بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه پیام نور

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته شیمی فیزیک

دانشکده علوم

گروه علمی شیمی

مرکز ابهر

ترمودینامیک پیوند تئوفیلین به آلبومین سرم انسان

استاد راهنمای اول:

دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی

استاد راهنمای دوم:

پروفسور علی اکبر صبوری

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا پورهروی

نگارش:

ساناز طهماسبی سروستانی

آذر ماه ۱۳۸۸

تقدیم

به پدر بزرگوارم که اسطوره‌ی پاکی است و ایستادگی

و

به مادر عزیزم که مظهر مهر است و فداکاری

سپاسگزاری

در ابتدای سخن حمد و شکر و سپاس، خدای را، آن نخستین بی‌پیشین را و آن آخرین بی‌پسین را...

سپاس فراوان و بی‌نهایت از اساتید ارجمندم،

جناب آقای دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی و جناب آقای پروفسور علی اکبر صبوری که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند و همواره از توجهات بی دریغ و راهنمایی‌های بی‌شمار ایشان هم از نظر علمی و هم از نظر اخلاقی بهره مند بوده ام.

تشکر بسیار از استاد مشاور محترم،

جناب آقای دکتر محمدرضا پورهروی که در طی این مدت از همراهی صمیمانه و مساعدت بی دریغ ایشان بهره‌مند گشتم.

سپاس بیکران از استاد محترم،

جناب آقای دکتر محمود پایه قدر استاد و رئیس محترم دانشگاه پیام نور مرکز ابهر که زحمت مطالعه، تصحیح و داوری این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند.

و تشکر فراوان از استاد محترم،

جناب آقای مهندس جعفر عابدینی نماینده‌ی محترم تحصیلات تکمیلی که زحمت نمایندگی این پایان‌نامه را برعهده داشته اند.

چکیده‌ی فارسی

آلبومین سرم انسان فراوان ترین و مهم ترین پروتئین ناقل داروها در بدن موجودات زنـده مـی باشـد. این پروتئین دارای دو جایگاه عمده جهت اتصال داروها به آن بوده و پس از اتصال آنان را بـه بافـت هدفشان می رساند.

پارامترهای برهمکنش میان تئوفیلین و آلبومین سرم انسان در محلول بافر ۳۰mM و دمای ۲۷ توسط دستگاه کالریمتری تیتراسیونی هم دما به دست آمده است. با استفاده از آنالیز گرماهای به دست آمـده از این اتصال، پارامترهایی همچون جایگاه اتصال، ثابت تفکیک و آنتالپی اتصال مولی به دست آمـده اند.

جایگـاه اتـصال اول شـامل دو جایگـاه اتـصال بـرای دارو بـا ثابـت تعـادل ۲ و آنتـالپی مـولی ٦,٨ kJ/mol- و جایگاه اتصال دوم شامل شش جایگـاه اتـصال بـا ثابـت تعـادل ٦ و آنتـالپی مـولی ٤,٥ kJ/mol- می باشند.

با توجه به پارامترهای به دست آمده می توان نتیجه گرفت جایگاه اول اتصال اگرچه شـامل جایگـاه-های کمتری جهت اتصال داروست، اما تمایل اتصال دارو به ایـن جایگـاه بیـشتر از جایگـاه دوم مـی باشد.

کلید واژگان: آلبومین سرم انسان، تئوفیلین، کالریمتری تیتراسیونی هم دما، ثابت های اتصال

