



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية – كلية العلوم

قسم علوم الحياة

**الخصائص الفيزيوكيميائية لأنزيم Superoxide  
Dismutase المنقى جزئياً من أوراق نبات الطرفة  
*Tamarix aphylla* L.**

رسالة تقدمت بها

**إيمان سلمان رهيف البديري**

بكالوريوس علوم حياة / كلية العلوم / جامعة القادسية

٢٠١٢

الى مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات

بأشراف

**أ. م. د. نزار عبد الأمير حمزة**

كانون الاول 2016 م

ربيع الاول 1438 هـ

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مِّنْ نَّشَأٍ وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ

عَلِيمٍ﴾

صدق الله العظيم

# الاهداء

الى ..... من تشرفت السماء بوجودهم وتطهرت الارض برقدتهم فيها

الى ..... من اختصهم الله لنفسه واستخلصهم لحمل الامانة

الى ..... الذين اذهب الله عنهم الرجس وطهرهم تطهيرا

مصاييح الدجي واعلام الهدى محمد واله الاطهار

الى ..... ينبوع المحبة ورمز التضحية ..... والدي

الى ..... الامل الذي من اجله اعيش وابدع ..... والدي

الى ..... من اشد بهم ازري ..... اخوتي واخواتي

الى ... كل من بهج بنجاحي وتقديمي ، أهدي جمدي المتواضع هـ ..... ذا...

الباحثة

إيمان

الشكر والتقدير

## بسم الله الرحمن الرحيم

الشكر لمن يستحق الشكر والثناء الواحد الاحد وهو به جدير وبالحمد والتسبيح عليم خبير .  
والصلاة والسلام على خاتم الانبياء والمرسلين محمد (ص) وعلى آل بيته الاطهار واصحابه الغر  
الميامين .

يطيب لي وقد اشرفت على اتمام رسالتي بأذن الله ان اتقدم بشكري الجزيل وتقديري الفائق  
وامتثاني العميق الى استاذي الفاضل الاستاذ المساعد الدكتور نزار عبد الأمير حمزة لأشرفه الرؤوب  
وتوجيهاته السديدة التي كانت خير عون لي ومرشد على اتمام هذا العمل راجية من الله ان يمن عليه  
بالصحة والعافية والعمر المديد خدمة للعلم وطلابه .

واتوجه بالشكر الجزيل الى عميد كلية العلوم الاستاذ المساعد الدكتور عبد الأمير سمير  
سعدون ورئيس قسم علوم الحياة الاستاذ المساعد الدكتور جاسم حنون هاشم .

كما يدعوني الوفاء ان اتقدم بالشكر الجزيل الى الاستاذ الدكتور عصام فاضل علوان الجميلي /  
جامعة بغداد – معهد الهندسة الوراثية متمنية له دوام التوفيق والازدهار، والاستاذة الدكتورة سهيلة  
حسين باجي / جامعة القادسية – كلية التربية .

كما اتوجه بالشكر والامتنان الى الزملاء اجمع من طلبة الدراسات العليا واخص بالشكر صديقتي  
سارة نائر عبد الامير، وكل من ساندني طيلة مدة البحث .

وليكن ختام شكري مسكا وان اقدمه الى من انتظروني ساعات طوال اثناء العمل اخوتي  
مشتاق وعلي .

الباحثة

## اقرار المشرف

اشهد ان رسالة الماجستير الموسومة بـ ( الخصائص الفيزيوكيميائية لأنزيم Superoxide Dismutase المنقى جزئياً من أوراق نبات الطرفة *Tamarix aphylla L.* ) قد اعدتها الطالبة إيمان سلمان رهيف بأشرافي ، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات .

التوقيع :

الاسم : د. نزار عبد الامير حمزة

اللقب العلمي : استاذ مساعد

العنوان : كلية التقانات الاحيائية – جامعة القادسية

التاريخ : / / ٢٠١٦

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية المقدمة من الاستاذ المشرف احيل هذه الرسالة الى المقيمين اللغوي والعلمي لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم : د. حبيب وسيل شبر

اللقب العلمي : استاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ : / / ٢٠١٦

## اقرار المقوم اللغوي

أشهد انه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة إيـمان سلمان رهيـف الموسومة بـ  
(الخصائص الفيزيوكيميائية لأنزيم Superoxide Dismutase المنقى جزئياً من أوراق  
نبات الطرفة. *Tamarix aphylla* L.).

التوقيع :

الاسم : د. خالد عبد فـزاع

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية – جامعة القادسية

التاريخ : / / ٢٠١٧

## اقرار لجنة المناقشة

نشهد اننا اعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ ( الخصائص الفيزيوكيميائية  
لأنزيم **Superoxide Dismutase** المنقى جزئياً من أوراق نبات الطرفة *Tamarix aphylla L.* )  
وناقشنا الطالبة (إيمان سلمان رهيف ) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 16 / 3 / 2017 وانها  
جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات وبتقدير ( امتياز ) .

التوقيع :

التوقيع :

عضو اللجنة

رئيس اللجنة

الاسم : د. ظافر عبد الكاظم جميل

الاسم : د. محمد عبد الله جبر

اللقب : استاذ مساعد

اللقب : استاذ

العنوان : كلية التربية / جامعة القادسية

العنوان : كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ : / / 2017

التاريخ : / / 2017

التوقيع :

التوقيع :

عضو اللجنة ( المشرف )

عضو اللجنة

الاسم : د. نزار عبد الامير حمزة

الاسم : د. كريم طالب خشان

اللقب : استاذ مساعد

اللقب : استاذ مساعد

العنوان : كلية التقانات الاحيائية / جامعة القادسية

العنوان : كلية العلوم / جامعة الكوفة

التاريخ : / / 2017

التاريخ : / / 2017

## اقرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته ..... المنعقدة في / / 2017 وقرر منحها شهادة  
الماجستير في علوم الحياة / علم النبات .

التوقيع :

الاسم : د. نبيل عبد الرضا

اللقب العلمي : استاذ

التاريخ :

## الخلاصة

اجريت الدراسة الحالية للتحري عن خصائص انزيم السوبراوكسايد دسميونيز (SOD) في بعض الانواع النباتية المنتخبة والتي شملت اوراق كل من الطرفة *Tamarix aphylla* L. و نبق العجم *Phragmites australis* و القصب *Alhagi maurorum* و العاقول *Elaeagnus angustifoli* L. . ان اعلى فعالية نوعية للانزيم تركزت في المستخلص الخام لأوراق الطرفة ، اذ بلغت 24.98 وحدة / ملغم بروتين، ثم يليها نبق العجم 16.71 وحدة / ملغم بروتين و العاقول 11.58 وحدة / ملغم بروتين ، في حين اعطى القصب اقل فعالية نوعية بلغت 7.99 وحدة/ ملغم بروتين . ثم اخذت بقية اجزاء الطرفة والتي شملت (الازهار، والثمار والبذور) اذ اعطت الازهار فعالية نوعية بلغت 17.53 وحدة / ملغم بروتين اما الثمار فقد اعطت فعالية نوعية بلغت 8.99 وحدة / ملغم بروتين في حين سجلت البذور اقل فعالية نوعية بلغت 5.66 وحدة / ملغم بروتين، باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 0.1 مولار و ذي الرقم الهيدروجيني 7.8 والحاوي على 0.1 ملي مولار Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid (EDTA-Na<sub>2</sub>) و 5% Polyvinyl pyroledon (PVP) و Pyrogallol مادة اساس . هدفت الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم . اذ بينت النتائج ان الظروف المثلى لكل من EDTA-Na<sub>2</sub> ، PVP ، نسبة الاستخلاص المثلى ، pH المحلول الدارى ، تركيز المحلول الدارى و زمن الاستخلاص كانت 1 ملي مولار ، 2% ، 3:1 ، 7.8 ، 0.1 مولار و 20 دقيقة على التوالي .

نقي الانزيم من اوراق الطرفة بعدد من الخطوات شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (50-75) % تليها خطوة التبادل الايوني باستخدام عمود DEAE-Cellulose والترشيح الهلامي بخطوتين على عمود Sephacryl S-200 بعدد مرات التنقية وحصيلة انزيمية 7.94 مرة 22.57% على التوالي . تم فحص نقاوة الانزيم باستخدام الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة -SDS PAGE اذ اظهرت النتائج وجود حزمة بروتينية واحدة .

اظهرت نتائج توصيف الانزيم المنقى ان وزنه الجزيئي 89.125 كيلو دالتون بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl S-200 و 85.703 كيلو دالتون باستخدام الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة . كما ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية للانزيم 7.5 ، و الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بين (7 - 8) . اما درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم 50°م ، ان طاقة التنشيط



لتحويل المادة الاساس الى ناتج حوالي 7312 سعرة/ مول، ودرجة الحرارة المثلى لثباتية الانزيم فقد كانت بين (20-50) م°.

اظهرت نتائج تأثير بعض المركبات الكيميائية احتفاظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه مع كلوريدات الصوديوم ، الكالسيوم ، البوتاسيوم بتركيز 5 و 10 ملي مولار، اظهرت كلوريدات الزئبق والخاصين وكبريتات الحديد تأثيراً مثبطاً في فعالية SOD بنسب متفاوتة، بينما احتفظ الانزيم بفعاليته عند معاملته بكبريتات المنغنيز.

بينما لوحظ فقدان كبير لفعالية الانزيم بوجود المواد المخليبية مثل مادة Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز 5 و 10 ملي مولار اذ بلغت الفعالية المتبقية 10 و 4 وحدة / مليلتر على التوالي. كما لوحظ ايضا فقدان كبير لفعالية الانزيم عند حضنه مع مادة Sodium dodecyl sulfate (SDS) بتركيزين 5 و 10 ملي مولار اذ بلغت الفعالية المتبقية 11 و 7 وحدة / مليلتر على التوالي . كما اوضحت النتائج ان الانزيم قد انخفضت فعاليته عند معاملته ب Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )، اذ بلغت الفعالية المتبقية 32 و 21 % عند التركيزين 5 و 10 ملي مولار على التوالي.

لم تظهر مادة بيروكسيد الهيدروجين ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) تأثيراً في فعالية الانزيم اذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند حضنه مع التراكيز 5 و 10 (v/v) ملي مولار من هذه المادة، كذلك بالاضافة الى مادة سيانيد البوتاسيوم (KCN) عند التراكيز 5 و 10 ملي مولار؛ مما يؤكد ان الانزيم من نوع MnSOD. وعند دراسة الثوابت الحركية للانزيم ظهر ان معدلات قيم ثابت ميكالس ( $K_m$ ) والسرعة القصوى ( $V_{max}$ ) كانت 0.133 ملي مولار و 54.945 ملي مولار/ دقيقة على التوالي باستخدام Pyrogallol مادة اساس.

## قائمة المحتويات

| رقم الصفحة          | الموضوع   | رقم الفقرة |
|---------------------|---|------------|
| أ - ب               | الخلاصة   |            |
| أ-خ                 | قائمة المحتويات   |            |
| خ                   | قائمة الجداول   |            |
| د - ر               | قائمة الاشكال   |            |
| ز                   | قائمة المختصرات   |            |
| <b>الفصل الاول</b>  |   |            |
| 2-1                 | المقدمة   | 1          |
| <b>الفصل الثاني</b> |   |            |
| 25-3                | استعراض المراجع   | 2          |
| 3                   | نبات الطرفة <i>Tamarix aphylla</i> L.                   | 1-2        |
| 3                   | التصنيف العلمي  | 1-1-2      |
| 4                   | الوصف النباتي   | 2-1-2      |
| 5                   | المواد الفعالة والاهمية الطبية للطرفة <i>T. aphylla</i> | 3-1-2      |
| 5                   | انواع الاوكسجين المتفاعل ROS                            | 2-2        |
| 6                   | كيمياء ROS  | 1-2-2      |
| 7                   | مواقع و مصادر ROS                                       | 2-2-2      |
| 8                   | ميكانيكات الدفاع النباتية ضد سمية ROS                   | 3-2-2      |

|                     |   |        |
|---------------------|---|--------|
| 9                   | انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز<br>(SOD) Superoxide dismutase            | 3-2    |
| 10                  | مصادر انتاج انزيم SOD   | 4-2    |
| 12                  | انواع انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز                                    | 5-2    |
| 12                  | حديد سوبراوكسايد دسميوتيز FeSOD                                       | 1-5-2  |
| 12                  | منغنيز سوبراوكسايد دسميوتيز MnSOD                                     | 2-5-2  |
| 14                  | نحاس / زنك سوبراوكسايد دسميوتيز Cu/Zn SOD                             | 3-5-2  |
| 14                  | الوظيفة الحيوية لانزيم السوبراوكسايد دسميوتيز SOD                     | 6-2    |
| 15                  | الية عمل انزيم SOD  | 7-2    |
| 16                  | استخلاص انزيم Superoxide dismutase                                    | 8-2    |
| 17                  | طرق قياس فعالية انزيم Superoxide dismutase                            | 9-2    |
| 18                  | طرق تنقية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز                                | 10-2   |
| 20                  | توصيف انزيم SOD   | 11-2   |
| 20                  | الوزن الجزيئي لانزيم SOD  | 1-11-2 |
| 21                  | الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثباتية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز | 2-11-2 |
| 22                  | درجة الحرارة المثلى لفعالية وثباتية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز      | 3-11-2 |
| 23                  | تأثير المواد المثبطة في فعالية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز           | 4-11-2 |
| 24                  | حركات انزيم SOD   | 12-2   |
| 25                  | الاستخدامات التطبيقية لانزيم Superoxide dismutase                     | 13-2   |
| <b>الفصل الثالث</b> |   |        |
| 51-26               | المواد وطرائق العمل   | 3      |

|    |  |           |
|----|--|-----------|
| 26 | الاجهزة و المواد   | 1-3       |
| 26 | الاجهزة المستعملة في الدراسة                                       | 1-1-3     |
| 27 | المواد   | 2-1-3     |
| 27 | المواد الكيميائية  | 1-2-1-3   |
| 28 | العينات النباتية <b>Plants samples</b>                             | 3-1-3     |
| 28 | طرائق العمل  | 2-3       |
| 28 | المواد والمحاليل   | 1-2-3     |
| 28 | تحضير المحاليل   | 1-1-2-3   |
| 28 | طريقة تحضير المستخلص الانزيمي الخام لانزيم SOD                     | 2-1-2-3   |
| 29 | تقدير فعالية انزيم SOD   | 2-2-3     |
| 29 | مبدأ العمل   | 1-2-2-3   |
| 29 | المواد والمحاليل المستعملة   | 2-2-2-3   |
| 30 | طريقة العمل  | 3-2-2-3   |
| 31 | تقدير تركيز البروتين   | 3-2-3     |
| 31 | المحاليل المستخدمة   | 1-3-2-2   |
| 32 | طريقة العمل  | 2-3-2-3   |
| 32 | المنحنى القياسي لألبومين المصل البقري                              | 1-2-3-2-3 |
| 32 | تقدير تركيز البروتين في المحاليل الانزيمية                         | 2-2-3-2-3 |
| 34 | تحديد فعالية انزيم SOD في الاجزاء النباتية المختلفة لنبات الطرفة   | 4-2-3     |
| 34 | تعيين الظروف المثلى للاستخلاص                                      | 5-2-3     |
| 34 | تعيين التركيز الامثل لمادة EDTA-Na <sub>2</sub> في المحلول الدائري | 1-5-2-3   |

|    |  |            |
|----|--|------------|
| 34 | تعيين التركيز الامثل لمادة PVP في المحلول الدارئ                     | 2-5-2-3    |
| 34 | تحديد نسبة الاستخلاص المثلى لانزيم SOD                               | 6-2-3      |
| 35 | تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لدارئ الاستخلاص                       | 7-2-3      |
| 35 | تأثير تركيز الدارئ على فعالية انزيم SOD                              | 8-2-3      |
| 35 | المواد والمحاليل   | 1-8-2-3    |
| 35 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.1) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 1-1-8-2-3  |
| 35 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.2) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 2-1-8-2-3  |
| 36 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.3) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 3-1-8-2-3  |
| 36 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.4) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 4-1-8-2-4  |
| 36 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.5) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 5-1-8-2-3  |
| 36 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.6) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 6-1-8-2-3  |
| 37 | محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز (0.7) مولار ورقم هيدروجيني 7.8 | 7-1-8-2-3  |
| 37 | تحديد زمن الاستخلاص الامثل لفعالية انزيم SOD                         | 9-2-3      |
| 37 | استخلاص انزيم SOD و تنقيته   | 10-2-3     |
| 37 | الاستخلاص بالظروف المثلى   | 1-10-2-3   |
| 38 | تنقية الانزيم  | 2-10-2-3   |
| 38 | الترسيب بكبريتات الامونيوم   | 1-2-10-2-3 |

|    |  |                |
|----|--|----------------|
| 38 | كروماتوغرافيا التبادل الايوني                                    | 2-2-10-2-3     |
| 38 | المواد والمحاليل   | 1-2-2-10-2-3   |
| 39 | تحضير المبادل الايوني ثنائي اثيل امينو سليلوز DEAE-<br>Cellulose | 2-2-2-10-2-3   |
| 40 | تعبئة العمود   | 3-2-2-10-2-3   |
| 40 | كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي                                    | 3-2-10-2-3     |
| 40 | تحضير المحاليل   | 1-3-2-10-2-3   |
| 41 | تحضير هلام Sephacryl S-200                                       | 2-3-2-10-2-3   |
| 41 | تعبئة العمود   | 3-3-2-2-10-2-3 |
| 43 | الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS          | 4- 2- 10-2-3   |
| 43 | المحاليل المستخدمة   | 1-4- 2-10-2-3  |
| 45 | طريقة الترحيل الكهربائي  | 2-4-2-10-2-3   |
| 46 | الترحيل الكهربائي  | 3-4-2-10-2-3   |
| 47 | توصيف انزيم السوبر اوكسايد دسميوتيز                              | 11-2-3         |
| 47 | تحديد الوزن الجزيئي  | 1-11-2-3       |
| 47 | المواد والمحاليل   | 1-1-11-2-3     |
| 47 | محاليل البروتينات القياسية                                       | 2-1-11-2-3     |
| 48 | طريقة العمل  | 3-1-11-2-3     |
| 48 | تحضير الهلام   | 4-1-11-2-3     |
| 49 | تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم                   | 2-11-2-3       |

|                     |   |            |
|---------------------|---|------------|
| 49                  | تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لنباتية الانزيم                    | 3-11-2-3   |
| 50                  | تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم                         | 4-11-2-3   |
| 50                  | تقدير طاقة التنشيط ( $E_a$ )                                      | 5-11-2-3   |
| 50                  | تعيين الثبات الحراري للانزيم                                      | 6-11-2-3   |
| 51                  | تعيين الثوابت الحركية للانزيم                                     | 7-11-2-3   |
| 51                  | تأثير الايونات الفلزية و المواد المثبطة في فعالية انزيم SOD       | 8-11-2-3   |
| 51                  | تحضير محاليل الاملاح و الكواشف                                    | 1-8-11-2-3 |
| 51                  | طريقة العمل   | 2-8-11-2-3 |
| <b>الفصل الرابع</b> |   |            |
| 92 – 52             | النتائج و المناقشة  | 4          |
| 52                  | التحري عن انزيم SOD في بعض الانواع النباتية                       | 1-4        |
| 53                  | التحري عن انزيم SOD في اجزاء نبات الطرفة <i>T. aphylla</i>        | 2-4        |
| 54                  | تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم                              | 3-4        |
| 54                  | تحديد التركيز الامثل لمادة EDTA-Na <sub>2</sub> في المحلول الدارئ | 1-3-4      |
| 56                  | تحديد التركيز الامثل لمادة PVP في المحلول الدارئ                  | 2-3-4      |
| 57                  | تأثير نسبة الاستخلاص  | 3-3-4      |
| 58                  | تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لدارئ الاستخلاص                    | 4-3-4      |
| 60                  | تأثير تركيز دارئ الاستخلاص على فعالية انزيم SOD                   | 5-3-4      |
| 61                  | تحديد زمن الاستخلاص الامثل  | 6-3-4      |
| 63                  | استخلاص انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز وتنقيته                      | 4-4        |
| 63                  | الاستخلاص   | 1-4-4      |

|    |  |         |
|----|--|---------|
| 63 | تنقية الانزيم  | 2-4-4   |
| 63 | تركيز الانزيم الخام بكبريتات الامونيوم                         | 1-2-4-4 |
| 65 | كروماتوغرافيا التبادل الايوني<br>Ion exchange chromatography   | 2-2-4-4 |
| 68 | كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي<br>Gel filtration chromatography | 3-2-4-4 |
| 72 | فحص نقاوة انزيم SOD  | 4-2-4-4 |
| 74 | توصيف انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز SOD                         | 5-4     |
| 74 | تعيين الوزن الجزيئي لانزيم SOD                                 | 1-5-4   |
| 74 | الترشيح الهلامي  | 1-1-5-4 |
| 76 | الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة SDS                    | 2-1-5-4 |
| 78 | تأثير الرقم الهيدروجيني  | 2-5-4   |
| 78 | الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم SOD                     | 1-2-5-4 |
| 79 | الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتية انزيم SOD                     | 2-2-5-4 |
| 81 | تأثير درجة الحرارة   | 3-5-4   |
| 81 | تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم SOD                        | 1-3-5-4 |
| 82 | طاقة التنشيط ( $E_a$ )   | 2-3-5-4 |
| 84 | تأثير درجة الحرارة على ثباتية انزيم SOD                        | 3-3-5-4 |
| 85 | تقدير الثوابت الحركية للانزيم                                  | 5-5-4   |
| 87 | تأثير بعض المواد الكيميائية في فعالية انزيم SOD                | 6-5-4   |
| 87 | تأثير الايونات المعدنية في فعالية الانزيم                      | 1-6-5-4 |



|                     |  |         |
|---------------------|--|---------|
| 90                  | تأثير المواد المثبطة في فعالية انزيم SOD | 2-6-5-4 |
| <b>الفصل الخامس</b> |  |         |
| 94-93               | الاستنتاجات والتوصيات                    | 5       |
| 93                  | الاستنتاجات                              | 1-5     |
| 94                  | التوصيات                                 | 2-5     |
| 123-95              | المصادر                                  |         |
| 95                  | المصادر العربية                          |         |
| 123-96              | المصادر الاجنبية                         |         |
| A-C                 | الخلاصة باللغة الانكليزية                |         |

## قائمة الجداول

| رقم الصفحة | عنوان الجدول   | رقم الجدول |
|------------|--|------------|
| 26         | الاجهزة المستعملة في الدراسة   | 1-3        |
| 27         | المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة   | 2-3        |
| 30         | قياس فعالية انزيم SOD  | 3-3        |
| 44         | البروتينات القياسية المستخدمة في تحديد الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة بطريقة الترحيل الكهربائي - SDS PAGE | 4-3        |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 48 | البروتينات القياسية المستخدمة في تحديد الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة بطريقة الترشيح الهلامي | 5-3 |
| 65 | ترسيب انزيم SOD من اوراق <i>T. Aphylla</i> بأستخدام كبريتات الامونيوم   | 1-4 |
| 71 | خطوات تنقية انزيم SOD المستخلص من اوراق <i>T. aphylla</i> L.  | 2-4 |
| 89 | تأثير الايونات المعدنية في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>                          | 3-4 |
| 92 | تأثير المواد المثبطة في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>                             | 4-4 |

## قائمة الأشكال

| رقم الصفحة | عنوان الشكل   | رقم الشكل |
|------------|---|-----------|
| 4          | نبات الطرفة <i>T. aphylla</i>                             | 1-2       |
| 8          | مواقع انتاج ROS في النبات                                 | 2-2       |
| 11         | المواقع المختلفة لأنزيم SOD في النبات                     | 3-2       |
| 13         | يوضح التركيب الهرمي المزدوج المثلي للموقع الفعال للـMnSOD | 4-2       |
| 16         | الآلية عمل انزيم Superoxide dismutase                     | 5-2       |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 29 | ميكانية تثبيط الاكسدة الذاتية للبايروكالمول   | 1-3 |
| 33 | المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين بطريقة برادفورد   | 2-3 |
| 42 | خطوات تنقية انزيم SOD من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>   | 3-3 |
| 52 | الفعالية النوعية لأنزيم SOD في اوراق انواع نباتية مختلفة  | 1-4 |
| 54 | الفعالية النوعية لأنزيم SOD في اجزاء مختلفة من نبات الطرفة <i>T. aphylla</i>                                | 2-4 |
| 55 | تأثير تركيز EDTA-Na <sub>2</sub> على الفعالية النوعية لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i> | 3-4 |
| 57 | تأثير تركيز PVP في فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>                              | 4-4 |
| 58 | تأثير نسبة الاستخلاص في الفعالية النوعية والانزيمية لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>   | 5-4 |
| 59 | تأثير الرقم الهيدروجيني لدائى الاستخلاص في فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>      | 6-4 |
| 61 | تأثير تركيز محلول فوسفات البوتاسيوم الدائى على فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>  | 7-4 |
| 62 | تأثير زمن الاستخلاص في الفعالية النوعية والانزيمية لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i>    | 8-4 |
| 64 | ترسيب انزيم SOD من اوراق الطرفة بأستخدام كبريتات الامونيوم  | 9-4 |

|    |  |      |
|----|--|------|
| 67 | <p>كروماتوغرافيا التبادل الايوني لأنزيم SOD المنقى من اوراق <i>T. aphylla</i> باستخدام عمود DEAE-Cellulose بأبعاد (3.5×20) سم. ثم الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.8 بتدرج خطي (1-0) مولار كلوريد الصوديوم ، جمعت الاجزاء بواقع 5 مليلتر و بسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة .</p> | 10-4 |
| 69 | <p>كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (الخطوة الاولى) لتنقية انزيم SOD من اوراق <i>T. aphylla</i> بأستعمال عمود Sephacryl S-200 بأبعاد (80×1.5) سم ، ثم الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى ( 0.2 مولار ، pH=7.8) ، جمعت الاجزاء بواقع 5 مليلتر لكل جزء وبسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة</p>                               | 11-4 |
| 70 | <p>كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (الخطوة الثانية) لتنقية انزيم SOD من اوراق <i>T. aphylla</i> بأستعمال عمود Sephacryl S-200 بأبعاد (80×1.5) سم ، ثم الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى ( 0.2 مولار ، pH=7.8) ، جمعت الاجزاء بواقع 5 مليلتر لكل جزء وبسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة</p>                              | 12-4 |
| 73 | <p>الترحيل الكهربائي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i> بوجود المواد الماسخة SDS</p>  | 13-4 |
| 75 | <p>تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة <i>T. aphylla</i> بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام هلام S-200 بأبعاد (80×1.5) سم</p>   | 14-4 |

|    |   |      |
|----|---|------|
| 77 | تعيين الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة<br><i>T.aphylla</i> بطريقة الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة<br>SDS   | 15-4 |
| 79 | الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم SOD المنقى من اوراق <i>T.aphylla</i>   | 16-4 |
| 80 | تأثير الرقم الهيدروجيني على ثباتية انزيم SOD المنقى من اوراق<br>الطرفة <i>T.aphylla</i>   | 17-4 |
| 82 | تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة<br><i>T.aphylla</i> التفاعل بدرجات حرارية مختلفة (20-80) °م بأستخدام<br>مادة اساس Pyrogallol  | 18-4 |
| 83 | منحنى ارينوس لتعيين طاقة التنشيط لأنزيم SOD المنقى من اوراق<br>الطرفة <i>T.aphylla</i>  | 19-4 |
| 85 | تأثير درجة الحرارة على ثباتية انزيم SOD المنقى من اوراق<br>الطرفة <i>T.aphylla</i> L. بحضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة<br>وبمدى (20-80) °م لمدة 30 دقيقة   | 20-4 |
| 86 | منحنى ميكالس – منتن لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة <i>T.aphylla</i>  | 21-4 |
| 87 | منحنى العلاقة بين مقلوب مادة التفاعل ومقلوب السرعة الاولية<br>باستخدام طريقة لاينويفر- بيرك Line Weaver-Burk Plot<br>لتقدير الثوابت الحركية لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة <i>T.aphylla</i><br>تجاه مادة الاساس الـ Pyrogallol . | 22-4 |

قائمة المختصرات

| <b>Abbreviation</b>               | <b>Key</b>                                       |
|-----------------------------------|--|
| <b>BSA</b>                        | <b>Bovine serum albumin</b>                      |
| <b>Cu/Zn SOD</b>                  | <b>Copper/ Zinc- superoxide dismutase</b>        |
| <b>DEAE</b>                       | <b>Di ethyl amino ethyl</b>                      |
| <b>DW</b>                         | <b>Distilled water</b>                           |
| <b>EDTA</b>                       | <b>Ethylen diamin tetra acetic acid</b>          |
| <b>EDTA-Na<sub>2</sub></b>        | <b>Ethylen diamin tetra acetic acid disodium</b> |
| <b>FeSOD</b>                      | <b>Ferric- superoxide dismutase</b>              |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | <b>Hydrogen peroxide</b>                         |
| <b>MnSOD</b>                      | <b>Manganese- superoxide dismutase</b>           |
| <b>Km</b>                         | <b>Michaelis constant</b>                        |
| <b>PMSF</b>                       | <b>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</b>           |
| <b>PVP</b>                        | <b>Polyvinyl pyrrolidon</b>                      |
| <b>KCN</b>                        | <b>Potassium cyanide</b>                         |
| <b>ROS</b>                        | <b>Reactive oxygen species</b>                   |
| <b>Rm</b>                         | <b>Relative mobility</b>                         |
| <b>NaN<sub>3</sub></b>            | <b>Sodium azide</b>                              |
| <b>PAGE</b>                       | <b>Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</b>       |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>SDS</b>                      | <b>Sodium dodycle sulphate</b>                |
| <b>SOD</b>                      | <b>Superoxide dismutase</b>                   |
| <i>T.aphylla</i>                | <i>Tamarix aphylla</i>                        |
| <b>TEMED</b>                    | <b>N,N,N,N, TEtraMethyl Ethylene Diamine</b>  |
| <b>UV/VIS spectrophotometer</b> | <b>Ultra Violet/visible spectrophotometer</b> |
| <b>Ve</b>                       | <b>Elution volume</b>                         |
| <b>V<sub>max</sub></b>          | <b>Maximum Velocity</b>                       |
| <b>Vo</b>                       | <b>Void volume</b>                            |
| <b>(V / V)</b>                  | <b>Volume per Volume</b>                      |
| <b>(W/V)</b>                    | <b>Weight per Volume</b>                      |

## المقدمة :

ينتمي انزيم Superoxide dismutase (SOD) الى انزيمات الاكسدة والاختزال وبرقم تسلسلي (EC 1.15.1.1) وهو من الانزيمات المعدنية (Metaloenzymes) اذ يحفز تحول جذور السوبراوكسايد الى الاوكسجين الجزيئي وبيروكسيد الهيدروجين (Que et al.,2010). تلعب انزيمات SOD دورا مهما في حماية الخلايا من الضرر التأكسدي لجذور السوبراوكسايد ، حيث تنتج هذه الجذور

في جميع الخلايا المستهلكة للاوكسجين خلال عملياتها الايضية ، وتتميز بتأثيرها الضار للخلايا وقدرتها على تحفيز سلسلة من التفاعلات المولدة لانواع ROS ومن ثم زيادة تلف الخلايا ، Fattman *et al.*, (2000) . ينتج انزيم SOD في كل الكائنات الحية ابتداء من البكتريا الى الانسان ، حيث يتواجد بأربعة انواع استناداً الى ايونات المعادن الموجودة في الموقع الفعال هي Cu/Zn ، Fe ، Mn و Ni (Perrey *et al.*,2010). تحتوي النباتات على Cu/ZnSOD الذي يوجد في الساييتوبلازم ، البلاستيدات الخضراء والاجسام الدقيقة Peroxisomes . FeSOD يقع في البلاستيدات الخضراء ( Moran *et al.*,2003,Miller, 2012) ، و MnSOD يقع في الميتوكوندريا، وهو اساسي لبقاء الحياة الهوائية (Carlioz and Touati,1986; Miller, 2012) . NiSOD اكتشف لأول مرة في *Streptomyces* (Youn *et al.*,1996) ، ولا يوجد في النبات (Wolfe-Simon *et al.*,2005) .

Dalton (1995) و Gratao وجماعته (2006) قد وثقوا تركيب وكتلة كل نوع ، Cu/Zn SOD وجد كـ Dimer مع كتلة جزيئية ( ٣٠ – ٣٣ ) كيلو دالتون ، Mn SOD وجد كـ Tetramer مع كتلة جزيئية ٩٠ كيلو دالتون. كما بينت نتائج الاشعة السينية ان تركيب MnSOD و FeSOD متطابق بلورياً ويختلف بدرجة كبيرة عن تركيب Cu/ZnSOD ، اذ وجد ان تركيب  $\beta$ - barrel هو صفة دائمية CuZnSOD التي تكون مفقودة في MnSOD و FeSOD التي تكون غنية بالـ  $\alpha$ - helix (Fridovich, 1974b). كما يتم الكشف عن كل نوع باستخدام مثبطات خاصة مثل سيانيد البوتاسيوم KCN وبيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  حيث تتفاعل بشكل مختلف مع كل نوع، Cu/ZnSOD حساس لكلا النوعين ، MnSOD مقاوم لكلا النوعين ، اما FeSOD حساس الى  $H_2O_2$  ( Del Rio *et al.*, 2004 ; Murao *et al.* ,1992; Bowler *et al.* , 1985) .

نظراً لتأثيراته المضادة للاكسدة فإن انزيم SOD له العديد من التطبيقات في مجال الطب والتجميل والاعذية والزراعة والصناعات الكيمائية (Liu *et al.* , 2011) .

وجدت مؤخراً تطبيقات عديدة لانزيم SOD كمكملات لمنع او عكس الاثار السلبية لامراض القلب والاعوية الدموية و الشيخوخة و العقم و الاضطرابات العصبية و امراض المناعة الذاتية والتهاب المفاصل ومرض السكري و الربو ، والسرطان ، وكذلك في الصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل ( Bafana *et al.* , 2011) . كذلك وجد ان التنظيم المتخصص للانزيمات المضادة للاكسدة ممكن ان يجهز طريقة جديدة لمنع امراض الجهاز المناعي ومعالجتها (Marikovsky *et al.*,2003) . ولأهمية



الانزيم في المجالات المذكورة اعلاه ولايجاد مصدر جديد واقتصادي فقد تم تحديد هدف الدراسة كالاتي :

١. استخلاص انزيم SOD من اوراق نبات الطرفة *T. aphylla* وتحديد الظروف المثلى للاستخلاص .
٢. تنقية الانزيم باستخدام طرائق الكروماتوغرافيا المتوفرة مثل التبادل الايوني والترشيح الهلامي.
٣. توصيف الانزيم من حيث تحديد الوزن الجزيئي ، الرقم الهيدروجيني الامثل ، درجة الحرارة المثلى
٤. دراسة تاثير بعض المركبات الكيميائية في فعالية انزيم SOD .

## 2: استعراض المراجع Literature review

### 1-2 : الطرفة *Tamarix aphylla* L.( Athel Tamarisk)

تعد من اكثر الأنواع المعروفة من جنس *Tamarix* وتوجد في وسط اسيا وشمال افريقيا وجنوب شرق اوربا . مواطنها الكثبان الرملية، و القنوات، و ضفاف الانهار، و الصحارى المالحة، و

المستنقعات المالحة والسهول الساحلية ( Orwa et al ., 2009 ). هي من النباتات الملحية التي تنمو في التربة الغنية بكلوريد الصوديوم، تأخذ الاملاح الذائبة في التربة وبتراكيز عالية الى داخل الانسجة و تؤدي هذه الاملاح الى قتل النبات ولهذا فأن النبات من اجل حماية نفسه من هذه الظروف فقد تكيفت الاوراق لانتاج نظام من الغدد الملحية والتي تفرز الملح الزائد خارج الانسجة، وهذه ضرورية لكي يستمر النبات بانتاج الغدد النشطة القادرة على القضاء بشكل كامل على الاملاح طوال حياة النبات ومن ثم فأن الغدد التي يكتمل افرازها تهرم وتموت ويتم استبدالها بغدد جديدة والتي تستمر بافراز الاملاح . ( Bosabalidis ,1992) .

### 1-1-2: التصنيف العلمي:

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Dilleniidae

Order : Violales

Family : Tamaricaceae

Genus : *Tamarix* L.

Species : *Tamarix aphylla*

### 2-1-2 : الوصف النباتي

اشجار او شجيرات صغيرة تفضل البيئة الصحراوية او التربة المالحة . اوراقها صغيرة جدا متبادلة بسيطة تشبه الحراشف مكبوسة على الاغصان ، تحتوي على العديد من الغدد الملحية. يتكون الساق من اغصان خضر سميكة الجدران ( Waisel, 1960 ). الازهار صغيرة جدا تامة شعاعية التناظر سفلية الاجزاء ، السبلات والبتلات (4 - 5) وهي سائبة والاخيرة تبقى مع الثمرة . تقع الاسدية والبتلات على قرص غدي لحمي . الاسدية بقدر عدد البتلات او ضعفها وقد تكون غير محدودة . طليقة او ملتحمة قاعديا . تنفتح المتوك بشقوق طولية . المدقة واحدة . المبيض مرتفع . احادي الغرف ، يتكون من 3 - 4 كرابل . المشيمة جدارية ( تختزل في جنس الطرفة الى جدارية قاعدية ) البويضات تتكون من 2 - كثيرة في المشيمة الواحدة . الاقلام بعدد الكرابل (3 - 4) طليقة او ملتحمة قاعديا ، او معدومة احيانا والمياسم جالسة . النورة عنقودية شبيهة بالسنبلة او انفرادية . اما الثمرة فتكون بشكل علبة والبذور كثيفة الشعيرات او ان لها خصلة في القمة (الكاتب ، 2000 ) .



الشكل ( 2 - 1 ) : نبات الطرفة *Tamarix aphylla* L.

3-1-2: المواد الفعالة والاهمية الطبية للطرفة *T. aphylla*

البحث الاولي للمواد الكيميائية في المستخلص المائي لنبات الطرفة *T. aphylla* يظهر وجود القلويدات، والصابونين، والتانينات والمركبات الفينولية ( Auribie,2011 ) . كذلك احتوى على Barkat and )Carboxylic acid ، Riboflavin و (Nawaar *et al.*,2009) Aphyllin ( Nada,1996 ) والفلافونات والكلايكوسيدات (El-Ansari *et al.*,1976) في اجزائه المختلفة.

