دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

دانشکده علوم پایه - گروه شیمی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته شیمی فیزیک

موضوع:

ترمودینامیک برهمکنش دودسیل تری‌متیل آمونیوم برمید با لیزوزیم در دماها و pHهای مختلف

اساتید راهنما:

دکتر غلامرضا رضایی بهبهانی

دکتر علی‌اکبر صبوری

استاد مشاور:

دکتر عادله دیوسالار

نگارش:

رباب اکبری

اسفند ۱۳۸۸

بسم الله الرحمن الرحيم

چکیده

اکثر درشت مولکول ها دارای جایگاه های پیوندی با قدرت و گزینش پذیری متفاوت برای انواع لیگاندها می باشند. اتصال یک لیگاند معین به درشت مولکول، تغییر ساختاری را در آن القا می کند که ممکن است جایگاه های پیوندی دیگر را تحت تأثیر قرار دهد، از اینرو انتظار می رود پیوندشدن چندین لیگاند به درشت مولکول فرایند پیچیده ای باشد. در این پروژه ترمودینامیک برهمکنش DTAB با لیزوزیم در pHهای ۷/۰ و ۹/۰ در سه دمای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در حضور بافر فسفات با استفاده از داده های کالریمتری تیتراسیونی همدما بررسی شده است . با استفاده از تئوری توسعه یافته حلالیت، غیرطبیعی شدن لیزوزیم و اثر ماده فعال سطحی بر روی پایداری این پروتئین نشان داده می‌شود. به طور کلی در برهمکنش‌های پروتئین – ماده فعال سطحی، برهمکنش‌های الکترواستاتیکی غالبا " گرمازا و برهمکنش های هیدروفوبیکی غالبا" گرماگیر هستند، چون در این پروژه، برهمکنش لیزوزیم با DTAB به صورت یک فرایند گرماگیر آغاز و ادامه این برهمکنش با دریافت گرمای بیشتری پیش می رود، می‌توان نتیجه گرفت که برهمکنش های الکترواستاتیکی به حدی ضعیف هستند که مغلوب برهمکنش های هیدروفوبیکی می شوند. این مسأله با بار سطحی لیزوزیم و بار DATB که یک ماده فعال سطحی کاتیونی است، نیز همخوانی دارد . چراکه لیزوزیم در pH زیر pH ایزوالکتریک، بیشتر دارای بار مثبت است و DTAB نیز یک سورفکتانت کاتیونی است، بنابراین برهمکنش از نوع الکترواستاتیکی (سربه‌سر) بسیار ضعیف بوده و مغلوب برهمکنش هیدروفوبیکی (که نتیجه برهمکنش دم ماده فعال سطحی با قسمت آب‌گریز و غیرقطبی پروتئین است) می‌شود که این امر نیز با مقدار مثبت δ_B^θ همخوانی دارد . از طرفی مقد ار بسیار کوچک و منفی δ_A^θ نیز تأییدی بر برهمکنش های بسیار ضعیف الکترواستاتیکی است. زیرا مقدار بسیار کوچک و منفی δ_A^θ نشان دهنده این موضوع است که حل‌شونده بیشتر توسط مولکول های آب احاطه شده است و پیوندهای حلال- حلال را تقویت می‌کند. بنابراین برهمکنش های هیدروفوبیکی نقشی مهم و بزرگ در غیرطبیعی شدن لیزوزیم دارند. مقدار آنتالپی غیرطبیعی شدن لیزوزیم در pH=۷/۰ بزرگتر از pH=۹/۰ است و هرچه مقدار آنتالپی غیرطب‌یعی شدن پروتئین بیشتر شود، پروتئین سخت‌تر غیرطبیعی می‌شود و کار لازم برای تخریب ساختار پروتئین افزایش می یابد، بنابراین لیزوزیم در pH =۷/۰ پایدارتر است (یعنی ساختار لیزوزیم در pH =۷/۰ نسبت به pH=۹/۰ از تخریب و غیرطبیعی شدن گریزان است). با روش ابداعی و نرم افزاری، پارامترهای مهمی چون ΔG° و $T\Delta S^\circ$ در برهمکنش ماده فعال سطحی با لیزوزیم بدست می‌آیند.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۱

فصل دوم: تئوری

۲-۱ پروتئین‌ها ۱۵
۲-۱-۱ پروتئین‌ها، مجموعه‌ای متشکل از ۲۰ آمینو اسید ۱۶
۲-۱-۲ خصلت اسیدی و بازی پپتیدها ۱۹
۲-۲ نیروهای غیرکووالان در ساختار پروتئین‌ها ۲۰
۲-۲-۱ برهمکنش‌های الکترواستاتیک ۲۰
۲-۲-۲ پیوندهای دی‌سولفیدی ۲۱
۲-۲-۳ برهمکنش‌های آب‌گریز ۲۱
۲-۲-۴ برهمکنش‌های هیدروژنی ۲۲
۲-۳ ساختارهای پروتئینی ۲۲
۲-۳-۱ ساختار اول ۲۲
۲-۳-۲ ساختار دوم ۲۲
۲-۳-۳ ساختار سوم ۲۴
۲-۳-۴ ساختار چهارم ۲۶
۲-۴ غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها (تقلیب پروتئین‌ها) ۲۸
۲-۵ تاخوردن متعاون پروتئین ۲۹

