مطالعه ایزوآنزیم‌های اکتینیدین کیوی با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید، ایزوالکتریک فوکوسینگ و الکتروفورز دوبعدی

مریم چلبی ، یدالله بهرامی ، علی مصطفایی

مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

چکیده

اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور یافت می‌شود. در این مطالعه ایزوآنزیم‌های اکتینیدین، جدا و با سه روش: الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE)، ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) و الکتروفورز دوبعدی (2DE) تعیین خصوصیت گردید. اکتینیدین از میوه کیوی (واریته هیوارد) با روش ترسیب توسط سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یون خالص گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم از هیدرولیز کازئین استفاده شد. SDS-PAGE در شرایط احیایی، غیراحیایی و اوره انجام گرفت. IEF در آمفولین در محدوده ۵-۳/۵ pH به‌روش آبگیری مجدد و الکتروفورز دوبعدی در هر دو جهت در ژل صفحه‌ای انجام گرفت.

نتایج SDS-PAGE در شرایط مختلف نشان داد که آنزیم اکتینیدین بسته به شرایط الکتروفورزی وزن متفاوتی (۲۹-۲۰ کیلودالتون) از خود نشان می‌دهد. این نتایج نشان داد که حرارت و احیای پیوندهای دی‌سولفیدی برای بازشدن کامل مولکول و اشباع‌شدن آن با SDS ضروری است. نتایج IEF نشان داد که اکتینیدین کیوی حاوی حداقل ٦ ایزوآنزیم با نقطه ایزوالکتریک (pI) در دامنه ۳/۸-٤/۰۳ و یک ایزوآنزیم با pI ۳/۵ است. این نتایج که متفاوت از نتایج مطالعه مشابه بود، ناشی از تفاوت واریته‌ها و روش آزمایش می‌باشد. حرکت ایزوآنزیمهای اکتینیدین در الکتروفورز دوبعدی نشان داد که این مولکول‌ها علاوه بر تفاوت pI ، دارای رفتار قابل توجهی در شرایط مختلف SDS-PAGE و الکتروفورز دوبعدی هستند که در روش معمول SDS-PAGE دیده نمی‌شود

واژه های کلیدی: اکتینیدین، کیوی، الکتروفورز، ایزوالکتریک فوکوسینگ

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

میوه کیوی حاوی مقدار زیادی از یک نوع آنزیم پروتئاز به نام اکتینیدین (EC:3.4.22.14) است (۱۰،۱). اکتینیدین حاوی۲۲۰ اسید آمینه و وزنی معادل ۲۳/۵ کیلودالتون است. درسال۱۹۷۸ توالی اسیدهای آمینه این آنزیم با روش دانسی- ادمن تعیین گردید (٦). درسالهای ۱۹۸۰ و ۱۹۸۹ بترتیب ساختمان فضایی و توالی نوکلئوتیدهای ژن آنزیم مشخص شد (۱۲،۲). اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی همچون پاپایین می‌باشد و بیشترین تشابه نیز مربوط به جایگاه فعال آنها است (۷،٤،۸). اگرچه نقش بیولوژیک اکتینیدین بطور دقیق شناخته نشده است، ولی این آنزیم می‌تواند کاربردهای متنوعی در صنعت داشته باشد. برای مثال می‌توان از آن بعنوان یک پروتئاز مناسب در تردکردن گوشت یا هضم مواد پروتئینی در بیماران دارای مشکلات گوارشی استفاده نمود (۳). در این مطالعه اکتینیدین از میوه کیوی (واریته هیوارد) خالص گردید. سپس با هدف تعیین بخشی از خصوصیات ایزوآنزیمهای آن از سه روش SDS-PAGE تحت شرایط مختلف، ایزوالکتریک فوکوسینگ و الکتروفورز دوبعدی استفاده شد.

