ارائه یک روش جدید برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳-بتا-هیدروکسی استروییید دهیدروژناز

دکتر دردی قوجق I

چکیده

۳-بتا-هیدروکسی-دلتا-۵استروییید دهیدروژناز، مهمترین آنزیم کلیدی در بیوسنتز هورمونهای استروییدی است که در تبدیل پرگننولون به پروژسترون در مسیر بیوسنتز هورمونهای جنسی نقش دارد. این کمپلکس آنزیمی دومین آنزیم شرکت کننده در مسیر بیوسنتز هورمونهای استروییدی است که در این پژوهش یک روش ساده برای اندازه‌گیری فعالیت آن در بیضه موش آزمایشگاهی ارائه شده است. برای انجام این تحقیق مقادیر زیاد پرگننولون همراه با غلظتهای متفاوت هموژنه بافت بیضه موش آزمایشگاهی انکوبه شد. مخلوط واکنش شامل پرگننولون، کوآنزیم نیکوتین‌آمید دی‌نوکلئوتید و ایزونیتر و تترازولیم در ۰/۱۵۰ مولار بافر تریس با PH=۸ و همچنین آنزیم استخراج شده از بیضه موش آزمایشگاهی بود که به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و جذب نوری آن در طول موج ۴۹۵ نانومتر توسط اسپکترو فتومتر اندازه‌گیری گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که فعالیت ۳-بتا-هیدروکسی استروییید دهیدروژناز از زمان و غلظت پروتئین محلول آنزیمی به صورت خطی تبعیت می‌کند. لازم به ذکر است که روش به کار رفته در این مطالعه حساسیت کافی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استروییید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی را داشت.

کلیدواژه‌ها: ۱ – ۳-بتا-هیدروکسی استروییید دهیدروژناز ۲ – بیضه موش ۳ – اسپکتروفتومتر

مقدمه

فاکتور رشد اپیدرمال، سنتز آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز(E.C.1.1.1.145) را تنظیم می‌کند و مکانیسم این کنترل بخوبی شناسایی شده است(۱).

محققان نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز در بیوسنتز هورمونهای استروییدی از اهمیت زیادی برخوردار است(۲).

دو سیستم آنزیمی در تبدیل آنزیمی کلسترول به پروژسترون دخالت دارند. شاخه جانبی کلسترول باید توسط یک آنزیم حذف شود تا مولکول کلسترول به پرگننولون تبدیل گردد.

آنزیمی که پرگننولون را در مرحله بعدی به پروژسترون تبدیل می‌کند شامل، ۳ ـ بتا هیدروکسی استروییید دهیدروژناز، NAD اکسیدوردوکتاز (E.C.1.1.1.145) و ۳ ـ کتواستروییید دلتا ٤ و۵ ایزومراز (E.C.5.3.3.1) است که به صورت 3B-HSDH نوشته می‌شود(۳). در سالهای اخیر توزیع آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز در بافت مغز و غده هیپوفیز توسط روشهای ایمونوشیمی مورد بررسی قرار گرفته که نتایج آن در شناخت مکانیسم سنتز نورواستروییدها اهمیت فراوانی داشته است(٤).

این طرح پژوهشی تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام شده است(شماره ثبت: ۱۳۷۹۹) همچنین در ششمین کنگره بیوشیمی در تهران سال ۱۳۸۰ و در نهمین کنگره بین‌المللی بیوشیمی در هند سال ۱۳۸۱ و ارائه گردیده است.

I) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی بابل.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-06-08]

