ORIGINAL ARTICLE

Kinetic Activity of Isolated Nitric-oxide Synthase Enzyme from Sheep Kidney

Manizheh Kadkhodaei Elyaderani[1],
Ali Mohammad Malek Askar[2],
Morad Rostami[3],
Mohammad Aberomand[3],
Alireza Khirollah[3]

[1] Department of Clinical Biochemistry and Thalassemia & Hemoglobinopathy Reseach Center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2] Department of Clinical Genetic, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received March 17, 2012 ; Accepted December 1, 2012)

Abstract

Background and purpose: Nitric oxide (NO) is produced by nitric oxide synthase (NOS) from L-arginine and has an important role in a variety of physiological and pathological processes in biological systems. In this study, kinetic activities of isolated NOS were evaluated from sheep kidney.

Materials and methods: In this reasearch homogenization, ammonium sulfate precipitation and column chromatography on DEAE-32 Cellulose and 2', 5'-ADP-agarose of 500 grams of sheep kidney were used to purify isolated nitric oxide. In all steps of purification process the amount of protein and its activity was assayed using Bradford and Griess reactions.

Results: The molecular weight of sheep kidney on SDS-PAGE electrophoresis was 54 KD. Specific activity was 0.6 units/mg protein and recovery of purification was 0.9% (relative purity was 20 times more). Optimum temperature and pH were 30˚C and 7.4 and incubation of purified enzyme at thermal interval of 10 to 30˚C for 15 minute showed a stable enzyme activity. At 75 µM concentration of L-arginine substrate, the highest level of NOS activity was seen. The Vmax and Km of enzyme were 250 nmol/min/mg protein and 5.32 µM, respectively.

Conclusion: NOS enzyme from sheep kidney was purified with relative purity of 20 times and their optimum temperature, pH, suitable substrate concentration, Vmax and Km were 30˚C, 7.4, 75 µM, 250 nmol/min/mg proteins and 5.32 µmol, respectively.

Keywords: Nitric oxide synthase (NOS), kinetic activity, sheep, kidney

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(96): 59-69 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۶ دی سال ۱۳۹۱ (۶۹-۵۹)

ارزیابی کینتیکی آنزیم نیتریک اکسید سنتاز استخراج شده از کلیه گوسفند

منیژه کدخدایی الیادرانی[۱]
علی محمد ملک عسکر[۲]
مراد رستمی[۳]
محمد آبرومند[۳]
علیرضا خیراله[۳]

چکیده

سابقه و هدف: نیتریک اکسید (NO) از طریق نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و از ال- آرژینین تولید شده و در پروسه‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متعددی از سیستم‌های بیولوژیکی نقش دارد. در این بررسی، فعالیت‌های کینتیکی NOS جدا شده از کلیه گوسفند مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: با استفاده از تکنیک‌های هموژنیزاسیون، رسوب توسط سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی ستونی روی DEAE-32سلولز و'۲، '۵-ADP-آگاروز، آنزیم NOS از ۵۰۰ گرم از بافت کلیه گوسفند، جدا و خالص‌سازی شد. در هر مرحله از روند خالص‌سازی این آنزیم، مقدار پروتئین و فعالیت آن با استفاده از روش‌های برادفورد و گریس بررسی شد.

یافته‌ها: در این بررسی، وزن ملکولی NOS کلیه گوسفند در الکتروفورزSDS-PAGE، 54 کیلو دالتون بود. فعالیت ویژه، ۰/۶ واحد بر میلی گرم پروتئین و بازده خالص سازی آن نیز ۰/۹ درصد (خلوص نسبی ۲۰ برابر) به دست آمد. pH و دمای اپتیم این آنزیم نیز به ترتیب ۷/۴ و ۳۰ درجه سانتیگراد به دست آمد و انکوباسیون پروتئین نشان داد که در محدوده دمایی ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، آنزیم پایدار می باشد. در غلظت ۷۵ میکرو مول از سوبسترای ال-آرژینین، بیشترین فعالیت NOS مشاهده شد. Vmax و Km آنزیم به ترتیب ۲۵۰ نانو مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین و ۵/۳۲ میکرومول به دست آمد.

استنتاج: نزیم NOS از کلیه گوسفند با خلوص نسبی ۲۰ برابر خالص سازی شد و دمای اپتیمم، pH، غلظت مناسب سوبسترا، Vmax و Km آن به ترتیب ۳۰ درجه سانتیگراد، ۷/۴، ۷۵ میکرومول، ۲۵۰ نانو مول در دقیقه در میلی گرم پروتئین و ۵/۳۲ میکرومول به دست آمد.

واژه های کلیدی: نیتریک اکسید سنتاز (NOS)، فعالیت کینتیکی، گوسفند،کلیه

مقدمه

نیتریک اکسید (NO)، یک رادیکال آزاد بسیار فعال بوده که نشان داده شده است دارای عملکردهای مختلف بیولوژیک می‌باشد. NO از ال- آرژینین به وسیله خانواده‌ای از ایزوآنزیم‌ها موسوم به نیتریک اکسید سنتاز (NOS) (EC 1.14.13.39) و در حضور اکسیژن تولید می شود که تولید ال- سیترولین(۱،۲) و NO نموده که به تنظیم سطح طبیعی NO در بدن کمک می‌نماید(۲). NOS از دسته اکسیدوردو کتازها بوده که

مؤلف مسئول: مراد رستمی- اهواز: دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی E-mail: morad_r56@yahoo.com
۱. گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۰/۱۲/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۵/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۹/۱۱

با عمل بر روی یک جفت‌دهنده (که در این واکنش شامل اکسیژن ملکولی و NADPH می‌باشند) و از طریق اتصال و یا احیای اکسیژن ملکولی، واکنش خود را به انجام می‌رساند. این واکنش به کوفاکتورهای مختلفی از قبیل NADPH، FMN، FAD، تترا هیدروبیوپترین، کلسیم، کالمودولین (Calmodulin) و اکسیژن مولکولی نیاز دارد(۴،۳). NOS دارای سه ایزوفرم بوده که توسط ژن‌های متفاوتی بیان می‌شوند. ایزوفرم بافت عصبی (nNOS) و ایزوفرم اندوتلیال عروق (eNOS) که هردو وابسته به یون کلسیم و کالمودولین بوده، ایزوفرم سوم که غیر وابسته به کلسیم و کالمودولین بوده، قابل القاء (iNOS) می‌باشد(۳).