مواد و روشها

تخلیص اکتینیدین: به عصاره کیوی (واریته هیوارد) سولفات آمونیوم اشباع اضافه گردید تا غلظت نهایی آن به ٦۰ درصد رسید. مخلوط ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰×g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH ۵/۵ حل و یک شب در مقابل آن دیالیز گردید. محلول دیالیزشده به یک ستون کروماتوگرافی تعویض یون با ارتفاع ۳۰ و قطر ۵ سانتیمتر وارد گردید. ستون حاوی رزین دی‌اتیل آمینو اتیل سفارز (فارماسیا) بود که با بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH ۵/۵ به تعادل رسید. پس از ورود نمونه به ستون، بافر سیترات با جریان ۱۰۰ میلی‌لیتر در ساعت به ستون وارد شد. پس از رسیدن جذب خروجی (در طول موج۲۸۰ نانومتر) به کمتر از ۰/۱، شیب خطی ۱-۰ مولار کلرید سدیم در بافر به ستون وارد گردید. مایع خروجی در حجمهای ۲۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین. اندازه‌گیری غلظت پروتئین با روش برادفورد (۵) انجام شد. در این روش با استفاده از معرف برادفورد (شامل ۰/۱ گرم کوماسی آبی G-۲۵۰، ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵ درصد و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفوریک ۸۵ در حجم نهایی یک لیتر)، غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (سیگما) اندازه‌گیری شد. در این منحنی دامنه غلظتهای مختلف آلبومین سرم گاوی بین ۱-۰/۱ میلی‌گرم می باشد.

بررسی فعالیت پروتئولیتیکی اکتینیدین:

برای بررسی فعالیت پروتئازی اکتینیدین از آزمون

www.SID.ir

هضم کازئین شیر استفاده شد. برای اینکار، آنزیم در pH معادل٤ با نسبت وزنی یک درصد (وزن آنزیم به سوبسترا) به محلول کازئین اضافه شد. محلول ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرارگرفت. سپس محتوای لوله‌های آزمون و شاهد، الکتروفورز و درصد هضم کازئین با تراکم‌سنجی باندهای پروتئین در ژل تعیین گردید. مقداری از آنزیم که ۵۰ درصد کازئین را هضم نماید، یک واحد فعالیت محسوب می گردد.

الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید:

الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات **(SDS-PAGE)** بر اساس روش لاملی (۹) در ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم‌کننده ٤ درصد تحت شرایط احیایی یا غیراحیایی انجام گرفت. در بعضی حالات نمونه بدون تیمار حرارتی الکتروفورز شد. در حالتی که الکتروفورز در حضور اوره انجام می‌گرفت، نمونه و ژل به ترتیب حاوی غلظت ۸ و ٤ مولار اوره بودند. پس از آماده شدن نمونه،۱۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک دستگاه تانک عمودی (پایا پژوهش، ایران) قرار داده شد و در ولتاژ ۱۵۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد.

ایزوالکتریک فوکوسینگ :

برای بررسی ایزوآنزیمهای اکتینیدین و تعیین pI آنها از ایزوالکتریک فوکوسینگ **(IEF)** به روش آبگیری مجدد بر اساس روش Westermeier (۱۵) استفاده شد. برای اینکار ابتدا ژل پلی‌اکریل آمید با غلظت ٤ درصد بر روی طلقهای نگهدارنده (Gel Bond PAG Film شرکت فارماسیا) منعقد و سپس با آب دیونیزه شسته شد و در دمای اتاق خشک گردید. در هنگام آزمایش مقدار معینی از ژل را بریده و در محلول حاوی چپس یک درصد، اوره ۸ مولار، آمفولیت ۵ درصد (آمفولین در دامنه pH ۳/۵-۵ ساخت شرکت فارماسیا)، دی‌تیوتریتول (DTT) ۱۸ میلی‌مولار و اتیلن‌گلیکول ۷/۵ درصد متورم گردید. نمونه‌های پروتئین در محلول حاوی اوره ۹ مولار، چپس ٤ درصد، DTT ۸۵ میلی‌مولار و آمفولیت ۰/۸ درصد (آمفولین ۵-۳/۵) آماده گردید. شرایط الکتروفورز شامل: پیش فوکوسینگ (۲۰ دقیقه در ولتاژ ۷۰۰ ولت)، نفوذپذیری نمونه (٦۰ دقیقه در ولتاژ ۵۰۰-۰ ولت)، جدا سازی (٤ ساعت در ولتاژ ۲۵۰۰ ولت) و نازک‌شدن باندها (۳۰ دقیقه در ولتاژ ۳۵۰۰ ولت) بود. پس از اتمام الکتروفورز ژل به نوارهایی به عرض دلخواه بریده شد. بعضی نوارها با کوماسی آبی رنگ‌آمیزی گردید. نوارهای دیگر برای الکتروفورز دوبعدی آماده گردید.

