

۱۲۳۹.



دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

عنوان:

مطالعه اثر اسمولیت های مختلف بر غیرفعال شدن حرارتی آنزیم گلوتامات
دهیدروژناز

استادان راهنما:

دکتر سیروس قبادی

دکتر محمد حسین میرمؤمنی

نگارش:

الهه علی زاده

۱۳۸۸ / ۴ / ۲۲

مجموعه اطلاعات مرکز
کتابخانه

مهرماه ۱۳۸۷

۱۲۶۳۹۰

کلیه حقوق مادی مرتبط بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.



دانشگاه رازی
دانشکده علوم
گروه بیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی بیوشیمی

تحت عنوان :

مطالعه اثر اسمولیت های مختلف بر غیرفعال شدن حرارتی آنزیم گلوتامات
دهیدروژناز

نگارش:

الهه علی زاده

در تاریخ ۱۳۸۷/۰۷/۰۸ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسیده است.

- | | | | |
|---------------------|-------------------------|------------------------|-------|
| ۱- استاد راهنما | دکتر سیروس قبادی | با مرتبه علمی استادیار | امضاء |
| ۲- استاد راهنما | دکتر محمد حسین میرمومنی | با مرتبه علمی استادیار | امضاء |
| ۳- استاد داور خارجی | دکتر شهرام رنجبر | با مرتبه علمی استادیار | امضاء |
| ۴- استاد داور داخلی | دکتر اسد ویسی رایگانی | با مرتبه علمی استادیار | امضاء |

تاریخ
از طرف

با سپاسگزاری از:

اساتید دانشمند و ارجمندم آقایان **دکتر سیروس قبادی** و **دکتر محمدحسین میرمؤمنی** که راهنمایی این اینجانب را در طول این دوره و پایان نامه به عهده داشته‌اند و با راهنمایی‌های بی‌درریغ خود مرا در پیشبرد این پایان نامه یاری نموده‌اند.

استاد گرامی آقای **دکتر شهرام رنجبر** که به عنوان داور داخلی جلسه دفاعیه حضور داشتند. استاد ارجمند آقای **دکتر اسد ویسی رایگانی** که قبول زحمت فرموده و با سمت داور خارجی در جلسه دفاعیه شرکت کردند.

استاد عزیزم خانم **دکتر سهیلا کاشانیان** که افتخار شاگردی ایشان را در بسیاری از دروس تئوری داشته‌ام.

خانم مختاری منشی محترمه گروه، که همواره یاری‌گر دانشجویان کارشناسی ارشد از جمله بنده بوده‌اند.

کارکنان زحمتکش گروه آقایان **چغاکبودی، فرامرزی، موقوفه‌ای**
همسر مهربان و فداکارم که صبوری و راهنمایی‌هایش دلگرمی من بوده و هست. مرحوم **پدر** بزرگوارم،
مادر مهربان و پاکدامنم، **خواهر** دلسوز و **برادر** عزیزم که همواره پشتیبان من بوده‌اند.

و

با تشکر از تمامی **دوستانم** در آزمایشگاه‌های مختلف به خصوص آزمایشگاه بیوشیمی که در انجام این پایان نامه مرا یاری نموده‌اند.

تقدیم به:

همسر مهربانم و خانواده‌هایمان که

بزرگترین سرمایه و پشتیبان ما بوده

و هستند.

