عزل وتنقية جزئية لانزيم الثايمدليت سينثيز من كالس نبات الخس (*Lactuca sativa , L.*)

عبد المطلب سيد محمد و قصي عبد القادر الجلبي و ساجدة عزيز عبود
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

تاريخ الاستلام ٢٠٠٦/١/٢ تاريخ القبول ٢٠٠٦/٥/١٠

ABSTRACT

Callus from hypocotyl explants of lettuce (*Lactuce sativa , L.*) was initiated on a modified Murashige and Skoog medium containing 1.0 mg/l of benzyladenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA)as growth factors. Thymidylate synthase (EC 2 . 1 . 1 . 45) was found in lettuce callus and purified about 100 fold treatment by ethanol and chloroform , ammonium sulfate and gel filtration on sephadex G – 150. Some properties of the partial purified enzyme from callus were investigated . The molecular weight was found to be a round 30000 D. The partially purified enzyme has an optimum pH of 6.8 with 50 mM potassium phosphate buffer with incubation temperature 30°C. The Michaelis - Menten constant for deoxyuridinemonophosphate (dUMP) was $1\text{-}05\times10^{-5}$M and for tetrahydrofolate (THF) 3.339×10^{-3}M .

الخلاصة

استحدث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الخس (***Lactuce sativa*** , L.) النامية على وسط موراشيج وسكوك المحور والمضاف اليه ١,٠ ملغم / لتر من البنزايل ادنين والنفثالين حامض الخليك كمنشطات نمو. نقي انزيم الثايمدليت سينثيز (TS) المعزول من كالس الخس بمقدار ١٠٠ مرة بوساطة معاملته بالايثانول والكلوروفورم. وكبريتات الامونيوم وكذلك من خلال تمريره بعمود الفصل الكروماتوغرافي الحاوي على الجيل من نوع السيفادكس G – 150 . ودرس عدد من صفات الانزيم المنقى جزئياً من الكالس، وجد ان قيمة الوزن الجزيئي التقريبي مساوية لـ ٣٠٠٠٠ دالتون

مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الثالث

واعطى الانزيم افضل فعالية عند الدالة الحامضية ٦,٨ عند استخدام البوتاسـيوم – فوسـفيت بتركيز ٥٠ ملي مولار بوصفه محلولاً منظماً ودرجة حرارة ٣٠ م . وكانـت قيمـة ثابـت ميكيلس (Km) مساوية لـ ١,٠٥ × ١٠^{-5} مولار للدي اوكسي يوردين احادي الفوسـفيت و ٣,٣٣٩ × ١٠^{-3} مولار للتتراهيدروفوليت.

المقدمة

يبنى نيوكليوتيد الثايمين بتحويل الدي اوكسي يوردين احادي الفوسـفيت الـى الـدي اوكسي ثايمين احادي الفوسفيت بوجود انزيم الثايمدليت سـينثيز (EC 2 . 1 . 1 . 45) (١) وذلك بازاحة الهيدروجين المرتبط بذرة الكربون ٥ لليوراسيل في dUMP واحلال مجموعـة مثيل بدلا عنها من مساعد الانزيم N^{10}, N^{5} – مثيلين تتراهيدروفوليت وبذلك يكـون مـساعد الانزيم مصدرا للهيدروجين والمثيل (٢). درس انزيم الثايمدليت سينثيز في خلايا اللبائن (٣) وفي خلايا الابتدائيات (١) ودرس الانزيم كذلك على نمو مفصل في خلايا الاحياء المجهريـة (٤). وهناك دراسات محدودة جدا عن فعاليته في خلايا النبات ، وقد قيست فعالية الانزيم على نحو غير مباشر بدلالة الانقسام المايتوزي (٥) وانخفاض بنـاء محتـوى DNA (٦) بعـد معاملته باحد مثبطات انزيم الثايمـدليت سـينثيز . وقيـست فعاليـة الانـزيم فـي خلايـا الكلاميدوموناس والتبغ والصنوبر والجزر (٧) وفي الخلايا المعلقة للجزر (٨).

