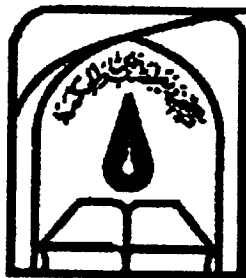
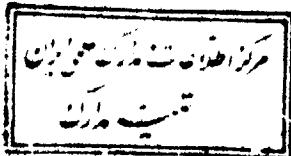


۲۶۷۰۸



۱۰ / ۶ / ۱۳۷۸



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد
بیوفیزیک

اثر اسمولیت های ساکارز و ال-پرولین بر پایداری حرارتی
آلبومین سرم گاو

نگارش:

بهمن صادقی لرنصرآباد

استاد راهنما: ۳۸۹۳ / ۲

دکتر بیژن رنجبر

استاد مشاور:

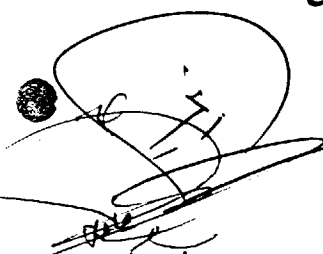


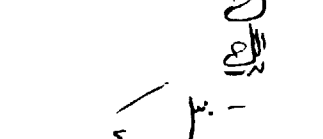

دکتر علی اکبر صبوری

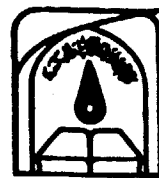
خرداد ۱۳۷۸

۲۶۷۰۴

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخه نهایی پایان نامه خانم / آقای بهمن صادقی لر نصرآباد
 تحت عنوان: اثر اسمولیت های ساکارزوال - پرولین بر پایداری حرارتی آلبومین سرم گاو
 را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر بیژن رنجبر	استادیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر علی اکبر صبوری	استادیار	
۳- استاد ناظر	آقای دکتر حسین نادری منش	استادیار	
۴- استاد ناظر	آقای دکتر هدایت اله قورچیان	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر پرویز عبدالمالکی	استادیار	



تاریخ:

شماره:

پیوست:

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظریه اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیت‌های علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد / رشته دکتری نگارنده در رشته بیوفیزیک است که در سال ۱۳۷۸ در دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر بیژن رفیعی و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر علی اکبر صبوری از آن دفاع شده است.»

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر دانشگاه اهدا کند دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب **بهمن صادقی لرنصر** اباد دانشجوی رشته بیوفیزیک مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به:

- پدر دلسوز و گرامی‌ام

که استقامت و پایداری به من آموخت و نخستین جرقه‌های عشق به دانستن را در وجودم فروزان ساخت.

- مادر فداکار و مهربانم

عزیزی که محبت را به من آموخت و اول مری و باغبان وجودم بود و نهال وفاداری و ایمان را در دلم کاشت.

- برادران و خواهران خوبم

که دوستشان دارم.

و تقدیم به همه معلمینم

آنانکه در وادی گمنامیها عشق، علم و ایمان را در گوش جانم نجوا کردند.

تشکر و قدردانی

«من لم یشکر المخلوق، لم یشکر الخالق»

حمد و سپاس بیکران خداوند منان را که توفیق نگارش و به اتمام رساندن پایان نامه

حاضر را عنایت فرمود و تشکر و صد سپاس از آنان که در فراز و نشیب‌های این راه دشوار

دست یاری و مدد خویش را از من دریغ ننمودند:

- استاد بسیار ارجمندم جناب آقای دکتر بیژن رنجبر، عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت

مدرس، که صمیمانه راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشتند.

- استاد بسیار محترم جناب آقای دکتر علی اکبر صبوری، عضو هیئت علمی دانشگاه

تهران، که در امر مشاوره این پایان نامه مرا یاری نمودند.