چکیده

پایدارسازی آنزیم‌ها برای استفاده از آنها در صنعت و بیوتکنولوژی ضروری است. پروتئین‌ها به سبب تعادل ظریف بین نیروهای پایدارکننده و ناپایدارکننده از حساسیت بالایی برخوردار هستند. از جمله راهکارهای افزایش پایداری آنزیم‌ها در محیط آبی، استفاده از مواد افزودنی است که به عنوان یکی از راه‌های مقابله با شرایط نامساعد محیطی (مانند خشکی و حرارت و...) در طبیعت نیز به کار گرفته می‌شوند. غیرفعال شدن حرارتی آنزیم گلوتامات دهیدروژناز کبد گاو (GDH) در اثر اعمال حرارت در بازه مشخصی از دما توسط اسپکتروفتومتری فرابنفش مریی مورد مطالعه قرار گرفته است. تمام آزمایش‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۶ انجام شد. اثرات اسمولیت‌ها شامل سوکروز، سوربیتول و پرولین (۱/۵ - ۰/۱ مولار)، رافینوز (۲۵/۰ - ۰/۰۵ مولار) و آرژنین (۸/۰ - ۰/۱ مولار)، بر فعالیت باقیمانده آنزیم اندازه‌گیری شده است. اثر پایدارکنندگی قوی برای سوکروز، سوربیتول، پرولین و رافینوز در یک روند وابسته به غلظت در حفظ فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز و جلوگیری از غیرفعال شدن حرارتی آن مشاهده شد. آنالیز آرینیوس غیرفعال شدن حرارتی نشان داد این اسمولیت‌ها (به جز آرژنین) انرژی فعال‌سازی غیرطبیعی شدن گرمایی (E_a) آنزیم را افزایش می‌دهند. همچنین به استثناء آرژنین دمای نقطه میانی بازشدگی آنزیم (T_m) در حضور این اسمولیت‌ها افزایش می‌یابد. نتایج دامیاسیون GDH با اعمال حرارت در غیاب و حضور این اسمولیت‌ها نشان داد که میزان دامیاسیون در حضور همه این اسمولیت‌ها کاهش می‌یابد. در بخش دیگر این تحقیق، اثر اسمولیت‌ها بر توده شدن آنزیم در اثر قرار گرفتن در معرض حرارت بررسی شده است. اثر بازدارندگی تجمع آنزیم گلوتامات دهیدروژناز، بر اثر اعمال حرارت، برای همه اسمولیت‌های مورد آزمایش، در یک روند وابسته به غلظت مشاهده شد. در مجموع نتایج نشان‌دهنده این است که این اسمولیت‌ها غیر از آرژنین در یک روند وابسته به غلظت سرعت غیرفعال شدن GDH را کاهش و دمای نقطه میانی بازشدگی آنزیم را افزایش می‌دهند. آرژنین نیز در یک روند متأثر از غلظت، هرچند به مقدار کم، از پایداری آنزیم می‌کاهد. همه اسمولیت‌های مورد آزمایش در کاهش دامیاسیون آنزیم در اثر حرارت و ممانعت از تجمع آنزیم در دمای بالا در روند وابسته به غلظت نقش دارند.

لغات کلیدی: آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GDH)، اسمولیت، غیرفعال شدن حرارتی، T_m ، تجمع (توده شدن)، دامیاسیون

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱- پایداری پروتئین‌ها
۴	۱-۱-۱- پایداری ترمودینامیکی
۴	۲-۱-۱- پایداری سینتیکی
۵	۲- اهمیت مطالعه پایداری پروتئین‌ها
۶	۳-۱- مکانیسم های غیرطبیعی شدن برگشت ناپذیر
۷	۴-۱- راه‌های افزایش پایداری حالت طبیعی پروتئین‌ها
۹	۵-۱- روش‌های پایدارسازی پروتئین‌ها
۱۱	۶-۱- اسمولیت‌ها
۱۲	۱-۶-۱- انواع اسمولیت‌ها
۱۲	۲-۶-۱- نقش اسمولیت‌ها در تاخوردگی پروتئین‌ها
۱۳	۳-۶-۱- اثر اسمولیت‌ها بر پروتئین‌های غیر طبیعی شده
۱۴	۴-۶-۱- تقسیم بندی اسمولیت‌ها بر اساس مکانیسم عمل
۱۴	۵-۶-۱- مکانیسم مولکولی اثر اسمولیت‌ها
۱۵	۱-۵-۶-۱- آبپوشی پروتئین‌ها
۱۶	۲-۵-۶-۱- میان‌کنش‌های ترجیحی
۱۸	۳-۵-۶-۱- کشش سطحی
۱۹	۴-۵-۶-۱- اثرات حلال دوستی/حلال‌گریزی
۲۱	۵-۵-۶-۱- حجم محروم شده یا دورشدگی فضایی
۲۳	۶-۵-۶-۱- تغییر انرژی آزاد سطحی
۲۳	۷-۱- نقش افزودنی‌ها در پایداری پروتئین‌ها
۲۴	۸-۱- آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GDH)
۲۶	۹-۱- گلوتامات دهیدروژناز حیوانات
۲۷	۱۰-۱- نقش متابولیکی آنزیم GDH
۲۷	۱۱-۱- اطلاعات ساختمانی و ترکیب اسیدهای آمینه آنزیم
۲۸	۱-۱۱-۱- ساختمان سوم
۳۰	۱۲-۱- پایداری آنزیم
۳۱	۱۳-۱- غیرطبیعی شدن، تفکیک زیر واحدها در آنزیم
۳۲	۱۴-۱- تجمع پروتئین
۳۳	۱۵-۱- ویژگی سوبسترای
۳۳	۱۶-۱- مکانیسم شیمیایی واکنش آنزیم

