عزل وتشخيص وتنقية جزئية لانزيم الداي هيدروفوليت سنثتيز من كالس السيقان تحت الفلقية لنبات الخس (*Lactuca sativa* L.)

ساجدة عزيز عبود امجد عبد الهادي محمد حكمت مصطفى الدليمي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

الخلاصة

استحدث الكالس من قطع السيقان تحت الفلقية لبادرات نبات الخس (*Lactuca sativa* L.) النامية على وسط موراشيج وسكوك المحور والمضاف اليه ١,٠ ملغم/ لتر من البنزايل ادينين (BA) والنفثالين حامض الخليك (NAA). وجد انزيم الداي هيدروفوليت سنثتيز (EC ٦.٣.٢.١٢.) في كالس نبات الخس وتم تنقيته بمقدار ٣٦ مرة بمعاملته بالايثانول والكلوروفورم والترسيب بكبريتات الامونيوم وكذلك من خلال تمريره بعمود الفصل الكروماتوغرافي باستخدام السيفادكس G-٢٠٠ . ووجد ان قيمة الوزن الجزيئي لانزيم الداي هيدروفوليت سنثتيز مساوية الى ٤٠ كيلو دالتون تقريبا. واعطى الانزيم افضل فعالية عند دالة حامضية ٦,٨ باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الداري بتركيز ٦٠ ملي مولار . ودرجة حرارة ٣٢°م وكانت قيمة ثابت ميكليس (K_m) للانزيم باستخدام حامض الداي هيدروبتروك والادينوسين ثلاثي الفوسفيت مساوية الى ٠,٠٣٦×١٠$^{-٣}$ مولار و ٥,٢٦٣ ×١٠$^{-٣}$ مولار على التوالي.

المقدمة

يرتبط حامض الداي هيدروبتروك مع حامض الكلوتامك ليكون حامض الداي هيدروفولك بفعالية انزيم الداي هيدروفوليت سنثتيز (EC ٦.٣.٢.١٢.) (McDonald وآخرون ،١٩٧٥)، ويتحول حامض الداي هيدروفوليت بعد ذلك الى حامض التتراهيدروفولك وبالتالي الى المرافقات الانزيمية (Coenzyme) للفوليت التي بدورها تشارك في عدد من التفاعلات الكيمياحياتية التي تشمل بناء نيوكليوتيدا البيورين والثايمين وبعض الاحماض الامينية في الكائن الحي (Gilles وآخرون ،٢٠٠٥) . درس انزيم الداي هيدروفوليت سنثتيز (DHFS) في العديد من الكائنات الحية لأهميته الكبيرة لكونه احد اهداف المعالجة الكيميائية للاورام السرطانية (Rebeille وآخرون ، ١٩٩٧) ، درس انزيم DHFS في خلايا اللبائن (Gina وآخرون ،٢٠٠٣) وخلايا الاحياء المجهرية (Bognar وآخرون ،١٩٨٥)، وهناك دراسات محدودة جدا عن فعاليته في خلايا النبات إذ درس في خلايا نبات *Mouseear cress* (رشاد الصخور) (Ravenel وآخرون ،٢٠٠١) وبادرات نبات البزاليا (Ikeda و Iwai ، ١٩٧٠) ونظرا لقلة المعلومات المتوفرة عن انزيم DHFS في خلايا النبات لذلك استهدفت الدراسة عزل وتنقية الانزيم ودراسة خواصه بعد استخلاصه من كالس السيقان تحت الفلقية لنبات الخس .

مواد البحث وطرائقه

زراعة البذور وتنمية البادرات : استخدم وسط Arnon و Hoagland المعقم (Arnon وHoagland، ١٩٤٤) لانبات البذور وتنمية البادرات ، يتكون الوسط الغذائي من المواد الغذائية الكبرى والمواد الغذائية الصغرى مضافا اليها سترات الحديد وتم اضافة السكروز بتركيز ٢٪ وضبط الاس الهيدروجيني ما بين ٥,٨-٦ ، صلب الوسط باضافة الاكار بتركيز ٠,٧٪ عقمت بذور نبات الخس بعد التاكد من حيويتها تعقيما سطحيا بمحلول الكحول الاثيلي بتركيز ٩٦٪ لمدة دقيقتين .ثم نقلت الى محلول هايبوكلورايت الصوديوم ٢٠٪ وغسلت عدة مرات بالماء المقطر المعقم (Mohammad و Abood ، ١٩٩٠)، نقلت البذور المعقمة الى دوارق زجاجية حاوية على وسط Arnon و Hoagland المعقم ، وحضنت البذور بعد الزرع في الظلام في حاضنة النمو وبدرجة حرارة ٢٠ ±٢°م لحين بزوغ الجذير ، ثم نقلت البذور النامية الى حاضنة النمو المجهزة بالضوء بشدة اضاءة ١٥٠٠ لوكس وبتعاقب يومي لمدة ١٦ ساعة إضاءة و ٨ ساعة ظلام .

تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٨/٨/٣١ وقبوله ٢٠٠٨/٤/١٧

استحداث الكالس وتنميته: استخدم الوسط الغذائي الذي قدمه موراشيج وسكوك (Murashige (MS و Skoog ، ١٩٦٢) لاستحداث الكالس ونموه ، مضافا اليه السكروز بتركيز ٣,٥٪ و NAA و BA بتركيز ١ملغم/ لتر لكل منهما (Mohammad و Abood ، ١٩٩٠)زرع قطع السيقانتحد الفلقية لنبا الخس السليمة وبعمر ١٥-٢٠ يوما وبطول ١ سم تقريبا في الدوارق الحاوية على الوسط الغذائي MS وحضن الوسط الغذائي الحاوي على القطع النباتية في حاضنة النمو بدرجة حرارة ٢٠±٢°م والمجهزة باضاءة ١٥٠٠ لوكس وبتعاقب يومي لمدة ١٦ ساعة إضاءة و٨ ساعة ظلام .

إستخلاص إنزيم الديهيدروفوليت سنثتيتر (DHFS)

الاستخلاص: استخدم ٥٠ غممن كالس نبا الخس بعمر ٣٠ يوما أذ اضيف اليه ١٥٠ سم^3 من المحلول المنظم بوتاسيوم- فوسفيد بتركيز ١٠ ملي مولار وبدالة حامضية (٧)سحق الخلايا في هاون خزفي مبرد بدرجة حرارة ٤°مواكمل سحق وتحطيم الخلايا باستخدام جهاز الترددا فوق الصوتية بتسليط ٢٠٠٠٠ ذبذبة /ثانية لمدة نصف دقيقة .

قياس الفعالية : تم قياس فعالية انزيم DHFSالمستخلص من كالس نبا الخس حسب الطريقة المتبعة من قبل Shapiro وStadman (١٩٧٠) والتي تعتمد على قياس كمية الفوسفا المتحررة من تفاعل تخليق الداي‌هيدروفولي وتم حساب كمية الفوسفا المتحررة إعتمادا على المنحنى القياسي للفوسفا باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي ٦٠٠ نانومتر.استخدم طريقة لاوري (Lowry وآخرون ،١٩٥١)في تقدير كمية البروتين المعزول من كالس نبا الخس.

تنقية الانزيم : عزل الرائق عن الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة ٣٦٠٠ دورة/دقيقة ولمدة نصف ساعة . أضيف الى كل ١٠ سم^3 من الرائق المحضر مقدار ١,٢ سم^3 من كحول الايثانول النقي و ١,٣ سم^3 من الكلوروفورم وبعد دقيقة واحدة تم عزل الطبقة العليا باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة ٣٦٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة، استعمل طريقة الفرز الغشائي Dialysis مع الماء المقطر بدرجة حرارة ٤°م ولمدة ٢٤ ساعة تمد اضافة كبريتا الامونيوم الى المحلول الناتج من الفرز الغشائي بحالتها الصلبة وبتشبع ٢٠-٨٠٪ بعد ذلك فصل الراسب عن الرائق بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٦٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ٣٥ دقيقة . أذيب الراسب بالماء المقطر وتم التخلص من كبريتا الامونيوم بواسطة عملية الفرز الغشائي مع محلول بوتاسيوم فوسفيد المنظم بتركيز ٠,٠٥ مولار وبدالة حامضية ٦,٢ لمدة ٢٤ ساعة واستخدم هلام السيفادكس٢٠٠-G في عمود الفصل ٢,٦ سم × ٤٥ سم لفصل الداي‌هيدروفولي سنثتيز عن بقية البروتينا جمع العينا بسرعة جريان ٥ سم^3 لكل ١٠ دقائق (عبود ، ١٩٩٧) وبعد كل خطوة من خطوا التنقية تم تقدير كمية البروتين وقياس فعالية الانزيم حسب الطرق المذكورة سابقا .

