وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری

دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

IMAM KHOMEINI
INTERNATIONAL UNIVERSITY

دانشکده علوم پایه – گروه شیمی

موضوع:

مطالعه شیمی فیزیکی برهمکنش نمک برخی از لانتانیدها با سرم آلبومین انسانی

پایان نامه برای دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد در رشتهٔ شیمی

گرایش شیمی فیزیک

نگارش:

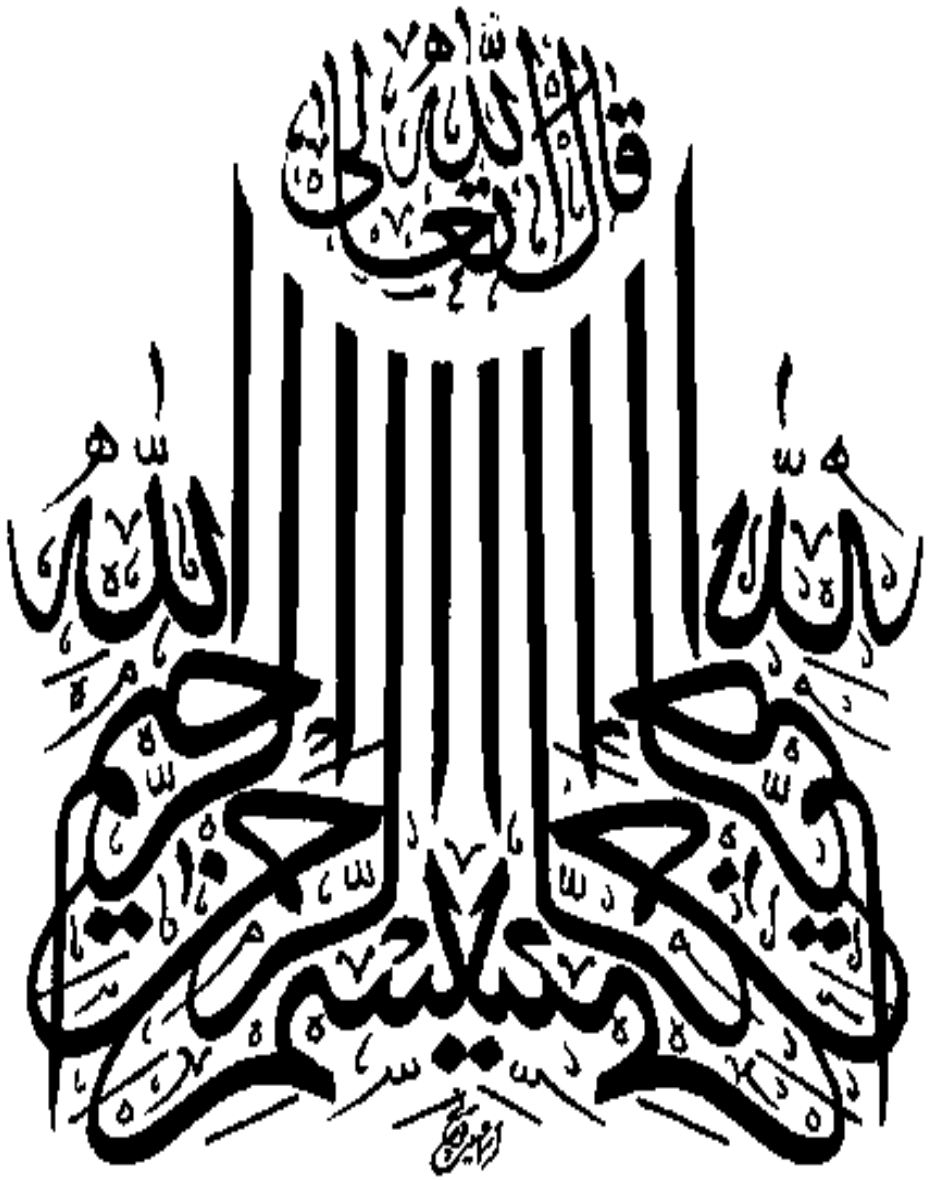
منیر شالبافان

استاتید راهنما:

دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی

دکتر نعمت الله غیبی

شهریور ۱۳۹۲


قال الله تعالى
بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری

دانشگاه بین المللی امام خمینی

IMAM KHOMEINI
INTERNATIONAL UNIVERSITY

دانشکده علوم پایه

گروه شیمی

موضوع:

مطالعه شیمی فیزیکی برهمکنش نمک برخی از لانتانیدها با سرم آلبومین انسانی

پایان نامه برای دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد در رشتهٔ شیمی

گرایش شیمی فیزیک

نگارش:

منیر شالبافان

استاتید راهنما:

دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی

دکتر نعمت الله غیبی

استاد مشاور:

دکتر داریوش ایلغاری

شهریور ۱۳۹۲

تقدیر و تشکر :

خدایا مرا به علم توانگرساز و به حلم زینت بخش و به تقوا عزیز کن و به عافیت زیبایی ده.

