

## بررسی فعالیت مهارکننده ریبونوکلتاز جفتی بر روی آنزیم ریبونوکلتاز\*

سودابه فلاح\*\*

دکتر بیژن فرزانی\*\*\*

### چکیده

مهارکننده ریبونوکلتاز 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 ریبونوکلتاز پانکراس گاوی با  $K_i = 2/9 \times 10^{-10}$  مولار ایجاد یک کمپلکس ۱:۱ نموده و آن را به طور غیررقابتی مهار می‌کند. *PH* مناسب برای مهارکننده برابر با  $7/6 \pm 0/1$  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 ۲۴۰-۴۰۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری افتراقی محاسبه گردید. امروزه در مراحل جداسازی اسیدهای نوکلئیک از بافتهای اختصاصی جهت محافظت آنزیم ریبونوکلتاز 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 مهارتی مهارکننده بر روی آنزیم ریبونوکلتاز زمینه‌های مناسب را جهت مطالعه مکانیسمهای کنترلی این پروتئین فراهم خواهد کرد.

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

### مقدمه

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 پروش *cDNA* مشخص گردیده است (۷).

مهارکننده ریبونوکلتاز 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

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

\*\* 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

کاتالیتیکی 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<sup>(۸)</sup>.

امروزه بررسی مستقیم اسیدهای نوکلئیک جهت کشف علت بسیاری از بیماریهای ژنتیکی و سایر تحقیقات کاربرد فراوانی در تکنولوژی‌های مهندسی ژنتیک پیدا کرده‌است<sup>(۱۲)</sup>. و در فرآیند جداسازی اسیدهای نوکلئیک از بافتهای اختصاصی و استخراج پلی‌زومها، جهت محافظت RNA از تجزیه توسط انواع ریبونوکلئازهای غیراختصاصی اضافه کردن مهارکننده ریبونوکلئاز به تیره بافتها ضروری می‌باشد<sup>(۱۳)</sup>.

### 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.

- سوپسترای ریبونوکلئاز Yeast RNA که از شرکت سیگما تهیه گردید.

- آلومین گاوی - تریس اسیدی و بازی - دی تیوتریول -

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 دی اتیل آمینواتیل سلولز

- سدیم تارتارات - معرف فولین سیوکالتی که از کارخانه

مرک آلمان تهیه گردید

- رزین سفارز فعال شده توسط سیانوژن بروماید که از

کارخانه سیگما تهیه گردید.

### دستگاهها:

- هموژنیزور

- اولتراسانتریفوژ مدل بکمن

- اسپکتروفتومتر

- ستونهای کروماتوگرافی با ابعاد  $30 \times 2/6 \text{ cm}$  و

هر ملکول مهارکننده حاوی ۷ واحد تکراری به طول ۵۷ اسید آمینه، شامل اسیدهای آمینه آسپارتیک، اسید گلوتامیک، لوسین و سیستئین می‌باشد. اسید آمینه‌های سیستئین نقش مهمی در حفظ فعالیت مهارکننده دارد بطوری که برداشته شدن یا بلوکه کردن گروههای تیول آزاد مربوط به سیستئین، مهارکننده را بطور برگشت ناپذیر غیرفعال می‌کند<sup>(۴)</sup>. اسیدهای آمینه گلوتامیک و آسپارتیک نیز نقش مهمی در مکانیسم عمل مهارکننده دارند<sup>(۱۴)</sup>.

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 RNAهای داخلی و کنترل

متابولیسم آنها و نهایتاً کنترل سنتز پروتئین<sup>(۲۳)</sup>

۲- تنظیم و کنترل میزان سنتز آنژیوژنین<sup>(۱۵)</sup>

در فرآیند دوباره سازی کبد بعد از برداشتن قسمتی از کبد و همچنین در لنفوسیت‌های تغییر شکل یافته، در مراحل سنتز اسیدهای نوکلئیک نسبت مهارکننده به آنزیم ریبونوکلئاز افزایش می‌یابد و بر عکس در بافتهایی که سنتز انواع RNAها و پروتئین کاهش یافته، این نسبت نیز کاهش می‌یابد<sup>(۱۵)</sup>.

