مقایسه اثر کلرورسدیم بر روی میان کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالازهای اس پرجی لوس نایجرو جگرگاو

دکتر علی اکبر موسوی موحدی و سیروس قبادی

مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران

چکیده

اثر غلظت‌های متفاوت کلرورسدیم بر روی میان کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالازا از منابع اس پرجی لوس نایجرو جگر گاو توسط روشهای دیالیز تعادلی، الکتروفورز و ویسکومتری در pH= ۳/۲ بافرگلیسین مورد مطالعه قرار گرفته است. با استفاده از روابط پتانسیل پیوندی و ایمن، مقادیر انرژی آزاد و از روابط هیل و اسکاچارد، مقدار تعاونی بودن میان کنش مشخص شده و از روی ویسکوزیتی نسبی و ژل‌الکتروفورز طریق باز و جمع شدن ماکرو ملکول کاتالازهای اس پرجی لوس نایجروجگرگاو مورد مقایسه و استقامت ساختمانی آنها مورد بررسی قرار گرفته است.

J. of Sci. Univ. Tehran, Vol 20 (1991), no2, p. 149-159

Comparative effect of sodium chloride on the interaction between sodium n-dodecyl sulphate and catalases (Aspergillus niger and bovine liver)

Dr.Ali Akbar Moosavi-Movahedi and Syrus Ghobadi

Institute of Biochemistry and Biophysics, Universiy of Tehran P.O.Box 13145-1384

Abstract

The effect of various concentrations of sodium chloride on the interaction between sodium n-dodecyl sulphate (SDS) and Catalases (Aspergillus niger and Bovine liver) were compared by a combination of equilibrium dialysis, electrophoresis and viscometry techniques at pH=3.2, glycine buffer.

A theoretical approach based on the binding potential concept of Wyman is presented and has been used to make estimates of the apparent Gibbs energies of

catalases-SDS complexes, comparing the structural stability of said catalases.

The binding date have been used in terms of the Hill and Scatchard equations which it is shown the type of binding.

مقدمه

کاتالاز (**E.C.1.11.1.6;H_2O_2:H_2O_2 -Oxidoreductase**) آنزیمی است که در تمامی سلولهای هوازی موجود است و موجب تجزیه پراکسید هیدروژن به اکسیژن مولکولی و آب میشود. تاکنون تمامی کاتالازها از انواع منابع دارای چهار دون واحد بوده‌اند و وزن مولکولی تمامی کاتالازها حدود ۲۵۰۰۰۰ دالتن است بجز کاتالاز از منبع اس پرجی لوس نایجر که برابر ۳۵۴۰۰۰ دالتن میباشد (**Moosavi-Movahedi, A.A., etal. 1987**). البته اس پرجی لوس نایجر کاتالاز دارای اختلافات دیگری نیز نسبت به سایر کاتالازها که از منابع دیگر مهیا میگردند میباشد. اس پرجی لوس نایجر کاتالازیک گلیکو پروتئین میباشد که شامل ۸/۳٪ شکر طبیعی و ۱/۹٪ گلوکز آمین است (**Kikuchi-Torii,K.,etal,1982**) اس پرجی لوس نایجر کاتالاز دارای ساختمان مقاوم‌تری نسبت به کاتالازجگرگاو میباشد وقتی که در مجاورت درجه حرارت، pH وپراکسیدهیدروژن قرار میگیرد (**Wasserman, B.P., etal,1981**) و این مسئله توسط اثر متقابل دناتوره کننده‌ای مثل سدیم دودسیل سولفات که یکی از قویترین دناتوره کننده‌های بیولوژیکی است با کاتالازهای از منابع اس‌پرجی‌لوس‌نایجر و جگرگاو از نظر ترمودینامیکی هم مشاهده گردید.

(**Moosavi-Movahedi,etal,1988, 1988, 1991**) از تفاوتهای شاخص کاتالاز اس پرجی لوس نایجر نسبت به سایر منابع، فعال شدن آنزیم در مجاورت سدیم دودسیل سولفات در pH= ۶/۴ با فرفسفات است (**Jones, M.N., etal 1987**)، تفاوتهائی دیگر هم در اثر متقابل با دودسیل تری متیل آمونیوم برماید بعنوان دناتوره کننده کاتیونی مشاهده شده است (**Moosavi- Movahedi,etal, 1989**).

هدف از این مقاله مطالعه خواص شیمی فیزیکی اثر متقابل کلرور سدیم و سدیم دودسیل سولفات در غلظت‌های مختلف بر روی ساختمان کاتالاز از منبع اس پرجی لوس نایجر و مقایسه آن با کاتالاز از منبع جگرگاو میباشد.

مواد و روشهای تجربی

کاتالاز از منبع اس پرجی لوس نایجر و جگرگاو از شرکت سیگما خریداری گردیده است. تمامی حلالها و نمکها از درجه بالای خلوص برخورداد بوده و از شرکت مرک خریداری گردیده است. سدیم دودسیل سولفات با درجه بالای خلوص از شرکت سیگما خریداری شده‌است. برای تهیه با فرها ازگلیسین استفاده شده‌است که غلظت ۵۰ میلی مولار بعنوان پایه استفاده شده تا خطای اثر دونان وجود نداشته باشد و در pH= ۳/۲ کار شده است، سپس غلظت‌های گوناگون نمک طعام ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰ میلی مولار تهیه کرده و آزمایشها درون آنها انجام گرفته‌اند. لوله دیالیز مصرف شده از شرکت سیک انگلستان تهیه شده است (**MW cut-off 10000-14000**) در تمامی آزمایشها آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شده است.

