استخلاص و تنقية الانزيم Deoxyribonuclease I من البنكرياس البقري

Extraction and purification of bovine pancreatic Deoxyribonuclease I

بيداء سيزار غازي منعم عزيز عبد الكريم عبد الرزاق
قسم التقنيات الاحيائية /كلية العلوم / جامعة بغداد

Baidaa S. Hermiz Ghazi M. Aziz Abdel kareem A. Alkazaz
Dept of Biology/ College of Science/ University of Baghdad

المستخلص :

جُمِعَت عينات من البنكرياس البقري والغدة الزعترية للعجول من المجازر المحلية لاستخلاص الانزيم Deoxyribonuclease I (DNaseI) والمادة الاساس(DNA) على التوالي . وقد تم الحصول على المستخلص الانزيمي الخام باستخدام الماء المقطر المثلج و0.25 عياري من حامض الكبريتيك برقم هيدروجيني 3 ولمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 5 م بفعالية انزيمية 8500 وحدة/مللتر . خُدِدَت بعض العوامل المؤثرة في فعالية الانزيم الخام التي تضمنت استعمال 17 وحدة/مللتر من الانزيم و ساعة واحدة مدة تفاعل للانزيم مع مادته الاساس . نُقيَ الانزيم باستخدام خطوات متتالية من الترسيب باستعمال كبريتات الامونيوم والتي اعطت عدد مرات تنقية مقدارها 529.4 بحصيلة انزيمية 6.35 %. اتصف الانزيم المنقى جزئيا بكونه فعالاً عند تركيز 2.7 وحدة / مللتر و50 مايكروغرام / مللترمن DNA الغدة الزعترية بعد 30 دقيقة من زمن التفاعل وامتلك الانزيم ثباتاًعند رقم هيدروجيني 9 وكان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليته 6.5 كما وأظهَرالانزيم اعلى فعالية عند درجة حرارة 50 م . وكان لايونات المغنيسيوم والمنغنيز المضافة الى مزيج التفاعل تأثيراً تحفيزياً كبيراً في الفعالية الانزيمية مع امتلاك الكالسيوم والنحاسيك أثراً تحفيزياً قليلاً، بينما كان لايونات الزئبقيك والفضة تأثيراً تثبيطياً واضحاً في فعالية الانزيم . ثبطت فعالية الانزيم بوجود بعض العوامل المدنترة للبروتين والتي منها Sodium (SDS) dodecyl sulphate والعامل الكلاًبيEthylene diamine tetra acetic acid (EDTA) وبصورة شبه كاملة عند معاملته ببعض العوامل المختزلة مثل 2- مركبتوايثانول واليوريا مع احتفاظ الانزيم بفعاليته عند وجود مادةPhenyl methyl sulphonyl floride (PMSF) .

Abstract

Samples of bovine pancreatic and calf thymus glands were collected from local slaughterers to extract deoxyribonuclease I enzyme (DNase I) and DNA respectively. Crude extract was prepared by using cooled distilled water and 0.25 N sulfuric acid .This study show that the best condition for the crude extract activity was 17 U/ml and 1 hr. Incubated period reaction with its substrate.The bovine pancreatic DNase I was purified by several steps of precipitation using ammonium sulphate to 529.4 times, with an enzymes yield 6.35%. Enzyme characterization studies indicate that: it is active at 2.7 U/ml, and 50 µg /ml DNA after 30 min of reaction time, the enzyme activity was higher at pH 6.5 and it showed stability at pH 9. The maximum enzyme activity was reported at 50 °C The results obtained from the role of metal ions (Mg^{+2}, Mn^{+2}) on enzyme activity indicate that these ions stimulated the enzyme activity while the Ca^{+2} and Cu^{+2} had lower stimulating activity on the enzyme but Ag^{+1} and Hg^{+2} showed inhibitory effect on enzyme activity. In addition the enzyme activity was inhibited by using denaturing Sodium dodecyl sulphate (SDS), chelating agents Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA),

and reducing agents (2-Merceptoethanol and Urea) , and maintained it's activity when incubated with Phenyl Methyl Sulphonyl Floride (PMSF) .

المقدمة

تعد النيوكلييزات (Nucleases) من اهم الانزيمات المتميزة بفعاليتها باصلاح الـ DNA المتضرراو دورها المهم الذي تلعبه كانزيمات هاضمة Digestive Enzyme [1] فضلاً عن اضافة صفة مقاومة الفايروسات للعديد من النباتات، حيث تُعَد انزيمات النيوكلييزات المحللة للمادة الوراثية DNA أو RNA العائدة للفايروسات من الطرائق الواعدة التي تسهم في السيطرة على الامراض الفايروسية [2] . ان اكتشاف انزيم الـ DNaseI البنكرياسي المحلل للحامض النووي منقوص الاوكسجين ودراسة تركيبه البلوري فضلاً عن دراسة فعاليته الحفزية والعديد من صفاته المهمة قد حقق تطوراً واسعاً في مجال بحوث انزيمات الـ Nucleases [3] . اتصف الـ DNase I البنكرياسي (Deoxyribonuclease EC 3.1.21.1) بانه بروتين سكري ذو وزن جزيئي 31000 دالتون ، وهو من انزيمات القطع الداخلي Endonucleases وإن ناتج تحليله للمادة الوراثية هوالنيوكليوتيدات ذات طرف 5′ فوسفات ، فضلاً عن حاجته الى الايونات الثنائية الشحنة الموجبة لفعاليته الحفزية.يُفرَز الانزيم الى قناة الجهاز الهضمي من الغدد ذات الافراز الخارجي مثل البنكرياس مع الاشارة الى امتلاك البنكرياس فعالية عالية للانزيم المذكور سابقاً[4] . ونظراً للتطبيقات المهمة والواسعة لهذا الانزيم ولقلة الدراسات المحلية في هذا المجال فقد هدفت هذه الدراسة الى تحضير هذا الانزيم من البنكرياس البقري ولتحقيق هذا الهدف شملت الدراسة :

1. استخلاص الانزيم من البنكرياس البقري .
2. تنقية الانزيم جزئياً باستخدام خطوات الترسيب بكبريتات الامونيوم .
3. تحديد بعض العوامل المؤثرة في فعالية الانزيم المنقى جزئياً .

طرائق العمل

جمع عينات البنكرياس البقري Collection of Pancreas Samples

جُمعت عينات من بنكرياس الأبقار(2.5 كغم) من المجازر المحلية ، وبحالة طرية وطازجة وقد شخصت في مختبرات كلية الطب البيطري/جامعة بغداد .

الاستخلاص والتنقية الجزئية للانزيم DNase I البنكرياسي

تم الاستخلاص والتنقية الجزئية للأنزيم DNaseI البنكرياسي من عينات البنكرياس البقري تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل [5] التي تتلخص باستخدام خطوات متتالية من الترسيب بملح كبريتات الامونيوم بدءاً بنسبة التشبع 20% وبرفع نسبة التشبع الى 40% ومن ثم الى 50% ، مع تركيز المحلول الانزيمي في الخطوة الاخيرة بنسبة اشباع 70% كبريتات الامونيوم .

إستخلاص وتنقية المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية للعجل) Extraction and Purification of Calf Thymus DNA

أُستخلص الدنا الكروموسومي (Chromosomal DNA) من الغدة الزعترية للعجل (اقل من سنة) Calf Thymus gland على وفقً الطريقة الموصوفة من قبل[6] .