۲-۶ لیزوزیم ۳۱
۲-۶-۱ خواص سینتیکی لیزوزیم ۳۱
۲-۶-۲ شکافته شدن دیواره سلولی باکتری‌ها توسط لیزوزیم..... ۳۲
۲-۶-۳ ساختمان سه بعدی لیزوزیم ۳۴
۲-۶-۴ بررسی جایگاه فعال لیزوزیم ۳۷
۲-۶-۵ وابستگی میزان کاتالیز لیزوزیم به pH ۳۷
۲-۶-۶ جداسازی و خالص سازی لیزوزیم ۳۸
۲-۶-۷ غیرطبیعی شدن لیزوزیم ۳۸
۲-۷ مواد فعال سطحی ۳۹
۲-۷-۱ مواد فعال سطحی یونی ۴۱
۲-۷-۲ مواد فعال سطحی غیریونی ۴۳
۲-۷-۳ مواد فعال سطحی یون–دوقطبی ۴۳
۲-۷-۴ دودسیل تری‌متیل آمونیوم برمید (DTAB یا DTABr یا DoTAB) ۴۴
۲-۷-۵ ترمودینامیک برهمکنش ماده فعال سطحی با پروتئین ۴۵
۲-۸ برهمکنش مواد فعال سطحی کاتیونی با لیزوزیم ۴۸
۲-۹ پیوند لیگاند به ماکرومولکول ۴۸
۲-۹-۱ پیوند لیگاند به ماکرومولکول دارای یک جایگاه پیوندی ۵۰
۲-۹-۲ پیوند لیگاند به ماکرومولکول دارای یک مجموعه جایگاه‌های پیوندی یکسان و مستقل ۵۱
۲-۹-۳ پیوند لیگاند به مجموعه‌ای از جایگاه‌های پیوندی یکسان و مستقل در ماکرومولکول با تکنیک کالریمتری تیتراسیونی همدما ۵۴
۲-۹-۴ پیوند رقابتی دو لیگاند روی مجموعه‌ای از جایگاه‌های پیوندی یکسان و مستقل..... ۵۸
۲-۹-۵ پیوند لیگاند به مجموعه‌ای از جایگاه‌های پیوندی یکسان و کنش‌گر (غیرمستقل) ۵۹

۲-۱۰ مطالعات کالریمتری برهمکنش مواد فعال سطحی با ماکرومولکول‌های حیاتی ۶۱

فصل سوم: فعالیت‌های آزمایشگاهی

۳-۱ دستگاه و مواد لازم ۶۴
۳-۲ روش‌ها ۶۴
۳-۳ نرم‌افزارهای مورد استفاده ۶۴
۳-۴ دستگاهوری کالریمتری تیتراسیونی همدما ۶۵
۳-۵ نحوه انجام آزمایش در دستگاه میکروکالریمتری تیتراسیونی همدما ۷۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ پیوند مواد فعال سطحی کاتیونی به ماکرومولکول‌ها ۷۴
۴-۲ نتایج خام ۷۹
۴-۲-۱ تبدیل واحدهای نتایج میکروکالریمتری ۷۹
۴-۲-۲ محاسبه غلظت لیزوزیم و مواد فعال سطحی کاتیونی بعد از هر تزریق ۸۰
۴-۳ بررسی داده‌های میکروکالریمتری با استفاده از تئوری انحلال ۸۱
۴-۴ برهمکنش DTAB با لیزوزیم در pH=۷/۰ ..... ۸۲
۴-۵ برهمکنش DTAB با لیزوزیم در pH=۹/۰ ..... ۹۱
۴-۶ برهمکنش لیزوزیم با DTAB از دیدگاه ظرفیت گرمایی ۹۶
۴-۷ نتیجه‌گیری کلی ۹۸
پیوست ۱۰۰
منابع و مأخذ ۱۱۲

فهرست جداول

عنوان صفحه

(۴-۱) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Lysozyme-DTAB در pH=۷/۰ و دمای K ۲۹۸ ..... ۱۰۰

(۴-۲) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Lysozyme-DTAB در pH=۷/۰ و دمای K ۳۰۳ ..... ۱۰۱

(۴-۳) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Lysozyme-DTAB در pH=۷/۰ و دمای K ۳۰۸ ..... ۱۰۲

(۴-۴) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Lysozyme-DTAB در pH=۹/۰ و دمای K ۲۹۸ ..... ۱۰۳

(۴-۵) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Lysozyme-DTAB در pH=۹/۰ و دمای K ۳۰۳ ..... ۱۰۴

(۴-۶) داده‌های خام دستگاه میکروکالریمتری در برهمکنش Lysozyme-DTAB در pH=۹/۰ و دمای K ۳۰۸ ..... ۱۰۵