روشها

برای اندازه‌گیری مقدار پیوندشدن سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز از روش دیالیز تعادلی استفاده شده‌است. ۲ میلی‌لیتر از سدیم دودسیل سولفات در غلظتهای گوناگون (**1-20 mM**)علیه ۲ میلی لیتر کاتالاز که درون کیسه دیالیز قرار گرفته بمدت ۹۶ ساعت در حمام بن ماری در ۲۷°C به تعادل رسانده شده و سپس با استفاده از روزانیلین هیدروکلراید و مخلوط (۱:۱) اتیل استات و کلروفرم رنگ سنجی نموده و در جذب ۵۵۰ ناتومتر با دستگاه شیمادزو ماورای بنفش- مرئی مدل ۱۶۰ خوانده میشود که این روش قبلاً شرح داده شده است (**Moosavi- Movahedi,A.A.,Housaindokht,M.R., 1990**)

ویسکوزیته توسط ویسکومتر استوالد اندازه‌گیری شده‌است که قبلاً شرح داده شده است

(Moosavi-Movahedi, A.A., etal, 1990)

ژل الکتروفورز با غلظت ۸/۱٪ آکریل آمیدو ۳/۵٪ نسبت بیس به بیس و آکریل آمید با روش ابداعی با کمک

(Darbre,A.(1988),Hames,B.D.and Rickwood, D.(1990)

تهیه کرده و بمدت دو ساعت قبل از گذاشتن نمونه بجریان ۱۸۰ ولت وصل کرده و تانک بالا و پائین را اسید استیک ۰/۹ نرمال قرار میدهیم سپس برای هر لوله مقدار ۲۰ میکروگرم از کاتالاز قرار داده و بمدت سه ساعت و هر لوله جریان ۸ میلی‌آمپر کار را ادامه میدهیم و سپس ژلها را استخراج کرده و در کموسی بلو (۰/۲۵٪) رنگ کرده و بعد از آن با مخلوط اسید استیک و متانول (آب مقطر ۴۲۵ml+ متانول ۵۰۰ml+ اسید استیک ۷۵ml) ژلها را کم رنگ کرده و سپس در مخلوط اسید استیک و متانول رقیق (آب مقطر ۸۷۵ml+ متانول ۵۰ml+ اسید استیک ۷۵ml) یک شب نگهداری شده‌است.

در تمامی آزمایشها وزن ملکولی اس پرجی لوس نایجرکاتالاز را ۳۵۴۰۰۰ و وزن ملکولی کاتالاز جگر گاو؛ ۲۵۰۰۰۰ استفاده شده است و غلظت بکار رفته کاتالاز برابر ۰/۱٪ ($\frac{W}{V}$) بوده است.

نتایج و بحث

شکل ۱ (a و b) نشان دهنده ایزوترمهای پیوندی ($\bar{v}$، تعداد مولهای سدیم دودسیل سولفات به یک مول کاتالاز، برحسب لگاریتم سدیم دودسیل سولفات آزاد) برای کاتالاز از منبع اس پرجی لوس نایجر (شکل ۱a) و کاتالاز از منبع جگر گاو (شکل ۱b) میباشد. همانطور که در شکل نمایان است کلرور سدیم اثرات متفاوتی بر روی کاتالاز از منبع اس پرجی لوس نایجر نسبت به جگر گاو میگذارد.

برای اس پرجی لوس نایجر کاتالاز مؤثرترین غلظت کلرور سدیم ۱۰ میلی مولار است که کاملاً منحنی را درسمت چپ‌ترین حالت میرساند و با ازدیاد غلظت نمک بطرف راست تغییر مییابد و حتی در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار کلرور سدیم بطرف راست ایزوترم پیوندی بدون حضور کلرور سدیم قرار میگیرد (شکل ۱a)، اما در شکل (۱b)، اثر کلرور سدیم بر روی کاتالاز جگر گاو متفاوت است و با ازدیاد غلظت کلرور سدیم از ۱۰ میلی مولار تا ۵۰ میلی مولار بطرف چپ تغییر مینماید.

با استفاده از روش پتانسیل پیوندی وایمن، از سطح زیر منحنی‌های ایزوترمهای پیوندی طبق روابط زیر استفاده نموده و انرژی آزاد اثر متقابل سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز محاسبه میگردد که قبلاً شرح داده شده است.

$$\pi = RT \int_{\bar{v}_{i=0}}^{\bar{v}_i} \bar{v}_i \, d\ln[SDS]_{free} \qquad (۱)$$

π ، پتانسیل پیوندی و ایمن است که بستگی به ثابت تعادل K_{app} دارد.

$$\pi = RT \, Ln \left(1 + K_{app}[SDS]^{\bar{v}}_{free}\right) \qquad (۲)$$

K_{app} از روابط (۱) و (۲) بدست می‌آید که میتوان از رابطه (۳) مقدار انرژی آزاد (ΔG) و انرژی آزاد بازاء هر $\bar{v}$ ($\Delta G_{\bar{v}}$) را بدست آورد.