مواد العمل وطرائقه

استحداث الكالس وتنميته

استعملت بذور نبات الخس النقية وراثيـا (***Lactuca sativa*** ,C.V. Longiflore) لاغراض البحث. عقمت البذور بمعاملتها مدة دقيقتين بمحلول الكحول الاثيلي بتركيـز ٩٦% ثم بمحلول القاصر (هايبوكلورات الكالسيوم) بتركيز ٢٠% مدة سبع دقائق وغـسلت البـذور عدة مرات بالماء المقطر المعقم. واستخدم وسط Arnon (٩ ,١٠) لزراعة البـذور وتنميـة البادرات، استحدث الكالس من قطع الساق تحت الفلقية لبادرات الخس المعمقة، وزرعت هـذه القطع على وسط موراشيج وسكوك (MS) (١١) المحور الحاوي بنزايل ادينـين والنفثـالين حامض الخليك بتركيز ١ ملغم / لتر لكل منهما و ٠,٥ % من الفحم المنشط.

استخلاص انزيم الثايمدليت سينثيز وتنقيته

سحق ٥٠غم من كالس نبات الخس بعمر ٣٠ يوما في هاون خزفي مبرد واضيف اليه ١٦٠ $سم^3$ من المحلول المنظم البوتاسيوم فوسفيت بتركيز ٥٠ ملي مولار وبدالـة حامـضية

(٧). اكمل السحق وتحطيم الخلايا باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية بتـسليط ٢٠٠٠٠ ذبذبة/ دقيقة مدة نصف دقيقة. فصل الرائق عن الراسب باستخدام جهـاز الطـرد المركـزي المبرد بسرعة ٩٠٠٠ دورة / دقيقة مدة ساعة. نقي الانزيم حسب طريقـة (١٢) باسـتخدام الايثانول النقي والكلوروفورم ثم اجراء عملية الفرز الغشائي مع الماء المقطر بدرجة حـرارة ٤ م مدة ٢٤ ساعة والترسيب بكبريتات الامونيوم بتراكيز تتراوح بين ٠ -٧٠%. واسـتخدام مادة الهلام نوع السيفادكس G – 150 لفصل انزيم التايمدليت سينثيز من الكـالس. قـدرت كمية البروتين بعد كل خطوة من خطوات التنقية حسب طريقة لاوري (١٣) وفعاليـة انـزيم التايمدليت سينثيز حسب طريقة Friedkin (١٤) التي تعتمد على الزيادة في الامتـصاص الضوئي للمحلول عند الطول الموجي ٣٤٠ نانوميتر بوجـود الديوكـسي يـوردين احـادي الفوسفيت بوصفه مادة اساساً والتتراهيدروفوليت بوصفه عاملاً مساعداً.

النتائج والمناقشة

استحداث الكالس وتنميته

اظهرت قطع سيقان بادرات نبات الخس (*Lactuce sativa* , L.) استجابة عاليـة لاستحداث الكالس في الوسط الغذائي MS المعقـم (١١) المـضاف اليـه BA و NAA بتركيز ١,٠ ملغم / لتر لكل منهما، وهذا يوكد ان استحداث ونمو كالس الخس ونموه يعتمـد على وجود الاوكسينات والسايتوكاينينات كما هو معروف في كالس النباتات الاخرى (١٥).

الفعالية النوعية لانزيم الثايمدليت سينثيز

ازدادت الفعالية النوعية للانزيم المستخلص من الكالس بمقدار ٤ ، ٥ ، ٦ مرة تقريبا من فعاليتها في اوراق نبات الخس وسيقانه وجذوره على التوالي (الجدول ١) ، ولعـل هـذا يعود الى كون خلايا كالس الخس خلايا برنكيمية هشة مفككة يسهل استخلاص الانزيمات منها (١٦).

الجدول (١) الفعالية النوعية لانزيم الثايمدليت سينثيز المعزول من الاجزاء النباتية المختلفة لبادرات الخس.

الاجزاء النباتية	الفعالية النوعية (مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين*)
الكالس	٩,١٠٣
الاوراق	٢,٢٨٠
السيقان	١,٨١١
الجذور	١,٤٩٩

التنقية الجزئية للانزيم

يشير الجدول (٢) الى زيادة الفعالية النوعية للانزيم بمقدار ثـلاث مـرات مقارنـة بفعاليته في المستخلص الخلوي غير المنقى ، وهذا يعطي مؤشرا على وجود الانزيم الحر في السايتوبلازم وغير مرتبط بالاغشية الخلوية (١٦) . ادى استخدام الايثانول والكلوروفورم الى زيادة في الفعالية النوعية للانزيم بمقدار سبع مرات وذلك لقابليتها على التخلص من عدد مـن اللبيدات الفوسفاتية (١٧). تم الحصول على اعلى فعالية للانزيم بتـشبع ٣٠ – ٤٠ % مـن كبريتات الامونيوم وازدادت الفعالية للانزيم بمقدار ١٠٠ مرة عند تنقيتهـا بعمـود الفـصل الحاوي السيفادكسي G – 150. ووجد ان قيمة الوزن الجزيئي لانـزيم الثايمـدليت سـينثيز والمساوية لـ ٣٠٠٠٠ دالتون (الشكل ١)، اقل بكثير مما وجد في نبات الجـزر (٦) وفـي خلايا اللبائن والبكتيريا (١٥).