الکتروفورز دوبعدی:

پس از ایزوالکتریک فوکوسینگ، ژل را به نوارهایی به عرض ۰/۵ سانتی‌متر بریده و مدت ۳۰ دقیقه در بافر متعادل‌کننده شامل تریس-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH ۸/۸

www.SID.ir

Archive of SID

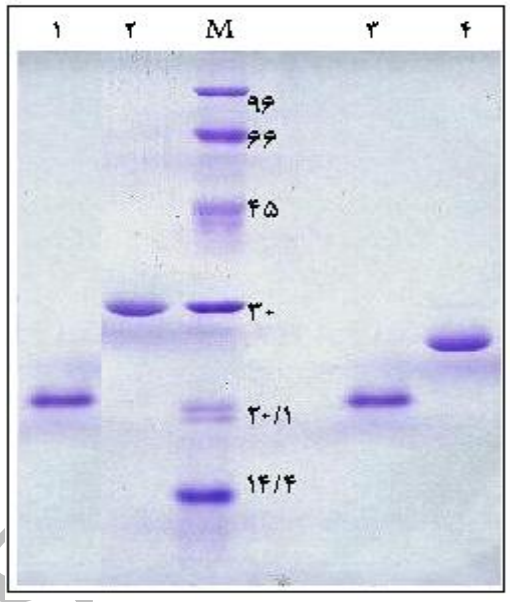
حاوی سدیم دودسیل سولفات ۲ درصد، DTT یک درصد، گلیسرول ۳۰ درصد و بروموفنل بلو ۰/۰۱ درصد قرار داده شد. سپس آنرا در سطح ژل پلی‌آکریل‌آمید عمودی قرار داده و با محلول آگارز ۰/۵ درصد (در بافر الکترود) در محل خود ثابت گردید. پس از الکتروفورز بعد دوم، ژل با رنگ کوماسی آبی R-350 (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد.

