جداسازی و اندازه‌گیری آنزیم بتا ـ گالاکتوزیداز مغز موش

دکتر کورش فولاد ساز *

خلاصه:

آنزیم β ـ گالاکتوزیداز یکی از آنزیم‌های لیزوزومی می‌باشد که کمبود آن در بسیاری از بیماریهای ارثی و اکتسابی مشاهده می‌شود. در این پژوهش جداسازی و اندازه‌گیری آنزیم بتاگالاکتوزیداز (EC.3.2.1.23) از هموژنیت مغز موش انجام شده است. در نتیجه تخلیص آنزیم توسط کروماتوگرافی DEAE ـ سلولز دو پیک مجزا حاصل شد. جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها از روش بسیار حساس و کم هزینه Lowry استفاده گردید. در خاتمه تخلیص و جداسازی فعالیت مخصوص آنزیم از ۳۲/۱ به ۴۲۹/۳ رسید و افزایش درصد recovery فعالیت آنزیم قابل محسوس بود. این نتایج نشان می‌دهند که با استفاده از این روش حساس و کم هزینهٔ تخلیص و اندازه‌گیری آنزیم می‌توان در تشخیص و تعیین بیماریها و انجام تکنیک‌های بسیار مهم بیوتکنولوژی گامهای مؤثری برداشت.

واژه‌های کلیدی: ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، β ـ گالاکتوزیداز، لیزوزوم، فعالیت مخصوص، بیوتکنولوژی

مقدمه:

لیزوزوم‌ها ذراتی کروی با قطر ۰/۰۵ الی ۰/۵ میکرون بعنوان دستگاه گوارش داخل سلولی بوده که دارای بیش از ۴۰ نوع آنزیم مختلف می‌باشند. در ارتباط با پاتولوژی سلولی بیش از ۲۰ نوع بیماری ذخیرهٔ لیزوزومی شناخته شده است که در اثر نقص ژنتیکی یک یا چند آنزیم ایجاد می‌شوند. در این میان می‌توان از انواع بیماری‌های اسفنگولیپیدوز نام برد که در مورد بیماری GM۱ ـ گانگلیوزیدوز کمبود آنزیم بتا ـ گالاکتوزیداز وجود دارد که دارای علائمی نظیر کاهش رشد، ضعف حرکتی، هپاتواسپلنومگالی و غیره می‌باشد. آنزیم بتا ـ گالاکتوزید واکنش هیدرولیز پیوند بتا ـ گالاکتوزید انتهایی را از کربوهیدراتها، گلیکولیپیدها و گلیکوپروتئین‌ها کاتالیز می‌نماید. در تشخیص بیماری اسفنگولیپیدوز تعداد منابع آنزیم متعدد می‌باشند نظیر مغز، کبد، طحال، کلیه، سرم، لکوسیتها، مایع آمنیوتیک، پلاسنتا، ادرار و غیره. هدف از تخلیص و اندازه‌گیری آنزیم β ـ گالاکتوزیداز تشخیص و تعیین بیماریهای ارثی فوق الذکر می‌باشد بعلاوه در انفارکتوس میوکارد نیز میزان آنزیم تغییراتی می‌نماید که در این مورد اندازه‌گیری آنزیم مفید خواهد بود (۳ ، ۱).

* متخصص بیوشیمی، عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان

بعلاوه می‌توان از آنزیم β ـ گالاکتوزیداز تخلیص شده بعنوان لیبل در سنجشهای ایمنی آنزیمی که امروزه بطور وسیع کاربرد دارند، استفاده نمود. اخیراً نیز سنجش سریع و نیمه کمی آنزیم بتا ـ گالاکتوزیداز بعنوان مارکر تشخیص سرطان پروستات و کولون مورد استفاده قرار گرفته است (۵، ۴).

مواد و روشها:

مواد:

بافرسیترات سدیم ۰/۱ مولار با pH = ۴/۵، پارانیتروفنیل بتا - دی - گالاکتوپیرانوزید، پارانیتروفنول، کربنات سدیم ۰/۲ مولار، محلول ۱٪ سولفات مس، BSA، معرف فولین ـ سیوکالتو، ساکارز، EDTA، محلول ۰/۵ درصد کولات سدیم، DEAE ـ سلولز، کلرور سدیم، تریس، اکریل آمید، پرسولفات آمونیوم، HCl، SDS، مرکاپتواتانول، کوماسی بلو - G 200، TEMED، برموفنول بلو، بیس اکریل آمید، اوره، اتانول، اسید استیک گلاسیال و موش‌های سفید.