در ابتدا از اولین و بزرگترین معلمان زندگیم، پدر و مادر عزیزم که به من درس زندگی آموختند، از صمیم قلب تشکر می کنم. بر خود لازم میدانم از کلیه افرادی که درانجام این پایان نامه مرا یاری نمودند، تشکر نمایم، بزرگوارانی چون:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی، استاد راهنما که همواره راهنما و راه گشای اینجانب در اتمام پایان نامه بودند، استاد ارجمند جناب آقای دکتر نعمت اله غیبی، استاد راهنما که در انجام این پایان نامه، خالصانه از هیچ کمکی دریغ نکردند، استاد ارجمند جناب آقای دکتر داریوش ایلغاری، استاد مشاور که اینجانب را از مشورت های سودمندشان بهره مند کردند و باعث پربارتر شدن این پایان نامه شدند؛استاد ارجمند سرکار خانم دکتر مریم درگاهی به خاطر مطالعه دقیق و اظهارنطرشان در تصحیح مطالب پایان نامه؛اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر واشقانی و سرکار خانم دکتر حسین پور رجبی که در دوران تحصیل کارشناسی ارشد از محضرشان کسب علم نمودم؛مسئولین محترم دانشگاه بین المللی امام خمینی و دانشگاه علوم پزشکی قزوین به خاطر همکاری صمیمانه شان.

فرم پ۲-۱ : فرم تأییدیه‌ی هیأت داوران جلسه‌ی دفاع از پایان‌نامه/ رساله

دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)

معاونت آموزشی – مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم تاییدیه‌ی هیأت داوران جلسه‌ی دفاع از پایان‌نامه/رساله (فرم شماره ۳۰)

بدین وسیله گواهی میشود جلسه دفاعیه از پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری ..... خانم مهری شاهی ..... دانشجوی رشته ..... گرایش ..... تحت عنوان ..... در تاریخ ۱۳۹۲/۶/۳۰ در دانشگاه برگزار گردید و این پایان نامه/رساله با نمره به عدد ۲۰ و به حروف ..... با درجه ..... مورد تایید هیئت داوران قرار گرفت.

ردیف	سمت	نام و نام خانوادگی	مرتبه‌ی دانشگاهی	دانشگاه یا مؤسسه	امضا
۱	استاد راهنمای اول	غلامرضا رضایی	دانشیار	امام خمینی	
۲	" راهنمای دوم	نعمت الله غیبی	دانشیار	دانشگاه علامه طباطبایی	
۳	" مشاور	داریوش اسلامی	استادیار	دانشگاه علوم زیستی فردیس	
۴	داور داخل	مریم درخشی	استادیار	امام خمینی	
۵	نماینده تحصیلات تکمیلی	احمد میرآمیر	استادیار	"	

* در صورت وجود استاد راهنمای دوم برای پایان نامه/ رساله، یک ردیف با عنوان استاد راهنمای دوم، ذیل ردیف استاد راهنما اضافه شود.

تذکر: این برگه پس از تکمیل توسط هیات داوران، در پایان نامه/رساله درج می گردد.

فرم پ۲-۲ : اصالت اثر / پایان نامه (فرم شماره ۲۸)

تعهدنامه اصالت اثر

اینجانب ..... دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد در رشته .....

گرایش ..... که در تاریخ ۹۲/۶/۳۰ از پایان نامه ی خود تحت عنوان .....

با کسب درجه ی ۲۰ دفاع کرده ام، شرعا و قانونا متعهد می شوم:

۱. مطالب مندرج در این پایان نامه، حاصل تحقیق و مطالعه اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و غیره استفاده کرده ام، با رعایت کامل امانت ، مطابق مقررات، اقدام به ارجاع در متن و ذکر آن در فهرست منابع و مآخذ نموده ام.

۲. تمامی یا بخشی ازاین پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی به سایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳. مقالات مستخرج ازاین پایان نامه کاملا حاصل کار اینجانب بوده و از هرگونه جعل داده و یا تغییر اطلاعات پرهیز کرده ام.

۴. از ارسال همزمان و یا تکراری مقالات مستخرج ازاین پایان نامه (با بیش از ۳ درصد همپوشانی) به مجلات و یا همایش های گوناگون خودداری نموده و می نمایم.

۵. کلیه حقوق مادی و معنوی حاصل از این پایان نامه متعلق به دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) بوده و متعهد می شوم هرگونه بهره مندی ویا نشر دستاوردهای حاصل از این تحقیق اعم از چاپ کتاب، مقاله، ثبت اختراع و غیره (چه در زمان دانشجویی و یا بعد از فراغت از تحصیل) با کسب اجازه از استاد (استادان) راهنما باشد.

