Archive of SID



# تخلیص و تعیین برخی خصوصیات اگزالات اکسیداز جو

دکتر حمیدراهی*؛ دکتر علی مصطفایی**؛ مهندس بیژن نعمانپور***

## چکیده

***سابقه و هدف:*** *آنزیم اگزالات اکسیداز از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که کاربردهای متنوعی در صنعت و پزشکی دارد. در این مطالعه، این آنزیم از ریشه جو خالص شد و بخشی از خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت.*

***مواد و روش ها:*** *پس از کشت جو و تهیه عصاره ریشه آن، آنزیم طی مراحل حرارت‌دهی (۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه)، رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و در دو مرحله کروماتوگرافی تعویض یون خالص شد. بررسی خلوص و تعیین وزن آنزیم با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) در شرایط احیایی و غیراحیایی انجام گرفت. تعیین فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی و رنگ‌آمیزی اختصاصی در ژل انجام گرفت. برای تعیین نقطه ایزوالکتریک از دو روش ایزوالکتریک فوکوسینگ و کروماتوفوکوسینگ استفاده شد. افزون بر این تأثیر غلظت‌های مختلف اگزالات، غلظت‌های مختلف اوره و تأثیر چند دترجنت در فعالیت آنزیم بررسی گردید.*

***یافته ها:*** *وزن آنزیم اگزالات اکسیداز که بیش از ۶۶۸ بار از ریشه جو خالص شد، در SDS-PAGE احیایی و غیراحیایی به‌ترتیب معادل ۲۶-۲۵ و ۱۲۰-۱۱۵ کیلو دالتون بود. شکل تک‌واحدی آنزیم فعالیتی در ژل نداشت و تنها در صورت حفظ ساختمان کامل، آنزیم فعال بود. حداقل دو بخش با نقاط ایزوالکتریک (pI) مختلف با فعالیت اگزالات اکسیدازی در ریشه جو مشاهده شد. pI این دو ایزوآنزیم که گزارشی در مورد یکی از آن دو دیده نشده، به‌ترتیب ۶/۸ و ۶/۲-۶ تخمین زده‌شد. آنزیم خالص‌شده در مقابل انواعی از عوامل واسرشته‌کننده‌ها همچون گرما، غلظت‌های پایین اوره و انواعی از دترجنت‌ها مقاوم بود.*

***بحث:*** *با اطلاعات بدست آمده از روش تخلیص آنزیم و خصوصیات آن، امکان استفاده از این آنزیم در اندازه گیری اگزالات فراهم شده است.*

***کلیدواژه‌ها:*** *اگزالات اکسیداز، تخلیص، جو، خصوصیات*

*« دریافت: تابستان ۱۳۸۳ پذیرش: تابستان ۱۳۸۴»*

---

* دانشیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

** دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

** **عهده‌دارمکاتبات:** مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، سرخه لیژه، بلوار دانشگاه، کرمانشاه. تلفن: ۴۲۲۹۴۰۲.

E-mail: amostafaie@kums.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

آنزیم اگزالات اکسیداز با نام اختصاری oxo (EC.1,2,3,4) از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که در حضور اکسیژن مولکولی، اگزالات را به آب اکسیژنه و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید(۱و۲). بسیاری از قارچ‌ها پس از آلوده‌کردن گیاه، اگزالات را به‌عنوان ماده سمی تولید می‌کنند. گیاه نیز در پاسخ با استفاده از این آنزیم، اگزالات را تجزیه می‌کند و از محصولات عمل، به‌ترتیب در چرخه کربن و تولید ماده ضدقارچی استفاده می‌کند (۴-۲). آنزیم اگزالات اکسیداز تاکنون از گیاهان مختلفی از جمله گندم، جو، برنج، ذرت، چغندر قند و علف تلخه جدا و شناسایی شده است. تفاوت انواع ایزوآنزیم‌های این آنزیم در گیاهان مختلف در تعداد اسیدهای آمینه، شرایط واکنش، ساختمان کلی آنزیم و تعداد زیر واحدهای آن می‌باشد(۵و۶).