النتائج والمناقشة

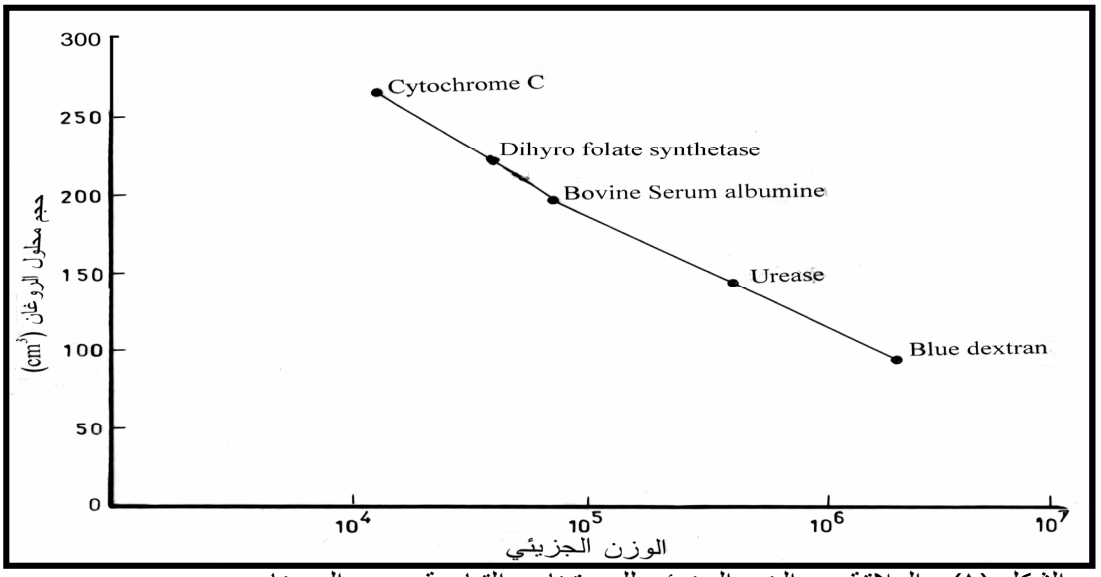
استحداث الكالس وتنميته: يعد وسط MS المضاف اليه NAAو BA بتركيز ١ملغم/لتر وسط غذائي جيد لاستحداث ونمو الكالس من قطع السيقانتحد الفلقية لنبا الخس كما ذكر سابقا (Mohammad و Abood ، ١٩٩٠) . والكالس النامي بدا هشا مفككا ولا سيما بعد ٣٠ يوما من بدء الزراعة القياسية ، مما سهل عملية إستخلاص انزيم DHFS وتنقيته (عبود،١٩٩٧) .

التنقية الجزيئية للانزيم: يشير الجدول (١) الى زيادة في الفعالية النوعية للانزيم DHFS في الرائق بمقدار ٣ مرة مقارنة بالمجنس الخام نقى مما يدل على وجود الانزيم الحر في السايتوبلازم وغير مرتبط بالاغشية الخلوية (Mohammad وآخرون ، ١٩٨٩) .أ التنقية بواسطة الكحول النقي والكلوروفورم الى زيادة الفعالية النوعية للانزيم بمقدار ٤ مرة مقارنة بالمجنس الخام وذلك لقابليتهما على التخلص من بعض البيدا الفوسفاتية (Green وHugbes ،١٩٥٥) ، وان اعلى فعالية تم الحصول عليها بنسبة تشبع ٦٥٪من كبريتا الامونيوم .وازداد الفعالية النوعية للانزيم بمقدار ٣٦ مرة عند تنقيتها بعمود الفصل الحاوي على السيفادكس ٢٠٠-G، وجد ان قيمة الوزن الجزيئي لانزيم DHFSالمستخلص من كالس نبا الخس مساو الى ٤٠ كيلودالتون تقريبا بالمقارنة مع مركبا بروتينية معلومة الوزن الجزيئي (الشكل١) وهذه القيمة مقاربة لقيمة الوزن الجزيئي لانزيم DHFS المستخلص من بدرا البزاليا (Ikeda و Iwai ، ١٩٧٠).

