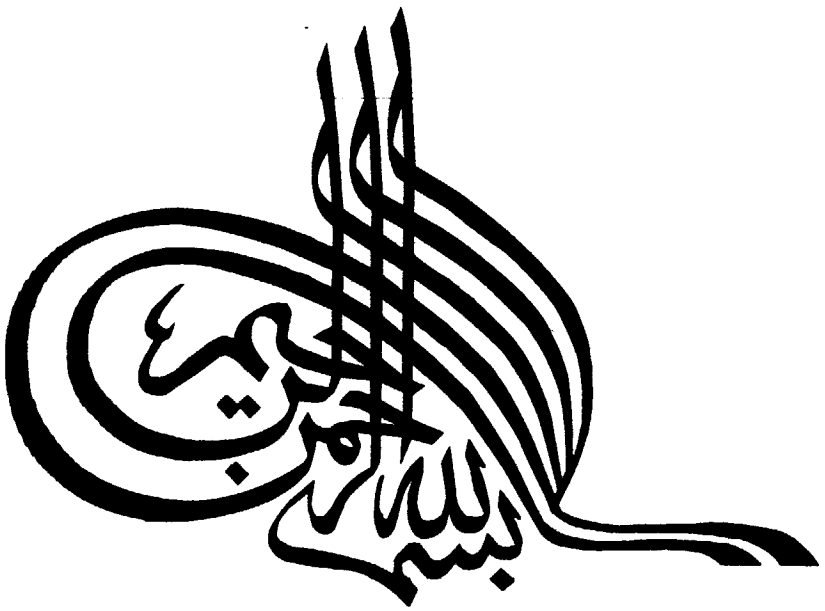

۶۵۹۳
۶۵ - داخل مجدی
کتابخانه ۱۲۰
۳۹۹۳۸

۱۳۸۱ /۱/ ۲۲

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

جهت دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ بیوشیمی بالینی

موضوع:

تخلیص و تعیین برخی خواص فیزیکو شیمیایی آنزیم گلوتامات دهیدروژناز از باکتری کوماموناس اسیدوارنس

016665

نگارش:
رضا مشکانی

اساتید راهنما:
دکتر محمد تقی‌خانی

۳۹۹۳۸

استاد مشاور:
دکتر عباس صمدی

شهریور ماه ۱۳۸۰

۳۹۹۳۸

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **آقای رضا مشکانی**

رشته: **بیوشیمی بالینی** گرایش:

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر محمد تقی‌خانی (ستاد راهنما)

جناب آقای دکتر عباس صمدی (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر ریاضی (استاد ناظر)

سرکار خانم دکتر بطحائی (استاد ناظر)

بسمه تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ بیوشیمی بالینی است که در سال ۱۳۸۰ در دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر محمدتقی خانی ، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر عباس صدری و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب رضا ... دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: رضا ...

تاریخ و امضاء

۸/۱۱/۱۳۸۰

تقدیم به

پدرپاکدل و مهربانم و مادر دلسوز و صبورم

آنانکه همواره دستها و دلهایشان پشتوانهٔ زندگی

و دعاهایشان تکیه گاه تلاشهایم بوده است.

و

تقدیم به

برادران و خواهرانم که همیشه یاور و پشتیبانم

بوده‌اند.

سپاسگزاری:

به نام خداوند جان و خرد　　کزین برتر اندیشه بر نگذرد

شکر بیکران خداوندی راکه ما را توفیق و راه و رسم بندگی و کتابت آموخت. سپاس فراوان بر ذات مقدس او که بر من منت نهاد تا بتوانم این تحقیق را به پایان ببرم. موقعیت را غنیمت شمرده سپاس و امتنان خود را از اساتید گرانقدر و عزیزانی که در مراحل مختلف این تحقیق یاریم دادند، ابراز دارم.

ـ از جناب آقای دکتر محمد تقی‌خانی، استاد فرهیخته و اندیشمند که راهنمایی این تحقیق را برعهده داشته و با راهنمائیهای ارزنده‌شان در پیشبرد این تحقیق همت گماشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

ـ از جناب آقای دکتر عباس صمدی، استاد راهنما و مشاور پایان‌نامه، که صادقانه ترجیبات گرانمایه خویش را در اختیار اینجانب قرار داده و همه گونه همکاری لازم را مبذول داشتند سپاسگزاری می‌نمایم.

ـ از سرکار خانم دکتر خاتمی ریاست محترم بخش بیوشیمی انستیتو پاستور که با خلوص نیت از هرگونه مشاورت و معاضدت دریغ نفرمودند کمال تشکر را دارم.

ـ از جناب آقای دکتر امیدنیاو آقای عمومی، سروران گرامی که از تجربیات علمی ارزنده‌شان بهره‌های فراوان جستم تشکر و امتنان دارم.

