(مقاله پژوهشی)

ارزیابی شرایط آزمایشگاهی مناسب جهت مطالعه کینتیکی آنزیم کراتین کیناز استخراج شده از اسپرم انسان

سید محمد علی غفاری*[۱]، محمد آبرومند**، بهروز مطلق***

چکیده

زمینه و هدف: کراتین کیناز آنزیمی است که واکنش برگشت‌پذیر انتقال فسفات از ATP به کراتین را کاتالیز می نماید، که نتیجه آن ترکیب پر انرژی فسفوکراتین (فسفاژن) خواهد بود. فسفوکراتین نقش مهمی در تامین نیروی مورد نیاز اسپرم جهت حرکت ایفا می نماید؛ بنابراین عملکرد صحیح کراتین کیناز، عامل مهمی در تأمین انرژی مورد نیاز حرکت اسپرم خواهد بود. بر این اساس در این مطالعه شرایط آزمایشگاهی مناسب جهت مطالعات کینتیکی این آنزیم، پس از استخراج از اسپرم مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

روش بررسی: آنزیم کراتین کیناز طی مراحل مختلف شستشو، سانتریفیوژ و کروماتوگرافی روی ستون DEAE-32 از حدود ۳۰ میلی لیتر مایع منی به دست آمده از ۱۰ مرد سالم با میانگین سنی ۳۰ سال جدا گردید. در هر مرحله از این جداسازی میزان پروتئین به روش برادفورد و فعالیت کراتین کیناز به شیوه Rosolki مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت کراتین کیناز اسپرم انسان با افزایش غلظت کراتین فسفات از ۰/۵ تا ۱۰ میلی مولار حدود ۶۷ درصد افزایش می یابد. به علاوه تغییر pH از ۶ تا ۶/۸ نیز افزایشی در فعالیت این آنزیم نشان داد. در پایان مطالعه اثر دماهای مختلف (۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد) بر فعالیت کراتین کیناز اسپرم انسان یک افزایش فعالیت در ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد، برای این آنزیم نشان داد.

نتیجه گیری: بهترین غلظت سوبسترا، دما و PH برای مطالعات آزمایشگاهی بررسی فعالیت کراتین کیناز به دست آمده از اسپرم انسان، به ترتیب برابر با ۳ میلی مولار، ۴۰ درجه سانتی گراد و ۶/۸ می باشد. *م ع پ ۱۳۸۸؛ ۸ (۳): ۳۳۰-۳۲۳*

کلید واژگان: کراتین کیناز، کینتیک، اسپرم، الکتروفورز

مقدمه

کراتین کیناز (CK: EC 2.7.3.2) آنزیمی با وزن ملکولی حدود ۸۲ کیلو دالتون است که اساساً در بازسازی ATP در سیستم‌های انقباضی و انتقالی فعالیت می‌نماید. این آنزیم واکنش برگشت‌پذیر انتقال فسفات را از ATP به کراتین و در نتیجه تولید فسفوکراتین (فسفاژن) را کاتالیز می‌نماید(۲ و ۱). فسفو کراتین اولین بار توسط اگلتون(Eggleton) در سال ۱۹۲۸در بافت عضلانی شناسایی شد که او آن را به عنوان منبع شیمیایی تأمین کننده انرژی جهت انقباض عضله مطرح نمود (۳). خالص سازی کراتین کیناز توسط کوبی(Kuby) و همکاران(۴) درسال ۱۹۵٤ از عضله خرگوش انجام گرفت و در سال ۱۹٦۷، ساختمان اول آن توسط داوسن (Dawson) (۵) و همکاران تعیین گردید.