اذ استخدم مستخلص اوراق الطرفة *T. aphylla* كبديل في علاج العديد من الامراض ومنها داء اللشمانيا Leishmaniasis ( Iqbal *et al.*,2013) ففي احدى الدراسات استخدم مستخلص اوراق الطرفة ضد بعض انواع البكتريا اذ بينت الدراسة ان القلويدات كانت اكثر تثبيطا لبكتريا *Staphylococcus aureus* ثم *Pseudomonas aeruginosa* في حين الفلافونات كانت اكثر تثبيطا لـ *Salmonella typhi* ثم *Staphylococcus aureus* لكن التأثير التثبيطي للقلويدات والفلافونات كان اقل تأثيرا على *E.Coli* (Adnan *et al.*,2015). كما تم استخدام الاوراق كعامل مضاد للالتهابات وفي شفاء الجروح (Abdallah and El-Ghazali, 2013) . فالفعالية المضادة للجراثيم في النباتات الطبية تعود الى وجود مركبات الايض الثانوية مثل القلويدات ، والدباغيات والمركبات الفينولية الموجودة في اوراق الطرفة ( Achakzai *et al.*,2009 ) .

احتوى مستخلص ازهار نبات الطرفة *T. aphylla* على Glycosylate isoferulic acid ، Tamarixetin 3,3-disodium sulphate و Dehydrodigallic acid (Nawwar *et al.*,2009) . وقد استخدم نبات الطرفة ايضاً كعامل مضاد للحساسية و الالتهابات الفطرية و الاكزيما والحرارة ( Iqbal *et al.*,2012) .

## 2-2 : انواع الاوكسجين المتفاعل ( ROS )

### Reactive oxygen species (ROS)

هي مواد كيميائية نشطة التفاعل (اي جزيئات او ذرة جزيء لها زوج من الالكترونات غير المتزاوجة Unpaired electron) حيث تهاجم الجزيئات الاخرى لسلب الالكترونات لتصبح الكترولونات متزاوجة ومن ثم تغير من التركيب الكيميائي للمواد الاخرى (Sgherri *et al.*,2007) تتكون ROS بواسطة عمليات الايض الهوائي Aerobic metabolism وتتضمن جزيئات نشطة تنشأ من الاوكسجين تشمل الاوكسجين الفردي  $^1O_2$  ، و جذور الهيدروكسيل  $OH^-$  ، وانيونات السوبراوكسايد  $O_2^-$  ، وبيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  ( Bowler *et al.*,1992; Navrot *et al.*,2007) . يتم انتاج هذه

الانواع المتفاعلة الوسيطة خلال عملية اختزال ( $O_2$ ) في الكائنات الهوائية . تتكون ROS اثناء نشاط الخلية في عضياتها مثل البلاستيدات الخضراء ، والميتوكوندريا ، والغشاء البلازمي ، و الاجسام الدقيقة Peroxisomes ، والشبكة الاندوبلازمية، و Apoplast وكذلك جدار الخلية (Halliwell,2006).

## 1-2-2 : كيمياء ROS

### Chemistry of ROS

تنتج ROS نتيجة اختزال الاوكسجين الجزيئي الى جذور السوبراوكساييد  $O_2^-$  او جذور اوكسيد الهيدروجين  $HO\cdot$  ، ثم تكوين بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  ( Henzler and Stuedle,2000; ) . تستطيع جذور السوبراوكساييد تعطيل العمليات الايضية الانزيمية المهمة والتي تحتوي على مجموعة Fe-S او تغيير الفعالية التحفيزية لها ( Van- Breusegem *et al.*,2001 ) ( Halliwell, 2006; ) . جذور  $HO\cdot$  توجد في البيئات الحامضية وتستطيع عبور الاغشية الحيوية واكسدة الدهون عن طريق استخلاص البروتونات من الاحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة ، جذور  $O_2^-$  تتحول بسرعة الى  $H_2O_2$  بواسطة انزيم SOD ، جذور  $H_2O_2$  تستطيع تعطيل الانزيمات عن طريق اكسدة مجموعة Thiol الخاصة بها (Halliwell,2006) . فالخصائص الضارة لـ  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  تكون اكثر وضوحا عندما تتفاعل بوجود ايونات المعادن لتكون  $HO\cdot$  شديدة التفاعل من خلال تفاعل Haber-Weiss (Kehrer,2000) . بسبب ان  $HO\cdot$  شديدة التفاعل الا ان الخلايا لا تمتلك اليات دفاع انزيمية لأزالة ROS والاعتماد على الاليات التي تمنع تكوينها ، هذه الاليات تتضمن ازالة  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  وعزل ايونات المعادن التي تحفز تفاعل Haber-Weiss مع البروتينات المرتبطة بالمعادن مثل Ferritins و Metallothionine ( Hintze and Theil,2006; Mittler *et al.*,2004) .

الميزة المهمة في كيمياء ROS هي تحويلها الى جذور اخرى ، بالاضافة الى تفاعلها مع  $H_2O_2$  وتكوين  $HO\cdot$  . كما تستطيع  $O_2^-$  التفاعل مع جذر اوكسيد النتريك ( $NO\cdot$ ) وتكوين Peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) ، ( $ONOO^-$ ) تتحول بسرعة الى Peroxynitrous ( $ONOOH$ ) والذي يكون عاملا مؤكسدا قويا ، وقادرا على تدمير كل الجزيئات الحيوية ويؤدي الى تكوين العديد من الجذور الضارة (Halliwell,2006) .

## 2-2-2 : مواقع ومصادر ROS

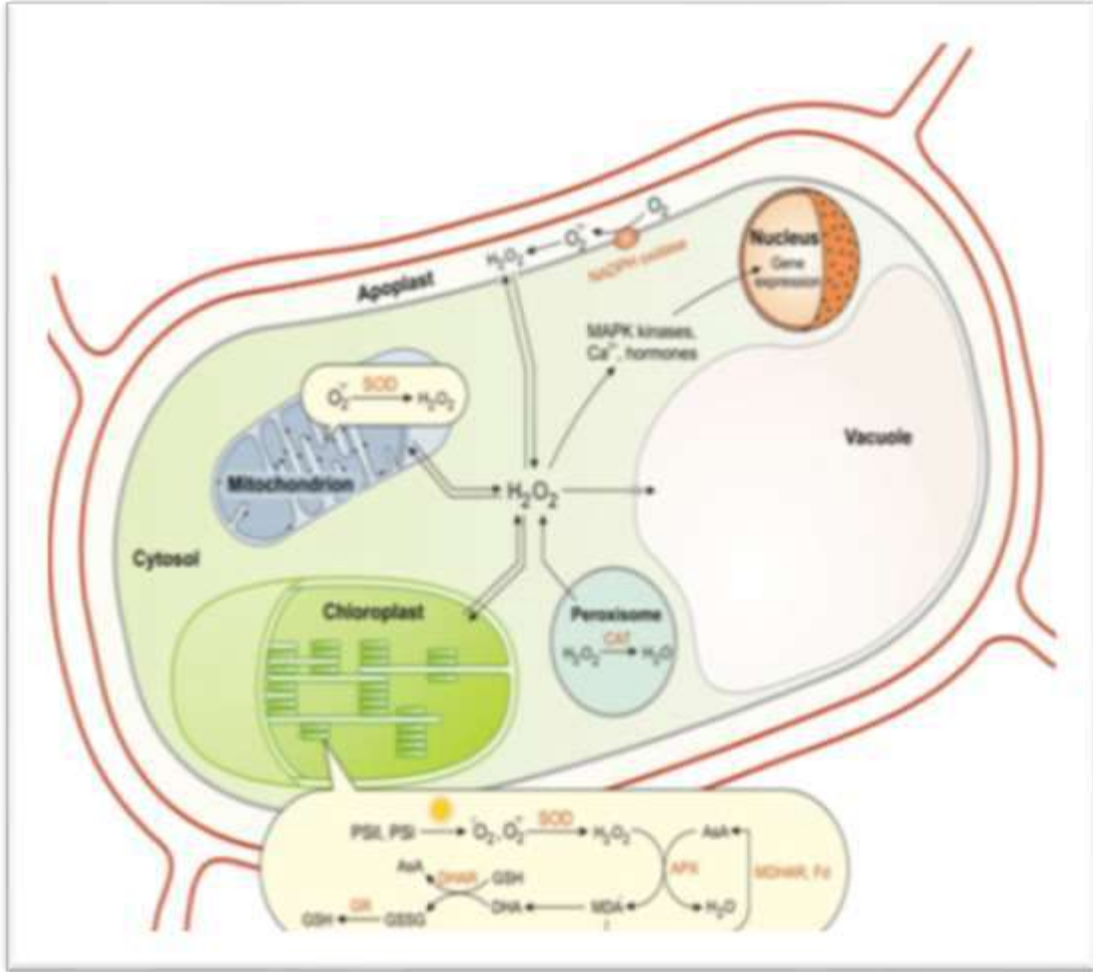
## Sites and Sources of ROS

المصادر و المواقع المتعددة لانتاج ROS تزيد من تعقيدها ، ROS هي نواتج طبيعية لعمليات التمثيل الغذائي Metabolism ويتم انتاجها في كل المكونات الخلوية خلال العديد من العمليات المختلفة . اذ تحافظ على مستوياتها في الخلايا السليمة ولكن تزداد نتيجة التعرض لظروف الاجهاد المختلفة ( Dat *et al.*,2000 ) .

البلاستيدات الخضراء هي مواقع رئيسة لانتاج ROS في النبات (Asada,2006) . اذ تنتج  $O_2$  اساسا عن طريق تسرب الالكترونات من مراكز Fe-S في النظام I او من خلال اختزال Ferridoxin الى  $O_2$  (Mehler reaction) وبعدها يتحول مباشرة الى  $H_2O_2$  بواسطة SOD (Dat *et al.*,2000) . Peroxisomes و Glycosomes هي مواقع رئيسة اخرى لانتاج ROS ، اذ تنتج ROS خلال عملية التنفس الضوئي Photorespiration و اوكسدة الحوامض الدهنية (Del Rio *et al.*,2006) .

من المصادر الرئيسية الاخرى لانتاج ROS في الميتوكوندريا هي NADH Dehydrogenase ، و جذور Ubiquinone . فمقدار انتاج ROS في الميتوكوندريا اقل بـ 20 مرة من انتاجها من البلاستيدات الخضراء (Foyer and Noctor,2003) .

الروابط البلازموذية NAD(P)H Plasmalema هي ايضا مواقع رئيسة لانتاج ROS . هنالك ايضا مواقع اخرى لانتاجها ، اذ تنتج بواسطة Xanthine oxidase خلال عملية هدم Burine او Ribonucleotide خلال عملية بناء Deoxyribonucleotide والعديد من العمليات الاخرى بما في ذلك الاجهادات الحيوية وغير الحيوية (Dat *et al.*,2000) .



الشكل

(2-2) : مواقع انتاج ROS في النبات (Dat et al., 2000)

### 3-2-2 : ميكانيكيات الدفاع النباتية ضد سمية ROS

مستويات (ROS) داخل الخلية تبقى في ادنى مستوى لها بواسطة ميكانيكيات حماية متعددة . مع ذلك يحدث زيادة في ROS خلال فترات معينة من التطور وكذلك استجابة لأنواع معينة من الاجهاد . الخلايا النباتية تمتلك اليات دفاع انزيمية وغير انزيمية والتي تستطيع التغلب على سمية الاوكسجين وتأخير التأثيرات الضارة للجذور الحرة (Ames et al., 1993; Larson, 1988). فنظام الحماية من الانزيمات يشمل SOD، Catalase (CAT) و Ascorbt peroxidase (APX) هي ميكانيكيات رئيسية في ازالة ROS (Asada et al., 1987; Bowler et al., 1992; Wellekens et al., 1997) . هذه الانزيمات قادرة على ازالة ، تحييد ROS . فالتوازن بين SOD و APX او فعالية Catalase في الخلايا لها دور رئيسي في ازالة ROS (Bowler et al., 1992) من دون هذه الدفاعات لا تتمكن

النباتات من تحويل الطاقة الضوئية الى طاقة كيميائية بشكل كفوء . حيث يعمل SOD كخط دفاع رئيسي لتحفيز تحول جذور السوبراوكسايد الى الاوكسجين الجزيئي وبيروكسيد الهيدروجين ، ثم يقوم انزيمي CAT و APX بازالة بيروكسيد الهيدروجين . SOD و CATs هما الاكثر اهمية في الخلايا كأنزيمات مضادة للاكسدة ، فعاليتها المشتركة تحول ( $O_2^-$ ) و بيروكسيد الهيدروجين الى ماء واوكسجين ، وبالتالي تجنب الضرر الخلوي. فالميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء تحتوي على ميكانيكيات ازالة ROS (Mittler,2002) . فالمواد المضادة للاكسدة الاخرى مثل Ascorbic acid و Glutathione توجد بتركيز عالية في البلاستيدات الخضراء والمكونات الخلوية الاخرى ، ولها دور رئيسي كميكانيكيات دفاع نباتية ضد الاجهاد التأكسدي (Noctor and Foyer,1998) .

### 3-2 : انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز (SOD) Superoxide dismutase

ينتمي انزيم SOD الى مجموعة انزيمات الاكسدة والاختزال Oxidoreductase ، وهو انزيم معدني ذي رقم تسلسلي (EC1.15.1.1) . يوجد في كل الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة ، و في كل المكونات الخلوية ويكون فعالا ايضا في الاجزاء الخارج خلوية (McCord *et al.*,1971) .

يعتبر انزيم SOD احد اهم الانزيمات المضادة للتأكسد Antioxidant enzymes اذ يحفز على تحويل جذور السوبراوكسايد السالبة الى بيروكسيد الهيدروجين والماء ، وتنتج جذور السوبراوكسايد في جميع الخلايا المستهلكة للاوكسجين خلال عملياتها الايضية ، وتتميز هذه الجذور بتأثيرها الضار للخلايا وبقدرتها على تحفيز سلسلة من التفاعلات المولدة لأنواع الاوكسجين المتفاعل ROS ومن ثم زيادة تلف الخلايا ؛ لذا فإن الوظيفة الرئيسية لأنزيم SOD تكمن في حماية الخلايا من الاضرار الناجمة عن جذور السوبراوكسايد (AL-Omare *et al.*,2004; Fattman *et al.*, 2000) .

عزل الانزيم لأول مرة بواسطة Mann و Keilin عام (1939) اذ عزل من دم الثور واطلق عليه Hemocuprein. وعزل ايضا من قبل كريات الدم الحمر للانسان واطلق عليه Erythrocuprein. وجاءت هذه التسمية نتيجة لمحتواه من النحاس والمصدر النسيجي الذي عزل منه حيث اكتشف احتواء هذا البروتين على ايون Zn فضلا عن Cu (Carrico and Deutsch, 1970). فالوظيفة الرئيسية له هي ازالة جذور السوبراوكسايد ( $O_2^-$ ) خلال العديد من العمليات الفسيولوجية. عزل الـ MnSOD لأول مرة من بكتريا *Escherichia coli* (Keele *et al.*, 1970). وفي عام 1996



اكتشف نوع جديد هو NiSOD حيث وجد في *Streptomyces coelicolor* ( Kim et al., 1996).

اهمية انزيم SOD تكمن في تفاعله مع انيون السوبراوكسايد ( $O_2^-$ ) في تفاعل غير متكافئ يعطي (جزيئة واحدة متأكسدة في حين تختزل الجزيئة الأخرى المتماثلة ) ، ليكون بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  و الاوكسجين الجزيئي، في النبات هذا التفاعل اساسي وان كان يحدث بمعدل واطى ، ولكن ينجز بمستويات اسرع وبالتالي خط دفاع مهم خلال الوقت ضد الاجهاد عندما تزداد مستويات ROS بشكل كبير (Gratao et al ., 2006; Corpas et al ., 2004; Prasad , 2004; Dalton, 1995; Gratao et al ., 2006).

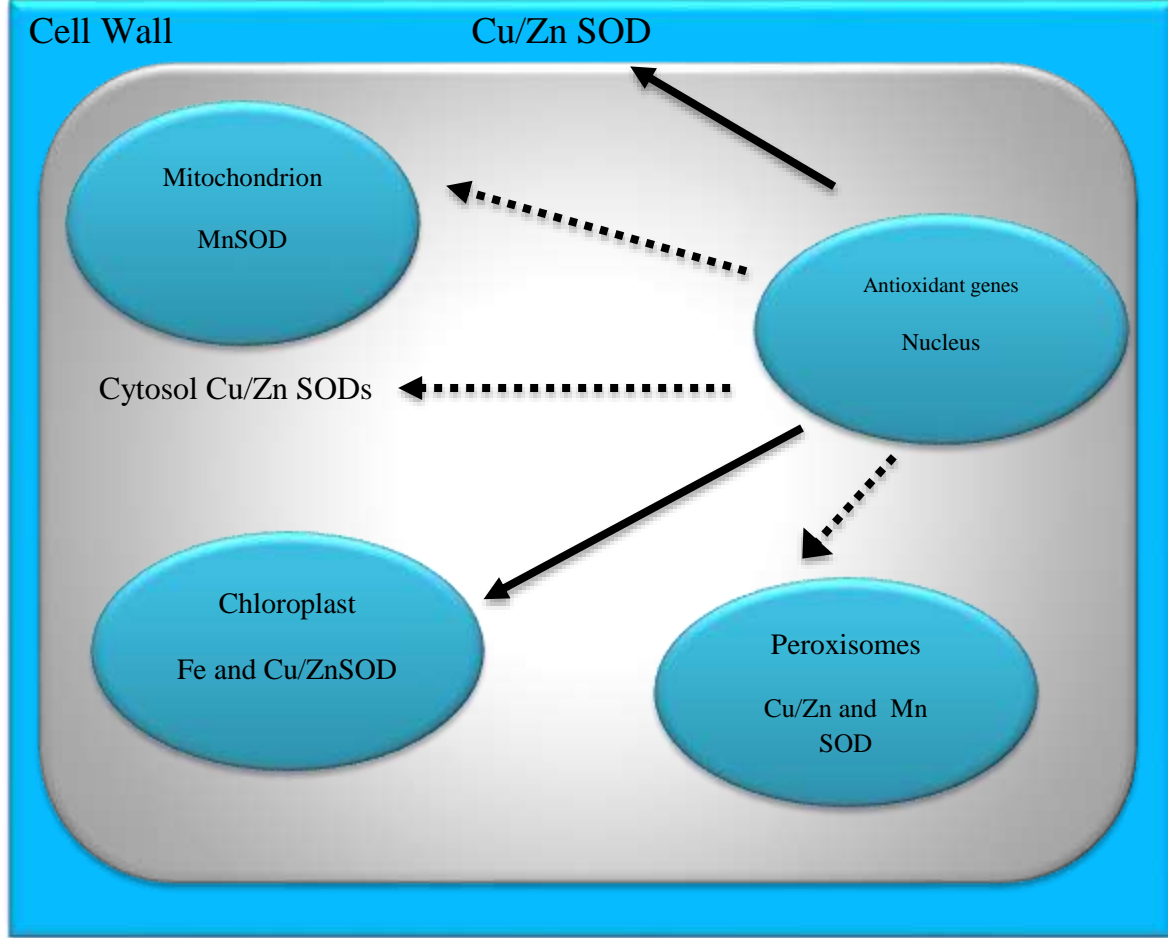
## 4-2 : مصادر انتاج انزيم SOD

انتج هذا الانزيم في كل الاحياء الهوائية ابتداءً من البكتريا الى الانسان ( Ravindranath and Fridovich,1975) اذ تم الحصول عليه من انسجة النباتات ( Beauchamp and Fridovich,1973)، والحيوانات (Weisiger and Fridovich, 1973)، وكذلك في الكائنات الحية الاخرى كالفطريات والبكتريا (Beaman et al., 1983) .

ففي النبات يتواجد الانزيم بثلاثة انواع تسمى المتناظرات الانزيمية Isozyme اعتمادا على المعدن المستخدم كعامل مساعد Cu/ZnSOD ,FeSOD, MnSOD الشكل (2-3) هنالك تشابه كبير في وظائف هذه الانواع هي (ازالة السموم لأنيونات السوبراوكسايد ) ، لكن توجد في اماكن مختلفة داخل الخلية ( Van Camp et al.,1994; Morgan et al.,2008) . Cu/ZnSOD يوجد في العصارة الخلوية . Mn SOD يوجد في الميتوكوندريا ، FeSOD يوجد في البلاستيدات الخضراء ، بالرغم من الاختلافات الواضحة الا ان MnSOD قد لوحظ ايضا مع البلاستيدات الخضراء (Gratao et al.,2006) . اما NiSOD وجد في *Streptomyces* (Youn et al.,1996) وانعدامه في النبات ( Wolfe-Simon et al.,2005) .

اما في اللبائن فقد بينت الدراسات الى وجود ثلاثة متناظرات انزيمية في انسجتها شملت Cu/ZnSOD الموجودة بصورة اولية في الساييتوبلازم ونواة الخلية، والـ MnSOD في الماييتوكوندريا، (Fattman et al., 2000). اما البكتريا فانها تمتلك انواعاً متعددة من SOD اذ وجد ان *E. coli* تمتلك

ثلاثة انواع من الـ SOD التي تختلف في الموقع والتعبير الجيني، اذ وجد ان الـ Fe و Mn موقعها في السايئوبلازم، بينما الـ Cu/ZnSOD موقعها في Preplasma (Barriere *et al.*, 2001)



الشكل (3-2) : المواقع المختلفة لأنزيم SOD في النبات

5-2 : انواع انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز

1-5-2 : حديد سوبراوكسايد دسميوتيز FeSOD

مجموعة FeSOD ربما تشكل المجموعة الاقدم لأنزيم SOD (Bannister *et al.*, 1991).  
 فكما ارتفعت مستويات  $O_2$  في البيئة وتأكدت المكونات المعدنية في البيئة سبب انخفاض في Fe (II)  
 المتوفر في البيئة مما يؤدي الى استخدام معادن اكثر وفرة Mn (III) (Alscher *et al.*, 2002).  
 FeSOD يتواجد في الخلايا بدائية النواة والبلاستيدات الخضراء للخلايا حقيقية النواة Poyart *et al.*

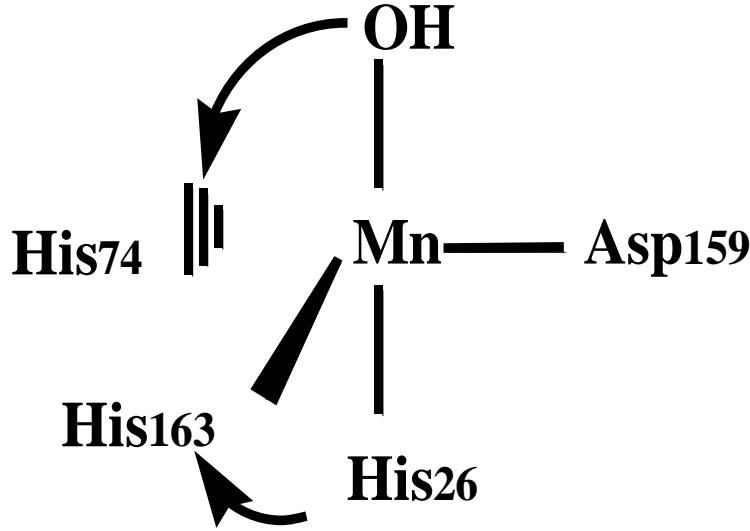
(al.,2001a) . عزل FeSOD اولاً من *E.coli* (Fridovich,1974b) ولوحظ وجوده في بعض الانواع النباتية كزنابق الماء واوراق الخردل (Saline and Bridage ,1980) . اذ يثبط هذا الانزيم بواسطة  $H_2O_2$  ولكنه مقاوم الى تثبيط KCN . هنالك مجموعتين متميزتين من FeSOD الاولى Homodimer تتكون من وحدتين بروتينية متطابقة مع وزن جزيئي 20 كيلو دالتون Yost and (Fridovich,1973). المجموعة الثانية موجودة في معظم النباتات هي Tetramer تتكون من اربع وحدات ثانوية متطابقة مع وزن جزيئي ( ٨٠ - ٩٠ ) كيلو دالتون (Barro et al.,1990)

## 2-5-2 : منغيز سوبراوكسايد دسميوتيز MnSOD

وكما تم الذكر ، كلما ارتفعت مستويات  $O_2$  في البيئة ، كلما قلت كمية Fe المتوفرة مما يسبب التحول الى المعادن الاكثر وفرة Mn(II). يتوزع Mn بصورة متجانسة في السايوتوبلازم للخلايا البدائية (Stanman,1994) وفي المتوكونديريا للخلايا حقيقية النواة (Weisiger and Fridovich,1973) كما يوجد في النباتات المتمثلة بحبوب الحنطة Fridovich,1973 (Beauchamp and) والذرة والبزاليا (Fridovich ,1974b) وعزل لأول مرة من *E.coli* (Kelle et al.,1970). كما سجلت العديد من الدراسات عزله من الخميرة كما في *Saccharomyces Cerviesiae* (Ravindranath and Fridovich,1975) وعزل ايضا من *Staphylococcus sanguris* (Janulezyk et al.,2003) MnSOD يكون اما Homodimer او Homotetradimeric ذو وزن الجزيئي (٤٠ - ٤٦) كيلو دالتون ولكن الوزن الجزيئي في انواع عديدة من البكتريا (١١٠ - ١٤٠) وانزيم MnSOD مقاوم الى KCN و  $H_2O_2$  (Alscher et al.,2002) . MnSOD الموجود في النبات يمتلك تقريبا ٦٥ % من التسلسل المشابه لبعضها الاخر وهذه الانزيمات لها ايضا اوجه عالية التشابه مع انزيمات البكتريا (Bowler) et al.,1992 .

لوحظ من دراسات الاشعة السينية ان تركيب MnSOD و FeSOD متطابق بلورياً ويختلف بدرجة كبيرة عن تركيب Cu/ZnSOD، اذ تمتلك الوحدات المكونة للـMnSOD، وFeSOD منطقتين منطقة النهاية الامينية N-terminal التي تحتوي على اثنين من التراكيب الحلزونية المنفصلة من نوع  $\alpha$ ، ومنطقة النهاية الكاربوكسيلية التي تحتوي على تركيب  $\alpha/\beta$  اذ يتكون من ثلاث شرائط من نوع  $\beta$  محاطة من كلا الجانبين بأربعة حلزونات من نوع  $\alpha$  منتظمة بشكل تركيب ثلاثي الابعاد Three (dimentional) structure (Miller, 2001). ويتكون الموقع الفعال من ثلاثة احماض امينية من الهستيدين وحمض الاسبارتيت مكونة شكل هرمي مزدوج (Trigonal- bipyramidal)، وقد ترتبط

جزيئة ماء بالموقع الفعال. ولوحظ ان His<sub>163</sub> ، Asp<sub>159</sub> في منطقة النهاية الكاربوكسيلية، اما His<sub>74</sub>، His<sub>26</sub> في منطقة النهاية الامينية ( Beyer *et al.*, 1989; Stroupe *et al.*, 2001 ).



الشكل (2-4): يوضح التركيب الهرمي المزدوج المثلي للموقع الفعال MnSOD ( Stroupe *et al.*, 2001 ).

### 3-5-2 : نحاس / زنك سوبراوكساييد دسميوتيز Cu/ZuSOD

يوجد انزيم (Cu/Zn SOD) في الغالب في كل مكونات الخلية ، فهو موجود بصورة رئيسية في العصارة الخلوية (Kim *et al.*,2008) ، و البلاستيدات الخضراء ( Kliebenstein *et al.*,1998; Kim ) ، والنواة ( Ogawa *et al.*,1996; Kim *et al.*,2008 ) ، والاجسام الدقيقة ( et al.,2008 ) و Peroxisomes (Bueno *et al.*,1995) و Apoplasts ( Karpinska *et al.*,2004; Karlsson *et al.* ) . وهو من اكثر من الانواع الموجودة في النبات ، ولا يمتلك تنابعا مشابها للـ Fe,Mn SOD ( Fink and) Scandalios,2002 .

ويتميز هذا الانزيم بالثباتية العالية تبعاً لوجود الاواصر الكبريتية الثنائية Disulfide bond داخل الوحدات الفرعية Intrsubunit المكونة للانزيم وتراص السطوح الكارهة للماء التي تفصل الوحدات الفرعية Subunit فضلاً عن وجود تركيب  $\beta$ -barrel ( Fridovich,1974b; Battistoni ) . ( et al.,1998 ) .

عادة ما تكون هذه الانزيمات مستقرة جدا تتحمل التعرض للمذيبات العضوية وتبقى فعالة في تركيز 8 مولاري يوريا (Forman and Fridovich,1973) . لوحظ وجود هذا النوع في الخميرة *Saccharomyces Cerviesiae* (Ravindranath and Fridovich,1975) . كذلك وجد في النبات وبنوعين هما السايوتوبلازمي يوجد في النبات في جميع انحاء الخلية وله نوعان مختلفان الاول هو السايوتوبلازمي والبريبلازمي ويكون Homodimer والثاني هو Chloroplast والخارج الخلوي هو Homotetrameric (Bardo et al.,1994) . انزيم Cu/ZnSOD يكون ذائب وكتلته الجزيئية ٣٢ كيلو دالتون ويتكون من وحدتين ثنويتين متماثلتين كل وحدة ثنوية تتكون من Cu و Zn .

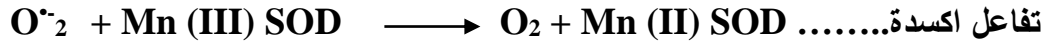
## 6-2: الوظيفة الحيوية لأنزيم السوبراوكسايد دسميوتيز SOD

معظم الكائنات الحية ، الاحياء المجهرية ، النباتات والحيوانات تمتلك على الاقل نوع واحد من انزيم SOD (Scott and Euton, 1987) . SOD في السابق كان يعتقد من البروتينات المعدنية مع وظيفة غير معروفة مثل Cu/ZnSOD معروف بـ (Erthrocurpin) and (McCord) (Fridovich,1988) . لكن مؤخراً اثبت ان انزيم SOD يحفز تحول انيونات السوبراوكسايد الى الاوكسجين الجزيئي وبيروكسيد الهيدروجين ، الاخير بدوره يتحول الى الماء بواسطة Catalase و Peroxidase (Que et al.,2010) .

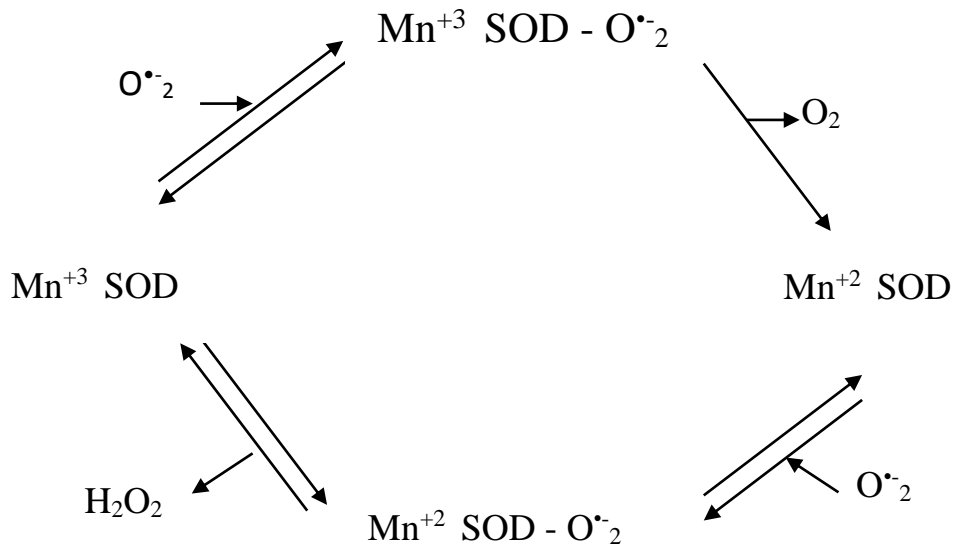
اذ تأتي اهمية هذا الانزيم من دوره المهم في حماية الخلايا من الاضرار الناتجة من الاكسدة ودوره في تنظيم تركيز الـ  $O_2^-$  في الخلايا والذي بدوره يعد مؤكسداً قوياً ونتاجاً غير مرغوب فيه نتيجة للايض الخلوي (Christianson, 1997). انزيم SOD يلعب دوراً مهماً في حماية انسجة النبات خلال مراحل مختلفة من النمو ، التطور ، الشيخوخة حتى قبل وبعد حصاد الفواكه . انزيمات SODs تحمي الخلايا والانسجة من التأثير الضار لأنيون السوبراوكسايد بأزالته قبل ان يتفاعل مع  $H_2O_2$  الخلوي ليكون جذور الهيدروكسيل ( $OH^\cdot$ ) شديدة التفاعل والتي تتكون عن طريق تفاعل Fenton (Kumagai et al.,1994; Fridovich,1978) . قد يرجع تلف الخلايا الى انزيم SOD نفسه لذلك فإن الوظيفة الرئيسية لأنزيم SOD هي ازالة جذور السوبراوكسايد التي تتولد خلال العديد من العمليات الفسيولوجية ، وبالتالي يمنع تأكسد الجزيئات البيولوجية اما بواسطة الجذور نفسها او عن طريق مشتقاتها ، (Alscher et al.,2002) . انزيم SOD يعرف بأنه انزيم مستقر بسبب تركيب  $\beta$ -barrel او المحتوى الواطئ من تركيب  $\alpha$ -helix (Ursby et al.,1999) .

## 7-2 : الية عمل انزيم SOD

يعمل انزيم SOD عن طريق تفاعل جزئي ثنائي يتطلب وجود جزيئين من  $O_2^{\bullet-}$  تشمل تفاعلين نصفيين الاول هو تفاعل اكسدة والذي يتم من خلال اكسدة  $O_2^{\bullet-}$  الى الاوكسجين الثنائي والآخر هو تفاعل اختزال يتحول فيه الـ  $O_2^{\bullet-}$  الى  $H_2O_2$ .



يختلف هذان التفاعلان في حالة الاكسدة عنه في الاختزال للانيون المعدني ( Bull *et al.*, 1991; Ludwig *et al.*, 1991 ).



الشكل (5-2) : الية عمل انزيم Superoxide dismutase (Ludwig *et al.*, 1991).

## 8-2 : استخلاص انزيم Superoxide dismutase

هنالك بعض الاعتبارات الاولية التي يجب الاعتماد عليها عند محاولة استخلاص الانزيمات من مصدر ما كأيجاد المصدر الملائم لأستخلاص الانزيم وبكميات كبيرة وبطرائق بسيطة ومتوفرة مع تحديد موقع الانزيمات داخل الخلية فيما اذا كان حرا في المحلول او مرتبطا بأحد اجزاء الخلية فضلا عن ذلك قد يستلزم اتباع برنامج علمي لأجل الاستخلاص وفصل المناظرات الانزيمية ( دلالي ، ١٩٨٣ ) .

استخلص انزيم SOD من مصادر عديدة ، اذ استخلص من اوراق التبغ *Nicotiana tubacum* بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7 ( Gupta et al.,1993 ) . كما تم استخدام اوراق نبات الحنطة *Triticum aestivum* L. بمزج ٣٠ غم من اوراق النبات مع ١٠٠ مليلتر من دارئ فوسفات الصوديوم وبرقم هيدروجيني ٦,٥ ( Asthir et al.,2011 ) . كذلك من اوراق الذرة الهجين *Zea maize* بمزج ١ غم من اوراق النبات مع ٨ مليلتر من ٥٠ ملي مولار فوسفات البوتاسيوم الدارئ وبرقم هيدروجيني ٧ والحاوي على PVP، ثم يليه النبد المركزي بسرعة 10.000xg ولمدة ١٥ دقيقة ( Chorianapoulon et al.,2012 ) . استخدمت ايضا اوراق نبات البامبوزيا *Syzygium cumini* بمزج 1 غم من الاوراق في 8 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 0.1 ملي مولار EDTA-Na2 و 1% PVP في جفنة خزفية مبردة . نبد المزيج بمنبذة مبردة بسرعة 20.000 rpm وبزمن 20 دقيقة ( Choudhary and Saroha, 2012 ) . كذلك تم الحصول عليه من بذور نبات القטיפية *Amaranthus spinosus* بأستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ وبرقم هيدروجيني ٧، ويليه النبد المركزي بسرعة 10.000 ولمدة ١٥ دقيقة ( Sharma et al.,2014 )

## 9-2 : طرق قياس فعالية انزيم Superoxide dismutase

التقدير الكمي للفعالية الانزيمية يمكن ان يجري بصورة سريعة وتقليدية عندما تكون مادة التفاعل او الناتج له ميزة لونية او قدرة على امتصاص الضوء على طول موجي معين ومتابعته بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer ( دلالي ، ١٩٨٣ ) .

تم تقدير فعالية انزيم SOD بطرق غير مباشرة معتمدة على التنافس بين الانزيم و مركبات تعد ادلة كنس ( $O_2^{\bullet-}$  Indicating scavenger) ، يعمل SOD على تثبيط ادلة الكنس اذ ان وحدة واحدة من الانزيم تسبب تثبيطا مقداره ٥٠% ( Firidovich,1974b ) . قيست فعالية انزيم SOD بطرائق متنوعة معتمدة على Xanthine oxidase بأعتبره مصدر لأنتاج  $O_2^{\bullet-}$  والذي يمكن الكشف عنه اما باختزاله

الى Cytochrome C عند طول موجي ٥٥٠ نانوميتر (Peyer and Fridovich,1987) او الاكسدة الذاتية لل Pyrogallol عند طول موجي ٤٢٠ نانوميتر (Marklund and Marklund,1974) او Nitro Tetazolium (NBT) الى Formazan عند طول موجي ٥٦٠ نانوميتر (Beaucham and Fridovich,1971) . او Epinphrine الى Adrenochrome عند طول موجي ٤٨٠ نانوميتر (Misra and Fridovich,1972) او Tetranitromethan الى Nitroform عند طول موجي ٣٥٠ (Forman and Fridovich,1973) . كذلك يمكن ان تقاس الفعالية بطريقة تعتمد على استخدام مصدر كهربائي ضوئي لتوليد  $O_2^-$  ، مثل صبغة (Riboflavin) الحساسة للضوء اذ عند تعرضها للضوء تؤكسد بعض المركبات الواهبة للاكترون مثل EDTA و Methionine . تختزل هذه الصبغة الى Semiquinone ويعمل هذا المركب على اختزال جزيئة الاوكسجين الى  $O_2^-$  والذي بدوره يختزل ال NBT الى Formazan ازرق غير دائم وعدم ذوبانية الفورمازان لها تأثير في تقدير فعالية الانزيم في المحاليل الحرة ، وامكن التغلب على هذه المشكلة بأضافة Triton X -100 (Fridovich,1974a; Beyer and Fridovich,1987) .

هنالك طريقة اخرى يتم من خلالها قياس فعالية انزيم SOD تعتمد على استخدام Water-soluble tetrazolium salt (WST-S) اذ امكن الحصول على نسبة تثبيط ١٠٠ % بواسطة الانزيم وبدون التداخل مع المكونات الاخرى (Uked,2000) .

