روش های بیوشیمی و بیوفیزیک

مؤلفان: دکتر بهزاد لامع راد و دکتر رضا حاجی حسینی

به نام خدا

پیشگفتار

در دهه گذشته بعضی از روش های آزمایشگاهی موجب تغییرات زیادی جهت کشف پدیده های شگرف طبیعت شد و کشف روش ها و دستگاه های جدید موجب جهش شگرفی در شناسایی بیشتر اعجاز طبیعت شده اند. در این کتاب سعی شده است که اصول فیزیکی دستگاه ها و به روز رسانی روش ها البته به صورت فشرده در اختیار دانشجویان مشتاق قرار داده شود.

روش هایی که در این کتاب آورده شده اند تجربیات چندین ساله محققان بیوشیمی در آزمایشگاه های مختلف جهان است که امیدوارم فضایی برای شما خواننده مشتاق فراهم کنند تا انجام کارهای تحقیقاتی مثل غولی نباشند. تمام روش های ذکر شده مثالی از انجام انجام بعضی کارهای استادان و دانشجویان آنها هستند و گاهی آنقدر ساده و کم هزینه صورت گرفته اند تا به شما نشان دهند که با یک روش آسان می توان نتایج پیچیده ای به دست آورد. در این کتاب سعی شده است از محاسبات ریاضی پیچیده اجتناب شود و شما را بیشتر با نحوه کار عملی آشنا کند. امروزه همین روش های آزمایشگاه را با دستگاه های اتوماتیک انجام می دهند و چون در کارهای تحقیقاتی زمان اهمیت زیادی دارد بنابراین دستگاه ها همان اعمال را با سرعت خیلی بیشتر پیش می برند ولی برای فهم و آشنایی روش مورد استفاده در این کتاب ترجیح دادم که اصل مطلب را بیان کنم.

دانشجویانی که می خواهند سفر علمی خود را آغاز کنند و وارد آزمایشگاه های تحقیقاتی شوند، نیاز به اطلاعات اولیه و نوع تفکر خاصی جهت انجام کار دارند. هنگام تحصیل در دوران کارشناسی برای برخی از دروس یک یا دو واحد آزمایشگاهی در نظر گفته شده است ولی کارهای تحقیقاتی و حل معما یعنی کشف جدید، حال و هوای دیگری دارد. در این درس می خواهیم به شما ایده هایی بدهیم که چگونه به کارهای تحقیقاتی و استفاده از روش ها و دستگاه های آزمایشگاهی نگاه کنید و گاهی با استفاده از وسایل بسیار ساده و قابل دسترس می توان کار تحقیقاتی خوبی انجام داد. من صادقانه امیدوارم که دانشجویان مشتاق و علاقمند بتوانند مطالب جالبی در بعضی از این روش ها پیدا کنند و همان موضوع موجب تحریک در نوع نگرش گردد. در نتیجه شما برای کشف معجزات طبیعت ترغیب شوید و در اینجاست که من (نویسنده کتاب) به هدف خود رسیده ام.

با آرزوی موفقیت

بهزاد لامع راد

۱۳۹۳

فهرست مطالب

موضوع	صفحه
فصل ۱	۸
مقدمه	۹
زنجیره های پلی پپتیدی و پلی نوکلئوتیدی	۱۱
ساختار پلیمرها	۱۲
مفهوم ساختارهای طبیعی و دناتوره شده	۲۰
مولکول های پلی نوکلئوتیدی خطی و حلقوی	۲۲
پیوندهای عرضی یا تقاطعی	۲۵
تمرین	۲۶
فصل ۲	۲۹
مقدمه	۳۰
عواملی که در ساختار و پایداری مولکول های زیستی مؤثرند	۳۲
اثر pH	۳۳
اثر حرارت	۳۸
اثر قطبیت حلال	۴۰
سیستم های تامپونی مورد استفاده در بیوشیمی	۴۲
تمرین	۴۶
فصل ۳ فیلتر کردن با استفاده از غشاهای مختلف و دیالیز	۴۸
مقدمه	۴۹
صافی های نیتروسلولزی و غشایی	۵۰
صافی های فایبرگلاس	۵۲
صاف کردن با استفاده از صافی های نیترو سلولز و فایبرگلاس	۵۲
جمع آوری رسوب برای شمارش مواد رادیو اکتیو	۵۳
انتقال به محیط کشت برای رشد باکتری	۵۳
استفاده از صافی های نیترو سلولز در روش اتصالی	۵۴
استفاده های متفرقه از صافی های غشایی	۶۰

دیالیز و صاف کردن مولکولی	۶۱
دیالیز با استفاده از فیبر شیشه ای	۶۳
تمرین	۶۹
فصل ۴	۷۲
کروماتوگرافی تفکیکی	۷۳
کروماتوگرافی جذبی	۸۲
انواع کروماتوگرافی جذبی	۸۴
تهیه ستون ها	۸۴
کروماتوگرافی کاغذی	۸۸
روش های عملی برای کروماتوگرافی کاغذی	۸۹
روش انگشت نگاری: روش به خصوصی از کروماتوگرافی کاغذی برای مطالعه پروتئین ها	۹۴
شناسایی تغییرات بازی انجاد شده به وسیله عوامل جهش زای ویژه	۹۶
کروماتوگرافی لایه نازک	۹۶
کروماتوگرافی گاز مایع	۱۰۱
شناسایی مواد خروجی	۱۰۲
تعیین مقدار مواد و تشخیص آنها با استفاده از کروماتوگرافی گاز مایع	۱۰۴
مزیت های کروماتوگرافی گاز مایع	۱۰۸
کاربردهای کروماتوگرافی گاز مایع	۱۰۸
کروماتوگرافی با استفاده از ژل	۱۰۹
مواد ژل کروماتوگرافی	۱۱۰
مزیت های ژل کروماتوگرافی	۱۱۳
تخمین جرم مولی	۱۱۳
کاربردهای ژل کروماتوگرافی	۱۱۵
کروماتوگرافی ژل لایه نازک	۱۲۰
کروماتوگرافی تعویض یونی	۱۲۲
خواص تعویض کننده های یونی	۱۲۲
انتخاب تعویض کننده های یونی	۱۲۵
انتخاب تخلخل و اندازه خانه ها	۱۲۶
انتخاب pH ، تامپون و شرایط یونی	۱۲۶

روش های عملی برای استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی ۱۲۷
کاربردهای کروماتوگرافی تعویض یونی ۱۲۹
کروماتوگرافی DNA- سلولز ۱۳۰
ستون های MAK ۱۳۲
ستون های Histone- Kieselgur ۱۳۲
کروماتوگرافی هیدروکسی اپتیت ۱۳۲
کروماتوگرافی تمایلی ۱۳۴
خالص سازی پروتئین ها ۱۳۵
خالص سازی آنتی بادی ها ۱۳۵
خالص سازی غشاها و ذرات حاوی مواد شناخته شده ۱۳۶
خالص سازی گلیکو پروتئین ها ۱۳۶
جداسازی سلول های ویژه جانوری ۱۳۶
تمرین ۱۳۷
فصل ۵ الکتروفورز ۱۴۱
مقدمه ۱۴۲
انواع الکتروفورز ۱۴۴
الکتروفورز کاغذی ۱۴۴
الکتروفورز نوار استات ۱۴۷
ژل الکتروفورز SDS ۱۴۹
ژل پلی آکریلامید و ژل پلی آلکریلامید- آگاروز الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک ۱۵۲
دیسک الکتروفورز در ژل های پلی آکریلامید ۱۵۶
الکتروفورز پیوسته ۱۶۱
ایزو الکتریک فوکوسینگ ۱۶۲
ایمونو الکتروفورز ۱۶۸
تمرین ۱۷۱
فصل ۶ سیستم ایمونولوژیکی ۱۷۴
مقدمه ۱۷۵
آماده سازی آنتی بادی ۱۷۶
واکنش آنتی بادی- آنتی ژن ۱۷۷

واکنش های ایمنی مفید در سنجش های زیستی ۱۷۸
واکنش های رسوبی با استفاده از انتشار در ژل ۱۷۸
سنجش کمپلمان ۱۸۲
سنجش های مهاری با استفاده از تثبیت کمپلمان و آگلوتیناسیون غیر فعال ۱۸۵
سنجش رادیو ایمونولوژی ۱۸۷
سنجش ایمونو رادیومتری ۱۹۲
تمرین ۲۰۰
فصل ۷ اسپکتروسکپی جذبی ۲۰۲
مقدمه ۲۰۳
تعیین مقدار پروتئین ۲۰۹
کاربردهای اسپکتروسکپی جذبی با استفاده از نور مریی و UV ۲۱۹
تمرین ۲۳۴
پیوست ۲۳۵

فصل ۳

فیلتر کردن با استفاده از غشاهای مختلف و دیالیز

پس از مطالعه کامل این فصل شما باید با مطالب زیر آشنا شوید:

۱. **صافی های نیتروسلولزی و غشایی**

۲. **صافی های فایبرگلاس**

۳. **استفاده های متفرقه از صافی های غشایی**

۴. **دیالیز و صاف کردن مولکولی**

مقدمه

برای جدا کردن مواد از یکدیگر در هر دو رشته شیمی و بیوشیمی از روش های بخصوصی استفاده می شود. قبل از پدید آمدن روش هایی مثل سانتریفیوژ کردن، الکتروفورز، کروماتوگرافی و غیره، این عمل در صورت امکان توسط صاف کردن انجام می شد. صافی ها (فیلترها) را از پارچه های ظریف و نازک تهیه می کردند. در واقع هنوز هم از پارچه برای مراحل اولیه ی خالص سازی عصاره های بافتی استفاده می شود. بعدها کاغذ جانشین پارچه شد و برای کنترل اندازه ی ذرات روی صافی (با توسعه صنعت کاغذسازی) کاغذهایی با منافذ مختلف ساخته شد. برای این که ذرات روی صافی، اندازه ای کوچکتر از اندازه ی موادی داشته باشند که توسط ظریف ترین کاغذ صاف شوند، امروزه از صافی هایی از جنس سلولز، نیتروسلولز یا فایبرگلاس استفاده می شود.

کیسه ی دیالیز که غشای ظریفی است، مولکول های کوچک و یون ها را از خود عبور می دهد ولی درشت مولکول ها و توده های درشت مولکولی را نمی تواند عبور دهد. کیسه های دیالیز مختلف به نام صافی مولکولی، درشت مولکول های کوچک را از درشت مولکول های بزرگ جدا می کند.

در استفاده از غشاهای نیتروسلولز، مشخص شده که این غشاها، علاوه بر خاصیت صاف کردن، توانایی جذب هم دارند که باعث می شود (البته ربطی به قابلیت صاف کردن آنها ندارد) این مواد با درشت مولکول های ویژه ای پیوند بر قرار کنند (موادی مثل پلی نوکلئوتیدهای تک رشته ای و بعضی از پروتئین ها) البته در این جا درشت مولکول ها از منافذ صافی، کوچک تر هستند. از این خاصیت در روش های تحلیلی پیشرفته استفاده می شود.

