Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012

بررسی فعالیت مهارکننده ریبونوکلئاز جفتی بر روی آنزیم ریبونوکلئاز*

سودابه فلاح**
دکتر بیژن فرزامی***

چکیده

مهارکننده ریبونوکلئاز که یک پروتئین اسیدی، محلول و سیتوپلاسمی می‌باشد به مقدار زیادی در جفت انسان وجود دارد.این ماده به روش شیمیایی، کروماتوگرافی تعویض یون و میل ترکیبی از جفت انسان در مقیاس ۱ جفت/ ۱mg استخراج و خالص گردید.

وزن مولکولی این پروتئین در حدود ۴۸۰۰۰ دالتون از طریق الکتروفورز با ژل اکریلامید و سدیم دودسیل سولفات به همراه سایر پروتئینهای استاندارد مشخص گردیده است.

مهارکننده با آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی با $Ki= ۲/۹\times۱۰^{-۱۰}$ مولار ایجاد یک کمپلکس ۱:۱ نموده و آن را به طور غیررقابتی مهار می‌کند. PH مناسب برای مهارکننده برابر با ۷/۶±۰/۱ می‌باشد که از طریق هم‌کنش میان آنزیم و مهارکننده با استفاده از تغییرات جذب نوری EI- (E-I) بر حسب تغییرات PH محیط در طول موجهای ۴۰۰-۲۴۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری افتراقی محاسبه گردید. امروزه در مراحل جداسازی اسیدهای نوکلئیک از بافتهای اختصاصی جهت محافظت آنزیم ریبونوکلئاز از تجزیه و در مهندسی ژنتیک، جهت کشف عوامل ژنتیکی بسیاری از بیماریهای ژنتیکی از طریق بررسی مستقیم بر روی اسیدهای نوکلئیک، حضور مهارکننده در محیط آزمایش و تحقیقات لازم می‌باشد. لذا مطالعات سینتتیکی بیشتر بر روی مفاهیم اثر مهاری مهارکننده بر روی آنزیم ریبونوکلئاز زمینه‌های مناسب را جهت مطالعه مکانیسمهای کنترلی این پروتئین فراهم خواهد کرد.

کلیدواژه‌ها: ۱- آنزیم ریبونوکلئاز ۲- مهارکننده ریبونوکلئاز ۳- آنژیوژنین

مقدمه

مهارکننده ریبونوکلئاز یک پروتئین سیتوپلاسمی، اسیدی و محلول با وزن ملکولی حدود ۴۸۰۰۰ دالتون است که برای اولین بار در سال ۱۹۵۲ توسط پیرت و دسرکس (Pirotte & Desreux) کشف شد[۱۲]. این پروتئین مهارکننده که در اکثر بافتهای پستانداران به ویژه جفت انسان به وفور یافت می‌شود شامل ۴۶۰ اسید آمینه است که در ۳۴ واحد پپتیدی با پیوند دی‌سولفید قرار دارد. توالی اسیدهای آمینه بروش cDNA مشخص گردیده‌است[۷].

* این مقاله به صورت سخنرانی در اولین کنگره بیوشیمی ایران در دانشگاه تربیت مدرس در اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۷۰ ارائه گردیده‌است.

** مربی گروه بیوشیمی - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران

*** استاد گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]

هر ملکول مهارکننده حاوی ۷ واحد تکراری به طول ۵۷ اسید آمینه، شامل اسیدهای آمینه آسپارتیک، اسید گلوتامیک، لوسین و سیستئین می‌باشد. اسیدآمینه‌های سیستئین نقش مهمی در حفظ فعالیت مهارکننده دارد بطوری که برداشته‌شدن یا بلوکه کردن گروههای تیول آزاد مربوط به سیستئین، مهارکننده را بطور برگشت‌ناپذیر غیرفعال می‌کند[۴]. اسیدهای آمینه گلوتامیک و آسپارتیک نیز نقش مهمی در مکانیسم عمل مهارکننده دارند[۱۴].

در سالهای ۱۹۵۶ و ۱۹۶۱ خواص مهارکننده به ترتیب توسط رت *(Roth)* و شورتمن *(Shortman)* مورد مطالعه قرار گرفت و اثرات مهارکننده ریبونوکلئاز از نظر فیزیولوژیکی حداقل در دو سیستم بیولوژیکی به شرح زیر مشخص گردید:

۱- کنترل مقدار و میزان سنتز *RNA*های داخلی و کنترل متابولیسم آنها و نهایتاً کنترل سنتز پروتئین [۳و۲]

۲- تنظیم و کنترل میزان سنتز آنژیوژنین [۱۵و۱]

در فرآیند دوباره‌سازی کبد بعد از برداشتن قسمتی از کبد و همچنین در لنفوسیتهای تغییر شکل‌یافته، در مراحل سنتز اسیدهای نوکلئیک نسبت مهارکننده به آنزیم ریبونوکلئاز افزایش می‌یابد و بر عکس در بافتهایی که سنتز انواع *RNA*ها و پروتئین کاهش یافته، این نسبت نیز کاهش می‌یابد[۱۵و۸].

مهارکننده از طریق تشکیل کمپلکس ۱:۱ با ریبونوکلئاز، آن را بصورت غیررقابتی مهار می‌کند بطوری که مطالعات قبلی توسط گروه پیتر بلک‌برن غیررقابتی بودن اثر مهارکننده را با $Ki = ۳\times۱۰^{-۱۰}$ گزارش نمودند[۹و۶].