طرائق قياس فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي

استعملت في هذه الدراسه طريقتين لقياس فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي ، هما :-

طريقة Kunitz باستعمال المطياف الضوئي Kunitz Spectrophotometer assay of DNase Activity

إن الاساس العلمي لهذه الطريقة يعتمد على زيادة نسبة الامتصاص الضوئي على طول موجي 260 نانوميتر عند درجة حرارة 25 م، والناتج بسبب تحلل المادة الوراثية (DNA) بفعل الانزيم DNase I ، وتعرف وحدة الانزيم تبعاً لطريقة Kunitz بانها كمية الانزيم التي تسبب زيادة في الامتصاصية عند طول موجي 260 نانوميتر مقدارها 0.001/دقيقة في الامتصاص عند درجة حرارة 25 م عند رقم هيدروجيني 5 .

طريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Gel assay of DNase I Activity

قدرت فعالية الانزيم حسب الطريقة الموصوفة من قبل [7] التي تعتمد على متابعة تحلل المادة الاساس(DNA) بتركيز 1 مايكروغرام/مللتر بفعل الانزيم Nase I في مستخلصات البنكرياس البقري باستعمال الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز.

تقدير تركيز البروتين

أُستخدمت الطريقة المطلقة (Absolute Method) لتقدير تركيز البروتين في نماذج الانزيم المستخلص والموصوفة من قبل [8] .

تحديد بعض العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم الخام

تحديد التركيز الامثل للانزيم الخام

حضرت تراكيز مختلفة من الانزيم الخام DNase I (ذات تركيز 8500 وحدة/ مللتر) والتي شملت (17 ،28 ،42، 85، 170، 850) وحدة/ مللتر لتحديد التركيز الامثل للانزيم في تحليل المادة الاساس (DNA)

تحديد زمن التفاعل الامثل للانزيم الخام

حددت اوقات زمنية مختلفة لتفاعل الانزيم الخام مع مادته الاساس بعد تثبيت التراكيز المثلى لهما والتي تضمنت (5 ،10 ،20 ،30 ،40 ،50 ،60) دقيقة لاجل اختيار الزمن الامثل للتفاعل الانزيمي .

العوامل المؤثرة في فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي المنقى جزئياً

تعيين التركيز الامثل للمادة الاساس (DNA)

لتحديد التركيز الامثل للمادة الاساس (DNA) لفعالية إلانزيم DNase I المنقى جزئياً من البنكرياس ، حضرت تراكيز مختلفة من المادة الاساس تضمنت (1،10 ،20 ،50 ،100 ،150 ،200 ،500) مايكروغرام/ مللتر.

تعيين زمن التفاعل المناسب للانزيم DNase I المنقى جزئياً

اختبرت اوقات زمنية مختلفة للتفاعل الانزيمي شملت 1 - 45 دقيقة لتحديد زمن التفاعل الامثل للانزيم DNase I المنقى جزئياً.

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

حضرت المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية) بارقام هيدروجينية مختلفة (4 ،5 ،6.5 ،8 ،9) لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم DNase I المنقى جزئياً من البنكرياس .

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم

حضر الانزيم بارقام هيدروجينية مختلفة (4 ،5 ،6.5 ،8 ،9) في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م لمدة 15 دقيقة وذلك بمزج حجوم متساوية (1:1) من المحلول الانزيمي والمحاليل الدارئة ذات الارقام الهيدروجينية المختلفة.

تعيين الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الانزيم DNase I البنكرياسي

لتعيين الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الانزيم DNase I اجري التفاعل الانزيمي في درجات حرارية مختلفة شملت (25 ،30 ،40 ،50 ،60 ،70 ،80) م لمدة 30 دقيقة.

تأثير بعض الاملاح في فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي

حضرت تراكيز مختلفة (10 ،20 ،40) ملي مولار من محاليل بعض الايونات الثنائية التكافؤ التي شملت: كلوريد المغنيسيوم وكلوريد المنغنيز وكلوريد الكالسيوم وكلوريد الزئبقيك وكلوريد النحاسيك فضلاً عن كلوريد الفضة باستعمال داريء الفوسفات 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 6.5 .

تأثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية الانزيم

مُزِجَ محلول الانزيم DNase I المنقى جزئياً مع المحاليل المحضرة سابقاً بتراكيز نهائية (5، 10، 20) ملي مولار لمادةالـ EDTA و(10 ، 20)% لمادة الـ SDS و(0.1 ، 10) ملي مولار لمادة الـ PMSF ، ثم حضن المزيج بدرجة حرارة 35 م لمدة 15 دقيقة .

تأثير اليوريا و 2– مركبتو ايثانول في فعالية الانزيم

حُضِرَ محلول اليوريا 2– مركبتو ايثانول اعتماداً على الطريقة الموصوفة من قبل [9] .

النتائج والمناقشة

استخلاص المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية للعجول)

امتاز الحامض النووي منقوص الاوكسجين المعزول من الغدة الزعترية Calf Thymus DNA بامتلاكه تركيزاً مقداره 3 ملغم/مللتر ونقاوة جيدة (1.85) وشكل (1) يوضح الـDNA المترسب بعد اضافة الكحول الاثيلي 96 % اثناء عملية الـ Spooling . واستخدم الـ DNA المعزول من الغدة الزعترية كمادة اساس من قبل العديد من الباحثين لقياس فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي [10,5] .

شكل (1) : دنا الغدة الزعترية (Calf Thymus DNA) في اثناء عملية الـ spooling

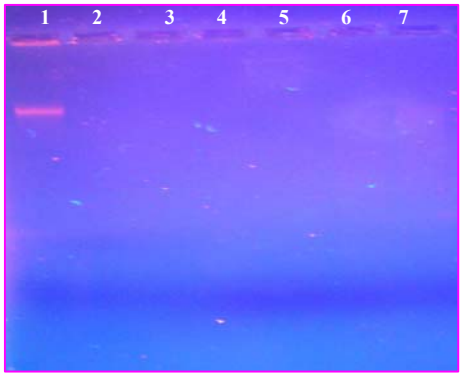
استخلاص الانزيم DNase I الخام من البنكرياس البقري

يشير الجدول (1)الى نتائج فعالية الانزيم DNase I المستخلص من البنكرياس البقري وعند قياس فعالية الانزيم الخام بطريقةالـ Gel assay وتركيز البروتين بلغت الفعالية الانزيمية 8500 وحدة/مللتر والفعالية النوعية 85 وحدة/ملغم بروتين . وقد تمت الاشارة الى تصنيف الانزيم DNase I الى ثلاثة انواع :Pancreas ، و Parotid ، والـ Pancreas – Parotid بناءا على توزيع تراكيز الانزيم في انسجة الكائنات الحية , مع تميز نسيج البنكرياس البقري باحتوائة على فعالية عالية للانزيم DNase I . ان مقارنة تراكيز الانزيم المذكور في الانسجة المختلفة للابقـار والمتضمنة البنكرياس والطحال والكبد والرئة والمعدة والغدة الزعترية والغدة النكفية يبين احتواء البنكرياس على فعالية نوعية عالية مقدرة بـ $1300 \text{ X } 10^3$ وحدة/ملغم , فضلا عن الغدة النكفية ذات الفعالية العالية وبالعكس مـن الانسجة الباقيـة المتميزة بانخفـاض الفعالية الانزيمية [11] , مما حدا الى استعمال البنكرياس البقري في عملية استخلاص الانزيم DNase I في الدراسة الحالية .

