بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی

مطالعه سینتیکی آنزیم پروتئیناز K در حضورنانو ذرات اکسید روی (ZnO) و اکسید آهن(Fe_2O_3، Fe_3O_4) و حلال های آلی

استاد راهنما:

دکتر بهزاد شارقی

استاد مشاور:

دکتر ابوالفضل سمنانی

پژوهشگر:

الهام یداللهی

شهریورماه۱۳۹۳

کلیه حقوق مادی مرتبط بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر

بر خود لازم می‌دانم از استاد شایسته جناب آقای دکتر بهزاد شارقی که در تمامی مراحل این پایان‌نامه راهنما و راه گشای من بوده اند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

همچنین از جناب آقای دکتر سمنانی که با راهنمایی‌های ارزنده خود به من در انجام این پایان نامه کمک کردند کمال تشکر و امتنان را دارم.

از خانواده عزیزم که همیشه بهترین پشتوانه و دل‌گرمی من در تمامی مراحل زندگی بوده‌اند نهایت تشکر و سپاسگذاری را دارم.

و از همه کسانی که به من در این مدت یاری رساندند کمال تشکر را داشته و برای همه این عزیزان آرزوی موفقیت روز افزون دارم.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یاوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

چکیده

آنزیم پروتئیناز K (EC(3.4.21.14 جزء خانواده سرین پروتئینازها می‌باشد که توسط قارچ Tritirachum album Limber تولید شده و این ارگانیسم را قادر می‌سازد کراتین را تجزیه و آن را به عنوان منبعی از قند و نیتروژن استفاده کند. این آنزیم دارای ۲۷۹ اسیدآمینه و به صورت پلی‌پپتید تک‌رشته‌ای است. در جایگاه فعال این آنزیم Ser۲۲۴، His۶۹ وAsp۳۹ قرار دارد که هیستیدین و آسپارتات توسط یک باند هیدروژنی کوتاه به هم وصل می‌شوند. این آنزیم برش در سوبسترا را از ناحیه کربوکسیلیک، اسیدهای آمینه آلیفاتیک و آروماتیک انجام می‌دهد که این برش بیشتر بین اسیدآمینه‌های فنیل‌آلانین و آلانین رخ می‌دهد. اکثر مطالعاتی که بر روی آنزیم پروتئیناز K صورت گرفته، مطالعات ساختاری بوده است. این مطالعات منجر به تعیین توالی اسیدآمینه و خصوصیات کلی آنزیم شده است. با توجه به پایداری بالای این آنزیم در دمای بالا و همچنین فعال ماندن در pH های مختلف (۱۰- ۳) در مطالعات مربوط به پروتئین‌ها از این آنزیم استفاده می‌شود.

مطالعات سینتیکی آنزیم پروتئیناز K، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۷ (بافرفسفات) و در حضور غلظت‌های مختلف بوتانول، ۱و۴بوتاندیول، اسپرمین، پوترسین، اکسید روی و نانوذرات اکسید آهن، اکسید روی و اکسید سیلیسیوم مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که در حضور حلال‌های آلی بوتانول و ۱و۴ بوتاندیول فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. اکسید روی و نانوذرات اکسید آهن، اکسید روی و اکسید سیلیسیوم بر روی آنزیم اثر مهاری دارند. پوترسین و اسپرمین باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شوند.

کلمات کلیدی: پروتئیناز K، بوتانول، ۱و۴بوتاندیول، اسپرمین، پوترسین، اکسید روی، نانوذرات اکسید آهن، اکسید روی و اکسید سیلیسیوم، سینتیک آنزیمی