آنزیم اگزالات اکسیداز استفاده‌های متنوع و متعددی در صنایع غذایی، کشاورزی، دامی و پزشکی دارد(۱۶-۷). از موارد استفاده این آنزیم در پزشکی، اندازه‌گیری دقیق و کمی سطح سرمی و ادراری اگزالات در بیماران اگزالمیا و بیماران مبتلا به سنگ‌های ادراری می‌باشد (۱۶-۱۴). افزون بر این بحث درمان سنگ‌های کلیوی (۱۷) و هیپراگزالمیای اولیه با این آنزیم یا ژن آن، از مباحث جالب‌توجهی است که در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۱۸و۱۹). موارد استفاده متعدد آنزیم اگزالات اکسیداز در صنایع مختلف و استفاده از آن در طراحی کیت اندازه‌گیری اگزالات سرم و ادرار، اهمیت تخلیص و تعیین خصوصیات آن را به‌وضوح روشن می‌سازد. در مطالعه حاضر هدف بر آنست که آنزیم با روشی نسبتاً ساده و کم‌هزینه تخلیص و بخشی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن بررسی گردد. دسترسی به آنزیم خالص، قدم مهمی برای طراحی کیت اندازه‌گیری اگزالات به روش آنزیمی محسوب می‌شود که در مرکز تحقیقات بیولوژیکی در حال انجام می‌باشد. قابل ذکر است که با توجه به مشکلات تخلیص آنزیم اگزالات اکسیداز، این آنزیم معمولاً به‌صورت نیمه‌خالص توسط شرکت‌های مربوطه (همچون شرکت سیگما) عرضه می‌گردد.

## مواد و روش‌ها

***کشت هیدروپونیک جو:*** ابتدا مقدار کافی دانه جو با محلول سولفات مس ۰/۱ درصد (w/v) به مدت ده دقیقه شسته شد. سپس در آب شرب به مدت یک شب در دمای آزمایشگاه به صورت غوطه‌ور قرار گرفت. روز بعد دانه‌ها در لای پارچه خیس قرار گرفت و در سبدهای دارای روزنه‌های ریز، در محیط تاریک قرار داده‌شد. ریشه‌ها طی ۶-۳ روز دو تا سه مرتبه بریده شدند. جوانه‌ها نیز قبل از سبز شدن بریده شد و تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری شدند.

***استخراج عصاره جو:*** ریشه یا جوانه با یک حجم آب سرد حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) یک میلی‌مولار در مخلوط‌کن همگون شد. عصاره از سه لایه صافی پارچه‌ای عبور داده‌شد . محلول حاصل ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و مایع رویی آن جدا و رسوب دور ریخته شد .

***تفکیک بخش آنزیمی با کمک سولفات آمونیوم و حرارت:*** به مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، سولفات آمونیوم تا غلظت نهایی ۷۰ درصد اضافه گردید. عصاره ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g در دمای ۴ درجه سانتریفوژ شد .

www.SID.ir

Archive of SID



رسوب حاصله در حجم کمی بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۲ حل و یک شب در مقابل این بافر دیالیز گردید. محلول دیالیزشده به مدت ۳ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. سپس در ظرف یخ به سرعت سرد گردید . محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و مایع رویی برای مراحل بعد نگهداری گردید.

***کروماتوگرافی تعویض یون:*** مراحل نهایی تخلیص شامل کروماتوگرافی تعویض یون در دو ستون دی‌اتیل آمینواتیل سلولز (واتمن) و دی‌اتیل آمینواتیل سفارز (فارماسیا) بود. ستون شیشه‌ای به ارتفاع ۲۵ و قطر داخلی ۲ سانتی‌متر با رزین دی‌اتیل آمینواتیل سلولز پر گردید و با حجم زیادی از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH معادل ۷/۲ شسته شد تا به تعادل رسید. نمونه پروتئین با غلظت ۱۵- ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر وارد ستون گردید. سپس جریان بافر با سرعت ۲۵ میلی‌لیتر در ساعت بر ستون برقرار گردید. پس از رسیدن جذب خروجی به نزدیک صفر (در طول موج ۲۸۰ نانومتر) بافر فسفات حاوی شیب خطی تا یک مولار کلریدسدیم در بافر به ستون وارد شد. لوله‌های حاوی آنزیم مخلوط گردید و در مقابل بافر فسفات ۰/۰۰۵ مولار با pH برابر۷/۲ دیالیز گردید. سپس به ستون تعویض یون دوم (ستون دی‌آتیل آمینواتیل سفارز) که با همان بافر به تعادل رسیده بود، وارد گردید. پس از رسیدن جذب مایع خروجی ستون به‌نزدیک صفر، شیب غلظت ۰/۰۰۵-۰/۰۵ مولار بافر فسفات با pH برابر ۷/۲ بر ستون اعمال گردید. لوله‌های حاوی آنزیم مخلوط و محتوای آن‌ها با سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۷۰ درصد رسوب داده شد. رسوب به‌دست آمده با سانتریفیوژ جدا و در مقابل آب مقطر یا بافرهای مورد نظر دیالیز گردید.