فهرست

فصل اول : مقدمه و پیشینه تحقیق

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- پروتئین‌ها ٦

۱-۳- اهمیت پپتیدها ۹

۱-٤- تعیین توالی پروتئین‌ها ۱۰

۱-۵- نیروهای غیرکووالان در ساختار پروتئین ۱٤

۱-٦- روش‌های متعدد تقسیم بندی پروتئین‌ها ۱٦

۱-۷- چهار نوع ساختمان در پروتئین‌ها ۱۷

۱-۸- تاخوردگی و مجتمع شدن پروتئین‌ها ۲۹

۱-۹- غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها ۳۱

۱-۹-۱-حالت‌های غیرطبیعی شدن پروتئین ۳۲

۱-۹-۲- تقسیم بندی حالت‌های غیرطبیعی شده ۳۲

۱-۱۰-روش‌های غیرطبیعی کردن پروتئین‌ها ۳۳

۱-۱۱- آلبومین سرم انسان ۳۵

۱-۱۱-۱-منابع آلبومین ۳۵

۱-۱۱-۲-خالص سازی و خصوصیات ساختاری ۳٦

۱-۱۲- ساختارهای آلبومین سرم انسان ۳۷

۱-۱۳-روند دستیابی به ساختار آلبومین سرم انسان ٤۵

۱-۱٤- توزیع بارهای سطحی و مدل فضایی آلبومین ٤٦
۱-۱۵- انعطاف پذیری کنفورماسیونی با تغییرات pH ٤٨
۱-۱٦- بازشدگی و غیرطبیعی شدن ملکول آلبومین ٥٢
۱-۱۷- ماهیت اتصال لیگاند به آلبومین سرم انسان ٥٢
۱-۱۸- مفهوم گیرنده و ضرورت مطالعه‌ی اندرکنش‌های آلبومین ٦٢
۱-۱۹- مطالعه‌ی برهمکنش تئوفیلین با آلبومین سرم انسان ٦٤
۱-۲۰- اندرکنش‌های داروهای گوناگون با سرم آلبومین ٦٥
۱-۲۰-۱- برهمکنش آمفیفیلیک پنی سیلین با آلبومین سرم انسان ٦٥
۱-۲۰-۲- برهمکنش داروهای ضد تومور با آلبومین سرم انسان ٦٨
۱-۲۰-۳- برهمکنش داروی ضد افسردگی با آلبومین سرم انسان ٦٩
۱-۲۰-٤- برهمکنش داروهای بیهوشی با آلبومین سرم انسان ۷۱
۱-۲۰-۵- تعیین ثابت‌های اتصال چند داروی معروف و روزمره با آلبومین سرم انسان ۷۳
۱-۲۱- مطالعه پیوند شدن لیگاندها به ماکروملکول ها ۷٤
۱-۲۱-۱-اتصال لیگاند به یک جایگاه ۷۵
۱-۲۱-۲-اتصال لیکاند به یک مجموعه جایگاه یکسان و مستقل ۷٦
۱-۲۱-۳- اتصال لیکاند به بیش از یک مجموعه جایگاه یکسان و مستقل ۷۷
۱-۲۱-٤- اتصال به مجموعه‌ای از جایگاه‌های یکسان و غیرمستقل ۷۹
۱-۲۱-۵- اثرات رقابتی بین لیگاندهای مختلف برای جایگاه پیوندی یکسان ۸۱
۱-۲۱-٦-پیوند لیگاند به مجموعه‌ای از جایگاه های پیوندی یکسان و غیرمستقل ۸۲

۱-۲۲- کاربرد روش کالریمتری در روش انحلال ۸۳

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده ۸۷

۲-۲- دستگاه مورد استفاده ۸۷

۲-۳- دستگاهوری کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۸۷

۲-٤-نحوه ی انجام آزمایش در دستگاه کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۹٤

فصل سوم: بحث و نتیجه گیری

۳-۱- نتایج خام و محاسبات اولیه ۹٦

۳-۲- ارائه فرمول‌بندی جدید برای محاسبه‌ی پارامترهای ترمودینامیکی اتصال دارو به HSA ۹۸

۳-۳-بررسی داده‌های میکروکالریمتری با استفاده از تئوری انحلال در برهمکنش تئوفیلین باHSA ۱۰۱

۳-٤-نتیجه گیری کلی ۱۰۷

مراجع ۱۰۸

پیوست ۱۱٦

چکیده‌ی انگلیسی ۱۱۸

فهرست جداول

جدول۱-۱- تعداد و نوع آمینواسیدهای آلبومین سرم انسان ۳۸

جدول۱-۲- لیگاندهای مختلف که برهمکنش آنان با آلبومین مطالعه شده است ٥٤

جدول۱-۳- پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش آمفیفیلیک پنی سیلین‌ها و آلبومین سرم انسان ٦٧

جدول۱-٤- پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش داروهای ضدتومور و آلبومین سرم انسان ٦٨