(۴-۷) پارامترهای حلالیت برهمکنش لیزوزیم-DTAB در pH=۷/۰ ..... ۱۰۶

(۴-۸) پارامترهای حلالیت برهمکنش لیزوزیم-DTAB در pH=۹/۰ ..... ۱۰۶

(۴-۹) آنتالپی‌های برهمکنش لیزوزیم–DTAB در دمای ۲۵°C، ۳۰°C و pH=۷/۰ ..... ۱۰۷

(۴-۱۰) آنتالپی‌های برهمکنش لیزوزیم-DTAB در دمای ۲۵°C، ۳۰°C و pH=۹/۰ ..... ۱۰۸

(۴-۱۱) انرژی آزاد گیبس و آنتروپی برهمکنش لیزوزیم-DTAB در pH=۷/۰ ، pH=۹/۰ و دمای ۲۵°C ۱۰۹

(۴-۱۲) ظرفیت گرمایی حاصل از برهمکنش لیزوزیم–DTAB در فاصله دمایی ۲۵°C-۳۰°C و pH=۷/۰ ..... ۱۱۰

(۴-۱۳) ظرفیت گرمایی حاصل از برهمکنش لیزوزیم–DTAB در فاصله دمایی ۲۵°C-۳۰°C و pH=۹/۰ ..... ۱۱۱

فهرست اشکال

عنوان صفحه

(۱-۱) رقابت آب برای تشکیل اتصال‌های هیدروژنی ۳

(۱-۲) ساختار یک فسفولیپید ۴

(۱-۳) ساختار میسل ۵

(۱-۴) ساختارهای میسل تک‌لایه و دولایه ۵

(۲-۱) تشکیل پیوند پپتیدی ۱۶

(۲-۲) اتصال عرضی دی‌سولفیدی (ارتباط دو سیستئین) در داخل یک زنجیره پلی‌پپتیدی..... ۲۵

(۲-۳) چهار ساختار پروتئین ۲۷

(۲-۴) گذر از شکل تاخورده به شکل بازشده ۲۹

(۲-۵) تقلیب پروتئین و بازشدن زنجیره پروتئینی ۳۰

(۲-۶) واحدهای قندی موجود در پلی‌ساکارید دیواره باکتریایی ۳۳

(۲-۷) هیدرولیز باند گلیکوزیدی مابین NAM و NAG توسط لیزوزیم ۳۴

(۲-۸) ساختار فضایی لیزوزیم (مدل گوی و میله) ۳۵

(۲-۹) زنجیره اصلی لیزوزیم ۳۶

(۲-۱۰) زنجیره اصلی لیزوزیم ۳۶

(۲-۱۱) نموداری از متوسط تعداد لیگاندهای پیوند شده به هر مولکول پروتئین ($\bar{\nu}$) بر حسب تابعی از لگاریتم غلظت لیگاند آزاد ۴۷

(۲-۱۲) نمودار اسکاچارد برای ماکرومولکولی شامل g جایگاه پیوندی یکسان و مستقل ۵۲

(۲-۱۳) نمودار خطی کلودز برای ماکرومولکولی شامل g جایگاه پیوندی یکسان و مستقل ۵۳

(۲-۱۴) نمایی از یک برهمکنش متعاون ۶۰

(۲-۱۵) نمودار اسکاچارد، برای سیستم‌های غیرمتعاون، سیستم‌های متعاون و سیستم‌های ضدمتعاون ۶۰

(۳-۱) مبادله گرما بین ظرف واکنش و محیط در میکروکالریمتر همدما ۶۶

(۳-۲) شمای کلی نشان دهنده فعالیت گرمایی (TAM) ۶۷

(۳-۳) سل نمونه در میکروکالریمتری تیتراسیونی همدما ۷۰

(۳-۴) نمونه ای از ترموگرام کالریمتری تیتراسیونی همدما ۷۲

(۴-۱) مقایسه مابین آنتالپی های تجربی (شامل آنتالپی های برهمکنش های الکترواستاتیکی، هیدروفوبیکی و غیرطبیعی شدن لیزوزیم) در pH=۷/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C ۸۵

(۴-۲) مقایسه مابین آنتالپی های تجربی در pH=۷/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در اثر برهمکنش‌های الکترواستاتیکی و هیدروفوبیکی لیزوزیم با DTAB در غیاب آنتالپی‌های غیرطبیعی شدن لیزوزیم ۸۶

(۴-۳) مقایسه بین آنتالپی های آزمایشگاهی در اثر برهمکنش های الکترواستاتیکی و هیدروفوبیکی و آنتالپی‌های غیرطبیعی شدن لیزوزیم در حضور DTAB و آنتالپی‌های کل برهمکنش ها شامل الکترواستاتیکی، هیدروفوبیکی و غیرطبیعی شدن لیزوزیم در اثر برهمکنش لیزوزیم با DTAB در pH=۷/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C ۸۷

(۴-۴) مقایسه مابین انرژی های آزاد (ΔG°) در pH=۷/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در اثر برهمکنش لیزوزیم با DTAB ۸۹

(۴-۵) مقایسه مابین $T\Delta S^{\circ}$ در PH=۷/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در اثر برهمکنش لیزوزیم با DTAB ۹۰