NO دارای عملکردهای مهم شناخته شده‌ای از قبیل تنظیم همودینامیک کلیه و تنظیم پرفیوژن ناحیه مدولاری در کلیه‌ها می‌باشد(۶،۵). علی رغم اثرات مفید NO، تولید بیش از حد NO به علت تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، نیتروژن فعال (RNS) و نیتروزیلاسیون پروتئین‌ها، دارای اثرات سمی می‌باشد(۷). NO قادر به عبور از غشای سلولی و طی مسافت‌های طولانی بوده، از این رو، باید تولید آن تحت کنترل باشد(۸). در ابتدا، NO را فاکتور شل کننده مشتق شده از اندوتلیوم عروق (Endothelium derived relaxing factor) می‌نامیدند به طوری که در طی ۱۰ سال گذشته، منجر به انتشار بیش از ۶۰/۰۰۰ مقاله در این مورد شده است(۹). نقش NO به عنوان یک پیامبر بیولوژیک در سال ۱۹۸۷ کشف گردید(۷) و در سال ۱۹۹۸، Furchgott، Ignarro و Murad جایزه نوبل را برای این یافته مهم، به خوداختصاص دادند(۹). تاکنون ایزوآنزیم‌های مختلفی از NOS از سلول‌ها و بافت‌های موجودات مختلف جدا سازی و خالص‌سازی شده است(۱۰) که از این میان می‌توان به پلاکت‌های انسانی(۱۱)، مغز و پانکراس گاو (۱۳،۱۲)، مغز گوسفند(۱۴)، میتوکندری سلول‌های کبدی موش صحرایی (Rat)(۱۵)، استافیلوکوکوس آرئوس(۱۰) و گونه‌های نوکاردیا(۱۶) اشاره نمود که هر کدام از این ایزوآنزیم‌ها دارای مشخصات ویژه خود از قبیل وزن ملکولی، Km و Vmax و حتی در برخی موارد دارای ساختمان متفاوت می‌باشند که می‌تواند بر رفتار آن‌ها و حتی در نحوه مهار آن‌ها تأثیرگذار باشد.

NO به دلیل چشم‌انداز آینده آن در تهیه داروهای مختلف و درمان برخی از بیماری‌های مهم، یکی از ملکول‌های مهم مورد مطالعه در علم پزشکی زیستی (Biomedical) به شمار می‌رود(۱۷). به دلیل اهمیت شناخت کینتیک آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند و از آن جایی که تاکنون مطالعه‌ای روی این آنزیم با منشاء بافت کلیه گوسفند صورت نگرفته است این مطالعه به بررسی کینتیک آزمایشگاهی، وزن ملکولی، دمای ماکزیمم، pH ماکزیمم، غلظت سوبسترا، Km و پایداری آنزیم در دماهای مختلف به منظور شناخت بیشتر ساختمان و رفتار آن به منظور تعیین استراتژی‌های مناسب در نحوه کنترل تولید و مهار آن در مطالعات بعدی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

این پروژه در طی مهر ماه سال ۱۳۸۷ تا دی ماه سال ۱۳۸۸ در گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شد. به‌جز کیت اندازه‌گیری فعالیت NOS که از شرکت کال بیوکم خریداری شد، سایر مواد مورد نیاز در این طرح از شرکت سیگما تهیه شدند. آنزیم NOS مورد نیاز در این طرح از ۵۰۰ گرم بافت تازه کلیه گوسفند (۹ عدد کلیه) از کشتارگاه شهر اهواز (مرکز استان خوزستان) که در داخل بافر A (تریس- HCL ۵۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار، Phenylmethysulfonyl fluoride (PMSF) ۱ میلی مولار، Leupeptine ۱۰ میلی مولار، Pepstatine A ۱۰ میلی مولار با pH=۷/۴ می‌باشد) و بر روی ظرف حاوی یخ، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شده بود، جدا سازی و خالص‌سازی گردید.

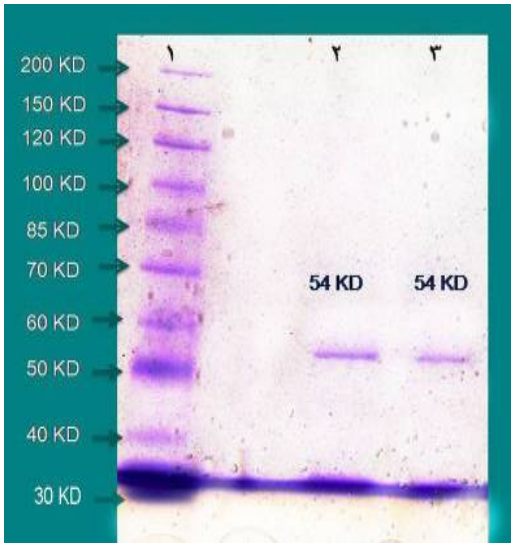
در ابتدا کلیه‌ها با بافر A با pH=۷/۴ شستشو داده، تمیز شدند. پس از قطعه قطعه کردن کلیه‌ها، در ۹۰۰ میلی لیتر از بافر A با pH=۷/۴ (۱۰۰ میلی لیتر بافر A به ازای هر کلیه) و در یک مخلوط کن که از قبل به منظور سرد شدن به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر قرار داده شده بود، به مدت ۵ دقیقه در سرعت بالا و به صورت منقطع هموژنیزه شدند. لازم به ذکر است که تمامی این مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. هموژنیت حاصل با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار با دور بالا، در g × ۳۰۰۰۰ و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی (Supernatant) که حاوی آنزیم بود، جدا و جهت ادامه مراحل تخلیص آنزیم مورد استفاده قرار گرفت(۱۰). در هر مرحله از خالص‌سازی، محتوای پروتئینی و فعالیت آنزیمی فراکشن حاصل به ترتیب با استفاده از روش برادفورد(۱۸) و واکنش رنگ سنجی گریس با استفاده از کیت اندازه‌گیری NOS از شرکت Calbiochem (Nitric Oxide Synthase Assay Kit, Colorimetric, Cat. No. 482702, Calbiochem) اندازه‌گیری شد (جدول شماره ۱).