جدول۱-٥- مقادیر واحدهای سازنده‌ی آلبومین در دو دسته جایگاه پیوندیشان ٦٩

جدول۱-٦- تعداد ملکول‌های کلومیپرامین جذبی بر روی آلبومین ۷۱

جدول۱-۷- پارامترهای ترمودینامیکی برهمکنش داروهای بیهوشی با آلبومین سرم انسان ۷۲

جدول۱-۸- ثابت اتصال هشت داروی گوناگون با آلبومین سرم انسان ۷۳

جدول۳-۱- پارامترهای ترمودینامیکی حاصل از برهمکنش تئوفیلین با آلبومین سرم انسان ۱۰٦

فهرست اشکال

شکل ۱-۱-ساختمان کلی اسیدهای آمینه ۷

شکل۱-۲-صورت‌های مختلف گروه‌های آمین و اسید کربوکسیلیک در محلول ۸

شکل۱-۳-پیوند پپتیدی و نحوه‌ی ایجاد آن ۹

شکل۱-٤- روش سانگر ۱۲

شکل۱-٥- واکنش ادمن جهت تعیین توالی پلی پپتیدها ۱۳

شکل۱-٦-نحوه‌ی قرارگیری اتم‌های زنجیره‌ی اصلی یک پپتید حول محور یک مارپیچ آلفا ۲۰

شکل۱-۷-نمای محوری یک مارپیچ آلفا از بالا ۲۰

شکل۱-۸-پیوندهای نیتروژنی در مارپیچ آلفا ۲۱

شکل۱-۹-مدل یک صفحه‌ی چین‌دار بتا ۲۳

شکل۱-۱۰-ساختار سوم پروتئین‌ها ۲۷

شکل۱-۱۱-نمونه‌ای از تاخوردگی پروتئین ۳۰

شکل۱-۱۲-توالی اسیدهای آمینه‌ی آلبومین سرم انسان ٤۱

شکل۱-۱۳-توالی کامل اسیدهای آمینه آلبومین و نمایش گروه تیول آزاد ٤۲

شکل۱-۱٤-شکل فضایی زیردمین A ٤٤

شکل۱-۱٥-شکل فضایی زیردمین B ٤٤

شکل۱-۱٦-شکل کلاسیک آلبومین ٤٥

شکل ۱-۱۷-توپولوژی کلی آلبومین ٤٦

شکل ۱-۱۸-مدل فضا پرکن سرم آلبومین ٤۷

شکل ۱-۱۹-فرم های N، FوE آلبومین سرم انسان ٤٩

شکل ۱-۲۰-ساختار شیمیایی تئوفیلین ٦٤

شکل۱-۲۱- ساختار شیمیایی کلوکساسیلین و دی کلوکساسیلین ٦٦

شکل ۱-۲۲- ساختار شیمیایی داروهای ضد افسردگی ۷۰

شکل ۱-۲۳- محل اتصال برخی داروها به آلبومین سرم انسان ۷٤

شکل ۱-۲٤- نمودار اسکاچارد برای ماکروملکولی با جایگاه یکسان و مستقل ۷۷

شکل ۱-۲۵- نمودار اسکاچارد سیستم‌های غیرمتعاون،متعاون و ضدمتعاون ۸۳

شکل ۲-۱-مبادله‌ی گرما در میکروکالریمتری هم‌دما ۸۸

شکل ۲-۲-طرح واژه‌ی کلی نشان دهنده‌ی فعالیت گرمایی ۸۹

شکل ۲-۳-سل نمونه در میکروکالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۹۱

