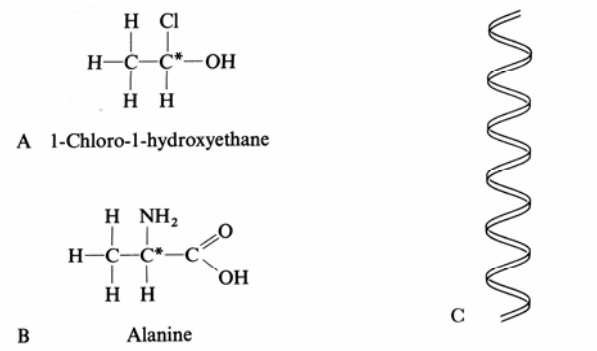
فصل هفتم
اسپکتروسکوپی دورنگی دایره‌ای[1] (CD)

۷-۱. میان‌کنش نور پلاریزه و ساختمان‌های کایرال[2]:

دو رنگی دایره‌ای یک تکنیک اسپکتروسکوپی است که میان‌کنش متفاوت برخی مولکول‌ها را با نور پلاریزه دایره‌ای چپ‌گرد و راست‌گرد اندازه‌گیری می‌کند. نور پلاریزه دایره‌ای کایرال است بدین معنی که در دو شکل غیرقابل انطباق وجود دارد که تصاویر آیینه‌ای یکدیگر محسوب می‌شوند. برای تشخیص دادن دو شکل کایرال نور، مولکول کروموفور نیز باید کایرال باشد. کایرال بودن کروموفور موجب ایجاد فعالیت نوری در آن می‌گردد بدین معنی که نسبت به نور پلاریزه دایره‌ای راست‌گرد و چپ‌گرد دارای ضرایب جذب مولی متفاوت (ε_R و ε_L) می‌باشد. فعالیت نوری ویژگی بسیاری از مولکول‌های آلی و تقریبا تمامی مولکول‌های بیولوژیک است. خصلت مشترک تمامی ترکیبات فعال نوری، عدم تقارن در ساختمان آنان است. اگر یک مولکول نامتقارن باشد، آنگاه بر تصویر آیینه‌ای خود قابل انطباق نخواهد بود. مثال‌هایی از ساختمان‌های فعال نوری را در شکل (۷-۱) می‌توانید ببینید:



شکل (۷-۱): مثال‌هایی از چند ساختمان فعال نوری. در (A) و (B) کربن نامتقارن به وسیله ستاره نشان داده شده است. ساختمان مارپیچی (C) نیز دارای عدم تقارن است.

وجود پدیده کایرالیتی[3] در مولکول کروموفور می‌تواند به یکی از سه صورت زیر باشد:

---

[1] Circular Dichroism Spectroscopy
[2] Chiral

۱- مولکول کروموفور ذاتا به واسطه ساختمان ویژه‌اش کایرال باشد.
۲- مولکول کروموفور به وسیله یک پیوند کووالان به یک مرکز کایرال متصل شده باشد.
۳- مولکول کروموفور در یک محیط نامتقارن قرار گرفته باشد.

