الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمی

مطالعات سینتیکی آنزیم اوره آز درحضور پراکسید هیدروژن، نانوذرات اکسید نیکل و اکسید آهن و عوامل دگرگون کننده شیمیایی

استاد راهنما:

دکتر بهزاد شارقی

استاد مشاور:

دکتر حمدالله مشتاقی

پژوهشگر:

سکینه صادقی کاجی

شهریورماه۱۳۹۳

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه خانم سکینه صادقی جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمی با عنوان: مطالعات سینتیکی آنزیم اوره آز درحضور پراکسید هیدروژن، نانوذرات اکسید نیکل و اکسید آهن و عوامل دگرگون کننده شیمیایی.

در تاریخ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با رتبه/نمره مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱.استادراهنمای پایان نامه دکتر بهزاد شارقی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۲.استاد مشاور پایان نامه دکتر حمدالله مشتافی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۳.استاد داور پایان نامه دکتر عبدالناصر محبی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۴. استاد داور پایان نامه دکتر اسدالله امینی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

دکتر محمدسعید حیدرنژاد

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم

کلیه حقوق مادی مرتبط بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تشکر و قدر دانی:

تشـکر و سپاس بی پایان مخصوص خدایی است که انسان را آفریده و به او قدرت اندیشیدن داده و تواناییهای بالقوه را در وجود انسان قرار داده و او را امر به تلاش وکوشش نموده و راهنمایانی را برای هدایت بشر فرستاده است.

پس از ارادت خالصانه به درگاه خداوند بی همتا لازم است از استاد ارجمند جناب آقای دکتر بهزاد شارقی که با سعه صدر و رهنمودهای دلسـوزانه که در تهیه ی این پایان نامه مرا مورد لطف خود قرار دادند و راهنماییهای لازم را نمودند، تشـکر و قدردانی نموده و همچنین از جناب دکتر حمدالله مشـــتاقی که مشـــاوره این پایان نامه را پذیرفتند و اســـاتید بزرگوار آقایان دکتر عبدالناصـر محبی و دکتر اسـدالله مشـتاقی که داوری این پایان نامه را پذیرفتند، نهایت تشـکر و قدردانی را دارم و موفقیـت همگـان را از درگـاه احـدیـت خواهانم. و در نهایت از پدر و مادر بزرگوار و خانواده محترمم که همیشـــه پشـتیبان و مشـوق من بوده و در رویارویی با مشـکلات من را تنها نگذاشـتند تشـکر میکنم و سـلامتی آنها را از خداوند ممنان خواستارم.

تقدیم به:

پدر و مادر

عزیز و بزرگوارم که علیرغم تحمل سختی ها، دشواریهای مسیر پرپیچ و خم کسب دانش و معرفت را هموار نموده و از دعای خیرشان بی نصیب نبوده ام .

برادران

عزیز و ارجمندم که در راه پرفراز و نشیب زندگی همواره تکیه گاهم بودند.

خواهر

عزیز و مهربانم که همیشه مشوق من بودند.

و تمام کسانی که به من آموختند که هیچ نمی دانم.