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

۱- فصل اول- مقدمه ۱

۱-۱- ماکرومولکول‌ها ۱

۱-۲- پروتئین‌ها ۱

۱-۲-۱- ساختمان پروتئین‌ها ۲

۱-۲-۱-۱- ساختار سه بعدی پروتئین‌ها ۲

۱-۲-۲- مروری کلی بر ساختمان پروتئین‌ها ۲

۱-۲-۲-۱- ساختمان اول ۳

۱-۲-۲-۲- ساختمان دوم ۳

۱-۲-۲-۳- ساختمان سوم ۵

۱-۲-۲-۴- ساختمان چهارم ۶

۱-۲-۳- عوامل پایدارکننده ساختارهای نوع سوم و چهارم ۶

۱-۲-۴- دگرگون‌سازی وتاخوردن پروتئین‌ها ۷

۱-۲-۴-۱- توصیف ترمودینامیکی تاخوردن پروتئین‌ها ۷

۱-۲-۴-۲- تا شدن پروتئین‌ها به کمک سایر پروتئین‌ها ۷

۱-۲-۴-۳- دگرگون‌سازی پروتئین‌ها ۷

۱-۲-۴-۴- روش‌های دگرگون‌سازی پروتئین‌ها ۸

۱-۲-۴-۵- استفاده از دگرگون‌سازی در مطالعه پروتئین‌ها ۹

۱-۲-۵- حلالیت پروتئین‌ها ۹

۱-۳- آنزیم‌ها ۱۰

۱-۳-۱- طبقه‌بندی آنزیم‌ها ۱۱

۱-۳-۲- مفاهیم کلی نحوه عمل آنزیم‌ها ۱۱

۱-۳-۳- جایگاه فعال آنزیم ۱۲

۱-۳-۴- فعالیت آنزیم‌ها ۱۳

۱-۳-۴-۱- چند اصطلاح در مورد فعالیت آنزیم‌ها ۱۳

۱-۳-۴-۲- اثر pH بر فعالیت آنزیم ۱۳

۱-۳-۴-۳- اثر دما بر فعایت آنزیم ۱۴
۱-۳-۴-۴- پایداری آنزیم‌ها ۱۴
۱-۳-۵- بررسی ترمودینامیک آنزیم‌ها ۱۴
۱-۳-۵-۱- اتصال آنزیم به سوبسترا ۱۵
۱-۳-۵-۲- حالت گذار ۱۵
۱-۳-۶- چند فرضیه درباره چگونگی اتصال سوبسترا به آنزیم ۱۶
۱-۴- سینتیک واکنش‌های آنزیمی ۱۷
۱-۴-۱- سینتیک آنزیمی واکنش‌های تک‌سوبسترایی ۱۸
۱-۴-۲- معادله میکائیلیس- منتن ۱۸
۱-۴-۳- معادله لینویور-برک ۱۹
۱-۴-۴- معادله ادی-هوفستی ۲۰
۱-۴-۵- معادله هانز ۲۰
۱-۴-۶- سرعت تشکیل محصول ۲۱
۱-۴-۷- واکنش‌های بیوشیمیایی چند سوبسترایی ۲۱
۱-۴-۸- مهارکننده‌ها ۲۲
۱-۴-۸-۱- مهارکننده‌های برگشت‌پذیر ۲۲
۱-۴-۸-۲- سایر مهارکننده‌ها ۲۴
۱-۵- پروتئازها ۲۴
۱-۵-۱- فعالیت پروتئازها ۲۵
۱-۵-۲- سرین پروتئازها ۲۵
۱-۵-۲-۱- چند مورد از ارتباط ساختمان و عمل سرین‌پروتئازها ۲۶
۱-۵-۳- پروتئیناز K ۲۷
۱-۵-۳-۱- مکانیسم عمل آنزیم ۲۸
۱-۵-۳-۲- سوبسترا و مهارکننده‌های آنزیم ۲۸
۱-۶- روش اندازه‌گیری جذب ۲۹
۱-۶-۱- جذب ۲۹
۱-۶-۲- مقدار جذب ۲۹
۱-۶-۳- رابطه جذب با غلظت ۲۹

۱-۶-۴- دستگاه اسپکتروفتومتر ۲۹
۱-۷- فناوری نانو ۳۱
۱-۷-۱- معرفی فناوری نانو ۳۱
۱-۷-۲- ویژگی‌های مواد نانوساختاری ۳۱
۱-۷-۳- نانوذرات ۳۱
۱-۷-۴- کابردهای مختلف نانوذرات ۳۲
۱-۷-۵- کاربرد فناوری نانودر پژشکی ۳۲
۱-۸- هدف از انجام مطالعه ۳۳
فصل دوم- مواد وروش‌ها ۳۴
۲-۱- مواد مورد نیاز ۳۴
۲-۲- تهیه محلول‌های مورد نیاز ۳۴
۲-۲-۱- تهیه تامپون فسفات سدیم (NaH_2PO_4) ۳۴
۲-۲-۲- تهیه محلول Fe_2O_3، Fe_3O_4، SiO_2 و ZnO ۳۵
۲-۲-۳- تهیه محلول اکسید روی ۳۵
۲-۲-۴- تهیه محلول اسپرمین ۳۵
۲-۲-۵- تهیه محلول پوترسین ۳۵
۲-۳- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور مواد مختلف ۳۵
۲-۳-۱- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور حلال آلی بوتانول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۵
۲-۳-۲- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور حلال آلی ۱و۴بوتاندیول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۶
۲-۳-۳- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره Fe_3O_4 در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۶
۲-۳-۴- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره Fe_2O_3 در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۶
۲-۳-۵- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره ZnO در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۶
۲-۳-۶- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره SiO_2 در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۶
۲-۳-۷- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور اکسید روی ZnO در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۷