نتایج

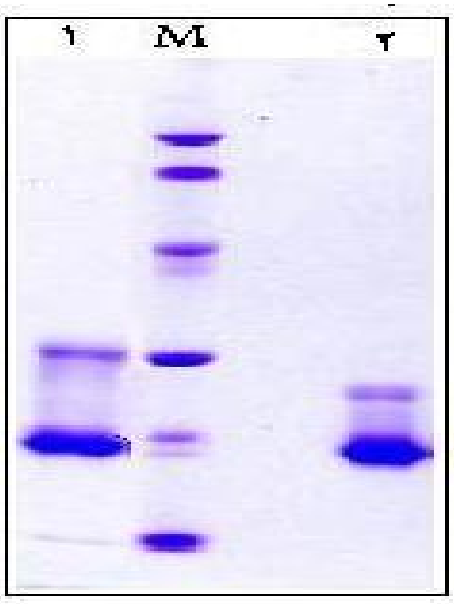
اکتینیدین خالص‌شده از واریته هیوارد که مسئول تقریباً تمام فعالیت پروتئازی عصاره کیوی بر کازئین بود، در روش متداول SDS-PAGE احیایی، وزنی معادل ۲۹ کیلودالتون داشت (شکل ۱ ستون ۲). در مقابل، آنزیم در شرایط احیایی و بدون تأثیر حرارت آب جوش عمدتا" در موقعیت ۲۱-۲۰ کیلودالتون قرار گرفت (شکل ۱ ستون ۱). وزن اکتینیدین درSDS-PAGE غیراحیایی و تحت اثر حرارت، معادل ۲۷-۲٦ کیلودالتون و در حالتی که به آن حرارت داده نشد، معادل ۲۱-۲۰ کیلودالتون تخمین زده شد (شکل ۱ بترتیب ستونهای ٤ و۳). وزن مولکولی آنزیم خالص‌شده با الکتروفورز در حضور اوره و تحت شرایط احیایی با دو باند مشخص گردید، بخش عمده آنزیم در محدوده وزنی ۲۱-۲۰ و بخش کمی از آن در موقعیت ۲۹ کیلودالتون بود (شکل ۲ ستون ۱). اما وقتیکه آنزیم اکتینیدین در شرایط غیراحیایی و در حضور اوره الکتروفورز گردید، بخش عمده آن در محدوده ۲۱-۲۰ و بخش کمتر در موقعیت ۲۷-۲٦ کیلودالتون قرار گرفت (شکل ۲ ستون ۲). البته در هر یک از دو حالت فوق بخشی از آنزیم هم بصورت اسمیر در حدفاصل باندهای ضخیم و باریک دیده شد. الگوی IEF اکتینیدین تخلیص‌شده در آمفولین با دامنه pH ۳/۵-۵ در شکل ۳ آمده است. این الگو جمعاً شامل ۹ باند پروتئینی است که حداقل هفت باند عمده آن بعنوان آنزیم (ایزوآنزیم) اکتینیدین محسوب می‌گردد (شکل٤). نقطه ایزوالکتریک تعداد کمی از این ایزوآنزیمها معادل ۳/۵ و بقیه بین ٤/۰۳ تا ۳/۸ تخمین زده شد. نتیجه الکتروفورز دوبعدی آنزیم تخلیص‌شده (شکل ٤) نشان داد که دو باند باریک که pI بالاتری نسبت به بقیه باندها دارند، ناخالصی بوده و به‌صورت دو لکه باریک در محدوده ۱۵ کیلودالتون دیده می‌شوند. در میان ایزوآنزیمهای اکتینیدین، دو ایزوآنزیم که pI کمتری داشتند، هر یک شامل دو لکه پروتئینی با تفاوت وزنی حدود یک کیلودالتون بودند. بقیه ایزوآنزیمها که بخش اعظم محتوای محصول خالص‌شده و عصاره اولیه را تشکیل می‌دادند، به صورت لکه‌های پررنگ پروتئینی در موقعیت وزنی ۲۹-۲۸ کیلودالتون دیده شدند. بخش کمی از این ایزوآنزیمها نیز به‌صورت لکه‌های کم‌رنگ‌تر در محدوده ۲۷-۲۵ کیلودالتون مشهود بود.

Archive of SID

www.SID.ir

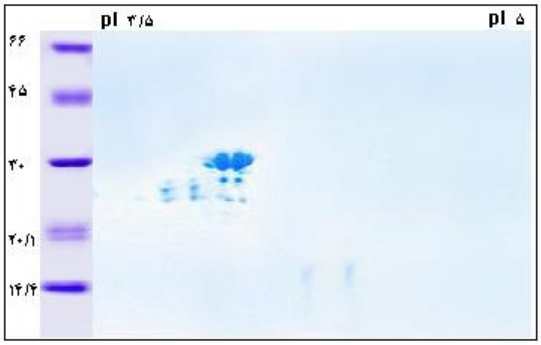


شکل ۱. SDS-PAGE اکتینیدین تحت شرایط احیایی و بدون حرارت (ستون ۱)، احیایی و حرارت (ستون ۲)، غیراحیایی و بدون حرارت (ستون ۳)، غیر احیایی وحرارت(ستون ۴). ستون M مارکرهای وزنی بترتیب با اوزان ۹۷، ۶۶، ۴۵، ۳۰، ۲۰/۱، ۱۴/۴ کیلودالتون است.



شکل ۲. SDS-PAGE اکتینیدین کیوی در حضور اوره، تحت شرایط احیایی (ستون ۱) و غیر احیایی (ستون ۲). ستون M مارکرهای وزنی بترتیب با اوزان ۹۶، ۶۶، ۴۵، ۳۰، ۲۰/۱، ۱۴/۴ کیلودالتون است.