چکیده

آنزیم اوره آز (EC:3.5.1.5) از نظر عملکردی جزه خانواده آمیدوهیدرولازها و فسفوتری استراز می باشد . این آنزیم هیدرولیز اوره به کربن دی اکسید و آمونیاک را کاتالیز می کند. به صورت اختصاصی تر می توان گفت که اوره آز کاتالیز اوره به آمونیا و کربامات را کاتالیز می کند سپس کربامات به طور خود به خودی تجزیه و ایجاد آمونیاک و کربن دی اکسید می نماید . اوره آز یک متالوآنزیم(حاوی نیکل) با وزن مولکولی بالا است . وزن مولکولی اوره آز ۴۸۰ یا ۵۴۵ کیلو دالتون می باشد. هر مولکول اوره آز داری ۸۴۰ آمینواسید می باشد که ۹۰ تای آنها سیستئین می باشند. pH اپتیمم اوره آز ۷/۲ و دمای اپتیمم آن ۴۰ درجه سانتیگراد می باشد. اوره آز لوبیای جک دارای زیرواحدهای یکسانی است (هر کدام ۹۰ کیلو دالتون) که بعنوان تریمر یا هگزامر تجمع می یابند. جایگاه فعال آنزیم در زیرواحد α قرار دارد و شامل دو یون نیکل با فاصله اتمی A^0 ۳/۵ ~ می باشد. یونهای نیکل به وسیله یک لیزین کربامیله شده و یک یون هیدروکسید به هم وصل شده اند. یون Ni (I) با اتم نیتروژن رزیدیوی هیستیدین و یک مولکول آب احاطه شده. یون Ni(II) از طریق دو رزیدیوی هیستیدین (از طریق یون نیتروژن)، یک آسپارتیک اسید (از طریق یون اکسیژن) و دو مولکول آب احاطه شده است. مولکولهای اوره برای واکنش به جایگاه فعال متصل می شوند و جایگزین مولکولهای آب می شوند. رزیدیوهای آمینواسید در اتصال سوبسترا، تثبیت حالت گذر و تسریع واکنش شرکت می کنند، به علاوه این رزیدیوهای آمینواسیدی در ساخت لبه متحرک جایگاه فعال آنزیم که به عنوان درب برای سوبسترا عمل می کند، شرکت می کنند. رزیدیوهای سیستئین به فراوانی در لبه متحرک آنزیم وجود دارند، این زیدیوها در تعیین موقعیت رزیدیوهای کلیدی جایگاه فعال نقش دارند. در این مطالعه سینتیک آنزیم اوره آز در حضور پراکسید هیدروژن ، نانوذرات اکسید نیکل و اکسید آهن و دیگر مواد شیمیایی بررسی شد که به منظور انجام این آزمایش ها از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis شیمادزو مدل Pharmacia-۴۰۰۰ استفاده گردید. آنزیم اوره آز با غلظت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر درتامپون فسفات آماده گردید. نتایج این آزمایش ها نشان دادندکه : ۱)پراکسید هیدروژن اثر مهاری بر روی سینتیک اوره آز دارد و این اثر مهاری به وسیله بوریک اسید و بتامرکاپتو اتانول کاهش می یابد. ۲) نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدآهن به عنوان یک مهارکننده غیر رقابتی برای اوره آز عمل می کنند و این اثر مهاری توسط EDTA کاهش می یابد. ۳)بوریک اسید و مرکوریک سولفات به ترتیب به عنوان مهارکننده رقابتی وغیر رقابتی عمل می کنند.

کلمات کلیدی: اوره آز، پراکسیدهیدروژن، سینتیک، ساختمان اوره آز، فعالیت اوره آز، نانوذرات اکسیدنیکل و اکسیدآهن

فهرست مطالب:

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول-مقدمه ۱

۱-۱- پروتئین‌ها ۱

۱-۱-۲- ساختمان پروتئین‌ها ۳

۱-۱-۲- ۱-مروری کلی بر ساختمان پروتئین‌ها ۳

۱-۱-۲- ۲-ساختمان اول ۳

۱-۱-۲- ۳- ساختمان دوم ۴

۱-۱-۲-۴-ساختمان‌های فوق دوم یا موتیف یا چین ۶

۱-۱-۲-۵-ساختمان سوم ۶

۱-۱-۲-۶-ساختمان چهارم ۷

۱-۱-۲-۷-عوامل متعددی ساختارهای نوع سوم و چهارم را پایدار می‌کنند ۷

۱-۱-۳- حلالیت پروتئین‌ها ۸

۱-۲- آنزیم ۹

۱-۲-۱-تعریف آنزیم ۹

۱-۲-۲-طبقه بندی آنزیم ها ۱۰

۱-۲-۳-ساختمان آنزیم ها ۱۱

۱-۲-۴- مفاهیم کلی نحوه عمل آنزیم ها ۱۲

۱-۲- ۴-۱- بررسی ترمودینامیک آنزیم ها ۱۳

۱-۲-۴-۲-اتصال آنزیم به سوبسترا ۱۴

۱-۲-۴-۳- حالت گذار ۱۴

۱-۲-۴-۴-اتصال محکم در حالت گذار ۱۵

۱-۲-۵- چند فرضیه در مورد چگونگی اتصال سوبسترا به آنزیم..... ۱۵

۱-۲-۶- سینتیک واکنش آنزیمی ۱۷

۱-۲-۶-۱-سینتیک آنزیمی واکنش های تک سوبسترایی..... ۱۷

۱-۲-۶-۲-در بیشتر واکنش های بیوشیمیایی چندین سوبسترا وجود دارد ۱۸

۱-۲-۷- مهار آنزیمی..... ۱۹

۱-۲-۷-۱- مهار رقابتی ۲۰

۱-۲-۷-۲-مهارکننده نارقابتی ۲۰

۱-۲-۷-۳-مهارکننده غیر رقابتی..... ۲۱

۱-۲-۸- فعالیت آنزیم..... ۲۲

۱-۲-۸-۱-چند اصطلاح درمورد فعالیت آنزیم ها ۲۲

۱-۲-۸-۲-فعالیت آنزیمی تحت تاثیر pH قرار می گیرد..... ۲۲

۱-۲-۸-۳-اثر دما بر فعالیت آنزیم ۲۳

۱-۲-۹- مقدمه ای بر اوره آز..... ۲۳

۱-۲-۹-۱-ویژگیهای اوره آز..... ۲۴

۱-۲-۹-۲-جایگاه فعال اوره آز..... ۲۵

۱-۲-۹-۳-فعالیت اوره آز..... ۲۶

۱-۲-۹-۴-مکانیسم های پیشنهادی..... ۲۷

۱-۳-فناوری نانو..... ۲۹

۱-۳-۱-معرفی فعالیت نانو..... ۲۹

۱-۳-۲-تعریف نانوذره..... ۲۹

۱-۳-۳-نانوتکنولوژی ۳۰

۱-۳-۴-کاربرد فناوری نانو در پزشکی..... ۳۱

۱-۳-۵-نانوذرات فلزی ۳۲

۱-۳-۶-سنتز نانوذره نیکل ۳۲
۱-۳-۷-کاربرد نانوذره نیکل ۳۳
۱-۴-روش اندازه گیری جذب..... ۳۴
۱-۴-۱-جذب ۳۴
۱-۴-۲-مقدار جذب ۳۴
۱-۴-۳-رابطه جذب با غلظت ۳۴
۱-۴-۴-دستگاه اسپکتروفتومتر ۳۵
۱-۵-هدف از انجام مطالعه..... ۳۵
فصل دوم-مواد و روشها..... ۳۶
۲-۱-مواد مورد نیاز..... ۳۶
۲-۲-تهیه محلولهای موردنیاز..... ۳۷
۲-۲-۱- تهیه بافر (تامپون)سدیم دی هیدروژن فسفات..... ۳۷
۲-۲-۲-تهیه محلولهای نانوذرات اکسید نیکل(NiO)، اکسیدآهن (Fe_2O_3 و Fe_3O_4)..... ۳۷
۲-۲-۳-تهیه محلولهای بوریک اسید وبتامرکاپتو اتانول واوره..... ۳۷
۲-۲-۴- تهیه معرف های فنول، سیترات، دی کلرو ایزوسیانوریت قلیایی و نیتروپروسید..... ۳۷
۲-۳- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور مواد مختلف..... ۳۸
۲-۳-۱- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور پراکسید هیدروژن در دمای ۴۰درجه سانتی گراد و در pH های گوناگون ۳۸
۲-۳-۲- مطالعه اثرحفاظتی بوریک اسید در برابر اثر مهاری پراکسید هیدروژن بر روی سینتیک آنزیم اوره آز در دمای ۴۰درجه سانتیگرادو pH=۸ ..... ۳۸
۲-۳-۳- مطالعه اثرحفاظتی بتا مرکاپتو اتانول در برابر اثر مهاری پراکسید هیدروژن بر روی سینتیک آنزیم اوره آز در دمای ۴۰درجه سانتیگراد وpH=۸ ..... ۳۸
۲-۳-۴- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید نیکل در دمای ۴۰ درجه سانتیگرادوpH=۷/۲.... ۳۹

۲-۳-۵- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3)در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و pH=۷/۲ ..... ۳۹

۲-۳-۶-مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_3O_4)در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و pH=۷/۲ ..... ۳۹

۲-۳-۷- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور مرکوریک سولفات دردمای ۴۰ درجه سانتیگرادو pH=۷/۲..... ۴۰

۲-۳-۸- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور بوریک اسید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در pH =۷/۲.... ۴۰

۲-۳-۹- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در دماهای گوناگون و در pH=۷/۲ ..... ۴۰

۲-۳-۱۰- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید نیکل وEDTA در دمای ۴۰ درجه سانتیگرادو pH=۷/۲ ..... ۴۰

۲-۳-۱۱- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_3O_4) و EDTA در دمای ۴۰ درجه سانتیگرادو pH=۷/۲ ..... ۴۱

