عزل وتنقية انزيم اريل استيريز من مصل دم الاصحاء
الجزء الثاني

رنا فاضل جاسم
قسم الكيمياء
كلية التربية للبنات
جامعة الموصل

ذكرى علي علوش
قسم الكيمياء
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2007/6/11، تاريخ القبول 2007/12/31)

الملخص

تضمن البحث عزل وتنقية إنزيم اريل استيريز من مصل دم شخص سليم وتقدير وزنه الجزيئي باستخدام تقنيتي الترشيح الهلامي (باستخدام Sephadex G–75) والهجرة الكهربائية (باستخدام SDS) اذ لوحظ ان الحزمة البروتينية الاولى المفصولة من محلول كبريتات الامونيوم بتشبع (25-50%) لمصل الدم باستخدام تقنيتي الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية هو (48123 دالتون) و(49185 دالتون) على التوالي وان الحزمة البروتينية الثانية المفصولة من مصل الدم بتقنية الترشيح الهلامي لها وزن جزيئي (47305 دالتون) وللحزمة البروتينية الاولى المفصولة من HDL مصل الدم هو (49907 دالتون).

كما درست الظروف المثلى لعمل انزيم اريل استيريز للحزمتين المفصولتين من HDL مصل الدم ومحلول كبريتات الامونيوم لمصل الدم فوجد ان لهما زمن تفاعل امثل عند الدقيقة (12) و(10) واس هيدروجيني امثل عند (7.2) و (7.6) ودرجة حرارة مثلى (30 C°) و (25 C°) والتركيز الامثل لمادة الاساس (4mM) و (4.5 mM) وقيمة السرعة القصوى V_{max} (243.9 U/ml) و (238.1 U/ml) وقيمة ثابت ميكيلس K_m (3.07 mM) و (3.26 mM) على التوالي.

Isolation and Purification of Arylesterase From Normal Blood Serum(Part II)

Rana F. Jasim
Department of Chemistry
College of Education of Girl
Mosul University

Thikra A. Allwsh
Department of Chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The research included isolation and purification of arylesterase from normal blood serum.The molecular weight of the partially purified enzyme was determined by gel filtration using (Sephadex G–75) and SDS electrophoersis techniques**.** It was found that the first proteinous peak separated from ammonium sulfate saturation of serum with (25 –50%) using gel filtration and SDS electrophoresis techniques had apparent molecular weight of (48123 d) and (49185d) respectively.The second proteinous peak separated from serum by gel filtration technique had apparent molecular weight (47305 d).On the other hand, the first proteinous peak separated from HDL serum had a molecular weight (49907 d).

The optimum conditions of arylesterase for the two peaks separated from HDL and ammonium sulfate precipitaion solution showed an optimum reaction incubation time at (12),(10) minutes, an optimum pH at(7.2),(7.6), an optimum temperature(30 C°), (25 C°) and optimum substrate concentration (4 mM), (4.5 mM) and V_{max} value (243.9U/ml), (238.1 U/ml) and K_m value (3.07 mM), (3.26 mM) respectively.

المقدمة

يرتبط أنزيم اريل استيريز باحكام بـ High density lipoprotein (HDL) وهو الناقل الرئيسي للأنزيم في الدورة الدموية اذ ترتبط نهايته الطرفية (–N) الكارهة للماء بالدهون المفسفرة في HDL ويعد هذا الارتباط مهما للتوزيع الفسلجي الملائم لأنزيم اريل استيريز اذ يعتقـد ان الأنـزيم يغـادر الغشـاء البلازمي للخلايا الكبدية منتقلا مع HDL حتى يصل الى مواقع تحطم الدهون ليمنع بيروكسدتها ويحلـل الدهون المؤكسدة (Kudchodkar et al., 2000; Valabhji et al., 2001).

كما بين البـاحثون (Gan et al., 1991 ; Brushia et al., 2001 ; Gouedard et al., 2003) ان الأنزيم هو بروتين سكري Glycoprotein مكون من (354) حامضاً أمينياً في حين ذكر الباحث Ozols (1999) انه بولي ببتيد مكون من (350) حامضاً أمينياً . لـلانزيم وزن جزيئـي يختـلف بـاختلاف الكائن والنسيـج ونوع التغذية وقد بين الباحثـان Aviram و Davies (2004) ان التركيـب البلـوري للأنزيم يكون بشكل مروحة ذات ست ريش مع موقع فعال مهم للارتباط مع HDL، ويحتوى الانزيم على مجموعة Sulfhydryl (–SH) حرة واحدة فقط عند الحامض الاميني سستين (Cysteine) فـي الموقـع

(284) وهي ضرورية لعمله في حماية البروتينات الدهنية من بيروكسيدات الدهون فقد وجد ان استبدال السستين بالالانين او السيرين يجعله غير قادر على حماية LDL من الأكسدة والتأثير على محتوى بيروكسيدات الدهون (Aviram et al., 2000; Tomas et al., 2000) ويحوي أنزيم اريل استيريز على موقعي ارتباط مميزين مع Ca^{+2} يحافظ على استقرارية الأنزيم وفعاليته والأخرضروري لتحفيز الأنزيم إذ يعمل Ca^{+2} محفزاً اليكتروفيلياً للانزيم (Billecke et al., 2000). كما يمتلك أنزيم اريل استيريز في مصل الإنسان اثنين من المتناظرات الانزيمية Isoenzyme ذات اهمية خاصة لاختلافها في حامض أميني واحد فقط فالاول يختلف في الحامض الاميني في الموقع (192) (كلوتامين وارجنين (R , Q) على التوالي) ويدعى متناظر الأنزيم (A) والذي تعزى إليه الاختلافات النوعية الملحوظة بين الانزيمين أما الثاني فيختلف في الحامض الاميني في الموقع (55) (ليوسين وميثيونين (M , L) على التوالي) ويدعى متناظر الأنزيم (B) والذي تعزى إليه الاختلافات الكمية في تركيز الانزيم (La Du et al., 1993 ; Sen – Banerjee et al., 2000).

