

فصل اول	۱۲
۱-مقدمه	۱۲
۱-۱-توصیف ترمودینامیکی تاخوردن پروتئین	۱۳
۱-۲-توصیف نیروهای غالب در تاخوردن پروتئین ها	۱۴
۱-۳-دگرگون سازی موجب از دست رفتن ساختمان طبیعی می شود	۱۶
۱-۴-نیرو های غیر کووالان منجر به تاخوردن پروتئین شده و در پایداری پروتئین ها شرکت می کنند	۱۷
۱-۵-پایدار سازی طبیعی توسط اسمولیت ها رخ می دهد	۱۷
۱-۶-ارتباط ترمودینامیکی بین ساختار، پایداری و عملکرد پروتئین	۱۸
۱-۷-پایداری پروتئین	۱۸
۱-۷-۱-پایداری ترمودینامیکی	۲۰
۱-۷-۲-پایداری سینتیکی	۲۰
۱-۸-تاخوردگی پروتئین ها و پایداری	۲۰
۱-۸-۱-پایداری حالت طبیعی	۲۰
۱-۸-۲-تعیین پایداری آرایش فضایی پروتئین	۲۱
۱-۹-دگرگون شدن پروتئین ها	۲۳
۱-۱۰-دگرگون سازی موجب از دست رفتن ساختار طبیعی می شود	۲۴
۱-۱۱-روش های دگرگون سازی پروتئین ها	۲۴
۱-۱۱-۱-دگرگون سازی حرارتی	۲۴
۱-۱۱-۲-دگرگون سازی توسط pH	۲۴
۱-۱۱-۳-دگرگون سازی توسط حلال های آلی	۲۴
۱-۱۱-۴-دگرگون سازی توسط اوره و گوانین هیدروکلراید	۲۵
۱-۱۱-۵-پاک کننده ها	۲۵

- ۱۲-۱- استفاده از دگرگون سازی در مطالعه پروتئین ها ۲۵
- ۱۳-۱- تعریف پروتئین ۲۶
- ۱-۱۳-۱ تعریف پروتئین های فیبری ۲۶
- ۱-۱۳-۲ تعریف پروتئین کروی ۲۶
- ۱-۱۳-۳ ساختارهای پروتئین ۲۶
- ۱-۱۳-۴ پروتئین های تک واحدی ۲۶
- ۱-۱۳-۵ پروتئین های اولیگومریک ۲۶
- ۱۴-۱- تعریف آنزیم ۲۷
- ۱۵-۱- روش های طیف سنجی برای ارزیابی ساختار و عملکرد پروتئین استفاده می شوند ۲۷
- ۱۶-۱- طیف سنجی فلورسانس ۲۷
- ۱۷-۱- لیزوزیم ۲۸
- ۱۸-۱- تصاویر سه بعدی از ساختار لیزوزیم ۳۰
- ۱۹-۱- ساختمان لیزوزیم ۳۳
- ۱-۲۰- انواع لیزوزیم ۳۷
- ۱-۲۱- لیزوزیم به عنوان یک درمان احتمالی HIV ۳۷
- ۱-۲۲- کریستاله کردن لیزوزیم های موجود در سفیده تخم مرغ ۳۸
- ۱-۲۳- مکانیسم لیزوزیم ۳۸
- ۱-۲۴- فناوری نانو ۴۱
- ۱-۲۵- تعریف فناوری نانو از منابع مختلف ۴۲
- ۱-۲۶- نانو تکنولوژی چیست؟ ۴۳
- ۱-۲۷- روش های ساخت عناصر پایه ۴۳
- ۱-۲۸- کاربردهای فناوری نانو ۴۴
- ۱-۲۹- تجهیزات ۴۴
- ۱-۳۰- محلول های نانوذرات SiO_2 و TiO_2 ۴۵
- ۱-۳۱- دگرگون کننده های استفاده شده ۴۶

فصل دوم	۴۸
۲- مواد و روش ها	۴۸
۲-۱- تهیه تامپون های مورد نیاز	۴۸
۲-۲- تهیه محلول های نانوذرات TiO_2 و SiO_2	۴۹
۲-۳- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۴۹
۲-۴- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۴۹
۲-۵- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور سدیم اوکتیل سولفات و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۴۹
۲-۶- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۴۹
۲-۷- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور ستیل تری متیل آمونیوم بروماید و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۵۰
۲-۸- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور اسپیرمین و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۵۰
۲-۹- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور اوره و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۵۰
۲-۱۰- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید (GdHCl) و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۵۰
۲-۱۱- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور نانوذره SiO_2 و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۵۰
۲-۱۲- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور نانوذره TiO_2 و دامنه حرارتی $20-100^\circ\text{C}$	۵۰
۲-۱۳- مطالعه اسپکتروفتومتری لیزوزیم در حضور SDS در دماهای مختلف	۵۱
۲-۱۴- مطالعه اسپکتروفتومتری لیزوزیم در حضور SOS در دما های مختلف	۵۱
۲-۱۵- مطالعه اسپکتروفتومتری لیزوزیم در حضور نانوذره SiO_2 در دمای 298 در جه کلوین	۵۱
۲-۱۶- مطالعه اسپکتروفتومتری لیزوزیم در حضور نانو ذره TiO_2 در دمای 298 درجه کلوین	۵۱
۲-۱۷- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور SDS در دما های مختلف	۵۱
۲-۱۸- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور SOS در دما های مختلف	۵۱
۲-۱۹- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور DTAB در دما های مختلف	۵۲
۲-۲۰- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور CTAB در دما های مختلف	۵۲
۲-۲۱- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور اسپیرمین در دما های مختلف	۵۲
۲-۲۲- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور اوره در دما های مختلف	۵۲
۲-۲۳- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور GdHCl در دما های مختلف	۵۲

۵۲.....	۲۴-۲- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور نانو ذره SiO_2 در دمای ۲۹۸ درجه کلونین
۵۲.....	۲۵-۲- مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور نانو ذره TiO_2 در دمای ۲۹۸ درجه کلونین
۵۳.....	فصل سوم
۵۳.....	۳- نتایج
۵۳.....	۳-۱- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۵۴.....	۳-۲- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور SDS و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۵۸.....	۳-۳- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور SOS و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۶۱.....	۳-۴- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور CTAB و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۶۵.....	۳-۵- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور DTAB و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۶۶.....	۳-۶- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور اسپیرمین و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۶۹.....	۳-۷- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور اوره و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۷۳.....	۳-۸- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید (GdHCl) و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۷۳.....	
۷۸.....	۳-۹- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور همزمان گوانیدین هیدروکلراید (GdHCl) و اوره و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۷۹.....	۳-۱۰- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور نانو ذره TiO_2 و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۸۲.....	۳-۱۱- مطالعه نتایج پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور نانو ذره SiO_2 و دامنه حرارتی $100-20^\circ\text{C}$
۸۵.....	۳-۱۲- مطالعه نتایج اسپکتروفوتومتری لیزوزیم در حضور SDS در دما و pH های مختلف
۸۹.....	۳-۱۳- مطالعه نتایج اسپکتروفوتومتری لیزوزیم در حضور SOS در دما و pH های مختلف
۹۳.....	۳-۱۴- مطالعه نتایج اسپکتروفوتومتری لیزوزیم در حضور نانو ذره SiO_2 در دمای ۲۹۸ درجه کلونین و $\text{pH}=7/25$
۹۴.....	۳-۱۵- مطالعه نتایج اسپکتروفوتومتری لیزوزیم در حضور نانو ذره TiO_2 در دمای ۲۹۸ درجه کلونین و $\text{pH}=7/25$ و $\text{pH}=2/5$
۹۵.....	۳-۱۶- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در دما های مختلف درجه کلونین و $\text{pH}=7/25$
۹۶.....	۳-۱۷- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور SDS در دما های مختلف درجه کلونین و pH های مختلف
۹۸.....	۳-۱۸- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور SOS در دما های مختلف و pH های مختلف