در این مطالعه، هر واحد فعالیت آنزیم به صورت مقداری از آنزیم که برای تولید ۱ میکرو مول نیترات در ۱ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷ مور نیاز می‌باشد، در نظر گرفته شد. برای تخلیص آنزیم از رسوب دادن به کمک سولفات آمونیوم ۳۰ و ۷۰ درصد و سپس کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونی با استفاده از ژل دی اتیل آمینو اتیل ۳۲ سلولز (DEAE-32 Cellulose) انجام گرفت(۱۰). شستشوی ستون کروماتوگرافی با بافر A تا زمان رسیدن pH بافر خروجی به ۷/۴ ادامه پیدا نمود. در مرحله بعد نمونه دیالیز شده حاصل از رسوب با آمونیوم سولفات توسط پی پت پاستور به آرامی از جدار ستون روی ژل ریخته شد. پس از نفوذ نمونه به داخل ژل، با استفاده از پمپ پریستالتیک، جریان بافر A (با pH=۷/۴) روی ستون حاوی ژل برقرار گردید. میزان سرعت جریان بافر (Flow rate) از ستون در هر دقیقه یک میلی لیتر تنظیم شد. پس از عبور ۱۰۰ میلی لیتر از بافر A (با pH=۷/۴)، ۲۰۰ میلی لیتر از محلول کلرید سدیم (NaCl) در بافر A به صورت گرادیانی از صفر تا ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد و محلول خارج شده از ستون در حجم ۲ میلی‌لیتر توسط دستگاه فراکشن کالکتور جمع‌آوری گردید(۱۷،۸). در مرحله بعد جذب نوری فراکسیون‌های جمع‌آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. فراکسیون‌های دارای جذب نوری به طور جداگانه جمع‌آوری و فعالیت آنزیم نیز در آن‌ها اندازه گیری شد (تصویر شماره ۱)(۱۱).

در مرحله بعد، دو فراکشن دارای فعالیت آنزیمی به دست آمد که به طور جداگانه جمع‌آوری و پس از دیالیز، هر پیک به صورت جداگانه از ستون 2',5'-ADP-agarose متعادل شده با بافر (Tris-HCl B

جدول شماره ۱: مراحل تخلیص و اندازه گیری پارامترهای مختلف در فراکشن های مختلف از آنزیم نیتریک اکسید سنتاز از کلیه گوسفند (نتایج حاصل میانگین ۳ بار اندازه گیری در هر مرحله می باشند)

نمونه	حجم (ml)	پروتئین (mg%)	پروتئین توتال (mg)	فعالیت توتال (U)	فعالیت ویژه (U/mg Protein)	بازیافت (درصد) (Recovery or Yield)	خلوص نسبی (Relative purity or Purification factor)
عصاره خام	۹۲۵	۵۵۷	۵۱۵۲	۱۰۳	۰/۰۲	۱۰۰	۱
محلول رویی اشباع ۳۰٪	۸۸۴	۲۷۰	۲۳۸۷	۷۱/۶	۰/۰۳	۶۹/۵	۱/۵
رسوب اشباع ۷۰٪	۶۲	۱۸۳۹	۱۱۴۰	۴۵/۶	۰/۰۴	۴۴/۳	۲
نمونه حاصل از دیالیز و تغلیظ با سوکروز	۱۲	۱۲۰۸	۱۴۵	۱۱/۶	۰/۰۸	۱۱/۳	۴
فراکشن اول ستون DEAE	۴۶	۴۹/۶	۲۲/۸	۲/۱۲	۰/۰۹	۲/۱	۴/۵
فراکشن دوم ستون DEAE	۲۲	۶۷/۷	۱۴/۹	۱/۹	۰/۱۳	۱/۸	۶/۵
فراکشن اول ستون 2',5'-ADP-agarose	۴۶	۳/۳	۱/۵	۰/۹	۰/۶	۰/۹	۲۰
فراکشن دوم ستون 2',5'-ADP-agarose	۴۲	۱/۲	۰/۵	۰/۱۸	۰/۳۶	۰/۱۷	۱۸



تصویر شماره ۱: حرکت الکتروفورزی آنزیم NOS استخراج شده از ستون 2',5'-ADP-agarose بر روی ژل SDS- PAGE، ۷/۵ درصد و رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بلو R-250. پروتئین مارکر کمپلکس با وزن ملکولی در محدوده ۳۰ کیلو دالتون تا ۲۰۰ کیلو دالتون. وزن ملکولی آنزیم NOS، ۵۴ کیلو دالتون (باندهای ایجاد شده در ستون های شماره ۲ و ۳) نشان داده شد.

(10 mM, EDTA 1 mM, Dithiothritol 1mM, pH 7.4 با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، عبور داده شد و مقدار پروتئین و فعالیت آنزیمی در فراکشن‌های جمع آوری شده مشخص گردید. در ادامه کار، فراکشن‌های دارای فعالیت آنزیمی حاصل از هر دو مرحله کروماتوگرافی با ستون 2',5'-ADP-agarose، از طریق لیوفیلیزه کردن، تغلیظ شده و جهت ادامه کار مورد استفاده قرار گرفتند (تصویر شماره ۱)(۱۰).