شکل ۲-٤-نمونه ای از ترموگرام کالریمتری تیتراسیونی هم‌دما ۹۳

شکل ۳-۱-نمودار گرمای حاصل از هر بار تزریق بر حسب شماره‌ی تزریق‌ها ۹۷

شکل ۳-۲-نمودار گرما بر حسب غلظت تئوفیلین ۱۰۲

شکل ۳-۳-نمودار مجموع گرماها بر حسب غلظت آلبومین سرم انسان ۱۰۳

شکل ۳-٤-نمودار انرژی آزاد گیبس بر حسب غلظت تئوفیلین ۱۰٤

شکل ۳-۵-نمودار TΔS بر حسب غلظت تئوفیلین ۱۰۵

فصل اول

مقدمه و پیشینه تحقیق

۱-۱-مقدمه

بررسی ساختمان و خواص ساختمانی مواد و نیروهای موجود در شرایط زمانی ومکانی، در محدوده‌ی دانش فیزیک قرار دارد. این تعریف تنها برای دانش مواد ظاهراً بی جان صدق نمی‌کند، بلکه علوم زیستی نیز مانند بسیاری از دانش‌های دیگر بر پایه‌ی قوانین فیزیکی استوار است. در علم شیمی، این وابستگی به حدی است که در بسیاری ,ر مواد نمی‌توان قوانین فیزیکی را از قوانین شیمیایی منفک داشت.

بر اساس موارد ذکر شده، علم بیوشیمی فیزیک مطالعه در شیمی فیزیک پدیده‌های حیاتی در تمام سطوح است که بررسی ملکول‌ها و خواص فیزیکی و شیمیایی مواد حیاتی و کلاً آنچه را که با موجود در ارتباط است، به عهده دارد.

گرچه شیمی فیزیک و بیوشیمی فیزیک را دانش‌های قرن بیستم نامیده اند، لیکن قوانین این علم و راه حل مسائل مربوط به آن، در تمامی ادوار جزء لاینفک مطالعه علمی دانشمندان بوده است.

امروزه شیمی فیزیک علاوه بر مطالعه‌ی خواص و آثار فیزیکوشیمیایی به مطالعه‌ی مسائلی مانند فرایندهای فیزیکوشیمیایی جانداران نیز می‌پردازد.

به نظر می‌رسد که قوانینی که بر اساس آن اعمال مختلف موجودات زنده انجام می‌شود، یکسان است. در مورد این قوانین فیزیکوشیمیایی و پدیده‌های مختلف حیاتی فرضیه هایی بیان و ارائه شده است. بدین ترتیب تمامی دانش فیزیکی مربوط به موجودات زنده را تحت عنوان کلی بیوشیمی فیزیک به کار می‌برند. بیوشیمی فیزیک مطالعه‌ی شیمی فیزیکی ملکول‌های فعال بیوشیمیایی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و به طور کلی بیوپلیمرها را عهده دار است.

مطالعات این چنینی در بسیاری از زمینه‌های علوم مانند ژنتیک، فیزیولوژی (مطالعه‌ی عملکرد بدن)، ایمنی شناسی، فارماکولوژی و داروسازی، علوم سم‌شناسی (بدلیل تأثیر سموم بر فرایندهای زیستی بدن)، جنبه‌های اساسی آسیب شناسی (مطالعه‌ی بیماری‌ها)، میکروب‌شناسی ، گیاه‌شناسی و... مورد استفاده قرار می‌گیرد.

به طور کلی می‌توان گفت سدهای قدیمی میان علوم زیستی در حال شکستن است و شیمی فیزیک بدن جانداران به طور فزاینده‌ای زبان مشترک آن‌ها مطرح می‌شود. درک سلامت، حفظ آن و فهم درمان مؤثر بیماری‌ها مسائل اصلی فعالان علوم تندرستی است. بیوشیمی فیزیک تأثیر عمیقی بر این

مسائل داشته و به عبارتی می‌توان گفت این رشته تحت یک رابطه‌ی دو طرفه با تمامی رشته‌های علوم قرار گرفته است.

اکثر بیماری‌ها، تظاهر اختلالات ملکولی هستند. عوامل اصلی مسئول ایجاد بیماری‌ها عبارتند از: عوامل فیزیکی (تغییرات ناگهانی فشار جو، شوک الکتریکی، دمای بسیار زیاد یا کم)، عوامل شیمیایی (ترکیبات خاص سمی)، عوامل زیستی (ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و...)، کمبود اکسیژن (کاهش خون رسانی، کاهش ظرفیت خون در حمل اکسیژن و....)، اختلالات ژنتیکی(مادرزادی)، واکنش‌های ایمنی، عدم توازن تغذیه‌ای (کمبودها و اضافه‌ها) و اختلالات غددی (کمبودها و افزایش هورمونی). این عوامل بر یک یا چند واکنش شیمیایی یا ملکولی حیاتی در بدن تأثیر گذاشته و منجر به بروز بیماری می‌شوند. مطالعات بیوشیمیایی جهت تشخیص این بیماری‌ها و مطالعات شیمی فیزیک زیستی جهت تجویز میزان نوع داروی مرتبط با هر بیماری، به درمان آنان کمک می‌کند.

