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

چکیده

مقدمه: پراکسیداز از گلیکوپروتئینهای حاوی هم بوده و دارای ایزو آنزیمهای کاتیونی و آنیونی متفاوتی است . این آنزیم کاربردهای فراوانی در زمینه تشخیص های آزمایشگاهی به روش ایمونواسی در تکنیک ELISA برای اندازه گیری هورمونها و سم باکتریها دارد . علاوه بر آن در تشخیص آنتی ژنهای بافتی و فعال کردن ماکروفاژها در برابر تومورهای سرطانی نیز بکار می رود ضمن اینکه اندازه گیری گلوکز ، اوره ، اسید اوریک نیز توسط این آنزیم قابل اجراست.

پراکسیداز به مقادیر متفاوتی در منابع گیاهی قابل دسترس وجود دارد در حالیکه آنزیم مصرفی کشور با صرف هزینه های ارزی از خارج وارد می شود .

هدف: این مطالعه تجربی با هدف جداسازی آنزیم های مختلف از گیاه Cultivated Radish انجام گرفت .

مواد و روش ها: استخراج با هموژنیزه کردن ریشه گیاه و تغلیظ عصاره خام با سولفات آمونیم انجام شد . روند خالص سازی با بکارگیری کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض کاتیونی پیگیری شده و جداسازی ایزو آنزیم های اسیدی و بازی با بهره گیری از کروماتوگرافی های مجدد صورت گرفت و نهایتا SDS- PAGE انجام شد .

نتایج: در نتیجه اعمال این روش‌ها درجه خلوصی به اندازه ۱۶۸/۵ برابر عصاره خام حاصل شد که فعالیت ویژه آنها قابل مقایسه با انواع تجاری می‌باشد.

نتیجه گیری: نتایج این طرح نشان می دهد که با اعمال روشهای مناسب قادر به دستیابی به ایزو آنزیمهای پراکسیداز خواهیم شد با توجه به مقاومت در برابر PH های مختلف و نیز پایداری حرارتی آنزیم ، با طرح ریزی روشهای خالص سازی می توان حداکثر صرف جوییهای لازمه را اعمال نمود .

امید است که با استفاده از منابع فراوان و ارزان گامی موثر در راستای تولید انبوه آنزیم در سطح کشور برداشته شده تا از صرف هزینه های ارزی جهت خرید آنزیم پراکسیداز جلوگیری شود .

کلید واژه ها : ایزوآنزیمها / پراکسیداز / گیاهان شفابخش

مقدمه

آنزیم‌پراکسیدازازمهمترین‌آنزیمهای خانواده‌اکسیدو ردوکتازها بوده و با EC:1.11.1.7 مشخص می‌شود از هموپروتئینهای گلیکو پروتئینی‌است که گروه پروستتیک‌آن‌حاوی پروتوپورفیرین‌IX Fe است(۱). درساختاراین‌آنزیم‌اتم‌کلسیم‌دیده‌شده‌که برای شکل گرفتن ساختار سوم پروتئین ضروری‌است(۲). وجوددهمار 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 به‌روش ایمونواسی درتکنیک 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 تذکراست که‌هنوز 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.

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.

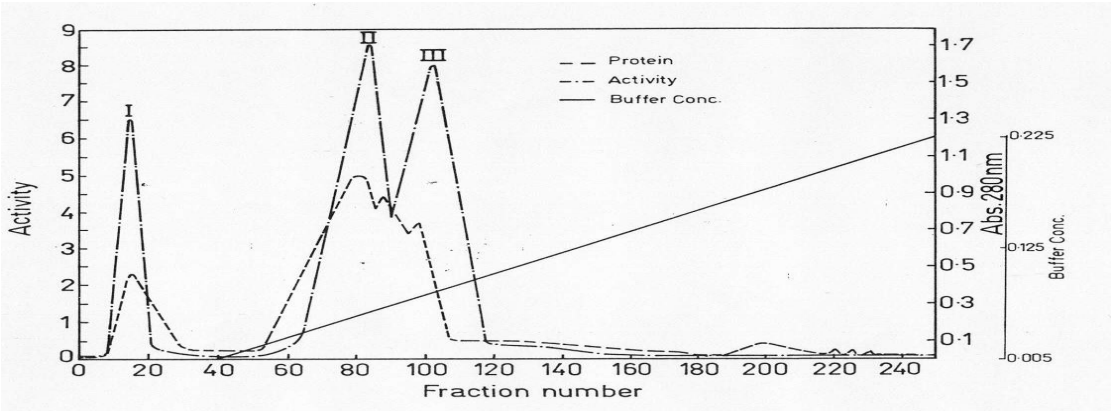
سپس جهت انجام کروماتوگرافی روی DEAE-Cellulose در مقابل با فرتریس ۰/۰۰۵ مولار و PH =۸/٤ دیالیزانجام گرفت وپس‌ازانتقال‌نمونه به ستون‌بابافرتریس‌شامل‌گرادیان خطی‌ازنمک‌شستشو داده شد و پارامترهای مربوطه درآنها اندازه‌گیری شد. لوله‌های‌دارای‌فعالیت‌پراکسیدازی(پیک IIو پیک III درنمودار شماره ۱) هر کدام به ستون 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