ـ از سرکار خانم دکتر بطحائی، استاد گرانقدر که در ویرایش نهایی پایان‌نامه زحمت فراوان متقبل شدند و اینجانب را همواره از راهنمائیهای ارزنده شان دریغ نفرموده‌اند سپاسگزاری می‌نمایم.

ـ از جناب آقای دکتر لطفی مدیر محترم گروه و سرکار خانم دکتر کرمی و کلیه اساتید گروه بیوشیمی بالینی که در طی این چند سال زحمات فراوانی جهت ارتقاء سطح علمی گروه متحمل شده‌اند صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

ـ از اعضاء هیأت علمی و پرسنل فهیم بخش بیوشیمی انستیتو پاستور، بخاطر همکاریهای صادقانه و مساعدتهایشان در کلیه مراحل تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

ـ از دوستان عزیزم جناب آقایان علی ملکی، علی اصغر کیانی، محمدعلی جلالی فر، و ناصر احمدی و سایر هم‌خوابگاهیهای ارجمند که همواره از پشتیبانیها و کمکهای ایشان بهره جسته‌ام قدردانی می‌نمایم.

چکیده:

گلوتامات دهیدروژناز (GDH) واکنش تبادل ۲-اکسوگلوتارات و ال -گلوتامات را کاتالیز می‌کند. این آنزیم تقریباً در تمام ارگانیسم‌ها وجود دارد، زیرا نقش مهمی در متابولیسم واسطه‌ای اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها دارد. بر اساس مطالعه روی باکتریهای خاک، نشان داده شده است که کوماموناس اسیدوارنس که یک باکتری غیر بیماری‌زای خاک است، فعالیت زیادی از GDH را دارد. در این مطالعه این آنزیم از این باکتری بعد از رشد آن در بهترین محیط کشت، استخراج و خواص فیزیکوشیمیائی آن بررسی شد. ال -گلوتامات به محیط کشت افزوده شد تا فعالیت GDH القاء گردد. پس از رشد، سلول‌ها توسط سونیکه شدن خرد شدند و آنزیم از عصاره سلولی توسط رسوب‌گیری با سولفات آمونیم ۳۵ درصد و بعد ۷۰ درصد، رسوب داده شد. بعد از آن، نمونه توسط روشهای مختلف کروماتوگرافی، از جمله غربالگری ژل روی سفادکس G-۲۰۰، کروماتوگرافی تعویض یونی روی DEAE - سلولز و کروماتوگرافی تمایلی روی پورسیون بلو MX-R خالص شد. پیشرفت مراحل به تعیین جذب نمونه‌ها در ۲۸۰ نانومتر و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، پیگیری شد. فعالیت ویژه آنزیم خالص شده ۸۰/۹۰ واحد بر میلی‌گرم، مرتبه خالص سازی ۱۶/۳۴ و بازده کار ۱۸/۴۸ درصد بود. همچنین خلوص و وزن مولکولی زیر واحدهای آنزیم توسط الکتروفورز روی صفحه - SDS تعیین شد. بر طبق این نتایج وزن مولکولی زیر واحد آنزیم برابر ۱ ±۴۷ کیلودالتون تعیین شد. وزن مولکولی آنزیم طبیعی توسط HPLC غربالگری ژل روی TSK ژل ۳۰۰۰ SW تعیین شد و برابر ۵ ±۲۷۵ کیلودالتون بدست آمد. بنابراین احتمالاً آنزیم شش زیر واحدی می‌باشد. همچنین کینتیک آنزیم خالص شده، بررسی شد. بر خلاف NAD^+، آنزیم هیچگونه فعالیتی در حضور $NADP^+$ نشان نداد، پس آنزیم برای NAD^+ ویژه است. pH بهینه آنزیم

در واکنش تبدیل ال-گلوتامات، ۹/۲۵ و در واکنش بالعکس، ۸/۲۵ تعیین گردید. مطالعه پایداری حرارتی آنزیم طی مدت ۱۰ دقیقه نشان داد که آنزیم در ۲۰ تا ۳۷ درجه سانتی گراد پایدار است، حال آنکه سریعاً در ۵۵ درجه سانتی گراد غیرفعال می‌شود. پارامترهای km و Vmax آنزیم نیز برای سوبستراهایش تعیین گردید.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱: مقدمه: ۲

۱-۲: باکتری کوماموناس اسیدوارنس ۵

۱-۳: آنزیم گلوتامات دهیدروژناز: (GDH) ۷

۱-۴: عمل متابولیکی آنزیم GDH ۸

۱-۴-۱: حد واسط متابولیسم اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها ۸

