

## تخلیص و تعیین برخی خصوصیات اگزالات اکسیداز جو

دکتر حمیدراهی\*؛ دکتر علی مصطفایی\*\*؛ مهندس بیژن نعمانپور\*\*\*

### چکیده

**سابقه و هدف:** آنزیم اگزالات اکسیداز از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که کاربردهای متنوعی در صنعت و پزشکی دارد. در این مطالعه، این آنزیم از ریشه جو خالص شد و بخشی از خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** پس از کشت جو و تهیه عصاره ریشه آن، آنزیم طی مراحل حرارت‌دهی (۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه)، رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و در دو مرحله کروماتوگرافی تعویض یون خالص شد. بررسی خلوص و تعیین وزن آنزیم با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-PAGE) در شرایط احیایی و غیراحیایی انجام گرفت. تعیین فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی و رنگ‌آمیزی اختصاصی در ژل انجام گرفت. برای تعیین نقطه ایزوالکتریک از دو روش ایزوالکتریک فوکوسینگ و کروماتوفوکوسینگ استفاده شد. افزون بر این تأثیر غلظت‌های مختلف اگزالات، غلظت‌های مختلف اوره و تأثیر چند دترجنت در فعالیت آنزیم بررسی گردید.

**یافته‌ها:** وزن آنزیم اگزالات اکسیداز که بیش از ۶۶۸ بار از ریشه جو خالص شد، در SDS-PAGE احیایی و غیراحیایی به ترتیب معادل ۲۶-۲۵ و ۱۲۰-۱۱۵ کیلو دالتون بود. شکل تک‌واحدی آنزیم فعالیتی در ژل نداشت و تنها در صورت حفظ ساختمان کامل، آنزیم فعال بود. حداقل دو بخش با نقاط ایزوالکتریک (pI) مختلف با فعالیت اگزالات اکسیدازی در ریشه جو مشاهده شد. این دو ایزوآنزیم که گزارشی در مورد یکی از آن دو دیده نشده، به ترتیب ۶/۸ و ۶/۲-۶ تخمین زده شد. آنزیم خالص شده در مقابل انواعی از عوامل واسرشته‌کننده‌ها همچون گرما، غلظت‌های پایین اوره و انواعی از دترجنت‌ها مقاوم بود.

**بحث:** با اطلاعات بدست آمده از روش تخلیص آنزیم و خصوصیات آن، امکان استفاده از این آنزیم در اندازه‌گیری اگزالات فراهم شده است.

**کلیدواژه‌ها:** اگزالات اکسیداز، تخلیص، جو، خصوصیات

«دریافت: تابستان ۱۳۸۳ پذیرش: تابستان ۱۳۸۴»

\* دانشیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

\*\* دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

\*\*\* کارشناس ارشد میکروپ شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

\*\* عهده‌دار مکاتبات: مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، سرخه لیزه، بلوار دانشگاه، کرمانشاه. تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۶۱۷

## مقدمه

و بخشی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن بررسی گردد. دسترسی به آنزیم خالص، قدم مهمی برای طراحی کیت اندازه‌گیری اگزالات به روش آنزیمی محسوب می‌شود که در مرکز تحقیقات بیولوژیکی در حال انجام می‌باشد. قابل ذکر است که با توجه به مشکلات تخلیص آنزیم اگزالات اکسیداز، این آنزیم معمولاً به صورت نیمه‌خالص توسط شرکت‌های مربوطه (همچون شرکت سیگما) عرضه می‌گردد.

## مواد و روش‌ها

کشت هیدروپونیک جو: ابتدا مقدار کافی دانه جو با محلول سولفات مس ۰/۱ درصد (w/v) به مدت ده دقیقه شسته شد. سپس در آب شرب به مدت یک شب در دمای آزمایشگاه به صورت غوطه‌ور قرار گرفت. روز بعد دانه‌ها در لای پارچه خیس قرار گرفت و در سبدهای دارای روزنه‌های ریز، در محیط تاریک قرار داده شد. ریشه‌ها طی ۶-۳ روز دو تا سه مرتبه بریده شدند. جوانه‌ها نیز قبل از سبز شدن بریده شد و تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری شدند.