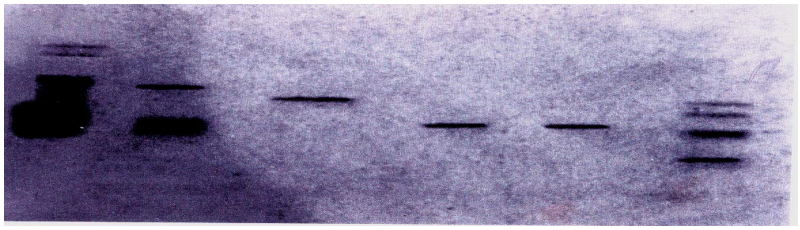
ایزوآنزیمهای بدست آمده(نمودار۱) فعالیت ویژه و RZ قابل مقایسه با انواع تجاری آنزیم پراکسیداز دارند(جدول ۱). درجه خلوص ایزوآنزیم I ۸۵/۲ بار، ایزوآنزیم II ۳۹/٦ بار و ایزوآنزیم III ٤۳/۷ بار افزایش نشان می دهد (جدول۲). وزن مولکولی ایزوآنزیم‌ها در مقایسه با مارکرهای وزن مولکولی (عکس ۱) بدست آمد ایزوآنزیم I: ٤۲ کیلو دالتون و ایزو آنزیمII و III: 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	٤۰	۰/۵
Cultivated Radish ایرانی	۷۲/۲	۰/۹۰۵
Cultivated Radish I ایرانی	۱۰۱/٤	۱/۷۱۱
Cultivated Radish II ایرانی	٤۷/۱	۰/٤۸۱
Cultivated Radish III ایرانی	۵۲	۰/٦۱۱



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



عکس شماره ۱: ۱- نمونه جمع آوری شده از CM سلولز(پیک I,II,III) ۲- پیک شماره I ۳ -پیک شماره II ٤ -پیک شماره III ٥- مارکر های وزن مولکولی (۹۷-٦٥-٤٥-۳۰ کیلو دالتون)

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	٤٧٦	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 ٦۲٪ 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.

بـا هـدف جداسـازی ایـزو آنـزیمهای مذکـور ، نمونـه‌هـای خارج شده از ستون ژل فیلتراسیون را بـه سـتون کروماتوگرافـی تعویـض کاتیونی منتقل نمودیم که سه پیک فعال آنزیمی حاصل شد. پیک I کـه بلافاصـله از سـتون خـارج شد، مبین وجود ایـزو آنـزیمهای حـاوی بـار منفی است که جذب CM-Cellulose نشـده اند اما پیک II,III نمایانگر وجود ایزو آنزیمهایی هستند که جذب ستون شده بودنـد و بـا تغییر شرایط در بافر شستشو دهنده از ستون شسته شدند پس دارای بار مثبت می باشند.

در مجمـوع درجـه مـیزان خلـوص آنزیم۳۰ برابر عصـاره خام است. بعد از جدا شدن ایزو آنزیمها، محـتویات موجـود در هـر پـیک فعـال آنزیمـی جداگانه بررسی شدند.

پـیک I کـه حاوی بار منفی بود به ستون DEAE-Cellulose منـتقل شـد کـه بـا شستشوی بافری با گـرادیان خطـی نمک افزایش قابل ملاحظه ای در مـیزان فعالیت ویژه نشان داد که ظهور تک باند در SDS-PAGE دلیلی بر خلوص این آنزیم می‌باشد.