خواص الانزيم

اوضحت النتائج ان فعالية الانزيم المنقى من كالس الخـس ازدادت بزيـادة تركيـز البروتين حتى بلغت اقصى حد لها عند ٦٠ مايكروغرام (شكل ٢) ، كمـا وجـد ان فعاليـة الانزيم تزداد خطيا مع زيادة مدة التحضين الى حد معين وبلغت اعلى حد لها بعد ١٤ دقيقة، ثم اعقبها انخفاض في الفعالية (الشكل ٣) ولعل ذلك يعود الى نفاذ المادة الاساس او الانـزيم في محلول التفاعل (١٦) ويشير الشكل (٤) الى زيادة الفعالية بزيادة درجة الحرارة الى حـد 30°م ثم اعقبها انخفاض في الفعالية وهذه الدرجة مقاربة لدرجـة الحـرارة المثاليـة لعمـل

(*) الفعالية النوعية للانزيم : كمية الانزيم اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من dUMP لكل دقيقة لكل ملغرام بروتين.

الانزيمات المستخلصة من النبات (١٦ ، ١٩) في حين يختلف عن انزيم التايمـدليت سـينثيز المستخلص من خلايا اللبائن والاحياء المجهرية

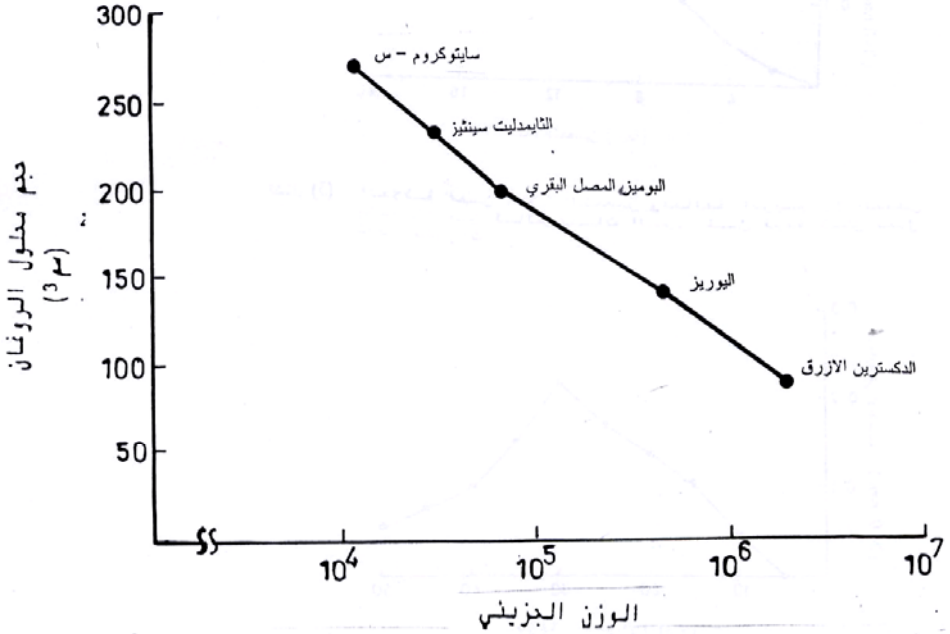
، اذ يعمل باعلى فعاليته عند درجة حرارة ٣٧ م (٣ ، ٤). وتشير النتائج كذلك الى وجـود فعالية للانزيم في المحاليل المنظمة المستخدمة فـي (الجـدول ٣) الا ان المحلـول المـنظم البوتاسيوم – فوسفيت بتركيز ٥٠ ملي مولار وبدلالة حامـضية ٦,٨ (الـشكل ٥) افـضل محلول قياسي لتحديد فعالية الانزيم مقارنة بالمحلول المنظم الترس – الحامضي والستريت – فوسفيت، واظهر الانزيم قمة امتصاص واحدة للـ pH المثالية وهذا مشابه لانزيم الثايمـدليت سينثيز المستخلص من الخلايا المعلقة للجزر (٦) وهذا يختلف بدوره عما وجد في عدد مـن انواع الكائنات الحية الاخرى ، اذ تظهر قمتان للـ pH المثاليـة للانـزيم (٢٠) . ازدادت الفعالية للانزيم باضافة عدد من الايونات المعدنية الى محلول التفاعل (الجدول ٤) فـازدادت الفعالية بمقدار الضعف بوجود ايون المغنيسيوم (16). ويوضح الشكل (٦) ان تركيز ٤٠ ملي مولار من ايون المغنيسيوم هو الامثل لعمل الانزيم، واوضحت النتائج ان قيمة ثابت ميكـيلس – منتـون (Km) لمركـب dUMP مـساوية لـ ١,٠٥×10^{-3} مـولار (الـشكل ٧). والتتراهيدروفوليت مساوية لـ ٣,٣٣٩× 10^{-3} مولار (الشكل ٨) وهذه القيم لل Km اعلى من تلك القيم في الخلايا المعلقة للجزر (٨) وفي خلايا الكائنات الحية الاخـرى (٢١) ويوضـح الجدول (٥) انخفاض النسبة المئوية لفعالية الانزيم بدرجة كبيرة في حالة حـذف او اسـتبدال المادة الاساس (dUMP) او العامل المساعد (THF) الداخل في التفاعل، وهذا يؤكد بدوره ان انزيم التايمدليت سينثيز متخصص يعمل فقط بوجود هذه المواد فقط (22).