در مرحله بعد، خلوص آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند، با استفاده از کروماتوگرافی SDS–PAGE و رنگ‌آمیزی آن با کوماسی بریلیانت بلو (تصویر شماره ۱) تأیید گردید. به منظور بررسی کینتیک آنزیم، ۲ پیک حاصل از مرحله کروماتوگرافی با 2',5'-ADP-agarose با همدیگر مخلوط شدند و سپس به بررسی کینتیک آزمایشگاهی، وزن ملکولی، دمای ماکزیمم، pH ماکزیمم، غلظت سوبسترا، Km و پایداری آنزیم در دماهای مختلف پرداخته شد.

تعیین غلظت های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز

در این روش جهت سنجش فعالیت آنزیم، ابتدا ۳۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار و ۳۰ میکرو لیتر از محلول سوبسترای ال- آرژینین ۱۰۰ میکرو مولار به چاهک های پلیت الایزا افزوده شدند. به این مخلوط، ۱۰ میکرو لیتر از محلول NADPH ۱۰۰ میکرو مولار و ۱۰ میکرو لیتر از $CaCl_2$ یک میلی مولار به هر چاهک افزوده شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از نمونه محتوی آنزیم به چاهک‌ها افزوده شد. در مرحله بعد ۱۰ میکرو لیتر از محلول نیترات ردوکتاز نیز به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند. پس از این زمان، ۱۰ میکرو لیتر از محلول LDH نیز به چاهک ها افزوده شد و ۲۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس ۵۰ میکرو لیتر از معرف شماره ۱ گریس (Sulfanilamide) و بلافاصله ۵۰ میکرو لیتر از معرف شماره ۲ گریس (N-(1-Naphthyl) ethylenediamine) به چاهک‌ها افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا کمپلکس رنگی تشکیل شود. میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از انتخاب فیلتر مخصوص این طول موج، توسط دستگاه خوانشگر الایزا قرائت شد.

از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار به عنوان بلانک استفاده شد. از استاندارد نیتریت نیز در محدوده غلظت صفر تا ۳۰ میکرو مولار برای رسم منحنی استاندارد نیتریت استفاده شد (۱ پایان نامه). در این روش میزان یک میکرومول نیتریت تولید شده در ساعت به عنوان یک واحد فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد (۱۳۸ پایان نامه). لازم به ذکر است که غلظت‌های مختلف آرژینین (۲۰۰ μM– ۲/۵) از محلول ذخیره ۲۰۰ میکرو مولار آن تهیه شد و هر نمونه به طور مستقل، سه بار مورد سنجش قرار گرفت. پس از قرائت جذب نمونه‌های محتوی غلظت‌های متفاوت آرژینین با استفاده از خوانشگر الایزا (مطابق روش شرح داده شده در قسمت

ب-۲- روش کار)، منحنی میزان فعالیت آنزیم در مقابل غلظت‌های مختلف آرژینین (نمودار میکائیلیس- منتون) و نیز نمودار لینوور- برک رسم گردید.

روش بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز و تعیین pH اپتیمم

جهت بررسی تأثیر pH بر فعالیت آنزیم، با استفاده از بافر فسفات پتاسیم (۵۰ mM)، ابتدا pH های مختلف ۱۰- ۳ تهیه گردید. روش کار مطابق روش بررسی اثر غلظت های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (که در بالا آورده شده است) انجام شد (به جز آن که در هر مورد از بافر فسفات پتاسیم با pH متفاوت استفاده شد). پس از مشاهده فعالیت ماکزیمم آنزیم در محدوده pH برابر ۷، pHهای مختلف ۶/۲، ۶/۴، ۶/۶، ۶/۸، ۷، ۷/۲، ۷/۴، ۷/۶، ۷/۸ و ۸ نیز تهیه و آزمایش مذکور انجام شد. در نهایت، منحنی فعالیت آنزیم در مقابل pH های مختلف رسم گردید (آزمایش فوق به طور مستقل ۳ بار تکرار شد). لازم به ذکر است که غلظت سوبسترا (ال- آرژینین) برای هر آزمایش، ۱۰۰ میکرو مولار بود.

روش تعیین درجه حرارت اپتیمم فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز

جهت انجام این آزمایش که به طور مستقل، سه بار تکرار گردید، دماهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شدند و مراحل مختلف واکنش آنزیمی، هر بار در یکی از دماهای انتخابی، مطابق روش بررسی اثر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (که در بالا آورده شده است) انجام شد. پس از مشاهده فعالیت اپتیمم آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سنجش فعالیت آنزیم مذکور در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز انجام شد. سپس منحنی فعالیت آنزیم در مقابل دماهای مختلف رسم گردید. لازم به توضیح است که برای هر آزمایش، به طور ثابتی، محلول ال- آرژینین با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار مورد استفاده قرار گرفت.

روش تعیین مقاومت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز نسبت به حرارت

جهت تعیین مقاومت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز نسبت به حرارت، ابتدا نمونه حاوی آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس مطابق روش بررسی اثر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (که در بالا آورده شده است)، سنجش فعالیت آنزیم انجام شد. غلظت سوبسترا (ال- آرژینین) برای هر آزمایش، ۱۰۰ میکرو مولار بود و هر آزمایش به طور مستقل، سه بار تکرار گردید.