شکل ۳. ایزوالکتریک فوکوسینگ اکتینیدین در آمفولین با دامنه pH ۳/۵-۵



شکل ۴. الگوی الکتروفورز دوبعدی اکتینیدین تخلیص‌شده از میوه کیوی.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

پروتئازها گروهی از آنزیمها هستند که کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارند (۱٤). بدین لحاظ تخلیص و تعیین خصوصیات مولکولی آنها اهمیت قابل توجهی در شناخت و کاربرد آنها دارد. اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی بوفور یافت می‌شود. این پروتئاز از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی همچون فیسین و پاپایین است (٤،۷). اکتینیدین متشکل از یک رشته پلی‌پپتیدی است که وزن مولکولی آن در مطالعات مختلف ۲۳/۵ یا ۲٦/۵-۲۵/۵ کیلودالتون گزارش شده است (۱۳،۱۰،٤) . وزن مولکولی آنزیم خالص شده از واریته هیوارد در مطالعه حاضر تحت شرایط SDS-PAGE احیایی معادل ۲۹ کیلودالتون تخمین زده شد که تا حدودی بیشتر از اغلب مطالعات (۱۳،۱۰،٤) مشابه نتایج پاستورلا و همکاران (۱۱) است. این تفاوتها عمدتاً ناشی از روشها و مارکرهای پروتئینی مختلف برای تعیین وزن می‌باشد. از نکات قابل توجه این مطالعه که در مطالعات دیگران مشاهده نمی‌شود، بررسی حرکت الکتروفورزی اکتینیدین در شرایط غیرمتعارف در SDS-PAGE بود (اشکال ۱و۲). برای مثال در حالتی که آنزیم تحت شرایط احیایی الکتروفورز گردید و نمونه در معرض حرارت قرار گرفت، وزنی معادل ۲۹ کیلودالتون از خود نشان داد. در مقابل، هنگامی که اکتینیدین تحت تأثیر حرارت و در شرایط غیراحیایی الکتروفورز گردید، وزنی معادل ۲۷-۲٦ کیلودالتون از خود نشان داد. در الکتروفورز، حداقل وزن آنزیم در شرایط احیایی و غیر احیایی بدون حرارت مشاهده گردید. وزن آنزیم در این حالت معادل ۲۱-۲۰ کیلودالتون تخمین زده شد. این نتایج نشان داد که حرارت و حضور ماده احیا کننده تأثیر بسزایی در بازشدن ساختمان آنزیم و اشباع شدن آن با دترجنت سدیم دودسیل سولفات (SDS) دارد. در عدم حضور ماده احیا کننده و یا حرارت احتمالاً ساختمان تاخورده آنزیم بطور کامل باز نشده و بدین لحاظ وزن کمتری در SDS-PAGE از خود نشان می‌دهد. نتایج حاصل از الکتروفورز تحت اثر اوره (شکل ۲) در شرایط احیایی یا غیراحیایی نیز نشان داد که محتوای آنزیم تخلیص‌شده از نظر مقاومت در برابر این ماده واسرشته کننده همگون نیست و بازشدگی بخش قابل توجهی از آن کمتر از بقیه آنزیم است. بدین لحاظ در این شرایط بخش اعظم اکتینیدین بدلیل حرکت الکتروفورزی سریعتر در موقعیت حدود ۲۰ کیلودالتون و بقیه آن در موقعیت‌های وزنی بالاتر دیده می‌شود (شکل ۲). در این مطالعه نشان داده شد که احیای پیوندهای دی‌سولفیدی تأثیر نسبی در باز شدن ساختمان آنزیم و اتصال به SDS دارد. اکتینیدین دارای ۳ پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای است که تأثیر بسزایی در ساختمان سوم آن دارد (٦). مطالعه Sugiyama نشان داد که حداقل ٦ ایزوآنزیم برای

