جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲ ، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۸۶
صفحات: ۱۳۹ - ۱۵۱

تخلیص و بررسی خصوصیات مولکولی پاراکسوناز سرم انسان

حسینعلی مهرانی✍ .Ph.D ، لیلا گل‌منش* .M.Sc ، فریده بهرامی** .M.Sc ،
سیدمحمد تابعی*** .Ph.D

چکیـده

هدف: هدف تخلیص پاراکسوناز -۱ سرم انسان که به نظر می‌رسد یکی از آنزیم‌های موثر در خنثی‌سازی مواد ارگانوفسفات است، می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق دو نوع ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی (DEAE Sephadex A-50) و غربال مولکولی (Sephadex G-200) برای تخلیص این آنزیم مناسب شناخته شد. با استفاده از دترجنت غیریونی، آنزیم از ساختار لیپوپروتئین HDL جدا گردید. پس از اتصال آنزیم به ستون تعویض یون با شستشوی متناوب پروتئین‌های ناخواسته و غیرمتصل از ستون خارج گردید. آنزیم مورد نظر با استفاده از شیب غلظتی از کلریدسدیم از ستون خارج و فراکسیون‌های فعال جمع و بر روی ستون غربال مولکولی برده شد. فراکسیون‌های فعال خارج شده از این ستون مجددا بر روی ستون تازه تهیه شده از میدیای ستون اول (DEAE Sephadex A-50) برده شد. با این تفاوت که هم بافر تغییر یافته بود و هم pH بافر شستشو نسبت به مرحله اول کاهش یافته بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که حاصل تخلیص این روش کروماتوگرافی، آنزیم با درصد خلوص بیش از ۹۵٪ و فعالیت ویژه ۳۲۰ واحد بین المللی در میلی‌گرم پروتئین است. با استفاده از ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) تنها یک باند پروتئینی در محدوده ۴۳ کیلو دالتون مشاهده شد. بررسی مطالعات سینیتیکی نشان داد میل ترکیبی آنزیم با سوبستراهای مختلف وابسته به بافر و یون کلسیم و سدیم است. چنان که با استفاده از سوبسترای پاراکسون هیدرولیز پاراکسون توسط آنزیم تخلیص شده وابسته به کلسیم و کلرید سدیم بود ($K_m = 1.39 \pm 0.52$). در صورتیکه هیدرولیز فنیل استات نیاز به کلرید سدیم و کلسیم نداشت ($K_m = 0.728 \pm 0.105$). حد اکثر فعالیت آنزیم برای هیدرولیز پاراکسون در محدوده pH برابر ۱۱-۹/۵ و برای فنیل استات در محدوده ۸/۵-۸ بود. گلیسرول ۲۰٪ (حجمی-حجمی) بهترین پایدار کننده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد شناخته شد. بطوری که پس از مدت ۲۰ روز در این دما بیش از ۷۵٪ فعالیت اولیه آنزیم باقی بود. بر عکس در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد سولفات آمونیوم عملکرد بهتری را نشان داد. آنزیم تخلیص شده توسط غلظت‌های میکرومولار EDTA و یون روی (Zn^{2+}) مهار گردید. غلظت‌های مهاری ۵۰ درصدی (IC_{50}) در حضور کلسیم برای هر دو مهار کننده افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: روش بکار رفته روش ارزان و سریع است بطوری که می‌توان با استفاده از این روش مقدار زیادی از این آنزیم را تخلیص و آلودگی و مسمومیت با ارگانو فسفات‌ها را از بین برد.

واژه‌های کلیدی: پاراکسوناز-۱ انسان، تخلیص پروتئین، پاراکسون، فنیل استات.

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۲۰، اصلاح مقاله: ۸۶/۴/۲۷، پذیرش مقاله: ۸۶/۵/۱

✍ نویسنده مسئول: استاد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌آله(عج)، تهران -ایران
* کارشناس ارشد مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج)،
** مربی گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌آله(عج)
*** گروه بیوشمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز
آدرس پست الکترونیکی: h.mehrani@bmsu.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفات و کاربامات سالهاست که در کشاورزی و در مصارف خانگی بعنوان حشره‌کش مصرف می‌شوند. مسمومیت با این مواد یکی از مشکلات بهداشتی جهان است. سالانه حدود سه میلیون نفر با این مواد مسموم و بیش از ۲۰۰هزار نفر جان خود را از دست می‌دهند (۱). علاوه‌بر این در جنگهای شیمیایی نیز تاکنون این ترکیبات بطور گسترده مورد استفاده قرارگرفته‌اند (۲).

از میان عوامل ارگانوفسفات ترکیباتی که بیشتر شناخته شده‌اند، عبارت از : پاراتیون، مالاتیون، پاراکسون، متیل پاراتیون، مالاکسون، فنیتوئین، دیازنون، کلروپیروفیس، تابون، سارین، دی‌ایزوپروپیل فسفوفلوریدات (DFP)، اکوتیوفات و VX هستند. برخی از این عوامل مانند پاراتیون، مالاتیون و دیازینون مصارف حشره‌کشی دارند، اما برخی نظیر سومان، سارین و تابون جزء سموم جنگی موثر بر اعصاب هستند (۳).

به طور کلی مکانیزم کلاسیک عملکرد ترکیبات ارگانوفسفره مهار کربوکسیلیک استرازها است. این مواد با گروه هیدروکسیل ریشه سرین جایگاه فعال آنزیم ترکیب می‌شوند و کمپلکسی به نام فسفوریل استر ایجاد می‌نمایند. این کمپلکس که دراثر هیدرولیز و جداشدن ریشه جانبی شکل می‌گیرد آنزیم را به ترکیب فسفریله، غیرفعال و نسبتاً پایداری تبدیل می‌کند. نوعی آنزیم کربوکسیل استراز که به استراز هدف نروپاتی (Neuropathy target esterase) معروف است، توسط برخی ارگانوفسفاتها قابل مهار است و به نظر می‌رسد در ایجاد پلی‌نوروپاتی تاخیری ناشی از این سموم (OPIDP) نقش داشته باشد (۴).

درمانهای رایج برای مسمومیت با ارگانوفسفاتها برای جلوگیری از مرگ و میر ناشی از آلودگی با ارگانوفسفاتها موثر است اما نمی‌تواند جلوی اثرات سمی و ناتوان کننده آنها را در حیوانات و احتمالاً انسان بگیرد. لذا تحقیقات اخیر روی تولید دام اندازهای بیولوژیکی و یا آنزیم‌های تجزیه کننده این ترکیبات متمرکز شده است تا ترکیبات ارگانوفسفات را در جریان خون قبل از اینکه به بافتهای حساس فیزیولوژیکی برسند به دام اندازند و یا تجزیه کنند (۵).

ارگانوفسفاتها توسط آنزیم‌های خاصی هیدرولیز شده و بنابراین سم‌زدایی می‌شوند که این عمل بوسیله استرازهای دسته A نظیر پاراکسوناز شماره ۱ (PON1) صورت می‌گیرد. آنزیم PON1 یکی از پروتئین‌های سرمی است که مقدار آن در جریان خون با میزان مقاومت به ارگانوفسفاتها مرتبط است. لذا به نظر می‌رسد که این آنزیم به عنوان تخریب کننده بیولوژیکی در in vivo عمل کند (۵). PON1 دارای فعالیت هیدرولیتیک است و ارگانوفسفاتهایی نظیر پاراکسون، سارین، سومان و تابون را تجزیه و غیرفعال می‌نماید (۶). همچنین این آنزیم قادر است متابولیتهای سمی اکسون مربوط به تعدادی از حشره‌کها نظیر پاراتیون، دیازینون و کلرپیروفیس را نیزهیدرولیز کند (۷). این آنزیم در پستانداران از طریق پروتئین apoA-1 به لیپو پروتئین HDL اتصال محکمی دارد (۸). هیدرولیز ارگانوفسفاتها توسط PON1 سرمی شاخص عمده مسمومیت در مهره‌داران از جمله انسان است. موش فاقد ژن PON1 پس از آلودگی با ارگانوفسفاتها در مقایسه با موشهای حاوی این ژن دچار مرگ سریع با دوزهای کم (Sub lethal) می‌شود (۹). در انسان تفاوت قابل توجهی در فعالیت سرمی PON1 بین افراد مختلف موجود است. پلی‌مورفیسم ژنتیکی این آنزیم ممکن است منجر به فنوتیپهای مختلفی گردد که حساسیتهای متفاوتی را در افراد نسبت به مسمومیت با ارگانوفسفاتها و یا بیماری‌های نظیر بیماری کرونر قلبی ایجاد کند (۱۰،۱۱).