تحديد بعض العوامل المؤثرة في فعالية الانزيم الخام

التركيز الامثل للانزيم الخام

لوحظ ان الانزيم DNaseI البنكرياسي الخام يمتلك القدرة على تحليل الـ DNA بتركيز5 مايكروغرام/مللتر بصورة كلية بالتراكيز (850 ،85،170 ،42.5 ،28.3) وحدة/مللتر، مللتر كما موضح في شكل (2) المجال (2 ،3 ،4 ، 5،6) قياساًبالـDNA غير المعامل بالانزيم (المجال 1) بينما يقوم بهضم وتحلل الـ DNA بشكل جزئي عند امتلاكه فعالية 17 وحدة/ مللتر (المجال 7) . ونتيجة لما ذكر سابقا تم اختيار الـ 17 وحدة/ مللتر تركيزاً مناسبا للانزيم ، ويتضح من هذه النتائج كفاءة الانزيم العالية في هضم الـ DNA الكروموسومي للغدة الزعترية بعد تخفيفة 500 مرة (17 وحدة /مللتر) ، اذ اشار[12] الى ان المللترالواحد من الانزيم غير المركز0.01 مايكرغرام/ مللتر ذو كفاءة عالية في فك بلمرة Depolymerization محلول الـ DNA المركز deoxyribonucleate solution . كما ذكر [13] ان الانزيم DNase II البنكرياسي يمتلك فعالية عالية في تحلل المادة الاساس حتى بتركيز 0.3 وحدة /مللتر تحت ظروف التفاعل المثلى للانزيم المذكور .

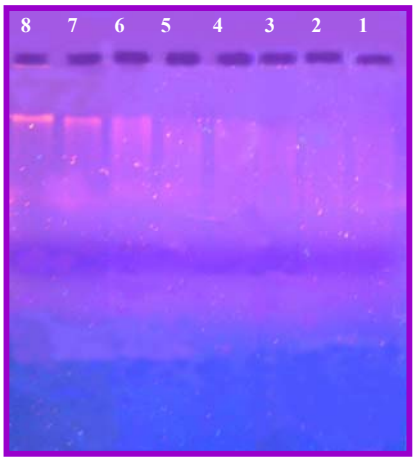


- المجال رقم (1) : نموذج الدنا بتركيز5 مايكروغرام /مليلتر غير معامل بالانزيم
- المجال رقم (2) : نموذج الدنا معامل بالانزيم الخام بتركيز 850 وحدة /مللتر .
- المجال رقم (3) : نموذج الدنا المعامل بالانزيم الخام بتركيز 170 وحدة/مللتر .
- المجال رقم (4) : نموذج الدنا المعامل بالانزيم الخام بتركيز 85 وحدة/مللتر .
- المجال رقم (5) : نموذج الدنا المعامل بالانزيم الخام بتركيز 42·5 وحدة/مللتر
- المجال رقم (6) : نموذج الدنا المعامل بالانزيم الخام بتركيز 28·3 وحدة/مللتر
- المجال رقم (7) : نموذج الدنا المعامل بالانزيم الخام بتركيز 17 وحدة/مللتر .

شكل (2) :الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم مع المادة الاساس(دنا الغدة الزعترية) لتحديد التركيز الامثل للانزيم الخام على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة .

زمن التفاعل الامثل للانزيم الخام

اظهرت النتائج قدرة الانزيم الخام بفعالية 17 وحدة/مللترعلى تحليل المادة الاساس بتركيز 5 مايكروغرام/مللتر بعد مضي10 دقائق بشكل اقل من تحلله للمادة الاساس بعد مضي 60 دقيقة شكل (3) (المجال 3 و8 على التوالي) , وبالقياس مع حزمة الدنا غير المعامل بالانزيم (المجال1) ، ويبين المجال رقم (2) بداية تحلل المادة الاساس بعد مضي5 دقائق ، فضلا عن ظهور التحلل المتدرج بعد مضي (20، 30، 40، 50)دقيقة كما هو موضح في المجال (4، 5، 6، 7) على التوالي ، وهذا يتفق مع ماتوصل اليه [13] ، اذ اشار الى ان ازدياد مدة حضن الانزيم مع مادته الاساس يؤدي الى التحلل التدريجي لحزمة الدنا وصولاً الى التحلل الكلي بعد مضي اكثر من 60 دقيقة (المجال رقم 8) وهذا ناتج من تحلل الاواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر باكملها وتكون النيوكليوتيدات المفردة التي لا تمتلك القدرة على التوهج نتيجة عدم تداخل صبغة بروميد الاثيديوم بين القواعد النيتروجينية بعد ان كانت حزمةالدنا غير المعاملة بالانزيم ذات توهج واضح عند تعريض هلام الاكاروز بتركيز 0.8% الى الاشعة فوق البنفسجية بعد ترحيل النماذج السابقة كهربائيا .



- المجال رقم (1) : نموذج الدنا بتركيز5 مايكروغرام/مليلتر غير معامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 5 دقائق .
- المجال رقم (3) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 10 دقائق .
- المجال رقم (4) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 20 دقيقة .
- المجال رقم (5) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 30 دقيقة .
- المجال رقم (6) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 40 دقيقة .
- المجال رقم (7) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 50 دقيقة .
- المجال رقم (8) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 60 دقيقة .

شكل (3): الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم مع المادة الاساس(دنا الغدة الزعترية) باوقات حضن مختلفة على هلام الاكاروز بتركيز0·8 % بفرق جهد 65 فولت و لمدة 1.5 ساعة .

تنقية الانزيم DNase I البنكرياسي

تضمنت عملية تنقية الانزيم DNase I البنكرياسي خطوات متتالية من الترسيب باستعمال ملح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع مختلفة، وعند متابعة قيم الفعالية النوعية للانزيم المذكور للمراحل المختلفة من هذه العملية كما مبين في الجدول (1) :

خطوات التنقية	الحجم (مللتر)	البرتين (ملغم/مللتر)	الفعالية (وحدة/مللتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية 10^5 x(وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية %
مستخلص خام (Crude Extract)	1000	100	8500	85	85	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 30%	115	10	11000	1100	12.65	12.9	14.88
راسب الـ30% بعد تعديل الرقم الهيدروجيني للمحلول الانزيمي الى pH=3. 2 وحضن لمدة ساعة عند 37 $م^0$	120	6.5	9000	1384.6	10.8	16.2	12.7
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 70 %	20	0.6	27000	45000	5.4	529.4	6.35