۲-۳-۸- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور پلی‌آمین اسپرمین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۷

۲-۳-۹- مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور پلی‌آمین پوترسین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۷

فصل سوم- نتایج ۳۸

۳-۱- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور مواد مختلف ۳۸

۳-۱-۱- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور حلال آلی بوتانول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۸

۳-۱-۲- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور حلال آلی ۱و۴ بوتاندیول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۰

۳-۱-۳- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۵٪ بوتانول و ۱و۴ بوتاندیول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۱

۳-۱-۴- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۱۵٪ بوتانول و ۱و۴ بوتاندیول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۲

۳-۱-۵- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۳۰٪ بوتانول و ۱و۴ بوتاندیول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۳

۳-۱-۶- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور اکسید روی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۳

۳-۱-۷- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانو ذره اکسید روی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۵

۳-۱-۸- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی و اکسید روی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۶

۳-۱-۹- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی و اکسید روی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۷

۳-۱-۱۰- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۰/۰۰۸ میلی‌گرم بر میلی لیتر نانوذره اکسید روی و اکسید روی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۷

۳-۱-۱۱- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره اکسیدآهن (Fe_3O_4) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۸

۳-۱-۱۲- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۹

۳-۱-۱۳- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۰/۰۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) و (Fe_2O_3) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۱

۳-۱-۱۴- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) و (Fe_2O_3) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۱

۳-۱-۱۵- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) و (Fe_2O_3) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۲

۳-۱-۱۶- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور نانوذره اکسیدسیلیسیوم (SiO_2) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۳

۳-۱-۱۷- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور پلی‌آمین پوترسین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۴

۳-۱-۱۸- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور پلی‌آمین اسپرمین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۵

۳-۱-۱۹- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۱ میلی‌مولار پلی‌آمین اسپرمین و پوترسین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۷

۳-۱-۲۰- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۲ میلی‌مولار پلی‌آمین اسپرمین و پوترسین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۷

۳-۱-۲۱- بررسی نتایج مطالعه مقایسه سینتیک آنزیم پروتئیناز K در حضور غلظت ۴ میلی‌مولار پلی‌آمین اسپرمین و پوترسین در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۵۸

فصل چهارم- بحث و نتیجه‌گیری ۵۹

۴-۱- اثر حلال‌های آلی بوتانول و ۱و۴بوتاندیول بر روی فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K ۶۰

۴-۲- اثر نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4 و Fe_2O_3) و SiO_2 بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K ۶۰

۴-۳- اثر نانوذره اکسید روی (ZnO) و اکسید روی بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K ۶۱

۴-۴- اثر پلی‌آمین‌های اسپرمین و پوترسین بر فعالیت سینتیکی آنزیم پروتئیناز K ۶۲

منابع: ۶۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: پیوند پپتیدی ۳
شکل ۱-۲: مارپیچ آلفا هلیکس ۴
شکل ۱-۳: نمایی از انواع ساختارهای دوم پروتئین‌ها ۵
شکل ۱-۴: سطوح ساختمانی در پروتئین‌ها ۶
شکل ۱-۵: دگرگون سازی توسط حلال‌های آلی ۹
شکل ۱-۶: دیاگرام اتصال سه‌نقطه‌ای بین آنزیم و سوبسترا ۱۲
شکل ۱-۷: دیاگرام انرژی برای واکنش‌های کاتالیزشده در برابر واکنش‌های کاتالیزنشده ۱۶
شکل ۱-۸: فرضیه قفل و کلید فیشر ۱۶
شکل ۱-۹: فرضیه قالب القایی کوشلند ۱۷
شکل ۱-۱۰: نمودار میکائیلیس- منتن ۱۹
شکل ۱-۱۱: نمودار لینویور و برک ۱۹
شکل ۱-۱۲: نمودار ادی- هوفستی ۲۰
شکل ۱-۱۳: نمودار هانز ۲۰
شکل ۱-۱۴: مهارکننده رقابتی ۲۲
شکل ۱-۱۵: مهارکننده نارقابتی ۲۳
شکل ۱-۱۶: مهارکننده غیررقابتی ۲۳
شکل ۱-۱۷: مهارکننده ترکیبی ۲۴
شکل ۱-۱۸: نمایی از نحوه عملکرد سرین پروتئازها ۲۶
شکل ۱-۱۹: آنزیم پروتئیناز K ۲۷
شکل ۱-۲۰: ساختار پارانیتروفنیل استات ۲۸
شکل ۱-۲۱: نمایی از دستگاه اسپکتروفتومتر ۳۰
شکل ۴-۳: شکل ساختاری اسپرمین و پوترسین ۶۲