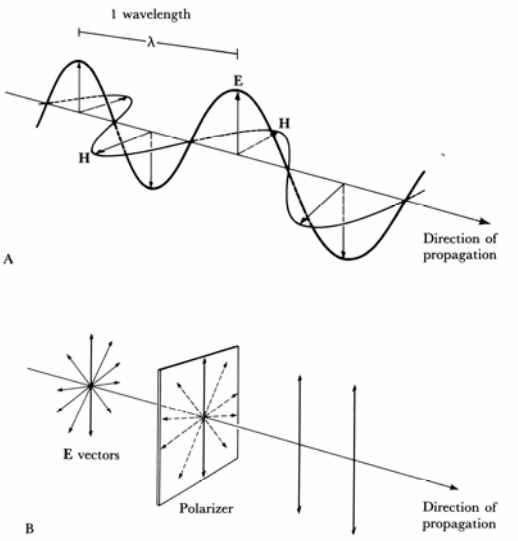
همان طور که گفته شد، بیشتر مولکول‌های بیولوژیک دارای خاصیت کایرالیتی هستند. تکنیکی که بتواند تفاوت‌های ظریف بین مولکول‌های غیرقابل انطباق و تصویر آیینه‌ای یکدیگر (انانتیومرها) را از هم تشخیص دهد باید نسبت به بنای فضایی و ساختار مولکول‌ها شدیدا حساس باشد. از این نظر تکنیک CD به واسطه دارا بودن حساسیت بالا در بیوشیمی و بیوفیزیک دارای کاربردهای بسیاری می‌باشد. به عنوان مثال، طیف CD یک زنجیر پلی‌پپتیدی بسته به اینکه پلی‌پپتید به صورت مارپیچ آلفا، صفحه چین‌دار بتا و یا پیچه نامنظم باشد، متفاوت خواهد بود و یا مولکول‌های DNA در بناهای فضایی A، B و یا Z دارای طیف CD کاملا متمایزی از یکدیگر می‌باشند. بسیاری از لیگاندهایی که به پروتئین‌ها و یا اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند کایرال نیستند و در نتیجه دارای طیف CD نمی‌باشند ولی وقتی پروتو هم[۴] به گلوبین، NADH به آنزیم‌های دهیدروژناز و یا اتیدیوم بروماید به DNA متصل می‌شوند، بندهای جذبی این لیگاندها طیف CD قوی از خود نشان می‌دهند. اتصال لیگاندها، میان‌کنش پروتئین-پروتئین و یا میان‌کنش پروتئین-DNA نیز می‌تواند طیف CD پروتئین و یا اسید نوکلئیک را تغییر دهد. از اینرو می‌توان با استفاده از تغییرات CD، ثابت‌های این تعادلات را تعیین نمود و شواهدی در مورد تغییرات بنای فضایی پروتئین یا DNA بدست آورد. بنابراین CD می‌تواند مهیاکننده اطلاعاتی در مورد ساختمان دوم پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و همچنین اتصال لیگاندها به این ماکرومولکول‌ها و تغیرات ساختمانی حاصل از این اتصالات باشد.

۷-۲. تئوری CD:

همان طور که در مبحث اسپکتروسکوپی ماوراء بنفش-مرئی دیدید، نور یک موج الکترومغناطیس است که از یک میدان نوسان‌کننده الکتریکی (E) و یک میدان نوسان‌کننده مغناطیسی (H) که بر

[۳] Chirality
[۴] Protho Heme

یکدیگر و بر جهت انتشارشان عمودند، تشکیل شده است. هر دوی این اجزاء نور در فضا با طول موج و فرکانس یکسانی ارتعاش می‌کنند (شکل۷-۲):

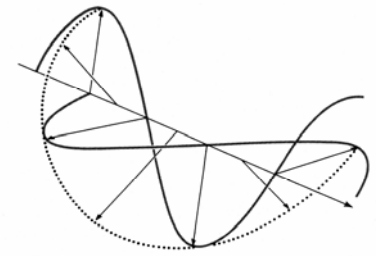


شکل (۷-۲): (A) انتشار یک موج الکترومغناطیس. مسیری را که نوک بردار E در فضا طی می‌کند با خط تیره و مسیر پیموده شده توسط نوک بردار H با خط نازک نشان داده شده است. بردارهای E، H و جهت انتشار آنان بر یکدیگر عمودند. صفحه بردار E، صفحه پلاریزاسیون نامیده می‌شود. (B) تولید نور پلاریزه صفحه‌ای. مجموعه‌ای از امواج به پلاریزور برخورد می‌کنند و تنها آنهایی که بردار Eشان بر محور پلاریزور عمود است می‌توانند از آن عبور کنند.