ونظرا لعدم وجود دراسة سابقة في العراق حول عزل الانزيم لهذا فان هدف البحث عزل انزيم اريل استيريز من مصل الدم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وتقدير وزنه الجزيئي بتقنيتي الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية.

المواد وطرائق العمل

تحضير مصل الدم:

اخذ (300 ml) من الدم من متبرع سليم بعمر 23 سنة وبمساعدة مركز نقل الدم وقدر البروتين في مصل الدم بطريقة لاوري كما قدرت فعالية أنزيم اريل استيريز فيه.

عزل البروتين الدهني ذي الكثافة العالية للكولسترول:

استخدمت طريقة (Crepaldi et al., 1978) لعزل HDL عن باقي البروتينات الدهنية وهي طريقة ترسيبية يتم فيها ترسيب الكيلومايكرونات، VLDL، IDL و LDL بواسطة ايون موجب ثنائي الشحنة (Mg^{++}) وفوسفوتنكستات الصوديوم حيث يبقى HDL في الراشح بعد إجراء الطرد المركزي.

ترسيب وفصل البروتين باستخدام كبريتات الامونيوم:

استخدمت طريقة الباحثين Dioxin و Weeb (1961) لترسيب البروتين من المصل باضافة كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة وبتشبع (0-75%) وبصورة تدريجية ثم قدرت كمية البروتين وفعالية الأنزيم في محاليل الرواسب البروتينية.

الفرز الغشائي:

استخدمت طريقة الباحث Plummer (1978) للفرز الغشائي اذ وضع (9.5 ml) من المحلول المائي للراسب البروتيني المستحصل من الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (25–50%) في كيس الفرز الغشائي وغمر الكيس في محلول (2.5 L) من بيكاربونات الامونيوم (0.1 M) وبعد الانتهاء حسب الحجم النهائي للمحلول الناتج وقدرت كمية البروتين وفعالية الأنزيم في المحلول الناتج.

تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

استخدمت هذه التقنية لعزل الانزيم وتقدير وزنه الجزيئي التقريبي (Andrews, 1965).

1 . تعبئة العمود:

استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (100 x 2cm) والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G–75) وتم وضع مادة الهلام على ارتفاع (95cm).

2 . المحاليل المستخدمة:

A . مصل الدم (Serum) (7 ml).

B . HDL مصل الدم (بعد ترسيب البروتينات الدهنية الأخرى)(8 ml).

C . المحلول المائي للراسب البروتيني المستحصل من الترسيب بكبريتات الأمونيوم بتشبع (25–50%) (بعد اجراء فرزغشائي) (9.6 ml).

3 . اضافة النماذج:

مررت المحاليل المذكورة على عمود الفصل باستخدام (2ml) من النموذج واستردت المواد البروتينية بمعدل جريان (52.5ml/h) وبمعدل (4min) لكل جزء من جامع الأجزاء مع متابعة المحتوى البروتيني بقراءة الامتصاصية عند (280nm) كما قيست فعالية الأنزيم في الاجزاء المفصولة ثم جمعت الأجزاء البروتينية التي تمثل كل حزمة على حدة.

تقنية التجفيف بواسطة التجميد:

جففت الحزم البروتينية الناتجة من عملية الترشيح الهلامي باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) للحصول عليها بشكل مسحوق جاف وحفظت بدرجة(°20C–).

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم اريل استيريز:

تم دراسة تاثير العوامل التالية على فعالية الأنزيم لتحديد الظروف المثلى لعمل الأنزيم وتتضمن :

تركيز الأنزيم، زمن التفاعل ، الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم (Tris–HCl)، درجـة حـرارة التفاعل وتركيز مادة الأساس. كما تم دراسة تأثير الخزن فـي درجـات الحـرارة (°C 4–) و (°C 4) (°C 35–30) على فعالية الأنزيم في مصل الدم و الأنزيم المنقى جزئيا من مصل الدم.

تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام SDS:

استخدمت تقنية الهجرة الكهربائية بوجود SDS لفصل الجزيئات المشحونة عند تعرضـها لمجـال كهربائي حسب طريقة الباحث Laemmli (1970).

تقدير كمية البروتين بطريقة العالم لاوري:

استخدمت طريقة لاوري واخرون (1951) والمحورة من قبل العـالمين Schacterle و Pollack (1973) لتقدير الكميات الدقيقة من البروتين.

تقدير فعالية إنزيم اريل استيريز:

قدرت فعالية الانزيم حسب طريقة الباحث Tomas واخرون (2000) إذ يعمل الأنزيم على تحليـل مادة فنيل اسيتيت الى فينول وحامض الخليك كما في المعادلة:

$$\text{Phenyl acetate} + H_2O \xrightarrow{\text{Arylesterase}} \text{Phenol} + \text{Acetic acid}$$

اذ قيست الامتصاصية عند طول موجي قدره (270 nm) لمادة الفينول الناتجـة وقـدرت الفعاليـة (Al-Robaiey,2006) .

الوحدة الانزيمية (U): كمية الانزيم التي تكون مايكرومول واحد من المادة الناتجة (Phenol) في الدقيقـة الواحدة.

الكشوفات التي اجريت على الحزم البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي:

1 . كشف مولش:

استخدم الكشف لمعرفة ما اذا كانت المادة البروتينية تحتوي على جزيئات سكرية متصلة بها مـن نوع (Glycoprotein) (Plummer, 1978).

2 . الكشف عن الكوليسترول:

تم الكشف عن الكولسترول اعتمادا على طريقة الباحث Richmond (1973).

3 . الكشف عن HDL:

استخدمت طريق الباحث Kostner (1976) للكشف عن HDL.

4 . الكشف عن الدهون الكلية:

تم الكشف عنها باستخدام طريقة الباحثين Chabrol و Chardonnet (1937).