* دانشیار بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

** استادیار بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

*** دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

۱- نویسنده مسوول: Email: ghaffarima@yahoo.com

دریافت مقاله ۱۳۸۷/۲/۲٦ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۸/۳/۱۳ اعلام قبولی: ۱۳۸۸/٤/۱٦

Archive of SID

www.SID.ir

کراتین کیناز دارای یک ساختمان دیمر بوده که در سه فرم عضلانی (CK-MM)، مغزی (CK-BB) و قلبی- عضلانی (CK-MB) در بافت‌های پستانداران یافت می‌شود (۶). کراتین کیناز جدا شده از اسپرم و مایع سمینال انسان در دو فرم کراتین کیناز میتوکندریایی ($CK\text{-}M_iM_i$) و کراتین کیناز سیتوزولی (CK-BB) می‌باشد. کراتین کیناز سیتوزولی در دم اسپرم یافت می شود در حالی که کراتین کیناز میتوکندریایی به طور اختصاصی در میتوکندری‌های قطعه میانی اسپرم وجود دارد (۷).

انتقال قابل برگشت فسفات پرانرژی بین ATP و فسفوکراتین از طریق کراتین کیناز نه تنها موجب حفظ سطح فسفات پرانرژی ($\sim P_i$) در سرتاسر سلول می‌شود، بلکه از طریق شاتل فسفوکراتین در انتقال انرژی به جایگاه‌های خاص سلولی نیز حائز اهمیت است (حضور کراتین کیناز میتوکندریایی و کراتین کیناز سیتوزولی موجب تشکیل شاتل فسفوکراتین می‌گردد).

در اسپرم، نیروی مورد نیاز برای حرکت اسپرم از طریق این شاتل تأمین می‌گردد؛ به طوری که کراتین کیناز میتوکندریایی موجود در قطعه میانی اسپرم موجب سنتز فسفوکراتین (فسفاژن) می شود. این فسفاژن از قطعه میانی به سمت ناحیه دم انتشار یافته و در آن جا توسط کراتین کیناز سیتوزلی جهت تولید ATP مورد استفاده قرار می گیرد و بدین طریق شاتل فوق ATP مورد نیاز جهت انقباض تارهای عضلانی دم اسپرم را فراهم نموده و موجب حرکت اسپرم می‌شود (۱۰-۸). بر این اساس در این مطالعه شرایط آزمایشگاهی مناسب جهت مطالعات کینتیکی این آنزیم، پس از استخراج از اسپرم انسان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مواد مورد استفاده: ADP، AMP، NADP، گلوکز۶-فسفات دهیدروژناز، هگزوکیناز، ترایتون X-100 و دی-اتیل آمین سلولز ۳۲ از شرکت آمریکایی سیگما خریداری شد. اتیلن دی-آمین ترا استیک اسید و آلبومین سرم گاوی نیز از شرکت آلمانی مرک تهیه گردیدند.

جداسازی کراتین کیناز از اسپرم: جهت استخراج آنزیم کراتین کیناز از اسپرم انسان، حدود ۳۰ میلی لیتر پول منی (نمونه ها، از نمونه های پرتی(Out) اسپرم آزمایشگاه های تشخیص طبی انتخاب شدند. این ماده دارای حجم بیشتر از ۳ میلی لیتر، غلظت اسپرم بیشتر از ۵۰ میلیون در هر میلی لیتر و حرکت بیشتر از ۶۰ درصد بودند) بودند که از ۱۰ مرد سالم در محدوده سنی ۲۵ تا ۳۵ سال بدست آمده بودند و توسط بافر immobilizing (محتوی تریس-HCl ۳۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۸۰ میلی مولار، کلریدپتاسیم ۴۰ میلی مولار، کلرید کلسیم۰/۱ میلی مولار با PH برابر ۸/۲) به میزان ۱۰ برابر رقیق گردیدند. سپس به مدت ۱۵دقیقه در دور ۲۰۰۰×g توسط سانتریفیوژ معمولی مدل Damon/IEC سانتریفیوژ شدند. بخش رسوب بدست آمده در ۲۴ میلی لیتر بافر سرد محتوی فسفات سدیم (۵۰میلی مولار)، کلریدسدیم (۱۵۰میلی مولار)، EDTA (۰/۲ میلی مولار)، آزیدسدیم (۱میلی مولار) وترایتون x-100 (۱درصد) با PH برابر ۷/۲ به فرم سوسپانسیون در آورده شد و به مدت۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه اینکوبه گردید. سپس این سوسپانسیون در دور ۲۰۰۰۰×g توسط سانتریفیوژ با سرعت بالا مدل Damond B60 به مدت ۳۰دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از انجام این مرحله، محلول رویی(Supernatant) (محتوی آنزیم کراتین کیناز است) جهت ادامه مراحل تخلیص آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