لیگاند، یون یا ملکولی است که از طریق پیوند داتیو با یک هسته‌ی مرکزی ارتباط برقرار کرده و ایجاد کمپلکس می‌کند.

برهمکنش‌های میان لیگاند و ماکروملکول‌ها، از نوع برهمکنش‌های فیزیکی است. یک ماکروملکول ممکن است یک یا چند جایگاه پیوندی و یا چندین دسته جایگاه پیوندی داشته باشد. جایگاه‌های پیوندی ممکن است یکسان، غیریکسان، مستقل یا وابسته باشند. برای مطالعه‌ی این گونه برهمکنش‌ها از روش‌های گوناگونی استفاده می‌شود. یکی از مهم ترین این روش‌ها، روش‌های کالریمتری است که با تحلیل داده‌های حاصل از آن می‌توان اطلاعاتی در مورد تعداد مجموعه جایگاه ها، تعداد جایگاه‌های پیوندی در هر مجموعه و قدرت و ماهیت پیوند را به دست آورد. کالریمتری، منبع اصلی اطلاعات ترمودینامیکی بوده و یک روش بسیار مستعد و حساس است. همچنین یک روش عمومی بوده و به این واقعیت بر می‌گردد که از نظر تجربی تمام فرایندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی همراه با مبادله‌ی گرما هستند. طی چند قرن، این واقعیت موجب شده است که اندازه‌گیری های جریان گرما، یکی از قدرتمندترین ابزار بسط دانش و درک وقایع در رشته‌های مختلف علوم و تکنولوژی باشد. کالریمتری یک روش تجزیه‌ای عام و مناسب برای ثبت پدیده‌هایی است که کاملاً ناشناخته بوده و حتی غیر قابل انتظارند.

روش‌های کالریمتری حساس که در حصول اطلاعات ترمودینامیکی نقش داشته‌اند، عبارتند از کالریمتری پیمایش تفاضلی (DSC) [1] و کالریمتری تیتراسیونی هم دما(ITC)[2] .

به کمک DSC طبیعت و اندازه‌ی نیروهای پایدار کننده‌ی ماکروملکول‌های زیستی تحقیق می‌شود. این مطالعات امکان تشریح جزئیات مکانیسمی مربوط به برهمکنش‌های بین نواحی مختلف داخل ماکروملکول‌ها را فراهم می‌سازد. تجربیات، شامل اختلال سیستم تحت مطالعه با تغییر محتوای انرژی گرمایی نمونه (یعنی با پیمایش دما به عنوان متغیر مستقل تحت شرایط آزمایش کنترلی) است. آنگاه ظرفیت گرمایی سیستم در مقابل دما، به عنوان پارامتر قابل مشاهده‌ی ترمودینامیکی، مستقیماً اندازه گیری می‌شود.

آنتالپی بازشدگی ناشی از غیرطبیعی کردن گرمایی نیز توسط این دستگاه اندازه گیری می‌شود. DSC همچنین تغییرات در ظرفیت گرمایی غیرطبیعی شدن پروتئین (ΔCp) را وقتی دما زیاد یا کم می‌شود اندازه می‌گیرد. این دستگاه می‌تواند فاکتورهایی را محاسبه کند که درتاخوردگی[3] و پایداری مولکول زیستی طبیعی شرکت می‌کنند. این فاکتورها شامل برهمکنش‌های هیدروفوبیکی، پیوند هیدروژنی، آنتروپی کنفورماسیونی و محیط فیزیکی (pH، دما، قدرت یونی و...) است.

روش کالریمتری تیتراسیونی هم دما به طور مستقیم گرمای جمع آوری شده از واکنش یا برهمکنش شیمیایی (پدیده‌های پیوند لیگاند، برهمکنش‌های آنزیم سوبسترا و برهمکنش‌های میان اجزا و کمپلکس‌های چند ملکولی) در دمای ثابت را با استفاده از شبکه‌ی بازخورد[4] سلولی بین دو سلول یکی سلول نمونه، شامل پروتئین و سلول مرجع شامل آب یا بافر را اندازه گیری می‌کند.

