مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية — جمادى الآخرة ١٤٠١
المجلد الرابع ـ العدد الاول من ٧١ الى ١٠٢ — نيسان ١٩٧١

الأغشية الخلوية للبكتريا وطرق تحضيرها أنزيمات الاغشية الخلوية

الدكتور ابراهيم جبور
كلية العلوم

سنتطرق في دراستنا هذه ، والتي ستكون مقدمة لدراسات اخرى الى القاء نظرة موجزة وأساسية عن بنية الاغشية الخلوية وأهميتها البنيوية والوظيفية ، عن الانزيمات الموجودة في هذه الاغشية ،وعن الطرق المستخدمة في زراعة البكتريا وتحضير الاغشية الخلوية .

كانت الاغشية البيولوجية ،منذ سنوات عديدة وما زالت ، هدفا لدراسات الباحثين البيوكيميائين سواء عند البكتريا أوالكائنات المتعددة الخلايا .

الغشاء البيولوجي (Membrane) عبارة عن تركيب (Structure) ثلاثي الابعاد يحيط بالخلية ويحتوى على البروتينات والفوسفوليبيدات والسكريات وسماكته تتراوح ما بين ٦٠ الى ١٥٠ أنغستروم .

أكثر الاغشية الخلوية المدروسة في الوقت الحاضر هي : أغشية المصورات الحيوية (Mitochondries) أغشية الـ Plastes- الاغشية البكترية ، وأغشية الكريات الحمر .

يفصل الغشاء الخلوى مابين محتوى الخلية والوسط الخارجي فهو يقاوم هروب الجزئيات الصغيرة الموجودة ضمن الخلية والضرورية لحياتها مثل : المواد المغذية ، الحموض الامّينية ،والحموض النووية . انه مركز النقل الفعال (Transport actif) للمواد الضرورية لتغذية الخلية ولطرح المواد السامة الناتجة عن عمليات الاستقلاب والتي لاتحتاج اليها الخلية . يحتوى الغشاء الخلوي أيضا على العناصر التي تسمح للخلية معرفة الوسط الخارجي وبالتالي التكيف معه . ان أنزيمات الاكسدة والارجاع التي تتدخل في عملية أكسدة الحموض الامّينية والحموض الدسمة والسكريات وفي نقل الالكترونات حتى الاكسجين توجد فقط في الاغشية الخلوية للمصورات الحيوية وللبكتريا .

تطرح الاغشية الخلوية مشاكل خاصة ناجمة عن تراكيبها المعقدة وبشكل خاص عند البكتريا سالبة الغرام (Gram - Negatives) حيث يشتمل الغشاء ، على طبقة خارجية (Paroi) ،طبقة

وسطى مكونة من (Peptidoglycane) ،ومن طبقة داخلية أوسيتوبلاسمية (1). تتميز الطبقة الخارجية باحتوائها على Lipopolysaccharides المرتبطة مع Peptidoglycane وبكونها محرومة من الحموض النووية والبروتينات ذات الوظائف الانزيمية باستثناء أنزيم الفوسفوليباز A ،يحتوى الغشاء الخارجي أيضا على نسب مرتفعة من السكريات الامينية التي تدخل في تركيب الـ Mureine . تكون نسبة الليبيدات أكبر بكثير في الطبقة الخارجية للبكتريا Gram-negatives منها في الطبقة الخارجية للبكتريا Gram - Positives .

تتميز الطبقة الداخلية أو الغشاء السيتوبلاسمي باحتوائها على الفوسفوليبيدات وبروتينات الأكسدة والارجاع مثل (الفلاثوبروتينات والسيتوكرومات). تكون هذه الطبقة على العكس من الطبقة الخارجية سهلة الاستخلاص بالمنظفات (Detergents) بنوعيها التأين وغير التأين.

من وجهة النظر الكيميائية ،فان الغشاء يكون موءلفا من البروتينات والدسم والسكريات المرتبطة مع البروتينات ، ليس من السهل أن ننسب الى أيٍ من هذه المكونات المذكورة أعلاه وظيفة بيولوجية محددة ومع ذلك فانه من الممكن أن نشير الى مايلي :

١- أهمية الليبيدات في وظيفة الـ Barriere de diffusion

٢- أهمية البروتينات في معرفة المواد الناقلة أو في عملية الاحتفاظ بالطاقة الناجمة عن عملية الاكسدة البيولوجية .

٣- أهمية السكريات في تحديد شروط الاتصال مابين الخلايا وفي تحديد صفات مولدات الضد .

سنتحدث قليلا عن بروتينات الغشاء الخلوى وذلك نظرا لاهميتها الكبيرة في بنية ووظيفة هذا الغشاء وهي توجد دائما بصورة شكلين :

آ- البروتينات المحيطية (Peripheriques): تكون هذه البروتينات حلولة في الاوساط المائية وبواسطة طرق معالجة معتدلة مثل ارتفاع القوة التشردية (Force ionique) أو اضافة المواد المكونة للمعقدات . تنفصل هذه البروتينات بسهولة عن

الغشاء الخلوى وعن الفوسفوليبيدات مما يدل على أن الرابطة بين هذه البروتينات والفوسفوليبيدات ليست رابطة تساهمية (Covalente). نذكر من هذه البروتينات : الادينوزين تري فوسفات (Adenosine tri phosphate) الموجودة في الغشاء الخلوى للبكتريا Gram - negatives المسماة Micrococcus Lysodeikticus (2,3)

ب - البروتينات الداخلية Integrales : تؤلف هذه البروتينات غير الحلولة في الوسط المائي أكثر من ٠/٠٧٠ من بروتينات الغشاء الخلوى واستخلاصها يتطلب استعمال طرق معالجة عنيفة بعض الشيء مثل استعمال المنظفات (Detergents) والمحاليل العضوية (Solvants organiques). تبقى هذه البروتينات ، بعد عملية الاستخلاص ،مرتبطة مع الفوسفوليبيدات بواسطة روابط من نوع (Hydrophobes) وتنزع الفوسفوليبيدات بشكل تام يسبب اتلاف هذا النوع من البروتينات

تتميز الاغشية الخلوية أيضا باحتوائها على الليبيدات وبشكل خاص الفوسفوليبيدات التي تضفي على الاغشية صفة كراهيتها للماء (Hydrophobe) . تؤلف الفوسفوليبيدات حوالي ١٥ - ٣٠ ٠/٠ من الوزن الجاف للغشاء الخلوى للبكتريا وتكون هذه الفوسفوليبيدات موزعة مابين الطبقتين الخارجية والداخلية للغشاء ولكنها تتوضع بشكل أساسي ضمن الطبقة الداخلية أو الغشاء السيتوبلاسمي.

تقوم الفوسفوليبيدات بوظيفتين أساسيتين :

١- تساهم في بناء الهيكل الخلوى الضروري لحدوث التفاعلات الانزيمية .

٢- تلعب دورا وظيفيا وذلك عن طريق علاقتها مع عدة أنزيمات موجودة في الغشاء الخلوى . هذا الدور الوظيفي الذى تلعبه الفوسفوليبيدات أمكن اثباته عند المصورات الحيوية (7 - 4) وعند البكتريا (5,7,8 - 10) حيث أن بعض الانزيمات تفقد فعاليتها البيولوجية بشكل تام بعد نزع الفوسفوليبيدات ،وبعضها الاخر تزداد فعاليتها بوجود الفوسفوليبيدات .

اقترحت عدة موديلات من أجل شرح وتوضيح البنية الجزيئية للغشاء الخلوى وسنكتفي بذكر عدد منها :

١- اقترح الموديل الاوّل من قبل DANIELLI و DAVSON عام ١٩٣٦ (11) ،وهو يعرف بالغشاء الخلوى بأنه طبقة مضاعفة من الجزيئات الليبيدية متصلة مع بعضها بواسطة نهاياتها الكارهة للماء وتتوضع هذه الطبقة المضاعفة من الليبيدات مابين طبقتين من البروتينات اللتان توءلفان بهذا الشكل السطح الخارجي والداخلي للغشاء ، ثم عمم هذا الموديل عام ١٩٦٠ من قبل ROBERTSON (12)

٢- اقترح Lucy (13) موديلا شرح بواسطته الجانب الحبيبي للغشاء الخلوى من خلال وجود حبيبات أو Micelles ليبيدية مكونة تحت جزئيات Sous Unites محاطة بالبروتينات والفليكوبروتينات .

٣- اقترح SJOSTRAND (14) موديلا مشابها للثاني ولكن الـ Micelles لاتكون مكونة فقط من الليبيدات وانما من معقد ليبوبروتيني . في كلا الموديلين يكون الثبات الميكانيكي موءمنا بواسطة التداخلات الحاصلة مابين البروتينات والليبيدات المكونة للغشاء .

