جدا سازی و خالص سازی ایزو آنزیم های پراکسیداز از تربچه

(Cultivated Radish)

منیره آقاجانی نسب*- دکتر نوشابه پژهان ** دکتر عبدالحسین باستانی **

*مربی عضو عیئت علمی دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی گیلان
** استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

مقدمه

آنزیم‌پراکسیدازازمهمترین‌آنزیمهای خانواده‌اکسیدو ردوکتازها بوده و با EC:1.11.1.7 مشخص می‌شود از هموپروتئینهای گلیکو پروتئینی‌است که گروه پروستتیک‌آن‌حاوی پروتوپورفیرین Fe IXاست(۱).

درساختاراین‌آنزیم‌اتم‌کلسیم‌دیده‌شده‌که برای شکل گرفتن ساختار سوم پروتئین ضروری‌است(۲). وجوده‌مار پیچ آلفا و چهار باندی سولفیدی نیز درساختمان آنزیم به اثبات رسیده است (۳).

این آنزیم دارای ایزو آنزیمهای کاتیونی و آنیونی متفاوتی‌می باشد (٤) و به اشکال مختلف کلرو پراکسیداز ، لاکتوپراکسیداز ، فلاوپراکسیداز ، میلوپراکسیداز ، تیروپراکسیداز ، پروستاگلندین هیدروپراکسیداز و نیز پراکسیداز های گیاهی در منابع مختلف وجود دارد که اعمالی را در رابطه با برداشت H_2O_2 که یک ماده سمی برای سلول است، انجام می دهد.

این آنزیم کاربردهای فراوانی را در زمینه های تشخیص آزمایشگاهی به‌روش‌ایمونواسی‌درتکنیک ELISA جهت اندازه گیری هورمونها از جمله تیروکسین، انسولین، HCG ، استروژن،پروژسترون و سم باکتریها دارد علاوه بر آن در تشخیص آنتی ژنهای بافتی و فعال کردن ماکروفاژها در برابر تومورهای سرطانی درانواع روش‌های پاتولوژی و هماتولوژی وایمونولوژی به کاربرده‌می‌شود(۵و٦).

در ضمن جهت تعیین میزان گلوکز در سرم و ادرار ، کلسترول، اوره و اسیداوریک با استفاده از کیتهای آنزیمی نیز مورد استفاده قرار می گیرد(۷).

با در نظر گرفتن کاربرد وسیع آنزیم و فراوانی آن در منابع گیاهی قابل دسترس در ایران ، این طرح جهت استخراج و جدا سازی ایزو آنزیم های مختلف مدنظر قرارگرفت.لازم‌به تذکراست‌که‌هنوز آنزیم مصرفی برای کاربرد های مختلف با صرف هزینه‌های دلاری‌فراوان واردکشورمی‌شوددرحالیکه کشورهای تولیدکننده آنزیم را از منابع گیاهی قابل دسترس در هر منطقه استخراج می کنند.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

ابتدا مقدار ۵۰۰گرم از Cultivated Radish با بافر فسفات پتاسیم۰/۱ مولارو PH=۷/۲ هموژنیزه شد. تغلیظ عصاره خام حاصله در دو مرحله با سولفات آمونیم (مرحله اول ۳۵- ۰٪) و مرحله دوم (۹۰-۳۵٪) در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار Damonice B-20A Division (0-2000RPM) انجام گرفت(۸). رسوب حاصله از مرحله دوم تغلیظ به‌منظورجداسازی‌نمکهاوتنظیم PH در مقابل بافرتریس۰/۰۰۵ مولار۸/۲ = PH در٤ درجه سانتیگراد دیالیز شد (کیسه دیالیز Sigma cut off = 12 KD).

مقدارپروتئین موجود در نمونه ها به روش براد فورد (۹) و فعالیت آنزیم به روش پیروگالل (۱۰) تعیین شد. به منظور تعیین درجه خلوص این هموپروتئین از شاخص Rz استفاده شد که مقدار آن عبارت است از نسبت میزان جذب نوری در طول موج ٤۰۳ نانومتر به میزان جذب نوری در طول موج ۲۷۵ نانومتر. کلیه این پارامتر ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر- BECKMAN Du-640 UV-VISIBLE اندازه گیری شد .