**استخراج عصاره جو:** ریشه یا جوانه با یک حجم آب سرد حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) یک میلی‌مولار در مخلوط‌کن همگون شد. عصاره از سه لایه صافی پارچه‌ای عبور داده شد. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در  $10000 \times g$  در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و مایع رویی آن جدا و رسوب دور ریخته شد.

**تفکیک بخش آنزیمی با کمک سولفات آمونیوم و حرارت:** به مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، سولفات آمونیوم تا غلظت نهایی ۷۰ درصد اضافه گردید. عصاره ۳۰ دقیقه در  $10000 \times g$  در دمای ۴ درجه سانتی‌فوژ شد.

آنزیم اگزالات اکسیداز با نام اختصاری OXO (EC.1,2,3,4) از پروتئین‌های فاز حاد در گیاهان است که در حضور اکسیژن مولکولی، اگزالات را به آب اکسیژنه و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید (۲۰۱). بسیاری از قارچ‌ها پس از آلوده کردن گیاه، اگزالات را به عنوان ماده سمی تولید می‌کنند. گیاه نیز در پاسخ با استفاده از این آنزیم، اگزالات را تجزیه می‌کند و از محصولات عمل، به ترتیب در چرخه کربن و تولید ماده ضدقارچی استفاده می‌کند (۴-۲). آنزیم اگزالات اکسیداز تاکنون از گیاهان مختلفی از جمله گندم، جو، برنج، ذرت، چغندر قند و علف تلخه جدا و شناسایی شده است. تفاوت انواع ایزوآنزیم‌های این آنزیم در گیاهان مختلف در تعداد اسیدهای آمینه، شرایط واکنش، ساختمان کلی آنزیم و تعداد زیر واحدهای آن می‌باشد (۵و۶).

آنزیم اگزالات اکسیداز استفاده‌های متنوع و متعددی در صنایع غذایی، کشاورزی، دامی و پزشکی دارد (۱۶-۷). از موارد استفاده این آنزیم در پزشکی، اندازه‌گیری دقیق و کمی سطح سرمی و ادراری اگزالات در بیماران اگزالمیا و بیماران مبتلا به سنگ‌های ادراری می‌باشد (۱۶-۱۴). افزون بر این بحث درمان سنگ‌های کلیوی (۱۷) و هیپراگزالمیای اولیه با این آنزیم یا ژن آن، از مباحث جالب توجهی است که در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۱۸و۱۹). موارد استفاده متعدد آنزیم اگزالات اکسیداز در صنایع مختلف و استفاده از آن در طراحی کیت اندازه‌گیری اگزالات سرم و ادرار، اهمیت تخلیص و تعیین خصوصیات آن را به وضوح روشن می‌سازد. در مطالعه حاضر هدف بر آنست که آنزیم با روشی نسبتاً ساده و کم‌هزینه تخلیص

سانتریفیوژ جدا و در مقابل آب مقطر یا بافرهای مورد نظر دیالیز گردید.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم:** اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اگزالات اکسیداز بر اساس روش Laker و همکاران (۲۰) با کمی تغییرات انجام گرفت. برای بررسی فعالیت آنزیم میزان پراکسید هیدروژن تولیدشده در واکنش را که باعث تغییر رنگ ماده ۳- متیل، ۲ا بنزوتیازولینون هیدرازون (MBTH) در حضور آنزیم پراکسیداز می‌گردد، اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل بافر سوکسینات ۵۰ میلی‌مولار با pH معادل ۳/۸ حاوی MBTH ۰/۰۳ درصد، دی‌متیل آنیلین (DMA) ۰/۱۳ درصد، پراکسیداز ۲ واحد در میلی‌لیتر، اگزالات پتاسیم ۰/۲۵ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه آنزیمی در حجم ۲/۲ میلی‌لیتر بود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با افزودن یک میلی‌لیتر محلول متوقف‌کننده (اسید سولفوریک ۵ درصد) واکنش، متوقف و جذب آن در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری غلظت پروتئین:** اندازه‌گیری غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد (۲۱) انجام گرفت. استاندارد مورد استفاده شامل محلول سرم آلبومین گاوی با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بود.

**الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE):** این آزمون به دو شکل احیایی و غیراحیایی بر اساس روش لاملی (۲۲) در ژل جداکننده ۱۰ درصد انجام گرفت. یک حجم بافر نمونه (۵x) به چهار حجم نمونه اضافه شد و پس از قراردادن آن به مدت ۵ دقیقه در ظرف آب جوش، ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه درون چاهک‌ها ریخته شد.

رسوب حاصله در حجم کمی بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۲ حل و یک شب در مقابل این بافر دیالیز گردید. محلول دیالیزشده به مدت ۳ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه قرار داده شد. سپس در ظرف یخ به سرعت سرد گردید. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و مایع رویی برای مراحل بعد نگهداری گردید.

**کروماتوگرافی تعویض یون:** مراحل نهایی تخلیص شامل کروماتوگرافی تعویض یون در دو ستون دی‌اتیل آمینواتیل سلولز (واتمن) و دی‌اتیل آمینواتیل سفارز (فارماسیا) بود. ستون شیشه‌ای به ارتفاع ۲۵ و قطر داخلی ۲ سانتی‌متر با رزین دی‌اتیل آمینواتیل سلولز پر گردید و با حجم زیادی از بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH معادل ۷/۲ شسته شد تا به تعادل رسید. نمونه پروتئین با غلظت ۱۵-۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر وارد ستون گردید. سپس جریان بافر با سرعت ۲۵ میلی‌لیتر در ساعت بر ستون برقرار گردید. پس از رسیدن جذب خروجی به نزدیک صفر (در طول موج ۲۸۰ نانومتر) بافر فسفات حاوی شیب خطی تا یک مولار کلرید سدیم در بافر به ستون وارد شد. لوله‌های حاوی آنزیم مخلوط گردید و در مقابل بافر فسفات ۰/۰۰۵ مولار با pH برابر ۷/۲ دیالیز گردید. سپس به ستون تعویض یون دوم (ستون دی‌اتیل آمینواتیل سفارز) که با همان بافر به تعادل رسیده بود، وارد گردید. پس از رسیدن جذب مایع خروجی ستون به نزدیک صفر، شیب غلظت ۰/۰۰۵-۰/۰۵ مولار بافر فسفات با pH برابر ۷/۲ بر ستون اعمال گردید. لوله‌های حاوی آنزیم مخلوط و محتوای آن‌ها با سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۷۰ درصد رسوب داده شد. رسوب به دست آمده با

کروماتوفوکوسسینگ: کروماتوفوکوسسینگ در تعویض کننده پلی بافر ۹۴ و پلی بافر ۷۴ انجام گرفت. ابتدا حجم کافی از ژل در بافر ایمیدازول ۲۵ میلی مولار با PH برابر ۷/۴ شسته شد و در ستونی به ارتفاع و قطر به ترتیب ۱۵ و ۱ سانتی متر ریخته شد. ستون با حجم کافی از بافر ایمیدازول شسته شد تا به تعادل بافری رسید. نمونه پروتئین که یک شب در مقابل بافر ایمیدازول دیالیز شده بود، وارد ستون گردید. سپس جریان پلی بافر ۷۴ که محلول استوک آن ۹ بار با آب مقطر رقیق شده و pH آن ۴ بود، با سرعت ۲۵ میلی لیتر در ساعت بر ستون وارد گردید. خروجی ستون بادستگاه جمع کننده فراکسیون جمع آوری گردید و محتوای لوله‌ها از نظر pH، میزان پروتئین و فعالیت اختصاصی با روش‌های مربوطه بررسی شد.

*اثر اوره و دترجنت‌ها بر آنزیم:* برای این کار، ابتدا آنزیم در حضور اوره با غلظت‌های ۲،۴،۶ یا ۸ مولار و دترجنت‌های تریتون X-100، توین بیست، چپس و زویترجنت ۱۴-۳ با غلظت‌های به ترتیب ۱، ۱، ۰/۵ و ۰/۵ درصد برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس فعالیت هر لوله آزمون نسبت به لوله کنترل با روش Laker و همکاران که در بخش‌های قبلی توضیح داده شد، اندازه‌گیری گردید.