صافی های نیتروسلولزی و غشایی

یک صافی نیتروسلولزی، شبکه ای از رشته های نیتروسلولزی است که با روش های صنعتی می توان اندازه ی ذرات عبور کننده از این غشاها را تعیین کرد. منافذ صافی، الزاماً دایره ای شکل نیستند بلکه اشکال بی قاعده دارند و تقریباً ۸۰ در صد سطح آنها را در بر می گیرند (شکل ۳– ۱). صافی ها آن قدر نازک هستند که ذرات باقیمانده، قادر به نفوذ به درون آنها نیستند و در سطح آنها باقی می مانند. بنابراین می توان این ذرات را به راحتی از سطح آنها شستشو داد. سازنده های شناخته شده ی این صافی ها Millipore و Schleicher و Gelman هستند. اندازه ی ذرات عبور کننده از صافی حدود ۰/۱ تا ۸ میکرون می باشند. معمولی ترین صافی، منافذی حدود ۰/۴۵ میکرون دارد.

به علت اندازه ی کوچک منافذ و همچنین به علت کشش سطحی، مایعات در اثر نیروی جاذبه به راحتی از صافی ها عبور

شکل ۳ –۱ صافی های نیتروسلولز

نمی کنند، لذا از نیروی فشار یا مکش برای عبور دادن مایعات از خلال صافی استفاده می شود. در شکل ۳– ۲ یک نوع مکش که با خلاء ناشی از آسپیراتور آب کار می کند نشان داده شده است، سرعت جریان از صافی ۰/۴۵ میکرونی برابر ۶/۵ $ml/min/cm^2$ است. از این نوع صافی ها، برای صاف کردن مقادیر کم مواد استفاده می شوند زیرا منافذ آنها به راحتی و سریع توسط ماده ی صاف شونده مسدود می گردند. میزان ماده ی باقیمانده قبل از این که کاهش چشمگیری در مقادیر جریان به

وجود آید، حدود $\mu g/cm^2$ ۲۵۰ است. برای جلوگیری از مشکلات مسدود شدن منافد، معمولاً از فایبرگلاس استفاده می شود که به آن پیش صافی گویند. به این ترتیب، از مسدود شدن صافی توسط ذرات بزرگی که می توانند به راحتی منافذ را مسدود کنند جلوگیری می شود.این صافی ها برای جمع آوری رسوب های بسیار ریز مناسبند.

دو مطلب در مورد کار برد صافی های نیتروسلولزی وجود دارند: اول این که این مواد آبگریز هستند و برای این که رطوبت پذیر باشند خیلی از این صافی ها را با یک ماده ی دترژانت (یا پاکساز) آغشته می کنند که مشخصات آنها توسط کارخانه سازنده ذکر می شود. دومین مسئله این است که وقتی صافی ها خشک باشند بسیار ترد و شکننده می شوند. خیلی از آنها حاوی مقدار کمی گلیسرول هستند تا قابلیت انعطاف آنها افزایش یابد. اگر این صافی ها قبل از استفاده شسته نشوند، این مواد ممکن است باعث آلودگی در مواد صاف شده شوند (در حقیقت ماده ناخواسته ای خواهند بود که در مواد صاف شده دیده می شوند).

صافی های نیتروسلولزی به صورت ورقه ها و دایره هایی به رنگ های سفید، سیاه و سبز می باشند. رنگ های به کار رفته، برای تشخیص میکروسکوپی بعصی میکروارگانیسم ها است. از آنجا که نیتروسلولز، در مواد مختلفی قابل حل است و توسط مواد شیمیایی خاصی مورد حمله قرار می گیرند، کارخانه های سازنده، غشاهایی از جنس استات سلولز، نایلون و کلریدپلی وینیل برای استفاده از این گونه حلال ها ساخته اند.

شکل ۳– ۲ وسیله ای که با مکش برای صاف کردن بعضی از مواد استفاده می شود.

صافی های فایبرگلاس

صافی های فایبرگلاس، شبکه ای از رشته های ظریف شیشه ای است. این شبکه را نمی توان با همان ظرافتی که شبکه های نیتروسلولزی را می سازند، تهیه کرد. بنابراین برای نگه داشتن ذراتی با اندازه کوچک، صافی های فایبرگلاس مناسب نیستند. این صافی ها ضخامت بیشتری دارند و منافذ آن حدود mm ۰/۲۵ است. از ویژگی های صافی فایبرگلاس سرعت جریان بالای آنهاست ($ml/mn/cm^2$ ۱۲۰) در ضمن ظرفیت زیادی در مقابل مسدود شدن منافذ، مقاومت در برابر تقریباً تمام حلال ها، قابلیت گرما دهی هنگام خشک کردن سریع، دارند. این صافی ها ارزان تر از صافی های غشایی می باشند.

یک نکته منفی در مورد این صافی ها آن است که گاهی اوقات تکه های نازکی از فایبرگلاس در ماده ی خارج شده از صافی یافت می شود و دیگر این که فقط تعداد کمی از منافذ را می توان در آنها ایجاد کرد. چون ضخامت صافی های فایبرگلاس زیاد است لذا ذرات ریز در داخل آنها گیر کرده و خارج کردن آنها مشکل می شود.

صاف کردن با استفاده از صافی های نیتروسلولز و فایبرگلاس

هنگام انجام کارهای عملی در زیست شناسی و شیمی نیاز به خارج کردن بعضی مواد از مایع خواهیم داشت. اگر ذرات خیلی ریز باشند (در صورتی که مواد زیاد داخل مایع نباشد) می توان آنها را با استفاده از هر دو صافی نیتروسلولز و فایبرگلاس جدا کرد به شرطی که آنقدر ریز نباشند تا نتوان آنها را روی صافی نگه داشت. اگر با مواد زبر و خشن کار می کنید، پیش صاف کردن آنها با صافی فایبرگلاس لازم است تا از مسدود شدن جلوگیری به عمل آید (اغلب پیش صافی ها از جنس فایبرگلاس هستند چون ظرفیت نگاهداری مواد زیادی دارند).

بعضی ویروس ها، پروتئین ها و باکتریوفاژها به نیتروسلولز جذب می شوند، بنابراین باید صافی را قبلاً توسط روش هایی تیمار کرد تا موادی که باید از صافی عبور کنند به سطح صافی متصل نشوند. با عبور دادن پروتئین آلبومین سرم گاوی[1] (BSA) ۰/۱ در صد از صافی و شستشوی زیاد آن با تامپون هایی که قدرت یونی کمی دارند باعث می شود که مکان های جذب سطحی

[1] Bovine serum albumin

صافی اشباع شوند و امکان پیوند یافتن صافی با دیگر پروتئین ها کاهش یابد. پلی نوکلئوتیدهای تک رشته ای با هر دو صافی و در محیطی با قدرت یونی معتدل پیوند می دهند و نمی توان تنها با شستشو توسط BSA از این امر جلوگیری کرد. به هر حال، در محیطی با قدرت یونی کم مشکلی به وجود نمی آید.

اگر محلول باید برای مطالعات خاصی پالایش شود مثل اندازه ی جذب سطحی، فلورسانس، فعالیت نوری یا اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته ای، از هر دو صافی می توان استفاده کرد.

اگر تفرق نوری یا ویسکومتری یک محلول مورد مطالعه باشد (باید از محلول بدون غبار استفاده شود)،

در این صورت، صافی های فایبرگلاس نامناسب اند چون گاهی اوقات ذرات فایبرگلاس به درون ماده ی خروجی وارد می شوند.

جمع آوری رسوب برای شمارش مواد رادیواکتیو

برای محاسبه ی رادیواکتیویته درشت مولکول ها لازم است که درشت مولکول های رادیواکتیو را از مولکول های کوچک رادیواکتیو جدا کرد. سپس برای اجتناب از اضافه کردن آب و رقیق کردن سنتیلاتور (مایعی که نمونه را در آن می ریزند و مواد رادیواکتیو شمارش می شود) باید نمونه را تغلیظ نموده و حجم کوچکی تهیه کرد. این عمل را می توان به وسیله رسوب دهی با استفاده از اسید، مثلاً اسید پرکلریک یا اسید تری کلرو استیک انجام داد (اسید هیدروکلریک را می توان برای پلی نوکلئوتیدها استفاده کرد ولی برای پروتئین ها قابل استفاده نیست). در روش اسیدی کردن، می توان رسوبات را از روی صافی فایبرگلاس یا صافی نیتروسلولزی، جمع آوری کرد و شستشو داد. برای دستگاه شمارنده مواد رادیو اکتیو مایع، باید از صافی فایبرگلاس استفاده شود چون می توان آن را در حرارت های بالا خشک کرد بدون آن که عمل رنگبری در آنها ایجاد شود. دستگاه شمارنده گایگر برای هر دو نوع صافی مناسب است.

انتقال به محیط کشت برای رشد باکتری

در بسیاری از آزمایش های مربوط به رشد باکتری ها، لازم است که به سرعت محیط کشت باکتری را عوض کنیم برای مثال اگر قرار باشد یک ترکیب رادیواکتیو یا یک ماده ی غذایی ضروری را از محیط کشت باکتری حذف کنیم، بهترین کار استفاده از صافی

غشایی است. در اینجا دو مسئله را باید مورد بررسی قرار داد: (۱) صافی های نیتروسلولزی حاوی گلیسرول هستند، این گلیسرول باید قبل از استفاده از فیلتر، شسته شود. وقتی که سلول ها را از صافی عبور می دهیم ممکن است دو باره گلیسرول به محیط کشت دوم باکتری ها اضافه شود، (۲) بسیاری از باکتری ها جذب نیتروسلولز می شوند (حدود ۲×۱۰^{۶} cell/cm^2). در تراکم کم سلول ها، باید قبل از جمع آوری آنها، محلول ۰/۱ در صد BSA را از آن عبور داد. در مرحله بعد، سلول ها را از روی صافی باید جدا کرد. این عمل با ریختن محیط کشت روی صافی یا به وسیله فرو بردن صافی در محیط کشت و تکان دادن آن انجام می شود. گر چه از این روش ها برای باکتری ها استفاده می شود (منظور استفاده از صافی های نیتروسلولز است) ولی برای سلول های جانوری بیشتر از صافی های فایبرگلاس استفاده می کنند.