(۴-۶) مقایسه مابین آنتالپی های تجربی (شامل آنتالپی های برهمکنش های الکترواستاتیکی، هیدروفوبیکی و غیرطبیعی شدن لیزوزیم) در pH=۹/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C ۹۱

(۴-۷) مقایسه مابین آنتالپی های تجربی در pH=۹/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در اثر برهمکنش‌های الکترواستاتیکی و هیدروفوبیکی لیزوزیم با DTAB ۹۲

(۴-۸) مقایسه بین آنتالپی های آزمایشگاهی در اثر برهمکنش های الکترواستاتیکی و هیدروفوبیکی و آنتالپی‌های غیرطبیعی شدن لیزوزیم در حضور DTAB و آنتالپی‌های کل برهمکنش ها شامل

الکترواستاتیکی، هیدروفوبیکی و غیرطبیعی شدن لیزوزیم در اثر برهمکنش لیزوزیم با DTAB در pH=۹/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C ۹۳

(۴-۹) مقایسه مابین انرژی های آزاد (ΔG°) در pH=۹/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در اثر برهمکنش لیزوزیم با DTAB ۹۴

(۴-۱۰) مقایسه مابین $T\Delta S^{\circ}$ در pH=۹/۰ و دماهای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵ °C در اثر برهمکنش لیزوزیم با DTAB ۹۵

(۴-۱۱) ظرفیت گرمایی در محدوده دمایی در فاصله دمایی ۲۵°C-۳۰°C و pH=۷/۰ ..... ۹۷

(۴-۱۲) ظرفیت گرمایی در محدوده دمایی در فاصله دمایی ۲۵°C-۳۰°C و pH=۹/۰ ..... ۹۷

فصل اول: مقدمه

فصل اول: مقدمه

یکی از اهداف مهم در بیوشیمی فیزیک، پیش‌بینی صحیح ساختمان سه بعدی ماکرومولکول ها است. در بیوشیمی، یک مولکول به عنوان جزئی که دارای استوکیوم تری و هندسه معین است و به راحتی تجزیه نمی شود، شناخته می شود. بنابراین، لازم نیست در یک مولکول تمام قسمت ها با پیوند کووالانسی به هم متصل باشند، بلکه ممکن است تعدادی از بسپارهایی که با پیوندهای غیرکووالانسی کنار هم قرار گرفته‌اند، باشند.

کار فوق العاده کریستین آنفینسن [۱] در دهه ۱۹۵۰ بر روی آنزیم ریبونوکلئاز ارتباط بین ترادف آمینواسیدی یک پروتئین و ساختار فضایی آن را روشن ساخت . طرح آنفینسن عبارت بود از تخریب ساختار سه بعدی آنزیم و سپس تعیین شرایطی که برای شکل گیری دوباره ساختار مورد نیاز است . موادی مانند اوره یا گوانیدینیو م کلراید به شکل موثری پیوندهای غیرکووالان را از بین می برند، هرچند مکانیسم عمل این مواد به خوبی شناخته نشده است [۱]. مطالعات بعدی عمومیت این اصل بیوشیمی را پایه گذاری نمود که ترادف، ساختار فضایی را تعیین می کند. وابستگی ساختار فضایی به ترادف، اهمیت ویژه‌ای دارد زیرا ارتباط نزدیکی بین ساختار فضایی و عملکرد وجود دارد.

مسأله پیش بینی ساختار کامل پلی پپتیدها با توجه به ساختار آنها، تاخوردگی پروتئین نامیده می‌شود که در سایر ماکرومولکول‌ها نیز وجود دارد.

ساختار ماکرومولکول های حیاتی، متأثر از شرایط محیطی آنها است. پروتئین‌هایی که در غشای سلول نقش حامل داشته و انتقال مواد را در طرفین غشای سلول تسهیل می کنند، حالت سیال داشته و محلول در محیط آب هستند .آب یک محیط بسیار قطبی است که برهمکنش های درون مولکولی و بین مولکولی را شدیدا " تحت تأثیر قرار می دهد و نقش بسزایی در تعیین ساختار و عمل بسیاری از مولکول های سلول دارد، از اینرو شناخت آب می تواند سهم عمده ای در شناسایی ساختار