## 10-2: طرق تنقية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز

### Purification of Superoxide dismutase

دراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية للانزيم تتطلب تنقيته للتخلص من الشوائب والبروتينات غير المرغوب فيها المتواجدة في المستخلص الانزيمي (المظفر، ١٩٩٠) . يكمن الهدف الرئيس من عملية التنقية عزل الانزيم في المستخلص الخام عن بقية مكونات الخلية والملوثات المتواجدة معه (Robert et al.,2000).

ولدراسة صفات الانزيم وخواصه الحركية توجد عدة تقنيات لتنقية الانزيمات والبروتينات بصورة عامة معتمدة على معايير مختلفة كالاختلاف في كثافة الشحنة ، الحجم ، شكل الجزيئة والتخصص في الارتباط بمجاميع معينة والتي تشمل على الترسيب بالاملاح والمذيبات العضوية



وكروموتوكرافيا التبادل الايوني Ion exchange ، و الترشيح الهلامي Gel filtration ، و الهجرة الكهربائية Electrophoresis ، و الترشيح الفائق Ultrafiltration ، و الديليزة Dialysis (Scopes,1987; Sueiter,1985;) Affinity chromatography اللفة وكروموتوكرافيا (Stellwagen,1990) . من النادر الحصول على الانزيم بصورته النقية من تطبيق خطوة واحدة (Whitaker,1972) .

وردت عدة طرائق لتنقية انزيم SOD اذ تمكن Salin و Bridge (1980) من تنقية الانزيم من اوراق الخردل بعدد خطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم وكروموتوكرافيا التبادل الايوني على عمود DEAE- Cellulose بثلاث خطوات متتالية ثم الترشيح الفائق . كذلك نقي الانزيم المستخلص من الصنوبر البري *Pinus sylvestris* بعدد خطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم وكروموتوكرافيا التبادل الايوني على عمود DEAE-52 ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephadix G-100 (Wingsle et al.,1991) كذلك تمكن Karpinska وجماعته (2001) ايضاً من تنقية الانزيم من الصنوبر البري *Pinus sylvestris* بعدد خطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم وكروموتوكرافيا التبادل الايوني على عمود DEAE-Celullose ثم الترشيح الهلامي على عمود Phenyl Sepharose. نقي انزيم Cu/ZnSOD ايضاً من بذور *Radix lethospermi* بعدد خطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم و التبادل الايوني على عمود DEAE-52 ثم الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephadex G-200 ثم DEAE-52 مرة اخرى Haddad and Yuan, (2005) . وفي دراسة اخرى نقي الانزيم من نبات *Camellia* اذ حددت خطوات تنقية متتابعة شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم و التبادل الايوني باستخدام عمود DEAE-Cellulose(DE52) ومن ثم كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-100 و Phenyl sepharose (Iae-Hong et al.,2005) . كذلك نقي انزيم Cu/ZnSOD من الثوم *Allium sativum* L. باستخدام عمود DEAE-Sepharose وترشيح هلامي باستخدام عمود Sephacryl S200-HR و Chromatofocusing باستخدام PBE94 (Hadji et al.,2007) .

كما نقي الانزيم من بادرات الحنطة بخطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم ، التبادل الايوني والترشيح الهلامي اذ وجد نوعين للانزيم في المستخلص الخام للنبات SODII, SODI (Lai et al.,2008) . كذلك نقي الانزيم من نبات الكركم *Curcuma aeruginosa* بخطوات تنقية

شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم ثم تبادل ايوني DEAE- cellulose ثم الترشيح الهلامي باستخدام هلام 75 Sephadex ( Moon-Aiet al.,2012) .

## 11-2: توصيف انزيم SOD

### Characterization of Superoxide dismutase

#### 1-11-2: الوزن الجزيئي لانزيم SOD

#### Molecular weight of SOD

يختلف الوزن الجزيئي لانزيم SOD تبعا للمصدر المستخلص منه ، واستخدمت عدة تقنيات لتعيين الوزن الجزيئي منها : تقنية الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة SDS، والترشيح الهلامي، والنبد المركزي فائق السرعة او عن طريق حساب المحتوى الانزيمي في الاحماض الامينية .

ففي احدى الدراسات حسب الوزن الجزيئي لانزيم Cu/ZnSOD في الرقي *Citrullus vulgaris* اذ بلغ ٣٣,٠٠٠ دالتون وله وحدتان ثانويتان اذ بلغ الوزن الجزيئي لها ١٦,٥٠٠ دالتون بأستخدام الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة SDS-PAGE (Bueno et al.,1995) . في حين قدر الوزن الجزيئي لأنزيم Cu/ZnSOD المنقى من اوراق التبغ *Nicotiana tobacum* 23 كيلو دالتون باستخدام SDS-PAGE ( Sheng et al.,2004). كذلك قدر الوزن الجزيئي لأنزيم Cu/ZnSOD في نبات *Radix lethosporum* بأستخدام الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة 30.500 دالتون ( Haddad and Yuan,2005) . كما بلغ الوزن الجزيئي لأنزيم SOD في ثمار السدر *Zizyphus mauritiana* Lamk 35,6 كيلو دالتون (Kumar and Malhotra, 2008) . بينما الوزن الجزيئي لانزيم MnSOD في بادرات الحنطة 23 كيلو دالتون مع نقطة تعادل كهربائي

3.95 (Lai et al.,2008) . كذلك حدد الوزن الجزيئي لأنزيم Cu/Zn SOD المنقى من الثوم *Allium sativum* L. 39 كيلو دالتون باستخدام HPLC على عمود G2000SW في حين اظهر SDS-PAGE وجود حزمة واحدة ذات وزن جزيئي 18 كيلو دالتون (Hadi et al.,2007) . اما الوزن الجزيئي لانزيم MnSOD المنقى من قصب السكر 25.3 كيلو دالتون (Que et al.,2012) .

## 2-11-2: الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثباتية انزيم السوبراوكساييد دسميوتيز

### Optimum pH for SOD Activity and Stability

ان للرقم الهيدروجيني تأثير كبير في سرعة التفاعلات الانزيمية وتأمين مجموعات الايون لموقع الانزيم النشط وتأثير التآين في مكونات وسط التفاعل الاخرى كالمادة الاساس والمرافق الانزيمي باعتبارها مواد اساسية وعوامل مساهمة لذلك يكون تأثيرها كبير في حال وجود الرقم الهيدروجيني الامثل لأن مقدار التفاعل الانزيمي يكون في اقصاه وان الارتفاع والانخفاض عن قيم الرقم الهيدروجيني الامثل سيقلل من نسبة التفاعل فينخفض نشاط الانزيم الناتج عن التغيير في تركيب الانزيم (دنتره) (الداودي ، ١٩٩٠) .

يعتبر الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم ضروريا لتوفير البيئة الملائمة لخرن الانزيم ، ويعتمد الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم على عوامل عديدة منها درجة الحرارة ، والقوة الايونية ، وطبيعة المحلول الدارى، وتركيز المنشطات والمثبطات، ومواد الاساس و تركيز الانزيم (Whitaker,1972) .

ففي دراسة حول انزيم FeSOD المنقى من الليمون *Citrus limonum* R.cv. Verna وجد ان اعلى فعالية انزيمية سجلت عند رقم هيدروجيني 7.8 (Almansa et al.,1994) في دراسة اخرى لانزيم SOD المنقى من اوراق التبغ *Nicotiana tobacum* وجد ان الانزيم اكثر ثباتا عند قيم pH (6-5) وبدرجة حرارة 25 °م لمدة 60 دقيقة (Sheng et al.,2004) .

بينما انزيم MnSOD المنقى من بادرات الحنطة كان اكثر استقراراً عند الرقم الهيدروجيني بين (٦ - ٧) والرقم الهيدروجيني الامثل كان ٨ ولكن الانزيم يتحسس للارقام الهيدروجينية المتطرفة وخصوصا الارقام الهيدروجينية الحامضية (Liu- Shiun et al.,2008) . كما ان اعلى فعالية انزيمية

للانزيم في نبات *Curcuma aeroginosa* Roxb سجلت عند رقم هيدروجيني 4 ( Moon-Ai et al.,2012). كما يكون انزيم SOD في الكشمش *Ribes nigrum* اكثر استقراراً عند pH بين (5-7) (Chaudhary et al.,2013).

## 3-11-2 : درجة الحرارة المثلى لفعالية وثباتية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز

### Optimum temperature for SOD Activity and Stability

ان الفعالية الانزيمية لمعظم الانزيمات تزداد بزيادة درجة الحرارة الى ان تصل الى حد معين تبدأ بعدها بالانخفاض بسرعة (Segel,1976) نتيجة لحصول مسخ للبروتين وتأثير درجة الحرارة على التركيب الثلاثي للبروتين (Whitaker,1972) فتتعرض الاواصر الهيدروجينية للكسر فضلاً عن التغيرات التي تطرأ على التاثرات الكارهة للماء مما ينتج عنه تحطم تركيب الموقع الفعال للانزيم ( Backer and Deamer,1991) .

تعرف اقصى درجة حرارة تحفظ النشاط التام للانزيم لمدة من الزمن بدرجة حرارة ثباتية الانزيم وتعتمد مباشرة على تركيز الانزيم والرقم الهيدروجيني وتركيز الملح والعوامل المرافقة (Co-factors) (Declerck et al.,2000) .

المستخلص الانزيمي الخام اكثر مقاومة للحرارة العالية من الانزيم النقي لوجود الانزيم مع مواد اخرى مثل الكربوهيدرات وبروتينات اخرى تعد حماية للانزيم ويكون اكثر مقاومة في الظروف الخارجية ، حيث تخلق هذه المواد طرق حماية للانزيم وتحد من تأثير الظروف الخارجية لطبيعة الانزيم . ان زيادة نقاوة الانزيم بالفصل عن هذه المواد تجعله اكثر حساسية للعوامل الخارجية واقل استقرارية (Segal,1976) .

تعتبر درجة الحرارة من العوامل الضرورية التي تؤدي الى وصول الفعالية الانزيمية الى اقصى ما يمكن ، حيث عند التحضير العملي يجب تجنب درجة الحرارة غير المناسبة لكونها تسبب تثبيط الانزيم ( Liu et al.,2013) . معظم انزيمات SOD في النبات والحيوان تمتلك درجة حرارة مثلى منخفضة . انزيم SOD العصاري و SOD الساييتوبلازمي وحتى SOD الذائب في العديد من الانسجة النباتية يظهر درجة حرارة مثلى بين ( ٢٠ - ٣٥ ) °م ( Babitha et al.,2002) . وقد لوحظ ايضاً الثبات

الحراري لأنزيم SOD ، حيث تجلى الثبات الحراري للانزيم بين (10 – 60) °م وبدرجة حرارة مثلى ٢٠ °م .ففي دراسة لأنزيم Cu/ZnSOD وجد ان الانزيم يكون اكثر استقرارا عند درجة حرارة بين (25-45) °م بعد مدة حضان 30 دقيقة ( Haddad and Yuan,2005) .حيث اظهر الانزيم تحمله لدرجات الحرارة العالية مع زيادة في الفعالية بدرجة حرارة ٤٥ °م ، مع ذلك فإن تراجع الفعالية للنباتات ربما يعود الى المسخ الحراري للانزيم الذي يعتمد على تركيب الوحدات الثانوية ( Bakardjieva *et al.*,2000).

بينت احدى الدراسات تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم SOD في نبات الأكاف *Agave attenuata* حيث سجل الانزيم النقي اعلى فعالية عند درجة حرارة ٤٠ °م ، اذ ان الانزيم مستقر نسبيا بدرجة حرارة ٦٠ °م ولكن يصبح غير فعال بسرعة عند درجة حرارة ٧٠ °م ( Chen *et al.*,2011)

## 2-11-4: تأثير المثبطات في فعالية انزيم السوبراوكساييد دسميوتيز

### Effect of inhibitors on SOD activity

يمكن تعريف المثبطات على انها مواد تعمل على ابطاء سرعة التفاعل الانزيمي بصورة عكسية Reversible inhibition او لا عكسية Irreversible inhibition وتشكل معرفة المثبطات اهمية كبيرة في توصيف الانزيم (Berret,1977) . فالمثبطات العكسية ترتبط بالانزيم بطريفة يمكن ازالها بالدليزة ويمكن في بعض الاحيان ازلتها بأضافة مركب اخر الى خليط التفاعل (دلالي ، ١٩٨٣) .

تأثير الايونات المعدنية يختلف بالاعتماد على نوع الانزيم المعدني اذ وجد ان لكل انزيم خصوصية كاملة للمعدن الموجود في الانزيم الاصلي ، فقد لوحظ في انزيم Cu/Zn SOD ان استبدال ايون  $Cu^{+2}$  باي معدن اخر يكون مرتبطا بفقدان كامل للفعالية ، بالمقابل وجد ان ايون  $Zn^{+2}$  ممكن استبداله بأيونات مثل  $Cd^{+2}$  ،  $Co^{+2}$  و  $Hg^{+2}$  و  $Cu^{+2}$  بدون اي فقدان للفعالية . اما انزيم Mn SOD فإن استبدال ايون  $Mn^{+2}$  بأيونات  $Co^{+2}$  و  $Fe^{+2}$  و  $Cu^{+2}$  و  $Zn^{+2}$  تؤدي الى فقدان الفعالية ، مثلما لوحظ في انزيم FeSOD عند استبدال ايون  $Fe^{+2}$  بأيونات معدنية اخرى (McCord and Fridovich,1969; Fridovich,1974b; Beyer *et al.*,1989) .

اكدت العديد من الدراسات ان للمواد المخيلية مثل EDTA تأثيرا مزدوجا اذ وجد من الدراسة على انزيم MnSOD استخدام EDTA بتراكيز واطئة تصل الى ٠,١ ملي مولار ترفع من الفعالية

الانزيمية ، وذلك عن طريق دوره في ازالة الايونات المعدنية الضعيفة الارتباط التي لا تساهم في الوظيفة التحفيزية (Fridovich,1974b; Ravindranath and Fridovich1975) وعند استخدامها بتركيز عالية تصل الى 1 ملي مولار يؤدي الى فقدان 85 % من الفعالية الانزيمية McCord and Fridovich,1969). فقد بينت احدى الدراسات على انزيم Cu/ZnSOD المنقى من *Radix lethospermi* ان عند استخدام 2 ملي مولار من EDTA و SDS فقد الانزيم تقريبا 18 و 34 % على التوالي من فعاليته (Haddad and Yuan,2005) .

اذ بينت احدى الدراسات تأثير KCN و  $H_2O_2$  لأنزيم MnSOD المنقى من اوراق نبات *Mesembryanthemum crystallinum* L. لوحظ عدم تأثر الانزيم بأستخدام 5 ملي مولار من  $H_2O_2$  و 3 ملي مولار KCN (Miszalski et al.,1998) . كذلك لوحظ عدم تأثر انزيم MnSOD المنقى من بادرات الحنطة عند استخدام  $H_2O_2$  و KCN (Lai et al.,2008) . بينما ثبت انزيم Cu/ZnSOD المنقى من بذور *Radix lethospermi* عند استخدام  $H_2O_2$  و KCN (Haddad and Yuan,2005) .

## 12-2: حركيات أنزيم السوبراوكساييد دسميوتيز Kinetics of SOD

يعد الهدف الرئيسي من دراسة الثوابت الحركية للأنزيمات هو التعرف على تخصص الأنزيم والفته تجاه المادة الأساس حيث تختلف الأنزيمات فيما بينها بصفاتهما الحركية حسب نوع الأنزيم ومصدره فهناك عدة عوامل تؤثر على قيم الثوابت الحركية للأنزيم منها درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني ، تركيز المادة الأساس والأنزيم . أن تركيز المادة الأساس ممكن أن يستنتج من سرعة التفاعل الذي يحفز بالأنزيمات (Bergmeyer, 1974) فهناك قيمة حركية ممكن أن تعبر عن تركيز المادة الأساس تدعى بثابت ميكالس منتن ( $K_m$ ) الذي يمكن تعريفه بأنه ( تركيز المادة الأساس عندما تكون السرعة الاولية مساوية لنصف السرعة القصوى ) حيث يمكن أن يعد هذا الثابت دليل او مؤشر على مدى ألفة الأنزيم تجاه المادة الأساس وان انخفاض قيمته تدل على ان الأنزيم له ألفة عالية تجاه المادة الأساس والعكس بالعكس ( Segel , 1976) .

قدر ( $K_m$ ) و ( $V_{max}$ ) لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الحنطة *Triticum aestivum* L. المصابة بالصدأ المخطط والغير مصابة اذ قدر ( $K_m$ )  $1.77 \pm 2.37$  ملي مولار للاوراق المصابة و  $1.82 \pm 2.51$  ملي مولار للاوراق الغير مصابة اما ( $V_{max}$ )  $12.4 \pm 24.1$  ملي مولار للاوراق المصابة و  $9.55 \pm 21.4$  مايكرومول / دقيقة / غم بأستخدام Pyrogallal مادة اساس (Asthir et al.,2011) .

## 13-2: الاستخدامات التطبيقية لأنزيم Superoxide dismutase

نظرا لتأثيراته المضادة للاكسدة ، فإن انزيم SOD له العديد من الاستخدامات التطبيقية في مجال الطب وكذلك التجميل، و الاغذية ، والزراعة والصناعات الكيميائية (Liu *et al.*,2011) .

كذلك قد تبين ان وجود انزيمات SOD قد يساعد على حماية العديد من انواع الخلايا من ضرر الجذور الحرة المهمة في الشيخوخة ، وتلف الانسجة الدماغية ، ويساعد ايضا على حماية الخلايا من التلف في الحمض النووي DNA، و اضرار الاشعة المؤينة، و تحطم البروتين والاشكال العديدة الاخرى من التدهور التدريجي للخلايا . SOD يستخدم في مستحضرات التجميل للحد من ضرر الجذور الحرة على الجلد ، على سبيل المثال الحد من التلف بعد الاشعاع لسرطان الثدي (Compana,2004) .

كذلك وجد ان التنظيم المتخصص للانزيمات المضادة للاكسدة ممكن ان تجهز طريقة جديدة لمنع امراض الجهاز المناعي ومعالجتها (Marikovsky *et al.*, 2003). ومن الدراسات وجد ان الـ MnSOD اكثر ملائمة للاستخدامات الطبية بسبب قدرته على البقاء في المصل 5-6 ساعات قياساً مع Cu/ZnSOD الذي يستمر وجوده 6-10 دقائق (Koppenol *et al.*, 1986).

وبرزت اهمية الانزيم في امكانية استخدامه كدواء في علاج العديد من الحالات الفسلجية والمرضية والتي تحدث بفعل انواع الاوكسجين التفاعلية مثل التهاب المفاصل الرثوي ، و التهاب المثانة ، والتكسبات العصبية كما يستخدم في معالجة امراض الجهاز المناعي مثل الايدز وداء الذؤابة الاحمراري (Proctor and Reynolds,1984) .

الاستقرار الحراري هي واحدة من المتطلبات الرئيسية لأنزيم SOD التجاري . وهذه الحقيقة حفزت اهتمام واسع النطاق في الكيمياء الحياتية والبيولوجي الجزيئي للكائنات المتحملة للحرارة Extremophiles. فالانزيمات الحرارية Thermoenzymes تكون اعلى استقرار وفعالية من نظائرها المستخدمة في الصناعات التكنولوجية الحيوية. لذلك فإن الانزيمات الحرارية ليست فقط للحرارة لكنها مقاومة ايضا للعوامل الكيميائية من Mesophiles المتماثلة وهذه الخصائص تجعلها مهمة للغاية لتطبيقها في العمليات الصناعية (Morozkina *et al.*,2010) .

### 3 : المواد وطرائق العمل Materials and Methods

#### 1-3 : الاجهزة والمواد Apparatus and Materials

1-1-3 : الاجهزة المستعملة في الدراسة :

جدول (1-3) : الاجهزة المستعملة :

| الشركة المصنعة والمنشأ             | أسم الجهاز                                    |
|------------------------------------|---|
| Beriin (Germany)                   | Mortar ceramic جفنة خزفية                     |
| Bio-Rad (U. S .A)                  | Electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي        |
| GFL (Germany)                      | Water bath حمام مائي                          |
| Rota mixer(England)                | Vortex مازج                                   |
| Bio-Rad (U.S.A)                    | Power supply مجهز القدرة                      |
| Boitec (sweden)                    | Magnetic stirrer محرك مغناطيسي                |
| FED-REP(Germany)                   | Vacuum Pump مضخة تفريغ                        |
| Spectronic 20 (Bosh& lamp) (U.S.A) | Visible spectrophotometer مطياف الاشعة المرئي |
| Shimadzu-uv (Japan)                | UV/Visible مطياف الاشعة فوق البنفسجية         |



|                     |                    |                         |
|---------------------|--------------------|-------------------------|
|                     | spectrophotometer  |                         |
| Jenway (Germany)    | pH meter           | مقياس الـاس الهيدروجيني |
| Sartorius (Germany) | Sensitive balance  | ميزان حساس              |
| Beckman (U.S.A)     | Cooling centerfuge | نابذ مبرد               |

2-1-3: المواد : واد :

1-2-1-3 : المواد الكيميائية :

جدول (2-3) : المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة :-

| الشركة المجهزة<br>والمنشأ | المادة   |
|---------------------------|--|
| BDH<br>(England)          | Potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ), Potassium monohydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ ), Bovine serum albumin (BSA), Sodium hydroxide (NaOH), Sodium chloride (NaCl), Hydrochloric acid (HCl), Ammonium sulfate ( $NH_4SO_4$ ), Pyrogallol, Ethanol 95%, Phosphoric acid 85%, Polyvinyl pyrrolidon (PVP), Mercury chloride ( $HgCl_2$ ), Sodium azide ( $NaN_3$ ), Casein, Trypsin, TEMED, Ovalbomine, Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), Alkaline phosphatase, Aldolase, Acrylamide, Bisacrylamide, Glycine, Butanol, Acetic acid, Glycerol, TEMED, Bromophenol blue, 2-Mercaptoethanol, Silver nitrate ( $AgNO_3$ ), Formaldehyde, Sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ ), Sodium thiosulfate ( $Na_2S_2O_3$ ), |

|                        |   |
|------------------------|---|
|                        | Acetic acid.  |
| Pharamacia<br>(Sweden) | Sephacryl S-200, Blue dextran 2000, DEAE-cellulose(Diethyl aminoethyl cellulose).   |
| Fluka<br>Switzerland   | Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> ), Potassium chloride (KCl), Ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), Manganese sulfate (MnSO <sub>4</sub> ), Sodium dodecyl sulfate (SDS), Ethylene diamine tetra acetic acid disodium (EDTA-Na <sub>2</sub> ), Potassium cyanide (KCN), Iron sulfate (FeSO <sub>4</sub> ), Tris-base, Zinc chloride (ZnCl <sub>2</sub> ), Copper chloride (CuCl <sub>2</sub> ), Ammonium persulfate. |
| Oxoid<br>(England)     | Sucrose , , Tris-HCl, Dialysis Sacs   |
| Sigma<br>(U.S.A)       | Coomassi Blue(G-250)  |

### 3-1-3: العينات النباتية Plants samples

تم جمع النباتات المستخدمة في الدراسة والتي تشمل كل من (اوراق نبق العجم ،اوراق العاقول اوراق القصب ونبات الطرفة المتكون من (الاوراق و الازهار و الثمار و البذور ) ) من الاراضي

الزراعية المحيطة بجامعة القادسية في محافظة الديوانية بعد تحديد نوع النبات ، وتم انتقاء العينات الطرية وغير المصابة بالأمراض .

### 2-3 : طرائق العمل

#### 1-2-3 : المواد والمحاليل

#### 1-1-2-3 : تحضير المحاليل

❖ محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز ٠,١ مولار وذى الرقم الهيدروجيني ٧,٨ حضر كالاتي :

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ) : (حضر بأذابة ١,٧٤٢ غم من  $K_2HPO_4$  في ١٠٠ مليلتر من الماء المقطر) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) : (حضر بأذابة ١,٣٦ غم من  $KH_2PO_4$  في ١٠٠ مليلتر من الماء المقطر) .

حضر المحلول بمزج ٩١,٥ مللتر من المحلول A مع ٨,٥ مللتر من المحلول B ، ثم عدل الرقم الهيدروجيني باستخدام جهاز ( pH meter ) .

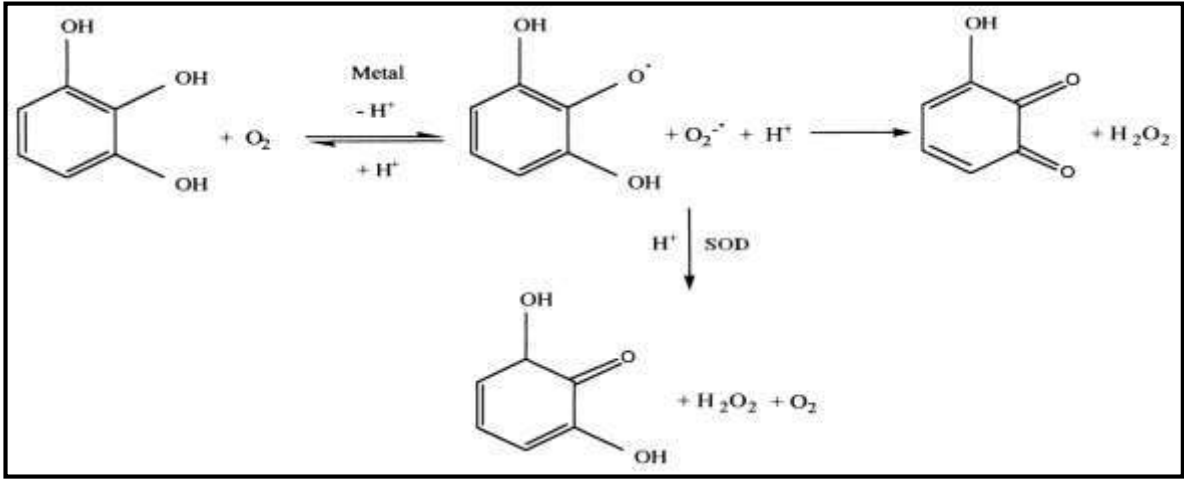
#### 2-1-2-3 : طريقة تحضير المستخلص الانزيمي الخام لأنزيم SOD

حضر المستخلص الانزيمي الخام على وفق الطريقة الموصوفة من قبل ( Wong, 1995 ) مع بعض التحويرات ، وذلك بوزن 5 غرام من النسيج النباتي للنباتات المذكورة اعلاه مع ١٥ مليلتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز ٠,١ مولار ورقم هيدروجيني ٧,٨ والحاوي على 0.1 ملي مولار من EDTA- Na<sub>2</sub> و5% من PVP في جفنة خزفية Morter مبردة لمدة 20 دقائق . رشح المتجانس بأستخدام اربع طبقات من الشاش . ثم نبذ المحلول باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد Cooling Centerfuge بسرعة 15.000 (دورة/ دقيقة) لمدة ٢٠ دقيقة وبدرجة حرارة 0 م° . جمع الراشح والذي يمثل المستخلص الانزيمي الخام .

### 2-2-3 : تقدير فعالية انزيم SOD

#### 1-2-2-3 : مبدأ العمل

تم تقدير فعالية انزيم SOD عن طريق استخدام طريقة سريعة وبسيطة اعتماداً على قدرة الانزيم على تثبيط الاكسدة الذاتية للبايروكالكول بوجود EDTA وبرقم هيدروجيني ٨,٢ . و اساس هذه الطريقة يعتمد على المنافسة بين الاكسدة الذاتية للبايروكالكول بواسطة (O<sub>2</sub>) وازالة هذه الجذور بواسطة SOD (Magnani et al.,2000) .



الشكل (1-3): ميكانيكية تثبيط الاكسدة الذاتية للبايروكالكول (Marklund and Marklund, 1974)

#### 3-2-2-2 : المواد والمحاليل المستعملة

❖ دارى Tris – EDTA ذي رقم هيدروجيني ٨,٢

حضر بأذابة ٢,٨٥ غم من Tris و ١,١١ غم من EDTA –Na<sub>2</sub> في لتر من الماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 8.2 .

❖ محلول Pyrogallol بتركيز ٠,٢ ملي مولار

حضر بأذابة ٠,٢٥٢ غم من Pyrogallol في لتر من الماء المقطر الحاوي على ٠,٦ مليلتر من HCL

#### 3-2-2-3 : طريقة العمل

قدت الفعالية الانزيمية للانزيم بأستخدام Pyrogallol كمادة اساس طبقا للطريقة الطيفية .  
 حيث صفر جهاز ( Spectrophotometer ) بأستخدام دارئ Tris – EDTA ذي الرقم الهيدروجيني  
 ٨,٢ .

### الجدول (3-3) : قياس فعالية انزيم SOD

| Reagent         | Test ( $\mu$ l ) | Control ( $\mu$ l ) |
|-----------------|------------------|---------------------|
| Enzyme solution | 50               | -                   |
| Tris – buffer   | 1000             | 1000                |
| DW              | -                | 50                  |
| Pyrogallol      | 1000             | 1000                |

قدت نسبة الزيادة في الامتصاصية على طول موجي ٤٢٠ نانوميتر في الوقت صفر وبعد دقيقة  
 من اضافة Pyrogallol .

تم تقدير الفعالية الأنزيمية حسب الطريقة الموصوفة ( Marklund and Marklund , 1974 )  
 كالاتي :

$$(\Delta A_{Control}) - (\Delta A_{Test})$$

$$\% \text{ inhibition of pyrogallol } \frac{\text{auto-oxidant}}{(\Delta A_{Control})} \times 100$$

$$\text{auto-oxidant} \quad (\Delta A_{Control})$$

## % inhibition of pyrogallol auto-oxidant

$$\text{SOD activity ( Unit / ml )} = \frac{\text{---}}{\% 50}$$

حيث تعرف فعالية انزيم السوبر اوكسايد دسميوتيز بأنها كمية الانزيم اللازمة لتنشيط 50 % من الاكسدة الذاتية للبايروكالول (Marklund and Marklund,1974) .

### 3-2-3 : تقدير تركيز البروتين

تم تقدر تركيز البروتين اعتمادا على الطريقة الموصوفة من قبل Bradford ( ١٩٧٦ ) وكما يأتي :

### 1-3-2-3 : المحاليل المستخدمة :-

#### ١ . صبغة الكوماسي الزرقاء Coomassia Brilliant blue G- 250

حضرت باذابة ٠,١ غم من مسحوق الصبغة في ٥٠ مليلتر من محلول ٩٥ % ايثانول ، ثم اضيف ١٠٠ مليلتر من ٨٥ % حامض الفسفوريك مع التحريك المستمر في حمام ثلجي واكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر . رشحت الصبغة بورق واتمان رقم (١) (Whatman No. 1) وحفظت في قنينة معتمة ودرجة ٤ ° م .

٢ . محلول ٠,٠٢ مولار ترس حامض الهيدروكلوريك (Tris – HCL) ذي الرقم الهيدروجيني ٧,٥ تم التحضير باذابة ٠,٣ غم من ترس حامض الهيدروكلوريك في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى ٧,٥ اكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر .

#### ٣ . محلول البومين المصل البقري (BSA) Bovin Serum Albumin

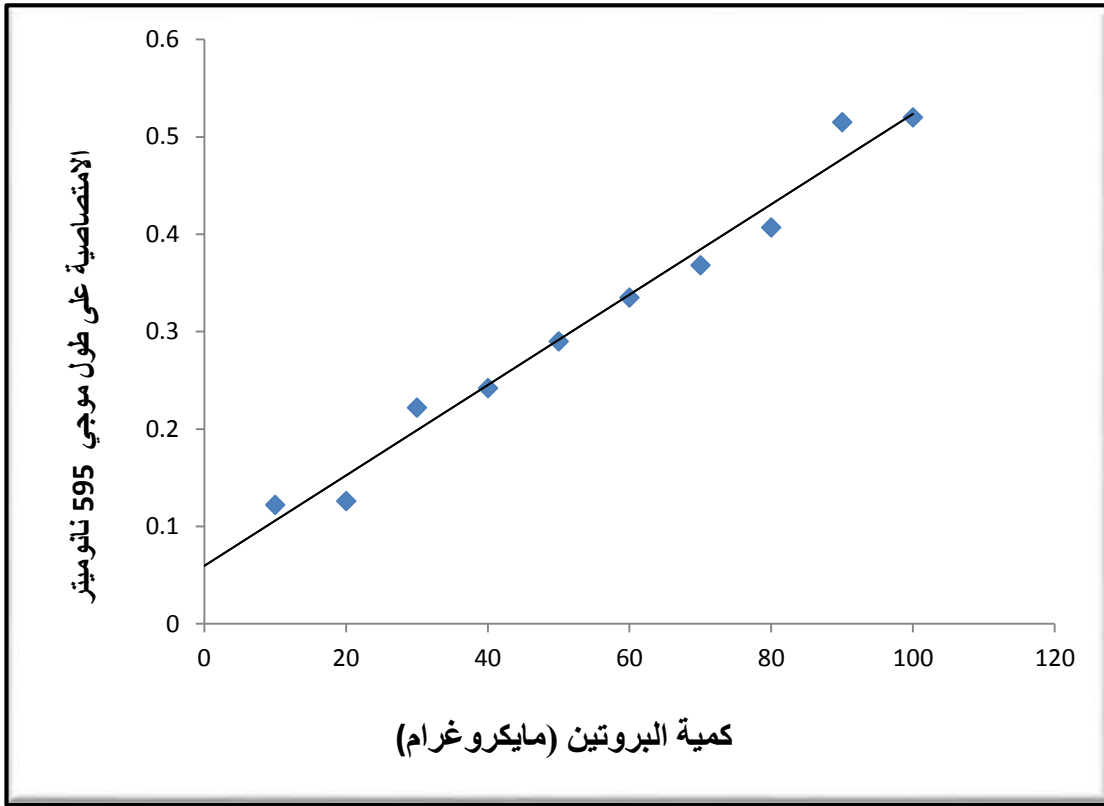
تم تحضير المحلول باذابة ٠,١ غم من البومين المصل البقري في كمية من محلول ترس حامض الهيدروكلوريك الدارئ واكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر بالمحلول نفسه .



قدرة الفعالية النوعية ( Specific activity ) على وفق المعادلة الاتية ( Whitaker and Bernard,1972 ).

فعالية الأنزيم ( وحدة / مليلتر )

الفعالية النوعية ( وحدة / ملغم بروتين )



تركيز البروتين ( ملغم / مليلتر )

الشكل (2-3) : المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين بطريقة برادفورد ( Bradford,1976 )



### 4-2-3 : تحديد فعالية انزيم SOD في الاجزاء النباتية المختلفة لنبات الطرفة

حضر المستخلص الأنزيمي الخام من الاجزاء النباتية المختلفة لنبات الطرفة *T. aphylla* بوزن ٥ غرام من ( الاوراق و الازهار و الثمار و البذور ) واستخلص كل جزء على حدة باستخدام الطريقة الموصوفة في الفقرة (2-1-2-3) ، ثم قدرت الفعالية وتركيز البروتين كما في الفقرتين (2-2-3) و (3-2-3) على التوالي لاختيار الجزء الاكثر فعالية .

### 5-2-3 : تعيين الظروف المثلى للاستخلاص

#### 1-5-2-3 : تعيين التركيز الامثل لمادة EDTA – Na<sub>2</sub> في المحلول الدارئ

استخلص انزيم SOD من اوراق الطرفة بتراكيز مختلفة من مادة EDTA – Na<sub>2</sub> ( ٠,١ ، ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٦ ، ٠,٨ ، ١ ، ٢ ) ملي مولار لتحديد التركيز الامثل ثم قدرت الفعالية وتركيز البروتين بحسب الفقرتين (2-2-3) و (3-2-3) .

#### 2-5-2-3 : تعيين التركيز الامثل لمادة PVP في المحلول الدارئ

استخلص الانزيم من اوراق الطرفة بتراكيز مختلفة من مادة PVP ( ٠,١ ، ٠,٢ ، ٠,٤ ، ٠,٦ ، ٠,٨ ، ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ ) % (وزن / حجم) لتحديد التركيز الامثل ثم قدرت الفعالية وتركيز البروتين بحسب الفقرتين (2-2-3) و (3-2-3) .

### 6-2-3 : تحديد نسبة الاستخلاص الامثل لانزيم SOD

بعد تحديد التركيز الامثل لمادة EDTA-Na<sub>2</sub> والتركيز الامثل لمادة PVP في المحلول الدارئ حسب ما ورد في الفقرتين (1-5-2-3) و (2-5-2-3) اعلاه على التوالي استخلص الانزيم من اوراق الطرفة بنسب استخلاص مختلفة شملت (٢:١ ، ٣:١ ، ٤:١ ، ٥:١ ، ٦:١) نسبة ( وزن : حجم ) ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين كما ورد في الفقرتين (2-2-3) و (3-2-3) على التوالي لتحديد نسبة الاستخلاص الامثل .

### 3-2-7 : تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لدارئ الاستخلاص

استخلص الانزيم من نبات الطرفة ( الاوراق ) بالنسبة المثلى للاستخلاص المنتخب من الخطوة (3-2-6) بأرقام هيدروجينية مختلفة والتي تراوحت بين (4-9) بأستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار .

### 3-2-8 : تأثير تركيز الدارئ على فعالية انزيم SOD

وبعد تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل ، استخلص الانزيم بتركيز مولارية مختلفة تراوحت بين (0.1-0.7) مولار وبرقم هيدروجيني 7.8 لأستخلاص الانزيم من اوراق نبات الطرفة .

### 3-2-8-1 : المواد والمحاليل : -

#### 3-2-8-1-1 : محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ) : ( حضر باذابة 1.742 غم من  $K_2HPO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) : ( حضر باذابة 1.36 غم من  $KH_2PO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول بمزج 91.5 مليلتر من المحلول A و 8.5 مليلتر من المحلول B ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7.8 .

#### 3-2-8-1-2 : محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ) : ( حضر باذابة 3.484 غم من  $K_2HPO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : ( حضر باذابة 2.738 غم من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول كما ورد في الفقرة المذكورة اعلاه.

### 3-1-8-2-3 : محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.3 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) : ( حضر باذابة 5.226 غم من  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : ( حضر باذابة 4.107 غم من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول كما ورد في الفقرات المذكورة اعلاه.

### 4-1-8-2-3 : محلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.4 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) : ( حضر باذابة 6.968 غم من  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : ( حضر باذابة 5.476 غم من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول كما ورد في الفقرات المذكورة اعلاه.

### 5-1-8-2-3 : محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.5 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) : ( حضر باذابة 8.71 غم من  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : ( حضر باذابة 6.845 غم من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول كما ورد في الفقرات المذكورة اعلاه.

### 6-1-8-2-3 : محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.6 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ): ( حضر باذابة 10.452 غم من  $K_2HPO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) : ( حضر باذابة 8.214 غم من  $KH_2PO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول كما ورد في الفقرات المذكورة اعلاه.