۲-۳-۱۲- مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3) وEDTA در دمای ۴۰ درجه سانتیگرادو pH=۷/۲ ..... ۴۱

۲-۳-۱۳- مطالعه مقایسه ای سینتیک آنزیم اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن در pH های مختلف و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۱

۲-۳-۱۴- مطالعه مقایسه ای سینتیک آنزیم اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن(۳۰میلی مولار) و بوریک اسید(۳۰میلی مولار) با پراکسیدهیدروژن (۳۰ میلی مولار) و بتامرکاپتواتانول(۳۰ میلی مولار) درpH=۸ و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۲

۲-۳-۱۵- مطالعه مقایسه ای سینتیک آنزیم اوره آز در حضور نانوذرات Fe_2O_3 , NiO و Fe_3O_4 در pH=۷/۲ و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۲

۲-۳-۱۶- مطالعه ثابت مهارکنندگی آنزیم اوره آز در حضور نانوذرات Fe_2O_3، Fe_30_4 وNiO در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در pH =۷/۲ ..... ۴۲

فصل سوم-نتایج..... ۴۳

۳-۱- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور مواد مختلف..... ۴۳

۳-۱-۱- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور پراکسید هیدروژن در دمای ۴۰ درجه ی سانتیگراد ودر pH های گوناگون ۴۲

۳-۱-۲- بررسی مقایسه ای نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن در pH های مختلف..۴۷

۳-۱-۳- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی اثرحفاظتی بوریک اسید در برابر اثر مهاری پراکسید هیدروژن بر روی آنزیم اوره آز در دمای ۴۰ درجه سانتیگرادو۸=pH ۴۸

۳-۱-۴- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی اثرحفاظتی بتامرکاپتواتانول در برابر اثر مهاری پراکسید هیدروژن بر روی آنزیم اوره آز در دمای ۴۰درجه سانتیگرادو۸=pH..... ۴۹

۳-۱-۵-بررسی مقایسه ای نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن(۳۰میلی مولار) و بوریک اسید(۳۰میلی مولار) با پراکسیدهیدروژن (۳۰ میلی مولار) و بتامرکاپتواتانول(۳۰ میلی مولار) در۸=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۵۱

۳-۱-۶- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید نیکل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در۷/۲ = pH..... ۵۲

۳-۱-۷- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در ۷/۲=pH ۵۴

۳-۱-۸- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_3O_4) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در۷/۲=pH ۵۵

۳-۱-۹- بررسی مقایسه ای نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذرات NiO، Fe_2O_3وFe_3O_4 در ۷/۲=pH و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۵۷

۳-۱-۱۰- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور مرکوریک سولفات در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در۷/۲=pH ۵۸

۳-۱-۱۱- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور بوریک اسید در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در۷/۲=pH ۶۰

۳-۱-۱۲- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در دمای های مختلف و ۷/۲=pH..... ۶۲

۳-۱-۱۳- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید نیکل و EDTA در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در ۷/۲=pH..... ۶۳

۳-۱-۱۴-بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_3O_4) و EDTA در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و در ۷/۲=pH ۶۵

۳-۱-۱۵- بررسی نتایج مطالعه سینتیکی آنزیم اوره آز در حضور نانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3) و EDTA در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و در pH=۷/۲ ..... ۶۶

۳-۱-۱۶- بررسی نتایج ثابت مهارکنندگی آنزیم اوره آز در حضور نانوذرات Fe_2O_3 , Fe_3O_4 وNiO در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و در pH=۷/۲ ..... ۶۸

فصل چهارم-بحث ونتیجه‌گیری ۷۱

منابع ۷۶

فهرست شکل‌ها، نمودارها و جدول‌ها:

شکل ۱-۱- پیوند پپتیدی ۳

شکل ۱-۲-تشکیل پیوندهای پپتیدی با روش تغلیظ ۴

شکل ۱-۳-ساختار دوم قسمتی از یک پروتئین؛ مارپیچ آلفا به رنگ خاکستری و صفحه بتا به رنگ قرمز نمایش داده شد ۵

شکل ۱-۴-سطوح ساختمانی در پروتئین‌ها ۷

شکل ۱-۵-تصویری از آپوآنزیم وهولو آنزیم ۱۲

شکل۱-۶-مکانیسم عمل آنزیم ۱۳

شکل ۱-۷- دیاگرام انرژی برای واکنش‌های کاتالیزشده در برابر واکنش‌های کاتالیزنشده ۱۵