النتائج والمناقشة

بعد قياس فعالية انزيم اريل استيريز في محاليل الرواسب البروتينية الناتجة من الترسيب باستخدام كبريتات الامونيوم وجد ان تشبع (25-50%) اعطى اعلى فعالية للانزيم مقارنة بتشبع (0-25%) و (50-75%) فاستخدم في عمليات التنقية اللاحقة. وكما مبين في الجدول (1)، وهذا يتفق مع ما وجده الباحث Pond واخرون (1998).

الجدول 1: تأثير الترسيب بكبريتات الامونيوم على فعالية انزيم اريل استيريز.

الترسيب بكبريتات الامونيوم	الحجم ml	البروتين الكلي mg	الفعالية* الكلية U**	الفعالية النوعية (U/mg)***
تشبع 0-25%	5.5	538.23	373.1	0.693
تشبع 25-50%	9.5	952.67	1029.6	1.08
تشبع 50-75%	13	102.01	915.7	0.83

* الفعالية : عدد وحدات الانزيم الموجود في مليلتر من المحلول البروتيني.

** الوحدة الانزيمية (U) : كمية الانزيم التي تعمل على تكوين مايكرومول واحد من المادة الناتجة (Phenol) في الدقيقة الواحدة.

*** الفعالية النوعية للانزيم : مايكرومول من المادة الناتجة (Phenol) لكل دقيقة لكل ملغرام بروتين.

تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

تم فصل انزيم اريل استيريز باستخدام هذه التقنية من مصل الدم ومن HDL مصل الدم ومن محلول الراسب البروتيني المستحصل من الترسيب بكبريتات الامونيوم. وعند فصل المركبات البروتينية لمصل الدم ظهرت ثلاث حزم بروتينية وكما مبين في الشكل (1). وكانت حجوم روغانها كما يأتي:

الحزمة (A) = 100.7 ml ،الحزمة (B) = 154.4 ml، الحزمة (C) = 289.7 ml

اذ تبين ان الحزمة البروتينية الثانية (B) لديها اعلى فعالية نوعية مقارنة بالحزمة (A) فعدت الحزمة الثانية (B) الحزمة الفعالة الرئيسية والممثلة لانزيم اريل استيريز في الدراسات اللاحقة في هذا البحث. وخلاصة نتائج مراحل تنقية الانزيم من مصل الدم مدرجة في الجدول (2) اذ بينت النتائج المذكورة ان عدد مرات التنقية للانزيم (الحزمة B) بعد عملية الترشيح الهلامي ازدادت بمقدار (2.2 مرة)عن مصل الدم.

وبين الشكل (2) ان HDL مصل الدم له ثلاث حزم بروتينية و لها حجوم روغان:

الحزمة (D) = 143.3 ml، الحزمة (E) = 167.4 ml، الحزمة (F) = 276.8 ml ، اذ تبين ان الحزمتين البروتينيتين (D , E) تمتلكان فعاليات متباينة لانزيم اريل استيريز والحزمة البروتينية (D) تمتلك اعلى فعالية نوعية مقارنة بالحزمة البروتينية (E). فعدت الحزمة البروتينية (D) الحزمة البروتينية الفعالة الرئيسية والممثلة لانزيم اريل استيريز في الدراسات اللاحقة في هذا البحث.

وخلاصة نتائج مراحل تنقية الانزيم من HDL مصل الدم مدرجة في الجدول (2) حيث بينت النتـائج ان عدد مرات تنقية الانزيم الحزمة (D) ازدادت بمقدار (3.1 مرة) عن مصل الدم. بينما بين الشكل (3) ان المحلول البروتيني لراسب كبريتات الامونيوم بتشبع (25-50%) والناتج من عملية الفرز الغشـائي لـه حزمتان بروتينيتان، وهذا يتفق مع ما وجده الباحث Pond واخـرون (1998) حيـث لاحظـوا ظهـور حزمتين بروتينيتين بعد فصل المتجانس الخام لكبد الفأر باستخدام تقنية الترشيح الهلامي.

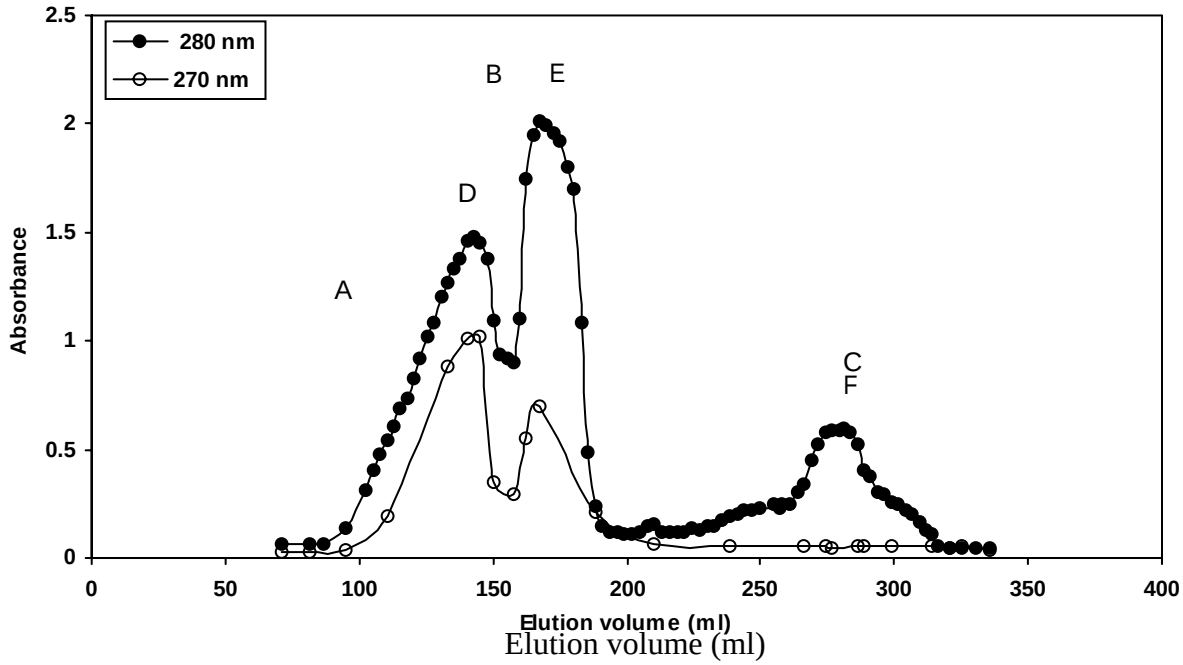
وان حجوم روغان القمم كما يأتي:

الحزمة (G) كانت بحجم (144.1 ml) والحزمة (H) كانت بحجم (261.1 ml).