مهارکننده از طریق تشکیل کمپلکس ۱:۱ با ریبونوکلئاز، آن را بصورت غیرقابلی مهار می‌کند بطوری که مطالعات قبلی توسط گروه پیتر بلک برن غیرقابلی بودن اثر مهارکننده را با  $Ki = 3 \times 10^{-10}$  گزارش نمودند<sup>(۶۹)</sup>.

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<sup>(۷)</sup>.

آنژیوژنین که فاکتور تشکیل دهنده 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

$10 \times 1 / 5 \text{ cm}$  که از شرکت فارماسیا تهیه گردید.

- کیسه دیالیز شماره ۴۱۰۰۰-۲۰۰۰۰ (*Mw-Cut off*) که از شرکت سیگما تهیه گردید.

- دستگاه جمع‌کننده فراکسیونهای حاصل از کروماتوگرافی

تهیه محلول پروتئینی: جفتهای نرمال مربوط به دوره کامل بارداری حداکثر ۴ ساعت پس از زایمان تهیه گردید. بعد از شستشوی آنها با بافر تریس ۲۰ میلی مولار،  $\text{PH}=7/5$ ،  $1 \text{ EDTA}$  میلی مولار، سوکروز  $0/25$  مولار و  $5 \text{ DTT}$  میلی مولار به نسبت  $1:2$  ( $\frac{W}{V}$ ) با همین بافر هموژنیزه نمودیم. در دمای  $4^\circ\text{C}$  محلول هموژنات را با دور  $16000 \text{ g}$  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  $4^\circ\text{C}$  (در حال تکان خوردن) قرار داده و به مدت نیم ساعت با دور  $16000 \text{ g}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  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  $4^\circ\text{C}$  به مدت یکساعت (در حال تکان خوردن) قرار داده، و مجدداً به مدت نیم ساعت با دور  $16000 \text{ g}$  سانتریفوژ کردیم. رسوب حاوی پروتئین مهارکننده که در دمای  $15-20$  درجه سانتی گراد برای مدت یک هفته و در دمای  $4^\circ\text{C}$  به مدت یک شب قابل نگهداری می باشد از محلول رویی جدا گردید (۱۳).

دیالیز: رسوب حاصل از سانتریفوژ را در  $100-50$  میلی لیتر بافر تریس ۲۰ میلی مولار،  $\text{PH}=7/5$ ،  $1 \text{ EDTA}$  میلی مولار  $5 \text{ DTT}$  میلی مولار حل کرده، وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت ۳۰ ساعت در دمای  $4^\circ\text{C}$  در محلولی از بافر با  $20$  برابر حجم نمونه، غوطه ور نمودیم بطوری که هر ۴ ساعت یک بار بافر تعویض شده تا ذرات اضافی از جمله سولفات آمونیم خارج گردد.

کروماتوگرافی تعویض یون: نمونه دیالیز شده به مدت یک ساعت در دمای  $4^\circ\text{C}$  با دور  $48000 \text{ g}$  سانتریفوژ شده، محلول رویی را جدا نموده و از ستون کروماتوگرافی تعویض یون منفی