۶. درصورت اثبات تخلف و نقض موارد پنجگانه فوق (درهر زمان) مدرک تحصیلی صادر شده توسط دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره) از درجه اعتبار ساقط و اینجانب هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

نام ونام خانوادگی دانشجو

امضاء

فرم پ۲-۳ : سوگندنامه / رساله

سوگندنامه دانش آموختگان دکتری دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)

به نام خدا

سپاس ایزد منان را که مرا مشمول الطاف خویش نمود که با طی مراحل تحصیل موفق به اخذ درجه دکتری شوم. به شکرانه این نعمت بزرگ الهی که با امکانات این مرز و بوم، فراهم و نزد اینجانب به امانت گذاشته شده است، در پیشگاه ملت ایران به کتاب آسمانی خود، قرآن کریم، سوگند یاد می کنم که :

- در سراسر زندگی حرفه ای، در راه اعتلای کشور ایران و جامعه بشری به نحو احسن قدم برداشته و دراین راه از هیچ تلاشی دریغ ننمایم.
- در تمام فعالیت های تخصصی، رضای خدا را همراه با صداقت علمی و اجتماعی در نظر داشته و از موقعیت های به دست آمده در جهت رفع مشکلات جامعه استفاده کنم و در همه ی امور، منافع کشور را بر منافع فردی مقدم بدارم.
- همواره علم و دانش خود را به روز نگاه داشته و در ایفای مسئولیت و تعهدات حرفه ای در حد توان سعی و تلاش خود را به کار گیرم.
- و اینک از خداوند علیم توفیق بندگی و پای بندی به مفاد این سوگندنامه را خواستارم و از او می خواهم که مرا در ایفای رسالت علمی و انسانی خویش موفق بدارد.

نام ونام خانوادگی دانشجو

امضاء

مجوز بهره برداری از پایان نامه/ رساله

کلیه حقوق اعم از چاپ، تکثیر، نسخه برداری، ترجمه، اقتباس و ... از نتایج این پایان نامه برای دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره) قزوین محفوظ است. بهره برداری از این پایان نامه/ رساله در چهارچوب مقررات کتابخانه و با توجه به محدودیتی که توسط استاد راهنما به شرح زیر تعیین می شود، بلامانع است:

☑ بهره برداری از این پایان نامه/ رساله برای همگان بلامانع است.

☐ بهره برداری از این پایان نامه/ رساله با اخذ مجوز از استاد راهنما، بلا مانع است.

☐ بهره برداری از این پایان نامه/ رساله تا تاریخ ..... ممنوع است.

استاد راهنما می تواند یکی از گزینه های بالا را انتخاب کند و مسئولین کتابخانه موظف به رعایت موارد تعیین شده می باشد.

نام استاد و یا اساتید راهنما:

تاریخ:

امضاء:

چکیده:

آلبومین سرم انسانی (HSA)، فراوان ترین پروتئین موجود در پلاسما و حمل کننده بسیاری از داروها می‌باشد. برهم کنش HSA با نمک برخی از لانتانیدها (سریم کلراید، لانتانیم کلراید، اربیم کلراید) در محلول بافر فسفات (۵۰mM) با۷/۴= PH در دمای ۲۹۸ K بوسیله طیف سنجی فلورسانس و اسپکتروسکوپی مرئی- فرابنفش بررسی شد. این لیگاندها در حضور آلبومین سرم انسانی، اثر ناپایدارکنندگی را نشان دادند. مقادیر مثبت برای انرژی آزاد استاندارد گیبس اربیم کلراید، لانتانیم کلراید، سریم کلراید بترتیب ۳۵/۸۷، ۳۲/۵۱، ۲۷/۴۶ کیلوژول بر مول می‌باشد که نشان می‌دهد اتصال این لیگاندها به پروتئین از نظر ترمودینامیکی، با افزایش در ناپایداری همراه است. افزایش در مقدار K_D احتمالا به علّت باز شدن جزئی جایگاه اتصالی می‌باشد که ممکن است بخواهد مقدار بیشتری از این لیگاندها را در خود جای دهد. باز شدن جایگاه اتصال می‌تواند یک محیط آبگریز بزرگی برای اتصال این لیگاندها ایجاد کند و بنابراین ثابت اتصال زیاد می‌شود. با بهره گیری از تکنیک تخریب گرمایی و تخریب شیمیایی با اوره، ناپایداری در ساختار پروتئین بوسیله این لیگاندها، اثبات شد. مطالعات فلوئورسانس ذاتی این پروتئین در حضور این لیگاندها، تاثیر این مواد را به طور جزئی بر روی ساختار سوم پروتئین نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که جایگاه اتصال این لیگاندها به پروتئین، احتمالا در جایی می‌باشد که اسید آمینه تریپتوفان در آنجا قرار دارد.