### 7-1-8-2-3 : محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.7 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ) : ( حضر باذابة 12.194 غم من  $K_2HPO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ): ( حضر باذابة 9.583 غم من  $KH_2PO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول كما ورد في الفقرات المذكورة اعلاه.

### 9-2-3 : تحديد زمن الاستخلاص الامثل لفعالية انزيم SOD

بعد تحديد نسبة الاستخلاص المثلى والرقم الهيدروجيني الامثل والتركيز الامثل لدارئ الاستخلاص المنتخب في الخطوة (8-2-3) استخلص الانزيم من نسيج الاوراق للطرفه بفترات زمنية مختلفة تباينت بين ( 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 ) دقيقة ، بعدها قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين كما ورد في الفقرتين (2-2-3) و (3-2-3) على التوالي لتحديد الزمن الامثل للاستخلاص .

### 10-2-3 : استخلاص انزيم SOD وتنقيته

#### 1-10-2-3 : الاستخلاص بالظروف المثلى

استخلص انزيم SOD من اوراق الطرفه *T. aphylla* بالظروف المثلى للاستخلاص والتي شملت ، التركيز الامثل للـ  $EDTA-Na_2$  ، التركيز الامثل للـ PVP ، نسبة الاستخلاص ، تركيز

المحلول الدارئ ، pH المحلول الدارئ وزمن الاستخلاص ، ثم نبذ بأستخدام منبذة مبردة بسرعة 15,000 (دورة / دقيقة ) لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 0 م° ، ثم اخذ المحلول الرائق واجريت عليه خطوات التنقية اللاحقة .

### 2-10-2-3 : تنقية الانزيم

نقي الانزيم بأجراء الخطوات الاتية :—

### 1-2-10-2-3 : الترسيب بكبريتات الامونيوم

اضيف ملح كبريتات الامونيوم الى 40 مليلتر من المستخلص الانزيمي الخام والذي حضر في الفقرة ( 2-1-2-3 ) بنسب اشباع مختلفة ( 75, 50, 25, 0 ) % . اذ اختيرت هذه النسب كلاً على حدة وبصورة تدريجية في حمام ثلجي مع المستمر ولمدة مستمر ولمدة 30 دقيقة لحين الحصول على نسبة الاشباع الافضل ، ثم نبذ المحلول بسرعة 15,000 ( دورة / دقيقة ) بدرجة حرارة 4 م° لمدة 20 دقيقة . اضيف ملح كبريتات الامونيوم مرة اخرى الى الراشح للوصول الى نسبة اشباع نهائي -75, 75 (100-75) (0-25, 25-50, 50) % ، ثم نبذ المحلول بسرعة 15,000 ( دورة / دقيقة ) بدرجة حرارة 4 م° لمدة 20 دقيقة بعدها اهمل الراشح واذيب الراسب في حجم معين من 0.1 مولار من دارئ فوسفات البوتاسيوم ذي الرقم الهيدروجيني 7.8 . جرت عملية الديلزة حيال عدة تبيدلات من محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم لمدة ٢٤ ساعة ، وتم تقدير الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين في النموذج كما ورد في الفقرتين (2-2-3) (3-2-3) على التوالي .

### 2-2-10-2-3 : كروماتوغرافيا التبادل الايوني

### 1-2-2-10-2-3 : المواد والمحاليل

محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ) : ( حضر باذابة 1.742 غم من  $K_2HPO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) : ( حضر بأذابة 1.36 غم من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول بمزج 91.5 مليلتر من المحلول A و 8.5 مللتر من المحلول B ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7.8 .

#### ❖ محلول حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز 0.25 مولار

حضر المحلول بتخفيف 10.4 مليلتر من حامض HCl المركز في حجم معين من الماء المقطر ، ثم اكمل الحجم الى 500 مليلتر ماء مقطر .

#### ❖ محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 0.25 مولار- 0.25 مولار كلوريد الصوديوم NaCl .

حضر بأذابة (٥) غرامات من NaOH و(٧,٣٠٩) غم من NaCl في كمية من الماء المقطر ، واکمل الحجم الى ٥٠٠ مليلتر.

#### ❖ محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 1 مولار

حضر بأذابة ٥٨,٤٤ غرام من NaCl في كمية من الماء المقطر واکمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر بالماء المقطر.

#### 2-2-2-10-2-3 : تحضير المبادل الايوني ثنائي اثيل امينو سليولوز DEAE- Cellulose

حضر محلول المبادل الايوني ثنائي اثيل امينو سليولوز ( DEAE-cellulose ) Diethylaminoethyl cellulose بحسب تعليمات الشركة المجهزة Fine Pharmicia Chemical ، اذ علق 20 غراماً من المبادل الايوني في لتر من الماء المقطر في اسطوانة مدرجة وترك ليبرد. ثم سكب السائل العلوي وكررت عملية الغسل عدة مرات بالماء المقطر الى ان اصبح السائل العلوي رائقاً. بعد ذلك رشح المبادل على ورقة ترشيح Whatman No.1 في قمع بخنر تحت التفريغ، نشط الراسب في 500 مليلتر من محلول 0.25 مولار HCl ورشح وغسل عدة مرات بالماء المقطر ثم في ٥٠٠ مليلتر من محلول 0.25 مولار هيدروكسيد الصوديوم و ٠,٢٥ مولار كلوريد الصوديوم، بعدها غسل عدة مرات بالماء المقطر ثم بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ( محلول الموازنة ) المحضر على وفق الفقرة (1-2-2-10-2-3) ، ثم ازيلت الغازات Degassing بمضخة مفرغة للهواء Vacuum pump .

### 3-2-2-10-2-3 : تعبئة العمود

تم تعبئة العمود عن طريق سكب محلول المبادل الايوني على قضيب زجاجي بشكل مائل على جداره الداخلي بصورة بطيئة ومستمرة لمنع تكون فقاعات هوائية الى ان يتم الحصول على ابعاد لمادة DEAE-cellulose في العمود مساوية الى (  $3.5 \times 20$  ) سم. جرت موازنة العمود بمحلول الفوسفات الدارئ المحضر في الفقرة (3-2-2-10-2-3) بسرعة جريان 30 مليلتر /ساعة. بعد ذلك مرر محلول الانزيم بعد خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم في الفقرة (3-2-10-2-3) على عمود المبادل الايوني DEAE-cellulose المحضر كما ورد في الفقرة (3-2-2-10-2-3) والذي سبق موازنته بمحلول الفوسفات الدارئ. جمعت الاجزاء المفصولة من العمود بمعدل جريان 30 مليلتر / ساعة وبواقع 5 مليلتر / جزء للبروتينات غير المرتبطة Wash ، وبعد وصول الامتصاصية على الطول الموجي 280 نانوميتر الى الخط الصفري جرت عملية استرداد Elution البروتينات المرتبطة على المبادل الايوني بوساطة تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم بمدى (0-1) مولار. تمت متابعة الامتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر للاجزاء المفصولة من عمليتي الغسل والاسترداد وقدرت فعالية الانزيم لتلك الاجزاء. جمعت الاجزاء الفعالة وقدرت لها الفعالية وتركيز البروتين ثم ركزت بالسكروز لامرارها على عمود الترشيح الهلامي.

### 3-2-10-2-3 : كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

#### 1-3-2-10-2-3 : تحضير المحاليل

محلول A : محلول فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين ( $K_2HPO_4$ ) : ( حضر باذابة 3.484 غم من  $K_2HPO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

محلول B : محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) : ( حضر باذابة 2.738 غم من  $KH_2PO_4$  في 100 مليلتر من الماء المقطر ) .

حضر المحلول بمزج 91.5 مليلتر من المحلول A و 8.5 مليلتر من المحلول B ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7.8 .

#### 2-3-2-10-2-3 : تحضير هلام Saphacryl S-200

حضر هلام Saphacryl S-200 طبقا لتعليمات الشركة Fine Pharmicia Chemical Company علق 20 غم من مسحوق Saphacryl S-200 في 500 مليلتر من الماء المقطر وسخن

في حمام مائي بدرجة حرارة 90 °م ولمدة 3 ساعات ، ثم ترك ليبرد وغسل مرتين بمحلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7.8 المحضر في الفقرة (3-2-10-2-3) علق المحلول مرة اخرى في كمية مناسبة من المحلول نفسه ، واجريت عملية ازالة الهواء Degassing، عبئ الهلام في العمود ليعطي هلاما بأبعاد (1.5×80) سم واجريت موازنة العمود بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ الذي سبق ذكره .

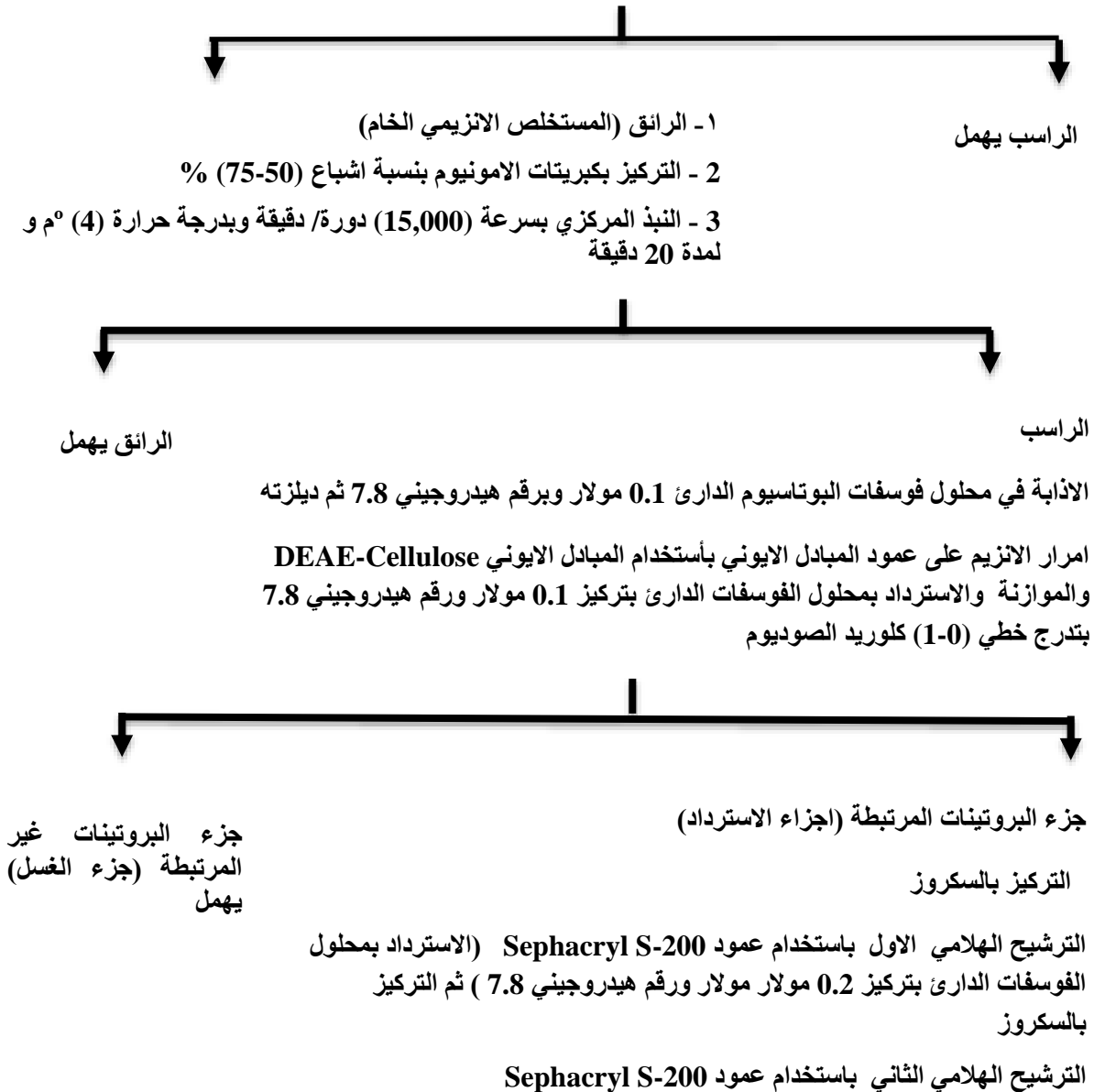
### **3-3-2-10-2-3 : تعبئة العمود**

مرر المحلول الانزيمي الذي تم الحصول عليه بعد خطوة التبادل الايوني على عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-200 واجريت عملية الاسترداد بوساطة محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.8 وبسرعة جريان 60 مليلتر/ساعة، تمت متابعة البروتين في الاجزاء التي جمعت بقياس الامتصاص لكل منها على الطول الموجي 280 نانوميتر، ثم قدرت الفعالية لتلك الاجزاء. ركز الانزيم بالسكروروز ثم مرر بعد ذلك على العمود نفسه وبالظروف نفسها المذكورة اعلا جمعت الاجزاء الفعالة و قدرت فعاليتها وتركيز البروتين ثم حفظ بعد ذلك بالتجميد لأجراء الخطوات اللاحقة . ويمثل الشكل (3-3) خطوات تنقية الانزيم من اوراق الطرفة.



الشكل (3-3) : خطوات تنقية انزيم SOD من اوراق الطرفة *T. aphylla*

استخلص الانزيم من اوراق نبات الطرفة باستخدام محلول دارى فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولر رقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 1 ملي مولر EDTA-Na<sub>2</sub> و 2 % PVP. نبذ مركزي بسرعة 15,000 (دورة / دقيقة) وبدرجة حرارة 0° لمدة 20 دقيقة





## انزيم منقى جزئياً

### 2-3-10-2-4: الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود الـ SDS

#### (Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS)

استخدمت هذه الطريقة لتقدير الوزن الجزيئي واختبار نقاوة انزيم السوبراوكسايد المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* .

#### 2-3-10-2-4-1 : المواد والمحاليل المستخدمة

١- المحلول الدائري لهلام الفصل **Resolving gel buffer (1.5M Tris-HCl)** ذو الرقم الهيدروجيني ٨,٨ .

اذيب ١٨,٢ غرام من الترس في 40 مليلتر من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى ٨,٨ باضافة ١ مولار حامض الهيدروكلوريك أكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر بالماء المقطر .

٢- المحلول الدائري لهلام الرص **Stacking gel buffer (0.5M Tris-HCl)** ذو الرقم الهيدروجيني ٦,٨ .

اذيب 6.1 غرام من الترس حامض الهيدروكلوريك في 80 مليلتر ماء مقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى ٦,٨ بأستخدام محلول ١ مولر حامض الهيدروكلوريك ، أكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر باستخدام الماء المقطر وحفظ في درجة حرارة 4 م° .

٣- محلول ١٠% كبريتات دودسيل الصوديوم (SDS)

اذيب ١٠ غرام من SDS في 60 مليلتر من الماء المقطر وامل الحجم الى ١٠٠ مليلتر .

٤- المحلول الدائري للمستودع **Reservoir buffer** ذو رقم هيدروجيني ٨,٣:

اذيب ٣ غرام من الترس (Tris base) و ١٤,٤ من الكلايسين في كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٨,٣ بمحلول ١ مولار حامض الهيدروكلوريك واضيف ١٠ مليلتر من محلول SDS (١٠%) ثم اكمل الحجم الى اللتر باستخدام الماء المقطر .

**5 - محلول الأكريل أمايد -بزاكريل أمايد Bis acrylamide- Acrylamide :**

اذيب ٢٩,٢ غرام من الأكريل امايد و٠,٨ غرام من بزاكريل أمايد في 70 مليلتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر باستخدام الماء المقطر وحفظ في قنينة معمة.

**6 - المحلول الدارئ الخزين للنموذج Stock sample buffer :**

حضر بمزج 4.8 مليلتر ماء مقطر و١,٢ مليلتر من محلول الدارئ لهلام الرص و ٢ مليلتر من محلول ١٠% من SDS و 1 مليلتر من 10% كليسرو و ٠,٥ مليلتر من محلول ٠,٥% صبغة البروموفينول الازرق .

**7 - محلول ١٠% برسلفات الامونيوم :**

حضر بادابة ١ غرام من برسلفات الامونيوم في 1مليلتر ماء مقطر ويحضرأنيا قبل الاستعمال.

**8 - التمد N,N,N,N, Tetra methyl ethylene diamine (TEMED)**

**9 - محلول الروتينات القياسية**

حضرت باذابة البروتينات القياسية الاتية بتركيز ( ١٠ مايكروغرام / ١٠٠ مايكرولتر من محلول الدارئ الخزين للنموذج .

الجدول (3-4) : البروتينات القياسية المستخدمة في تحديد الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى

من اوراق الطرفة بطريقة الترحيل الكهربائي SDS-PAGE

| الوزن الجزيئي<br>(دالتون) | البروتين القياسي     | ت |
|---------------------------|----------------------|---|
| 158.000                   | Aldolase             | 1 |
| 80.000                    | Alkaline phosphatase | 2 |
| 67.000                    | Bovine serum albumin | 3 |
| 43.000                    | Ovalbomin            | 4 |

|        |        |   |
|--------|--------|---|
| 31.000 | Casein | 5 |
|--------|--------|---|

**10 - محلول تثبيت الصبغة Fixation solution** (40% ميثانول و 10% حامض الخليك Acitic acid)

حضر باذابة 100 غم من حامض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) في 500 مليلتر ماء مقطر، ثم اضيف 400 مليلتر ميثانول الى المحلول واكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر.

**11 - محلول الانزيم Enzyme solution**

مزج حجم 250 مايكروليتر من محلول الانزيم مع 250 مايكروليتر من المحلول الخزين للنموذج في انبوب، ثم اضيف اليه 25 مايكروليتر من المركبتوايثانول وضع بعدها في حمام مائي بدرجة غليان لمدة 5 دقائق ثم برد بدرجة حرارة المختبر.

**12 - Oxidizer solution**

حضر باذابة 0.04 غم من ثايوسلفات الصوديوم في 200 مليلتر من الماء المقطر .

**13 - محلول الصبغة Staining solution**

حضر باذابة 0.2 غم من صبغة نترات الفضة و 40 مايكروليتر من 35% فورمالديهايد في 200 مليلتر من الماء المقطر يضاف الفورمالديهايد فقط قبل الاستخدام.

**14 - Developer solution**

حضر باذابة 7.5 غم من كاربونات الصوديوم و 125 مايكروليتر من 35% من الفورمالديهايد في 250 مليلتر من الماء المقطر يضاف الفورمالديهايد قبل الاستخدام .

**15 - Stop solution**

حضر باضافة 10 مليلتر حامض الخليك الثلجي في لتر من الماء المطر.

**2-10-2-3-2-4-2 : طريقة الترحيل الكهربائي**

❖ حضر هلام الفصل (7.5%) بمزج ٢,٥ مليلتر من محلول الاكريل امايد- بزاكريل امايد و ٤,٨٥ مليلتر من الماء المقطر، و ٢,٥ مليلتر من محلول دارى هلام الفصل و ٠,١ مليلتر من محلول ١٠% SDS وبعد ازالة الهواء من المزيج اضيف ٥٠ مايكروليتراً من محلول ١٠% برسلفات الامونيوم ، و ٥ مايكروليتر من TEMED ومزج بهدوء، نقل المزيج الى الانابيب الخاصة بجهاز الترحيل الكهربائي القرصي وترك ليتصلب بعد تغطية سطح المزيج بقليل من البيوتانول.

❖ حضر هلام الرص بمزج ٦,١ مليلتر ماء مقطر و ٢,٥ مليلتر من محلول دارى هلام الرص و ١,٣ مليلتر من محلول الاكريل امايد – بزاكريل امايد و ٠,١ مليلتر من محلول ١٠% SDS وبعد ازالة الهواء من المزيج اضيف ٥٠ مايكروليتر من محلول ١٠% برسلفات الامونيوم و ٥ مايكروليتر من TEMED ومزج بهدوء ، ووضع المزيج فوق هلام الفصل في الانابيب الخاصة في العملية وترك ليتصلب بعد اضافة قليل من البيوتانول على سطح الهلام .

### 3-4-2-10-2-3: الترحيل الكهربائي

اضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول النموذج الى الهلام في الانابيب بعد وضع محلول المستودع بحيث يغطي سطح الانابيب، ثم اوصل التيار الكهربائي بقوة 2 ملي امبير، لكل انبوب في مرحلة الرص لمدة ٣٠ دقيقة و ٥ ملي امبير / أنبوب ( بفرق جهد مقداره ٢٤٠ فولت) في مرحلة الفصل لمدة ٤-٥ ساعة مع التبريد بدرجة ٤ درجة مئوية، ثم اخرج الهلام من الأنابيب وغمر في محلول تثبيت الصبغة لمدة 30 دقيقة ثم غسل بالماء المقطر لمدة 10 دقائق وجرت عدة تبديلات بالماء المقطر ، ثم غمر في محلول Oxidizer لمدة 30 دقيقة ، ثم اخرج الهلام وغسل في الماء المقطر ثلاث الى اربع مرات لمدة 5 – 10 دقيقة ، ثم غمر الهلام في محلول الصبغة لمدة 30 دقيقة ثم غسل بالماء المقطر لمدة 1-2 دقيقة ، وبعدها غمر لمدة دقيقة واحدة في محلول الـ Developer ثم تم تبديل محلول الـ Developer عدة مرات حتى تظهر الحزم البنوية بوضوح ، ثم اوقف التفاعل بتبديل محلول Developer بمحلول الـ Stop لمدة 5 دقائق، ثم حفظ الهلام في محلول 1% حامض الخليك .

وقيست المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الزرقاء من السطح العلوي للهلام الى مركز حزمة الصبغة لاستخراج الوزن الجزيئي لانزيم السوبراوكسايد ، كما قيست المسافات من السطح العلوي للهلام الى مركز حزم البروتينات القياسية المنفصلة .

المسافة التي قطعها البروتين  
الحركة النسبية (Rm) =  $\frac{\text{المسافة التي قطعها البروتين}}{\text{المسافة التي قطعها صبغة البروموفينول الازرق}}$

رسمت العلاقة بين الحركة النسبية (Rm) ولو غارتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية ، وقدر الوزن الجزيئي لأنزيم السوبراوكسايد بعد أستخراج قيمة Rm للأنزيم وأسقاطها على المنحني القياسي.

### 11-2-3 : توصيف انزيم السوبراوكسايد ديسميوتيز

#### 1-11-2-3 : تحديد الوزن الجزيئي

عين الوزن الجزيئي لأنزيم SOD بكموتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl S-200 كالاتي :

#### 1-1-11-2-3 : المواد والمحاليل

A- محلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 7.8

حضر في الفقرة (1-3-2-10-2-3)

B- محلول الدكستران الازرق Blue Dextran-2000 (3 ملغم / مليلتر)

حضر بتركيز 3 ملغم / مليلتر من الدكستران الازرق 2000 مذابا في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ (0.2 مولار، pH = 7.8) .

#### 2-1-11-2-3 : محاليل البروتينات القياسية

استعملت خمسة بروتينات قياسية لتقدير الوزن الجزيئي للأنزيم المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* المحضر بتركيز 3 ملغم / مليلتر مذابة في المحلول المذكور في الفقرة المذكورة اعلاه بحسب الجدول ( 5-3 ) :

الجدول (5-3) : البروتينات القياسية المستخدمة في تحديد الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة بطريقة الترشيح الهلامي

| الوزن الجزيئي<br>(دالتون) | البروتين القياسي     | ت |
|---------------------------|----------------------|---|
| 24.000                    | Trypsin              | ١ |
| 31.000                    | Casein               | ٢ |
| 67.000                    | Bovine Serum albumin | ٣ |
| 80.000                    | Alkaline phosphatase | ٤ |
| 158.000                   | Aldolase             | ٥ |

3-1-11-2-3 : طريقة العمل

4-1-11-2-3 : تحضير الهلام

استعمل عمود Sephacryl S-200 بأبعاد (1.5×80) سم في تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم SOD . استعمل محلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.2 مولار ويرقم هيدروجيني 7.8 في موازنة العمود واسترداد كل من الدكستران الأزرق والبروتينات القياسية المحضرة في الفقرة (2-1-11-2-3) بسرعة جريان مقدارها 60 مليلتر / ساعة .

#### ❖ تقدير حجم الفراغ للعمود (Vo) Void volume

قدر حجم الفراغ (Vo) للعمود باستخدام محلول الدكستران الأزرق بتركيز 3 ملغم/مليلتر اذ تم اضافة ١ مليلتر من هذا المحلول بشكل تدريجي على جدار العمود الداخلي بالقرب من سطح الهلام،

واسترد محلول الدكستران الازرق بمحلول الموازنة (فوسفات البوتاسيوم 0.2 مولار ذو رقم هيدروجيني ٧,٨) وسرعة جريان 60 مليلتر /ساعة، وجمعت الاجزاء. بعدها قيس الامتصاص الضوئي في جهاز المطياف الضوئي للاجزاء المنفصلة عند طول موجي ٦٠٠ نانوميتر، وقدر حجم الفراغ للعمود من حساب مجموع حجوم الاجزاء المنفصلة عند امرار محلول الدكستران من اول جزء الى الجزء الذي يمثل قمة امتصاص الدكستران الازرق.

### ❖ تقدير حجم الاسترداد (Ve) Elution volume

قدر حجم الاسترداد للانزيم والبروتينات القياسية كلاً على انفراد واستردت بوساطة محلول الدارى (3-2-10-2-3)، ثم قيست الامتصاصية الضوئية على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر لكل جزء من الاجزاء المنفصلة بغية تحديد حجم الاسترداد  $V_e$  لكل بروتين قياسي. ورسمت العلاقة بين نسبة حجم استرداد البروتينات  $V_e/V_0$  /حجم الفراغ  $V_0$  (  $V_e/V_0$ ) مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية، وقدر الوزن الجزيئي للانزيم استنادا الى المنحنى القياسي لهذه البروتينات القياسية.

### 3-11-2-2 : تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

حضر محلول مادة التفاعل ( Pyrogallol ) بتركيز 0.2 ملي مولار بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين ( ٤ - 10) . وزع على انابيب بواقع ( ١,٨ ) مليلتر وحضنت الانابيب بدرجة 25 م° . ثم اضيف ٠,٢ مليلتر من محلول الانزيم المنقى جزئياً الى الانابيب وحضنت لمدة 30 دقيقة ، ثم اوقف التفاعل وقدرت الفعالية الانزيمية

### 3-11-2-3: تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم

حضر الانزيم المنقى جزئياً في حمام مائي بدرجة حرارة 25 م° ولمدة 30 دقيقة بمديات مختلفة من الارقام الهيدروجينية؛ وذلك بمزج 0.2 مليلتر من المحلول الانزيمي المنقى جزئياً مع 0.2 مليلتر من المحاليل الدارئة ذات الارقام الهيدروجينية المختلفة والمحضرة بتركيز 0.1 مولار، وبمدى تراوح ما بين (4-10)، ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي وقدرت الفعالية المتبقية طبقاً للفقرة (3-2-2) ورسمت العلاقة بين قيم الرقم الهيدروجيني المختلفة و النسبة المئوية للفعالية الانزيمية المتبقية لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم.

### 3-11-2-4 : تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم



قدرت الفعالية الانزيمية في الفقرة (2-2-3) بمديات حرارية تراوحت بين (20-80) °م لمدة 5 دقائق ، ثم قدرت الفعالية لانزيمية ورسمت العلاقة بين درجة الحرارة وفعالية لانزيم لتعيين الدرجة الحرارية المثلى للانزيم .

### 5-11-2-3: تقدير طاقة التنشيط ( $E_a$ )

قدرت طاقة التنشيط لتحويل مادة التفاعل الى ناتج Transformation  $E_a$  من خلال العلاقة بين لوغارتم ثابت سرعة التفاعل الملاحظ (  $K_{obs}$  ) Reaction Rate Constant Observed على مدى من درجات الحرارة تراوحت بين ( 20-80 ) °م كما وردت في الفقرة (3-2-11-4) ومقلوب درجة الحرارة المطلقة ( $K^o$ ) وفقاً لمعادلة ارينوس ( Segal , 1976 ) .

$$\text{Log}K_o = \frac{E_a}{2.303 RT} + \text{Log} A.$$

اذ ان  $K_o$  : ثابت سرعة التفاعل الملاحظ (  $K_{obs}$  )

$E_a$  : طاقة التنشيط Activation Energy

$R$  : ثابت الغاز ( 1.987 cal / mol/ $K^o$  ) Gas Constant

$A$  : ثابت التفاعل الخاص Constant for the Particular Reaction

$T$  : درجة الحرارة المطلقة ( $K^o$ )

### 6-11-2-3 : تعيين الثبات الحراري للانزيم

حضر ١٠٠ مايكروليتر من المحلول الانزيمي في حمام مائي بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (20-80) °م لمدة 30 دقيقة، ثم بردت الانابيب مباشرة في حمام ثلجي، وقدرت الفعالية المتبقية وفق الفقرة (2-2-3) ، ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة و النسبة المئوية للفعالية الانزيمية المتبقية لتعيين درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم.

### 7-11-2-3: تعيين الثوابت الحركية للانزيم

حضرت تراكيز مختلفة من المادة الاساس تراوحت بين ( 0.05 - 0.4 ) ملي مولار وقدرت قيم ثابت ميكالس (  $K_m$  ) والسرعة القصوى (  $V_{max}$  ) من رسم العلاقة بين السرعة الاولية (Vo) وتراكيز المادة الاساس ( S ) بطريقة لاينويفر-بيرك Line Weaver-Bruk reciprocal plot طبقاً لما ورد في Segal ( ١٩٧٦ ) واعتمد حساب الفعالية الانزيمية على اساس كمية الـ Pyrogallol المتحررة في الدقيقة الواحدة عند ظروف القياس اعتماداً على منحنى القياسي .

### 8-11-2-3 : تأثير الايونات الفلزية والمواد المثبطة في فعالية انزيم SOD

#### 1-8-11-2-3 : تحضير محاليل الاملاح والكواشف

❖ حضرت محاليل كلوريدات وكبريتات الفلزات الاتية بتركيزين 5 و 10 ملي مولار بصورة منفصلة لكل ملح من الاملاح المستخدمة  $FeSO_4$  ,  $KCl$  ,  $NaCl$  ,  $ZnCl_2$  ,  $CuCl_2$  ,  $CaCl$  ,  $MnSO_4$  ,  $HgCl_2$  , بوتاسيوم بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 .

❖ حضرت محاليل  $NaN_3$  sodium azid , Sodium dodecyl sulfate (SDS) , Potassium cyanide (KCN), Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) و Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) بتركيزين ( 5 و 10 ) ملي مولار باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 .

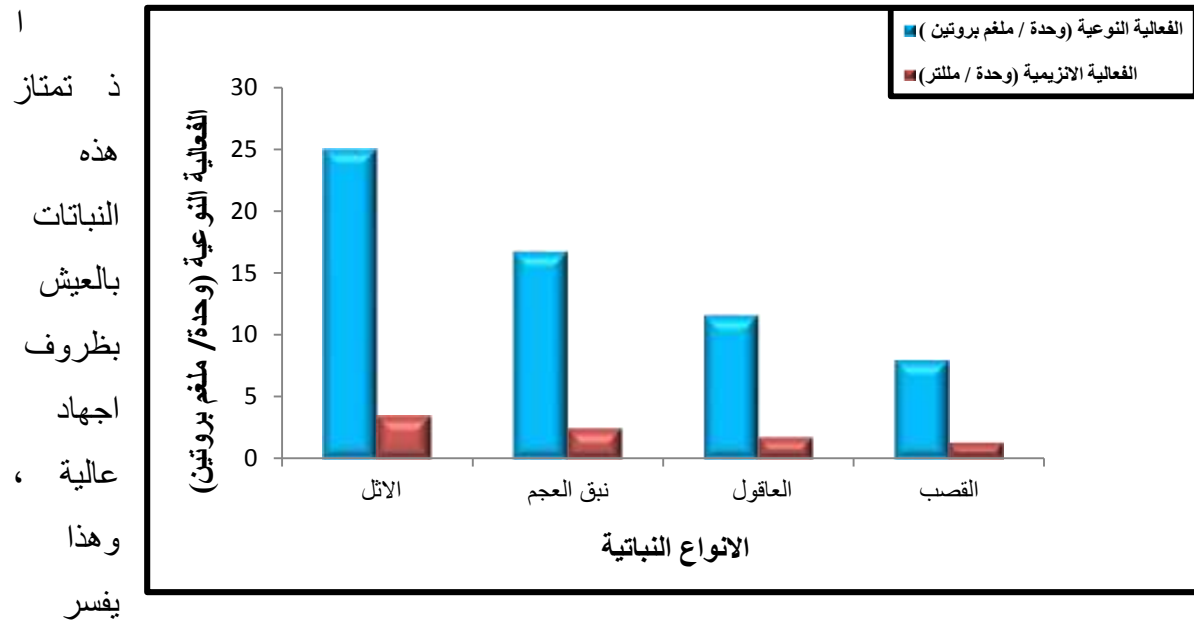
#### 2-8-11-2-3 : طريقة العمل

حجم متساو من محلول الانزيم ومحاليل كلوريدات الفلزات و المواد المثبطة ، حضنت المحاليل بدرجة حرارة 25 م° ولمدة 30 دقيقة . قدرت الفعالية الانزيمية وفق الفقرة (2-2-3) . الفعالية المتبقية (%) للانزيم قدرت بالمقارنة مع معامل السيطرة الذي حضر باضافة المحلول الانزيمي غير المعامل الى مادة التفاعل .

## 4: النتائج والمناقشة Results and Discussion

### 1-4 : التحري عن انزيم SOD في بعض الانواع النباتية :

تم التحري عن فعالية انزيم SOD في بعض الانواع النباتية والتي شملت اوراق كل من نبات الطرفة و نبق العجم والعاقول و القصب . يوضح الشكل (1-4) امتلاك المصادر المذكورة قيد الدراسة فعالية انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز و بدرجات متباينة وقد تميز المستخلص الخام لاوراق نبات الطرفة باعطاء اعلى فعالية نوعية مقارنة مع بقية الانواع الاخرى، اذ بلغت 24.98 وحدة / ملغم بروتين ، اما بقية الانواع الاخرى فهي كالاتي : نبق العجم 16.71 وحدة / ملغم بروتين ،و العاقول 11.58 وحدة / ملغم بروتين، اما القصب فقد اعطى اقل فعالية نوعية اذ بلغت 7.99 وحدة / ملغم بروتين .



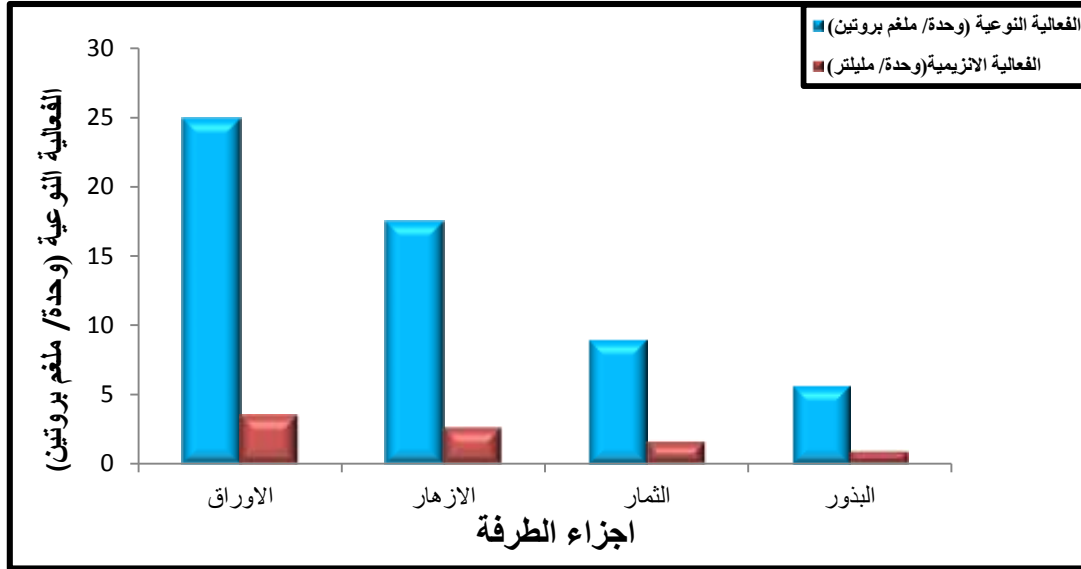
احتوائها على هذا الانزيم بفعاليات مختلفة . اذ يعتبر نبات الطرفة من النباتات الملحية التي تنمو في الترب الغنية بكوريد الصوديوم ، والتي تكيفت اوراقها لانتاج الغدد الملحية (Bosabalidis ,1992) .

الشكل (4 - 1) : الفعالية النوعية لأنزيم SOD في اوراق انواع نباتية مختلفة .

#### 2-4 : التحري عن انزيم SOD في اجزاء نبات الطرفة *T. aphylla*

تم التحري عن وجود انزيم SOD في اجزاء نبات الطرفة والتي شملت ( الاوراق ، و الازهار ، والثمار والبذور ) لاختيار الجزء الانسب لانتاج الانزيم يوضح الشكل (4- ٢ ) امتلاك الاجزاء النباتية المذكورة قيد الدراسة فعالية انزيم SOD وبدرجات متفاوتة وقد تميز المستخلص الخام لجزء الاوراق باعطاء اعلى فعالية نوعية مقارنة مع بقية الاجزاء اذ بلغت 24.98 وحدة / ملغم بروتين .اما بقية الاجزاء الاخرى فهي كالاتي: على التوالي الازهار 17.53 وحدة / ملغم بروتين، والثمار فقد اعطت فعالية نوعية بلغت 8.99 وحدة / ملغم بروتين في حين ان البذور سجلت اقل فعالية نوعية اذ بلغت 5.66 وحدة / ملغم بروتين. استناداً الى النتائج التي تم التوصل اليها جرى اعتماد اوراق الطرفة كمصدر لاستخلاص وتنقية الانزيم ودراسة بعض الخصائص الفيزيوكيميائية له باعتباره من المصادر غير المدروسة في قطرنا ، فضلاً عن محتواه العالي للانزيم كذلك محتواه العالي من مضادات الاكسدة.

لم نجد في البحوث العلمية اية اشارة الى استخدام الطرفة كمصدر لأنزيم SOD. لكن هناك العديد من الدراسات التي استخلصت الانزيم من مصادر متعددة، اذ استخلص من اوراق *Deschampsia Antarctica* (Perez-Torres,2004). كما استخلص من اوراق نبات *Haberlea rhodopensis* ( Terzi and Yahubyan et al., 2005). استخلص ايضاً من اوراق وجذور *Ctenanthe setosa* )



( Kadioglu, 2006). كذلك من اوراق نبات الكرنب (*Brassica napus* L. ( Abedi and Pakniyat,2010) و الخيزران الاخضر (*Bambusa oldhamii*) (Wu et al.,2011). واستخلص ايضا من نبات العكرش (*Aelluropus littoralis*) (Moradian et al.,2014). كما استخلص من الكاسافا (*Manihot esculenta*) 2014 ( Xu et al.,).