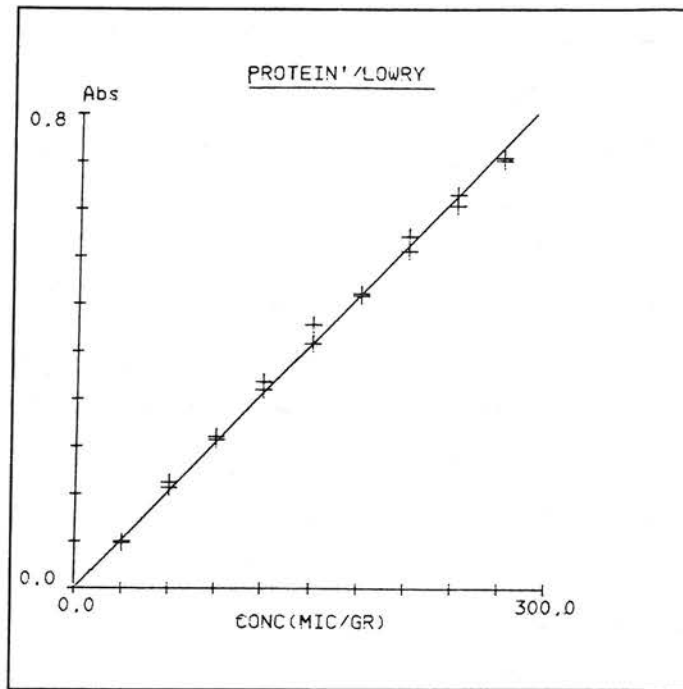
حاوی رزین دی اتیل آمینواتیل سلولز با ابعاد  $30 \times 2 / 6 \text{ cm}$  که قبلاً با بافر فوق کالیزه شده، عبور داده، بعد از جذب نمونه به رزین یکسری از پروتئینهای اضافی از طریق شستشوی ستون با بافر تریس حاوی  $0/15 \text{ NaCl}$  مولار خارج گردید. ستون حاوی نمونه را توسط  $600$  میلی لیتر از بافر فوق با گرادیان  $M$   $0/5-15 \text{ NaCl}$  شستشو داده شد و نمونه بصورت فراکسیونهای ۵ میلی لیتری جمع آوری گردید (منحنی ۲)

با توجه به منحنی ۲ حدود ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه جمع آوری شده (لوله های 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).

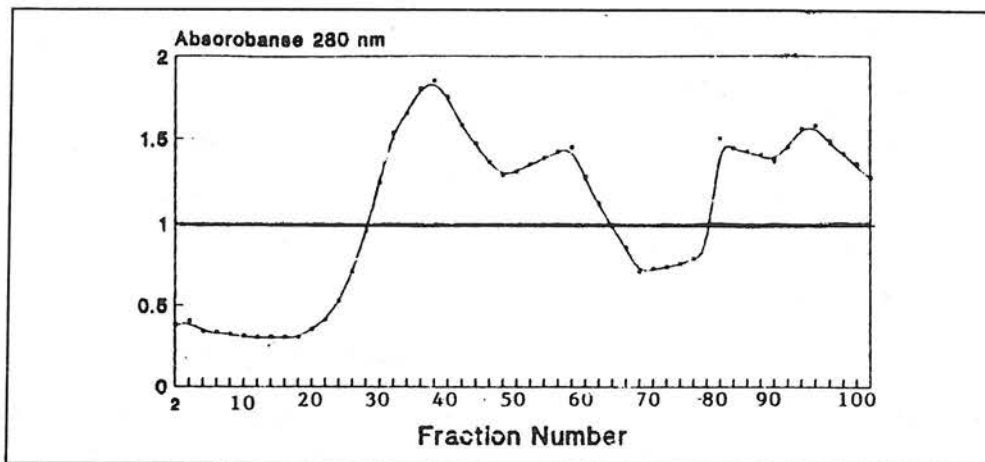
کروماتوگرافی میل ترکیبی: نمونه دیالیز شده را از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی با سفارز 48 فعال شده توسط سیانوژن پروماید که قبلاً آماده گردیده بود عبور داده تا ریبونوکلئاز مهارکننده ریبونوکلئاز جذب ریبونوکلئاز باند شده به رزین گردد.

جهت حذف یکسری پروتئینهای اضافی که نسبت به ریبونوکلئاز اختصاصی نیستند ستون را با بافر فسفات ۴۵ میلی مولار  $0/5 \text{ NaCl}$  مولار،  $1 \text{ EDTA}$  میلی مولار و  $4/6 \text{ PH}$  شستشو داده، سپس بافر استات  $20$  میلی مولار حاوی  $3 \text{ NaCl}$  مولار، گلیسرول  $15$  درصد ( $\frac{V}{V}$ )  $1 \text{ EDTA}$  میلی مولار،  $5 \text{ DTT}$  میلی مولار را از ستون عبور داده تا مهارکننده ریبونوکلئاز باند شده به ریبونوکلئاز را از ستون جدا کرده و بصورت فراکسیونهای ۱ میلی لیتری (لوله های شماره ۴۵-۳۰) جمع آوری گردید.