در سرتاسر دوره بارداری و شیردهی، میزان مهارکننده ریبونوکلئاز افزایش می‌یابد، این افزایش همراه با سالم ماندن پلی‌زومها در حین استخراج از بافتهای خاص و کاهش فعالیت ریبونوکلئاز آندوژن می‌باشد[۷].

آنژیوژنین که فاکتور تشکیل‌دهنده رگهای خونی است، از نظر ساختمانی به آنزیم ریبونوکلئاز شباهت دارد، میزان آن در پلاسمای انسان بر اساس ظرفیت لازم جهت تشکیل رگهای خونی و در سلولهای توموری قابل تغییر می‌باشد. مطالعات نشان داده‌است که آنژیوژنین با خاصیت کاتالیتیکی جهت تجزیه اسیدهای نوکلئیک *(RNA)* می‌باشد. اگرچه فعالیت کاتالیتکی آنژیوژنین با مهارکننده می‌تواند یک کمپلکس ۱:۱- ایجاد نماید، بنابراین مهارکننده ریبونوکلئاز می‌تواند نقش مهمی در کنترل میزان تشکیل رگهای خونی و جلوگیری از تومورهای کارسینومایی داشته باشد[۸].

امروزه بررسی مستقیم اسیدهای نوکلئیک جهت کشف علت بسیاری از بیمارهای ژنتیکی و سایر تحقیقات کاربرد فراوانی در تکنولوژی‌های مهندسی ژنتیک پیدا کرده‌است[۱۲]. و در فرآیند جداسازی اسیدهای نوکلئیک از بافتهای اختصاصی و استخراج پلی‌زومها، جهت محافظت *RNA* از تجزیه توسط انواع ریبونوکلئازهای غیراختصاصی اضافه‌کردن مهارکننده ریبونوکلئاز به تیره بافتها ضروری می‌باشد[۱۳].

مواد و روشها

مواد لازم عبارتست از:

- جفت تازه انسان مربوط به جنین کامل شده *(Fullterm)*
- آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی که از شرکت سیگما تهیه گردید.
- سوبسترای ریبونوکلئاز *Yeast RNA* که از شرکت سیگما تهیه گردید.
- آلبومین گاوی - تریس اسیدی و بازی - دی تیوترتیول - محلول پرکلریک اسید استات یورانیل - سولفات آمونیم - کلرید سدیم *EDTA* - گلیسرول - سدیم آزید - اسید سولفوریک - سولفیت سدیم - اسید استیک - استات سدیم - فسفات پتاسیم - سوکروز - رزین دی‌اتیل آمینواتیل سلولز
- سدیم تارتارات - معرف فولین سیوکالتی که از کارخانهٔ مرک آلمان تهیه گردید
- رزین سفارز فعال‌شده توسط سیانوژن بروماید که از کارخانهٔ سیگما تهیه گردید.

دستگاهها:

- هموژنیزور
- اولتراسانتریفوژ مدل بکمن
- اسپکتروفتومتر
- ستونهای کروماتوگرافی با ابعاد $۳۰\times۲/۶\ cm$ و

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]

۱۰×۱/۵cm که از شرکت فارماسیا تهیه گردید.
- کیسهٔ دیالیز شمارهٔ ۴۱۰۰۰-۲۰۰۰۰ (Mw-Cut off) که از شرکت سیگما تهیه گردید.
- دستگاه جمع‌کننده فراکسیونهای حاصل از کروماتوگرافی

تهیه محلول پروتئینی : جفتهای نرمال مربوط به دورهٔ کامل بارداری حداکثر ۴ ساعت پس از زایمان تهیه گردید. بعد از شستشوی آنها با بافرتریس ۲۰ میلی‌مولار، PH=۷/۵، EDTA ۱ میلی‌مولار، سوکروز ۰/۲۵ مولار و DTT ۵ میلی‌مولار به نسبت ۱:۲ ($\frac{W}{V}$) با همین بافر هموژنیزه نمودیم. در دمای ۴°C محلول هموژنات را با دور g ۱۶۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ کرده، سپس محلول روئی را از رسوب حاصله جدا نموده، به آن سولفات آمونیم ۳۵٪ اشباع اضافه کردیم، سپس محلول را به مدت یکساعت در دمای ۴°C (در حال تکان‌خوردن) قرارداده و به مدت نیم ساعت با دور g ۱۶۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفوژ کردیم تا یکسری ترکیبات اضافی بصورت رسوب از محلول جدا گردد، بر روی محلول رویی جداشده، سولفات آمونیم ۵۰ درصد اشباع اضافه کرده و در دمای ۴°C به مدت یکساعت (در حال تکان خوردن) قرار داده، و مجدداً به مدت نیم‌ساعت با دور g ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. رسوب حاوی پروتئین مهارکننده که در دمای ۱۵- تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مدت یک هفته و در دمای ۴°C به مدت یک شب قابل نگهداری می‌باشد از محلول رویی جدا گردید[۱۳].