الشكل (4 - 2) : الفعالية النوعية لأنزيم SOD في اجزاء مختلفة من نبات الطرفة *T. aphylla*

3-4 : تحديد الظروف المثلى لاستخلاص الانزيم

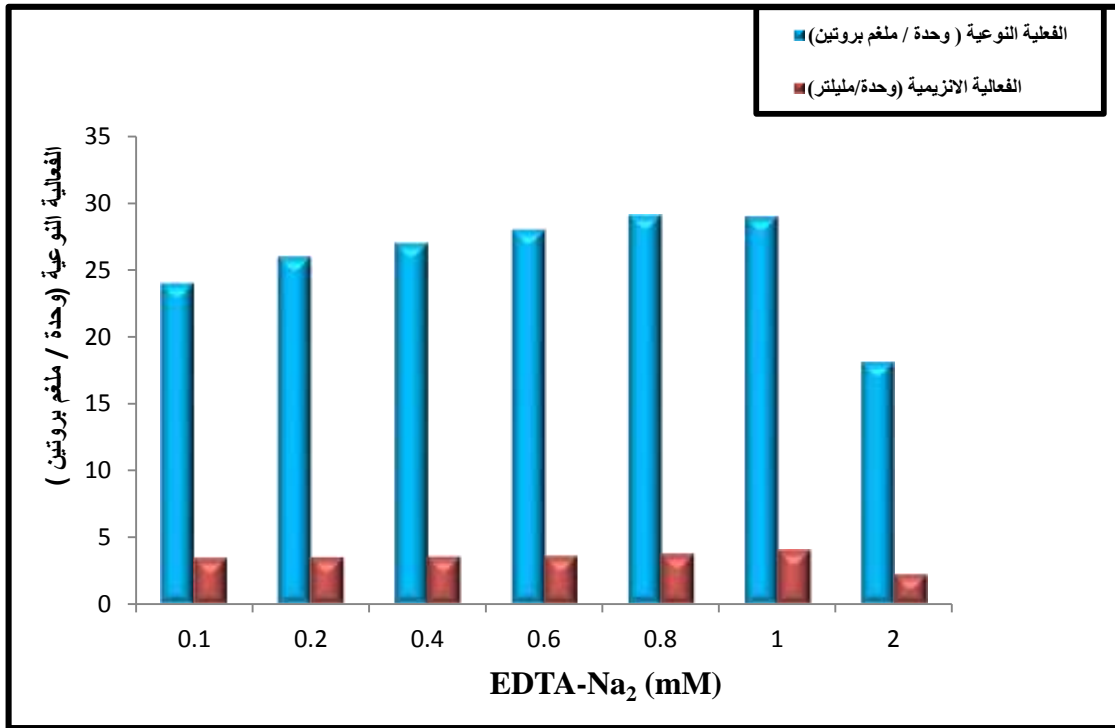
1-3-4 : تحديد التركيز الامثل لمادة EDTA-Na<sub>2</sub> في المحلول الدارئ

درس تأثير تراكيز مختلفة لمادة EDTA-Na<sub>2</sub> في المحلول الدارئ اذ حضرت بتراكيز (0.1 ، 0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8 ، 1 ، 2) ملي مولار ، اوضحت النتائج الشكل (3-4) زيادة الفعالية مع زيادة تركيز EDTA-Na<sub>2</sub> حتى تركيز 1 ملي مولار ثم بدأت الفعالية بعدها بالانخفاض ، اذ ان اعلى فعالية نوعية سجلت عند تركيز 1 ملي مولار اذ بلغت 28.99 وحدة / ملغم بروتين، لذلك اعتبر التركيز الافضل للاستخلاص . وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع بعض الدراسات حول استخدام EDTA في استخلاص الانزيم، ففي احدى الدراسات استخلص الانزيم من الحمص *Cicer arietinum* باستخدام محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم بتركيز 100 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 1 ملي مولار من EDTA-Na<sub>2</sub> ( Singh et al.,2013). كما استخلص الانزيم من اوراق الدخن *Eleusine*

*coracana* L. بمزج 1 غم من الاوراق مع دارى فوسفات الصوديوم بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 6.4 والحاوي على 1 ملي مولار EDTA-Na<sub>2</sub> (Kotapati et al.,2014).

استخلص ايضاً من اوراق اللوتس *Lotus corniculatus* بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 50 ملي مولر ورقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 0.5 ملي مولر EDTA ( Borsani et al., 2001 ). كما استخلص من جذور الجت واوراقه *Medicago truncatula* بمزج 400 ملغم مع 4 مليتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 0.1 ملي مولار EDTA ( Lopez-Millan et al., 2005 ).

ان استخدام EDTA مع دارى الفوسفات في استخلاص الانزيم يحافظ على ثبات الانزيم لكونه عاملا مخليبيا يمنع تداخل الايونات الملوثة للدارى في اثناء عمل الانزيم (Stoll and Blanchard,1990) لذا تم اضافة EDTA بتركيز 1 ملي مولار في الدراسة الحالية للتخلص من الاثار الضارة للايونات المعدنية والمحافظة على ثبات الانزيم . فضلا عن ذلك ان وجود EDTA في وسط الاستخلاص يساعد على تحطيم الاغشية الخلوية (Gupta,1998).

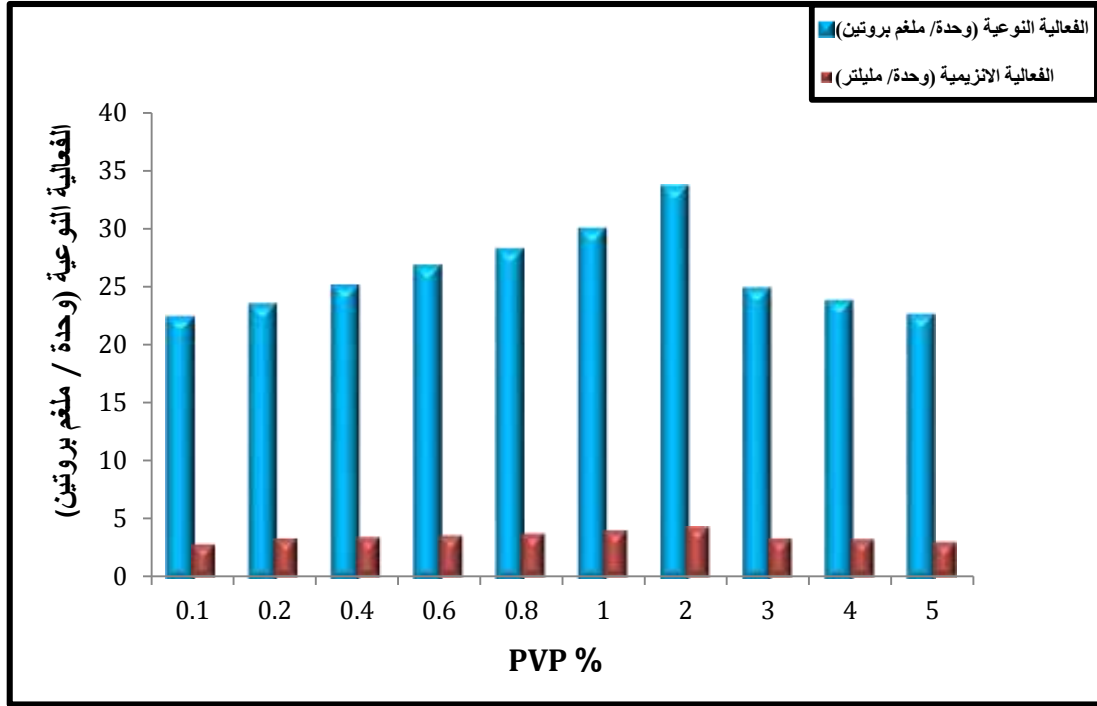


الشكل (4 - 3): تأثير تركيز EDTA-Na<sub>2</sub> على الفعالية النوعية لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *T. aphylla*.

#### 4-3-2: تحديد التركيز الامثل لمادة PVP في المحلول الدارئ

استخلص انزيم SOD بتركيز مختلفة لمادة PVP المضافة الى المحلول الدارئ . استخدمت بتركيز ( 0.1 ، 0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ) % (وزن/ حجم) . حيث يستخدم محلول PVP في أستخلاص الانزيمات من الانسجة النباتية وذلك للادمصاص المركبات الفينولية والتقليل من تأثيرها في ثبات البروتينات وفعاليتها (Whitaker, 1972) . اظهرت النتائج في الشكل (4 - 4) ان الفعالية تزداد بزيادة التركيز حتى بلغت اقصاها عند التركيز 2 % ، اذ بلغت الفعالية 33.53 وحدة / ملغم بروتين . لذلك اعتبرت النسبة الامثل للاستخلاص . ففي احدى الدراسات استخلص انزيم SOD من نبات *Fritillaria meleagris* بمزج 0.5 غم من نسيج النبات مع 4 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.1 مولار والحاوي على 200 ملغم من PVP (Jevremovic et al.,2010) . كذلك استخلص من نبات عباد الشمس *Helianthus annus* L. بمزج 0.3 غم من النسيج النباتي في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار والحاوي على 1 غم PVP (Costa et al., 2002) . كما استخلص من اوراق وجذور نبات *Kandelia cande* L. بمزج 0.5 غم من الاوراق والجذور مع 5 مليلتر من محلول الفوسفات الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 7.8 والحاوي على 4% PVP . ( Rahman et al.,2010 ) .

استخلص ايضاً من نبات *Abutilon indicum* بمزج 200 ملغم من النسيج النباتي مع 5 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 7.8 والحاوي على 2% PVP Ghosh ( et al.,2011) . كذلك من اوراق *Syzygium cumini* بمزج 1 غم من الاوراق في 8 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار وبرقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 1 % PVP ( Choudhary and Saroha, 2012 ) .



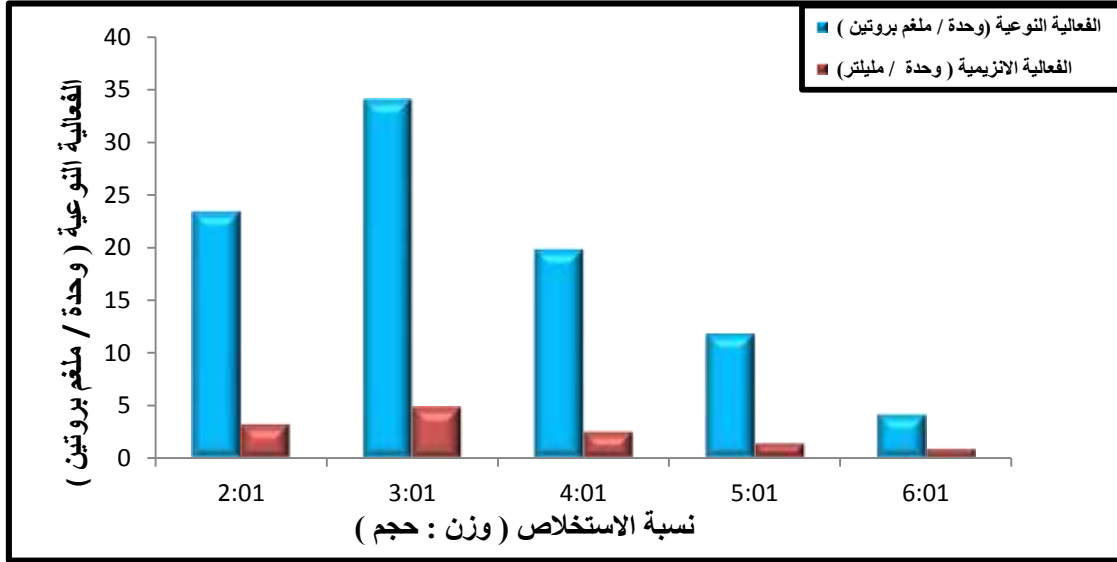
T. الشكل (4 - 4): تأثير تركيز PVP في فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *aphylla*

#### 3-3-4 : تأثير نسبة الاستخلاص

النتائج التي سجلت في الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية لأنزيم SOD قد تفاوتت باختلاف نسبة الاستخلاص ( وزن الاوراق : حجم المحلول الدارئ ) المستخدم. فقد سجلت اعلى فعالية نوعية 34.11 وحدة / ملغم بروتين في نسبة الاستخلاص 3:1 ( وزن : حجم ) تليها نسبة 2:1 ثم نسبة 4:1 ثم 5:1 واقل فعالية سجلت عند نسبة 6:1. اما النسبة 1:1 فقد تعذر استخدامها كون المزيج مركز فيصعب بذلك قياس الفعالية. لذلك فان النسبة 3:1 هي الافضل في استخلاص الانزيم كما في الشكل (4-5). ففي احدى الدراسات استخلص انزيم SOD من اوراق نبات الكرنب *Brassica napus L.* بنسبة استخلاص 3:1 باستخدام محلول Tris-HCl الدارئ بتركيز 0.1 مولار وذي الرقم الهيدروجيني 7.5 (Abedi and Pakniyat, 2010)، كذلك استخلص MnSOD من اوراق البازيلا *Pisum sativum L.* بنسبة استخلاص 5:1 باستخدام محلول فوسفات الصوديوم الدارئ برقم هيدروجيني 7.8 (Del Rio et al., 2003). استخلص ايضا من اوراق التوت الاحمر *Rubus idaeus L.* بنسبة 1:1 اي بوزن 1 غم من اوراق النبات في 1 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار ورقم



هيدروجيني 7.8 ( Patamsyte *et al.*,2004). كذلك استخلص من نبات الذرة بنسبة 8:1 اي بمزج 1 غم من النبات في 8 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.0 ( Chorianopoulon *et al.*,2012 ). كما استخلص الانزيم من ثلاثة انواع من التفاح بنسبة استخلاص 3:1 اي بوزن 5 غم من نسيج التفاح المجمد مع 15 مليلتر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 ( Susaj *et al.*,2013).

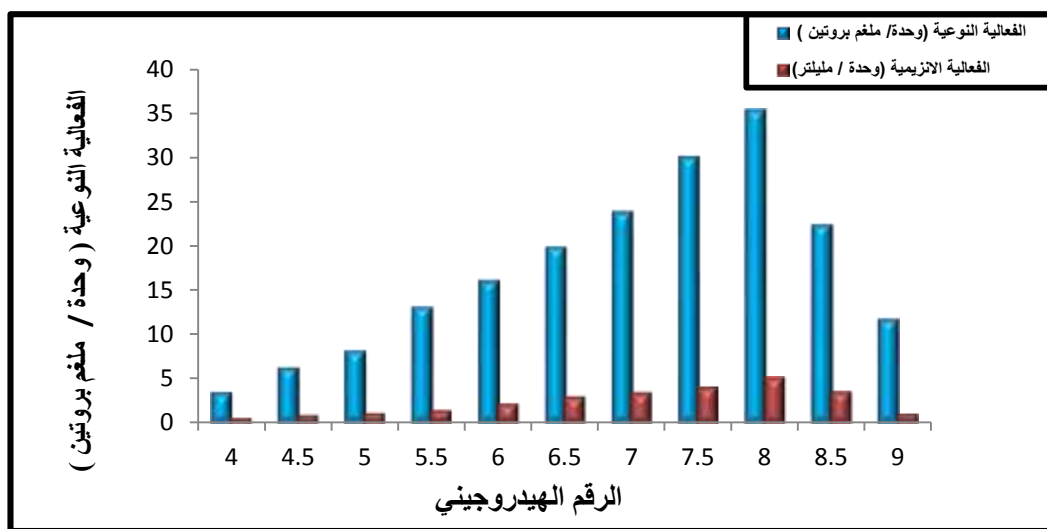


الشكل (4-5) : تأثير نسبة الاستخلاص في الفعالية النوعية والانزيمية لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *T. aphylla*

#### 4-3-4 : تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لدارئ الاستخلاص

ان تحديد الرقم الهيدروجيني يعتمد على الطريقة التي يستخلص فيها الانزيم وكذلك المادة الاساس المستخدمة في قياس الفعالية الانزيمية . اذ درس تأثير الرقم الهيدروجيني في استخلاص الانزيم من اوراق الطرفة *T. aphylla* ، حيث حضر المحلول الدارئ بأرقام هيدروجينية تراوحت بين ( 4 - 9 ) الشكل (4-6) . ان اعلى فعالية نوعية سجلت عند رقم هيدروجيني 7.8 اذ بلغت 35.012 وحدة/ ملغم بروتين لذلك اعتبر الرقم الهيدروجيني 7.8 الافضل في استخلاص انزيم SOD. نستنتج من النتائج المذكورة اعلاه انخفاض قدرة الظروف الحامضية والقاعدية في استخلاص الانزيم وفك ارتباطه من الاجزاء النباتية فضلا عن تأثيرها في ثباتية الانزيم وفعاليتيه (Chaplin and Chri, 2004) .

جاءت هذه الدراسة متوافقة مع بعض الدراسات حول تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية انزيم SOD ففي احدى الدراسات استخلص من جذور واوراق وساق *Epipremnum aureum* بأستخدام محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 25 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.8 ( Meshram and Srivastava,2016 ). كما استخلص الانزيم من بذور نبات الكرنب *Brassica napus L.* بمحلول دارئ فوسفات البوتاسيوم برقم هيدروجيني 7.8 ( Ali et al.,2015 ). كذلك استخلص الانزيم من اوراق نبات *Harberlea rhodopensis* باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 50 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.8 ( Yahubyan et al.,2005 ). و استخلص ايضا من اوراق نبات الحنطة *Triticum aestivum L.* بأستخدام دارئ فوسفات الصوديوم وبرقم هيدروجيني 6,5 ( Asthir et al.,2011 ). كما استخلص من نبات الكشمش الاسود *Ribes nigrum* بدارئ فوسفات البوتاسيوم برقم هيدروجيني 7 ( Chaudhary et al.,2013 ).



الشكل (4 - 6) : تأثير الرقم الهيدروجيني لدارئ الاستخلاص في فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *T. aphylla*

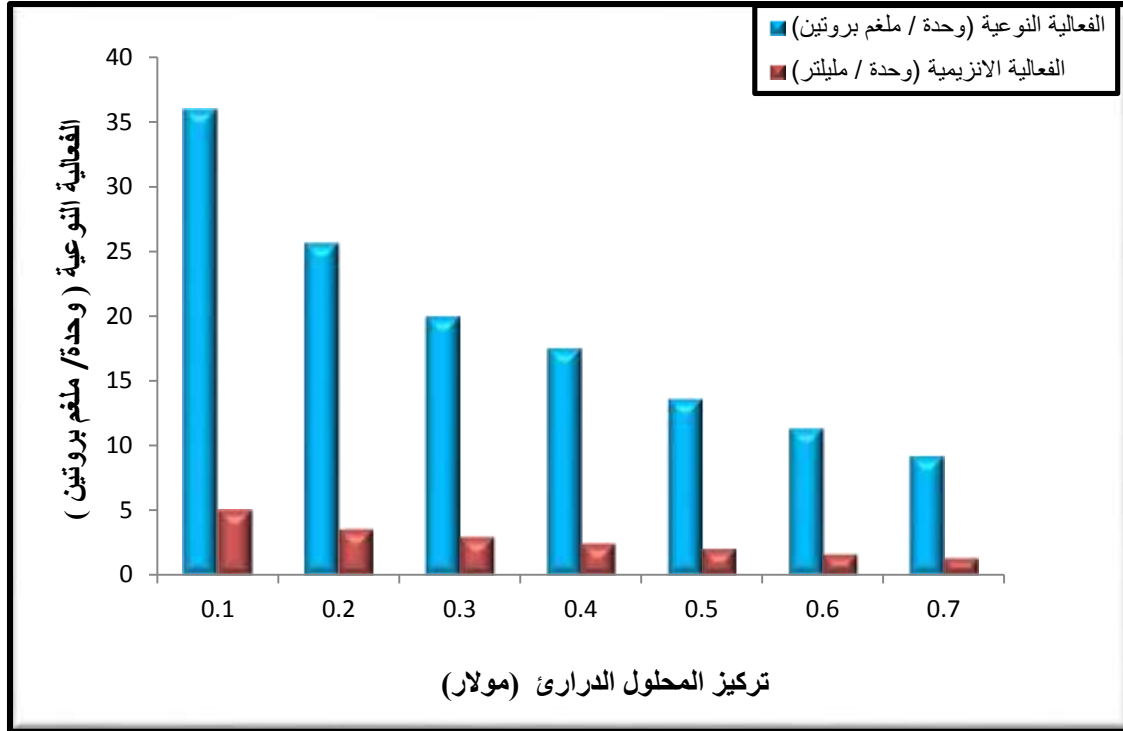
#### 4-3-5 : تأثير تركيز دارئ الاستخلاص على فعالية انزيم SOD

درست تأثير تراكيز مختلفة لمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ في فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة، اوضحت النتائج في الشكل (4-7) انخفاض الفعالية النوعية لأنزيم SOD كلما ازداد تركيز المحلول الدارئ ، اذ ان اعلى فعالية نوعية سجلت عند تركيز 0.1 مولار اذ بلغت

35.99 وحدة / ملغم بروتين باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارى . لذلك اعتبر محلول دارى فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 0.1 مولار هو الافضل في استخلاص الانزيم .

جاءت هذه الدراسة متوافقة مع بعض الدراسات اذ استخلص انزيم SOD من اوراق التبغ *Nicotiana tabacum* باستخدام دارى فوسفات البوتاسيوم بتركيز 0.1 مولا ورقم هيدروجيني 7.5 (Park et al., 2002). استخلص ايضا من بذور Chickpea بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.5 ( Randhaua and Kaur, 2015 ) . كذلك استخلص من نوعين من الرز *Orizya sativum* L. بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 100 ملي مولار ورقم هيدروجيني 7.8 (Verma and Dubey, 2003) . كما استخلص الانزيم من السبانغ بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 50 ملي مولار برقم هيدروجيني 7.8 ( Li et al., 2008 ) .

يتضح من النتائج المذكورة اعلاه ، ان القوة الايونية 0.1 مولار لدارى فوسفات البوتاسيوم كافية لفك الترابط بين الانزيم والمواد الخلوية الاخرى في حين نلاحظ اختلاف تراكيز دارى الاستخلاص المستخدمة في الدراسة تضمنت نقصان في كفاءة الاستخلاص بزيادة التركيز وذلك لأن زيادة التركيز للمحلول الدارى يزيد من تحرر المواد البروتينية وغير البروتينية ومن ثم زيادة تركيز البروتين وهذا يؤدي الى انخفاض الفعالية النوعية .



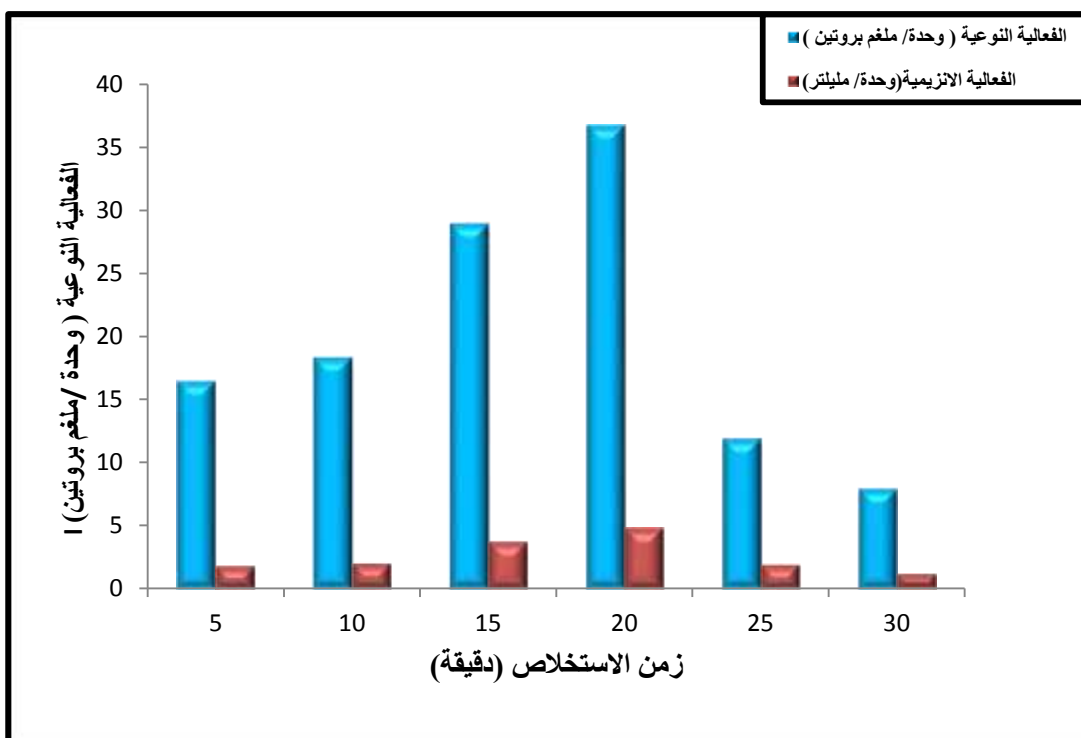
الشكل (4-7) : تأثير تركيز محلول فوسفات البوتاسيوم الدراري على فعالية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *T. aphylla*

#### 4-3-6 : تحديد زمن الاستخلاص الامثل

استخلص انزيم SOD بفترات زمنية مختلفة ( 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 ) دقيقة ، الشكل 8-4 ( 4 ) اذ سجلت اعلى فعالية نوعية بزمن 20 دقيقة اذ بلغت الفعالية النوعية 36.76 وحدة / ملغم بروتين ثم تليها المدة الزمنية 15 دقيقة ثم 10 دقائق تليها 5 و 25 دقيقة اما اقل فعالية نوعية فقد سجلت عند زمن 30 دقائق .

يتضح من النتائج المذكورة اعلاه ان المدة الزمنية 20 دقيقة قد كانت كافية لتحرير الانزيم لذلك اعتبرت 20 دقيقة هي المدة الزمنية المثلى لأستخلاص الانزيم . اما عند استخدام مدة استخلاص أعلى من ذلك قد يحصل تلوث او فقدان بعض العوامل المرافقة للانزيم Co-factors والضرورية لفعالية الانزيم. تم التغلب على هذه المشاكل باستخدام مدة استخلاص قصيرة وبظروف مبردة .

وكما هو معروف فإن الانزيمات جزيئات غير مستقرة تمتلك تنظيم فيزيو-كيميائي محدود وان اي تغير وان كان طفيفا يؤدي الى تقليل فعالية الانزيم وفي بعض الاوقات الى يؤدي الى فقدان تام للفعالية (Gupta,1998). لذا تم استخلاص الانزيم قيد الدراسة في ظروف مسيطر عليها من قوى ايونية ، ورقم هيدروجيني ودرجة حرارة لتحقيق اعلى درجات الثبات . كما وان تحديد الظروف المستخدمة يفيد في تجنب النتائج التي تؤدي الى الاستنتاجات الخاطئة .



الشكل (4- 8) : تأثير زمن الاستخلاص في الفعالية النوعية والانزيمية لأنزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *T. aphylla*.

#### 4-4 : استخلاص انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز وتنقيته

##### 1-4-4 : الاستخلاص

استخلص انزيم SOD من اوراق الطرفة *T. aphylla* باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارى بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.8 والحاوي على 1 ملي مولار من EDTA-Na<sub>2</sub> و 2% PVP ، وبنسبة استخلاص 3:1 ( وزن : حجم ) في جفنة خزفية مبردة . ثم رشح الانزيم باستخدام اربع طبقات من الشاش . تلاها النبد المركزي بسرعة ( 15,000 دورة / دقيقة) لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 0 م° . ثم اخذ الراشح الذي يمثل المستخلص الانزيمي الخام لأجراء الخطوات اللاحقة .

##### 2-4-4 : تنقية الانزيم

اجريت عدة خطوات تنقية للانزيم المستخلص من اوراق الطرفة، شملت هذه الخطوات تركيز المستخلص الخام بواسطة املاح كبريتات الامونيوم اعقبته خطوة تبادل ايوني بالمبادل الايوني DEAE-Cellulose ثم ترشيح هلامي بمرحلتين بأستخدام هلام Sephacryl S-200.

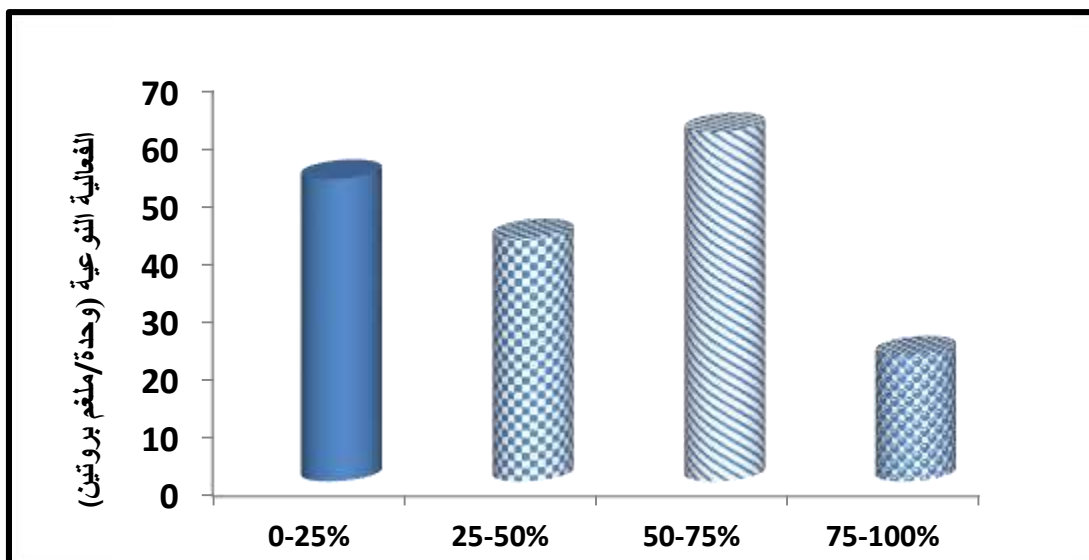
##### 1-2-4-4 : تركيز الانزيم الخام بكبريتات الامونيوم

تعد عملية الترسيب بالاملاح المتعادلة من العمليات الضرورية في تنقية الانزيمات للتخلص من البروتينات غير المرغوب فيها والمتواجدة مع الانزيم وتقليل حجم المستخلص الخام والحصول على الانزيم بدرجة عالية من النقاوة ، فهناك العديد من الاملاح التي تكون فعالة في ترسيب البروتينات واكثرها شيوعا كبريتات الامونيوم بسبب ذائبيتها العالية فضلا عن انعدام تأثيرها على البروتينات ( Munoz and Barcelo,1995) . فيحدث الترسيب بالاملاح بفعل معادلة الشحنة المتواجدة على سطح البروتين والاخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما يؤدي ذلك الى انخفاض ذائبيتها وترسيبها وهذه العملية تسمى التملح الخارجي Salting out ( Schmander, 1997) .

استخدمت كبريتات الامونيوم بنسب اشباع مختلفة ( 100-75, 75-50, 50-25, 25-0 )% اختيرت هذه النسب كلاً على حده لحين الحصول على نسبة الاشباع الافضل. اختيرت نسبة الاشباع الافضل ( 75-50 ) % لتركيز الانزيم وذلك باضافة كبريتات الامونيوم الى المستخلص الانزيمي الخام.

حققت هذه الخطوة تنقية جزئية للانزيم بلغت 1.53 وبحصيلة انزيمية مقدارها 50.51 % مع ارتفاع الفعالية النوعية لتصل الى 60.36 وحدة / ملغم بروتين . كما في الجدول (4 - 1) .

بين Kroniger وجماعته (1992) ان اعلى فعالية نوعية لانزيم SOD المستخلص من الصنوبر البري *Picea abies* L. سجلت عند نسبة اشباع (55-75) % . ففي دراسة اخرى رسب الانزيم من العقد الجذرية للوبياء *Vigna unguiculata* بنسبة اشباع (35-65) % ( Moran *et al.*, 2003). كذلك رسب من البطيخ *Citrullus lanatus* بنسبة اشباع (30 - 70) % (Rodriguez-Serrano *et al.*, 2007). اما الانزيم المستخلص من الثوم *Allium sativum* L. فتم ترسيبه بنسبة اشباع (30 - 75) % ( Sfaxi *et al.*, 2009) كما رسب الانزيم المستخلص من *Ribes nigrum* باستخدام كبريتات الامونيوم بنسب اشباع (0 - 40) % و (40 - 80) % ، حيث سجلت اعلى فعالية نوعية عند نسبة اشباع (0- 40) % اذ بلغت 66.5 وحدة / ملغم بروتين اما النسبة (40 - 80) % فقد اعطت فعالية نوعية بلغت 35.55 وحدة / ملغم بروتين ( Chaudhary *et al.*, 2013) كما ركز الانزيم المستخلص من جذور *Stemona tuberosa* بنسبة اشباع 90 % (Niyomploy *et al.*, 2014) .



الشكل (4-9) : ترسيب انزيم SOD من اوراق الطرفة باستخدام كبريتات الامونيوم.

الجدول (2-4) : ترسيب انزيم SOD من اوراق الطرفة *T. aphylla* بأستخدام كبريتات الامونيوم

| الخطوة                   | الحجم<br>(مليتر) | الفعالية<br>الانزيمية<br>(وحدة/ مليتر) | تركيز البروتين<br>(مليتر/ ملغم) | الفعالية<br>النوعية (وحدة<br>/ ملغم بروتين) | الفعالية<br>الكلية<br>(وحدة) | عدد مرات<br>التنقية | الحصيلة<br>% |
|--------------------------|------------------|--|---------------------------------|---|------------------------------|---------------------|--------------|
| المستخلص الخام           | 40               | 4.9                                    | 0.131                           | 37.40                                       | 196                          | 1                   | 100          |
| نسبة اشباع<br>(0-25) %   | 10               | 4.7                                    | 0.0899                          | 52.28                                       | 47                           | 1.39                | 23.97        |
| نسبة اشباع<br>(25-50) %  | 10               | 5.6                                    | 0.133                           | 42.10                                       | 56                           | 1.12                | 28.57        |
| نسبة اشباع<br>(50-75) %  | 10               | 9.9                                    | 0.164                           | 60.36                                       | 99                           | 1.53                | 50.51        |
| نسبة اشباع<br>(75-100) % | 10               | 3.6                                    | 0.165                           | 21.81                                       | 36                           | 0.58                | 18.36        |

#### 2-2-4-4 : كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion exchange chromatography

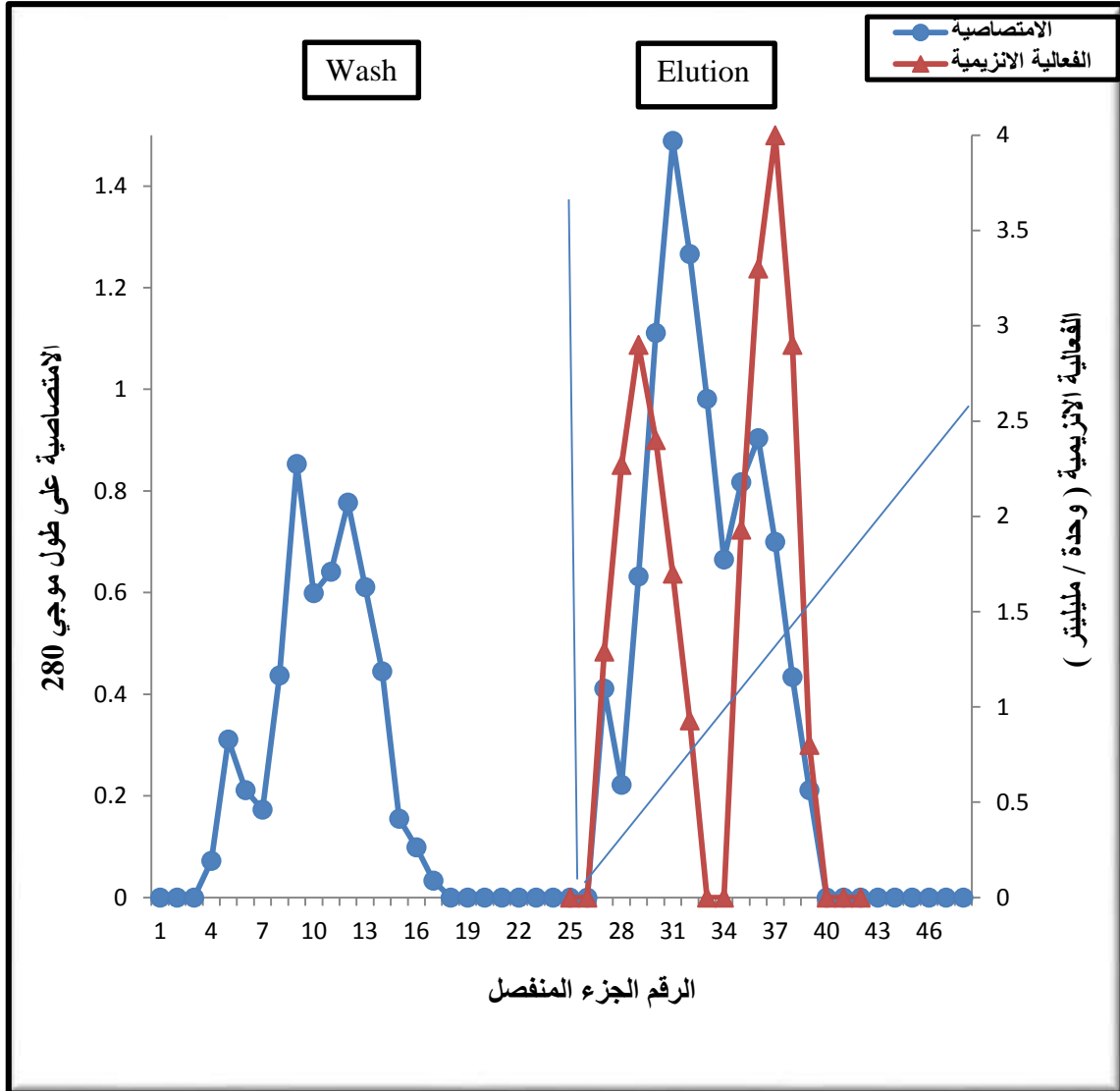
مرر الانزيم المرسب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (50-75) % على عمود المبادل الايوني DEAE- cellulose الذي سبق موازنته بمحلول الفوسفات الدارىء 0.1 مولار ذي الرقم الهيدروجيني ٧،٨، وتم قياس الامتصاصية الضوئية لاجزاء الغسل (البروتينات غير المرتبطة التي تحمل شحنة موجبة) على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر وعند وصول الامتصاصية الى الخط الصفري (Base line)، اجريت بعد ذلك عملية استرداد البروتينات المرتبطة بالمبادل (البروتينات التي تحمل الشحنة السالبة) بإستعمال 0.1 مولار محلول الموازنة بتدرج ملحي خطي (0- ١) مولار كلوريد الصوديوم ويرقم



هيدروجيني ٧,٨. ولوحظ من النتائج المبينة في الشكل (4 - 10) ظهور عدة قمم بروتينية في خطوة الغسل خالية من الفعالية و عدة قمم للبروتين لإجزاء الاسترداد مع قمتين للفعالية الانزيمية تركزت الاولى في الاجزاء (29-34) ، والثانية في الاجزاء (36-40) . ان خلو الاجزاء غير المرتبطة بالمبادل (اجزاء الغسل) من الفعالية الانزيمية تماماً يؤكد ارتباط الانزيم بالمبادل الايوني. وان محصلة الشحنة المحمولة على الانزيم في الظروف المستخدمة بالتجربة هي شحنة سالبة. تم الحصول بهذه الخطوة على عدد مرات تنقية 2.45 مرة وبحصيلة انزيمية 42.47 % مع ارتفاع الفعالية النوعية لتصل الى 95.62 وحدة / ملغم بروتين كما موضح بالجدول (2-4).