از آنجایی که یک منبع نورانی معمولا از مجموعه‌ای از نشرکننده‌هایی که به طور اتفاقی آرایش پیدا کرده‌اند تشکیل شده است، نور منتشر شده مجموعه‌ای از امواج با تمامی جهت‌یابی‌های فضایی بردار E است. نور پلاریزه صفحه‌ای یا خطی معمولا به وسیله گذراندن نور از درون یک پلاریزه‌کننده (یک صفحه پلاروید و یا یک منشور نیکول) به وجود می‌آید.

نور پلاریزه صفحه‌ای خارج شده از یک پلاریزه‌کننده تنها دارای یک صفحه پلاریزاسیون است. به عبارت دیگر، میدان الکتریکی آن تنها به یک صفحه منفرد محدود شده است (شکل ۷-۲-B). فرض کنید دو موج پلاریزه صفحه‌ای که به اندازه یک چهارم طول موج با یکدیگر اختلاف فاز داشته باشند

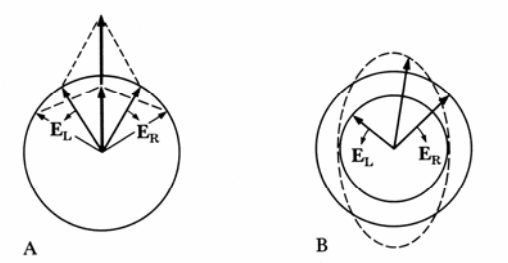
(یعنی اختلاف فاز آنها باعث شود وقتی یک منحنی سینوسی از محور انتشار می‌گذرد، منحنی سینوسی دیگر در بیشینه یا کمینه قرار داشته باشد) و بردارهای E آنها نیز بر یکدیگر عمود باشد، بر هم منطبق شوند. با انتشار این دو موج به سمت جلو، بردار E منتج از دو بردارE تشکیل‌دهنده آن خواهد چرخید به نحوی که نوک آن یک مسیر مارپیچی را تعقیب خواهد کرد (شکل۷-۳).



شکل (۷-۳): تولید نور پلاریزه دایره‌ای. بردارهای E دو موج الکترومغناطیس به اندازه یک چهارم طول موج با هم اختلاف فاز داشته و بر هم عمودند. برداری که حاصل جمع بردارهای E دو جزء موج الکترومغناطیس است به نحوی در فضا می‌چرخد که نوک آن یک مسیر مارپیچی (خط نقطه‌چین) را در فضا تعقیب می‌کند.

چنین نوری را نور پلاریزه دایره‌ای[۵] می‌نامند. اگر نسبت به مشاهده‌گری که در جهت انتشار نور به منبع نورانی نگاه می‌کند، بردار E منتج در جهت حرکت عقربه‌های ساعت بچرخد، نور پلاریزه دایره‌ای را راست‌گرد می‌نامند و اگر جهت چرخش بردار E منتج در جهت خلاف حرکت عقربه‌های ساعت باشد، نور پلاریزه دایره‌ای، چپ‌گرد نامیده می‌شود. اگر یک موج پلاریزه دایره‌ای راست گرد (R) و یک موج پلاریزه دایره‌ای چپ‌گرد (L) که دامنه یکسانی دارند بر یکدیگر منطبق شوند، حاصل نور پلاریزه صفحه‌ای[۶] خواهد بود زیرا در هر نقطه از فضا، بردار E هر یک از موج‌های پلاریزه دایره‌ای راست‌گرد و چپ‌گرد با یکدیگر جمع می‌شوند. به طور مشابه، نور پلاریزه صفحه‌ای را می‌توان به دو جزء نور پلاریزه دایره‌ای راست‌گرد و چپ‌گرد تجزیه نمود (شکل ۷-۴):

[۵] Circular Polarized Light
[۶] Plane Polarized Light



شکل (۷-۴): دیاگرام نشان می‌دهد که چگونه نور پلاریزه دایره‌ای چپ‌گرد و راست‌گرد با هم ترکیب می‌شوند. (A) اگر دو موج دامنه یکسانی داشته باشند، حاصل نور پلاریزه صفحه‌ای (خط ممتد) خواهد بود و (B) اگر دامنه‌های آنها متفاوت باشد، حاصل نور پلاریزه بیضوی (خط منقطع) خواهد بود. طول محورهای اصلی و فرعی بیضی به ترتیب a و b است.