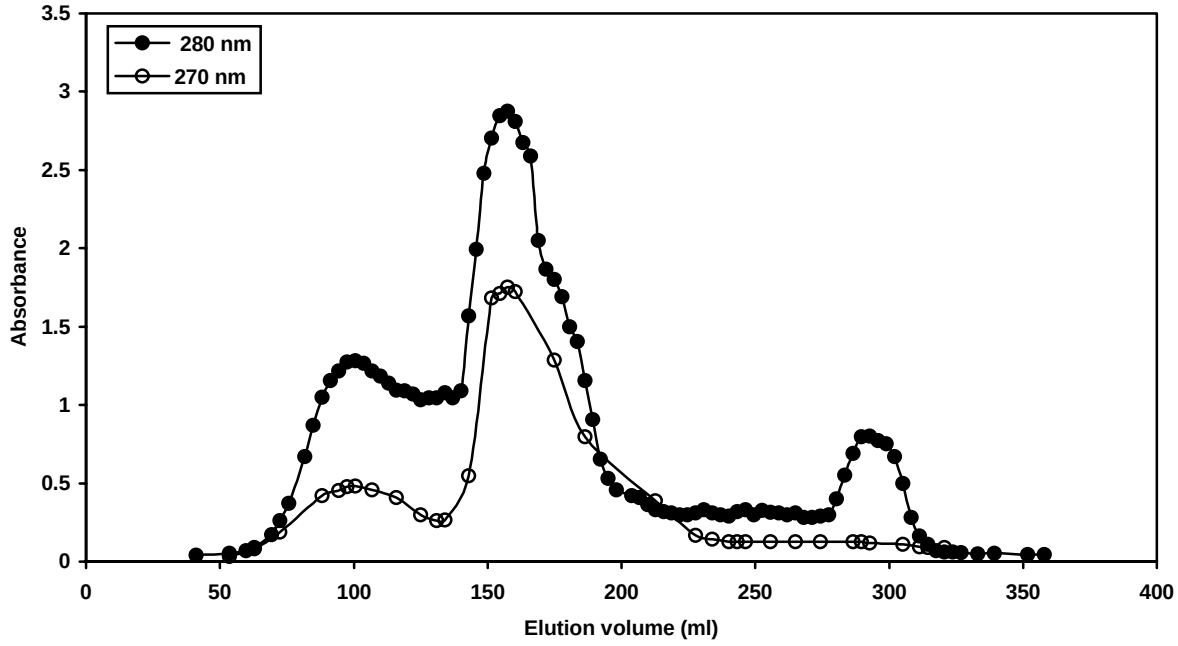
ومن خلال متابعة فعالية الانزيم تبين ان الحزمتين البروتينيتن (G, H) تمتلكان فعالية متباينة لانزيم اريل استيريز حيث ان الحزمة البروتينية (G) تمتلك اعلى فعالية نوعية مقارنة بالحزمة الثانية (H) فعدت الحزمة (G) الحزمة الفعالة الرئيسية والممثلة للانزيم في الدراسات اللاحقة وقد بينت النتائج المـذكورة في الجدول (2) ان عدد مرات تنقية الانزيم (الحزمة G) بعد عملية الترشـيح الهلامـي ازدادت بمقـدار (3.08 مرة) عن مصل الدم.

الجدول 2: مراحل تنقية انزيم اريل استيريز.

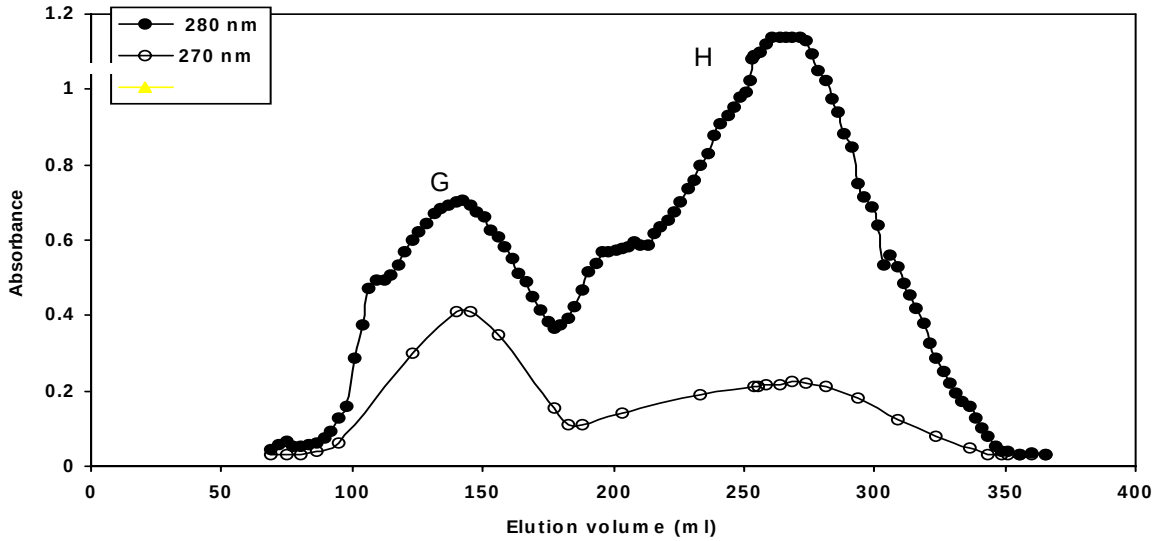
مراحل التنقية			الحجم ml	البروتين الكلي mg	الفعالية الكلية U	الفعالية النوعية U/mg	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
مصل الدم	مصل الدم		7	632.1	785.4	1.242	100	1.0
	الترشيح الهلامي	الحزمة الثانية B	214.7	214.7	589.7	2.74	75.08	2.2
HDL مصل الدم	مصل الدم		10	903	1122.0	1.242	100	1.0
	راشح HDL		8	660.6	869.3	1.315	77.4	1.0
	الترشيح الهلامي	الحزمة الاولى D	188	192.7	746.3	3.87	66.5	3.1
محلول البروتين المترسب بكبريتات الامونيوم	مصل الدم		25	2257.5	2805.1	1.242	100	1.0
	الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (25-50%)		9.5	816.05	1029.6	1.26	36.7	1.0
	الفرز الغشائي		9.6	674.5	955.2	1.41	34.05	1.1
	الترشيح الهلامي	الحزمة الاولى G	177	126.3	483.2	3.82	17.22	3