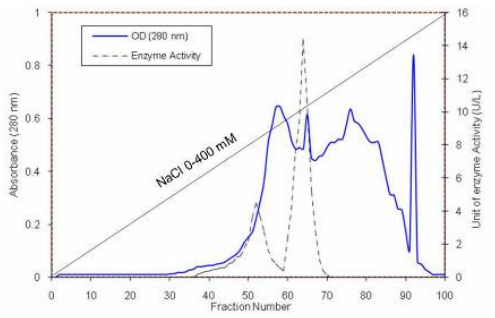
یافته‌ها

NOS استخراج شده از کلیه گوسفند توسط ستون کروماتوگرافی ژل DEAE-32 Cellulose و 2',5'-ADP-agarose خالص‌سازی شد و محتوای پروتئینی و فعالیت آنزیم آن در طی تمامی مراحل استخراج و خالص‌سازی آنزیم اندازه‌گیری شد. در کروماتوگرافی ژل DEAE-32 Cellulose، ۴ پیک به دست آمد که از میان آن‌ها تنها ۲ پیک نخست دارای فعالیت آنزیم NOS بودند (نمودار شماره ۱). این ۲ پیک که دارای فعالیت آنزیمی برای NOS بودند، به صورت جداگانه به ستون کروماتوگرافی 2',5'-ADP-agarose منتقل شدند که برای هر کدام، ۱ پیک دارای فعالیت آنزیمی NOS به دست آمد (نمودارهای شماره ۲ و ۳).

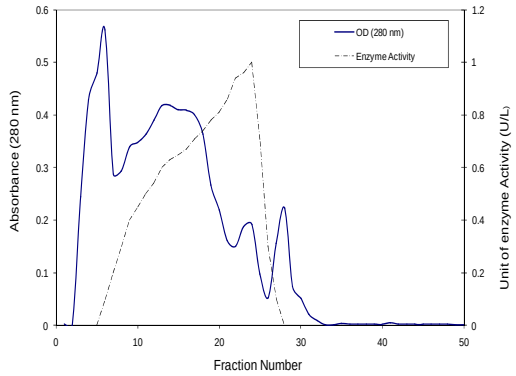
در این مطالعه، به منظور بررسی خلوص آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند، الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید (PAGE) انجام شد.

همچنین به منظور تعیین وزن ملکولی آنزیم استخراج شده، الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از

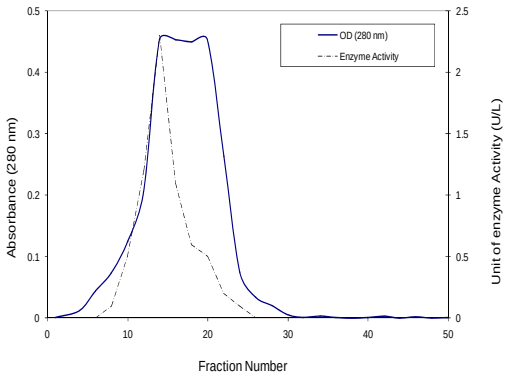
مارکرهای شرکت فرمنتس در محدوده ۲۰۰-۳۰ کیلو دالتون استفاده شد. هر ۲ پیک حاصل از مرحله نهایی کروماتوگرافی که روی ستون 2',5'-ADP-agarose انجام شده بود، در الکتروفورز SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی بریلیانت کوماسی بلو، تنها یک باند به وجود آوردند و دارای وزن ملکولی مشابه بودند. وزن ملکولی آنزیم NOS با منشأ کلیه گوسفند، ۵۴ کیلو دالتون به دست آمد (تصویر شماره ۱ و نمودار شماره ۴).



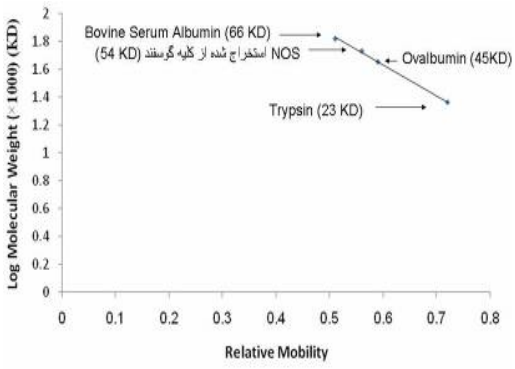
نمودار شماره ۱: بررسی میزان جذب نوری (۲۸۰ نانومتر) و فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در فراکشن‌های جدا شده از ستون DEAE-32 Cellulose. نمونه توسط محلول کلرید سدیم با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد. سرعت عبور این محلول، یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید. فراکشن‌های شماره ۳۷ تا ۵۹ حاصل از پیک اول و فراکشن های شماره ۶۰ تا ۷۰ حاصل از پیک دوم که دارای فعالیت آنزیمی بودند.



نمودار شماره ۲: بررسی میزان جذب نوری (۲۸۰ نانومتر) و فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز پیک اول دارای فعالیت آنزیم NOS از مرحله DEAE-32 Cellulose در فراکشن های جدا شده از ستون 2',5'-ADP-agarose. محلول کلرید سدیم ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد. سرعت عبور محلول کلرید سدیم، یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید. فراکشن‌های ۶ تا ۲۷ دارای فعالیت آنزیمی بودند.



نمودار شماره ۳: بررسی میزان جذب (۲۸۰ نانومتر) و فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز پیک دوم دارای فعالیت آنزیم NOS حاصل از کروماتوگرافی با ژل DEAE-32 Cellulose، در فراکشن های جدا شده از ستون 2',5'-ADP-agarose. نمونه توسط محلول کلرید سدیم ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد. سرعت عبور این محلول، یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید. در این مرحله فراکشن‌های ۶ تا ۲۶ دارای فعالیت آنزیمی بودند.

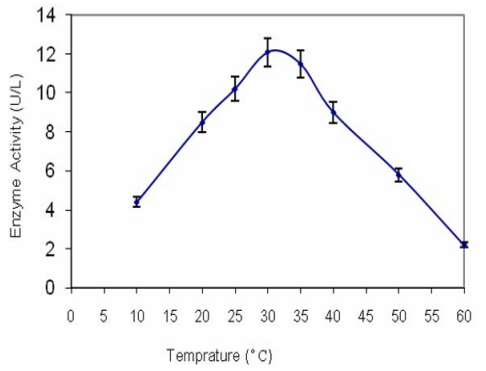


نمودار شماره ۴: تعیین وزن ملکولی آنزیم NOS استخراج شده با استفاده از منحنی استاندارد و پروتئین مارکرهای سرم آلبومین گاوی (BSA) ۶۶ کیلو دالتون، پروتئین سفیده تخم مرغ (Ovalbumin) ۴۵ کیلو دالتون و تریپسین ۲۳ کیلو دالتون.