۱-۴-۲: کمک به ذخیره‌سازی آمونیاک در داخل سلول ۹

۱-۵: سابقهٔ تحقیق ۹

۱-۶: گستردگی آنزیم و اختصاصیت کوآنزیم ۱۲

۱-۶-۱: قارچ‌ها ۱۳

۱-۶-۲: باکتری‌ها ۱۳

۱-۶-۳: گیاهان ۱۴

۱-۶-۴: حیوانات ۱۴

۱-۷: ساختمان GDH انسانی ۱۵

۱-۷-۱: ساختمان الیگومر ۱۶

۱-۸: ساختمان GDH در منابع دیگر ۱۸

۱-۹: وزن مولکولی آنزیم ۲۱

۱-۱۰: سوبستراهای آنزیم ۲۲

عنوان	صفحه

۱-۱۱: جایگاه آنزیم ۲۳

۱-۱۲: ایزوآنزیم‌های گلوتامات دهیدروژناز ۲۳

۱-۱۳: مطالعه شیمیایی باند شدن سوبسترا و آنزیم ۲۴

۱-۱۴: مکانیسم کینتیکی آنزیم ۲۵

۱-۱۴: فعال‌کننده‌های آنزیم GDH ۲۸

۱-۱۶: مهارکننده‌های آنزیم ۲۹

۱-۱۷: اثر فلزات برفعالیت آنزیم GDH ۳۱

۱-۱۸: پایداری آنزیم GDH ۳۲

۱-۱۹: pH بهینه فعالیت آنزیم GDH ۳۳

۱-۲۰: Km آنزیم GDH ۳۴

۱-۲۱: تنظیم فعالیت GDH انسانی ۳۴

۱-۲۱-۱: نوکلئوتیدهای پورینی دی‌وتری‌فسفات: ۳۴

۱-۲۱-۲: سوبسترا و کوآنزیم: ۳۵

۱-۲۱-۳: چربی‌ها و هورمونهای استروئیدی: ۳۵

۱-۲۲: اهمیت بالینی GDH ۳۶

۱-۲۲-۱: بیماری‌های کبدی: ۳۶

۱-۲۲-۲: ازدیاد انسولین و آمونیاک خون در نوزادان ۳۷

۱-۲۲-۳: آسیب‌های مغزی ۳۸

۱-۲۳: کاربرد آنزیم GDH در تشخیص بالینی ۳۹

۱-۲۴: اهداف تحقیق ۴۰

عنوان	صفحه

فصل دوم: مواد و روشها ۴۱

۲-۱: محیط کشت باکتری کوماموناس اسیدوارنس ۴۲

۲-۲: فرمانتور ۴۳

۲-۳: طریقهٔ کشت باکتری کوماموناس اسیدوارنس ۴۳

۲-۴: جداسازی سلولهای کشت داده ۴۴

۲-۵: شرایط لازم برای تهیهٔ عصارهٔ سلولی ۴۵

۲-۵-۱: تهیهٔ بافر مناسب جهت عصارهٔ سلولی ۴۵

۲-۵-۲: بافر استفاده شده در این تحقیق ۴۶

۲-۶: اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد ۴۷

۲-۷: شکستن باکتری کوماموناس اسیدوارنس ۴۸

۲-۷-۱: شکستن سلول به روش اولتراسونیک ۴۸

۲-۷-۲: شکستن سلول به روش تلفیقی از اولتراسونیک و لیزوزیم ۴۹

۲-۸: روشهای تغلیظ ۴۹

۲-۸-۱: استفاده از مواد خشک پلیمری ۵۰

۲-۸-۲: اولترافیلتراسیون ۵۰

۲-۹: تعیین فعالیت آنزیمی ۵۱

۲-۹-۱: روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ۵۳

۲-۱۰: تعیین فعالیت ویژه ۵۵

۲-۱۱: تخلیص آنزیم ۵۵

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

عنوان | صفحه

۲-۱۱-۱: روش رسوبی با سولفات آمونیم: ۵۵

۲-۱۱-۱ـالف: تعیین بهترین درصد غلظت اشباعی جهت رسوب پروتئین ۵۶

۲-۱۱-۱ـب: رسوب آنزیم گلوتامات دهیدروژناز با استفاده از غلظت اشباعی ۳۵ درصد و ۷۰ درصد..... ۵۷

۲-۱۲: کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون توسط سفادکس G-200 ..... ۵۷

۲-۱۲-۱: نکاتی چند در مورد کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-200..... ۵۹

۲-۱۳: کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی DEAE - سلولز..... ۶۰

