
بیوشیمی مولکولی، ساختار و عملکرد

آنزیم پراکسیداز گیاهی HRP

تالیف

دکتر حسین طایفی نصرآبادی

استادیار بیوشیمی دانشکده دامپزشکی

دانشگاه تبریز

انتشارات آشینا

شناساگر رکورد : ۱۱۶۲۷۲۹ :
 وضعیت فهرست نویسی : فیا
 رده بندی کنگره : ۱۳۸۶ پ ۴ / ۸۹۸ QP
 شماره کتاب شناسی ملی : ۱۱۶۲۷۲۹ :
 سر شناسه : طایفی نصرآبادی، ۱۳۵۱-
 عنوان و نام پدیدآور : بیوشیمی مولکولی، ساختار و عملکرد آنزیم پراکسیداز گیاهی HRP / تالیف
 حسین طایفی نصرآبادی.
 وضعیت نشر : تبریز: آشینا، ۱۳۸۶.
 مشخصات ظاهری : ۱۱۶ ص.
 شابک : ۲۰۰۰۰ ریال: ۳-۵۸-۸۵۸۸-۹۶۴-۹۷۸
 موضوع : پراکسیداز.
 موضوع : گیاهان - زیست شناسی مولکولی.
 رده بندی دیویی : ۵۷۲/۷۹۱ :



انتشارات آشینا

شابک : ۳-۵۸-۸۵۸۸-۹۶۴-۹۷۸

نام کتاب : بیوشیمی مولکولی، ساختار و عملکرد آنزیم پراکسیداز گیاهی HRP
 مؤلف : دکتر حسین طایفی نصرآبادی
 ناشر : انتشارات آشینا
 نوبت چاپ : اول - زمستان ۱۳۸۶
 تعداد صفحه و قطع : ۱۱۶ صفحه - وزیری
 تیراژ : ۱۰۰۰ جلد
 لینوگرافی : رنگین
 چاپ و صحافی : لک لری
 قیمت : ۲۰۰۰ تومان
 حق چاپ برای ناشر محفوظ است

مراکز پخش : انتشارات آشینا

تبریز - خیابان امام - بازار بزرگ تربیت - طبقه پائین - پلاک ۷ : ۵۵۳۶۱۹۶ ■
 تبریز - خیابان جمهوری اسلامی - بن بست علیخان - پلاک ۲۰ : ۵۵۶۸۳۳۴ ■

فهرست مطالب

۱	مقدمه
۲	۱- پیشینه آنزیم پراکسیداز
۴	۲- تقسیم بندی آنزیم های پراکسیداز
۶	۳- تقسیم بندی آنزیمهای پراکسیداز گیاهی
۶	۳-۱ پراکسیدازهای گیاهی کلاس I
۶	۳-۲ پراکسیدازهای گیاهی کلاس II
۷	۳-۳ پراکسیدازهای گیاهی کلاس III
۹	۴- ایزوآنزیم های پراکسیداز
۱۱	۵- خصوصیات مولکولی آنزیم HRPc
۱۴	۶- ساختار کریستالوگرافی و سه بعدی آنزیم HRPc
۱۶	۷- کلسیم و اهمیت آن در ساختار و عملکرد پراکسیدازها
۲۳	۸- وظایف و عملکرد آنزیم های پراکسیداز گیاهی
۲۳	۸-۱ تولید لیگنین، سوپرین و متابولیت های دیگر در دیواره سلولی گیاه
۲۳	۸-۲ تجزیه و غیرفعال سازی هورمونهای گیاهی اکسین و ایندول استیک اسید
۲۴	۸-۳ کمک در ترمیم و بهبود زخمهای ایجاد شده در گیاه
۲۵	۸-۴ دفاع در مقابل عفونی شدن بوسیله پاتوژن ها
۲۵	۹- مکانیسم عمومی فعالیت آنزیمهای پراکسیداز گیاهی
۳۱	۱۰- نقش هر یک از رزیدوهای اصلی و حفاظت شده در جایگاه فعال آنزیمهای پراکسیداز
۳۳	۱۱- فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور غلظت زیاد پراکسید هیدروژن
۳۴	۱۲- واکنش شبه کاتالازی توسط آنزیم HRPc
۳۷	۱۳- طیف جذب الکترونی در آنزیم HRPc
۴۰	۱۴- بررسی فعالیت سینتیکی آنزیم HRPc
۴۰	۱۴-۱ سینتیک واکنش های آنزیمی با چندین جایگاه فعال
۴۱	۱۴-۱-۱ سیستم های تعادل سریع تصادفی دو و دو