شکل ۲a و ۲b بترتیب نشان دهنده $\Delta G_{\bar{v}}$ برحسب مقدار $\bar{v}$ برای میان کنش بین سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز از منبع اس پرجی لوس نایجر و جگر گاو می‌باشد. شکلها نشانگر این هستند که اس‌پرجی لوس نایجر کاتالاز در ۱۰ میلی مولار غلظت کلرور سدیم قوی‌ترین اثر را بر روی این میان کنش داشته و با ازدیاد غلظت کلروسدیم افینیته میان کنش کاهش می‌یابد حتی تا جائی که اثر متقابل در ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار کلروسدیم از صفر میلی‌مولار کلروسدیم کمتر است و نسبت‌های میان کنش به همان مقدار تغییرات $\Delta G_{\bar{v}}$ می‌باشد چون پارامتر انرژی آزاد یک پارامتر مقداری ترمودینامیکی است. همانطور که در شکل ۲ (a و b) نمایان است مثلاً برای $\bar{V} = ۱۰۰۰$ مقدار $\Delta G_{\bar{v}}$ که نشان دهنده افینیته میان کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز است که در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۰، ۲۵، ۵۰ میلی‌مولار کلرور سدیم برابر ۱۹/۹-، ۱۹/۶-، ۱۹/۲-، ۱۸/۵-، ۱۸-، کیلو ژول بر مول برای اسپرجی‌لوس‌نایجر به ترتیب می‌باشد و برای غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰ میلی مولار کلرور سدیم برابر ۲۵-، ۲۷-، ۲۹-، ۳۰-، ۳۴- کیلوژول بر مول برای کاتالاز جگر گاو بترتیب می‌باشد. که این ارقام نشان‌دهنده اینست که کاتالاز جگر گاو در اثر متقابل با سدیم دودسیل سولفات دارای

استقامت کمتری نسبت به اس پرجی لوس نایجر کاتالاز دارد و هرچه غلظت کلرور سدیم افزایش یابد، استقامت کاتالاز جگر گاو نسبت به کاتالاز اس پرجی لوس نایجر کمتر میشود بدلیل اینکه تفاضل انرژی آزاد افزایش می‌یابد و این افزایش در غلظتهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار کلرورسدیم خیلی بیشتر می‌شود چون این غلظت‌های کلرور سدیم موجب افزایش مقاومت کاتالاز اس‌پرجی لوس نایجر در اثر متقابل با سدیم دودسیل سولفات شده‌است.

با استفاده از روابط اسکاچاردوهیل

(Moosavi-Movahedi, A.A. and Goodarzi, M., 1989)

$$\frac{\bar{\nu}}{[SDS]_{free}} = K(n - \bar{\nu}) \qquad (۴)$$

$$Log\left(\frac{\bar{\nu}}{g - \bar{\nu}}\right) = n_H \; Log\,[SDS]_{free} + n_H \;\; Log\,K \qquad (۵)$$

میتوان میان کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز را تفسیر نمود. همانطور که در شکل **۳a**، هویداست برای اس پرجی لوس نایجر کاتالاز همگی منحنی‌های اسکاچارد گنبدی شکل هستند که نشانه تعاونی مثبت است که در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار کلرور کلسیم شدت بیشتری یافته و سپس در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار کاهش یافته است، اما در شکل **۳b**، میان کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز جگر گاو را نشان میدهد که با ازدیاد غلظت‌های کلرور سدیم تا ۲۵ میلی‌مولار تعاونی مثبت افزایش یافته اما در غلظت ۵۰ میلی‌مولار دیگر شکل منحنی تعاونی مثبت را نشان نمی‌دهد بلکه نشانگر یک میان کنش بیشتر الکترواستاتیک است و همانطورکه در شکل نمایان است حدود ۵۴۰ اسید امینه کاتالاز جگر گاو در سطح بروز کرده‌است یعنی ۵۰ میلی‌مولار نمک باعث شده که همه اسیدهای امینه قابل تیتر شدن در سطح باشند. شکل ۴ (**b** و **a**) منحنی‌های هیل هستند و مقدار n_H که ضریب هیل میباشد نشان دهنده حالت تعاونی سیستم است که اگر بزرگتر از ۱ باشد تائیدکننده همان روند اسکاچارد است و در ۵۰ میلی‌مولار کلرورسدیم در شکل **۴b** برای کاتالاز جگر گاو n_H =۱ است که نشان‌دهندهٔ یک میان کنش ویژه از نوع الکترواستاتیک می‌باشد.