- اساتید بسیار گرانقدر جناب آقایان دکتر حسین نادری‌منش و دکتر هدایت‌الله قورچیان

که قبول زحمت کردند و نظارت دفاع از این پایان نامه را پذیرفتند.

- پدر و مادر بسیار عزیزم و تمامی اعضای خانواده خویش بپاس تشویق‌ها، راهنمایی‌ها

و یاری‌هایشان در مسیر علم و معرفت.

- سروران گرامی جناب آقایان دکتر صمد صادقی‌لر و دکتر علی جعفروند به خاطر

کمک‌های فکری و تشویقی شان.

- خانم‌ها زرنندی (مسئول محترم آزمایشگاه)، کربلایی محمد، صوفیان، بصیری، یزدانی و

ابراهیمی و آقایان دکتر عبدالمالکی، دکتر میرشاهی، دکتر مصطفایی، میرزایی، عرب، بصیری و

کلیه همکاران آزمایشگاهی که مرا مرهون کمک‌های بی دریغ خود نمودند.

- گروه آزمایشگاه بیوشیمی فیزیک مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران.

و کلیه افرادی که به هر نحو مرا مورد بذل توجه خویش قرار دادند.

چکیده:

ارگانسیم‌ها و سیستم‌های سلولی به علت دارا بودن حل‌شونده‌های آلی ویژه، با غلظت بالا که تحت عنوان اسمولیت‌ها شناخته شده‌اند، به تنش‌هایی مانند دمای بالا، خشکی و محیط‌های سرشار از اوره یا نمک پاسخ می‌دهند. این اسمولیت‌ها پروتئین و سایر سیستم‌های ماکرو مولکولی را علیه چنین تنش‌های غیر طبیعی کننده‌ای حفاظت می‌کنند. در این پژوهش، غیر طبیعی شدن حرارتی مونومر آلبومین سرم گاو کربوکسی آمید و متیله شده، در حضور غلظت‌های مختلف اسمولیت‌های ساکارزوال - پرولین با روش‌های اسپکتروفتومتری، میکروکالریمتری همدمای و دو رنگ نمایی دورانی مورد مطالعه قرار گرفته است. مشاهدات اساسی به قرار زیر می‌باشند:

- ۱- غیر طبیعی شدن حرارتی مونومر BSA کربوکسی آمید و متیله شده، در حضور و در غیاب ساکارزوال - پرولین کاملاً برگشت پذیر است.
- ۲- هر دو پارامتر درجه حرارت میانی غیر طبیعی شدن حرارتی (T_m) و انرژی آزاد گیبس پایداری ($\Delta G_D(25^\circ C)$) با افزایش غلظت ساکارزوال - پرولین افزایش می‌یابند.
- ۳- درجه حرارت غیر طبیعی شدن BSA در حضور غلظت‌های یک مولارال - پرولین و ساکارز، به ترتیب ۷ و ۱۲ درجه سانتیگراد افزایش می‌یابد.
- ۴- براساس پارامترهای ترمودینامیکی مشاهده شده، غلظت‌های یک مولارال - پرولین و ساکارز منجر به افزایش انرژی آزاد پایداری به ترتیب ۲/۴ و ۲/۶ کیلو ژول بر مول برای BSA در دمای $55^\circ C$ می‌شوند.
- ۵- مطالعات سینتیکی غیر طبیعی شدن پروتئین به روش میکروکالریمتری همدمای نشان داد که سینتیک غیر طبیعی شدن BSA از قانون مرتبه اول، وابسته به غلظت پروتئین، پیروی می‌کند و سرعت غیر طبیعی شدن BSA در حضور ال - پرولین و ساکارز کاهش یافته و همچنین سرعت غیر طبیعی شدن پروتئین در حضور ساکارز بیشتر از ال - پرولین کاهش می‌یابد.
- ۶- نتایج حاصل از دو رنگ نمایی دورانی نشان دادند که ساکارز و ال - پرولین نمی‌توانند تغییر بنای فضایی در BSA القاء نمایند، لذا تمامی مشاهدات تجربی می‌توانند به اثرات این اسمولیت‌ها بر کشش سطحی آب نسبت داده شوند.

