتناظر Π للاصحاء ومرضى فقر الدم.



الشكل 5: التركيز الامثل لـ 5´-AMP على سرعة تفاعل انزيم 5´-NT للمتناظر III للأصحاء ومرضى فقر الدم

تعيين قيم ثابت ميكاياس – منتن (Km)

تم اتباع الطريقة البيانية هانس-وولف و لينوفر- بيرك لتعيين قيم ثابت ميكاياس منتن Km لأنزيم 5´-NT في مصل الدم والمتناظرات I وΠ وIII. ويوضح الجدول (2) قيم ألـ Km المستخرجة حسب الطريقتين أعلاه. حيث يتضح من النتائج وجود فرق واضح بين قيم Km لمتناظرات الانزيم 5´-NT المنقاة من امصال دم الاصحاء ومرضى فقر الدم. فنجد ان قيم Km للمتناظرات Π وIII المنقاة من

امصال دم المرضى اقل من قيمتها في الاصحاء وهذا يدل على ان الفة هذين المتناظرين للمادة الاساس (5′-AMP) في المرضى اكبر من الفتهما في الاصحاء. فيما نجد ان قيم Km للمتناظر I وانزيم مصل دم مرضى فقر الدم اكبر من قيمتها في الاصحاء وهذا يدل على انها اقل الفة للمادة الاساس (5′-AMP) مما في حالة الاصحاء. وربما يعود هذا الى الاختلاف الحاصل في التراكيب البنائية ومراكز الارتباط للانزيم بالحالة المرضية. وبالتالي وعلى ضوء ماتحقق من نتائج والاختلاف الواضح في قيم Km وبالاخص بالنسبة لمصل الدم ربما يمكن استخدام ذلك كمؤشر لتشخيص حالات فقر الدم.

الجدول 2: قيم Km لأنزيم 5′-NT في مصل الدم والمتناظرات I وII وIII

Enzyme	قيم *Km* (ملي مول/لتر)			
	⋆ *[s]/v vs. [s]*		⋆⋆ 1/[s] vs. 1/v	
	اصحاء	مرضى	اصحاء	مرضى
serum	12.8	14	12.5	14.5
Isoenzyme I	13.1	14.5	13.0	14.08
Isoenzyme II	14.5	12.7	14.08	12.98
Isoenzyme III	15.5	8.5	15.6	8.4

⋆ طريقة هانس ـ وولف.

⋆⋆طريقة لينوفر ـ بيرك.

المصادر العربية

احمد، هيثم ناجي. 1977. الظاهرة الالوستيرية ذات التعاون السالب، وصفات حركية اخـ ـ ـرى 5′-N للمتناظرين I و II لـ 5′-NT النقيين من مصل الدم البشري الطبيعي. رسالة ماجستير، كليـة العلوم، جامعة بغداد.

الطائي، رفد ربيع سعدون. 2000. دراسة فعالية انزيم 5′-نيوكليوتايـديز فـي مـصل دم الاشـخاص الاصحاء وبعض الحالات المرضية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

خورشيد، صباح حسين. 1995. تنقية انزيم النيوكليوتايديز وانزيم الفوسفوداليستريز النيوكليوتيدي الحلقي من كبد الاغنام، رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات، جامعة تكريت.

المصادر الأجنبية

Bianchi, V., and Spychala, J., 2003. Mammalian 5′-Nucleotidase. Boil. Chem. J.278 (47), pp.46195-46198.

Dixon, T.F., and Purdon, M., 1952. Serum 5-Nucleotidase. Nature, 170 (4325): pp.500-501.

Dovorak, H.F.; Anraku, Y., and Heppel, L.A., 1966. The Occurrence of a Protein Inhibitor for 5'-Nucleotidase in Extracts of Escherichia Coli. Biochem. Biophys, Res. Commun. 22(5): pp.628-632.

Fisk, C.H., and Subbarow, K., 1925. The Coloromatric Determination of Phosphorouse. J. Biol. Chem. 66, pp.375.

Fritzson, p., 1991. Purification and some Particular Kinetic Properties of Rat Spleen Cytoplasmic Deoxyribonucletidase. Int. J. Biochem. 23: pp.1403-1409.