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱: اثر غلظت‌های مختلف بوتانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد....۳۹
نمودار ۳-۲: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف بوتانول.....۴۰
نمودار ۳-۳: اثر غلظت‌های مختلف ۱و۴ بوتاندیول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۰
نمودار ۳-۴: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف ۱و۴ بوتاندیول.....۴۱
نمودار ۳-۵: اثر غلظت ۵٪ ۱و۴ بوتاندیول و بوتانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۲
نمودار ۳-۶: اثر غلظت ۱۵٪ ۱و۴ بوتاندیول و بوتانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۲
نمودار ۳-۷: اثر غلظت ۳۰٪ ،۱و۴ بوتاندیول و بوتانول بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۳
نمودار ۳-۸: اثر غلظت‌های مختلف اکسید روی بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K درpH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۴۴
نمودار ۳-۹: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف اکسید روی ۴۴
نمودار ۳-۱۰: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۵
نمودار ۳-۱۱: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید روی.....۴۶
نمودار ۳-۱۲: اثر غلظت ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی و اکسید روی بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K درpH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۶
نمودار ۳-۱۳: اثر غلظت ۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی و اکسید روی برسینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۷
نمودار ۳-۱۴: اثر غلظت ۰/۰۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره اکسید روی و اکسید روی بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۸
نمودار ۳-۱۵: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن (Fe_3O_4) بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۴۸
نمودار ۳-۱۶: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آهن(Fe_3O_4) ۴۹
نمودار ۳-۱۷: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن (Fe_2O_3) بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۵۰
نمودار ۳-۱۸: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آهن (Fe_2O_3).....۵۰
نمودار ۳-۱۹: اثر غلظت ۰/۰۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسیدآهن (Fe_2O_3)و (Fe_3O_4) بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۵۱
نمودار ۳-۲۰: اثر غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسیدآهن (Fe_2O_3)و (Fe_3O_4) بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K درpH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد.....۵۲

نمودار ۳-۲۱: اثر غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسیدآهن (Fe_2O_3)و (Fe_3O_4) بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۲
نمودار ۳-۲۲: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدسیلیسیوم (SiO_2) بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۳
نمودار ۳-۲۳: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید سیلیسیوم (SiO_2)..... ۵۴
نمودار ۳-۲۴: اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین پوترسین بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۴
نمودار ۳-۲۵: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف پلی‌آمین پوترسین..... ۵۵
نمودار ۳-۲۶: اثر غلظت‌های مختلف پلی‌آمین اسپرمین بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۶
نمودار ۳-۲۷: تغییرات V_{max} در غلظت‌های مختلف پلی‌آمین اسپرمین..... ۵۶
نمودار ۳-۲۸: اثر غلظت ۱ میلی‌مولار پلی‌آمین‌های اسپرمین و پوترسین بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۷
نمودار ۳-۲۹: اثر غلظت ۲میلی‌مولار پلی‌آمین‌های اسپرمین و پوترسین بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۸
نمودار ۳-۳۰: اثر غلظت ۴میلی‌مولار پلی‌آمین‌های اسپرمین و پوترسین بر سینتیک آنزیم پروتئیناز K در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد..... ۵۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱: مواد مورد نیاز ۳۴
جدول ۳-۱: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف بوتانول در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۳۹
جدول ۳-۲: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف ۱و۴ بوتاندیول در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۴۱
جدول ۳-۳: تغییرات V_{max}و K_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف اکسید روی در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۴۴
جدول ۳-۴: تغییرات V_{max}وK_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۴۵
جدول ۳-۵: تغییرات V_{max}وK_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن (Fe_3O_4) در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۴۹
جدول ۳-۶: تغییرات V_{max}و K_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدآهن (Fe_2O_3) در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۵۰
جدول ۳-۷: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف نانوذره SiO_2 در pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۵۳
جدول ۳-۸: تغییرات V_{max}وK_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف پلی‌آمین پوترسین pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۵۵
جدول ۳-۹: تغییرات V_{max}وK_m آنزیم پروتئینازK در غلظت‌های مختلف پلی‌آمین اسپرمین pH=۷ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۵۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱- ماکرومولکول‌ها[1]