آنزیم پاراکسوناز-۱ یک آنزیم با عملکردهای متفاوت است که از آن به عنوان جک برای هر چرخی یاد می‌کنند. افزایش هموسیستئین در خون انسانبه عنوان یک ریسک فاکتور مستقل برای بیماریهای قلبی- عروقی مطرح است. هموسیستئین می‌تواند برای سلولهای انسانی مضر باشد چون منجر به هموسیستئین تیولاکتون (HTL) می‌شود که این ترکیب با پروتئین‌ها واکنش داده و از طریق مکانیسم هموسیستئینه شدن اسید آمینه لیزین در ساختار پروتئین‌ها، منجر به تخریب و یا ناکار آمدی پروتئین‌ها می‌گردد (۱۲)، در نتیجه تجمع LDL افزایش می‌یابد و هجوم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ماکروفاژها را تشدید می‌کند. بنابراین PON1 می‌تواند از طریق هیدرولیز HTL به عنوان محافظ در مقابل هموسیستئینه شدن عمل کند. تخلیص PON1 دارای مزیتهای متعددی است که از آن جمله تسهیل در تعیین ویژگیهای ساختمانی وفعالیت گوناگون این آنزیم است. در نتیجه در غیاب سایر آنزیمهای سرمی، تعیین فعالیتهای بیولوژیکی آن امکان‌پذیر می‌گردد. از آنجائیکه این آنزیم به HDL متصل است، تخلیص آن مشکل و شامل روندهای چندمرحله‌ای است. تخلیص آریل استراز (پاراکسوناز) از سرم انسان ابتدا توسط Gan و همکاران صورت گرفت (۱۳). در مطالعات بعدی روشهای تخلیص این آنزیم بتدریج بهبود یافته است (۱۴،۱۵).

تخلیص این آنزیم می‌تواند اهمیت خاصی در سمزدایی ارگانوفسفاتها در بدن و محیط زیست داشته باشد.

Brushia و همکاران با استفاده از سه مرحله کروماتوگرافی که شامل DEAE-Sepharose (کروماتوگرافی تعویض یون) و Sephacryl (S-200) (ژل فیلتراسیون) وکان کاوالین (Con A) که یک کروماتوگرافی گرایشی غیراختصاصی است آنزیم را از سوپرنانت سلولی خالص نمودند (۱۶). Rodrigo و همکاران پاراکسوناز را با استفاده از DEAE-Sepharose Cl-6B (کروماتوگرافی تعویض یون)، سیباکرون بلو (افینیتی کروماتوگرافی غیر اختصاصی) و ۲ ستون DEAE-anion exchange و افینیتی کروماتوگرافی ConA- Sepharosre آنزیم را از میکروزوم کبد موش استخراج نمودند (۱۷).

Sinan و همکاران با استفاده از رسوب‌گیری آمونیوم سولفات۶۰-۸۰ درصد، و بکارگیری نفتیل آمین اتصال یافته به سفارز این آنزیم را پس از چند مرحله تخلیص نمودند (۱۸). چنانکه از تمام تحقیقات گذشته مشاهده می‌شود در تمام این روشها از کروماتوگرافی گرایشی استفاده شده است که هم گران و هم زمانبر است.

لذا هدف از مطالعه حاضر استفاده از یک روش ارزان، ساده و سریع برای تخلیص پاراکسوناز-۱ انسانی می‌باشد. بطوریکه بتوان با بکارگیری این روش و حجم زیادی از سرمهای تاریخ گذشته به مقدار مناسب این آنزیم را برای کاربردهای خاص تخلیص نمود.

روش بررسی

رزین‌های کروماتوگرافی شامل.

Sephadex (G-100), ، DEAE Sephadex (A-25), (A-50) /(G-200) Phenyl Sepharose فارماسیا CM – Sephadex (کربوکسی متیل سفادکس) از شرکت فارماسیای سوئد، تهیه گردید. کلیه مواد شیمیایی دیگر شامل: فنیل استات، پاراکسون، پلی اتیلن گلایکول(PEG) ۶۰۰۰ پلی اتیلن گلایکول۱۰۰۰۰، آلبومین، آگارز و سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شد.

منبع تخلیص پاراکسوناز-۱. نمونه بکار برده جهت تخلیص آنزیم پاراکسوناز-۱، پلاسمای تازه فریز شده انسان بود که از بانک انتقال خون دریافت و در کیسه‌های خون به صورت فریز شده به آزمایشگاه منتقل شد. سپس کیسه‌های حاوی سرم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از خارج شدن از حالت فریز و تبدیل به محلول یکنواخت، در اندازه‌های معین تقسیم گردید و در یخچال در ۴ درجه سانتیگراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

تهیه نمونه جهت تخلیص پاراکسوناز سرمی. در ابتدا به ازای هر ۱۰میلی لیتراز محلول سرم ۱۰۰میکرولیتر (۱٪) تریتون X-100 افزوده و پس از یکنواخت کردن آن، در طول شب در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس به مدت ده دقیقه در ۵۰۰۰g سانتریفیوژ (4°C) شد. محلول رویی (سوپرنانت) را جمع‌آوری و پس از تعیین حجم کل، میزان پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پاراکسوناز وابسته به یون کلسیم، طبق روش اسپکتروفتومتری Gan و همکاران (۱۳) با اندکی تغییر انجام گرفت. در این روش دو نوع محلول انکوباسیون بکار برده شد که حجم نهایی برای هر دو محلول ۱/۲میلی لیتر بود. محلول شماره ۱ براساس اندازه‌گیری فعالیت آریل استرازی و محلول شماره ۲ براساس اندازه‌گیری فعالیت پاراکسونازی بود.

سنجش فعالیت آریل استرازی. محلول سنجش که در خالص سازی و جداسازی آنزیم و برخی مطالعات سینیتیک اولیه

بکار برده شد بـه ترتیـب شـامل: محلـول آنزیمـی ۵۰ میکرولیتـر، سوبسترای فنیل استات ۱۰۰ میکرولیتـر و بافرسـنجش (تـریس – هیدروکلرید ۲۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۱ میلی مـولار، EDTA ۵ میکرومولار و کلرید سدیم یک مولار با pH برابـر ۸) در حجـم نهایی ۱/۲میلی لیتر بود. غلظت نهایی سوبـسترا بـستگی بـه نـوع سنجش آنزیم در مراحل مختلف سینیتیکی داشت.

سنجش فعالیت پاراکسونازی. محلول آنزیمی۵۰ میکرولیتر، سوبسترای پاراکسون ۱۰۰ میکرولیتر و بافرسنجش فوق در حجـم نهایی ۱/۲ میلی لیتر بود. واکنش آنزیمی با اضافه کـردن محلـول سوبسترای تازه تهیه شده فنیل استات و یا پاراکـسون بـه محلـول انکوباسیون فوق شروع می‌گردید. افزایش جذب نور در طول مـوج ۲۷۰ نانومتر (فعالیت آریـل اسـترازی) و یـا ۴۰۵ نـانومتر (فعالیـت پاراکسونازی) دردمای ۲۵درجه سانتی گراد، در فواصل زمـانی ۳۰ ثانیه به مـدت ۵ دقیقـه توسـط دسـتگاه اسـپکتروفتومتر بـه روش سینیتیکی قرائت می‌شد.