الجدول (١): التنقية الجزئية لانزيم الداي‌هيدروفولي سنثتيز المستخلص من كالس نبا الخس بعد ٣٠ يوما من النمو بالظروف القياسية

مراحل التنقية	الحجم الكلي(سم٣)	البروتين الكلي(ملغم)	الفعالية الكلية(U*)	الفعالية النوعية (**U/mg)	درجة النقاوة	الاستعادة (٪)
المجنس الخام	١٥٠	٣٥٠	٩,٨٥١	٠,٠٢٨	-	١٠٠
الرائق	٨٠	١١٠	٩,٠٤١	٠,٠٨٢	٣	٩٢
المعاملة بالايثانول والكلوروفورم	٥٥	٧٠,٢٣١	٧,٩٨٢	٠,١١٤	٤	٨١
المعاملة بكبريتات الامونيوم	٥,٢٣	٢٠,٢٤١	٥,٥٨٧	٠,٢٧٦	١٠	٥٧
الترشيح الهلامي G-٢٠٠	٥	٢,٤٠٠	٢,٣٩٥	٠,٩٩٨	٣٦	٢٥

*U :كمية الانزيم التي تعمل على تحرر مايكرومول واحد من الفوسفا في الدقيقة الواحدة .
** الفعالية النوعية :عدد وحدا الانزيم الموجودة في ١,٠ ملغم من البروتين .
كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررا .



الشكل (١) : العلاقة بين الوزن الجزيئي للبروتينا القياسية وحجم الروغان
-كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررا .

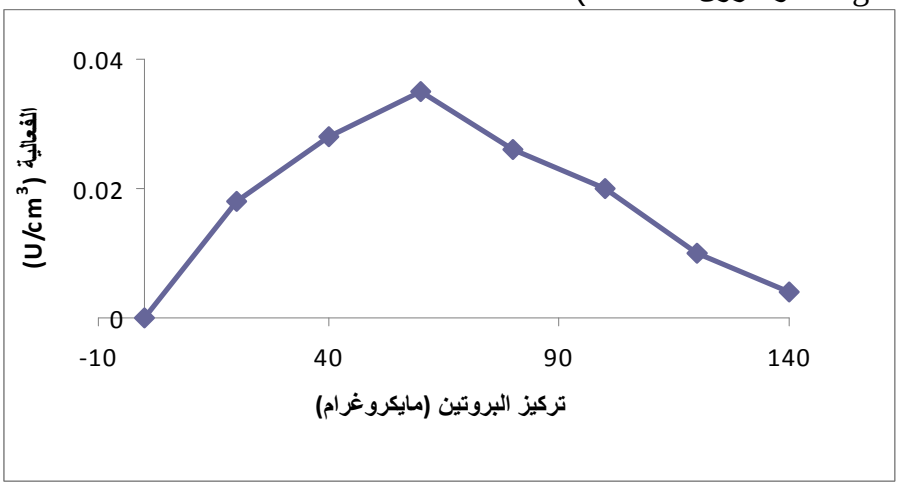
تاثير بعض العوامل على فعالية انزيم DHFS المنقى جزئيا من الكالس

تاثير تركيز الانزيم : يوضح الشكل (٢) زيادة في فعالية انزيم DHFS مع زيادة في تركيز البروتين حتى بلغ اقصى حد لها عند ٦٠ مايكروغراموانخفض الفعالية تباعا بعد ذلك ، وهذا الانخفاض يعود الى انتهاء المادة الداخلة في التفاعل ، وهذه النتيجة مطابقة لخواص انزيما اخرى عزل من نباتا مختلفة (محمد وآخرون ،٢٠٠٧ وعبود وعز ،٢٠٠٧) . وقد استخدم تركيز ٦٠ مايكروغرام في جميع التجارب اللاحقة .