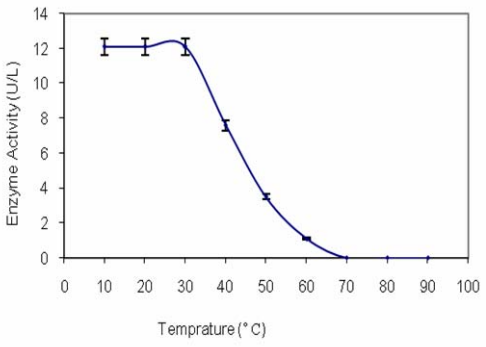
در این بررسی، فعالیت مخصوص و بازده خالص‌سازی آنزیم NOS به ترتیب ۰/۶ واحد در میلی گرم و ۰/۹ درصد (خلوص نسبی ۲۰ برابر) به دست آمد (جدول شماره ۱).

همان طوری که در تصویر شماره ۱ نیز مشاهده می‌شود، حضور تنها ۱ باند در الکتروفورز SDS-PAGE بوده که نشان دهنده خالص سازی مطلوب این آنزیم می‌باشد. در نهایت، ۲ فراکشن حاصل از کروماتوگرافی

2',5'-ADP-agarose با یکدیگر مخلوط شدند و مطالعه کینتیک آنزیم روی مخلوط فراکشن ها انجام شد. نتایج حاصل از اثر دما بر فعالیت آنزیم، نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در ۳۰ درجه سانتی‌گراد می باشد (نمودار شماره ۵). همچنین انکوباسیون آنزیم خالص شده به مدت ۱۵ دقیقه در محدوده دمایی ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که فعالیت آنزیم تقریباً ثابت بوده و در دماهای بالاتر، فعالیت آنزیم مذکور رو به کاهش گذاشته؛ به طوری که در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیتی مشاهده نشد (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۵: اثر دما بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز. آزمایش در حضور غلظت ۱۰۰ میلی مولار ال- آرژینین انجام گرفت. هر داده معرف سه بار تکرار اندازه گیری مستقل بوده که به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.



نمودار شماره ۶: بررسی پایداری فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در دماهای مختلف (۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی گراد). آزمایش در حضور غلظت ۱۰۰ میلی مولار ال- آرژینین انجام گرفت. هر داده معرف سه بار تکرار اندازه گیری مستقل بوده که به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

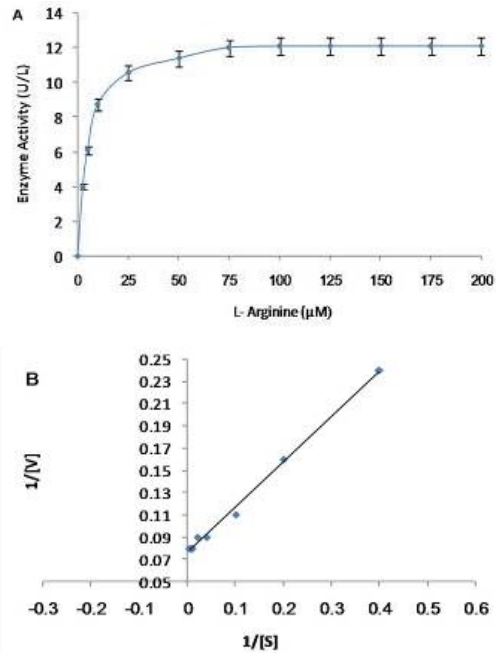
در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم به‌طور کامل حفظ شده بود و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، تنها ۹/۱ درصد از فعالیت آنزیم باقی مانده بود. در دماهای بالاتر نیز که فعالیت آنزیم به طور کلی از دست رفته بود (جدول شماره ۲).

با استفاده از غلظت های ۲/۵ تا ۲۰۰ میکرو مولار ال- آرژینین به عنوان سوبسترا، بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار ال- آرژینین به دست آمد. Km آنزیم نیز برای این غلظت از سوبسترا، ۵/۳۲ میکرو مول به دست آمد (نمودار شماره ۷).

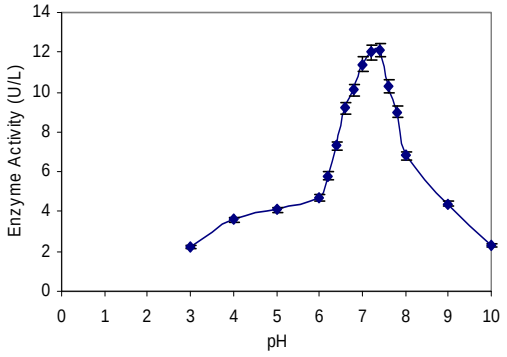
بیشترین فعالیت آنزیم در pH برابر ۷/۴ به دست آمد و در مقادیر بالاتر از ان، فعالیت آنزیم کاهش می یافت (نمودار شماره ۸).

جدول شماره ۲: درصد فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در دماهای مختلف

دمای انکوباسیون	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰
درصد فعالیت آنزیم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۳	۲۹	۹/۱	۰	۰	۰



نمودار شماره ۷: اثر غلظت‌های مختلف ال- آرژینین (۲/۵-۲۰۰ µM) بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (نمودار میکائیلیس- منتون (A) و نمودار لینویور- برک (B)). آزمایش در حضور ۱۰ میکرو لیتر محلول آنزیم. هر داده معرف سه بار تکرار اندازه گیری مستقل بوده که به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.



