عزل وتنقية جزئية لأنزيم الكلوتامين سنثتيز من كالس نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*)

ساجدة عزيز عبود   نهال عزت
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

الاستلام   القبول
١٦ / ٠٨ / ٢٠٠٧   ٠٦ / ١١ / ٢٠٠٧

ABSTRACT

Callus induction occurred on stem segments of *Nigella sativa L.* seedlings grown on a modified Murashige and Skoog medium containing 10^{-6} M of 2, 4- dichlorophenoxy acetic acid (2, 4 – D).

Glutamine synthetase (EC 6. 3 . 1. 2) was isolated and partially purified from *Nigella sativa L.* callus the partially purified enzyme from the aqueous extract by ammonium sulfate precipitation, dialysis and gel filtration on sephadex G – 200 revealed that the activity increased by 37 fold. The molecular weight by gel – filtration chromatography was found to be around 50000 Da. The optimum conditions of the partially purified glutamine synthetase from callus were obtained by using Tris – HCl (80 mM) at pH 2.7 as a buffer and 10 mM of glutamate as substrate with incubation temperature 30° C. The Michaelis Menten constants for glutamate, adenosinetriphophate and ammonium chloride were 10×10^{-3}M, 2×10^{-3} M and 0.280×10^{-3} M respectively.

الخلاصة

استخدم وسط موراشج وسكوك المحور والمضاف إليه 2, 4 – D بتركيز 10^{-3} M لاستحداث الكالس من قطع سيقان باد رات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*). وجد أنزيم الكلوتامين سنثتيز (EC 6 . 3 . 1. 2) في مستخلص كالس نبات الحبة السوداء وتم تنقيته

جزئياً بمقدار 37 مرة بواسطة عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم والفرز الغشائي وكذلك من خلال تمريره بعمود الفصل الكروماتوغرافي الحاوي على السيفا دكس G – 200، ووجد ان الوزن الجزيئي للانزيم مساوٍ إلى (50000 Da) تقريباً. تم دراسة الظروف المثلى للانزيم المنقى جزئيا من الكالس وأعطى الكلوتامين سنثتيز أعلى فعالية عند استخدام محلول الترس الحامضي بتركيز 80mM بدالة حامضية 7.2 كمحلول (منظم) و 10mM من الكلوتامين بوصفها المادة الأساس والتحضين بدرجة حرارة 30° C لمدة 15 min.

المقدمة

يقوم أنزيم الكلوتامين سنثتيز (E. C. 6. 3. 1. 2.) بدور مهم في أيض النايتروجين في كل الاحياء من البكتريا مرورا بالنباتات والحيوانات (1). يحفز أنزيم الكلوتامين سنثتيز تحول الكلوتاميت والأمونيا إلى الكلوتامين اعتمادا على وجود الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATD) (2)، وبذلك يمثل هذا الأنزيم مفتاحا لأيض النايتروجين والذي يتضمن التخليق الحيوي للنيوكلوتيد والأحماض الأمينية (3). أشارت الدراسات إلى أن أعلى فعالية للأنزيم في جسم الإنسان تكون في الدماغ والكبد (4) وقد أمكن أيضا عزل الانزيم من خلايا لبائن أخرى (5)، وهناك دراسات أيضا للأنزيم في خلايا الأحياء المجهرية (6). أما في النباتات فإن النيتروجين يضمن من الامتصاص المباشر لأيون الامونيوم حيث أن معظم أيون الأمونيوم الممتص في النباتات يتحول إلى أحماض أمينية (8,7) درس الأنزيم في أوراق نبات الطماطم (9) وفي العقد الجذرية لنبات فول الصويا (10) وفي جذور نبات الرز (11) نظراً لقلة المعلومات المتوفرة عن امكانية عزل وتنقية أنزيم GS من خلايا أنسجة كالس النباتات وخاصة كالس نبات الحبة السوداء لذا استهدف البحث عزل وتنقية جزئية لانزيم GS ودراسة خواصه في خلايا كالس نبات الحبة السوداء.