***اندازه‌گیری فعالیت آنزیم:*** اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اگزالات اکسیداز بر اساس روش Laker و همکاران (۲۰) با کمی تغییرات انجام گرفت. برای بررسی فعالیت آنزیم میزان پراکسید هیدروژن تولیدشده در واکنش را که باعث تغییر رنگ ماده ۳- متیل، ۱و۲ بنزوتیازولینون هیدرازون (MBTH) در حضور آنزیم پراکسیداز می‌گردد، اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل بافر سوکسینات ۵۰ میلی‌مولار با pH معادل ۳/۸ حاوی MBTH ۰/۰۰۳ درصد، دی‌متیل آنیلین (DMA) ۰۱۳ /۰ درصد، پراکسیداز ۲ واحد در میلی‌لیتر، اگزالات پتاسیم ۰/۲۵ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه آنزیمی در حجم ۲/۲ میلی‌لیتر بود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با افزودن یک میلی‌لیتر محلول متوقف‌کننده (اسید سولفوریک ۵ درصد) واکنش، متوقف و جذب آن در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

***اندازه‌گیری غلظت پروتئین:*** اندازه‌گیری غلظت پروتئین براساس روش برادفورد (۲۱) انجام گرفت. استاندارد مورد استفاده شامل محلول سرم آلبومین گاوی با غلظت‌های۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بود.

***الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS-PAGE):*** این آزمون به دو شکل احیایی و غیراحیایی بر اساس روش لاملی (۲۲) در ژل جداکننده ۱۰ درصد انجام گرفت. یک حجم بافر نمونه (۵x) به چهار حجم نمونه اضافه شد و پس از قراردادن آن به‌مدت ۵ دقیقه در ظرف آب جوش، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه درون چاهک‌ها ریخته شد.

www.SID.ir

Archive of SID



الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل انجام گرفت. پس از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی آبی انجام گرفت (۲۳).

***بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم در ژل:*** در حالاتی که لازم بود موقعیت آنزیم به‌طور اختصاصی در ژل مشخص گردد، SDS-PAGE در شرایط غیراحیایی انجام گرفت و نمونه آنزیم نیز تحت تأثیرحرارت قرار داده نشد. در این حالت، پس از انجام الکتروفورز، ژل در بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH معادل ۷/۵ حاوی اتانول ۰ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شد. حجم مورد نیاز از محلول رنگ‌آمیزی (شامل بافر سوکسینات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۳/۸ حاوی MBTH ۰/۰۰۳ درصد، دی‌متیل آنیلین (DMA) ۰/۰۱۳ درصد، پراکسیداز ۲ واحد در میلی‌لیتر و اگزالات پتاسیم ۰/۲۵ میلی‌مولار) به سطح ژل افزوده شد. پس از ظاهرشدن باند آنزیم، ژل در آب مقطر شسته شد و از آن تصویر تهیه گردید.

***ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF):*** ایزوالکتریک فوکوسینگ به روش آبگیری مجدد ژل در آمفولین ۹-۳ (فارماسیا) بر اساس روش Allen و Budowle با بعضی تغییرات انجام گرفت (۲۴). پس از قراردادن ژل روی دستگاه، پیش‌فوکوسینک به مدت ۲۰ دقیقه در ۷۰۰ ولت انجام گرفت. سپس ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه روی کاغذهای مخصوص نمونه‌گذاری قرار داده شد. مرحله نفوذپذیری به مدت یک ساعت در شیب ولتاژ ۵۰۰- ۰/۰ ولت، مرحله جداسازی در ولتاژ ثابت ۲۵۰۰ ولت به مدت شش ساعت و مرحله نازک‌شدن باندها نیز در ولتاژ ثابت ۳۰۰۰ ولت به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس ژل برای رنگ‌آمیزی غیراختصاصی یا رنگ‌آمیزی اختصاصی به محلول‌های مربوطه منتقل گردید.

