

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش بیوشیمی

مطالعات ساختمانی پایداری میوگلوبین در حضور اوره،
گوانیدین هیدروکلرید و نانو ذرات ZnO ، Fe_2O_3 و Fe_3O_4

استاد راهنما:

دکتر بهزاد شارقى

استاد مشاور:

دکتر ابوالفضل سمنانى

توسط:

هما محمدى

شهریور ماه ۱۳۹۲

چکیده:

میوگلوبین یک پروتئین کروی تک زنجیره‌ای ۱۵۳ یا ۱۵۴ اسیدآمینهای دارای یک گروه پروستاتیک هم با عملکرد زیستی اولیه اتصال برگشت‌پذیر و انتقال اکسیژن در بافت ماهیچه‌ای است. میوگلوبین شامل یک حلقه پورفیرینی با یک مرکز آهن است. یک گروه هیستیدین نزدیک وجود دارد که مستقیماً به مرکز آهن متصل است و یک گروه هیستیدین دور در سمت مخالف که به آهن متصل نیست. میوگلوبین با هم، وزن مولکولی ۱۷۶۹۹ دالتون دارد. میوگلوبین دارای ۸ آلفاهلیکس و یک هسته هیدروفوبیک می‌باشد. میوگلوبین قلب اسب دارای ۲ رزیدوی تیروزین و ۷ رزیدوی تریپتوفان می‌باشد. برای اولین بار ساختار کریستالی این پروتئین مشخص شد و بازشدگی برگشت‌پذیر آن به خوبی مطالعه شده است. در این مطالعه، برهم‌کنش اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید و نانوذرات Fe_2O_3 ، ZnO و Fe_3O_4 با میوگلوبین اسب در بافر فسفات سدیم توسط طیف‌سنجی در محدوده ماورای بنفش - مرئی در $\text{pH}=7$ و طیف‌سنجی فلورسانس در ۷ و $\text{pH}=2$ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج اثر دگرگون‌کنندگی اوره و گوانیدین‌هیدروکلراید بر ساختار پروتئین و کاهش T_m میوگلوبین را نشان می‌دهد و بنابراین پایداری میوگلوبین طبیعی کاهش می‌یابد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات Fe_2O_3 ، ZnO و Fe_3O_4 سبب ناپایداری میوگلوبین در نتیجه یک کاهش در دمای باز شدن میوگلوبین می‌گردند. در حضور اوره، شدت فلورسانس در دماهای مختلف در ۷ و $\text{pH}=2$ افزایش یافت. در حضور گوانیدین‌هیدروکلراید، شدت فلورسانس در دماهای مختلف در $\text{pH}=7$ افزایش یافت، درحالی‌که $\text{pH}=2$ یک اثر منفی روی شدت فلورسانس میوگلوبین در دماهای مختلف داشت. داده‌های فلورسانس نشان داد که خاموشی فلورسانس میوگلوبین توسط نانوذرات اکسیدروی در نتیجه تشکیل کمپلکس میوگلوبین اسب-نانوذرات اکسیدروی بود. در حضور نانوذرات Fe_2O_3 ، شدت فلورسانس در دماهای مختلف در $\text{pH}=7$ کاهش یافت. نانوذرات Fe_3O_4 با میوگلوبین برهم‌کنش می‌دهند و سبب تشکیل یک میوگلوبین باز می‌گردند.

کلمات کلیدی: میوگلوبین، بازشدگی، اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید، نانوذرات ZnO ، Fe_2O_3 و Fe_3O_4 ، طیف‌سنجی در محدوده ماورای بنفش - مرئی، طیف‌سنجی فلورسانس