Hokari, S., and Sakagishi, Y., 1988. Rat Spleen Cytoplasmic Nucleotidase: Characterization and its Physiological Significance. Int. J. Biochem., 20(12): pp.1405-1410.

Hokari, S., and Sakagishi, Y., 1992. Purification and of Characterization Cytoplasmic 5´(3´)-Nucleotidase from Rabbit Spleen: Characteristic Differences of the Enzyme from the Rat Spleen Nucleotidase. Comp. Biochem. Physiol., 103B(2): pp.399-405.

Ipata, P.L., 1967. Resolution of 5´-Nucleotidase of Sheep Brain from Non- specific Phosphatase and its Inhibition by Rucleoside -triphosphates. Nature.214, 618.

Itoh, R.; Usmi, C.; Nishino, T., and Tsushima, K., 1978. Kinetic Properties of Cytosol 5´-Nucleotidase from Chicken liver. Biochim. Biophy. Acta, 526: pp.145-162.

Itoh, R., 1981. Purification and Some Properties of Cytosol 5´-Nucleotidase from rat Liver. Biochim. Biophs. Acta, 657: pp.402-410.

Kaplan, L.A., and Pesce, A.J., 1989. Clinical Chemistry: Theory, Analysis and correlation. 2 nd Edn., Pub. C.V. Mosby Company, U.S.A.

Leloir, L., and Cardini, C., 1957. Characterized of Phosphorous Compound by Acid lability. Meth enzymol, 3, pp.840-850.

Murry, J.L.; Reuben, J.M.; Munn, C.G.; Mansell, P.W.; Newell, G.R., and Hersh, E.M., 1984. Decreased 5´-Nucleotidase Activity in Lymphocytes from Asymptomatic Sexually Active Homosexual Men and Patients with the Acquired Immune Deficiency Syndrome. Blood, 64(5): pp.1016-1021.

Peglia, D.E.; Valentine, W.N., and Brockway, R.A., 1984. Identification of Thymidine Nucleotidase and Deoxy Ribo Nucleotidase Activities Amony Hormonal Isozymes of 5´-Nucleotidase in Human Erythrocytes. Proc. Nat. Acad. Sci., 81: pp.588-592.

Peters, T., 1968. Proposals for Standardization of Total Protein Assays. Clin. Chem. 14, pp.1147-1159.

Pragathi, P.; Bharath kumar, P.V.; Amar kumar, P.; Ramakanth Reddy, M.; Sravani, V.; Neeraja, J.; Rebamary Eapen, Gopalakrishna, K., 2005. Evaluation of Serum Adenosine Deaminase and 5´-Nucleotidase Activities as Probable Markers in Overian Cancer. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20(2): pp.195-197.

Sakhibov, D.N.; Sorokin, V.M., and Lukel'son, L.Ia., 1970. Isolation of Phospholipase A from the Venom of a Mid-Asiatic Cobra. Biokhimia. 35(1): pp.13-16.

Song, C.S, and Bodansky, O., 1966. Purification of 5'-Nucleotidase from Human Liver. Biochem. J. 101(1): pp.5C-6C

Sulkowski, E.; Bjork, W., and Laskowski, M., 1963. A Specific and Nonspecific Alkaline Monophosphatase in the Venom of Bothrops Atrox and their Occurrence in the Purified Venom Phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 238, pp.2477-2486.

Tietz, N.W., 1987. Text Book of Clinical Chemistry. 3rd Edn., W.B Saunders Co Canada, pp339-342.

Yassen, A. I.; Al-Salihi, F. G., and Khorsheed, S. H., 2007. The Activity of 5′-Nucleotidase from Sera of Anemic Patients. Accepted in Tikrit J. of Pure Science.

Yonng, I.I., 1958. Serum 5-Nucleotidase; Characterization and Evaluation in Disease States. Ann. N.Y. Acad. Sci, 75(1): pp.357-362.

Zeffren, E., and Hall, P.L., 1973. The Study of Enzyme Mechanisms. 1st Edn. Johnwiely and Sons, U.S.A.

Zimmermann, H., 1992. 5′-Nucleotidase: Molecular Structure and Functional as Pects. Biochem .J. 285: pp.345-365.