***کروماتوفوکوسینگ:*** کروماتوفوکوسینگ در تعویض‌کننده پلی‌بافر۹۴ و پلی‌بافر۷۴ انجام گرفت. ابتدا حجم کافی از ژل در بافر ایمیدازول ۲۵ میلی‌مولار با PH برابر ۷/۴ شسته شد و در ستونی به ارتفاع و قطر به‌ترتیب ۱۵ و ۱ سانتی‌متر ریخته شد. ستون با حجم کافی از بافر ایمیدازول شسته شد تا به تعادل بافری رسید. نمونه پروتئین که یک شب در مقابل بافر ایمیدازول دیالیز شده‌بود، وارد ستون گردید. سپس جریان پلی‌بافر ۷۴ که محلول استوک آن ۹بار با آب مقطر رقیق شده و pH آن ۴ بود، باسرعت ۲۵ میلی‌لیتر در ساعت بر ستون وارد گردید. خروجی ستون بادستگاه جمع‌کننده فراکسیون جمع‌آوری گردید و محتوای لوله‌ها از نظر pH، میزان پروتئین و فعالیت اختصاصی با روش‌های مربوطه بررسی شد.

***اثر اوره و دترجنت‌ها بر آنزیم:*** برای این کار، ابتدا آنزیم در حضور اوره با غلظت‌های ۲،۴،۶ یا ۸ مولار و دترجنت‌های تریتون X-100، توین بیست، چپس و زویترجنت ۱۴-۳ با غلظت‌های به‌ترتیب ۱، ۱، ۰/۵ و ۰/۵ درصد برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس فعالیت هر لوله آزمون نسبت به لوله کنترل با روش Laker و همکاران که در بخش‌های قبلی توضیح داده‌شد، اندازه‌گیری گردید.

## یافته ها

الگوی SDS-PAGE عصاره ریشه جو در شکل ۱- الف آمده است. این الگو شامل ده‌ها باند پروتئینی کم‌مقدار است. باند مربوط به موقعیت آنزیم اگزالات اکسیداز نیز درصد ناچیزی را به خود اختصاص می‌دهد. الگوی الکتروفورزی آنزیم خالص‌شده در قسمت‌های ب و ج شکل ۱ به‌ترتیب در شرایط احیایی و غیراحیایی آمده

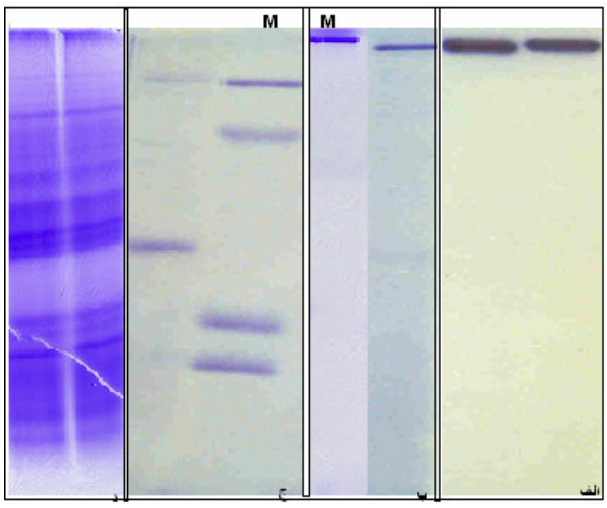
www.SID.ir

Archive of SID



است. همان‌گونه که این نتایج نشان می‌دهد، وزن آنزیم در شرایط احیایی در محدوده ۲۶-۲۵ و در شرایط غیراحیایی در محدوده ۱۲۰-۱۱۵ کیلودالتون تخمین زده شده است. در الگوی الکتروفورز احیایی یک باند پروتئینی ضعیف نیز در موقعیت وزنی ۲۶-۲۵ کیلودالتون (معادل وزن آنزیم تک‌واحدی) دیده می‌شود. در شرایط احیایی برای تخمین وزن مولکولی آنزیم تک‌واحدی از چهار پروتئین استاندارد شامل آلبومین سرم گاو، اوآلبومین، بتالاکتوگلوبوبین و آلفا لاکتالبومین به‌ترتیب با اوزان ۶۷، ۴۵، ۱۸ و ۱۴/۴ کیلودالتون استفاده شد. در مقابل، در شرایط غیراحیایی برای تخمین وزن مولکولی آنزیم فقط از IgG انسانی با وزن ۱۵۰ کیلودالتون استفاده شد که به دلیل محدودیت در دسترسی به پروتئین‌های استاندارد با وزن مولکولی بالا بود.