فهرست مطالب

شماره صفحه	عنوان
۱	فصل اول-مقدمه
۱	۱-۱- پروتئین‌ها
۲	۱-۱-۱- تعریف پروتئین‌های فیبری
۲	۲-۱-۱- تعریف پروتئین کروی
۲	۳-۱-۱- پروتئین‌های تک‌واحدی
۲	۴-۱-۱- پروتئین‌های الیگومریک
۳	۲-۱- ساختار پروتئین‌ها
۳	۱-۲-۱- ساختار اول
۴	۲-۲-۱- ساختار دوم
۵	۳-۲-۱- ساختار سوم
۶	۴-۲-۱- ساختار چهارم
۷	۳-۱- پایداری پروتئین
۹	۴-۱- توصیف ترمودینامیکی تاخوردن پروتئین
۱۰	۵-۱- توصیف سهم نیروهای غالب در تاخوردن پروتئین
۱۱	۶-۱- نیروهای غیرکووالان منجر به تاخوردن پروتئین شده و در پایداری پروتئین‌ها شرکت می‌کنند
۱۱	۷-۱- ارتباط ترمودینامیکی بین ساختار، پایداری و عملکرد پروتئین
۱۲	۸-۱- دگرگون شدن پروتئین‌ها
۱۳	۹-۱- روش های دگرگون سازی پروتئین‌ها
۱۳	۱-۹-۱- دگرگون سازی حرارتی
۱۳	۲-۹-۱- دگرگون سازی توسط pH
۱۴	۳-۹-۱- دگرگون سازی توسط حلال‌های آلی
۱۴	۴-۹-۱- دگرگون سازی توسط اوره و گوانیدین‌هیدروکلراید
۱۵	۵-۹-۱- پاک کننده‌ها
۱۵	۱۰-۱- استفاده از دگرگون سازی در مطالعه پروتئین‌ها
۱۶	۱۱-۱- میوگلوبین

- ۱۲-۱- هم ۱۸
- ۱۳-۱- نقش میوگلوبین در بیماری‌ها ۱۹
- ۱۴-۱- کد نمودن واحد اتصال شونده به هم توسط آگرون مرکزی ژن میوگلوبین ۲۰
- ۱۵-۱- شباهت و تفاوت میوگلوبین و هموگلوبین ۲۰
- ۱۵-۱-۱- شباهت زنجیره‌های α و β هموگلوبین و میوگلوبین ۲۱
- ۱۶-۱- منحنی اشباع اکسیژن توسط میوگلوبین ۲۲
- ۱۷-۱- اتصال اکسیژن و میوگلوبین ۲۲
- ۱۸-۱- ذخیره اکسیژن توسط اکسی میوگلوبین ۲۶
- ۱۹-۱- آپومیوگلوبین ۲۷
- ۲۰-۱- اتصال مونواکسیدکربن و نیتریک اکساید به میوگلوبین ۲۷
- ۲۱-۱- جلوگیری از اتصال مونواکسیدکربن به هم توسط هیستیدین انتهایی ۳۰
- ۲۲-۱- عوامل محیطی مؤثر بر قابل برگشت بودن اکسیژناسیون میوگلوبین ۳۱
- ۲۳-۱- روش‌های طیف‌سنجی برای ارزیابی ساختار و عملکرد پروتئین ۳۳
- ۲۳-۱- جذب ۳۳
- ۲۳-۱-۲- مقدار جذب ۳۳
- ۲۳-۱-۳- رابطه جذب با غلظت ۳۴
- ۲۳-۱-۴- دستگاه طیف‌سنج ۳۴
- ۲۴-۱- فلورسانس ۳۵
- ۲۴-۱-۱- دستگاه طیف‌سنج فلورسانس ۳۵
- ۲۵-۱- فناوری نانو ۳۶
- ۲۵-۱-۱- مفهوم مقیاس نانو ۳۶
- ۲۵-۱-۲- معرفی فناوری نانو ۳۶
- ۲۵-۱-۳- نانو تکنولوژی ۳۷
- ۲۵-۱-۴- ویژگی‌های مواد نانو ساختاری ۳۷
- ۲۵-۱-۵- کاربردهای فناوری نانو در پزشکی ۳۷
- ۲۶-۱- محلول‌های نانوذرات اکسیدروی (ZnO) و اکسید آهن (Fe_3O_4 , Fe_2O_3) ۳۹
- ۲۷-۱- عوامل دگرگون کننده مورد استفاده ۴۰
- ۲۸-۱- هدف از انجام مطالعه ۴۱

فصل دوم- مواد و روش ها ۴۲

۱-۲- تهیه محلول های مورد نیاز: ۴۲

۱-۱-۲- تهیه بافر (تامپون) فسفات سدیم (NaH_2PO_4): ۴۲

۲-۱-۲- تهیه محلول های اوره و گوانیدین هیدروکلراید: ۴۳

۳-۱-۲- تهیه محلول های نانوذرات اکسیدروی (ZnO) و اکسید آهن (Fe_2O_3 و Fe_3O_4): ۴۳

۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور مواد مختلف: ۴۳

۱-۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۳

۲-۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور اوره در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۳

۳-۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۳

۴-۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور نانوذره اکسیدروی در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۴

۵-۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۴

۶-۲-۲- مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور نانوذره اکسید آهن IV (Fe_3O_4) در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۴

۳-۲- مطالعه طیف سنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور مواد مختلف: ۴۴

۱-۳-۲- مطالعه طیف سنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور اوره در دماهای مختلف: ۴۴

۲-۳-۲- مطالعه طیف سنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دماهای مختلف: ۴۵

۳-۳-۲- مطالعه طیف سنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور نانوذره اکسیدروی در دماهای مختلف: ۴۵

۴-۳-۲- مطالعه طیف سنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دماهای مختلف: ۴۵

۴۶..... فصل سوم- نتایج

۱-۳- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور مواد مختلف: ۴۶

۱-۱-۳- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۶

۲-۱-۳- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور اوره در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۴۷

۳-۱-۳- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: ۵۰

۳-۱-۴- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور نانوذره اکسیدروی (ZnO) در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین:.....	۵۳
۳-۱-۵- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور نانوذره اکسید آهن III (Fe ₂ O ₃) در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین:.....	۵۶
۳-۱-۶- بررسی نتایج مطالعه پایداری حرارتی میوگلوبین در حضور نانوذره اکسید آهن IV (Fe ₃ O ₄) در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین:.....	۵۹
۳-۲- بررسی نتایج مطالعه طیفسنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور محلول‌های مختلف:.....	۶۲
۳-۲-۱- بررسی نتایج مطالعه طیفسنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور اوره در دماها و pHهای مختلف:.....	۶۲
۳-۲-۲- بررسی نتایج مطالعه طیفسنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دماها و pHهای مختلف:.....	۶۹
۳-۲-۳- بررسی نتایج مطالعه طیفسنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور نانوذره اکسیدروی (ZnO) در دماها و pHهای مختلف:.....	۷۶
۳-۲-۴- بررسی نتایج مطالعه طیفسنجی فلورسانس میوگلوبین در حضور نانوذره اکسید آهن III (Fe ₂ O ₃) در دماهای مختلف و pH=۷:.....	۸۳
فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری	۸۷
منابع	۹۸

فهرست شکل‌ها

شماره صفحه	شکل
۳.....	شکل ۱-۱: ساختار اول پروتئین
۴.....	شکل ۱-۲: تشکیل پیوند پپتیدی با روش تغلیظ
۶.....	شکل ۱-۳: عوامل پایدارکننده ساختار سوم یک پروتئین
۷.....	شکل ۱-۴: سطوح ساختمانی در پروتئین‌ها.....
۱۰.....	شکل ۱-۵: تشکیل پیوند هیدروژنی و پیوند آب‌گریز در تاخوردگی پروتئین
۱۱.....	شکل ۱-۶: عمل متقابل سهم اجزای شرکت کننده در پایداری کلی یک پروتئین کروی
۱۲.....	شکل ۱-۷: دگرگون شدن ساختمان پروتئین
۱۴.....	شکل ۱-۸: دگرگون سازی توسط pH
۱۵.....	شکل ۱-۹: دگرگون سازی توسط اوره و گوانیدین هیدروکلراید.....
۱۶.....	شکل ۱-۱۰: ساختمان میوگلوبین
۱۸.....	شکل ۱-۱۱: مدل میوگلوبین با تفکیک بالا
۱۹.....	شکل ۱-۱۲: ساختار پورفیرین: A: حلقه پیرول، B: حلقه پورفیرین، C: پروتوپورفیرین IX
۱۹.....	شکل ۱-۱۳: ساختار هم
۲۱.....	شکل ۱-۱۴: منحنی اشباع شدن میوگلوبین و هموگلوبین
۲۲.....	شکل ۱-۱۵: منحنی اشباع اکسیژن میوگلوبین
۲۳.....	شکل ۱-۱۶: موقعیت قرارگیری اتم آهن در میوگلوبین
۲۳.....	شکل ۱-۱۷: هیستیدین دیستال و پروکسیمال
۲۴.....	شکل ۱-۱۸: محل اتصال اکسیژن در میوگلوبین
۲۵.....	شکل ۱-۱۹: کسر مولکولهای متصل شده به اکسیژن
۲۶.....	شکل ۱-۲۰: اکسیژنه شدن هم
۲۸.....	شکل ۱-۲۱: ساختارهای $Fe(II)O_2$ ، $Fe(II)CO$ و $Fe(II)NO$ در میوگلوبین طبیعی
۳۰.....	شکل ۱-۲۲: ترسیم چهار مرحله اتصال اکسیژن به میوگلوبین
۳۲.....	شکل ۱-۲۳: پورفیرین آهن دار متصل به اکسیژن
۳۲.....	شکل ۱-۲۴: فرمول ساختمانی محفظه‌ای که پورفیرین آهن دار در آن جای میگیرد