[۱]- Anfinsen

چکیده

اکثر درشت مولکول ها دارای جایگاه های پیوندی با قدرت و گزینش پذیری متفاوت برای انواع لیگاندها می باشند. اتصال یک لیگاند معین به درشت مولکول، تغییر ساختاری را در آن القا می کند که ممکن است جایگاه های پیوندی دیگر را تحت تأثیر قرار دهد، از اینرو انتظار می رود پیوندشدن چندین لیگاند به درشت مولکول فرایند پیچیده ای باشد. در این پروژه ترمودینامیک برهمکنش DTAB با لیزوزیم در pHهای ۷/۰ و ۹/۰ در سه دمای ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در حضور بافر فسفات با استفاده از داده های کالریمتری تیتراسیونی همدما بررسی شده است . با استفاده از تئوری توسعه یافته حلالیت، غیرطبیعی شدن لیزوزیم و اثر ماده فعال سطحی بر روی پایداری این پروتئین نشان داده می‌شود. به طور کلی در برهمکنش‌های پروتئین – ماده فعال سطحی، برهمکنش‌های الکترواستاتیکی غالبا " گرمازا و برهمکنش های هیدروفوبیکی غالبا" گرماگیر هستند، چون در این پروژه، برهمکنش لیزوزیم با DTAB به صورت یک فرایند گرماگیر آغاز و ادامه این برهمکنش با دریافت گرمای بیشتری پیش می رود، می‌توان نتیجه گرفت که برهمکنش های الکترواستاتیکی به حدی ضعیف هستند که مغلوب برهمکنش های هیدروفوبیکی می شوند. این مسأله با بار سطحی لیزوزیم و بار DATB که یک ماده فعال سطحی کاتیونی است، نیز همخوانی دارد . چراکه لیزوزیم در pH زیر pH ایزوالکتریک، بیشتر دارای بار مثبت است و DTAB نیز یک سورفکتانت کاتیونی است، بنابراین برهمکنش از نوع الکترواستاتیکی (سربه‌سر) بسیار ضعیف بوده و مغلوب برهمکنش هیدروفوبیکی (که نتیجه برهمکنش دم ماده فعال سطحی با قسمت آب‌گریز و غیرقطبی پروتئین است) می‌شود که این امر نیز با مقدار مثبت δ_B^θ همخوانی دارد . از طرفی مقد ار بسیار کوچک و منفی δ_A^θ نیز تأییدی بر برهمکنش های بسیار ضعیف الکترواستاتیکی است. زیرا مقدار بسیار کوچک و منفی δ_A^θ نشان دهنده این موضوع است که حل‌شونده بیشتر توسط مولکول های آب احاطه شده است و پیوندهای حلال- حلال را تقویت می‌کند. بنابراین برهمکنش های هیدروفوبیکی نقشی مهم و بزرگ در غیرطبیعی شدن لیزوزیم دارند. مقدار آنتالپی غیرطبیعی شدن لیزوزیم در pH=۷/۰ بزرگتر از pH=۹/۰ است و هرچه مقدار آنتالپی غیرطب‌یعی شدن پروتئین بیشتر شود، پروتئین سخت‌تر غیرطبیعی می‌شود و کار لازم برای تخریب ساختار پروتئین افزایش می یابد، بنابراین لیزوزیم در pH =۷/۰ پایدارتر است (یعنی ساختار لیزوزیم در pH =۷/۰ نسبت به pH=۹/۰ از تخریب و غیرطبیعی شدن گریزان است). با روش ابداعی و نرم افزاری، پارامترهای مهمی چون ΔG° و $T\Delta S^\circ$ در برهمکنش ماده فعال سطحی با لیزوزیم بدست می‌آیند.

ماکرومولکول‌های حیاتی داشته باشد، لذا در اینجا لازم است هرچند به طور اختصار به شرح ساختار آب پرداخته شود.

برهمکنش‌های درون مولکولی[۱] و بین مولکولی[۲] ماده حل شونده[۳] در آب تحت تأثیر مولکول های آبی قرار می‌گیرد. یک مولکول آب منفرد در محلول، به صورت چهاروجهی[۴] است. اتم اکسیژن در آن دارای هیبرید sp^3 بوده و در مرکز تتراهدرال قرار گرفته است.

اتم اکسیژن دارای دو جفت الکترون غیر پیوندی است و با دو اتم هیدروژن پیوند یافته است. اکسیژن یک اتم الکترونگاتیو است، از اینرو ابر الکترونی پیوند O-H را به سمت خود کشیده و دارای بار جزئی منفی (δ-) می‌شود، متقابلا" اتم هیدروژن نیز بار جزئی مثبت پیدا خواهد کرد (δ+). این عدم تقارن ابر الکترونی در پیوند O-H سبب ایجاد یک گشتاور دو قطبی دائمی[۵] در آن می شود. اندازه این گشتاور دوقطبی تحت تاثیر مولکول‌های باردار اطراف خود قرار می‌گیرد.

بنابراین آب دارای قطبش‌پذیری[۶] و ثابت دی‌الکتریک بالایی است. با توجه به خاصیت قطبی بودن مولکول آب و قدرت تشکیل اتصال های هیدروژنی، آب می‌تواند سبب تضعیف پیوندهای یونی و هیدروژنی در مولکول های دیگر شود. زیرا آب در این واکنش های قطبی به صورت یک رقیب شرکت می‌کند. برای مثال می توان تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه کربونیل و گروه آمید در پروتئین ها را ذکر کرد. آب می‌تواند به عنوان یک گروه دهنده هیدروژن جانشین گروه NH– شود و یا این که اتم اکسیژن آن در تشکیل یک اتصال هیدروژنی دیگر جانشین گروه کربونیل شود (شکل ۱-۱).