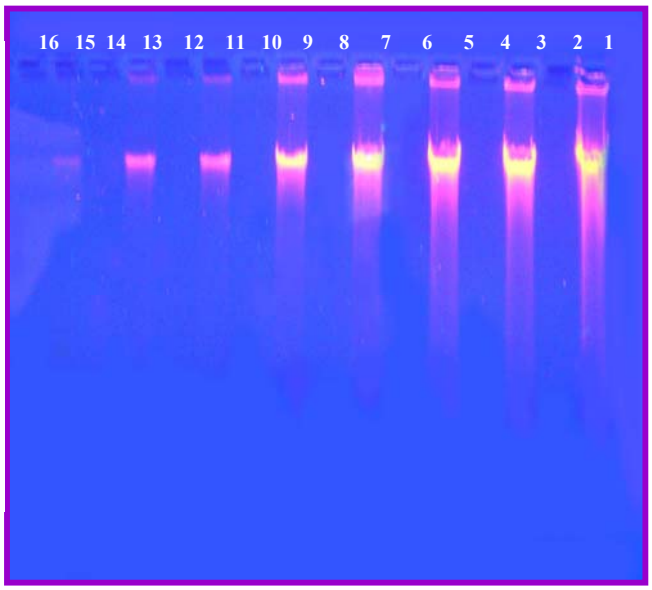
يمكن ملاحظة امتلاك الانزيم في خطوة التشبع بكبريتات الامونيوم بنسبة 30% فعالية نوعية مقدارها 1100 وحدة/ ملغم بروتين ، ولوحظ ان هذه الخطوة قد اعطت عدد مرات تنقية مقدارها 12.9 بحصيلة انزيمية 14.88 % . و بعد تغيير الرقم الهيدروجيني للمحلول الانزيمي المشبع بنسبة 30% كبريتات الامونيوم الى 3.2 وحضن لمدة ساعة عند درجة حرارة 37 م ، إمتلك الانزيم فعالية نوعية قدرت بـ 1384.6 وحدة/ملغم بروتين، مع الاشارة الى كون هذه الخطوة قد اعطت عدد مرات تنقية مقدارها 16.2 بحصيلة انزيمية 12.7 % . رُكِزَ المحلول الانزيمي في الخطوة الاخيرة بنسبة اشباع 70% كبريتات الامونيوم إذ ارتفعت فعاليته النوعية الى 45000 وحدة/ملغم بروتين ، و بلغ عدد مرات التنقية 529.4 مرة بحصيلة انزيمية 6.35 . اعتمدت طريقة الترسيب بملح كبريتات الامونيوم والمعروفة بالتمليح الخارجي (Salting-out) لغرض تنقية الانزيم DNase I البنكرياسي ، وبناءاً على النتائج الموضحة سابقاً تم التخلص من معظم المواد الملوثة لتحضيرات الانزيم الخام والمتضمنة الانزيمات المحللة للحامض النووي الرايبوزي (RNase) والمحللة للبروتينات (Trypsin , Chymotrypsinogen) والمواد الدهنية. حيث أشار [5] الى أن نسبة التشبع (20 – 40) % بكبريتات الامونيوم ضمن عملية الاستخلاص والتنقية الجزئية للانزيم المذكور تساعد على فصل معظم البروتينات الموجودة في المستخلص البنكرياسي , Trypsin , Chymotrypsinogen) (RNase عن الانزيم DNase I . كما أكد[12] أن تحضير الانزيم DNase I البنكرياسي بصورة نقية جزئياً يتم بوساطة خطوات متدرجة من الترسيب بكبريتات الامونيوم التي تضمنت نسبة اشباع (20-40) % والتي نتج منها عدد مرات تنقية 22 بحصيلة انزيمية 28% مع امتلاك الانزيم فعالية نوعية 10000 وحدة/ ملغم . ويتضح من النتائج الخاصة بخطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم 30% وتعديل الرقم الهيدروجيني الى 3.2 بعد ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37 م قد ساعدت على زيادة الفعالية النوعية وعدد مرات التنقية , وهذا ما اشار اليه [5] الى اهمية حضن المستخلص الانزيمي في الظروف المذكورة سابقاً يؤدي الى التمسيخ الانتقائي Selective Denaturation لمعظم البروتينات الخاملة (Inert Proteins) , فضلاً عن خطوات الترسيب اللاحقة وصولاً الى نسبة التشبع 70% كبريتات الامونيوم التي أدت الى الحصول على انزيم منقى جزئياً مع زيادة الفعالية النوعية وعدد مرات التنقية .

العوامل المؤثرة في فعالية الانزيم المنقى جزئياً

التركيز الامثل للمادة الاساس (دنا الغدة الزعترية)

بعد ترحيل نماذج التفاعل كهربائياً وبالمقارنة بنماذج السيطرة (دنا غير معامل بالانزيم) بالتراكيز المطلوبة تَبيَنّ قدرة الانزيم المنقى جزئياً على تحليل حزم الدنا وكما موضح في شكل (4) المجالات (2 ،4 ،6 ،8 ،10 ،12 ،14 ،16)

وبالعكس من حزم السيطرة التي يظهر توهجها بصورة واضحة على هلام الاكاروز (المجالات 1 ،3 ،5 ،7 ،9 ،11 ،13 ،15) . تم تحديد 50 مايكروغرام/ مللتر بكونه تركيزاً مناسباً لفعالية الانزيم المنقى وبالامكان الاعتماد عليه في التجارب اللاحقة لغرض متابعة التحلل الظاهر بشكل مسحات متتابعة بشدة توهجها تحت الاشعة فوق البنفسجية فضلاً عن أن التراكيز العالية من المادة الاساس تؤثر في لزوجة مزيج التفاعل مؤدية الى اعاقة تحلل الـ DNA وتحتاج الى تراكيز أعلى من الايونات الثنائية التكافؤ المحفزة للتفاعل الانزيمي. أشار [14] الى إن تركيز المادة الاساس الامثل للانزيم DNase المنقى من بكتيريا الـ *Fibrobacter* هو 80 مايكروغرام/مللترمع وجود تثبيط للفعالية الانزيمية عند استعمال تراكيز أعلى من 100 مايكروغرام/مللتر، وبالعكس من ذلك اوضح[15] قدرة انزيم *Serratia* nuclease على تحلل التراكيز العالية والمتمثلة بـ 1000 مايكروغرام/ مللتر لتميز الانزيم بامتلاكه جزيئة ثنائية متماثلة Homodimer . كما قام [16] باستعمال 125 مايكروغرام/مللتر كتركيز مناسب من الـ DNA لقياس فعالية الانزيم DNase البنكرياسي ، فضلاً عن استعمال تراكيز مختلفة من المادة الاساس التي تراوحت بين 1000 1 - مايكروغرام/ مللتر مع الاشارة الى الاختلاف في ظروف التفاعل من تراكيز نموذج الانزيم والايونات الثنائية التكافو ومدة الحضن لنموذج التفاعل والتي تكون مناسبة للتركيز المستعمل [17] .

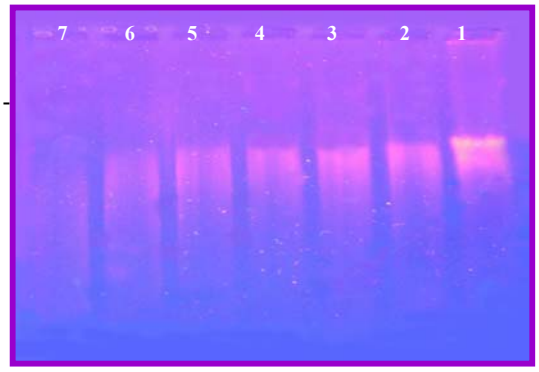


المجال رقم (1) : نموذج الدنا بتركيز 500 مايكروغرام / مللتر غير معامل بالانزيم .
المجال رقم (2) : نموذج الدنا بتركيز 500 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (3) : نموذج الدنا بتركيز 200 مايكروغرام/ مللتر غير معامل بالانزيم .
المجال رقم (4) : نموذج الدنا بتركيز 200 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (5) : نموذج الدنا بتركيز 150 مايكروغرام/ مللتر غير معامل بالانزيم .
المجال رقم (6) : نموذج الدنا بتركيز150 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (7) : نموذج الدنا بتركيز 100 مايكروغرام/ مللتر غير معامل بالانزيم .
المجال رقم (8) : نموذج الدنا بتركيز100 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (9) : نموذج الدنا بتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر غير معامل بالانزيم .
المجال رقم (10) : نموذج الدنا بتركيز50 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (11) : نموذج الدنا بتركيز 25 مايكروغرام/ مللتر غير معامل بالانزيم .
المجال رقم (12) : نموذج الدنا بتركيز 25 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (13) : نموذج الدنا بتركيز 10 مايكروغرام/ مللترغير معامل بالانزيم .
المجال رقم (14) : نموذج الدنا بتركيز 10 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .
المجال رقم (15) : نموذج الدنا بتركيز1 مايكروغرام/ مللترغير معامل بالانزيم .
المجال رقم (16) : نموذج الدنا بتركيز1 مايكروغرام/ مللتر معامل بالانزيم .