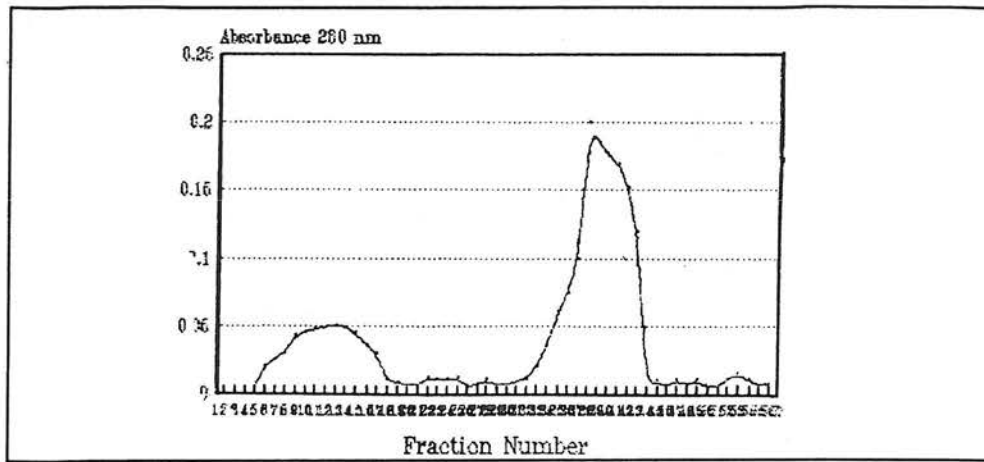
سنجش پروتئین: در کلیه مراحل استخراج و تخلیص، اندازه گیری پروتئین به روش لوری با استفاده از منحنی تغییرات جذب نوری پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی)  $1 \text{ mg}/1 \text{ ml}$  بر حسب تغییرات غلظت (حجم) پروتئین (منحنی ۱) انجام گرفت.



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



منحنی ۲: کروماتوگرافی تعویض یون



منحنی ۳: منحنی کروماتوگرافی میل ترکیبی

تغییرات جذب در دقیقه  $A =$

غلظت آنزیم  $C = mg/ml$

حجم آنزیم مورد استفاده  $v =$

حجم کورت  $V =$

سرعت واکنش = فعالیت ویژه  $V = S \cdot A =$

محلول واکنش آنزیمی حاوی  $0.2$  میلی لیتر بافرتریس،  $0.1$  میلی لیتر آلبومین سرم گاوی  $0.1$  درصد،  $10$  میکرو لیتر آنزیم را با آب مقطر به حجم نیم میلی لیتر رسانده، سپس  $0.5$  میلی لیتر سوبسترای  $2$  درصد جهت شروع واکنش اضافه نموده، به مدت  $30$  دقیقه آنکوباسیون در دمای  $37^\circ C$  انجام گرفت.

جهت ختم واکنش  $1$  میلی لیتر از محلول پرکلریک اسید - اورانسیل استات خنک را اضافه کرده، بعد از  $20$  دقیقه آنکوباسیون در یخ جهت تشکیل رسوب، محلول را با دور  $3000g$  در دمای  $4^\circ C$  به مدت  $30$  دقیقه سانتریفوژ نموده،  $0.5$  میلی لیتر از محلول رویی را جدا و توسط آب مقطر به حجم  $5$  میلی لیتر رسانده، تغییرات جذب نوری محلول حاصله در طول موج  $260$  نانومتر در مقابل شاهد قرائت گردید (منحنی ۴).