امـا پـیک II و III کـه جـزو ایزوآنـزیمهای بـازی هسـتند کـه جهـت خـالص 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 کـل می توان گفت سه ایزو آنزیم بدست آمده از کروماتوگرافـی مجـدد درجه خلوصی به اندازه ۱٦۸/۵ برابـر بیشـتر از عصـاره خـام ارائه دادند و مـیزان RZ نـیز در هـریک از آنهاافـزایش قـابل ملاحظـه ای داشـت. تفـاوت بیـن ایزوآنـزیمهای اسیدی و بازی علاوه بر وزن مولکولی، طبعا ناشی از اخـتلاف بیـن گروههای یونیزه آنها می باشد که در صـورت وجـود امکانـات کافـی جهـت تعیین توالـی اسـیدهای آمیـنه، مـی تـوان دقـیقا بـه این اخـتلاف مولکولی پی برد. در هر صورت این ایزو آنـزیمها به طور طبیعی در ریشه گیاه ایرانی وجود دارنـد و چـه بسـا با اعمال روشهای دیگر قادر به دسـتیابی بـه مقادیـر بیشـتری از ایـن ایزو آنزیمها شـویم کـه در مقایسـه بـا نمونـه هـای تجـاری هماهنگـی هـای قـابل قبولـی دارنـد. بـا توجه به کاربرد های فراوان آنزیم چه در زمینه تشخیصهای بالینـی و چه از طریق کونژوگه کردن با آنتی بادیها و فعـال کـردن ماکـروفاژها جهـت تشـخیص تومورهـای سـرطانی ، لـزوم اسـتخراج و خـالص سـازی ایـن آنـزیم احساس می شود .بدیهی است کـه جهـت استفاده از آنزیم ها در موارد مختلف فعالیـت ویـژه خاصـی مـد نظـر قـرار می‌گیرد. به عـنوان مـثال در کیـتهای آزمایشـگاهی بـرای انـدازه‌گیری قند و کلسترول فعالیت ویژه تا حدود ۵۰ واحـد در میلـی گرم کافی می باشد. بنابراین با طـرح‌ریـزی روشـهای مخـتلف مـی توان به ایزو آنـزیم‌های پراکسیداز با فعالیت ویژه مد نظر دست یافت.

بـا ذکـر ایـن نکـته کـه پـایداری حرارتی آنزیم و مقاومت به PH های مختلف در این آنزیم بالاست بنابرایـن در طـرح ریـزی روشـهای خالص سازی دچـار 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 کشـور و نـیز اجـرای روشـهای اسـتخراج و خـالص سـازی پراکسـیداز در سطح تولید انبوه ، ضمن جلوگیری از صرف هزینه های گزاف ارزی جهـت خرید از کشورهای خارجی، گامی موثر در جهت خودکفایی برداشته شود.

تقدیر و تشکر

این‌طرح‌تحقیقاتی‌باهمکاری صمیمانه ومساعدتهای

بـی دریـغ اسـاتید گرانقدر و اعضای محترم گروه بیوشـیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شـهید بهشـتی انجام گرفت که بدین وسیله مراتب 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.

Separation and Purification of Peroxidase Isoenzymes from Cultivated Radish

Aghajany Nasab M, Pejhan N, Bastany A.

Abstract

Introduction: Peroxides is a glycoprotein that contains hem group and variable cationic and anionic is enzymes.

This enzyme is used in laboratory diagnosis for determination of hormones and bacterial toxins with ELISA method , detection of tissue antigens and macrophage activation against tumoral cells.

In addition , this enzyme is used for measurement of glucose, urea, uric acid and cholesterol.

Although peroxides is widely seen in available sources of plants, this enzyme for meeting the consuming needs of our country is imported from abroad with high foreign currency costs.

Objective: This experimental study was conducted for separation and purification of peroxides is enzymes from cultivated radish which is cheap and abundant in all seasons in Iran.

Materials and Methods: Extraction was carried out by homogenization of plant roots and concentration of Ammonium sulfate. Then, purification method was followed by gel filtration, cationic exchange chromatography. Finally, separation of basic and acidic is enzymes was conducted by different and repeated column chromatography and SDS-PAGE.

Results: As a result of these procedures, Purification degree obtained was 168.5 folds more than the raw extract and specific activity was comparable with commercial peroxides .

Conclusion: As this enzyme is stable at wide range of PH and temperature, we can economize its purification methods to a great extent and achieve the maximum required foreign currency savings.

It is hoped that with the use of wide and cheap sources , we can take an effective step toward large scale production of the enzyme in our country and avoid spending our financial resources in purchasing peroxides from foreign countries.

Key words: Isoenzymes/ Peroxidase/ Plants, Medicinal

A:\n1.jpg