مواد العمل وطرائقه

استحداث الكالس وتنميته:

عومل عدد من بذور نبات الحبة السوداء (*Nigella sativa L.*) بالكحول الأثيلي بتركيز 96% لمدة دقيقتين ثم بمحلول هابيوكلورات الكالسيوم بتركيز 20% مدة سبع دقائق وغسلت البذور عدة مرات بالماء المقطر المعقم، استخدم وسط Arnon (12) لزراعة البذور وتنمية البادرات، بعد الانبات استخدمت قطع من سيقان نبات الحبة السوداء السليمة وبعمر (30 – 25) يوما وبطول (1 cm) تقريبا، زرعت هذه القطع على وسط موراشيج وسكوك MS (13)

الحاوي على السكروز بتركيز 4% و 2, 4 – D بتركيز 10^{-6}M (14). وحضن الوسط الغذائي الحاوي على القطع النباتية في حاضنة النمو بدرجة حرارة (20±1ºC) والمجهزة بإضاءة 1500 لوكس ويتعاقب يومي لمدة (16 h) إضاءة و (8 h) ظلام، استخدم الكالس النامي بعمر (35) يوما في التجارب اللاحقة.

استخلاص أنزيم الكلوتامين سنثتيز وتنقيته

الاستخلاص:

استخدم (50) غراماً من كالس نبات الحبة السوداء بعمر 35 يوما، أضيف إليه (100 cm) من المحلول المنظم ترس بتركيز (50 mM) وبدالة حامضية (7.2) سحقت الخلايا في هاون خزفي مبرد بدرجة حرارة (4ºC). وأكمل سحق وتحطيم الخلايا باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية بتسليط 20000 ذبذبة / ثانية ولمدة نصف ثانية.

قياس الفعالية

تم قياس فعالية انزيم الكلوتامين سنثتيز المستخلص من الكالس بعمر 35 يوما بواسطة قياس كمية الفوسفات المتحررة من تفاعل تخليق الكلوتامين وتم حساب كمية الفوسفات المتحررة اعتمادا على المنحني القياسي للفوسفات باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600nm (15) استخدمت طريقة لاوري (16) في تقدير كمية البروتين المعزول من كالس نبات الحبة السوداء.

تنقية الأنزيم

عزل الرائق عن الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 3600xg ولمدة نصف ساعة. وتمت إضافة كبريتات الأمونيوم إلى المستخلص الانزيمي بحالتها الصلبة وبتشبع كامل (0-70%)، بعد ذلك فصل الراسب عن الرائق بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3600xg ولمدة 35 دقيقة أذيب الراسب بالماء المقطر، أجريت عملية الفرز الغشائي باستخدام أنابيب السليوفان النصف ناضحة بدرجة حرارة (4ºC) ولمدة 48h واسخدمت مادة الهلام من نوع السيفادكس G-200 وعمود الفصل ذو الأبعاد (2.6 × 45cm) لفصل الكلوتامين سنثتيز عن بقية الأنزيمات، وبعد كل خطوة من خطوات التنقية ثم تقدير كمية البروتين وقياس فعالية الأنزيم حسب الطرق المذكورة سابقاً.

النتائج والمناقشة

استحداث الكالس وتنميته

وجد ان افضل وسط لاستحداث ونمو الكالس من قطع سيقان بادرات نبات الحبة السوداء هو وسط MS المعقم (13) والمضاف إليه 2.4-D بتركيز M 10^{-6} كما ذكر سابقاً (14) والكالس النامي بدا هشا مفكك الخلايا ولاسيما بعد 35 يوما من بدء الزراعة القياسية، مما سهل عملية استخلاص أنزيم الكلوتامين سنثيتز وتنقيته (17).

التنقية الجزئية للأنزيم

يشير الجدول (1) إلى زيادة في الفعالية النوعية لأنزيم الكلوتامين سنثيتز في الرائق بمقدار مرتين مقارنةً بفاعليته في المستخلص الخلوي غير المنقى مما يدل على وجود الأنزيم الحر في السايتوبلازم وغير مرتبط بالأغشية الخلوية (18). أدت التنقية بوا سطة الترسيب بكبريتات الامونيوم الحصول على أعلى فاعلية للأنزيم بتشبع (50-60%)، في حين أدت عملية الفرز الغشائي إلى زيادة الفعالية النوعية للانزيم بمقدار 10 مرة ويعود ذلك إلى إزالة الأملاح والمواد ذو الأوزان الجزئية الصغيرة من محاليل الأنزيم.