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان مصل الدم بتقنيـة الترشـيح الهلامـي حيـث ان (A, B, C) الحـزم البروتينية.



الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان HDL مصل الدم بتقنية الترشيح الهلامي حيث ان (D, E, F) الحزم البروتينية



الشكل 3: المظهر الجانبي لروغان محلول الراسب البروتيني الناتج من الترسيب بكبريتات الامونيوم بتشبع (25-50%) بتقنية الترشيح الهلامي حيث ان (G, H) الحزم البروتينية.

تقدير الوزن الجزيئي لانزيم اريل استيريز:

1. تقدير الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي:

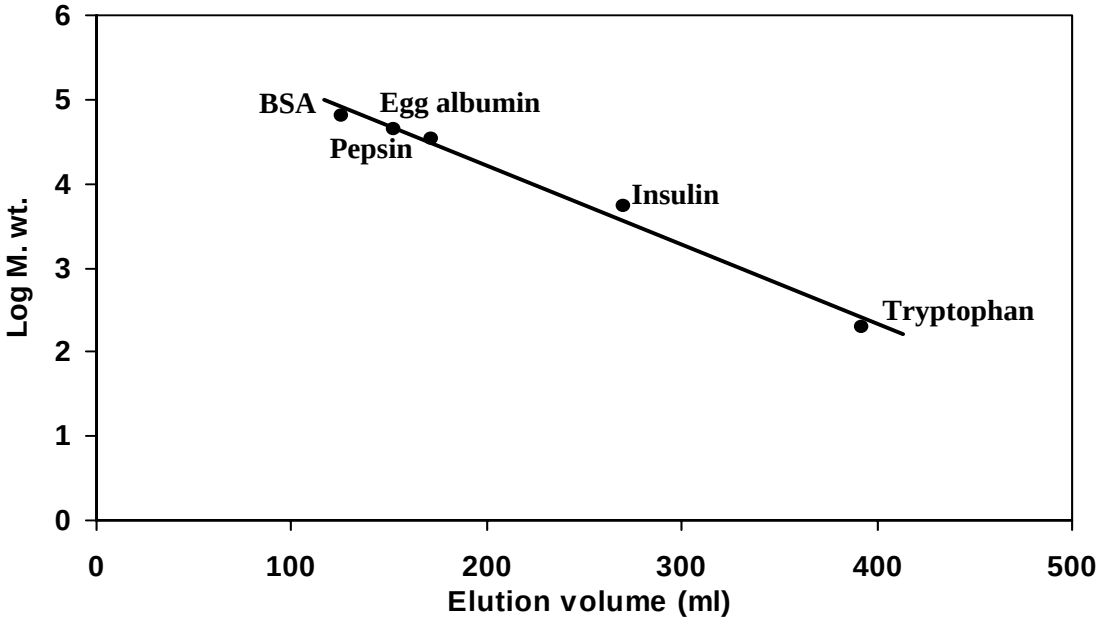
تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم اريل استيريز من الحزم البروتينية الحاوية على اعلى فعالية للانزيم (G, D, B) اذ استخدم نفس عمود الفصل وامررت مركبات معلومة الوزن الجزيئي تراوحت اوزانها الجزيئية بين (204-2000000 دالتون) لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (Internal volume, Vi) والحجم الخالي او الفارغ من الحبيبات (Void volume, Vo) وكما مبين في الجدول (3).

الجدول 3: الاوزان الجزيئية وحجوم روغان المواد المستعملة.

المادة	الوزن الجزيئي(دالتون)	حجم الروغان (ml)
الدكستران الأزرق Blue dextran	2000000	85.5
البومين مصل البقر BSA	67000	118.5
البومين البيض Egg albumin	45000	151.5
انزيم الببسين pepsin enzyme	36000	170.8
الانسولين Insulin	5750	270.3
التربتوفان Tryptophan	204	390.7

والشكل (4) يبين حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئـي اذ تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للحزم البروتينية فبعد امرارها على عمود الفصل وجد ان حجم الروغان لهذه الحزم كما يأتي:

الحزمة (B) = 149.3ml، الحزمة (D) = 146.8ml، الحزمة (G) = 148.5ml.

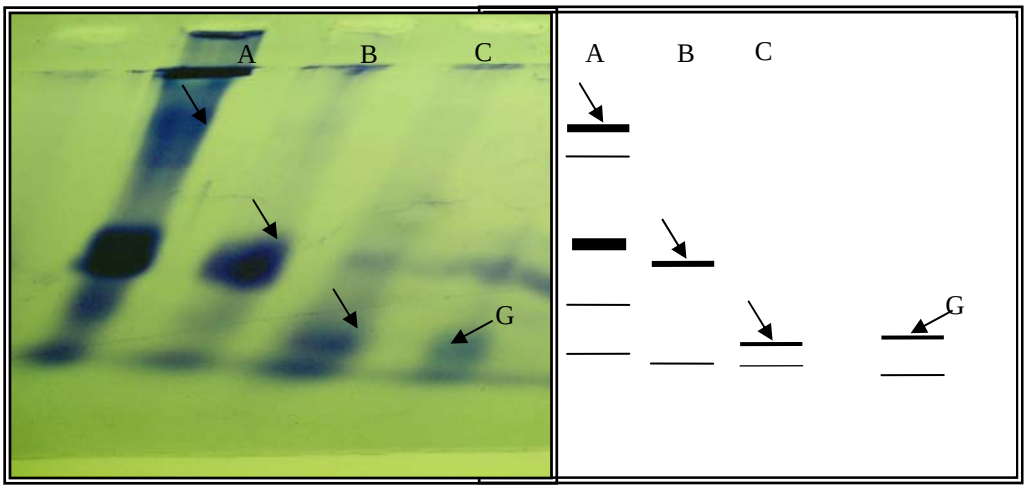


الشكل 4: المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي.