استفاده از صافی های نیتروسلولز در روش اتصالی

صافی های نیتروسلولزی تحت شرایط خاصی با پروتئین ها و DNA تک رشته ای پیوند می دهند. از این خاصیت می توان در سنجش های آنزیمی و شیمی فیزیکی و به عنوان راهی جهت خالص سازی مواد گوناگون استفاده کرد. جدول ۳- ۱ خصوصیات پیوندی دو صافی نیتروسلولز قابل خریداری از دو شرکت مختلف را نشان می دهد. باید توجه داشت که خاصیت اتصال یا پیوند دادن پروتئین ها، به قدرت یونی آنها ارتباطی ندارد اما DNA تک رشته ای در محلول دارای قدرت یونی بالا تمایل به چسبیدن به صافی را پیدا می کند. علت پیوند شدن ضعیف DNA تک رشته ای به صافی میلی پورمعلوم نیست. اگر چه این امکان وجود دارد که این صافی ها از نیتروسلولز خالص نباشند. مولکول RNA با این صافی ها نمی تواند پیوند ایجاد کند. استفاده از این خصوصیات پیوندی یا اتصالی را در مثال های زیر مشاهده خواهید کرد.

مثال ۱ خالص سازی DNA حلقوی کووالانت

بعضی سویه های باکتریایی و برخی سلول های جانوری، DNA حلقوی دو رشته ای دارند به طوری که در زنجیره های پلی نوکلئوتیدی آنها هیچ انقطاعی وجود ندارد. این نوع DNA، بخش کوچکی از کل DNA موجود در طبیعت است.

اگر DNA را در یک محلول قلیایی قرار دهیم، پیوندهای هیدروژنی شکسته می شوند و DNA تک رشته ای به وجود می آید. بنابراین هنگامی که DNA به صورت کووالانی تک حلقه ی بسته را داشته باشند، رشته هایDNA از لحاظ فیزیکی با هم در گیر خواهند شد. وقتی DNA را دو باره در محلولی دارای **pH** خنثی قرار دهیم و دما را کمی بالا ببریم، DNA های حلقوی که به صورت کووالانی بهم متصل اند تشکیل می شوند. سرعت انجام این عمل کم است و این سرعت به غلظت DNA بستگی دارد.

یک DNA حلقوی که یک شکاف در یکی از رشته های خود دارد در صورتی که پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته ی مکمل از هم باز شوند این مولکول تبدیل به دو نوع DNA یعنی DNA حلقوی و DNA خطی می شود. تشکیل مجدد یک DNA دو رشته ای حلقوی به همان عواملی که برای ایجاد DNA دو رشته ای خطی لازم است، نیاز دارد.

جدول ۳- ۱ اتصال ترکیبات مختلف به صافی های نیتروسلولز

▒╣ī	Schleicher Schuell	Millipore	ŋ ĵļ Ō╣ ►ĝ
╣ı ğ╟╚ř	+	+	¦ - ž/ ž¦
ŋ ╣ı╣►Ģ ╢ DNA	+	Ë ðûj	ž /¦ ý
DNA تك رشته اي	-	-	ž /ž¦
ŋ ╣ı╣►ļ▒ DNA	-	-	ž /žý <
ŋ ╣ı╣►ļ▒ DNA	+	+	ž /žžý - ž /žž¦
ŋ ╣ı╣►Ģ ╢ RNA	-	-	¦ - ž /ž¦
ŋ ╣ı╣►ļ▒DNA ļą ğ╟╚řĕğą Ĭ ╢ī	+	+	۱ - ۰/۰۱

اگر یک تیمار قلیایی روی DNA انجام شده و سپس از صافی Schleicher و Schuell تحت قدرت یونی بالا عبور داده شود (جدول ۱)، تنها DNA های حلقوی دو رشته ای از صافی عبور می کنند زیرا ترکیبات دیگر که DNA های تک رشته ای

هستند با صافی پیوند ایجاد می نمایند. به این ترتیب DNA، خالص می شود (شکل ۳– ۳). برای مقیاس های بزرگ، از پودر نیتروسلولز استفاده می شود.

سؤال: **gr ۴/۸ سولفات آمونیم جامد را در ۳۵ میلی لیتر آب حل کردیم. قدرت یونی محلول را تعیین کنید؟**

(سولفات آمونیم: p = ۰/۵۶۵ ، MW = ۱۳۲/۱۴)

حل: بیومولکول ها را باید در تامپون خاصی حل کرد. نحوه تهیه تامپون در فصل قبلی صحبت شد. معمولاً در مقالات قدرت یونی تامپون مربوط به بیومولکول خالص شده نیز ذکر می گردد، بنابراین با این سؤال می خواهیم تا حدی شما را با تهیه تامپونی با قدرت یونی خاص آشنا کنیم. برای شروع کار فرمول تعیین مول سولفات آمونیم را می نویسیم:

$$\text{mole} = \frac{\text{wt}}{\text{MW}}$$

$$\text{mole} = \frac{8.4}{58.5} = 6.35 \times 10^{-2}$$

	ml
1 gr	0.565
8.4	x = 4.764 ml

$$4.746 + 35 = 39.746 \text{ ml} = 0.039746 \text{ Lit} = 39.746 \times 10^{-3} \text{ Lit}$$

$$M = \frac{\text{mole}}{\text{lit}}$$

$$M = \frac{6.35 \times 10^{-2}}{39.746 \times 10^{-3}}$$

$$M = 1.6$$

$$I = \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2$$

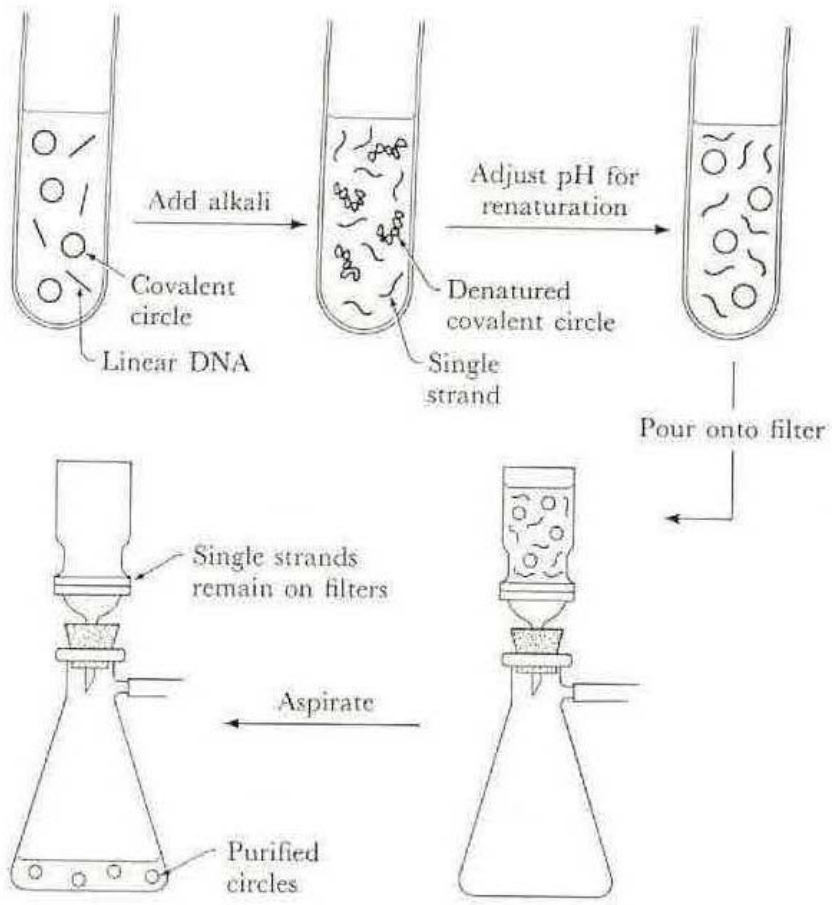
$2\ (NH_4^+) = 2\ (\ 1^2 \times 1.6\ ) = 3.2$

$SO_4^{2-} = (\ 2^2 \times 1.6\ ) = 6.4$

$I = \frac{1}{2}\ [\ (3.2) + (6.4)\ ] = 4.8$

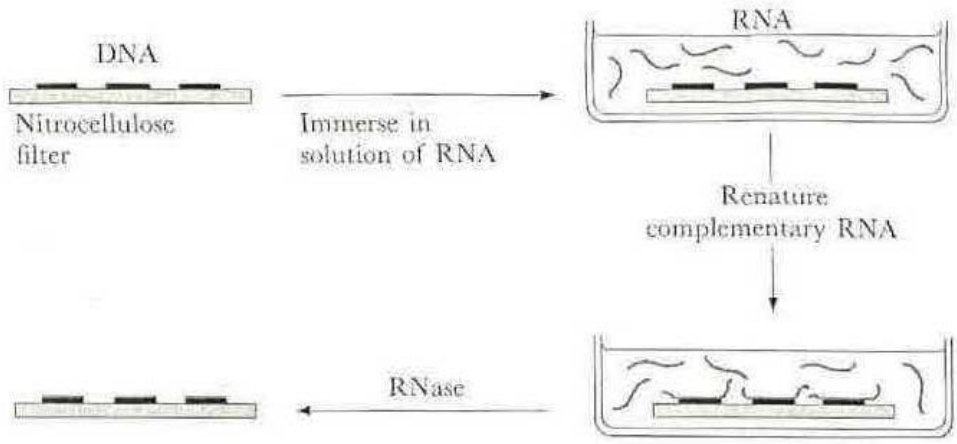
مثال ۲ تهیه **mRNA**

با عبور دادن محلولی حاوی DNA تک رشته ای از صافی و سپس خشک کردن صافی در خلاء می توان صافی تهیه کرد که DNA های تک رشته ای به آن پیوند یافته اند. این DNA به صافی متصل باقی می مانند، حتی اگر صافی را در آب فرو بریم. اگر RNA رادیواکتیو و این صافی را در لوله آزمایشی ریخته و شرایط رناتوره را برای آن فراهم کنیم، پیوندهای هیدروژنی بین هیبرید مکمل DNA- RNA ایجاد می شوند. اگر صافی را تحت فشار مکش قرار داده و شستشو دهیم، بسیاری از RNA های پیوند نشده از صافی پاک می شوند (شکل ۳– ۴). سپس با تیمار این صافی با آنزیم ریبونوکلئاز لوزوالمعده (این آنزیم قادر است RNA های تک رشته ای غیر پیوندی را هضم کند ولی قادر به هضم قسمتی از RNA که ایجاد پیوند هیدروژنی کرده، نیست)، بخش هایی از RNA که جفت نشده اند، هضم می شوند. بعاد از این مرحله صافی را شستشو داده و بخش هایی ازRNA که در تشکیل هیبرید با DNA شرکت کرده اند روی صافی باقی می مانند. این بخش ها به دلیل رادیواکتیو بودن RNA، قابل جستجو می باشند.



شکل ۳- ۳ خالص کردن DNA حلقوی توسط صافی های نیتروسلولز.

اگر صافی شسته شده را در دمای بالایی (منظور دمایی است که هیبرید DAN- RNA جدا شوند) حرارت دهیم، RNA مورد نظر، آزاد می شود این بهترین راه برای خالص کردن mRNA ها است.



شکل ۳– ۴ روش هیبرید کردن RNA به صافی نیتروسلولزی که دارای DNA تک رشته ای است.