کلمات کلیدی: اسمولیت‌ها، غیر طبیعی شدن حرارتی، پایداری و آلبومین سرم گاو

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه و کلیات

۲	۱-۱ مطالعه پایداری پروتئین‌ها
۸	۲-۱ اسمولیت‌ها
۱۰	۱-۲-۱ انواع اسمولیت‌ها
۱۳	۲-۲-۱ مکانیسم اثرات اسمولیت‌ها بر پایداری ساختمان پروتئینها
۲۵	۳-۱ آلبومین سرم گاوی
۲۷	۱-۳-۱ ساختمان آلبومین سرم گاوی
۲۷	۱-۱-۳-۱ ساختمان اول
۳۰	۲-۱-۳-۱ ساختمان دوم
۳۲	۳-۱-۳-۱ ساختمان سوم
۳۵	۴-۱ غیرطبیعی شدن حرارتی پروتئینها
۳۸	۵-۱ مروری بر مطالعات انجام شده
۴۱	۶-۱ هدف و زمینه تحقیق

فصل دوم: مواد و روشها

۴۵	۱-۲ مواد
۴۵	۲-۲ روشها
۴۵	۱-۲-۲ آماده‌سازی کیسه دیالیز

عنوان

صفحه

۲-۲-۲ بلوکه کردن گروه سولفیدریل آزاد BSA	۴۶
۲-۲-۲ کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون	۴۷
۲-۲-۲ الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE)	۴۹
۲-۲-۴ تهیه محلولهای مورد نیاز	۴۹
۲-۲-۴ نحوه تهیه ژل و آماده سازی نمونه	۵۰
۲-۲-۴ الکتروفورز	۵۱
۲-۲-۴ نحوه رنگ آمیزی ژل	۵۲
۲-۲-۵ بیناب نمایی ماوراء بنفش - مرئی	۵۲
۲-۲-۶ میکروکالریمتری	۵۳
۲-۲-۷ دورنگ نمایی دورانی	۵۵

فصل سوم: نتایج

۱-۳ تهیه منومر آلومین سرم گاو و با گروه سولفیدریل کربوکسی آمیدو متیله شده	۵۸
۲-۳ بررسی پایداری حرارتی منومر BSA کربوکسی آمیدو متیله شده با تکنیکهای اسپکتروسکوپی و میکروکالریمتری همدا	۶۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۱-۴ بحث	۱۰۵
۲-۴ نتیجه گیری	۱۱۱
فهرست منابع و مأخذ	۱۱۳

فهرست جداول

<u>عنوان</u>	<u>صفحه</u>
جدول (۱-۱) برخی از پارامترهای ترمودینامیکی پایداری پروتئین	۷
جدول (۲-۱) مهمترین حل شونده‌های تشکیل دهنده سیستم‌های اسمولیت سلولی	۱۱
جدول (۳-۱) انواع برهم کنش افزودنیها با پروتئینها	۲۰
جدول (۴-۱) ترکیب اسیدهای آمینه مربوط به سه آلبومین سرم انسان، گاو و موش	۲۹
جدول (۵-۱) اندازه‌های فیزیکی آلبومین سرم انسان و گاو	۳۳
جدول (۱-۲) مقادیر تغییرات جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر علیه غلظت‌های متفاوت BSA در بافر فسفات pH۷ با قدرت یونی ۰/۰۱۴ مولار	۶۷
جدول (۲-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیته، ثابت تعادل و انرژی آزاد غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در غیاب ساکارز	۶۸
جدول (۳-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیته، ثابت تعادل و انرژی آزاد غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۲ مولار ساکارز	۶۹
جدول (۴-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیته، ثابت تعادل و انرژی آزاد غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۴ مولار ساکارز	۷۰
جدول (۵-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیته، ثابت تعادل و انرژی آزاد غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۶ مولار ساکارز	۷۱
جدول (۶-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیته، ثابت تعادل و انرژی آزاد غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۸ مولار ساکارز	۷۲