کلید واژگان: آلبومین سرم انسانی، سریم کلراید، لانتانیم کلراید، اربیم کلراید، اسپکتروفتومتری، طیف سنجی فلورسانس

فهرست مطالب

عنوان فصل **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه : ۲

فصل دوم: تئوری

۲-۱ پروتئین ها ۹

۲-۱-۱ ساختار پروتئین ۹

۲-۱-۲ طبقه بندی پروتئین ها ۱۶

۲-۱-۳ نیروهای غیر کووالان در ساختار پروتئین ۱۷

۲-۱-۴ خصلت اسیدی و بازی پپتیدها..... ۲۰

۲-۱-۵ پروتئین‌های مرتبط به هم از نظر تکاملی ۲۰

۲-۱-۶ مطالعه پروتئین‌ها در محلول ۲۱

۲-۱-۷ عوامل مؤثر در پایداری پروتئین ۲۱

۲-۱-۸ پیوند لیگاند به پروتئینها و عملکرد آنها ۲۴

۲-۱-۹ ترمودینامیک برهمکنش لیگاند با پروتئین ۲۶

۲-۱-۱۰ دگرگونی پروتئین ها ۲۸

۲-۱-۱۱ ترمودینامیک غیرطبیعی شدن..... ۲۹

۲-۱-۱۲ تخریب گرمایی پروتئین ها ۳۱

۲-۱-۱۳ تخریب شیمیایی پروتئین ها..... ۳۳

۲-۲ آلبومین سرم انسانی ۳۵

۲-۲-۱ آلبومین سرم..... ۳۵

۲-۲-۲ ساختار آلبومین سرم انسانی..... ۳۷

۲-۲-۳ بازشدگی و غیرطبیعی شدن مولکول آلبومین..... ۳۹

۲-۲-۴ منابع آلبومین ۴۰

۲-۲-۵ توالی آمینو اسیدها در آلبومین سرم انسانی ۴۰

۲-۲-۶ برهم کنش آلبومین سرم انسانی با لیگاندها ۴۱

۲-۲-۷ جایگاه I ۴۲

۲-۲-۸ جایگاه II ۴۳

۲-۲-۹ جایگاه‌های اضافی ۴۴
۲-۲-۱۰ سیستئین ۴۵
۲-۲-۱۱ کاربردهای درمانی آلبومین سرم انسانی ۴۵
۲-۲-۱۲ مفهوم گیرنده و علت مطالعه برهم کنش‌های آلبومین ۴۶
۲-۳ شیمی لانتانیدها ۴۶
۲-۳-۱ لانتانیدها ۴۶
۲-۳-۲ منابع طبیعی لانتانیدها ۴۷
۲-۳-۳ تجزیه و جداسازی لانتانیدها ۴۷
۲-۳-۴ خواص لانتانیدها ۴۸
۲-۳-۵ لانتانیم ۴۹
۲-۳-۶ نقش بیولوژیکی لانتانیم ۵۰
۲-۳-۷ سریم ۵۰
۲-۳-۸ نقش بیولوژیکی سریم ۵۱
۲-۳-۹ اربیم ۵۲
۲-۳-۱۰ نقش بیولوژیکی اربیم ۵۳
۲-۴ تئوری دستگاهی ۵۳
۲-۴-۱ مطالعات برهم کنش لیگاند - پروتئین با استفاده از کالریمتری تیتراسیونی هم دما ۵۳
۲-۴-۲ مطالعه پیوند لیگاند به پروتئین دارای یک مجموعه جایگاه پیوندی مستقل و یکسان ۵۴
۲-۴-۳ کاربرد روش کالریمتری در تئوری انحلال ۵۵
۲-۴-۴ اثبات تئوری توسعه یافته حلالیت به روش هندسی ۵۶
۲-۴-۵ مطالعات برهم کنش لیگاند-پروتئین با استفاده از روش طیف سنجی مرئی_ فرابنفش ۵۸
۲-۴-۶ کروموفورهای طیف سنجی الکترونی ۵۸
۲-۴-۷ قواعدتجربی برای تفسیر طیف جذبی ماکرومولکول‌های حیاتی ۶۰
۲-۴-۸ مطالعه برهم کنش لیگاند - پروتئین با استفاده از روش طیف سنجی فلوئورسانس ۶۰
۲-۴-۹ فلوروفور طبیعی و نشان گرهای فلورسنت ۶۲
۲-۴-۱۰ اندازه گیری فلورسنت ذاتی برای مطالعه پروتئین ها ۶۳

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱ مواد مورد استفاده ۶۶

۳-۲ دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده ۶۶

۳-۲ دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده ۶۶

۳-۳ تهیه محلول‌های مورد نیاز ۶۷

۳-۴ طریقه انجام آزمایش در دستگاه طیف سنجی مرئی _ فرابنفش ۶۸

۳-۵ طریقه انجام آزمایش تخریب شیمیایی پروتئین با اوره ۶۸

۳-۶ طریقه انجام آزمایش بررسی تغییرات ساختاری در دستگاه طیف سنجی فلوئورسانس ۷۰

۳-۷ طریقه انجام آزمایش تخریب گرمایی ۷۱

فصل چهارم: بحث ونتیجه گیری

۴-۱ بررسی طیف‌های جذبی اتصال نمک لانتانیدها با آلبومین سرم انسانی ۷۶

۴-۲ بررسی داده‌های تخریب شیمیایی آلبومین سرم انسانی در حضور اوره ۸۴

۴-۳ مطالعه تغیرات ساختار سوم آلبومین سرم انسانی در حضور و عدم حضور لیگاندهای سریم، لانتانیم و اربیم ۸۷