مثال ۳ تهیه DNA تک رشته ای مکمل

در مثال ۲ توضیح دادیم که چگونه می توان صافی هایی تهیه کرد که به این صافی ها DNA تک رشته ای غیر رادیواکتیو متصل باشند. این گونه صافی ها را می توان برای تهیه DNA تک رشته ای مکمل به کار برد. بنابراین اگر به این صافی ها، DNA تک رشته ای رادیواکتیو افزوده شود، بدون توجه به این که DNA از قبل متصل شده ای به صافی وجود داشته باشد یا نه، DNA تک رشته ای رادیواکتیو هم به صافی متصل خواهد شد (جدول ۳– ۱). بنابراین اگر صافی را که دارای DNA غیر رادیواکتیو است را با سرم آلبومین گاوی و پلی وینیل پیرولیدون، شستشو دهیم، در این صورت جایگاه های اتصال DNA تک رشته ای باقیمانده، اشباع می شوند و دیگر قادر به اتصال با DNA رادیواکتیو تک رشته ای نخواهند بود. با فرو بردن چنین صافی تیمار شده ای در محلول DNA رادیواکتیو و ایجاد شرایط هیبریداسیون مانند آنچه که در مثال ۲ گفته شد، DNA رادیواکتیو مکمل به DNA متصل به صافی، پیوند خواهد یافت. DNA متصل نشده را می توان با شستشو دادن از محلول خارج نمود. و DNA رادیواکتیو متصل شده را به دست آورد. از این روش برای تعیین قطعات ویژه ای از DNA استفاده می کنند. به عنوان مثال، در اثر اینکوباسیون باکتری E.coli آلوده شده به فاژ λ در محیطی حاوی تیمیدین رادیواکتیو (^{3}H- thymidine)، هر دو نوع DNA (E. coli یا λ)، سنتز می شوند. اگر DNA رادیواکتیو را تک رشته ای کنیم (به وسیله حرارت یا ماده ی قلیا) و آن را روی

صافی هایی که یکی از دو نوع DNA (E. coli یا λ) را داشته باشند، قرار دهیم، آنگاه مقادیر رادیواکتیویته ی متصل به هر صافی، نشانگر فراکسیونی از هر کدام از آنها در مخلوط می باشد.

مثال۴ تهیه پروتئین های متصل به DNA دو رشته ای

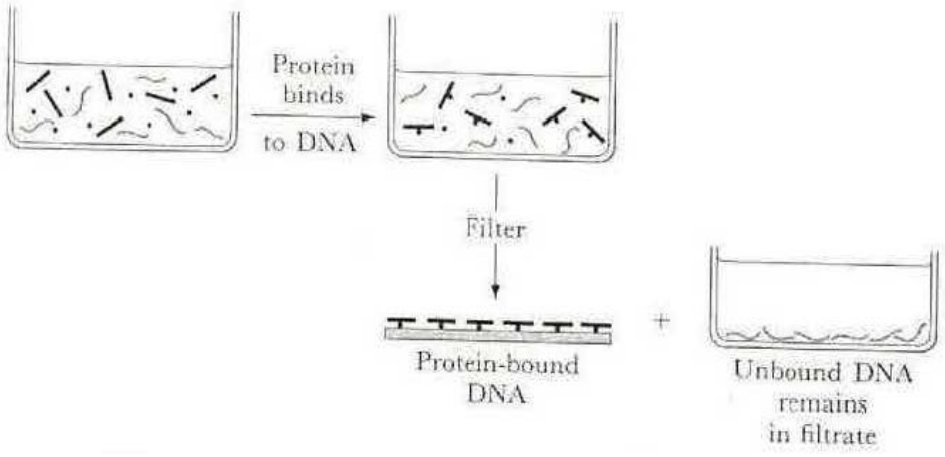
اگر یک مخلوط پروتئینی در شرایط مناسب با DNA رادیواکتیو دو رشته ای، اینکوبه شود، چندین ترکیب پروتئن- DNA تشکیل خواهد شد (شکل ۳- ۵). از آنجا که پروتئین قابلیت چسبیدن به صافی دارد، این گونه روش ها را اگر با صافی های میلی پور انجام دهیم بهتر است زیرا اتصال DNA تک رشته ای به این نوع صافی ها خیلی ضعیف است (جدول ۳- ۱). از این سنجش ساده برای خالص سازی پروتئن های رپرسور[1] استفاده می شود، زیرا آنها فقط به این دلیل قابل جستجو هستند که قادرند به جایگاه های ویژه ای روی DNA دو رشته ای متصل شوند. از این خاصیت برای جستجوی واسطه های آنزیم- DNA در واکنش های ویژه و اندازه گیری تعداد مکان های اتصال با پروتئین های ویژه (مثل RNA پلیمراز) روی مولکول استفاده می کنند.

استفاده های متفرقه از صافی های غشایی

از یک صافی غشایی می توان به عنوان یک عامل تثبیت کننده استفاده کرد. به عنوان مثال، در جفت شدن کروموزوم های انتقالی سویه های نر باکتری (H fr) E.coli و سویه های ماده پذیرنده استفاده می کنند، حرکت براونی از انجام این عمل جلوگیری می کند. در ایجاد سویه هایی از باکتری، گاهی لازم است که ژنی را به باکتری منتقل کنیم که به ندرت در پدیده ی جفت شدن باکتری ها (یا با تأخیر) از باکتری نر به باکتری های ماده انتقال می یابد. اگر چه انتقال ژن های تأخیری به ندرت انجام می شوند، علت این موضوع همان حرکت براونی است که توضیح دادیم. اگر باکتری های ماده را روی صافی غشایی جمع کنیم و باکتر های نر را روی آنها بریزیم، صافی را روی آگار مغذی (NA) قرار دهیم، عمل جفت شدن به طور طبیعی انجام خواهد شد.

[1] Repressor

زیرا به علت تثبیت شدن باکتری ها، انتقال ژن های تأخیری به طور قابل توجهی افزایش می یابد. در پایان زمان جفت گیری، می توان سلول ها را از روی صافی شستشو داده و به پلیت آگار مناسب منتقل نمود.

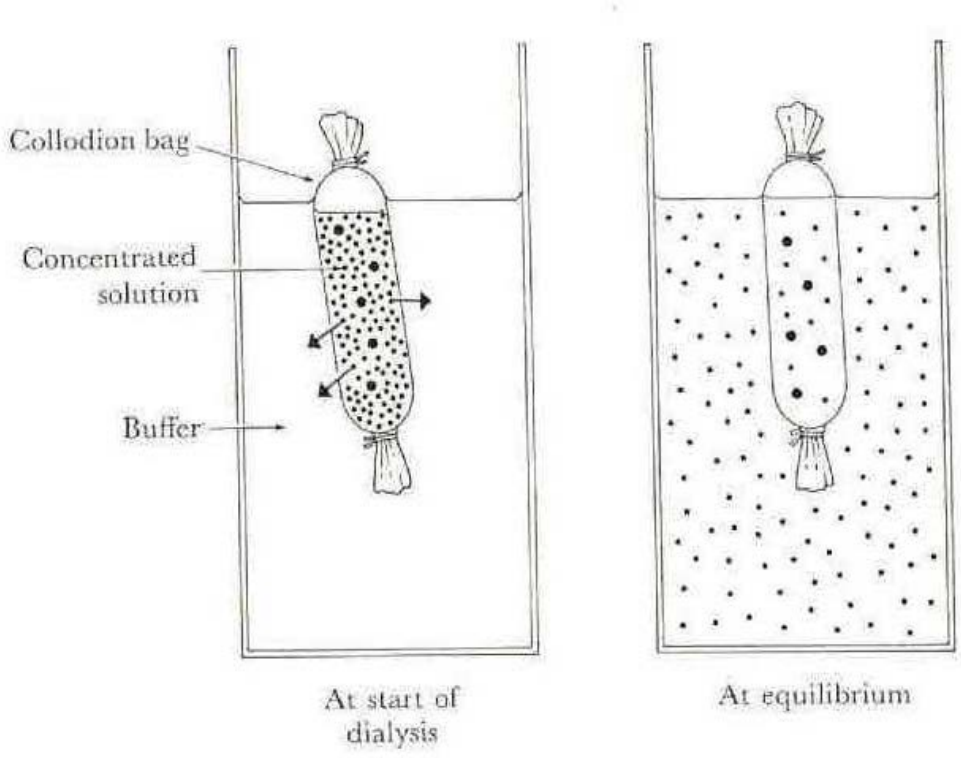


شکل ۳- ۵ اتصال DNA به پروتئین با استفاده از روش جذب به نیتروسلولز.

دیالیز و صاف کردن مولکولی

برای جدا کردن مواد موجود در مایع معمولاً سوسپانسیون مربوطه را از پارچه عبور می دهند. این عمل را می توان با عبور دادن همان سوسپانسیون از غشاهای نیمه تراوا انجام داد.

بهترین روش شناخته شده دیالیز می باشد که در آن یک محلول آبی که دارای درشت مولکول ها و مولکول های ریز می باشد در یک کیسه کلوئیدی قرار داده می شود و خود این کیسه در محفظه ای شامل تامپون قرار می گیرد (شکل ۳-۶).



شکل ۳- ۶ دیالیز. فقط مولکول های کوچک (با تقاط ریز نشان داده شده)می توانند از غشای کلوئیدی عبور کنند. در هنگام تعادل غلظت مولکول های کوچک در دو طرف غشا برابر می شوند.

مولکول های کوچک حل شده (به جز آنها که بسیار بار دار هستند) به راحتی و با آزادی از میان غشا عبور می کنند تا جایی که تعادل به وجود آید. برای تبدیل شدن ترکیب حل شده به ترکیب مودر نظر در داخل کیسه، مایع بیرونی باید به سرعت تعویض شود تا ترکیب مورد نیاز نهایی به دست آید. آب نیز به راحتی از میان دیواره ی کیسه عبور می کند. بنابراین غلظتی که در کیسه به وجود می آید بستگی به این دارد که محلول داخلی غلیظ تر یا رقیق تر از غلظت محلول بیرونی باشد (اثرا سمزی).