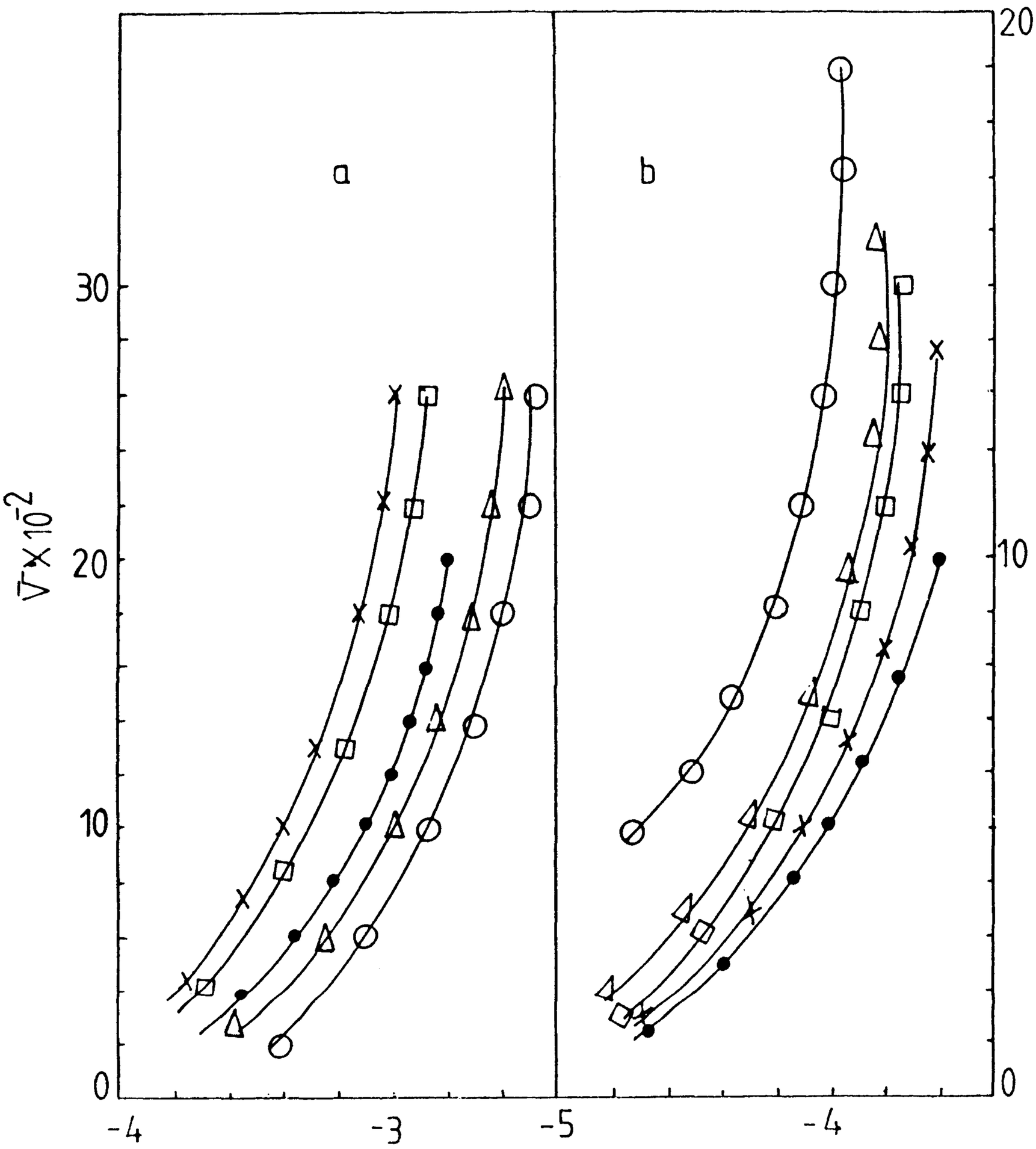
شکل ۵(**b** و **a**) نشان‌دهنده ویسکوزیته نسبی برحسب غلظت سدیم دودسیل سولفات در اثر متقابل با کاتالاز است. در شکل **۶a** که مربوط به اس پرجی لوس نایجر کاتالاز است منحنی بدون کلرورسدیم نشان‌دهنده اینست که تا غلظت **۲mM** سدیم دودسیل سولفات کاتالاز باز میشود و سپس جمع میگردد که این مسئله توسط پلی‌اکریل آمیدژل الکتروفورز که تحرک یونی کاتالاز را در مجاورت با سدیم دودسیل سولفات که در ژل اسیدی است تائید میگردد. (شکل **۶a**).

مطالعه ویسکوزیته نسبی در حضور کلرورسدیم همان مسئله قبل را تکرار می‌نماید در ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار کلرورسدیم کاتالاز بازتر و در ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار جمع‌تر میشود ولی شکل **۵a** مسئله‌ای را هم نشان میدهد که منحنی ویسکوزیته در ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار دوشاخه شده‌است احتمالاً میتوان گفت که در این غلظت نمک اس پرجی لوس نایجر کاتالاز بدون واحد تبدیل شده است. شکل **۵b** مربوط به کاتالاز جگر گاو است که منحنی بدون حضور کلرور سدیم نشان‌دهنده جمع‌شدگی در اول و حدود غلظت **۳mM** سدیم دودسیل سولفات بازشدگی را نشان میدهد که این مسئله هم توسط ژل الکتروفورز اسیدی در مجاورت همان غلظت‌های سدیم دودسیل سولفات تائید میگردد. (شکل **۶b**).

شکل **۶b** تحرک یونی کاتالاز جگر گاو را نشان میدهد که تا غلظت حدود کمتر از ۴ میلی‌مولار سدیم دودسیل سولفات جمع شده و سپس باز گردیده است. اما حضور کلرور سدیم برای کاتالاز جگر گاو موجب بازشدن سیستم میگردد و با ازدیاد غلظت کلرورسدیم همان روند سابق را طی مینماید اما در **۵۰mM** کلرور سدیم تغییرات ویسکوزیته خیلی کم است و بازهم نشان‌دهنده این موضوع میتواند باشد که بیشتر اسیدهای امینه در حضور کلرور سدیم در معرض قرار گرفته و ازدیاد غلظت سدیم دودسیل سولفات بسیار کم موجب تغییر کنفورماسیون آن میگردد.

در خاتمه از شورا و معاون محترم پژوهشی دانشگاه تهران که موجب مساعدت‌های فراوان و پشتوانه مالی برای انجام طرح "اثر قدرت یونی بر روی میان‌کنش کاتالاز با سدیم دودسیل سولفات" گردیدند کمال تشکر را داریم.

از خانم رضائی که در این قسمت طرح زحمات زیادی را متحمل شده‌اند کمال قدردانی را می‌نمائیم.