شكل (4): الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم المنقى جزئيا مع المادة الاساس لتحديد التركيز الامثل لها على هلام الاكاروز بتركيز 0·8% بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة

زمن التفاعل الافضل للانزيم DNase I البنكرياسي المنقى جزئياً

تم تعيين اوقات زمنية مختلفة لتفاعل الانزيم المنقى جزئياً (54 وحدة/مللتر) مع مادته الاساس بتركز 50 مايكروغرام/مللتر وشملت(1 ،5 ،10 ،20 ،30 ،45)دقيقة . كما موضح في شكل (5) المجالات (2 ،3 ،4 ،5 ،6 ،7) والتي تظهر مراحل التحلل الجزئي لحزمة الـ DNA وصولاً الى التحلل الشبه الكامل لتلك الحزمة وبالقياس مع حزمة الـ DNA السيطرة (المجال 1) ، وبناءاً على النتائج المبينة تم تعيين زمن التفاعل 30 دقيقة مدة الحضن المناسبة لتفاعل الانزيم وذلك لقدرة الانزيم في هذه المدة على التحلل بصورة جيدة بحيث تظهر تحلل تدريجي للـDNA (بشكل Smear) لاجل المقارنة بين المعاملات المختلفة للأنزيم . أوضح [18] أن تحلل الـ DNA يحصل بمراحل متعددة والتي ينتج عنها نيوكليوتيدات قليلة (Oligonucleotidem) مع قطع من الـ DNA الى ان يحصل هنالك تحلل كامل والذي يؤدي الى تحول قطع الـ DNA الى نيوكليوتيدات مفردة .

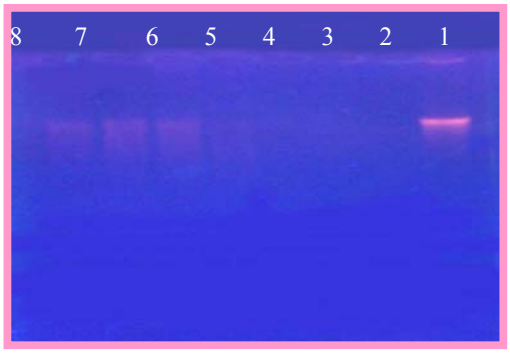


- المجال رقم (1) : نموذج الدنا غير معامل بالانزيم بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر غير معامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن دقيقة واحدة .
- المجال رقم (3) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 5 دقائق .
- المجال رقم (4) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 10 دقائق .
- المجال رقم (5) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 20 دقيقة .
- المجال رقم (6) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 30 دقيقة .
- المجال رقم (7) : نموذج تفاعل الانزيم مع الدنا / مدة الحضن 45 دقيقة .

شكل (5) : الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم المنقى جزئيا مع المادة الاساس(دنا الغدة الزعترية) باوقات حضن مختلفة على هلام الاكاروز بتركيز 0·8 % بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة

التركيز الامثل للانزيم DNase I المنقى جزئياً

اوضحت النتائج المبينة في الشكل (6 المجالات 2 ،3 ،4 ،5) تحلل حزمة الـ DNA كلياً عند معاملتها بتراكيز انزيمية (270 ،54 ،27 ،13.5) وحدة/ مللتر على التوالي، والتحلل الجزئي لهذه الحزمة عند معاملتها بتراكيز (5.4 ،3.6 ،2.7) وحدة/ مللتر والموضحة في المجالات (6 ،7 ،8) على التوالي مع الاخذ بنظر الاعتبار مقارنة هذه النتائج مع حزمة الـ DNA السيطرة (المجال1) واستناداً الى النتائج المذكورة سابقاً فقد تم اختيار التركيز الانزيمي 2.7 وحدة/ مللتر لاجراء التجارب اللاحقة لكونه اقل تركيز من الانزيم يمكنه ان يهضم جزئياً المادة الاساس . استعملت تراكيز نهائية 0.01 – 0.1 وحدة/مللتر من الانزيم القياسيDeoxyribonuclease البنكرياسي لتحلل المادة الاساس من الدنا البلازميدي[19] ، فضلاً عن استعمال تراكيز مقدرة بـ (0.2 ،0.1 ،0.05) وحدة/ مللتر للـ DNase A *Fibrobacter* لتحلل المـادة الاساس مـن الـ DNA [7].



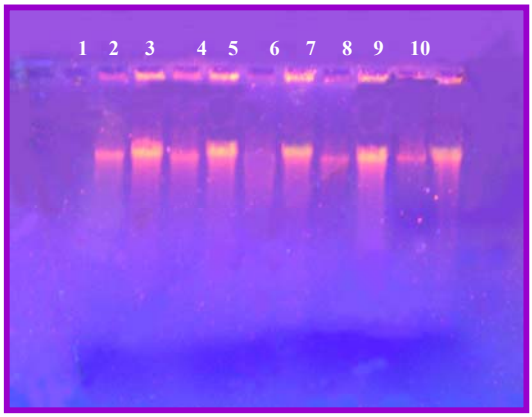
- المجال رقم (1) : نموذج الدنا بتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر غير معامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 270 وحدة / مللتر .
- المجال رقم (3) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 54 وحدة / مللتر .
- المجال رقم (4) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 27 وحدة / مللتر .
- المجال رقم (5) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 13·5 وحدة / مللتر
- المجال رقم (6) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 5·4 وحدة / مللتر .
- المجال رقم (7) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 3·6 وحدة / مللتر .
- المجال رقم (8) : نموذج الدنا معامل بالانزيم المنقى جزئيا بتركيز 2·7 وحدة / مللتر .

شكل (6) :تفاعل الانزيم مع المادة الاساس(دنا الغدة الزعترية) لتحديد التركيز الامثل من الانزيم المنقى جزئيا على هلام الاكاروز بتركيز 0·8% بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة .

الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية

ان الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية هو 6.5 نتيجة تحلل حزمة الـ DNA بصورة شبه كلية الشكل (7) المجال(6) وبالعكس من حزمة السيطرة (المجال 5) مع وجود فعالية قليلة للانزيم في الرقم الهيدروجيني (4 ،5) (المجال 2 و4) قياساً بحزمة الـ DNA السيطرة (المجال 1 و3) على التوالي ، فضلا عن ملاحظة انخفاض الفعالية الانزيمية عند الرقم الهيدروجيني (8 ،9) (المجال 8 و10) عند قياس تحلل حزمة الـ DNA مع نموذج السيطرة في المجال رقم (7 ،9) على التوالي.وعند دراسة نمط الفعالية الانزيمية بارقام هيدروجينية مختلفة (pH-activity profiles)

تبين ان منحنى الفعالية كان اقرب الى الشكل الجرسي (Bell-shaped curves) مع امتلاكه اعلى فعالية عند الرقم الهيدروجيني(6 - 7) [20] .

