وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه مقطع کارشناسي ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و ملکولی

# بررسی تإثیرحلال‌های آلی برروی فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین‌آمیداز وپایدارسازی آن توسط افزودنی‌ها

استاد راهنمای اول:
محمد پاژنگ

استاد راهنمای دوم:
فرامرز مهرنژاد

استاد مشاور:
نادر چاپارزاده

پژوهشگر:
نرگس مردی

بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

**صورتجلسه نتیجهٔ دفاع از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد**

شماره: .....
تاریخ: .....


**بسمه تعالی**

طبق درخواست شمارهٔ ۱۱۱۵۳/د/۲۶۰ مورّخ ۹۲/۱۱/۸ تحصیلات تکمیلی دانشکدهٔ علوم پایه و مجوّز شمارهٔ ۴۱۷/۱۰۴۵ مورّخ ۹۲/۱۱/۹ تحصیلات تکمیلی دانشگاه، جلسهٔ دفاع از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد خانم نرگس مردی به شمارهٔ دانشجویی ۹۰۱۵۱۱۳۱۱ در رشتهٔ زیست شناسی گرایش سلولی ملکولی تحت عنوان: بررسی تاثیر حلالهای آلی بر روی فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین آمیداز و پایدارسازی آن توسط افزودنیها و به ارزش ۶ واحد، در ساعت ۱۶ مورّخ ۹۲/۱۱/۱۴ در حضور هیئت داوران مرکّب از:

۱- استاد راهنمای اول: دکتر محمد پازنگ — امضاء

۲- استاد راهنمای دوم: دکتر فرامرز مهرنژاد — امضا

۳- استاد مشاور: دکتر نادر چاپارزاده — امضاء

۴- عضوهیئت‌داوران: دکتر سعید نژاوند — امضاء

۵- نمایندهٔ مدیریت تحصیلات تکمیلی در گروه : دکتر محمد پازنگ — امضاء

برگزار شد و با درجه ..... نمرهٔ ..... ارزشیابی گردید.

مدیر گروه آموزشی
امضاء

رئیس دانشکده
امضاء
دانشکده علوم پایه

دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

**تأییدیهٔ اعضای هیئت داوران حاضر در جلسه دفاع**
**از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد**

شماره: .....
تاریخ: .....
صفحه: ۱ از ۱ صفحه

*بسمه تعالی*

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامهٔ خانم نرگس مردی تحت عنوان بررسی تاثیر حلالهای آلی بر روی فعالیت و پایداری آنزیم پیرازین آمیداز و پایدارسازی آن توسط افزودنیها را از نظر شکل و محتوا بررسی نموده، پذیرش آن را جهت نیل به درجهٔ کارشناسی ارشد مورد تأیید قرار دادند.

| اعضاء هیأت داوران | نام و نام خانوادگی | رتبه علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| ۱. استاد راهنمای اول: | دکتر محمد پاژنگ | استادیار | |
| ۲. استاد راهنمای دوم: | دکتر فرامرز مهرنژاد | استادیار | |
| ۳. استاد مشاور: | دکتر نادر چاپارزاده | دانشیار | |
| ۴. استاد ناظر: | دکتر سعید نژاوند | استادیار | |
| ۵. نمایندهٔ مدیریت تحصیلات تکمیلی: | دکتر محمد پاژنگ | استادیار | |

**فهرست مطالب**

**عنوان**.....صفحه

**چکیده**

**۱- فصل اول: مقدمه ومروری بر مطالعات انجام شده**

**۱-۱ مقدمه**.....۳

**۱-۲ دلایل بررسی آنزیم‌ها در حلال‌های آلی**.....۳

**۱-۳ ویژگی آنزیم‌ها (Enzymes specificity)**.....٤

**۱-٤ پارامترهای طبقه‌بندی حلال‌های آلی**.....٥

**۱-٤-۱ Log P**.....٥

**۱-٥ سیستم‌های حلالی**.....٦

**۱-٥-۱ سیستم‌های تک فازی**.....٦

**۱-٥-۲ سیستم های دو فازی**.....۷

**۱-٥-۳ مزایا و معایب سیستم‌های تک فازی و دو فازی**.....۷

۱-٦ فرم‌های مورد استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی.....۸

۱-۷ پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی.....۸

۱-۷-۱ پایداری پروتئین‌ها.....۸

۱-۷-۱-۱ پایداری ترمودینامیکی.....۹

۱-۷-۱-۲ پایداری سینتیکی.....۹

۱-۷-۲ پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی و آبی.....۱۱

۱-۷-۲-۱ مکانیسم واسرشتگی پروتئین ها در حلال های آلی.....۱۲

۱-۷-۲-۲ مراحل واسرشتگی پروتئین‌ها در حلال‌های آلی.....۱۲

۱-۷-۲-۳ (DC) Denaturation capacity.....۱۵

۱-۷-۲-٤ بررسی پایداری پروتئین در درصدهای مختلف از حلال آلی.....۱۵

۱-۷-۳ پایداری پروتئین‌ها در حلال‌های آلی خالص.....۱٦

۱-۸ پایدارسازی پروتئین‌ها در حلال‌های آلی.....۱۸

۱-۸-۱ مهندسی پروتئین.....۱۸

۱-۸-۲ تغییرات شیمیایی در ساختار پروتئین.....۱۹

۱-۸-۳ تغییرات فیزیکی .....۲۰

۱-۸-٤ تثبیت ..... ۲۰

۱-۸-۵ استفاده از افزودنی‌ها (Use of additives) ..... ۲۱

۱-۸-۵-۱ مکانیسم آبپوشی پروتئین ها(Protein hydration)..... ۲۲

۱-۸-۵-۲ آبپوشی ترجیحی (Preferential hydration) ومکانیسم‌های ایجاد کننده آن..... ۲۲

۱-۹ فعالیت آنزیم‌ها در حلال‌های آلی..... ۲٤

۱-۹-۱ دلایل کاهش فعالیت آنزیم‌ها در حلال‌های آلی خالص..... ۲٤

۱-۹-۲ دلایل کاهش فعالیت آنزیم‌ها در حلال‌های آبی – آلی..... ۲۵

۱-۹-۳ تأثیر آب روی فعالیت آنزیم در حلال‌های آلی خالص..... ۲۷

۱-۱۰ آنزیم پیرازین‌آمیداز..... ۲۷

۱-۱۰-۱ خصوصیات بیوشیمیایی پیرازین‌آمیداز..... ۲۹

۱-۱۰-۲ ساختار کریستالی پیرازین‌آمیداز..... ۳۰

۱-۱۱ هدف از این تحقیق..... ۳۲

۱-۱۲ اهداف و فرضیه‌ها..... ۳۲

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد و دستگاه‌ها..... ۳۵

۲-۱-۱ لیست مواد آزمایشگاهی استفاده شده در این تحقیق..... ۳۵

۲-۱-۲ انواع دستگاه‌های استفاده شده در این تحقیق..... ۳۶

۲-۱-۳ مواد ژنتیکی مورد استفاده در این تحقیق..... ۳۷

۲-۱-۳-۱ معرّفی وکتور **pET-21a(+)**..... ۳۷

۲-۱-٤-۱ آنتی‌بیوتیک ها و محیط‌های کشت..... ۳۹

۲-۱-٤-۱ آنتی بیوتیک‌ها..... ۳۹

۲-۱-٤-۲ محیط کشت مایع **LB**..... ۳۹

۲-۱-٤-۳ محیط کشت جامد **LB**..... ۳۹

۲-۱-۵ بافرهاومحلول‌ها..... ۳۹

۲-۱-۵-۱ بافرهای مورد استفاده در الکتروفورز ژل آگارز ..... ٤۰

۲-۱-۵-۲ بافرهای مرحله بیان و سنجش فعالیت پروتئین‌ها..... ٤۰

۲-۲ استخراج پلاسمید ازباکتری ***E. coli*** سویه **TOP10** همسانه سازی شده و انتقال پلاسمید های حامل ژن به ***E.coli*** سویه بیانی **BL21(DE3)** ..... ٤۳

۲-۲-۱ استخراج پلاسمید به روش **Mini-Prep**..... ٤٤

۲-۲-۲ الکتروفورز قطعات DNA روی ژل آگارز.....۴۵

۲-۳ بیان پیرازین آمیداز.....۴۵

۲-۳-۱ انتقال پلاسمید های حامل ژن به *E.coli*سویه بیانی (BL21(DE3).....۴۵

۲-۳-۱-۱ تهیّه‌ی سلول‌های شایسته(BL21(DE3 با روش شوک حرارتی.....۴۵

۲-۳-۱-۲ انتقال پلاسمیدها به باکتری *E.coli* سویه بیانی (BL21(DE3به روش شوک حرارتی.....۴۶

۲-۳-۲ گزینش همسانه‌های مثبت .....۴۷

۲-۳-۳ القای بیان ژن *pncA* با لاکتوز.....۴۸

۲-۳-۴ بررسی میزان بیان پروتئین با انجام یک روش مبتنی بر تستWayne.....۴۸

۲-۳-۵ تهیه محتوای سلولی از باکتری .....۴۹

۲-۴ انجام الکتروفورزSDS-PAGE در یک سیستم بافری ناپیوسته.....۵۰

۲-۵ مطالعات اسپکتروسکپی و سنجش فعالیت آنزیمی.....۵۱

۲-۵-۱ بررسی فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های‌آلی.....۵۱

۲-۵-۲ بررسی پایداری آنزیم در حضور و عدم حضور حلال‌ها.....۵۱

۲-۵-۳ پایدارسازی آنزیم توسط افزودنی‌ها.....۵۲

۲-۶ اندازه گیری ثابت سرعت غیرفعال شدن و نیمه عمر آنزیم.....۵۳

۲-۷ بررسی فلورسانس ذاتی ..... ٥٤

۳- فصل سوم: نتایج

۳-۱ تعیین توالی..... ٥٧

۳-۲ بیان پیرازین‌امیداز ..... ٥٩

۳-۲-۱ انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به *E-coli* سویه بیانی **BL21(DE3)**..... ٥٩

۳-۲-۲ بیان پروتئین پیرازین‌آمیداز..... ٦٠

۳-۳ تأثیر غلظت‌های مختلف حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم پیرازین‌آمیداز..... ٦١

۳-٤ بررسی پایداری آنزیم در حضور و عدم حضور حلال‌های آلی..... ٦٢

۳-٥ پایدارسازی آنزیم توسط افزودنی‌ها..... ٦٤

۳-٥-۱ پایدارسازی آنزیم توسط افزودنی‌ها در حضور متانول..... ٦٥

۳-٥-۲ پایدارسازی آنزیم توسط افزودنی‌ها در حضور اتانول..... ٦٦

۳-٥-۳ پایدارسازی آنزیم توسط افزودنی‌ها در حضور ایزوپروپانول..... ٦٧

۳-٥-٤ پایدارسازی آنزیم توسط افزودنی‌ها در حضور پروپانول..... ٦٨

۳-٦ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیرفعال شدن $k_{inactivation}$ و $t_{1/2}$..... ٦٩

۳-٦-۱ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیر فعال شدن $k_{inactivation}$ و$t_{1/2}$ برای DMSO و DMF ..... ۷۰

۳-٦-۲ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیر فعال شدن $k_{inactivation}$ و$t_{1/2}$ برای متانول، اتانول، پروپانول و ایزوپروپانول ..... ۷۱

۳-٦-۳ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیر فعال شدن $k_{inactivation}$ و$t_{1/2}$ برای متانول ۱۰٪ به علاوه‌ی افزودنیها ..... ۷۳

۳-٦-٤ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیر فعال شدن $k_{inactivation}$ و$t_{1/2}$ برای اتانول ۱۰٪ به علاوه‌ی افزودنیها ..... ۷٤

۳-٦-۵ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیر فعال شدن $k_{inactivation}$ و$t_{1/2}$ برای پروپانول ۱۰٪ به علاوه‌ی افزودنیها ..... ۷٦

۳-٦-٦ محاسبه‌ی ثابت سرعت غیر فعال شدن $k_{inactivation}$ و$t_{1/2}$ برای ایزوپروپانول ۱۰٪ به علاوه‌ی افزودنیها ..... ۷۷

۳-۷ محاسبه‌ی نیمه عمرنسبی ..... ۷۹

۳-۸ مطالعه تغییرات ساختاری آنزیم پیرازین‌آمیداز در حضور حلال‌های آلی ..... ۸۱

٤- فصل چهارم:

بحث ..... ۸۳

**۵-فصل پنجم:**

**منابع**.....۸۹

**چکیده انگلیسی**

**چکیده**

تحقیقات مشخص کرده که نه تنها آنزیم‌ها در حلالهای آلی ساختارشان را از دست نمی‌دهند، بلکه خواص وفعالیت‌های تازه‌ای پیدا می‌کنند که در محیط‌های آبی ازآنها دیده نمی-شود. پیرازین‌آمیداز نیز یک هیدرولاز است. این آنزیم واکنش تبدیل پیرازین‌آمید به پیرازینوئیک اسید را کاتالیز می‌کند. این امرباعث فعال شدن داروی پیرازین‌آمید می‌شود. دراین تحقیق فعالیت، پایداری و ساختار آنزیم پیرازین‌آمیداز در حلالهای آلی(متانول، اتانول، پروپانول، ایزوپروپانول، DMSO و DMF) مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس با استفاده از افزودنی‌ها (ساکاروز، سوربیتول و گلیسرول) آنزیم پیرازین‌آمیداز در مقابل حلال‌های آلی پایدار گردید. نتایج نشان می‌دهد که حلالهای آلی مورد استفاده باعث افت فعالیت آنزیم پیرازین‌آمیداز شدند. از بین حلالهای استفاده شده متانول باعث افت بیشتر و ایزوپروپانول باعث افت کمتر فعالیت آنزیم پیرازین‌آمیداز شدند. بررسی‌های پایداری آنزیم پیرازین‌آمیداز نشان داد که حلال DMSO باعث افزایش پایداری، حلال DMF بدون تأثیر بر روی پایداری آنزیم و حلال‌های دیگر مورد استفاده باعث کاهش پایداری آنزیم پیرازین‌آمیداز شدند. به نحوی که کاهش پایداری در حضور متانول بیشترین مقدار بود. بررسی‌های ساختاری نشان داد که حلال DMSO باعث پایدار شدن ساختار آنزیم، حلال DMF بدون تأثیر بر روی ساختار و حلال‌های دیگر باعث کاهش ساختار آنزیم شدند که در این مورد نیز متانول بیشترین اثر تخریبی را بر روی ساختار آنزیم پیرازین-آمیداز نشان داد. با بررسی اثر پایدارسازی افزودنیهای ساکاروز، سوربیتول و گلیسرول دیده شد که این افزودنی‌ها بیشترین تأثیر پایدارسازی خود را بر روی متانول نشان می‌دهند که این امر می‌تواند به‌دلیل قطبی بودن این حلال نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده باشد.

**کلمات کلیدی**: پیرازین‌آمیداز؛حلالهای آلی ؛ افزودنی‌ها ؛ پایداری و پایدارسازی ؛نیمه عمر

# فصل اول

# مقدمه و مروری بر
# مطالعات انجام شده

## ۱-۱ مقدمه:

سالها عقیده بر این بود که آنزیم‌ها در آب و سیستم‌های سلولی و بافری می‌توانند عمل بکنند و در غیر این صورت عملکرد و ساختارشان را از دست می‌دهند، ولی آقـایKlibanov و همکارانش با انجام یک سری از تحقیقات گسترده در زمینـه عملکـرد و سـاختار آنـزیم‌هـا در حلال‌های آلی دریچه‌های نوینی را در زمینه آنزیمولوژی غیر آبی(Nonaqueous enzymology) ارائه دادند[۱،۲،۳،٤]. این تحقیقات مشـخص کـرد کـه نـه تنهـا آنـزیم‌هـا در حـلال‌هـای آلـی ساختارشان را از دست نمی‌دهند، بلکه خواص و فعالیت‌های تازه‌ای پیدا می‌کنند که در محیط-های آبی از آنها دیده نمی‌شود، مثلاً هیدرولازها در محیط‌های آلی قادر به سنتز همان پیوندهایی هستند که در محیط‌های آبی هیدرولیز می‌کنند[۵].

## ۱-۲ دلایل بررسی آنزیم‌ها در حلال‌های آلی:

دلایلی که می تواند یک محقق را علاقمند به تحقیق در باره حلال‌های آلی سازند به شرح زیر می‌تواند باشد:

۱- بررسی میانکنش‌های آنزیم (پروتئین) با حلال‌های آلی اطلاعات کامل‌تری را راجع به ساختار پروتئین در اختیار قرار می‌دهد که در این روش که به Multiple Solvent Crystal Structure (MSCS) معروف است به مطالعه حلال‌ها بر روی ساختار پروتئین در کریستال می‌پردازند و در آخر نقشه‌ای از میانکنش‌ها بین پروتئین و حلال آلی بدست می‌آید که کاربردهای زیادی همچون طراحی مهارکننده برای پروتئین‌های مورد نظر دارد[٦،٧،٨].

۲- در مواردی سوبسترا و محصول واکنش آنزیمی در آب قابل حل نیستند و یا در آب ناپایدارند که جایگزینی آب با حلال آلی این مشکل را رفع خواهد کرد [۹].

۳- با استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی می توان از آلودگی‌های میکروبی در محیط واکنش آنزیمی جلوگیری کرد. با توجه به اینکه میکروبها می‌توانند در محیط‌های عمل آنزیم‌ها رشد کنند و واکنش آنزیمی را مختل سازند پس با جایگزینی آب با حلال آلی می توان از این امر جلوگیری نمود [۹].

٤- با استفاده ازآنزیم‌ها درحلال‌های آلی می توان واکنش‌هایRegioselective وStereoselective را که موردنیاز در صنایع شیمیایی و دارویی است انجام داد. آنزیم‌ها کاتالیزورهایی هستند که عمل کاتالیز خود را با ویژگی فوق العاده‌ای انجام می دهند که این عامل باعث شده است که آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزورهای ایده‌آل قلمداد شوند.

### ۱-۳ ویژگی آنزیم‌ها (Enzymes specificity):

ویژگی آنزیم‌ها را می توان به ۵ نوع تقسیم کرد:[۱۰].

۱- **ویژگی سوبسترایی (Substrate specificity)**: در این نوع از ویژگی، آنزیم از بین چندین نوع سوبسترا یک سوبسترا را ترجیح می‌دهد و روی آن کاتالیز انجام می‌دهد.

۲- **ویژگی انـانتیومری (Enantioselectivity)**: در ایـن نـوع ویژگـی آنـزیم از بـین انانتیومرها یا ایزومرهای فضایی موجود برای یک ترکیب یکی از آنها را انتخاب می‌کند. ویژگی ممتاز انانتیومری کاتالیز آنزیمی یک مشخصه بسیار ارزشمند آنزیم‌ها بـرای یـک شـیمیدان آلـی است.

۳- **ویژگی پروکایرال(Prochiral selectivity)**: در این ویژگی آنزیم با توجه به اینکه سوبسترای متقارن را کاتالیز می‌کند همیشه یک نوع محصول نا متقارن می دهد.

٤- **جا ویژگی(Regioselectivity)**: در سوبسترای یک آنزیم مـی توانـد چنـد عامـل شیمیایی از یک نوع باشد مثلاً عامل OH در قندها که آنزیم می‌تواند روی آن‌ها عمل بکند. ولی آنزیم همیشه یکی از آنها را تغییر می‌دهد که این نوع ویژگی را جاویژگی گویند.

۵- **ویژگی شیمیایی(Chemoselectivity)** : دیده می‌شـود کـه در سوبسـتراهایی کـه چندین نوع عامل شیمیایی فعال وجود دارد مثل OH و $NH_2$ آنزیم فقط بـر روی یکـی از ایـن عوامل عمل می‌کند و تأثیری روی عامل دیگر نمی‌گذارد، این مفهـوم ویژگـی شـیمیایی آنـزیم است.

## ۱-٤ پارامترهای طبقه بندی حلال های آلی :

برای طبقه بندی حلا ل های آلی از پارامترهای مختلف شـیمی- فیزیکـی همچـون ۱- پلاریته حلال ۲- Log P حلال ۳- ثابت دی‌الکتریک حلال، استفاده می‌شود.

### ۱-٤-۱ Log P:

مقدار حلالیت یک حلال در n- اکتانول نسبت به حلالیت آن در آب می باشد.

$$\text{Log P} = \text{Log}\frac{[Material]_{n-octanol}}{[Material]_{H_2O}} \qquad (۱-۱)$$

با افـزایش LogP آبگریـزی (Hydrophobicity) حـلال بـالا مـی‌رود و بـا کـاهش آن آبدوستی (Hydrophilicity) افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه حلال های غیر قابل امتزاج با آب آبگریز هستند و حلال های قابل امتزاج با آب، آبدوست هستند، بنابراین دیده می‌شود که قابـل امتزاج بودن و یا غیر قابل امتزاج بودن یک حلال می تواند توسط Log P تعیین گردد.

جدول (۱-۱) رابطه مقدار حلالیت حلال آلی با Log P حلال

| **Log P** | **Solubility in water (20°c) (Wt %)** |
|---|---|
| **Log P<2** | >0/4 |
| **2< Log P<4** | 0/04- 0/4 |
| **Log P>4** | <0/04 |

### ۱-۵ سیستم‌های حلالی:

زمانی که حلال مورد استفاده قابل امتزاج با آب باشد سیستم دارای یک فاز است ولـی وقتی غیر قابل امتزاج با آب باشد سیستم دارای دو فاز است. پس دو سیسـتم مـی‌توانـد مطـرح باشد: سیستم‌های تک فازی و سیستم‌های دو فازی [۹].

### ۱-۵-۱ سیستم‌های تک فازی :

در این سیستم ها حلال همگن بوده و فازی تشکیل نمی‌گردد که شامل:

۱- حلال آلی خالص

۲- آب به همراه حلال آلی قابل امتزاج با آب است

**۱-۵-۲ سیستم های دو فازی:**

در این سیستم‌های حلال همگن نیست و فاز تشکیل می‌شود بطوری که حد ومرز فاز قابل مشاهده است که شامل:

۱- آب و حلال آلی غیرقابل امتزاج با آب

۲- آنزیم در داخل میسل‌های معکوس (Reversed micelles) یا سورفاکتانت‌ها: در این مورد سورفاکتانت‌ها که مواد آمفی‌پاتیک هستند، وقتی در حلال آلی هیدروفوب حل می-شوند چون دارای سرهای قطبی و دمهای غیر قطبی هستند، سرهای قطبی آنها به طرف آنزیم که دارای سطوح هیدروفیل است، جهت‌گیری می‌کند و دمهای آنها به طرف حلال هیدروفوب جهت‌گیری می کند که باعث جدا شدن آنزیم از محیط اطراف و ایجاد فاز می‌گردد.

**۱-۵-۳ مزایا و معایب سیستم‌های تک فازی و دو فازی.**

اما استفاده از آنزیم‌ها در هر یک از سیستم‌ها مزایا و معایبی دارد که در جدول زیر آمده

جدول (۱-۲) مزایا و معایب سیستم‌های مونوفازیک ودوفازی

| سیستم | مزایا | معایب |
|---|---|---|
| **تک فازی** | چون سیستم همگن است محدودیت انتشار سوبسترایی وجود ندارد | به علت تماس مستقیم آنزیم با حلال دناتوراسیون اتفاق می‌افتد |