اگر دامنه‌های دو موج پلاریزه دایره‌ای یکسان نباشد، نوک بردار E منتج یک مسیر بیضوی را تعقیب خواهد کرد و چنین نوری را نور پلاریزه بیضوی[۷] می‌نامند. با گذراندن یک تابش نور پلاریزه صفحه‌ای از درون یک دستگاه نوری به نام صفحه یک چهارم موج[۸] می‌توان نور پلاریزه دایره‌ای تولید نمود. اگر پس از عبور نور پلاریزه صفحه‌ای از درون نمونه، اجزاء چپ‌گرد و راست‌گرد نور جذب نشوند (و یا به یک میزان جذب شوند)، ترکیب این اجزاء پس از عبور از نمونه، تابش پلاریزه را در صفحه اولیه خود دوباره تولید خواهد کرد. ولی اگر یکی از اجزاء (چپ‌گرد یا راست‌گرد) بیش از جزء دیگر توسط نمونه جذب شود، تابش منتج از ترکیب دو جزء به صورت بیضوی پلاریزه می‌شود (شکل ۷-۴-B). در عمل، دستگاه CD (اسپکتروپلاریمتر) اجزاء چپ‌گرد و راست‌گرد نور را دوباره ترکیب نمی‌کند بلکه دو جزء را جداگانه اندازه‌گیری کرده و سپس دورنگی را در طول موج معین تابش عبور کرده به

[۷] Elliptical Polarized Light
[۸] Quarter Wave Plate

صورت تفاوت در جذب دو جزء ($\Delta A = A_L - A_R$) و یا به صورت الیپتیسیتی[۹] (θ) نشان می دهد. الیپتیسیتی به صورت آرک تانژانت نسبت محور فرعی به محور اصلی بیضی تعریف می‌شود:

$$\text{Ellipticity (degrees)} = \theta = \tan^{-1}(\frac{b}{a}) \qquad (۱-۷)$$

که در این رابطه، b محور فرعی و a محور اصلی بیضی می‌باشد. رابطه عددی ساده‌ای نیز بین ΔA و θ (در واحد درجه) به صورت زیر وجود دارد:

$$\theta = ۳۲/۹۸ \, \Delta A \qquad (۲-۷)$$

برای حذف اثرات طول مسیر عبور نور و غلظت ماده کایرال، الیپتیسیتی مولار به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$[\theta] = \frac{۱۰۰\,\theta}{l\,c} = ۳۲۹۸\Delta\varepsilon \qquad (۳-۷)$$

و

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

که در این رابطه، $\Delta\varepsilon$ اختلاف ضریب جذب مولی جزء چپ‌گرد و راست‌گرد ماده فعال نوری، l طول مسیر عبور نور و c غلظت مولار ماده کایرال است. واحد الیپتیسیتی مولار، $\text{degrees.cm}^{۲}\text{.dmol}^{-۱}$ می‌باشد.

۷-۳. کروموفورهای CD در پروتئین‌ها و اطلاعات ساختمانی:

پروتیئن‌ها دارای گروه‌های کروموفوری هستند که در نواحی ویژه‌ای از ناحیه مرئی و ماوراءبنفش دارای بند جذبی می باشند. مطالعه ناحیه ماوراء بنفش دور[۱۰] (۱۸۰-۲۴۰ nm) را می توان جهت ارزیابی کمی محتوای کلی ساختمان دوم پروتئین‌ها مورد استفاده قرار داد. در این ناحیه، کروموفور

[۹] Ellipticity
[۱۰] Far-UV Region

پیوند پپتیدی است که دارای یک انتقال ضعیف و پهن $n \rightarrow \pi^*$ در حدود ۲۱۰ nm و یک انتقال قوی $\pi \rightarrow \pi^*$ در حدود ۱۹۰ nm است. در ناحیه ماوراءبنفش نزدیک (۳۵۰-۲۵۰ nm)، زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه آروماتیک در محدوده ۲۹۰-۲۵۰ nm جذب دارند و تاخوردگی زنجیر پلی‌پپتیدی می‌تواند این زنجیرهای جانبی را در محیط‌های کایرال قرار دهد که در نتیجه طیف CD حاصله می‌تواند به عنوان اثر انگشت ویژه ساختمان طبیعی پروتئین مورد توجه قرار گیرد. بنابراین ناحیه ماوراء بنفش نزدیک حساس به محیط اطراف زنجیرهای جانبی آروماتیک می‌باشد. هر یک از اسیدهای آمینه آروماتیک نیز پیک جذبی خاص خود را دارد: تریپتوفان در حدود ۲۹۰ nm، تایروزین در محدوده ۲۸۲-۲۷۵ nm و فنیل‌آلانین در حدود ۲۷۰-۲۵۵ nm دارای پیک جذبی می‌باشند. سه فاکتور بر شدت بندهای CD زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه آروماتیک اثر می‌گذارد:

۱- صلبیت پروتئین: زنجیرهای جانبی با تحرک بالا دارای شدت جذب پایین‌تری می‌باشند.

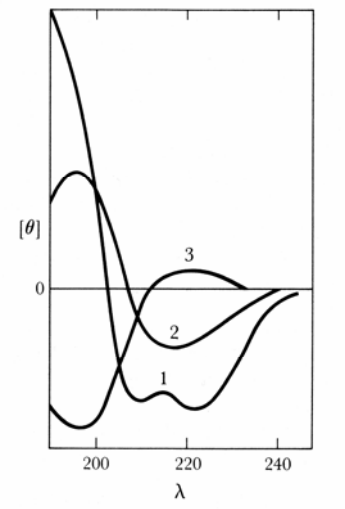
۲- میان‌کنش بین اسیدهای آمینه: میان‌کنش بین اسیدهای آمینه به ویژه وقتی مهم خواهد بود که فاصله بین آنها کمتر از ۱ nm باشد.

۳- تعداد اسیدهای آمینه آروماتیک: پروتئین‌های با تعداد زیاد اسیدهای آمینه آروماتیک، بندهای جذبی کوچکتری از مقدار مورد انتظار دارند که این به واسطه اثرات حذف‌کنندگی بندهای مثبت و منفی CD است.

گروه دی‌سولفیدی موجود در ساختمان پروتئین‌ها نیز دارای دو انتقال الکترونی $n \rightarrow \sigma^*$ در ناحیه ماوراء بنفش نزدیک است و طول موج این بندهای جذبی بستگی به زاویه دای هیدرال پیوند دی سولفیدی (χ_{ss}) دارد. وقتی χ_{ss} در حدود ۹۰ درجه باشد (در پروتئین‌ها معمولا مقدار زاویه دای‌هیدرال پیوند دی‌سولفیدی این مقدار است)، دو انتقال $n \rightarrow \sigma^*$ دژنره[۱۱] هستند و یک بند جذبی منفرد و پهن را در حدود ۲۶۰ nm بوجود می‌آورند. با باز و بسته شدن زاویه دای‌هیدرال از ۹۰ درجه، این دژنریسی[۱۲] شکسته‌شده و یک انتقال $n \rightarrow \sigma^*$ به سطح انرژی بالاتر و انتقال $n \rightarrow \sigma^*$ دیگر به سطح انرژی پایین‌تر جابجا می‌شود. اجزاء غیرپروتئینی یا کوفکتورهایی از قبیل فلاوین‌ها، گروه‌های هم، پیریدوکسال فسفات و غیره در ناحیه‌هایی از طیف دارای جذب می‌باشند که از جذب اسیدهای