- شکل ۱-۲۵: شماتیکی از دستگاه طیف‌سنج ۳۴
- شکل ۱-۲۶: شماتیکی از دستگاه طیف‌سنج فلورسانس ۳۵
- شکل ۱-۲۷: نانوذره اکسیدروی ZnO ۳۹
- شکل ۱-۲۸: نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) ۴۰
- شکل ۱-۲۹: نانوذره اکسید آهن IV (Fe_3O_4) ۴۰
- شکل ۴-۱: مدل برهم‌کنش اوره با میوگلوبین در محلول آبی ۹۲

فهرست نمودارها

نمودار

شماره صفحه

- نمودار ۱-۳: تغییرات جذب (A) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف اوره در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۴۸
- نمودار ۲-۳: تغییرات F_U (کسر دگرگون سازی) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف اوره در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۴۸
- نمودار ۳-۳: تغییرات ΔG° میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف اوره در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۴۹
- نمودار ۴-۳: تغییرات جذب (A) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۰
- نمودار ۵-۳: تغییرات F_U (کسر دگرگون سازی) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۱
- نمودار ۶-۳: تغییرات ΔG° میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۲
- نمودار ۷-۳: تغییرات جذب (A) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۴
- نمودار ۸-۳: تغییرات F_U (کسر دگرگون سازی) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۴
- نمودار ۹-۳: تغییرات ΔG° میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۵
- نمودار ۱۰-۳: تغییرات جذب (A) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۷
- نمودار ۱۱-۳: تغییرات F_U (کسر دگرگون سازی) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۷
- نمودار ۱۲-۳: تغییرات ΔG° میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در $\text{pH}=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین ۵۸

- نمودار ۳-۱۳: تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن IV (Fe_3O_4) در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلین..... ۶۰
- نمودار ۳-۱۴: تغییرات ΔG° میوگلوبین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن IV (Fe_3O_4) در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلین..... ۶۰
- نمودار ۳-۱۵: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۶۲
- نمودار ۳-۱۶: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۶۳
- نمودار ۳-۱۷: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۶۳
- نمودار ۳-۱۸: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۶۴
- نمودار ۳-۱۹: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۶۴
- نمودار ۳-۲۰: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف اوره و دماهای مختلف و $pH=7$ ۶۵
- نمودار ۳-۲۱: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۶۶
- نمودار ۳-۲۲: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۶۶
- نمودار ۳-۲۳: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۶۷
- نمودار ۳-۲۴: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۶۷
- نمودار ۳-۲۵: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۶۸
- نمودار ۳-۲۶: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف اوره و دماهای مختلف و $pH=2$ ۶۸
- نمودار ۳-۲۷: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین-هیدروکلراید در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۶۹
- نمودار ۳-۲۸: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین-هیدروکلراید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۰

- نمودار ۳-۲۹: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۰
- نمودار ۳-۳۰: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۱
- نمودار ۳-۳۱: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۱
- نمودار ۳-۳۲: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید و دماهای مختلف و $pH=7$ ۷۲
- نمودار ۳-۳۳: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۷۳
- نمودار ۳-۳۴: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۷۳
- نمودار ۳-۳۵: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۷۴
- نمودار ۳-۳۶: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۷۴
- نمودار ۳-۳۷: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۷۵
- نمودار ۳-۳۸: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید و دماهای مختلف و $pH=2$ ۷۵
- نمودار ۳-۳۹: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۶
- نمودار ۳-۴۰: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۷
- نمودار ۳-۴۱: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۷
- نمودار ۳-۴۲: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۸
- نمودار ۳-۴۳: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۷۸