٤- اقترح BENSON (15) وجود طبقة واحدة من تحت الجزئيات الليبوبروتينية ،في هذا الموديل أعطى الموءلف الدّور الاسّاسي للبروتينات أما الفوسفوليبيدات فانها تندمج في مستوى المنطقة البروتينية غير المحبة للماء ..

٥- اقترح كل من NICOLSON , SINGER (16) حديثا موديلا من نوع .. Mosaique fluide حسب هذا الموديل ، تتوضع الفوسفوليبيدات بشكل طبقة مضاعفة مكونة قالبا سائلا (fluide) معطية بهذا الشكل للغشاء الخلوي ميوعته ومقاومته الكهربائية العالية ، أما البروتينات فانّها تتوضع ضمن هذا القالب الليبيدى حيث بعضها ينغرس ضمن الليبيدات بشكل جزئي بينما يخترق بعضها الاخَر الطبقة الليبيدية من طرف الى آخر . يتجه الطرف القطبي (polaire) للبروتينات

نحو الخارج بحيث يكون على اتصال مع الطور المائي ، بينما يكون الطرف غير القطبي (Non Polaire) للبروتينات متجها نحو الطبقة الغشائية الكارهة للماء .

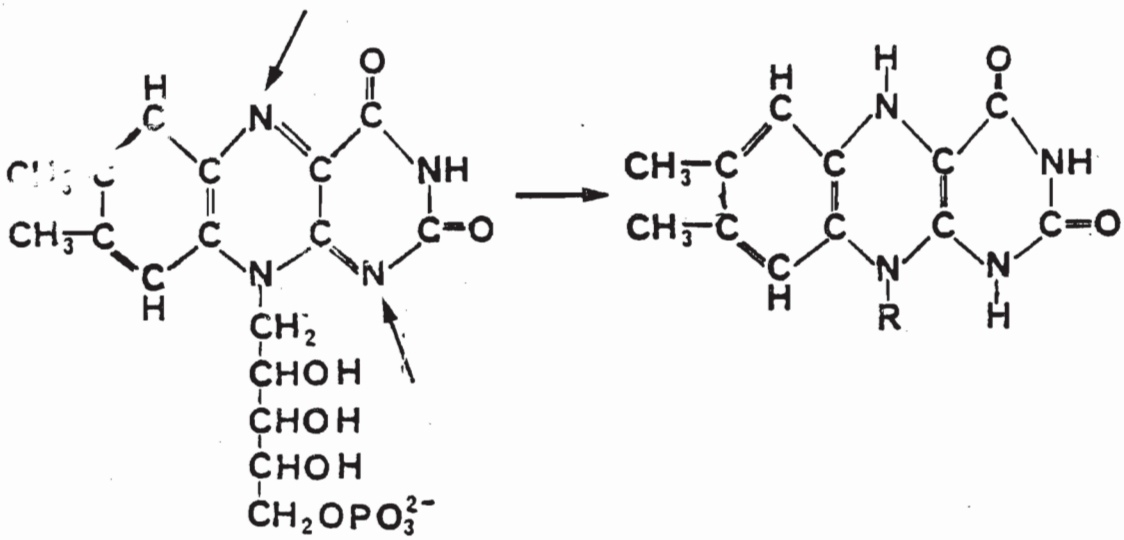
بعد هذه الفكرة الموجزة عن الغشاء الخلوي وتركيبه سنتكلم وبشكل مختصر جدا عن انزيمات الاكسدة والارجاع الموجودة ضمنه .

تقوم البكتريا من نوع Proteus بنزع الزمرة الامينية (Désamination) من أغلب الحموض الامينية الطبيعية بوجود اكسجين الهواء . ان تشكل الفثيل بيروفات اعتبارا من الفثيل الاتين يستخدم دائما لتمييز هذا النوع من البكتريا .

توءكسد الاجزاء الغشائية المستحضرة من البكتريا Proteus بواسطة التحطيم الميكانيكي ، الـ NADH ، Succinate ، Lactate , Fumarate ، (17,18) . BERNHEIM ومساعديه (19) وجدوا أيضا أن البكتريا من نوع P. Vulgaris توءكسد تقريبا كل الحموض الامينية الطبيعية من نمط L - . وجد كل من PELMONT و JABBOUR (20) وآخرين حديثا أن الاجزاء الغشائية للبكتريا التالية P . morganii P . mirabilis P . Vulgaris تكون غنية بانزيمات الاكسدة والارجاع التي تستطيع أن توءكسد الحموض الامينية من النمط L - ، كما وجد هؤلاء الباحثين بان أغلب السوبيستترا الموكسدة من قبل البكتريا P.mirabilis تنتمي الى مجموعتين: احداهما حموض آمينية ذات سلسلة جانبية غير قطبية ،والاخرى حموض آمينية ذات سلسلة جانبية قطبية . أكد التخريب الحراري (Dénaturation thermique) المدروس من قبل هؤلاء الباحثين أن لاغشية الخلوية المعزولة من P.mirabilis تحتوي على الاقل على نوعين من أنزيمات الاكسدة والارجاع Oxydo - reductase .

تتحقق عملية نزع الزمرة الامينية الموكسدة Desamination oxydative بواسطة أنزيمات النازعة للهيدروجين Aminoacides deshydrogenases وأنزيمات الاكسدة Oxydases flaviniques .

يكون الجزء المتمم لهذه الانزيمات اما الفلافين أدنين دينكليوتيد (FAD) أو الفلافين مونو نكليوتيد (FMN). الزمرة الفعالة في الجزء المتمم التي تشارك في عملية الاكسدة والارجاع هي النواة المسماة (ايزو اللوكزازين) وعملية ارجاعها تتم حسب الشكل التالي



يمكن تصور التفاعل وكأنه عملية نقل مباشر لزوج من ذرات الهيدروجين من السوبيسترا معطية بهذا الشكل الاشكال المرجعة من $FADH_2$ و $FMNH_2$ حسب التفاعلين التاليين :

$$SH_2 + E - FMN \rightleftharpoons S + E - FMNH_2$$

$$SH_2 + E - FAD \rightleftharpoons S + E - FADH_2$$

ان المستقبل الطبيعي لالكترونات أنزيمات الـ déshydrogenases flaviniques هو الـ (Coenzyme q)Ubiquinone ( ) الذى يشكل أحد مكونات السلسلة التنفسية مع ذلك فان أنزيمات الـ déshydrogenases flaviniques المرجعة توءكسد من جديد بسهولة بواسطة مستقبلات الكترونية اصطناعية مثل الـ Ferricyanure ، أو بواسطة الملونات القابلة للارجاع مثل Phénazine méthosulfate , bleu de méthylène أو(DCIP) 2,6 dichlorophénol indophénol كمافي التفاعل التالي :

$$E - FADH_2 + DCIP_{ox} \longrightarrow E\text{-}FAD + DCIP\text{-}H_{2red}$$

ازرق عديم اللون

ان عددا كبيرا من الاحياء المجهرية Micro organismes يحتوي على أنزيمات الـ Oxydases flaviniques التي تنشط عملية désamination oxydatives للحموض الامينية : يكون أحد هذه الانزيمات نوعيا للحموض الامينية من النمط ـ L ـ وينشط التفاعل التالي :

$$L\text{-aminoacide} + H_2O + E\text{-}FMN \longrightarrow \alpha\text{-}\text{cétoacide} + NH_3 + FMNH_2$$

يحتوى هذا الانزيم المذكور أعلاه على (FMN) Flavine mono nucléotide كجزء متمم ، و يوجد في الكبد وينشط عملية نزع الزمرة الآمينية للحمض الآميني ليزين .

بينما يسمى الانزيم الاخر الذى يتدخل في عملية نزع الزمرة الامينية بـ D-aminoacide oxydase وهو ينشط التفاعل التالي :

$$D\text{-aminoacide} + H_2O + E\text{-}FAD \longrightarrow \alpha\text{-}\text{Cétoacide} + NH_3 + E\text{-}FADH_2$$

يحتوى هذا الانزيم على (FAD) Flavine adenine di nucleotidc

وهو يتدخل في تحطيم الحموض الامّينية من النمط ـ D ـ والتي تأتي من عملية القطع الانزيمي للجزئيات المسماة الـ Peptidoglycanes

يشتمل المخطط العام للتفاعل على مرحلتين : الاولى تتضمن عملية نزع الهيدروجين أنزيميا من الحمض الامّيني موءدية الى تشكل الـ iminoacide بينما تتضمن المرحلة الثانية تفاعلا غير أنزيميا يتم أثناءه اضافة جزئية ماء الى المركب المتشكل وتحرر جزئية أمونياك وتشكل الـ Cétoacide المطابق حسب التفاعل التالي :

$$\underset{\text{acide aminé}}{\underset{\mid \atop NH_2}{R-CH-COOH}} \xrightarrow{-\ 2H} \underset{\text{iminoacide}}{\underset{\| \atop NH}{R-C-COOH}} \xrightarrow{+\ H20} \underset{\text{cétoacide}}{\underset{\| \atop O}{R-C-COOH}} + NH_3$$

ان أنزيمات الـ Oxydases Flaviniques المرجعة تتأكسد ذاتيا مستهلكة الاكسجين ومشكلة الماء الاكسجيني (21) ومكونة من جديد الشكل الموءكسد للانزيم وذلك حسب التفاعلات التالية :

$$\underset{\mid \atop NH_2}{R-CH-COOH} + F\ (Flavine) \longrightarrow \underset{\| \atop NH}{R-C-COOH} + FH_2$$

$$\underset{\| \atop NH}{R-C-COOH} + H_2O \longrightarrow \underset{\| \atop O}{R-C-COOH} + NH_3$$

$$FH_2 + O_2 \longrightarrow H_2O_2 + F\ (Flavine)$$

<u>أوساط النمو وطرق زراعة البكتريا</u> :

تأتي البكتريا Proteus Mirabilis، التي لاتحتوى على صفات وراثية خاصة ،من معهد باستور (باريس).