محققان مختلفی آنزیم 3B-HSDH را از میتوکندری و میکروزوم جدا کرده و خصوصیات آن را مورد مطالعه قرار داده‌اند. در این مطالعات به نقش آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز و پروژسترون در طناب نخاعی نیز اشاره شده است(۵). همچنین مشخص شد که هورمون تستوستون بطور مستقیم روی غده آدرنال اثر کرده و سبب مهار فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز می‌گردد(٦). در یک مطالعه که اثر مهار کننده‌ها بر تبدیل پرگننون و دهیدرواپی آندروسترون توسط هموژنه آنزیمهای استروژنیک بررسی شده بود، نشان داده شد که هموژنه جفت انسان، اپی اندروستین دیون را به اندروستین دیون، تستوسترون و ۱۷ ـ بتا ـ استرادیول و استرون و پرگننولون را به پروژسترون و ۵ ـ آلفا پروژسترون تبدیل می‌کند(۷). فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز از طریق تبدیل دهیدرو اندروسترون به پروژسترون با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود(۸). نارسایی فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز در کودکان مبتلا به کلستازیس مشخص شده است(۹). مرحله کلیدی در بیوسنتز هورمونهای استروییدی تبدیل استروییدهای ۵ـ دلتا ـ ۳ ـ بتا ال به استروییدهای ٤ ـ دلتا ـ ۳ ـ اکسو توسط گنادها یا غدد آدرنال است، مانند پروژسترون و آندرواستات ٤ـ ان و ۳ و ۱۷ دی ان (اندروستین دیون) که از نظر بیولوژیکی بسیار فعال بوده و می‌تواند پس از انتقال به داخل اندروژن‌ها، استروژنها یا کورتیکوستروییدها عمل کند. این مرحله تبدیل توسط ۲ آنزیم کاتالیز می‌شود که به صورت کمپلکس است و شامل آنزیم ۵ ـ دلتا ـ ۳ ـ بتا هیدروکسی استرویید دهیدروژناز (E C. 1.1.1.51) و ۵ ـ دلتا ـ ۳ ـ اکسو استرویید ایزومراز(E C. 5.3.3.1) می‌باشد. اولین واکنش نیاز به کوآنزیم NAD دارد(۱۰) محققان گزارش کرده‌اند که پروژسترون بیان ژن آنزیم ۳ ـ بتاهیدروکسی استرویید دهیدروژناز را تحریک می‌کند(۱۱). هدف از انجام این پژوهش دست یافتن به یک روش سریع و حساس برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز در بافت بیضه موش آزمایشگاهی(Rat) بوده است. بدین ترتیب که از یک روش کالریمتریک ساده برای اندازه‌گیری ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز در بیضه موش آزمایشگاهی استفاده شد.

روش بررسی

در این بررسی موادشیمیایی مورد نیاز عبارت بودند از: پرگننولون(۵ ـ پرگنه ۳ ـ بتا ـ ال ۲ ـ اون) و تستوسترون، (۱۷ ـ بتا ـ هیدروکسی اندروستان ـ ٤ ـ ان ـ ۳ ـ اون) که از نمایندگی شرکت سیگما خریداری شده بود و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید نمک سدیم(NAD)، فرم احیا شده نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید(NADH) ایدونیترو تترازولیم کلراید(INT) و فنازن متوسولفات(PMS) از نمایندگی شرکت مرک تهیه شده بودند.

معرف‌های به کار برده شده در این بررسی عبارت بودند از: ۱- بافر فتالدیید(۱۰۰ میلی مول PH=۳/٤) که ۵/۲۰ گرم از پتاسیم هیدروژن فتالدیید به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اسیدکلریدریک نرمال و ۵ میلی‌لیتر از توئین ۲۰، اضافه و PH آن روی ۳/٤ تنظیم گردید و حجم نهایی محلول توسط آب مقطر به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

۲- بافر تریس ـ اسید کلریدریک(۰/۱۵ مولار، PH=۸): NAD (Nicotinamide adenine dinucletide) (۵میلی‌مول در لیتر).

ـ برای تهیه معرف رنگی ۵۰ میلی‌گرم ایدونیترو تترازولیم کلراید، ۱۵ میلی‌گرم فنازن متوسولفات و ۱ میلی‌لیتر توئین ۲۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب مقطر حل شد و از آن برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. در شرایط اندازه‌گیری آنزیم، پس از حذف فنازن متوسولفات، معرف رنگی در شیشه‌های تیره نگهداری و ذخیره شد. برای تهیه سوبسترا، پرگننولون در ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول دی متیل فرم آمید حل شد و محلول غلیظ ذخیره با غلظت ۱ میلی‌مول در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر تریس (۰/۱۵ مولار، PH=۸) تهیه گردید. حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-06-08]

در قفسه‌های جداگانه بـه تعـداد ٦ تـایی و درجـه حـرارت حدود ٥±٢٣ درجه و دوره‌های ١٢ ساعت روشـنایی و ١٢ ساعت تاریکی نگهداری می‌شـدند. در ایـن بررسـی بیضـه موشهای آزمایشگاهی صحرایـی بالغ(Rat) پس از کشـته شدن از طریق بیهوشی با اتر خارج می‌شد و حدود ٢ تـا ٤ بیضه از موش آزمایشگاهی بـا وزن ٥ میلی‌گـرم در لولـه آزمایش قـرار داده می‌شـد، سـپس در ٥ میلی‌لیـتر از بـافر تریس- HCL(٠/٠١٥ مولار با PH=٨) هموژنیزه می‌گردید و پس از سانتریفوژ بـا دور ٤٥٠٠ در دمـای حـدود ١٠-٥ درجه محیط آزمایشگاه (کلمنت ٢٠٠٠) محلول رویی بـرای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ٣ ـ بتـا اسـترویید دهیـدروژنـاز مورد استفاده قرار می‌گرفت.