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد، برای تأیید پروتئین خالص‌شده به عنوان آنزیم اگزالات اکسیداز، بخشی از ژل SDS-PAGE غیراحیایی به صورت اختصاصی رنگ‌آمیزی گردید. نتیجه این آزمون نشان داد که پروتئین خالص‌شده موقعیت ۱۲۰-۱۱۵ کیلودالتون فعالیت اگزالات اکسیدازی دارد ( شکل ۱- د). نتایج ایزوالکتریک فوکوسینگ عصاره ریشه جو و بخش‌های آنزیمی نشان داد که دو باند پروتئینی متفاوت از نظر pI با فعالیت اگزالات اکسیدازی دیده می‌شود. نقطه ایزوالکتریک باند دارای فعالیت بیشتر در محدوده ۶/۸-۶/۶ تخمین زده‌شد. pI باند با فعالیت کمتر اگزالات اکسیداز حدود ۶ تخمین زده شد. روش دیگر که برای تعیین pI به‌کار رفت، کروماتوفوکوسینگ در دامنه pH ۴ الی ۷ بود. شکل ۲ کروماتوگرام لوله‌های با فعالیت اگزالات اکسیداز را در این روش نمایش می‌دهد. نتایج این آزمون نشان داد که دو بخش با pI متفاوت دارای فعالیت اگزالات اکسیدازی هستند. این دو بخش که از نظر فعالیت تفاوت قابل توجهی داشتند، به‌ترتیب دارای pI معادل ۶/۲ و ۶/۸ بودند. بخش با pI بالاتر، فعالیت آنزیمی بیشتری از خود نشان داد.

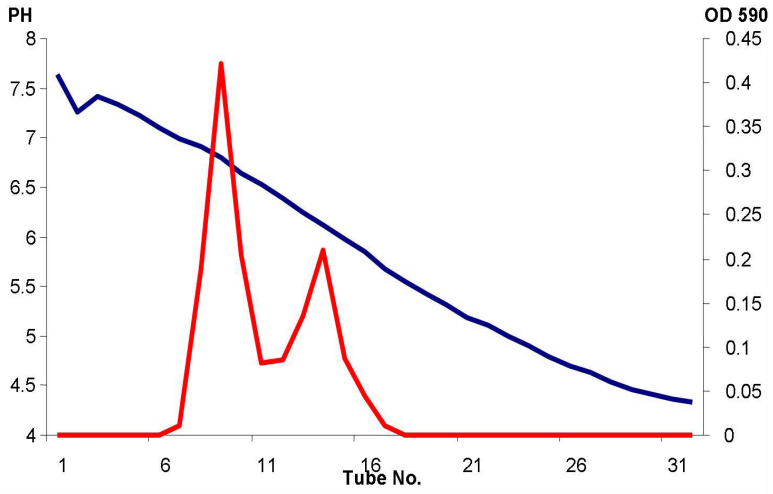



**شکل۱**- (د) الگوی SDS-PAGE عصاره ریشه جو در شرایط احیایی (ج) و (ب) الگوی SDS-PAGE آنزیم خالص‌شده به‌ترتیب در شرایط احیایی و غیراحیایی. ستون‌های M مربوط به مارکرها وزنی است (الف) الگوی SDS-PAGE غیراحیایی آنزیم با رنگ آمیزی اختصاصی

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل۲**– کروماتوفوکوسینگ فراکسیون غنی از آنزیم اگزالات اکسیداز در تعویض‌کننده پلی‌بافر ۹۴ در دامنه pH ۴ تا ۷

آنزیم اگزالات اکسیداز خالص پس از قرارگرفتن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تا ۵۰ درصد فعالیت خود را از دست داد. حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه کمتر از ۲۰ درصد فعالیت آنزیم را کاهش داد. اثر غلظت‌های مختلف سوبسترای اگزالات پتاسیم در فعالیت آنزیم نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در محدوده ۰/۲۵ تا یک میلی‌مولار اگزالات پتاسیم دیده می‌شود و فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از محدوده فوق کاهش می‌یابد.