نمودار شماره ۸: اثر pH بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز. آزمایش در حضور غلظت ۱۰۰ میلی مولار ال- آرژینین انجام گرفت. هر داده معرف سه بار تکرار اندازه گیری مستقل بوده که به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

بحث

نیتریک اکسید (NO) که از طریق نیتریک اکسید سنتاز (NOS) و از ال- آرژینین تولید می‌گردد، در پروسه‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متعددی از سیستم‌های بیولوژیکی نقش دارد(۱۰). NOS دارای سه ایزوفرم بوده که توسط ژن‌های متفاوتی بیان می‌شوند. ایزوفرم بافت عصبی (nNOS) و ایزوفرم اندوتلیال عروق (eNOS) که هردو وابسته به یون کلسیم و کالمودولین بوده و ایزوفرم سوم که غیر وابسته به کلسیم و کالمودولین بوده و قابل القا (iNOS) می‌باشد(۳). بیشترین اهمیت NO در تنظیم عروقی بوده و تعجب آور نیست که بگوییم NO در تنظیم همودینامیک کلیه نقش مهمی دارد(۶). بنابراین در این مطالعه، به بررسی شرایط مناسب برای آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند از قبیل غلظت سوبسترا، دمای ماکزیمم، مدت زمان انکوباسیون و pH مناسب پرداخته شد. لازم به ذکر است که تاکنون مطالعه‌ای در مورد آنزیم NOS با منشاء کلیه و به ویژه کلیه گوسفند صورت نگرفته است.

در این مطالعه، در آخرین مرحله کروماتوگرافی با ستون 2',5'-ADP-agarose، فعالیت مخصوص و بازده خالص‌سازی آنزیم به ترتیب ۰/۶ واحد در میلی لیتر و ۰/۹ درصد به دست آمد. بازده خالص‌سازی آنزیم NOS در برخی مطالعات دیگر با منشاء استافیلوکوکوس، ۲/۸ درصد(۱۰)، کبد موش صحرایی، ۳/۷ درصد(۱۹)، مغز گوسفند، ۷/۴ درصد و پانکراس گاو، ۷/۶ درصد(۱۲) گزارش شده است. به نظر می‌رسد که این اختلاف در بازده خالص‌سازی به عواملی از قبیل روش جداسازی و خالص‌سازی، تعداد ستون‌های کروماتوگرافی به کار رفته، روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم و نوع بافت و ارگانیسم مورد استفاده و حتی نوع ایزوآنزیم باشد.

وزن ملکولی NOS خالص شده از کلیه گوسفند با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی بریلیانت کوماسی بلو، ۵۴ کیلو دالتون به دست آمد. از آن‌جایی که آنزیم NOS به صورت دایمر می‌باشد و از طرفی، تنها ۱ باند در الکتروفورز SDS-PAGE مشاهده شد، بنابراین می‌توان گفت که آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند به صورت همودایمر وجود دارد. وزن ملکولی آنزیم NOS استخراج شده از گونه‌های نوکاردیا(۱۶)، کبد موش صحرایی(۱۹)، ماکروفاژهای موش صحرایی(۲۰)، پلاکت های انسانی(۱۱)، پانکراس گاو(۱۲) و مغز گاو(۱۳) به ترتیب ۵۱/۹، ۱۳۵، ۱۵۰، ۱۳۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۱۵۰ کیلو دالتون به دست آمده است. تنها در مطالعه خالص سازی NOS از استافیلوکوکوس، ۲ باند مجزا با وزن های ملکولی ۶۴ و ۶۷ کیلو دالتون در الکتروفورز SDS-PAGE به دست آمده است که نشان دهنده هترودایمر بودن این آنزیم می باشد(۱۰). در سایر مطالعات انجام شده، تنها ۱ باند در الکتروفورز SDS-PAGE به دست آمده است که نشان دهنده همودایمر بودن آنزیم مذکور می‌باشد(۱۳-۱۱،۱۶،۱۹). تفاوت در وزن ملکولی NOS استخراج شده از گونه‌ها و بافت‌های مختلف می تواند ناشی از ایزوآنزیم‌های مختلف این آنزیم و همچنین تفاوت‌های ساختاری آن باشد. در این مطالعه، pH و دمای اپتیمم به ترتیب ۷/۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد و انکوباسیون آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که فعالیت آنزیم در این محدوده دمایی ثابت بوده، در

دماهای بالاتر فعالیت آنزیم کاهش می یابد. دمای اپتیمم بـه دسـت آمـده بـرای فعالیـت آنـزیم در مطالعـه مـا، کـاملاً بـا دمـای اپتـیمم توصـیه شـده توسـط کیـت اندازه‌گیری فعالیت آنـزیم NOS شـرکت Calbiochem (Nitric Oxide Synthase Assay Kit, Colorimetric, Cat. No. 482702, Calbiochem) برابر بوده در حـالی که pH اپتیمم به دست آمده در مطالعه ما، بـه میـزان ۰/۴ بالاتر از pH بافر همین کیت برای انـدازه‌گیـری فعالیـت NOS می‌باشد. در سایر مطالعات انجام شده، pH اپتـیمم به دست آمده برای NOS استخراج شـده از گونـه هـای نوکاردیا و ماکروفاژهای موش صـحرایی(۲۰) بـه ترتیـب بین ۷/۵-۷ و ۷/۴ گزارش شده است که بسیار نزدیک به pH اپتیمم مطالعه ما می باشند.

Choi و همکاران نـشان دادنـد کـه NOS اسـتخراج شده از استافیلوکوکوس، بـه ترتیـب دارای pH و دمـای اپتیمم ۷ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد(۱) که ایـن دمـا، بسیار بالاتر از دمـای اپتـیمم گـزارش شـده توسـط سـایر محققین بوده، نشان دهنده مقاومت بیشتر NOS با منـشاء استافیلوکوکوس آرئوس می‌باشد. دمـای اپتـیمم فعالیـت NOS با منشاء گونه هـای نوکاردیـا(۱۶) و ماکروفاژهـای موش خانگی (murine macrophages)(۲۱) بـه ترتیـب ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد گـزارش شـده اسـت. دمـای اپتیمم به دست آمده در مطالعه ما، با دمای اپتـیمم NOS با منشاء گونه هـای توکاردیـا(۱۶) کـاملاً برابـر بـوده، در حالی که دمای اپتیمم گزارش شده برای NOS با منـشاء ماکروفاژهای مـوش خـانگی(۲۱)، بـسیار بـالاتر از دمـای اپتیمم به دست آمده در مطالعه ما می‌باشد.