ماکرومولکول‌ها یکی از موضوعات مهم در بیولوژی بوده و از واحدهای کوچکتری تشکیل شده‌اند که این واحدها با پیوندهای کووالانسی و غیرکووالانسی به یکدیگر متصل می‌شوند. سه گروه مهم از ماکرومولکول های سلولی، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشند که این ماکرومولکول‌ها همگی پلیمرهایی متشکل از واحدهای مونومری هستند. پروتئین‌ها پلیمرهای خطی بوده، که ۱۰ تا چندین هزار واحد اسیدآمینه تشکیل و وزن مولکولی آنها از حدود ۵۰۰۰ تا بیش از یک میلیون دالتون متغیر است (Lodish,2000).

۱-۲- پروتئین‌ها

پروتئین از واژه یونانی پروتئوس[2] به معنی نخست گرفته شده است، به فراوانی در انواع موجودات زنده یافت می‌شود و بیش از نصف وزن خشک سلول‌ها را تشکیل می‌دهد.. همه پروتئین‌ها شامل واحدهای آمینواسید می‌باشند که به هم متصل شده‌اند. توالی آمینواسیدها در یک پروتئین، خاص بوده و توسط ساختار ماده ژنتیکی سلول مشخص می‌شود و ویژگی‌های بی‌همتایی را به پروتئین می‌دهد (Palmer, 2001).

پروتئین‌ها به دو گروه اصلی پروتئین‌های فیبری یا رشته‌ای[3] که زنجیرهای پلی‌پپتیدی آنها به صورت رشته‌ها یا صفحات بلند آرایش می‌یابند و پروتئین‌های گلبولی یا کروی[4] که زنجیرهای پلی‌پپتیدی آنها

[1] -Macromolecole
[2] -Proteios
[3] -Filamentary protein
[4] -Globular protein

به شکل کروی تا می‌گردند تقسیم می‌شوند. این دو گروه از نظر ساختمانی با یکدیگر تفاوت دارند؛ پروتئین های فیبری معمولاً از یک نوع ساختمان دوم تشکیل می‌شوند؛ در حالی‌که پروتئین‌های کروی اغلب چند نوع ساختمان دوم را شامل می‌شوند. این گروه‌ها از نظر فعالیت نیز با هم متفاوت هستند؛ ساختمان‌های حمایت کننده، شکل‌ساز و شرکت‌کننده در حفاظت خارجی مهره‌داران، از پروتئین‌های فیبری تشکیل شده‌اند، در حالی‌که بیشتر آنزیم‌ها و پروتئین‌های تنظیمی از انواع پروتئین‌های کروی می‌باشند (Lehninger et al., 2005). یک پروتئین به طور معمول دارای ۲۰۰-۳۰۰ اسیدآمینه است اما بعضی بسیار کوچک‌ترند (کوچک‌ترین آنها اغلب پپتیدها نامیده می‌شوند) و بعضی بسیار بزرگتر هستند (بزرگترین پروتئین تا به حال تیتین بوده که در عضله اسکلتی وکاردیاک یافت شده و یک نوع از آن دارای ۳۴۳۵۰ اسیدآمینه در یک زنجیره تنها است) (Levitt and Chothia, 1976).

۱-۲-۱- ساختمان پروتئین‌ها

۱-۲-۱-۱- ساختار سه بعدی پروتئین‌ها

اسکلت کووالانس[5] یک پروتئین شاخص از هزاران پیوند پپتیدی تشکیل شده است. از آنجایی‌که چرخش آزاد حول بسیاری از این پیوندها ممکن می‌باشد، این پروتئین می‌تواند تعداد نامحدودی کونفورماسیون به خود بگیرد. هرچند، هرکدام از این پروتئین‌ها دارای عملکرد شیمیایی یا ساختاری اختصاصی بوده که مطرح می‌نماید که هریک دارای یک ساختار سه بعدی بی‌همتا هستند. تا اواخر دهه ۱۹۲۰، چندین پروتئین، ازجمله هموگلوبین (وزن مولکولی۶۴۵۰۰) و آنزیم اوره‌آز (وزن مولکولی۴۸۳۰۰۰)، به شکل کریستالی درآمدند، با توجه به این‌که دسته‌های منظم پروتئین‌های موجود در یک کریستال عموماً تنها زمانی می‌توانند تشکیل گردند که واحدهای مولکولی موجود در آنها مشابه باشند، کریستالیزه شدن بسیاری از پروتئین‌ها دلیل محکمی برای این واقعیت است که حتی پروتئین‌های بسیار بزرگ، موجودیت‌های شیمیایی منحصر و با ساختارهای بی‌همتا می‌باشند. این نتیجه‌گیری، تفکر پیرامون پروتئین‌ها و اعمال آنها را متحول نمود (Berman, 1999).