۴-۴ محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی برهم کنش بوسیله تئوری استرن – ولمر ۸۹

۴-۵ بررسی اثرات افزایش تاثیر درجه حرارت بر روی ساختمان پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاندهای سریم، لانتانیم و اربیم ۹۴

۴-۶ مقایسه نتایج با داده‌های بدست امده از تیتراسیون کالریمتری همدما ۱۰۰

۴-۷ نتیجه گیری کلی و پیشنهادات ۱۰۰

فصل پنجم: مراجع

۵-۱ مراجع ۱۰۳

فصل ششم: پیوست

۶-۱ پیوست ۱۱۱

فهرست جداول

عنوان فصل **صفحه**

جدول ۲-۱: تعداد و نوع آمینواسیدهای آلبومین سرم انسان ۳۶

جدول۲-۲:برهم کنش تمایل بالا لیگاندها برای جایگاهI وII از HSA ۴۲

جدول ۲-۳: ضریب جذب مولی و طول موج ماکزیمم اسیدهای آمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین در pH خنثی و محیط آبی. ۶۰

جدول۲-۴:فلوروفورهای طبیعی و نشانگرهای فلورسنت ۶۲

جدول ۳-۱: وزن مولکولی نمونه‌های مورد استفاده ۶۶

جدول ۳-۱: وزن مولکولی نمونه‌های مورد استفاده ۶۶

جدول۴-۱ : پارامترهای ترمودینامیکی تخریب شیمیایی البومین سرم انسانی توسط اوره ۸۷

جدول۴-۲: پارامترهای ترمودینامیکی بدست آمده از واکنش نمک لانتانیدها با آلبومین سرم انسانی با استفاده از تئوری استرن -ولمر ۹۲

جدول ۴-۳ :مقایسه پارامتر دمای تخریب پروتئین آلبومین سرم انسانی در غیاب و در حضور لیگاندهای سریم، ... ۹۹

جدول ۴-۴ : پارامترهای ترمودینامیکی برهم کنش آلبومین سرم انسانی و نمک برخی از لانتانید ها ۱۰۱

فهرست اشکال و نمودارها

عنوان فصل **صفحه**

شکل۲-۱ :نحوه تشکیل پیوند پپتیدی در آمینواسیدها ۹

شکل ۲-۲ مدل یک مارپیچ آلفا، مسیر مارپیچی که به وسیله زنجیره پلی پپتیدی طی می‌شود ۱۱

شکل ۲-۳ صفحه چین دار بتای موازی که از اتصال سه زنجیرهٔ پلی پپتیدی مجاور تشکیل شده است ۱۲

شکل۲-۴ یک دور بتا امکان خم شدن یک زنجیرهٔ پلی پپتیدی را بر روی خود بوجود می‌آورد ۱۳

شکل ۲-۵ اتصال عرضی دی سولفیدی (ارتباط دو سیستئین) در داخل یک زنجیره پلی پپتیدی[۲۶]. ۱۵

شکل ۲-۵ اتصال عرضی دی سولفیدی (ارتباط دو سیستئین) در داخل یک زنجیره پلی پپتیدی ۱۵

شکل ۲-۶ چهار ساختار پروتئین[۲۶] ۱۶

شکل ۲-۷ پیوند هیدروژنی تشکیل شده بین دو مولکول آب ۱۸

شکل ۲-۸ خصلت اسیدی و بازی پپتیدها ۲۰

شکل ۲-۹:دگرگونی پروتئین ها ۲۹

شکل ۲-۱۰ :منحنی سیگموئیدی جذب بر حسب درجه حرارت که غیرطبیعی شدن دو حالته پروتئین را نشان می‌دهد. ۳۳

شکل ۲-۱۱:منحنی تغییرات انرژِی آزاد گیبس بر حسب درجه حرارت ۳۳

شکل ۲-۱۲ : منحنی تغییرات جذب پروتئین بر حسب غلظت لیگاند. ۳۴

شکل ۲-۱۳ :ساختار آلبومین سرم انسانی به همراه نمایش دمین‌های مختلف آن. ۳۷

شکل ۲-۱۴: نقش آلبومین در ترابری داروها در حضور اسیدهای چرب در دمین‌های IIA وIIIA ۳۷