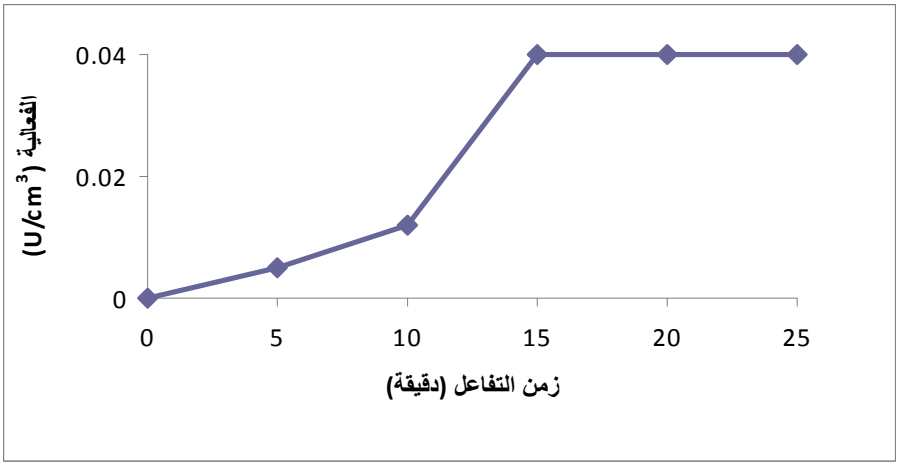
العلاقة بين زمن التفاعل وفعالية الانزيم :اوضح النتائج بان فعالية الانزيم المنقى جزئيا من كالس نبا الخس تزداد خطيا مع زيادة فترة التحضين لحد معين وبلغ اعلى حد لها بعد 15 دقيقة من بدأ التفاعل ثم اعقبهاثبا في الفعالية (الشكل ٣) ، ربما يعود ذلك الى نفاذ المادة الاساس في محلول التفاعل (دلالي ، ١٩٨٣).

تاثير درجة الحرارة : يوضح الشكل (٤) تاثير درجة الحرارة على سرعة التفاعل الانزيمي ويبدو من الشكل ان سرعة التفاعل تصل الى الحد الاقصى عند ٣٢°م ، إذ إن زيادة درجة الحرارة تسبب زيادة في الطاقة الحركية لكل منمادة التفاعل وجزيئا الانزيما وبالتالي زيادة في فرصة الاصطدام بين الانزيم وجزيئا مادة التفاعل .وعند استخدام درجا حرارة اعلى من ٣٢°م حصل انخفاض في سرعة التفاعل بسبب حدوث تشوه في طبيعة الانزيم (Denaturation) نتيجة لتفكك الاواصر الهيدروجينية والقوى الاخرى المسؤولة عن المحافظة على التركيب الثلاثي للبروتين وبالتالي فقدان الانزيم لفعاليته (دلالي ، ١٩٨٣). وتعد درجة حرارة ٣٠±٢°ملائمة لعمل كثير من الانزيما المستخلصة من النباتا (عبود ،٢٠٠٤) وهذا يختلف بدوره عنمعظم الانزيما المستخلصة من نسجة الكائنا الحية الاخرى إذ تصل الدرجة الحرارية المثلى لعمل الانزيما في تلك الكائنا بصورة عامة إلى

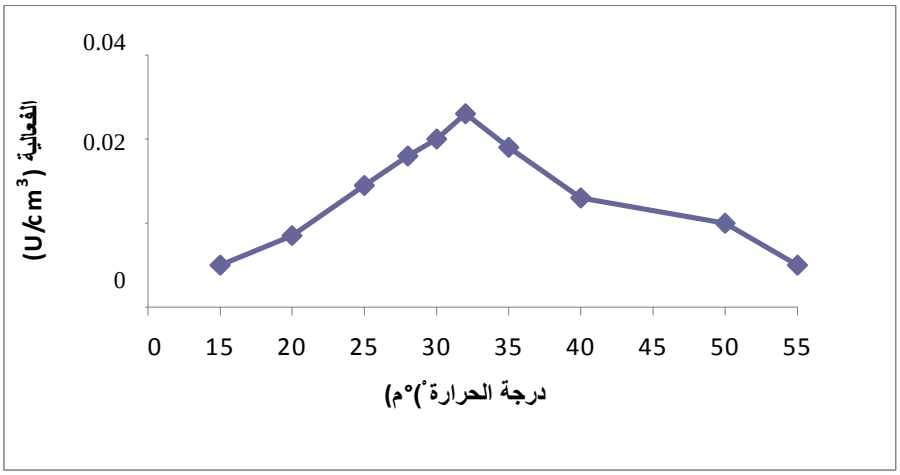
م°٣٧
Pongsamart) وآخرون ، ١٩٨٤) .