شکل ۱-۸-فرضیه قفل و کلید فیشر ۱۶

شکل ۱-۹-فرضیه قالب القایی کوشلند ۱۶

شکل ۱-۱۰-نمودار میکائیلیس-منتون ۱۸

شکل ۱-۱۱- مهارکننده رقابتی ۲۰

شکل ۱-۱۲- مهار نارقابتی ۲۱

شکل ۱-۱۳- مهار غیر رقابتی ۲۱

شکل ۱-۱۴- ساختار سه بعدی اوره آز ۲۴

شکل ۱-۱۵- توالی اسید آمینه های موجود در اوره آز ۲۵

شکل ۱-۱۶- تصاویری از جایگاه فعال اوره آز و واکنش کاتالیز شده توسط اوره آز ۲۶

شکل ۱-۱۷- روش کاهش هیدروژنی در تولید نانوذره نیکل ۳۳

شکل۱-۱۸- شماتیکی از دستگاه اسپکتروفتومتر ۳۵

نمودار۳-۱- اثر غلظت های مختلف پراکسیدهیدروژن بر آنزیم اوره آز در۵/۵=pH ، در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۴

جدول۳-۱- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن در۵/۵=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۴

نمودار۳-۲- اثر غلظت های مختلف پراکسید هیدروژن بر آنزیم آوره آز در۷/۲= pH ،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۵

جدول ۳-۲- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن در۷/۲=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۵

نمودار ۳-۳- اثر غلظت های مختلف پراکسید هیدروژن بر آنزیم اوره آز در۸=pH دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۶

جدول۳-۳- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن در۸=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد را ۴۶

نمودار۳-۴- اثر پراکسید هیدروژن (۳۰میلی مولار)بر آنزیم اوره آز در pH های مختلف و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد.... ۴۷

جدول۳-۴- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن (۳۰ میلی مولار) در pH های مختلف، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۸

نمودار۳-۵- اثر حفاظتی غلظت های مختلف بوریک اسید بر مهار شدن آنزیم اوره آز در برابر پراکسید هیدروژن (۳۰میلی مولار) در۸= pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۸

جدول ۳-۵- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) آوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن (۳۰میلی مولار) و غلظت های مختلف بوریک اسیددر۸=pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۴۹

نمودار ۳-۶- اثر حفاظتی غلظت های مختلف بتامرکاپتواتانول بر مهار شدن آنزیم اوره آز در برابر پراکسید هیدروژن (۳۰میلی مولار) در۸=pH ،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۵۰

جدول۳-۶- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) آوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن (۳۰میلی مولار) و غلظت های مختلف بتامرکاپتواتانول در۸=pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۵۰

نمودار۳-۷- اثر حفاظتی بتامرکاپتواتانول و بوریک اسید بر مهار شدن آنزیم اوره آز در برابر پراکسید هیدروژن (۳۰میلی مولار) در۸= pH دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۱

جدول۳-۷- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) آوره آز در حضور پراکسیدهیدروژن (۳۰میلی مولار)به همراه بتامرکاپتواتانول و بوریک اسید در۸=pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۲

نمودار۳-۸-اثر غلظت های مختلف نانوذره اکسید نیکل بر آنزیم اوره آز در۷/۲= pHدمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۵۳

جدول ۳-۸- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضورنانوذره اکسید نیکل در۷/۲=pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۳

نمودار ۳-۹- اثر غلظت های مختلف نانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3)بر آنزیم اوره آز در۷/۲=pH دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۴

جدول۳-۹- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضورنانوذره اکسید آهن (Fe_2O_3) در۷/۲=pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۵

نمودار۳-۱۰- اثر غلظت های مختلف نانوذره اکسید آهن (Fe_3O_4) بر آنزیم اوره آز در۷/۲= pH دمای ۴۰ درجه سانتیگراد... ۵۶.....