عنوان

صفحه

- جدول (۷-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیستی، ثابت تعادل و انرژی آزاد
غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور یک مولار ساکارز ۷۳
- جدول (۸-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیستی، ثابت تعادل و انرژی آزاد
غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در غیاب ال-پرولین ۷۴
- جدول (۹-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیستی، ثابت تعادل و انرژی آزاد
غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۲ مولار ال-پرولین ۷۵
- جدول (۱۰-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیستی، ثابت تعادل و انرژی آزاد
غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۶ مولار ال-پرولین ۷۶
- جدول (۱۱-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیستی، ثابت تعادل و انرژی آزاد
غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور ۰/۸ مولار ال-پرولین ۷۷
- جدول (۱۲-۲) مقادیر تغییرات جذب، هیپرکرومیسیستی، ثابت تعادل و انرژی آزاد
غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در حضور یک مولار ال-پرولین ۷۸
- جدول (۱۳-۲) پارامترهای ترمودینامیکی غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در غلظتهای
مختلف ساکارز در pH ۷ ۷۹
- جدول (۱۴-۲) پارامترهای ترمودینامیکی غیرطبیعی شدن حرارتی BSA در غلظتهای
متفاوت ال-پرولین در pH ۷ ۷۹
- جدول (۱۵-۲) مقادیر مبادله حرارتی محلول ۲/۵ میلی لیتر BSA با غلظت ۰/۵ میلی گرم
بر میلی لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۸۰
- جدول (۱۶-۲) مقادیر $L_n (1-q/q_{max})$ برحسب زمان. حاصل از آنالیز داده‌های جدول

عنوان

صفحه

۸۱..... (۱۵-۳)

جدول (۱۷-۳) مقادیر پارامترهای سینتیکی BSA با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در

دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در غیاب و در حضور ۰/۵ مولار ال-پرولین و ساکارز..... ۸۲

فهرست اشکال و نمودارها

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۲۲	شکل (۱-۱) انواع برهم کنشهای پروتئین - حلال.....
۲۴	شکل (۲-۱) دیاگرام انرژی آزاد اثر کمک حلالها روی پایداری پروتئین.....
۲۸	شکل (۳-۱) توالی اسید آمینه‌های آلبومین سرم انسان، گاو و موش.....
۳۱	شکل (۴-۱) طرحی از یک دمین آلبومین.....
۳۴	شکل (۵-۱) تصویر فضایی آلبومین سرم.....
۳۵	شکل (۶-۱) ایزومرهای BSA که در pHهای مختلف حاصل می‌شوند.....
۵۹	شکل (۱-۲) الکتروفورز طبیعی آلبومین سرم گاو.....
۶۰	شکل (۲-۲) کروماتوگرام ژل فیلتراسیون محلول ۲ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو که گروههای سولفیدریل آزاد آن قبلاً بلوکه شده‌اند، روی سفادکس G-۷۵.....
۶۱	شکل (۳-۲) الکتروفورز طبیعی اجزاء حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون در حضور BSA شاهد.....
۶۱	شکل (۴-۲) نمودار تغییرات جذب علیه غلظتهای متفاوت مونومر BSA در بافر فسفات pH۷ با قدرت یونی ۰/۰۱۴ در مولار.....
۸۳	شکل (۵-۲) نمودارهای غیرطبیعی شدن حرارتی محلول ۰/۰۴ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو در بافر فسفات pH۷ و در غلظتهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۱ مولار ساکارز.....
۸۴	شکل (۶-۲) نمودارهای غیرطبیعی شدن حرارتی محلول ۰/۰۴ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو در بافر فسفات pH۷ و در غلظتهای ۰/۸ و ۱ مولار ساکارز.....
۸۵	شکل (۷-۲) نمودارهای تغییرات dH/dT علیه درجه حرارت در غلظتهای صفر و ۰/۲.....