از دیالیز معکوس[1] (شکل ۳- ۷) می توان برای غلیظ کردن ماده ی داخل کیسه استفاده کرد. کیسه از پلیمر محلول در آب پر شده است (این پلیمر نمی تواند از غشا عبور کند). پس از مدتی آب داخل کیسه به داخل فاز خارجی و خشک نفوذ می کند. از

[1] Reverse dialysis

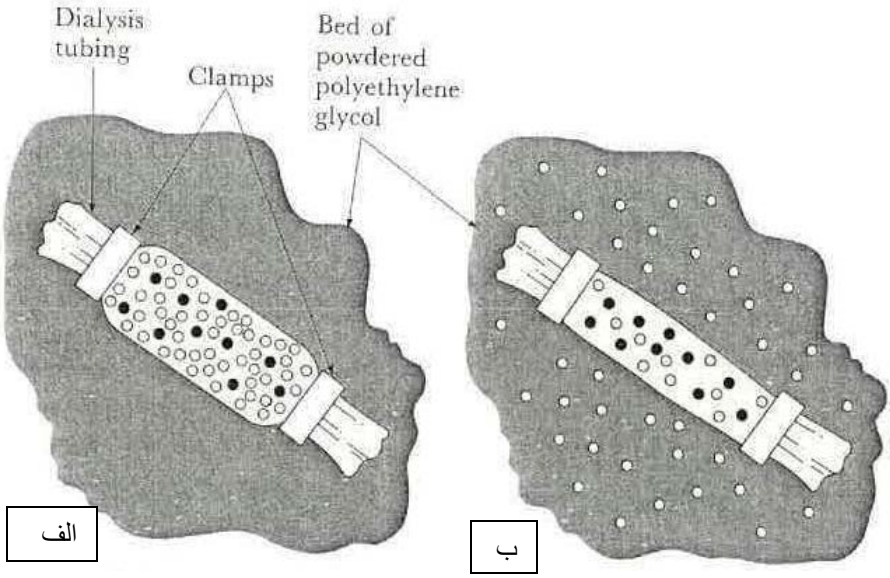
سوکرز نیز می توان برای این کار استفاده کرد چون ماده ای دیالیز شوند است و با خروج آب از کیسه، سوکرز به داخل کیسه نفوذ می نماید. غشاهای نیمه تراوایی که اجازه می دهند مولکول های کوچک از آنها عبور کنند را می توان از شرکت های سازنده خریداری کرد. به عنوان مثال، کیسه ی لوله ای اسپکتروپور[1] در سه نوع مختلف وجود دارد که وزن مولکولی قابل عبور (cut off) از آنها بین ۶۰۰۰ تا ۱۴۰۰ می باشند. کیسه لوله ای دیافلو[2] دارای غشای نازک با قطر حدود ۰/۱ تا یک میکرون و حدود ۲ تا ۱۰۰ آنگستروم روی لایه ی محافظ ضخیم تر (۲۵۰ – ۵۰ میکرون) قرار دارد. این کیسه های لوله ای دارای cut off بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ می باشند.

از چنین غشاهایی می توان برای غلیظ کردن استفاده کرد (با استفاه از غشایی که فقط آب می تواند از آن عبور کند) همچنین برای نمک زدایی در فرایند آماده سازی کروماتوگرافی و جدا سازی جزء به جزء می توان از این غشاها بهره برد. سرعت جریان مواد از خلال غشاء آنقدر آهسته و کند است که این عمل را زیر فشار انجام می دهند. معمولاً نگهدارنده های ویژه ای مورد نیاز است (شکل ۳– ۸). برای صاف کردن مقادیر بسیار زیاد یا بسیار کوچک نمونه های مورد آزمایش، انواع مختلفی از این نوع کیسه ها ساخته شده اند.

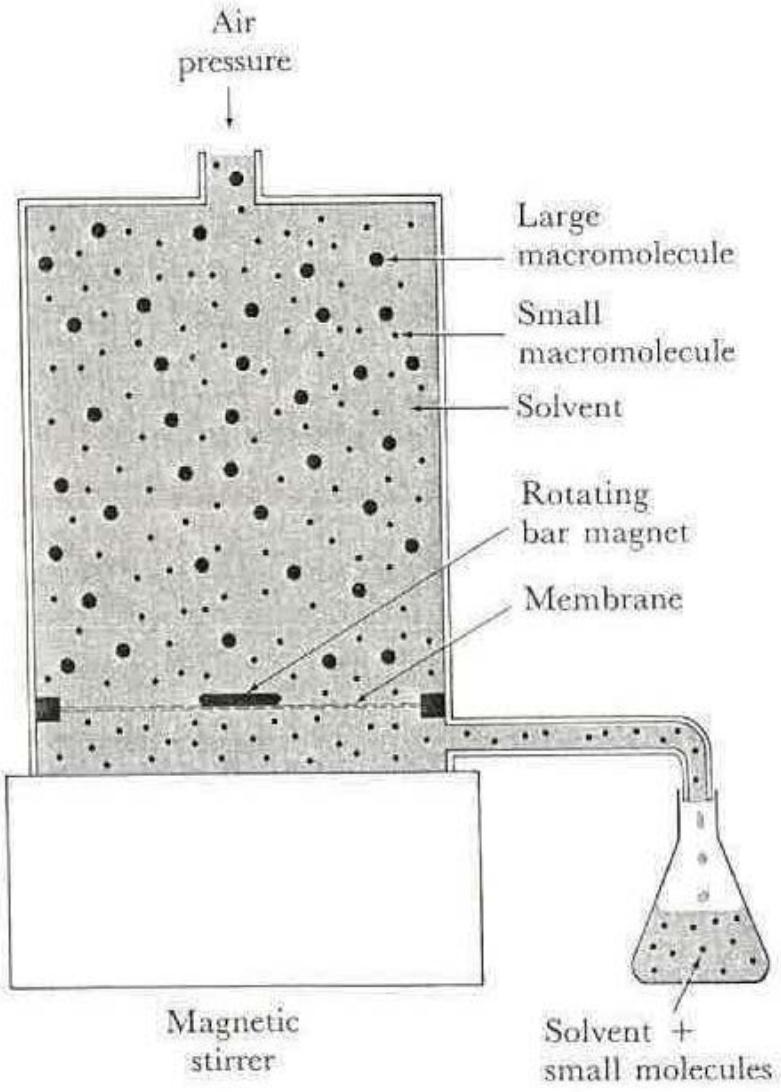
دیالیز با استفاده از فیبر شیشه ای

فایبرگلاس های نیمه تراوا، ابزارهای با ارزشی هستند که هم برای دیالیز و هم برای غلیظ کردن استفاده می شوند. آنها از فیبرهای تو خالی سوراخ دار درست شده اند که دیواره های شیشه ای آنها دارای منافذی با اندازه های کنترل شده می باشند. مولکول های کوچکتر می توانند از منافذ عبور کنند (شکل ۳– ۹). از این فیبرها معمولاً به صورت دسته های فیبری استفاده می کنند تا سطح بزرگی ایجاد شود. از آنها در یک وسیله ای که در شکل ۳– ۱۰ نشان داده شده، استفاده می شود. برای تغییر دادن تامپون در یک نمونه ای که حاوی درشت مولکول است به تامپون دوم، نمونه را در یک محفظه یا کیسه قرار می دهند تا مقدار زیادی از تامپون دوم از فیبرها عبور کند (شکل ۳– ۱۰).

[1] Spectropor
[2] Diaflo

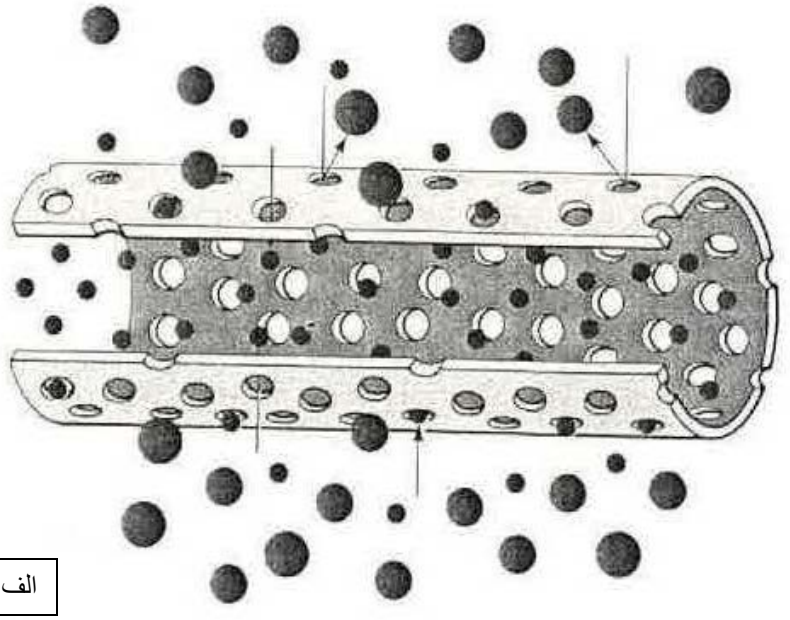


شکل ۳- ۷ دیالیز معکوس

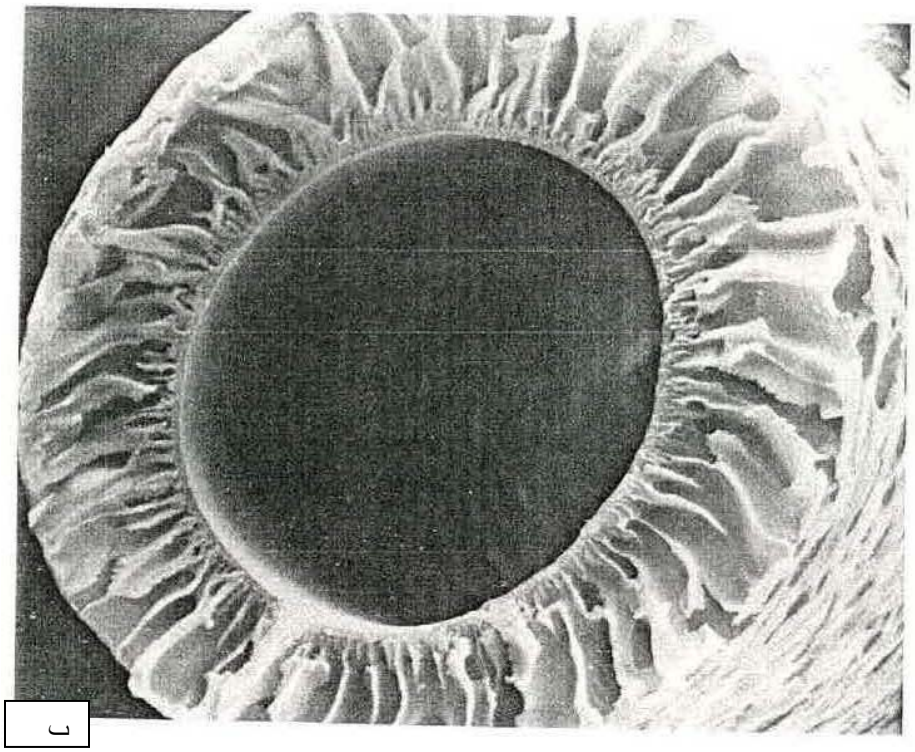


شکل ۳- ۸ دستگاهی برای صاف کردن مولکولی.