۱۰۱.....	۳-۱۹- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور CTAB در دما های مختلف و pH های مختلف
۱۰۴.....	۳-۲۰- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور DTAB در دما های مختلف و pH های مختلف
۱۰۶.....	۳-۲۱- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور اسپیرمین در دماهای مختلف و pH های مختلف
۱۰۹.....	۳-۲۲- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور اوره در دماهای مختلف و pH های مختلف
۱۱۲.....	۳-۲۴- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید (GdHCl) در دما های مختلف و pH های مختلف
۱۱۵.....	۳-۲۵- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور نانوذره TiO_2 در دمای ۲۹۸ درجه کلون و pH های مختلف
۱۱۷.....	۳-۲۶- مطالعه نتایج اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور نانوذره SiO_2 در دمای ۲۹۸ درجه کلون و pH های مختلف
۱۲۰.....	فصل چهارم
۱۲۰.....	۴- بحث و نتیجه گیری

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: دگرگون سازی سرماییه..... ۱۴
- شکل ۲-۱: عمل متقابل سهم اجزای شرکت کننده در پایداری کلی یک پروتئین کروی..... ۱۶
- شکل ۳-۱: وابستگی دمایی دو پروتئین فرضیه..... ۲۱
- شکل ۴-۱: تغییرات انرژی آزاد در تبادل با غلظت اوره..... ۲۲
- شکل ۵-۱: منحنی باز شدن گرمایی برای یک پروتئین مونومر..... ۲۳
- شکل ۶-۱: ساختارهای سه بعدی لیزوزیم..... ۳۰
- شکل ۷-۱: توزیع نیروی الکترواستاتیک در ساختمان لیزوزیم..... ۳۱
- شکل ۸-۱: ساختار کریستال لیزوزیم..... ۳۲
- شکل ۹-۱: توالی اسید آمینه ها در ساختار لیزوزیم..... ۳۳
- شکل ۱۰-۱: مکانیسم عمل لیزوزیم..... ۳۹
- شکل ۱۱-۱: مکانیسم شیمیایی لیزوزیم..... ۴۰
- شکل ۱۲-۱: اکتیو سایت لیزوزیم..... ۴۱
- شکل ۱۳-۱: نانوذره TiO_2 ۴۵
- شکل ۱۴-۱: نانوذره SiO_2 ۴۶
- شکل ۱-۳: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SDS و $pH=2/5$ ۵۵
- شکل ۲-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف SDS در $pH=2/5$ ۵۵
- شکل ۳-۳: تغییرات ΔG° در برابر دما و غلظت های متفاوت SDS..... ۵۵
- شکل ۴-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف SDS در $pH=4/5$ ۵۶
- شکل ۵-۳: تغییرات ΔG° در برابر دما و غلظت های متفاوت SDS..... ۵۶
- شکل ۶-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف SDS در $pH=7/25$ ۵۷
- شکل ۷-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف SOS در $pH=2/5$ ۵۸
- شکل ۸-۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم علیه دما در غلظت های مختلف SOS در $pH=2/5$ ۵۸
- شکل ۹-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف SOS در $pH=4/5$ ۶۰
- شکل ۱۰-۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم علیه دما در غلظت های مختلف SOS در $pH=4/5$ ۶۰
- نمودار ۱۱-۳: تغییرات جذب لیزوزیم علیه دما در غلظت های مختلف SOS در $pH=7/25$ ۶۱
- شکل ۱۲-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف CTAB در $pH=2/5$ ۶۲
- شکل ۱۳-۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف CTAB و $pH=2/5$ ۶۲
- شکل ۱۴-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف CTAB در $pH=4/5$ ۶۳
- شکل ۱۵-۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف CTAB و $pH=4/5$ ۶۳
- شکل ۱۶-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف CTAB در $pH=7/25$ ۶۴
- شکل ۱۷-۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف CTAB و $pH=7/25$ ۶۴

- شکل ۳-۱۸: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف DTAB در $\text{pH}=9$ ۶۶
- شکل ۳-۱۹: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف DTAB و $\text{pH}=9$ ۶۶
- شکل ۳-۲۰: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف اسپیرمین در $\text{pH}=2/5$ ۶۷
- شکل ۳-۲۱: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف اسپیرمین و $\text{pH}=2/5$ ۶۷
- شکل ۳-۲۲: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف اسپیرمین در $\text{pH}=4/5$ ۶۸
- شکل ۳-۲۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف اسپیرمین و $\text{pH}=4/5$ ۶۸
- شکل ۳-۲۴: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف اسپیرمین در $\text{pH}=7/25$ ۶۹
- شکل ۳-۲۵: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف اسپیرمین و $\text{pH}=7/25$ ۶۹
- شکل ۳-۲۶: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف اوره و $\text{pH}=2/5$ ۷۰
- شکل ۳-۲۸: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف اوره در $\text{pH}=4/5$ ۷۱
- شکل ۳-۲۹: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف اوره و $\text{pH}=4/5$ ۷۱
- شکل ۳-۳۰: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف اوره در $\text{pH}=7/25$ ۷۲
- شکل ۳-۳۱: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف اوره و $\text{pH}=7/25$ ۷۲
- شکل ۳-۳۳: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید و $\text{pH}=2/5$ ۷۴
- شکل ۳-۳۵: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید و $\text{pH}=4/5$ ۷۵
- شکل ۳-۳۶: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $7/25$ ۷۷
- شکل ۳-۳۷: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید و $\text{pH}=7/25$ ۷۷
- شکل ۳-۳۸: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های برابر گوانیدین هیدروکلراید و اوره در $\text{pH}=11$ ۷۸
- شکل ۳-۳۹: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید و اوره و $\text{pH}=11$ ۷۸
- شکل ۳-۴۰: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانو ذره TiO_2 در $\text{pH}=2/5$ ۸۰
- شکل ۳-۴۱: تغییرات ΔG° لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف نانو ذره TiO_2 و $\text{pH}=2/5$ ۸۰
- شکل ۳-۴۲: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 در $\text{pH}=4/5$.. ۸۱
- شکل ۳-۴۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 در $\text{pH}=7/25$. ۸۲
- شکل ۳-۴۴: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 در $\text{pH}=2/5$... ۸۳
- شکل ۳-۴۵: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 در $\text{pH}=4/5$... ۸۴
- شکل ۳-۴۶: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 در $\text{pH} 7/25$ ۸۵
- شکل ۳-۴۷: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SDS و $\text{pH}=2/5$ ۸۶
- شکل ۳-۴۸: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل غلظت های مختلف SDS در دماهای مختلف و $\text{pH}=2/5$ ۸۶
- شکل ۳-۴۹: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SDS و $\text{pH}=4/5$ ۸۷
- شکل ۳-۵۰: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل غلظت های مختلف SDS در دماهای مختلف و $4/5$ ۸۷
- شکل ۳-۵۱: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SDS و $\text{pH}=7/25$ ۸۸

- شکل ۳-۵۲: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل غلظت های مختلف SDS در دماهای مختلف و $pH=7/25$
- شکل ۳-۵۳: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SOS و $pH=2/5$ ۸۹
- شکل ۳-۵۴: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل غلظت های مختلف SDS در دماهای مختلف و $pH=2/5$ ۸۹
- شکل ۳-۵۵: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SOS و $pH=4/5$ ۹۱
- شکل ۳-۵۶: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل غلظت های مختلف SOS در دماهای مختلف و $pH=4/5$.. ۹۱
- شکل ۳-۵۶: تغییرات جذب لیزوزیم در مقابل دما را در غلظت های مختلف SOS و $pH=7/25$ ۹۲
- شکل ۳-۵۷: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل غلظت های مختلف SOS در دماهای مختلف و $pH=7/25$ ۹۲
- شکل ۳-۵۸: تغییرات جذب لیزوزیم در دمای ۲۹۸ درجه کلون در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 و $pH=7/25$... ۹۳
- شکل ۳-۵۹ و ۳-۶۰: تغییرات جذب لیزوزیم در دمای ۲۹۸ درجه کلون را در غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 و $pH=7/25$ و $pH=2/5$ ۹۴
- شکل ۳-۶۱: که تغییرات اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم را در $pH=7/25$ و دما های مختلف ۹۵
- شکل ۳-۶۲ و ۳-۶۳: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور SDS و دما های مختلف و $pH=2/5$ ۹۶
- شکل ۳-۶۴ و ۳-۶۵: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور SDS و دما های مختلف و $pH=4/5$ ۹۷
- شکل ۳-۶۶ و ۳-۶۷: که تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور SDS و دما های مختلف و $pH=7/25$ ۹۸
- شکل ۳-۶۸ و ۳-۶۹: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور SOS و دما های مختلف و $pH=2/5$ ۹۹
- شکل ۳-۷۰ و ۳-۷۱: که تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور SOS و دما های مختلف و $pH=4/5$ ۱۰۰
- شکل ۳-۷۲ و ۳-۷۳: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور SOS و دما های مختلف و $pH=7/25$ ۱۰۱
- شکل ۳-۷۴ و ۳-۷۵: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور CTAB و دما های مختلف و $pH=2/5$ ۱۰۲
- شکل ۳-۷۶ و ۳-۷۷: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور CTAB و دما های مختلف و $pH=4/5$ ۱۰۳
- شکل ۳-۷۸ و ۳-۷۹: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور CTAB و دما های مختلف و $pH=7/25$ ۱۰۴
- شکل ۳-۸۰ و ۳-۸۱: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور DTAB و دما های مختلف و $pH=9$ ۱۰۵
- شکل ۳-۸۲ و ۳-۸۳: که تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور DTAB و دما های مختلف و $pH=11$ ۱۰۶
- شکل ۳-۸۴ و ۳-۸۵: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور Spermin و دما های مختلف و $pH=2/5$ ۱۰۷
- شکل ۳-۸۶ و ۳-۸۷: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور Spermin و دما های مختلف و $pH=4/5$ ۱۰۸
- شکل ۳-۸۸ و ۳-۸۹: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور Spermin و دما های مختلف و $pH=7/25$ ۱۰۹
- شکل ۳-۹۰ و ۳-۹۱: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور اوره و دما های مختلف و $pH=2/5$ ۱۱۰
- شکل ۳-۹۲ و ۳-۹۳: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور اوره و دما های مختلف و $pH=4/5$ ۱۱۱
- شکل ۳-۹۴ و ۳-۹۵: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور اوره و دما های مختلف و $pH=7/25$ ۱۱۲
- شکل ۳-۹۶ و ۳-۹۷: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور گوانیدین هیدروکلراید و دماهای مختلف و $pH=2/5$ ۱۱۳
- شکل ۳-۹۸ و ۳-۹۹: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور گوانیدین هیدروکلراید و دماهای مختلف و $pH=4/5$ ۱۱۴
- شکل ۳-۱۰۰ و ۳-۱۰۱: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در حضور گوانیدین هیدروکلراید و دماهای مختلف و $pH=7/25$ ۱۱۵
- شکل ۳-۱۰۲ و ۳-۱۰۳: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در pH ، ۲۹۸ کلون، و غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 ۱۱۶.
- شکل ۳-۱۰۴ و ۳-۱۰۵: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در pH ، ۲۹۸ کلون، و غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 ۱۱۷.

شکل ۱۰۶-۳ و ۱۰۷-۳: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در ۲۹۸ کلوین، pH و غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 . ۱۱۸.

شکل ۱۰۸-۳ و ۱۰۹-۳: تغییرات فلورسانس لیزوزیم را در ۲۹۸ کلوین، pH و غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 . ۱۱۹.

جدول ۱-۱: قدرت پیوند های موجود در ساختار پروتئین ها ۱۷

جدول ۲-۱: خصوصیات تک تک اسید آمینه های لیوزیم ۳۳

جدول ۳-۱: مناطق هلیکس و شیت آنزیم لیوزیم ۳۶

جدول ۴-۱: ابزار ها و تجهیزات مورد استفاده در فناوری نانو ۴۵

جدول ۱-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف SDS در $pH=۲/۵$ ۵۶

جدول ۲-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف SDS در $pH=۴/۵$ ۵۷

جدول ۳-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف SDS در $pH=۷/۲۵$ ۵۷

جدول ۴-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف SOS در $pH= ۲/۵$ ۵۹

جدول ۵-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف SOS در $pH= ۴/۵$ ۶۱

جدول ۶-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف CTAB در $pH= ۲/۵$ ۶۲

جدول ۷-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف CTAB در $pH= ۴/۵$ ۶۳

جدول ۸-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف CTAB در $pH =۷/۲۵$ ۶۵

جدول ۹-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف DTAB در $pH =۹$ ۶۶

جدول ۱۰-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف اسپیرمین در $pH =۲/۵$ ۶۷

جدول ۱۱-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف اسپیرمین در $pH =۴/۵$ ۶۸

جدول ۱۲-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف اسپیرمین در $pH =۷/۲۵$ ۶۹

جدول ۱۳-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف اوره در $pH =۲/۵$ ۷۰

جدول ۱۴-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف اوره در $pH =۴/۵$ ۷۲

جدول ۱۵-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف اوره در $pH =۷/۲۵$ ۷۳

جدول ۱۶-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $pH =۲/۵$ ۷۴

جدول ۱۷-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $pH =۴/۵$ ۷۶

جدول ۱۸-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $pH =۷/۲۵$ ۷۷

جدول ۱۹-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید اوره در $pH =۱۱$ ۷۹

جدول ۲۰-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 در $pH =۲/۵$ ۸۰

جدول ۲۱-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 در $pH =۴/۵$ ۸۱

جدول ۲۲-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف نانوذره TiO_2 در $pH =۷/۲۵$ ۸۲

جدول ۲۳-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 در $pH =۲/۵$ ۸۳

جدول ۲۴-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف SiO_2 در $pH =۴/۵$ ۸۴

شکل ۴۶-۳: تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در مقابل دما در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 در $pH = ۷/۲۵$.. ۸۵

جدول ۲۵-۳: تغییرات T_m لیوزیم را در غلظت های مختلف نانوذره SiO_2 در $pH =۷/۲۵$ ۸۵

جدول ۲۶-۳: تغییرات $L_{1/2}$ لیوزیم را در غلظت های مختلف SDS در $pH=۲/۵$ ۸۶

- جدول ۳-۲۷: تغییرات $L_{1/2}$ لیزوزیم را در غلظت های مختلف SDS در $pH=۴/۵$ ۸۸
- جدول ۳-۲۸: تغییرات $L_{1/2}$ لیزوزیم را در غلظت های مختلف SDS در $pH=۷/۲۵$ ۸۹
- جدول ۳-۲۹: تغییرات $L_{1/2}$ لیزوزیم را در غلظت های مختلف SOS در $pH=۲/۵$ ۹۰
- جدول ۳-۳۰: تغییرات $L_{1/2}$ لیزوزیم را در غلظت های مختلف SOS در $pH=۴/۵$ ۹۱
- جدول ۳-۳۱: تغییرات $L_{1/2}$ لیزوزیم را در غلظت های مختلف SOS در $pH=۷/۲۵$ ۹۳

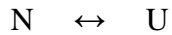
فصل اول

۱-مقدمه

واکنش های پیچیده و مرتبط با هم که تشکیل دهنده فرایند های زنده هستند بستگی به حضور پروتئین ها دارند که نه فقط به عنوان کاتالیزور ها، بلکه در نقش مولکول های ساختاری، ذخیره ای، حامل و هم چنین موتورهای مولکولی هم می توانند حضور داشته باشند. انفینسن (Anfinsen) نشان داد اطلاعات لازم برای تاخوردن زنجیره تازه ساخته در توالی آمینو اسید ها وجود دارد. برای این که پروتئین به ساختمان طبیعی (native) دچار تاخوردگی شود لازم است که ساختمان طبیعی دارای انرژی آزاد کم تر از شکل باز شده داشته باشد. Anfinsen پیشنهاد داد که حالت های باز شده و طبیعی با هم دیگر در حالت تعادل هستند و هم چنین حالت طبیعی دارای حداقل مطلق انرژی آزاد است که بدون شکستن پیوند های کووالان به دست آمده است. این فرض به عنوان فرضیه ترمودینامیک شناخته شده است، به خاطر این که این فرضیه پیشنهاد می کند که تاخوردن پروتئین تحت کنترل ترمودینامیک است. فرضیه ترمودینامیک شامل دو مفهوم کلیدی است: (۱) حالت طبیعی که دارای حداقل مطلق انرژی آزاد گیبس است. (۲) حالت های باز شده و طبیعی با هم دیگر در حالت تعادل هستند. درک نیرو های مسئول برای پایداری ساختمان پروتئین ها حیاتی و مهم است. با درک این نیرو ها می توان ساختار پروتئین ها را پیشگویی کرد. طراحی پروتئین هایی با پایداری بیش تر برای استفاده در صنعت و فرایند هایی داروسازی و هم چنین توجیح عملکرد پروتئین امکان پذیر است (Murphy, 2001).

۱-۱- توصیف ترمودینامیکی تاخوردن پروتئین

حالت های باز شده و طبیعی پروتئین ها با هم دیگر در حالت تعادل هستند. تعادل بین حالت های باز شده و طبیعی با ثابت تعادل K تعریف می شود:



$$K = \frac{[U]}{[N]}$$

تفاوت در انرژی آزاد حالت های باز شده و طبیعی به صورت زیر بیان می شود:

$$\Delta G^\circ = -R T \ln K$$

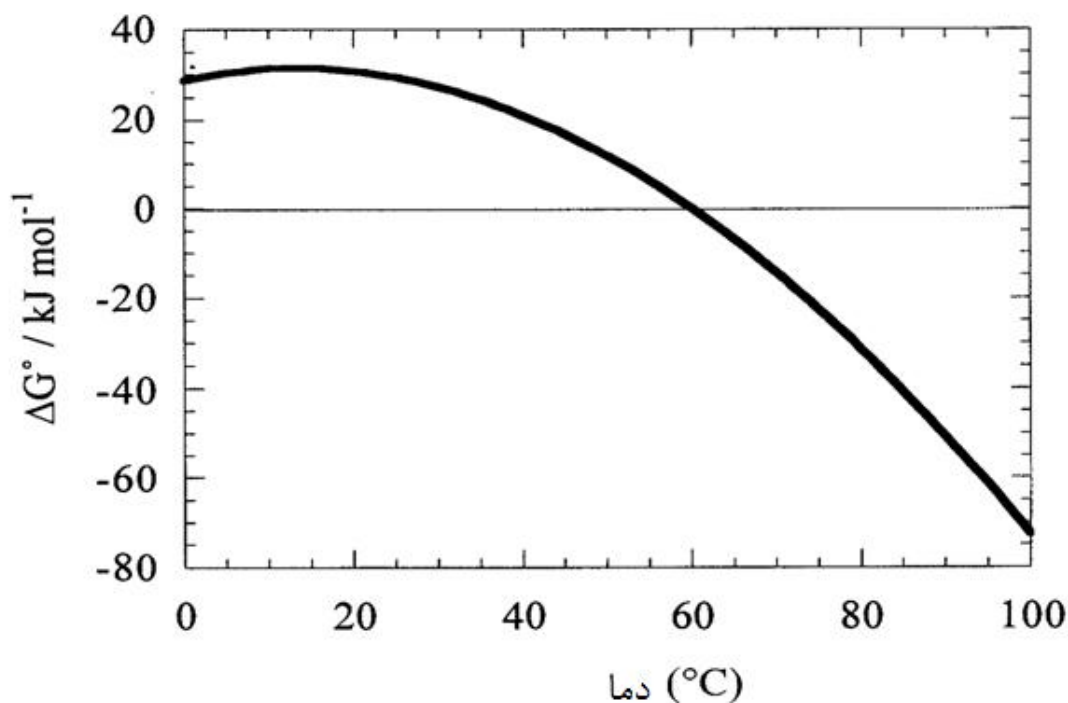
انرژی آزاد از دو بخش آنتالپی و آنتروپی تشکیل شده است.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

علاوه بر این واکنش هایی که در آب رخ می دهند ΔH° و ΔS° به طور قوی وابسته به دما هستند بنابراین تغییرات انرژی آزاد بهتر است به صورت زیر نوشته شوند:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ_{R-T} - T \Delta S^\circ_{R-T} + \Delta C_P \{ (T-T_R) - T \ln(T/T_R) \}$$

حداکثر پایداری گرمایی در جایی رخ می دهد که ΔS° برابر صفر است. خمیدگی منحنی گاهی اوقات رهنمون این است که پروتئین در شرایط سرما دگرگون می شود که این پدیده دگرگون سازی سرمایی نامیده می شود. این خصیصه در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. در این شکل ΔG° بر علیه دما برای پروتئینی با ۱۵۰ ریشه رسم شده است (Murphy, 2001).



شکل ۱-۱: دگرگون سازی سرمایی

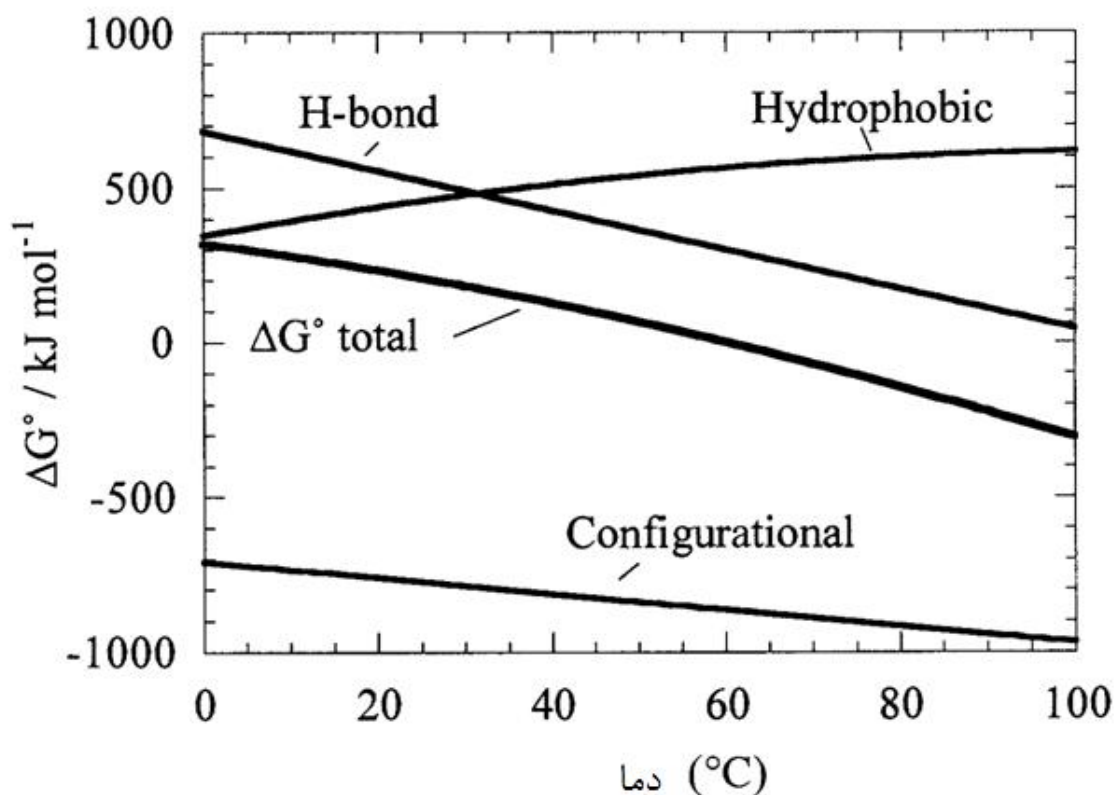
۲-۱- توصیف نیروهای غالب در تا خوردن پروتئین ها

برهم کنش هایی که در پایداری پروتئین ها حائز اهمیت اند شامل اثرات آب گریز، پیوند های هیدروژنی، آنتروپی بنای فضایی و عوامل محیطی به عنوان مثال دما، pH و غلظت نمک هستند. اثر آب گریز مربوط به حلالیت کم ترکیبات آب گریز در آب است. در پروتئین ها پیوند هیدروژنی درون مولکولی با ایجاد پیوند هیدروژنی با مولکول های آب رقابت می کند. این رقابت تعیین کننده سهم پیوند هیدروژنی در پایداری پروتئین ها است. در یک پروتئین با تا خوردگی باز شده، زنجیره پروتئینی می تواند موقعیت های چرخشی متفاوتی را در اطراف زوایای پیچشی ψ و ϕ قبول کند. هم چنین زنجیره جانبی می تواند اطراف (چرخنده ها) rotomers متفاوت زاویه χ را قبول کند. به محض اتخاذ حالت طبیعی، تقریباً همه زوایای ψ و ϕ به یک موقعیت منفرد محدود می شوند. این فقدان درجه آزادی به از دست دادن آنتروپی بنای فضایی تعبیر می شود. دما توسط تغییر سهم اثر آب گریز، پیوند هیدروژنی و آنتروپی بنای فضایی تاثیرش را اعمال می کند. نتایج پایدارسازی آنتالپیک انتقال پیوند هیدروژنی از زنجیره جانبی به ستون فقرات در لیروزیم T4 نشان داده است که با کاهش دمای ذوب، افزایش آنتالپی باز شده رخ داده است. هم چنین در مطالعه ای دیگر نشان داده شده است که وجود یک پل نمکی بین زنجیره های جانبی بر پایداری پروتئین ها کم اثر یا بی اثر است. اما وجود پل نمکی بین زنجیره جانبی و ستون فقرات به میزان $6/3 \text{ KJ mol}^{-1}$ باعث پایدارتر شدن می شود. سهم واکنش های متفاوت برای یک پروتئین معمولی در شکل ۱-۲ توضیح داده شده است (Murphy, 2001).

قدرت نیروهای هیدروفوب به خاطر کشش ذاتی بین گروه های غیر قطبی نیست بلکه بیش تر به خاطر ویژگی های آب است که گروه های غیر قطبی را احاطه کرده است. یک زنجیره جانبی غیر قطبی یا یک ناحیه از مولکول پروتئینی در آب، باعث تشکیل یک پوسته آب در اطراف نواحی آب گریز می شوند که در این پوسته مولکول های آب به شدت به صورت منظم قرار گرفته اند. وقتی دو زنجیره جانبی غیر کووالان کنار هم قرار بگیرند، سطح تماس با حلال کاهش یافته و برخی از مولکول های آب منظم پوسته آزاد می شوند (از حالت نظم خارج می شوند) و بی نظمی سیستم (بی نظمی کل مولکول های آب در سیستم) افزایش می یابد. افزایش بی نظمی، از نظر ترمودینامیکی مناسب بوده و نیرویی خواهد بود که بخش های غیر قطبی در حلال آبی کنار هم قرار بگیرند. در گذر از حالت بی نظم به آرایش فضایی های دوم مانند آلفا-هلیکس و رشته های بتا، تقریباً یک سوم از آب حلال اطراف ساختار پروتئین تاخورد، از حالت نظم خارج می شوند. این مقدار شامل $0.9-0.5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ برای هر باقیمانده پپتیدی است. یک سوم دیگر مولکول های آب پوسته حلال، وقتی که یک پلی پپتید، آرایش طبیعی خود را می یابد از نظم خارج می شوند. این موضوع سبب می شود که بخش های مختلف رشته پلی پپتیدی تاخورد، با خارج شدن آب حلال بین این قطعات، به هم نزدیک تر شوند. پیوند هیدروژنی زمانی شکل می گیرد که یک اتم هیدروژن به طور کووالان به یک اتم الکترونگاتیو متصل شده است با یک اتم الکترونگاتیو دیگر به اشتراک گذاشته شود. اتمی که هیدروژن به آن متصل است، اتم دهنده هیدروژن نام دارد و اتم دیگر پذیرنده هیدروژن نام دارد. در ساختار های آلفا-هلیکس و زنجیره های بتا، پیوند های هیدروژنی فراوانی وجود دارند. قدرت پیوند هیدروژنی به فاصله بین اتم های دهنده و گیرنده بستگی دارد. بیش ترین انرژی اتصال زمانی خواهد بود که این فاصله بین $2.7-3.1$ انگستروم باشد. هم چنین نحوه قرار گرفتن اتم ها درگیر در پیوند نسبت به هم بر روی قدرت پیوند تاثیر دارد. پیوند های هیدروژنی با انرژی بالا از نظر فضایی در یک خط قرار دارند، یعنی اتم دهنده و گیرنده هیدروژن در امتداد یک خط مستقیم قرار گرفته اند. هم چنین ثابت دی الکتریک محیط اطراف پیوند نیز روی قدرت اتصال تاثیر دارد. معمولاً انرژی پیوند های هیدروژنی در پروتئین ها بین $1-7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ است. میانکنش های الکترواستاتیک بین گروه های باردار، در پایدار کردن ساختار پروتئین و در اتصال لیگاند ها و سوبسترا های باردار به پروتئین ها اهمیت دارند. ثابت دی الکتریک آب بالا است ($D=80$) و برهم کنش های الکترواستاتیک در آب در مقایسه به برهم کنش های به وجود آمده درون پروتئین که ثابت دی الکتریک پایینی دارد، ضعیف تر است. ولی در هر صورت اکثر گروه های باردار روی سطح پروتئین باقی می ماند و نمی توانند با دیگر گروه های باردار پروتئین میانکنش بدهند، زیرا ثابت دی الکتریک آب بالا است. ولی این گروه ها با تشکیل پیوند هیدروژنی و میانکنش های قطبی با آب، پایدار می شوند. این چنین میانکنش هایی، نیرو هایی به وجود می آورند که اکثر گروه های باردار یک پروتئین را در سطح بیرونی ساختار تاخورد قرار می دهند. نیروی پراکندگی لاندن-واندروالس ضعیف ترین نیرو های غیر کووالان هستند. هنگامی که اوربیتال های الکترونی دو اتم به هم نزدیک می شوند پیوند به وجود می آید. اگر دو اتم باز به هم نزدیک شوند، اوربیتال های الکترونی دو اتم مجاور با هم، هم پوشانی خواهند داشت و نیروی دافعه واندروالس بین دو اتم تشکیل می شود. مناسب ترین فاصله برای ایجاد قوی ترین پیوند بین دو اتم، فاصله واندروالس دو اتم است. نیروی دافعه واندروالس بین اتم های پیوند پپتیدی، زوایای ϕ و ψ اختصاصی آرایش فضایی های آلفا-هلیکس و زنجیره های بتا، ضعیف ترین نیروها می باشند. بنابراین نبود نیروی دافعه واندروالس برای تشکیل ساختار دوم در پروتئین ها ضروری است. ولی برای دست یابی به ساختار طبیعی پروتئین، هزاران میانکنش ضعیف واندروالسی مورد نیاز است. حضور این نیرو ها در پایداری ساختار تاخورد پروتئین نیز قابل توجه است. نوعی میانکنش اختصاصی (π -الکترون- π -الکترون)، به هنگام نزدیکی دو حلقه آروماتیک به هم رخ می دهند که در این هنگام الکترون های حلقه آروماتیک به طور مطلوبی با هم میانکنش می دهند. این میانکنش ها می توانند سبب ایجاد نیروی جاذبه با انرژی بیش از 6 Kcal mol^{-1} شود (Devlin, 2011).

۳-۱- دگرگون سازی موجب از دست رفتن ساختمان طبیعی می شود

دگرگون سازی هنگامی روی می دهد که ساختار طبیعی دوم و یا سوم و یا چهارم یک پروتئین تخریب شود. ساختار اول با دگرگون سازی تخریب نمی شود. حالت دگرگون سازی همراه با از دست رفتن فعالیت پروتئین همراه است ولی از دست رفتن فعالیت همیشه با دگرگون سازی همراه نیست چون تغییرات آرایش فضایی کوچک هم می تواند بدون برهم زدن ساختار تاخوردده طبیعی پروتئین، منجر به از دست رفتن فعالیت شود. مثلا پروتونه شدن یک زنجیره جانبی اسید آمینه می تواند فعالیت آنزیم را تغییر دهد. اگرچه تفاوت های آرایش فضایی بین ساختار های دگرگون و طبیعی می تواند قابل توجه باشد، ولی اختلاف انرژی آزاد بین این ساختارها عمدتا بین 10 Kcal mol^{-1} است. بنابراین از دست رفتن یک پیوند هیدروژنی و یا الکترواستاتیک و یا آب گریز می تواند منجر به ناپایداری ساختار تاخوردده شود. در شرایط آزمایشگاهی، دگرگون سازی پروتئین در حضور اوره یا دترجنت ها که اتصالات آب گریز در پروتئین ها را تضعیف می کنند و فرم دگرگون پروتئین را پایدار می کنند، روی می دهد. روش های دیگر برای دگرگون سازی پروتئین اضافه کردن باز یا اسید و یا حلال های آلی قوی و گرم کردن پروتئین ها تا دما های بالای 60 درجه برای اکثر پروتئین ها است (Devlin, 2011).



شکل ۱-۲: عمل متقابل سهم اجزای شرکت کننده در پایداری کلی یک پروتئین کروی

در شکل ۱-۲ عمل متقابل سهم اجزای شرکت کننده در پایداری کلی یک پروتئین کروی نشان داده شده است. اثرات آب گریز و پیوند های هیدروژنی سهم بزرگ مساعد را برای ΔG° کلی فراهم می کنند. در حالی که آنتروپی

بنای فضایی یک سهم بزرگ غیر مساعد را برای ΔG° کلی فراهم می کند (Murphy, 2001). در جدول ۱-۱ قدرت پیوند های موجود در ساختار پروتئین ها (Devlin, 2011) نشان داده شده است.

جدول ۱-۱: قدرت پیوند های موجود در ساختار پروتئین ها (Devlin, 2011)

نوع پیوند	قدرت اتصال (Kcal mol^{-1})
کووالان	>50
غیر کووالان	$0.6-7$
هیدروفوب (آب گریز)	$2-3$
هیدروژنی	$1-7$
یونی	$1-6$
واندروالس	$1 >$
میانگین انرژی حرکتی کینتیک (37°C)	
	0.6

۱-۴- نیرو های غیر کووالان منجر به تا خوردن پروتئین شده و در پایداری پروتئین ها شرکت می کنند

نیرو های غیر کووالان باعث می شوند که یک پلی پپتید، تاخورد و آرایش طبیعی ویژه خود را به دست آورده و سپس ساختار طبیعی در برابر دگرگون شدن پایدار می شود. نیرو های غیر کووالان، نیرو های اتصالی ضعیفی با قدرت $1-7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ($4-29 \text{ KJ mol}^{-1}$) هستند. این نیرو ها ممکن است با قدرت اتصال پیوند کووالان مقایسه شوند، که حداقل قدرت پیوندی آن معادل 50 Kcal mol^{-1} است. اگر چه این نیرو ها به تنهایی خیلی ضعیف هستند تعداد زیادی از نیرو های غیر کووالان، انرژی زیادی برای تا خوردن پروتئین فراهم می کنند (Devlin, 2011).

۱-۵- پایدار سازی طبیعی توسط اسمولیت ها رخ می دهد

در طبیعت در تعداد زیادی از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها در محیط های با شرایط استرس زا رشد می کنند غلظت های درون سلولی از مولکول های ارگانیک کوچک دیده شده است، این مولکول های کوچک اسمولیت نام دارند که توانایی حفظ پروتئین های سلول را از طریق پایدار سازی آن ها در برابر مواد دگرگون کننده دارا هستند. به عنوان مثال دی ساکارید ترهالوز یک اسمولیت انتخاب شده برای حفاظت گیاهان احیا شونده بر علیه خشک شدن است. هر چند همه اسمولیت ها از اجزای سلولی محافظت به عمل نمی آورند. یک مثال مهم در این رابطه اوره است، که در سلول های بخش مرکزی کلیه کوسه ماهی و باله های بدن ماهی سله کانت تجمع می یابد. شناسایی خصوصیات یک اسمولیت که از لحاظ تکاملی انتخاب شده است و باعث حفاظت و پایداری پروتئین ها می شود می تواند بینش عمیقی در مورد مشکلات اساسی پایداری پروتئین ها را فراهم می کند این مشکلات در صنایع داروسازی، بیوتکنولوژی و تحقیقات روزانه وجود دارد. اسمولیت های محافظت کننده در سه گروه شیمیایی اصلی قرار می گیرند: ۱- پلی ال ها که شامل گلیسرول، سوکروز، ترهالوز و برخی از دیگر قندهای ویژه ۲- آمینو اسیدهای ویژه شامل پرولین و گلیسین ۳- متیل آمین های ویژه از قبیل سارکوزین، تری متیل آمین ان اکساید (TMAO) و بتانین است. پلی ال ها انتخاب مناسبی برای پایداری پروتئین ها بر علیه استرس دما های افراطی، کم آبی و خشک شدن، و آمینو اسید ها برای حفاظت سلول ها در برابر غلظت بالای نمک مناسب هستند. اتصال لیگاند های مطلوب به پروتئین ها همیشه منجر به کاهش ترمودینامیکی انرژی آزاد برای فرایندهایی مثلاً پتانسیل شیمیایی استاندارد برای واکنش

های کمپلکس پروتئین لیگاند می شوند این مقدار کم تر از مجموع پتانسیل شیمیایی استاندارد لیگاند آزاد و پروتئین آزاد است (ΔG° منفی است). بر عکس، استثناء مهم در این زمینه که موجب افزایش مقدار ΔG° و پتانسیل استاندارد شیمیایی می شود سیستم پروتئین-ساکاروز است (Murphy, 2001).

۱-۶-ارتباط ترمودینامیکی بین ساختار، پایداری و عملکرد پروتئین

پروتئین ها ماکرومولکول های به شدت بسته بندی شده هستند که نشان دهنده یک تعداد زیادی از واکنش های اتمی غیر کوالان هستند و هم چنین نشان دهنده ساختار سه بعدی، پایداری و خصوصیات عملکردی هستند. درحالی که رابطه بین انرژی و تاخوردگی و پایداری در تحقیقات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است با این وجود رابطه بین ساختار و عملکرد تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. به طور کامل مشخص شده است که خیلی از پروتئین ها تغییرات آرایش فضایی و یا انعطاف پذیری آرایش فضایی را در طی عملکرد شان تحمل می کنند که این امر برای فعالیت بیولوژیکی حیاتی است (Murphy, 2001).

۱-۷-پایداری پروتئین

پایداری ساختاری فضایی یک پروتئین کروی از تغییرات انرژی آزاد در دمای 25°C و در غیاب عوامل دگرگون کننده برای واکنش برگشت پذیر حالت غیر طبیعی به حالت طبیعی محاسبه می شود (Fersht, 1999). پایداری ساختمانی بیش تر پروتئین های کروی به میزان قابل توجهی کم و بین ۵ تا ۱۵ کیلو کالری بر مول می باشد. دو روش که اغلب برای تخمین پایداری ساختمانی پروتئین ها استفاده می گردد عبارتند از کالریمتری اسکن تفاضلی (DSC) و مطالعات دگرگون سازی با استفاده از اوره و گوانیدین هیدرو کلراید است. مقادیر نقطه میانی باز شدن گرمایی، T_G ، تغییر آنتالپی در این دما، ΔH_G و اختلاف ظرفیت حرارتی بین ساختمان تا خورده و باز شده را می توان با کالریمتری محاسبه نمود. از این پارامتر ها می توان جهت تخمین تغییر انرژی آزاد در هر دمایی با استفاده از معادله گیبس و هلمهولتز بهره گرفت (Von Hippel and Schleich, 1969):

$$\Delta G_D^\circ(T) = \Delta H_G^\circ(1 - T_G) - \Delta C_p \left[(T_G - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_G} \right) \right]$$

چهار چوب اصلی غیر طبیعی شدن پروتئین را در مطالعات کالریمتری، می توان به صورت زیر طبقه بندی نمود:

۱) اساساً فرآیند غیر طبیعی شدن پروتئین های کروی فشرده کوچک را می توان یک فرایند دو حالتی فرض کرد که مقدار حالت های حد واسط قابل نظر کردن است. این موضوع نشان گر آن است که مولکول های کروی کوچک را می توان یک سیستم تعاونی ماکروسکوپی در نظر گرفت که در آن عناصر ساختمانی آمینو اسیدی مستقل از یکدیگر تغییر حالت نمی دهند.

۲) ساختمان طبیعی پروتئین های بزرگ چند دمینی در چندین مرحله مجزا که هر کدام همراه با جذب مقدار معینی انرژی است غیر طبیعی می گردند. مجزا بودن واحدهای مختلف ساختمان، اصل کلی معماری ساختمان پروتئین است و این مسأله نه تنها در دگرگون شدن و تخریب ساختمان پروتئینی منعکس می شود، بلکه پایه فیزیکی عمیقی هم دارد.

۳) انتقال یک پروتئین یا دومین واحد تعاونی از حالت طبیعی به غیر طبیعی معمولاً همراه با افزایش قابل ملاحظه ای در ظرفیت گرمایی هنگام غیر طبیعی شدن، توسط رابطه زیر نشان داده می شود:

$$\Delta^D_N C_p = C^D_p - C^N_p$$

۴) آنتالپی و آنتروپی ویژه انتقال فضایی پروتئین ها از حالت طبیعی به حالت غیر طبیعی دارای یک مقدار حدی در بالاتر از ۱۲۵ درجه سانتی گراد بوده و به نظر می رسد که برای تمام پروتئین ها این مقدار یکسان باشد. آنتالپی و آنتروپی ویژه انتقال همان آنتالپی و آنتروپی غیر طبیعی شدن پروتئین است که در آن اثرات آنتالپی و آنتروپی یونیازسیون پروتئین و بافر حذف شده است (karimidehkordi, 2008).

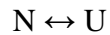
ساختار پروتئین ها توسط واکنش های بین مولکولی غیر کووالان بین اسید آمینه های زنجیره جانبی پایدار می شوند. مهم است که بدانیم پروتئین ها چگونه به حالت فعال از نظر بیولوژیکی تاخوردده می شوند و چگونه این حالت فعال باقی می ماند. زیرا همه فعالیت های بیولوژیکی بستگی به حضور پروتئین های پایدار و به طور مناسب تاخوردده شده دارد. مهندسی پروتئین، طراحی داروهای معقول و تولید داروهای نو ترکیب (biopharmaceutical)، توسعه، تولید و ذخیره پروتئین های پایدار با فعالیت کامل را شامل می شود. توصیف کامل هر پروتئینی نیاز به تعیین پایداری و نیروهایی که منجر به پایداری و تاخوردگی صحیح می شود دارند. کالریمتری اسکن تفاضلی (DSC) یک ابزار قدرتمند آنالیزی است که پایداری و بازشدگی یک پروتئین را اندازه گیری می کند. در DSC به یک پروتئین با سرعت ثابت گرما داده می شود و علائم قابل شناسایی ثبت می شوند. علائم DSC موارد زیر را می توانند نشان دهند (Von Hippel and Schleich, 1969):

- نقطه میانی گذار (T_m)
- آنتالپی (ΔH) و تغییر ظرفیت گرمایی مرتبط با حالت باز شده (ΔC_p)
- حضور دمین های انرژی

یک پروتئین در محلول آبی بین آرایش فضایی طبیعی (تاخوردده) و آرایش فضایی دگرگون (باز شده) در حال تعادل است. پایداری حالت طبیعی براساس بزرگی انرژی آزاد گیبس (ΔG) سیستم و روابط ترمودینامیکی بین تغییرات انتالپی، تغییرات آنتروپی (ΔS) خواهد بود. ΔG مثبت نشان دهنده این است که حالت طبیعی بیش تر از حالت دگرگون شده پایدار است. برای یک پروتئین باز شده، نیروهای پایدار کننده لازم است تا از بین بروند. نقطه میانی گذر یا T_m دمایی است که در آن دما ۵۰٪ از پروتئین به صورت طبیعی و ۵۰٪ دیگر به صورت دگرگون شده است. به طور کلی، T_m بالاتر پایداری بالاتر پروتئین را شامل می شود. پروتئین هایی که پایدارترند کم تر مستعد باز شدن و رسوب هستند، باز شدن پروتئین ها عموماً واکنشی گرما گیر است. تغییر ظرفیت گرمایی باز شدن پروتئین ها در اصل به خاطر تغییر در هیبریداسیون زنجیره های جانبی که در حالت طبیعی مدفون شده بودند ولی به خاطر در معرض قرار گرفتن حلال به حالت دگرگون تبدیل می شوند (Freire, 2001; Bruylants *et al.*, 2005; Krell, 2008). پایداری پروتئین ها از دو جنبه: ۱- پایداری ترمودینامیکی ۲- پایداری سینتیکی می تواند قابل بررسی باشد. بحث در مورد پایداری پروتئین ها معمولاً محدود به پایداری حالت طبیعی بر علیه حالت دگرگون شده می شود. در عین حال حالت طبیعی ممکن است شامل ترکیب های مربوط عملکردی متفاوتی باشد که توسط انرژی آزاد گیبس متفاوت و بنابراین پایداری های متفاوتی (به عنوان مثال حالت های R و T در هموگلوبین) مشخص شده اند. در خیلی از موارد پایداری پروتئین زمانی که لیگاند متصل می شود (به عنوان مثال HIV پروتئین) تغییر می کند. در این مورد دو ترکیب دارای انرژی آزاد گیبس متفاوتی هستند و بنابراین دارای پایداری ذاتی متفاوتی هستند (Murphy, 2001).

۱-۷-۱- پایداری ترمودینامیکی

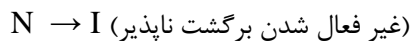
تمایل پروتئین برای ماندن در حالت طبیعی (N) و تبدیل نشدن به حالت باز شده (U) است که با توجه به رابطه زیر می شود برای آن ثابت تعادل تعریف کرد که می شود که با به دست آوردن مقدار K_U می توان ΔG_U را بدست آورد.



$$\Delta G_U = -RT \ln K_U$$

در این نوع پایداری اگر پروتئین حالت طبیعی در اثر هر عاملی (مثلاً حرارت) به حالت باز شده تبدیل شود، پروتئین بعد از رفع استرس دوباره به فرم و حالت اولیه خود، یعنی حالت طبیعی باز می گردد. پس دگرگون شدن (Denaturation) برگشت پذیر شاخصی برای پایداری ترمودینامیکی می باشد. معمولاً هر چه مقدار ΔG_U بیش تر باشد آنزیم پایدارتر است.

۱-۷-۲- پایداری سینتیکی



در این نوع پایداری، مقاومت پروتئین در برابر واسرشتگی غیرقابل برگشت مورد بحث قرار می گیرد. که می توان سرعت تبدیل شدن N به I را در صورتی که از مکانیسم واکنش درجه اول تبعیت کند از طریق معادله زیر بدست آورد.

$$V_{in} = k_{in} [U]$$

بر خلاف واسرشتگی برگشت پذیر که اغلب یک انتقال همه یا هیچ یا دو حالت (Two state) است، غیر فعال شدن برگشت ناپذیر یک روند چند مرحله ای است. این روند با باز شدن قابل برگشت آغاز می شود که شاخص آن ثابت K_U تعادل است، پس از آن مرحله برگشت ناپذیر واقع می شود که ثابت سرعت k_{in} تعیین کننده آن است.

۱-۸-۱- تاخوردگی پروتئین ها و پایداری

۱-۸-۱- پایداری حالت طبیعی

پایداری حالت طبیعی (و هر حالت آرایش فضایی دیگری) از پروتئین توسط مقدار انرژی آزاد ΔG° مشخص می شود. که توسط اصطلاح انرژی آزاد (ترمودینامیک) استاندارد بیان می شود.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

نقطه میانی دگرگون سازی دمایی یک پروتئین مونومر (T_m) زمانی رخ می دهد که ΔG° برابر صفر باشد. این خصیصه در شکل ۱-۳ دیده می شود. حالت طبیعی از لحاظ ترمودینامیکی بین دو دما پایدار است و ΔG بیشینه جایی است که ΔS برابر صفر باشد.