الجدول (2) ملخص لخطوات التنقية الجزئية لانزيم الثايمدليت سينثيز المعزول من كالس نبات الخس بعد 30 يوماً من النمو بالظروف القياسية. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات

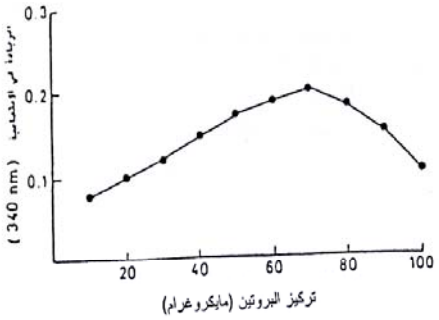
الخطوات	الحجم الكلي (سم3)	البروتين الكلي (سم3)	الفعالية الكلية (وحدة)••	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم) •	التنقية النسبية (عدد مرات)	الحاصل %
المجنس الخام	160	100.000	910.340	9.103	-	100
الرائق	133	26.400	792.158	30.008	3	87
التجزئة بواسطة الايثانول والكلوروفورم	110	10.120	609.210	60.198	7	67
التجزئة بواسطة كبريتات الامونيوم (30 - 40 %)	30	1.080	300.000	277.777	31	33
الترشيح الهلامي (G - 150)	5	0.066	60.344	914.303	100	7

• وحدة الانزيم : كمية الانزيم اللازمة لانتاج مايكرومول واحد من الداي هيدروفوليت.

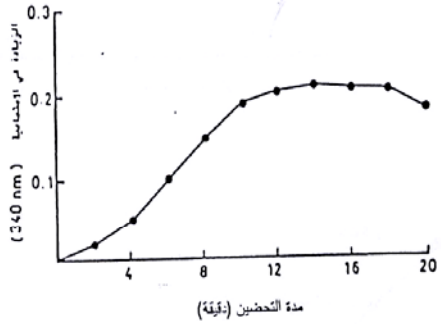
•• الفعالية النوعية للانزيم : عدد وحدات الانزيم لكل ملغرام بروتين.



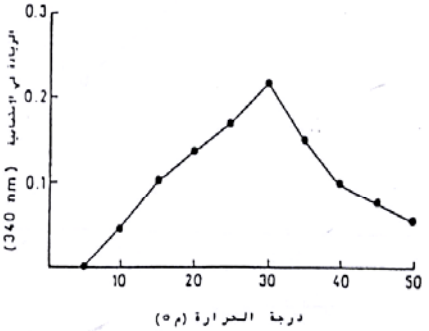
الشكل (1) العلاقة بين الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية وحجم الروغان كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات.