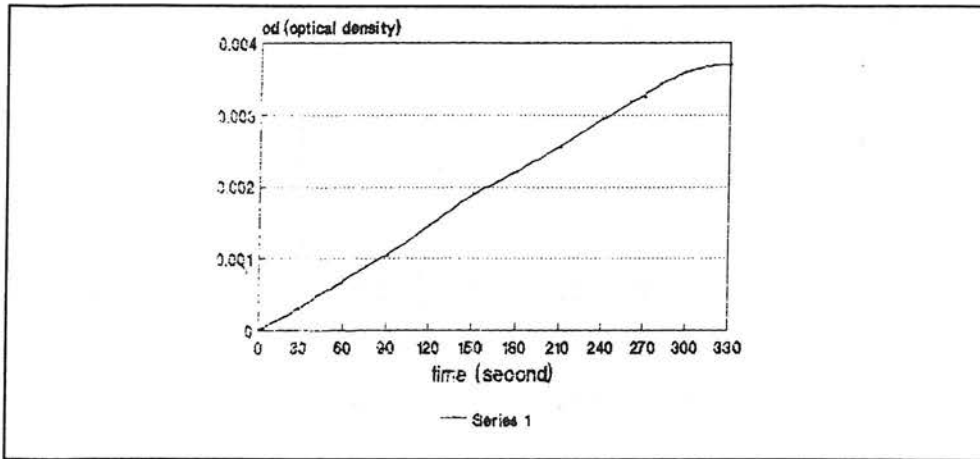
در مرحله دوم، تغییرات جذب نوری در مقاطع زمانی محلول واکنش حاوی آنزیم با غلظتهای مختلف سوبسترا از  $1 \times 10^{-2}$  -  $3 \times 10^{-2}$  میلی مولار طبق روش فوق جهت محاسبه  $Ki$  Km و  $Vmax$  قرائت گردید. (منحنی های ۵ و ۶)

اندازه گیری فعالیت ویژه آنزیم ریبونوکلتاز: فعالیت ویژه آنزیم ریبونوکلتاز بر اساس طیف جذبی محصول واکنش آنزیم با سوبسترای ریبونوکلیتیک اسید در بافرتریس  $0.5$  مولار و  $PH=7.5$  و آلبومین سرم گاوی  $0.1$  درصد اورانسیل استات / اسید پرکلریک  $0.25$  (V) در طول موج  $260$  نانومتر بر حسب زمان طبق روش آفینسن (Affinsen) مورد بررسی قرار گرفت (۷۹)، در این واکنشها غلظت آنزیم  $1 ng/\mu l$  و غلظت سوبسترا  $2g/ml$  بود. محلول شاهد از نظر محتوی کاملاً مشابه لوله تست بوده، با این تفاوت که در لوله تست بعد از اضافه کردن محلول آنزیم و سوبسترا، مخلوط به مدت  $30$  دقیقه در دمای  $37$  درجه سانتی گراد آنکوبه گردید، سپس جهت ختم واکنش  $1$  میلی لیتر محلول اسید پرکلریک اورانسیل استات خنک شده به مخلوط اضافه کرده ولی در لوله شاهد آنزیم را در مرحله آخر یعنی بعد از اضافه کردن اسید فوق الذکر، 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 ( $\Delta A$ ) سرعت واکنش (فعالیت ویژه) از رابطه زیر محاسبه گردید (منحنی ۴).

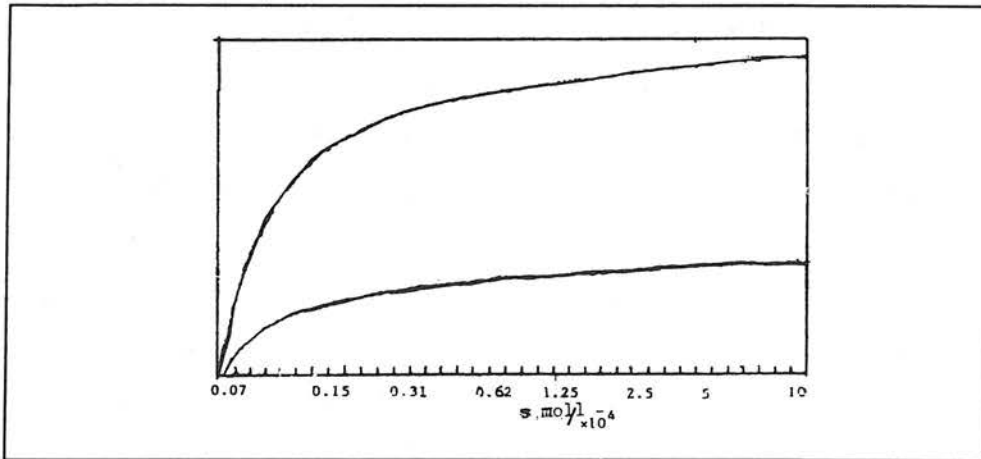
$$S \cdot A = V = \frac{A \cdot V}{E} \cdot \frac{1}{cy}$$