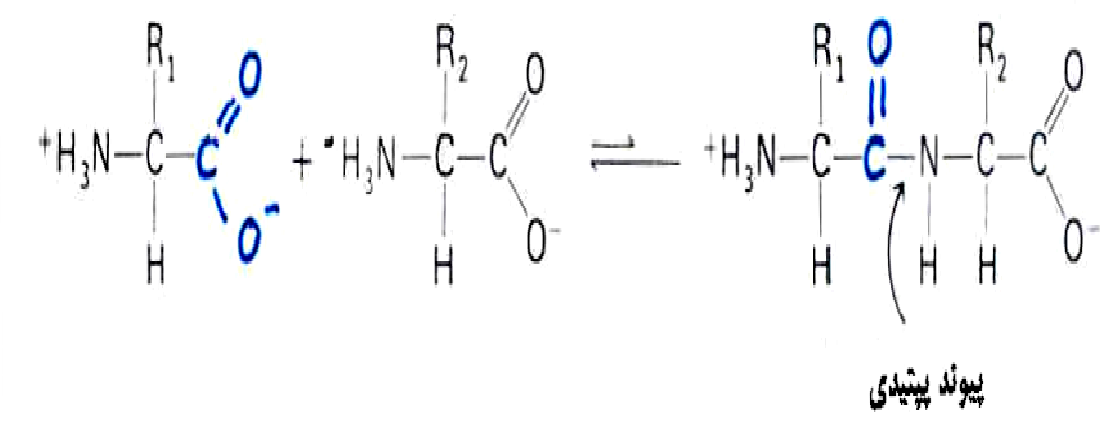
۱-۲-۲- مروری کلی بر ساختمان پروتئین‌ها

آرایش فضایی اتم‌های موجود در یک پروتئین را کونفورماسیون[6] می‌گویند. کونفورماسیون‌های ممکن یک پروتئین شامل هر وضعیت ساختمانی است که بدون شکسته شدن پیوندهای کووالان بدست می‌آید. تغییر در کونفورماسیون، برای مثال، چرخش حول پیوندهای یگانه ایجاد می‌گردد. از میان کونفورماسیون‌های متعددی که از نظر تئوری در یک پروتئین حاوی صدها پیوند یگانه ممکن است، یک یا چند نوع آن عموماً در شرایط بیولوژیک غالب است. کونفورماسیونی که تحت یکسری شرایط وجود دارد، معمولاً نوعی است که از نظر ترمودینامیک پایدارتر بوده و کمترین انرژی آزاد گیبس را دارد (Lehninger et al, 2005).

[5] -Covalence
[6] -Conformation

۱-۲-۲-۱- ساختمان اول

ترتیب قرار گرفتن پی‌درپی اسیدهای آمینه در یک زنجیره پلی پپتیدی را ساختمان اول یک زنجیره پلی‌پپتیدی می‌نامند، بنابراین پیوندهای پپتیدی پایه‌های ساختمان اول می‌باشند. در واقع پروتئین‌ها از حدود ۲۲ آمینواسید تشکیل شده‌اند که با استفاده از پیوند آمیدی یا پپتیدی به هم متصل می‌شوند (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: پیوند پپتیدی