شکل ۲-۱۵ : تصویر کلاسیک آلبومین ۳۸

شکل۲-۱۶: توالی آمینواسیدهای آلبومین سرم انسانی ۴۱

شکل۲-۱۷:مکان دقیق تریپتوفان ۲۱۴ در جایگاه I آلبومین سرم انسانی ۴۳

شکل ۲-۱۹: ساختار شیمیایی لانتانیم کلراید ۵۰

شکل ۲-۲۰ :ساختارشیمیایی سریم کلراید ۵۲

شکل ۲-۲۱ :ساختار شیمیایی اربیم کلراید ۵۳

شکل ۲-۲۲ :. نمایی از دستگاه کالریمتری تیتراسیون همدما ۵۴

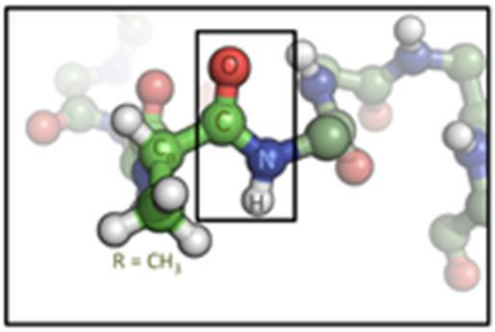
شکل ۲-۲۳ : نمایی از دستگاه اسپکتروسکوپی Uv ۵۸

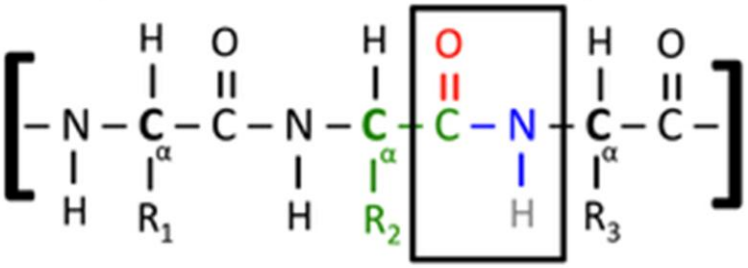
شکل ۲-۲۴:طیف فرابنفش یک نمونه پروتئینی ۵۹
شکل ۲-۲۵ :نمایی از دستگاه اسپکتروفلوریمتری..... ۶۱
شکل ۲-۲۶: طیف سنج فلوئورسانس..... ۶۱
نمودار ۴-۱: طیف جذبی HSA در عدم حضور (○) و در حضور غلظت‌های مختلف از یون سریم (—) ۷۷
نمودار۴-۲ : طیف جذبی یون سریم با غلظت ۰/۳۳ میلی مولار(□)، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۷۸
نمود۴- ۳: طیف جذبی یون سریم با غلظت ۱/۱۶ میلی مولار(□)، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۷۸
نمودار ۴-۴ : تاثیر غلظت‌های مختلف یون سریم بر روی طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۷۹
نمودار۴-۵: طیف جذبی HSA در عدم حضور (◊) و در حضور غلظت‌های مختلف از یون لانتانیم (—)..... ۸۰
نمودار۴-۶ : طیف جذبی یون لانتانیم با غلظت ۰/۲۳ میلی مولار(□)، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۸۰
نمودار۴-۷ : طیف جذبی یون لانتانیم با غلظت ۰/۶ میلی مولار(□)، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۸۱
نمودار۴-۸ : تاثیر غلظت‌های مختلف یون لانتانیم بر روی طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۸۱
نمودار ۴-۹: طیف جذبی HSA در عدم حضور (Δ) و در حضور غلظت‌های مختلف از یون اربیم (—) ۸۲
نمودار۴-۱۰ : طیف جذبی یون اربیم با غلظت ۰/۴۶ میلی مولار(Δ)، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۸۳
نمودار ۴-۱۱ : طیف جذبی یون اربیم با غلظت ۱/۶۶ میلی مولار(Δ)، طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۸۳
نمودار۴- ۱۲ : تاثیر غلظت‌های مختلف یون اربیم بر روی طیف جذبی آلبومین سرم انسانی ۸۴
نمودار۴-۱۳: منحنی جذب آلبومین سرم انسانی۲میکرومولار برعلیه غلظت اوره ۶مولار: درغیاب لیگاند(Δ)، در حضور یون لانتانیم ۳۲ میکرومولار(▼)، درحضور یون سریم۶۴ میکرومولار(o)، در حضور یون اربیم ۶۴ میکرومولار (♦) ۸۵
نمودار ۴- ۱۴ : منحنی انرزی آزاد گیبس بر حسب غلظت اوره : در غیاب لیگاند (●)، در حضور لیگاند لانتانیم (▼)، در حضور لیگاند اربیم (◊)، در حضور لیگاند سریم (o) ۸۷
نمودار ۴-۱۴ : بررسی ساختار سوم آلبومین سرم انسانی توسط تکنیک فلوئورسانس ذاتی در عدم حضور (o) و در حضور غلظت‌های مختلفی از یون سریم(—). بترتیب از پایین به بالا در نمودار، غلظت لیگاند افزایش یافته است. .. ۸۷
نمودار ۴-۱۵ : بررسی ساختار سوم آلبومین سرم انسانی توسط تکنیک فلوئورسانس ذاتی در عدم حضور (Δ) و در حضور غلظت‌های مختلفی از یون لانتانیم (—). بترتیب از پایین به بالا در نمودار، غلظت لیگاند افزایش یافته است. ۸۸
نمودار۴-۱۶ : بررسی ساختار سوم آلبومین سرم انسانی توسط تکنیک فلوئورسانس ذاتی در عدم حضور (Δ) و در حضور غلظت‌های مختلفی از یون اربیم. بترتیب از پایین به بالا در نمودار، غلظت لیگاند افزایش یافته است. ۸۸
شکل۴-۱۷- انحراف در نمودار استرن- ولمر برای لیگاندهای : a)یون سریم b)یون لانتانیم c) یون اربیم، بر اساس معادله کلاسیک استرن – ولمر ۹۱