تخلیص آنزیم کراتین کیناز: برای تخلیص آنزیم از روش کروماتوگرافی ستونی با استفاده از ژل دی اتیل آمینو اتیل ۳۲ سلولز (DEAE-32 Cellulose) که نوعی ژل تعویض یونی (آنیونی) است، استفاده گردید (۹). به ژل فعال شده، مقداری بافر تریس(هیدروکسی متیل) آمینو متان (۰/۰۲ درصد با PH=۸) اضافه گردید. رزین آماده شده با پی پت پاستور از جداره ستون کروماتوگرافی (

Archive of SID
www.SID.ir

۲×۲۰ سانتی متر) به داخل ستون ریخته شد. سپس ستون توسط بافر تریس (۰/۰۲ درصد با PH=۸) شستشو گردید و این عمل تا زمانی که PH بافر خروجی ۸ می شد، ادامه پیدا می نمود. در مرحله بعد، محلول حاصل ازآخرین مرحله قبلی، توسط پیپت پاستور روی ژل ریخته شد. پس از نفوذ نمونه به داخل ژل، با استفاده از پمپ پریستالتیک، جریان بافر تریس (۰/۰۲ درصد با PH=۸) روی ستون حاوی ژل برقرار گردید. میزان سرعت جریان بافر(Flow Rate) از ستون در هر دقیقه یک میلی لیتر تنظیم شد.۳۰۰میلی لیتر محلول کلرید سدیم به صورت گرادیانی از صفر تا ۰/۶ مولار از ستون عبور داده شد و محلول خارج شده از ستون در حجم ۳ میلی لیتر توسط دستگاه فراکشن کالکتور جمع آوری گردید. در مرحله بعد جذب نوری فراکسیونهای جمع آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد، که فراکسیون های شماره ۲۵ تا ۷۵ در این طول موج دارای جذب بوده و دو قله را در این محدوده تشکیل دادند.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کراتین کیناز: در این پروژه جهت سنجش فعالیت آنزیم کراتین کیناز از روش Rosalki استفاده گردید (۱۱). طبق تعریف، یک واحد فعالیت آنزیم کراتین کیناز، مقدار آنزیمی است که در دقیقه، یک میکرومول فسفات را از فسفو کراتین به ADP، انتقال دهد. جهت سنجش فعالیت آنزیم، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس و۵۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا (کراتین فسفات) در لوله آزمایش کاملاً مخلوط شدند. به مخلوط فوق،۳۰۰ میکرولیتر محلول ADP،۲۰۰ میکرولیتر محلول AMP،۲۰۰ میکرولیتر محلول گلوکز، ۱۰۰میکرولیتر محلول گلوکوکیناز،۲۰۰میکرولیتر محلول G6PD، ۲۰۰میکرولیتر محلول NADP و۱۰۰ میکرولیتر محلول استات منیزیم اضافه شد. سپس به مخلوط حاصل، مقدار ۱۰۰میکرولیتر از نمونه محتوی آنزیم اضافه شده و به خوبی مخلوط گردید و تغییرات جذب در ۳۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد و در نهایت با استفاده از فرمول ذیل فعالیت آنزیم تعیین گردید (۱۱).

× تغییرات جذب نوری در دقیقه = فعالیت آنزیم کراتین کیناز

۴۸۰۰ × تغییرات جذب نوری = ۲/۰۷ / ۱۰۰۰۰

غلظت پروتئین در نمونه های تحت مطالعه با استفاده از روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت (۱۲) و جهت تأیید استخراج آنزیم، آخرین نمونه مرحله استخراج توسط الکتروفورز پلی اکریل آمید (PAGE) در مقابل سه مارکر پروتئینی مورد مطالعه قرار گرفت (۱۳).