محلول لیگاند توسط یک سرنگ به درون سلول شامل محلول ماکرومولکول در دمای ثابت تیتر می‌شود. وقتی لیگاند به درون سلول تزریق می‌شود دو ماده با هم برهمکنش می‌کنند و متناسب با مقدار پیوند گرما آزاد یا جذب می‌شود. وقتی ماکرومولکول از لیگاند اشباع می‌شود، علامت گرمایی کاهش می‌یابد تا فقط گرمای رقیق شدن مشاهده شود. دستگاه مقدار گرمایی را که برای جبران اختلاف دما بین سلول نمونه و مرجع نیاز می‌باشد اندازه می‌گیرد. از این طریق دستگاه قادر به تعیین

[1] Differential scanning calorimetry

[2] Isothermal titration calorimetry

[3] folding

[4] feedback

پارامترهای ترمودینامیکی مانند تغییر آنتالپی(ΔH)، ثابت تعادل (K)، تعداد جایگاه پیوندی (g) وتغییرات آنتروپی (ΔS)حاصل از برهمکنش دو ملکول است.

هدف از این پایان نامه بکارگیری تئوری‌های جدید کالریمتری و انحلال در برهمکنش میان تئوفیلین و آلبومین سرم انسان جهت بدست آوردن پارامترهای ترمودینامیکی اعم از تعداد جایگاه‌های اتصال، ثابت اتصال، تغییرات آنتالپی واکنش و... است که امکان اظهار نظر در مورد فعالیت زیستی آلبومین را به ما می دهد. به این ترتیب می‌توان میزان پایداری آلبومین را در برهمکنش آن با تئوفیلین بررسی نموده و از نتیجه‌ی آن جهت تشخیص مکانیسم تأثیر این دارو کمک گرفت.

۱-۲- پروتئین‌ها

پروتئین‌ها درشت ملکول‌های پیچیده‌ی فیزیکی و عملکردی هستند که نقش‌های حیاتی متعددی ایفا می‌کنند. شبکه‌ی پروتئینی داخل سلولی، اسکلت سلولی، شکل و ثبات فیزیکی سلول را حفظ می‌کند [۱]. از آنجایی که تمامی سلول‌های تشکیل دهنده‌ی بدن جانداران حاوی پروتئین می‌باشند بنابراین بکار بردن کلمه "عامل زندگی" برای این درشت ملکول‌های حیاتی، خالی از لطف نیست. پروتئین‌ها با دارا بودن عملکردهای متفاوت مهمترین ماده موجود بدن موجودات زنده به شمار می‌آیند [۲]. از جمله این اعمال می‌توان به حمل ونقل ویتامین‌ها، اکسیژن و دی اکسید کربن و اعمال ساختمانی، کینتیک، کاتالیتیک، پیام رسانی و انتقال مواد مختلف به بافت‌های هدفشان اشاره کرد [۳].

پروتئین‌ها، پلیمرهای متراکمی از اسیدهای آمینه هستند که توسط پیوندهای پپتیدی (آمیدی) به یکدیگر متصل شده اند و دارای وزن بالای ۱۰۰۰ دالتن هستند. آن ها را پپتید و یا گاهی پلی پپتید نیز می‌نامند [٤-۲].

خلوص بالای پروتئین برای تعیین جزئیات ویژگی‌های فیزیکی و عملکردی آن لازم است، سلول‌ها حاوی هزاران نوع پروتئین مختلف هستند که از نظر مقدار، تنوع وسیعی دارند. بنابراین، جداسازی یک پروتئین خاص به مقدار کافی برای آنالیز، نیازمند تلاش قابل ملاحظه‌ای است که شامل استفاده از روش‌های متعدد و متوالی تخلیص است[۱]. در روش‌های قدیمی از تفاوت‌هایی در حلالیت نسبی هر کدام از پروتئین‌ها به عنوان تابعی از pH (رسوب ایزوالکتریک)، قطبیت (رسوب با اتانل یا استن)، یا غلظت نمک (رسوب با آمونیوم سولفات) جهت جداسازی استفاده می‌شد.