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۳۴	۱۷-۱- مکانیسم سینتیکی آنزیم
۳۵	۱۸-۱- اثرگذارنده‌ها
۳۵	۱۹-۱- بازدارنده‌های آنزیم
۳۶	۲۰-۱- کاربرد آنزیم GDH در تشخیص بالینی
۳۶	۲۱-۱- مطالعات انجام شده در رابطه با موضوع
۳۸	۲۲-۱- اهمیت و هدف تحقیق
۳۹	فصل دوم : مواد و روش‌ها
۴۰	۱-۲- فهرست مواد مورد استفاده
۴۰	۲-۲- فهرست دستگاه‌های مورد استفاده
۴۱	۳-۲- تهیه محلول‌های مورد استفاده
۴۱	۱-۳-۲- تهیه بافر فسفات سدیم
۴۲	۲-۳-۲- تهیه محلول کوکتل آنزیمی
۴۲	۳-۳-۲- تهیه ۲۵ میلی لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار با pH ۹
۴۳	۴-۳-۲- تهیه محلول NADH ۰/۱ میلی مولار
۴۳	۴-۲- طرز تهیه اسمولیت‌ها
۴۴	۱-۴-۲- طرز تهیه ذخیره هر یک از اسمولیت‌ها
۴۴	۵-۲- تهیه معرف نسلر جهت اندازه گیری آمونیاک (دآمیداسیون)
۴۴	۱-۵-۲- تهیه معرف نسلر
۴۵	۲-۵-۲- محلول تارتارات پتاسیم
۴۵	۳-۵-۲- روش کار
۴۵	۴-۵-۲- تهیه محلول استاندارد آمونیوم (NH_4^+) با استفاده از کلرور آمونیوم
۴۵	۶-۲- تهیه محلول ذخیره آنزیمی در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۶
۴۶	۷-۲- سنجش فعالیت آنزیمی
۴۷	۸-۲- تعیین غلظت بهینه آنزیم جهت سنجش فعالیت
۴۷	۹-۲- مطالعات غیر فعال شدن گرمایی
۴۷	۱-۹-۲- روش کار
۴۸	۱۰-۲- بررسی پایداری حرارتی آنزیم
۴۸	۱-۱۰-۲- روش کار
۴۸	۱۱-۲- بررسی تجمع یا توده شدن آنزیم و اثر غلظت‌های مختلف اسمولیت‌های سوکروز، سوربیتول و پرولین (۱/۵ - ۰/۱ مولار)، رافینوز (۰/۲۵ - ۰/۰۵ مولار) و آرژنین (۰/۸ - ۰/۱ مولار)