واستمرت الفعالي ة بالازدياد عند استخدام عمود الفصل الحاوي على السيفا دكس G-200 فقد ازدادت بمقدار 37 مرة مقارنة بالمستخلص الخلوي . ووجد أن قيمة الوزن الجزيئي للأنزيم الكلوتامين سنثتيز المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء مساوٍ لـ 50000 Da تقريبا بالمقارنة مع مركبات بروتين مع لومة الوزن الجزئي (الشكل 1) وهذه القيمة مقاربة لقيمة الوزن الجزيئي لأنزيم الكلوتامين سنثيتز المستخلص من نبات alfalfa (19).

تأثير بعض العوامل على فعالية أنزيم الكلوتامين سنثتيز (GS) المنقى جزئيا من الكالس

تأثير تركيز الأنزيم

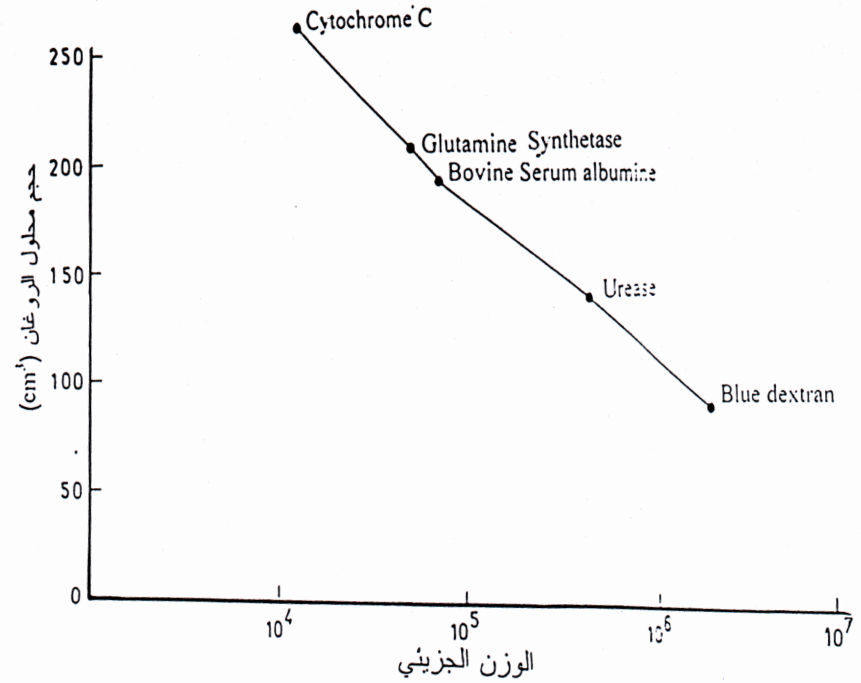
يبين الشكل (2) أن فعالية أنز يم (GS) ازدادت بزيادة تركيز البروتين (الانزيم) وبلغت أعلى فعالية بوجود 80µg بروتين، وانخفضت الفعالية تباعا بعد ذلك، وهذا يتطابق مع ما أشارت إليه البحوث الأخرى من حيث كون فعالية الأنزيم تتناسب طرديا مع تركيز الأنزيم (20) وقد استخدم تركيز 80µg من الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة.

الجدول (1) ملخص نتائج التنقية الجزئية لأنزيم الكلوتامين سنثتيز المستخلص من كالس نبات الحبة السوداء بعد 35 يوما من النمو بالظروف القياسية. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات

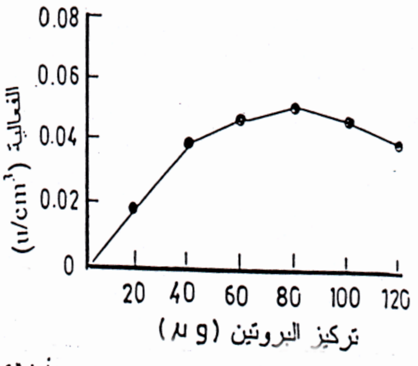
مراحل التقنية	الحجم الكلي cm^3	البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية *U	الفاعلية النوعية** U/ mg	عدد مرات التنقية	% الاستعادة
المستخلص العام	90	556	10.31	0.018	___	100
المستخلص الرائق	65.4	233	9.40	0.040	2	91
الترسيب بكبريتات الأمونيوم	10.3	95.3	7.99	0.083	5	77
الفرز الغشائي	15.4	35.4	6.42	0.181	10	62
الترشيح الهلامي باستخدام السيفادكس (G-200)	5	7.3	4.90	0.671	37	48

* U: كمية الأنزيم التي تعمل على تحرر (1 µ mol) من الفوسفات في الدقيقة الواحدة.