شکل۴-۱۸- نمودار استرن- ولمر تغییر یافته برای تعیین پارامترهای ترمودینامیکی آلبومین سرم انسانی و یون سریم . ۹۱
شکل۴-۱۹- نمودار استرن- ولمر تغییر یافته برای تعیین پارامترهای ترمودینامیکی آلبومین سرم انسانی و یون لانتانیم ۹۲
شکل۴-۲۰- نمودار استرن- ولمر تغییر یافته برای تعیین پارامترهای ترمودینامیکی آلبومین سرم انسانی و یون اربیم.. ۹۳
نمودار ۴-۲۱ :منحنی اثرافزایش دمابرروی شدت فلوئورسانس پروتئین آلبومین سرم انسانی باغلظت۲۰میکرومولار . ۹۵
نمودار ۴-۲۲:منحنی اثرافزایش دمابرروی شدت فلوئورسانس پروتئین آلبومین سرم انسانی با غلظت۲۰میکرومولار . ۹۶
نمودار۴-۲۳: منحنی اثر افزایش دمابرروی شدت فلوئورسانس پروتئین آلبومین سرم انسانی باغلظت۲۰میکرومولار . ۹۶
نمودار۴-۲۴: منحنی اثر افزایش دمابروی شدت فلوئورسانس پروتئین آلبومین سرم انسانی باغلظت۲۰میکرومولار ... ۹۷
نمودار۴-۲۵ : انرژی آزاد گیبس برحسب دما برای پروتئین آلبومین سرم انسانی با غلظت ۲۰ میکرومولار ۹۷
نمودار۴-۲۶ : انرژی آزاد گیبس برحسب دما برای پروتئین آلبومین سرم انسانی با غلظت ۲۰ میکرومولار..... ۹۸
نمودار۴-۲۷: انرژی آزاد گیبس برحسب دما برای پروتئین آلبومین سرم انسانی با غلظت ۲۰ میکرومولار ۹۸
نمودار۴-۲۸ : انرژی آزاد گیبس برحسب دما برای پروتئین آلبومین سرم انسانی با غلظت ۲۰ میکرومولار ۹۹

فصل اول:

مقدمه





۱-۱ مقدمه :

کلمه پروتئین به معنی اولیه یا اولین می‌باشد. این نامگذاری اولین بار در سال ۱۲۱۷ شمسی (۱۸۳۸ میلادی) توسط مولدر[1]، شیمی دان هلندی، به کار برده شد. این دانشمند معتقد بود که پروتئین، عامل اصلی و اولیه زندگی است و بدون آن زندگی غیرممکن است. پروتئین نقش بسیار مهمی در اعمال حیاتی تمام موجودات زنده، از کوچکترین ویروس گرفته تا بزرگترین پستاندار از جمله انسان بازی می‌کند و اگر بخواهیم ترکیبی را به نام "اساس زندگی" بخوانیم، آن را به پروتئین اطلاق می‌کنیم. کار فوق العاده کریستین انفینسن[2] و همکارانش در دهه ۱۹۵۰ بر روی آنزیم ریبونوکلئاز، ارتباط بین ترادف آمینواسیدی یک پروتئین و ساختار فضایی آن را روشن ساخت[3]. طرح انفینسن عبارت بود از تخریب ساختار سه بعدی آنزیم و سپس تعیین شرایطی که برای شکل گیری مورد نیاز است[۱]. وقتی که پروتئینها در محیط آبی قرار می‌گیرند، بخشهای آبدوست[4] در معرض مولکولهای آب و بخشهای آب گریز[5] دور ازآن قرار می‌گیرند و آرایش فضایی خاصی را به وجود می‌آورند که پروتئین درآن حالت، عمل خاص خود را ایفا می‌کند[۴-۲]. یکی از اهداف مهم در بیوشیمی فیزیک، پیش بینی صحیح ساختمان سه بعدی ماکرومولکولها است[۵].