مولکول های کوچک هر دو تامپون به سرعت از میان منافذ فیبرها مبادله می شوند، زیرا تامپون داخل فیبرها بسیار زیاد است. تامپون اول توسط تامپون دوم جایگزین می شود. درشت مولکول ها قادر به نفوذ به داخل منافذ فیبرها نیستند و در بیرون باقی می مانند. اگر نمک زدایی مورد نظر باشد، آب از فیبرها عبور می کند. برای تغلیظ کردن نمونه ها، ترتیب کار در شکل ۳- ۱۰ نشان داده شده است. نمونه را در یک ظرف می ریزند و از داخل فیبرها مکش ایجاد می کنند. فشار باعث می شود تا مولکول های جسم حل شده وحلال به داخل فیبرها بروند و محلول غلیظ شود.

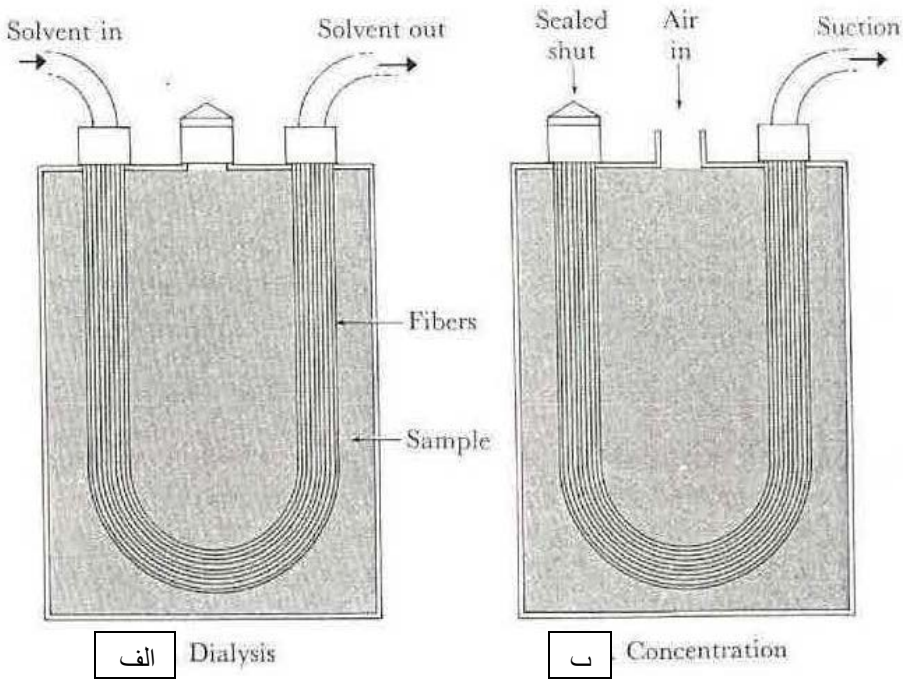


الف



شکل ۳- ۹ در قسمت (الف)، عملی که منافذ فیبرها انجام می دهند،نشان داده شده است. فیبر در ابتدا در داخل محلول حاوی مولکول های بزرگ و کوچک قرار می گیرد. مولکول های کوچک از آن عبور می کنند. (ب) یک منفذ فیبر را توسط میکروسکپ الکترونی نشان می دهد.

کارهای فیزیکی دیگری نیز می توان انجام داد تا نمونه از فیبرها عبور کنند ولی معمولاً انجام نمی شوند زیرا ممکن است منافذ فیبرها مسدود گردند.



شکل ۳- ۱۰ دو نمونه برای نشان دادن نحوه ی استفاده از فیبرهای حاوی منافذ را مشاهده می کنید.

تمرین

۱- اگر از روی فیلتر نیتروسلولز ..... را عبور دهیم، به آن جذب می شود.

الف) ویروس

ب) اوره

ج) متان

د) سدیم کلرید

۲- در محلولی با قدرت یونی ۰/۰۰۵ کدام یک از ترکیبات زیر به فیلتر نیتروسلولز جذب می شود؟

الف) DNA تک رشته ای

ب) RNA

ج) DNA دو رشته ای

د) همه موارد فوق صحیح هستند.

۳ – با عبور دادن پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) ۰/۱ درصد از نیتروسلولز و شستشوی زیاد آن با تامپون هایی که ..... دارند باعث می شود، مکان های خاصی در روی فیلتر که جذب سطحی دارند، اشباع شوند. در نتیجه پیوند صافی با سایر پروتئین ها کاهش یابد.

الف) قدرت یونی کمی ب) مقدار نمک زیاد

ج) pH اسیدی د) pH بازی

۴ – DNA دو رشته ای در تامپونی با قدرت یونی ۰/۰۰۳ به فیلتر نیترو سلولز ..... ولی در قدرت یونی ۰/۰۵ قابلیت جذب .....

الف) جذب نمی شود ، دارد ب) جذب می شود، ندارد

ج) جذب نمی شود ، ندارد د) جذب می شود ، دارد

۵ – قدرت یونی محلول ۰/۵ مولار $MgSO_4$ چقدر می شود؟

الف) ۲

ب) ۴

ج) ۶

د) ۸

۶ – کدام یک از ترکیبات زیر در محلولی با قدرت یونی ۰/۰۱ از فیلتر نیتروسلولز عبور می کند؟

الف) پروتئین

ب) DNA تک رشته ای

ج) RNA تک رشته ای

د) پاسخ های (ب) و (ج) صحیح هستند.

منابع:

Berson, S. A., and R. S. Yalow. 1971. "Radioimmunoassay: A Status Report," in *Immunobiology*, edited by R. A. Good and O. W. Fisher, pp. 287–293. Sinauer Associates. An excellent description of the radioimmunoassay.

Bremer, J. M., A. J. Pesce, and R. B. Ashworth. 1974. *Experimental Techniques in Biochemistry*, ch. 4. Prentice-Hall.

Clausena, J. 1969. "Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 1, edited by T. S. Work and E. Work, pp. 405–556. North-Holland.

Kabat, E. A. 1968. *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*. Holt, Rinehart and Winston.

فصل ۴

کروماتوگرافی

پس از مطالعه کامل این فصل شما باید با مطالب زیر آشنا شوید:

۱. کروماتوگرافی تفکیکی

۲. کروماتوگرافی جذبی

۳. کروماتوگرافی کاغذی

۴. کروماتوگرافی گاز- مایع

۵. کروماتوگرافی با استفاده از ژل

۶. کروماتوگرافی ژل لایه نازک

۷. کروماتوگرافی تعویض یونی

۸. کروماتوگرافی **DNA** – سلولز

۹. ستونهای **MAK**

۱۰. ستون های **Histon- Kieselgur**

۱۱. کروماتوگرافی هیدروکسی اپتیت

۱۲. کروماتوگرافی تمایلی

کروماتوگرافی تفکیکی

مقدمه :

سنجاق های آهنی و قطعات شیشه ای را می توان با استفاده از یک آهنربا از هم جدا کرد. شن و شکر را با حل کردن آنها در آب از یکدیگر جدا کرد. این مواد از نظر فیزیکی شبیه هم هستند و این موضوع مراحل جداسازی آنها را مشکل می کند. در روش کروماتوگرافی تفکیکی، مواد را در سیستمی قرار می دهند که از دو بخش متمایز تشکیل شده است، یک فاز متحرک و یک فاز ثابت که به این ترتیب مولکول های مختلف از هم جدا می شوند. بعضی از آنها به آرامی بین دو فاز حرکت می کنند. حرکت نسبی هر مولکول تحت اثر نیروی رانش (مثلاً حرکت فاز متحرک) و نیرو های کند کننده (مثلاً جذب سطحی) قرار دارد که این مولکول ها بین این دو نیرو به تعادل می رسند.

در بحث کروماتوگرافی، واژگان استاندارد زیر به کار می رود : فاز ثابت، یک ماده ی جذب کننده است. اگر فاز ثابت مایع باشد توسط یک جامد نگهداری می شود و به بخش جامد، محافظ[1] یا ماتریکس[2] می گویند. فاز متحرک، حلال[3] یا پیش رونده[4] است. ماده ای که در مخلوط وجود دارد و می خواهیم جدا کنیم به نام حل شونده[5] گفته می شود.

در کروماتوگرافی تفکیکی دو فاز فوق در تماس با یکدیگرند. در اینجا یکی یا هر دوی آنها حاوی یک جسم هستند و ماده ی حل شده (solute) بین این دو فاز پخش می شوند که به این عمل تفکیک شدن گویند.

اگر دو حلال اختلاط ناپذیر داشته باشیم، نسبت غلظت ماده حل شونده در دو فاز را در حالت تعادل و دمای مشخص را ضریب تفکیک[6] گویند. مثلاً آب و فنل یا آب وبوتانل.

[1] Support
[2] Matrix
[3] Solvent
[4] Developer
[5] Solute
[6] Partition coefficient

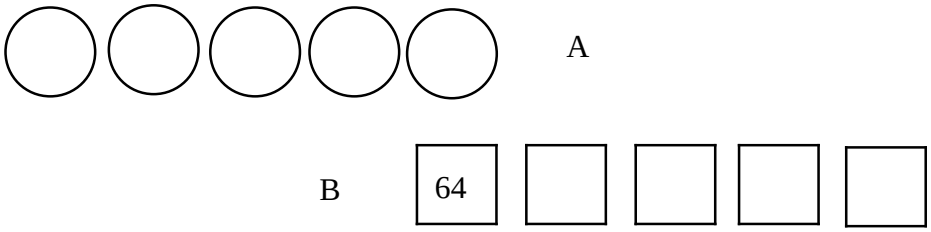
مقدار (واحد) ماده حل شده = Y

$$\text{ضریب تفکیک} = \frac{[Y]_A}{[Y]_B}$$

در فرمول فوق A و B حلال های اختلاط ناپذیر هستند.

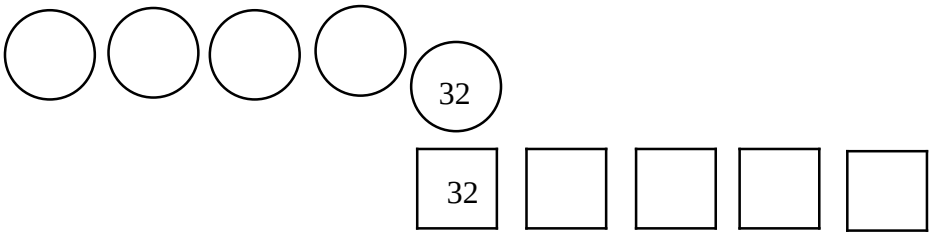
کروماتوگرافی تفکیکی را در یک ستون انجام می دهند که این ستون لوله ای است که با یک ماده ی جاذب و حلال پر شده است. محلول، حاوی جسم حل شده را روی قسمت بالایی ماده ی جاذب می ریزند و اجازه می دهند تا وارد ماده ی جاذب شود. سپس ماده حل شده به طور دائم از ستون عبور می کند. اگر چه ماده ی جاذب و ماده ی حل شده داخل ستون، به طور دائمی از بالای ستون به سمت پایین آن در حرکت هستند ولی می توان ستون را به صورت لایه های بسیار زیاد غیر قابل مجزا در نظر گرفت یعنی صفحات فرضی تصور کنید[1] که در هر کدام ماده حل شونده می تواند حل شود. برای سهولت آزمایش ضریب تفکیک را برابر ۱ فرض کنید یعنی ماده خاصی در دو حلال آب (A) و بوتانل (B) برابر حل می شود.