جهت مطالعه شرایط آزمایشگاهی مناسب کینتیک این آنزیم، ابتدا اثر غلظت‌های مختلف سوبسترا (کراتین فسفات) (۱۰ mM- ۰/۵) بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز بررسی گردید. سپس فعالیت یک واحد آنزیم کراتین کیناز (معادل ۱۰۰ میکرولیتر استوک آنزیمی) در زمان های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) محاسبه شد. همچنین جهت بررسی اثرات PH و دما بر فعالیت آنزیم، تأثیر ۵ مقدار PH مختلف (۶ ، ۶/۴ ، ۶/۸، ۷/۲ و ۷/۶) و نیز ۷ دمای متفاوت (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ ، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتی گراد) بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه هر داده معرف سه بار تکرار مجزا بود که به صورت میانگین ± انحراف معیار مشخص شده بود.

یافته ها

نتایج حاصل از مراحل مختلف تخلیص آنزیم کراتین کیناز از اسپرم انسان نشان داد که در پایان مرحله استخراج، آنزیم فوق به میزان حدود ۱۲ بار تخلیص شده و بازده عمل با روش مورد استفاده در این مطالعه حدود ۴۵/۳ درصد بوده است. از طرفی میزان فعالیت ویژه آنزیم در نمونه بدست آمده از آخرین مرحله استخراج نیز حدود ۴/۴ واحد بین المللی بر میلی‌گرم بدست آمد (جدول ۱). جهت تأیید جداسازی کراتین کیناز، نمونه بدست آمده از آخرین مرحله تخلیص در مقابل سه مارکر پروتئینی (در

Archive of SID
www.SID.ir

محدوده وزن ملکولی ۴۰ تا ۹۴ کیلودالتون) توسط الکتروفورز PAGE مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

همان طور که شکل۱ نشان می دهد، حضور یک باند تک با وزن ملکولی حدود ۸۲ کیلودالتون تأییدی بر جداسازی مناسب کراتین کیناز از اسپرم انسان است.

نتایج حاصل از بررسی اثر زمان و غلظت سوبسترا (فسفوکراتین) بر فعالیت کراتین کیناز نشان داد که افزایش زمان موجب کاهش فعالیت آنزیم به میزان حدود ۲۵ درصد می شود (نمودار۱)، در حالی که افزایش غلظت سوبسترا فعالیت آن را به مقدار حدود ۶۷ درصد افزایش می دهد (نمودار۲).

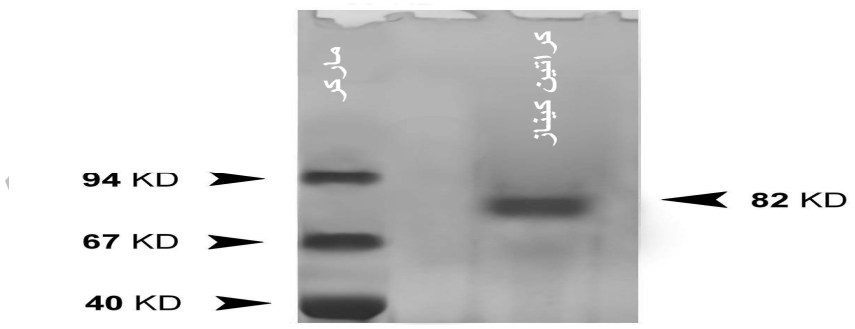
افزایش PH در محدوده ۶ تا ۷/۶ نشان داد که با افزایش PH از ۶ تا ۶/۸، فعالیت آنزیم افزایش یافته است در حالی که از این محدوده به بعد (تا PH معادل ۷/۶) فعالیت آنزیم کراتین کیناز کاهش پیدا کرده است (نمودار۳).