واحدفعالیت آنزیمی (U). در تمام آزمایشات این تحقیق واحـد فعالیت آنزیمی (U) برابر مقدار فعالیتی از آنزیم در نظرگرفته شـده است که در مدت یک دقیقه یک میکرومول سوبسترا را در شـرایط آزمایش به محصول تبدیل نماید.

مراحل تخلیص آنزیم پاراکسوناز-۱ ازسـرم انـسانی. مراحل خالص‌سازی آنزیم از سرم انسانی به ترتیب توسط ستونهای کروماتوگرافی تبادل آنیونی و ژل فیلتراسیون زیر انجام گرفت.

الف- کروماتوگرافی تبادل آنیونی اول

DEAE Sephadex A-50 . این رزین تبادل یونی در pH کمتر از ۹ دارای حداکثر ظرفیت اتصال بـه پـروتئین‌هـا اسـت. لـذا pH مناسب ۸ تا ۸/۶ برای این ستون انتخاب گردید. جهت تهیه ستون از ستونهای شیشه‌ای ساخت شرکت فارماسیا بطول ۳۰ سانتیمتر و قطـر ۲ سـانتیمتر اسـتفاده شـد. ابتـدا رزیـن در یـک بـشر۲۵۰ میلی‌لیتری به مدت ۲ ساعت در آب مقطر غوطـه‌ور شـد تـا ذرات ریز آن جدا و تخلیه گردیـد. سـپس بـه مـدت ۲۴ سـاعت در بـافر شستشوی A در دمای اطاق انکوبه شد تا به تعادل pH بافر برسد. بعد از آن برا ی گرفتن ذرات ریز معلق، مایع فوقانی رزین خـارج و با تکرار این عمل ذرات ریز اضافی کاملاً از مخلوط جدا گردیـد. در خاتمـه بـا اضـافه کـردن حـدود ۲۰۰ میلـی لیتـر از بـافر مـذکور سوسپانسیون تهیه شده جهت پر کردن ستون مورد اسـتفاده قـرار گرفت. رزین را وارد ستون کروماتوگرافی نموده و پس از ته نـشین شدن، با بافر جداسازی A (تریس-بازی ۲۰ میلی مولار، گلیسرول ۲ درصد، کلرید کلسیم یک میلی مولار و EDTA ۵ میکرو مولار (pH=۸) شسته شد تا pH خروجی برابر ۸ گردید. سپس مقدار ۱۰ میلی لیتر از سرم حاوی تریتون X-100 (۱٪) (طبق شـرایط ذکـر شده در قسمت فوق) که حاوی ۶۵ میلی گرم پروتئین در هر میلی لیتر بـود، بـر روی سـتون قـرار داده شـد. پـس از جـذب محلـول پروتئینی به ستون، بتدریج بافر جداسازی A افزوده شد و ستون بـا سرعت ۰/۶ میلی لیتـر در دقیقـه شـسته شـد. خروجـی سـتون در لوله‌های جداگانه با حجم ۳ میلی لیتری بـا اسـتفاده از فراکـسیون collector جمع‌آوری گردید. میزان جذب پـروتئین در لولـه‌هـای جمع‌آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شـد. زمـانی که جذب در آخرین لوله به صفر نزدیک می‌شد، ستون با استفاده از شیب غلظت کلـرور سـدیم کـه توسـط gradient maker تـامین می‌شد (از صـفر تـا ۷۵۰میلـی مـول بـر لیتـر تهیـه شـده در بـافر جداسازی A) شسته می‌شد. مواد خروجی در لولـه‌هـای مجـزا بـه حجم ۳ میلی لیتر جمع‌آوری و فعالیـت آنـزیم پـارا اکـسوناز-۱ در تمام لوله‌ها اندازه‌گیری گردید. لوله‌هایی که فعالیتی بیشتر از بقیـه داشتند را در یک ظرف جمع‌آوری نموده و تا اسـتفاده بعـدی در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

آماده سـازی ژل سـفادکسG-200 . مقـدار مناسـب از ژل سفادکس G-200 را تـوزین و در آب مقطـر دی یـونیزه غوطـه‌ور گردید. به منظور آبدار شدن رزین (Swelling) آن را حداقل یـک ساعت غوطه‌ور نموده، سپس محلول رویـی (Fine) را خـارج و بـا بافر جداسازی A شستشو داده شد تا تمام ذرات ریـز خـارج گـردد. ستونی به طول۶۰ و قطر۲ سانتی متر انتخاب و به تدریج ژل آبـدار شده به ستون اضافه شد. ابتدا شیر خروجی ستون بسته شد. پس از تشکیل ارتفاعی در حدود ۱۰سانتی متر از ژل، خروجـی سـتون بـا سرعت کم تنظیم شد و به طور پیوسته ژل از بالا به ستون اضـافه گردید تا مانع از لایه لایه شدن آن شود. پس از پرشدن سـتون تـا حد مناسب، با بافر جداسازی A به تعادل رسانده شد. سپس حـدود

۸ میلی لیتر از خروجی کروماتوگرافی تعویض آنیونی که دارای بیشترین فعالیت بود بر روی ستون سفادکس G-200 قرار داده شد. شیر خروجی ستون بسته شد تا محلول آنزیم بطور کامل وارد ستون شود (از خشک شدن ستون جلوگیری شد) سپس شیر ستون را باز نموده و با بافرجداکننده شستشو داده و خروجی ستون در لوله‌های جداگانه با حجم ۴ میلی لیتر جمع‌آوری گردید. جذب لوله‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر جهت تخمین پروتئین و فعالیت آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. لوله‌هایی که فعالیتی بیشتر از بقیه داشتند در یک ظرف جمع‌آوری شده و تا استفاده بعدی در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

ج- ستون کروماتوگرافی دوم DEAE Sephadex A-50. رزین این ستون نیز همانند ستون اول DEAE Sephadex A-50 تهیه شد با این تفاوت که بافر شستشو، بافرجداسازی B (بافر فسفات ۲۰ میلی مولار، تریتون X-100 ۰/۱در صد، کلرید کلسیم یک میلی مولار، EDTA ۵ میکرو مولار pH =۷) بود. پس از تعادل ستون با بافرجداسازی B مقدار ۶ میلی لیتر از آنزیم تخلیص شده در مرحله قبل بر روی ستون قرار داده شد. پس از شستشو با بافر طبق مرحله قبل مواد خروجی در لوله‌هایی جداگانه و به حجم یک میلی لیتر جمع‌آوری گردید. در نهایت آنزیم با استفاده از شیب غلظت کلرورسدیم (صفرتا ۰/۶ مولار) از ستون خارج گردید. فعالیت آنزیم در تمام لوله‌ها اندازه‌گیری و لوله‌هایی که بیشترین فعالیت را داشتند جمع‌آوری گردید. آنزیم حاصل در طی شب با استفاده از کیسه دیالیز بر علیه بافر جداسازی دیالیز گردید و تا مرحله بعدی در۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه گیری غلظت پروتئین. غلظت پروتئین در نمونه‌های خروجی کروماتوگرافی با اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در ۲۸۰ نانومتر و در سایر نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد طبق مطالعات گذشته اندازه‌گیری شد (۱۹). نمونه‌های پروتئینی به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد با معرف براد فورد انکوبه شد، پس از این مدت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش با استفاده از سرم آلبومین گاوی منحنی استاندارد تهیه و غلظت پروتئین در نمونه‌های مختلف محاسبه شد.