مثال ۱ : فرض کنید ۶۴ مولکول داریم و دو سری لوله آزمایش (هر سری از ۵ لوله تشکیل شده است). در هر یک از لوله های آزمایش بالایی (A) ۱۰ میلی لیتر آب ریختیم و در هر یک از لوله های پایینی (B) هم ۱۰ میلی لیتر بوتانل داریم.

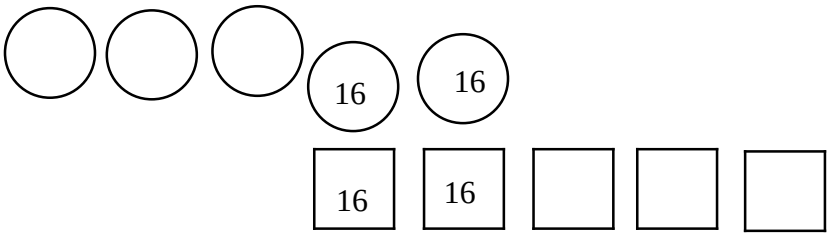


حال ۶۴ مولکول را به لوله B اضافه می کنیم. سپس حلال لوله A در حلال B می ریزیم (۲۰ میلی لیتر می شود). پس از بهم زدن آنها چند لحظه لوله آزمایش را بحال خود می گذاریم تا دو فاز تشکیل شود. چون این دو حلال اختلاط ناپذیر هستند بنابراین در هر فاز ۳۲ مولکول خواهیم داشت:

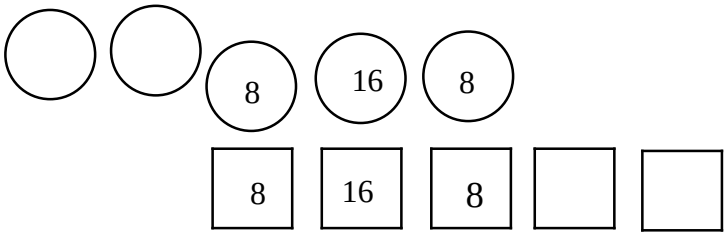
[1] Plate



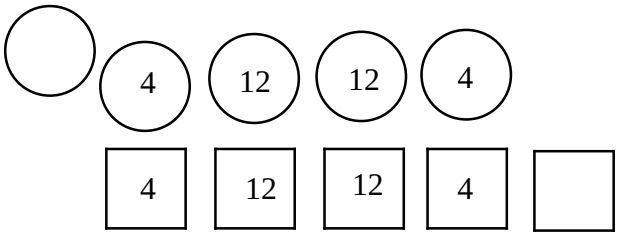
حال به آرامی حلالی رویی را داخل لوله بعدی می ریزیم و باید مواظب باشیم که مولکول های داخل حلال زیری همانجا بمانند.پس ۳۲ مولکول وارد حلال بعدی (که خودش ۱۰ میلی لیتر از حلال B داشت) می شود وقتی خوب بهم زدیم و دو فاز تشکیل شد در هر کدام ۱۶ مولکول خواهیم داشت. در لوله اول که مواظب بودیم ۳۲ مولکول آن خارج نشود، حلال A را که هیچ مولکولی در آن نیست، اضافه می کنیم (۲۰ میلی لیتر حلال است). باز هم این لوله را بهم می زنیم و می گذاریم تا دو فاز تشکیل شود:



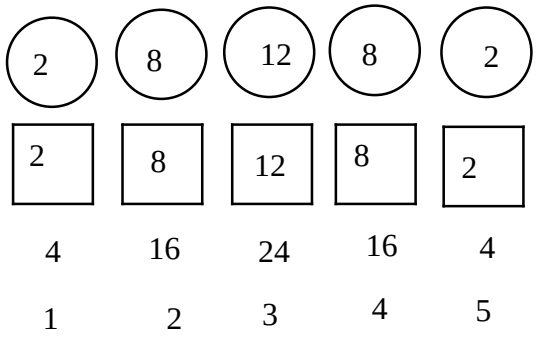
بنابراین لوله ۱ حاوی دو فاز و در هر کدام ۱۶ مولکول و لوله ۲ نیز دو فاز دارد و در هر کدام ۱۶ مولکول خواهیم داشت. این عمل را تکرار می کنیم به طوری که در هر مرحله فاز رویی را به حلال بعدی افزوده و یکی دیگر از حلال های B را به اولین لوله حاوی حلال A اضافه می کنیم. بدین ترتیب:



مولکول ها در این ۵ لوله تفکیک می شوند و در نهایت چنین خواهیم داشت:



اگر تعداد مولکول ها را با Y نشان دهیم و تعداد لوله های آزمایش را از چپ به راست شماره بگذاریم، چنین خواهیم داشت:



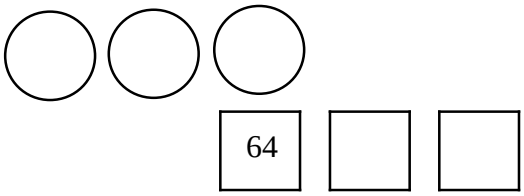
[Y]	4	16	24	16	4
No.tube:	1	2	3	4	5

پس ۵ لوله آزمایش داریم که در اولی رویهم ۴ مولکول و در دومی ۱۶ مولکول و بالاخره در پنجمی ۴ مولکول وجود دارد.

مثال ۲ – فرض کنید ضریب تفکیک ۱ به ۳ است:

$$\text{partition coefficient} = \frac{[Y]_A}{[Y]_B} = \frac{1}{3}$$

برای سهولت آزمایش دو حلال اختلاط ناپذیر و سه لوله آزمایش در نظر بگیرید:



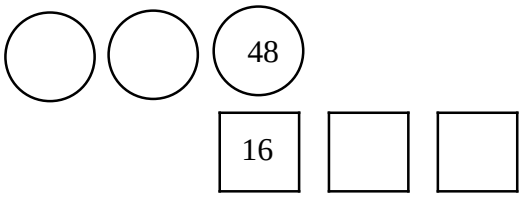
فرض کنید این مولکول ها در حلال بالایی سه برابر حلال پایینی حل می شود. بنابراین محاسبات چنین می شود:

$$3 + 1 = 4$$

$$\frac{64}{4} = 16$$

$$16 \times 1 = 16$$
$$16 \times 3 = 48$$

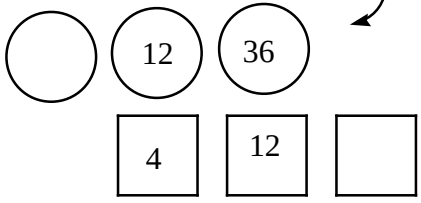
پس وقتی دو حلال را مخلوط کردیم و دو فاز تشکیل دادیم، در لوله آزمایش اولی به نسبت ۴۸ به ۱۶ خواهیم داشت:



با تکرار آزمایش چنین می شود:

$$\frac{48}{4} = 12$$

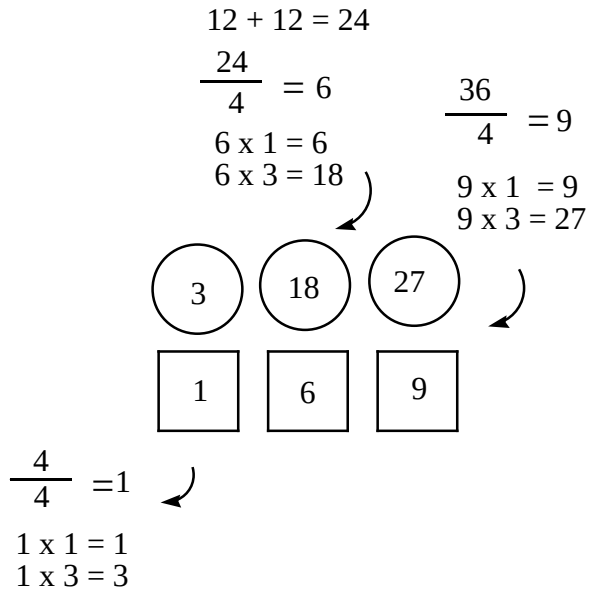
$$12 \times 1 = 12$$
$$12 \times 3 = 36$$