در محدوده دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد با افزایش دما تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم افزایش پیدا نمود، اما بعد از آن فعالیت آنزیم به سرعت رو به کاهش گذاشت، به طوری که در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هیچ گونه فعالیتی مشاهده نشد (نمودار۴).

جدول۱: مراحل تخلیص آنزیم کراتین کیناز از اسپرم انسان

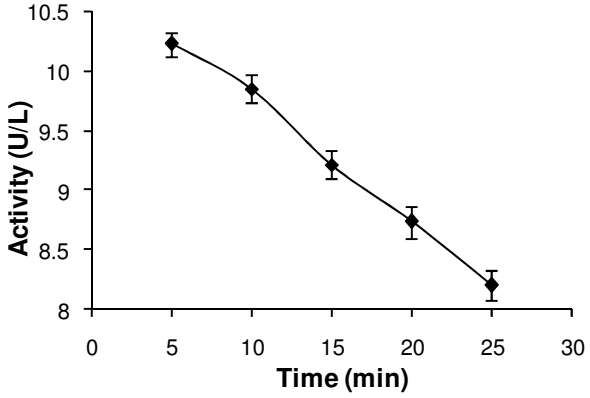
مراحل استخراج	حجم کل(میلی لیتر)	توتال پروتئین (میلی گرم)	توتال آنزیم (واحد)	فعالیت ویژه (واحد/میلی گرم)	بازده (درصد)	فاکتورخالص سازی
قبل از سانتریفیوژ	۱۲۰	۱۱۷	۴۳/۶	۰/۳۷	۱۰۰	۱
سوسپانسیون	۸۵	۵۸/۷۶	۲۹/۳۸	۰/۵	۶۷/۴	۱/۳۵
قبل از کروماتوگرافی	۴۳	۲۰/۵۸	۲۵/۷۲	۱/۲۵	۵۹	۳/۳۸
پس از کروماتوگرافی	۲۵	۴/۵۲	۱۹/۷۵	۴/۴	۴۵/۳	۱۱/۹

غلظت پروتئین توسط روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و داده های مربوط به بازده هر مرحله از درصد، نسبت فعالیت آنزیم آن مرحله به فعالیت آنزیم در مرحله قبل از سانتریفیوژ بدست آمد.

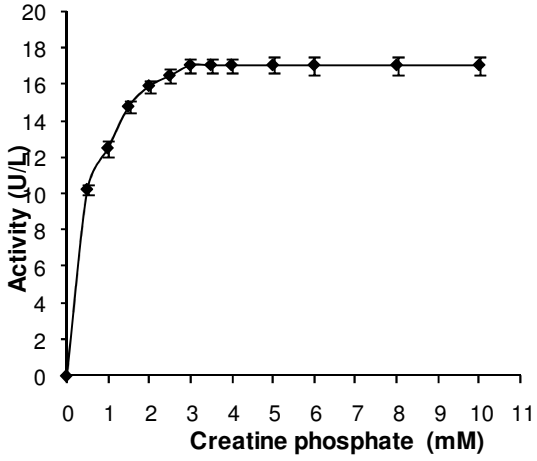


شکل۱: مقایسه حرکت الکتروفورزی سه مارکر Taq DNA polymerase (۹۴ کیلو دالتون)، آلبومین (۶۷ کیلو دالتون) و سوپر اکسید دیسموتاز (۴۰ کیلو دالتون) با آنزیم کراتین کیناز استخراج شده از اسپرم انسان بر روی ژل پلی آکریل آمید، ۷/۵ درصد.

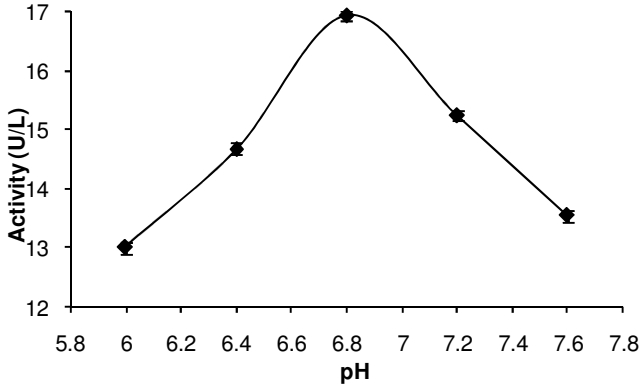
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۱: اثر زمان بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز اسپرم انسان.