دیالیز: رسوب حاصل از سانتریفوژ را در ۱۰۰-۵۰ میلی‌لیتر بافرتریس ۲۰ میلی‌مولار، PH=۷/۵ ، EDTA ۱ میلی مولار DTT ۵ میلی‌مولار حل کرده، وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت ۳۰ ساعت در دمای ۴°C در محلولی از بافر با ۲۰ برابر حجم نمونه، غوطه‌ور نمودیم بطوری که هر ۴ ساعت یک بار بافر تعویض شده تا ذرات اضافی از جمله سولفات آمونیم خارج گردد.

کروماتوگرافی تعویض یون: نمونه دیالیزشده به مدت یک ساعت در دمای ۴°C با دور g ۴۸۰۰۰ سانتریفوژ شده، محلول رویی را جدا نموده و از ستون کروماتوگرافی تعویض یون منفی حاوی رزین دی‌اتیل آمینواتیل سلولز با ابعاد ۳۰×۲/۶cm که قبلاً با بافر فوق کالیبزه شده، عبور داده، بعد از جذب نمونه به رزین یکسری از پروتئینهای اضافی از طریق شستشوی ستون بابافرتریس حاوی Nacl ۰/۱۵ مولار خارج گردید. ستون حاوی نمونه را توسط ۶۰۰ میلی‌لیتر از بافر فوق با گرادیان M ۰/۵-۱۵ Nacl شتشو داده شد و نمونه بصورت فراکسیونهای ۵ میلی‌لیتری جمع آوری گردید (منحنی ۲)

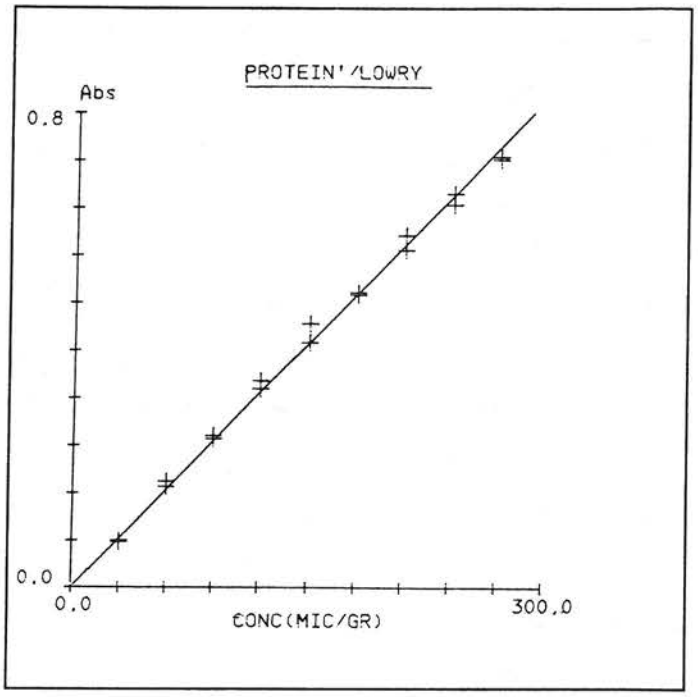
با توجه به منحنی ۲ حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونهٔ جمع‌آوری شده (لوله‌های شماره ۵۴-۲۰) را که بیشترین فعالیت را دارند جداشده و به مدت یک شبانه روز در بافر با حجم بیست برابر، دیالیز گردید[۱۳].

کروماتوگرافی میل ترکیبی: نمونهٔ دیالیز شده را از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی با سفارز 48 فعال شده توسط سیانوژن بروماید که قبلاً آماده گردیده بود عبور داده تا ریبونوکلئاز مهارکننده ریبونوکلئاز جذب ریبونوکلئاز باند شده به رزین گردد.

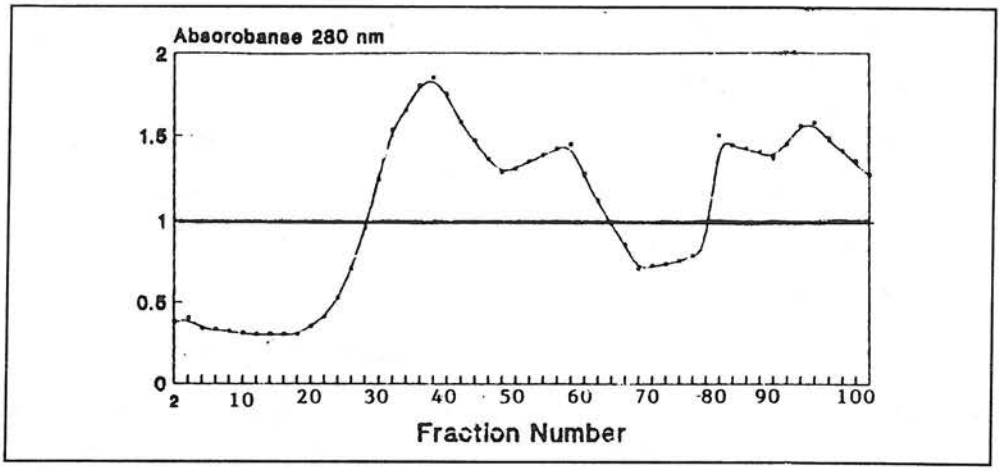
جهت حذف یکسری پروتئینهای اضافی که نسبت به ریبونوکلئاز اختصاصی نیستند ستون را با بافرفسفات ۴۵ میلی‌مولار Nacl ۰/۵ مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار و PH=۶/۴ شستشو داده، سپس بافر استات ۲۰ میلی‌مولار حاوی Nacl ۳ مولار، گلیسرول ۱۵ درصد ($\frac{V}{V}$) EDTA ۱ میلی‌مولار، DTT ۵ میلی‌مولار را از ستون عبور داده تا مهارکننده ریبونوکلئاز باند شده به ریبونوکلئاز را از ستون جداکرده و بصورت فراکسیونهای ۱ میلی‌لیتری (لوله‌های شماره ۴۵-۳۰) (منحنی ۳) جمع‌آوری گردید.