هناك العديد من الدراسات حول تنقية انزيم SOD باستخدام المبادل الايوني DEAE-Cellulose ففي احدى الدراسات نقي انزيم MnSOD من الرقي من جنس *Citrullus lanatus* Schrad باستخدام المبادل الايوني DEAE-Cellulose وقد سجل عدد مرات تنقية 357 مرة وبحصيلة انزيمية 60.8 % مع فعالية نوعية 30.71 وحدة / ملغم بروتين (Rodriguez-Serrano et al.,2007) . كذلك نقي من ثمار *Zizyphus mauritiana* Lamk باستخدام عمود DEAE-cellulose وقد سجل عدد مرات تنقية 4.5 مرة وبحصيلة انزيمية 14.8 مع فعالية نوعية 30.9 وحدة / ملغم بروتين (Kumar et al.,2008) . كما نقي الانزيم المستخلص من الاكاف *Agave attenuata* باستخدام المبادل الايوني DEAE-Cellulose وقد سجل عدد مرات تنقية 0.8 مرة وحصيلة انزيمية 10 % مع فعالية نوعية 306.43 وحدة / ملغم بروتين (Chen et al.,2011) .

من خلال الدراسات السابقة نلاحظ استخدام المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بشكل واسع لما يتمتع به من مميزات عديدة جعلته يفضل استعماله في عمليات التنقية منها القدرة العالية على أستيعاب البروتينات المرتبطة وقابليته على الفصل الجيد ، إضافة الى اعتماده على مبدأ بسيط هو اختلاف الشحنة مما يؤدي الى إمكانية تنشيطه واستخدامه مرات عديدة . مبدأ الفصل في هذه الطريقة دقيق ومباشر، تتم عملية التداخل بين البروتين والمبادل الايوني بالاعتماد على صافي الشحنة والقوة الايونية ، وتوزيع الشحنة على سطح البروتين ، وكذلك الرقم الهيدروجيني . وقد استخدمت المبادلات الايونية الطبيعية التي هي من مشتقات السليلوز بسبب ملاءمتها لفصل البروتينات ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة فضلا عن الاحتمالات القليلة لمسح البروتين (Janson and Ryden, 1998) .



الشكل (10-4) : كروماتوغرافيا التبادل الايوني لأنزيم SOD المنقى من اوراق *T. aphylla* بأستخدام عمود DEAE-Cellulose بأبعاد (3.5×20) سم . الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدائري بتركيز 0.1 مولار ورقم هيدروجيني 7.8 بتدرج خطي (1-0) مولار كلوريد الصوديوم ، جمعت الاجزاء بواقع 5 مليلتر و بسرعة جريان 30 مليلتر / ساعة .

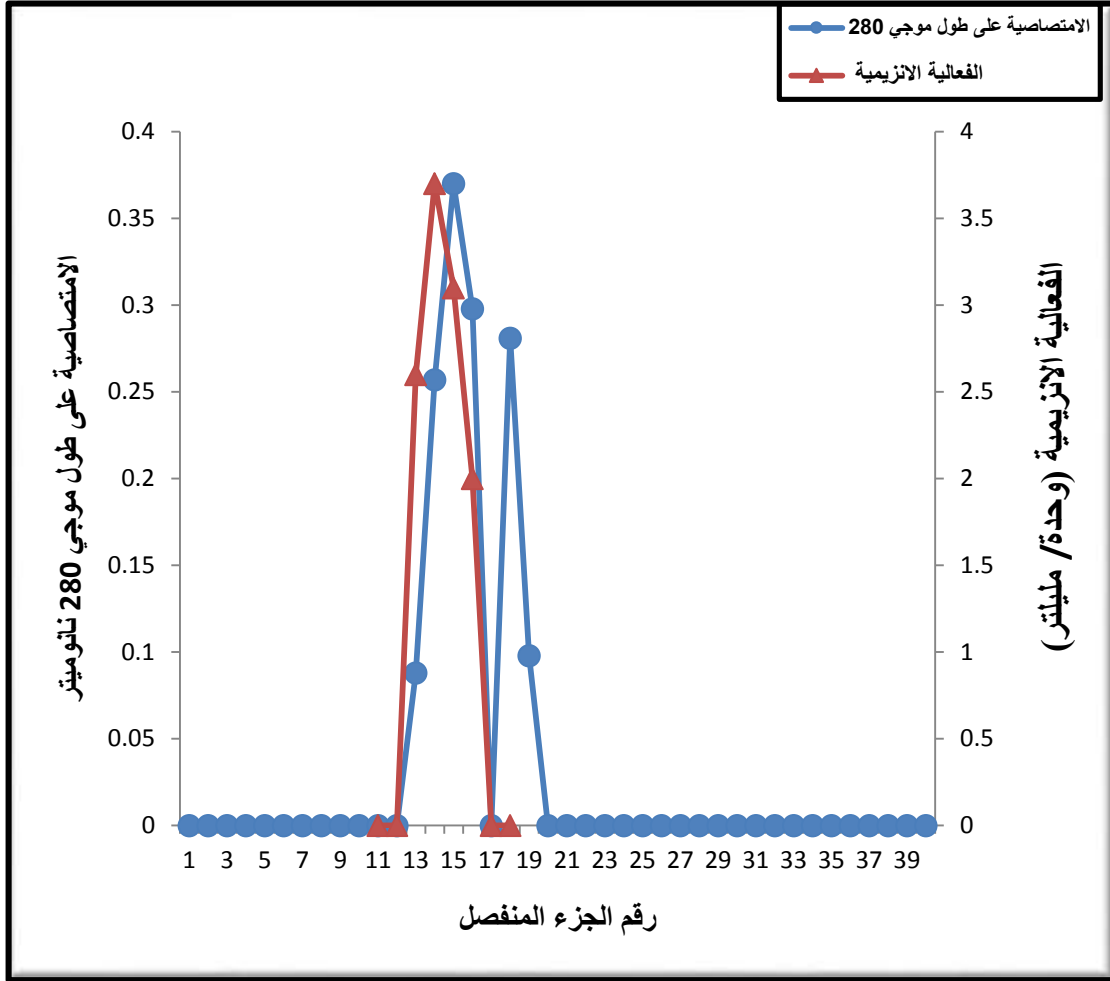
#### 3-2-4-4 : كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

بعد اكمال خطوة التبادل الايوني تلاها خطوة الترشيح الهلامي بمرحلتين باستعمال هلام السفاكريل S-200 في المرحلتين كليتهما ، لما يتمتع به من خصائص جيدة فهو يحتوي على الاكريل امايد فضلاً عن الدكستران مما يعطيه صلابة ومقاومة للانضغاط. ويمتاز كذلك بالفصل الجيد والسريع فضلاً عن سهولة الاستخدام والتحضير اذ يبقى ثابتاً مدة طويلة لكونه محضراً سلفاً من الشركة المنتجة Pharmacia fine chemical.

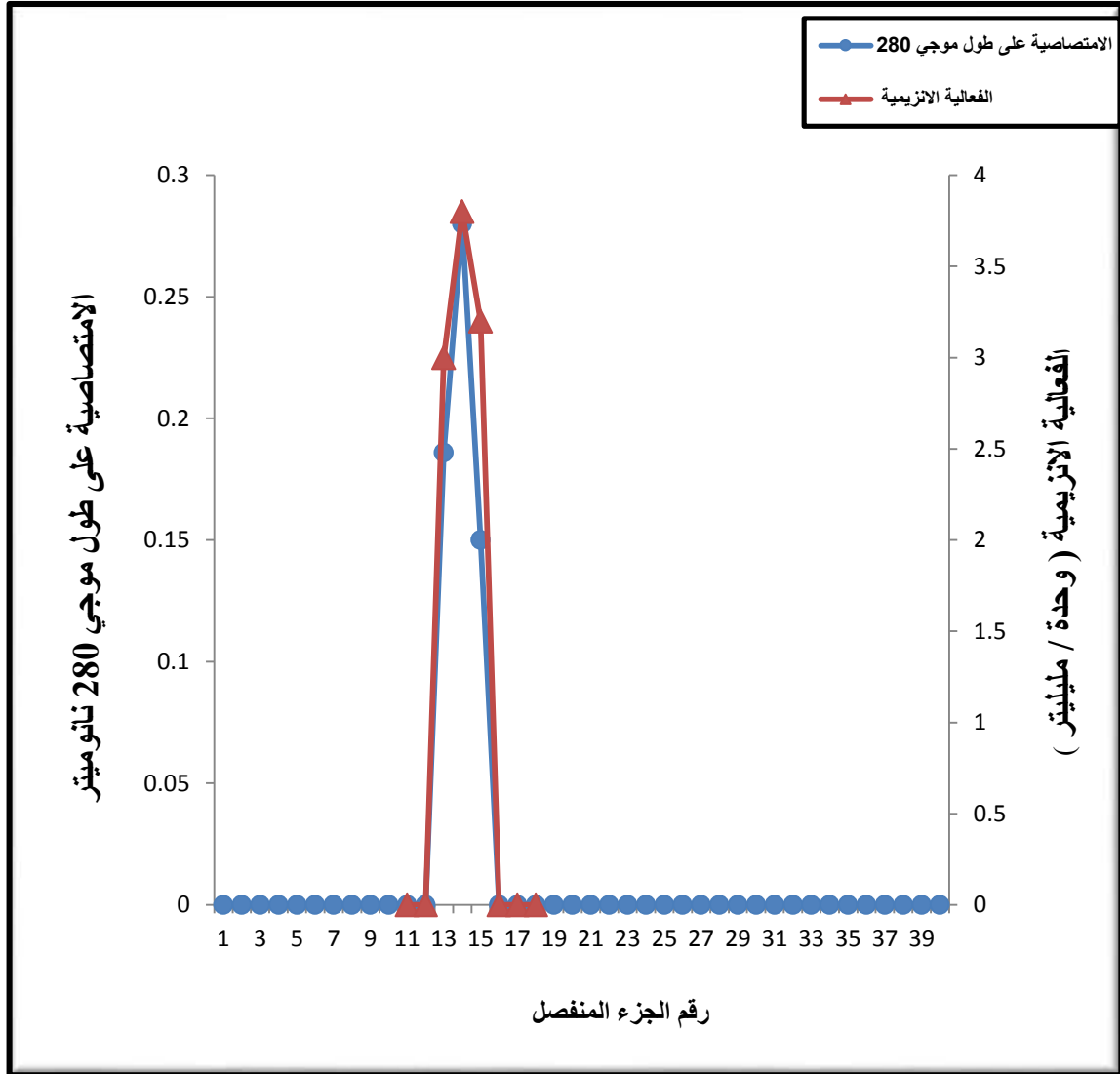
مرر المحلول الانزيمي الناتج من جمع اجزاء القمة الثانية للفعالية الانزيمية للخطوة السابقة (التبادل الايوني) . لامتلاكها عدد مرات تنقية وفعالية نوعية اعلى من القمة الاولى على عمود الترشيح الهلامي Sphacryl S-200 بأبعاد (80×1.5) سم وبمعدل جريان 60 مليلتر/ ساعة. لوحظ من فصل المجاميع البروتينية ظهور قمتين للبروتين في الاجزاء المستردة من عمود الترشيح الهلامي مع ظهور قمة واحدة للفعالية الانزيمية تركزت في الاجزاء المستردة (13-16) الشكل (4-11) فقد تم الحصول في هذه الخطوة على عدد مرات تنقية 3.94 مرة وحصيلة انزيمية 31.55 % مع ارتفاع بالفعالية النوعية لتصل الى 154.02 وحدة / ملغم بروتين . بعدها جمعت الاجزاء الفعالة وركزت مرة اخرى بعمود الترشيح الهلامي تحت الظروف ذاتها ، وتظهر النتائج في الشكل (4-12) قمة واحدة للبروتين مع ظهور قمة واحدة للفعالية الانزيمية مطابقة مع القمة البروتينية، وتم الحصول على عدد مرات تنقية 7.94 مرة وحصيلة انزيمية 22.57 % مع ارتفاع الفعالية النوعية الى 310 وحدة / ملغم بروتين . ويعد تطابق قمتي البروتين والفعالية احد ادلة النقاوة للانزيم (Whitaker, 1972).

وتشير البحوث العلمية الى استخدام طريقة الترشيح الهلامي كاحدى خطوات التنقية لأنزيم SOD بعد خطوة التبادل الايوني وذلك للتأكد من زيادة نقاوة الانزيم. هنالك العديد من الدراسات حول انزيم SOD المنقى من عدة مصادر، اذ نقي الانزيم من الشاي *Camellia sineses L.* باستخدام عمود Sephadex G-100 بحصيلة انزيمية مقدارها 41.6 % وعدد مرات تنقية 34.7 مرة والفعالية النوعية بلغت 17123 وحدة / ملغم بروتين (Iae-Hong et al.,2005) . كما نقي الانزيم من بادرات الحنطة بخطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم ، التبادل الايوني والترشيح الهلامي اذ وجد نوعين للانزيم في المستخلص الخام للنبات (SODII, SODI) بحصيلة انزيمية 11 و 2.4 % على التوالي وبعدها مرات تنقية 154 و 98 مرة على التوالي (Lia et al.,2008). نقي ايضا من *Curcuma*

*aeruginosa* Roxb على عمود Superdex 75 بحصيلة انزيمية 2.51 % مع فعالية انزيمية 812.20 وحدة / ملغم بروتين (Moon-Ai et al.,2012) .



الشكل (4-11) : كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (الخطوة الاولى) لتنقية انزيم SOD من اوراق *T. aphylla* بأستعمال عمود Sephacryl S-200 بأبعاد (80×1.5) سم، ثم الموازنة والاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ (0.2 مولار، pH=7.8) ، جمعت الاجزاء بواقع 5 مليلتر لكل جزء وبسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة



الشكل (4-12) : كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (الخطوة الثانية) لتنقية انزيم SOD من اوراق *T. aphylla* بأستعمال عمود Sephacryl S-200 بأبعاد (80×1.5) سم، ثم الموازنة و الاسترداد بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ( 0.2 مولار، pH=7.8 ) ، جمعت الاجزاء بواقع 5 مليلتر لكل جزء وبسرعة جريان 60 مليلتر / ساعة

الجدول (2-4) : خطوات تنقية انزيم SOD المستخلص من اوراق الطرفة *T. aphylla*

| الخطوة   | الحجم (مليتر) | الفعالية الانزيمية (وحدة / مليتر) | تركيز البروتين (ملغم/مليتر) | الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين) | الفعالية الكلية (وحدة) | عدد مرات التنقية | الحصيلة (%) |
|--|---------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------|-------------|
| المستخلص الخام   | 40            | 5.15                              | 0.132                       | 39.015                               | 206                    | 1                | 100         |
| الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (50-75)%                | 10            | 10.3                              | 0.166                       | 62.04                                | 103                    | 1.59             | 50          |
| التبادل الايوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose (القمة الاولى) | 30            | 3.15                              | 0.0424                      | 74.29                                | 94.5                   | 1.90             | 45.87       |
| التبادل ايوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose (القمة الثانية)  | 25            | 3.5                               | 0.0366                      | 95.62                                | 87.5                   | 2.45             | 42.47       |
| الترشيح الهلامي الاول باستخدام Sepheryl S-200 (الخطوة الاولى)  | 20            | 3.25                              | 0.0211                      | 154.02                               | 65                     | 3.94             | 31.55       |

|       |      |      |     |      |     |    |   |
|-------|------|------|-----|------|-----|----|---|
| 22.57 | 7.94 | 46.5 | 310 | 0.01 | 3.1 | 15 | الترشيح الهلامي<br>الثاني بأستخدام<br>Sephacryl S-<br>200<br>( الخطوة الثانية ) |
|-------|------|------|-----|------|-----|----|---|

#### 4-2-4-4: فحص نقاوة انزيم SOD

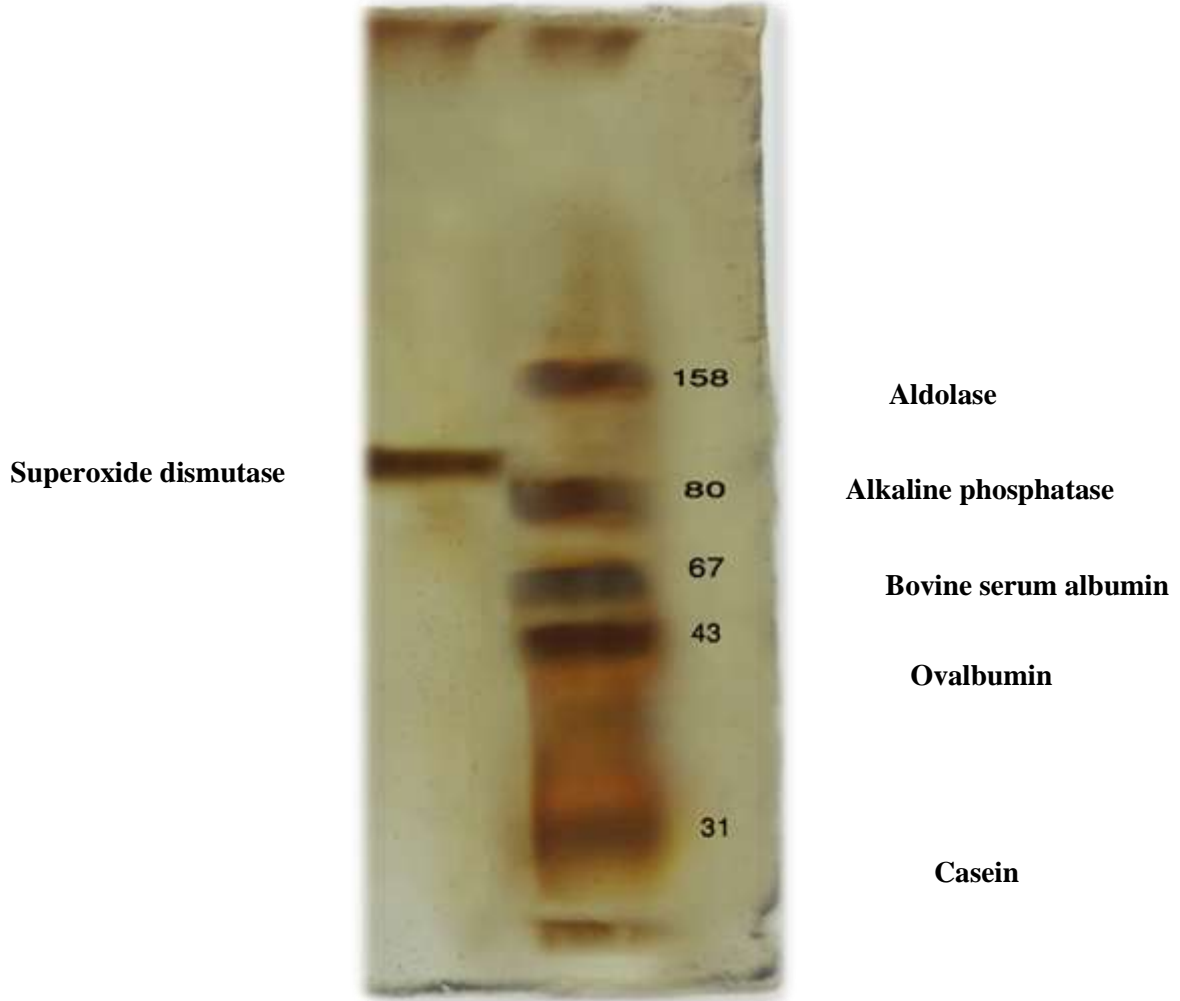
##### Purity of SOD

تعد خطوة فحص نقاوة الانزيم من الخطوات المهمة في التعرف على كفاءة خطوات التنقية المستخدمة إذ من الضروري اجرائها قبل توصيف الانزيم وذلك لان وجود مواد أخرى غالباً ما يؤدي الى اعطاء نتائج غير دقيقة. وقد استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد (7.5%) بوجود المواد المدنترة SDS (SDS- PAGE) لفحص نقاوة الانزيم الناتج بعد خطوات التنقية المذكورة سابقاً، اذ اشارت النتائج المستحصلة الشكل (4-13) ظهور حزمة بروتينية واحدة في الهلام للنموذج النقي والذي يعد أحد الدلائل على نقاوة الانزيم . وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع بعض الدراسات اذ بين Carter وجماعته (2000) ظهور حزمة بروتينية واحدة لأنزيم MnSOD المنقى من *Nicotiana sp.* ذات وزن جزيئي 17.5 كيلو دالتون باستخدام SDS-PAGE . كما بين Sundaram وجماعته (2009) ظهور حزمة بروتينية واحدة لأنزيم Cu/ZnSOD المنقى من *Chenopodium murale*. كما وجد ان انزيم Cu/ZnSOD المنقى من الثوم *Allium sativum* يتكون من حزمة بروتينية واحدة ( Hadji et al.,2007 ). اما انزيم Mn SOD المنقى من الرقي من جنس *Citrullus lanatus* Schrad اظهر وجود اربع حزم ذات وزن جزيئي 27 كيلو دالتون (Rodriguez-Serrano et al., 2007) . اما (2014) انزيم SOD المنقى من جذور *Stemona tuberosa* اظهر وجود وحدتين ذات وزن جزيئي 17.6 و 31.5 كيلو دالتون (Singh et al.,2014).

ويعد استخدام طريقة الترحيل الكهربائي خلال مراحل التنقية دليلاً مهماً للتعرف على كفاءة كل خطوة من خطوات التنقية فضلاً عن ذلك استخدام هذه التقنية لتقدير الوزن الجزيئي للأنزيم (Slykhouse and Fee, 1976; Inaoka *et al.*, 1998; Laas, 1998).

**M**





الشكل (4-13) : الترحيل الكهربائي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T.aphylla* بوجود المواد  
الماسحة SDS

5-4 : توصيف انزيم السوبراوكسايد دسميوتيز SOD

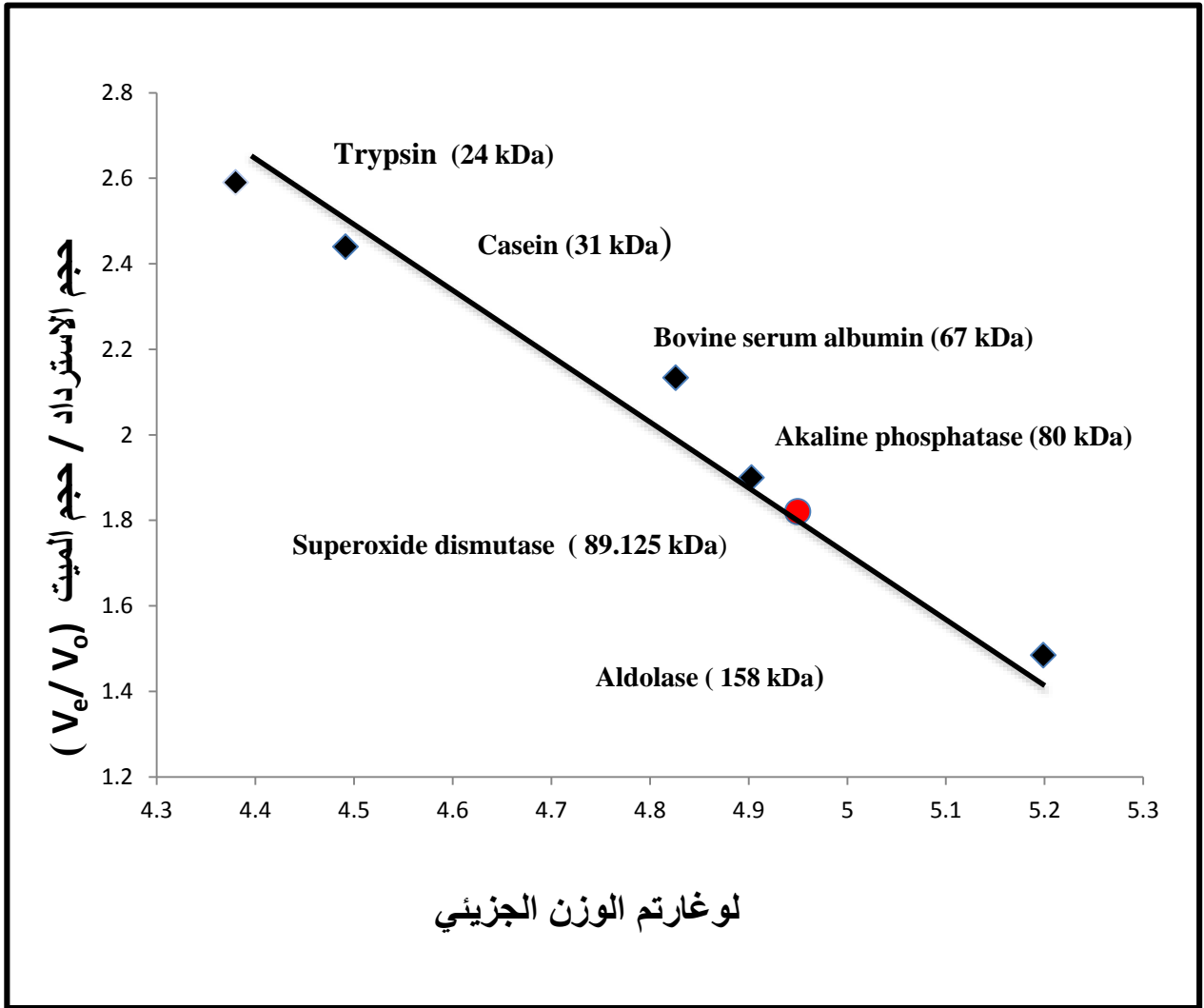
1-5-4 : تعيين الوزن الجزيئي لانزيم SOD

عين الوزن الجزيئي للانزيم المنقى بطريقتين هما الترشيح الهلامي، والترحيل الكهربائي في هلام الاكريل أمايد المتعدد بوجود المواد الماسخة SDS-PAGE .

#### 4-5-1-1 : الترشيح الهلامي:

استخدمت طريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 في تقدير الوزن الجزيئي لانزيم SOD قيد الدراسة ويوضح الشكل (4-14) المنحنى القياسي اللوغارتمي للوزن الجزيئي مقابل نسبة حجم الاسترداد / حجم الفراغ (Ve/ Vo) للبروتينات القياسية المستخدمة وعن طريق هذه العلاقة قدر الوزن الجزيئي للانزيم 89.125 كيلو دالتون .

هنالك العديد من الدراسات حول تقدير الوزن الجزيئي لانزيم SOD ، اذ اظهرت احدى الدراسات ان انزيم SOD المنقى من نبات *Mesembryanthemum crystallinum L.* يتكون من ثلاث متناظرات انزيمية هي Mn ، Fe ، Cu/Zn ذات وزن جزيئي (82, 48, 34) كيلو دالتون على التوالي (Miszalski et al.,1998). كما قدر الوزن الجزيئي للانزيم Cu/ZnSOD المنقى من *Nicotiana plumbaginifolia* 33.2 كيلو دالتون باستخدام الترشيح الهلامي كما بين SDS-PAGE ان الانزيم يتكون من وحدتين ثانويتين متماثلة 16.6 كيلو دالتون (Ragusa et al.,2001). كما تم حساب الوزن الجزيئي لأنزيم MnSOD المنقى من الرقي *Citrullus lanatus Schrad* 108 كيلو دالتون ووجد انه يتكون من اربع وحدات ثانوية متماثلة ذات وزن جزيئي 27 كيلو دالتون (Rodriguez-Serrano et al., 2007) كذلك تم حساب الوزن الجزيئي لأنزيم FeSOD في *Panax ginseng* 31,071 دالتون ( Li et al.,2010). بينما الوزن الجزيئي لأنزيم Cu/ZnSOD المنقى من اليقطين *Cucurbita moschata* 35 كيلو دالتون باستخدام طريقة الترشيح الهلامي (Qin et al.,2012). في حين حسب الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من *Curcuma aeruginosa* 31.5 كيلو دالتون باستخدام SDS-PAGE (Moon-Ai et al.,2012).



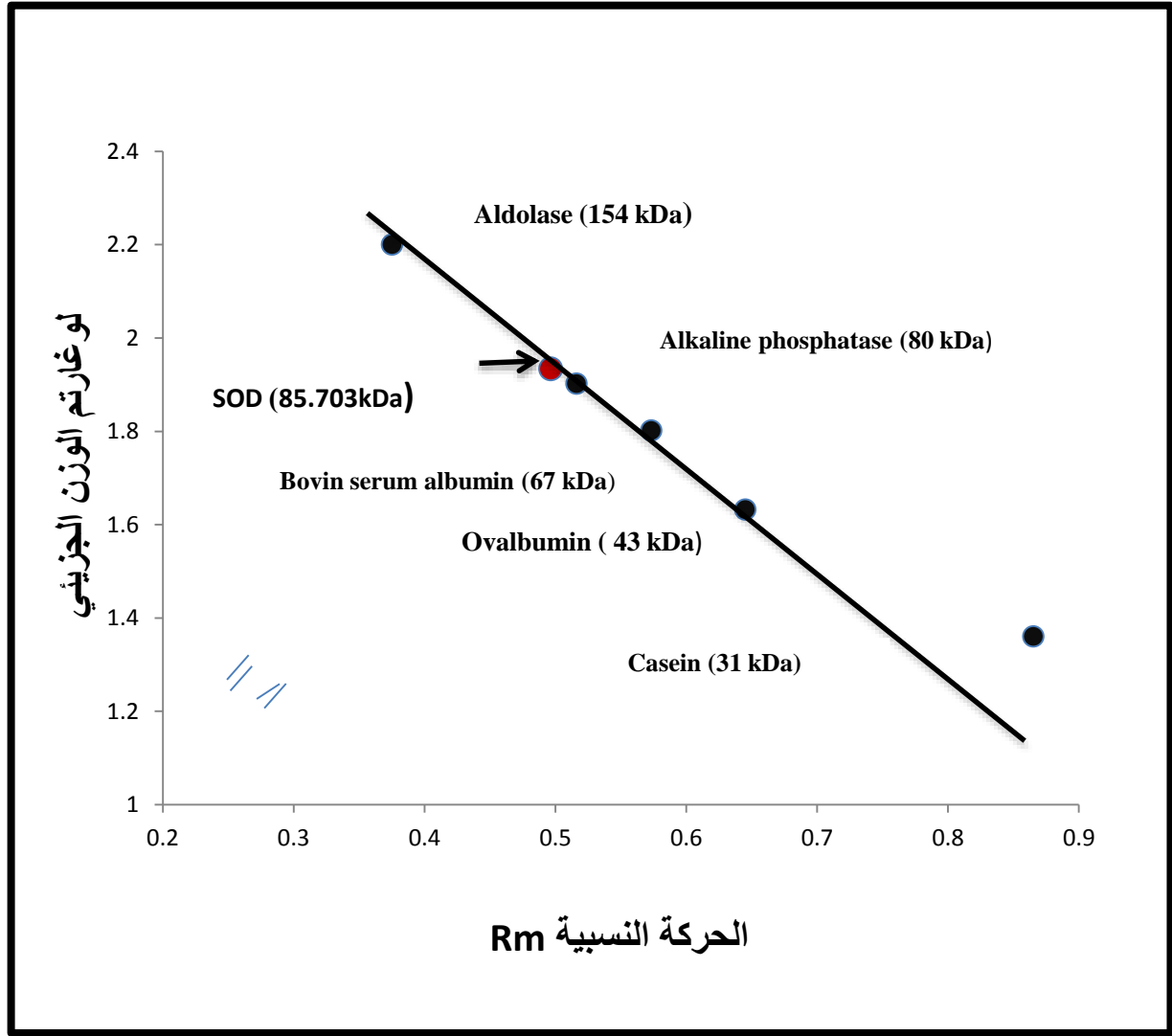
الشكل (4-14) : تقدير الوزن الجزيئي لانزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephacryl S-200 بأبعاد (80×1.5) سم .

### 2-1-5-3 : الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة

#### SDS-PAGE electrophoresis

استخدم المنحني القياسي (العلاقة لوغاريتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية Relative mobility (Rm) ) للبروتينات القياسية في هلام الاكريل امايد المتعدد بوجود SDS لحساب الوزن الجزيئي للانزيم بطريقة الترحيل الكهربائي ، فكان 85.703 كيلو دالتون الشكل (4-15) ويتضح من النتائج المستحصلة ان الوزن الجزيئي للانزيم المقدر بطريقة الترشيح الهلامي اعلى من الوزن الجزيئي للانزيم المقدر بالترحيل الكهربائي .

قدر الوزن الجزيئي لانزيم SOD المنقى من اوراق الكركم *Curcuma longa* L. 30.8 كيلو دالتون بأستخدام Native PAGE كما اظهر SDS-PAGE ان الانزيم يتكون من وحدتين ثانويتين ذات وزن جزيئي 15 كيلو دالتون (Kochhard and Kochhard,2008) . ففي الفراولة اظهر وجود متناظرين انزيمين هما MnSOD و Cu/Zn SOD مع وزن جزيئي 19 و 16 كيلو دالتون على التوالي ( Ehsani - Moghaddam *et al.*,2008). كما حسب الوزن الجزيئي لأنزيم Cu/Zn SOD المنقى من فول الصويا Black soybean 31.0 كيلو دالتون باستخدام SDS-PAGE (Wang *et al.*,2012) . بينما كان الوزن الجزيئي لأنزيم Cu/Zn SOD المنقى من اوراق *Jatrova curcas* 16.4 كيلو دالتون باستخدام SDS-PAGE (Qu-Yang *et al.*,2013) . كما قدر الوزن الجزيئي لانزيم SOD في جذور نبات *Stemona tuberosa* 663,79 دالتون باستخدام Native -PAGE (Niyomploy *et al.*, 2014).



الشكل (4-15) : تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* بطريقة الترحيل الكهربائي وبوجود المواد الماسخة SDS.

## 2-5-4 : تأثير الرقم الهيدروجيني

### 1-2-5-4 : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم SOD

تم دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة عند قيم هيدروجينية تراوحت بين (4 - 10) . وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم هو 7.5 اذ اعطى فعالية بلغت 3.49 وحدة / مليلتر الشكل (4-16) . كما لوحظ انخفاض كبير في الفعالية عند القيم الحامضية (4-5) والقاعدية (9-10) .

تشير احدى الدراسات ان الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم MnSOD المنقى من الشاي *Camellia sinensis* هو 8 (Vyas and Kumar,2005) . بينما الرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم SOD المنقى من الحنطة هو 8 (Lai et al.,2008) . بينما الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم SOD في نبات *Curcuma aeruginosa* Roxb هو 4 (Moon-Ai et al.,2012) . في حين الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المستخلص من بذور *Amaranthus spinosus* هو 8 (Sharma et al.,2014) . كما ان اعلى فعالية لأنزيم SOD المنقى من جذور *Stemona tuberosa* سجلت عند رقم هيدروجيني 5 (Niyomploy et al.,2014) .

يتضح مما ذكر اعلاه ان الارقام الهيدروجينية تغير من الحالة المتأينة للسلسلة الجانبية للاحماض الامينية التي تكون ضرورية للمحافظة على التركيب الثلاثي . وخصوصاً الموقع الفعال الذي يقود الى تغيير في شكل الموقع الفعال ، ارتباطه بالمادة الاساس ، ومعدل التفاعل وهذا يؤدي الى تغير الحالة المتأينة على مادة التفاعل مما ينعكس ذلك على فعالية الانزيم اذ ان ارتفاع الرقم الهيدروجيني او انخفاضه عن حدود معينة يمكن ان يؤدي الى مسخ الانزيم وفقدان فعاليته (Segal,1976) .

وتشير الدراسة التي قام بها Colowick و Kaplan (1984) الى ان الانزيم شهد انخفاضاً كبيراً في الفعالية الانزيمية عند الارقام الهيدروجينية الحامضية قياساً بقيم الفعالية عند الارقام الهيدروجينية القاعدية. ويعزى هذا الانخفاض في الفعالية الانزيمية الى تأثير الرقم الهيدروجيني في تأين المجاميع الجانبية للاحماض الامينية المكونة للانزيم وتأين المجاميع في المادة الاساس ومن ثم يؤثر في شكل الموقع الفعال وارتباط المواد الاساس او تحفيز التفاعل (المظفر، 1990) .

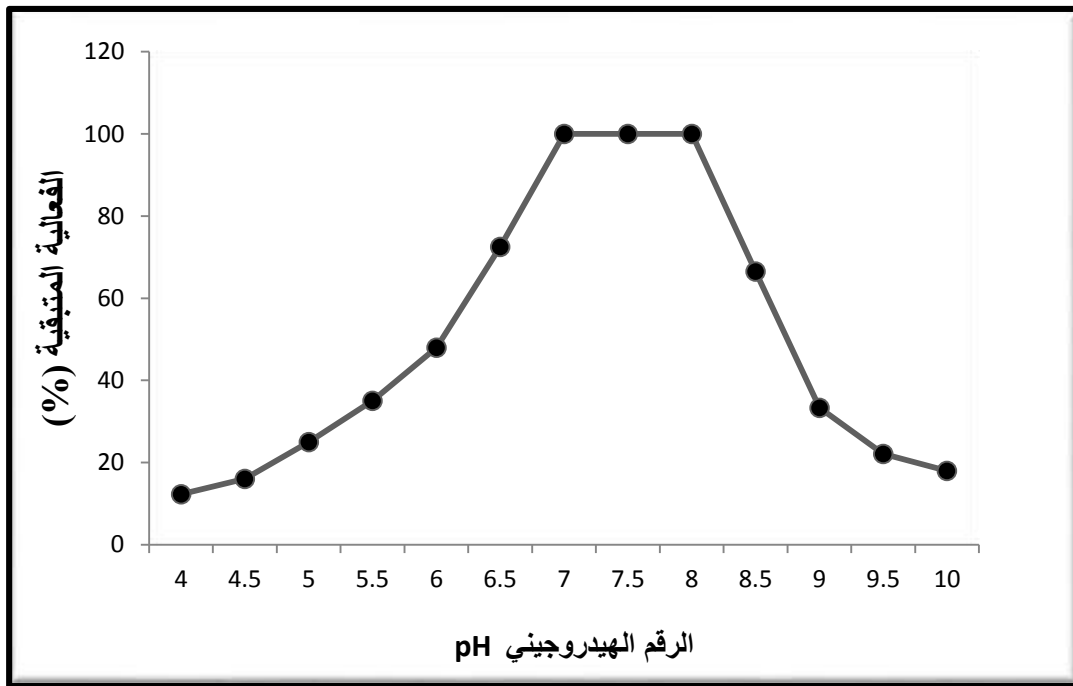


الشكل (4- 16) : الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم SOD المنقى من اوراق *T. aphylla*

#### 2-2-5-4 : الرقم الهيدروجيني الامثل لثباتية انزيم SOD

تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* . بين الشكل (4-17) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم هو بين (7-8) عند حضن الانزيم بدرجة حرارة 25 °م لمدة 30 دقيقة ، اذ وجد ان الانزيم يكون اكثر ثباتا في التعادل الى القاعدي ، اذ ان الانزيم ظل محتفظا بفاعليته عند pH 7, 7.5, و 8 ، كما يكون الانزيم غير مستقر تقريبا عند قيم pH اقل من 5.0 فالفعالية المتبقية عند pH 4 و 4.5 هي ( 12 و 18) على التوالي ، اما الفعالية المتبقية عند pH 9 و 9.5 و 10 هي (33.2, 22.1, 18) على التوالي. يمكن ان يعود السبب في انخفاض فعالية الانزيم في الارقام الحامضية القليلة الى تأثير حموضة الوسط في تركيب بروتين الانزيم وتأين المجاميع الموجودة في الموقع الفعال ، كما ان زيادة الرقم الهيدروجيني عن الحد الامثل يؤدي الى مسخ البروتين وتغيير تركيب الموقع الفعال وفقدان فعالية الانزيم (Segal,1976) .