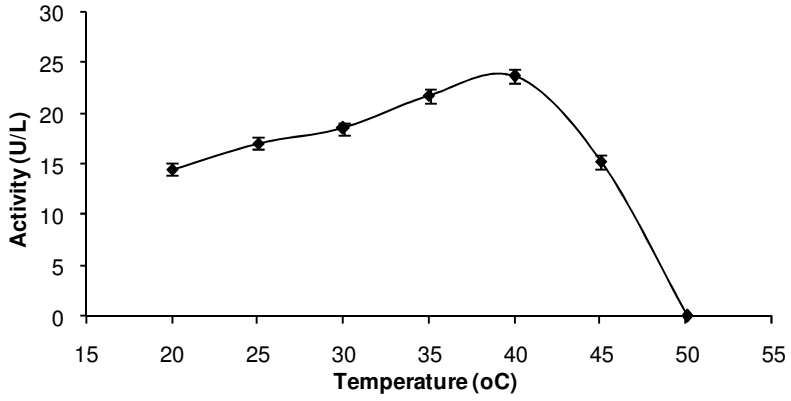


نمودار۲: اثر غلظت‌های مختلف کراتین فسفات (mM ۱۰- ۰/۵) بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز اسپرم انسان



نمودار۳: اثر PH بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز اسپرم انسان

www.SID.ir



نمودار۴: اثر دما بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز اسپرم انسان

بحث

کراتین کیناز، یکی از مهمترین آنزیم های دخالت کننده در حرکت اسپرم ها می باشد که بدست آوردن شرایط مناسب آزمایشگاهی جهت اندازه گیری آن در نمونه اسپرم، نقش مهمی جهت بررسی عملکرد مناسب اسپرم می تواند داشته باشد (۱). بر این اساس در مطالعه فوق شرایط مناسب آزمایشگاهی از نظر غلظت سوبسترا، دما، زمان و PH برای آنزیم کراتین کیناز پس از جداسازی از اسپرم تعیین گردید. نتایج حاصل از استخراج کراتین کیناز از نمونه های اسپرم انسان با استفاده از کروماتوگرافی روی ژل DEAE سلولز مشخص نمود که آنزیم فوق با یک بازده خوبی از اسپرم جدا شده است، به نحوی که میزان کراتین کیناز بدست آمده از آخرین مرحله استخراج در مقایسه با محلول اولیه حدود ۱۲ بار خالص تر شده است. همچنین فعالیت ویژه آنزیم و بازده عمل آن به ترتیب حدود ۴/۴ واحد بین‌المللی بر میلی گرم پروتئین و۴۵ درصد بود.

بر اساس گزارش گرزیب(Grzyb) و همکاران بازده عمل استخراج کراتین کیناز از اسپرماتوزوآی شاه ماهی حدود ۳۰ درصد بیان شده است (۱۴) و طبق گزارش دیگری که در مورد استخراج کراتین کیناز از عضله اسکلتی بیان شده است، میزان خلوص، حدود ۸ بار و بازده عمل، حدود ۴۴ درصد عنوان گردیده است (۱۵). این گزارشات تأییدی بر جداسازی مناسب آنزیم فوق در این مطالعه است و تفاوت مشاهده شده می تواند به خاطر نوع نمونه های به کار گرفته شده باشد. بر اساس مقایسه تک باند بدست آمده از مرحله پایانی استخراج با مارکرهای پروتئینی پلی مراز (۹۴ کیلودالتون)، آلبومین (۶۷ کیلودالتون) و سوپراکسید دیسموتاز(۴۰ کیلودالتون) روی ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) وزن ملکولی آنزیم استخراج شده حدود ۸۲ کیلودالتون تخمین زده شد.