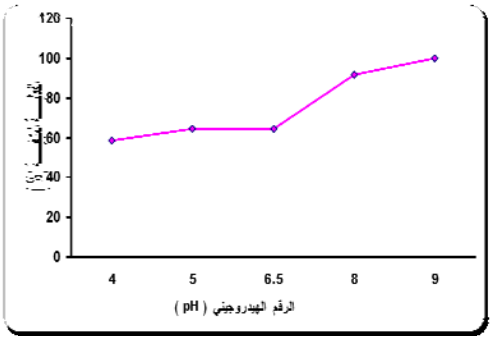


- المجال رقم (1) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 4 غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 4 معامل بالانزيم .
- المجال رقم (3) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 5 غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (4) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 5 معامل بالانزيم .
- المجال رقم (5) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 6·5 غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (6) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 6·5 معامل بالانزيم .
- المجال رقم (7) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 8 غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (8) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 8 معامل بالانزيم .
- المجال رقم (9) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 9 غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (10) : دنا الغدة الزعترية برقم هيدروجيني 9 معامل بالانزيم .

شكل (7): تفاعل الانزيم مع المادة الاساس(دنا الغدة الزعترية) لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة .

الرقم الهيدروجيني الامثل للثباتية

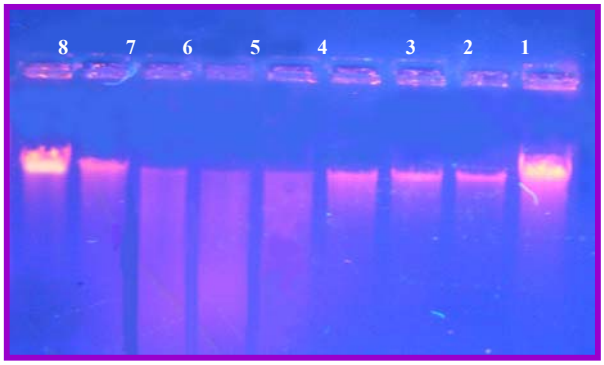
لوحظ ان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 9 مع انخفاض طفيف عند الرقم الهيدروجيني 8 إذ احتفظ بـ 91.7 % من فعاليته، ثم انخفضت الى 64.7 % عند الرقم الهيدروجيني 6.5 و5 مع الاحتفاظ بـ 58.8 % من الفعالية عند الرقم الهيدروجيني 4 وكما موضح في الشكل رقم (8) . أشار [21] إن انزيم Streptodornase المحلل للـDNA والمستخلص من بكتريا الـ*Streptomyces* قد احتفظ بكامل فعاليته في مدى يتراوح بين رقم هيدروجيني 8 - 9 مع انخفاض في الفعالية المتبقية للانزيم عند الارقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية المتطرفة .



شكل (8) : تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4 – 9) في ثباتية الانزيم DNase I البنكرياسي

الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الانزيم

كما موضح في شكل (9) اظهرت النتائج إن اقصى فعالية للانزيم كانت عند درجة حرارة 50 م (المجال 5)، فضلا عن امتلاك الانزيم فعالية عند الدرجات الحرارية (25، 30، 40، 60، 70) م كما موضح في المجال رقم (2، 3، 4، 6، 7) على التوالي، اما المجال رقم (8) فقد لوحظ فيه انخفاضًا في الفعالية الانزيمية عند درجة حرارة 80 م بالمقارنة مع الدرجات الحرارية الاخرى. واشار [21] الى ان الدرجة الحرارية المثلى لمعظم الانزيمات المحللة داخلياً للـ DNA تتراوح بين (25-70) م^0 ، مع تميز *Leishmania* nuclease وWheat nuclease بدرجة حرارية مثلى لفعاليتهما مقدرة بـ 50 م . بَيَنَ [7] إن درجة الحرارة 25 م هي الدرجة الحرارية المثلى لفعالية *Fibrobacter* DNase A والتي تختلف عن الدرجة الحرارية التي تنمو بها هذه البكتيريا أصلاً في معدة الحيوانات المجترة 39 م^0 ، وهذا يعكس الفعالية الانزيمية المختلفة بين داخل الجسم الحي *in vivo* وخارجه *in vitro* .

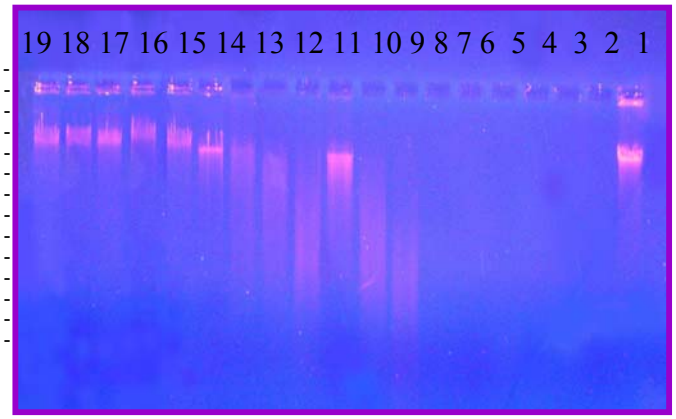


- المجال رقم (1) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر غير المعامل بالانزيم
- المجال رقم (2) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 25 م .
- المجال رقم (3) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 30 م .
- المجال رقم (4) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 40 م .
- المجال رقم (5) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 50 م .
- المجال رقم (6) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 60 م .
- المجال رقم (7) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 70 م .
- المجال رقم (8) : التفاعل الانزيمي بدرجة حرارة 80 م .
- المجال رقم (9) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر غير المعامل بالانزيم

شكل (9): تفاعل الانزيم مع المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية) لتعيين الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الانزيم المنقى جزئيا على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة .

تأثير بعض الاملاح في فعالية الانزيم DNaseI

اظهرت النتائج امتلاك ايونات المغنيسيوم والمنغنيز أعلى فعل تحفيزي، إذ لوحظ هضم واضح لمادة التفاعل عند إضافة هذه الايونات في محلول التفاعل الانزيمي مع المادة الاساس شكل(10) المجالات (2 ،3 ،4 ،5 ،6 ،7) مقارنةً مع نموذج الـ DNA السيطرة (المجال رقم 1) .كما لوحظ امتلاك الكالسيوم فعل تحفيزي اقل من المغنيسيوم والمنغنيزعند التراكيز (10 ،20) ملي مولار (المجالان 8 ،9) على التوالي بينما انخفض هذا الفعل التحفيزي بشكل واضح جداً في تحلل حزمة الـ DNA (المجال 10) عند تركيز 40 ملي مولار كذلك كان تأثير ايونات النحاس على فعالية الانزيم قليلا مقارنةً بتاثيرأيونات المغنيسيوم (المجالات 11 ،12 ،13) ، كما لوحظ تثبيط في فعالية الانزيم بصورة تدريجيةعند التراكيز(10 ،20 ،40) ملي مولار من كلوريد الفضة (المجالات 14 ،15 ،16) على التوالي , فضلاً عن التثبيط التام لفعالية الانزيم عند هذه التراكيز من كلوريد الزئبق والموضحة في المجالات المرقمة (17 ،18 ،19) قياساً مع المعاملات الاخرى . تؤثر الايونات المعدنية في فعالية الانزيمات بطرائق مختلفة ، فهي تتقبل او تمنح الالكترونات لتنشيط مواد محبة للالكترونات (Electrophiles) او مواد محبة للنواة (Nucleophiles) ، ويتم ذلك حتى في المحاليل المتعادلة كما يمكن ان تقوم هي ايضاً بوظيفة تلك المواد نفسها، فضلاً عن ذلك تقوم بربط الانزيم والمادة الاساس سويةً باواصر تناسقية Co-ordinate bonds [22] .