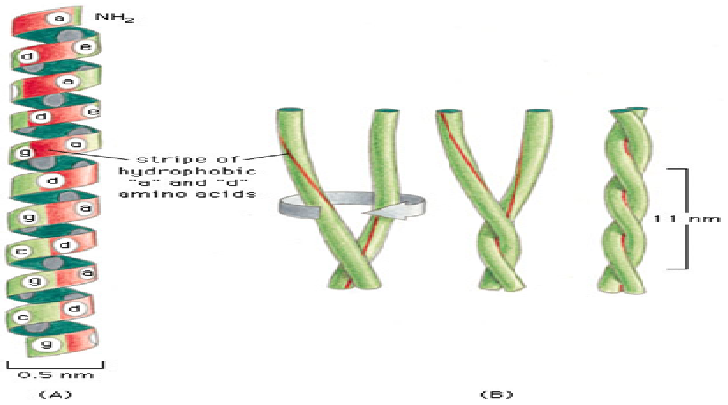
این پیوند با برداشت عناصر یک مولکول آب (دهیدراتاسیون) از گروه آلفا-کربوکسیل یک آمینواسید و آلفا-آمینوی آمینواسید دیگر ایجاد می‌گردد. در یک پپتید، ریشه آمینواسید موجود در انتهای دارای گروه آلفا-آمینوی آزاد را ریشه انتهای آمینو (یا انتهایN) و ریشه موجود در انتهای دیگر دارای یک گروه کربوکسیل آزاد را ریشه انتهای کربوکسیل (یا انتهایC) گویند. هرچند هیدرولیز یک پیوند پپتیدی که یک واکنش انرژی‌زا است، به‌خاطر انرژی فعال‌سازی بالای آن، به آهستگی صورت می‌گیرد (Dougherty, 2000; Mayo,2000). پیوند پپتیدی چندین ویژگی مهم دارد. اول، در برابر هیدرولیز مقاوم است، لذا پروتئین‌ها از نظر سینتیکی به میزان قابل توجهی پایدار هستند. دوم، این گروه پپتیدی مسطح است، زیرا پیوند C-N ویژگی قابل توجه پیوند دوگانه را دارد. سوم، هر پیوند پپتیدی یک دهنده پیوند هیدروژنی (گروه NH) و یک گیرنده پیوند هیدروژنی (گروه CO) دارد. ایجاد پیوند هیدروژنی بین این گروه‌های داربستی یک ویژگی مجزای ساختمان پروتئینی است (Berg and Tymoczko,2002).

۱-۲-۲-۲- ساختمان دوم

ساختمان دوم اشاره به کونفورماسیون موضعی قسمتی از پلی‌پپتید می‌کند. بحث ساختان دوم بیشتر بر الگوهای تا شدن منظمی متمرکز می‌شود که در اسکلت پلی‌پپتیدی معمول هستند. چند نوع ساختمان دوم پایدار وجود دارد که در پروتئین‌های مختلف وجود دارند که برجسته‌ترین این‌ها کونفورماسیون‌های α و β می‌باشند (شکل ۱-۳).

۱) مارپیچ آلفا:

ساده‌ترین آرایش زنجیر پلی‌پپتیدی با پیوندهای سخت (ولی سایر پیوندهای یگانه دارای چرخش آزاد می‌باشند) یک ساختمان مارپیچی است که پائولینگ و کوری آن را مارپیچ α (شکل ۱-۲) نامیدند. چرخش مارپیچی موجود در تمامی پروتئین‌ها از نوع راست‌گردان می‌باشد. ساختمان مارپیچ آلفا توسط پیوند هیدروژنی موجود در بین اتم هیدروژن متصل به اتم نیتروژن الکترونگاتیو یک پیوند پپتیدی و اتم اکسیژن کربونیل الکترونگاتیو آمینواسید چهارم موجود در سمت انتهای آمینوی آن پیوند هیدروژنی ایجاد می‌گردد (Lehninger et al, 2005). در داخل مارپیچ آلفا به غیر از گروه آمینو و کربوکسیل ابتدایی و انتهایی مارپیچ، تمام گروه‌های کربوکسیل و آمینو از طریق پیوند هیدروژنی به یکدیگر متصل هستند. این آرایش متناوب پیوندها، گروه‌های آمینو را به کربوکسیل انتهایی در مارپیچ آلفا نزدیک می‌کند زیرا که تمام گیرنده‌های پیوندهای هیدروژنی (مثل گروه‌های کربونیل) در یک جهت قرار خواهند گرفت و منجر به تشکیل ساختمانی می‌شود که در آن به ازای هر ۳/۶ اسیدآمینه یک چرخش کامل در مارپیچ ایجاد می‌شود (Lodish,2000).