- نمودار ۳-۴۴: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی و دماهای مختلف و $pH=7$ ۷۹
- نمودار ۳-۴۵: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۸۰
- نمودار ۳-۴۶: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۸۰
- نمودار ۳-۴۷: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۸۱
- نمودار ۳-۴۸: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۸۱
- نمودار ۳-۴۹: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=2$ ۸۲
- نمودار ۳-۵۰: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی و دماهای مختلف و $pH=2$ ۸۲
- نمودار ۳-۵۱: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۸۳
- نمودار ۳-۵۲: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۸۴
- نمودار ۳-۵۳: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۸۴
- نمودار ۳-۵۴: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۸۵
- نمودار ۳-۵۵: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و $pH=7$ ۸۵
- نمودار ۳-۵۶: تغییرات شدت فلورسانس میوگلوبین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) و دماهای مختلف و $pH=7$ ۸۶

فهرست جدول‌ها

شماره صفحه	جدول
۴۹.....	جدول ۱-۳: تغییرات T_m میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۰.....	جدول ۲-۳: تغییرات T_m ، ΔS_m° و ΔH_m° میوگلوبین در غلظت‌های مختلف اوره در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۲.....	جدول ۳-۳: تغییرات T_m میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۳.....	جدول ۴-۳: تغییرات T_m ، ΔS_m° و ΔH_m° میوگلوبین در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۶.....	جدول ۵-۳: تغییرات T_m میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۶.....	جدول ۶-۳: تغییرات T_m ، ΔS_m° و ΔH_m° میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی، در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۸.....	جدول ۷-۳: تغییرات T_m میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۵۹.....	جدول ۸-۳: تغییرات T_m ، ΔS_m° و ΔH_m° میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن III (Fe_2O_3) در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۶۱.....	جدول ۹-۳: تغییرات T_m میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن IV (Fe_3O_4) در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....
۶۱.....	جدول ۱۰-۳: تغییرات T_m ، ΔS_m° و ΔH_m° میوگلوبین در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن IV (Fe_3O_4) در $pH=7$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین.....

فصل اول

۱- مقدمه

۱-۱- پروتئین‌ها

پروتئین‌ها ماکرومولکول‌هایی با وزن مولکولی حداقل چند هزار دالتون می‌باشند. این بیومولکول‌ها به فراوانی در انواع موجودات زنده یافت می‌شوند و بیش از نصف وزن خشک سلول‌ها را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌ها ساختارهای اصلی غشاهای سلولی و سیتوپلاسم می‌باشند. پروتئین‌ها یکی از مهم‌ترین مولکول‌های زیستی در تشکیل و بقای ساختار بدن می‌باشند. برخی از پروتئین‌ها دارای فعالیت کاتالیتیک بوده و به عنوان آنزیم عمل می‌کنند؛ سایر پروتئین‌ها به عنوان هورمون‌ها، عناصر ساختمانی، آنتی‌بادی‌ها، عناصر تنظیمی، عناصر ذخیره‌ای، گیرنده‌های پیام یا انتقال دهنده پیام می‌باشند. پروتئین‌های ساده به دو گروه پروتئین‌های فیبری و پروتئین‌های کروی تقسیم می‌شوند.

۱-۱-۱- تعریف پروتئین‌های فیبری

این دسته از پروتئین‌ها، در آب حلالیت کمی داشته و برخی از آن‌ها غیر محلول می‌باشند به طوری که قادرند نقش ساختاری ایفا کنند. از این گروه می‌توان به کلاژن و آلفا-کراتین اشاره نمود (Murray et al., 2009).

۱-۱-۲- تعریف پروتئین کروی

این دسته از پروتئین‌ها در آب محلول بوده و امکان دارد که از محلول، کریستاله شوند. نقش عملکردی در ارگانیسم‌های زنده دارند. آنزیم‌ها، در این گروه جای دارند. همه پروتئین‌ها از واحد های 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 (Devlin and Harwood, 2002).

۱-۱-۳- پروتئین‌های تک‌واحدی

پروتئین‌هایی هستند که فقط واحد یک زنجیر پلی پپتیدی بوده و بنابراین به واحدهای کوچک‌تری تجزیه نمی‌گردند. تعداد کمی از آنزیم‌های تک‌واحدی شناخته شده‌اند و همه آنها واکنش‌های هیدرولیتیک را کاتالیز می‌کنند. به‌طور کلی این پروتئین‌ها دارای ۱۰۰ تا ۷۰۰ اسیدآمینو 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. پروتئین‌ها نیز در این گروه جای دارند.