اثر دترجنت‌ها در فعالیت آنزیم اگزالات اکسیداز نشان داد که دترجنت‌های غیرقطبی تریتون x-100 و توین بیست و دترجنت‌های زویتریونی چپس و زویترجنت ۱۴-۳ در دمای اتاق تأثیر محسوسی در فعالیت آنزیم ندارد. در حالتی که محلول آنزیم و دترجنت‌های فوق دقایقی در آب جوش یا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، فعالیت آنزیم متوقف گردید. افزون بر این نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف اوره در آنزیم نشان داد که اگزالات اکسیداز در حضور غلظت ۲ مولار اوره برای چندین ساعت فعالیت خود را به‌طور کامل و حتی در غلظت ۸ مولار اوره برای مدت یک ساعت، تا ۳۰ درصد فعالیت خود را حفظ می نماید.

## بحث

روش آنزیمی با استفاده از اگزالات اکسیداز، در حال حاضر دقیق‌ترین روش برای اندازه‌گیری اگزالات در پلاسما و ادرار است (۱۶). به‌علاوه این آنزیم می‌تواند در درمان سنگ‌های کلیوی(۱۷) و هیپراگزالمیای اولیه (۱۸ و ۱۹) مورد استفاده قرارگیرد. این موضوع اهمیت استخراج و تخلیص آن را از منابع مناسب روشن می‌سازد. در مطالعه حاضر با توجه به سادگی کشت و بالابودن فعالیت مخصوص آنزیم اگزالات اکسیداز، از ریشه جو به عنوان منبع گیاهی تخلیص آنزیم استفاده شد. نتایج نشان داد که این آنزیم با درجه خلوص بالا (شکل۱) بیش از ۶۲۸ بار از عصاره ریشه جو خالص شده است. محصول خالص شده در SDS-PAGE احیایی وزنی معادل ۲۶-۲۵ کیلودالتون (قسمت ب شکل ۱) و در SDS-PAGE غیراحیایی وزنی معادل ۱۲۰-۱۱۵ کیلودالتون (قسمت ج

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱) داشت. اگرچه وزن واحدهای آنزیمی در این مطالعه، با سایر مطالعات هم‌خوانی دارند، ولی وزن تخمین‌زده‌شده برای آنزیم کامل با نتایج بعضی مطالعات مشابه و بعضی دیگر متفاوت است(۲۷- ۲۵). بدین لحاظ به‌نظر می‌رسد آنزیم خالص ساختمانی ۵ واحدی دارد. باید توجه داشت که در SDS-PAGE با تعیین وزن زیرواحدها و پروتئین کامل، در بسیاری از حالات نمی‌توان به تعداد زیرواحدها پی برد. این موضوع از دلایل عمده گزارش‌های متفاوت مبنی بر ۵ یا ۶ واحدی‌بودن آنزیم اگزالات اکسیداز است.

در بررسی فعالیت آنزیم در ژل مشخص گردید که شکل تک‌واحدی آنزیم هیچ‌گونه فعالیتی ندارد. این نتایج نشان داد که برهم‌خوردن ساختمان چهارم و شکستن پیوندی دی‌سولفیدی که در طول SDS-PAGE رخ می‌دهد، به جداشدن زیرواحدها و متوقف‌شدن فعالیت آنزیم می‌انجامد. Kotsira و Clonis (۲۸) نشان داده‌اند که آنزیم اگزالات اکسیداز ریشه جو ۸۳ درصد فعالیت خود را پس از ۵ دقیقه در محلول یک میلی‌مولار مرکاپتواتانل از دست می‌دهد. آن‌ها معتقدند که ساختمان چهارم و فعالیت آنزیم وابسته به پیوندهای دوسولفیدی بین اسیدهای آمینه سیستئین است. این پیوندها در طول SDS-PAGE شکسته می‌شوند.