روشها:

مراحل جداسازی آنزیم β - گالاکتوزیداز از بافت مغز موش (۶):

مرحله ۱ ـ تهیه پارتیکل‌های لیزوزومی:

۲ عدد موش سفید را به روش Cervical dislocation کشته و مغز آنها پس از توزین (۳/۵ گرم) در داخل مزور حاوی ساکارز ۰/۲۵ مولار، EDTA ۱ میلی مولار و pH = ۷ ریخته شد. پس از هموژنیزاسیون با ۹ برابر حجم محلول ساکارز ـ EDTA و سانتریفیوژ بمدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰g، محلول رویی جدا شد. پس از سانتریفیوژ مجدد بمدت ۱۵ دقیقه در ۲۰/۰۰۰g، رسوب حاصله در محلول سوکروز ـ EDTA اولیه بصورت سوسپانسیون درآمده و هموژنیزه گردید.

مرحله ۲ ـ خرد کردن پارتیکلها و استخراج باکولات:

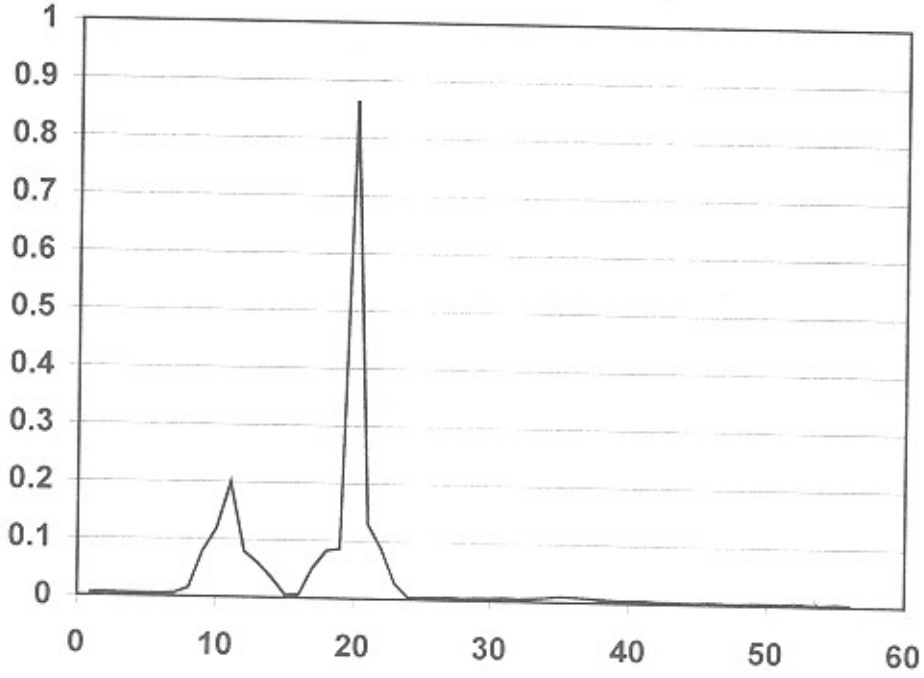
در این مرحله پارتیکلهای انتهای مرحله اول بمدت ۱۰ دقیقه در ۱۰ کیلو سیکل سونیکیت شده و سپس توسط سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۳۰۰۰g محلول رویی جدا گردید و رسوب زیرین در محلول سوکروز ـ EDTA حاوی ۰/۵ درصد کولات سدیم به صورت سوسپانسیون در آمد و مرحله سانتریفیوژ تکرار گردید و آنگاه دو محلول رویی اخیر حاصل از سانتریفیوژ مخلوط شدند و آنگاه بمدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰۰g سانتریفیوژ گردیده و محلول رویی جدا و نگهداری شد.

مرحله ۳ ـ رسوب در pH = ۵:

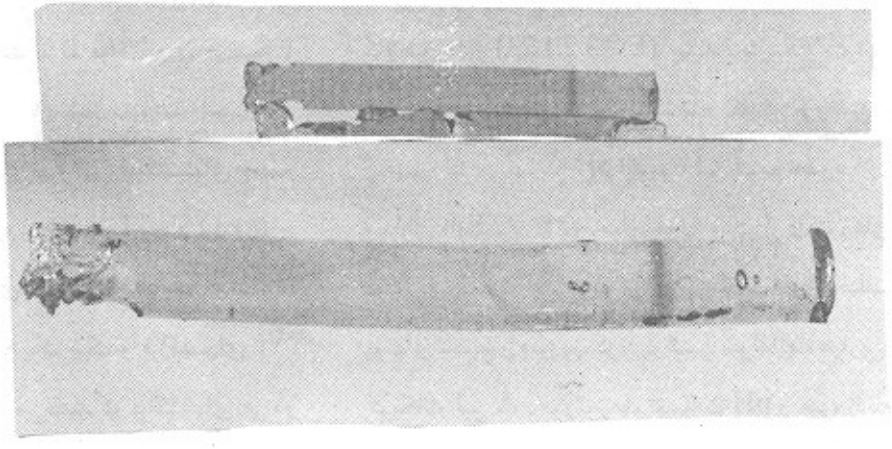
محلول انتهایی مرحله قبل با ۰/۳۹ میلی لیتر بافر استات سدیم pH = ۵ مخلوط و بمدت یک ساعت در یخچال قرار داده شد. محلول رویی جهت خالص سازی بیشتر در برودت ۲۰ ـ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد.