** الفعالية النوعية: عدد وحدات الأنزيم الموجودة في (1.0 mg) من البروتين وتكون وحدتها (µ mol of pi/ min/ mg protein).



الشكل (1) العلاقة بين الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية وحجم الروغان. كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.



الشكل (2) العلاقة بين تركيز بروتين كمصدر لانزيم GS المنقى جزئياً وفعاليته في كالس نبات الحبة السوداء، كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.

العلاقة بين زمن التفاعل وفعالية الانزيم

وضحت النتائج بأن فعالية الأنزيم المنقى جزئيا من الكالس ازدادت خطيا مع زيادة فترة التحضين لحد معين وبلغت أعلى حد لها بعد 15 min من بدء التفاعل ثم أعقبها انخفاض في الفعالية (الشكل 3).

تأثير درجة الحرارة

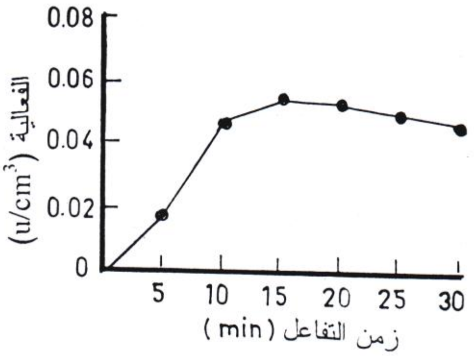
يوضح الشكل (4) ازدياد معدل سرعة التفاعل المحفز بالأنزيم كلما ازدادت درجة الحرارة وبلغت أعلى حد عند درجة حرارة 30ºC، وعند استخدام درجات حرارة أعلى من 30ºC حصل انخفاض في ذلك المعدل بسبب حصول تشوه في طبيعة الأنزيم (Denaturation) نتيجة لتفكك الأواصر الهيدروجينية والقوى الأخرى المسؤولة ع ن التركيب الثلاثي للبروتين وبالتالي فقدان الأنزيم لفاعليته (21) وتعد درجة حرارة 30ºC ملائمة لعمل الكثير من الأنزيمات المستخلصة من النباتات (17 ,20).

نوع وتركيز المحلول المنظم

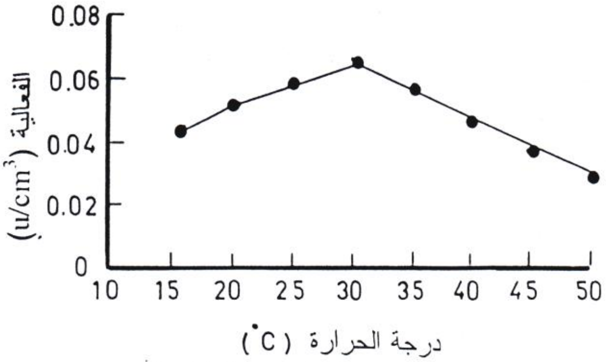
يشير الجدول (2) الى أن أعلى فعالية تم الحصول عليها عند استخدام المحلول المنظم الترس بتركيز 80mM وبدالة حامضية 7.2 مقارنة بالمحلول المنظم بوتاسيوم وفوسفيت.

تأثير الدالة الحامضية للمحلول المنظم

وجد أن الدالة الحا مضية المثالية لعمل الأنزيم باستخدام الترس وبوتاسيوم فوسفيت المنظم هي (7.2) كما موضح في شكل (5) وهذه النتيجة مقار بة للدالة الحامضية لأنزيم الكلوتامين المستخلص من كائنات حية أخرى (23,22) وهذا يدل على أن الانزيم يعمل في الوسط المتعادل، وأعطى المحلول المنظم ترس الحامض ي فعالية أعلى من البوتاسيوم فوسفيت المنظم لذا استخدم ترس بوصفه محلولاً منظماً في جميع التجارب اللاحقة.