جدول۳-۱۰- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضورنانوذره اکسید آهن(Fe_3O_4) در۷/۲=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۶

نمودار۳-۱۱- اثر نانوذرات مختلف، Fe_2O_3 , NiO و Fe_3O_4 بر فعالیت آنزیم اوره آز در۷/۲=pH ودمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۷

جدول۳-۱۱- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضورنانوذرات Fe_2O_3 , NiO و Fe_3O_4 در۷/۲=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد را نشان می دهد..... ۵۸

نمودار۳-۱۲- اثر غلظت های مختلف مرکوریک سولفات بر آنزیم اوره آز در ۷/۲=pH دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۵۹

جدول۳-۱۲- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) و Km (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضور مرکوریک سولفات در۷/۲=pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد را نشان می دهد..... ۵۹

نمودار ۳-۱۳- اثر غلظت های مختلف بوریک اسید بر آنزیم اوره آز در۷/۲= pH، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۶۰

جدول۳-۱۳- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در حضور بوریک اسید در۷/۲=pH،دمای ۴۰ درجه سانتیگراد..... ۶۱

نمودار ۳-۱۴- منحنی دیکسون برای اثر غلظت های مختلف بوریک اسید بر سینتیک آنزیم اوره آز در pH=۷/۲ و دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۶۱

نمودار ۳-۱۵- اثر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم اوره آز در pH =۷/۲ ..... ۶۲

جدول۳-۱۴- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) و Km (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در دماهای مختلف در pH=۷/۲ ..... ۶۳

نمودار۳-۱۶- اثر غلظت های مختلف EDTA وغلظت ۰/۰۰۶میلی گرم بر میلی لیتری نانوذره اکسید نیکل بر فعالیت آنزیم اوره آز در pH=۷/۲ ..... ۶۴

جدول۳-۱۵- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در غلظت های مختلف EDTA وغلظت ۰/۰۰۶میلی گرم بر میلی لیتری نانوذره نیکل در pH=۷/۲ ..... ۶۴

نمودار ۳-۱۷- اثر غلظت های مختلف EDTA وغلظت ۰/۰۰۶میلی گرم بر میلی لیتری نانوذره اکسید آهن بر فعالیت آنزیم اوره آز در pH =۷/۲ .. .. ۶۵

جدول۳-۱۶- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در غلظت های مختلف EDTA وغلظت ۰/۰۰۶ میلی گرم بر میلی لیتری نانوذره Fe_3O_4 در pH=۷/۲ ..... ۶۶

نمودار ۳-۱۸- اثر غلظت های مختلف EDTA وغلظت ۰/۰۰۶ میلی گرم بر میلی لیتری نانوذره اکسید آهن بر فعالیت آنزیم اوره آز در pH =۷/۲ ..... ۶۷

جدول۳-۱۷- تغییرات Vmax(فعالیت آنزیم) وKm (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره آز در غلظت های مختلف EDTA وغلظت ۰/۰۰۶ میلی گرم بر میلی لیتری نانوذره Fe_2O_3 ..... ۶۷

نمودار ۳-۱۹- منحنی دیکسون برای اثر نانوذره NiO بر روی سینتیک آنزیم اوره آز در pH=۷/۲، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۶۸

نمودار۳-۲۰- منحنی دیکسون برای اثر نانوذره Fe_2O_3 بر روی سینتیک آنزیم اوره آز در pH=۷/۲، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۶۹

نمودار۳-۲۱- منحنی دیکسون برای اثر نانوذره Fe_3O_4 بر روی سینتیک آنزیم اوره آز در pH=۷/۲، دمای ۴۰ درجه سانتیگراد ۶۹

جدول۳-۱۸ ، میزان KI (تمایل آنزیم به مهارکننده)اوره آز در حضور نانوذرات مختلف را نشان می دهد ۷۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱-پروتئین‌ها:

نام پروتئین (protein) از از کلمه یونانی (proto) به معنی اولیه اقتباس شده است. پروتئین‌ها ماکرومولکول-هایی با وزن مولکولی حداقل چند هزار دالتون می‌باشند که از یک یا چند زنجیره های اسید های آمینه که با پیوندهای پپتیدی در ارتباط هستند، تشکیل شده اند. توالی آمینواسیدها در یک پروتئین، خاص است که توسط ساختار ماده ژنتیکی سلول مشخص می‌شود. پروتئین ها فراوان ترین گروه مواد آلی موجود در سلول ها می باشد که بیش از ۵۰ درصد وزن خشک سلول را شامل می شوند. این ماکرو مولکول های الی در همه ی قسمت های تمام سلول ها یافت می شوند و دارای نقش های اساسی در جنبه های ساختمانی و کارکردی سلول می باشند (Palmer,2001). این دسته از مواد مسئول واکنش های مهمی در بدن هستند : به طور مثال آنزیم هایی که کلیه ی واکنش های شیمیایی و فیزیکی بدن را انجام می دهند، هورمون ها، حاملین اکسیژن، عوامل موثر بر انقباضات ماهیچه ای و نیز عناصر شرکت کننده در اعمال ایمونولوژیک، همه دارای ساختمان پروتئینی هستند. هدف کلی بررسی بیوشیمی پروتئین، مطالعه ی رابطه ی بین ساختمان مولکولی پروتئین و کارکرد و فعالیت بیولوژیک آن می باشد. تجزیه نشان داده است که همه ی آنها عناصر کربن، هیدروژن، اکسیژن و ازت را دارا می باشند و برخی عناصر