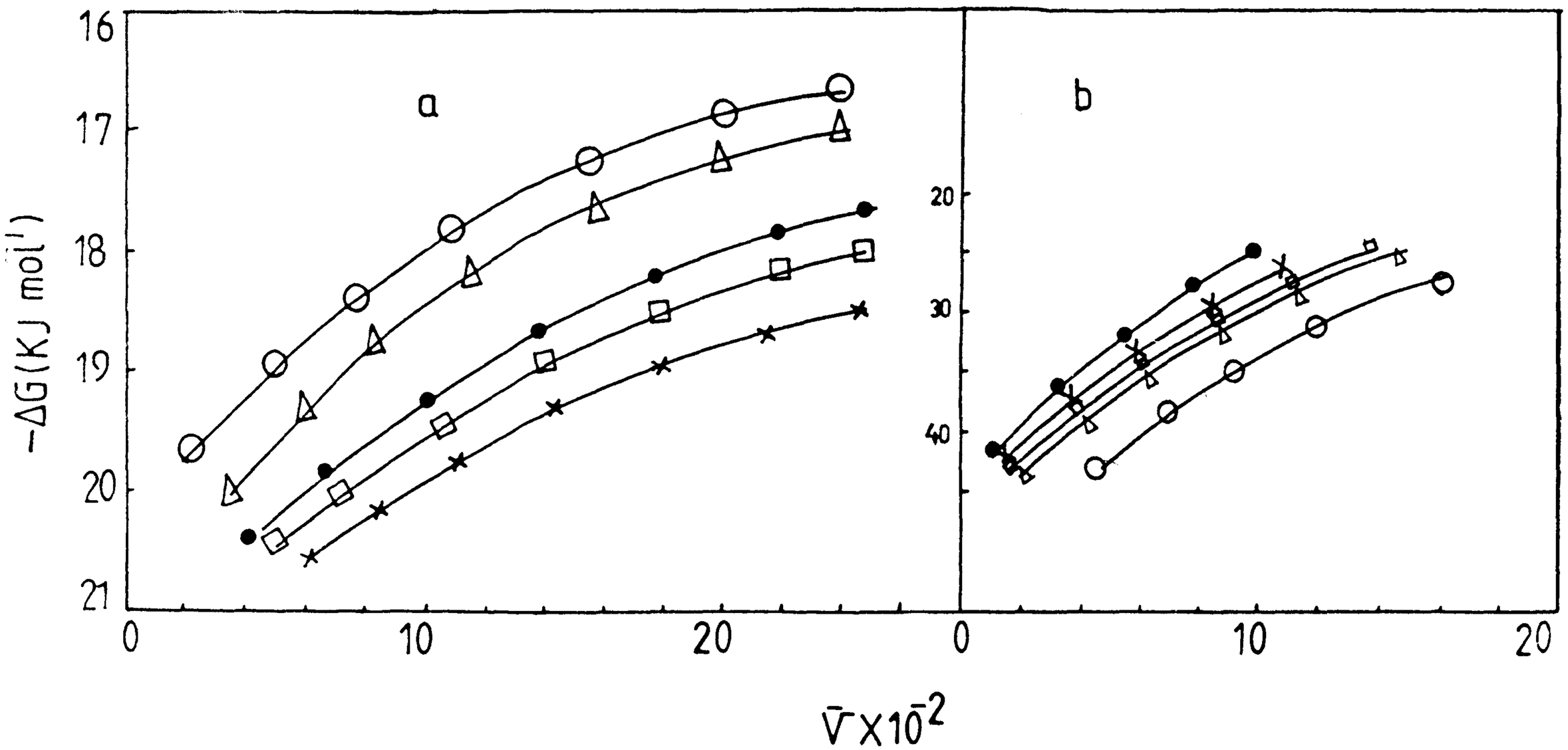


شکل ۱- ایزوترم‌های پیوندی اثر متقابل سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز در غلظت‌های متفاوت کلرورسدیم در ۲۷°C و pH=۳/۲، ۵۰mM با فرگلیسین

بدون کلرورسدیم ؛ ۱۰mM,x کلرورسدیم؛ □، ۲۰mM;Δ ، ۲۵mM کلرورسدیم؛ ۵۰mM,o کلرورسدیم. (این علائم در تمام شکلها همانند انتخاب شده‌اند).