تحفظ الأرومة البكترية (Souche bacterienne) بشكل دوري فوق الجيلوز الجاوى على المركبات التالية في الليتر الواحد .

- Peptone Pancreatique .... 5 g
- Extrait de Levure .... 3 g
- Lactose .... 10 g
- Bleu de Bromothymol .... 25 mg
- Gélose .... 15 g
- Tergitol (7-Sodium Heptadecyl Sulfate)..10 mg

تضبط درجة حموضة الوسط على ٦٫٨ –٧ : PH .

تثبط المنظفات (detergents) حركة الميكروبات على سطح الجيلوز . يسمح وجود اللاكتوز بالكشف بسهولة عن وجود البكتريا P.mirabilis التي تعتبر سالبة للاكتوز ولاتسبب تحول لون الكاشف الملون الى اللون الاصفر .

يعاد عزل الارومة البكترية بشكل دوري اعتبارا من مستعمرة معزولة (Colonie) وتراقب من خلال تشكل الفنيل بيروفات والاورياز Urease .

تزرع البكتريا اما في وسط مغذي (Z-Glu) او في وسط فقير (Milieu minimum) ،ويحتوي الوسط المغذي بالليتر الواحد على المواد والمقادير التالية :

- Peptone Pancréatique .... 20 g
- Glucose .... 4 g
- Extrait de levure .... 5 g

يعقم هذا الوسط ،ضمن المرجل الذي يستوعب ١٦ ليتر ،لمدة ٩٠ دقيقة وبدرجة حرارة قدرها + ١١٠ درجة مئوية .

بينما يحتوي الوسط الفقير بالليتر الواحد على المواد والمقادير التاليـــة :

- NH_4Cl .... 1 g
- Na_2SO_4 .... 0,2 g
- KH_2PO_4 .... 0,5 g
- K_2HPO_4 .... 4,5 g
- Glucose .... 1 g
- $Fe\ SO_4, 7H_2O$ .... 1 mg
- $Mg\ SO_4, 7H_2O$ .... 40 mg

- Pantothenate de - Cal Cium ..... 1 mg
- Nicotinamide ..... 1 mg
- Chlorhydrate de Thiamine (Vitamine B1)... 1 mg
- Acide P. aminobenzoique ..... 1 mg

تعقم ،بشكل عام ، أملاح الحديد والمغنزيوم والفيتامينات بالباردبو اسطة الترشيح فوق غشاء معقم بشكل مسبق ،بينما تعقم الفوسفات وكبريتات الصوديوم وكلور الامونيوم بالمرجل (Autoclave) لمدة ٢٠دقيقة وبدرجة حرارة + ١١٠ درجة مئوية .

يمكن للغليسيرول في بعض الزراعات البكترية أن يحل محل الغليكوز كمصدر للكربون وذلك بتركيز نهائي قدره ٢ر٠ ٠/٠ (ح/ح). تحتوي بعض الزراعات البكترية أيضا على منشط للنمو مثل الحموض الامّينية بتركيز قدره ١-٢ ٠/٠ أوهيدروليزات الكازئين بتركيز ٠١/٠ .

في جميع الحالات ،تحضر زراعة بكترية أولية وذلك بزراعة مستعمرة واحدة معزولة ضمن الوسط المغذى المعقم (١٠٠ مل) . تمدد هذه الزراعة الاوّلية ،بعد تركها تنمو لمدة ليلة واحدة ضمن حمام مائي درجة حرارته ٣٠ درجة مئوية مع التحريك المستمر ،بنسبة ٢٠ مل في كل ليتر من الوسط المغذى Z-Glu أو في الوسط الفقير. تترك الزراعة الجديدة تنمو في نفس شروط الزراعة السابقة .

تحضير الـ Sphéroplastes :

من المعروف أن البنسلين يمنع اصطناع الغشاء الخلوي الطبيعي للبكتريا وذلك بوقف تشكل الروابط مابين الوحدات التيترا ببتيديك للغشاء ، فالانقسام الخلوي يتوقف عند وجود البنسلين ولكن حجم الخلايا يستمر في الازدياد بحيث تأخذ شكلا حلقيا متحولة بذلك الى مايسمى الـ Sphéroplastes الشديدة الحساسية للضغط الحلولي للوسط وللتحريك الميكانيكي .

يضاف عادة السكاروز بتركيز ٤ر٠ مول الى وسط الزراعة وذلك لكي يرفع وبشكل كاف الضغط الحلولي للوسط (Pression Osmotique) من أجل ثبات الـ Spheroplastes للبكتريا P.Mirabilis

طريقة تحضير الـ Sphéroplastes :

يضاف الى ١٦٠٠ مل من البكتريا المأخوذة في الطور الاسي (Phase exponentielle) مايلي :

- Saccharose 75% (P./V.) .... 380 ml
- Mg Cl_2 1 M .... 20 ml
- Penicilline G .... 5.10^6 unites

بعد هذه الاضافة ،تستمر عملية الحضن مع التهوية الدائمة لمدة ٣ ساعات في درجة حرارة ٣٠ درجة مئوية . يكون هذا الوقت بشكل عام كاف لاتمام عملية تحول الخلايا الى الـ Sphéroplastes وللتأكد من ذلك تجرى مراقبة الخلايا المتكونة بواسطة المجهر .

تحضير الاغشية الخلوية :

تحضر الاغشية الخلوية اما من الـ Sphéroplastes أومن البكتريا الكاملة entiéres Bacteries .

١- اعتبارا من الـ Sphéroplastes :

تثقل الـ Sphéroplastes خلال ١٠ دقائق بسرعة قدرها ٨٠٠٠ – ١٠٠٠٠ × g ، ثم يعلق الراسب الناتج ويغسل مرة واحدة وذلك بالتثقيل ضمن المحلول الموقي(Tampon TMS (Saccharose 0,4M , $Mgcl_2$ 10mm , Tris-maléate 2omm,PH:7,5)

يضاف ببطء ،بعد وضع الـ Sphéroplstes من جديد في معلق مكون من (Tris-Maleate 20mm,PH :7,5 و Saccharose o,4m)، ٥٠٠ مل من الـ EGTA ٢ر٠ نظامي وبدرجة حموضة ٥ر١٠: : pH .

يحرك هذا المزيج بواسطة التحريك المغناطيسي لمدة ٣٠ دقيقة وبدرجة حرارة الثلج ، تراقب درجة الحموضة أثناء هذا التحريك بحيث تبقى محافظة على القيمة ٨ر١٠ : pH .

يغسل الراسب الناتج من جديد في ١٥ مل من المحلول الموقي السابق

ويضاف الى هذا المعلق ١٥٠ ميكرو غرام من الانزيم RN_{ase}
و٣٠٠ ميكرو غرام من الانزيم DN_{ase} .

يوضع هذا المحضر بعد مرور ١٥ ـ ٢٠ ساعة ضمن الثلج فوق سطح محلول من السكاروز متدرج التركيز ومؤلف من طبقتين تركيزهما على التوالي ٣٧ ٠/٠ و ٠/٠٧٥ (P / V) .

تجمع الاغشية الخلوية ،بعد التشغيل لمدة ساعة واحدة وبسرعة ٨٠٠٠٠ ـ ١٠٠ ٠٠٠ × g ،المتكونة في المنطقة الفاصلة بين طبقتي السكاروز .