۱- Interamolecular interactions

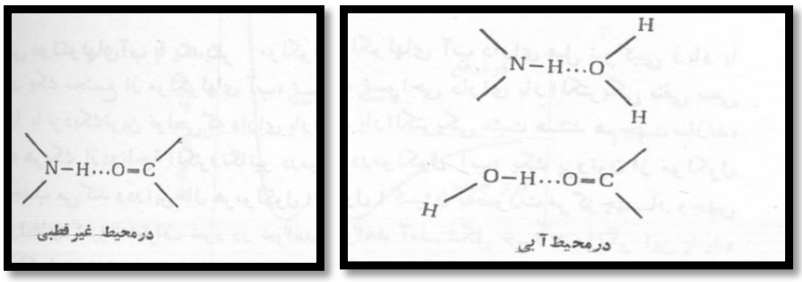
۲- Intermolecular interactions

۳- Solute

۴- Tetrahedral

۵- Permanent dipole moment

۶- Polarity disclosure



شکل (۱- ۱): رقابت آب برای تشکیل اتصال‌های هیدروژنی

ضریب ثابت دی‌الکتریک آب زیاد است و به همین جهت سبب کاهش واکنش‌های یونی می‌شود. چگونگی عمل به این شکل است که مولکول‌های آب با محاصره یون‌ها مانع ترکیب آنها با یکدیگر می‌شوند [۲]. برهمکنش بین دو مولکول آب، برهمکنش میان دو ماده قطبی است . این برهمکنش سبب می‌شود که اتم اکسیژن و هیدروژن بیش از شعاع به یکدیگر نزدیک شوند.

مولکولی که در آب حل می شود باید برهمکنش یابد . هنگامی که مولکول در آب قرار می گیرد، حلال فضایی را ایجاد می کند که در بسیاری از جهات شبیه فضای مابین آب و هوا می باشد. اگر مولکول مورد نظر یون باشد، آب در اطراف آن تجمع یافته و ساختار قفس مانندی را شکل می‌دهد. از اینرو آنتروپی یون مورد نظر کاهش می‌یابد.

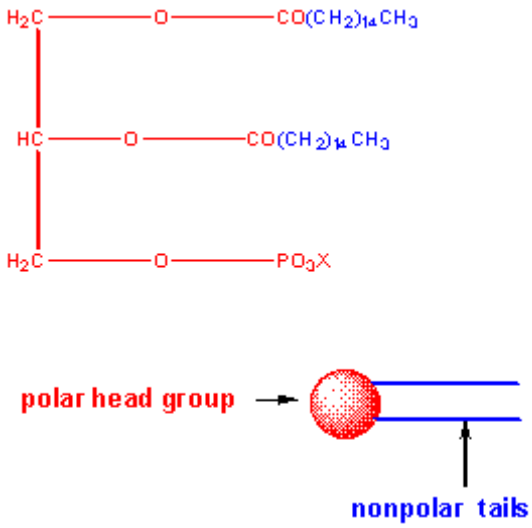
ترکیبات آب‌دوست[۱] مانند نمک‌ها در داخل آب به یون تبدیل شده و به طور قوی با مولکول های آب برهمکنش داده و در آن حل می شوند. هیدروکربن‌ها، ترکیبات غیر قطبی‌اند و قفس آبی احاطه‌کننده آنها مطلوب نمی باشد. قفس تشکیل شده در اطراف آنها شبیه یخ بوده و اغلب دارای سطوح پنج ضلعی است . این قفس پنج ضلعی دارای آنتروپی پایینی است، به همین دلیل است که هیدروکربن‌ها در محیط آبی حل نمی شوند. این مواد، ترکیبات آب گریز[۲] نامیده شده‌اند. مولکول‌های

[۱]- Hydrophilic

[۲]- Hydrophobic

آب‌گریز در حلال های آلی و غیر قطبی به خوبی محلولند. برهمکنش‌های مطلوب میان گروه های غیرقطبی ناشی از جاذبه واندروالسی میان آنها، سبب حلالیت در محیط آلی می شوند [۳]. به مولکول‌هایی که گروه های آب دوست و آب گریز را تواما " دارا هستند، آمفی پاتیک[۱] می‌گویند. فسفولیپیدها جزء این دسته از مواد می باشند و دارای سر باردار و محلول در آب و دم هیدروکربنی غیرباردار و نامحلول در آب هستند . این ترکیبات هنگامی که در آب قرار می گیرند، سر قطبی آنها با آب واکنش داده و در آن حل می شوند و دم های غیرباردار با یکدیگر برهمکنش می دهند. ساختار شکل گرفته به نوع مولکول های برهمکنش‌کننده و خواص فیزیکی سیستم بستگی دارد .