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۴۹	۱۲-۲- دامیداسیون آنزیم
۵۰	فصل سوم: نتایج
۵۱	۱-۳- تعیین غلظت بهینه آنزیم جهت سنجش فعالیت
۵۲	۲-۳- اثر دما بر پایداری سینبیتیکی آنزیم (غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم)
۵۳	۱-۲-۳- درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز پس از قرار گرفتن در دماهای مختلف در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف سوکروز
۵۸	۲-۲-۳- درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز پس از قرار گرفتن در دماهای مختلف در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول
۶۲	۳-۲-۳- درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز پس از قرار گرفتن در دماهای مختلف در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف رافینوز
۶۶	۴-۲-۳- درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز پس از قرار گرفتن در دماهای مختلف در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف آرژنین
۷۰	۵-۲-۳- درصد فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز پس از قرار گرفتن در دماهای مختلف در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف پرولین
۷۴	۳-۳- اثر اسمولیت‌های مختلف در غلظت‌های مشابه بر پایداری آنزیم
۸۹	۴-۳- تعیین ثابت سرعت غیرفعال شدن حرارتی آنزیم (k_{in}) و انرژی فعال‌سازی (E_a) فرآیند غیرفعال شدن در غیاب اسمولیت‌ها
۹۲	۱-۴-۳- تعیین ثابت سرعت غیرفعال شدن حرارتی آنزیم (k_{in}) و انرژی فعال‌سازی (E_a) فرآیند غیرفعال شدن در غیاب و حضور اسمولیت‌ها
۹۷	۵-۳- پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم
۱۰۳	۶-۳- دمای انتقال حرارتی یا T_m آنزیم گلوتامات دهیدروژناز
۱۰۸	۷-۳- تجمع
۱۱۱	۸-۳- دامیداسیون
۱۱۲	فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری
۱۲۹	فصل پنجم: منابع

فهرست شکل‌ها

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۸	شکل ۱-۱. دیاگرام انرژی پایداری ترمودینامیکی
۱۷	شکل ۱-۲. شمای میان‌کنش‌های ترجیحی
۲۲	شکل ۱-۳. اثر حجم محروم شده
۵۲	شکل ۳-۱. نمودار تغییرات سرعت در برابر غلظت آنزیم
۵۳	شکل ۳-۲. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب اسمولیت‌ها
۵۴	شکل ۳-۳. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 25°C
۵۵	شکل ۳-۴. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 35°C
۵۵	شکل ۳-۵. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 40°C
۵۶	شکل ۳-۶. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 45°C
۵۶	شکل ۳-۷. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 48°C
۵۷	شکل ۳-۸. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 52°C
۵۷	شکل ۳-۹. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوکروز در دمای 55°C
۵۸	شکل ۳-۱۰. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 25°C
۵۹	شکل ۳-۱۱. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 35°C
۵۹	شکل ۳-۱۲. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 40°C
۶۰	شکل ۳-۱۳. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 45°C
۶۰	شکل ۳-۱۴. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 48°C
۶۱	شکل ۳-۱۵. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 52°C
۶۱	شکل ۳-۱۶. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف سوربیتول در دمای 55°C

عنوان

صفحه

- شکل ۳-۳۴. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های مختلف پرولین در دمای 45°C ۷۲
- شکل ۳-۳۵. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های مختلف پرولین در دمای 48°C ۷۲
- شکل ۳-۳۶. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های مختلف پرولین در دمای 52°C ۷۳
- شکل ۳-۳۷. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های مختلف پرولین در دمای 55°C ۷۳
- شکل ۳-۳۸. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین ۷۴
- شکل ۳-۳۹. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین، در دمای 25°C ۷۵
- شکل ۳-۴۰. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین، در دمای 35°C ۷۵
- شکل ۳-۴۱. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین، در دمای 40°C ۷۶
- شکل ۳-۴۲. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین، در دمای 45°C ۷۶
- شکل ۳-۴۳. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین، در دمای 52°C ۷۷
- شکل ۳-۴۴. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های $1/5\text{ M}$ سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/25\text{ M}$ رافینوز $0/8\text{ M}$ آرژنین، در دمای 55°C ۷۷
- شکل ۳-۴۵. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های 1 M سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/2\text{ M}$ رافینوز $0/6\text{ M}$ آرژنین، در دمای 25°C ۷۸
- شکل ۳-۴۶. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت های 1 M سوکروز، سوربیتول و پرولین، $0/2\text{ M}$ رافینوز $0/6\text{ M}$ آرژنین، در دمای 35°C ۷۹

- شکل ۳-۴۷. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۲ M رافینوز ۰/۶ M آرژنین، دردمای ۴۰ °C
- شکل ۳-۴۸. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۲ M رافینوز ۰/۶ M آرژنین، دردمای ۴۵ °C
- شکل ۳-۴۹. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۲ M رافینوز ۰/۶ M آرژنین، دردمای ۴۸ °C
- شکل ۳-۵۰. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۲ M رافینوز ۰/۶ M آرژنین، دردمای ۵۲ °C
- شکل ۳-۵۱. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۱ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۲ M رافینوز ۰/۶ M آرژنین، دردمای ۵۵ °C
- شکل ۳-۵۲. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۰/۵ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۱ M رافینوز ۰/۴ M آرژنین، دردمای ۲۵ °C
- شکل ۳-۵۳. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۰/۵ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۱ M رافینوز ۰/۴ M آرژنین، دردمای ۳۵ °C
- شکل ۳-۵۴. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۰/۵ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۱ M رافینوز ۰/۴ M آرژنین، دردمای ۴۰ °C
- شکل ۳-۵۵. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۰/۵ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۱ M رافینوز ۰/۴ M آرژنین، دردمای ۴۵ °C
- شکل ۳-۵۶. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۰/۵ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۱ M رافینوز ۰/۴ M آرژنین، دردمای ۴۸ °C
- شکل ۳-۵۷. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های ۰/۵ M سوکروز ، سوربیتول و پرولین، ۰/۱ M رافینوز ۰/۴ M آرژنین، دردمای

- شکل ۳-۵۸. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/5 M$ سوکروز ، سوربیتول و پرولین ، $0/1 M$ رافینوز $0/4 M$ آرژنین، دردمای $55^{\circ}C$
- شکل ۳-۵۹. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز، دردمای $25^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۰. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز، دردمای $35^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۱. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول ، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز، دردمای $40^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۲. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول ، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز، دردمای $45^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۳. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول ، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز، دردمای $48^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۴. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول ، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز، دردمای $52^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۵. نمودار فعالیت باقیمانده آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب و در حضور غلظت‌های $0/1 M$ سوکروز ، سوربیتول ، پرولین و آرژنین $0/05 M$ رافینوز ، دردمای $55^{\circ}C$
- شکل ۳-۶۶. نمودار آرینیوس برای غیرفعال شدن حرارتی آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در غیاب اسمولیت‌ها.
- شکل ۳-۶۷. بخش اول نمودار شکل (۳-۶۶).
- شکل ۳-۶۸. بخش دوم نمودار شکل (۳-۶۶).
- شکل ۳-۶۹. اثر غلظت‌های مختلف سوکروز بر انرژی فعال سازی فرآیند غیر فعال شدن حرارتی آنزیم.

فهرست جدول‌ها

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۲۹	جدول ۱-۱- توالی اسیدهای آمینه آنزیم گلوتامات دهیدروژناز کبد گاو
۴۲	جدول ۱-۲- غلظت مواد موجود در کوکتل آنزیمی
۵۱	جدول ۱-۳- محدوده غلظتی نمودار سرعت واکنش آنزیم در برابر غلظت آنزیم
۹۱	جدول ۲-۳- معادله خط بخشهای اول و دوم نمودار شکل (۳-۶۶).
۹۲	جدول ۳-۳- مقایسه شیب های نمودار آرینیوس غیر فعال شدن حرارتی آنزیم در غیاب و در حضور غلظت های مختلف سوکروز.
۹۳	جدول ۴-۳- مقایسه شیب های نمودار آرینیوس غیر فعال شدن حرارتی آنزیم در غیاب و در حضور غلظت های مختلف سوربیتول.
۹۴	جدول ۵-۳- مقایسه شیب های نمودار آرینیوس غیر فعال شدن حرارتی آنزیم در غیاب و در حضور غلظت های مختلف پرولین.
۹۵	جدول ۶-۳- مقایسه شیب های نمودار آرینیوس غیر فعال شدن حرارتی آنزیم در غیاب و در حضور غلظت های مختلف رافینوز.
۹۶	جدول ۷-۳- مقایسه شیب های نمودار آرینیوس غیر فعال شدن حرارتی آنزیم در غیاب و در حضور غلظت های مختلف آرژنین.
۹۸	جدول ۳-۸- اثر سوکروز بر پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم.
۹۹	جدول ۳-۹- اثر سوربیتول بر پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم.
۱۰۰	جدول ۳-۹- اثر رافینوز بر پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم.
۱۰۱	جدول ۳-۹- اثر آرژنین بر پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم.
۱۰۲	جدول ۳-۹- اثر پرولین بر پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم.
۱۰۷	جدول ۳-۱۳- مقایسه T_m آنزیم در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف اسمولیت‌ها.
۱۱۴	جدول ۳-۱۶- اثر اسمولیت‌ها بر غلظت آمونیاک آزاد شده حین دامیداسیون، پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در 55°C .
۱۱۵	جدول ۳-۱۷- اثر اسمولیت‌ها بر غلظت آمونیاک آزاد شده حین دامیداسیون، پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در 65°C .

فصل اول

مقدمه

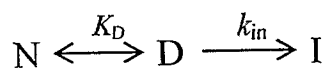
۱-۱ پایداری پروتئین‌ها

پروتئین‌ها متنوع‌ترین ماکرومولکول‌ها در سیستم‌های زنده هستند که الزاماً در تمام فرآیندهای حیاتی نقش مهمی ایفا می‌نمایند. آنها به عنوان کاتالیزور عمل می‌کنند، مولکول‌هایی مانند اکسیژن را انتقال داده و ذخیره می‌کنند، باعث حرکت می‌شوند، پیام عصبی را انتقال می‌دهند و رشد و تمایز را تنظیم می‌کنند (Berg, et al. 2008). پروتئین‌ها طی فرآیند ترجمه، از اتصال اسیدهای آمینه به یکدیگر به صورت زنجیره‌های پلی‌پپتیدی خطی، تشکیل شده و سپس طی فرآیند تاخوردگی به بنای فضایی نهایی خود تامی‌خورند (Richardson, 1981). واژه حالت طبیعی پروتئین به‌طور وسیعی توسط بیوشیمی‌دان‌ها به کار می‌رود اما به ندرت تعریف دقیقی از آن ذکر شده است. در حال حاضر حالت طبیعی مطابق با پر جمعیت‌ترین حالت ساختاری تحت شرایط نزدیک به شرایط فیزیولوژیک در نظر گرفته می‌شود که پروتئین می‌تواند فعالیت بیولوژیک خود را نشان دهد. به عبارت دیگر حالت طبیعی پایدارترین حالت در دسترس از لحاظ ترمودینامیکی برای پروتئین می‌باشد. به هر حال باید توجه شود که در چندین مورد معنی حالت طبیعی مبهم است یا شکلی است که به نظر نمی‌رسد پایدارترین حالت از لحاظ ترمودینامیک باشد (Pace, et al. 1997). میان‌کنش‌های پیچیده بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه، بنای فضایی سه بعدی یک پروتئین و فعالیت آن را شکل می‌دهند. (تقریباً همه) پروتئین‌ها فقط در بنای فضایی طبیعی خود قادر به ایفای نقش می‌باشند، با این حال در شرایط مختلفی بنای فضایی طبیعی پروتئین‌ها ممکن است دستخوش تغییر شده و منجر به غیر فعال شدن آنها شود. در میان پروتئین‌ها، آنزیم‌ها از این جهت که با کاتالیز واکنش‌های شیمیایی موجب سرعت بخشیدن به فرآیندهای بیوشیمیایی می‌شوند و از طرفی بسیاری از آنزیم‌ها در محیط‌های خارج سلولی و به منظورهای مختلفی از قبیل مصارف صنعتی و مواد غذایی کاربرد دارند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. از اینرو مطالعه مکانیسم پایداری آنها و نیز شناسایی روش‌های پایدارکنندگی آنزیم‌ها و پروتئین‌ها یکی از موضوعات بحث برانگیز در بیوشیمی می‌باشد (Richardson, 1981). اصطلاح پایداری، به مقاومت پروتئین در مواجهه با شرایط مختلف تهدیدکننده کلیت مولکولی و عملکرد بیولوژیکی آن از قبیل دماهای بالا، pH و غیره اطلاق می‌شود (Dill, 1990; Imoto, 1997 & Illanes, 1999). در واقع پروتئین‌ها

پایداری مرزی^۱ از خود نشان می‌دهند که این پایداری مرزی به دلیل میان‌کنش‌های درون مولکولی ضعیف و تعادل حساس و شکننده بین میان‌کنش‌های پایدارکننده و ناپایدارکننده می‌باشد (Jaenicke, 1999 & Imoto, 1997).

پایدارسازی پروتئین در حقیقت، افزایش سهم میان‌کنش‌های پایدارکننده و کاهش سهم میان‌کنش‌های ناپایدارکننده ساختار پروتئین می‌باشد. پایداری ساختاری پروتئین کروی به صورت تفاوت در انرژی آزاد بین ساختار طبیعی^۲ و باز شده^۳ پروتئین تحت شرایط فیزیولوژیک بیان می‌شود. پایداری ساختاری تقریباً همه ساختارهای طبیعی پروتئین‌های کروی بین ۵-۱۵ کیلوکالری بر مول (۶۳-۲۱ کیلوژول بر مول) می‌باشد. میانگین انرژی آزاد پایداری برای پروتئین‌های کروی با اندازه متوسط حدود ۵۰ کیلوژول بر مول می‌باشد. همین انرژی کم، باعث می‌شود حالت طبیعی به طور مرزی پایدارتر از حالت غیرطبیعی باشد. دلیل آن هنوز کاملاً روشن نیست، ولی ممکن است به دلیل افزایش بازده کاتالیتیکی یا عملکرد پروتئین باشد (Pace, 1990 & Pfeil, 1998). در همین رابطه پروتئین‌های مقاوم در برابر شرایط حدی (گرما، pH و...) تفاوت زیادی با هم‌تاهای مزوفیل خود نشان نمی‌دهند (Jaenicke, et al. 2000) و این پایداری ذاتی احتمالاً به دلیل تقویت یا افزایش تعداد میان‌کنش‌های موجود از طریق جابه‌جایی یک یا چند باقی‌مانده اسید آمینه‌ای در کل پروتئین یا یک مکان کلیدی در ساختار پروتئین می‌باشد (Janecek, 1993).

پایداری پروتئین‌ها از دو جنبه مورد بحث قرار می‌گیرد (۱) پایداری ترمودینامیکی (۲) پایداری سینتیکی. دونوع پایداری پروتئین (ترمودینامیکی و دراز مدت یا سینتیکی) از دیدگاه کاربردی مورد توجه‌اند و آزمایش‌های متعددی برای مطالعه آنها انجام می‌شود.



(N) حالت طبیعی پروتئین، (D) حالت غیرطبیعی پروتئین و (I) حالت غیرطبیعی شده و غیرفعال آن می‌باشد، K_D ثابت تعادل و k_{in} ثابت سرعت غیرفعال شدن پروتئین می‌باشد (Aymard, et al. 2000).

^۱ Marginal stability

^۲ Native

^۳ Unfolded

پایداری ترمودینامیکی به بررسی مقاومت بنای فضایی طبیعی پروتئین در برابر غیرطبیعی شدن می‌پردازد در حالی که پایداری سینتیکی، مقاومت پروتئین را در برابر غیر فعال شدن برگشت ناپذیر (مقاومت فعالیت بیولوژیکی پروتئین)، مورد بررسی قرار می‌دهد (Ciaran, 1995).

۱-۱-۱ پایداری ترمودینامیکی

تمایل پروتئین برای ماندن در حالت N و تبدیل نشدن به فرم D پایداری ترمودینامیکی نامیده می‌شود که با توجه به رابطه (۱-۱) می‌توان برای آن ثابت تعادل تعریف کرد و با استفاده از آن ΔG_D را به دست آورد (رابطه ۱-۲)

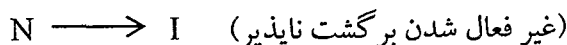
$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad (1-1)$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_D \quad (2-1)$$

در این نوع پایداری اگر پروتئین در اثر هر عاملی (مثل حرارت) به حالت D تبدیل شود، بعد از رفع استرس دوباره به فرم اولیه خود، یعنی N باز می‌گردد. پس غیرطبیعی شدن برگشت پذیر شاخصی برای پایداری ترمودینامیکی می‌باشد. معمولاً هرچه ΔG_D بزرگتر باشد آنزیم پایدارتر است (Vieille, et al. 2001).

پایداری ترمودینامیکی به وسیله تکنیک‌های نوری از قبیل اسپکتروسکوپی UV-Vis، فلورسانس و اسپکتروپلاریمتری و یا الکتروفورز ژل با گرادیان اوره اندازه گیری می‌شود. این روش‌ها حساس به تغییرات بنای فضایی پروتئین‌ها بوده و غیر طبیعی شدن پروتئین مورد مطالعه را نشان می‌دهند (Ciaran, 1995).

۲-۱-۱ پایداری سینتیکی



در این نوع پایداری، مقاومت پروتئین در برابر غیرطبیعی شدن برگشت ناپذیر مورد توجه قرار می‌گیرد. می‌توان سرعت تبدیل N به I را در صورتی که از مکانیسم واکنش تک مولکولی تبعیت کند از طریق رابطه (۳-۱) به دست آورد:

$$V_{in} = - \frac{d[N]}{dt} = k_{in} [D] \quad (3-1)$$

در این رابطه V_{in} سرعت غیرفعال شدن پروتئین می‌باشد. بر خلاف غیرطبیعی شدن برگشت پذیر^۱ که اغلب یک انتقال همه یا هیچ^۲ یا دو حالتی^۳ می‌باشد، غیرفعال شدن برگشت ناپذیر^۴ یک روند چند مرحله‌ای است. این روند با باز شدگی قابل برگشت آغاز می‌شود که شاخص آن ثابت تعادل K_D است. پس از آن مرحله برگشت ناپذیر واقع می‌شود که ثابت سرعت k_{in} تعیین کننده آن می‌باشد (Vieille, et al. 2001).

پایداری سینتیکی به وسیله اندازه‌گیری پارامترهای مرتبط با عملکرد بیولوژیک از قبیل فعالیت کاتالیتیک یک آنزیم، توسط روش‌های مناسب تعیین می‌شود. مثلاً در تیمار حرارتی پروتئین، در فواصل زمانی مشخص مقداری از نمونه برداشته شده و فعالیت آن در شرایط بهینه اندازه‌گیری می‌شود و نمودار فعالیت متناسب با زمان ترسیم شده و بسیاری از اطلاعات مورد نیاز از روی آن به دست می‌آید (Ciaran, 1995).

نتایج مطالعات غیرطبیعی شدن شیمیایی و حرارتی پروتئین‌ها به نتایج نسبتاً شگفت‌انگیزی منتهی شده است و آن این که حالت تاخوردی اکثر پروتئین‌ها پایداری نسبتاً پایینی دارد که به‌طور ویژه در محدوده ۲۰-۶۰ kJ/mol، معادل انرژی تعداد کمی از پیوندهای هیدروژنی است. این مقدار کم، تعادل ظریف در ΔG کلی بین دو کمیت بزرگ انرژی‌تیک را منعکس می‌کند آنتالپی که تاخوردن را به دلیل برهمکنش‌های جدیدی که در حالت تاخوردی ایجاد شده مطلوب می‌نماید و آنتروپی که حالت باز شده را مطلوب می‌نماید (Pace, 1990).

۱-۲ اهمیت مطالعه پایداری پروتئین‌ها

بررسی پایداری پروتئین در شرایط *in vitro* و شناسایی عوامل مؤثر در پایداری پروتئین، در مهندسی پروتئین‌ها برای طراحی پروتئین‌های با حداکثر پایداری و نیز از نظر کاربرد پروتئین‌ها در صنعت که نیاز به پایداری این مولکول‌ها در شرایط مختلف دارد، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Ciaran, 1995).

پایدارسازی یکی از روش‌های معمول برای بهبود عملکرد پروتئین‌هاست (Imoto, 1997). چون فاکتورهای مختلفی از قبیل غلظت ماکرومولکول‌ها، pH، قدرت یونی، پتانسیل اکسیداسیون و احیاء و دما می‌تواند

^۱ Reversible

^۲ All-or-none

^۳ Two state

^۴ Irreversible