سنجش پروتئین : در کلیه مراحل استخراج و تخلیص، اندازه‌گیری پروتئین به روش لوری با استفاده از منحنی تغییرات جذب نوری پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی) 1mg/1ml بر حسب تغییرات غلظت (حجم) پروتئین (منحنی ۱) انجام گرفت.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]

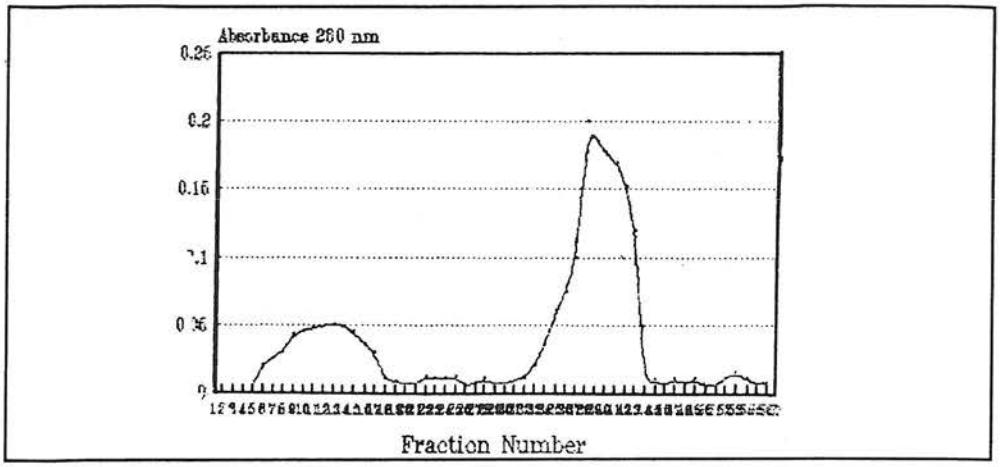


منحنی ۱: تغییرات جذب نوری پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی) بر حسب تغییرات غلظت آن



منحنی ۲: کروماتوگرافی تعویض یون

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]



منحنی ۳: منحنی کروماتوگرافی میل ترکیبی

اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم ریبونوکلئاز: فعالیت ویژه آنزیم ریبونوکلئاز بر اساس طیف جذبی محصول واکنش آنزیم با سوبسترای ریبونوکلئیک اسید در بافرتریس ۰/۵ مولار و $PH=۷/۵$ و آلبومین سرم گاوی ۰/۱ درصد اورانیل استات / اسیدپرکلریک ۰/۰۲۵ ($\frac{V}{V}$) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر حسب زمان طبق روش آفین‌سن (Affinsen) مورد بررسی قرار گرفت[۷و۹]، در این واکنشها غلظت آنزیم $1ng/\mu l$ و غلظت سوبسترا $\frac{2g}{100ml}$ بود. محلول شاهد از نظر محتوی کاملاً مشابه لوله تست بوده، با این تفاوت که در لولهٔ تست بعداز اضافه کردن محلول آنزیم و سوبسترا، مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه گردید، سپس جهت ختم واکنش ۱ میلی‌لیتر محلول اسید پرکلریک اورانیل استات خنک شده به مخلوط اضافه کرده ولی در لولهٔ شاهد آنزیم را در مرحلهٔ آخر یعنی بعداز اضافه کردن اسید فوق‌الذکر، اضافه نمودیم تا در چنین واکنشی آنزیم عمل نکند. در هر مرحله از واکنش جذب نوری محلول مورد آزمایش در مقابل شاهد خوانده، یا به عبارتی جذب نوری شاهد از جذب نوری محلول واکنش کسر گردید. از روی مقادیر جذب نوری در زمانهای مختلف و تغییرات جذب در دقیقه (ΔA) سرعت واکنش (فعالیت ویژه) از رابطه زیر محاسبه گردید (منحنی ۴).

$$\text{فعالیت ویژه} = \text{سرعت واکنش} = S = \frac{A.V}{E} \cdot \frac{1}{cy} = V \cdot A$$