وتبين من المنحني القياسي ان الوزن الجزيئي التقريبـي لانـزيم اريـل اسـتيريز (الحزمـة B) (47305 دالتون) و(الحزمة D) (49907 دالتون) و(الحزمة G) (48123 دالتون).

2 . تقدير الوزن الجزيئي بتقنية الهجرة الكهربائية الحاوية على SDS:

قدر الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية (G) التي اعطت اعلى فعالية نوعية لانزيم اريـل استيريز باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية بوجود SDS بامرار مواد معلومة الوزن الجزيئـي تراوحـت اوزانها الجزيئية بين(58000- 186000 دالتون) فضلا عن الحزمة (G) وكان التيار المستخدم 50 ملي امبير والزمن المستغرق 10 ساعات وكما موضح في الشكل (5):



الشكل 5: صور الهجرة الكهربائية الحاوية على SDS

المواد القياسية : (A) انزيم كلوكوز اوكسديز، (B) البومين مصل البقر BSA، (C) انزيم الفـا–اميليـز، (G) تمثل الحزمة البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي.

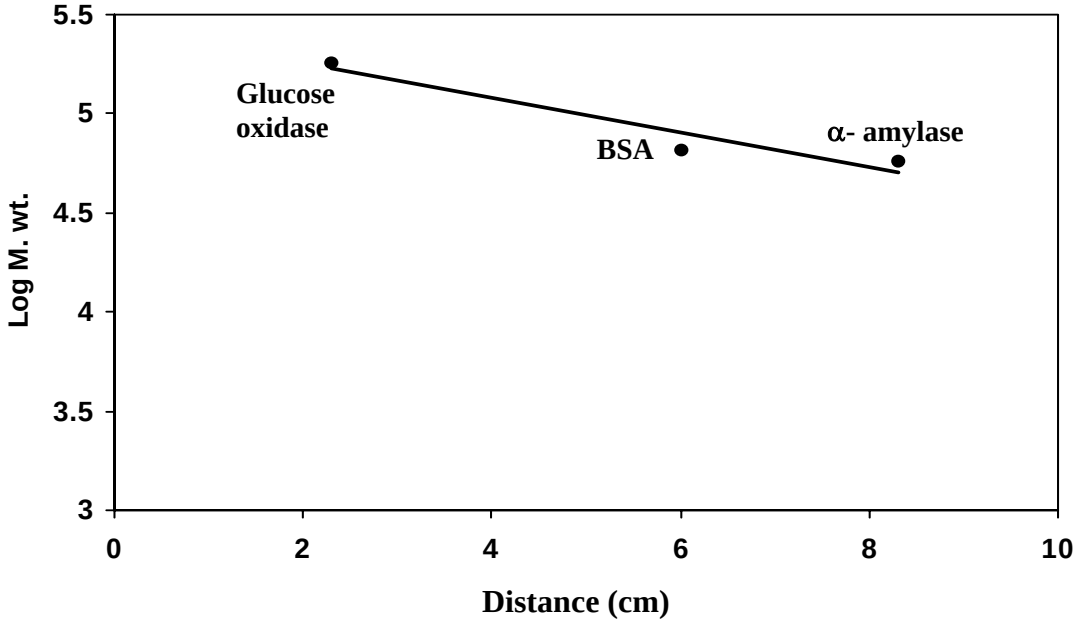
ويبين الجدول (4) المسافات التي قطعتها المواد البروتينية واوزانها الجزيئية وعند رسـم المسـافة المقطوعـة لكـل مـادة مقابـل لوغـاريتم وزنهـا الجزيئـي تبـين ظهـور خـط مسـتقيم حـدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة (G) اذ كانت المسافة التي قطعتها الحزمة (G) هي(7.9cm) وكما موضح في الشكل (5).

الجدول 4: الاوزن الجزيئية والمسافات المقطوعة للمواد المستخدمة.

المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	المسافة المقطوعة (cm)
انزيم كلوكوز اوكسديز Glucose oxidase	186000	2.3
البومين مصل البقر BSA	67000	6
انزيم الفا- اميليز α–Amylase	58000	8.3

وتشير النتائج من المنحني القياسي في الشكل (6) ان الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم اريل استيريز (الحزمة G) يساوي (49185 دالتون). ويتضح من خلال نتائج فصل إنزيم اريـل اسـتيريز ان الـوزن الجزيئي التقريبي للانزيم باستخدام تقنيتي الترشـيح الهلامـي والهجـرة الكهربائيـة (48123 دالتـون)

و(49185 دالتون) وهو يقع ضمن المدى الذي بينه الباحثون (Gan et al., 1991 ; Pond et al., 1998 ; Kujiraoka et al., 2000) . وهو (43000–49000 دالتون) ومقارب للمدى الذي بينه الباحثون (Elosua et al., 2002 ; Vincent–Viry et al., 2003) وهو (43000–45000 دالتون)



الشكل 6: المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية SDS- PAGE.