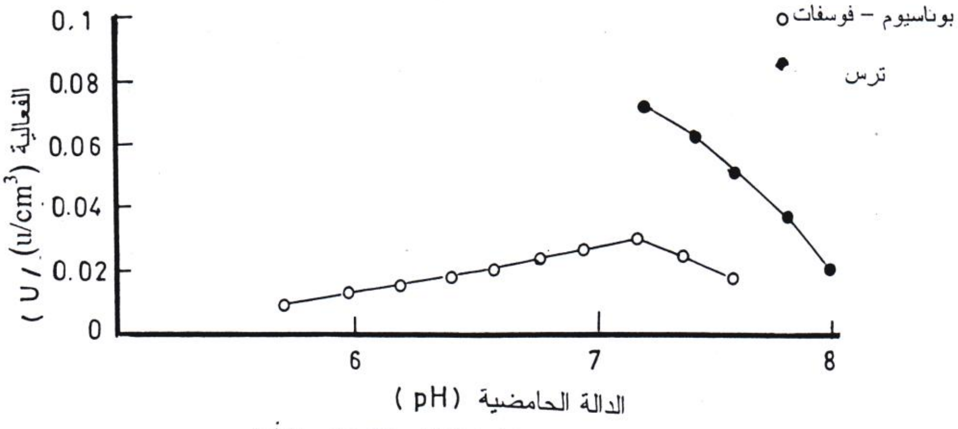
الشكل (3) العلاقة بين فعالية انزيم GS المنقى جزئيا من كالس نبات الحبة السوداء وزمن التفاعل كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.



الشكل (4) تأثير درجات الحرارة المختلفة في فعالية انزيم GS المنقى جزئياً من كالس نبات الحبة السوداء، كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.

الجدول (2) فعالية أنزيم الكلوتامين سنثتيز المنقى جزئيا من كالس نبات الحبة السوداء باستخدام تراكيز مختلفة من المحاليل المنظمة، كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات

التراكيز (m M)	المحاليل المنظمة الفعالية (U/cm^3) بوتاسيوم – فوسفيت المنظم (pH 7 . 2)	المحاليل المنظمة الفعالية (U/cm^3) الترس المنظم (pH 7 . 2)
20	0.012	0.021
40	0.022	0.033
60	0.031	0.066
80	0.030	0.072
100	0.022	0.051
120	0.010	0.033



الشكل (5) تأثير الدالة الحامضية (pH) في فعالية انزيم GS المنقى جزئياً من كالس نبات الحبة السوداء، كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.

تأثير تركيز الكلوتاميت و ATP و NH_4Cl

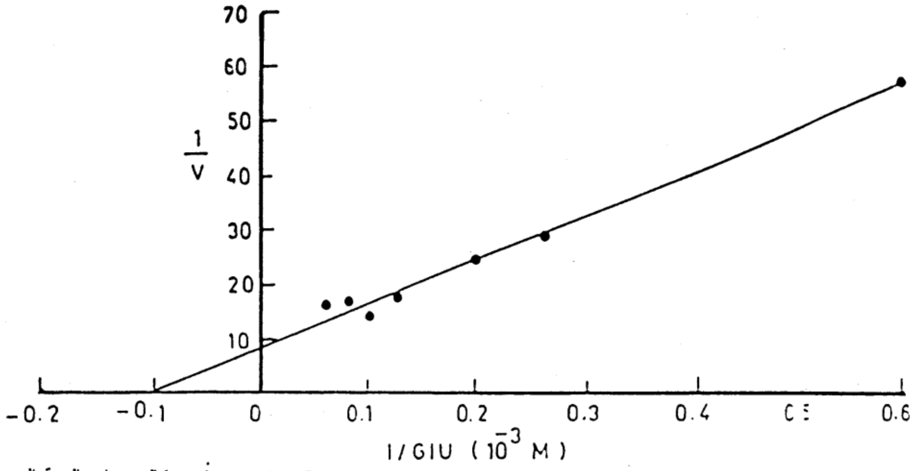
استخدم مركب الكلوتاميت بوصفه المادة الأساس و ATP و NH_4Cl عوامل مساعدة وبتراكيز مختلفة لتحديد التراكيز ا لمثالية لعمل أنزيم GS. ويبدو واضحا أن كل المواد السابقة أدت إلى زيادة في فـعلية الأنزيم إلى حد معين، وأن قيمة ثابت ميكيلس – منتون للكلوتاميت و ATP و NH_4Cl مساوية إلى $10 \times 10^{-3}M$ (الشكل 6) و $2 \times 10^{-3}M$ (الشكل 7) و $0.280 \times 10^{-3}M$ (الشكل 8) على التوالي باستخد ام رسم لينويفر – بيرك (24) هذه النتيجة تؤكد بوجود علاقة طردية بين تركيز المادة الأساس وسرعة التفاعل عندما يكون تركيز الانزيم ثابتاً، فأن زيادة تركيز المادة التي يعمل عليها الانزيم سينتج عنه في البداية زيادة ملحوظة في سرعة التفاعل وفي حالة استمرار زيادة ترك يز المادة الأساس تزداد سرعة التفاعل ببطئ بسبب عدم تشبع المواقع الفعالة للانزيم بالمادة الأساس وعليه فان سرعة التفاعل الانزيمي تعتمد على تركيز المادة الأساس، لكن عند زيادة تركيز مادة الأساس المستخدمة بشكل كبير بحيث تصبح المواقع الفعالة للانزيم مشبعة بالمادة فان سرعة التفاعل الأولى غير معتمدة على تركيز المادة الأساس . وأكد هذا التفسيرفي دراسات عديدة لانزيمات مختلفة ومستخلصة من كائنات حية مختلفة (22 ,25).