ـ انـدازه‌گـیری فعـالیت آنزیـم ٣ ـ بتـا ـ هیدروکسـی استرویید دهیـدروژنـاز: فعـالیت آنزیـم در بـافر تریـس HCL، ٠/١٥ مولار و PH=٨ حاوی ٥٠٠ میکرومول NAD و سوبسترا(پرگننـولون) به مقدار ١٠٠ میکرومول در حجم محلول به میزان ٥ میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. واکنش آنزیمی و سوبسترا با اضافه کردن آنزیم (محلول رویی همـوژنـه) به میزان ١٠٠ میکرولیتر و انکوبه کردن در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٩٠ دقیقه شروع شـد. همچنیـن واکنـش آنزیمی و سوبسترا با افزودن ٢ میلی‌لیتر از بافر فتالدئید با PH=٨ متوقف گردید. پس از رفع کـدورت از طریـق انجـام سانتریفوژ در ٣٥٠٠ دور به مدت ٢٠ دقیقـه محلـول رویـی برداشته شد و جذب نوری هر یک از نمونه ها در طول موج ٤٩٥ نـانومتر توسـط اسـپکتر و فتومـتر (سیسـیل ١٠٢٠) اندازه‌گیری گردید. فعـالیت آنزیمـی بـا اسـتفاده از منحنـی استاندارد و بر حسب مقدار نـانومول NADH تولیـد شـده در ساعت در هر میلی گرم پروتئیـن بـافت بیضـه محاسـبه شد. مقدار پروتئین بافت بیضه نیز بـه روش لـوری تعییـن گردید. برای دست یـافتن بـه نمـودار اسـتاندارد محلـول ١ میلـی مـول از کوآنزیـم NADH در آب مقطـر و غلظـت NADH در مقادیر متغیر صفر تا ٣٠٠ نانومول تهیه شد و پس از واکنش دادن با حجم حدود ٠/٥ میلی‌لیتر بـا معـرف رنگی و ایجاد رنگ، ٢ میلی‌لیتر از بافر فتالدیید به هر یک از لوله‌های آزمایش اضافه گردید و میزان جذب در طول موج ٤٩٥ نـانومتر خوانـده شـد. بـرای مقایسـه نتـایج از روش آماری Student T-t-test اسـتفاده شـد. مقـادیر سنجـش فعالیت آنزیم ٣ ـ بتا ـ هیدروکسی اسـترویید دهیـدروژنـاز بافت بیضه موش آزمایشگاهی بر حسب میانگین و خطـای استاندارد ارائه شد و برای بررسی تفاوت بین گروهها نـیز از آنالیز واریانس استفاده گردید و مقدار P<٠/٠٥ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها بـا برنامـه اکسـل ٢٠٠٠ رسـم شدند.

نتایج

منحنی اسـتاندارد انـدازه‌گـیری NADH توسـط احیـای تـترازولیم در نمـودار شـماره ١ نشـان داده شـده اسـت. غلظتهای مختلف NADH پـس از واکنـش دادن در حضـور فنـازن متوسـولفات و بـافر تریـس ـ HCL(٠/١٥ مـولار، PH=٨) و ایجاد کمپلکس رنگی در طـول مـوج ٤٩٥ نـانومتر انـدازه‌گـیری شـد. سیسـتم سـنجش فعـالیت آنزیـم در ایـن پژوهش با غلظتهای پرگننولون در غلظتهای متفاوت نـیز در نمـودار شـماره ١ نشـان داده شـده اسـت. سـرعت واکنـش آنزیمـی تـا غلظـت ٢٥٠ میکرومـول در لیـتر سوبسـترا (پرگننولون)، بـه صـورت خطـی بـود. در جـدول شـماره ١ فعـالیت آنزیـم بـا روش کـالریمتریک و اسـپکتروفتومتری مقایسه شده است.