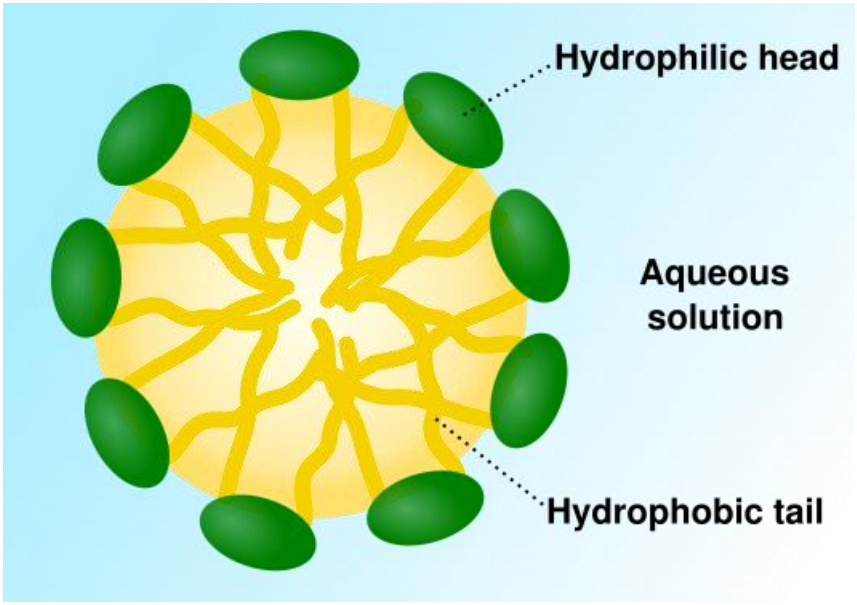
فسفولیپیدها که در محیط آب قرار می گیرند، ساختارهای میسل[۲]، تک لایه‌ای و دو لایه‌ای را شکل می‌دهند. شکل‌های (۱-۲)، (۱-۳) و (۱-۴) این ساختارها را نشان می‌دهند.



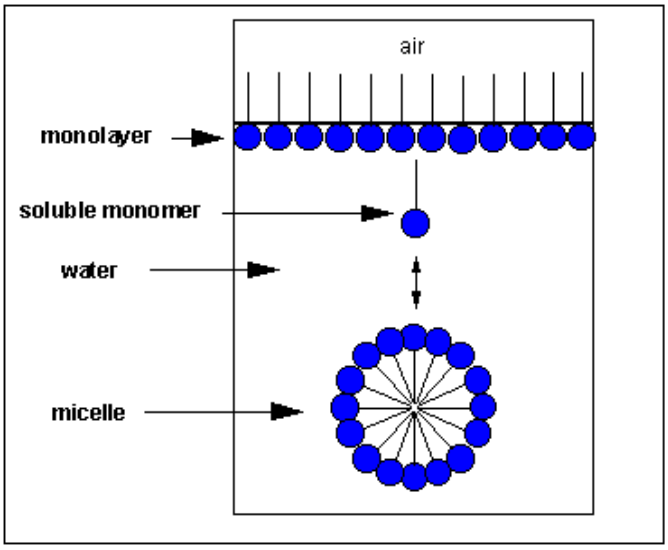
شکل (۱-۲): ساختار یک فسفولیپید

[۱]- Amphipatic

[۲]- Micelle



شکل (۱-۳): ساختار میسل



شکل (۱-۴): ساختارهای میسل تک‌لایه و دولایه

نیروهای محدود کننده رشد میسل عبارتند از:

الف) دافعه الکترواستاتیکی بین سرها در مواد فعال سطحی یونی

ب) هیدراسیون سر، که اتصال مولکول‌های آب به سر قطبی باعث افزایش حجم آن شده و مانع از نزدیک‌شدن سرها به همدیگر می‌شود [۴].

پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، ترکیبات آمفی پاتیک هستند. پروتئین‌ها شامل اسیدهای آمینه قطبی و غیرقطبی و اسیدهای نوکلوئیک شامل بازهای آب گریز و گروه های فسفات با بار منفی و محلول در آب می باشند. این ماکرومولکول های حیاتی هنگامی که در محیط آب قرار می گیرند، گروه‌های غیر قطبی و آب گریز کنار یکدیگر قرار گرفته و با یکدیگر برهمکنش می دهند، این موضوع سبب تاخوردن [۱] ماکرومولکول‌های حیاتی در اثر برهمکنش های آب گریز میان گروه های غیر قطبی است، البته نقش برهمکنش‌های الکترواستاتیک در تاخوردگی پروتئین هم محرز است [۶-۵].

حال به بررسی رفتار پروتئین ها در محیط مائی می پردازیم. عموما" هر چه سطح یک پروتئین قطبی‌تر باشد در محیط آبی بیشتر حل خواهد شد . حلالیت بعضی از پروتئین ها با اعمال تغییراتی ازقبیل گلیکوزیله شدن یا فسفوریله شدن افزایش می یابد.

طی بررسی‌هایی مشاهده شده است که به هر اسید آمینه تقریبا " دو مولکول آب متصل می شود. در بررسی‌های کریستالی مشخص شده است که مولکول های آب به شکل نسبتا" پایداری به پروتئین متصل شده‌اند. این مولکول‌ها با گروه های قطبی یا باردار در سطح پروتئین تشکیل پیوند هیدروژنی می‌دهند. مولکول‌های آب پیوندشده با پروتئین نسبت به مولکول های آب پیوندشده با آب آزاد اطراف پروتئین دارای ثبات بیشتری هستند.