يمكن تلخيص عملية تحضير الغشاء الخلوي حسب المخطط التالي :

البكتريا (P.mirabilis)

+ ٥×١٠^٦ وحدة من البنسلين

+ ٣٦٠ مل من السكاروز ٧٥ ٠/٠

+ ٢٠ مل من M_gcl_2 النظامي

٣ ساعات في ٣٠ درجة مئوية

Spheroplastes

تشفيل لمدة ١٠ دقائق وبسرعة ١٠٠٠٠ × g

غسل بواسطة TMS

يعلق من جديد ضمن ٥٠ مل من TS

+ ٥٠ مل من الـ EGTA ٢ر٠ نظامي وبدرجة حموضة ٥ر١٠ : PH

٣٠ دقيقة في درجة حرارة الثلج

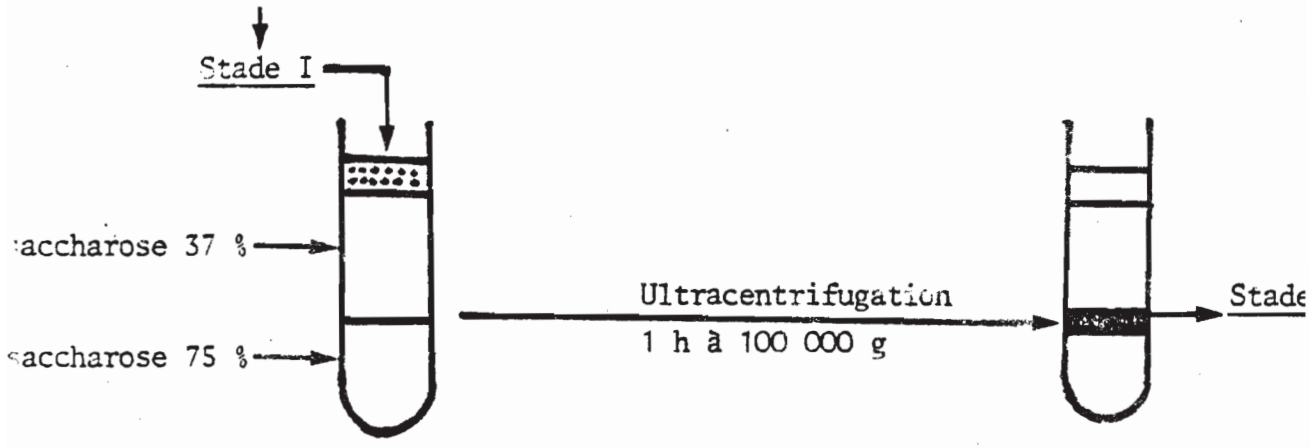
تشفيل خلال ٢٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠ × g

غسل مرتين بواسطة المحلول الموقي TS

اخذ من جديد ضمن ١٥ مل من المحلول الموقي TS

+ RN_{ase} 9 , DN_{ase} +

١٥ ساعة في درجة حرارة الثلج



٢- إعتبارا من البكتريا الكاملة : Bacteries enbieres :

تجمع البكتريا ، المزروعة حتى الطور الثابت (Phase Stationnaire) في الوسط الفقير (Milieu Minimum) الحاوي على هيدروليزات الكازئين ، بواسطة التشغيل المستمر وبسرعة ٢٠٠٠٠ × g وبدرجة حرارة + ٤ درجة مئوية ضمن المثفلة MSE-18

تعلق الخلايا المثفلة ضمن المحلول المؤلف من Tris-maleate ٠٫٠٢ مل مول ، ٧٫٥: pH ثم تغسل على الأقل مرتين بواسطة التثفيل لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠ × g .

تعلق البكتريا المغسولة من جديد ضمن نفس المحلول الموقي وبنسبة ٤ مل لكل ١ ملغ من البكتريا الرطبة ، ثم يضاف الى هذا الوسط محلول الـ EGTA بتركيز نهائي قدره ٥٠ مل مول وبدرجة حموضة قدرها ١٠٫٥ : pH ومحلول كربونات البوتاسيوم K_2CO_3 بتركيز نهائي قدره ٥٠ مل مول ، وتراقب درجة حموضة الوسط بحيث تبقى محافظة على القيمة ١٠٫٥ : pH .

تترك الخلايا تتفسخ مع التحريك الهادئ والمتقطع خلال ٤٠ دقيقة وبدرجة الحرارة العادية (+ ٢٠ درجة مئوية) ثم يثفل هذا المعلق لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠ × g .

يغسل الراسب الحاصل والمعلق في نفس المحلول الموقي السابق مرتين

على الاقل بواسطة التثفيل لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠ x g . يعلق من جديد الراسب الحاصل ضمن نفس المحلول الموقي السابق وبنسبة ٤ مل لكل ١ ملغ من البكتريا الرطبة .

تعالج البكتريا المعلقة بواسطة محلول أنزيم الليزوزيم (Lysozyme) وبنسبة ١٢٥ ميكرو غرام لكل مل من البكتريا الرطبة ثم يسخن المزيج لمدة ٤٥ دقيقة ضمن حمام مائي درجة حرارته ٣٠ درجة مئوية مع التحريك الهادئ والمتقطع ،يثفل هذا المزيج لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠ x g ثم يعلق من جديد في نفس المحلول الموقي السابق وبنسبة ٤ مل لكل ملغ من البكتريا الرطبة .

يعالج معلق البكتريا الحاصلة بما يسمى ما فوق الصوت (Ultra-Sons) والمعالجة هذه تتم على عينات تحوي كل واحدة منها على ٥٠ مل من البكتريا وتستمر هذه المعالجة لمدة ٤دقائق ونصف بحيث تجزأ هذه المدة الزمنية على ثلاث فترات مدة كل منها ٥ر١ دقيقة . يسمى الجهاز المستخدم في هذه المعالجة بـ Sonimasse 250T

تثفل من جديد البكتريا المعالجة لمدة ساعة واحدة وبسرعة ١٢٠ ٠٠٠ x g وبدرجة حرارة + ٤ درجة مئوية ،ثم يعلق من جديد الراسب الحاصل ضمن نفس المحلول الموقي السابق ،يسمى المحضر الذي حصلنا عليه بالمرحلة (١).

يمكن تلخيص خطوات تحضير الغشاء الخلوي على الشكل السابق .

البكتريا P.mirabilis

↓

بكتريا مجموعة بواسطة التثفيل المستمر وبواسطة المثفلة MSE-18

غسل بواسطة المحلول الموقي (٠ر٠٢Tris-maleate نظامي

وبدرجة حموضة ٥ر٧ : PH

تثفيل لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠× g

↓

راسب معلق من جديد ضمن المحلول الموقي (٠ر٠٢ Tris-maleate

نظامي ٥ر٧ : PH

\+ EGTA ٥٠ر٠ مول ، ٥ر١٠ : p^H

\+ $K_2\ CO_3$ ٥٠ر٠ مول

تحريك مغناطيس لمدة ٤٠ دقيقة وفي درجة الحرارة العادية

تثفيل لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠× g وفي درجة حرارة + ٤ درجة مئوية

↓

راسب معلق في المحلول الموقي (Tris-maléate

٢٠ر٠ نظامي ، ٥ر٧ : p^H)

غسل مرتين بواسطة المحلول الموقي (Tris-maléate

٢٠ر٠ نظامي ، ٥ر٧ : p^H)

↓

راسب معلق في المحلول الموقي(Tris-maléate

٢٠ر٠ نضامي ٥ر٧ : p^H)

\+ Lysozyme (١٢٠ ميكرو غرام / مل)

تسخين ضمن حمام مائي لمدة ٤٥ دقيقة وبدرجة حرارة + ٣٠ درجة مئوية

تثفيل لمدة ٣٠ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠٠ g x

↓

راسب معلق في المحلول الموقي (Tris-maléate

٢٠ر٠ نظامي ، ٥ر٧ : p^H)

معالجة بجهاز مافوق الصوت(Ultra-sons)لمدة ٥ر٤دقيقة وبدرجة حرارة + ٤ درجة مئوية

↓

تثفيل لمدة ساعة واحدة وبسرعة ١٢٠ ٠٠٠ g x

↓

راسب معلق في المحلول الموقي Tris-maléate

٢٠ر٠ نظامي ٥ر٧ : p^H

↓

الغشاء الخلوي (مرحلة ١)

تحضير الأغشية الداخلية والخارجية :

الغاية من هذه الدراسة هي الحصول على غشاء داخلي

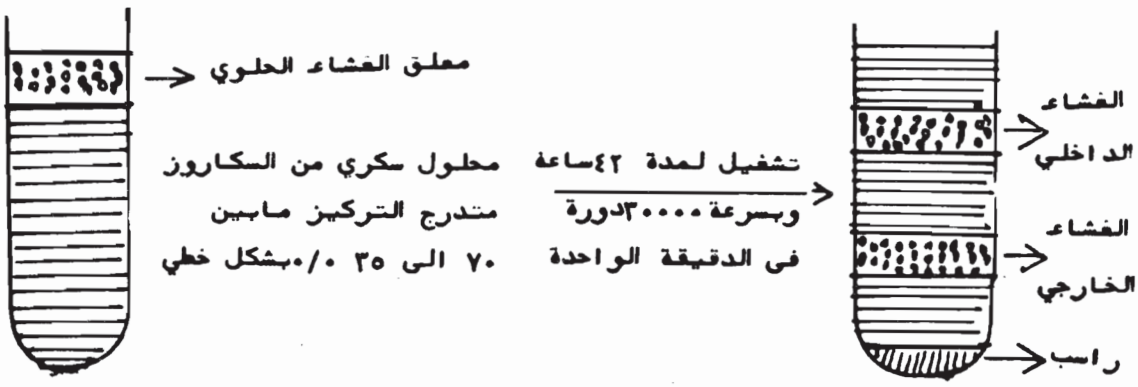
(Membrane interne) نقي الى حد كبير وذلك بعد فصله عن الغشاء الخارجي(Membrane externe)

يستعمل لتحقيق فصل الغشاءين الداخلي والخارجي عن بعضهما طريقة التشغيل ضمن محلول سكرى متدرج التركيز .