الکتروفورز ژل آکریل آمید (SDS-PAGE) . جهت بررسی آنزیم تخلیص شده از نظر میزان خلوص و ساختار ملکولی، از الکتروفورز با استفاده از روش لاملی (Laemmli) طبق مطالعات قبلی انجام شد (۲۰). ژل غیرپیوسته (discontinuous ژل جداکننده) باغلظت ۱۲٪ و ژل تفکیک کننده (Stacking gel) با غلظت ۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. پس از ریختن ژل در قالب مخصوص، پروتئین تخلیص شده و استانداردهای وزن ملکولی در بافر نمونه در حضور مرکاپتواتانول جوشانده شد تا پیوندهای دی‌سولفیدی احیا شوند. پس از سرد شدن به مقدار ۵ میکروگرم از آنزیم تخلیص شده و ۲۰ میکروگرم استاندارد به حجم‌های ۲۰ میکرولیتر در حفره‌های جداگانه برروی ژل قرار داده شد. ژل به مدت ۳ ساعت با استفاده از دستگاه UWR 570 با ولتاژ متغیر با آمپر ثابت ۲۵ میلی آمپر الکتروفورز شد. پس از خاتمه، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه ژل در محلول تثبیت کننده قرار گرفت. سپس با محلول کوماسی بریلیانت بلو رنگ‌آمیزی شد. برای از بین بردن رنگ زمینه از محلول بی‌رنگ کننده (destaining) استفاده شد. پس از بی‌رنگ شدن رنگ زمینه از ژل تصویر تهیه گردید.

بررسی خصوصیات سینتیکی آنزیم. آنزیم پاراکسوناز سرم انسان نسبت به سوبستراهای مختلف گرایش متفاوتی را نشان می‌دهد. در این تحقیق از سوبستراهای فنیل استات جهت فعالیت آریل استرازی و از پاراکسون جهت فعالیت پاراکسونازی استفاده گردید.

بررسی اثر pH برفعالیت آنزیم. برای پیدا کردن pH مطلوب خاص هر سوبسترا، فعالیت آنزیم در دو حالت آریل استرازی و پاراکسونازی بطورجداگانه در pHهای مختلف و دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. در تمام سنجشها غلظت یونی بافر مقدار ثابت ۲۰ میلی مولار انتخاب شد. تا pH برابر ۵، از بافر استات – استیک اسید، از pH ۸-۶ از بافر فسفات، از بافر تریس برای pH۸/۵-۸ و از بافر گلایسین – هیدروکلرید برای pH های ۱۲-۸/۵ استفاده گردید.

بررسی پایداری آنزیم در دمای محیط. جهت بررسی پایداری و ماندگاری فعالیت آنزیم در دمای طبیعی آزمایشگاه (۲۵°C)، آنزیم تخلیص شده همراه مواد پایدارکننده با حجم‌های ثابت دو میلی لیتر و با غلظت۲۰٪ وزنی-حجمی پایدارکننده‌ها

(آمونیوم سولفات، گلیسرول و پلی اتیلن گلایکول۶۰۰۰) در لوله‌های اپندورف در دمای آزمایشگاه در شرایط استریل در بافر تریس 20Mm و pH=8 انکوبه شدند. در زمانهای مختلف به فاصله زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت از نمونه‌ها جهت بررسی فعالیت آنزیم نمونه‌برداری و فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل یا شاهد حاوی آنزیم بدون پایدارکننده بود. فعالیت باقیمانده در نمونه‌ها نسبت به فعالیت اولیه محاسبه گردید.

اثرمهارکننده هابرفعالیت آنزیم.

الف – اثر مهاری EDTA بر فعالیت پاراکسونازی و آریل استرازی جهت بررسی اثر مهاری این ماده، یک استوک EDTA در آب مقطر با pH=8 ساخته شد. سپس غلظتهای مختلف از این ماده تهیه و اثر آن بر فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. واکنش طوری طراحی شد که غلظت نهایی EDTA در محیط واکنش آنزیمی برابر ۵ میکرومولار تا ۵ میلی مولار باشد. غلظت سوبستراها، آنزیم و حجم واکنش در تمام واکنش‌ها ثابت بود. تنها متغیر غلظت مهار کننده بود.

ب– اثرمهاری کلرید روی بر فعالیت پاراکسونازی و آریل استرازی جهت بررسی اثر مهاری این یون فلزی یک استوک اولیه در آب دی یونیزه دو بار تقطیر تهیه گردید.

سپس غلظتهای مختلف از این ماده در بررسی فعالیت پاراکسونازی با استفاده از سوبسترای پاراکسون و فعالیت آریل استرازی با استفاده از فنیل استات مورد بررسی قرار گرفت. واکنش طوری طراحی شد که غلظت نهایی کاتیون روی درمحیط واکنش آنزیمی بین ۵ تا ۵۰ میکرومولار باشد.

یافته‌ها

خالص سازی آنزیم. برای تخلیص این آنزیم ازروشهای متفاوت کروماتوگرافی استفاده شد.

پس از بررسی انواع ستونهای کروماتوگرافی در نهایت به یک روش ساده، سریع و ارزان دست یافتیم. نتایج بدست آمده حاکی از درصد خلوص بالا و بازده قابل قبول است.

نتایج نمونه‌ای از درصد خلوص و فعالیت آنزیم در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنان که در جدول ۱ مشاهده می‌کنید، در طی مراحل خالص‌سازی، آنزیم با خلوص بالا و با فعالیت ویژه ۳۲۰ واحد بر میلی‌گرم پروتئین و بازده ۶۰ درصد بازیابی شده است.

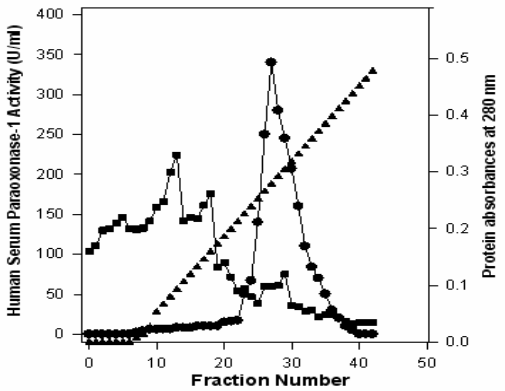
جدول ۱. مراحل خالص سازی آنزیم پاراکسوناز سرم انسان

Steps	Volume (ml)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Pooled Human plasm	15	474	0.11	100
Triton X-100 treated plasma	10	435	0.19	92
First DEAE Sephadex A-50	10	420	7.25	89
G-200 gel filtration column	8	350	39.45	73
Second DEAE A-50 column	4	285	320.00	60

جدول ۲. ثابت های سینیتیکی آنزیم پاراکسوناز سرم انسانی

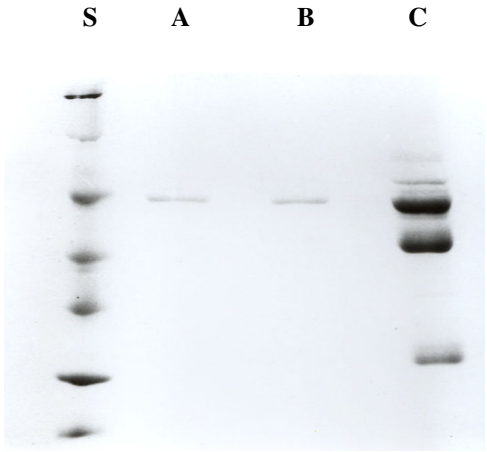
Substrate		K_m (mM)	V_{max} (U/L)
Phenyl acetate		0.73 ± 0.08	15175 ± 256
Paraoxon		1.20 ± 0.2	158 ± 19
Inhibitors		IC_{50} (μM)	
Zinc chloride			
	+ Ca^{++} (1 mM)	15.4 ± 2.3	
	- Ca^{++}	6.1 ± 0.7	