پروتئین‌ها در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک کمترین حلالیت را دارند (pH ایزوالکتریک pHای است که بار خالص سطح پروتئین در آن صفر است). غلظت اندکی از نمک (به عنوان یک

[۱]- Folding

ترکیب آب‌دوست) با افزایش انرژی الکترواستاتیک موجب افزایش حلالیت پروتئین به میزان متفاوتی (با توجه به نمک به کار رفته) می‌شود. کاهش دامنه الکترواستاتیک بین مولکول های حل شونده توسط نمک، یکی از عوامل افزایش حلالیت در غلظت پایی ن نمک است . غلظت بالای نمک کشش سطحی آب را زیاد می کند. با این عمل مولکول های آب به دلیل وضعیت نامناسب انرژی قادر به تشکیل حفراتی که مولکول‌های پروتئین در آن قرار گیرند، نخواهند بود [۷].

پروتئین‌هایی که به صورت جزئی تاخورده اند، معمولا" دارای حلالیت کمتری نسبت به پروتئین‌های تاخورده هستند. علت این موضوع این است که در پروتئین های تانخورده یا جزئی تاخورده، گروه‌های غیرقطبی بیشتر در معرض حلالیت‌اند.

توانایی یونیزاسیون گروه های قطبی در پروتئین ها تحت تأثیر pK آنها است. این موضوع به علت نزدیک بودن اتم‌های گروه‌های مختلف به یکدیگر و نیز برهمکنش آنها با دیگر ساختار تاخورده است . به عنوان مثال، pK زنجیر جانبی هیستدین در پروتئین میوگلوبین بین ۵/۵ تا ۸/۱ متغیر است. شاید این عامل یکی از علل بازشدن تاخوردگی پروتئین ها در pH اسیدی یا قلیایی باشد [۸].

پروتئین‌ها را گرما و تغییرات pH واسرشت[۱] (غیرطبیعی) می‌کنند، اگر شبکه پیوندهایی که ساختار پروتئین را حفظ می کنند از هم گسیخته شو رد، فعالیت زیستی آن پروتئین از بین می رود، این تغییر را واسرشت گویند و ممکن است در نتیجه گرما یا تغییرات pH ایجاد شود. انرژی گرمایی، پیوندهای هیدروژنی را می شکند، بسیاری از پروتئین ها بوسیله دماهای بالاتر از ۵۰°C واسرشت می‌شوند. اسید یا قلیای قوی، با شکستن پل های نمکی، بارهای الکتریکی زنجیره های جانبی آمینواسیدها را تغییر می دهد. محلول‌های نمکی با غلظت بالاتر اثر مشابهی دارن د و شوینده‌ها نیز منجر به شکستن پیوندهای آب‌گریز مولکول پروتئین می‌شوند.

[۱]- Denaturation

واسرشت‌شدن مولکول پروتئین ممکن است موقتی یا دائمی باشد، امکان دارد که در شرایط معینی ساختار خطی مولکول (دگرسرشت‌شده[۱]) پروتئین، بار دیگر خودبخود تابخورد و ساختار سوم خود را بازیابد [۹]. افزودن مواد غیرطبیعی کننده (مانند اوره)، احیای پیوندهای دی سولفیدی و حذف گروه‌های پروستیک می توانند سبب غیرطبیعی شدن ساختار پروتئین شوند. برای مثال مواد غیرطبیعی کننده مثل اوره یا نمک‌های گوانیدینیوم با سطوح قطبی و غیرقطبی به شکل مناسبی برهمکنش می‌کنند [۳].

برهمکنش لیگاند – پروتئین اغلب از نوع برهمکنش فیزیکی است . لیگاندها شامل سوبستراهای آنزیمی، آنیون‌های اسید چرب، کاتیون فلزی ، مواد فعال سطحی و غیره هستند . یک ماکرومولکول ممکن است یک یا چند جایگاه پیوندی یا حتی چندین دسته جایگاه پیوندی داشته باشد . جایگاه‌های پیوندی ممکن است یکسان یا غیریکسان، مستقل یا وابسته باشند.

روش‌های مختلفی برای بررسی اتصال لیگاند به ماکرومولکول استفاده می شود که به بررسی چند مورد از آنها می‌پردازیم:

الف) پراش[۲] اشعه X و طیف‌سنجی NMR[۳]

پروتئین‌ها از نظر زیستی هنگامی فعال هستند که به صورت آرایش فضایی اصلی اشان تابخورند. از اینرو فهم ساختارهای سه بعدی پروتئین‌ها، کلید اصلی فهم نحوه عملکردشان است.

بیشترین اطلاعات در مورد ساختار پروتئین ها توسط پراش اشعه X و NMR بدست می آیند. طبق روش پراش اشعه X بخش‌هایی نظیر ساختار دوم پروتئین مشخص می شود و در حالیکه طبق روش NMR می‌توان اطلاعاتی راجع به دینامیک پروتئین، از جمله انعطاف پذیری و حرکت در

---

[۱]- Renature

[۲]- Scattering

[۳]- Nuclear magnetic resonance spectroscopy