تقوم طريقة الفصل في اساسها على طريقة WITHOLI ومساعديه (22) لتحقيق عملية التفسخ القلوي للبكتريا (lyse alcaline) وعلى طريقة HAZIN (٢٣) لتحقيق عملية فصل الغشاءينعن بعضهما.

لتحقيق عملية الفعل ضمن محلول سكري ،يمكن استخدام محلول سكري من السكاروز متدرج التركيز بشكل خطي(linéaire) اومكون من عدة طبقات سكرية متناقضة التركيز بدءا من الاسفل ونحو الاعلى، ولتحقيق هذا الغرض استخدمنا في دراستنا هاتين الطريقتين :

تتلخص الطريقة الاولى بتحضير محلول سكري من السكاروز ،ضمن المحلول الموقي(Tris-maléate ٠٫٠٢ نظامي، ٧٫٥ : pH) بتركيزين مختلفين (٠/٠٧٠ و ٠/٠٣٥) على سبيل المثال، وبواسطة جهاز خاص يمزج هذين المحلولين للحصول على محلول سكري متدرج التركيز بشكل خطي مابين ٧٠ الى ٠/٠٣٥ . يوضع الغشاء الخلوي (Suspension Membranaire) ،المحضر بالطريقة المذكورة سابقا ،على سطح المحلول السكرى المتدرج التركيز والموجود ضمن انبوب اختبار خاص ،ويمكن توضيح هذه الطريقة بالشكل التالي المبسط .



يخضع هذا النظام لعملية تثفيل ضمن مثفلة من نوع MSE-50 لمدة ٤٢ ساعة وبسرعة قدرها ٣٠٠٠٠ دورة / الدقيقة الواحدة وبدرجة حرارة + ٤ درجة مئوية . هذه المدة تكون بشكل عام كافية للوصول بالنظام الى نقطة التوازن (Equilibre) والتي عندها تتوقف جزئيات الغشاء الخلوي عن الهجرة وتتوضع في المنطقة (Zone) والتي كثافتها (densité) تكون مساوية لكثافة جزئيات الغشاء الخلوي ،وبما أن كثافة الغشاء الخارجي أكبر من كثافة الغشاء الداخلي فانه يتوضع في طبقة من المحلول السكري المتدرج التركيز والتي كثافتها تكون أكبر من كثافة المنطقة التي تتوضع ضمنها جزئيات الغشاء الداخلي. اذا عند الوصول بالنظام الى نقطة التوازن نقوم بايقاف المثفلة ويجمع المحلول السكري بواسطة جامع (Collecteur) ضمن أنابيب اختبار بحيث يحتوي كل منها على حوالي ٥ر١ مل من المحلول السكري وطبعا تتم عملية الجمع هذه بدرجة حرارة + ٤ درجة مئوية . تجري على العينات المجموعة قياس الفعالية الانزيمية (activité enzymatique) وقياس الكثافة الضوئية (donsité optique) على موجة طولها 280 nm . بينما تتلخص الطريقة الثانية بتحضير محلول سكري من السكاروز بتراكيز مختلفة ضمن المحلول الموقي (Tris-maléate ٠ر٠٢ نظامي ، ٧ر٥ pH :)،ثم يملأ انبوب الاختبار بهذا المحلول على شكل طبقات متدرجة التركيز بحيث يتناقص التركيز بدءا من الاسفل نحو الاعلى ،وبالطبع يمكن التحكم بتراكيز طبقات المحلول السكري حسب الغرض المطلوب من التجربة . يمكن لمعلق الغشاء الخلوي أن يوضع اما على سطح المحلول السكري أو أن يمزج مع أي من الطبقات السكرية .

استخدمنا في دراستنا التراكيز السكرية التالية (٠/٠٦٥ ، ٠/٠٥٠ و ٠/٠٣٠) بدءا من الاسفل ونحو الاعلى ووضعنا معلق الغشاء الخلوي على سطح الطبقة السكرية الثالثة (٠/٠٣٠) ،ثم أخضعنا هذا النظام لعملية التثفيل ضمن المثفلة MSE-50 لمدة ٤٥ ساعة متواصلة وبسرعة تثفيل قدرها ٤٢٠٠٠ دورة /الدقيقة الواحدة وبدرجة حرارة قدرها + ٤ درجة مئوية ،وقد وجدنا بأن هذه المدة الزمنية تكون كافية

لجعل المحلول السكري المتدرج التركيز يأخذ شكلا خطيا (أي أن تركيز المحلول السكري يتناقص بدءا من الأسفل ونحو الأعلى بشكل خطي وليس بشكل طبقات)، وللوصول بهذا النظام الى نقطة التوازن (Equilibrc) والتي عندها تتوقف جزئيات الغشاء الخلوي عن الهجرة وتتوضع في المنطقة والتي كثافتها تكون معادلة لكثافة الغشاء الخلوي .

بعد وقف عملية التشغيل ،يتم جمع المحلول السكري ضمن أنابيب اختبار وبواسطة جامع خاص (Collecteur) وبدرجة حرارة + ٤ درجة مئوية ثم تجري على العينات المجموعة قياس الفعالية الأنزيمية وقياس الكثافة الضوئية على موجة طولها 280 nm .

صورة رقم (١) :

فصل الغشاء الداخلي عن الغشاء الخارجي للغشاء الخلوي للبكتريا P.mirabilis بطريقة التشغيل حتى نقطة التوازن(Eqnilibre) ضمن محلول سكري متدرج التركيز من السكاروز .

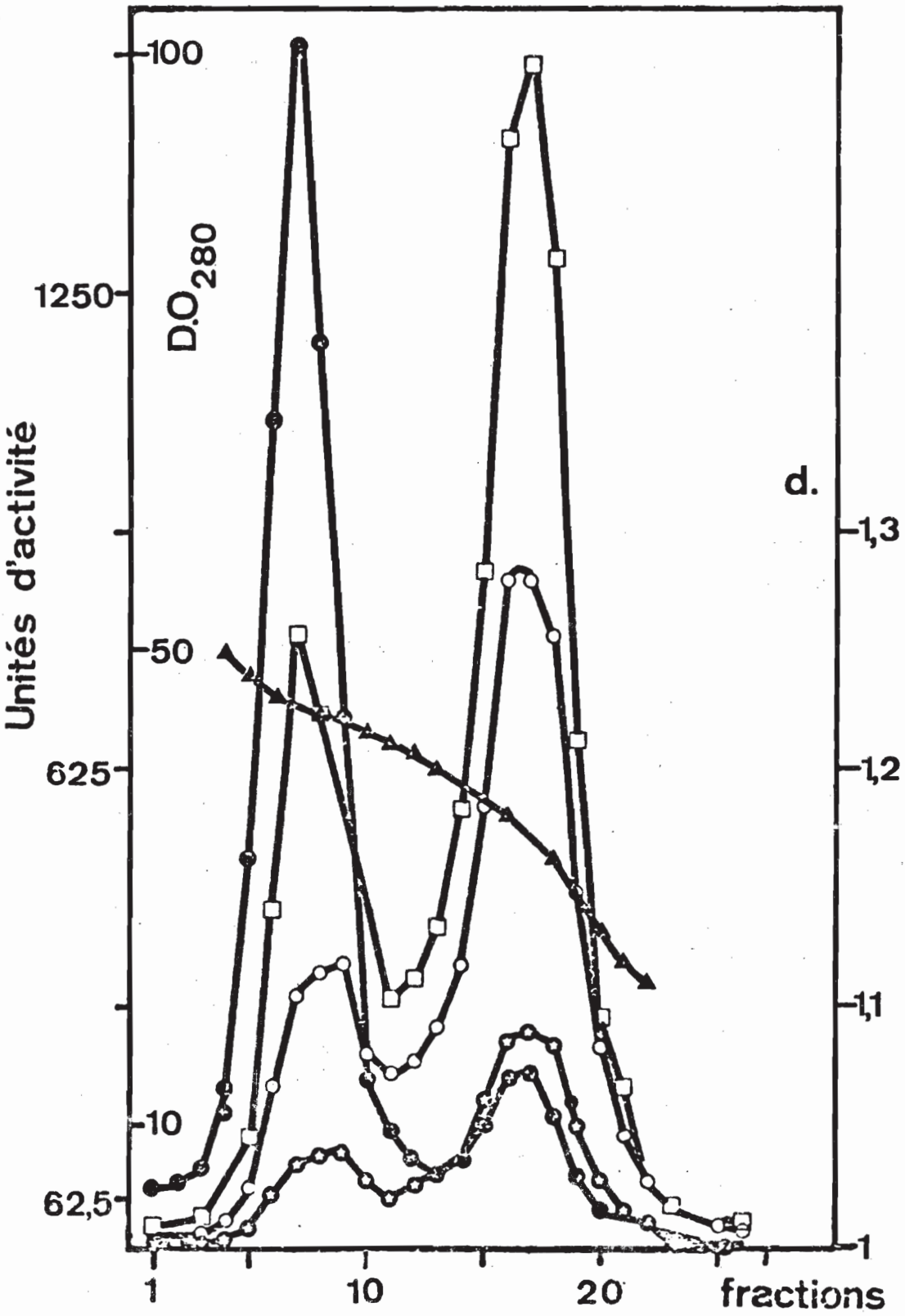
النقاط البيض : الفعالية الأنزيمية للأنزيم L-Phénylalanine DCIP-réductase