بـــا اســـتفاده از ســـتون کرومـــاتوگرافی تعـــویض آنیـــونی DEAE-Sephadex A-50 مرحله اول تخلیص در pH=8 شروع شد. آنزیم بطور موثر جذب ستون شده و با شستشوی بافر شستشو از ستون جدا نگردید. با استفاده از شیب غلظت کلرورسدیم بتدریج پروتئین‌های اتصال یافته به ستون از ستون خارج گردیدنـد. پیـک فعالیت آنزیم در لوله‌های ۴۵-۴۰ بـود کـه در غلظـت ۴۵۰ میلـی مولار کلرید سدیم از ستون خارج گردید. فراکسیون‌های فعـال بـر روی ستون بعـدی یعنـی ژل فیلتراسـیون G-۲۰۰ بـرده شـد. بـا استفاده از این ستون نیازی به دیالیزفراکـسیون‌هـای فعـال جهـت حذف نمک خارج شده از ستون قبل نبود. علاوه بر ایـن بـرعکس ستون قبلی که جداسازی بر اساس بار الکتریکی انجام می‌گرفـت، در ایـن روش جداسـازی مـستقل از بـار الکتریکـی و بـر اسـاس کانفرماســیون و وزن مولکـــولی پـــروتئین‌هـــا اســـتوار بـــود. فراکسیون‌های فعال این ستون نیـز جمـع‌آوری و بـر روی سـتون سوم برده شد. در این روش که ستون کروماتوگرافی همان سـتون اسـتفاده شـده در مرحلـه اول و بـا اسـتفاده از سـتون تعـویض آنیونی DEAE- Sephadex A-50 بود شرایط متفاوت از مرحلـه اول مورد استفاده قرار گرفت. چرا که با پایین آوردن pH از ۸ به ۷ شرایطی ایجاد شد که منجر به جداسازی آنزیم بصورت یک پیـک فشرده در غلظت ۴۰۰ میلی مولارکلریدسـدیم گردیـد. نمونـه‌ای از نحوه خالص‌سازی در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱. نمونه کروماتوگرام تخلـیص پاراکـسوناز-۱ سـرمی بـا استفاده از ستون کرومـاتوگرافی DEAE-Sephadex A-50 ، مربع ها (■) نشانگر میزان جذب پروتئین درنمونـه، دایـره‌هـا(●) فعالیت آنزیم در فراکسیون‌های خروجی از ستون و مثلث‌هـا (▼) گرادیان غلظت کلرید سدیم که از صـفرتا ۱مـول در لیتـر متغیـر است.

پس از الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید و رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو مشخص شد که آنزیم دارای یک باند پروتئینی منفـرد ۴۳ کیلو دالتونی و درصد خلوص بیش از ۹۵ در صد است. نمونه‌ای از تصویر الکتروفورز در شکل ۱ نشان داده شده است.



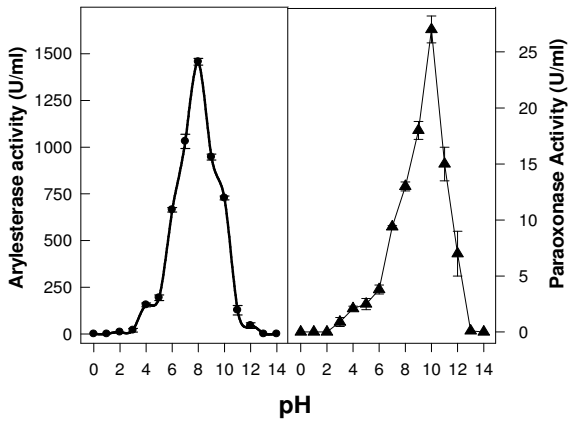
شکل ۱. الکتروفورز SDS-PAGE که باکوماسـی‌لـو نـگ‌میـزی شده است. ردیـف A مربـوط بـه اوزان مولکـولی پـروتئین‌هـای استاندارد است که به ترتیـب از بـالا بـه پـایین عبارتنـد از: بتـا گالاکتوزیداز (116KD)، آلبومین سرم گاو (66 KD)، اوآلبوبومین (45 KD)، لاکتات دهیدروژناز (35 KD)، انـدونوکلئاز اشریـشیا کـولی (25 KD) و بتـا لاکتوگلـوبین (18.4 KD). ردیـف B و C آنزیم تخلیص شده توسط سـتون سـوم (DEAE-Sephadex A-50)، ردیف D آنزیم تخلـیص شـده توسـط سـتون دوم (ژل فیلتراسیون) می‌باشد.

ثابتهای سینتیکی-تعیین K_m,V_{max} . جهت تعیین پارامترهای سینیتیکی اثرغلظتهای مختلف فنیل استات و پاراکسون بر فعالیت آنزیم با بافرهای مختلف ذکر شده در قسمت روشها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج داده‌های حاصل و اثر مهار کننده‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. چنان که مشاهده می‌شود میل ترکیبی آنزیم نسبت به سوبسترای فنیل استات بیشتر از پاراکسون است. چرا که هم فعالیت بیشتری دارد و هم دارای K_m کمتری نسبت به پاراکسون است.

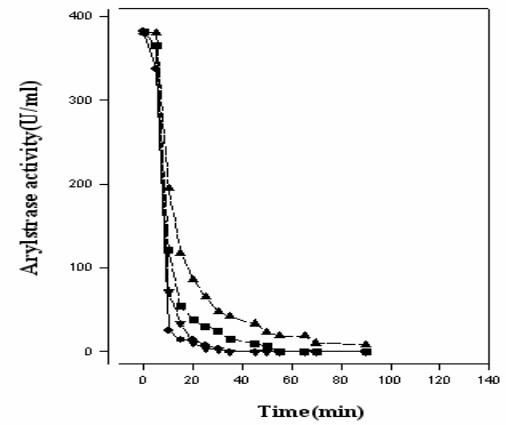
اثرpH برفعالیت آنزیم.

الف- بررسی فعالیت آریل استرازی. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم درpHهای مختلف و دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد نشان

داد که این آنزیم در محدوده خاصی از غلظت یون هیدروژن دارای فعالیت مطلوب است. نتایج حاکی از این است که pH مطلوب برای فعالیت آریل استرازی این آنزیم در دامنه ۸/۵-۸ است (نمودار ۲).

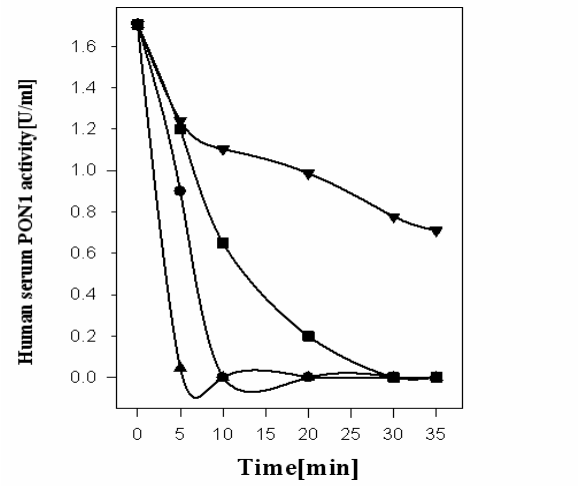


نمودار۲ . اثر pH برفعالیت پاراکسونازی (سمت راست) و آریل استرازی (سمت چپ) آنزیم پاراکسوناز-۱ سرم انسان.



نمودار ۳. بررسی پایداری فعالیت آریل استرازی آنزیم (دیالیز شده) در ٥٦ درجه سانتی گراد در زمانهای مختلف انکوباسیون: مثلث‌های سر بالا (▲) آمونیوم سولفات، مربع‌ها (■) گلیسرول، دایره‌ها (●) پلی اتیلن گلایکول و مثلث‌های سر پایین (▼) آنزیم بدون هیچگونه پایدار کننده است.