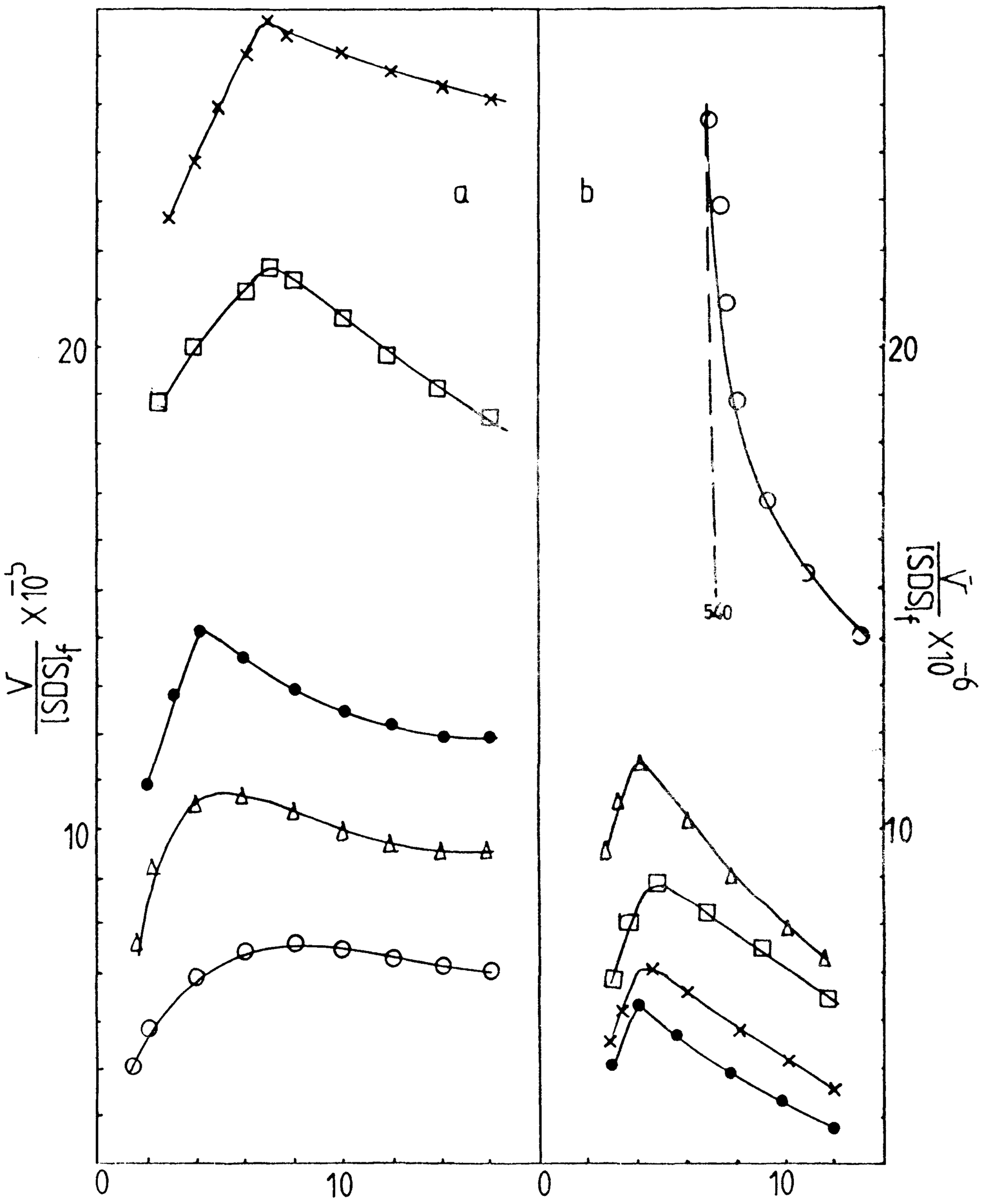
a) اس پرجی لوس نایجر کاتالاز

b) کاتالاز جگر گاو



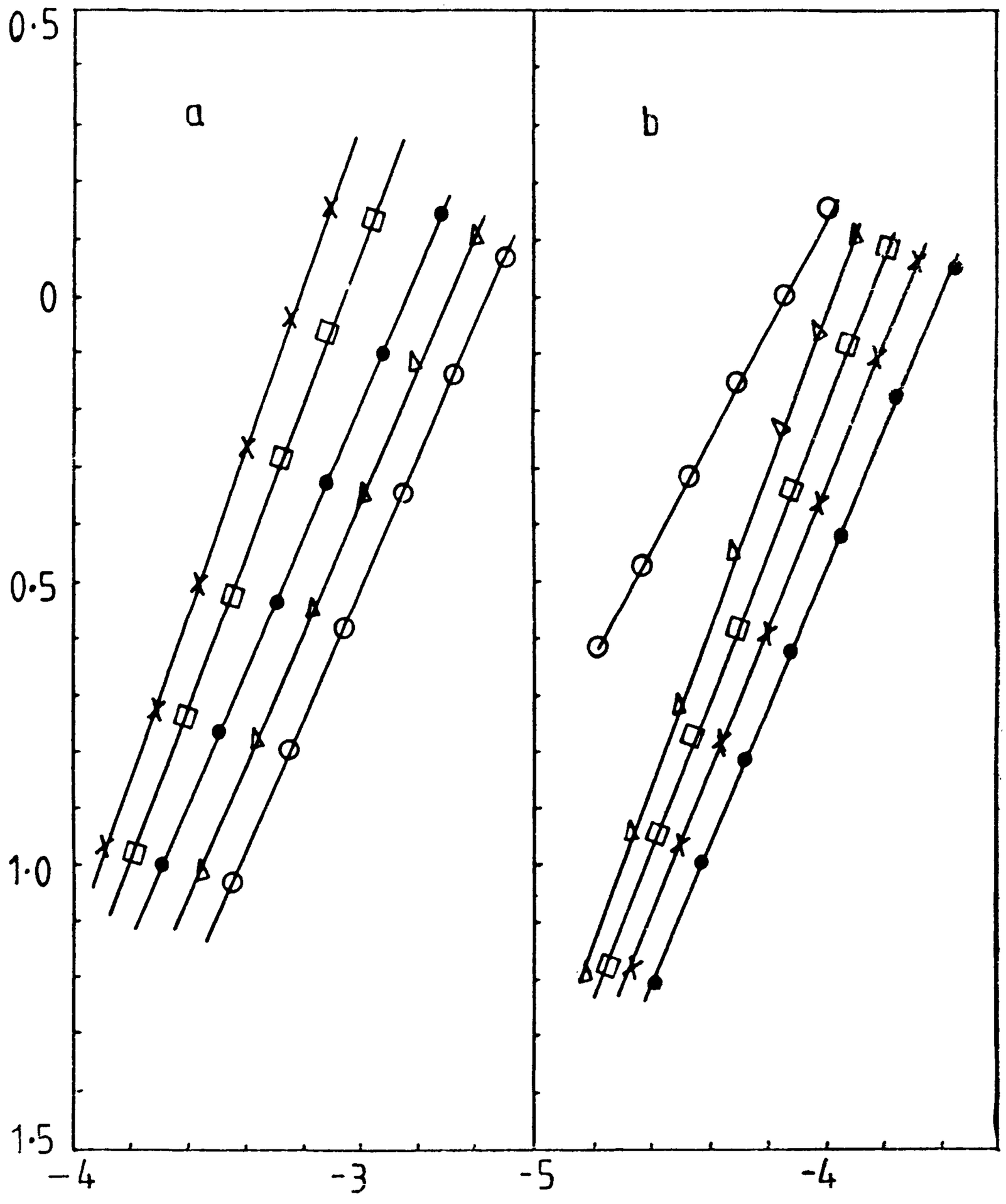
شکل ۲- تغییرات انرژی آزاد بازاء هر $\bar{v}$ برحسب ($\Delta G_{\bar{v}}$) برای میان‌کنش سدیم دودسیل با کاتالاز در غلظت‌های متفاوت کلرورسدیم