النجوم البيض : الفعالية الأنزيمية للأنزيم L-Histidine DCIP-réductase

المربعات البيض : الفعالية الأنزيمية للأنزيم L-Phénylalanine Oxydase

النقاط السود : الكثافة الضوئية للعينات على موجة طولها 280 nm

المثلثات السود : كثافة (dcnsite) العينات بالنسبة للماء



Unités d'activité
1250
625
62,5
D.O 280
100
50
10
d.
1,3
1,2
1,1
1
1
10
20
fractions

تظهر الصورة السابقة (١) النتائج التي توصلنا اليها باستخدام طريقة الفصل بواسطة المحلول السكري المتدرج التركيز ويمكن تلخيص هذه النتائج كما يلي :

١- امكانية فصل الغشاء الخارجي (membrane cxterne) عن الغشاء الداخلي (membrane interne) بشكل تام تقريبا .

٢- كون كثافة الغشاء الخارجي المساوية ١ر٢٢ غ/مل أكبر من كثافة الغشاء الداخلي (١ر١٨ غ/مل) تعود الى كون كمية الفوسفوليبيندات الموجودة في الغشاء الداخلي أكبر بكثير من تلك الموجودة في الغشاء الخارجي .

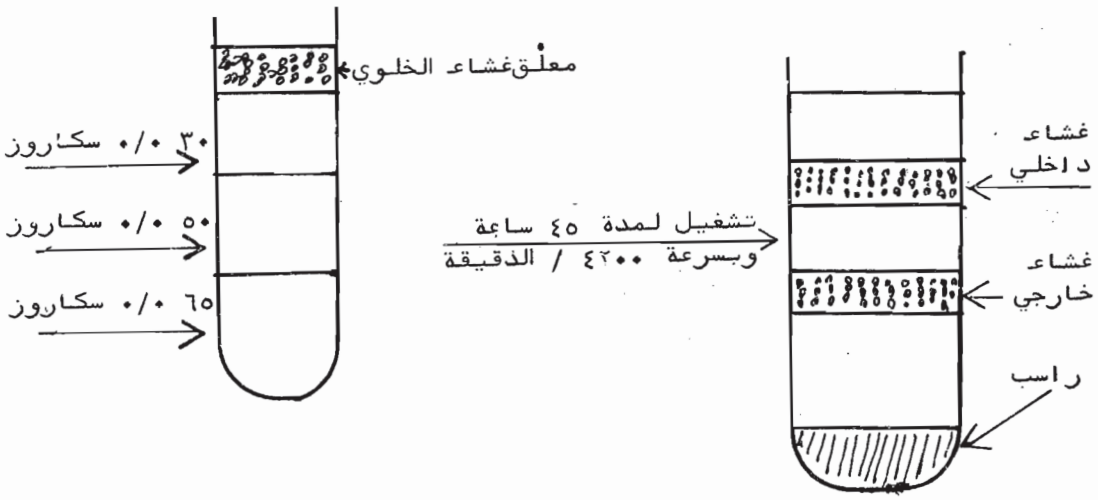
٣- تتوضع الفعاليتان الانزيميتين L-phénylalanine DCIP - réductase و L-Phénylalanine Oxydase بشكل أساسي في الغشاء الداخلي مع وجود آثار منهما في الغشاء الخارجي ويمكن أن نعزو ذلك الى الشلوث الحاصل أثناء عملية الفصل .

٤-التطابق التام في توضع الفعاليتين الانزيميتين L-Phénylalanine , L-histidine DCIP - réductases حيث أنهما تتوضعان بشكل أساسي في الغشاء الداخلي .

٥- تعذر امكانية الفصل بين الفعاليتين الانزيميتين L-Phénylalaninc و L-histidine ،بواسطة طريقة الفصل باستعمال المحلول السكري المتدرج التركيز ،يشير الى أنهما تتوضعان في نفس المنطقة من الغشاء الداخلي .

٦- الفعالية النوعية (Activité Spécifique) للفعالية الانزيمية L-Phénylalanine DCIP-réductase المتوضعة في الغشاء الداخلي ازدادت حوالي ٣ مرات بالنسبة للفعالية النوعية للانزيم الموجود في الغشاء الخلوي ،أما الفعالية المستحصل عليها (Activite recuperee) بعد عملية الفصل فتعادل تقريبا ٠/٠٩٠ من الفعالية الانزيمية الكلية الموجودة في الغشاء الخلوي قبل اجراء عملية الفصل . تكون هذه النتيجة الاخيرة على اتفاق تام مع تلك الموجودة في المراجع العلمية (24)

يمكن تمثيل الخطوات السابقة بالشكل التالي :



قياس الفعالية الانزيمية Mesure de lactivité cnzymatique

تقاس الفعالية الانزيمية للأنزيم L-Phénylalanine désaminase بواسطة ثلاث طرق مختلفة تم دراستها وتحديد شروطها في المخبر من قبل PELMONT , JABBOUR

وسنتكلم عن هذه الطرق بشكل مختصر :

١- تشكيل Phénylpyruvate اعتبارا من الـ Phénylalanine :

يستعمل تفاعل تشكل Phénylpyruvate اعتبارا من Phénylalanine بشكل دائم لتمييز البكتريا من نوع Providencia , Proteus (25-27) . يقاس تشكل Phénylpyruvate بواسطة اختباز لوني (Colorimetrique) بسيط وحساس

لانّ القياسات المحصول عليها تتناسب طرديا مع تركيز Phénylpyruvate ضمن مجال يتراوح مابين صفر حتى ٣٠ ميكرو مول /مل.

بحضور كمية من الاغشية الخلوية تتراوح مابين ١٠ - ١٥ ميكروغرام من البروتين ،فان تشكل Phénylpyruvate يتم بسرعة ثابتة خلال الخمسة عشر دقيقة الاولى من التفاعل وبدرجة حرارة قدرها + ٣٠ درجة مئوية . ان السرعة الابتدائية للتفاعل (٧) تتم بشكل خطي مع تركيز جزئيات الاغشية الخلوية طالما لم يتم استهلاك كل الاكسجين المنحل . يقف التفاعل الانزيمي عند استهلاك كل الاكسجين المنحل أو عند تحريك مزيج التفاعل مع الازوت ،لهذا السبب فان القياسات يجب ان تتم مع شرط تأمين سطح تلامس واسع مابين الهواء ومزيج التفاعل .

يوضع الشكل (٢) تغير سرعة الاكسدة بدلالة تركيز السوبيسترا (Substrat) . قيمة ثابت ميكاليس (Km) المقاسة في شروط التفاعل تكون من رتبة ١٫٤٧ x 10^{-3} مول ،حددنا أيضا السرعة الاعظمية (Vm) ضمن شروط التفاعل وهي من رتبة ٦٠٠ x 10^{-3}ميكرو مول من Phénylpyruvate / ملغ من البروتين / الدقيقة .

٢- استهلاك الاكسجين : Consommation doxygenc :

دل قياس الاكسجين بواسطة طريقة الـ Oxygraphie الى أن تشكل ميكرو مول من الـ Cétoacide يوافق استهلاك نصف ميكرو مول من الاكسجين وذلك حسب التفاعل التالي :

$$C_6H_5-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow C_6H_5-CH_2-\underset{\underset{O}{||}}{C}-COOH + NH_3$$

Phénylalanine — Phénylpyruvate — ammoniaque

يقاس تشكل الامونياك بواسطة كاشف NESSLER (28)

تختلف هذه النتيجة الموضحة سابقا من قبل STUMPF , GREEN (29) عن النظام المدروس عند الحيوانات والمتميز بتشكل البيروكسيد (30) ،حيث لم نستطع أن نعثر

على تشكل أي كمية من الماء الاكسجيني (H_2O_2) من قبل جزئيات الغشاء الخلوي .