سپس نمونه جهت کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون روی ستون sephadex G-100 در مقابل بافر فسفات۰/۰۲ مولار و ۷/۲ = PH دیالیزشده‌وپس از انتقال به ستون و شستشوی آن با بافر، میزان‌جذب نوری در ۲۸۰نانومتروفعالیت‌آنزیم‌اندازه‌گیری شده و محتوای لوله‌های دارای فعالیت پراکسیدازی بالا با یکدیگر ادغام وRz، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌درآنهااندازه‌گیری شد.درمرحله‌بعدجهت‌انتقال به‌ستون CM-Cellulose درمقابل‌بافراستات ۰/۰۰۵ مولار و٤/٤ = PH دیالیزشدو به ستون‌منتقل و با استفاده‌ازگرادیان خطی‌بافرشستشو داده شدچنانچه درنمودار شماره ۱ ملاحظه می‌شود لوله‌های دارای فعالیت‌پراکسیدازی‌بالا(پیکI) با یکدیگر ادغام شده و سنجشهای لازم در آن صورت‌گرفت(۱۱).

سپس جهت انجام کرو ماتوگرافی روی DEAE-Cellulose در مقابل پروتئین و فعالیت آنزیم در آنها اندازه گیری شد. در مرحله بعد جهت انتقال به‌ستون CM- Cellulose درمقابل‌بافراستا ت۰/۰۰۵ مولارو۸/٤ = PH دیالیزشد و به ستون‌منتقل‌وبا استفاده‌ازگرادیان خطی بافرشستشوداده‌شد،چنانچه درنمودارشماره ۱ ملاحظه می‌شود لوله های دارای فعالیت پراکسیدازی بالا (پیک ۱) با یکدیگر ادغام شده و سنجشهای لازم در آن صورت گرفت.

سپس جهت انجام کروماتوگرافی روی DEAE-Cellulose در مقابل با فرتریس ۰/۰۰۵ مولار و ۸/٤= PH دیالیزانجام گرفت وپس‌ازانتقال‌نمونه به ستون‌بابافرتریس‌شامل‌گرادیان خطی‌ازنمک‌شستشو داده شد و پارامترهای مربوطه درآنها اندازه‌گیری شد.

لوله‌های‌دارای‌فعالیت‌پراکسیدازی(پیکIIوپیکIII درنمودار شماره ۱) هر کدام به ستون-CM Cellulose دوم منتقل شده و با گرادیان خطی بافر شستشوداده شد تا شاخص‌های مذکور در آنها اندازه‌گیری شود(۱۲). نهایتا نمونه های کنار گذاشته از هر مرحله همراه با مارکر های وزن مولکولی SDS- PAGE شده و وزن مولکولی ایزو آنزیمها محاسبه شد.

نتایج

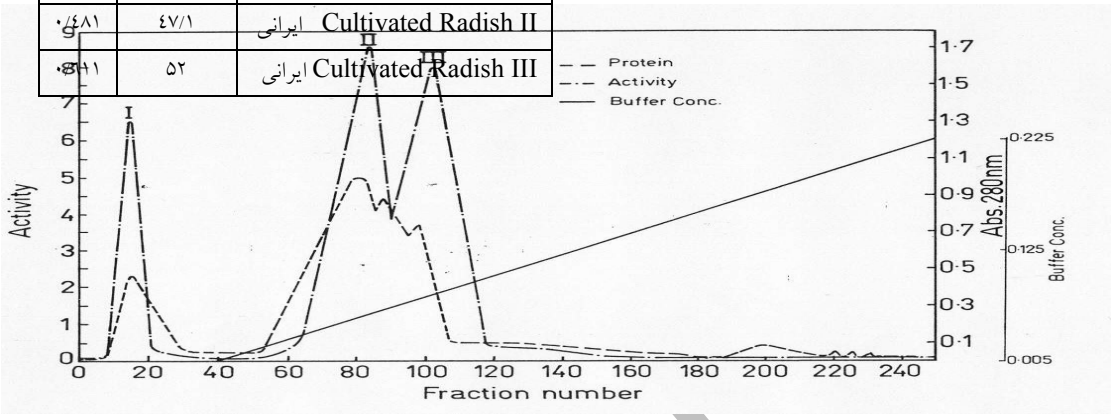
ایزوآنزیمهای بدست آمده(نمودار۱) فعالیت ویژه و RZ قابل مقایسه با انواع تجاری آنزیم پراکسیداز دارند(جدول ۱). درجه خلوص ایزوآنزیم I ۸۵/۲ بار، ایزوآنزیم II ۳۹/٦ بار و ایزوآنزیم III ٤۳/۷ بار افزایش نشان می دهد (جدول۲). وزن مولکولی ایزوآنزیم‌ها در مقایسه با مارکرهای وزن