۱-۱-۴- پروتئین‌های الیگومریک

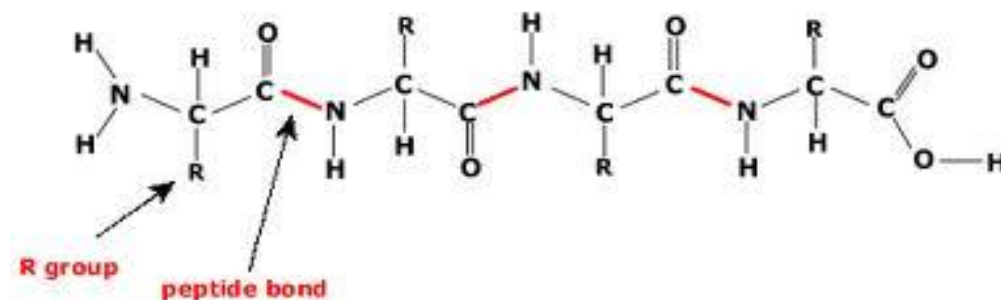
این دسته از پروتئین‌ها از دو یا بیش از دو زنجیر پلی پپتیدی تشکیل می‌گردند و معمولاً از طریق اندرکنش-های غیرکووالان به یکدیگر متصل می‌شوند. زنجیره‌های پلی پپتیدی تشکیل دهنده زیرواحد نام داشته که ممکن است مشابه یکدیگر یا متفاوت باشند. پروتئین‌های دایمریک از دو زیر واحد و انواع تریمریک از سه زیرواحد تشکیل 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 غیرفعال سنتز نمی‌شوند بلکه فعالیت‌شان از طریق مهار شدن پس‌نورد کنترل می‌گردد. به عنوان مثال تمام آنزیم‌های درگیر در فرایند گلیکولیز دو یا چهار زیرواحدی هستند (Tymoczko et al., 2011).

۱-۲- ساختار پروتئین‌ها

اغلب پروتئین‌ها دارای چهار ساختار می‌باشند:

۱-۲-۱- ساختار اول:

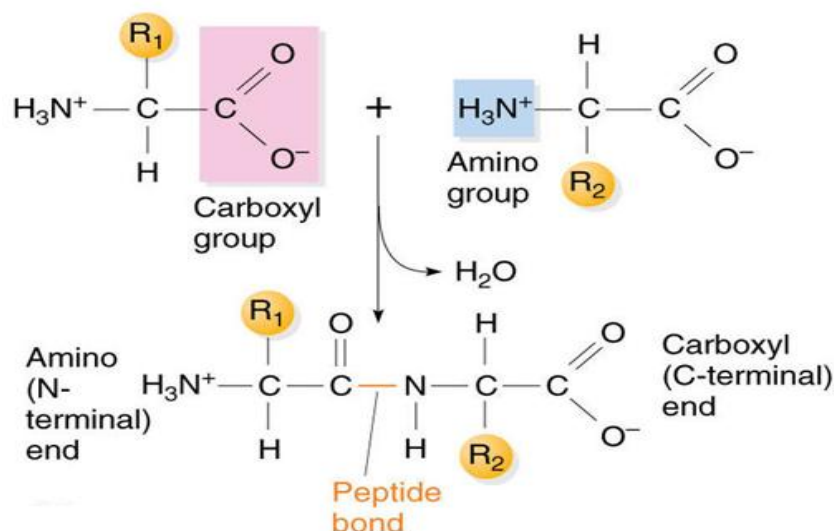
آرایش فضایی اتم‌های موجود در یک پروتئین را صورت‌بندی^۱ می‌گویند. توالی آمینواسیدهای موجود در یک زنجیره پلی‌پپتیدی شامل ۲۰۰۰-۵۰ رزیدو، ساختار اول پروتئین نام دارد. ترکیب آمینواسیدهای یک زنجیره پپتیدی تأثیر شگرفی بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها دارد. ساختار اول، ساختار طبیعی سه بعدی یک مولکول پروتئینی را نمی‌تواند نشان‌دهد.