۲-۱۳-۱: آماده‌سازی ژل DEAE - سلولز ۶۰

۲-۱۳-۲: تعیین ظرفیت ژل DEAE - سلولز..... ۶۱

۲-۱۳-۳: روش انجام آزمایش: ۶۱

۲-۱۴: کروماتوگرافی تمایلی از نوع لیگاند - رنگ (dye - ligand)..... ۶۲

۲-۱۴-۱: روش انجام کروماتوگرافی تمایلی..... ۶۳

۲-۱۵ـ تنظیم جدول نهایی تخلیص آنزیم گلوتامات دهیدروژناز..... ۶۴

۲-۱۶ـ اثبات مراحل تخلیص و تعیین وزن ملکولی آنزیم به روش SDS-PAGE ۶۴

۲-۱۷: تعیین وزن ملکولی آنزیم به روش HPLC ژل فیلتراسیون..... ۶۶

۲-۱۷-۱: روش انجام آزمایش: ۶۷

۲-۱۷-۲: نکات مهم در کار با HPLC ۶۸

۲-۱۸: الکتروفورز معمولی (Non - denaturing electrophoresis) و رنگ‌آمیزی فعالیت آنزیم (Activity staining) ۶۹

۲-۱۸-۱: روش انجام آزمایش: ۷۰

عنوان | صفحه

۲-۱۹: تعیین pH بهینهٔ فعالیت آنزیم: ۷۱

۲-۲۰: بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما: ۷۲

۲-۲۱: بررسی پایداری آنزیم: ۷۲

۲-۲۲: تعیین کوآنزیم اختصاصی آنزیم ۷۲

۲-۲۳: تعیین Km و Vmax ۷۳

فصل سوم: نتایج ۷۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۹۷

بحث و نتیجه‌گیری ۹۸

منابع ۱۰۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: ویژگیهای باکتری کوماموناس اسیدوارنس..... ۶

جدول ۱-۲: بررسی اسیدهای آمینه آنزیم GDH [۹ و ۱۱]..... ۲۰

جدول ۱-۳: بررسی وزن مولکولی آنزیم GDH در چند منبع مختلف..... ۲۱

جدول ۱-۴: سوبستراهای مختلف آنزیم گلوتامات دهیدروژناز از منابع مختلف ۲۲

جدول ۱-۵: بررسی فعال کننده‌های آنزیم GDH در منابع مختلف..... ۲۸

جدول ۱-۶: مهارکننده‌های مختلف آنزیم GDH از منابع مختلف..... ۳۰

جدول ۱-۷: اثر فلزات مختلف بر فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در منابع مختلف..... ۳۱

جدول ۱-۸: مقادیر آنزیم GDH در مراحل مختلف آسیب کبدی [۱۲]..... ۳۶

جدول ۲-۱: تعیین فعالیت آنزیمی در جهت آمین‌زدایی..... ۵۳

جدول ۲-۲: تعیین فعالیت آنزیمی در جهت آمین‌دار کردن..... ۵۴

جدول ۳-۱: نتایج مربوط به تعیین وزن ملکولی آنزیم گلوتامات دهیدروژناز..... ۸۳

جدول ۳-۳: نتایج مربوط به تعیین وزن ملکولی آنزیم با روش HPLC ژل فیلتراسیون ۸۴

جدول ۳-۳: جدول نهایی تخلیص آنزیم گلوتامات دهیدروژناز ۸۷

جدول ۳-۴: نتایج مربوط به تعیین کوآنزیم اختصاصی..... ۹۵

جدول ۳-۵: بررسی پایداری آنزیم گلوتامات دهیدروژناز تخلیص شده ۹۶

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱: تعیین بهترین غلظت اشباعی سولفات آمونیم برای رسوب آنزیم GDH ۷۵

نمودار ۳-۲: کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-200 ۷۶

نمودار ۳-۳: کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی ژل DEAE - سلولز ۷۸

نمودار ۳-۴: کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تمایلی بروی Porcion Blue MX-R ۸۰

نمودار ۳-۵: تعیین وزن ملکولی آنزیم GDH ۸۳

نمودار ۳-۶: تعیین وزن ملکولی کل آنزیم GDH به روش HPLC ژل فیلتراسیون ۸۴

نمودار ۳-۷: کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به روش HPLC ۸۵

نمودار ۳-۸: ترسیم منحنی lineweaver - Burk برای +NAD ۸۸

نمودار ۳-۹: ترسیم منحنی lineweaver - Burk برای L ـ گلوتامات ۸۹

نمودار ۳-۱۰: ترسیم منحنی lineweaver - Burk برای NADH ۹۰

نمودار ۳-۱۱: ترسیم منحنی lineweaver - Burk برای آلفا کتوگلوتارات ۹۱

نمودار ۳-۱۲: ترسیم منحنی lineweaver - Burk برای +NH4 ۹۲

نمودار ۳-۱۳: تعیین pH بهینهٔ فعالیت آنزیم GDH ۹۳

نمودار ۳-۱۴: پایداری آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در برابر دما ۹۴