ضریب خاموشی اسید ریبونوکلئیک $E = ۱/۱\times۱۰^{-۲}$ $nmol/min\ mg$

تغییرات جذب در دقیقه $=A$

غلظت آنزیم $C=mg/ml$

حجم آنزیم مورد استفاده $=y$

حجم کووت $=V$

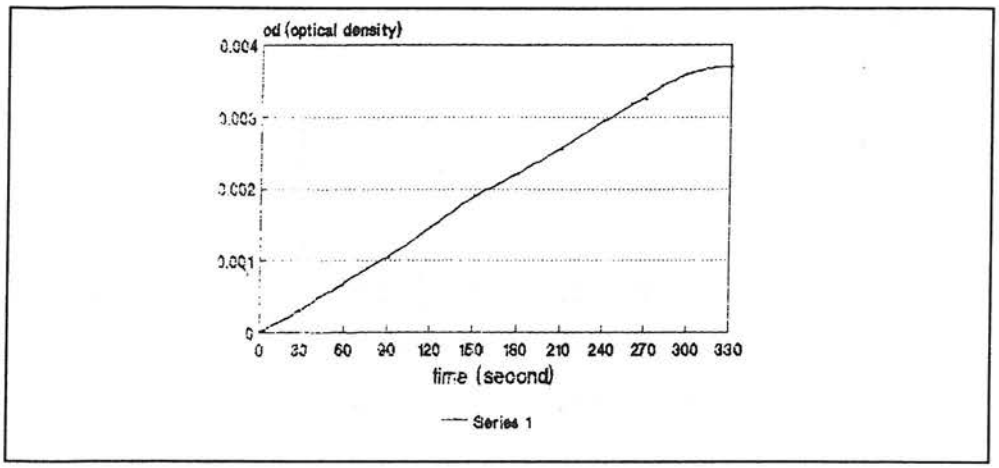
سرعت واکنش = فعالیت ویژه $=S.A=v$

محلول واکنش آنزیمی حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر بافرتریس، ۰/۱ میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی ۰/۱ درصد، ۱۰ میکرو لیتر آنزیم را با آب مقطر به حجم نیم‌میلی‌لیتر رسانده، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر سوبسترای ۲ درصد جهت شروع واکنش اضافه نموده، به مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$ انجام گرفت.

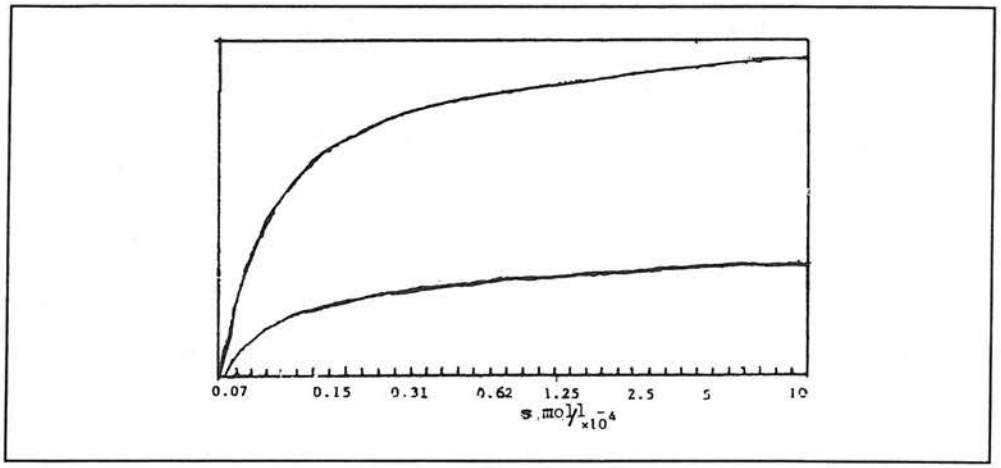
جهت ختم واکنش ۱ میلی‌لیتر از محلول پرکلریک اسید - اورانیل استات خنک‌را اضافه کرده، بعداز ۲۰ دقیقه انکوباسیون در یخ جهت تشکیل رسوب، محلول را با دور $3000g$ در دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ نموده، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی را جدا و توسط آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده، تغییرات جذب نوری محلول حاصله در طول موج ۲۶۰ نانومتر در مقابل شاهد قرائت گردید (منحنی ۴).

در مرحلهٔ دوم، تغییرات جذب نوری در مقاطع زمانی محلول واکنش حاوی آنزیم با غلظتهای مختلف سوبسترا از ۱×۱۰^{-۳} - ۳×۱۰^{-۴} میلی‌مولار طبق روش فوق جهت محاسبه $Ki\ Km$ و $Vmax$ قرائت گردید. (منحنی‌های ۵ و ۶)

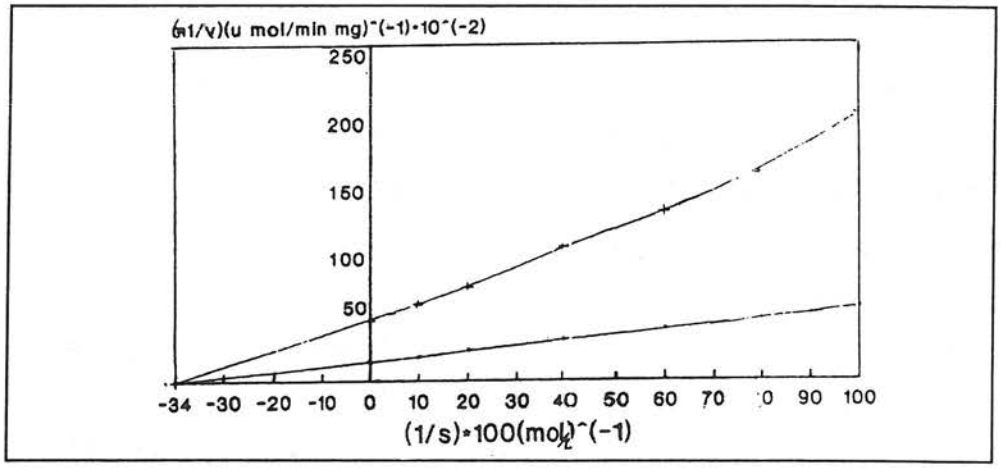
Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]