تتناقص كمية الأكسجين المنحلة بسرعة ولكن بشكل خطي بدلالة الزمن حتى تصل الى ١ـ ٢ ٠/٠ من قيمتها الاصلية . تشير هذه الخاصة الى الالفة القوية التي تتمتع بها جزئيات الغشاء الخلوي بالنسبة للاكسجين حيث مستوى الاشباع يحدث عند مستوى منخفض جدا .

يحتوي (١) مل من مزيج التفاعل على المواد والمقادير التالية :

- L-Phenylalanine .... 50 U Moles
- $M_g CL_2$ .... 10 U Moles
- Tris-Maleate , $_pH$: 7,5 .... 20 U Moles
- Suspension Membranaire .... 10 a 100 U Moles de Protéines Totales .

٣ـ الارجاع الانزيمي لمادة Dichloro Phénolindo Phénol (DCIP):

تستعمل الأغشية الخلوية للبكتريا P.mirabilis مادة DCIP كمستقبل للالكترونات بغياب الاكسجين أو في حضوره ينشط هذا التفاعل بشكل قوي (٥٠) تقريبا وذلك باضافة مادة (PMS Phénazine métho Sulfate)

والتي تلعب دور وسيط . تزداد السرعة الابتدائية (٧) للتفاعل بشكل خطي مع ازدياد تراكيز مادة (PMS) وحتى تبلغ قيما أكبر من ٢ × ١٠^-٣ مول ، ولكن حددنا تركيز مادة PMS عند القيمة ٢٥٠ ميكرو غرام /مل (٨ر٢ × ١٠^-٤ مول) وذلك لتحاشي التأثيرات الثانوية والناتجة بشكل خاص من التفاعل الحادث مابين مادة (PMS) والمركبات الكيتونية ذات النواة العطرية أو الايميدازول (imidazole) .

يكون ارجاع مادة (DCIP) خطيا بدلالة الزمن وضمن الشروط القياسية المختارة ،وهو يسمح بالتحري عن أكسدة الحمض الامّيني (L-Phénylalanine) وبواسطة عدة ميكرو غرامات من البروتينات الغشائية فقط . تبلغ الفعالية المقاسة ضمن هذه الشروط ٢ر٠ الى ٤ر٠ ميكرو مول من مادة (DCIP) المرجعة في الدقيقة الواحدة وبواسطة (١) ملغ من البروتين . يكون هذا التفاعل خطيا بدلالة الزمن كما ذكرنا أعلاه وبدلالة تركيز كمية البروتينات الغشائية أيضا ضمن مجال يتراوح مابين ١ الى ٨٠ ميكرو غرام /مل اذا يمكن اعتبار هذا التفاعل شديد الحساسية بحيث يسمح بالتحري عن أكسدة الحمض الامّيني L-Pénylalanine بواسطة كمية صغيرة جدا من البروتينات الغشائية أو بواسطة عدة ميكروليترات من الانّزيم المنحل فقط .

تبلغ قيمة ثابت ميكاليس (K_m) للانّزيم المنحل ضمن شروط التفاعل ٤ر٤ × 10^{-3} مول ،أما السرعة الاعظمية (V_m) فانها من رتبة ١٧٠ × 10^{-3} ميكرو مول من DCIP المرجعة /ملغ منالبروتين/ الدقيقة الواحدة .

تزداد الفعالية الانّزيمية المقاسة بواسطة ارجاع مادة DCIP حوالي ٠/٠٣٠ عند اضافة مادة سيانور البوتاسيوم KCN ،بينما تزداد هذه الفعالية ٠/٠١٨ فقط عند اضافة مادة آزوت الصوديوم : أن ازدياد الفعالية الانّزيمية بواسطة هذين العاملين (هما من مثبطات السلسلة التنفسية) يعود الى وقف انتقال الالكترونات ،الناتجة عن عملية الاكسدة ،مابين السيتوكروم A_2 والاكسجين .

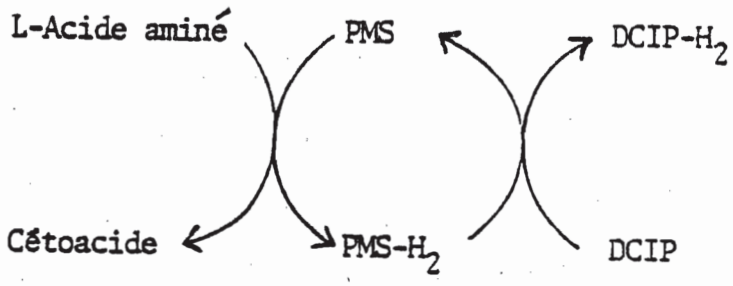
ان التأثير المثبط للمثبطات التي تعمل مابين السيتوكروم a_1 , b_1 مثل مادة anitimycine ومادة HOQNO يجعلنا نقترح بأن السلسلة التنفسية تتدخل في عملية أكسدة الحمض الامّيني L-phénylalanine . تأكدت هذه الفرضية بدراسة الطيف التفاضلي (Spectre différentiel) للاغشية الخلوية بحضور الحمض الامّيني L-Phénylalanine كسوبيسترا ،حيث

وجدنا أن الطيف الحاصل يشابه تماما طيف الأغشية الخلوية المرجعة بواسطة مادة $Na_2 S_2 O_4$ والذى نلاحظ عنده وجود عصابات (Bandes) مميزة للسيتوكرومات .

يسمح الارجاع الانزيمي لمادة DCIP - PMS بواسطة الأغشية الخلوية بمعايرة المرحلة الاولى من تابع معقد لمجموعة تفاعلات تدخل فيها السلسلة التنفسية . ان هذا التفاعل ممكنا بغياب الأكسجين ،وتنشيطه بواسطة مادة KCN يعود الى وقف المنافسة (Compétition) الممارسة من قبل النواقل الطبيعية للالكترونات .

يمكن كتابة المخطط العام لهذا التفاعل على الشكل التالي :

المراجع العلمية



يحتوي (١) ميليلتر من مزيج التفاعل على المواد والمقاديرالتالية

- DCIP ..... 0,06 U Moles
- PMS ..... 0,02 U Moles
- Tris-maléate ($_pH$: 7,5 ..... 20 U Moles
- $MGCL_2$ ..... 10 U Moles
- L-Acide aminé ..... 50 U Moles
- SUspension Membranaire ..... 2a 50 U Moles de Protéines Totales

ملاحظات :

١- تؤكسد الاغشية الخلوية للبكتريا P.mirabilis حموضا آمينية أخرى غير الـ L-Phénylalanine وبحضور الاكسجين . تتحقق هذه الاكسدة وبشكل خاص مع الحموض الامينية ذات السلسلة الجانبية غير القطبية ومع الحموض الامينية القلوية ان المماكبات - D - للحموض الامينية , L-Leucine , L-histidine , L-phénylalanine L-tryptophane تكون غير فعالة مع الانزيم المدروس (PELMONT , JABBOUR نتيجة غير منشورة).

٢- تحتوي الاغشية الخلوية المعزولة من البكتريا P.mirabilis أيضا على أنزيم (NADH oxydase)، وجدنا أن هذا الانزيم يفقد فعاليته بسرعة كبيرة مع الزمن على العكس من أنزيم (L-Phénylalanine oxydase) يستطيع أنزيم (NADH oxydase) أن يستخدم مادة فري سيانو البوتاسيوم كمستقبل للالكترونات على العكس من أنزيم (L-Phénylalaninie oxydase). وجدنا أيضا أن هذا الانزيم يرجع كل من مادة DCIP والسيتوكروم C.