شکل ۱-۲: مارپیچ آلفا هلیکس

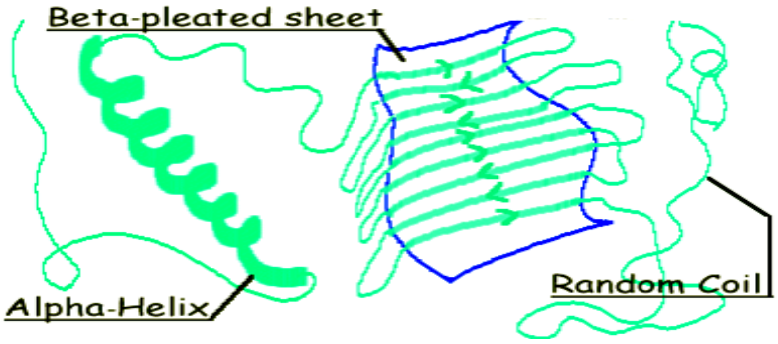
۲) کونفورماسیون بتا:

ساختار دوم دیگر، صورت‌بندی بتا است که در آن زنجیره‌های پپتیدی به‌صورت صفحه[۷] سازماندهی می‌شوند. در این صورت‌بندی، اسکلت پلی‌پپتیدی به شکل یک ساختمان زیگزاگی، به جای مارپیچی، گسترش یافته وجود دارد. این زنجیره‌های زیگزاگی می‌توانند به طور 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 می تواند به‌صورت 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 (۶/۵ A°، در مقابل ۷A° برای موازی ناهمسو) و الگوی متفاوت پیوندهای هیدروژنی را دارند (Berman, 1999; Ponting and Russell,2002).

[۷] -Sheet

۳) پیچ‌های بتا:

درپروتئین‌های کروی که ساختمان متراکم تاشده‌ای دارند، حدود یک سوم ریشه‌های آمینواسید در ساختمان پیچ‌ها و قوس‌ها قرار دارند که در آنها جهت زنجیرها عوض می‌شود. این‌ها عناصر ارتباطی هستند که بخش‌های متوالی مارپیچ α و کونفورماسیون β را به یکدیگر متصل می‌کنند. پیچ‌های β از انواع به خصوص و شایعی هستند که دو انتهای دو قطعه مجاور یک صفحه β موازی ناهمسو را به یکدیگر متصل می کنند. این ساختمان یک پیچ 180° است که در آن چهار ریشه آمینواسید وجود دارد و اکسیژن کربونیل ریشه آمینواسید اول با هیدروژن گروه آمینوی اسیدآمینه چهارم ایجاد یک پیوند هیدروژنی می‌کند. گروه‌های پپتیدی دو ریشه میانی در ایجاد هیچ پیوند هیدروژنی بین ریشه‌ای شرکت نمی‌کنند. پیچ‌های β اغلب در نزدیکی سطح پروتئین دیده می‌شوند که در آنجا گروه‌های پپتیدی دو ریشه آمینواسید میانی می‌توانند با آب ایجاد پیوند هیدروژنی کنند (Lehninger et al., 2005).



شکل ۱-۳: نمایی از انواع ساختارهای دوم پروتئین‌ها

۱-۲-۲-۳- ساختمان سوم

آرایش سه‌بعدی کلی تمامی اتم‌های موجود در یک پروتئین را ساختمان سوم پروتئین گویند. ساختمان سوم شامل خصوصیات توالی اسیدآمینه‌ای است که دامنه بلندتری دارد. آمینواسیدهایی که در زنجیر پلی‌پپتیدی به فاصله دور از یکدیگر و در قطعات دارای ساختمان دوم متفاوت قرار دارند، ممکن است در داخل یک ساختمان کاملاً تا شده یک پروتئین با یکدیگر تعامل داشته باشند. ساختمان سوم تابعی از pH، قدرت یونی و نوع حلال می‌باشد، این ساختمان در اثر نیروهای آب‌گریز، الکتروستاتیک و هیدروژنی بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه از یک سو و از سوی دیگر میان‌کنش اسیدهای آمینه سطحی پروتئین با حلال و نیز تشکیل اتصالات دی‌سولفیدی در نواحی مختلف پروتئین ایجاد می‌شود (Lehninger et al., 2005). پروتئین‌های کروی به‌خاطر این که تاخوردگی داخلی‌شان (ساختار سومشان) ساختار کروی دارد، به این اسم نامگذاری شده‌اند. این پروتئین‌های کروی محلول در آب هستند، این دسته از پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های عملکردی، آنزیم‌ها، ایمنوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های انتخابی، پروتئین‌های تنظیمی و غیره می باشند. در ساختار یک پروتئین کروی، آمینواسیدهای هیدروفوبیک و غیرقطبی در قسمت داخلی مولکول و دور از آب قرار گرفته‌اند در حالی‌که آمینواسیدهای قطبی در قسمت خارجی پروتئین قرار دارند (Ringia, Garrett et al, 2004).