مرحله ۴ ـ کروماتوگرافی DEAE ـ سلولز:

ابتدا ستون کروماتوگرافی (۲/۵ cm × ۳۹ cm) با بافرفسفات سدیم ۱۰ میلی مولار حاوی NaCl ۱۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار و pH = ۷ به تعادل رسید و سپس محلول انتهایی مرحله ۳ روی ستون ریخته شد و همزمان گرادیان غلظتی کلرور سدیم با غلظتهای ۰/۰۵ و ۰/۲ مولار به ستون متصل شد. تعداد ۵۶ فراکشن (حجم هر فراکشن ۱۶ میلی لیتر) جمع آوری و فراکشنها تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در ۲۰ ـ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد.



نمودار شماره ۱ : منحنی کروماتوگرافی DEAE - سلولز مغز موش



شکل شماره ۱ :
باندهای جداگانه پیک های اول و دوم

جدول شماره ۱ ـ باندهای جداگانه پیک‌های اول و دوم، جدول مربوط به مراحل تخلیص آنزیم بتا ـ گالاکتوزیداز

فراکشن	حجم (ml)	پروتئین تونال (mg)	پروتئین (%)Recovery	فعالیت آنزیم تونال (Unit)	فعالیت آنزیم (%)Recovery	فعالیت مخصوص	Purification
مرحله هموژنیت	۱۸۰	۳۳۲۰	—	۱۰۷۱۰۰	—	۳۲/۱	۱
انتهای مرحله‌اول(پارتیکها)	۱۴	۱۴۴۴	۴۳	۷۳۵۰۸	۶۸/۶	۵۱	۱/۵۸
مرحله استخراج باکولات (مرحله دوم)	۶	۳۰۰	۹/۰۳	۶۰۸۰۰	۵۶	۲۰۰/۱	۶/۲
مرحله سوم یا سوپرنیتنت با PH = ۵	۶	۳۶	۱/۰۸	۱۵۴۵۸	۱۴/۴	۴۲۹/۳	۱۳/۳

اندازه‌گیری آنزیم βـ گالاکتوزیداز طبق روش Calvo P, Reglero A and Cabezas JA پس از تهیه منحنی استاندارد آنزیم با استفاده از غلظتهای استاندارد ۸ ـ ۰/۰۰۸ میکرو مولار پارانیتروفنول در محلول حاوی نسبتهای مساوی بافر سیترات سدیم ۰/۱ مولار با pH= ۴/۵ و کربنات سدیم ۰/۲ مولار انجام شد (۷).

منحنی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فراکشنهای حاصله از مرحله ۴ در نمودار شماره (۱) نشان داده شده است.

ضمناً اندازه‌گیری غلظتهای پروتئین فراکشنهای جمع آوری شده با استفاده از روش Lowry انجام شد (۸).

پس از قرائت جذب نوری فراکشنهای آنزیمی مشاهده گردید فراکشنهای ۱۲ ـ ۸ یک پیک و فراکشنهای ۲۳ ـ ۱۷ پیک دیگر را تشکیل می‌دهند که فراکشنهای هر دو پیک بطور جداگانه جمع آوری شد و علیه بافر فسفات سدیم ۱۰ mM و pH= ۷ دیالیز و تغلیظ انجام شد.

مرحله ۵: الکتروفورز SDS - PAGE به روش laemmli انجام شد (۹). نتیجه الکتروفورز پیک‌های اول و دوم به صورت دو باند جداگانه در جدول شماره (۱) قابل مشاهده است.