اسیدهای آمینه اعمال متعددی در سلول‌های زنده به عهده دارند که از آن جمله می‌توان به نقش آن‌ها به عنوان واحدهای منومری که زنجیره‌های پلی پپتیدی پروتئین‌ها از آن‌ها ساخته می‌شوند، اشاره کرد. اکثر پروتئین‌ها با نسبت‌های مختلف، دارای ۲۰ نوع اسیدآمینه‌ی گوناگون اند[٤-۲]. نوع اسیدهای آمینه، ترتیب پیوند آن‌ها با یکدیگر و ارتباط فضایی متقابل آن‌ها با هم، ساختمان سه بعدی و خواص بیولوژیک پروتئین‌های ساده را مشخص می‌کنند.

اسیدهای آمینه با دارا بودن ساختمان کلی زیر، از لحاظ بین المللی به اختصار با یک و سه حرف مشخص می‌شوند (شکل ۱-۱).

شکل ۱-۱- ساختمان کلی اسیدهای آمینه

با این که بیش از ۳۰۰ نوع اسیدآمینه‌ی مختلف در طبیعت وجود دارد، زیر مجموعه‌ای متشکل از تنها ۲۰ اسیدآمینه، واحد منومری را تشکیل می‌دهند که اسکلت پلی پپتیدی پروتئین‌ها از آنها ساخته می‌شوند. تمامی اسیدآمینه‌های متداول بجز پرولین دارای ساختمان عمومی مشابهی می‌باشند که به کربن α آنها عوامل NH_3^+ و COO^- متصل بوده و اختلافشان تنها در ریشه‌ی R است. خصوصیات هر اسیدآمینه بوسیله‌ی ماهیت ریشه‌ی آن مشخص می‌شود.

آمینواسیدها براساس ماهیت ریشه‌ی R به صورت زیر تقسیم بندی می‌شود

الف) اسیدهای آمینه با ریشه‌های غیرقطبی یا آبگریز مانند L-آلانین، L-والین، L-لوسین، L-ایزولوسین، متیونین، L-پرولین، L-فنیل آلانین، L-تریپتوفان

ب) اسیدهای آمینه با ریشه‌های R با بار منفی مانند L-آسپارتیک، L-گلوتامیک اسید

ج) اسیدهای آمینه با ریشه‌های R بدون بار الکتریکی یا آب دوست مانند L-آسپارژین، L-گلوتامین، گلایسین، L- سرین، L-تریئونین، L-تیروزین، L-سیتیسن

د) اسیدهای آمینه با ریشه‌های R با بار مثبت مانند L-لیزین، L-آرژینین، L-هیستیدین [۲،۳،۵]

اسیدهای آمینه حاوی هر دو گروه آمین و اسید کربوکسیلیک هستند به این علت آن ها را آمفوتر می‌نامند، زیرا در محیط اسیدی رفتار بازی و در محیط بازی رفتار اسیدی از خود نشان می‌دهند.

همان طوری که گفته شد در اسیدآمینه‌ی α این دو گروه به یک اتم کربن متصل‌اند اگر چه اسیدهای آمینه به صورت‌های مختلفی می‌توانند به یکدیگر متصل گردند، تمام پروتئین‌های طبیعی دارای اسیدهای آمینه‌ی نوع L (چپگرد) هستند [٤-۳].

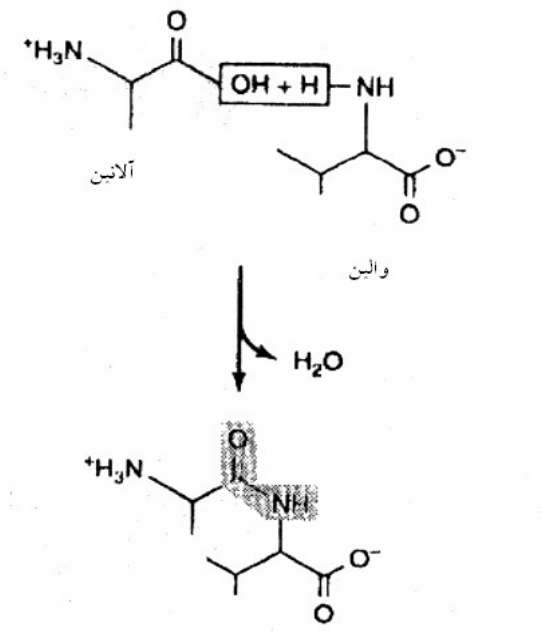
اسیدهای آمینه، حداقل دو اسید ضعیف قابل یونیزه شدن یعنی NH_3^+ و $COOH$ دارند. دو شکل از این گروه‌ها یکی به صورت باردار و دیگری بدون بار به حالت تعادل پروتونی در محلول وجود دارد (شکل ۱-۲).