هنالك العديد من الدراسات التي تناولت الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم SOD المنقى من مصادر اخرى ، فقد وجد Hadji وجماعته (2007) ان انزيم Cu/Zn SOD المنقى من الثوم *Allium sativum* L. اكثر ثباتاً عند pH (5-10) . كما يكون الانزيم المستخلص من بادرات الحنطة اكثر ثباتاً عند pH (7-9) لكن الانزيم يتحسس الى قيم pH المتطرفة وخصوصا الحامضية (Lai et al.,2008) اما انزيم SOD المنقى من بادرات الحمص *Cicer cerietinum* يكون اكثر ثباتاً عند pH (6-8.5) (Singh et al.,2013). بينما يكون الانزيم المنقى من اوراق *Jatropha curcas* يكون اكثر ثباتاً عند pH (4-9) بعد 10 دقائق من الحضان (Qu-Yang et al.,2013) . بينما يكون انزيم Cu/Zn SOD لنبات *Sonneratia alba* ( Mangrove) اكثر استقرارا عند pH بين (3 - 7) (Yang et al.,2016) .



الشكل (4-17): تأثير الرقم الهيدروجيني على ثباتية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla*.

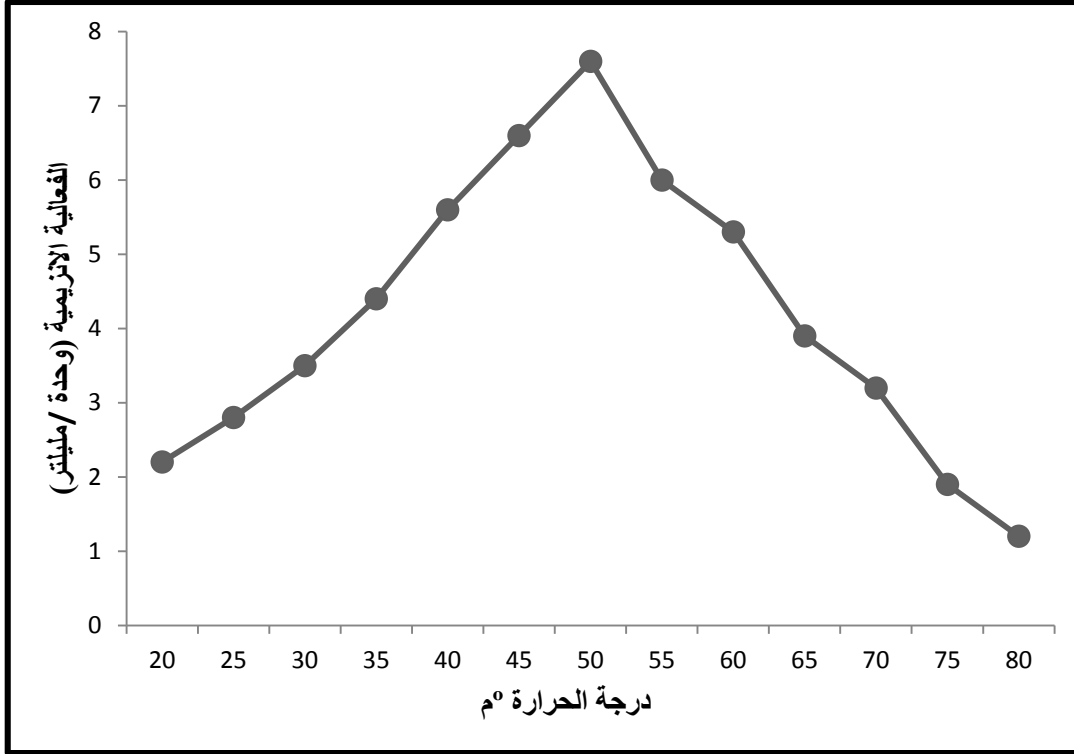


#### 3-5-4 : تأثير درجة الحرارة

##### 1-3-5-4 : تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم SOD

بينت النتائج تأثير درجة الحرارة المختلفة (20-80) °م في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* ، لوحظ ان فعالية الانزيم تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة لغاية 50 °م حتى بلغت اقصاها 7.6 وحدة / مليلتر ، اذ ان الفعالية تزداد بزيادة درجة الحرارة ثم تبدأ بعدها بالانخفاض بزيادة درجة الحرارة اذ بلغت الفعالية الانزيمية 1.27 وحدة/ مليلتر عند درجة حرارة 80 °م الشكل (4-18) ويعود السبب في ذلك الى ان سرعة التفاعل الانزيمي تزداد بزيادة درجة الحرارة ضمن مدى معين بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات وزيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم والمادة الاساس نتيجة زيادة الطاقة الحركية بفعل زيادة درجة الحرارة ، الا ان ارتفاع درجة الحرارة عند حدود معينة تؤدي الى مسخ الانزيم وتلف التركيب الثلاثي له من ثم انخفاض الفعالية (Segal, 1976; Muro et al.,1984).

ففي احدي الدراسات وجد ان اعلى فعالية لانزيم SOD المنقى من *Curcuma aeruginosa* سجلت عند درجة حرارة 50 °م (Moon-Ai et al.,2012). كما ان اعلى فعالية لانزيم SOD المنقى من الفول الاسود سجلت ايضاً عند درجة حرارة 50 °م (Wang et al.,2012). بينما انزيم SOD المنقى من بادرات الحمص *Cicer cerietinum* كانت الدرجة الحرارة المثلى له 30 °م (Singh et al.,2013). كما ان اعلى فعالية للانزيم المنقى من *Stemona tuberosa* عند درجة حرارة (0-50) °م (Niyomploy et al.,2014) . .



الشكل (18-4) : تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* اجري التفاعل بدرجات حرارية مختلفة (20-80) م° باستخدام Pyrogallol مادة اساس .

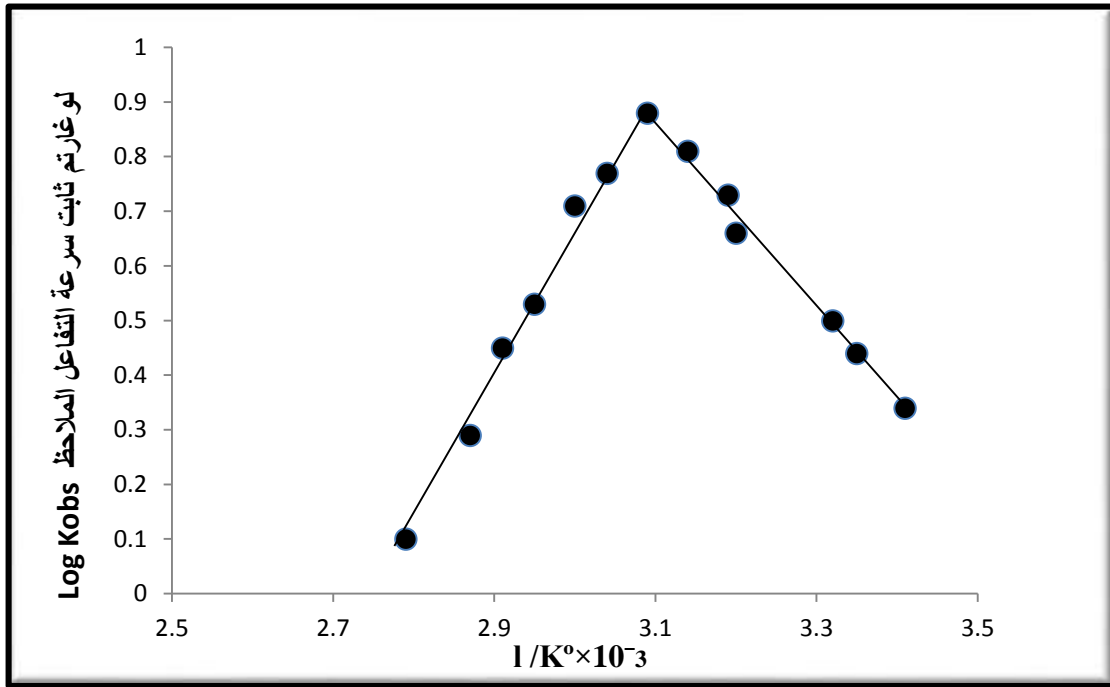
#### 2-3-5-4 : طاقة التنشيط $E_a$

### Activation energy

بلغت طاقة التنشيط ( $E_a$ ) لتحويل المادة الاساس الى ناتج بفعل انزيم SOD 7312 سعرة/مول شكل (4-19)، والتي قدرت من العلاقة بين لوغاريتم ثابت سرعة التفاعل الملاحظ ( $K_{obs.}$ ) ومقلوب درجة الحرارة المطلق ( $1/K^\circ$ ) تبعاً لمعادلة ارينوس. وتتراوح طاقة التنشيط للتفاعلات الكيميائية وبضمنها التفاعلات الانزيمية بين 6000-18000 سعرة/مول (Whitaker, 1972). وللانزيمات دور مهم في خفض طاقة التنشيط لذا فإن سرعة التفاعلات الانزيمية تكون اعلى من سرعة التفاعلات غير الانزيمية اذ من المعلوم ان انخفاض طاقة التنشيط لتحويل مادة التفاعل الى نواتج يعد مؤشراً على قدرة الانزيم الحفزية ، وبقياس قيمة طاقة

التنشيط لانزيم SOD قيد الدراسة البالغة 7312 سعرة/مول مع القيم اعلاه يمكننا القول : ان هذا الانزيم يمتلك قدرة عالية في تحويل المادة الاساس (Pyrogallol) الى ناتج.

وبالرغم من اهمية تعيين طاقة التنشيط لمعرفة قدرة الانزيم التحفيزية الا ان معظم الدراسات التي اهتمت بتوصيف انزيم SOD لم تبد اهتماماً كبيراً بتعيين هذه الطاقة الا بعض الدراسات القليلة في هذا المجال ،ففي دراسة لأنزيم CuZnSOD المنقى من اوراق التبغ *Nicotiana plumbaginifolia* قدرت طاقة التنشيط 263 كيلوجول / مول (Ragusa et al., 2001) .



الشكل (4-19): منحنى ارينيوس لتعيين طاقة التنشيط لانزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla*

#### 3-3-5-4 : تأثير درجة الحرارة على ثباتية انزيم SOD

لغرض معرفة الحرارة المثلى التي يعمل فيها الانزيم المنقى من المصدر قيد الدراسة ، اجري التفاعل الانزيمي بمدى حراري من درجات الحرارة تتراوح بين (20-80) °م واطهرت النتائج ان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته بعد حضنه لمدة 30 دقيقة وبمدى (20-50) °م بعدها تبدأ بالانخفاض مع زيادة درجة الحرارة اذ ان الانزيم احتفظ 73 و53 من فعاليته الاصلية عند درجة حرارة ( 55 و 60 ) °م على التوالي بينما احتفظ 29 و8 % من فعاليته في درجة حرارة (70 و80) °م على التوالي . ان الهبوط في فعالية الانزيم عند ارتفاع درجة الحرارة قد يعزو الى تغيير في تركيب جزيئة البروتين بواسطة هدم الاواصر التي تربط الاحماض الامينية في التركيب الثانوي والثلاثي للبروتين والتي تقود الى دنثرة الانزيم ( Chesworth et al., 1998 ) .

تناولت العديد من الدراسات الثبات الحراري لأنزيم SOD ، ففي احدى الدراسات لأنزيم Cu/Zn SOD المستخلص من *Sonneratia alba* وجد انه اكثر استقرارا بدرجة حرارة بين (55-25) °م ( Yang et al.,2016 ) . كما درس الثبات الحراري لأنزيم SOD المنقى من الأكاف *Agave attenuata* بمدى حراري (20-80) لمدة 25 دقيقة في حمام مائي لوحظ ان اعلى فعالية سجلت في درجة حرارة 40°م والانزيم مستقر نسبيا في درجة حرارة 60°م ولكن يصبح غير فعال عند درجة حرارة 70 °م (Chen et al.,2011).وفي دراسة اخرى لأنزيم SOD المستخلص من *Amaranthus spinosus* بمدى حراري (10-90) ولمدة ساعتين يكون الانزيم مستقر بدرجة حرارة (20-40) °م ( Sharma et al.,2014) .



الشكل (4-20): تأثير درجة الحرارة على ثباتية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* بحضن الانزيم بدرجات حرارية مختلفة وبمدى (20-80) °م لمدة 30 دقيقة .

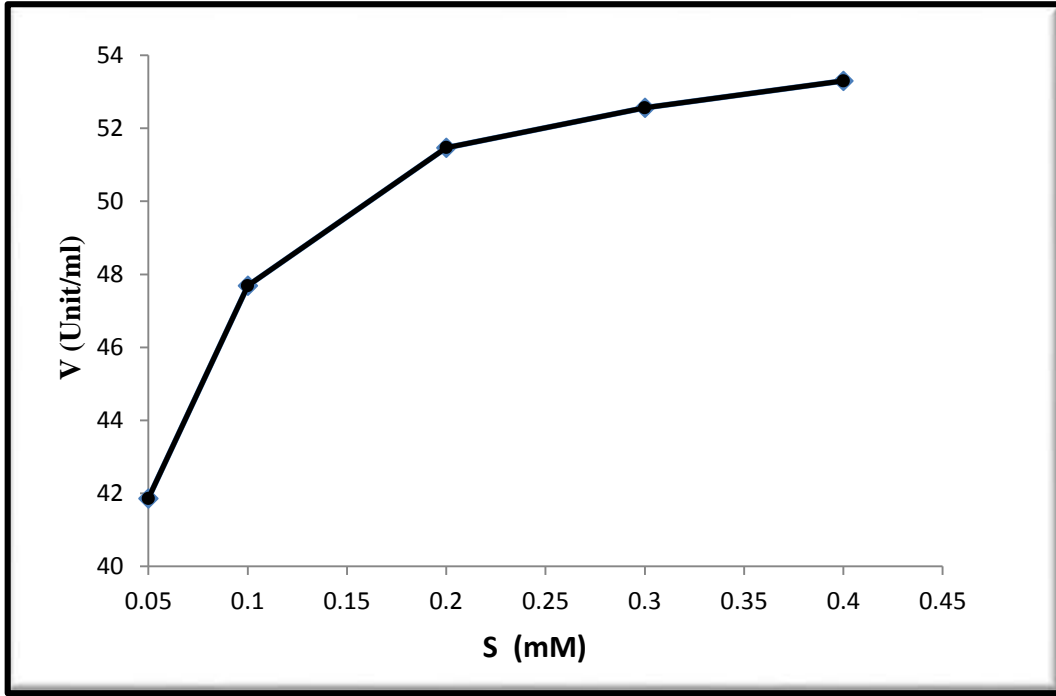
#### 5-5-4 : تقدير الثوابت الحركية للانزيم

تم تقدير ثابت ميكالس ( $K_m$ ) والسرعة القصوى ( $V_{max}$ ) لانزيم SOD (المنقى) باستخدام البايروكالول مادة اساس (ركيزه) واستخدمت طريقة لاينويفر-بيرك Line Weaver-Burk reciprocal plot لرسم العلاقة بين مقلوب سرعة التفاعل  $1/V_0$  ومقلوب تركيز المادة الاساس  $1/S$  الشكل (4-22).

اظهرت النتائج بان ثابت ميكالس ( $K_m$ ) والسرعة القصوى ( $V_{max}$ ) بلغت 0.133 ملي مولار و 54.94 ملي مولار / دقيقة على التوالي. أن اختلاف قيم ثابت ميكالس -منتن تعتمد على اختلاف المصادر المستخلص منها انزيم SOD والرقم الهيدروجيني والقوة الايونية للدارئ المستخدم . ففي دراسة لأنزيم Cu/Zn SOD المنقى من الحمص *Cicer arietinum* L. قدر  $K_m$  قدر  $10.16 \pm 2.5 \mu M$  باستخدام Riboflavin مادة اساس (Singh et al.,2013) . كما قدر  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم SOD المنقى من *Stemona tuberosa*  $62.414 \pm 0.015$  مولار و  $101.010 \pm 0.022$  مايكرومول/ دقيقة / ملغم

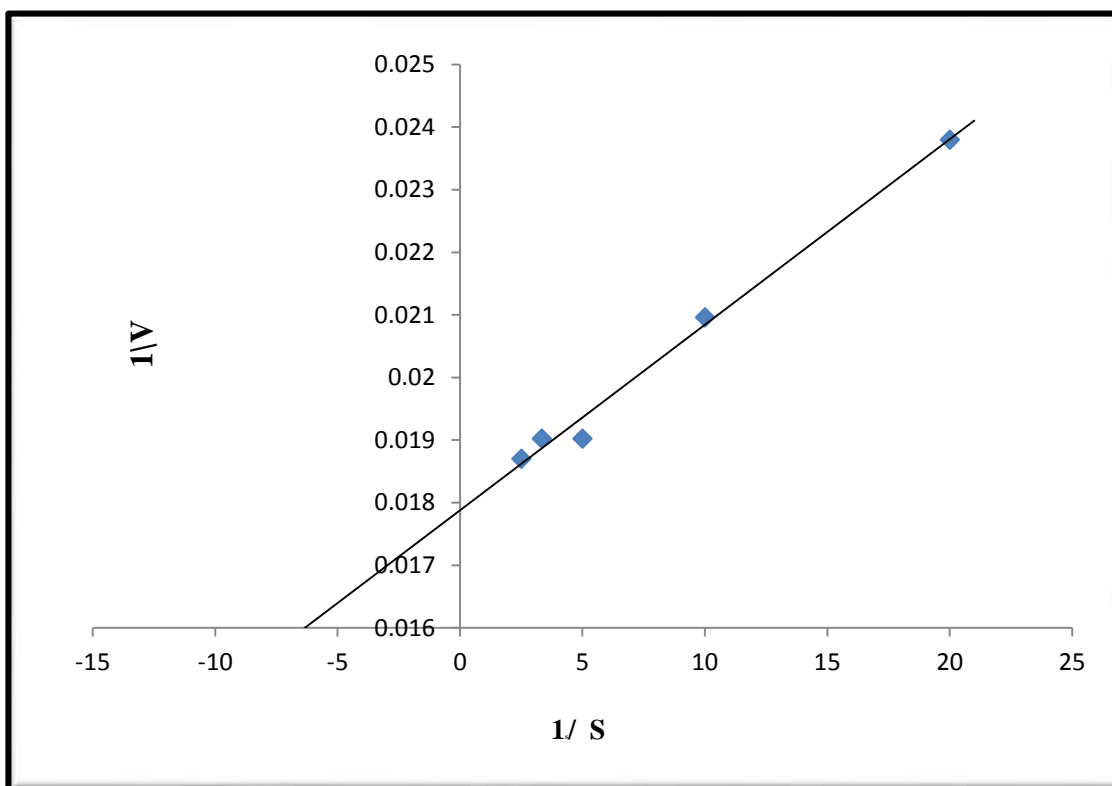
بروتينين بأستخدام Nitroblue tetrazolium (NBT) مادة اساس و  $27.389 \pm 0.032$  مولار و  $38.167 \pm 0.021$  مايكرومول/ دقيقة/ ملغم بروتينين بأستخدام Riboflavin مادة اساس ، على التوالي (Niyomploy *et al.*,2014).

تعود اهمية تحديد قيمة ثابت ميكالس  $K_m$  ( الذي يمثل تركيز المادة الاساس عندما تكون سرعة التفاعل  $V_0$  مساوية لنصف السرعة القصوى  $V_{max}$  ) لكونه يقدم قيمة تقريبية لمستوى المادة الاساس في الخلية كما يتخذ ثابت ميكالس معياراً للتعرف على آفة الانزيم تجاه مواد الاساس المختلفة ، وان قيم  $K_m$  الواطنة لمادة اساس معينة تعكس آفة الانزيم العالية تجاهها ( Segal, 1976 ) .



الش  
كل

(21 – 4) : منحنى ميكالس – منتن لأنزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla*



الشكل ( 4-22 ) : منحنى العلاقة بين مقلوب مادة التفاعل ومقلوب السرعة الاولية باستخدام طريقة لاينويفر- بيرك Line Weaver-Burk Plot لتقدير الثوابت الحركية لانزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* تجاه مادة الاساس الـ Pyrogallol .

#### 6-5-4 : تأثير بعض المواد الكيميائية في فعالية انزيم SOD

##### 1-6-5-4 : تأثير الايونات المعدنية في فعالية الانزيم

درس تأثير بعض الايونات المعدنية في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* بحضن الانزيم المنقى مع محاليل بعض كلوريدات المعادن بدرجة حرارة 25 °م لمدة 30 دقيقة . ولوحظ اختلاف في تأثير ايونات المعادن في فعالية الانزيم اعتماداً على نوع المعادن وتركيزها كما في الجدول (4-3).

تناولت العديد من الدراسات دراسة تأثير الايونات المعدنية. اذ بينت احدى الدراسات تأثير الايونات المعدنية المختلفة في فعالية انزيم MnSOD المنقى من التبغ ، اذ لوحظ زيادة في نشاط الانزيم عند معامته بأيون  $Mn^{2+}$  في حين تقل فعالية الانزيم عند اضافة ( $Fe^{2+}$  ،  $Cu^{2+}$  ،  $Zn^{2+}$  وكذلك  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ ) (Carter and Thornburg,2000). ففي دراسة اخرى لأنزيم SOD المنقى من جذور *Stemona tuberosa* Roxb. وجد ان الانزيم قد ثبت بقوة عند استخدام  $MgCl_2$  و  $MnCl_2$  و  $HgCl_2$  عند كل التراكييز المستخدمة (Niyomploy *et al.*,2014).

اشارت بعض الدراسات الى عدم وجود تأثير تثبيطي لبعض الاملاح مثل كلوريد الصوديوم والبتوتاسيوم في فعالية الانزيم؛ مما امكن استخدامها في المحاليل المستعملة في استرداد الانزيم خلال خطوات التنقية للانزيم وفي تقنيات كروماتوغرافيا التبادل الايوني و الترشيح الهلامي، كما لوحظ استخدام كلوريد البوتاسيوم عند المعاملة الحرارية للانزيم للحفاظ على التركيب الثلاثي للانزيم خلال عملية التنقية (Slykhouse and Fee, 1976; Miller, 2001; Lin *et al.*, 2001)؛ مما يؤكد عدم تأثير الانزيم بوجود هذه الايونات.



جدول (3-4) : تأثير الايونات المعدنية في فعالية انزيم S0D المنقى من اوراق *aphylla*

| الفعالية المتبقية<br>(%) | التركيز<br>(ملي مولار) | ايونات المعادن            |
|--------------------------|------------------------|---------------------------|
| 100                      | -                      | معامل السيطرة             |
| 44.67                    | 5                      | كبريتات الحديد $FeSO_4$   |
| 31.04                    | 10                     |                           |
| 7.21                     | 5                      | كلوريد الزئبق $HgCl_2$    |
| 2.34                     | 10                     |                           |
| 84.54                    | 5                      | كلوريد النحاس $CuCl_2$    |
| 50.99                    | 10                     |                           |
| 100                      | 5                      | كلوريد الكالسيوم          |
| 111                      | 10                     |                           |
| 55.03                    | 5                      | كلوريد الخارصين $ZnCl_2$  |
| 28.68                    | 10                     |                           |
| 98                       | 5                      | كبريتات المنغنيز $MnSO_4$ |

|     |    |                       |
|-----|----|-----------------------|
| 102 | 10 |                       |
| 100 | 5  | كلوريد الصوديوم NaCl  |
| 105 | 10 |                       |
| 100 | 5  | كلوريد البوتاسيوم KCl |
| 103 | 10 |                       |

#### 2-6-5-4: تأثير المواد المثبطة في فعالية انزيم SOD

درس تأثير بعض المركبات الكيميائية المثبطة في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla* وذلك بحضن الانزيم مع تلك المواد بدرجة حرارة 25 °م ولمدة 30 دقيقة .

من النتائج في الجدول (4-4) احتفظ الانزيم 10 و 4 % من فعاليته بعد معاملته بمادة EDTA بتركيز 5 و 10 ملي مولار على التوالي عند حضنه بدرجة حرارة 25 °م لمدة 30 دقيقة . اذ تعد هذه المادة من المواد المخليبية (chelating agent) التي تعمل على سحب ايونات المعادن ثنائية التكافؤ الموجودة في الموقع الفعال للانزيم؛ مما يؤكد انتماء هذا الانزيم الى مجموعة الانزيمات المعدنية (Metalloenzymes) (Battistoni *et al.*, 1998). وفي دراسة قام بها McCord و Fridovich (1969) حول تأثير مركب EDTA في فعالية انزيم الـ SOD لوحظ فقدان حوالي 85% من الفعالية عند حضن الانزيم مع 1 ملي مولار من مركب الـ EDTA . ففي دراسة اخرى حول تأثير EDTA في فعالية أنزيم Cu/Zn SOD المستخلص من الحنطة بتركيز 5 ملي مولار لوحظ فقدان كبير في فعالية الانزيم اذ قدرت الفعالية المتبقية للانزيم 11 % (Casano *et al.*, 1997) .

كما درس تأثير SDS في فعالية الانزيم اذ لوحظ انخفاض كبير في فعالية الانزيم الى 11 و 7 % عند التراكيز 5 و 10 ملي مولار على التوالي . اذ اكدت العديد من الدراسات التأثير المثبط لوجود هذه المادة في انزيم MnSOD ( Fridovich, 1974b; Colowick and Kaplan, 1984; )

Radix ( Roberts and Hirts, 1996). ففي دراسة لأنزيم Cu/ZnSOD المنقى من بذور *lethosporum* فقد الانزيم تقريبا 18 و 34% من فعاليته بأستخدام 2 ملي مولار من EDTA و SDS على التوالي (Haddad and Yuan,2005). كما ثبت الانزيم المنقى من جذور *Stemona tuberosa* Roxb. تماما عند استخدام 0.5 ملي مولار SDS ( Niyomploy et al.,2014 ).

كما درس ايضا تأثير الصوديوم ازايد  $\text{NaN}_3$  في فعالية انزيم SOD حيث احتفظ الانزيم 32 و 21 % من فعاليته عند تركيز 5 و 10 ملي مولار على التوالي . ففي دراسة لأنزيم Cu/ZnSOD المنقى من نبات *Pennisetum glaucum* وجد ان الانزيم لم يثبط باستخدام الازايد بتركيز 10 ملي مولار ولكن ثبت بأستخدام  $\text{H}_2\text{O}_2$  بتركيز 4.3 ملي مولار ( Mahanty et al.,2012 ).

ففي دراسة اخرى لصفات Cu/Zn SOD في *Sonneratia alba* لوحظ فقدان بشكل كبير لفعالية الانزيم بوجود SDS ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  , Phenol و  $\beta$ -mercaptoethanol كما احتفظ الانزيم 90 % من فعاليته بوجود (DMSO) Dimethyl sulphoxide , Chloroform و Glycerol (Yang et al., 2016).

درس ايضا تأثير KCN و  $\text{H}_2\text{O}_2$  في فعالية انزيم SOD وذلك بحضن الانزيم مع هذه المواد بتركيز نهائية ( 5 و 10 ) ملي مولار بدرجة حرارة 25 م° ولمدة 30 دقيقة ، لوحظ احتفاظ الانزيم بكامل فعاليته مما يدل على ان الانزيم المنقى من *T. aphylla* هو MnSOD وجاءت هذه النتائج متوافقه مع ما ذكره Lai وجماعته (2008) مقاومة الانزيم لكل من KCN و  $\text{H}_2\text{O}_2$ . كما واتفقت ايضا مع Que وجماعته (2012) عدم تثبيط الانزيم بأستخدام 5 ملي مولر من  $\text{H}_2\text{O}_2$  و 3 ملي مولار KCN في نبات قصب السكر مما يدل على ان الانزيم هو MnSOD . ففي دراسة اخرى لأنزيم Cu/ZnSOD المنقى من اوراق *Jatropha curcas* اظهر ان فعالية الانزيم تقل بزيادة تراكيز كل من Imidazole ،  $\text{H}_2\text{O}_2$  و EDTA (Ou-Yang et al.,2013).

بينت الدراسات ان استخدام KCN بتركيز 2ملي مولار يسبب تثبيطاً بنسبة 94% في فعالية انزيم Cu/Zn SOD (Colowick and Kaplan, 1984)، في حين لا تؤثر هذه المادة في FeSOD وMnSOD (Roberts and Hirts, 1996)، فضلاً عن ذلك ان التثبيط بالـ  $\text{H}_2\text{O}_2$  يكون متخصصاً

للنوع FeSOD فضلاً عن تثبيطه للـ Cu/Zn SOD وعدم تأثيره في MnSOD Roberts and (Hirts, 1996; Lefebre and Valvano, 2001).

الجدول (4-4) تأثير المواد المثبطة في فعالية انزيم SOD المنقى من اوراق الطرفة *T. aphylla*

| الفعالية المتبقية (%) | التركيز | المادة                        |
|-----------------------|---------|-------------------------------|
| 100                   | —       | معامل السيطرة                 |
| 100                   | 5       | سيانيد البوتاسيوم KCN         |
| 95                    | 10      |                               |
| 100                   | 5       | بيروكسيد الهيدروجين           |
| 99                    | 10      | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

|    |    |                             |
|----|----|-----------------------------|
| 32 | 5  | صوديوم ازايد $\text{NaN}_3$ |
| 21 | 10 |                             |
| 11 | 5  | SDS                         |
| 7  | 10 |                             |
| 10 | 5  | EDTA                        |
| 4  | 10 |                             |

## 5 : الاستنتاجات والتوصيات

### 1-5 : الاستنتاجات Conclusions

- ١ . اثبتت الدراسة ان نبات الطرفة *T. aphylla* مصدر كفوء لأنتاج انزيم السوبراوكسايد دسميونيز.
- ٢ . اثبتت الدراسة ان تحديد الظروف المثلى في الاستخلاص عامل مهم للحصول على انزيم عالي النقاوة .
- ٣ . تبين ان اختيار طرق تقنية لتنقية الانزيمات ضرورية وبسيطة للحصول على درجة عالية من النقاوة مثل التبادل الايوني والترشيح الهلامي .
- ٤ . بلغت قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثباتية الانزيم 7.5 و (8-7) على التوالي.

٥. درجة الحرارة المثلى لفعالية وثباتية الانزيم هي 50 °م و (20-50) °م على التوالي .
٦. اختلاف تأثير المواد المثبطة لفعالية الانزيم باختلاف تراكيزها المستخدمة .
٧. اتضح من خلال الدراسة انتماء الانزيم قيد الدراسة الى الانزيمات المعدنية وذلك لتنشيط فعاليته باستخدام مادة EDTA .
٨. بلغت قيمة طاقة التنشيط لانزيم SOD 7312 سعرة / مول .
٩. بينت الدراسة ان قيمة ثابت ميكالس ( $K_m$ ) والسرعة القصوى ( $V_{max}$ ) للانزيم 0.133 ملي مولار و 54.94 ملي مولار / دقيقة على التوالي .
١٠. تبين ان الانزيم قيد الدراسة يعود الى مجموعة الانزيمات المعدنية من نوع MnSOD وذو وزن جزيئي 89.125 كيلو دالتون مقاسة بطريقة الترشيح الهلامي و 85.703 كيلو دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي .

## 2-5 : التوصيات Recommendations

١. اجراء دراسة تفصيلية للتعرف على الانزيمات والبروتينات ذات الفعالية البيولوجية الاخرى التي تحتويها اوراق الطرفة *T. aphylla* لما لها من فوائد جمة في المجالات الطبية .
٢. القيام بدراسة جزيئية للتحري عن مواقع الجينات المسؤولة عن انتاج انزيم SOD ومحاولة تطوير عملية انتاجه بالسيطرة على الجينات المنظمة .
٣. محاولة تقييد الانزيم واستخدامه في التطبيقات الطبية .

## المصادر العربية :

الداودي ، علي حسن (1990) . الكيمياء الحيوية المتقدمة ، دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة بغداد ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

الكاتب، يوسف (2000) . تصنيف النباتات البذرية . دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المظفر، سامي عبد المهدي (١٩٩٠). الكيمياء الحياتية ، الطبعة الثانية. الانزيمات، الطاقة ، طرق كيميائية حيوية، العمليات الحياتية للكربوهيدرات. الطبعة الثانية، كلية العلوم. جامعة بغداد ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

دلالي ، باسل كامل . (1982) . الانزيمات في التصنيع الغذائي ، دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

### المصادر الاجنبية :

**Abdalah, E. M. and El-Ghazali, G. E. (2013).** Screening for antimicrobial activity of some plants from Saudi folk medicine. *Global J. Res. Med. Plant and Indigen. Med.*, 2: 189-197.

**Abedi, T. and Pakniyat, H. (2010).** Antioxidant enzyme change in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech . J. Genet. Plant Breed.*, 46(1): 27-34.

**Achakzai, A. K. K.; Achakzai, P.; Masood, A.; Kayani, S. A. and Tareen R. B.(2009).** Response of plant parts and age on the



distribution of secondary metabolites on plant pound in Quetta, Pak. J. Bot.,41(5): 2129-2135 .

**Adnan, M.; Tariq, A.; Bibi, R.; Abdelsalam, N. M.; Rehman, H.; Murad, W.; Ahmad, S.; Israr, M.; Sabahat, S.; Ullah, R.; Ud Din, J. and AbdulAziz, M. (2015).** Antimicrobial potential of alkaloids and flafonoids extracted from *tamarix aphylla* leaves against commonhuman pathogenic bacteria. Afr. J. Tradit. Compl .Altern. Med. 12(2): 27-31.

**Ali, B.; Deng, X.; Hu, X.; Gill, R. A.; Ali, S.; Wang, S. and Zhou, W.(2015).** Deterio active effects of cadmium stress an antioxidant system and cellular structure in germination seeds of *Brassica napus* L. J. Agric. Sci. Tech., 17: 63-74.

**Almansa, M. S.; Del Rio, L. A. and Sevilla, F.(1994).** Characterization of an iron- superoxide dismutase from a high plant, *Citrus limonum*. Physiologia Plantarum., 90(2): 339-347.

**AL-Omary, M. A.; Beedham, C. and Alsarra, I. A.(2004).** Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms .Saudi Pharma. J., 12: 1-18.

**Alscher, R. G.; Erturk, N. and Heath, L. S. ( 2002):** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. exp. Bot., 53: 1331-1341.

**Ames, B. N.; Shigenaga ,M. K. and Hagen, T. M. (1993) .** Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 7915-7922 .

**Asada, K. (2006).** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiol., 141: 391-396.

**Asada, K.; Urano, M. and Takahashi, M. (1973).** Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. *Europ. J. Biochem.*, 36(1): 257-266.

**Asthir, B.; Koundal, A. and Bains, N. S.(2011).** Kinetics properties of wall Bound superoxide dismutase in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) following stripe rust (*Puccinia striiformis*) infection. *J. Biochem. Biophysic.*, 48: 341-345.

**Auribie, M. A. (2011).** Antioxidant activity of tannin from *Tamarix aphylla* leaves. *Basra. J. Agric. Sci.*, 24:1-10.

**Backer, W. N .and Deamer, D. W. (1991).** *The World of the cell.* 2nd. Ed. p.298. The Benjamin/Cummingsn Publishing company, Inc, California.

**Bafana, A.; Dutt, S.; Kumar, S. and Ahuja, O. S. (2011).** Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit. Rev. Biotech.*, 31: 65–76.

**Babitha, M.P.; Prakash, H. S. and Shekar- Shetty, H .(2002).** Purification and partial characterization of manganese superoxide dismutase from downy mildew resistant pearl millet seedlings inoculated with *Sclerospora graminicola*. *Plant Sci.*, 63, 917-924.

**Bakardjieva, N. T.; Cristov, K. N. and Cristova, N. V.(2000).** Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase. *Biol .Plant.* ,43, 73-78.

**Bannister, W. H.; Bannister, J. V.; Barra, D.; Bond, J. and Bossa, F. (1991)** .Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Res. commun.*, 12: 349-361.

- Bardo, D.; Djinoovic, K. and Bolognesi, M. (1994).** Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J. Mole. Biol.*, 238: 366-386 .
- Barkat, H. H. and Nada, S. A. (1996).** Chemical and biological Constituents investigation of phenolics of two Egyptian folk medicinal plant- A novel phenolic galls of *Tamarix aphylla*, *Nat. Prod.*, 2:96-101.
- Barriere, C.; Bruckner, R. and Talon, R. (2001).** Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9): 4096-4104.
- Barro, D.; Schinina, M. E.; Bossa, F.; Puget, K. and Durosay, P. (1990).** A tetrameric iron superoxide dismutase from eucaryote *Tetrachymena pyridornis* .*J. Biol. Chem.*, 265: 17680-17687 .
- Battistoni, A.; Folcarelli, S.; Cervoni, L.; Polizio, F.; Desideri, A.; Giartosio, A. and Rotilio, G. (1998).** Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 273(10):5655-5661.
- Beaman, B. L.; Scates, S. M.; Moring, S. E.; Deem, R. and Misra, H. P. (1983).** Purification and properties of a unique superoxide dismutase from *Nocardia asteroides*. *J. Biol. Chem.* 258(1): 91-96.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971).** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochem.*, 44: 276-287.
- Bergmeyer, (1974):** Enzymes as Biochemical Reagents (Peroxidase) methods of enzymatic analysis (Volum1) Academic Press, Inc . New York and London, p: 494-495.
- Berrett, A. J.(1977).** proteinases in Mammals Cells and Tissues North – Hall and Publishing Company Amsterdam , New York, Oxford.