جدول شماره ١- مقایسه فعالیت آنزیم ٣ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز با ٢ روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی(مقادیر بر حسب میانگین ±خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش بطور جداگانه)

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی	مقدار فعالیت آنزیمی
روش اسپکتروفتومتری	٠/٥٤±٠/١٣ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه
روش کالیمتریک	١/٦٤±٠/١٦ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه

نمودار شماره ٢ نشان‌دهنده تغییرات سرعت بـر حسـب مقدار عصاره آنزیمی می‌باشد. با مقادیر متفاوت از محلـول سوبسترا که به محلول سنجش فعالیت آنزیمی اضافه شـد، مشخـص گردید که در مقادیر بیـش از مقـدار مطمئـن(١٠٠ میکرومول) سرعت واکنش آنزیمی از مقـدار سوبسـترا بـه صورت خطی تبعیت نمی‌کند، بنابراین سوبسـترا در بخـش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-06-08]

فعالیت آنزیمی در حد پایین‌تر از ۱۰۰ میکرومول مورد استفاده قرار گرفت تا رابطه بین سرعت واکنش آنزیمی و محلول سوبسترا به صورت خطی باشد.

نمودار شماره ۱– منحنی استاندارد اندازه‌گیری NADH توسط احیای تترازولیم. مقادیر بر حسب میانگین ±خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ٦ بار آزمایش بطور جداگانه است.

نمودار شماره ۲– منحنی تغییرات سرعت بر حسب مقدار عصاره آنزیمی برای آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی با سوبسترای پرگنولون در سیستم سنجش استاندارد آنزیمی. مقادیر بر حسب میانگین ±خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ٦ بار آزمایش بطور جداگانه است.

نمودار شماره ۳ اثر مدت زمان انکوباسیون را بر فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا هیدروکسی استروییید دهیدروژناز بافت بیضه موش آزمایشگاهی نشان می‌دهد همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود، تا زمان ۱۰۰ دقیقه، فعالیت آنزیم ۳ ـ بتاـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز را می‌توان اندازه‌گیری نمود و منحنی تا این زمان به صورت خطی است.

نمودار شماره ۳– اثر مدت زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز بیضه موش آزمایشگاهی. مقادیر بر حسب میانگین ±خطای استاندارد ارائه شده است و حاصل تکرار حداقل ٦ بار انجام آزمایش بطور جداگانه است.

بحث

در این پژوهش یک روش کالریمتریک ساده برای اندازه‌گیری ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استروییید دهیدروژناز در بیضه موش آزمایشگاهی به کار برده شد. جایگزینی ایدونیتروازولیم کلراید، نمک تترازولیم در این روش، موجب افزایش توانایی این روش در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استروییید دهیدروژناز شده است.

در این روش مقدار NADH تولید شده از طریق اکسیداسیون استروییید بافت بیضه موش آزمایشگاهی و جفت کردن NADH ایجاد شده با واکنش احیای تترازولیم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-06-08]

توسط دیافورز بافت بیضه موش آزمایشگاهی اندازه‌گیری گردید، مقدار فعالیت ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز با روش ما برابر با ۱/٦٤+۰/۱٦ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه بود اما باروش اسپکتروفتومتری برابر با ۰/٥٤+۰/۱۳ نانومول در میلی‌گرم در دقیقه به دست آمد. آزمون T مستقل با سطح معنی‌دار بودن P<۰/۰٥ نشان داد که روش ما بطور معنی‌داری از روش اسپکتروفتومتری بهتر است. آنالیز واریانس با تکرار، اختلاف معنی‌داری را بین روش ما و روش اسپکتروفتومتری نشان داد. روش به کار رفته در این پژوهش فعالیت آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز را که به روش UV قابل اندازه‌گیری نبود، به دلیل جذب بالای فورمازان اندازه‌گیری نمود که فعالیت آنزیم تا حدود ۰/٥ میلی‌گرم پروتئین بافت بیضه به صورت خطی بود(نمودار شماره ۱). یافته‌های به دست آمده در این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان قابل مقایسه است(۲و ٤). در این مطالعه کنتیک آنزیمی آنزیم ۳ ـ بتا ـ هیدروکسی استرویید دهیدروژناز در ارتباط با زمان و غلظت سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت(نمودار شماره ۲و ۳). کنتیک آنزیمی درجه اول (سرعت اولیه) در زمان آنکوباسیون ۱۲۰ دقیقه و تا ۱۰۰ میکرومول در لیتر سوبسترا بود. رابطه بین سرعت اولیه، زمان و مقدار سوبسترا به ترتیب تا زمان ۱۲۰ دقیقه و مقدار سوبسترای ۱۰۰ میکرومول در لیتر به صورت خطی بود. روش ما برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در سایر بافتهای استروژنیک نیز قابل استفاده می‌باشد.