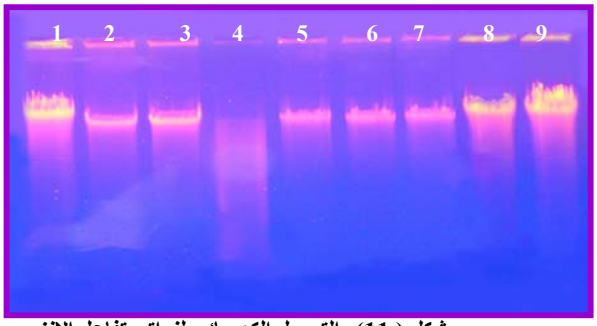
- المجال رقم (1) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 10 ملي مولار كلوريد المغنيسيوم .
- المجال رقم (3) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 20 ملي مولار كلوريد المغنيسيوم .
- المجال رقم (4) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 40 ملي مولار كلوريد المغنيسيوم .
- المجال رقم (5) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 10 ملي مولار كلوريد المنغنيز .
- المجال رقم (6) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 20 ملي مولار كلوريد المنغنيز .
- المجال رقم (7) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 40 ملي مولار كلوريد المنغنيز .
- المجال رقم (8) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 10 ملي مولار كلوريد الكالسيوم .
- المجال رقم (9) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 20 ملي مولار كلوريد الكالسيوم.
- المجال رقم (10) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 40 ملي مولار كلوريد الكالسيوم.
- المجال رقم (11) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 10 ملي مولار كلوريد النحاس .
- المجال رقم (12) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 20 ملي مولار كلوريد النحاس .
- المجال رقم (13) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 40 ملي مولار كلوريد النحاس .
- المجال رقم (14) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 10 ملي مولار كلوريد الفضة .

شكل (10): الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم مع المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية) بوجود تراكيزمختلفة لمحاليل بعض الايونات على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % بفرق جهد 65 فولت و لمدة 1.5 ساعة .

تأثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية الانزيم

توضح النتائج المبينة في شكل (11) تأثر فعالية الانزيم بوجود بعض المركبات الكيميائية التي شملت مادة الـ SDS بتركيزين (10 ،20) % والـ PMSF بتركيز (0.1 ،10) ملي مولار، فضلاً عن الـ EDTA بتراكيز(5 ،10)

ملي مولار ، فقد لوحظ انخفاض فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي عند حضنه مع مادة الـ SDS بتراكيز 10% و20% من ملاحظة عدم تحلل المادة الاساس بصورة جيدة عند مقارنة المجال رقم(2 ،3) والتي تمثل الانزيم المعامل بالـ SDS بتراكيز 10% و20%على التوالي مع حزمة االـ DNA غير المعامل بالانزيم المجالان رقم (1 ،9) , بينما أظهرت نتائج معاملة الانزيم بمادة الـ PMSF احتفاظ الانزيم بفعاليته عند تركيز0.1 ملي مولار لهذه المادة (المجال 4) ، مع حصول انخفاض في فعاليته عند وجود 10 ملي مولار من الـPMSF . أ ن استعمال العامل الكلاّبي EDTA فكان له تأثيراً مثبطاً واضحاً في فعالية الانزيم، إذ تبين تأثيره في انخفاض الفعالية الانزيمية بوجود 5 و10 ملي مولار من هذه المادة (المجال6 ،7) وتثبيط شبه كامل عند استعمال 20 ملي مولار من هذه المادة (المجال 8) عند مقارنة هذه النتائج مع حزمة الـ DNA السيطرة ، دُرس تأثير مادة الـ SDS على الانزيم DNase I البنكرياسي من قبل الباحث [23] ووجد إن الانزيم يصبح غير فعال بعد حضنه مع الـ SDS بتركيز 0.025% لمدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة 45 م . أما استعمال مادة الـ PMSF فكان لغرض المحافظة على الفعالية الانزيمية من التثبيط بوساطة انزيمات البروتييزات الموجودة في مستحضرات الانزيم المنقى جزئياً،حيث حافظت هذه المادة على فعالية الانزيم عند استعمالها بتركيز 0.1 ملي مولار ، وهذا ما جاء مطابقاً لما استعملته عدد من الدراسات بحضن نموذج الانزيم مع مادة الـ PMSF وبالتركيز المذكور سابقاً قبل عملية تنقيته او استعمال مادة الـDFP وذلك لتميزهاتين المادتين بقدرتهما على تثبيط البروتييزات السيرينية الملوثة للمستحضرات الانزيمية الخام للانزيم البنكرياسي فضلاً عن عدد من النيوكلييزات غير المعتمدة على السيرين في الموقع الفعال [32] . تبين من النتائج الموضحة سابقاً دور مادة الـ EDTA العامل الكلاّبي من حيث تأثيره المثبط في فعالية الانزيم حيث تعمل هذه المادة على تكوين معقدات قوية مع اغلب الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ ويعتمد تثبيط الانزيم بهذه المادة على ثباتية المعقد المتكون بينها وبين الايون المعدني مقارنة بثباتية معقد الايون المعدني- الانزيم فقد وجد أن عدداً كثيراً من النيوكلييزات تحفز بوساطة الايونات الثنائية التكافؤ وهي بذلك تكون حساسة للـ EDTA ، وبالعكس من انزيمات DNaseII التي تحتفظ بكامل فعاليتها عند المعاملة بـ 5 ملي مولار EDTA او EGTA لعدم اعتمادها على الايونات المعدنية في تحفيز فعاليته[21] .

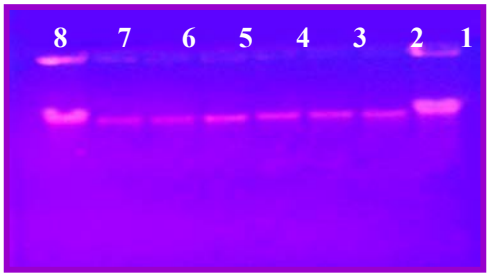


- المجال رقم (1) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ SDS بتركيز 10 % .
- المجال رقم (3) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ SDS بتركيز 20% .
- المجال رقم (4) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ PMSF بتركيز 0.1 ملي مولار .
- المجال رقم (5) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ PMSF بتركيز 10 ملي مولار .
- المجال رقم (6) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ EDTA بتركيز 5 ملي مولار .
- المجال رقم (7) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ EDTA بتركيز 10 ملي مولار .
- المجال رقم (8) : فعالية الانزيم المتبقية بعد معاملته بمادة الـ EDTA بتركيز 20 ملي مولار .
- المجال رقم (9) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/مللتر غير المعامل بالانزيم .

شكل (11): الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم مع المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية) بوجود تراكيز مختلفة من بعض المركبات الكيميائية على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % بفرق جهد 65 فولت ولمد ة 1.5 ساعة .