عنوان

صفحه

مولار ساکارز	۸۵
شکل (۸-۲) نمودارهای تغییرات dH/dT علیه درجه حرارت برای غلظت‌های ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و یک مولار ساکارز	۸۶
شکل (۹-۲) نمودارهای تغییرات ΔG_D علیه دما در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ مولار ساکارز	۸۷
شکل (۱۰-۲) نمودارهای تغییرات ΔG_D علیه دما در غلظت‌های ۰/۸ و یک مولار ساکارز	۸۸
شکل (۱۱-۲) نمودار غیرطبیعی شدن حرارتی محلول ۰/۴ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو برای غلظت‌های متفاوت ساکارز در بافر فسفات pH ۷ با قدرت یونی ۰/۱۴	۸۹
شکل (۱۲-۲) نمودار تغییرات ΔG_D علیه درجه حرارت در غلظت‌های متفاوت ساکارز، حاصل از آنالیز داده‌های شکل (۱۱-۲) با استفاده از معادله (۴-۳)	۹۰
شکل (۱۳-۲) نمودارهای غیرطبیعی شدن حرارتی محلول ۰/۴ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو در بافر فسفات pH ۷ برای غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۰/۲ و ۰/۶ مولار آل-پرولین	۹۱
شکل (۱۴-۲) نمودارهای غیرطبیعی شدن حرارتی محلول ۰/۴ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو در بافر فسفات pH ۷ برای غلظت‌های ۰/۸ و یک مولار آل-پرولین	۹۲
شکل (۱۵-۲) نمودارهای تغییرات dH/dT علیه درجه حرارت برای غلظت‌های صفر و ۰/۵ مولار آل-پرولین	۹۲

عنوان

صفحه

- شکل (۱۶-۲) نمودارهای تغییرات dH/dT علیه درجه حرارت برای غلظتهای ۰/۶، ۰/۲، ۰/۱۴
- ۰/۸ و یک مولار ال-پرولین..... ۹۳
- شکل (۱۷-۲) نمودارهای تغییرات ΔG_D علیه دما در غلظتهای صفر، ۰/۲، ۰/۶ و یک مولار ال-پرولین..... ۹۴
- شکل (۱۸-۲) نمودار غیرطبیعی شدن حرارتی محلول ۰/۴ درصد (W/V) آلبومین سرم گاو برای غلظتهای متفاوت ال-پرولین در بافر فسفات PH۷ با قدرت یونی ۰/۱۴ مولار..... ۹۵
- شکل (۱۹-۲) نمودار تغییرات ΔG_D علیه درجه حرارت در غلظتهای متفاوت ال-پرولین، حاصل از آنالیز داده‌های شکل (۱۸-۲) با استفاده از معادله (۴-۲)..... ۹۶
- شکل (۲۰-۲) نمودار تغییرات ΔT_m علیه غلظتهای متفاوت ال-پرولین (Δ) و ساکارز..... ۹۷ (۵)
- شکل (۲۱-۲) نمودار ΔG_D ۲۵°C علیه غلظتهای متفاوت ال-پرولین (Δ) و ساکارز..... ۹۷ (۵)
- شکل (۲۲-۲) منحنی مبادله حرارتی محلول ۲/۵ میلی لیتری BSA با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، در بافر فسفات PH۷ با قدرت یونی ۰/۱۴ مولار، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در غیاب اسمولیت..... ۹۸
- شکل (۲۳-۲) منحنی مبادله حرارتی محلول ۲۵ میلی لیتری BSA با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، در بافر فسفات PH۷ با قدرت یونی ۰/۱۴ مولار، در حضور ۰/۵ مولار ال-پرولین..... ۹۹