ترمودینامیک غیرطبیعی شدن[6] پروتئین، پایه و اساس درک پایداری پروتئین است. غیرطبیعی کردن پروتئینها فرایندی است که در آن آرایش فضایی حالت طبیعی ماکرومولکول تغییر می‌کند، بدون آنکه پیوندهای کووالانسی اولیه تخریب شود یعنی در فرایند فوق، ساختمان اولیهٔ (توالی اسیدهای آمینه) ماکرومولکول تغییر نمی کند بلکه آرایش فضایی (ساختمان سه بعدی) آن تغییر می‌کند. منظور از آرایش فضایی، آرایش خاص اتمها در فضای سه بعدی و طول زوایای پیوندی می‌باشد[۶]. مکانیسم غیرطبیعی شدن پروتئین توسط لیگاندهای یونی بر پایهٔ دو نوع برهمکنش می‌باشد. ابتدا برهمکنشهای الکتروستاتیک[7] مابین بخش قطبی و باردار لیگاند و یونهای سطحی پروتئین و در ادامه برهمکنشهای آب گریز[8] مابین دم لیگاند و بخشهای آب گریز مابین دم لیگاند و بخشهای آب گریز پروتئین، سبب از هم گسیختن ساختار پروتئین می‌شود. در حقیقت غیرطبیعی شدن پروتئین، تغییر توازن برهمکنشهای قطبی و غیرقطبی در آن است. مولکول پروتئین که در

[1] -Mulder
[2] -Anfinsen
[3] -Structure-function relationship
[4] -Hydrophilic
[5] -Hydrophobic
[6] -Denaturation
[7] -Electrostatic interaction
[8] -Hydrophobic interaction

حالت تاخورده دارای فعالیت زیستی است، با بازشدن ساختمان سوم، فعالیت زیستی خود را از دست می‌دهد، این نوع غیرطبیعی شدن ساختمان پروتئین، پدیده‌ای متعاون بوده و با حذف تأثیر عوامل غیرطبیعی کننده پروتئین، برگشت‌پذیر می‌باشد. حالت تاخورده[9] پروتئین‌ها از حالت بازشده[10] آنها پایدارتر می باشد. پایداری حالت طبیعی پروتئین به تعادل میان برهمکنشهای موجود در ساختار طبیعی پروتئین بستگی دارد. این موضوع بیشتر بستگی به آرایش فضایی حالت غیرطبیعی پروتئین و نیز برهمکنشهای میان حالتهای طبیعی و غیرطبیعی با حلال دارد. با تغییر جزئی در pH یا درجه حرارت می‌توان ساختار پروتئین را تغییر داد. افزودن مواد غیر طبیعی کننده (مانند اوره)، با احیای پیوندهای دی سولفیدی می‌تواند سبب غیر طبیعی شدن ساختار پروتئین شود.

روش‌های گوناگون به کار رفته برای غیرطبیعی کردن پروتئین، بیانگر وجود برهمکنشهای متفاوتی است که سبب بی ثباتی حالت تاخورده می‌شود. باز شدن تا خوردگی اغلب بدون تغییر پیوندهای کووالان در پروتئین صورت می‌گیرد، بدین جهت حتی در صورت احیای پیوندهای دی سولفیدی این وضعیت برگشت پذیر است. همچنین پروتئین با ایجاد تغییرات شیمیایی به طور برگشت ناپذیر، فعالیت خود را از دست داده و غیرفعال می‌گردد که این غیرفعال شدن می‌تواند در نتیجهٔ برهمکنش لیگاند-پروتئین باشد.

پیوند لیگاند[11] به پروتئین می‌تواند اطلاعات ساختاری فراوانی از پروتئین در اختیار قرار دهد[۱۲-۷]. لیگاندها از نظر میزان پیچیدگی با یکدیگر تفاوت دارند. بعضی از لیگاندها پایدارکننده پروتئینها هستند و بعضی دیگر پروتئینها را ناپایدار می‌کنند. اتصال لیگاندها به پروتئینها سبب تغییر در آرایش فضایی آنها می‌شود. برهمکنش لیگاند و پروتئین از نوع برهمکنش فیزیکی می‌باشد. لیگاندها شامل سوبستراهای آنزیمی، آنیونهای اسیدچرب، کاتیونهای فلزی، مواد فعال سطحی و غیره هستند. به ناحیه ای از سطح ماکرومولکول که پذیرای لیگاند موردنظر است، جایگاه اتصال[12] گویند. یک ماکرومولکول می‌تواند یک یا چندین جایگاه پیوندی یا حتی چندین دسته جایگاه پیوندی[13] یکسان[14]، غیریکسان[15]، مستقل[16] یا وابسته[17] داشته باشد. اختصاصی بودن اتصال لیگاند یکی از پارامترهای مهم در فعالیتهای بیولوژیکی پروتئینهاست. در بعضی موارد کاهش این ویژگی، خود یک امتیاز محسوب شده و باعث می‌شود که یک ماکرومولکول بتواند به طیف وسیعی از

[9] -Folding
[10] -Unfolding
[11] -Ligand binding
[12] -Binding site
[13] -Binding set
[14] -Identical
[15] -Non identical
[16] -Independent
[17] -Dependent