الشكل (٢): العلاقة بين تركيز البروتين (DHFS) المنقى جزئيا وفعاليتهفي كالس نبا الخس
- كل قيمة تمثل معل ثلاث مكررا

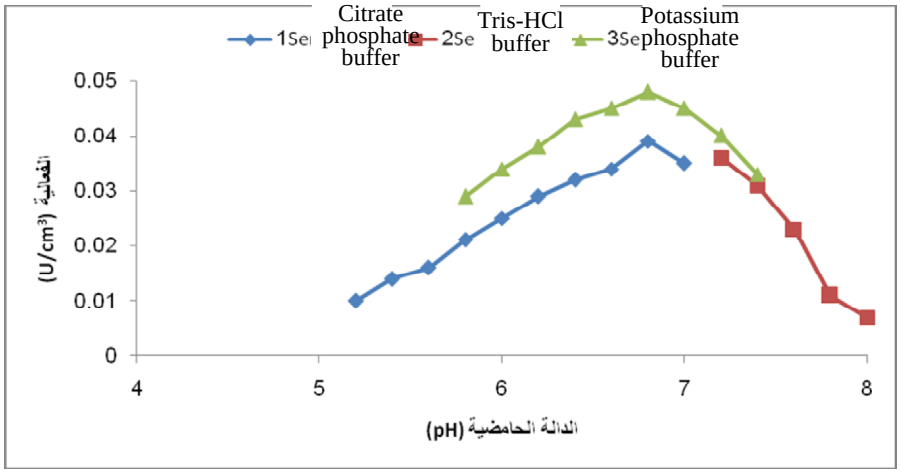


الشكل (٣): العلاقة بين فعالية انزيم DHFS المنقى جزئيا من كالس نبا الخس وزمن التفاعل
-كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررا



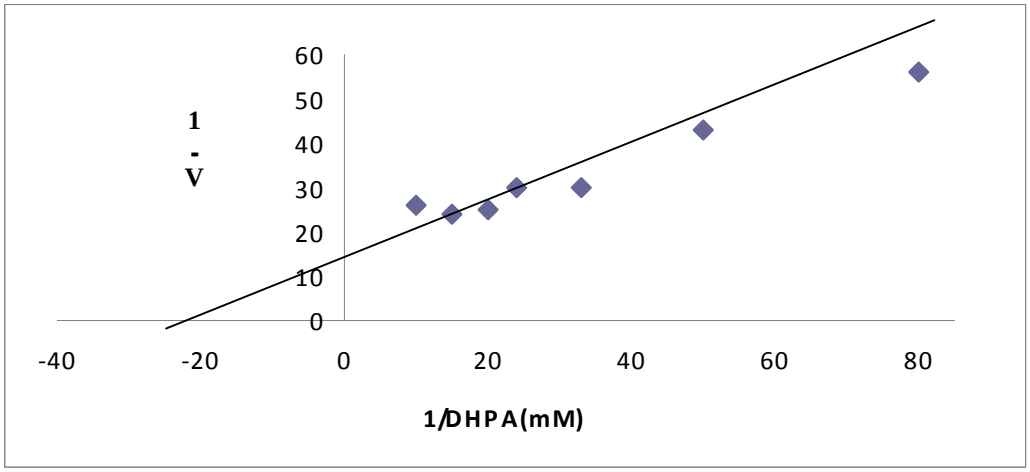
تـــاثير الدالـــة الحامـــية للمحلول المنظم: استخدم مـديا مختلفـة مـن الدالـة الحامضية للمحاليل المنظمة المستخدمة في هذه الدراسة . ويوضح الشكل (٥) ان افضل محلول منظم لعمل الانزيم هو بوتاسيوم - فوسفيد بتركيز ٦٠ ملي مولار وبدالة حامضية ٦,٨ وبذلك يعد محلول بوتاسيوم - فوسفيد محلولا منظما للعديد من انزيما المسار الحيوي لنباء حامض الفولك من كالس نبا الخس (عبود ،١٩٩٧) .