در ادامـه ایـن مطالعـه، از غلظـت هـای ۲/۵ تـا ۲۰۰ میکرو مـولار ال-آرژینـین بـه عنـوان سوبـسترای آنـزیم NOS استفاده شد و نشان داده شد که با افـزایش غلظـت ال-آرژینین، فعالیت آنـزیم نیـز افـزایش یافتـه، بیـشترین فعالیت آن در غلظت ۱۰۰ میکرومـولار از ال- آرژینـین به دست می‌آید. همچنین Vmax و Km آنزیم به ترتیب ۲۵۰ نانو مـول در دقیقـه در میلـی گـرم پـروتئین و ۵/۳۲ میکرومول به دست آمد.

در مطالعـه Chen و همکـارانش (۱۹۹۵) مقـادیر Vmax و Km برای NOS با منشاء گونـه‌هـای نوکاردیـا به ترتیب ۲۷۴ نانومول در دقیقه در میلی‌گـرم پـروتئین و ۵/۷ میکرومـول گـزارش شـده اسـت(۱۶). Crack و همکـاران (۱۹۹۸) نیـز Km و Vmax آنـزیم NOS استخراج شده از مغز گوسـفند را بـه ترتیـب ۲/۸ میکـرو مول و ۲۲۵ نانو مول در دقیقه در میلی گرم پـروتئین، بـه دسـت آوردنـد(۱۴). Km ایزوآنـزیم nNOS مـوش صـحرایی(۲۲) و پـانکراس گـاو(۱۲) نیـز بـه ترتیـب ۲ و ۱۵/۷۲ میکرومول به دست آمده است.

نتـایج حاصـل از ایـن مطالعـه در جهـت ارزیـابی شـرایط مناسـب فعالیـت آنـزیم NOS بـه ویـژه NOS اسـتخراج شـده از کلیـه گوسـفند، مـی‌توانـد بـه درک مکانیسم‌های تنظیم‌کننده سنتز NO در کلیه و مقایسه آن با NOS بافت‌ها و ارگانیـسم‌هـای دیگـر کمـک نمـوده، بـدین ترتیـب راه‌گـشای مطالعـات بیـشتر و تکمیلـی و همچنین تهیه داروهای تولیدکننده و یا در برخـی مـوارد، داروهای بازدارنده سنتز NO گردد.

سپاسگزاری

این مقاله، بخشی از پایان‌نامه اخذ مقطع کارشناسـی ارشد رشته بیوشیمی بالینی آقای مراد رسـتمی بـا شـماره U-88092 بـوده کـه هزینـه انجـام آن توسـط معاونـت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی شـاپور اهواز تأمین گردیده است.

References

1. Choi WS, Chang MS, Han JW, Hong SY, Lee HW. Identification of nitric oxide synthase in Staphylococcus aureus. Biochem Biophys Res Commun 1997; 237(3): 554-558.

2. Lokhande PD, Kuchekar BS, Chabukswar AR, Jagdale SC. Nitric oxide: Role in biological system. Asian J Biochem 2006; 1(1): 1-17.
3. Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits; purification, characterization and role of prosthetic groups and substrate in regulation their association into a dimeric enzymes. JBC 1993; 268(28): 21120-21129.
4. Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. Andrology 2001; 22(3): 349-356.
5. Majid DS, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anaesthetized dogs. Am J Physiol 1993; 264(1 pt 2): F79-F87.
6. Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. Am J Hypertense 2001; 14(6 pt 2): 74S-82S.
7. Sharma SP. Nitric oxide and the kidney. Indian J Nephrol 2004; 14: 77-84.
8. Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity-the heart of the problem. J Cell Sci 2003; 116: 9-15.
9. Nobel prize in medicines 1998. Avaliable at: http://www.ijsidonline.info/admin/nobel_file/Nobel%20prize%20in%20Medicines%201998.pdf.IJSID. Accessed June 19, 2010
10. Hong IS, Kim YK, Choi WS, Seo DW, Yoon JW. Purification and characterization of nitric oxide synthase from Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett 2003; 222(2): 177-182.
11. Muruganandam M, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. Biochimica ET Biophysica Acta 1994; 1200: 1-6.
12. Nam SW, Seo D, Sung DS, Han JW, Hong SY, Lee HW. Nitric oxide synthase from bovine pancreas: Purification and characterization. Arch Pharm Res 1998; 21(2): 128-134.
13. Ohshima H, Oguchi S, Adachi H, Iida S, Suzuki H, Sugimura T, et al. Purification of nitric oxide synthase from bovine brain: immunological characterization and tissue distribution. Biochem Biophys Res Commun 1992; 183: 238-244.
14. Crack PJ, Tetaz T, Smith AI. Purification, characterization and distribution of ovine neuronal nitric oxide synthase. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1998; 120(4): 727-733.
15. Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. J Biol Chem 1998; 273(18): 11044-11048.
16. Chen Y, Rosazza JP. Purification and characterization of nitric oxide synthase (NOSNoc) from a Nocardia species. J Bacteriol 1995; 177(17): 5122-5128.
17. Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. J Biol Chem 1999; 274(20): 13729-13732.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
19. Evans T, Carpenter A, Cohen J. Purification of a distinctive form of endotoxin-induced nitric oxide synthase from rat liver. Proc Natl Acad Sci 1992; 89(12): 5361-5365.
20. Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. J Bio Chem 1991; 266(19): 12544-12547.

21. Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. J Biol Chem 1991; 266(34): 22789-22791.

22. Bredt DS, Snyder S. Isolation of nitric oxide synthatase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl Acad Sci USA 1990; 87(2): 682-685.