ب-بررسی فعالیت پاراکسونازی. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در pH های مختلف و دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد نشان داد که فعالیت مطلوب پاراکسونازی این آنزیم متفاوت از آریل استرازی و در محدوده خاصی از غلظت یون هیدروژن است. نتایج نشانگر این است که فعالیت مطلوب پاراکسونازی در دامنه pH ۱۱-۹/۵ است (نمودار ۲).



نمودار ٤. بررسی پایداری فعالیت پاراکسونازی آنزیم در ٥٦درجه سانتی گراد در زمانهای مختلف انکوباسیون: مثلث های سر بالا (▲) آمونیوم سولفات، مربعها (■) گلیسرول، دایره‌ها (●) پلی اتیلن گلایکول و مثلث‌های سر پایین (▼) آنزیم بدون هیچگونه پایدار کننده است.

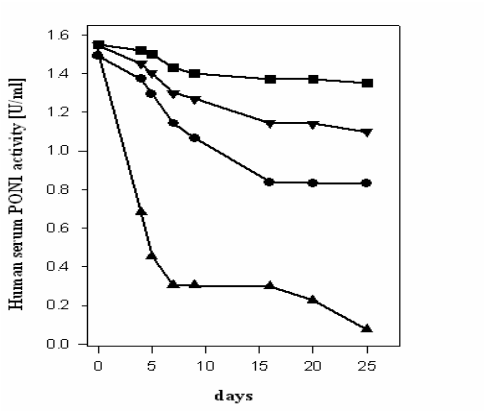
بررسی پایداری آنزیم در ٥٦°C.

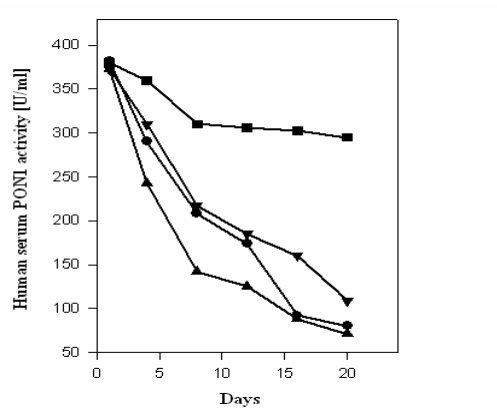
الف -بررسی پایداری فعالیت آریل استرازی. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در زمانهای مختلف و دمای ثابت ۵۶ درجه سانتی گراد طبق روش ذکر شده در بخش روشها نشان داد که آنزیم انکوبه شده در حضور آمونیوم سولفات دارای پایداری بیشتر و زمان طولانی‌تر نسبت به گلیسرول و پلی‌اتیلن گلایکول در این دما است. این نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.

ب- بررسی پایداری فعالیت پاراکسونازی. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای پاراکسون در زمانهای مختلف و دمای ثابت ۵۶ درجه سانتی‌گراد نیز نشان داد که آنزیم حاوی آمونیوم سولفات دارای بیشترین زمان پایداری نسبت به گلیسرول و پلی‌اتیلن گلایکول بود. نتایج این مورد در نمودار ۴ نشان داده شده است.

بررسی پایداری آنزیم در دمای محیط (C° ۲۵). جهت بررسی پایداری آنزیم در این دما، لوله کنترل یا شاهد حاوی آنزیم بدون پایدار کننده بود. فعالیت باقیمانده در حضور مواد پایدار کننده نسبت به فعالیت اولیه محاسبه شد و بصورت درصد فعالیت اولیه رسم گردید.

نتایج نشان داد پایداری آنزیم در گلیسرول و بافر تنها بهتر از پلی اتیلن گلایکول و آمونیوم سولفات است. این نتایج در نمودار ۵ نشان داده شده است.





نمودار ۵. بررسی پایداری فعالیت آریل استرازی (تصویر سمت راست) و پاراکسونازی (تصویر سمت چپ) آنزیم پاراکسوناز-۱ با استفاده از پایدارکننده‌های مختلف: مثلث‌های سر بالا (▲) آمونیوم سولفات، مربعها (■) گلیسرول، دایره‌ها (●) پلی اتیلن گلایکول و مثلث‌های سر پایین (▼) آنزیم بدون هیچگونه پایدار کننده است.

اثرمهارکننده‌ها برفعالیت آنزیم پاراکسوناز-۱

الف- اثرمهاری EDTAبر فعالیت آنزیم پاراکسوناز -۱. مطالعات گذشته نشان داده که EDTA می‌تواند با کلاته کردن کاتیونهای ۲ ظرفیتی فعالیت این آنزیم را کاهش دهد. با بررسی این مهارکننده مشاهده شد که در حضور کلسیم و نمک کلریدسدیم این آنزیم در غلظتهای بالاتری (۸۰۰-۴۰۰ میکرومولار) مهار می‌شود، در صورتیکه در بافر بدون نمک کلرید سدیم و کلسیم در غلظت کمتری از مهار کننده (۸۰-۴۰ میکرومولار) کاهش فعالیت نشان می‌دهد.

ب- اثرمهاری کلرید روی برفعالیت آنزیم پاراکسوناز-۱. در بررسی اثر مهاری کاتیون روی بر فعالیت آنزیم نتایج حاصله نشان داد که I_{C50} آنزیم (غلظت مهاری ۵۰ درصدی) در حضور یون کلسیم ۲۰ میکرومولار و در عدم حضور کلسیم این مقدار پایینتر و ۱۰ میکرومولار است (جدول ۲).

بحث

ارگانوفسفات‌ها ترکیبات بسیار سمی هستنند که آنزیم استیل کولین استراز در بافت‌های مختلف موجودات پر سلولی از جمله انسان را مهار و موجب ضایعات متعددی می‌گردند. تحقیقات اخیر در راستای تولید به دام‌اندازهای بیولوژیکی (Bioscavenger) و یا هیدرولازهای موثری هستند تا این مواد را قبل از اینکه به بافت‌های حساسی نظیر مغز برسند غیر فعال و یا هیدرولیز نمایند (۵). این بدام‌اندازها یا هیدرولیز کننده‌ها بایستی دارای خصوصیاتی باشند که در نبود ارگانوفسفات‌ها برای میزبان مضر نباشند، در مقابل ارگانوفسفات‌ها موثر عمل کنند و اختصاصی نیز باشند. علاوه بر این با شرایط فیزیولوژیک بدن انسان سازگار و عوارض ناخواسته ایجاد ننمایند. پاراکسوناز-۱ سرم انسان یک کاندیدای مناسب در زمینه فوق برای هیدرولیز ارگانوفسفات‌ها می‌باشد. چرا که در خود بدن انسان تولید می‌شود. خاصیت ایمونوژنیک در انسان ندارد و فاقد هر گونه عوارض احتمالی ثانویه است.

در این مطالعه پاراکسوناز-۱سرم انسان با استفاده از روشهای مختلف کروماتوگرافی تخلیص گردید. با بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی آنزیم مشخص گردید که آنزیم قادر به هیدرولیز ارگانوفسفات‌های نظیر پاراکسون است. با بررسی میزان خلوص پروتئین تخلیص شده

در الکتروفورز SDS-PAGE تنها یک باند یگانه با وزن مولکولی ۴۳ کیلودالتون مشاهده شد. در مطالعات دیگر نیزدر الکتروفورز دناتوره به همین نتیجه دست یافته‌اند (۱۸). در اغلب مطالعات وجود یک باند اضافی درکنار باند اصلی دیده می‌شود (۲۱). از آن جا که این آنزیم یک گلایکو پروتئین است در محل‌های مختلف کربوهیدرات‌ها از طریق پیوندهای گلیکوزید از طریق کووالانت به ساختمان آنزیم متصل هستند. احتمال می‌رود در حین عمل تخلیص کربوهیدرات‌ها از ساختمان آنزیم جدا گشته و یک باند اضافی با وزن مولکولی کمتر در الکتروفورز دیده شود و یا این که آنزیم توسط پروتئازها شکسته شده و باند اضافی تولید نماید. به همین دلیل وزن مولکولی گزارش شده برای این آنزیم بین ۴۳-۳۷ کیلو دالتون متغیر است.