در این تحقیق مشخص گردید که در ریشه جو حداقل دو ایزوآنزیم اگزالات اکسیداز وجود دارد. یکی از این دو آنزیم که دارای نقطه ایزوالکتریک ۶/۸ است، از نظر غلظت و فعالیت، میزان بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد. Requena و Bornemann در سال ۱۹۹۹ نقطه ایزوالکتریک اگزالات اکسیداز جو را معادل ۶/۹ گزارش نمودند (۲۹). در مورد ایزوآنزیم دیگر که بخش کمتری از فعالیت اگزالات اکسیدازی را به خود اختصاص می‌دهد و نقطه ایزوالکتریک آن معادل ۶/۲-۶ تخمین زده می‌شود، ظاهراً گزارشی در دست نیست. استفاده از روش کروماتوفوکوسینگ برای یافتن این ایزوآنزیم‌ها در حالت طبیعی و مقایسه نتایج آن با روش ایزوالکتریک فوکوسینگ در مطالعه دیگر دیده نمی‌شود.

در این مطالعه همچنین معلوم گردید که آنزیم اگزالات اکسیداز مقاومت قابل‌توجهی در برابر اوره و انواعی از دترجنت‌های غیرقطبی و زویتریونی دارد. Zhang و همکاران (۳۰) نیز نشان دادند که اگزالات اکسیداز جو مقاومت خوبی در مقابل سدیم دودسیل سولفات و اتانل دارد. به همین خاطر آنزیم می‌تواند شرایط بافر نمونه SDS-PAGE غیراحیایی در حرارت‌های پایین‌تر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد را تحمل نماید و رنگ‌آمیزی اختصاصی آن در ژل امکان‌پذیر است. وجود چنین خصوصیاتی از مزیت‌های قابل‌توجه برای استخراج و کاربرد این آنزیم در صنعت و پزشکی است. امروزه شرکت‌های سازنده کیت‌های سنجش اگزالات، روش‌های مختلفی با استفاده از آنزیم اگزالات اکسیداز جو برای انجام این کار طراحی نموده‌اند یا در حال طراحی آن هستند (۱۹و۳۵-۳۱). این آنزیم به صورت نیمه‌خالص توسط شرکت‌های تجاری همچون شرکت سیگما باهزینه قابل‌توجه به فروش می‌رسد. بااطلاعاتی که از پژوهش حاضر در خصوص تخلیص و تعیین خصوصیات این آنزیم از ریشه جو به‌دست آمده، امکان تخلیص آن در مقیاس کم یا زیاد فراهم شده است. در ادامه پژوهش سعی بر آن است تا شکل خالص‌شده آنزیم به همراه آنزیم پراکسیداز که قبلاً تخلیص شده است(۳۶)، در طراحی کیت اندازه‌گیری اگزالات ادرار مورد استفاده قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID



**نتیجه گیری:**

**در مطالعه حاضر روشی نسبتا ساده برای تخلیص آنزیم اگزالات اکسیداز از جوانه جو طراحی گردید و مقاومت آنزیم در برابر انواعی از عوامل واسرشته کننده تعیین شد. درمطالعات بعدی بر آن است که شکل خالص آنزیم در طراحی کیت اندازه گیری اگزالات مورداستفاده قرار گیرد.**

## منابع


1. Dunwell J, Cupins M. A new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. Biotechnol Genet Eng Rev 1998; 15:1-32.
2. Dunwell JM, Khuri S, Gane PJ. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. Microbiol Molecul Biol Reviews 2000; 64:153-79.
3. Dumas B, Freyssinet G, Pallett KE. Tissue specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. Plant Physiol 1995; 107:1091-96.
4. Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. Molecular Plant Pathology, 2002, 3(3): 135-144.
5. Oxalate oxidase. Available at: http://www.Swiss-port.com .
6. Oxalate oxidase. Available at: http://www.TrEMBL.com .
7. Zaitsev GM, Tsitko IV, Rainey FA, Trotsenko YA, Uotila JS, Stackebrandt E, et al. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1998; 48:151-163.
8. Hiatt W R, March JB. Oxalic acid removal in beer production. U.S. Patent 1987; 4: 652, 452.
9. Haas GJ, Fleischman AI. The rapid enzymatic determination of oxalate in wort and beer. J Agric Food Chem 1961; 9:451-452.
10. Purdy LH. Sclerotinia sclerotiorum: History, diseases and symptomology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology 1979; 69:875-880.
11. Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE, Lay V, Ray J, Watson H, et al. Introduction of genes for oxalate degrading enzymes into plants as a potential means of providing tolerance to Sclerotinia. IOBC Wprs Bull. 1995; 18:34-38.


www.SID.ir

Archive of SID



12. Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE, Lay V, Ray J, Schmitt M, et al. Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. Euphytica 1995; 85:169-172.