منابع

1- Feltus FA., Kovacs WJ., Nicholson W., Silva CM., Nagdas SK., Ducharme NA., et al. Epidermal growth factor increases cortisol production and type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogense /delta 5 delta 4 isomerase expression in human adrencortical carcinoma cells, Endocrinology, 2003,144(5):1847-1853.

2- Teichman A., Joerg H., Werner P., Brenig B., Stranzinger G., CDNA cloning and physical mapping of porcine 3 β hydroxy steroid dehydrogenase/deta 5 delta 4 isomerase, Anim Genet, 2001, 32(5):298-302.

3- Hashimoto N., Yamanaka H., Mizushima T., Noguchi K. Increased expression of 3 β hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in dorsal root ganglio neurons of adult rats following peripheral nerve injury, Neurosci Lett, 2003, 340(1):45-48.

4- Mathieu M., Mensah –Nyagan AG., Vallarino M., Do-Rego JL., Beaujean D., Vaudry D., et al. Immunohistochemical localization of 3 β hydroxy steroid dehydrogenase and 5 alpha – reductase in the brain of the african lungfish protopterus annectens, J Comp Neuro, 2001, 438(2):123-135.

5- Coirini H., Gouezou M., Liere P., Delespierre b., Pianos A., Eychenne B., et al. 3 β hydroxy steroid dehydrogenase expression in rat spinal cord, Neroscience, 2002, 113(4):883-891.

6- Stalvey JR., Inhibition of 3 β hydroxy steroid dehydrogenase isomerase in mouse adrenal cells, a direct effect of testestrone .Steroids, 2002, 67(8):721-731.

7- Goldman AS., and Sheth K. Inhibitors of human placental c19 and c21, 3β - hydroxysteroid dehydro genase, Biochimica et Biophy, 1973, 315: 233-249.

8- Nagendra RJ.,Datta M.,Bhattacharya S. Differential regulation of leydig cell 3 β hydroxy steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase activity by gonadotropin and thyroid hormone in a freshwater perch,Anabas testudineus.Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol, 1999, 124(2):165-173.

9- Yamato Y., Kimura A., Murai T., Yoshimura T., Kurosawa T., Terazawa S., et al. 3 β hydroxy delta 5–C27steroid dehydrogenase deficiency,diagnosis and treatment, J Paediatr Child Health, 2001, 37(5):516-519.

10- Armstrong DG., and wells JW. The measurment of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in ovaries of fowls. General and Comparative Endocrinology, 1976, 29: 313-318.

11- Rodway MR., Swan CL., Crelin NK., Gillio- Meina C., and Chedrese PJ. Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable procine granulosa cell line: a role for progestins, Journal of steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 68: 173-180.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-06-08]

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF 3β-HYDROXY STEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY

D. Qujeq, PhD[I]

ABSTRACT

3 beta-Hydroxy-Delta-5-steroid dehydrogenase is an important key anzyme of steroid hormone biosynthesis, which is involved in catalyzing the conversion of pregnenolone to progesterone in the biosynthesis of steroid sex hormones. This complex enzyme is the second enzyme in the steroid hormone biosynthesis pathway and it is identified as an autoantigenic target. In this study, a simple method is presented for the quantitative assay of 3β-Hydroxy steroid dehydrogenase activity in testis of rat. An excess of pregnenolone was incubated with several concentrations of whole testis homogenate. The reaction mixture containing the pregnenolone, NAD, isonitrotetrazolium in 0.15 M Tris-HCL buffer(PH=8) and the enzyme extract from testis of rat was incubated for 1.5 at 37°c. Absorbance at 495 nm was read in a spectrophotometer. The results showed that 3-β-hydroxy steroid dehydrogenase activity was linear with time and protein concentration. The present method can easily be performed and is sensitive enough to assay 3-β-hydroxy steroid dehydrogenase activity in rat testis.

Key Words: 1) 3 β-hydroxy steroid dehydrogenase 2) Rat testis 3) Spectrophotometer

This research is conducted under financial support of Babol University of Medical Sciences and Health Services(NO.13799). It is also presented in the 9th International Congress of Biochemistry in India(2002) and in the 6th Congress of Biochemistry in Tehran(2001).

I) *Associate Professor of Biochemistry. Babol University of Medical Sciences and Health Services, Babol, Iran.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-06-08]