الظروف المثالية لعمل الانزيم

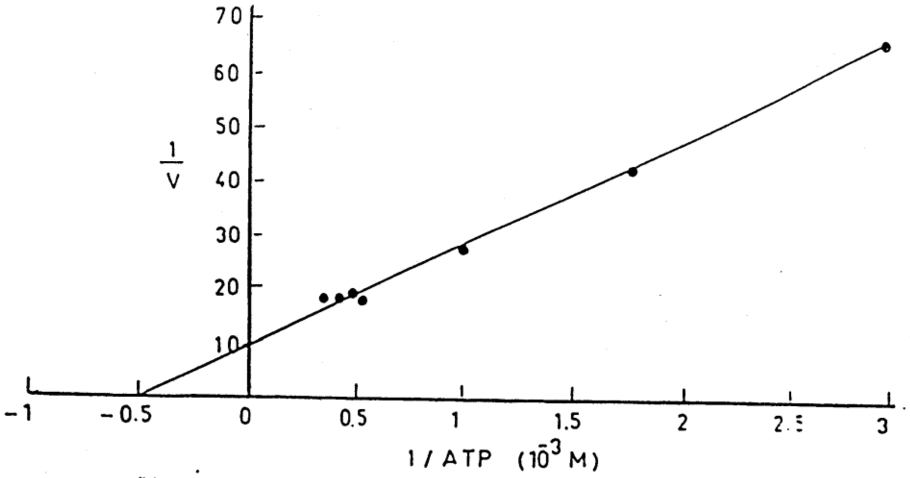
إن الظروف المثالية لعمل أنزيم الكلوتامين سنثتيز المنقى جزئيا من كالس نبات ا لحبة السوداء موضحة في الجدول (3).

الجدول (3) الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم الكلوتامين سنثيتز المنقى جزئيا من كالس نبات الحبة السوداء بعمر 35 يوماً

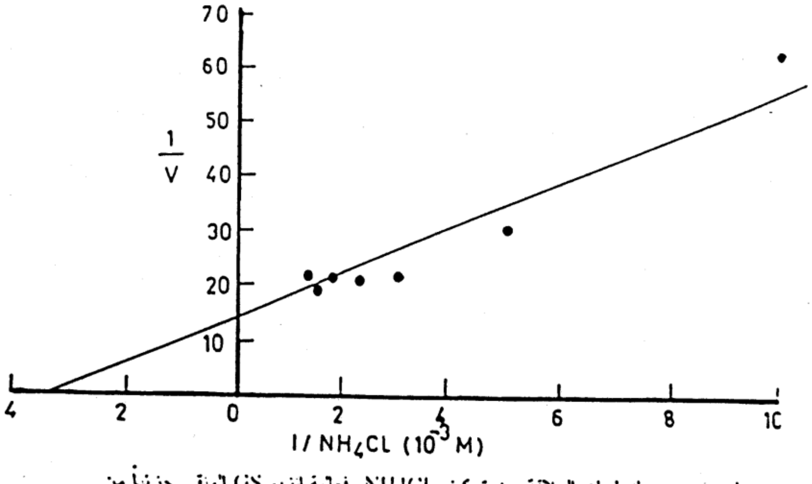
تركيز الأنزيم µg	زمن التفاعل min	التركيز والدالة الحامضية للترس	درجة الحرارة C°	تركيز الكلوتاميت mM	تركيز ATP mM	تركيز NH_4Cl mM
80	15	80mM pH 7. 2	30	10	2	0.3



الشكل (6) رسم لينويفر – بيرك لبيان العلاقة بين تركيز الكلوتاميت وفعالية انزيم GS المنقى جزئياً من كالس نبات الحبة السوداء، كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.



