BİLDİRİLER KİTABI



18. ULUSAL BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ

18-19 Aralık 2015
KONYA

www.biyoteknolojikongresi.com

Poster Bildiri P-HB-1

Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Karaciğer ve Böbrek Dokusundan Saflaştırılan Glutatyon Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Parametrelerinin Karşılaştırılması

Ercüment Aksakal[1], Ebru Akkemik[2], Harun Budak[3], Abdullah Tunç[1-3], Esra Günaydın[1]

[1]*Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum*

[2]*Siirt Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Siirt*

[3]*Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü, Erzurum*

eakkemik@siirt.edu.tr

Giriş

Endojen ve ekzojen kaynaklı olarak oluşan serbest radikaller, hücrelerdeki makromoleküllere kalıcı hasarlar vermeleri sebebiyle oldukça zararlıdırlar. Oluşan bu radikaller ve metabolitleri, vücudun kendi savunma mekanizmalarından biri olan antioksidan savunma ile zararsız hale getirilirler. Glutatyon redüktaz (NADPH; GSSG oksidoredüktaz, E.C.1.6.4.2) hücre için en önemli antioksidan bileşiklerden biri olan indirgenmiş glutatyonun (GSH) devamlılığını sağlayan antioksidan enzimlerden biridir. Belirtilen önemi de dikkate alındığında yaklaşık seksen yıldır GR enzimi birçok canlıdan saflaştırılmış, kinetik parametreleri araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada glutatyon redüktaz enziminin gökkuşağı alabalığının karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılması ve elde edilen karakterizasyon parametrelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntemler

Bu amaçla taze gökkuşağı alabalık karaciğer ve böbrek dokusundan homojenat hazırlandı. Elde edilen homojenat 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisine yüklendi. GSH ve NADPH'ın farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen gradientle enzim kolondan elüe edildi. Elde edilen enzim numunesi jel filtrasyon kromatografisine yüklendi. GR enzimi her iki dokudan belirtilen yöntemler kullanılarak üç kademede saflaştırıldı. SDS-PAGE ile enzimin saflığı kontrol edildi. Enzim aktivitesi Carlberg and Mannervik 1985'in metoduna göre 340 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Saflaştırılan enzimlerin optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E_a) ve Q_{10} değeri, stabil pH belirlendikten sonra NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Bulgular

Taze gökkuşağı alabalık karaciğer ve böbrek dokusundan GR enzimi sırasıyla 79,163, 1216,20 saflaştırma katsayısıyla, 1,512, 30,9614 EÜ/mg spesifik aktiviteyle yaklaşık %4-5 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan gökkuşağı alabalık karaciğer ve böbrek GR enzimlerinin karakterizasyon sonuçları ise sırasıyla optimum pH; her iki enzim için 50 mM KH_2PO_4 pH=7,5,optimum iyonik şiddet; 1 M (Küvet içi 200 mM), 0,8 M (Küvet içi 160 mM), optimum sıcaklık her iki enzim içinde 50°C, aktivasyon enerjisi (E_a); 1,99, 1,51(kal/mol) ve Q_{10} değeri; 1,05, 1,21, stabil pH; 50 mM Tris/HCl tamponunda pH:8,0, 50 mM K-fosfat tamponunda pH:6,0 olarak belirlendi. Gökkuşağı alabalık karaciğer ve böbrek GR enziminin NADPH ve GSSG substratları için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Sonuç ve Tartışma

Sonuç olarak her iki enzim üç basamakta saflaştırılırken gökkuşağı alabalık böbrek GR daha yüksek bir saflaştırma katsayısı ve spesifik aktiviteyle elde edilmiştir. Verim her iki enzim içinde jel filtrasyon kromatografisinden sonra oldukça azalmıştır. Bunun sebebi olarak jel filtrasyon prosedürünün uzunluğunun yanı sıra enzim çözeltisinin seyrelmesinin de sebep olabileceği düşünülmektedir. Karakterizasyon parametreleri karşılaştırıldığında her iki dokudan elde edilen enzim örnekleri için benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Teşekkür: Bu çalışma "114O366" nolu proje koduyla TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir