بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش بیوشیمی

مطالعات سینتیکی آنزیم پروتئیناز K در حضورحلال های آلی، اوره و گوانیدین هیدروکلرید

استاد راهنما:
دکتر بهزاد شارقی

استاد مشاور:
دکتر راضیه پوراحمد

توسط:
عظیمه ربیعی
شهریور ماه ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر:

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست...

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخته تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنها شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم، چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام بوده اند دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. آموزگارانی که برایم زندگی، بودن و انسان بودن را معنا کردند....

با تشکر و سپاس از استاد راهنمای گرامی ام جناب آقای دکتر شارقی که از محضر پر فیض تدریسش ، بهره ها برده ام.

با امتنان بیکران از مساعدت های سرکار خانم دکتر پوراحمد که زحمت مشاوره این پایان نامه را متقبل شدند .

از اساتید فرزانه جناب آقای دکتر محبی و سر کار خانم دکتر صفار که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

با تشکر از جناب آقای دکتر سمنانی، مدیریت محترم دانشکده علوم پایه که بدون مساعدت ایشان، این مهم به نتیجه مطلوب نمی رسید.

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان و عزیزانم.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است:

- به استوارترین تکیه گاهم، دستان مهربان پدرم و به سبزترین نگاه زندگیم،چشمان پر از مهر مادرم کسانی که از نگاهشان صلابت، از رفتارشان محبت و از صبرشان ایستادگی را آموختم ؛

- به همسرم که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است ؛

- به نگاه معصوم و قلب مملؤ از مهر خواهران و برادرانم ؛

- و به آنانی که دعای خیرشان بدرقه ی راهم بود ؛

پدر و مادر عزیزم امروز هستی ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما، ره آوردی گران سنگ تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم، باشد که حاصل تلاشم نسیم‌گونه، غبار خستگیتان را بزداید.
بوسه بر دستان پرمهرتان...
پروردگارا ؛ توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

چکیده:

پروتئینازK(EC ۳.۴.۲۱.۱۴) یک اندوپپتیداز خارج سلولی است که به وسیله قارچ Tritirachum album Limber ترشح می‌شود و متعلق به رده سرین اندوپپتیدازهاست. این آنزیم دارای ۲۷۹ اسید آمینه است. در جایگاه فعال این آنزیم سه اسیدآمینه ۳۹ Asp، ۶۹ His و۲۲۴ Ser وجود دارد .پروتئینازK تک زنجیره ای با وزن مولکولی ۲۸/۹ کیلودالتون می‌باشد. این آنزیم در pH ۳ تا ۱۱ بسیار پایدار و فعال است. نقطه ایزوالکتریک این آنزیم ۸/۹ و pH بهینه آن ۱۲-۷/۵ می‌باشد.

در این مطالعه اثر اوره، گوانیدین هیدروکلراید، اتانول، متانول، ایزوپروپانول، نانوذرات اکسید نیکل و اکسید تیتانیوم بر سینتیک آنزیم پروتئینازK، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ (بافر فسفات سدیم) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل نشان دهنده ی نقش دگرگون کنندگی گوانیدین هیدروکلراید بر ساختار آنزیم است. در حضور گوانیدین هیدروکلراید فعالیت کاتالیتیکی پروتئینازK کاهش می یابد. فعالیت پروتئینازK در غلظت‌های پائین اوره کاهش می‌یابد ولی در غلظت‌های بالای اوره فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. نانوذرات اکسید تیتانیوم و اکسید نیکل به عنوان یک فعال کننده سبب افزایش فعالیت آنزیم شده‌اند. حلال‌های آلی، اتانول، متانول و ایزوپروپانول در درصدهای پائین باعث افزایش فعالیت آنزیم شدند ولی با افزایش درصد این حلال‌ها فعالیت آنزیم کاهش می یابد.

کلمات کلیدی: پروتئینازK، اوره، گوانیدین هیدروکلراید، اتانول، متانول، ایزوپروپانول، نانوذرات اکسید نیکل و اکسید تیتانیوم، سینتیک، دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول- مقدمه ۱

۱-۱-پروتئین‌ها: ۱

۱-۱-۱-اسیدهای‌آمینه: ۲

۱-۱-۲-انواع پروتئین: ۲

۱-۱-۲-۱-پروتئین‌های فیبری: ۲

۱-۱-۲-۲-پروتئین‌های کروی: ۲

۱-۱-۲-۳-پروتئین‌های تک واحدی: ۲

۱-۱-۲-۴-پروتئین‌های اولیگومریک: ۲

۱-۱-۳-ساختار پروتئین‌ها: ۳

۱-۱-۳-۱-ساختار اول: ۳

۱-۱-۳-۲-ساختار دوم: ۴

۱-۱-۳-۳-ساختار سوم: ۵

۱-۱-۳-۴-ساختار چهارم: ۵

۱-۱-۴-عوامل پایدار کننده ساختارهای نوع سوم و چهارم: ۵

۱-۱-۵-نقش نیروهای غیرکووالان در پایداری پروتئین‌ها: ۶

۱-۱-۶-خواص پروتئین‌ها: ۶

۱-۱-۶-۱-حلالیت پروتئین‌ها: ۶

۱-۱-۶-۲-تعیین pH ایزوالکتریک: ۷

۱-۲-آنزیم‌ها: ۷

۱-۲-۱-آنزیم‌ها به عنوان کاهنده انرژی فعال سازی: ۸

۱-۲-۲-طبقه بندی آنزیم‌ها: ۸

۱-۲-۳-فعالیت آنزیم‌ها: ۹

۱-۲-۳-۱-چند اصطلاح در مورد فعالیت آنزیم‌ها: ۹

۱-۲-۳-۲-جایگاه فعال آنزیم: ۱۰

۱-۲-۳-۳-شیمی فضایی جایگاه فعال آنزیم: ۱۰

۱-۲-۳-۴-حالت گذار: ۱۰

۱-۲-۳-۵-اتصال محکم در حالت گذار: ۱۱
۱-۲-۳-۶-فعالیت آنزیمی تحت تأثیر pH قرار می گیرد: ۱۱
۱-۲-۳-۷-سنجش فعالیت آنزیم: ۱۱
۱-۳-سینتیک واکنش های آنزیمی: ۱۱
۱-۳-۱-اثر غلظت سوبسترا بر روی سرعت واکنش آنزیمی: ۱۱
۱-۳-۲-سینتیک واکنش‌های آنزیمی تک سوبسترایی: ۱۳
۱-۳-۲-۱-معادله میکائیلیس-منتن: ۱۳
۱-۳-۲-۲-تغییرات بریگس-هالدن در معادله میکائیلیس-منتن: ۱۴
۱-۳-۲-۳-پارامترهای کلیدی معادله میکائیلیس-منتن: ۱۵
۱-۳-۲-۴-اهمیت ثابت میکائیلیس (K_m): ۱۶
۱-۳-۳-روش‌های مختلف ترسیم داده‌های سینتیکی ۱۷
۱-۳-۳-۱-معادله لینویور-برک: ۱۷
۱-۳-۳-۲-معادله ادی- هافستی: ۱۷
۱-۳-۳-۳-معادله هانز-ولف: ۱۸
۱-۳-۴-مهار آنزیمی: ۱۸
۱-۴-طیف سنجی: ۲۰
۱-۴-۱-کروموفور: ۲۰
۱-۴-۲-دستگاه اندازه گیری جذب نور مرئی و ماوراء بنفش: ۲۲
۱-۴-۳-کاربردهای مهم طیف سنجی جذبی: ۲۲
۱-۴-۴-روش‌های طیف سنجی برای ارزیابی ساختار و عملکرد پروتئین استفاده می‌شوند: ۲۲
۱-۵- پروتئازها: ۲۲
۱-۵-۱-سرین پروتئازها: ۲۲
۱-۵-۲-مکانیسم کاتالیزی: ۲۲
۱-۵-۳-مهار کننده‌های سرین پروتئازها: ۲۳
۱-۵-۴- آنزیم پروتئینازK: ۲۳
۱-۵-۶-مکانیسم عمل آنزیم پروتئینازK: ۲۵

۱-۵-۷-سوبسترا و مهار کننده‌های آنزیم پروتئینازK: ۲۵
۱-۶-فناوری نانو: ۲۶
۱-۶-۱-خواص نانو مواد: ۲۶
۱-۶-۲-کاربردهای فناوری نانو: ۲۶
۱-۶-۳-محلول نانوذره TiO_2: ۲۷
۱-۶-۴-نانوذره نیکل: ۲۷
۱-۷-ترکیبات افزایش دهنده آبدوستی: ۲۷
۱-۸-هدف از انجام مطالعه: ۲۹

فصل دوم- مواد و روش‌ها ۳۰
۲-۱-مواد مورد نیاز: ۳۰
۲-۲-تهیه محلول‌های مورد نیاز: ۳۱
۲-۲-۱-تهیه بافر (تامپون) فسفات سدیم (Na_2HPO_4): ۳۱
۲-۲-۲-تهیه محلول ۸ مولار اوره: ۳۱
۲-۲-۳-تهیه محلول ۱۰۰ میلی مولار پار نیتروفنیل استات: ۳۱
۲-۲-۴- تهیه محلول ۶ مولار گوانیدین هیدروکلرید: ۳۱
۲-۲-۵-تهیه‌ی محلول‌های نانوذرات NiO_9TiO_2: ۳۲
۲-۳-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور مواد مختلف: ۳۲
۲-۳-۱-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور اوره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴: ۳۲
۲-۳-۲- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد وpH=۷/۴: ۳۲
۲-۳-۳-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور نانو ذره‌ی اکسید نیکل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۲
۲-۳-۴-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۳
۲-۳-۵-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور متانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۳
۲-۳-۶-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور اتانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۳
۲-۳-۷-مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور ایزوپروپانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۳

فصل سوم- نتایج ۳۴

۳-۱-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور محلول های مختلف: ۳۴

۳-۱-۱-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور اوره در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۶

۳-۱-۲-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۳۸

۳-۱-۳-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور نانو ذره‌ی اکسید نیکل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۴۰

۳-۱-۴-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور نانو ذره‌ی اکسید تیتانیوم در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۴۱

۳-۱-۵-بررسی مقایسه‌ای سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور نانوذرات اکسید نیکل و اکسید تیتانیوم در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۴۳

۳-۱-۶-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور متانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۴۳

۳-۱-۷-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور اتانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۴۵

۳-۱-۸-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور ایزوپروپانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴: ۴۶

۳-۱-۹-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئینازK در حضور غلظت های برابر حلالهای آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول: ۴۸

فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری ۵۳

۴-۱- اثر اوره و گوانیدین هیدرو کلراید بر فعالیت سینتیک آنزیم پروتئینازK: ۵۴

۴-۲- اثر نانوذرات TiO_2 و NiO بر فعالیت سینتیک آنزیم پروتئینازK: ۵۶

۴-۳-اثر حلال های آلی متانول، اتانول و ایزوپروپانول بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئینازK: ۵۸

منابع ۵۹

فهرست شکل‌ها

شکل **شماره صفحه**

شکل۱-۱:پیوند پپتیدی ۳

شکل۱-۲:تشکیل پیوند پپتیدی باروش تغلیظ ٤

شکل ۱-۳: اثر غلظت سوبسترا بر روی سرعت اولیه یک واکنش آنزیمی. ۱۲

شکل ۱-۴: منحنی V_0 علیه S_0 در غلظت ثابت آنزیم در واکنش تک سوبسترایی ۱۵

شکل ۱-۵: نمودار لینویور-برک ۱۸

شکل ۱-۶:. مهار رقابتی ۱۹

شکل ۱-۷: مهار نارقابتی ۱۹

شکل ۱-۸: مهار غیر رقابتی ۲۰

شکل ۱-۹: ساختار سه بعدی آنزیم پروتئینازK ۲٤

شکل۱-۱۰: تصویر فضایی از زنجیره کربن های آلفا پروتئیناز K ۲۵

نمودار ۳-۱: نمودار اولیه‌ی سرعت علیه غلظت سوبسترای آنزیم پروتئینازK در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴ ..... ۳۵

نمودار ۳-۲: نمودار لینویور-برک آنزیم پروتئیناز¬ Kدر دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴. ..... ۳٦

نمودار ۳-۳: اثر غلظت های مختلف اوره بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ Kدر دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ۳۷

نمودار ۳-۴: اثر غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ Kدر دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ۳۸

نمودار۳-۵: نمودار ثانویه ی تغییرات $1/V_{max}$ آنزیم پروتئیناز¬ Kعلیه تغییرات غلظت گوانیدین هیدرو کلرید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ۳۹

نمودار ۳-۶: اثر غلظت های مختلف نانو ذره‌ی اکسید نیکل بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ Kدر دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤۰

نمودار ۳-۷: اثر غلظت های مختلف نانو ذره‌ی اکسید تیتانیوم بر سینتیک آنزیم پروتئینازK در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤۲

نمودار۳-۸: نمودار ثانویه‌ی تغییرات V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز¬ Kعلیه تغییرات غلظت نانوذراتTiO_2 و NiO در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴.....۴۳
نمودار ۳-۹: اثر غلظت های مختلف متانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ .....۴۴
نمودار ۳-۱۰: اثر غلظت های مختلف اتانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ .....۴۵
نمودار ۳-۱۱: اثر غلظت های مختلف ایزو پروپانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴.....۴۷
نمودار ۳-۱۲: اثر غلظت ۱۰ ٪ حلال های آلی متانول، اتانول و ایزو پروپانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴.....۴۹
نمودار ۳-۱۳: اثر غلظت ۳۰ ٪ حلال های آلی متانول، اتانول و ایزو پروپانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴.....۵۰
نمودار ۳-۱۴: اثر ۵۰ ٪ حلال های آلی متانول، اتانول و ایزو پروپانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ .....۵۱
نمودار ۳-۱۵: اثر ۷۰ ٪ حلال های آلی متانول، اتانول و ایزو پروپانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز¬ K در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴.....۵۲

فهرست جدول‌ها

جدول | شماره صفحه

جدول ۱-۱: طبقه بندی بین المللی آنزیم ها ۹

جدول۲-۱: مواد مورد نیاز ۳۱

جدول ۳-۱: تغییرات V_{max}(فعالیت)، K_m و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در غلظت های مختلف اوره در pH=۷/۴ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد. ۳۷

جدول ۳-۲: تغییرات V_{max}، K_m و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ۳۹

جدول ۳-۳: تغییرات V_{max}، K_m و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف نانو ذره‌ی اکسید نیکل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤١

جدول ۳-۴: تغییرات V_{max}، K_m و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف نانو ذره‌ی اکسید تیتانیوم در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤٢

جدول ۳-۵: تغییرات V_{max}, K_m و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف متانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤٤

جدول ۳-۶: تغییرات K_m, V_{max} و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف اتانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤٦

جدول ۳-۷: تغییرات V_{max}، K_m و V_{max}/K_m آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف ایزو پروپانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٤٨

جدول ۳-۸: تغییرات V_{max} آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت های مختلف متانول،اتانول و ایزوپروپانول در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۷/۴ ..... ٥٢

فصل اول

مقدمه

۱-۱پروتئین‌ها:

پروتئین‌ها ترکیبات بیوشیمیایی متشکل از یک یا چند پلی‌پپتید هستند که به طور معمول به یک فرم کروی یا رشته‌ای تا شده و یک عملکرد زیستی را تسهیل می‌کنند. هر پلی‌پپتید یک زنجیره خطی از اسیدآمینه-هاست که توسط باندهای پپتیدی بین گروه‌های کربوکسیل و آمینوی، اسیدآمینه‌های مجاور، به هم متصل شده‌اند. یک پروتئین به طور معمول دارای ۳۰۰-۲۰۰ اسیدآمینه است اما بعضی بسیار کوچک‌تر وبرخی بسیار بزرگ‌ترند. (Levitt and chothia, 1976). تنوع پروتئین‌ها از لحاظ اندازه، شکل و فعالیت با وجود تشکیل شدن از تنها ۲۰ واحد متفاوت اسیدآمینه در کل ارگانیسم‌ها قابل توجه است.پروتئین‌ها ابزارهای مولکولی برای بیان اطلاعات ژنتیکی می‌باشند(Lodish, et al. 2008). سلول‌ها می‌توانند با اتصال همین ۲۰ اسیدآمینه با ترکیبات و توالی‌های بسیار متنوع، پروتئین‌ها را تولید نمایند که ویژگی‌ها و فعالیت‌های فوق العاده متنوعی دارند. موجودات مختلف می‌توانند با استفاده از این بلوک‌های ساختمانی محصولات بسیار متفاوتی نظیر آنزیم-ها، هورمون‌ها، آنتی بادی‌ها، انتقال‌دهنده‌ها، عضله، پروتئین عدسی چشم، پر، تار عنکبوت شاخ کرگدن، پروتئین‌های شیر، آنتی بیوتیک‌ها، سموم قارچی و تعداد زیادی از موارد دیگر با فعالیت بیولوژیک متفاوت، ایجاد نمایند که از میان این محصولات، آنزیم‌ها تنوع بیش‌تری داشته و اختصاصی‌تر می‌باشند. در واقع تمامی واکنش‌های سلولی توسط آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند(Lehninger, 2005).

۱-۱-۱-اسیدهای آمینه:

تمامی ۲۰ نوع اسیدآمینه یافت شده در پروتئین‌ها، α-آمینواسید می‌باشند.این مولکول‌ها دارای یک گروه کربوکسیل و یک گروه آمینو متصل به یک اتم کربن(کربن α) می باشند. تفاوت اصلی آن‌ها در زنجیره جانبی یا گروه R آن‌ها می‌باشد که از نظر ساختار، اندازه و بار الکتریکی در اسیدهای‌آمینه گوناگون متفاوت بوده و بر حلالیت اسیدآمینه در آب تأثیر گذار است. ۲۰ اسیدآمینه موجود در ساختار پروتئین‌ها را اغلب با عنوان اسیدآمینه استاندارد یاد می‌کنند. اسیدهای‌آمینه شرکت کننده در ساختار پروتئین‌ها به فرم انانتیومر L خود هستند و تنها در معدودی پپتیدهای کوتاه، از جمله پپتیدهای دیواره سلولی باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی خاص رزیدو های D-آمینواسید دیده شده‌است(Lodish, et al. 2008) .

۱-۱-۲-انواع پروتئین:

۱-۱-۲-۱-پروتئین‌های فیبری:

این دسته از پروتئین‌ها، در آب حلالیت کمی داشته و برخی از آنها غیر محلول می‌باشند به طوری‌که قادرند نقش ساختاری ایفا کنند. از این گروه می توان به آلفا- کراتین و کلاژن اشاره نمود.

۱-۱-۲-۲-پروتئین‌های کروی:

این دسته از پروتئین‌ها در آب محلول بوده و امکان دارد که از محلول، کریستاله شوند و نقش عملکردی در ارگانیسم‌های زنده دارند. آنزیم‌ها، در این گروه جای دارند.همه پروتئین‌ها از واحدهای L- آمینواسید ، تشکیل می‌گردند که توسط پیوندهای پپتیدی به یکدیگر متصل می‌شوند. توالی آمینواسیدی در پروتئین‌ها، ویژه است که با ساختار مواد ژنتیکی سلول تعیین می‌شود و در نتیجه هر پروتئین، خصوصیات مشخصی دارد.

۱-۱-۲-۳-پروتئین‌های تک واحدی:

پروتئین‌هایی هستند که فقط واجد یک زنجیر پلی‌پپتیدی بوده و بنابراین به واحدهای کوچک‌تری تجزیه نمی‌گردند. تعداد کمی از آنزیم‌های منومریک شناخته شده‌اند و همه آن‌ها واکنش‌های هیدرولیتیک را کاتالیز می‌کنند. به طور کلی این پروتئین‌ها دارای ۱۰۰ تا ۷۰۰ اسیدآمینه بوده و وزن مولکولی آنها ۳۵۰۰۰-۱۳۰۰۰ دالتون است. یکی از انواع این آنزیم‌ها، کربوکسی پپتیداز A که همراه یک یون فلزی است. هر چند بیشتر این آنزیم‌ها بدون کمک هر نوع کوفاکتوری عمل می‌کنند. پروتئازها نیز در این گروه جای دارند.

۱-۱-۲-۴-پروتئین‌های اولیگومریک:

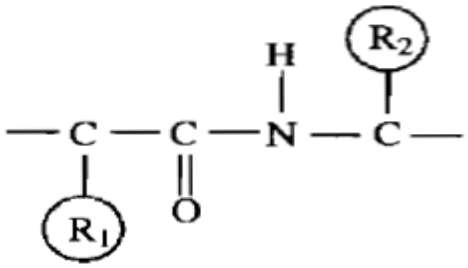
این دسته از پروتئین‌ها از دو یا بیش از دو زنجیر پلی‌پپتیدی تشکیل می‌گردند و معمولاً از طریق اندرکنش-های غیرکووالان به یکدیگر متصل می‌شوند. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی تشکیل دهنده زیر واحد نام داشته که ممکن است مشابه یکدیگر یا متفاوت باشند. پروتئین‌های دایمریک از دو زیر واحد و انواع تریمریک از سه زیر واحد تشکیل می‌شوند. معمولاً جرم مولکولی آنها از ۳۵۰۰۰ – ۱۵۰۰۰ دالتون بیش‌تر است. اکثر آنزیم‌های شناخته شده از دسته الیگومریک هستند. این دسته از آنزیم‌ها به صورت پیش آنزیم‌های غیر فعال سنتز نمی-شوند بلکه فعالیتشان از طریق مهار شدن پس نورد کنترل می‌گردد. به عنوان مثال تمام آنزیم‌های درگیر در فرایند گلیکولیز دو یا چهار زیر واحدی هستند(Tymoczko et al., 2011).

۱-۱-۳-ساختار پروتئین‌ها:

اغلب پروتئین‌ها دارای چهار ساختار می‌باشند: ساختار اول پروتئین توسط توالی آمینواسیدها در هر زنجیره پلی‌پپتیدی، تشکیل می‌گردد که می‌توان این ساختار را از طریق استفاده سیستماتیک از فرایندهای شیمیایی تعیین نمود. خصوصیات ساختمانی منظم و تکرار شونده ساختار دوم را تشکیل می‌دهد. این ساختار به فراوانی در فیبرها و پروتئین‌های ساختاری دیده می‌شود و در بخش‌هایی از پروتئین‌های عملکردی مثل آنزیم‌ها، از بین می‌رود. همه ساختارهای سه بعدی زنجیر پلی‌پپتیدی ساختار سوم، نامیده می‌شوند. پروتئین‌ها ممکن است شامل یک یا تعداد بیشتری از زنجیره‌های پلی‌پپتیدی باشند. ساختار چهارم، مربوط به پروتئین‌هایی است که بیش‌تر از یک زنجیره پلی‌پپتیدی دارند.

۱-۱-۳-۱-ساختار اول:

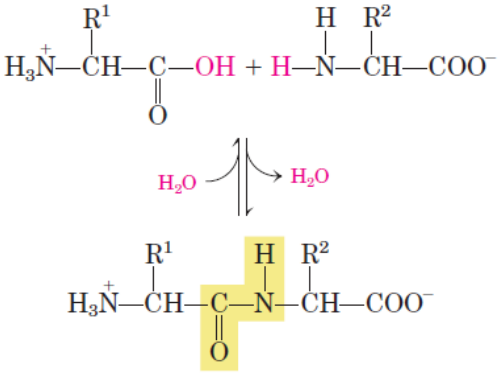
آرایش فضایی اتم‌های موجود در یک پروتئین را صورت‌بندی[1] می‌گویند. توالی آمینواسیدهای موجود در یک زنجیره پلی‌پپتیدی، ساختار اول پروتئین نام دارد. با استفاده از ساختار اول، نه‌تنها شکل نهایی پروتئین ایجاد می‌شود بلکه ویژگی‌های فیزیکی و در نهایت عملکرد بیولوژیکی پروتئین تشخیص داده می‌شود. در واقع پروتئین‌ها از حدود ۲۰ آمینواسید تشکیل شده‌اند که با استفاده از پیوند آمیدی یا پپتیدی به هم متصل می-شوند (شکل ۱-۱).



شکل۱-۱:پیوند پپتیدی

این پیوند با برداشت عناصر یک مولکول آب (دهیدراتاسیون) از گروه‌آلفا-کربوکسیل یک آمینواسید و آلفا-آمینوی آمینواسید دیگر ایجاد می‌گردد (شکل ۱-۲). در یک پپتید، ریشه آمینواسید موجود در انتهای دارای گروه آلفا-آمینوی آزاد را ریشه انتهای آمینو (یا انتهایN) و ریشه موجود در انتهای دیگر دارای یک گروه کربوکسیل آزاد را ریشه انتهای کربوکسیل (یا انتهایC) گویند.

1.conformation



شکل۱-۲:تشکیل پیوند پپتیدی باروش تغلیظ

هرچند هیدرولیز یک پیوند پپتیدی، یک واکنش انرژی‌زا است، به‌خاطر انرژی فعال‌سازی بالای آن، به آهستگی صورت می‌گیرد، لذا پیوندهای پپتیدی موجود در پروتئین‌ها کاملاً پایدارند(Dougherty 2000; Mayo 2000).

۱-۱-۳-۲-ساختار دوم:

شکل سه بعدی زنجیره پلی‌پپتیدی را ساختار دوم گویند. ساختار دوم شامل چند نوع می‌باشد:

۱)مارپیچ آلفا: مارپیچ آلفا یکی از ساختمان‌های دوم معمول پروتئینی است. این ساختار با استفاده از پیوند-های هیدروژنی درون‌زنجیره‌ای که بین هیدروژن آمیدییک پیوند پپتیدی و اکسیژن گروه کربوکسیل پیوند پپتیدی دیگر ایجاد می‌شوند، پایدار می‌گردد.

۲)صورت‌بندی بتا: ساختار دوم دیگر، صورت‌بندی بتا است که در آن زنجیره‌های پپتیدی به‌صورت صفحه سازمان‌دهی می شوند. در این این صورت‌بندی، اسکلت پلی‌پپتیدی به شکل یک ساختمان زیگزاگی، به‌جای مارپیچی، امتداد یافته، وجود دارد. این زنجیره‌های زیگزاگی می‌توانند به‌طور پهلو به پهلو در کنار یکدیگر قرار گرفته و ایجاد ساختمانی مشابه یکسری چین نمایند. در این آرایش که صفحه بتا نامیده‌می‌شود، پیوندهای هیدروژنی بین قطعات مجاور زنجیره پلی‌پپتیدی برقرار می‌گردد. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی مجاور در یک صفحه بتا می‌تواند بصورت موازی همسو یا موازی ناهمسو (به ترتیب دارای جهت‌های آمینو به کربوکسیل یکسان و مخالف) باشند. این ساختمان‌ها قدری مشابه هستند، هرچند صورت‌بندی موازی همسو، دوره تکراری کوتاه‌تر (۶/۵A°، در مقابل ۷A° برای موازی ناهمسو) و الگوی متفاوت پیوندهای هیدروژنی را دارند(Berman 1999; Ponting and Russell 2002).

۳)ترن‌ها[۲]: این ساختارهای ثانویه U-شکل و فشرده، از ۳ یا ۴ رزیدو تشکیل شده که پایداری آن‌ها به علت وجود پیوند هیدروژنی میان رزیدوهای دو انتهای آن‌هاست. ترن‌ها بر سطح پروتئین‌ها قرار می‌گیرند و با ایجاد

2.turn

خم تند، جهت زنجیر پلی‌پپتیدی را به سمت درون آن تغییر می‌دهند. اسیدآمینه‌های گلیسین و پرولین بیش‌تر در این ساختار دیده شده‌اند، زیرا عدم وجود زنجیره جانبی بزرگ در گلیسین و وجود خمیدگی ذاتی در پرولین این دو اسیدآمینه را برای اشغال رزیدوهای دوم و سوم درترن‌ها مناسب گردانیده است. هم‌چنین، یک پلی-پپتید، می‌تواند خم‌های بلندتری به نام حلقه[3] تشکیل دهد که نسبت به ترن‌ها راحت‌تر و با محدودیت کم‌تری تشکیل می‌شوند (Lodish, et al. 2008).

۱-۱-۳-۳-ساختار سوم:

آرایش سه بعدی کلی تمامی اتم‌های موجود در یک پروتئین را ساختمان سوم پروتئین گویند. پروتئین-های کروی به خاطر این‌که تاخوردگی[4] داخلی (ساختار سوم)، کروی دارد، به این اسم نام‌گذاری شده‌اند. این پروتئین‌های کروی محلول در آب هستند، محلول‌های کلوئیدی تشکیل می‌دهند و در شکل جامد، ساختار کریستالی ایجاد می‌کنند. این دسته از پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های عملکردی، آنزیم‌ها، ایمنوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های انتخابی، پروتئین‌های تنظیمی و غیره می‌باشند. در ساختار یک پروتئین کروی، آمینواسیدهای هیدروفوبیک و غیرقطبی در قسمت داخلی مولکول و دور از آب قرار گرفته‌اند در حالی که آمینواسید های قطبی در قسمت خارجی پروتئین قرار دارند. وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین، که از طریق اکسیداسیون دو آمینواسید سیستئین ایجاد می‌شوند، باعث پایداری بیشتر زنجیره پلی‌پپتید تاخورده می-شود(Ringia, Garrett et al. 2004).

۱-۱-۳-۴-ساختار چهارم:

بسیاری از پروتئین‌های کروی، از زیرواحدهای متعددی ساخته شده‌اند که ساختار چهارم، مربوط به این نوع از پروتئین‌ها است. به یک پروتئین چند زیرواحدی، مولتیمر نیز گفته می‌شود. پروتئین‌های مولتیمری می‌توانند از دو تا صدها زیرواحد تشکیل شده باشند(Daggett and Fersht 2003).

۱-۱-۴-عوامل پایدار کننده ساختارهای نوع سوم و چهارم:

ترتیب‌های رده بالاتر ساختار پروتئینی به طور عمده توسط برهم‌کنش‌های غیرکوالانسی پایدار می‌شوند. مهم-ترین آن‌ها برهم‌کنش‌های آب‌گریز هستند که رنجیره‌های جانبی آمینواسیدی را که دارای بیش‌ترین خاصیت آب‌گریزی هستند به درون قسمت داخلی پروتئین می‌رانند بدین ترتیب آن‌ها را از آب دور می‌کنند. سایر برهم‌کنش‌هایی که به ساختار پروتئینی پایداری می‌بخشند شامل پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی بین کربوکسیلات‌های مربوط به اسیدآسپارتیک و گلوتامیک و زنجیره‌های جانبی با بار مخالف، مربوط به رزیدو-های پروتونه لیزیل، آرژینیل و هیستیدیل می‌باشند. هر چند این برهم‌کنش‌ها به خودی خود نسبت به یک پیوند کوالانسی با قدرت ۱۲۰-۸۰ Kcal/mol، ضعیف هستند ولی در مجموع به علت تعداد زیاد، درجه بالایی از پایداری به آرایش فضایی پروتئینی فعال از نظر زیست شناختی اعطا می‌کنند(Dill K. A. et al., 1995).

3.loop

4.Folding

برخی پروتئین‌ها حاوی پیوندهای دی‌سولفیدی کوالانسی هستند که گروه‌های سولفیدریل مربوط به رزیدوهای سیستئین را به هم متصل می‌کنند. تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی مستلزم اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل مربوط به سیستئین بوده و نیازمند اکسیژن است. پیوندهای دی‌سولفیدی درون پلی‌پپتیدی باعث پایداری بیش‌تر آرایش فضایی خمیده مربوط به یک پپتید می‌شود، در حالی که پیوندهای دی‌سولفیدی بین پلی‌پپتیدی ساختار نوع چهارم پروتئین-های اولیگومریک خاص را پایدار می-کنند(Dill K. A. et al., 1995).

۱-۱-۵-نقش نیروهای غیرکووالان در پایداری پروتئین‌ها:

نیروهای غیرکووالان باعث می‌شوند که یک پلی‌پپتید، تا خورده و آرایش طبیعی ویژه خود را به دست آورده و سپس ساختار طبیعی در برابر دگرگون شدن پایدار می‌شود. نیروهای غیرکووالان، نیروهای اتصالی ضعیفی با قدرت $^{-1}$Kcalmol ۷-۱ ($^{-1}$KJmol ۲۹-۴) هستند. این نیروها ممکن است با قدرت اتصال پیوند کووالان مقایسه شوند، که حداقل قدرت پیوندی آن معادل $^{-1}$Kcal mol ۵۰ است. اگرچه این نیروها به تنهایی خیلی ضعیف هستند تعداد زیادی از نیروهای غیرکووالان، انرژی زیادی برای تاخوردن پروتئین فراهم می-کنند(Devlin, 2011).

۱-۱-۶-خواص پروتئین‌ها:

۱-۱-۶-۱-حلالیت پروتئین‌ها:

حلالیت پروتئین‌ها بر حسب نوع مولکول مورد نظر خیلی متغییر است و از طرف دیگر، غلظت الکترولیت‌ها و تأثیر pH دو شاخص اصلی بشمار می‌روند(Branden C. and Tooze J, 1991).

تأثیر pH

در حالت کلی حلالیت پروتئین در pH ایزوالکتریک به حداقل خود می‌رسد(Branden C. and Tooze J, 1991). در pHهای بسیار بالا، ساختار سوم از بین می‌رود و یک ساختار بی‌نظم‌تر تشکیل می‌شود به این فرآیند، دناتوراسیون[5] می‌گویند. از آن‌جایی‌که ساختار سوم یک پروتئین حلقوی فعال، توسط گروه‌های هیدروفوبیکی که درون مولکول قرار گرفته‌اند مشخص می‌شود، با از بین رفتن ساختار سوم، این گروه‌های هیدروفوب در تماس با حلال آلی قرار می‌گیرند (به سطح می‌آیند) و در نتیجه حلالیت پروتئین کاهش می-یابد(Palmer 2001).

تأثیر نیروی یونی

پروتئین‌ها فقط در یک نیروی یونی مشخصی محلول هستند. در این زمینه نمک‌ها از نظر میزان بار و غلظت نقش مهمی دارند. معادله نیروی یونی به شرح زیر است:

$$\mu=1/2 \sum C\times Z^2$$

C : غلظت هر یک ار یون‌ها بر حسب مولاریته

Z : ظرفیت هر یک از یون‌ها

5.Denaturation

تأثیر دما

افزایش دما عاملی است که باعث تغییر ماهیت پروتئین‌ها گشته و در اکثر مواقع موجب رسوب کردن آن‌ها می شود. درآنزیم‌ها وقتی دما زیاد می‌شود فعالیت نیز تغییر می‌کند، تا محدوده خاصی از دما با افزایش دما میزان واکنش افزایش می‌یابد و با افزایش بیشتر دما، آنزیم دناتوره شده و فعالیت کاتالیتیکی آن کم می-شود(Palmer 2001).

تأثیر حلال آلی

پروتئین‌ها در حلال آلی حل نمی‌شوند و از این خاصیت در جدا کردن آن‌ها استفاده می‌شود. برخی از پروتئین‌ها در درصدهای بالای حلال آلی به صورت محلول باقی می‌مانند(Mattos C. and Ringe D, 2001).

۱-۱-۶-۲-تعیین pH ایزوالکتریک:

اگر پروتئین‌ها را در محلول تامپون‌دار و در یک میدان الکتریکی مداوم قرار دهیم بر حسب بار خود به طرف آند یا کاتد حرکت می‌کنند ولی در نقطه ایزوالکتریک خود هیچ حرکتی ندارند. نقطه ایزوالکتریک را به‌طور تجربی به وسیله الکتروفورز یا الکتروفوکالیزاسیون تعیین می‌نمایند(Branden C. and Tooze J, 1991).

pH ایزوالکتریک یک پروتئین، pHای است که در آن بار الکتریکی خالص برابر با صفر است، یا می-توان گفتpHای که در آن ویژگی‌های اسیدی و بازی با هم در تعادل‌اند.

۱-۲-آنزیم‌ها:

آنزیم‌ها پروتئین‌های تخصص‌یافته‌ای هستند که واکنش‌های زیستی را کاتالیز می‌کنند. تقریباً هر واکنشی که در سلول اتفاق می‌افتد نیاز به فعالیت یک آنزیم دارد زیرا اکثر واکنش‌ها نمی‌توانند تحت شرایط فیزیولوژیک سلول (نظیر pH، دما و محیط یونی) رخ دهند. آنزیم‌ها کاتالیزورهای کارایی هستند. آن‌ها نه‌تنها سرعت تبدیل سوبسترا به محصول را افزایش می‌دهند، بلکه یک ساختار اختصاصی را در حضور ساختارهای مشابه برای تولید یک محصول خاص تشخیص می‌دهند (Suckling 1990).کاتالیزورها از طریق کاهش انرژی فعال سازی، سرعت واکنش‌های شیمیایی ممکن را افزایش می‌دهند. در حقیقت علت این که آنزیم‌ها در شرایطی که کاتالیزورهای غیرزیستی در عمل بی تأثیراند به خوبی نقش خود را ایفا می‌کنند، این است که از طرفی سرعت واکنش‌های شیمیایی را به شدت افزایش می‌دهند و از طرفی بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. سرعت یک واکنش در حضور آنزیم به طور معمول، $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۱۲}$ برابر سرعت آن در حضور کاتالیزور و در شرایط طبیعی می‌باشد. اکثر آنزیم‌ها درون سلول‌ها قرار دارند، اما برخی نیز ترشح شده و در خون، فضای درون لوله گوارشی، یا فضاهای خارج سلولی دیگر عمل می‌کنند. برخی آنزیم‌های میکروبی نیز از سلول ترشح شده و در خارج از سلول فعال‌اند(Lodish, et al. 2000).

بعضی از آنزیم‌ها برای فعالیت، علاوه بر ریشه‌های آمینواسید خود نیاز به گروه‌های شیمیایی دیگری ندارند. در حالی‌که سایر آنزیم‌ها نیاز به جزء شیمیایی دیگری بنام کوفاکتور دارند که ممکن است یک یا چند یون معدنی نظیر Fe^{2+}، Mg^{2+}، Mn^{2+} و Zn^{2+} یا یک مولکول آلی یا فلزی-آلی پیچیده بنام کوآنزیم باشد. برخی آنزیم‌ها برای فعالیت هم به کوآنزیم و هم به یک یا چند یون فلزی نیاز دارند. یک کوآنزیم و یا یون فلزی که به‌طور محکم و یا حتی کووالان به پروتئین آنزیم متصل شده است را گروه پروستتیک گویند. یک