**Beyer, W. F.; JR. and Fridovich, I. (1987).** Assaying for superoxide dismutase activity: Some Large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochem.*,161: 559-566.

**Beyer, W. F.; Jr., Reynolds, J. A. and Fridovich, I. (1989).** Differences between the manganese –and the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli* detected through sedimentation equilibrium, hydrodynamic, and spectroscopic studies. *Biochem.*, 28(10): 4403-4409.

**Borsani, O.; Diaz, P.; Agius, M. F.; Valpuesta, V. J. and Monza, J.(2001).** Water stress generators an oxidative stress through the Bound superoxide dismutase in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) following stripe rust (*Puccinia striiformis*) infection. *J. Biochem. Biophysics.*, 48: 341-345.

**Bowler, C.; Montagu, M. V. and Inze, D. (1992) .** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 43: 83-116.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein. Dye binding. *Analytical Biochem.*, 72: 248-254.

**Bienert, G. P.; Schjoerring, J. K. and Jahn, T. P. (2006).** Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophysica. Acta.*, 1758: 994-1003.

**Bosabalidis, A. M.(1992).** A morphological approach to the question of salt glands life-time in leaves of *Tamarix aphylla* L. . *Isr. J. Bot* .,41: 115-121.

**Bueno, P. and Del Rio, L. A.(1992).** Purification and properties of glycoxysomal cuprozinc superoxide dismutase from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Plant Physiol.*,98: 331-336.

**Bueno, P.; Varela, J.; Gimenez-Gallego, G. and Del Rio, L. A. (1995).** Peroxisomal copper,zinc superoxide dismutase-characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledon . *plant Physiol.*, 108: 1151- 1160.

**Bull, C.; Niederhoffer, E. C.; Yoshida, T. and J. A.(1991).** Kinetic studies of superoxide dismutase properties of the manganese contain protein from *Thermus thermophiles* . *J. Am. Soc.*,113: 4069-4076.

**Carlioz, A. and Touati, D.(1986).** Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life. *EMBO. J.* 5: 623-630.

**Carter, C. and Thornburg, R. W.(2000).** Purification and characterization as a germin-like manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues. *J. Biol. Chem.*, 275(47): 36726-36733.

**Carrico, R. J.; and Deutsch, H. F. (1970).** Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology. J. Biol. Chem.*, 41:35-97.

**Cassano, L. M.; Gomez, L. D.; Lascano, H. R.; Gonzalez, C. A. and Trippi, V. S.(1997).** Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Cell Physiol.*, 38(4): 433-440.

**Campana, F.; Zervoudis, S.; Perdereau, B.; Gez, E.; Fourquet, A.; Badiu, C.; Tsakiris, G. and Koulaloglou, S. (2004).** Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis. *J. Cell. Mole. Med.*, 8: 109-116.

**Chaplin, M. and Chri (2004).** Enzyme technology. <http://www.sbu.ae>.

- Chaudhary, A. N.; Chandand .B. S. and Kaur, C. N.(2013).** Kinetic and biochemical parameters of thermostable superoxide dismutase isolate from (*Ribes nigrum*) : Afunctional food Int. J. Bio .Sci., 12(2): 2251-31.
- Chen, B.; Chen, L.; Gao, L. J.; Xiao, R.; Liu, P. L.; Chen, B. L.; Zhang, Y. X. and Yao, J.(2011).** Purification and characterization of superoxide dismutase from Agave hybrid No-11648. J. Chin-Chem. Soc., 59(1): 113-122.
- Chesworth, J. M.; Stuchbury, T. and Scaife, J.R. (1998).** An Introduction to Agricultural Biochemistry. Chapman & Hall, London.
- Choudhary, R. and Saroha, A. E.(2012).** Effects of abscisic acid and hydrogen peroxide on antioxidant enzyme in *Syzygium cumini* plant. J. Food. Sci. Technol., 49(5): 649-652.
- Chorianopoulon, S. N.; Giamouroglou, M. and Bouranis, D. L.(2012)** Different early fluctuations in superoxide dismutase and catalase activities are included in the response of young maize . American J. Plant Sci., 3: 338-345.
- Christianson, D. (1997).** Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. Prog. Biophys. Molec. Biol. 67: 217-252.
- Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (1984).** Oxygen radicals in biological systems. Methods In Enzymology. (Ed. By Packer, L. and Board, A).V.105. Academic Press. Inc.London .
- Corpas, F. J.; Fernandez-Ocana, A.; Carreras, A.; Valderrama, R.; Luque, F.; Esteban, F. J.; Rodriguez-Serrano, M.; Chaki, M.; Pedrajas, J. R.; Sadaio, L. M.; Del Rio, L. A. and Barroso, J. B.(2006).** The expression of different superoxide dismutase forms in cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. Plant Cell Phsiol., 47(7): 94-994.

**Costa, H.; Gallego, S. M. and Tomaro, M. L.(2002). Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in Sunflower cotyledons . Plant Sci.,162: 939-945.**

**Dalton,D. A.(1995) . Antioxidant defenses of plant and fungi. In S. Ahmad (Ed). Oxidative stress and antioxidant defenses in biology (pp.298-342). Chapman and Hall: USA.**

**Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranova´, E.; Van Montagu, M. and Inze, D.(2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life. Sci. 57: 779-795.**

**Declerck, N.; Machius, M.; Wiegand, G.; Huber, R. and Gaillardin, C. (2000). Probing structural determination specifying high thermostability in Bacillus licheniformis alpha-amylas. J. Mol. Biol. 301: 1041- 1057.**

(Cited by Ali, H. M.(2006). Improvement of local isolate of Bacillus sp. For production of a thermostable alpha- amylase. M. Sci. Thesis, Biotechnology, University of Baghdad. Iraq).

**Del Rio, L. A.; Sandalio, L. M.; Altomare, D. A. and Zilinskas, B. A.(2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: different expression during leaf senescence. J. Experment. Botany., 154 (384) : 932-933.**

**Del Rio, L. A.; Sandalio, L. M.; Corpas, F. J and Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiol., 141:330–335.**

**Del Rio , L. A.; Sandalio, L. M.; Yanez, J. and Gomes, M.(1985). Induction of a manganese- containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum***

*sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese . J. Inorganic. Biochem., 24: 25-34 .

**Ehsani-Moghaddam, B.; Charles, M. T.; Carisse, O. and Khanizadeh, S.(2008).** Regulation of superoxide dismutase isoforms in resistant and susceptible strawberry cultivars subjected to leaf spot disease. Archives of Phytopathol and Plant Protection. 41(7):492-500.

**El-Ansari, M. A.; Nawaar, M. A.; El-Dein, A. and El-Sherbeiny, A. E. I.(1976).** A sulphat keampferol 7,4-dimethyl ether and quercetin quercetin isoferulyl glucuronide from the flowers of *Tamarix aphylla*. Photochem., 15: 231-232.

**Elstner, E. F. (1991).** Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*, pp. 13-25. Pell EJ, Steffen KL, eds. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.

**Fattman, C. L.; Enghild, J. J.; Crapo, J. D. and Schaefer, L. M. (2000).** Purification and characterization of extracellular superoxide dismutase in mouse lung. Biochem. Biophysic. Res. commun., 275 (2): 542-548.

**Fink, R. C. and Scandalios, J. G.(2002).** Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys. 399: 19-36.

**Forman, H. J. and Fridovich, I. (1973).** Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. Arch. Biochem. Biophysics. 158: 396-400.



**Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003).** Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plantarum.* 119: 355-364.

**Fridovich, I. (1974a).** Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology.* 41:35-96

**Fridovich, I. (1974b).** Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology.* 58:61-97.

**Fridovich, I. (1978).** The Biology of Oxygen radicals. *Science.* 201: 875-880.

**Ghosh, M.; Sahani, S. J. and Pulicherla, K. K.(2011).** Evaluating the Antioxidant activities in the leaf extract of a medicinal plant, *Abtilon Indicum* (Linn). sweet .*International J. Sci. Nature* ., 2(3): 602-606.

**Gratao, P. L.; Gomes-Junior, R. A.; Delite, F. S.; Lea, P. J.and Azevedo, R. A.(2006).** Antioxidants stress responses of plants to cadmium. In N. A. Khan and Samiullah(Eds.), *Cadmium toxicity and tolerance in plant* . pp.1-34. Alpha Science International Ltd: Oxford.

**Gupta, A. S.; Webb, R. P.; Holaday, S. and Allen, R. P.(1993).** Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.*, 103: 1067-1073.

**Gupta, P. K. (1998).** Elements of Biotechnology. First edition. INDIA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria, *FEBS Lett.*, 18: 261-264.

**Haddad, N. I. A. and Yuan, Q.(2005).** Purification and some properties of Cu, Zn superoxide dismutase from *Radix lethospermi* seed, kind of chinese traditional medicine. *J. Chromatography B.*, 818(2): 123-131.

**Hadji, J.; Marzouk, M. N.; Ferraro, D.; Fasano, E.; Majdoub, H. and Limam, F.(2007).** Purification and characterization of a Cu,Zn SOD

from garlic (*Allium sativum* L.) antioxidant effect on tumeral cell lines. Appl. Biochem. Biotechnol.,143(2): 129-41.

**Halliwell, B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant. Physiol., 141: 312–322.

**Henzler, T. and Steudle, E. (2000).** Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across waterchannels. J. Exp. Bot., 51: 2053–2066.

**Hintze, K. J. and Theil, E. C. (2006).** Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. Cell. Mol. Life. Sci., 63:591–600.

**Iae-Hong, H. E. X., In, W. V. M. and Shan-yu, L. I. (2005).** Purification and characterization of superoxide dismutase (SOD) from camellia pollen. 21(5): 558-561.

**Inaoka, T.; Matsumura, Y. and Tsuchido, T. (1998).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the superoxide dismutase gene and characterization of its product from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 180(14): 3697-3703.

**Iqbal, H. B.; Khattak, S.; Ayaz, A.; Rehman, M.; Ishfaq, M.; Abbas, M.S.; Malik, A.; Wahab, I. and Mehsud, S. (2013).** Pollution study of metals in medicinal plant *Aleo vera* and *Tamarix aphylla*. J. Appl. Pharm. Sci., 3: 054-050.

**Iqbal, H.; Khallak, B.; Ayaz, S.; Rehman, A.; Ishfaq, M.; Abbas, M. N.; Rechman, H.; Waheed, S. and Wahab, A.(2012).** Comparative efficacy of *Aloe vera* and *Tamarix aphylla* against Cutaneous Leishmaniasis, Int. J. Basic. Med. Sci. Pharm.,2: 42-45.

**Janulczyk, R.; Ricci, S. and Bjorck, L. (2003).** MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*. 71(5): 2656-2664.

**Janson, J.-C. and Ryden, L. (1998).** Protein purification principles, high-resolution methods, and application. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc, pp. 695.

**Jevremovic, S.; Petric, M.; Zivkovic, S.; Trifunovic, M. and Subotic, A. (2010).** Superoxide dismutase activity and enzyme profiles in bulbs of snakes head Fritillary in response to cold treatment. *Arch. Bio. Sci.*, Belgrad, 62(3): 553-558.

**Karlsson, M.; Melzer, M.; Prokhorenko, I.; Johansson, T. and Wingsle, G. (2005).** Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in *Zinnia elegans*. *J. Exp. Bot.*, 56: 2085-2093.

**Karpinska, B.; Karlsson, M.; Schinkel, H.; Steller, S.; Karl-Heinzsuss, S.; Melzer, M. and Wingsle, G.(2001).** A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants, expression, regulation and protein localization. *American Society of Plant Biologist.*, 126: 1668-1676.

**Karpinska, B.; Karlsson, M.; Srivastava, M.; Stenberg, A.; Schrader, J.; Sterky, F.; Bhalerao, R. and Wingsle G.(2004).** MYB transcription factors are differentially expression and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen. *Plant. Mol Biol.* 56: 255-270.

**Kasai, T.; Suzuki, T.; Ogawa, K. O. K.; Inagaki, Y.; Ichinose, Y.; Toyoda, K. and Shiraishi, T.(2006).** Pea extracellular Cu/Zn-superoxide

dismutase responsive to signal molecules from a fungal pathogen. *J. Gen. Plant. Pathol.*, 27: 265-272.

**Keele, B. B.; JR.; McCord, J. M. and Fridovich, I. (1970).** Superoxide dismutase from *Escherichia Coli* B. *J. Biol Chem.*, 245(22): 6176-6181.

**Kehrer, J. P. (2000).** The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43–50.

**Kim, E. J.; Kim, H. P.; Hah, Y. C. and Roe, J. H. (1996).** Differential expression of superoxide dismutase containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicor*. *European Journal of Biochemistry.*, 241: 178-185.

**Kim, H. J.; Kato, N.; Kim, S. and Triplett, B.(2008).** Cu/Zn superoxide dismutase in developing cotton fibers: evidence for an extracellular form. *Planta.*, 228: 281-2.

**Kochhar, S. and Kochhar, V. K.(2008).** Identification and characterization of a super-stable Cu-Zn SOD from leaves of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Planta.*, 228(2): 307-318.

**Koppenol, W.; Levine, F.; Hatmaker, T. and Rush, J. (1986).** Catalysis of superoxide dismutation by manganese aminopoly carboxylate complexes. *Archive Biochemistry Biophysics.*, 251: 594-599.

**Kroniger, W.; Rennenberg, H. and Polle, A.(1992).** Purification of two sueroxide dismutase isozymes and their subcellular localization in Needles and Roots of Norway Spruce (*Picea albies* L.) Trees. *Plant Physiol.*, 100: 334-340.

**Kotapati, K. V.; Palaka, B. K.; Kandukuri, A.; Pamuru, R. R. and Ampasala, D. R. (2014).** Response of antioxidative enzymes to drought

stress in finger Millet leaves ( *Eleusine coracana* L.) GAERTN.  
International Journal of Plant and Ieuviromatal Science.,4 (3): 2231-4490.

**Kumagai, Y.; Shinyashiki, M.; Sun, G. F.; Shimojo, N. and Sagai, M. (1994).** An efficient method for purification of cuprozinc superoxide dismutase from bovine erythrocytes. *Experientia.*, 50: 673-676.

**Kumar, S. and Malhotra, S. P.(2008).** Partial purification of superoxide dismutase and peroxidase from ber (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) fruit using anion exchange chromatography. *Physiol. Mole. Biol. Plant.*, 14(3): 167-172.

**Kumar, S.; Dhillon, S.; Singh, D. and Singh, R. (2004).** Partial purification and characterization of superoxide dismutase (SOD) from tomato fruit. *J. Food Sci. Nutr.*, 9: 283-288.

**Laas, T. (1998).** Electrophoresis in Gels. In: *Protein Purification* (ed by Wiley, Llis). A John Wiley and sons, Inc, publication.

**Lai, LS.; Chang, PC. And Chang, CT.(2008).** Isolation and characterization of superoxide dismutase from wheat seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.*, 56(17): 8121-8129.

**Larson, R. A. (1988) .** The antioxidants of higher plants. *Phytochem.*, 27: 969-978.

**Li, H. Y.; Zhao, Y.; Cao, Y.; Wang, W. E. and Zhao, D. O.(2010).** Purification and characterization of superoxide dismutase from *Panax ginseng* . *Biomedical Chromatography.*,24(11): 1203-1207.

**Li, W. X.; Zang, M. and Wang, S. J.(2008).** Effect of three-stage hypobaric storage on membrane lipid peroxidation and activities of defense enzyme in green asparagus . *LWT. Food Sci. Technol.*, 41: 2175-2181.

- Lin, C. T.; Lee, T. L.; Duan, K. J. and Su, J. C. (2001).** Purification and characterization of black porgy muscle Cu/Zn superoxide dismutase. *Zoological Studies*. 40(2): 84-90.
- Liu, J.; Yin, M.; Zhu, H.; Lu, J. and Cui, Z. (2011).** Purification and characterization of a hyperthermostable Mn superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*. 15: 221-226.
- Liu, N.; Liu, W.; Wang, D.; Zhou, Y.; Lin, X.; Wang, X. and Li, S.(2013).** Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower bud of (*Lonicera japonica*) Thunb. *Food Chemistry*., 138: 478-483.
- Lih-Shiuh, L.; Pi-Chen, Ch. and Chen-Tien, Ch.(2008).** *J. Agric. Food Chem.*, 56: 8121-8129.
- Lopez-Millan, A. F.; Ellis, D. R. and Grusak, M. A. (2005).** Effects of Zinc and Manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and rzn mutant plant. *Plant Sci.*, 168: 1015-1022.
- Ludwig, M.; Metzger, A.; Patridge, K. and Stallings, W. (1991).** Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model and refined at 1.8 Å resolution. *J. Mole. Biol.*, 219: 335-358.
- Magnani L, Gaydou, M. and Jean, C. H. (2000)** Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion, *Anal. Chim. Acta.*, 411(1-2) 1: 209-216.
- Mahanty, S.; Kaul, T.; Pandey, P.; Reddy, R. A.; Mallikarjuna, G.; Reddy, C. H.; Sopory, S. K. and Reddy, M. K. (2012).** Biochemical and molecular analysis of copper-zinc superoxide dismutase from a C<sub>4</sub> plant *Pennisetum glaucum* reveals an adaptive role in response to oxidative

stress. International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology., 505(2): 309-317.

**Marikovsky, M.; Ziv, V.; Nevo, N.; Harris-cerruti, C. and Mahler, O. (2003).** Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. The Journal of Immunology., 170: 2993-3001.

**Marklund, S. and Marklund, G. (1974).** Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Europ. J. Biochem., 47: 469-474.

**Mann, T. and Keilin, D. (1939).** Proc. Roy. Soc. (London), B126,303. Cited by Fridovich, I. (1974a). Superoxide dismutase. Advanced Enzymology. 41:35-97.

**McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969).** Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). J. Bio. Chem., 244(22): 6049-6055.

**McCord, J. M and Fridovich, I. (1988).** Superoxide dismutase: the first twenty years(1968-1988). Free. Radic. Biol. Med. 5(5-6): 363-369.

**McCord, J. M.; Keele, B. B.; Jr. and Fridovich, I. (1971).** An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proc. Natl .Acad. Sci .U. S. A., 68: 1024-1027.

**Merfort, I.; Buddrus, J.; Nawwar, M. A. M. and Lambbert, J. (1992).** A tri-terpene from The bark of *Tamarix aphylla* . photochem.,31:4031-4032.

**Meshram, A. and Srivastava, N.(2016).** Phytochemical screening and vitro *metabolism*, pp. 13-25. Pell EJ, Steffen KL, eds. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologist.

**Miller, A. F. (2001).** Fe superoxide dismutase. Handbook of Metalloproteins. (Ed. By Messerschmidt, A, Huber, R. Poulos, T. and Weighardt, K.) John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, U.S.A., P. 668-670.

**Miller, A. F.(2012).**Superoxide dismutase: ancient enzymes and new insight FEBS Lett., 585-595.

**Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972).** The role of superoxide dismutase anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 247(10): 3170-3175.

**Miszalski, Z.; Slesak, I.; Niewiadomska, E.; Baczek-Kwinta, R.; Lottge, U. and Ratajczak, R.(1998).** Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C<sub>3</sub> -CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant Cell and Environment., 21: 169-179.

**Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M. and Breusegem, F.V. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Sci., 9 (10): 490-498.

**Moon-Ai, W.; Niyomploy, P.; Boonsombat, R.; Sangvanich, P. and Karnchanatat, A.(2012).** A superoxide dismutase purified from the rhizome of *Curcuma aeruginosa* Robx. As inhibitor in the microphage-like row 264.7 cell line. Appl. Biochem. Biotechnol., 166(8):2138-2155.

**Moon, H.; Lee, B.; Choi, G.; Shin, S. and Prasad, D. T.( 2003).** NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 100:358– 363.



- Moradian, F.; Modarresi, M. and Nematzadeh, G. A. (2014).** The study of superoxide dismutase activity in salt stress and identification of its gene from *Aeluropus littoralis*. International Conference on Agriculture. Enviroment. Biol. Sci., 14: 4-5.
- Moran, J. F.; James, E. K.; Rubio, M. C.; Sarath, G.; Klucas, R. V. and Becana, M.(2003).** Functional characterization and expression of cytosolic Iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. American Society of Plant Biologist., 133:773-782.
- Morgan, M. J., Lehmann, M., Schwarzlander, M. and Baxter, C. J. (2008).** Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. Plant physiol., 147 : 101-114.
- Morozkina, E. V.; Slutskaya, E. S.; Fedorova, T. V.; Tugay, T.; Golubev L. I. and Korolev, O.V. (2010)**. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (Review). Appl. Biochem. Microbiol., 46: 1– 14.
- Murao, K.; Takamiya, M.; Ono, K. and Takio, S. (2004).** Copper deficiency induced expression of Fe-superoxide dismutase gene in *Matteucci astruthiopteris*. Plant Physiol. Biochem., 42: 143-148.
- Murro, T.; Tominaga, Y. and Okada, S.(1984).** Agric. Biol. Chem., 48(5): 1223-1230.
- Munoz, and Ros-Barcelo.(1995).**Hand Book of Food analysis Vol 1 Marcel Dekker,Inc.New York.Basel .Hang Kong.
- Navrot, N.; Rouhier, N.; Gelhaye, E. and Jacquot, J.(2007).** Reactive oxygen species generation and antioxidant system in plant mitochondria. Physiologi Plantarum., 129: 185-195.

**Nawaar, M. A.; Hussein, S. A.; Ayoub, N. A.; Hofmann, K, Linscheid, M. H.; Arms, M and Lindequist, U.(2009).** Aphyllin, the first isoferulic acid glycoside and other phenolic from *Tamarix aphylla* L. flowers.

Pharmazie.,64: 342-347.

**Niyomploy, P.; Boonsambat, R.; Karnchanatal, A. and Sangvanich, B.(2014).** A superoxide dismutase purified from the roots of *stemona tuberosa*. Prep. Biochem. Biotechnol. 44(7): 663-679.

**Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998).** Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. Annual Review on Plant Physiol. Plant Mole. Biol., 49 (2): 249-279.

**Ogawa, K.; Kanematsu, S. and Asada, K.(1996).** Intra- and extra-cellular localization of Cytosolic Cu-Zn superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl .Plant Cell Physiol., 37: 790-799.

**Orwa, C.; Mutua, A.; Kindt, R.; Jamnadass, R. and Anthony, S., (2009).** Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.

**Oury, T. D.; Crapo, J. D.; Valnickova, Z. and Enghild, J. J. (1996).** Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide- linked dimers: a simplified, high- yield purification of extracellular superoxide dismutase. Biochem. J., 317: 51-57.

**Patamsyte, J.; Zvingila, D.; Labokas, J.; Baliuckas, V.; Kleizait, V.; Balciuniene, L. and Rancelis, V.(2004).** Assessment of diversity of wild Raspberries ( *Rubus idaeus* L.)in Lithuania . J. Fruit Ornament. Plant. Res., 12: 195-206.

**Park, D. H.; Sung-Yong, H.; Nam, H. G. and Park, J. M. (2002) .**

Expression of functional human-cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase in transgenic tobacco . *Biotechnol. Lett.*, 24: 681-686.

**Perez-Torres, E.; Garcia, A.; Dinamarca, J.; Alberdi, M.; Gutierrez, A.; Gidelkel, M.; Ivanova, A. G.; Huner, N. P. A.; Corcuera, L. J. and Bravo, L. (2004).** The role of photochemical quenching and antioxidants in photoproduction of *Deschampsia Antarctica*. *Functional Plant Biol.*, 31:731-741.

**Perry, J. J. P.; Shin, D. S.; Getzoff, E. D. and Tainer , J. A. (2010).** Structural biochemistry of superoxide dismutase . *Biochim . Biophys. Physiol.*,101: 7-12.

**Poyart, C.; Pellegrini, E.; Gaillot, O.; Boumaila, C.; Baptista, M. and Trieu- Cuot, P. (2001a).** Contribution of Mn- cofactored superoxide dismutase (sodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity.*, 69(8): 5098-5106.

**Prasad, M. N. V. (2004)** . Heavy metal stress in plant – from biomolecules to ecosystems (2 Ed). Springer: India.

**Proctor, P. and Reynolds, E. S. (1984).** Free radicals and disease in man. *Physiol. Chem. Physics. Med. NMR.*, 16: 175 – 195.

**Qin, X.; Zhang, M. and Wu, L. (2012).** Purification and characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp. *European Food Research and Technology.*, 235(6): 1049-1054.

**Qin, X.; Zhang, M.; Qin, J.; Yuan, S.; Hou, Y. and Liu, J.(2012).** Two-step purification of Cu/ Zn superoxide dismutase from (*Cucurbita moschata*) pulp. *Separation and Purification Technology* , 87:79- 83.

**Qu, C. P.; Xu, Z. R.; Lu, G. J.; Li, Y.; Wei, Z. G. and Liu, G. F. (2010) .**

Differential expression of copper –zinc superoxide dismutase gene of *Polygonum sibiricum* leaves, stems, and underground stems, subjected to high-salt stress .Int. J. Mol. Sci., 11: 5234-5245 .

**Que, Y.; Liu, J.; Guo, J. and Chen, R.(2012).** Molecular cloning and expression analysis of Manganese superoxide dismutase gene in sugarcane. Afri. J. Biotechnol., 11(3): 552-560.

**Qu-Yang, C.; Gao, S.; Cai, F.; Chung, T S. W.; Wang, SH. and Chen, F.(2013).** Cloning, expression, and purification of Cu,Zn superoxide dismutase from *Jatropha curcas*. Z. Nature Forsch., 68: 60-69.

**Ragusa, S.; Cambria, M. T.; Scarpa, M.; Dipaolo, M. L.; Falconi, M.; Rigo, A. and Cambria, A.(2001).** Properties of purified cytosolic isozymes 1 of Cu/Zn superoxide dismutase from *Nicotiana plumbaginifolia* leaves. Protien Expression and Purification., 23(2): 261-269.

**Rahman, M. M.; Islam, K. S. and Chongling, Y.(2010).** Effect of Chromium stress on antioxidative enzymes and malondialdehyde content activities in leaves and root of Mangrove seedling (*Kandelia cande* L.) . J. Forest. Sci., 26(3):171-179.

**Randhawa, N. and Kaur, J. (2015).** Antioxidant responses of Chickpea genotypes exposed to moisture. iJar., 3( 2): 950-955.

**Ravindranath, S. D. and Fridovich, I. (1975).** Isolation and characterization of a manganese -containing superoxide dismutase from yeast. J. Biol .Chem., 250(15): 6107-6112.

**Robert, K.; Murray, D. and Granner, K.(2000).** Enzymes: General properties arpers Biochemistry.

**Robert, B. and Hirts, R. (1996).** Identification and characterization of a superoxide dismutase and catalase from *Mycobacterium ulcerans*. Journal of Medical and Microbiology., 45: 383-387.

**Robson, C. A and Vanlerberghe, G. C. (2002).** Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. Plant Physiol., 129: 1908- 1920.

**Rodriguez-Serrano, M.; Romero-Puertas, M. C.; Pastori, G. M.; Corpas, F. J.; Sandalio, L. M.; Del Rio, L. A. and Palma, J. M.(2007).** Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad) cotyledons.

**Salin, M. L. and Bridges, S. M. (1980).** Isolation and characterization of an iron- containing superoxide dismutase from a eukaryote, *Brassica campestris*. Archives of Biochemistry and Biophysics., 201(2): 369-374.

**Schmander, H. P. (1997).** Peroxidase .Methods in Biotechnology .Taylor and Francis .London.

**Scopes, R. K. (1987).** Protein Purification, Principles and Practice 2nd ed  
Asco trade typesetting Ltd, Hong Kong.

**Scott, M. D.; Meshnickq, S. R. and Eaton, J. W. (1987).**Superoxide dismutase-rich bacteria: paradoxical increase in oxidant toxicity. J. Biol. Chem.,262(8): 3640-3645.

- Segel J. H.** (1976). Biochemical Calculation, 2<sup>nd</sup> edition, John and Sons .Inc. New York.
- Sfaxi, I. H.; Ferrano, D.; Fasano, E.; Pani, G.; Himam, F. and Marzouki, M. N.**(2009). Inhibitory effects of Manganese superoxide dismutase isolated from garlic (*Allium sativum* L.) on the vitro tumoral cell growth. Wily Interscience Biotechnol. Prog., 125(1): 257-264.
- Sgherri, C.; Navari-Izzo, F.; Pardossi, A.; Soressi, G.P. and Izzo, R.** (2007). The Influence of Diluted Seawater and Ripening Stage on the Content of Antioxidants in Fruits of Different Tomato Genotypes. Int. J. Agric. Food Chem., 55: 2452-2458.
- Sharma, S.; Bahuguna, S.; Kaur, N. and Chaudhary, N.**(2014). Biochemical aspects of superoxide dismutase isolate from *Amaranathus spinosus*: A therapeutically important plant. Int. J. Genetic Engineering . Biotechnol., 5(1): 35-42.
- Sheng, L.; Zheng, X.; Tong, H.; Liu, S.; Du, J. and Liu, Q.**(2004). Purification and characterization of cytosolic isozymes III of Cu/Zn superoxide dismutase from tobacco leaves. Plant Sci., 167(6): 1235-1241.
- Singh, S.; Singh, A. N.; Verma, A. and Dubey, V. K.**(2013). A novel superoxide dismutase from *Cicer cerietinum* L. seedlings: isolation, purification and characterization. Protein. Rept Lett., 20(7): 741-748.
- Slykhouse. T. O. and Fee, J. A.** (1976). Physical and chemical studies on bacterial superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 251(18): 5472-5477.
- Stell -Wagen, E.** (1990). Gel Filtration. In: Method in enzymology ed Deutscher, M. P.182:317-328. Academic Press, New York.
- Stoll, V. S. and Blanchard, J. S.** (1990). Buffers: Principles and practice P: stresses, Plant Cell Environ.

**Stroupe, M. E.; Didonata, M. and Tainer, J. A. (2001).** Manganese superoxide dismutase. Handbook of Metalloproteins. (Ed. By Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. and Wieghardt, k.). John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, USA. P. 941-948.

**Sueiter, C. H. (1985).** A practical guide to enzymology. Wiley Interscience Publication, New York.

**Sundaram, S. and Khanna, S. (2009).** Purification and characterization of thermostable monomeric chloroplastic Cu/ Zn superoxide dismutase from *Chenopodium murale*. Physiol. Mole. Biol. Plant., 15:199.

**Susaj, E.; Kallco, I.; Susaj, L. and Gixhari, B. (2013).** Effects of cold storage period on fruit antioxidants of three apple cultivars pre-treated with 2% CaCl<sub>2</sub> and 20°C hot-air treatment per 24 hours. 2249-9598.

**Terzi, R. and Kadioglu, S. (2006).** Drought stress tolerance and antioxidant enzyme system in *Ctenanthus setosa* (ROSC). ACTA Biologica CRACO Viensia Series Botanica., 48(2): 89-96.

**Ukeda, H. (2000).** Assay of enzyme superoxide dismutase. Dojindo Newsletter. Vol. 3.

**Ursby, T.; Adinolfi, B. S.; Al-Karadaghi, S.; De Vendittis, E. and Bocchini, V. (1999).** Iron superoxide dismutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Analysis of structure and thermostability. J. Mole. Biol., 286: 189-205.

**Van Breusegem, F.; Vranova, E.; Dat, J. F. and Inze, D. (2001).** The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant. Sci., 161:405-414.

**Van Camp, W.; Montago, M. V. and INZ, D. (1994).** Superoxide dismutase. In. C.H. vascular biology: implications in hypertension, Histochem .Cell Biol.

**Verma, S. and Dubey, R. S.(2003).** Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant. Sci., 164: 645-655.

**Vyas, D. and Kumar, S.(2005).** Purification and partial characterization of a low temperature responsive Mn-SOD from tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze). Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol,329(3): 831-838.

**Waisel, Y. (1960).** Ecological studies on *Tamarix aphylla* (L.) Kart . I. distribution and reproduction , Phytion (Argentina),15(1): 7-17.

**Wang, S.; Shao, B.; Liu, S.; Ye, X. and Rao. P.(2012).** Purification and characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from black soybean. Food Research International., 47(2): 374-379.

**Weisiger, R. A. and Fridovich, I. (1973).** Mitochondrial superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 248(13): 4793-4796.

**Whitaker, J. K. and Bernard, R. A. (1972).** Experiments for an Introduction to Enzymology. The Wiber Press. Davis, Calif.

**Whitaker. (1972).** Peroxidase Principles of enzymology for the Food Science Marcel Dekker, INC, New York.

**Willekens, H.; Chamnongpol, S.; Davey, M.; Schraudner, M. and Langebartels, C. (1997).** Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C-3 plants. EMBO .J., 16: 4806–4816.



- Wingsle, g.; Gardestrom, P.; Hallgren, J. E. and Karpinsk, S.(1991).** Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Needles. Plant Physiol., 95: 21-28.
- Wolfe-Simon, F.; Schofield, D .G . O. and Falkowski, P .G (2005).** The role and evolution Of superoxide dismutase in algae. J. Phycol.,41: 453-465.
- Wong, C. Y. (1995).** Effect of temperature preconditioning on Catalase, Peroxidase, and Superoxide dismutase in chilled zucchini squash. Postharvest Biology and Technology.,5: 67-76.
- Wu,T. H.; Liao, M. H.; Kuo, W. Y.; Huany, C. H.; Hsieh, H. L. and Jinn, T. L.(2011).** Characterization of Copper/Zinc and manganese superoxide dismutase in green bamboo (*Bambusa oldhamii*) cloning, expression and regulation. Plant Physiol . Biotechnol., 49(2): 195-200.
- Xu, J.; Yang, J.; Duan, X.; Jiang, Y. and Zhang, P.(2014).** Increased expression of native cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improves tolerance to oxidative and chilling stress in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). BMC Plant Biol., 14: 208-212.
- Yahhbyan, G.; Devens, I. and Gozmanova, M.(2005).** Determination of the Multiple isoforms of some antioxidant enzymes in *Haberlea rhodopensis* . from 19<sup>th</sup> title 21<sup>st</sup> . 226-230.
- Yang, E.; Yi, S.; Bai, F.; Niu, D.; Zhong, J.; Wu, Q.; Chen, S.; Zhou, R. and Wang, F. (2016).** Cloning, characterization and expression pattern analysis of a Cytosolic Copper/ Zinc superoxide dismutase (SaCSD1) in a highly salt tolerant Mangrove (*Sonneratia alba*). Int. J. Mol. Sci., 17(4): 5-12.

**Yost, F.J.; Jr. and Fridovich, I. (1973).** Journal of Biological Chemistry. 248: 4905-4908. Cited by Fridovich, I. (1974b). superoxide dismutase. Advances in Enzymology., 58: 61-88.

**Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. S. and Kang, S. O. (1996)**  
A novel nickel –containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. Biochem. J., 318: 889-896.

## Summary

The present study was conducted to investigate the superoxide dismutase (SOD) enzyme properties in some plant species collected, which included leaves each of the *Tamarix aphylla* L. (tamarisk), *Elaeagnus angustifoli* L. (buckthorn Persians), *Alhagi maurorum* (acol) and *Phragmites australis* L. (reeds) . The results indicated the highest superoxide dismutase specific activity concentrated in the crude extract of the leaves of *Tamarix aphylla*, reaching 24.98 unit / mg protein, and followed by buckthorn Persians 16.71 unit / mg protein , and acol 11.58 unit / mg protein , while the reed lowest specific activity 7.99 unit / mg protein. Then took the rest of the plant parts of the tamarisk, which included (flowers, fruits and seeds). The highest superoxide dismutase specific activity was flowers 17.53 unit / mg protein and followed by fruits 8.99 unit / mg protein, while the seeds lowest specific activity 5.66 unit / mg protein, using potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7.8 containing 0.1mM EDTA-Na<sub>2</sub> and 5% PVP, and pyrogallol as substrate . The study was amid to determine the optimum conditions for enzyme extraction, The results indicated that the optimum conditions of EDTA-Na<sub>2</sub>, PVP, extraction ratio, pH, buffer concentration, and the time extraction were 1mM , 2% , 1:3 , 7.8 ,0.1 M and 20 min respectively .

The superoxide dismutase extracted from *Tamarix aphylla* leaves was purified by several techniques, precipitation with ammonium sulfate (50 – 75)%, Ion exchange chromatography using DEAE-cellulose and two steps of gel

filtration on sephacryl S-200 column. The obtained purification fold and recovery were 7.94 and 22.57 % respectively. The purified enzyme revealed one band by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The results of superoxide dismutase characterization showed that the molecular weight was (89.125) Kilodalton by gel filtration using Sephacryl S-200 and (85.703) kilodaltons determined by SDS-PAGE electrophoresis. The optimal pH for enzyme activity was 7.5, while the optimal pH for enzyme stability was between (7 - 8). The optimal temperature for enzyme activity was 50 °C, The activation energy of conversion of substrate to product was about 7312 cal/mol, and the optimal temperature for enzyme stability was between (20-50)°C.

The effect of metals ions showed that the enzyme maintained full activity when incubated with the chloride of sodium, potassium and calcium at concentration 5 and 10 mM. The compounds (HgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, , FeSO<sub>4</sub>) showed inhibitory effect on enzyme activity at 5 and 10mM. While the enzyme maintained full activity by used MnSO<sub>4</sub>.

The chelating agents such as EDTA show inhibited effectiveness to enzyme activity at concentration 5,10 mM, remaining activity 10, 4% respectively, indicating this enzyme belong to metalloenzymes. The enzyme activity inhibited when the enzyme treated with Sodium dodecyl sulfate (SDS) at concentration 5,10 mM, the remaining activity 11%, 7% respectively. The obtained results showed that the activity of the enzyme decreased by incubating the enzyme with sodium azide (NaN<sub>3</sub>) as the remaining enzyme activity was 32%, 21% at concentrations 5, 10 mM respectively.

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> had no effect on enzyme activity, the enzyme maintained full activity when incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a concentration of 5 and 10 (v/v) mM

and with KCN at concentrations 5 and 10 mM and these results showed that the type of the enzyme is MnSOD.

Michalis constant  $k_m$  and maximum velocity  $V_{max}$  values were 0.133mM and 54.94 mM/min , respectively by using Pyrogallol as substrate .

Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education & Scientific Research  
AL-Qadisiyah University – College of Science  
Department of Biology



# Physio-Chemical Properties of Superoxide Dismutase Partially Purified From Leaves of *Tamarix aphylla* L.

BY;

Eman Salman Raheif

B.Sc. / Biology / College of Science / University

Of AL-Qadisiyah, 2012

A thesis

Submitted to the Council of the College of Science University of AL-  
Qadisiyah as partial fulfillment of the Requirements For the Degree of  
Master of Science in Biology / Botany

Supervised by;

A. Prof. Dr. Nazar Abdulameer Hamzah

2016 A.D

1438 A.H