$$E = 1/1 \times 10^{-2} =$$

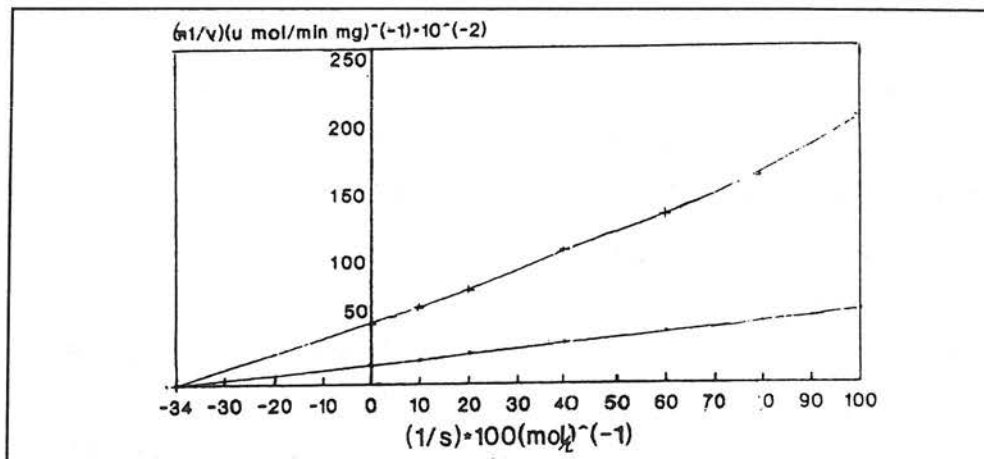
ضریب خاموشی اسید ریبونوکلیتیک  $nmol/min \text{ } mg$



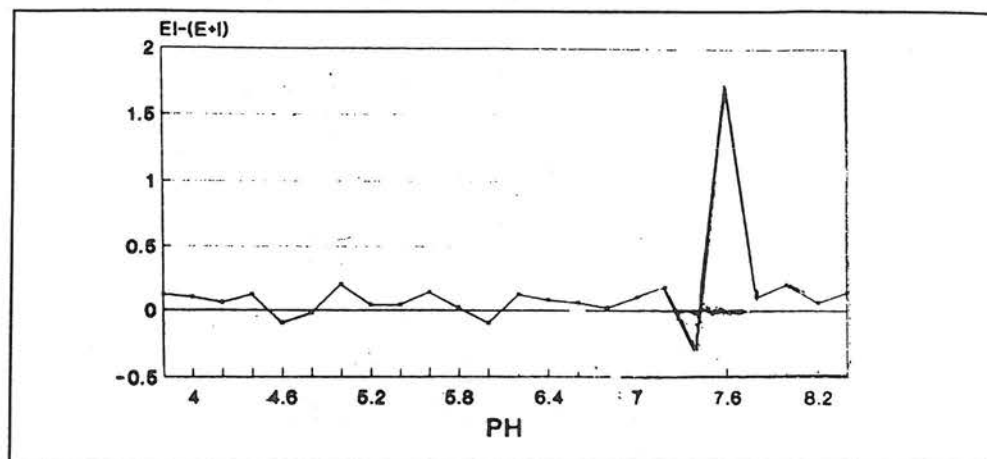
منحنی ۴: منحنی تغییرات دانسیته نوری آنزیم بر حسب زمان



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



منحنی ۶: منحنی لینووبرگ آنزیم ریبونوکلاز در حضور و بدون حضور مهارکننده



منحنی ۷: منحنی PH اپتیمم برای فعالیت مهارکننده

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 (۱۰، ۱۱، ۱۳).