Archive of SID
www.SID.ir

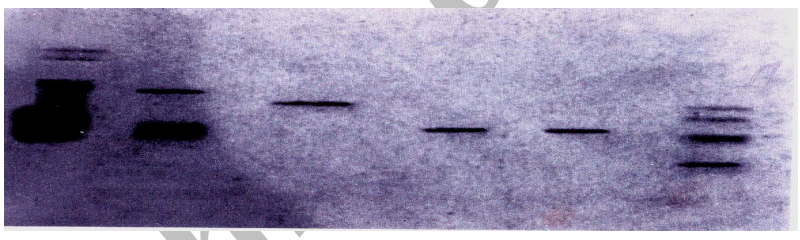
مولکولی (عکس ۱) بدست آمـد ایزوآنـزیم I: ۴۲ کیلو دالتون و ایزو آنزیمII وIII: ۵۸ کیلو دالتون.

جدول‌شماره۱: مقایسه فعالیت ویژه و RZ ایزو آنزیمهای خالص شده با نمونه های تجاری

پراکسیداز	فعالیت ویژه	RZ
Cat.NO.6782 سیگما	۲۵۰	۳
Cat.NO.8250 سیگما	۱۵۰-۲۵۰	۲
Worthington HRP	۸۵	۱
Cat.NO 1432 سیگما	۵۰-۷۰	۰/۵
Cat.NO.8000 سیگما	۴۰	۰/۵
Cultivated Radish ایرانی	۷۲/۲	۰/۹۰۵
Cultivated Radish I ایرانی	۱۰۱/۴	۱/۷۱۱
Cultivated Radish II ایرانی	۴۷/۱	۰/۴۸۱
Cultivated Radish III ایرانی	۵۲	۰/۶۱۱



نمودار شماره ۱: کروماتوگرافی روی ستون CM سلولز نمونه حاصل شده از ستون سفادکس G-100



۱ ۲ ۳ ۴ ۵

عکس شماره ۱: ۱- نمونه جمع آوری شده ازCM سلولز(پیک I,II,III) ۲- پیک شماره I ۳ -پیک شماره II ۴ -پیک شماره III ۵- مارکر های وزن مولکولی (۹۷-۶۵-۴۵-۳۰ کیلو دالتون)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: مشخصات ایزو آنزیمهای پراکسیداز در مراحل مختلف استخراج و خالص سازی

نمونه	حجم (ml)	فعالیت (unit/ml)	کل (unit)	کل (mg)	فعالیت ویژه (Unit /mg)	درصد بازدهی	درجه خلوص	RZ
عصاره خام	۳۵۰	۱/۳٦	٤۷٦	۳۹۹	۱/۱۹	٪۱۰۰	۱/۰۰	۰/۰٤۹
سولفات آمونیم۳۵-۰٪	۳۵۵	۱/۱۵	۳۸۵/۲۵	۳۲۱/۹	۱/۱۹	٪۸۰/۹	۱/۰۰	۰/۰٦۵
سولفات‌آمونیم۹۰-۳۵٪	۲۰	۲۰/۵۷	٤۱۱/٤	۹٦	٤/۲	٪۸٦/٤	۳/۵۲	۰/۰۹
سفادکس G-100	۳۸	۱۰/۳	۳۹۱/٤	٤۵/٦	۸/۵۸	٪۸۲/۲	۷/۲	۰/۲۵۱
CM سلولز I	۲۰	٦/۱	۱۲۲	۲۲	۵/۵٤	٪۲۵/٦	٤/٦	۰/۱۹۷
CM سلولز II	۱۸	۷/٤	۱۳۳/۲	۱۲/۲٤	۱۰/۸	٪۲۷/۹	۹/۱	۰/۲۸۳
CM سلولز III	۱٤	۸	۱۱۲	۵/۷٤	۱۹/۵	٪۲۳/۵	۱٦/۳	۰/۳۷۱
DEAE سلولز I	۱۲	۷/۱	۸۵/۲	۰/۸٤	۱۰۱/٤	٪۱۷/۸	۸۵/۲	۱/۷۱۱
DEAE سلولز II	۸	۱۵/۱	۱۲۰/۸	۲/۵٦	٤۷/۱	٪۲۵/۳	۳۹/٦	۰/٤۸۱
DEAE سلولزIII	۱۲	۵/۲	٦۲/٤	۱/۲	۵۲	٪۱۳/۱	٤۳/۷	۰/٦۱۱