www.SID.ir

اکتینیدین در کیوی وجود دارد (۱۳). این ایزوآنزیمها که از Kp1 تا Kp6 نامگذاری شده‌اند، وزن مولکولی مشابه‌ای دارند و نقاط ایزوالکتریک آنها نیز نزدیک بهم و در محدوده ۳/۵-۳/۳۳ گزارش شده است. نتایج مطالعه حاضر اگرچه وجود حداقل ٦ ایزوآنزیم را تأئید نمود ولی تعیین pI این ایزوآنزیمها نشان داد که در واریته هیوارد pI آنها عمدتاً در محدوده ٤/٠٣-٣/٨ قرار دارد و تنها بخش کوچکی از آنزیم دارای pI نزدیک ۳/۵ است. بعلاوه این آنزیمها برغم آنکه در روش معمول SDS-PAGE وزن مولکولی مشابهی دارند، الگوی حرکت الکتروفورزی آنها در الکتروفوز دوبعدی جالب توجه است. اغلب این ایزوآنزیمها به بیش از یک لکه پروتئینی در بعد دوم الکتروفورز تقسیم می‌شوند. این موضوع احتمالا حاکی از ناهمگونی هر ایزوآنزیم از نظر مقاومت به عوامل واسرشته‌کننده در الکتروفورز همچون اوره، سدیم دودسیل سولفات، ماده احیاکننده و حرارت است. بهر حال این درجه از تنوع ایزوآنزیمی و رفتار ناهمگون الکتروفورزی آنزیم اکتینیدین که ظاهرا تنها در این مطالعه با SDS-PAGE در شرایط مختلف و الکتروفورز دو بعدی نشان داده شده است، قابل تأمل و نیازمند مطالعات بیشتر در سایر واریته‌های کیوی می‌باشد.

تشکر: از حوزه معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که امکان انجام این مطالعه را فراهم نمودند، تشکر می‌شود.

منابع

1- Arcus A.C. 1959. Proteolytic enzyme of *Actinida chinensis*. Biochim. Biophys. Acta, **33**: 242-244.

2- Baker E.N. Structure of actinidin, after refinement at 1.7Å resolution. (1980). J.Mol.Biol; **141**: 441-484.

3- Boland M. and Burns D. 1980. Production of actinidin; a proteolytic enzyme from kiwifruit. Internal report 1. Auckland N.Z.: DSIR. Mt. Albert Research Center.

4- Boland M.J.; Hardman M.J. 1972. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. FEBS Lett; **27 (2)**: 282-4.

5- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, **72**:248-254.

Archive of SID
www.SID.ir

6- Carne A.; Moore CH. 1978. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. Biochem. J; **173 (1)**: 73-83

7- Czaplewski C.; Grazonka Z.; Jaskolski M.; Kasprzykowski F.; Kozak M.; Politowska E.; Ciarkowski J. 1999. Binding modes of a new epoxysuccinyl-peptide inhibitor of cysteine proteases. Where and how do cysteine proteases express their selectivity? Biochem. Biophys. Acta, **1431(2)**: 290-305.

8- Kamphuis IG.; Drenth J.; Baker EN. 1985. Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H stem bromelain. J. Mol. Biol; **182(2)**: 317-29.

9- Laemmli U.K**.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4 .Nature, **227**:680-685.

10- McDowall M.A. 1970. Anionic proteinase from *Actinida chinensis,* Preparation and properties of the crystalline enzyme. Eur. J. Biochem; **14**: 214-221.

11- Pastorello EA.; Conti A.; Pravettoni V.; Farioli L.; Rivolta F.; Ansaloni R. et al. 1998. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. J. Allergy Clin. Immunol.**101(4 pt 1)**: 531-7

12- podivinsky E.; Forster R.L.S.; Gardner R.C. 1989. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwi fruit protease. Nucleic Acids Res; **17**:8363-8363

13- Sugiyama S.; Ohtsuki K.; Sato K.; Kawabata M. 1996. Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins Toyopearl-SuperQ and Bakerbond WP-PEI. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, **60(12)**:1994-2000.

14- Walsh G. and Headon D. 1994. Protein Biotechnology. John Wiley & Sons Publications. 15- Westermeier R. 2001. Electrophoresis in practice. Thired ed. WILEY-VCH Publications.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir