وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه
گاوازنگ - زنجان

بررسی اثر دستکاری شیمیایی باقیمانده‌های لیزین بر پایداری حرارتی، ساختار و عملکرد پراکسیداز تربچه

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

رسول نوروزی

استاد راهنما: دکتر لیلا حسنی

بهمن ۹۱

تقدیم به همسر عزیزم

و

پدر و مادر شفیقم

که همیشه همراه و دعاگویم بودند.

تشکر وقدردانی

باتشکر از استاد گرامی، خانم دکتر حسنی که زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را برعهده داشتند و در طول این پروژه قدم به قدم مرا همراهی کردند.

با تشکر از اساتید محترم دکتر سعید عمادی، دکتر علی ملتی و خانم دکتر محمدی که قبول زحمت فرموده و داوری این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند.

با تشکر از سرکار خانم فاخری، متصدی آزمایشگاه بیوشیمی که زحمت‌های زیاد ما را متقبل شدند.

با تشکر از همکلاسیها و هم‌دانشکده‌ایهایم که همواره از مساعدتهای بی‌دریغشان برخوردار بودم.

و در نهایت از همه کسانی که به هر نحوی در این پایان‌نامه مرا یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنم.

چکیده

کاتالیزورهای زیستی به دلیل انتخاب گری و پتانسیلی که در جایگزین شدن با کاتالیزورهای شیمیایی دارند کاربرد گسترده ای در فرایندهای شیمیایی یافته اند. ازنظر تکامل طبیعی آنزیم ها برای کار در محیط سلول سازگار شده اند، بنابراین در حضور حلال های آلی، pH اکسترمم و دماهای بالا ناپایدارند، در نتیجه تمایل زیادی برای توسعه روش های بهبود پایداری پروتئین در محیط های نامناسب وجود دارد. چندین راهکار برای افزایش پایداری عملکردی آنزیم ها وجود دارد. دستکاری شیمیایی یک راه سریع و ارزان برای پایدارسازی آنزیم هاست. پراکسیداز تربچه (HRP, E.C.1.11.1.7) یکی از پراکسیدازهای گیاهی مونومر حاوی گروه هم است. این گلیکوپروتئین دارای چهار پل دی سولفیدی و دو یون کلسیم می باشد. این آنزیم موقعیت برجسته ای در صنایع دارویی، شیمیایی و زیست فناوری کسب کرده است و کاربرد وسیعی در موارد تشخیص پزشکی و حسگرهای زیستی دارد؛ بنابراین روش های بهبود پایداری و عملکرد این آنزیم مسلماً کاربرد آن را در حال حاضر و آینده افزایش خواهد داد. در این تحقیق، تأثیر دستکاری شیمیایی توسط دستکاری‌کننده‌های ۲و۳- دی‌کلرومالئیک انیدرید و ۲و۳- دی‌متیل‌مالئیک انیدرید بر پایداری حرارتی پراکسیداز تربچه و پایداری آن در حضور دناتورانت شیمیایی، حلال آلی، فشار اکسیداتیو و pH های مختلف بررسی شد. اثر دستکاری شیمیایی بر ساختار و عملکرد آنزیم HRP، با روش‌های جذب‌سنجی، دورنگ‌نمایی دورانی و فلوئوریمتری بررسی شد. نتایج بدست آمده از آزمایشات انجام شده نشان می‌دهند که دستکاری آنزیم HRP با دستکاری‌کننده ۲و۳- دی‌کلرومالئیک انیدرید باعث افزایش پایداری حرارتی و شیمیایی این آنزیم می‌شود ولی دستکاری با مادیفایر ۲و۳- دی‌متیل‌مالئیک‌انیدرید، پایداری این آنزیم را فقط در برابر دناتورانت‌شیمیایی افزایش می‌دهد و در پایداری حرارتی آن بی‌تأثیر بوده و حتی در بعضی موارد ناپایدارکننده است. ضمناً هر دو مادیفایر بر پایداری آنزیم در حضور حلال آلی دی‌متیل‌سولفوکساید و در محیط هایی با pHهای مختلف تأثیری نمی‌گذارند، همچنین آنها اثری بر بازده‌کاتالیتیکی و انرژی فعال‌سازی واکنش آنزیمی ندارند. بررسی ساختاری نشان می‌دهد که اتصال کوالانت هر دو مادیفایر به لیزین‌های در دسترس آنزیم باعث کاهش فشردگی ساختار آنزیم می‌شود. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که آبدوست کردن سطح آنزیم HRP، برخلاف آبگریزکردن آن، بدون تأثیر نامطلوب بر عملکرد آن، باعث افزایش پایداری حرارتی و شیمیایی آن می‌شود.

فهرست

عنوان شماره صفحه

فصل اول: مقدمه
۱.۱ آنزیم پر کسیداز تربچه..... ۱
۱.۱.۱ معرفی آنزیم..... ۱
۲.۱.۱ ساختار آنزیم..... ۳
۳.۱.۱ مکانیسم عمل HRP ۵
٤.۱.۱ کاربرد آنزیم ۸
۵.۱.۱ تاریخچه پایدارسازی..... ۸
۲.۱ نیروهای مؤثر در پایداری..... ۹
۱.۲.۱ میانکنش های الکتروستاتیک..... ۱۰
۲.۲.۱ میانکنش‌های واندروالس و هیدروژنی..... ۱۰
۳.۲.۱ اثر آبگریزی..... ۱۰
۳.۱ روش های پایدارسازی پروتئین..... ۱۱
۱.۳.۱ استفاده از افزودنی های پایدار کننده..... ۱۱
۱.۱.۳.۱ مکانیسم های پایدارسازی افزودنی ها..... ۱۲
۱.۱.۱.۳.۱ خروج ترجیحی از سطح پروتئین..... ۱۲
۲.۱.۱.۳.۱ افزایش کشش سطحی حلال..... ۱۲
۳.۱.۱.۳.۱ افزایش نظم حلال..... ۱۲
۲.۳.۱ دستکاری شیمیایی..... ۱۳
۱.۲.۳.۱ ایجاد اتصال عرضی در آنزیم ۱۳
۲.۲.۳.۱ اتصال کوالانسی پلی مرها به پروتئین..... ۱۳
۳.۲.۳.۱ دستکاری سطحی آنزیم..... ۱٤
۳.۳.۱ تثبیت آنزیم..... ۱۵
۱.۳.۳۱ راههای تثبیت کردن آنزیم..... ۱۵
٤.۳.۱ جهش زایی..... ۱۵
۱.٤.۳.۱ راههای تهیه پروتئین های جهش یافته پایدار..... ۱٦
۵.۳.۱ زمینه های کاربردی مطالعات پایدارسازی حرارتی پروتئین..... ۱٦

فصل دوم: مواد و روش ها..... ۱۸
۲.۱ مواد ۱۸
۲.۲ دستگاه ها..... ۱۹
۳.۲ روش ها ۱۹
۱.۳.۲ دستکاری شیمیایی آنزیم پراکسیداز تربچه..... ۱۹
۲.۳.۲ تعیین تعداد لیزین های مادیفای شده..... ۲۰
۳.۳.۲ محاسبه نیمه عمر غیر فعال شدگی..... ۲۰
٤.۳.۲ سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز تربچه..... ۲۰
۵.۳.۲ بررسی اثر دما بر فعالیت و پایداری آنزیم..... ۲۱
٦.۳.۲ بررسی پایداری آنزیم در حضور اوره..... ۲۱
۷.۳.۲ بررسی پایداری HRP در حضور حلال آلی دی‌متیل‌سولفوکساید..... ۲۲
۸.۳.۲ اثر استرس اکسیداتیو بر پایداری آنزیم HRP..... ۲۲
۹.۳.۲ محاسبه ثابت‌میکائیلیس- منتون (K_m) و سرعت‌بیشینه واکنش آنزیمی (V_{max})..... ۲۲
۱۰.۳.۲ محاسبه انرژی فعال سازی واکنش آنزیمی..... ۲۳
۱۱.۳.۲ فلوئوریمتری..... ۲۳
۱۲.۳.۲ آزمایشات طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)..... ۲٤
فصل سوم: نتایج و بحث..... ۲۵
۱.۳ تعداد لیزین های مادیفای شده HRP پس از دستکاری..... ۲۵
۲.۳ پایداری حرارتی..... ۲٦
۳.۳ اثر دستکاری شیمیایی بر نیمه‌عمر غیرفعال شدگی حرارتیHRP..... ۳۵
٤.۳ پایداری در حضور اوره..... ۳٦
۵.۳ پایداری در حضور حلال آلی دی متیل سولفوکساید (DMSO)..... ۳۷
٦.۳ اثر استرس اکسیداتیو بر پایداری HRP..... ۳۸
۷.۳ پایداری HRP در pH های مختلف..... ۳۹
۸.۳ نمودار لینویور-برک آنزیم HRP و انواع دستکاری شده آن..... ٤۰
۹.۳ نمودار آرنیوس آنزیم HRP و انواع دستکاری شده آن..... ٤۱
۱۰.۳ نمودار ایرینگ آنزیم HRP و انواع دستکاری شده آن..... ٤۲
۱۱.۳ اثر دستکاری شیمیایی بر پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی آنزیم..... ٤۳
۱۲.۳ طیف فلورسانس ذاتی آنزیم HRP..... ٤٤
۱۳.۳ طیف فلورسانس خارجی در حضور ANS ٤٦
۱٤.۳ اثر خاموش کنندگی آکریل‌آمید بر HRP..... ٤۷

۱۵.۳ طیف‌های دورنگ نمایی دورانی در ناحیه ماورای بنفش دور..... ٤٨
۱٦.۳ طیف‌های دورنگ نمایی دورانی در ناحیه ماورای بنفش نزدیک..... ٤٩
۱۷.۳ طیف‌های دورنگ نمایی دورانی در ناحیه مرئی..... ۵۰
۱۸.۳ بحث ۵۱
۱۹.۳ پیشنهادات ۵۳

فهرست شکل‌ها

عنوان شماره صفحه

۱.۱ ساختار آنزیم HRP ٤
۲.۱ واکنش اکسیداسیون آسکوربیک اسید توسط آنزیم HRP ٥
۳.۱ مکانیسم عمل HRP ٦
۱.۳ لیزین‌های سطحی HRP ۲٥
۲.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ٥۰ ^{o}C ۲۷
۳.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ٥٥ ^{o}C ۲۸
٤.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ٦۰ ^{o}C ۲۹
٥.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ٦٥ ^{o}C ۳۰
٦.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ۷۰ ^{o}C ۳۱
۷.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ۷٥ ^{o}C ۳۲
۸.۳ فعالیت انواع طبیعی و دستکاری شده آنزیم HRP در دمای ۸۰ ^{o}C ۳۳
۹.۳ پایداری انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP در حضور اوره ۳٦
۱۰.۳ پایداری انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP در حضور حلال آلی DMSO ۳۷
۱۱.۳ پایداری انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP در حضور غلظت‌های اکسیدکننده H_2O_2 ..... ۳۸
۱۲.۳ پایداری انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP در pHهای مختلف ۳۹
۱۳.۳ نمودار لینویور- برک انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP ٤۰
۱٤.۳ نمودار آرنیوس انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP ٤۱
۱٥.۳ نمودار ایرینگ انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP ٤۲
۱٦.۳ طیف فلورسانس ذاتی انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP با طول موج تحریک ۲۸۰ nm ٤٤
۱۷.۳ طیف فلورسانس ذاتی انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP با طول موج تحریک ۲۹٥ nm ٤٥
۱۸.۳ طیف فلورسانس خارجی انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP با طول موج تحریک ۳۷۰ nm ٤٦
۱۹.۳ نمودار استرن- ولمر انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP در حضور آکریل آمید ٤۸
۲۰.۳ طیف دو رنگ‌نمایی دورانی در ناحیه ماوراء بنفش دور انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP ٤۸
۲۱.۳ طیف دو رنگ‌نمایی دورانی در ناحیه ماوراء بنفش نزدیک انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP ٤۹
۲۲.۳ طیف دو رنگ‌نمایی دورانی در ناحیه مرئی انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP ٥۰
۱.٤ شکل ساختار مولکولی ۲و۳-دی‌کلرومالئیک انیدرید و ۲و۳-دی‌متیل‌مالئیک انیدرید ٥۲

فهرست جدول‌ها

عنوان شماره صفحه

۱.۲ مواد به کار رفته در تحقیق و شرکت‌های تولیدکننده آنها..... ۱۸
۱.۳ تعداد و درصد لیزین‌های مادیفای شده آنزیم HRP پس از دستکاری..... ۲۶
۲.۳ نیمه‌عمر غیرفعال‌شدگی انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP..... ۳۵
۳.۳ پار امترهای آنزیمی انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP..... ۴۳
۴.۳ ثابت استرن- ولمر انواع طبیعی و دستکاری‌شده آنزیم HRP در حضور آکریل‌آمید..... ۴۷

فصل اول:مقدمه

کاتالیزورهای زیستی به دلیل انتخاب‌گری و پتانسیلی که در جایگزین شدن با کاتالیزورهای شیمیایی دارند کاربرد گسترده‌ای در فرایندهای شیمیایی یافته اند [۱]. ازنظر تکامل طبیعی آنزیم‌ها برای کار در محیط سلول سازگار شده‌اند؛ بنابراین در حضور حلال‌های آلی، pHهای خیلی بالا و پایین و دماهای بالا ناپایدارند؛ در نتیجه تمایل زیادی برای توسعه روش‌های بهبود پایداری پروتئین در محیط‌های نامناسب وجود دارد. راهکارهای زیادی مانند دستکاری شیمیایی، استفاده از افزودنی‌های پایدارکننده، تثبیت و مهندسی ژنتیک برای افزایش پایداری آنزیم‌ها حین فرایند واکنش وجود دارد. دستکاری شیمیایی یک راه سریع وارزان برای پایدارسازی آنزیم‌هاست. در این تحقیق تاثیر دستکاری شیمیایی بر پایداری حرارتی پراکسیداز تربچه بررسی شده است. پراکسیداز تربچه یکی از اعضای گروه پراکسیدازهای گیاهی است. این آنزیم موقعیت برجسته‌ای در صنایع دارویی، شیمیایی و زیست‌فناوری کسب کرده‌است. بنابراین روش‌های بهبود پایداری وعملکرد پراکسیداز تربچه مسلماً کاربرد آن را در حال حاضر و آینده افزایش خواهدداد [۱].

۱.۱ آنزیم پراکسیداز تربچه

۱.۱.۱ معرفی آنزیم

پراکسیدازها پروتئین‌های فلزداری هستند که از پراکسیدهیدروژن جهت کاتالیز اکسیداسیون سوبستراهای متنوع آلی و معدنی استفاده می کنند. ایزوزیم‌های پراکسیداز به سه گروه اسیدی، خنثی و بازی تقسیم می شوند؛ پراکسیدازهایی که نقطه ایزوالکتریک آنها کمتر از ٤ باشد در گروه اسیدی، آنهایی که نقطه ایزوالکتریک بین ۱۰-٤ دارند در گروه خنثی و پراکسیدهایی با نقطه ایزوالکتریک بالاتر از۱۱، در گروه بازی قرار می‌گیرند. بر طبق تخلیص و جداسازی شنون[1]و پاول[2] پراکسیدازهای اسیدی با حروف A، خنثی با B و C و بازی با D و E نشان داده می‌شوند [۲]. ایزوزیمی از پراکسیداز که در شیمی تحلیلی و تجزیه‌ای به طور گسترده استفاده می‌شود، HRPC (ایزوزیم نوع C) است که از ریشه گیاه تربچه[3] جدا می شود.

1.Shannon
2. Paul
3. Horseradish

پراکسیداز این گیاه ایزوزیم‌های مختلفی دارد که مقدار HRPC از بقیه انواع این ایزوزیم‌ها بیشتر است. این ایزوزیم بیش از ۵۰٪ کل عصاره پراکسیداز تهیه شده از این گیاه را تشکیل می دهد. بنابراین بحث روی ساختار، مکانیسم عمل و کاربردهای تجزیه‌ای[1] و بیوشیمیایی پراکسیداز بیشتر با بررسی ایزوزیم HRPC و تاکید بر شکل و ترکیب آن انجام می‌گیرد [۳].

ابرخانواده پراکسیدازها شامل پراکسیدازهایی با مبدأ باکتریایی، قارچی و گیاهی هستند که پراکسیداز تربچه جزء دسته III ابرخانواده پراکسیدازها است. در این ابرخانواده گروه یک شامل پراکسیداز باکتریایی[2] حاصل مضاعف‌شدگی ژن و آسکوربات پراکسیداز[3] است. گروه دو شامل پراکسیداز سیتوکروم مخمر[4] و پراکسیداز قارچی است. این رده‌بندی براساس تفاوت در توالی آمینواسیدی می‌باشد ولی اطلاعاتی که اخیراً از ساختار سه بعدی این آنزیم‌ها بدست آمده به این رده بندی کمک می‌کند. خیلی از عناصر ساختاری موجود در این سه گروه مشابه و حفظ شده‌است که به شناسایی تاخوردگی مرکزی مشترک بین پراکسیدازها کمک می کند. ساختار HRPC و پراکسیدازهای دیگر گروه III دارای سه مارپیچ آلفا هستند که به این تاخوردگی مرکزی اضافه شده‌اند.HRP جزء آنزیم‌های پراکسیدازی است که کاتالیزکننده واکنش‌های اکسیداسیون مولکول‌های آروماتیک کوچک می‌باشد [۳]. برای آنزیم HRP نقش‌های فیزیولوژیک زیادی از جمله متابولیسم اندول۳–استیک‌اسید سنتز لیگنین[5]، اتصال عرضی پلی‌مرهای دیواره‌سلولی، تشکیل سوبرین و ایجاد مقاومت در برابر آلودگی مشخص شده‌است [٤].

۲.۱.۱ ساختار آنزیم

HRP دارای ۳۰ ایزوزیم است که شکل غالب آن ایزوزیم C می‌باشد. این شکل از یک مونومر گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ٤٤ kDa تشکیل شده‌است. HRP از یک پلی‌پپتید با ۳۰۸ باقیمانده تشکیل شده و دارای یک گروه پروتوهمین IX بعنوان گروه پروستتیک و دو فلز کلسیم می‌باشد. انتهای N آن با پیروگلوتامات بلوکه‌شده ولی انتهای C آن هتروژن بوده و هر اسید

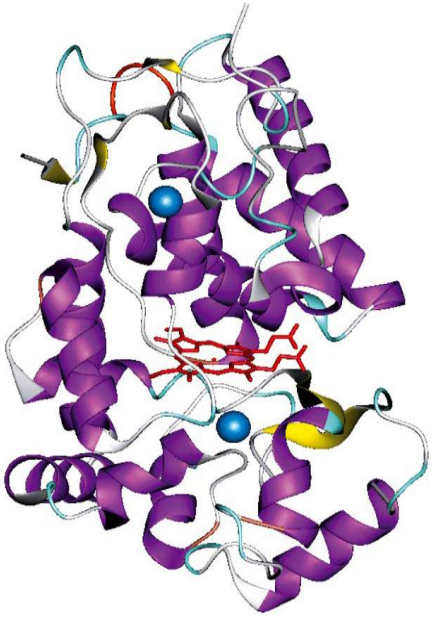
1. Analytical application
2. Bacterial peroxidase
3. Ascorbate peroxidase
4. Yeast cytochrome peroxidase
5. Biosyntesis of ligenin

آمینه‌ای بجز سرین می‌تواند در آن محل قرار گیرد. اسید آمینه‌های آروماتیک در این آنزیم زیادند مثلاً در ساختار این آنزیم ۱ تریپتوفان، ۵ تیروزین و ۲۰ فنیل‌آلانین دیده می‌شود که از بین آنها فنیل‌آلانین ٤١ در عدم دسترسی سوبسترا به گروه فرّیل نقش دارد و از بین اسیدهای‌آمینه غیرآروماتیک اسید آمینه آرژنین ۳۸ در متصل شدن لیگاند و پایداری آن و پرولین ۱۳۹ در ایجاد موتیف ساختاری Pro-X-Pro (حفظ شده در گیاهان) و همچنین متصل شدن و اکسیداسیون سوبسترا نقش اساسی دارند. در ساختار این آنزیم گروه ایمیدازول هیستیدین با آهن هم اتصال دارد، همچنین گروه کربونیل و زنجیره‌جانبی بعضی باقیمانده‌ها به عناصر کلسیم متصل اند. زنجیره پلی‌پپتیدی HRP تا حد زیادی (۱۸٪) گلیکوزیله شده‌است و ۹ جایگاه N– گلیکوزیله دارد که هپتاساکارید شاخه‌دار، ۸۵–۷۵ درصد گلیکان آن را تشکیل می‌دهد. بیشترین گلیکوزیلاسیون در محل لوپ‌هاست که با مانوز و NAGlc[1] گلیکوزیله شده‌اند. ٤٤/۸۱ درصد ساختار دوم این آنزیم از مارپیچ آلفا تشکیل شده‌است و صفحات بتا ۱/۹۵ درصد ساختار آن را تشکیل می‌دهد. این آنزیم دو قلمرو[2] دور[3] و نزدیک[4] دارد، در بین این دو قلمرو گروه هم مستقر شده‌است. این دو قلمرو احتمالاً نتیجه بیان دو ژن مضاعف شده‌اند. وجود دو جایگاه اتصال کلسیم در دو قلمرو و عناصر ساختاری دیگر این احتمال را تقویت می‌کند [٤]. چهار باند دی‌سولفیدی، یک پل‌نمکی دفن شده بین آسپاراژین ۹۹ و آرژنین ۱۲۳ و هشت زنجیره کربوهیدرات که به اتم‌های N زنجیره‌جانبی باقیمانده‌های آسپاراژین اتصال یافته‌اند جزء ساختار این آنزیم هستند [٤].

جایگاه‌های اتصال دو یون کلسیم در دیستال و پروکسیمال صفحه ِهم قرار داشته و با شبکه ای از پیوندهای هیدروژنی به گروه ِهم متصل شده‌اند. جایگاه اتصال هر کلسیم هفت کوئوردینانس[1] است که از لیگاند اکسیژن موجود در گروه کربوکسیلات زنجیره‌جانبی آمینواسید آسپاراژین، گروه هیدروکسیل آمینواسیدهای سرین و ترئونین، گروه کربونیل زنجیره اصلی و مولکولهای آب ساختاری تشکیل شده‌است. از دست دادن کلسیم باعث کاهش فعالیت، کاهش پایداری حرارتی آنزیم و تغییر

1. N- Acetyle Glucose amine
2. Domain
3. Distal
4.Proximal

کوچک در محیط گروه هم می‌شود که با روش‌های اسپکتروسکوپی قابل بررسی است. گروه هم به باقیمانده‌های هیستیدین ۱۷۰ آنزیم با پیوند کوئوردینانسی بین زنجیره‌جانبی هیستیدین و اتم آهنِ هم متصل شده‌است. جایگاه کوئوردیناسیون محوری دوم که در بخش دیستال صفحه هم قرار دارد، در شکل استراحت این آنزیم اشغال نشده ولی در طول واکنش آنزیمی برای پذیرش پراکسیدهیدروژن آماده است. اتصال مولکولهای کوچک مانند مونواکسیدکربن، سیانید، فلوئوراید و آزید به اتم آهن هم در جایگاه دیستال منجر به تشکیل کمپلکس پراکسیداز شش کوئوردینه می‌شود؛ بعضی از این ترکیبات فقط در شکل پروتونه خود که از طریق میانکنش هیدروژنی با زنجیره‌جانبی آمینواسیدهای آرژنین ۳۸ و هیستیدین ٤۲ پاکتِ هم پایدار می‌شوند به آنزیم متصل می‌شوند [۵].

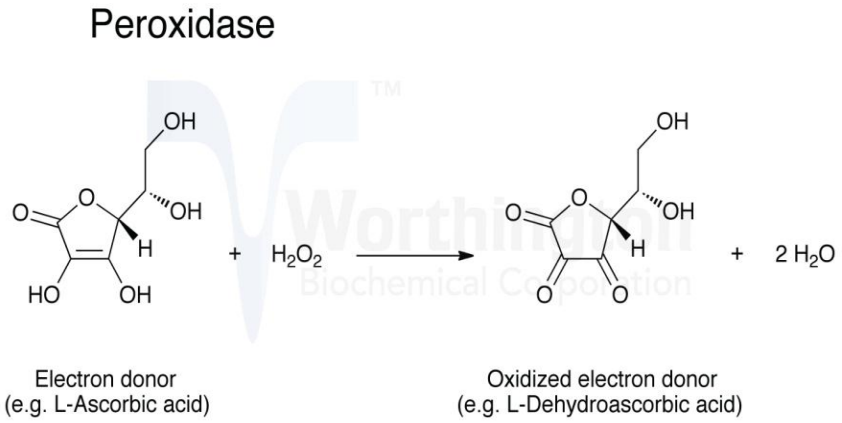


شکل ۱-۱: ساختار آنزیم HRP [۵]

1. Seven coordinate

۳.۱.۱ مکانیسم عمل HRP

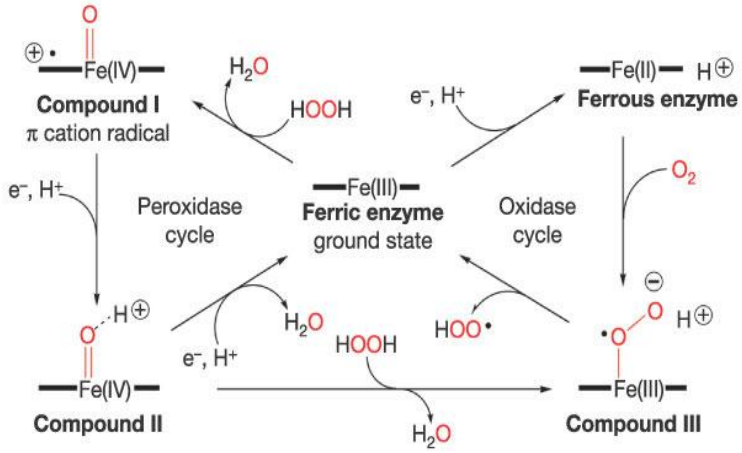
تشکیل محصولات رادیکالی در واکنش‌های کاتالیز شده با HRPC به بعضی عملکردهای این آنزیم در محیط زنده مانند گیاه دلالت دارد؛ این واکنش‌ها شامل واکنش‌های اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک، تشکیل اتصال عرضی، تشکیل پیوندهای دی‌فرولات[1] با گروه‌های فروی متصل به پلیمر(پلی‌ساکارید و پکتین)، تشکیل دی‌تیروزین با اتصال دو باقیمانده تیروزین، اتصال عرضی مونومرهای فنلی در تشکیل سوبرین و جفت‌شدن‌های اکسیداتیو ترکیبات فنلی بعنوان بخشی از فرایند سنتز لیگنین می‌باشد. پراکسیدازی که واکنش‌های تشکیل اتصال‌عرضی را کاتالیز می‌کند اصولاً در پاسخ به آسیب‌های بافتی، از دست دادن آب، حمله پاتوژن به گیاه بیان می‌شود. گیاه این تنش‌ها را با تشکیل سدهای پلیمری مانند سوبرین محدود می‌کند. اگر چه نقش‌های ایزوزیم‌های پراکسیداز در محیط زنده، کامل مشخص نشده اما مشاهده شده که فعالیت پراکسیداز، هنگام ایجاد زخم در برگ گیاه تحریک می‌شود [۵]. در شکل ۲-۱ واکنش اکسیداسیون یک ترکیب آروماتیک توسط آنزیم HRP آورده شده است.



شکل ۱-۲: واکنش اکسیداسیون آسکوربیک اسید توسط آنزیم HRP

1.Diferrolate

دانفورد[1] و همکارانش شرح جامع و دقیقی از سینتیک و مکانیسم واکنش HRPC ارائه داده‌اند [۲].
HRP (پراکسیدهیدروژن اکسیدو ردوکتاز[2]) اکسیداسیون ترکیبات گوناگونی را به کمک پراکسیدهیدروژن یا ترکیبات پراکسید دیگر کاتالیز می‌کند. واکنش عمومی که توسط پراکسیداز کاتالیز می‌شود توسط اکسیداسیون پیش می‌رود که طی آن دو فرآیند انتقال الکترون انجام می‌گیرد با انتقال این الکترون‌ها آنزیم به صورت یک ترکیب اکسیدشده در می‌آید، این ترکیب در معادله واکنشی که در ادامه آمده، ترکیب۱ نام دارد و این ترکیب در واقع یک اکسی‌فریل است که در آن یک الکترون از گروه هم گرفته می‌شود تا رادیکال کاتیونی پورفیرین ایجاد شود، این حدواسط تشکیل شده در عدم حضور یک الکترون‌دهنده مناسب یا غلظت کم پراکسیدهیدروژن تدریجاً تجزیه می‌شود. حال به آنزیم یک هیدروژن با فرآیند انتقال تک الکترون اضافه می‌شود تا حد واسط آنزیمی دوم به نام ترکیب۲ و یک رادیکال حاصل شود. ترکیب۲ دوباره توسط یک هیدروژن طی فرایند انتقال تک الکترون احیاء می‌شود که نهایتاً آنزیم طبیعی، یک مولکول آب و یک رادیکال دیگر تولید می‌شود. دو رادیکال حاصل می‌توانند ترکیب شوند و محصول نهایی پایدار را تولید کنند. شکل‌گیری ترکیب۱ از واکنش بین آنزیم و پراکسیدهیدروژن یک فرایند کنترل انتشار[3]است.



شکل (۱-۳): مکانیسم عمل HRP [۳۳]

1. Dunford
2. Hydrogen peroxide oxidoreductase
3. Diffution control

حالت اکسیدشده آهن در ترکیب۱ به صورت چهارظرفیتی است. تبدیل ترکیب۱ به ترکیب۲ و همچنین ترکیب۲ به آنزیم طبیعی یک فرایند انتقال تک الکترون است. ترکیباتی مانند یدید، سولفیت و لامینول می‌توانند با ترکیب ۱ واکنش دهند و آنرا طی دو فرایند انتقال تک الکترون به آنزیم طبیعی تبدیل کنند. سینتیک حالت پایا[1]ی آنزیم HRPC توسط ۳ واکنش نشان داده می‌شود .

۱) $P + H_2O_2 \longrightarrow C_1 + H_2O$

۲) $C_1 + AH_2 \longrightarrow C_2 + {}^{\cdot}AH$

۳) $C_2 + AH_2 \longrightarrow P + {}^{\cdot}AH + H_2O$

P آنزیم پراکسیداز، $C_۱$ ترکیب۱، $C_۲$ ترکیب۲ و AH سوبسترای دهنده الکترون می‌باشد. واکنش خالص HRPC با $H_۲O_۲$ بصورت زیر نشان داده‌می‌شود.

$$H_2O_2 + ۲AH_2 + HRPC \longrightarrow ۲H_2O + ۲.AH + HRPC$$

در واکنش بالا $AH_۲$ سوبسترای کاهنده مانند فنل‌ها، اندولات، سولفونات، آمین‌ها و $AH^{\cdot}$ رادیکال آزاد است. واکنش‌های کاتالیزشده توسط HRPC برگشت‌ناپذیر و با مکانیسم پینگ‌پنگ است.

حالت اکسیدشده آهن در ترکیب۱ به صورت چهارظرفیتی است. تبدیل ترکیب۱ به ترکیب۲ و همچنین ترکیب۲ به آنزیم طبیعی یک فرایند انتقال تک الکترون است. ترکیباتی مانند یدید، سولفیت و لامینول می‌توانند با ترکیب۱ واکنش دهند و آنرا طی دو فرایند انتقال تک الکترون به آنزیم طبیعی تبدیل کنند. در واکنش‌های غیرقابل‌برگشت، سرعت ترکیب آنزیم با سوبسترا بیشتر از سرعت جدایی آنها و تولید آنزیم طبیعی و سوبسترای آن است. بنابراین به نظر می‌رسد سرعت واکنش محدودیت زیادی نداشته باشد. افزایش غلظت سوبسترا و آنزیم باعث افزایش سرعت واکنش می‌شود. بنابراین نمودار سرعت شکل‌گیری ترکیب۱ بصورت درجه‌یک کاذب، خطی و غیرقابل‌اشباع است که این نمودار حاصل نسبت غلظت پراکسیدهیدروژن به سرعت واکنش می‌باشد.

واکنش‌های کاتالیزشده توسط HRP شامل موارد زیر است [٦].

۱- سنتز مواد آلی از طریق آلکیلاسیون نیتروژن و اکسیژن

۲- برقراری اتصال‌های اکسیدشده

۳- هیدروکسیلاسیون

٤- واکنش‌های انتقال اکسیژن

---

1. Steady state

٤.١.١ کاربرد آنزیم HRP

آنزیم HRP یک آنزیم چندکاره است که کاربردهای زیادی در آنالیزهای شیمیایی و بیوشیمیایی دارد. ویژگی‌های این آنزیم آن را به عنوان یک عامل حساس به گلوکز، برای استفاده توسط بیماران دیابتی برای اندازه‌گیری گلوکز خون مناسب می‌کند. پراکسیداز به عنوان یک آنزیم کلیدی در سنجش‌های ایمنی به ویژه در روش الایزا برای جدا کردن عوامل عفونی از نمونه‌های خونی کاربرد دارد؛ همچنین آنتی‌بادی‌های متصل به پراکسیداز نقش مهمی را در بررسی‌های ایمنوبلاتینگ ایفا می‌کنند [۳].

HRP در کاتالیز واکنش‌های هیدروکسیلاسیون انتخابی، انتقال اکسیژن و تشکیل اتصال‌های اکسیداتیو نقش دارد. یکی از کاربردهای HRP، سنتز مواد آلی طی واکنش‌های O و N ِدآلکیلاسیون می‌باشد. واکنش دیگری که توسط این آنزیم کاتالیز می‌شود اتصال کاتارانتین[1] و ویندولین[2] برای تولید α-۳و٤-آنیدرو وینبلاستین[3] است که این محصول بعنوان یکی از ترکیبات اساسی در تولید داروی ضد سرطان وینبلاستین و وینکریستین استفاده می‌شود.

علاوه بر نقش‌های ذکر شده‌ای که پراکسیداز در آنالیز و سنتز دارد، این آنزیم در پاک کردن محیط زیست، ساختن پلیمر و استخراج لیگنین از چوب نقش دارد. استخراج پراکسیداز سویا که خیلی مقاوم به گرما است دورنمای این آنزیم را خیلی درخشان ساخته‌است [۵].

1. Catarantin
2. Vindolin
3.α- 3,4- anhydrovinblastine

۵.۱.۱ تاریخچه پایدارسازی HRP با دستکاری شیمیایی

دستکاری شیمیایی زنجیره‌های جانبی واکنشگر در معرض حلال، بطور گسترده‌ای برای افزایش پایداری و فعالیت آنزیم ها استفاده می‌شود. در بین باقیمانده‌های موجود در سطح، دستکاری لیزین در پایداری تعدادی از آنزیم‌ها مانند آمینوترانسفراز، α- آمیلاز، تریپسین، α- کیموتریپسین و پراکسیداز تربچه موفقیت‌آمیز بوده‌است. بنابراین در بسیاری از مشتق‌های شیمیایی پایدارشده پراکسیداز تربچه که تا به حال گزارش شده، اسیدآمینه لیزین دستکاری شده‌است. دستکاری هیستیدین با پیروکربنات‌های مختلف اثر خنثی یا منفی گذاشته است. دستکاری زنجیره‌های‌جانبی در دسترس تیروزین، آرژنین، آسپارتیک و گلوتامیک‌اسید برای پایدارسازی پراکسیداز تربچه مؤثر نبوده‌است. انواع مختلف دستکاری شیمیایی لیزین از جمله استفاده از اتصال‌دهنده‌عرضی، اتصال پلی‌اتیلن گلیکول و استیلاسیون ساده در پایدارسازی پراکسیداز تربچه موفق عمل کرده‌اند [۷].

در آزمایشاتی که حسنی و همکارانش درباره اثر دستکاری شیمیایی لیزین‌های در سطح HRP روی میزان پایداری این آنزیم انجام دادند، مشخص شده که دستکاری این آنزیم با انیدریدها پایداری این آنزیم را افزایش می‌دهد. مثلاً دستکاری این آنزیم توسط سیتراکونیک و تری‌ملیتیک‌انیدرید باعث افزایش پایداری آن در بازه دمایی ۵۰ تا ۶۰ درجه می‌شود؛ ولی در دماهای بالاتر، تنها سیتراکونیک‌انیدرید پایدارکننده بوده‌است. این گروه همچنین با پیروملیتیک انیدرید، HRP را دستکاری کردند که نتیجه آن کاهش فشردگی ساختار و افزایش پایداری حرارتی قابل توجه آنزیم در دماهای پایین‌تر از ۶۵ درجه بوده‌است [۶]. گروه دیگر مقرب و همکارانش بودند که گزارش کردند، اتصال کوالان آنتراکوئینون۲-کربوکسلیک‌اسید به لیزین در سطح HRP باعث افزایش ویژگی انتقال الکترون آن می‌شود. همچنین مطالعه واسرشتگی و غیرفعال‌شدن حرارتی این آنزیم توسط این محققان لنشان داد که این نوع دستکاری، پایداری پیکربندی و عملکردی HRP را افزایش می‌دهد [۷].

۲.۱ نیروهای مؤثر در پایداری

نیروهای حاصل از میانکنش‌های الکتروستاتیک، واندرولس، هیدروژنی و اثر آبگریزی در پایداری پروتئین‌ها مؤثر است. البته در کنار نیروهای پایدارساز عواملی نیز وجود دارند که در جهت ناپایداری پروتئین عمل می‌کنند [۸].

۱.۲.۱ میانکنش های الکتروستاتیک

ویژگی مهم این نوع میانکنش ها وابستگی آنها به قدرت یونی و pH محیط است و می توانند به صورت جاذبه در جهت پایدارسازی و یا دافعه در جهت ناپایدار نمودن ساختار عمل کنند.
در دهه۹۰، جفت یون ها را مهمترین عامل در پایداری پروتئین می دانستند. اما امروزه سهم کمتری برای آنها قائل هستند؛ وابستگی کم میزان پایداری به تغییرات pH و نمک (غلظت پایین نمک) در نقطه ایزوالکتریک، حفاظت نسبتاً اندک یون ها در مسیر تکامل و تعداد کم جفت یون ها در پروتئین (حدود ۵ جفت به ازای ۱۵۰ اسید آمینه) که ۲۰ درصد آنها هم در درون پروتئین مدفون بوده و عامل ناپایداری می باشند، از مهمترین دلایلی است که اثبات می کند، میانکنش های الکتروستاتیک در مقایسه با سایر نیروها، بالاخص میانکنش های آبگریز نقش کمتری در پایدارسازی ساختار پروتئین ایفا می‌کنند. در واقع سهم آنها ۱۰-۵ برابرکمتر از نیروهای آبگریز است. بطور کلی kCal/mol ۳-۱ به ازای هر جفت یون، پایداری برای پروتئین تخمین زده شده است [۸].

۲.۲.۱ میانکنش های واندروالس و هیدروژنی

برخی از محققین به علت قابلیت ایجاد پیوند هیدروژنی بین گروههای داخلی با یکدیگر در حالت طبیعی و همین گروهها با آب در حالت واسرشته، سهم آنها را در تفاوت سطح انرژی آزاد بین این دو حالت ناچیز می دانند. اما متعاون بودن میانکنش ها در پروتئین طبیعی و نوسانات بیشتر پیوندهای ایجاد شده در سطح پروتئین با آب، نسبت به داخل پروتئین، دلیلی برای اثبات نقش مثبت پیوند هیدروژنی در پایداری می باشد. در عین حال پیوند های هیدروژنی در تشکیل ساختار دوم در پروتئین نقش اساسی دارند [۹]. میانکنش های واندروالس که فاصله گروههای اتمی نقش مهمی در تشکیل آنها دارد، به دلیل فشردگی بیشتر گروههای اتمی در پروتئین طبیعی نسبت به وضعیتی که گروهها در معرض حلال واقع می شوند، نقش مثبتی در پایداری ایفا می کنند [۱۰].

۳.۲.۱ اثر آبگریزی در پروتئین

عامل اصلی در شکل گیری حالت طبیعی و سرشته پروتئین، قرار گرفتن گروههای آبگریز در داخل پروتئین است و علت بالا رفتن سطح انرژی پروتئین واسرشته در شرایط فیزیکی، کاهش آنتروپی سیستم در اثر نظم ساختار آب در اطراف گروههای غیر قطبی است که به دلیل تلاش مولکولهای آب

برای حفظ انسجام ساختار سه بعدیشان صورت می گیرد. در واقع حضور گروههای غیرقطبی سد انرژی بالایی جهت واسرشته شدن ساختار طبیعی ایجاد می کند [۱۱–۸].

۳.۱ روش های پایدارسازی پروتئین

سه روش معمول در پایدار سازی پروتئین عبارتند از [۱۲]:

۱) استفاده از افزودنی های پایدار کننده
۲) دستکاری شیمیایی پروتئین
۳) تثبیت کردن پروتئین های آنزیمی
٤) جهش زایی جهت دار

۱.۳.۱ استفاده از افزودنی های پایدار کننده

بیش از نیم قرن است که زیست شناسان به هنگام جداسازی پروتئین، جهت حفاظت، آن را در گلیسرول، ساکاروز یا مواد مشابه نگهداری می کنند. برخی از نمک ها وقتی در غلظتهای بالا (بیش از ۱ مولار) استفاده شوند، اثر پایدار کنندگی بر روی پروتئین دارند. میکروارگانیسم ها، گیاهان و جانورانی که در شرایط سخت محیطی چون استرس های حرارتی، سرمایی، آبی و نمکی واقع می شوند، غلظت یک سری از ترکیبات آلی را در درون سلول افزایش می دهند؛ این ترکیبات آلی با جرم مولکولی کم که نقش حمایت سلول را در مقابل عوامل نا مساعد بر عهده دارند، تحت عنوان اسمولیت شناخته می شوند. از نظر عملکردی، اسمولیت ها به دو گروه سازگار و ناسازگار تقسیم می شوند. انواع سازگار این مواد نقش پایدارکنندگی خود را بدون تأثیر در میزان فعالیت آنزیم ایفا می کنند؛ در حالی که نوع ناسازگار در کنار پایدارسازی، ساختار و فعالیت آنزیم را دستخوش تغییر می سازند. از دلایل مهم اختلال عمل آنزیم در حضور اسمولیت های ناسازگار، برهمکنش آنها با سوبسترا، کوفاکتور و جایگاههای فعال ماکرومولکول می باشد [۱۲].