تأثير مادة اليوريا و 2 - مركبتوايثانول

أظهرت النتائج المبينة في شكل (12) انخفاض في فعالية الانزيم DNase I البنكرياسي المعامل باحجام مختلفة من محلول اليوريا و2 - مركبتوايثانول ، حيث لوحظ عدم تحلل حزمة الـ DNA في المجال رقم (2-7) قياساً بحزمة الـ DNA غير المعامل بالانزيم (المجالان 1 ،8). تقوم العوامل المختزلة مثل الـ 2 - مركبتو ايثانول واليوريا بكسر الاصرة الثنائية الكبريت S-S التي تتكون بين ثمالتين من السستايين تحت ظروف مؤكسدة مما يؤدي الى فك التفاف جزيئة الانزيم وانخفاض فعالية الانزيم و هذا دليل على احتواءه أواصر من نوع الـ S-S والتي تتأثر عند وجود العوامل المختزلة ، وهذا ما اكدته الادبيات العلمية من احتواء الانزيم DNase البنكرياسي على آصرتي S- Sاحداهما ضرورية لفعالية الانزيم والاخرى غير ضرورية [25] .



- المجال رقم (1) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر غير المعامل بالانزيم .
- المجال رقم (2) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 10 مايكروليتر محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول .
- المجال رقم (3) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 20 مايكروليتر محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول .
- المجال رقم (4) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 30 مايكروليتر محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول .
- المجال رقم (5) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 40 مايكروليتر محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول .
- المجال رقم (6) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 50 مايكروليتر محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول .
- المجال رقم (7) : التفاعل الانزيمي مضافا اليه 60 مايكروليتر محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول .
- المجال رقم (8) : دنا الغدة الزعترية بتركيز 50 مايكروغرام/ مللتر غير المعامل بالانزيم .

شكل (12): الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل الانزيم المنقى جزئيا مع المادة الاساس (دنا الغدة الزعترية) بوجود احجام مختلفة من محلول اليوريا- 2 مركبتوايثانول على هلام الاكاروز بتركيز 0.8 % بفرق جهد 65 فولت ولمدة 1.5 ساعة.

References :

1. Carpenter, E.P.; Corbett, A.; Thomson, H.; Adacha, J.; Jensen, K.; Bergeron. J.; Kasampalid. I.; Exley, R.; Winterbotham, M.; Tang, C.; Baldwin, G. and Freemont, P. (2007). AP endonuclease paralogues with distinct activities in DNA repair and bacterial pathogenesis. EMBO J. 26: 1363-1372.
2. Begam,M. ; Narwal,S. ; Roy,S. ; Kumer,S. ; Lodha,L. and Kapoor ,H.C.(2006).Anantiviral protein having deoxyribonuclease and ribonuclease activity from leaves of the post-flowering stage of *Celosia cristata* .Biochem.(Moscow).71:s44-s48.
3. Chen, W.J. and Liao, T.H. (2006). Structure and Function of Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease I. Protein and Peptide left. 13 (5): 1-7
4. Chen, W.J.; Lo, T.; Lai, Y.S.; Huang, P.T.; Lin, C.C. and Liao, T.H.(2007 a).Construction and Characterization of bifunctional enzyme with Deoxyribonuclease I and thioredoxin– like activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. 356: 750 – 755.
5. Kunitz, M. (1950 a). Crystalline Deoxyribonuclease I. II-Digestion of thymus nucleic acid and the kinetics of the reaction.J.Gen.Physiol.33:363-377
6. Kay,E.R. ; Simmons,N. and Dounce,A. (1952). An Improved preparation of deoxyribonucleate . J.Am.Chem.Soci.74:1724-1726.
7. Lee,S.F. ; Forsberg,C.W. and Gibbins,A. (1992). TypeII DNA restriction – modification system and an endonuclease from the rminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. J.Bacteriol. 174 (16) : 5275 – 5283 .
8. Whitaker, C. Falk, K. and Sanclez, H. (1980). Detection of the proteins by absolute method. Anal. Biochem.109 : 156 – 160 .
9. Grestfield,A.M.;Moore,S.and Stein,W.H. Reduction of the deoxyribonuclrase by reducing agent .J.Biol.Chem. (1963) 238 : 622 – 630 .
10. Doherty,A.J.;Worrall,A.F. andConnolly,B.A.(1995).The role of Aginine 41 and Tyrosine 76 in the coupling of DNA recognition tophosphodiester bond cleavage by DNase I :A study using site-directed mutagenesis .J.Mol.Biol.251:366-377.
11. Takeshita, H.; Mogi, K; Yasuda, T.; Nakajima, T. Nakashima, Y.; Mori, S.; Hoshino, T and Kishi, K. (2000). Mammalian Deoxyribonuclease I are classified into three

types: Pancrease, Parotid, and Panereas – Parotid (Mixed), based on differences in their Tissue concentrations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 481 – 484.

12. Lu, S.; Shih,C.H. and Liao, T.H. (2003) Expression of DNase I in Rat Parotid gland and small intestine is regulated by starvation and refeeding. J. Nutrition. 133: 71-74

13. Kuntiz,M.(1950b).Crystalline Deoxyribonuclease I :Isolation and general properties .J.Gen.physiol .33:349-362

14. Maclellan, S. R. (1999). Purification and characterization of DNase A , The major endonuclease of *Fibrobacter succinogenes* S85.M.Sc.thesis .The faculty of Gradute studies/Guelph Universites.

15. Friedhoff, P.; Meiss, G.; Kolmess, B.; Pieper, U.; Gimadutdinow, O.; Urbanke, C. and Pingound, A. (1996). Kinetic analysis of the cleavage of natural and Synthetic Subsrates by the *Serratia* nuclease. Eur. J. Biochem. 241: 572-520.

16. Liao, T.H. and Hsieh, J.C. (1988). Hydrolysis of *P*-nitro Phenylphosphonate Catalysed by bovine pancreatic Deoxyribonuclease. Biochem. J. 255: 781-787.

17. Nadano,D.;Yasuda,T.and Kishi,K.(1993).Measurement of deoxyribonucleae I activity in human tissue and body fluids by Single Radial Enzyme Diffusion method .Clinc. Chem. 39 (3) : 448 – 452 .

18. Counis, M.F.; Chaudun, E.; Arruti, C.; Oliver.; Sanwal, M.; Courtois, Y. and Torriglia, A. (1998). Analysis of nuclear degredation during cell differentiation. Cell Death Differ. 5: 251-261.

19. Sasaki,Y.;Miyoshi,D.and Sugimoto,N.(2007).Regulation of DNA nuclease by molecular crowding .Nucleic Acids Res.445:1-8 .

20. Chen, W.J.; Lai, P.J.; Lai, Y.S.; Hsang, P.T.; Lin,C.C. and Liao, T.H.(2007 b).Probing the catalytic mechanism of Bovine pancreatic Deoxyribonuclease I by Chemical rescue. Biochem. Biophys. Res. Commun. 352: 689-696.

21. حميد ، عصام حامد (2003) . دراسة كيموحيويةعلى الانزيم streprodornase المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes* .رسالة ماجستير. االتقنيات الاحيائية / جامعة بغداد .

22. Rangarajan,E.S. and Shanker,V.(2001).Sugar non–Specific endonuclease .FEMS Microbiol rev.25:583-613.

23. Palmer,T.(1985).Understanding enzymes 2nd ed .Ellis Honwood limited .

24. Shiokawa, D.; Ohyama, H.; Yamada, T. and Tanuma, S-I. (1997). Purification and Properties of DNase δ from apoptotic rat thymocytes. Biochem. J. 326: 675-681.

25. Baker, K.P.; Baron, W.F.; Henzel, W.J. and Spancer, S.A. (1998). Molecular Cloning and Characterization of human and murine DNase II. Gene. 215: 281-289.