الشكل (٤):تـأثير درجـا الحـرارة المختلفـة فـي فعاليـة انـزيم DHFSالمنقى جزئيا من كالس نبا الخس
- كل قمة تمثل معدل ثلاث مكررا

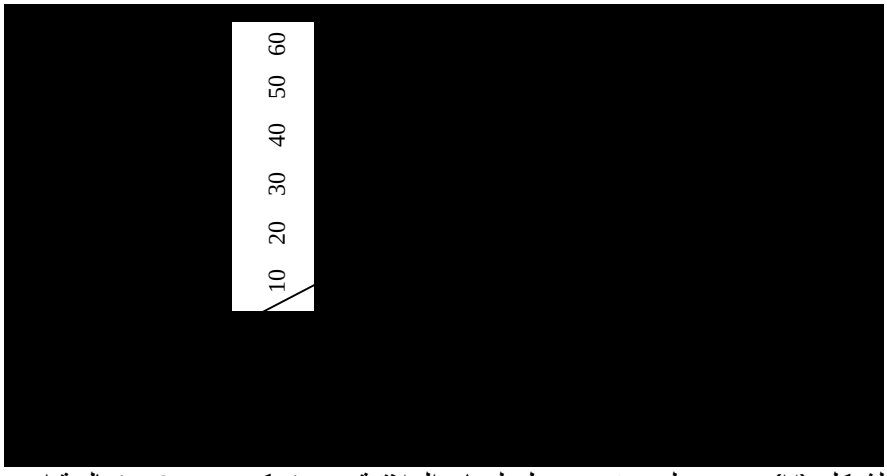


الشكل (٥): تـأثير الدالـة الحامضـية (pH) فـي فعاليـة انـزيم DHFS المنقـى جزئيا من كالس نبا الخس
-كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررا

تاثير تركيز حامض الداي هيدروبتروك والادينوسين ثلاثي الفوسفيت: استخدم مـادة حـامض الداي هيدروبتروك كمادة اساس و ATP كعامل قرين انزيمي .واد زيادة تركيز المادة الاساس و ATP مع عدم تغير في العوامل الاخرى الى زيادة في فعالية الانزيم ، وكان قيمة ثابـ ميكليس منتون (K_m) لحامض الداي هيدروبتروك بمقدار ٠,٠٣٦×١٠$^{-٣}$مولار (الشكل ٦) وللـ ATP بمقدار ٥,٢٦٣ ×١٠$^{-٣}$ مولار (الشكل ٧) ، وهذا يعود الى كون زيادة في تركيز المادة الاساس يؤدي الى زيادة في سرعة التفاعل الانزيمي ولكن عند زيادة تركيز المادة الاساس المستخدمة بشكل كبير بحيث تصبح جميع المواقع الفعالة للانزيم مشبعة بالمادة فان سرعة التفاعل الانزيمي تكون غير معتمدة على تركيز المادة الاساس (دلالي،١٩٨٣) .



الشكل (٦) : رسم لينويفر-بيرك لبيان العلاقة بين تركيز حامض الداي هيدروبتروك وفعالية انزيم DHFSالمنقى جزئيا من كالس نبا الخس
-كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررا



الشكل (٧) : رسم لينويفر- بيرك لبيان العلاقة بين تركيز ATP وفعالية انزيم DHFSالمنقى جزئيا من كالس نبا الخس
-كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررا

يتضح مما سبق بامكانية استخدام تقنية زراعة الانسجة النباتية كنظام في دراسة وفهم بعض الجوانب المتعلقة بمسار الي نوفو لبناء حامض الفولك في نبا الخس ، وتعد هذه الدراسة مكملة لدراسا سابقة تم فيها عزل وتنقية جزئية لانزيما اخرى مشاركة في مسار بناء حامض الفولك في نبا الخس (عبود،١٩٩٧ و محمد واخرون ،٢٠٠٧).

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PARTIAL PURIFICATION OF DIHYDROFOLATE SYNTHETASE FROM HYPOTYL STEMS CALLUS OF LETTUSE PLANT (*Lactuca sativa* L.)

Sajida A-Abood Amjad A.Mohammad Hekmat M.AlDulimi
Biology Dept., College of Sci., Mousl Univ., Iraq

ABSTRACT

Callus from hypocotyl explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.) was initiated on a modified Murashige and Skoog medium containing 1.0 mg/l of benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA) .Dihydrofolate synthetase (EC.6.3.2.12) was found in lettuce callus and purified about 36 fold by treating with ethanol and chloroform, ammonium sulfate and gel filtration on Sephadex G-200. The molecular weight of dihydrofolate synthetase was found to be around 40 KD. By Sephadex G-200 column chromatography. The optimum pH for the activity was 6.8 . The optimum reaction temperature was 32C°. The Michaelis constants using dihydropetroic acid and adenosinetriphosphate were $0.036x10^{-3}$M and $5.263x10^{-3}$M respectively.

المصادر

دلالي ، باسل كامل (١٩٨٣). "فهم الانزيما " ترجمة /مطبعة جامعة الموصل / العراق .
عبود ، ساجدة عزيز (١٩٩٧). دور حامض الفولك في بناء البريمدينا والبيورنيا في كالس نبا الخس، اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق .

عبود ، ساجدة عزيز (٢٠٠٤). عزل وتشخيص وتنقية جزئية لانزيم السايتوسين دي امينيز من كالس نبا زهرة الشمس . مجلة علوم الرافدين ، ١٥ (عدد خاص) : ٣١-٤٢ .

عبود ، ساجدة عزيز وعز ،نهال (٢٠٠٧). عزل وتنقية جزئية لانزيم الكلوتامين سنثتيز من كالس نبا الحبة سوداء . مجلة التربية والعلم، مقبول للنشر .

محمد ، عبد المطلب سيد ، وقصي عبد القادر الجلبي ، ساجدة عزيز عبود (٢٠٠٧). عزل وتنقية جزئية لإنيم الثايمدليـ سنثتيز من كالس نبا الخس ، مجلة التربية والعلم ، ١٩ (٢) : ١-١١.

Arnon, D.I. and D.R Hoagland (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods. . Biol. Rev. , 19:55-67.

Bognar, A. l. ; C. Osborne ; B. Shane; S.C. Singer and R. Ferone (1985). Folypolyglutamate synthetase-dihydrofolate synthetase.Cloning and high expression of *E. coli* gene and purification and properties of the gene product. J. Biol. Chem. 260: 5625-5630 .

Gilles, J.C. B.; P.Q. Eoin ; F. G. Jesse and D. H. Andrew (2005). Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification . Crop Sci., 45: 449-453.

Gina, M. C. ; B.A. Tuliu ; T. Naoko and M.K. Philipp (2003). Retroviral transduction of a mutant dihydrofolate reductase , thymidylate synthetase fusion gene into murine marraw cells confers resistance to both methotrexate and 5-fluorouracil .Human Gene Therapy, 14 : 435-446 .

Green, A.A. and W.L. Hugbes (1955). Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In Methods In Enzymology, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Academic Press, New York , and London, 1: 67-77 .

Ikeda, M. and K. Iwai (1970). Biosynthesis of folic acid compound in plants VI , The occureance and properties of the dihydrofolate synthesizing enzyme in pea seedling . Plant and Cell Physiol. , 11: 639-656

Lowry , O. H.; N.J. Rosebrough ; A.L. Farr and R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 .

McDonald, D. ; I.J. Atkiason ; E.A. Cossius and B. Shaue (1975). Isolation of dihydrofolate and folypolyglutamate synthetase activities from *Neurospora* . Phytochem., 38 : 327-333 .

Mohammad, A.M.S. ; K.A. Al-Chalabi and S.A. Abood (1989). The occurrence and properties of dihydrofolate reductase isolated from sunflower callus. J.Exp. Bot. , 40:693-699.

Mohammad,A.M.S.and S.A. Abood (1990). Propagation of Lettuce (*Lactuca sativa* C.V. Longiflora) by tissue culture. LE/ ESCWA. , ID, 89 Conf. 1110.

Murashige , T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures . Physiol . Plant. , 15:473-497.

Pongsamart, S. ; I. Richard ; L. Coman and O. William (1984). Characterization and inhibition of dihydrofolate synthetase from *Neisseria gonorhaene* .Molecular and Cellular Biochem.,59: 1573-4919.

Ravenel, S.; H. Cherest ; S. Jabrin ; D. Grunwald ; Y. Surdin-kerjan ; R Douce and F. Rebeille (2001). Tetrahydrofolate biosynthesis in plants :

Molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and characterization three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana* Natl. Acad . Sci. 98: 15360-15365 .

Rebeille, F.; D. Macherel ; J.M. Mouillon ; J. Garin and R. Douce (1997). Folate biosynthesis in higher plants : Purification and cloning of abifurictional 6-hydroxymethyl – 7,8- dihydropyrophosphokinase / 7,8-dihydropteroate synthase in mitochondria. EMBO J., 16 : 947-957 .

Shapiro, B.M. and E.R. Stadman (1970). Glutamine synthetase (*E. coli*) in Tabor, H. and Tabor, W.C. (Eds.). In "Methods in Enzymology" 17A; Academic Press, New York , and London , pp. 910-912 .