گزارش ارائه شده توسط لی(Lee) و همکارانش بر روی کراتین کیناز استخراج شده از عضله اسکلتی انسان نشان داد که وزن ملکولی آن حدود ۸۰ کیلودالتون است (۱۶) و طبق سایر مطالعات که روی کراتین کیناز جدا شده از عضله اسکلتی کانگورو (۱۷) و عضلات پستان خفاش وزن ملکولی کراتین کیناز از آن ها به ترتیب حدود ۸۶ کیلودالتون و بین ۷۸ تا ۸۰ کیلودالتون (۱۸) تخمین زده شد. بنابراین با توجه به گزارشات ارائه شده می توان چنین پیشنهاد نمود که کراتین کیناز جدا شده از اسپرم انسان در این مطالعه مشابه نوع عضلانی آن (CK-MM) می باشد. نتایج فوق نشان می دهند که آنزیم کراتین کیناز به طور مناسبی استخراج شده است و از این رو می تواند تأیید مجددی بر مطالب عنوان شده فوق باشد.

در ادامه مطالعه اثرات زمان، غلظت کراتین فسفات (به عنوان سوبسترا)، PH و دما بر فعالیت آنزیم کراتین کیناز استخراج شده از اسپرم انسان جهت بدست آوردن شرایط مناسب آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از اثر زمان بر فعالیت یک واحد آنزیم نشان داد که در اثر افزایش زمان، فعالیت آنزیم کاسته شده و در واقع یک ارتباط غیر مستقیم بین آنها برقرار می باشد.

بررسی تأثیر غلظت های مختلف کراتین فسفات نشان داد که با افزایش غلظت سوبسترا، فعالیت آنزیم نیز افزایش می‌یابد؛ به طوری که بهترین غلظت سوبسترا جهت فعالیت بهینه آنزیم، مقدار ۳ میلی مولار کراتین

Archive of SID
www.SID.ir

فسفات می‌باشد. نتایج به دست آمده از مطالعه تأثیر PH و دما بر روی فعالیت آنزیم، مشخص نمود، که بهترین دما و PH جهت فعالیت مناسب آنزیم کراتین کیناز، به ترتیب ۴۰ درجه سانتی گراد و ۶/۸ می‌باشد.

مطالعه ملیکشتین(Meliksetian) (۱۹) حاکی از آن بود که کراتین کیناز استخراج شده از عضله قلب انسان در محدوده وسیعی از PH (حدود ۵ تا ۸) دارای فعالیت بوده که ماکزیمم فعالیت آن در PH برابر با ۶ تا ۶/۷ تعیین حاصل شده بود. در مطالعه ما نیز مشخص شد که کراتین کیناز اسپرم انسان در محدوده PH حدود ۶ تا ۸ دارای فعالیت بوده که ماکزیمم فعالیت آن مربوط به PH های ۶/۴ تا ۶/۸ است. نتایج فوق می تواند تأییدی بر تشابه این نوع کراتین کیناز با فرم عضلانی آن باشد.

شرایط مناسب آزمایشگاهی بدست آمده در این مطالعه می تواند به عنوان شرایط بهینه جهت سنجش فعالیت آنزیم کراتین کیناز اسپرم انسان در بررسی های عملکردی مناسب این آنزیم، در مردانی قرار گیرد که از جنبه حرکت اسپرم و در نتیجه زایایی دچار مشکل هستند.

قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به خاطر تأمین منابع مالی مورد نیاز این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1- Ellington WR. A dimeric creatine kinase from a sponge: implications in terms of Phosphagen kinase evolution. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2000;126:1-7.
2- Oliveria PRP, Rodrigues-Junior V, Rech VC and Wammacher CMD. Cystine inhibits creatine kinase activity in pig retina. Arch Med Res 2007;38:164-9.
3- Eggleton P, Eggleton GP. Further observations of phosphagens. J Physiol 1928;65:15-24.
4- Kuby SA, Noda L, Lardy HA. Adenosine triphosphate creatine trans phosphorylase I: Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle. J Biol Chem 1954;209:191-201.
5- Dawson D, Eppenberger H, Kaplan N. The comparative enzymology of creatine kinase II, physical and chemical Properties. J Biol Chem 1967;242:210-7.
6- Grzyb K, Skorkowski EF. Characterization of creatine kinase isoforms in herring (Clupea harengus) skeletal muscle. Comp Biochem Physiol Part B 2005; 140:629-34.
7- Miyaji K. Creatine Kinase Isoforms in the Seminal Plasma and the Purified Human Sperm. Arch Androl 2001;46:127-34.
8- Tombes RM, Shapiro BM. Enzyme termini of a phosphocreatine shuttle. J Biol Chem 1987;262:16011-9.
9- Bessman SP, Carpeter CL. The creatine- creatine phosphate energy shuttle. Annu Rev Biochem 1985;54:831-65.
10- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase in tissues with high and fluctuating energy demands: The phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. Biochem J 1992;281:21-40.
11- Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. J Lab Clin Med 1967;69:696-705.
12- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
13- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
14- Grzyb K, Skorkowski EF. Purification and some properties of two creatine kinase isoforms from herring (Clupea harengus) spermatozoa. Comp Biochem Physiol, Part B 2006;144:152-8.
15- Takasawa T, Shiokawa H. Isolation and properties of creatine kinase from porcine skeletal muscle. J Biochem 1981;90:194-204.
16- Lee CS, Nicholson GA, O'Sullivan WJ. Some properties of human skeletal muscle creatine kinase. Aust J Biol Sci 1977;30:507-15.
17- Grossman G, O'Sullivan WJ. Eastern grey kangaroo muscle creatine kinase. Aust J Bio Sci 1981;34:269-82.
18- Afolayan A, Daini OA. Isolation and properties of creatine kinase from the breast muscle of tropical fruit bat, Edolon helvum (kerr). Com Biochem physiol B 1986;85:463-8.
19- Meliksetian GO, Mkrtchian ZS, Akopian ZHI. Purification and various properties of creatine kinase MM isoenzyme from the human heart muscle. Vopr Med Khim 1987;33:112-6.

Archive of SID
www.SID.ir

Evaluation of optimum *in vitro* for creatine kinase enzyme kinetic study of isolated from human sperm

Ghaffari MA*, Abromand M, Motlagh B

Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract

Background and Objectives: Creatine kinase catalyzes the reversible transfer of a phosphoryl group from ATP to creatine, producing phosphocreatine (phosphagen). Phospho creatine as an energy source has an important role for sperm motility. Therefore, proper function of creatine kinase is the main factor of energy preparation for sperm movement. The aim of this study was to study the optimum *in vitro* creatine kinase enzyme kinetic after its isolation from human sperm.

Subjects and Methods: Creatine kinase was extracted from approximately 30 ml human semen related to 10 health men with age average 30 ± 5 years, after washing, centrifuge and chromatography of sperms on DEAE-32 column. In each step of purification, protein levels and enzyme activity were assayed according to Bradford and Rosalki methods, respectively.

Results: Results this study showed that human sperm creatinine kinase activity increased by 67% with increase of the creatine phosphate concentration from 0.5 to 10 mM. Moreover pH change from 6 to 6.8 also showed an increase in the activity of this enzyme. Ceatine kinase activity increased in the temreure range of 20 to 40 °C.

Conclusion: Our results showed that the most suitable substrate concentration, temperature and pH for optimum activity of human sperm creatine kinase were at 3 mM, 40°C and 6.8 respectively.

Keywords: Creatine kinase, Kinetic, Sperm, Electrophoresis

Received: 15/May/2008 **Revised: 3/Jun/2009** **Accepted: 7/Jul/2009**

Archive of SID

*Corresponding author email: ghaffarima@yahoo.com

www.SID.ir