این آنزیم در جریان خون همراه با لیپوپروتئینها و متصل به HDL است، در نتیجه خاصیت هیدروفوبیسیته بالایی دارد و به همین دلیل در کروماتوگرافی تعویض یون مانع چسبیدن آنزیم به ستون کروماتوگرافی می‌شود. به همین دلیل در این تحقیق قبل از کروماتوگرافی، آنزیم طی شب با تریتون X-100 انکوبه گردید و سپس با استفاده از سانتریفیوژ عوامل نا محلول از سرم جدا گردید. این عمل باعث شد که آنزیم از لیپوپروتئین‌ها جدا شده و خاصیت هیدروفوبیسیتی خود را ازدست بدهد، بطوریکه بعد از این عمل آنزیم طوری به ستون تعویض یونی DEAE Sephadex A-50 می‌چسبید که تنها با شیب غلظت کلرید سدیم از ستون خارج می‌گردید.

در بیشتر تحقیقا ت قبلی، محققین از ستونهای گرایشی و یا افینیتی غیراختصاصی نظیر سیباکرون بلوآگارز وکانکاوالین A برای تخلیص این آنزیم استفاده نموده‌اند (۲۲،۲۱). در برخی مطالعات هم از ژل هیدروفوبیک سنتزی 4B-Biogel استفاده شده است (۲۳). درست است در این روشها آنزیم اختصاصا به ستون کروماتوگرافی متصل می‌شود. از آنجائیکه ارتباط آنزیم با میدیای ستون کروماتوگرافی از طریق پیوندهای آبگریز و غیرقطبی است جهت جداسازی آنزیم از ستون از معکوس شیب غلظت کلرید سدیم استفاده می‌شود. به همین دلیل خروج آنزیم از ستون با یک پیک پهن همراه است و غلظت آنزیم در فراکسیون‌های بیشتری توزیع شده و بازده تخلیص پایین است. علاوه بر این، این روشها پرهزینه و طولانی مدت نیز هستند. در نتیجه روشی که در این تحقیق بکار رفت هم از نظر زمانی کوتاه‌تر است، چرا که تعداد مراحل از هفت مرحله به سه مرحله کاهش یافته است. هم اینکه تنها از دو میدیای کروماتو گرافی استفاده شده است که علاوه بر کاهش مراحل تخلیص از میدیاهای ارزانتری نسبت به روشهای قبلی استفاده شده است.

در تحقیق حاضر تنها از دو ستون تعویض آنیونی DEAE-Sephadex A-50 و ژل فیلتراسیون G-200 استفاده گردید. در نتیجه هم منجر به کوتاه شدن مراحل تخلیص و هم افزایش بازده تخلیص شد. بازده تخلیص روش بکار رفته ۶۰٪ و فعالیت ویژه آنزیم ۳۲۰ بین‌المللی در لیتر بود که نسبت به سایر روشهای گزارش شده از بازده و خلوص بالاتری برخوردار است (۲۴).

در بررسی فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای فنیل استات و پاراکسوناز وابستگی آنزیم به کلسیم و نمک دیده شد. در این تحقیق غلظتهای مختلفی از سوبستراهای فنیل استات و پاراکسون تهیه و فعالیت آنزیم بطور جداگانه در حضور نمک و کلسیم و همچین بدون حضور آنها بررسی شد. نتایج نشان داد در شرایط استفاده از پاراکسون (فعالیت پاراکسونازی) ثابت میکائلیس-منتن (K_m) وابسته به یون کلسیم است. در غلظتهای پایین سوبسترا (کمتر از1mM) این تفاوت فاحش بود ولی در غلظتهای بالاتر این اختلاف دیده نشد. یعنی حضور کلسیم و نمک در غلظت‌های پایین سوبسترا، غلظت‌های مشابه غلظت‌های فیزیولوژیک باعث کاهش Km شده که نشاندهنده گرایش بیشتر آنزیم به سوبسترا در این شرایط است. در گزارشات منتشره K_m آنزیم برای فنوتایپ‌های Q و R به ترتیب (۰/۲۷و۰/۶۹ میلی مول در لیتر) و یا بترتیب ۰/۵۲و ۰/۸۱ میلی مولار گزارش شده است (۱۲). اما در شرایطی که از نمونه Pooled Serum استفاده شده است این میزان ۱/۳۸ و ۴/۱۶ گزارش شده‌اند (۱۸). که داده‌های گروه اول موافق این تحقیق و داده‌های گروه دوم با این تحقیق مغایرت دارد. البته باید در نظر داشت که ثابت میکائلیس-منتن تابع شرایط خاصی است که وابسته به نوع بافر استفاده شده، میزان pH نوع سوبسترای بکار رفته (منبع فروش و درصد خلوص) و میزان درجه حرارت است.

در بررسی سینیتیکی آنزیم تخلیص شده مشخص گردید که pH اپتیموم برای این آنزیم با استفاده از فنیل استات (فعالیت آریل

استرازی) در دامنه ۸/۵–۸ است. در صورتیکه برای هیدرولیز سوبسترای پاراکسون (فعالیت پاراکسونازی) بالاتر از این مقدار و دارای دامنه ۱۱–۹/۵ بود. تحقیقات گذشته نیز به نتایج مشابهی دست یافته‌اند (۲۵). هرچند pH مطلوب پاراکسونازی در این تحقیق ۱۰/۵ تعیین شد، ولی بدلایل زیر در تمام آزمایشات از pH ۸/۵ جهت سنجش آنزیم استفاده گردید. اولا pH استفاده شده در این تحقیق به فیزیولوژیک بدن نزدیک تر است. ثانیا برای مقایسه با فعالیت آریل استرازی که در pH مشابه اندازه‌گیری شده است مناسب است.

در تخلیص آنزیم‌های با کاربرد خاص یکی از مشکلات نگهداری آنزیم برای مصارف بعدی است. لذا در این تحقیق جهت نگهداری بلند مدت آنزیم تخلیص شده از نگهدارنده‌های مختلف در دمای ۴ و ۲۵ درجه سنتیگراد استفاده شد. برای این منظور از پایدارکننده‌های آمونیوم سولفات، گلیسرول و پلی اتیلن گلایکول (۲۰ درصد –وزنی حجمی) استفاده شد. نتایج نشان داد گلیسرول پایدارکننده مناسبی نسبت به دو پایدار کننده دیگر در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد است. از آنجائیکه گلیسرول دارای مولکول دو قطبی است، احتمالا در این دما از دناتوره شدن آنزیم جلوگیری کرده و خاصیت هیدروفوبیستی آنزیم را حفظ کرده و به عنوان یک محافظ عمل نموده است. در دمای ۴ درجه سانتیگراد هر سه پایدار کننده موثر بودند. برعکس نتایج در ۵۶ درجه سانتی گراد مغایر با نتایج در ۲۵ درجه سانتی گراد بود. در این حرارت آمونیوم سولفات پایدار کننده بهتری به نظر می‌رسید.

آمونیوم سولفات بدلیل داشتن بار الکتریکی بیشتر، غلظت یونی محلول را افزایش داده و تعادل مولکول‌های آب در ساختار آنزیم را حفظ نموده است. در نتیجه در درجه حرارت بالاتر به عنوان پایدار کننده بهتری عمل می‌کند.

با افزایش دما خاصیت هیدروفوبیسیتی اتیلن گلایکول و گلیسرول کاهش یافته و به عنوان پایدار کننده ضعیف عمل نمودند. برای این آنزیم مهارکننده‌های مختلفی شناسایی شده‌اند اما در اکثر تحقیقات EDTA را به عنوان شاخص‌ترین مهار کننده معرفی نموده‌اند. در یکسری از تخلیص‌ها آنزیم به همراه آلبومین خارج می‌شود از آنجا ئیکه آلبومین دارای فعالیت لاکتونازی می‌باشد و از طرفی فعالیت لاکتونازی توسط EDTA مهار نمی‌شود، یک معیار مناسبی برای بررسی تخلیص آنزیم بکار می‌رود. در این تحقیق مشاهده شد در استفاده از بافر سنجش فاقد کلسیم، اثر مهاری EDTA خیلی سریعتر و با غلظت پایین‌تری نسبت به زمانی که بافر حاوی کلسیم بود رخ می‌دهد. در مطالعات گزارش شده نیز به نتایج مشابهی دست یافته‌اند (۲۶). احتمالا اثر مهاری EDTA از طریق کلاته کردن یون کلسیم که برای فعالیت آنزیم ضرورت دارد رخ می‌دهد. در صورتیکه این فرضیه در مورد فعالیت آریل استرازی قابل توجیه نیست. چرا که جهت فعالیت آریل استرازی، این آنزیم نیاز مبرمی به کلسیم ندارد. در صورتیکه این تحقیق و سایر تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت آریل استرازی این آنزیم نیز توسط EDTA مهار می‌شود (۲۷).

آنزیم پاراکسوناز–۱ توسط یکسری از فلزات دو ظرفیتی نیز مهار می‌شود. برای بررسی اثر مهاری فلزات دو ظرفیتی از نمکهای کلردار این فلزات استفاده شد تا اثرات تداخلی کلر حذف و فقط اثر یون فلزی مورد بررسی قرار گیرد.

در بین یونهای دوظرفیتی، یون مس، یون آهن و یون روی مورد بررسی قرار گرفتند. اثر مهاری یون روی بارزتر و در غلظت‌های خیلی کم رخ می‌داد. در این مورد نیز وقتی بافر سنجش فاقد کلسیم بود مهار شدگی خیلی سریعتر و با غلظت پایین‌تری نسبت به زمانی که بافر حاوی کلسیم بود اتفاق می‌افتاد.

در مورد مس و آهن این اثر مهاری در غلظتهای پایین (میکرو مولار) مشاهده نشد و در غلظتهای بالاتر این فلزات به علت رنگی شدن محلول واکنش، رنگ زمینه در طول موج سنجش فعالیت آنزیم تداخل ایجاد می‌کرد و مانع از سنجش می‌شد. در صورتیکه محققین اثر مهاری این ترکیبات را مشابه غلظت مهاری روی گزارش کرده‌اند که در این تحقیق چنین پدیده‌ای مشاهده نشد (۲۸).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق با استفاده از روشهای ساده کروماتوگرافی آنزیم پاراکسوناز سرم انسان تخلیص گردید. نشان داده شد که روش بکار رفته از کارآمدی و بازده بالا و قابل قبولی برخوردار است.

با استفاده از پایدار کننده‌ها نشان داده شد حتی می‌توان در دمای محیط به مدت طولانی آنزیم تخلیص شده را نگهداری و استفاده نمود.

تشکر و قدردانی. از معاونت و مدیریت محترم دانشکده پزشکی و همکاران محترمشان کمال تشکر را داریم که به موقع هزینه‌های این تحقیق را فراهم نمودند. همچنین از تمام همکاران گروه بیوشیمی خصوصاً آقای رضایی که در این طرح مارا یاری نمودند متشکریم.

References

1. Kwong TC. Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology.Therapeutic Drug Monitoring J 2002; 24: 144-149.

2. Cherry N, Creed F. Health and exposures of United Kingdom Gulf war veterans. Part II: The relation of health to exposure. Occup Environ Med 2001; 58 : 299–306.

3. Black RM, Harrison JM. The chemistry of organophosphorus chemical warfare agents. In: Hartley, F.R. (Ed.), the Chemistry of Organophosphorus Compounds. John Wiley & Sons, Chichester 1996; 781–840.

4. Moretto A. Experimental and clinical toxicology of anticholinestrase agents. Toxicol Lett 1998; 102-103: 509-513.

5. Yeung D, Josse D. Structure/function analyses of human serum paraoxonases (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model. Biochimica ET Biophysica Acta 2004; 1702: 67-77.

6. Akgur S, Ozturk P. Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute Organophosphorous insecticide poisoning. Forensic Science International 2003; 133: 136–140.

7. Wan Fen Li, Clement E. Paraoxonase protects against Chlorpyrifos toxicity in mice. Toxicology Letters 1995; (76)3: 219-226.

8. Himbergen T, Tits T, Roest T. The story of poN1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. The Netherlands Journal of Medicine 2006; (64)2: 34-38.

9. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme PON1. Clinical Science 2004; 107: 435-447.

10. Hotoph M, Mackness I. Paraoxonase in Persian Gulf War veterans. J Occup Environ Med 2003; 45: 668-675.

11. Aviram M, Hardak E. Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions. Circulation 2000; 101: 2510-2517.

12. Billecke S, Draganov D. Human serum PON1 isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metabolism and Disposition 2000; 28: 1335-1342.

13. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum Paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug Metab Dispos 1991; 19: 100–106.

14. Adler A, Disteche CM, Omiecinski CJ, Crabb JW, Humbert R. Human and Rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of Polymorphism in organophosphate detoxification. Chem Biol Interact 1993; 87: 35–48.

15. Rodrigo L, Gil F, Hernandez AH, Marina A, Vazquez J, Pla A. Purification and Characterization of paraoxon hydrolyses from Rat Liver. Biochem J 1997; 321: 595–601.

16. Robert J, Brushia RJ. Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1. Journal of Lipid Research 2001; 42: 951-958.

17. Rodrigo L, GIL F. Identification of paraoxonases-3 in rat liver microsomes: purification and biochemical properties. Biochem. J 2003; 376: 261–268.

18. Sinan S, Kockar F. Amphenicol and Macrolide Derived Antibiotics Inhibit Paraoxonase Enzyme Activity in Human Serum and Human Hepatoma Cells (HepG2) in vitro. Biochemistry (Moscow) 2006; 71(1): 46-50.

19. Mehrani H. Protective Effect of polyurethane immobilized human Butyrylcholinesterase, against parathion inhalation in rat. Environmental Toxicology And Pharmacology 2004; 16: 179-185.

20. Mehrani H. Simplified procedures for purification and stabilization of Human plasma butyrylcholinesterase. Process Biochemistry 2004; 39: 877-882.

22. Nguyen D, Wen Liu X. Protective action of CLA against oxidative inactivation of paraoxonase-1/and antioxidant enzyme.Lipids 2003; 38(6): 615-622.

23- Dragomir I, Draganov J, Teiber F. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. Journal of Lipid Research 2005; 46:1239-1247.

24. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. Eur. J. Biochem 1993; 211: 871-879.

25. Rodrigo L, Gil F, Hernandez AF. Identification of two rat liver proteins with Paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase; Chemico-Biological Interactions 1999; (119)120: 263–275.

26. Gonzalvo M.C, Gil F, Hernandez A.F. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurial. Chemico-Biological Interactions 1997; 3(105): 169-79.

27. Lucio G, Costa A. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochemical Pharmacology 2005; 69: 541–550.

28. Debord J, Bollinger JC. Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides. Journal of Inorganic Biochemistry 2003; 94: 1-4.