شکل ۱-۱: ساختار اول پروتئین

در واقع پروتئین‌ها از حدود ۲۲ آمینواسید تشکیل شده‌اند که با استفاده از پیوند آمیدی یا پپتیدی به هم متصل می‌شوند. 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 انتهایی آمینو (یا انتهای N) و ریشه موجود در انتهای دیگر، دارای یک گروه کربوکسیل آزاد را ریشه انتهایی کربوکسیل (یا انتهای C) گویند (Devlin and Harwood, 2002 Dougherty, 2000,)

¹ Conformation



شکل ۱-۲: تشکیل پیوند پپتیدی با روش تغلیظ

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

۱-۲-۲- ساختار دوم

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

۱) **مارپیچ آلفا**^۲: مارپیچ آلفا یکی از ساختمان‌های دوم معمول پروتئینی است که توسط پیوندهای هیدروژنی درون زنجیره‌ای که بین هیدروژن آمیدی یک پیوند پپتیدی و اکسیژن گروه کربوکسیل پیوند پپتیدی دیگر ایجاد می‌شوند، پایدار می‌گردد (Nelson and Cox, 2010).

۲) **صورتبندی بتا**^۳: ساختار دوم دیگر، صورتبندی بتا است که در آن زنجیره‌های پپتیدی بصورت صفحه سازماندهی می‌شوند. در این صورتبندی بتا، اسکلت پلی‌پپتیدی به شکل یک ساختمان زیگزاگی امتداد یافته وجود دارد. این زنجیره‌های زیگزاگی می‌توانند بطور پهلو به پهلو در کنار یکدیگر قرار گرفته و ایجاد ساختمانی مشابه یکسری چین نمایند. در این آرایش که صفحه بتا نامیده می‌شود، 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 ($6/5\text{\AA}$) در مقابل 7\AA برای موازی ناهمسو) و الگوی متفاوت پیوندهای هیدروژنی را دارند.

^۲ α -Helix

^۳ B Conformation

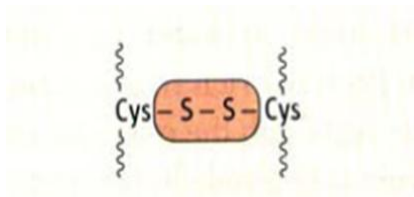
۳) پیچ بتا^۴: در پروتئین‌های کروی که ساختمان متراکم تاشده‌ای دارند، حدود یک‌سوم ریشه‌های اسیدآمینه در ساختمان پیچ‌ها و قوس‌ها قرار دارند که در آن‌ها جهت زنجیرها تغییر می‌کند. این‌ها عناصر ارتباطی هستند که بخش‌های متوالی مارپیچ آلفا و صورتبندی بتا را به یکدیگر متصل می‌کنند. انواع بخصوص شایع، شامل پیچ‌های بتا می‌باشند که دو انتهای دو قطعه مجاور یک صفحه بتا موازی ناهمسو را به یکدیگر متصل می‌کنند. این ساختمان یک پیچ 180° است که در آن چهار ریشه آمینواسید وجود دارد و اکسیژن کربونیل ریشه آمینواسید اول با هیدروژن گروه آمینوی آمینواسید چهارم ایجاد یک پیوند هیدروژنی می‌کند. پیچ‌های بتا اغلب در نزدیکی سطح یک پروتئین دیده می‌شوند که در آنجا گروه‌های پپتیدی دو ریشه آمینواسید میانی می‌توانند با آب ایجاد پیوند هیدروژنی کنند (Berman, 1999).