الشكل (2) العلاقة بين تركيز بروتين انزيم TS المنقى جزئياً وفعاليته في كالس نبات التبغ. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات



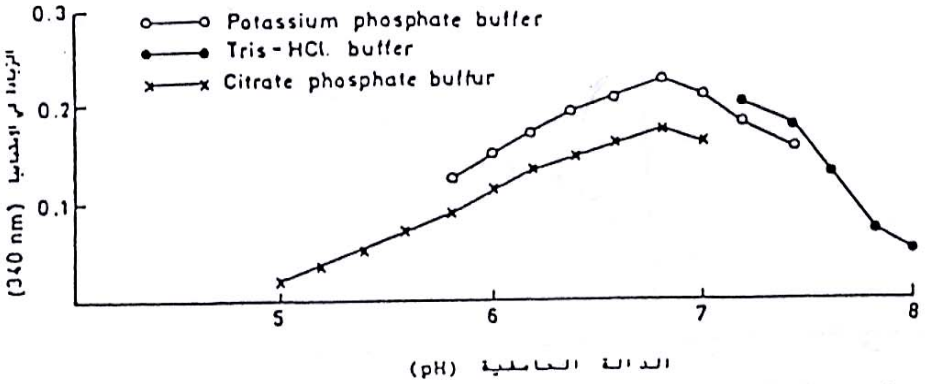
الشكل (3) العلاقة بين مدة التحضين وفعالية انزيم TS المنقى جزئياً من كالس نبات التبغ. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات



الشكل (4) تأثير درجات الحرارة المختلفة في فعالية انزيم TS المنقى جزئياً من كالس نبات التبغ. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات

الجدول (3) فعالية انزيم الثايمدليت سنثيز المنقى جزئياً من كالس نبات الخس باستخدام تراكيز مختلفة من المحاليل المنظمة. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

التراكيز (ملي مولار)	المحاليل المنظمة: الزيادة في الامتصاصية (340nm/14min.) — بوتاسيوم – فوسفيت – المنظم (pH 5.9)	(%)	ترس الحامض المنظم (pH 7.2)	(%)	ستريت – فوسفيت المنظم (pH 5.9)	(%)
10	0.080	37	0.153	77	0.090	78
20	0.089	41	0.182	91	0.098	85
30	0.132	60	0.200	100	0.115	100
40	0.192	88	0.179	90	0.101	88
50	0.219	100	0.160	80	0.090	78
60	0.182	83	0.062	31	0.062	54
70	0.058	26	0.031	16	0.022	19
80	0.035	16	0.000	0	0.000	0

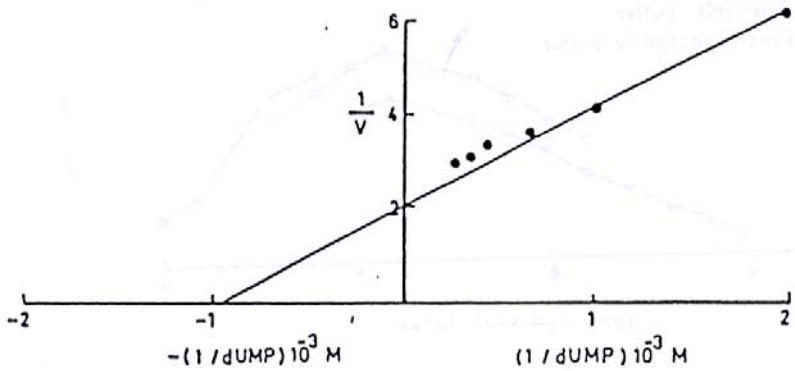


الشكل (5) تأثير الدالة الحامضية (pH) في فعالية انزيم TS المنقى جزئياً من كالس نبات الخس. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات

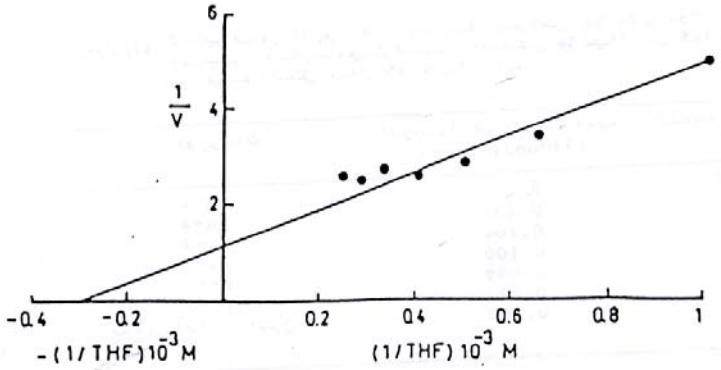
الجدول (4) تأثير عدد من الايونات المعدنية بتركيز 50 ملي مولار على فعالية انزيم الثايمدليت سنثيز المنقى جزئياً من كالس نبات الخس كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