۴۵	۱۴-۱-۲ سیستم های دو و دو دارای ترتیب
۴۹	۱۴-۱-۳ سیستم های دو و دو با مکانیسم پینگ پنگ
۵۲	۱۴-۱-۴ آنزیم های آلوستریک و غیر آلوستریک
۵۳	۱۴-۱-۵ سینتیک مجموعه جایگاههای غیرمتعاون
۵۶	۱۴-۱-۶ آنزیم های آلوستریک و جایگاه های متعاون
۵۸	۱۴-۱-۷ الگوی اندرکنش پی در پی در آنزیم های آلوستریک
۶۰	۱۴-۱-۸ معادله سرعت برای آنزیم های آلوستریک: معادله هیل
۶۲	۱۴-۱-۹ سیگمونییدی بودن منحنی سرعت
۶۴	۱۴-۱-۱۰ نمودار لگاریتمی هیل
۶۶	۱۴-۱-۱۱ انتقال هماهنگ یا الگوی تقارن
۷۴	۱۵- محاسبه مقادیر K_m و V_{max} آنزیم HRPc
۷۶	۱۶- محاسبه مقادیر ثابت های سرعت K_1 و K_4 در آنزیم HRPc
۷۸	۱۷- بررسی اثر pH بر ساختار و فعالیت آنزیم HRPc
۸۳	۱۸- بررسی اثر فلزات سنگین بر روی خصوصیات ساختاری و عملکردی آنزیم HRPc
۸۳	۱۸-۱ اثر فلز نیکل بر روی پارامترهای سینتیکی آنزیم HRPc
۸۳	(V_{max} , K_m) و نوع مهار آنزیم HRPc
۸۹	۱۸-۲ اثر فلز نیکل بر روی بازده کاتالیتیکی آنزیم HRPc
۹۰	۱۸-۳ بررسی اثر فلز نیکل بر روی طیف جذب الکترونی آنزیم HRPc
۹۵	۱۸-۴ بررسی حداقل تعداد جایگاههای اتصال نیکل بر روی آنزیم HRPc
	۱۸-۴-۱ بررسی تعداد جایگاه های اتصال نیکل بر روی آنزیم HRPc از طریق طیف
۹۵	جذب افتراقی آنزیم
۱۰۳	۱۸-۴-۲ بررسی تغییرات ساختار سوم آنزیم HRPc در حضور یون نیکل
۱۰۵	۱۸-۵ بررسی رابطه بین جایگاههای اتصال نیکل در آنزیم HRPc
۱۰۸	۱۸-۶ بررسی اثر نیکل بر ساختار دوم آنزیم HRPc
۱۱۲	منابع:

پیشگفتار

پراکسیداز آنزیمی است که در تمام موجودات زنده از جمله سلولهای گیاهی، جانوری و میکرواگانیزمهای هوازی یافت شده و بر حسب نوع موجود زنده نقش های متفاوتی همچون کاهش سطح پراکسید هیدروژن، تولید لیگنین و سوپرین، بیوستز دیواره سلولی، بیوستز اتیلن، دفاع در برابر حشرات و پاتوژنها، ترمیم زخم، کاتابولیسم اکسین و ایندول استیک اسید را ایفا می نماید. با توجه به اهمیت و نقش های گوناگون این آنزیم در سیستمهای بیولوژی، در سالهای اخیر توجه دانشمندان و محققان زیادی به این آنزیم معطوف گردیده است. در بین آنزیمهای پراکسیداز، آنزیم "هورس رادیش پراکسیداز (HRP)" از همه قابل توجه تر بوده چراکه این آنزیم کاربردهای فراوانی در زمینه های مختلف علوم زیستی و در صنعت دارا می باشد. از جمله می توان به کاربرد این آنزیم در تصفیه فاضلابها، در ایمونواسی، در تهیه بیوسنسورهای زیستی، در تهیه رزین های پلی فنلی، در کیت های تشخیص طبی، در زیست فناوری و در درمان سرطان اشاره کرد.

در این کتاب سعی شده است علاوه بر بررسی جنبه های مختلف بیوشیمیایی این آنزیم (جنبه های مولکولی، ساختاری و عملکردی)، به مباحثی همچون اتصال لیگاند به پروتئین، سینتیک پیشرفته واکنشهای آنزیمی با چندین جایگاه فعال، تاثیر فلزات سنگین بر ساختار دوم و سوم و همچنین تاثیر آن بر پارامترهای سینتیکی نیز پرداخته شود. از نکات قابل توجه کتاب حاضر، استفاده از تجارب و نتایج مطالعات محققین ایرانی در بخشهای مختلف آن است. امید است این کتاب بتواند به عنوان یک راهنمای نظری و عملی جهت کار با آنزیمهای پراکسیداز، مورد استفاده دانشجویان و محققان عزیز قرار گیرد.

با تشکر

دکتر حسین طایفی نصرآبادی

زمستان ۱۳۸۶

مقدمه

متابولیسم اکسیژن مولکولی در موجودات زنده هوازی باعث تولید گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS)¹ از جمله رادیکال آنیون سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^\cdot$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می شود. این ترکیبات از عوامل بالقوه سرطانزا و مضر در موجودات زنده محسوب می شوند. مکانیسمهای مختلفی جهت مقابله با گونه های واکنشگر اکسیژن در موجودات زنده یافت شده که می توان به یکی از مهمترین آنها بنام سیستمهای آنزیمی آنتی اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم، شامل آنزیمهایی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می باشد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق تبدیل O_2^- به H_2O_2 از سمیت آنیون سوپراکسید کاسته و سپس پراکسید هیدروژن تجمع یافته در محیط، توسط گروهی از آنزیمها بنام هیدروپراکسیدازها، سم زدایی می شود. هیدروپراکسیدازها از سه زیر گروه مختلف آنزیمی بنام کاتالازها، کاتالاز-پراکسیدازهای دو عملکردی² و پراکسیدازها تشکیل شده اند. پراکسیدازها آنزیمهایی هستند که در تمام موجودات زنده از جمله سلولهای گیاهی، جانوری و میکروارگانیسمهای هوازی یافت می شوند. این آنزیمها بر حسب نوع موجود زنده نقش های عملکردی متفاوت یا بعضا مشترکی را ایفا می نمایند. یکی از آنزیمهای شاخص پراکسیدازی که از دو قرن پیش تاکنون تحقیقات زیادی بر روی آن صورت گرفته است آنزیم هورس رادیش پراکسیداز (HRP³) می باشد. این آنزیم یک هموپروتئین گیاهی است که به مقدار فراوان در ریشه گیاه هورس رادیش⁴ یافت می شود. هورس رادیش گیاهی از خانواده صلیبیان یا شب بو بوده که یک گیاه علفی و بادوام محسوب می شود. این گیاه در مناطق معتدل دنیا کشت داده می شود و کشت آن عمدتاً بخاطر ارزش غذایی ریشه آن می باشد (شکل ۱). آنزیم HRP که از ریشه این گیاه استخراج می شود از لحاظ تجاری بسیار با اهمیت می باشد، زیرا کاربردهای فراوانی در زمینه های مختلف علوم زیستی دارد. از جمله می توان به کاربرد آن در تهیه کیت های تشخیص طبی برای آزمایشگاهها، در ایمونواسی، در تصفیه

¹ - Reactive Oxygen Species

² - Bi-functional catalase-peroxidase

³ -Horseradish peroxidase

⁴ -Horseradish

فاضلاب ها، در تهیه بیوسنسورهای بیولوژیکی، در تهیه رزین های پلی فنلی، در بیوتکنولوژی و غیره اشاره کرد.

اگر چه عنوان HRP یک لفظ عمومی برای آنزیم پراکسیداز در ریشه این گیاه محسوب می شود اما گیاه هورس رادیش حداقل شامل ۱۵ ایزوآنزیم پراکسیداز مختلف می باشد که ایزوآنزیم نوع C آن (HRPc) فراوانترین نوع آنها محسوب می گردد. تاکنون نقش های فیزیولوژیکی مختلفی برای ایزوآنزیم های HRP گزارش شده است، از جمله می توان به نقش آنها در متابولیسم ایندول^۱ -۳- استیک اسید، لیگنیفیکاسیون، اتصال عرضی پلی مرهای دیواره سلولی، تشکیل سوبرین و مقاومت در برابر عفونی شدن بوسیله عوامل پاتوژن اشاره کرد. تاکنون اطلاعات زیادی درباره عملکرد اختصاصی این آنزیم ها در گیاهان گزارش نشده است. تنها گیاهی که در آن به طور کامل مطالعات مقایسه ای بر روی پراکسیدازهای آن صورت گرفته است گیاه آرابیدوپسیس تالیانا^۱ می باشد که از آن به عنوان یک مدل برای گیاهان استفاده می شود. تمام خانواده ژن پراکسیدازی که در این گیاه یافت شده است ۷۳ ژن می باشد که پیش بینی شده است که اکثریت آنها بتوانند آنزیم پایدار تولید نمایند. لذا به نظر می رسد که هر گونه گیاهی، شامل یک سری از ایزوآنزیم های مختلف پراکسیدازی باشد که بطور جداگانه هر کدام قادرند یک عملکرد خاصی را در گیاه انجام دهند.

۱- پیشینه آنزیم پراکسیداز

اولین مشاهدات ضبط شده از واکنش کاتالیز شده توسط آنزیم HRP، توسط آقای لوئیس پلانچ^۲ در سال ۱۷۷۶ گزارش شده است. پلانچ در هنگام تحقیقات بر روی رزین گیاه ژالاب^۳ (از خانواده گیاه نیلوفران که منشاء مکزیکی دارد) متوجه شد که، هنگامی که یک قطعه از ریشه تازه گیاه هورس رادیش را در این رزین قرار می دهد یک رنگ آبی زیبا تولید می شود. واکنش مشاهده شده، بخاطر اکسیداسیون کاتالیز شده بوسیله آنزیم پراکسیداز بر روی ماده ۲ و ۵- (۴- هیدروکسی-۳- متوکسی فنیل) ۳ و ۴- دی متیل فوران (که قبلا به آن آلفا-گوایکونیک اسید گفته می

^۱ - Arabidopsis Taliana

^۲ - Louis Antine Plonche

^۳ - Jalap

شد) و تبدیل آن به بیس - متیلن کوئینون بود. این محصول، آبی رنگ بوده و اکنون گوایکم بلو^۱ نامیده می شود.



شکل (۱): گیاه هورس رادیش
از گیاهان بومی مناطق معتدل
جهان محسوب می شود. آنزیم
HRP هم در ریشه و هم در برگ
این گیاه یافت می شود.

لفظ پراکسیداز در انتهای قرن ۱۹ توسط روبرت چودات^۲ برای این آنزیم انتخاب شد. روبرت چودات یکی از دانشمندانی است که در دانشگاه ژنوا تحقیقات فراوانی بر روی ریشه گیاه هورس رادیش انجام داده است. سپس نتایج تحقیقات حاصله توسط دیوید کلین^۳ که خود نیز یک محقق برجسته بر روی آنزیم HRP بود در یک کتاب چاپ گردید. اولین بار در سال ۱۹۸۲ هوگو تنورل^۴ آنزیم HRP را از ریشه گیاه هورس رادیش خالص نمود. پیشرفت های دیگری نیز در دوره ۱۹۴۵-۱۹۲۰ در آشکارسازی بخش هم و کربوهیدرات به عنوان اجزاء تشکیل دهنده آنزیم

^۱ - Guaiacum blue

^۲ - Robert chodat

^۳ - David keilin

^۴ - Hugo Theorell