$$R - COOH \Leftrightarrow R - COO^- + H^+$$
$$R - NH_3^+ \Leftrightarrow R - NH_2 + H^+$$

شکل ۱-۲- صورت‌های مختلف گروه‌های آمین و اسید کربوکسیلیک در محلول

$R-COOH$ و $R-NH_3^+$ اشکال پروتون دار یا اسیدی این معادلات بوده و $R-COO^-$ و $R-NH_2$ بازهای کونژوگه (گیرنده وپروتون) اسیدهای مربوطه هستند. با اینکه $R-COOH$ و $R-NH_3^+$ هر دو اسید ضعیف هستند، $R-COOH$ نسبت به $R-NH_3^+$ اسید بسیار قویتری است. در pH پلاسمای خون یا فضای داخل سلولی (که به ترتیب ۷,٤و ۷,۱ است) گروه‌های کربوکسیل تقریباً به طور کامل به شکل یون کربوکسیلات یعنی $R-COO^-$ می‌باشند. در مقادیر pH فوق اکثر گروه‌های آمینی غالباً به صورت شکل پروتون دار یا $R-NH_3^+$ می‌باشند [۳-۲].

پیوند پپتیدی در اثر ترکیب دو اسیدآمینه با از دست دادن یک ملکول آب، بین عامل‌های $COOH$ و NH_2 ایجاد می‌گردد. در واقع می‌توان گفت مهم ترین واکنش اسیدهای آمینه تشکیل پیوند پپتیدی است. L- آلفا آمینواسیدها توسط این پیوندها با یکدیگر اتصال برقرار کرده و تولید پروتئین (پلی پپتید) را می‌نمایند. به عنوان مثال ترکیب دو اسیدآمینه‌ی آلانین و والین، جهت ایجاد پیوند پپتیدی، به صورت زیر است (شکل ۱-۳)[٤-۲].



شکل ۱-۳- پیوند پپتیدی و نحوه‌ی ایجاد آن

۱-۳- اهمیت پپتیدها

پپتیدها از لحاظ زیست پزشکی وعلی الخصوص از نظر شناخت غدد درون ریز بسیار مورد توجه می‌باشند. بسیاری از هورمون‌های اصلی و مهم پپتید بوده و می‌توان آنها را جهت اصلاح بیماری‌های ناشی از کمبود هورمون به بیمار تجویز کرد. برخی پپتیدها نیز در سیستم عصبی به صورت ناقل پیام ها یا تنظیم کننده‌ی عصبی عمل می‌کنند. برخی آنتی بیوتیک‌ها مانند والینکومایسین وگرامیسیدین و نیز تعدادی از داروهای ضدتومور مانند بلئومایسین نیز پپتید هستند.

همان طوری که گفته شد پپتیدها از اتصال L- آلفا آمینواسیدها به کمک پیوند پپتیدی تشکیل می-شوند. نکته‌ی حائز اهمیت آن است که همان طوری که در شکل بالا مشاهده می‌کنیم دی پپتید حاصله، متشکل از دو ریشه‌ی اسیدآمینه است اما دارای یک پیوند پپتیدی است. به طور قراردادی، ساختمان پپتیدها را طوری می‌نویسند که ریشه‌ی انتهای آمینی (ریشه ای که دارای گروه آلفا آمینوی آزاد است) در سمت چپ و ریشه‌ی انتهای کربوکسیل (ریشه ای که دارای گروه آلفا کربوکسیل آزاد است) در سمت راست نوشته شود.