a) اس پرجی لوس نایجر کاتالاز **b)** کاتالاز جگرگاو



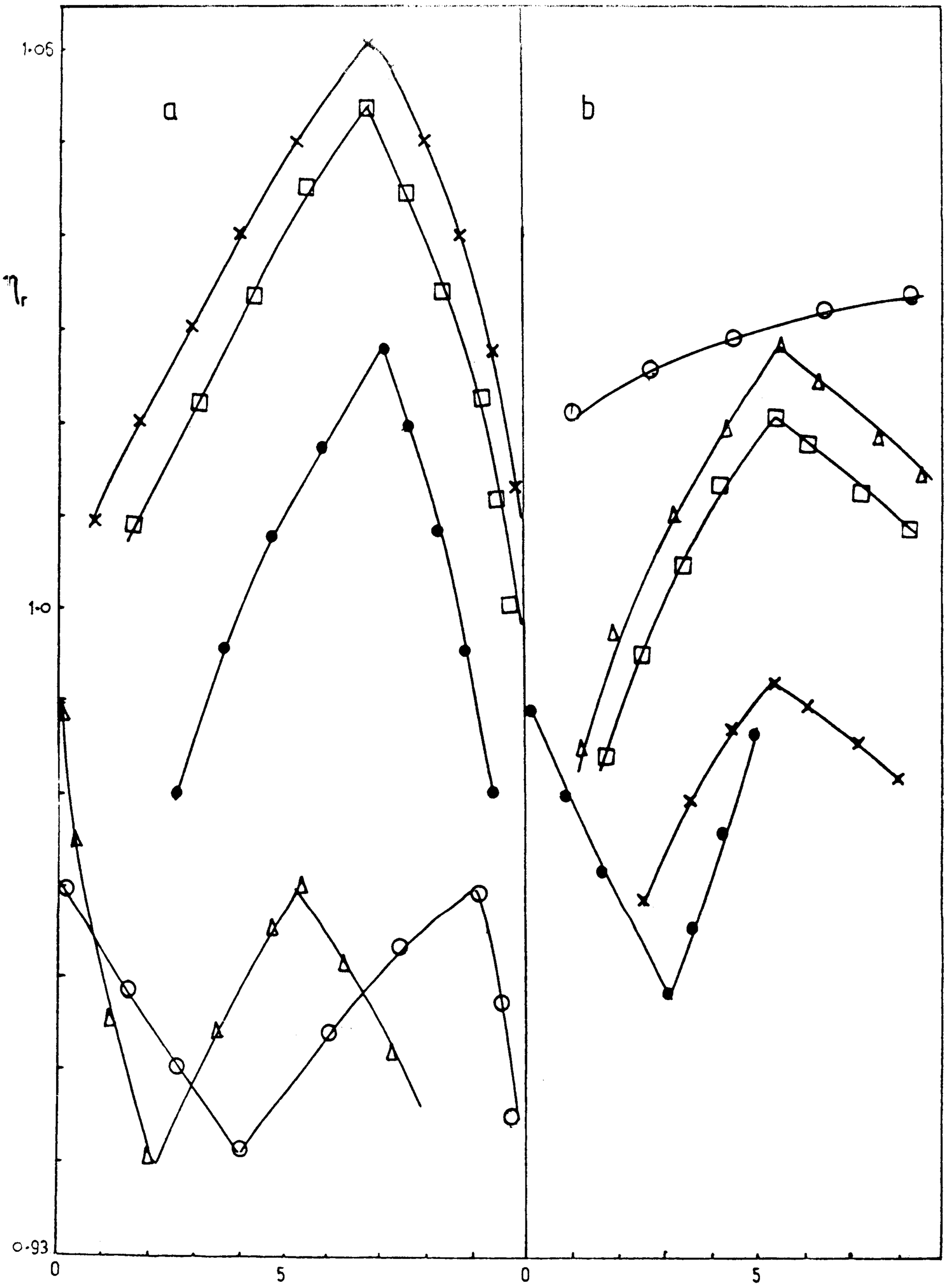
b) کاتالاز جگر گاو **a)** اس پرجی لوس نایجر کاتالاز

شکل ۳- منحنی اسکاچارد، میان‌کنش سدیم دودسیل با کاتالاز
در غلظت‌های متفاوت کلرورسدیم