الايونات	الزيادة في الامتصاصية (340nm/14min.)	النسبة المئوية (%)
Mg^{+2}	0.230	100
Mn^{+2}	0.184	80
Zn^{+2}	0.104	45
Na^{+1}	0.100	43
K^{+1}	0.069	30
Fe^{+3}	0.022	10
بدون اضافة ايون	0.105	46

الشكل (6) تأثير التراكيز المختلفة من ايون المغنيسيوم في فعالية انزيم TS المنقى جزئياً من كالس نبات الخس. كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات



الشكل (7) رسم ليتويفر – بيرك لبيان العلاقة بين تركيز dUMP وفعالية انزيم TS المنقى جزئياً من كالس الخس – كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.



الشكل (8) رسم ليتويفر – بيرك لاظهار العلاقة بين تركيز THF وفعالية انزيم TS المنقى جزئياً من كالس الخس – كل قيمة تمثل معدل ثلاثة مكررات.

الجدول (٥) المتطلبات الاساسية لعمل انزيم الثايمدليت سينثيز المنقى جزئياً من كالس نبات الخس

الظروف	الزيادة في الامتصاصية (340nm / 14min)	النسبة المئوية %
* المحلول الكامل	0 . 320	100
حذف dUMP	0 .000	0.0
حذف THF	0 .000	0.0
حذف HCHO	0 .001	0.03
حذف الانزيم	0 .000	0.0
حذف dUMP واضافة dCMP	0 .006	2.0
حذف THF واضافة DHF	0 .001	0.3

Reference :

1. Graziani S., Xia y., Gurnan J. R., Van Effen J. L., Leduc D., Skouloubris S., Mynykallio H. and Liebs U., J. Biol. Chem., 279 : 54340 – 54347 (2004).
2. Zhong J., Skouloubris S., Dai Q., Myllykalio H., Arni A. and Barbour G., J. Bacteriol., 188 : 909 – 918 (2006).
3. Open M.M.O., Xing Y.Y., Kolis S. and Berger F. G., Biochem J., 394: 355 – 363 (2006).
4. Liu X.O. and yang J., J. Bacteriol., 186: 6316 – 6319 (2004).
5. Macleod R.D. , Ann. Bot. , 35 : 237 – 248 (1971).
6. Nitson J. and Lang A. , Plant Physiol. , 41 : 964 – 970 (1966).
7. Vandiver V.V. and Fites R.C. , Plant Physiol , 64 : 668 – 670 (1979).
8. Nielsen E. and Cella R. , Plant and Cell Physiol. , 29: 503 – 508 (1988).
9. Arnon D.I. and Hoagland D.R. , Soil Sci. , 50 : 463 (1940).
10. Arnon D.I. and Hoagland D.R. , Biol. Rev. , 19 : 55 – 67 (1944).
11. Murashige T. and Skoog F. , Physiol. Plant. , 15 : 473 – 497 (1962).
12. Al-Chalabi K. ; Mohammad A.M.S. and Abood S.A. , J.C.E. , 2 : 369 – 391 (1990).
13. Lowry O.H. , Rosebrough N.J. ; Farr A.L. and Randall R.J. , J. Biol. Chem. , 193 : 265 – 275 (1951).
14. Friedkin M. , "Advance in Enzymology". Ed. Alton Meister. New York (1963).

١٥. محمد، عبد المطلب سيد وعبود، ساجدة عزيز، مجلة زراعة الرافدين، المجلد (٣٣)، العدد ١ (٢٠٠٥).

١٦. عبود، ساجدة عزيز، مجلة علوم الرافدين، المجلد (١٥) العدد ٥ خاص بعلوم الحيـاة ٣ – ٤١ (٢٠٠٤).

17. Green A.A. and Hughes W.L. , " Methods in Enzymology" . , 1 : 67 – 77 (1955).
18. Reid V.E and Friedkin M. , Mol. Pharmacol. , 9 : 74 – 80 (1973).
19. Abood S.A. , J. Agric. , 25 : 41 – 49 (1993).
20. Bisson L.F. and Thorner J. , J. Boil. Chem. , 256 : 12456 – 12462 (1981).
21. Santi D.V. and Banenberg P.V. , "Folates and Pterins" 1:345 – 398, John Wiley and Sons , New York (1984).
22. Griffin J., Roshick. C., Iliffe – Lee E. and McClarty G., J. Biol. Chem., 280: 5456 – 5467 (2005).