٣- دل التخريب الحراري (Inactivation Thermique) للاغشية الخلوية المدروس في الدرجة (٥١) درجة مئوية على وجود فعاليتين أنزيميتين على الاقل قادرتين على أكسدة الحموض الامينية (JABBOUR , PELMONT): تكون

احدى هاتين الفعاليتين نوعية (Specifique) للحموض الامّينية ذات السلسلة الجانبية غير القطبية

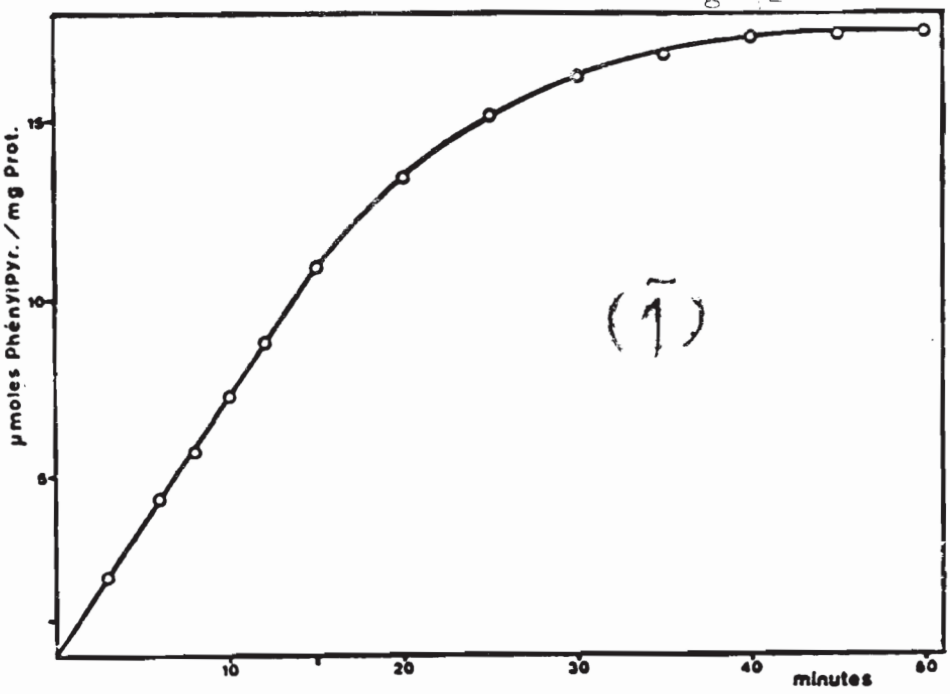
Phénylalanine , Tryptophane , Norleucine , Methioninie Leucine

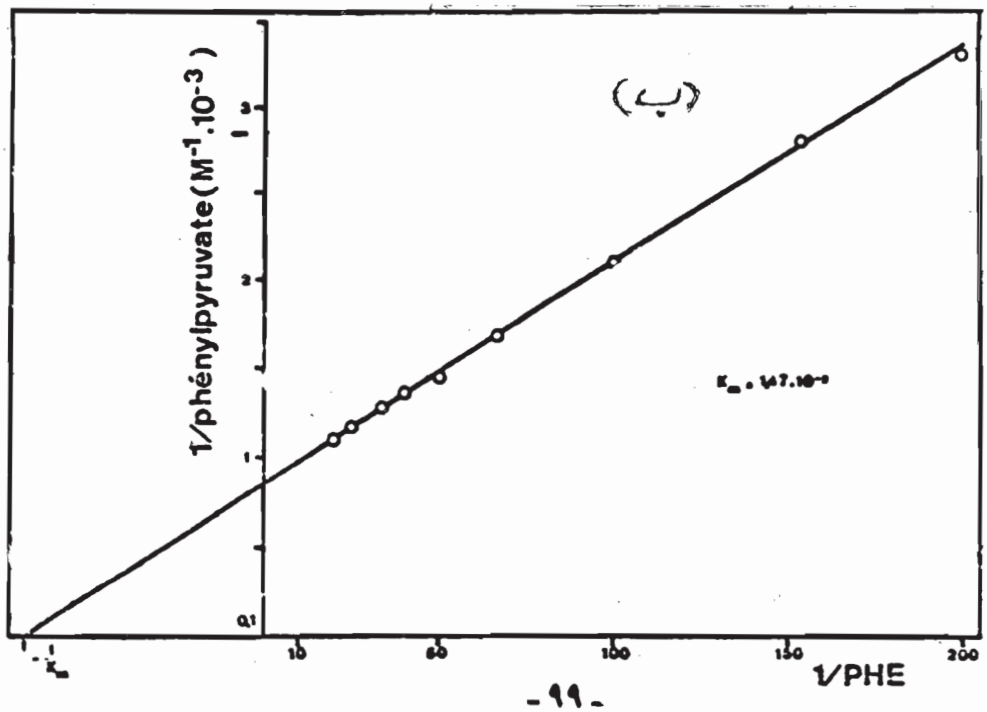
بينما تخص الثانية الحموض الامّينية ذات السلسلة الجانبية القلوية (Lysine , Histidine , Ornithine , arginine) . تتميز هاتان الفعاليتان عن بعضهما بوضوح بخاصة التخريب الحراري الذي يكون أكثر سرعة بالنسبة للفعالية الانزيمية الثانية .

صورة رقم (٢) آ_ حركية (Cinetique) اكسدة الحمض الاميني Phenylalanine الى Phenylpyruvate بدلالة الزمن .

تحضر الجزئيات الغشائية (١٠-٥٠ ميكروغرام من البروتين/مل) خلال ٢٠ دقيقة وبدرجة حرارة ٣٠ درجة مئوية بحضور (٥٠ مل مول) من L-Phenylalanine (١٠ مل مول) من $MgCl_2$ و١٠ ميللي مول من Tris - Maleate PH 7,5

ب _ سرعة (Vitesse) اكسدة الحمض الاميني L-Phenylalanine بدرجه حرارة ٣٠ درجة مئوية وبدلالة تركيز السوبيسترا .





1 - COSTERTON , J.W., INGRAM , J.M. et CHENG , K.J. (1974)
Bacteriol . Rev. , 38 , 87-110

2 - MUNOZ , E. , SALTON , M-R.J., N.G , M.H. et SCHOR , M.T.
Eur . J. Biochcm . , 7 , 490

3 - ABRAMS,A. (1965)
J. Biol. Chem., 240 , 3675 - 3681

4 - ROTHFIED ,L. et FINKELSTEIN. A. (1968)
Ann . Rev . Biochem. , 37 , 463

5 - ROTHFIELD , L. TAKESHITA,M. , PEARLMAN , M. , HORNE ,
R.W. (1966)
Federation Proc. , 25 , 1495

6 - MILNER , L. S. et KABACK , H.R. (1970)
Proc . Natl . Acad . Sci . U.S.A., 65 , 683 - 690

7 - KUNDIG , W. et ROSEMAN , S. (1971)
J. Biol . Chem. . , 246 , 1407 - 1418

8 - CUNNINGHAM , C.C. et HAGER , L.P. (1971)
J.Biol , Chem. , 246 , 1575

9 - HIROMICHI KIMURA et MASAMTISU FUTAI (1978)
J.Biol . Chem. , 253 , 1095 - 1100

10 - TANAKA , Y., ANRAKU , Y. et FUTAI , M.(1976)
J.Biochem. , 80 , 821 - 830

11 - DANIELLI , J.F. et DAVSON , H. (1935)
J. Cell . Comp . Physiol ., 5 , 495

12 - ROBERTSON , J.D. (1960)
Progr . Biophys . Biophys . Chem ., 10 , 343

13 - LUCY , J.A . (1964)
J. Theor . Biol. , 7, 360

14 - SJOSTRAND , F.S. (1965)
Protoplasma , 63 , 248

15 - BENSON , A.A. (1966)
J. Am . Oil . Chemists , Sic ., 43 , 265

16 - SINGER , S.J. et NICOLSON, G.L. (1972)
Science , 175 , 720

17 - NOSSAL , P.M. , KEECH , D.B. et MORTON , D.J. (1956)
Biochim . Biophys . Acta , 22 , 412

18 - FELDMAN , W.et O'KANE , D.J. (1960)
J. Bacteriol . , 80 , 218

19 - BERNHEIM , F . , BERNHEIM , M.L.C. et WEBSTER M.D (1935)
J. Biol . Chem . , 110 , 165 - 172

20 - PELMONT . JABBOUR (1973)
Biochimie , 55 , 237 - 244

21 - MEISTER , A. (1965)
Biochemistry of the amino-acide , Academic Press ,1, 304

22 - WITHOLT , B.et Coll . (1976)
Analytical Biochem . , 74 , 160 - 170

23 - HAZIN , M. , ROTEM , S. et RAZIN , S. (1975)
Biochim . Biophys . Acta , 375 , 381 - 394

24 - OLTMANN , L.F. , SCHOENMAKER , G.S. et STOUTHAMER ,
A.H. (1974)
Arch . Microbiol . , 98 , 19 - 30

25 - HENRIKSEN , S.D. (1950)
J. Bacteriol . , 60 , 225

26 - SHAW , C. et CLARK , P.H. (1955)
J. Gen - Microbiol . , 13 , 155

27 - HAMIDA , B. et LEMINOR , L. (1956)
Ann , Inst . Pasteur (Paris) , 90 , 671

28 - PELMONT , J. , ARLAUD , G. et ROSSAT , A.M. (1972)
Biochimie , 54 , 1359 - 1374

29 - STUMPF , P.K. et GREEN , D.E. (1944)
J. Biol . Chem . , 153 , 387 - 403

30 - MEISTER , A. (1963)
The Enzymes (BOYER , P.D. , LARDY , H.A. et MYRBACK , K. Academic Press , N.Y.), 7 , 609