اضافی مثل اهن، مس، روی و فسفر را نیز شامل می شوند. پروتئین ها را بر اساس ترکیب آن ها به دو گروه پروتئین ساده و مرکب تقسیم می کنند. پروتئین های ساده در اثر هیدرولیز فقط اسیدهای امینه تولید می کنند بدون آن که مواد آلی یا معدنی دیگری مثل آلبومین، گلوبولین، هیستون، پروتآمین و اسکلروپروتئین بدست آید. پروتئین های مرکب در اثر هیدرولیز علاوه بر اسید های امینه، مواد الی و معدنی دیگری نیز ایجاد می کنند. آن قسمت از پروتئین مرکب که از اسیدهای امینه تشکیل نشده باشد، گروه پروستتیک نام دارد. انواع پروتئین های مرکب با توجه به گروه پروستتیک آنها نام گذاری می شوند. مثل نوکلئوپروتئین ها، لیپوپروتئین ها، فسفوپروتئین ها و متالوپروتئین ها (هموگلوبین، سیتوکروم ، کاتالاز و اوره آز). هر مولکول پروتئین در حالت عادی دارای شکل سه بعدی خاصی است که به آن ساختمان فضائی گویند. بر همین مبنا پروتئین ها را به دو دسته ی رشته ای و کروی تقسیم بندی می کنند. پروتئین های رشته ای از زنجیره های پلی پپتیدی که به موازات هم در طول یک محور قرار می گیرند و تشکیل زنجیره های طولانی یا صفحات را می دهند، تشکیل شده اند. این دسته از پروتئین ها اجزای اصلی سازنده بافت پیوندی در جانوران می باشند که شامل کلاژن زرد پی در ماتریکس، الاستین بافت همبندی ارتجاعی و الفا کراتین موجود در مو، شاخ، ناخن، و پوست می باشند. تمام پروتئین های متعلق به این دسته از نظر فیزیکی محکم و در آب و محلول های رقیق نمکی نامحلول هستند (Palmer,2001). در پروتئین کروی رشته های پلی پپتیدی محکم به هم پیچ خورده و اشکال کروی ایجاد می کند. به دلیل شکل ویژه ی پروتئین های کروی، آن ها غالبا نقش سیار و متحرک را در داخل سلول ایفا می کنند. اغلب انزیم ها، پروتئین ها، پادتن ها، هورمون ها و پروتئین هایی مانند هموگلوبین و سرم البومین که نقش انتقال را در بدن ایفا می کنند از نظر فیزیکی معمولا در محیط های آبی محلول هستند. بیشتر آنزیم ها و پروتئین های تنظیمی از انواع پروتئین های کروی می باشند (Lehninger et al., 2005). دسته ی سوم پروتئین ها از نظر ساختمانی شبیه به انواع رشته ای بوده اما از نظر حلالیت در محلول های نمکی مانند پروتئین های کروی عمل می کنند، (مانند میوزین و فیبرینوژن).

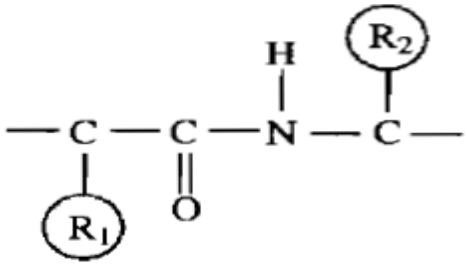
۱-۱-۲-ساختمان پروتئین‌ها

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

آرایش فضایی اتم‌های مو جود در یک پروتئین را کونفورماسیون[1] می‌گویند.کونفورماسیون‌های ممکن یک پروتئین شامل هر وضعیت ساختمانی است که بدون شکسته شدن پیوندهای کوالان بدست می‌آیند. 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).پروتئین هایی که در هر کدام از وضعیت های تاشده خود وجود داشته و انجام وظیفه می کنند را پروتئین های طبیعی گویند (Socolich et al ., 2005).

۱-۱-۲-۲-ساختمان اول

انواع اسیدهای آمینه و ترتیب قرارگرفتن آنها در یک رشته پلی پپتیدی را ساختمان اول گویند (Lehninger et al., 2005). بنابراین پیوندهای پپتیدی پایه های ساختمان اول می باشند. این ساختمان همچنین موقعیت پیوندهای دی سولفیدی را در صورت وجود بیان می کند. پروتئین‌ها از حدود ۲۲ آمینواسید تشکیل شده‌اند که با استفاده از پیوند آمیدی یا پپتیدی به هم متصل می‌شوند(شکل ۱-۱).

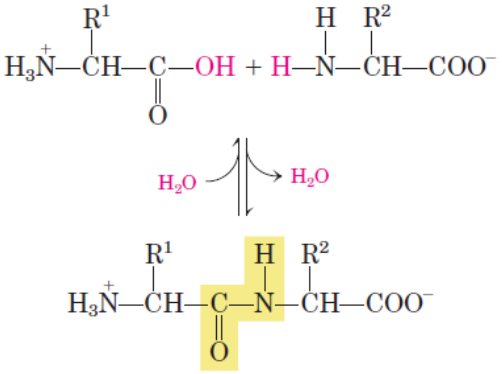


شکل۱-۱:پیوند پپتیدی

این پیوند از ترکیب عامل کربوکسیل یک اسید آمینه با گروه آمین اسید آمینه دیگر با از دست دادن یک مولکول آب به وجود می آید (شکل ۱-۲). 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،یک واکنش انرژی‌زا است، بخاطر انرژی فعالسازی بالای آن، به آهستگی صورت می‌گیرد (Dougherty, 2000; Mayo, 2000).

[1]Conformation



شکل۱-۲:تشکیل پیوندهای پپتیدی باروش تغلیظ

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).

۱-۱-۲-۳-ساختمان دوم

ساختمان دوم پروتئین اشاره به نظم‌های موضعی دارد که پروتئین در حین تاشدگی به خود می‌گیرد. چند نوع ساختار دوم پایدار در پروتئین های مختلف دیده می شود. برجسته ترین این ساختارها، کونفورماسیون های آلفا و بتا می باشند.

۱)**مارپیچ آلفا:** مارپیچ آلفا یکی از ساختارهای دوم رایج در پروتئین‌ها است. مارپیچ آلفا یک مارپیچ راست‌گرد است (شکل ۱-۳) که ساختار آن هر ۵/۴ آنگستروم یک بار تکرار می‌شود. در هر دو مارپیچ آلفا، ۳/۶ اسید آمینه وجود دارد. یعنی هر ۱/۵ آنگستروم یک اسید آمینه در طول مارپیچ آلفا قرار می‌گیرد. هر گروه کربوکسیل و آمین در مارپیچ آلفا با اسید آمینه‌ای با فاصله چهار تا از خود، دارای باند هیدروژنی می‌باشد و این الگو در سراسر مارپیچ، غیر از چهار اسیدآمینه در دو انتهای آن تکرار شده‌است (Lehninger et al., 2005). بسیاری از مارپیچ های آلفا در یک سمت محور خود به طور غالب زنجیر ه های جانبی آب گریز و در سمت دیگر خود به طور غالب زنجیر های جانبی آب دوست دارند. این مارپیچ های دوگانه دوست به خوبی برای تشکیل سطوح تماس بین نواحی قطبی وغیر قطبی مثل قسمت داخلی آب گریز پروتئین و محیط آبی اطراف آن سازگار شده اند. تجمعات مارپیچ های دوگانه دوست با تشکیل کانال یا منفذ، می تواند به مولکولهای قطبی خاص، اجازه عبور از غشای سلولی آب گریز را بدهد(Ponthng and Russell, 2002).

۲)**صفحات بتا :** ساختار صفحه‌های بتا، ساختار دوم بسیارکشیده و چین‌دار می‌باشد. یکی از تفاوت‌های مهم صفحه های بتا با مارپیچ آلفا این است که اسیدآمینه‌هایی که معمولاً در ساختار اول زنجیره ی پروتئینی با