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تغلیظ عصاره خام با استفاده از پودر سولفات آمونیم در دو مرحله صورت گرفت. نظر به اینکه حلالیت آنزیم پراکسیداز در درصد های مختلف اشباع متفاوت است دومرحله با درصد اشباع (۳۵-۰)و (۹۰-۳۵) مد نظر قرار گرفت. از آنجائیکه پراکسیداز تا ۵۸٪ اشباع سولفات آمونیم قابل حل شدن است پس انتظار می‌رفت در بخش رسوب مرحله (۳۵-۰٪) هیچگونه فعالیت پراکسیدازی مشاهده نشود و از محلول رویی جهت ادامه فرایند تغلیظ استفاده شود. با توجه به اینکه پراکسیداز در درجات اشباع بالاتر از ۶۲٪ با سولفات آمونیم غیر قابل حل شدن است، برای ادامه پروسه باید از بخش رسوب فراکش (۹۰-۳۵٪) استفاده کنیم که نتایج حاصله دقیقا این مطلب را تایید کردند. ضمن اینکه RZ نمونه در هر مرحله نسبت به مراحل قبلی نیز افزایش یافت. لازم به تذکر است که روند خالص سازی آنزیم پراکسیداز در خارج از کشور و حتی روشهای اجرا شده در داخل کشور بعد از سولفات آمونیم از حلالهای آلی استفاده می کنند که در این مرحله مقدار زیادی از درصد بازدهی (yeild) آنزیم به دلایل زیر از دست خواهد رفت . در این مطالعه از حلالهای آلی به این دلیل استفاده نشد :

۱- چون حلال آلی مورد نیاز برای استخراج پروتئینها معمولا ۲ تا ۳ برابر محلول اولیه می باشد لذا حجم محلول نهایی بسیار زیاد شده و مقدار آنزیم بیشتری طی انجام این مرحله از دست خواهد رفت. ۲- با توجه به این واقعیت که حلالهای آلی حلالیت تمام پروتئینها را کم می کند پس فرآیند خالص سازی طولانی تر و بازده عمل کمتر خواهد شد.

به نظر می رسد در طی انجام یک پروسه خالص‌سازی، به منظور حفظ ساختار آنزیم بهتر است حتی الامکان مراحل اجرای روند کوتاهتر باشند زیرا از دست رفتن درصد بازدهی (yeild) در هر مرحله اجتناب ناپذیر است بنابراین ملزم به حذف مراحل اضافی می باشیم.

Archive of SID
www.SID.ir

با هدف جداسازی ایزو آنزیمهای مذکور ، نمونه‌های خارج شده از ستون ژل فیلتراسیون را به ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیونی منتقل نمودیم که سه پیک فعال آنزیمی حاصل شد. پیک I که بلافاصله از ستون خارج شد، مبین وجود ایزو آنزیمهای حاوی بار منفی است که جذب CM-Cellulose نشده اند اما پیک II,III نمایانگر وجود ایزو آنزیمهایی هستند که جذب ستون شده بودند و با تغییر شرایط در بافر شستشو دهنده از ستون شسته شدند پس دارای بار مثبت می باشند. در مجموع درجه میزان خلوص آنزیم ۳۰ برابر عصاره خام است. بعد از جدا شدن ایزو آنزیمها، محتویات موجود در هر پیک فعال آنزیمی جداگانه بررسی شدند.

پیک I که حاوی بار منفی بود به ستون DEAE-Cellulose منتقل شد که با شستشوی بافری با گرادیان خطی نمک افزایش قابل ملاحظه ای در میزان فعالیت ویژه نشان داد که ظهور تک باند در SDS-PAGE دلیلی بر خلوص این آنزیم می‌باشد. اما پیک II و III که جزو ایزوآنزیمهای بازی هستند که جهت خالص سازی بیشتر به ستون تعویض کاتیونی دوم بابافر شستشو دهنده متفاوت منتقل شدند . هر دو این ایزو آنزیمها افزایش قابل ملاحظه ای را در درجه خلوص نشان دادند و در SDS-PAGE نیز تک باند حاصل شد.