۱-۲-۳- ساختار سوم

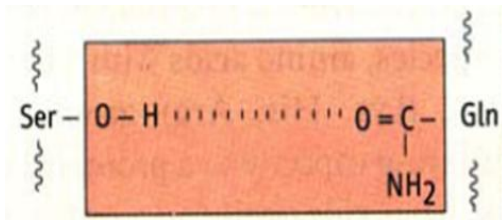
آرایش سه‌بعدی کلی تمامی اتم‌های موجود در یک پروتئین را ساختمان سوم پروتئین گویند. پروتئین‌های کروی بخاطر اینکه تاخوردگی^۵ داخلی‌شان (ساختار سومشان) ساختار کروی دارد، به این اسم نامگذاری شده‌اند. این پروتئین‌های کروی محلول در آب هستند، محلول‌های کلوئیدی تشکیل می‌دهند و در شکل جامدشان، ساختار کریستالی ایجاد می‌کنند. این پروتئین‌های کروی محلول در آب هستند، محلول‌های کلوئیدی تشکیل می‌دهند و در شکل جامدشان، ساختار کریستالی ایجاد می‌کنند. این دسته از پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های عملکردی، آنزیم‌ها، ایمنوگلوبولین‌ها، 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 آمینواسیدهای قطبی در قسمت خارجی پروتئین قرار دارند (Taylor Ringia et al., 2004). عوامل پایدارکننده ساختار سوم یک پروتئین برهم کنش‌های آب‌گریز، پیوندهای هیدروژنی، پل نمکی و پیوندهای دی‌سولفیدی می‌باشند. در ساختار سوم زنجیره جانبی آمینواسیدهای تریپتوفان و آرژینین به عنوان دهنده و گیرنده پیوند هیدروژنی و آمینواسیدهای لیزین، آسپارتیک‌اسید، گلوتامیک‌اسید، تیروزین و هیستیدین همچنین به عنوان دهنده و گیرنده تشکیل جفت یون (پل نمکی) به کار می‌روند. در سطح پروتئین دو آمینواسید با بار مخالف مثل گلوتامات با گروه γ -کربونیل و لیزین با یک گروه ϵ -آمینو می‌توانند تشکیل یک پل نمکی دهند (Murray et al., 2009). برخی پروتئین‌ها دارای پیوندهای دی‌سولفیدی کووالانسی که گروه‌های سولفیدریل رزیدوهای سیستمین را به هم متصل می‌کنند. تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی مستلزم اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل مربوط به سیستمین و نیازمند اکسیژن می‌باشد. پیوندهای دی‌سولفیدی درون پلی‌پپتیدی سبب پایداری بیشتر آرایش فضایی خمیده یک پپتید می‌شوند، در حالی که پیوندهای دی-سولفیدی بین پلی‌پپتیدی ساختار نوع چهارم پروتئین‌های الیگومریک خاص را پایدار می‌کند (Dill, 1990).

⁴ β -Turn

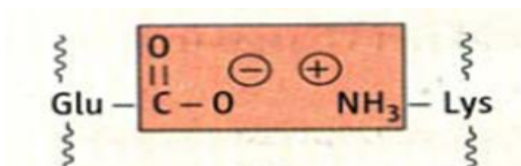
⁵ Folding



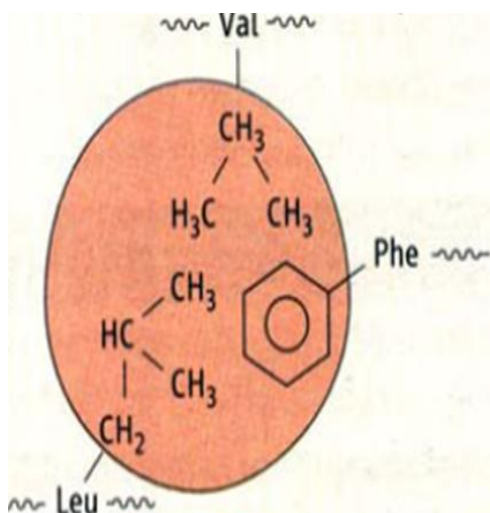
۱. پیوندهای دی سولفیدی



۲. پیوندهای هیدروژنی



۳. پل های نمکی



۴. برهم کنش های آب گریز

شکل ۱-۳: عوامل پایدارکننده ساختار سوم یک پروتئین

۱-۲-۴- ساختار چهارم

بسیاری از پروتئین‌های کروی از زیرواحدهای متعددی ساخته شده‌اند که ساختار چهارم به این گروه از پروتئین‌ها اختصاص دارد. یک کمپلکس که شامل دو یا چند زنجیره پپتیدی مجزا که توسط برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی کنار هم نگه داشته می‌شوند، ساختار چهارم می‌باشد. به یک پروتئین چند زیرواحدی مولتی‌مر نیز می‌گویند که اگر زیرواحدها یکسان باشند، ساختار چهارم هموزن و اگر زیرواحدها متفاوت باشند، ساختار چهارم هتروزن می‌باشد. پروتئین‌های مولتی‌مری می‌توانند از دو تا صدها زیرواحد تشکیل شده باشند (Daggett and Fersht, 2003). در شکل ۱-۴ چهار ساختار پروتئین‌ها که تاکنون گفتیم به تصویر کشیده شده‌است.