منحنی ۴: منحنی تغییرات دانسیته نوری آنزیم بر حسب زمان

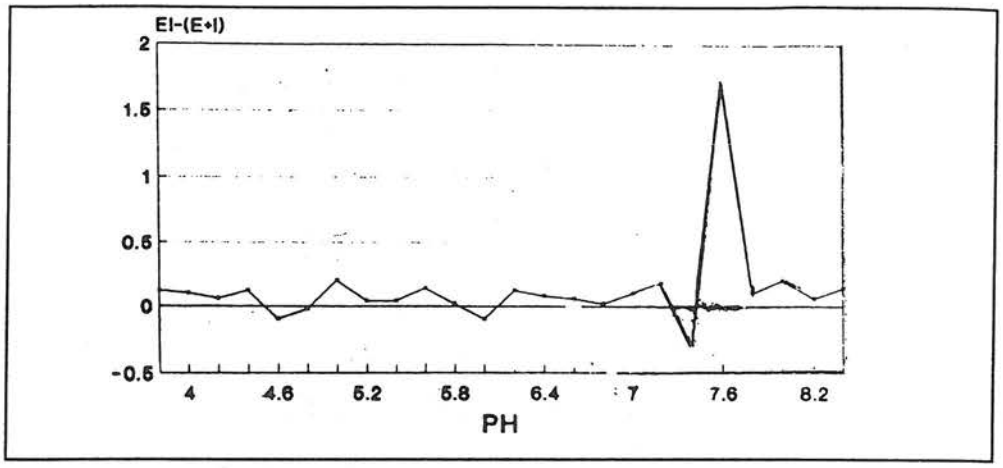


منحنی ۵: منحنی میکائیلیس و منتون آنزیم ریبونوکلئاز در حضور و عدم حضور مهارکننده



منحنی ۶: منحنی لینوویرگ آنزیم ریبونوکلئاز در حضور و بدون حضور مهارکننده

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]



منحنی ۷: منحنی PH اپتیمم برای فعالیت مهارکننده

اندازه‌گیری فعالیت مهارکننده و درصد مهارکنندگی: در این مرحله جهت اندازه‌گیری فعالیت مهارکننده، مقدار کمیت (Ki) با استفاده از معادلهٔ $\frac{1}{Vmax}(1+\frac{I}{Ki})=۴۵\times۱۰^{-۳}$ و تعریف Ki مهارکننده که عبارت است از مقدار مهارکننده‌ای که ۵۰ درصد فعالیت آنزیم $(\frac{10ng}{10ml})$ را کاهش دهد، تغییرات فعالیت آنزیم را بر حسب تغییرات جذب نوری محصول واکنش آنزیم ریبونوکلئاز جهت هیدرولیز ۰/۵ میلی‌لیتر سوبسترای ۲ درصد yeast RNA در حضور حجمهای ۱۰۰، ۸۵، ۴۵، ۲۵، ۱۰ و ۵ میکرولیتر از پروتئین مهارکننده خالص شده با غلظتی برابر $\frac{۱mg}{۱۵ml}$ به ازای هر یک جفت انسان طبق روش رت و شورتمن اندازه‌گیری و محاسبه گردید (منحنی ۸)[۹].

درصد مهارشوندگی: بر طبق رابطهٔ:

$\frac{V-V0}{V_{کنترل}}\times۱۰۰$ = کنترل درصد مهارشوندگی محاسبه گردید.

سرعت اولیه بدون حضور مهارکننده = V، سرعت واکنش در حضور مهارکننده = V

اندازه‌گیری PH مناسب (اپتیمم):

جهت اندازه‌گیری و تعیین بهترین PH برای برهم‌کنش میان آنزیم و مهارکننده به روش اسپکتروفتومتری افتراقی، بطور مجزا تغییرات جذب نوری آنزیم (E)، مهارکننده (I) و مخلوط آنزیم - مهارکننده را بر حسب تغییرات PH (۳/۸-۸/۴) در طول موجهای ۴۰۰-۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری نموده سپس تغییرات جذب نوری (جمع جبری) EI-(E±I) در طول موجهای ۴۰۰-۲۴۰ نانومتر بر حسب تغییرات PH (۳/۸-۸/۴) رسم گردید (منحنی ۷)

بهترین PH (Optimum PH) جهت مهار فعالیت آنزیم توسط پروتئین مهارکننده به کمک منحنی مشخص گردید[۱۳و۱۱،۱۰].