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية انزيم اريل استيريز:

تم دراسة العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم وايجاد الظروف المثلى التي يعمل بها هذا الانزيم وتبين ان الظروف المثلى لفعالية انزيم اريل استيريز المنقى جزئياً من HDL مصل الدم (الحزمة D) ومن محلول راسب كبريتات الامونيوم (الحزمة G) (Al-Robaiey, 2006) وكما في الجدول (5). وباستخدام رسم لاينويفر-برك وجد ان قيمة السرعة القصوى V_{max} للحزمتين المفصولتين من HDL مصل الدم والمحلول المائي للراسب المستحصل من الترسيب بكبريتات الامونيوم هو(243.9 U/ml) و (238.1 U/ml) على التوالي وقيمة ثابت ميكيلس-منتن K_m هو (3.07 mM) و (3.26 mM) على التوالي (Al-Robaiey,2006).

تاثير الخزن على فعالية انزيم اريل استيريز:

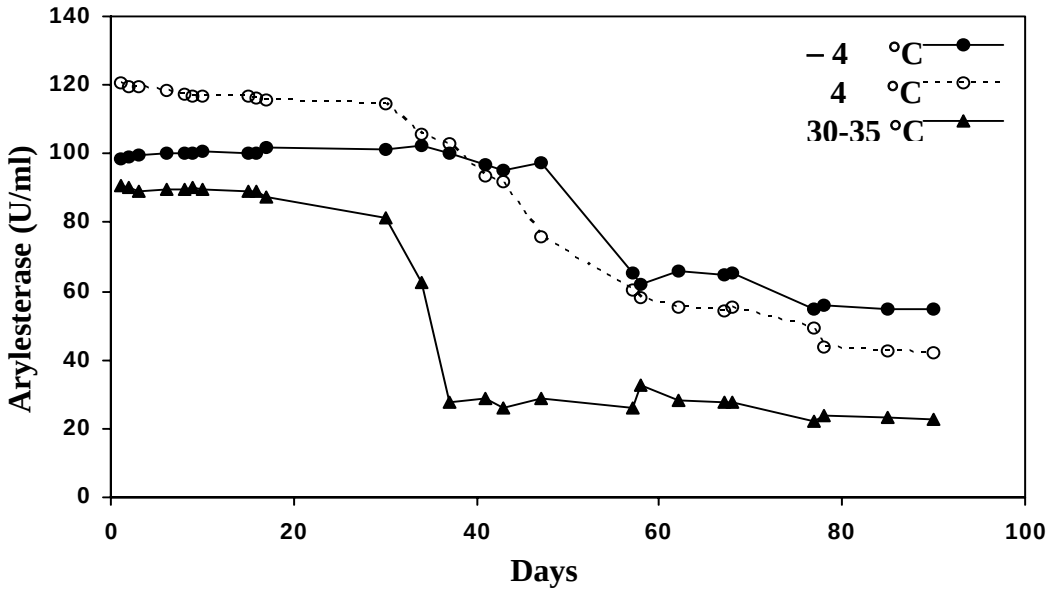
تمت دراسة تاثير الخزن على فعالية انزيم اريل استيريز في مصل الدم وفعالية الانزيم المنقى جزئيا من HDL مصل الدم (الحزمة D) ومن محلول راسب كبريتات الامونيوم (الحزمة G) عند درجة حرارة (30–35C°) و (4C°) و(4C°–) بقياس فعالية الانزيم عند فترات متعاقبة وكما الشكل (7).

اذ يلحظ من الشكل (7) ان انزيم اريل استيريز المنقى من HDL مصل الدم ومن محلول راسـب كبريتات الامونيوم تنخفض نسبة فعاليته بصورة تدريجية خلال شهر من خزنه بدرجات الحرارة (°4C–) و (°4C) و(°30–35C) وبعد مرور شهر تقريبا بقي الانزيم محتفظا بفعاليته في مصل الدم في درجـات الحرارة المـذكورة وبعـد ثلاثـة اشـهر انخفضـت فعاليـة الانـزيم وهـذا يتفـق مـع مـا ذكـره McElveen واخرون (1986).

الجدول 5: الظروف المثلى لقياس فعالية انزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من HDL مصل الدم والمحلول البروتيني للراسب المستحصل من الترسيب بكبريتات الامونيوم.

اريل استيريز	تركيز الانزيم µg/ ml	زمن التفاعل Min	pH المحلول المنظ (Tris–HCl) (9 mM)	درجة الحرارة C°	تركيز مادة الاساس mM	حجم المحلول ml
الحزمة (D)	9	12	7.2	30	4	2
الحزمة (G)	9	10	7.6	25	4.5	2

وقد كان تاثير تركيز الانزيم على سرعة التفاعل الانزيمي خطيا الى حد 10 مايكروغرام/مل



الشكل 7: تأثير فترات الخزن على فعالية انزيم اريل استيريز في مصل الدم.

الكشوفات التي اجريت على الحزم البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي:

1. كشف مولش:

لم يلحظ تكون حلقة بنفسجية مما يشير الى عدم وجود جزيئات سكرية متصلة بالانزيم بمعنى انـه ليس كلايكوبروتين وهذا يتفق مع ما ذكره العالم Ozols (1999) ان انزيم اريل استيريز بولي ببتيد فقط.

2. الكشف عن الكولسترول:

لم يلحظ من الكشف وجود الكولسترول وهذا يتفق مع ما ذكره Ozols (1999).

3. الكشف عن HDL:

لم يعطي الكشف دليلا على وجودHDL مما يشير الى انفصال HDL عن الانزيم خلال الترشـيح الهلامي.

4. الكشف عن الدهون الكلية:

لم يلحظ من الكشف وجود الدهون الكلية وهذا يتفق مع ما ذكره Ozols (1999).

REFERENCES

Akgur, S.A., Ozturk, P., Solak, I., Moral, A.R. and Ege, B., 2003. Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute organophosphorous insecticide poisoning. Forensic. Sci. Int. Vol. 133, No. (1-2): pp.136-140.

Al-Robaiey, Rana Fadhel Jasim. 2006. Isolation and Studying Arylesterase in Blood Serum and Its Relation with Atherosclerosis in Mosul. (MSC) University of Mosul, College of science, Department of chemistry.