بحث و نتیجه‌گیری:

تاکنون بیش از ۲۰ نوع بیماری ذخیرهٔ لیزوزومی شناسایی شده‌اند که در اثر نقص ژنتیکی یک یا چند آنزیم ایجاد می‌شود که در این خصوص می‌توان از بیماری پمپ، بیماری گوشر، بیماری فابری، بیماری نیمن پیک، بیماری تی ساکز و غیره نام برد. آنزیم βـ گالاکتوزیداز (EC.3.2.1.23) پیوند ـ بتا ـ گالاکتوزید انتهایی کربوهیدراتها، گیلکولیپیدها و گلیکو پروتئین‌ها را هیدرولیز می‌نماید. pH اپتیموم این آنزیم حدود ۴/۱ و دارای Km برابر ۰/۲۲ میلی مول است. از فاکتورهای مؤثر در فعالیت این آنزیم می‌توان غلظت‌های مختلف یونهای سدیم و منیزیم، کوندروئیتین سولفاتها، هپارین، کونکاناوالین A ، فورانوزها، تغییرات pH و غیره را نام برد (۳ ـ ۱). کمبود این آنزیم همانطور که اشاره شد در بسیاری از بیماریهای ارثی و اکتسابی نظیر بیماری اسفنگولیپیدزها، انفارکتوس قلبی و سرطان کولون و پروستات مشاهده می‌گردد که می‌توان به عنوان شاخص مهمی در تشخیص و تعیین اینگونه ناهنجاریها در نظر

گرفته شود. بعلاوه تخلیص این آنزیم می‌تواند گام مهمی در تهیه لیبل آنزیمی در سنجشهای ایمنوشیمیایی باشد (۵ ، ۴). همانطور که مشخص است در حال حاضر اینگونه سنجشها نظیر EIA و ELISA در آزمایشات بالینی و تحقیقاتی مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند و به دلیل ویژگی و حساسیت و دقت زیاد دارای ارزش تشخیصی زیادی می‌باشند و می‌توان با تولید و تخلیص این آنزیم و استفاده آن در تکنیکهای بیوتکنولوژی گامی مؤثر در پیشرفت علمی کشور برداشت.

روش اندازه‌گیری آنزیم β ـ گالاکتوزیداز بسیار کم هزینه و آسان می‌باشد و نیاز به استفاده از کیت خاصی ندارد و در مورد روش اندازه‌گیری پروتئین نیز حساسیت سنجش بسیار خوب می‌باشد؛ بطوریکه در حد ۲۰ میکروگرم پروتئین در میلی لیتر سرم یا نمونه را سنجش می‌نماید.

همانطور که در جدول مربوط به مراحل تخلیص آنزیم β ـ گالاکتوزیداز مشهود است در مرحله سوم فعالیت مخصوص آنزیم β ـ گالاکتوزیداز از ۳۲/۱ به ۴۲۹/۳ رسیده است و درصد recovery فعالیت آنزیم افزایش زیادی داشته است و همانطور که اشاره شد می‌توان از این آنزیم تخلیص شده در تکنیکهای بیوتکنولوژی و قطع وابستگی کشور استفاده شایانی نمود.

کتابنامه :

1 - Kanda A ., Nakao S., Tsuyama S. and Murata F . Fabry Disease : Ultrastructural lectin histochemical analyses of lysosmal deposits. Virchows. Arch (2000) ; 436 (1) : 36-42.

2 - Hill JA . and Huber RE.Effects of various concentrations of Na^+ and $Mg\ 2^+$ on activity of B- galactosidase . (1971). Biochim . Biophys . Acta 250(3) : 530-537.

3 - Calvo P., Barda JL. and Cabezas JA Serum Beta - N- acetyl glucosaminidase and beta- D- galactosidase levels in myocardial in farction and breast cancer . (1982). Clin Chim . Acta 119(1-2) : 15-19 .

4 - Khathhatay MI . and Desai M.A Comparison of perfomances of four enzymes used in ELISA with special reference to beta - lactamase . (1999). J . Immunoassay 20(3) : 151-183.

5 - Roigas J., Wallen ES , and loening SA. Beta - galactosidase as a marker of HSP70 promoter induction in Dunning R3327 prostate carcinoma cells . (1997) . Urol . Res 25(4) : 251-255.

6 - Serrano MA, Cabezas JA. and Reglero A. Carbohydrate contents glycosidase and glycosyl transferase activities in tissues from streptozotocin diabetic mice. (1985). Comp . Biochem . Physiol . B. 80(3) : 629-632.

7 - Calvo P., Reglero A. and Cabezas JA. Purification and properties of beta- N-acetyl hexosaminidase from the mollusc Hellicella ercicetorum muller. (1978).

the headof bacteriophage T4 . (1970) .

Biochem . J.175:743-775 .

8 - Lowry OH., Rosenbrough NJ ., Farr AL. and Randall RG (1951) . Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol . Chem . 193 : 265-275.

9 - Laemmli UK . Cleavage of structural proteins during the assembly of Nature. 277: 680-685.

10 - Snyder RA. and Brady Ro . The use of white cells as a source of diagnostic material for lipid storage disead=scs . (1969). Clin. Chim. Acta. 25(2): 331-338 .