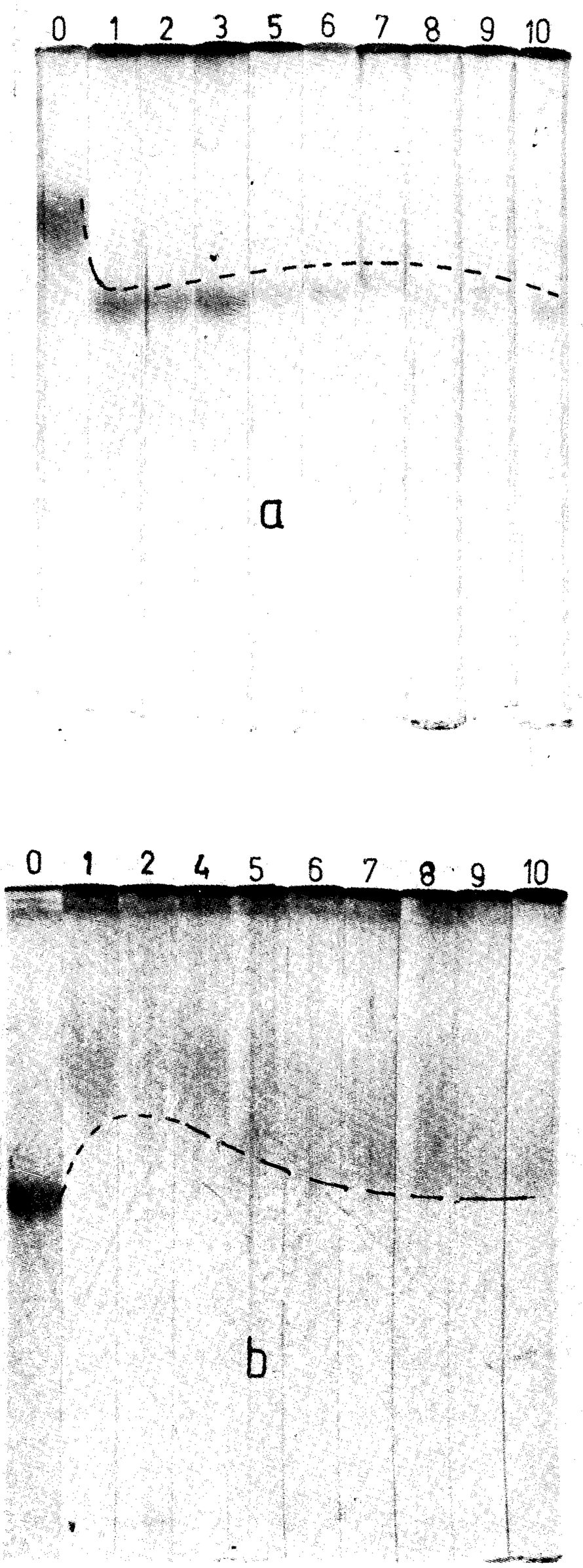


a) اس پرجی لوس نایجر کاتالاز b) کاتالاز جگر گاو

شکل ۴- منحنی هیل، میان‌کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز در غلظت‌های متفاوت کلرورسدیم



شکل ۵- منحنی ویسکوزیته نسبی میان‌کنش کاتالاز با سدیم دودسیل سولفات در غلظت‌های متفاوت کلرورسدیم در ۲۷°C



شکل ۶- نشان‌دهنده لوله‌های اکریل آمیدژل الکتروفورزاسیدی در مجاورت غلظت‌های متفاوت سدیم دودسیل سولفات
a) اس پرجی لوس نایجر کاتالاز b) کاتالاز جگر گاو

Refrences

Darbre, A. (1988) "Practical Protein Chemistry"; John Wiley and Sons Ltd, New York, p.14.

Hames, B.D., Rickwood,D. (1990):"Gel Electrophoresis of Proteins"; Oxford University Press, New York, p.3.

Jones, M.N., Finn, A., Moosavi- Movahedi, A.A. and waller, B.J. (1987): "The Activation of Aspergillus niger Catalase by Sodium n- dodecyl suplphate"; Biocnim. Biophys. Acta 913, 395.

Kikuchi- Torii, K, Hayashi, S., Nakamoto, H. and Nakamura, S. (1982): "Properties of Aspergillus niger Catalase"; J. Biochem. 92, 1449.

Moosavi- Movahedi, A,A, Wilkinson, A. E. and Jones, M.N. (1987): "Characterization of Aspergillus niger Catalase"; Int. J. Biol. Mocromol. 9. 327.

Moosavi- Movahedi, A.A., Jones, M.N. and Pilcher, G. (1988): "Thermodynamics of the Interaction of Sodium n-dodecyl sulphate with Aspergillus niger Catalase in low ionic strength aqueous solutions"; Int.J. Biol. Mocromol. 10, 75.

Moosavi-Movahedi, A.A., Jones, M.N. and Pilcher, G. (1989): "Thermodynamics of the Interaction of Sodium n-dodecyl sulphate with Aspergillus niger Catalase in high ionic strength aqueous solutions"; Int.J. Biol. Mocromol. 11, 26.

Moosavi-Movahedi, A.A., Pilcher,G. and Jones, M.N. (1989): "Thermodynamics of the Interaction between n-dodecyl trimethylammonium Bromide and Catalase"; Thermochimica Acta, 146, 215.

Moosavi-Movahedi, A.A., and Ghobadi, s. (1991): "Thermodynamic Analysis of SDS and Aspergillus niger Catalase Interaction" Thermochimica; Ada 189/201.

Moosavi-Movahedi, A.A., and Housaindokht (1990): "Thermodynamic Studies on the Interaction between Sodium n-dodecyl sulphate and Histone H_2B"; Physiol. Chem. Phys. and Med. NMR. 22, 19

Moosavi-Movahedi, A.A., Goodarzi, M. and Housaindokht, M.R. (1990): "Folding of the interaction of Histon H_1 with Sodium n-dodecyl sulphate"; J. Sci. I. R. Iran, 1, No. 2, 81.

Moosavi-Movahedi, A.A., and Housoindokht, M.R. (1990) "The Influence of Charge Density on the Interaction between Sodium n-dodecyl sulphate with H_1"; J.Sci. I.R. Iran, 1, No. 4. 253.

Wasserman, B.P. and Hultin, H.O. (1981): "Effect of Deglycosylation on the Stability of Aspergillus niger Catalate"; Arch. Biochem. and Biophys. 212, 385.