Andrews, P., 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weight over a wide rang. J. Biol. Chem. Vol. 96: 595p.

Aviram, M. and Davies, K.A., 2004. Paraoxonase 1, 2 and 3, oxidative stress and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 37, No. 9, pp.1304-1316.

Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., 2000. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectivity decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerosis lesions. Circulation. Vol. 101, 2510p.

Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., 2000. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab. Dispos. Vol. 28, No. 11, pp.1335-1342.

Brushia, R.J., Forte, T.M., Oda, M.N., La Du, B.N. and Bielicki, J.K., 2001. Baculovirus–mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A. J. Lipid. Res. Vol. 42, pp951-958

Chabrol and Chardonnet, 1937. Cited by Gelson Toro and Philip G. Ackermann (1975). Prac. Clin. Chem. Little, Brown and company, Boston, pp.353-354.

Chemnitius, J.M., Winkel, H., Meyer, I., Schirrmacher, K., Armstrong, V.W., Kreuzer, H. and Zech, R., 1998. Age related decrease of high density lipoproteins (HDL) in women after menopause. Quantification of HDL with genetically determined HDL arylesterase in women with healthy coronary vessels and in women with angiographically verified coronary heart disease. Med. Klin. (Munich). Vol. 93, No. 3, pp.137-145.

Crepaldi, G., Lefebvre, P.J. and Alberti, K.G.M.M., 1978. Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias. Academic press Inc., London Ltd., 265p.

Dioxin, M. and Weeb, E.C., 1961. Tools of Biochemistry. T.G. Copperol: 370 John Wiley and Sons. Inc. (1977). 370p.

Elosua, R., Tomas, M., Senti, M., Molina, L., Vila, J., Anglada, R., Fito, M., Covas, M.I. and Marrugat, J., 2002. Paraoxonase1−192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxanase 1 activity. J. Lipid Res. Vol. 43, pp.713-720.

Fenster, K.M., Parkin, K.L. and Steele, J.L., 2003. Intracellular esterase from lactobacillus casei LILA: nucleotide sequencing, purification, and characterization. J. Dairy Sci. Vol. 86, pp.1118-1129.

Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W. and La Du, B.N., 1991. Purification of human serum paraoxonase / arylesterase evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug Metab. Dispos. Vol. 19, No. 1, pp.100-106.

Gouedard, C., Koum−Besson, N., Barouki, R. and morel, Y., 2003. Opposite regulation of the human paraoxonase−1 gene PON−1 by fenofibrate and statins . Mol. Pharmacol. Vol. 63, No. 4, pp.945- 956.

Kostner, G.M., 1976. Enzymatic determination of cholesterol in high density lipoprotein fraction prepared by polyanion precipitation. Clin. Chem. Vol. 22, No. 5, 698p.

Kudchodkar, B.J., Lacko, A.G., Dory, L. and Fungwe, T.V., 2000. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. J. Nutr. Vol. 130, No. 10, pp.2427-2433.

Kujiraoka, T., Oka, T., Ishihara, M., Egashira, T., Fujioka, T., Saito, E., Saito, S., Miller, N.E. and Hattori, H., 2000. A sandwich serum enzyme−linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration. J. Lipid Res. Vol. 41, pp.1358-1363.

La Du, B.N., Adkins, S., Kuo, C.L. and Lipsig, D., 1993. Studies on human serum paraoxonase / arylesterase. Chem. Biol. Interact. Vol. 87, No. (1-3), pp.25- 34.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature. Vol. 227, 680p.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. Vol. 193, p.265-275.

McElveen, J., Mackness, M.L., Colley, C.M., Peard, T., Warner, S. and Walker, C.H., 1986. Distribution of paraoxonase hyderolytic activity in the serum of patients after myocardial infraction. Clin. Chem. Vol. 32, No. 4, pp.671-673.

Ozols, J., 1999. Isolation and complete covalent structure of liver microsomal paraoxonase. Biochem. J. Vol. 338, pp.265-272.

Paragh, G., Seres, I., Balogh, Z., Varga, Z., Karpati, I., Matyus, J., Ujhelyi, L. and Kakuk, G., 1998. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. Nephron. Vol. 80, pp.166-170

Plummer, T.D., 1978. An Introduction of Practical Biochemistry. 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., U.K., : 48p., 53p., 174p., 270p., 274p.

Pond, A.L., Chambers, H.W., Coyne, C.P. and Chambers, J.E., 1998. Purification of two rat hepatic proteins with A-esterase activity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon. The J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics. Vol. 286, No. 3, pp.1404-1411.

Richmond, W., 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clin. Chem. Vol. 19, No. 12, pp.1350-1356.

Rozenberg, O., Shih, D.M. and Aviram, M., 2003. Human serum paraoxonase 1 decrease macrophage cholesterol biosynthesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Vol. 23, 461p.

Schacterle, G.R. and Pollack, R.L., 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. Anal. Biochem. Vol. 51, pp.654-655.

Sen–Banerjee, S., Siles, X. and Campos, H., 2000. Atherosclerosis and lipoproteins: tobacco smoking modifies association between Gln–Arg 192 polymorphism of human paraoxorase gene and risk of myocardial infarction. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Vol. 20, 2120p.

Tomas, M., Senti, M., Gareia–Faria, F., Vila, J., Torrents, A., Govas, M. and Marrugat, J., 2000. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoprotein in familial hypercholesterolemic patients. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Vol. 20, 2113p..

Valabhji, J., Mccoll, A.J., Schachter, M., Dhanjil, S., Richmond, W. and Elkeles, R.S., 2001. High–density lipoprotein composition and paraoxonase activity in type I diabetes. Clinical Science. Vol. 101, pp.659-670.

Vincent–Viry, M., Sass, C., Bastien, S., Aguillon, D., Siest, G. and Visvikis, S., 2003. PON1–192 phenotype and genotype assessments in 918 subjects of the stanislas cohort studyp. Clin. Chem. Lab. Med. Vol. 41, No. 4, pp.535-540.