جذب نوری آنزیم خالص = E

جذب نوری مهارکننده = I

جذب نوری مخلوط کمپلکس آنزیم مهار کننده = EI

نتایج

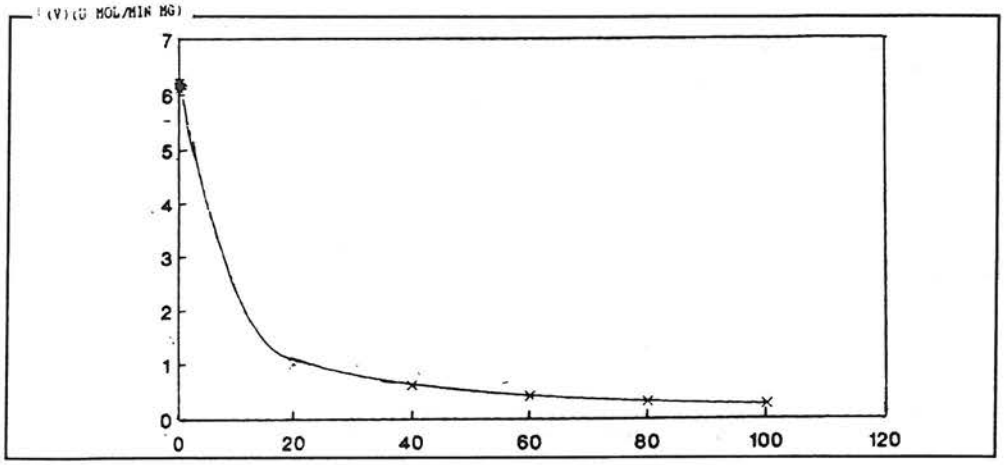
همانطور که اشاره گردید جهت بررسی اثر مهاری مهارکننده ریبونوکلئاز خالص شده از جفت انسان به روش شیمیایی، کروماتوگرافی تعویض یون و میل ترکیبی از روشهای آنزیماتیک استفاده گردید.

ابتدا فعالیت ویژه آنزیم ریبونوکلئاز (سرعت هیدرولیز) بدون حضور مهارکننده طبق روش فین‌سن [۷] با استفاده از سوبسترای اختصاصی Yeast RNA برابر ۶/۸±۰/۳۸ و در حضور مهارکننده برابر ۰/۴±۰/۰۱ $\frac{Umol}{min/mg}$ تعیین گردید.

میزان Km آنزیم ریبونوکلئاز (ثابت میکائیلیس و منتون) با استفاده از معادله و رسم منحنی لینوو و برگ برابر $Km = ۳/۰۵\times۱۰^{-۴}\pm۰/۰۱$ مولار محاسبه گردید.

Ki یا ثابت مهارکنندگی مهارکننده طبق روش رت و شورتمن[۹] برابر $Ki = ۰/۹۷\times۱۰^{-۱۰}\pm۰/۰۱$ تعیین گردید.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]



منحنی ۸: منحنی تغییرات فعالیت آنزیم در حضور غلظتهای مختلف مهارکننده خالص

PH مناسب (Optimum PH) به روش Difference Spectrophotometry با اثر مهاری برابر ۰/۳۱±۹۴/۱۹ درصد مهارکننده به روی آنزیم ریبونوکلئاز برابر PH=۷/۶±۰/۱ تعیین گردید.

میزان غلظت پروتئین مهارکننده خالص شده بروش لوری اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی تغییرات جذب نوری پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی) بر حسب تغییرات غلظت آن برابر با 1mg/15ml به ازای یک جفت انسان تعیین گردید.

بحث

مهارکننده ریبونوکلئاز جفتی انسان، پروتئین اسیدی است که در PH فیزیولوژیک و قدرت یونی مناسب، به طور فعال در اکثر بافتهای پستانداران به ویژه جفت انسان جهت تنظیم در تشکیل عروق خونی و فعالیت بیوسنتزی به وفور یافت می‌شود[۲].

همانطور که در بخش مواد و روشها بیان شد، این مهارکننده فعالیت آنزیم را از طریق تشکیل کمپلکس ۱:۱ با آن، مهار می‌کند[۱۴].

میزان Km آنزیم جهت هیدرولیز سوبسترای اختصاصی Yeast RNA در حضور مهارکننده معادل با Km آنزیم در غیاب مهارکننده با شرایط یکسان و برابر $Km=۳\pm۰/۰۱\times۱۰^{-۴}$ مولار تعیین گردید. بنابراین با استناد به این نتیجه می‌توان غیررقابتی بودن مهارکننده را جهت مهار آنزیم نتیجه گرفت. مقدار Ki ثابت مهارکنندگی مهارکننده در فرمول کلی میکائیلس و منتون و لینوویرگ در شرایطی که عامل مهارکننده غیررقابتی در واکنش آنزیمی دخالت دارد به روش رت و شورتمن [۹] سنجش و برابر $Ki=۰/۹۷\pm۰/۰۱\times۱۰^{-۱۰}$ مولار تعیین گردید که در مقایسه با $Ki = ۳\times۱۰^{-۱۰}$ که توسط گروه پیتر بلک‌برن گزارش شده با توجه به اینکه میزان میل ترکیبی (Affinity) $\frac{۱}{Ki}$ است[۶]. می‌توان نتیجه گرفت اثر مهاری مهارکننده خالص شده بیشتر است.

از طریق بررسی مستقیم پیوند بین مهارکننده و آنزیم در PHهای مختلف به روش Difference Spectrophotometry همانطور که شرح داده شده میزان PH مناسب جهت اثر مهاری مهارکننده بر روی فعالیت آنزیم برابر با PH=۷/۶±۰/۱ تعیین گردید. مطالعات کریستالوگرافی با اشعه نشان می‌دهد که هم‌کنش و اتصال میان مهارکننده و آنزیم از طریق اتصال بین رزیدوهای اسیدی مهارکننده و بازی آنزیم صورت می‌گیرد[۶و۳]. بنابراین پیشنهاد می‌شود که PH =۷/۶ نتیجهٔ تعادل میان دو نوع PK اسیدی و بازی می‌باشد.