### یافته‌ها

الگوی SDS-PAGE عصاره ریشه جو در شکل ۱- الف آمده است. این الگو شامل ده‌ها باند پروتئینی کم‌مقدار است. باند مربوط به موقعیت آنزیم اگزالات اکسیداز نیز درصد ناچیزی را به خود اختصاص می‌دهد. الگوی الکتروفورزی آنزیم خالص شده در قسمت‌های ب و ج شکل ۱ به ترتیب در شرایط احیایی و غیراحیایی آمده

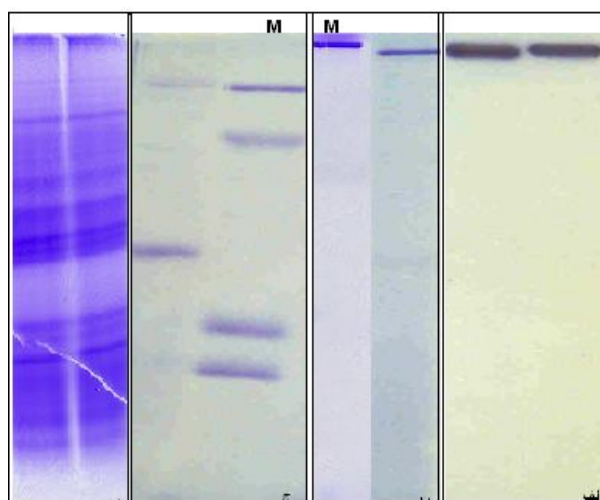
الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت تا رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل انجام گرفت. پس از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی آبی انجام گرفت (۲۳). بررسی فعالیت اختصاصی آنزیم در ژل: در حالتی که لازم بود موقعیت آنزیم به‌طور اختصاصی در ژل مشخص گردد، SDS-PAGE در شرایط غیراحیایی انجام گرفت و نمونه آنزیم نیز تحت تأثیر حرارت قرار داده نشد. در این حالت، پس از انجام الکتروفورز، ژل در بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH معادل ۷/۵ حاوی اتانول ۰ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شد. حجم مورد نیاز از محلول رنگ‌آمیزی (شامل بافر سوکسینات ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۳/۸ حاوی MBTH ۰/۰۰۳ درصد، دی‌متیل آنیلین (DMA) ۰/۰۱۳ درصد، پراکسیداز ۲ واحد در میلی لیتر و اگزالات پتاسیم ۰/۲۵ میلی مولار) به سطح ژل افزوده شد. پس از ظاهر شدن باند آنزیم، ژل در آب مقطر شسته شد و از آن تصویر تهیه گردید.

*ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF):* ایزوالکتریک فوکوسینگ به روش آگیری مجدد ژل در آمفولین ۳-۹ (فارماسیا) بر اساس روش Allen و Budowle با بعضی تغییرات انجام گرفت (۲۴). پس از قراردادن ژل روی دستگاه، پیش‌فوکوسینگ به مدت ۲۰ دقیقه در ۷۰۰ ولت انجام گرفت. سپس ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه روی کاغذهای مخصوص نمونه‌گذاری قرار داده شد. مرحله نفوذپذیری به مدت یک ساعت در شیب ولتاژ ۵۰۰-۰/۰ ولت، مرحله جداسازی در ولتاژ ثابت ۲۵۰۰ ولت به مدت شش ساعت و مرحله نازک‌شدن باندها نیز در ولتاژ ثابت ۳۰۰۰ ولت به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. پس ژل برای رنگ‌آمیزی غیراختصاصی یا رنگ‌آمیزی اختصاصی به محلول‌های مربوطه منتقل گردید.

صورت اختصاصی رنگ آمیزی گردید. نتیجه این آزمون نشان داد که پروتئین خالص شده موقعیت ۱۲۰-۱۱۵ کیلودالتون فعالیت اگزالات اکسیدازی دارد ( شکل ۱-د). نتایج ایزوالکتریک فوکوسینگ عصاره ریشه جو و بخش‌های آنزیمی نشان داد که دو باند پروتئینی متفاوت از نظر pI با فعالیت اگزالات اکسیدازی دیده می‌شود. نقطه ایزوالکتریک باند دارای فعالیت بیشتر در محدوده ۶/۶-۶/۸ تخمین زده شد. pI باند با فعالیت کمتر اگزالات اکسیداز حدود ۶ تخمین زده شد. روش دیگر که برای تعیین pI به کار رفت، کروماتوفوکوسینگ در دامنه pH ۴ الی ۷ بود. شکل ۲ کروماتوگرام لوله‌های با فعالیت اگزالات اکسیداز را در این روش نمایش می‌دهد. نتایج این آزمون نشان داد که دو بخش با pI متفاوت دارای فعالیت اگزالات اکسیدازی هستند. این دو بخش که از نظر فعالیت تفاوت قابل توجهی داشتند، به ترتیب دارای pI معادل ۶/۲ و ۶/۸ بودند. بخش با pI بالاتر، فعالیت آنزیمی بیشتری از خود نشان داد.

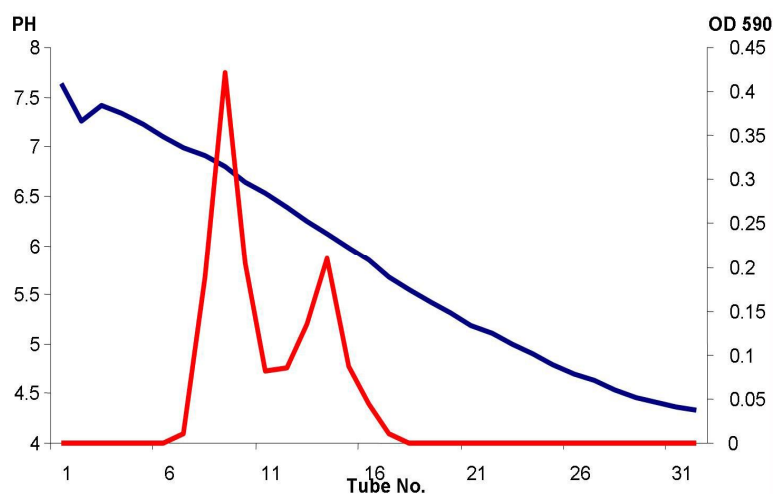
است. همان‌گونه که این نتایج نشان می‌دهد، وزن آنزیم در شرایط احیایی در محدوده ۲۶-۲۵ و در شرایط غیراحیایی در محدوده ۱۲۰-۱۱۵ کیلودالتون تخمین زده شده است. در الگوی الکتروفورز احیایی یک باند پروتئینی ضعیف نیز در موقعیت وزنی ۲۶-۲۵ کیلودالتون (معادل وزن آنزیم تک‌واحدی) دیده می‌شود. در شرایط احیایی برای تخمین وزن مولکولی آنزیم تک‌واحدی از چهار پروتئین استاندارد شامل آلبومین سرم گاو، اوآلبومین، بتالاکتوگلوبوبین و آلفا لاکتالبومین به ترتیب با اوزان ۶۷، ۴۵، ۱۸ و ۱۴/۴ کیلودالتون استفاده شد. در مقابل، در شرایط غیراحیایی برای تخمین وزن مولکولی آنزیم فقط از IgG انسانی با وزن ۱۵۰ کیلودالتون استفاده شد که به دلیل محدودیت در دسترسی به پروتئین‌های استاندارد با وزن مولکولی بالا بود.

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد، برای تأیید پروتئین خالص شده به عنوان آنزیم اگزالات اکسیداز، بخشی از ژل SDS-PAGE غیراحیایی به



شکل ۱- (د) الگوی SDS-PAGE عصاره ریشه جو در شرایط احیایی (ج) و (ب) الگوی SDS-PAGE آنزیم خالص شده به ترتیب در شرایط

احیایی و غیراحیایی. ستون‌های M مربوط به مارکرها وزنی است (الف) الگوی SDS-PAGE غیراحیایی آنزیم با رنگ اختصاصی



شکل ۲- کروماتوفوکوسینگ فراکسیون غنی از آنزیم اگزالات اکسیداز در تعویض کننده پلی بافر ۹۴ در دامنه pH ۴ تا ۷

چندین ساعت فعالیت خود را به طور کامل و حتی در غلظت ۸ مولار اووره برای مدت یک ساعت، تا ۳۰ درصد فعالیت خود را حفظ می نماید.

#### بحث

روش آنزیمی با استفاده از اگزالات اکسیداز، در حال حاضر دقیق ترین روش برای اندازه گیری اگزالات در پلاسما و ادرار است (۱۶). به علاوه این آنزیم می تواند در درمان سنگ های کلیوی (۱۷) و هیپراگزالمیای اولیه (۱۸) و (۱۹) مورد استفاده قرار گیرد. این موضوع اهمیت استخراج و تخلیص آن را از منابع مناسب روشن می سازد. در مطالعه حاضر با توجه به سادگی کشت و بالابودن فعالیت مخصوص آنزیم اگزالات اکسیداز، از ریشه جو به عنوان منبع گیاهی تخلیص آنزیم استفاده شد. نتایج نشان داد که این آنزیم با درجه خلوص بالا (شکل ۱) بیش از ۶۲۸ بار از عصاره ریشه جو خلوص شده است. محصول خلوص شده در SDS-PAGE احیایی وزنی معادل ۲۶-۲۵ کیلودالتون (قسمت ب شکل ۱) و در SDS-PAGE غیراحیایی وزنی معادل ۱۲۰-۱۱۵ کیلودالتون (قسمت ج

آنزیم اگزالات اکسیداز خلوص پس از فرارگرفتن در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تا ۵۰ درصد فعالیت خود را از دست داد. حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه کمتر از ۲۰ درصد فعالیت آنزیم را کاهش داد. اثر غلظت های مختلف سوبسترای اگزالات پتاسیم در فعالیت آنزیم نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم در محدوده ۰/۲۵ تا یک میلی مولار اگزالات پتاسیم دیده می شود و فعالیت آنزیم در غلظت های بالاتر و پایین تر از محدوده فوق کاهش می یابد.

اثر دترجنت ها در فعالیت آنزیم اگزالات اکسیداز نشان داد که دترجنت های غیرقطبی تریتون x-100 و توین بیست و دترجنت های زویتریونی چپس و زویتریجت ۱۴-۳ در دمای اتاق تأثیر محسوسی در فعالیت آنزیم ندارد. در حالتی که محلول آنزیم و دترجنت های فوق دقایقی در آب جوش یا دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد، فعالیت آنزیم متوقف گردید. افزون بر این نتایج تأثیر غلظت های مختلف اووره در آنزیم نشان داد که اگزالات اکسیداز در حضور غلظت ۲ مولار اووره برای

بخش کمتری از فعالیت اگزالات اکسیدازی را به خود اختصاص می‌دهد و نقطه ایزوالکتریک آن معادل ۶-۶/۲ تخمین زده می‌شود، ظاهراً گزارشی در دست نیست. استفاده از روش کروماتوفوکوسینگ برای یافتن این ایزوآنزیم‌ها در حالت طبیعی و مقایسه نتایج آن با روش ایزوالکتریک فوکوسینگ در مطالعه دیگر دیده نمی‌شود.

در این مطالعه همچنین معلوم گردید که آنزیم اگزالات اکسیداز مقاومت قابل توجهی در برابر اوره و انواعی از دترجنت‌های غیرقطبی و زوتریونی دارد. Zhang و همکاران (۳۰) نیز نشان دادند که اگزالات اکسیداز جو مقاومت خوبی در مقابل سدیم دودسیل سولفات و اتانل دارد. به همین خاطر آنزیم می‌تواند شرایط بافر نمونه SDS-PAGE غیراحیایی در حرارت‌های پایین‌تر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد را تحمل نماید و رنگ‌آمیزی اختصاصی آن در ژل امکان‌پذیر است. وجود چنین خصوصیتی از مزیت‌های قابل توجه برای استخراج و کاربرد این آنزیم در صنعت و پزشکی است. امروزه شرکت‌های سازنده کیت‌های سنجش اگزالات، روش‌های مختلفی با استفاده از آنزیم اگزالات اکسیداز جو برای انجام این کار طراحی نموده‌اند یا در حال طراحی آن هستند (۱۹، ۳۵-۳۱). این آنزیم به صورت نیمه‌خالص توسط شرکت‌های تجاری همچون شرکت سیگما باهزینه قابل توجه به فروش می‌رسد. با اطلاعاتی که از پژوهش حاضر در خصوص تخلیص و تعیین خصوصیات این آنزیم از ریشه جو به دست آمده، امکان تخلیص آن در مقیاس کم یا زیاد فراهم شده است. در ادامه پژوهش سعی بر آن است تا شکل خالص شده آنزیم به همراه آنزیم پراکسیداز که قبلاً تخلیص شده است (۳۶)، در طراحی کیت اندازه‌گیری اگزالات ادرار مورد استفاده قرار گیرد.

شکل ۱) داشت. اگرچه وزن واحدهای آنزیمی در این مطالعه، با سایر مطالعات هم‌خوانی دارند، ولی وزن تخمین زده شده برای آنزیم کامل با نتایج بعضی مطالعات مشابه و بعضی دیگر متفاوت است (۲۷-۲۵). بدین لحاظ به نظر می‌رسد آنزیم خالص ساختمانی ۵ واحدی دارد. باید توجه داشت که در SDS-PAGE با تعیین وزن زیرواحدها و پروتئین کامل، در بسیاری از حالات نمی‌توان به تعداد زیرواحدها پی برد. این موضوع از دلایل عمده گزارش‌های متفاوت مبنی بر ۵ یا ۶ واحدی بودن آنزیم اگزالات اکسیداز است.

در بررسی فعالیت آنزیم در ژل مشخص گردید که شکل تک‌واحدی آنزیم هیچ‌گونه فعالیتی ندارد. این نتایج نشان داد که برهم خوردن ساختمان چهارم و شکستن پیوندی دی‌سولفیدی که در طول SDS-PAGE رخ می‌دهد، به جداشدن زیرواحدها و متوقف شدن فعالیت آنزیم می‌انجامد. Kotsira و Clonis (۲۸) نشان داده‌اند که آنزیم اگزالات اکسیداز ریشه جو ۸۳ درصد فعالیت خود را پس از ۵ دقیقه در محلول یک میلی‌مولار مرکاپتواتانل از دست می‌دهد. آن‌ها معتقدند که ساختمان چهارم و فعالیت آنزیم وابسته به پیوندهای دوسولفیدی بین اسیدهای آمینه سیستئین است. این پیوندها در طول SDS-PAGE شکسته می‌شوند.

در این تحقیق مشخص گردید که در ریشه جو حداقل دو ایزوآنزیم اگزالات اکسیداز وجود دارد. یکی از این دو آنزیم که دارای نقطه ایزوالکتریک ۶/۸ است، از نظر غلظت و فعالیت، میزان بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد. Requena و Bornemann در سال ۱۹۹۹ نقطه ایزوالکتریک اگزالات اکسیداز جو را معادل ۶/۹ گزارش نمودند (۲۹). در مورد ایزوآنزیم دیگر که

## نتیجه گیری:

آنزیم در برابر انواعی از عوامل واسرشته کننده تعیین شد.

در مطالعات بعدی بر آن است که شکل خالص آنزیم در

طراحی کیت اندازه گیری اگزالات مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعه حاضر روشی نسبتاً ساده برای تخلیص آنزیم

اگزالات اکسیداز از جوانه جو طراحی گردید و مقاومت

## منابع

1. Dunwell J, Cupins M. A new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1998; 15:1-32.
2. Dunwell JM, Khuri S, Gane PJ. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol Molecul Biol Reviews* 2000; 64:153-79.
3. Dumas B, Freyssinet G, Pallett KE. Tissue specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiol* 1995; 107:1091-96.
4. Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, 2002, 3(3): 135-144.
5. Oxalate oxidase. Available at: <http://www.Swiss-port.com> .
6. Oxalate oxidase. Available at: <http://www.TrEMBL.com> .
7. Zaitsev GM, Tsitko IV, Rainey FA, Trotsenko YA, Uotila JS, Stackebrandt E, et al. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998; 48:151-163.
8. Hiatt W R, March JB. Oxalic acid removal in beer production. U.S. Patent 1987; 4: 652, 452.
9. Haas GJ, Fleischman AI. The rapid enzymatic determination of oxalate in wort and beer. *J Agric Food Chem* 1961; 9:451-452.
10. Purdy LH. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 1979; 69:875-880.
11. Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE, Lay V, Ray J, Watson H, et al. Introduction of genes for oxalate degrading enzymes into plants as a potential means of providing tolerance to *Sclerotinia*. *IOBC Wprs Bull.* 1995; 18:34-38.



12. Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE, Lay V, Ray J, Schmitt M, et al. Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica* 1995; 85:169-172.
13. Kyriazakis I, Anderson DH, Duncan AJ. Conditioned flavor aversions in sheep: the relationship between the dose rate of a secondary plant compound and the acquisition and persistence of aversions. *Br J Nut* 1998; 79:55-62.
14. Hesse A, Bongartz D, Heynck H, Berg W. Measurement of urinary oxalic acid: a comparison of five methods. *Clin Biochem* 1996; 29:467-472.
15. Honow R, Bongartz D, Hesse A. An improved HPLC-enzyme-reactor method for the determination of oxalic acid in complex matrices. *Clin Chem Acta* 1997; 261:131-139.
16. Ruml LA, Pearle MS, Pak CY. Medical therapy: calcium oxalate urolithiasis. *Urol Clin North Am* 1997; 24:117-133.
17. Raghavan KG, Tarachand U. Degradation of oxalate in rats implanted with immobilized oxalate oxidase. *FEBS Lett* 1998; 195:101-105.
18. Kemper MJ, Nolkemper D, Rogiers X, Timmermann K, Sturm E, Malago M, et al. Perimptive liver transplantation in primary hyperoxaluria type I: timing and preliminary results. *J Nephrol* 1998; 11:46-48.
19. Skinner E, Waterson M. Improvement of a standard MIRA method for urinary oxalate by elimination of reagent carry-over. *Annal Clin Biochem* 2001; 38: 54-56
20. Laker MF, Hofmann AF, Meeuse JD. Spectrophotometric determination of oxalate with oxalate oxidase prepared from moss. *Clin Chem* 1980; 26(7): 827-830.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
22. Lamemmlli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- ۲۳ - مصطفایی علی. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. چاپ دوم، تهران: انتشارات یادآوران، سال ۱۳۸۲، صفحات ۶۰-۳۵.
24. Allen RC, Budowle B, Lack PM, Graves G. *Electrophoresis*. 1<sup>st</sup> ed. Weinheim: VCH ; 1986, PP. 462-473.
25. Chiriboga J. Some properties of an oxalic oxidase purified from barley seedlings. *Biochem Biophys Res Commun* 1963; 11(4): 277-282.
26. Chiriboga J. Purification and properties of oxalic oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1966; 116: 516 -523.

27. Svensson H. Isoelectric fractionation, analysis, and characterisation of ampholytes in natural pH gradients: I- The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. Acta Chem Scand 1961; 15:325-341.
28. Kotsira VP, Clonis YD. Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties. Arch Biochem Biophys 1997; 340:239-249.
29. Requena L, Bornemann S. Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. Biochem J 1999; 343:185-190.
30. Zhang,Z, Collinge DB, Thordahl-Christensen H. Germin-like oxalate oxidase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant J 1995; 8:139-145.
31. Tsukagoshi K, Kimura T, Fuji T, Nakajima R. Improvement of capillary electrophoresis- chemiluminescence detection system for using a polyacrylamide-coated capillary. Anal Sci, 2001; 17(2): 345-347.
32. Milardovic S, Grabaric Z, Grabaric B.S. Sensitive amperometric oxalate biosensor for food analysis. Food Technol Biotechnol 2000; 38:203-210.
33. Pundir CS, Kuchhal NK, Bhargava AK. Determination of urinary oxalate with oxalate oxidase and peroxidase immobilized on to glass beads. Biotechnol Appl Biochem 1998; 27:103-107.
34. Langman LJ, Allen LC. An enzymatic method for oxalate automated using the Hitachi 911 analyzer. Clin Biochem 1998; 31:429-432.
35. Gaulier JM, Lardet G, Cochat P, Vallon JJ. A serum oxalate assay using chemiluminescence's detection. J Neph 1998; 11(S1): 73-74.

۳۶- مصطفایی علی، راهی حمید و ناصری منصور. خالص سازی پراکسیداز از ترب سیاه. فصلنامه علمی پژوهشی بهبود.

سال ۱۳۷۹، جلد ۴، صفحات ۱۶-۸.