در کل می توان گفت سه ایزو آنزیم بدست آمده از کروماتوگرافی مجدد درجه خلوصی به اندازه ۱۶۸/۵ برابر بیشتر از عصاره خام ارائه دادند و میزان RZ نیز در هریک از آنهاافزایش قابل ملاحظه ای داشت. تفاوت بین ایزوآنزیمهای اسیدی و بازی علاوه بر وزن مولکولی، طبعا ناشی از اختلاف بین گروههای یونیزه آنها می باشد که در صورت وجود امکانات کافی جهت تعیین توالی اسیدهای آمینه، می توان دقیقا به این اختلاف مولکولی پی برد. در هر صورت این ایزو آنزیمها به طور طبیعی در ریشه گیاه ایرانی وجود دارند و چه بسا با اعمال روشهای دیگر قادر به دستیابی به مقادیر بیشتری از این ایزو آنزیمها شویم که در مقایسه با نمونه های تجاری هماهنگی های قابل قبولی دارند. با توجه به کاربرد های فراوان آنزیم چه در زمینه تشخیصهای بالینی و چه از طریق کونژوگه کردن با آنتی بادیها و فعال کردن ماکروفاژها جهت تشخیص تومورهای سرطانی ، لزوم استخراج و خالص سازی این آنزیم احساس می شود .بدیهی است که جهت استفاده از آنزیم ها در موارد مختلف فعالیت ویژه خاصی مد نظر قرار می‌گیرد. به عنوان مثال در کیتهای آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری قند و کلسترول فعالیت ویژه تا حدود ۵۰ واحد در میلی گرم کافی می باشد. بنابراین با طرح‌ریزی روشهای مختلف می توان به ایزو آنزیم‌های پراکسیداز با فعالیت ویژه مد نظر دست یافت.

با ذکر این نکته که پایداری حرارتی آنزیم و مقاومت به PH های مختلف در این آنزیم بالاست بنابراین در طرح ریزی روشهای خالص سازی دچار اشکالات ویژه نخواهیم شد و حتی الامکان می توان کلیه صرفه جوییهای لازم را اعمال نمود . با امید اینکه با استفاده از منابع ارزان قیمت موجود در کشور و نیز اجرای روشهای استخراج و خالص سازی پراکسیداز در سطح تولید انبوه ، ضمن جلوگیری از صرف هزینه های گزاف ارزی جهت خرید از کشورهای خارجی، گامی موثر در جهت خودکفایی برداشته شود.

تقدیر و تشکر

این‌طرح‌تحقیقاتی‌باهمکاری صمیمانه ومساعدتهای

Archive of SID

www.SID.ir

بی دریغ اساتید گرانقدر و اعـضای محتـرم گـروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشـکی شهید بهشتی انجام گرفت که بدین وسـیله مراتـب سپاسگزاری را تقدیم می داریم.

منابع

1. Neitch NC. Horseradish Peroxidase: Modern View of Classic Enzyme. Phytoche Mistry 2004: 65(3): 249-50.
2.Lasagna M. Gratton E, Jamesa D M. Apohorseradish Peroxidase Unfolding and Refolding: Biophy J 1999: 76(10): 443-445.
3.Kristensen B K, Bloch H, Rasmnssen S K. Barley Eoleoptile Peroxidase Purification, Molecular Cloning, and Induction by Pathogens. Plant Physiology 1999: 120(2): 501-512.
4.Welinder KG. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. Eur J. Biochem 1997: 96: 483-502.
5.Graham C, Karnousky M. Localization of Hormones with the Peroxidase Labeled Antibody Methods. Histochem Cytochem 1993: 14: 291.
6.Nokame PK, Chivez U, Taylor C. Peroxidase – Labeled Antibody Methods. Acta Endocrinology 1981: 153: 195.
7.Carl A, Burits E, Ashwood R. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W B Sunders, 1999: 776, 840, 1244, 1250.
8.Regalado C, Asenjo JA, Pyle DL. Studies on Purification from Horseradish Roots. Enzyme Microb Technol 1996: 18(5): 332-9.
9.Compton J, Jons G. Mechanism of Dye Response and Interferences in the Bradford Protein Assay. Anal Biochem 1985: 151: 369- 348.
10. Huang S, Lee Y. Seperation and Purification of Horseradish Peroxidase from Amoracia rusticana Root . Bioseperation 1994: 4:1-5.
11.Price N, Pinheiro C, Soares D, Ashford C. A Biochemical and Molecular Characterization of Extensin Peroxidase. J Biol Chem 2003: 278(42): 41389- 41399.
12. Chen Z, Patricia A, Mabronk. Isolation and Purification of Soyabean Peroxidase. Plant Physiology 1998: 96:214-220.

Archive of SID

www.SID.ir