الشكل (7) رسم لينويفر – بيرك لبيان العلاقة بين تركيز ATP وفعالية انزيم GS المنقى جزئياً من كالس نبات الحبة السوداء، كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.



الشكل (8) رسم لينويفر – بيرك لبيان العلاقة بين تركيز NH4Cl وفعالية انزيم GS المنقى جزئياً من كالس نبات الحبة السوداء، كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.

References

1. Tateno, Y., Jpn. J. Genet., 69: 489 – 502 (1994).

2. Kolker, S.; Hoffimmann, G. F.; Okun, J. G.; Rose, C.; Jalan, R.; Haberle, J.; Schliess, F. and Haussinger, D., N-Engl. J. Med. 354: 1093 – 1094 (2006).

3. Kumada, Y.; Benson, D. R.; Hillemann, D.; Hosted, T. J.; Rochefort, D. A.; Thompson, C. J.; Wohlleben, W. and Tatemo, Y., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 3009 – 3013 (1993).

4. Suarez, I.; Bodega, G. and Fernandez, B., Neurochem. Int., 41: 123 – 142 (2002).

5. Pews, M. R.; Cooper, J. D.; Mitchison, H. M.; Mortishire – Smith, R. J.; Peaoce, D. A. and Griffia, J. L., J. Biol-Chem., 280: 49508 – 49519 (2005).

6. Zubay, G. L., Biochemistry. 4th ed., McGraw – Hill Comp, Inc., U.S.A., PP. 964 (1962).

7. Lea, P. and Mifflin, B., Nature, 251: 614 – 616, (1974).

8. Suarez, R.; Marquez, J.; Shishkovo, S. and Hornandez, G., Physiol. Plant., 117 (2003).

9. Perez – Garcia, A.; Pereira, S.; Pissarra, J.; Gutierrez, A. G.; Cazorla, a F. M. Sulema, R.; Devicente, A. and Canovas, F. M., Planta, 206: 426 – 434 (1998).

10. McParland, R. H.; Guerara, J. G.; Becker, R. R. and Evans, H. J., Biochem. J., 153: 597 – 606 (1976).

11. Ishiyama, K.; Inone, E.; Tabachi, M.; Xamaya, T. and Takahashi, H., Plant Physiol., 45 (11): 1640 – 1647 (2004).

12. Arnon, D. I. and Hoagland, D. R., Biol. Rew., 19: 55 – 67 (1944).

13. Murashige, T. and Skoog, 9, F., Physiol. Plant., 15: 473 – 497, (1962).

١٤. البكر، رحاب عبد الجبار حامد عبد الله، "رسالة ماجستير"، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

15. Shapiro, B. M. and Stadtman, E. R., "Method's in enzymology" 17A; Academic Press, New York, and London, PP, 910 – 912 (1970).

16. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J., J. Biol-Chem., 193: 265 – 275 (1951).

١٧. محمد، عبد المطلب سيد والجلبي، قصي عبد القادر وعبود، ساجدة عزيز، مجلة التربية والعلم، المجلد 19، العدد 2 (2007).

١٨. عبود، ساجدة عزيز، "أطروحة دكتوراه"، كلية العلوم، جامعة الموصل، (1997).

19. Gene Grout, R. and Larry, E. S., Plant Physiol. 70(6): 1759 – 1761 (1982).

٢٠. عبود، ساجدة عزيز، مجلة علوم الرافدين، المجلد 15، العدد 5 خاص بعلوم الحياة، 31 – 41 (2004).

٢١. آل فليح، خولة أحمد، "مدخل إلى الكيمياء الحياتية"، طبعة ثانية بمطبعة جامعة الموصل، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر، (2000).

٢٢. فخري، محمود أحمد محمد، "أطروحة دكتوراه"، كلية العلوم، جامعة الموصل، (2006).

23. McCormick, D. A.; Clark, G. A.; Lavond, D. G.; Thompson, R. F. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 2731 – 2735 (1982).

24. Lineweaver, H. and Burk, D. J. Am. Chem. Soc, 56: 658 – 666 (1934).

25. Mohammad, A. M. S.; Al-Chalabi, K. A. and Abood, S. A., J. Exp. Bot., 40: 693 – 699 (1989 a).