جذب نوری آنزیم خالص = E

جذب نوری مهارکننده = I

جذب نوری مخلوط کمپلکس آنزیم مهارکننده = EI

### نتایج

همانطور که اشاره گردید جهت بررسی اثر مهاریه 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 فین سن (۷) با استفاده از سوبسترای اختصاصی Yeast RNA برابر  $6/8 \pm 0/38$  و در حضور مهارکننده برابر  $0/4 \pm 0/01$  تعیین گردید.

میزان Km آنزیم ریبونوکلئاز (ثابت میکائلیس و منتون) با استفاده از معادله و رسم منحنی لینو و برگ برابر  $Km = 3/05 \times 10^{-4} \pm 0/01$  مولار محاسبه گردید.

Ki یا ثابت مهارکنندگی مهارکننده طبق روش رت و شورتمن (۹) برابر  $Ki = 0/97 \times 10^{-10} \pm 0/01$  تعیین گردید.

اندازه گیری فعالیت مهارکننده و درصد مهارکنندگی: در

این مرحله جهت اندازه گیری فعالیت مهارکننده، مقدار کمیت (Ki) با استفاده از معادله  $(1 + \frac{I}{Ki}) = 45 \times 10^{-3}$  و تعریف Ki مهارکننده که عبارت است از مقدار مهارکننده ای 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 میلی لیتر سوبسترای ۲ درصد yeast RNA در حضور حجمهای ۱۰۰، ۸۵، ۴۵، ۲۵، ۱۰ و ۵ میکرولیتر از پروتئین مهارکننده خالص شده با غلظتی برابر  $1mg$  به ازای هر یک جفت انسان طبق روش رت و شورتمن اندازه گیری و محاسبه گردید (منحنی ۸) (۹).

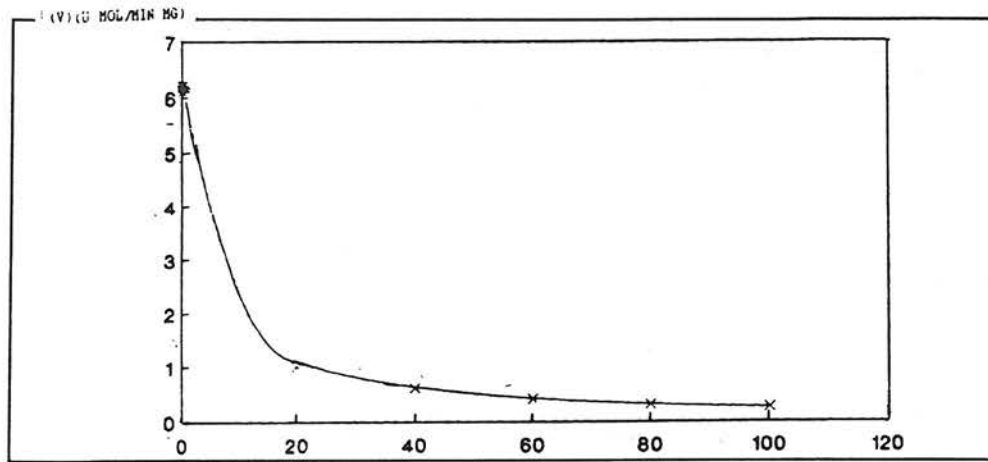
درصد مهارشوندگی: بر طبق رابطه:

$$V_{\text{کنترل}} \times 100 = \frac{V - V_0}{V} \times 100$$

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

اندازه گیری PH مناسب (اپتیمم):

جهت اندازه گیری و تعیین بهترین PH برای برهم کنش 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 اندازه گیری نموده سپس تغییرات جذب نوری (جمع جبری) EI-(E±I) در طول موجهای