[۱۱] Degenerate
[۱۲] Degeneracy

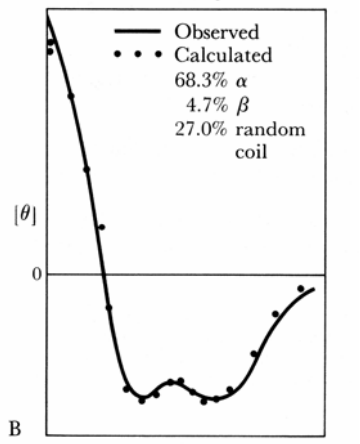
آمینه و پیوندهای پپتیدی مجزاست. سیگنال های CD در این نواحی مهیا کننده اطلاعات مفصل ساختمانی در مورد محیط اطراف این کروموفورهاست. نشان داده شده است که شکل های مختلف ساختمان منظم دوم موجود در پروتئین ها دارای طیف CD ماوراء بنفش دور مشخصی هستند (شکل ۷-۵):



شکل (۷-۵): طیف CD ناحیه ماوراءبنفش دور پلی- ال-لایزین. (۱) مارپیچ آلفا، (۲) ساختمان بتا و (۳) پیچه نامنظم.

همانطور که دراین شکل مشاهده می‌شود، قوی‌ترین طیف مربوط به مارپیچ آلفاست که دارای دو بند منفی با بزرگی قابل مقایسه در ۲۲۲ nm و ۲۰۸ nm و یک بند قوی مثبت در ۱۹۰ nm است. پپتیدهای دارای بنای فضایی بتا طیف CD ساده تری دارند و دارای دو بند منفی در ۲۱۷ nm و ۱۸۰ nm و یک بند مثبت در ۱۹۵ nm می‌باشند. پلی‌پپتیدهای غیرمنظم نیز دارای یک بند جذبی منفی قوی در حدود ۲۰۰ nm می‌باشند و ممکن است دارای یک بند جذبی ضعیف مثبت و یا منفی در طول موج‌های بالاتر نیز باشند.

به عنوان نمونه طیف CD مایوگلوبین در شکل (۷-۶) نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان دهنده وفور ساختمان ماپیچ آلفا در این پروتئین می‌باشد:



شکل (۷-۶): منحنی CD مشاهده‌شده (خط ممتد) برای مایوگلوبین و منحنی CD محاسبه‌شده (نقاط) با استفاده از داده‌های شکل (۷-۵) برای پلی- ال-لایزین.

قابل توجه است که نتایج حاصل از تعیین محتوای ساختمان دوم بسیاری از پروتئین ها توسط CD در تطابق بسیار خوبی با نتایج حاصل از آنالیز پراش تابش ایکس است. در جدول (۷-۱) محتوای مارپیچ آلفای پروتئین های مایوگلوبین، لایزوزیم، رایبونوکلئاز، پاپایین، لاکتیک دهیدروژناز، آلفا-کایموتریپسین و کایموتریپسینوژن که توسط CD تعیین شده است، با نتایج حاصل از آنالیز پراش تابش ایکس همین پروتئین‌ها مورد مقایسه قرار گرفته است.

جدول (۷-۱): تعیین محتوای مارپیچ آلفای چند پروتئین توسط CD و مقاسیه آن با آنالیز پراش تابش ایکس.

پروتئین	درصد مارپیچ آلفا (CD)	درصد مارپیچ آلفا (پراش ایکس)
مایوگلوبین	۷۷	۷۷
لایزوزیم	۲۹	۲۹
رایبونوکلئاز	۱۸	۱۹

پاپایین	۲۱	۲۱
لاکتیک دهیدروژناز	۳۱	۲۹
آلفا-کایموتریپسین	۸	۹
کایموتریپسینوژن	۹	۶