تغییرات فعالیت آنزیم منحنی ۱-۷ جهت هیدرولیز سوبسترا در حضور حجمهای مختلف مهارکننده خالص شده نشان می‌دهد که فعالیت ویژه آنزیم 1 ng/1μL بدون حضور مهارکننده از ۰/۰۳۸±۶/۱۸ به ۰/۰۱±۰/۴ umol/mimg در حضور ۱۰۰ میکرولیتر مهارکننده خالص شده کاهش یافته، بنابراین پیشنهاد می‌شود که حجم ۱۰۰ میکرولیتر از مهارکننده یک جفت انسان /1mg یک غلظت مناسب جهت مهار فعالیت آنزیم با درصد مهاری برابر با ۰/۳۱±۰/۹۴/۱۹ می‌باشد.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]

REFERENCES

1) Andrzei, Bierzynski and Robert L.; Detection of RNAase inhibitor from different species and organs; J. Mol. Biol. 1982, V. 162(1) PP: 187-201

2) Andrzei, Bierzynski and Robert L., Detection of RNAase inhibitor from different species and organs; J. Mol. Biol. 1982, PP:173-186

3) Blackburne P: Gavilans K.Q; The role of lysine-41 of Ribonuclease in the interaction with RNA are inhibitor from placenta, J.Biol. chem. 1980, 255(22) No.25: PP: 5486-94

4) Daniel J. Strydom. James W.Fetts Roy et al. Amino acid sequence of human tumour derived angiogenin Biochemistry 1985, V.24, PP: 5486-5494

5) DA: Kee liu et at. Alkaline Ribinuclease and Ribonucleas inhibitor in mmamary Gland during the lactation cycle and in the R320AC mmamary tumour. Biochem J. 1975, V.14. PP: 67-76

6) Dauthart RJ: Klein Sefmidt WJ et al. Interferon induction and macrophage activation by a mycovirus double-stranded RNA/tobramycin. Complex following treatment with human serum J.interforn. Res. (982-1214): PP: 443-9

7) Frank S.lee Robert sharpiro and Bertl. Vallee Tight binding inhibitor of Angiogenin and Ribonuclease A by placental Ribonuclease inhibitor Biochemistry 1989, V,28,PP: 225-230

8) Frank S.lee David S. Auld and Bertl. Vallee Tryptophan fluorescence as a probe of placental Ribonuclease inhibitor binding of Angiogenin. Biochemistry 1989, V,28, PP: 219-224

9) Frank S.lee Binding of placental Ribonuclease inhibitor to the Active site of Angio genin Biochemistry 1988. 27, 8545-8553

10) Malgorzata Ana-Kowalcze cwska and Jaysroth Ribonuclease inhibitor compelex from liver Rabit Biochemical and Biophysical Research commun. 1975. V.165,NO, 3PP: 833-836

11) Michael E. The structeral role of Amino acid residues near the carboxy terminus of bovine pancreatic Ribonuclease A lin the Journal of Bioligical chemistry V.245.No 24,PP: 6726-70

12) Purification, characterization and development of radiommunoassay of human liver Ribonuclease Clin, Chem. Acta. 1982-Sep-1:124(1): PP-51-62

13) Peter Black Burn, Gignn wilson and standford morde. Ribonuclease inhibitor form Human placenta The Journal of Biological Chemistry 1977. V. 262,NO,16 Aug. PP. 5404-10

14) Peter Blackburn, Gignn wilson and standfor Morde. Ribonuclease Inhibitor from human placenta: Rapid purification and Assay The Journal of Biologycal Chemistry. 1979.V.254.No, 24.Dec.25,PP: 12484-87

15) Paul M. Turner Kenneth M. and Fredrick J. The Ribounuclease inhibitor from procine thyroid and liver are slow tight binding inhibitor of bovine pancreatic Ribonuclease A J.Kull Biochemical and Biological Research Communication, 1983. V, 114, No, 39 Aug, 12.PP: 1154-60

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 10:52 IRDT on Saturday July 21st 2012

STUDY OF THE RIBONUCLEASE INHIBITOR EFFECT ON RIBONUCLEASE

*S. Fallah** *B.Farzami, Ph.D.***

ABSTRACT

Ribonuclease inhibitor is an acidic protein, soluble in cytoplasm. It is abundantly present in human placenta. It could be extracted from this organ to the extent of 1mg/placenta using chemical ion exchange and affinity techniques. Molecular weight of this protein is estimated by electophoresis or SDS-PAG electrophoresis using standards of known proteins.

Molecular weight has been found to be 48000D. The inhibitor could from a 1:1 complex with bovine pancreatic ribonuclease in a noncompetitive fashion (Ki= 2.9 . 10^{-10}). Optimal PH for such inhibition is found to be 7.6±0.1

This compound is currently for nucleic acid separations due to its protective abilities and also in genetic engineering, to identify genetic defects in a wide variety of diseases. Thus, due to the importance of the subject, we undertook the kinetic - inhibitory studies of this inhibitor to obtain more insight about the regulatory mechanism of the protein.

Key Words: 1) Ribonuclease enzyme 2) Ribonuclease inhibitor 3) Angiogenin

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-04-11]

* *M.S. of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences and Health Services*

** *Ph.D. of Biochemistry, Tehran University of Medical Sciences and Health Services*