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

میکائیلز و منتون و لینوورگ در شرایطی که عامل مهارکننده غیررقابتی در واکنش آنزیمی دخالت دارد به روش رت و شورتمن<sup>(۹)</sup> سنجش و برابر  $K_i = 0.97 \pm 0.01 \times 10^{-10}$  مولار تعیین گردید که در مقایسه با  $K_i = 3 \times 10^{-10}$  که توسط گروه پیتز بلک برن گزارش شده با توجه به اینکه میزان میل ترکیبی  $\frac{1}{K_i}$  (Affinity) است<sup>(۶)</sup>. می توان نتیجه گرفت اثر مهارتی 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 مهارتی مهارکننده بر روی فعالیت آنزیم برابر با  $PH = 7.6 \pm 0.1$  تعیین گردید. مطالعات کریستالوگرافی با اشعه نشان می دهد که همکنش و اتصال میان مهارکننده و آنزیم از طریق اتصال بین رزیدوهای اسیدی مهارکننده و بازی آنزیم صورت می گیرد<sup>(۳۶)</sup>. بنابراین پیشنهاد می شود که  $PH = 7.6$  نتیجه تعادل میان دو نوع PK اسیدی و بازی می باشد.

تغییرات فعالیت آنزیم منحنی ۱-۷ جهت هیدرولیز سوبسترا در حضور حجمهای مختلف مهارکننده خالص شده نشان می دهد که فعالیت ویژه آنزیم  $1 \text{ ng}/1 \mu\text{L}$  بدون حضور مهارکننده از  $0.38 \pm 0.06/18$  به  $0.4 \pm 0.01/4$   $\text{umol}/\text{mimg}$  در حضور ۱۰۰ میکرولیتر مهارکننده خالص شده کاهش یافته، بنابراین پیشنهاد می شود که حجم ۱۰۰ میکرولیتر از مهارکننده یک جفت انسان  $1 \text{ mg}/1$  یک غلظت مناسب جهت مهار فعالیت آنزیم با درصد مهارتی برابر با  $0.94/19 \pm 0.31$  می باشد.

PH مناسب (*Optimum PH*) به روش *Difference Spectrophotometry* با اثر مهارتی برابر  $94/19 \pm 0.31$  درصد مهارکننده به روی آنزیم ریبونوکلئاز برابر  $PH = 7.6 \pm 0.1$  تعیین گردید.

میزان غلظت پروتئین مهارکننده خالص شده بروش لوری اندازه گیری و با استفاده از منحنی تغییرات جذب نوری پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی) بر حسب تغییرات غلظت آن برابر با  $1 \text{ mg}/15 \text{ ml}$  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 بیوستتزی به وفور یافت می شود<sup>(۲)</sup>.

همانطور که در بخش مواد و روشها بیان شد، این مهارکننده فعالیت آنزیم را از طریق تشکیل کمپلکس ۱:۱ با آن، مهار می کند<sup>(۱۴)</sup>.

میزان  $K_m$  آنزیم جهت هیدرولیز سوبسترای اختصاصی *Yeast RNA* در حضور مهارکننده معادل با  $K_m$  آنزیم در غیاب مهارکننده با شرایط یکسان و برابر  $K_m = 3 \pm 0.01 \times 10^{-2}$  مولار تعیین گردید. بنابراین با استناد به این نتیجه می توان غیررقابتی بودن مهارکننده را جهت مهار آنزیم نتیجه گرفت. مقدار  $K_i$  ثابت مهارکنندگی مهارکننده در فرمول کلی

## REFERENCES

- 1) Andrzej, Bierzynski and Robert L.; Detection of RNAase inhibitor from different species and organs; *J. Mol. Biol.* 1982, V. 162(1) PP: 187-201
- 2) Andrzej, 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.interform. Res.* (982-1214): PP: 443-9
- 7) Frank S.lee Robert shapiro 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 iphibitor compelex from liver Rabbit *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 Biologial chemistry* V.245.No 24,PP: 6726-70
- 12) Purification, characterization and development of radiomunoassay 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 Błackburn, 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

---

## 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 electrophoresis 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 ( $K_i = 2.9 \cdot 10^{-10}$ ). Optimal PH for such inhibition is found to be  $7.6 \pm 0.1$*

*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**

---

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

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