13. Kyriazakis I, Anderson DH, Duncan AJ. Conditioned flavor aversions in sheep: the relationship between the dose rate of a secondary plant compound and the acquisition and persistence of aversions. Br J Nut 1998; 79:55-62.

14. Hesse A, Bongartz D, Heynck H, Berg W. Measurement of urinary oxalic acid: a comparison of five methods. Clin Biochem 1996; 29:467-472.

15. Honow R, Bongartz D, Hesse A. An improved HPLC-enzyme-reactor method for the determination of oxalic acid in complex matrices. Clin Chem Acta 1997; 261:131-139.

16. Ruml LA, Pearle MS, Pak CY. Medical therapy: calcium oxalate urolithiasis. Urol Clin North Am 1997; 24:117-133.

17. Raghavan KG, Tarachand U. Degradation of oxalate in rats implanted with immobilized oxalate oxidase. FEBS Lett 1998; 195:101-105.

18. Kemper MJ, Nolkemper D, Rogiers X, Timmermann K, Sturm E, Malago M, et al. Perimptive liver transplantation in primary hyperoxaluria type I: timing and preliminary results. J Nephrol 1998; 11:46-48.

19. Skinner E, Waterson M. Improvement of a standard MIRA method for urinary oxalate by elimination of reagent carry –over. Annal Clin Biochem 2001; 38: 54-56

20. Laker MF, Hofmann AF, Meeuse JD. Spectrophotometric determination of oxalate with oxalate oxidase prepared from moss. Clin Chem 1980; 26(7): 827-830.

21. 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; 72:248-254.

22. Lamemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

۲۳ - مصطفایی علی. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. چاپ دوم، تهران: انتشارات یادآوران، سال ۱۳۸۲، صفحات ۶۰-۳۵.

24. Allen RC, Budowle B, Lack PM, Graves G. Electrophoresis. 1st ed. Wenheim: VCH ; 1986, PP. 462-473.

25. Chiriboga J. Some properties of an oxalic oxidase purified from barley seedlings. Biochem Biophysic Res Comun 1963; 11(4): 277-282.

26. Chiriboga J. Purification and properties of oxalic oxidase. Arch Biochem Biophys 1966; 116: 516 -523.

www.SID.ir

Archive of SID



27. Svensson H. Isoelectric fractionation, analysis, and characterisation of ampholytes in natural pH gradients: I- The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. Acta Chem Scand 1961; 15:325-341.

28. Kotsira VP, Clonis YD. Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties. Arch Biochem Biophys 1997; 340:239-249.

29. Requena L, Bornemann S. Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. Biochem J 1999; 343:185-190.

30. Zhang,Z, Collinge DB, Thordahl-Christensen H. Germin-like oxalate oxidase, an $H_2O_2$-producing enzyme accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant J 1995; 8:139-145.

31. Tsukagoshi K, Kimura T, Fuji T, Nakajima R. Improvement of capillary electrophoresis- chemiluminescence detection system for using a polyacrylamide-coated capillary. Anal Sci, 2001; 17(2): 345-347.

32. Milardovic S, Grabaric Z, Grabaric B.S. Sensitive amperometric oxalate biosensor for food analysis. Food Technol Biotechnol 2000; 38:203-210.

33. Pundir CS, Kuchhal NK, Bhargava AK. Determination of urinary oxalate with oxalate oxidase and peroxidase immobilized on to glass beads. Biotechnol Appl Biochem 1998; 27:103-107.

34. Langman LJ, Allen LC. An enzymatic method for oxalate automated using the Hitachi 911 analyzer. Clin Biochem 1998; 31:429-432.

35. Gaulier JM, Lardet G, Cochat P, Vallon JJ. A serum oxalate assay using chemiluminescence's detection. J Neph 1998; 11(S1): 73-74.

**۳۶- مصطفایی علی، راهی حمید و ناصری منصور. خالص‌سازی پراکسیداز از ترب سیاه. فصلنامه علمی پژوهشی بهبود. سال ۱۳۷۹، جلد۴، صفحات ۱۶-۸**

www.SID.ir