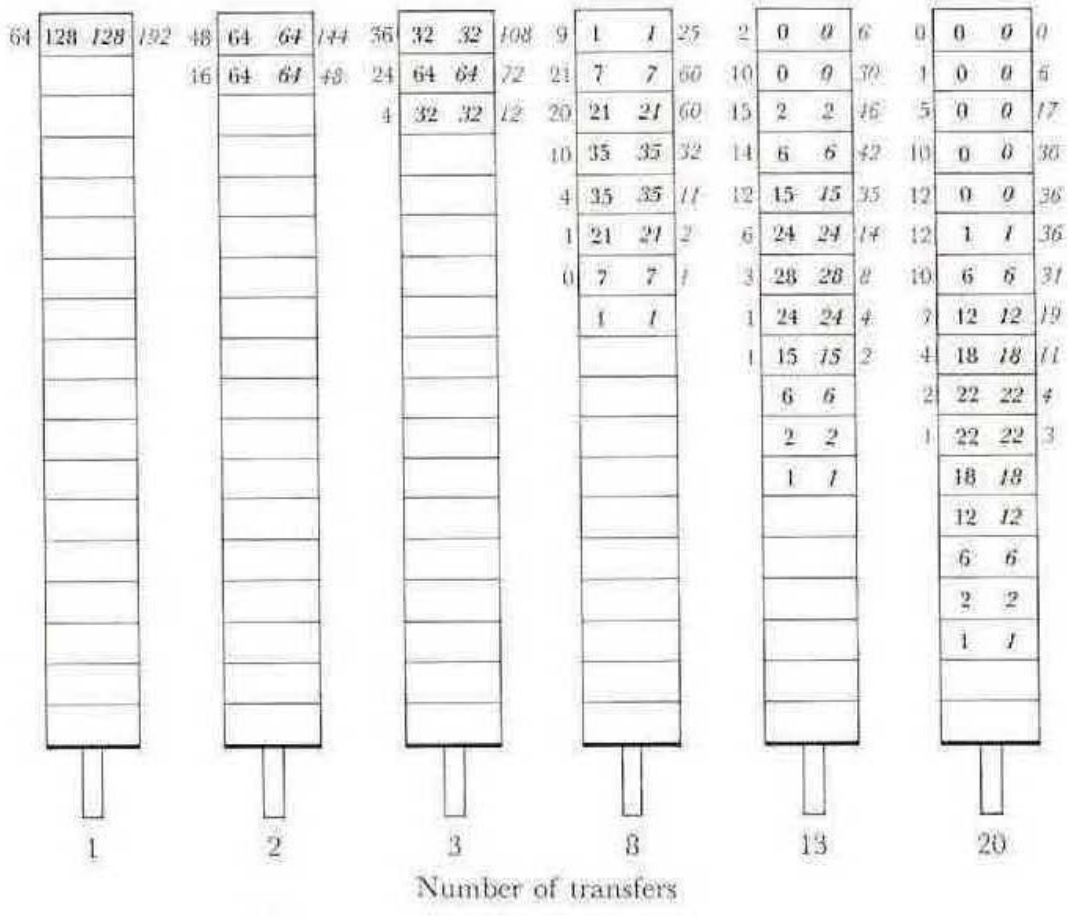
$$\frac{16}{4} = 4$$

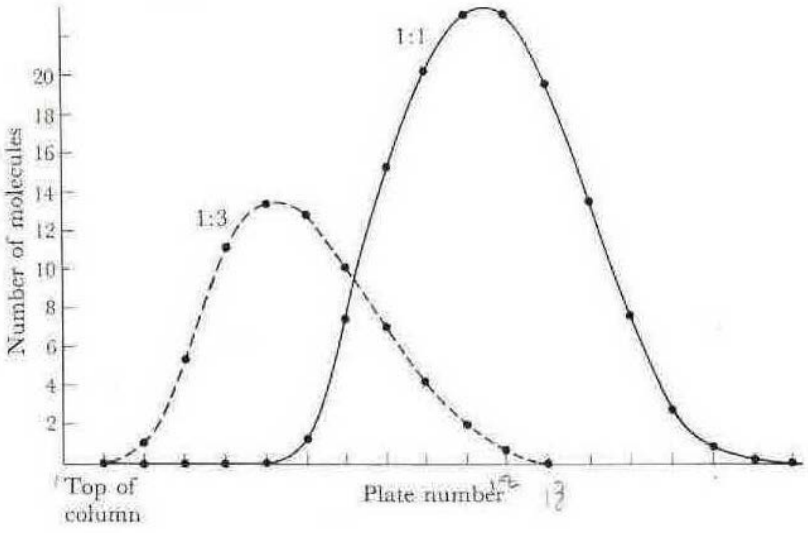
$$4 \times 1 = 4$$
$$4 \times 3 = 12$$

همین محاسبات را برای لوله آزمایش سومی نیز انجام می دهیم و تفکیک مولکول ها چنین می شود:



مثال ۳ – برای این که آزمایش را کمی به حقیقت نزدیک کنیم، یک لوله آزمایش را در نظر بگیرید و داخل آن را با ژل پر می کنیم. انتهای این لوله باز است. ژل داخل این لوله آزمایش را به صفحات فرضی تقسیم می نماییم. اگر این ژل از جنس نشاسته باشد، مسلم است که پودر نشاسته با آب باد کرده و به صورت ژل در آمده است، بنابراین داخل ژل حلال آب قرار دارد. حال مولکول ها مثلاً ۲۵۶ عدد را در بالای ژل ریخته و از بالا حلال دوم یا بوتانل اضافه می کنیم. پس در هر صفحه دو حلال اختلاط ناپذیر (شبیه یک لوله آزمایش قبلی که حاوی ۲۰ میلی لیتر آب و بوتانل بود، می شود) وجود دارد. یکبار آزمایش را با ضریب تفکیک ۱ در نظر بگیرد و بار دیگر ۱ به ۳ آزمایش را انجام می دهیم (شکل ۴– ۱). تعداد مولکول هایی که با ضریب ۱ محاسبه شدند را داخل لوله و آنهایی که ۱ به ۳ محاسبه شدند را در بیرون لوله نوشتیم. اگر تعداد صفحات فرضی را ۱۸ عدد تصور کنیم (در عمل میلیون ها صفحه خواهیم داشت) و دو تفکیک را (یعنی با ضریب تفکیک ۱ و ضریب تفکیک ۱ به ۳) رو نمودار نشان دهیم، چنین می شود (به شکل ۴– ۱ مراجعه کنید).





شکل ۴- ۱ کروماتوگرافی تفکیکی.

نحوه محاسبه اولین و دومین صفحه فرضی با دو ضریب تفکیک مختلف چنین است:

$$\text{partition coefficient} = \frac{1}{1}$$

۲۵۶ مولکول با ضریب تفکیک ۱ چنین محاسبه می شود:

$$\frac{256}{2} = 128$$

همانطور که در داخل لوله نوشته شده در آب و بوتانل به نسبت مساوی یعنی ۱۲۸ مولکول خواهیم داشت. با اضافه کردن بوتانل به بالای لوله ۱۲۸ مولکول به صفحه بعدی می رود که داخل صفحه دوم، آب نیز وجود دارد بنابراین چنی می شود:

$$\frac{128}{2} = 64$$

بعد از ۱۶ صفحه فرضی تفکیک مولکول در صفحه شانزدهم یک به یک می شود.

آزمایش را با ضریب تفکیک ۱ به ۳ تکرار می کنیم:

$$\text{partition coefficient} = \frac{1}{3}$$

۲۵۶ مولکول به نسبت ۱ به ۳ شامل ۶۴ و ۱۹۲ می شود. حال ۱۹۲ وارد صفحه دوم شده و بدین ترتیب تقسیم می گردد:

$$3 + 1 = 4$$

$$\frac{192}{4} = 48$$

$$48 \times 1 = 48$$

$$48 \times 3 = 144$$

۶۴ مولکول دیگر نیز چنی تقسیم می شود:

$$3 + 1 = 4$$

$$\frac{64}{4} = 16$$

$$16 \text{ x } 1 = 16$$

$$16 \text{ x } 3 = 48$$

این عمل ۱۱ بار تکرار شد و مقادیر نوشته شده در خارج لوله به دست آمد.

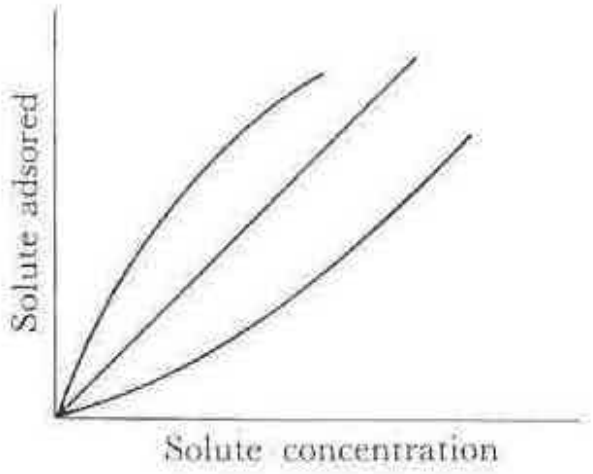
متداول ترین انواع کروماتوگرافی عبارتند از کروماتوگرافی کاغذی و کروماتوگرافی لایه نازک. در هر دو نوع کروماتوگرافی، ماتریکس حاوی یک مایع پیوسته است. مولکول های آب در کروماتوگرافی کاغذی، به ماتریکس که همان سلولز است، متصل اند و حلال به کار رفته برای ایجاد لایه نازک (در کروماتوگرافی لایه نازک) به محافظ اتصال دارد. از این روش ها به عنوان روش های کروماتوگرافی جذب سطحی یاد می شود زیرا جذب روی میزان جدا سازی مؤثر است. گر چه بیشترین کار توسط تفکیک انجام می پذیرد. مثال های دیگر کروماتوگرافی تفکیک عبارتند از کروماتوگرافی گاز- مایع و کروماتوگرافی ژل.

کروماتوگرافی تفکیکی ممکن است در ستون هایی انجام شود که ماتریکس آن قادر به جذب ماده ی حل شونده، نباشد. مواد محافظ معمول عبارتند از: مواد دارای جدار سیلیسی (مثل Celite)، ژل سیلیکا (silica gel)، پودر سلولز، و بعضی از دکستران ها (مثل Sephadex LH20). فاز ثابت، با سوسپانسیون کردن محافظ یا شستن ستون با یک ماده جاذب مناسب به وجود می آید. با این روش، ماده جاذب، ذرات محافظ را می پوشاند و توسط جذب سطحی یا با نفوذ ساده به سوراخ های ریز و در شکاف های ذرات، نگهداشته می شود. در ضمن توسط خاصیت لوله های موئین حفظ می گردد. لازم است که به خاطر داشته باشیم فاز ثابت فضاهای بین ذرات را پر نمی کند. این فضاها باید توسط فاز متحرک پر شوند. مواد سازنده ی فاز ثابت از نوع حلال های آب گریزی مثل بنزن هستند که برای جداسازی مواد غیر قطبی یا حلال های آب گریز مثل الکل برای مواد قطبی هستند. فازهای متحرک الکل ها یا آمیدها برای مواد غیر قطبی، یا آب برای مواد قطبی هستند. توجه داشته باشید که در اینجا فاز ثابت، مایع است. کروماتوگرافی تفکیکی، برای مولکول هایی با جرم مولی کم به کار می رود.

کروماتوگرافی جذبی

مقدمه :

یک سطح جامد با جایگاه های پیوندی زیاد را در نظر بگیرید. در این سطح مناطقی وجود دارند که غنی از الکترون هستند (یعنی بار منفی دارند)، مناطقی ممکن است باشند که بار مثبت دارند و بالاخره مناطقی هم ممکن است غیر قطبی باشند. مایعی داریم حاوی جسم حل شده که با سطح در تماس است. اگر این اتصال بر گشت پذیر باشد، تعداد مولکول هایی که در تماس با سطح هستند متناسب با غلظت جسم حل شده خواهد بود. این وابستگی در شکل ۴- ۲ نشان داده شده است. این گونه منحنی ها را جذب های همدما[1] گویند.



شکل ۴- ۲ سه توزیع ماده حل شده بین جاذب و حلال بر حسب غلظت ماده حل شده.

این نمودار شامل منحنی های جذب در حرارت ثابت است.

[1] Adsorption isotherm

جدول۴- ۱ مواد مورد استفاده در کروماتوگرافی جذبی

Material	Substances separated
Alumina	Small organic molecules, proteins
Silica gel	Sterols, amino acids
Activated carbon	Peptides, amino acids, carbohydrates
Calcium phosphate gel	Proteins, polynucleotides
Hydroxyapatite	Nucleic acids

متداول ترین نوع آن منحنی محدبی است که ابتدا جایگاه های اتصال دارای میل ترکیبی زیاد پر می شوند. بنابراین با اضافه کردن مقادیر بیشتری از جسم حل شده، اتصال ها کم کم ضعیف تر می شوند. اتصال های همدما خصوصیات یک مولکول ویژه و ماده جاذب را نشان می دهد. اگر غلظت معینی از یک مولکول روی یک سطح را در نظر بگیریم (در عمل، مجموعه ای از ذرات یک ستون یا روی یک محافظ جامد) و به حلال اجازه داده شود تا در سطح، جریان یابد، مقدار معینی به سطح متصل شده و مقادیر باقی مانده و متصل نشده در طول سطح حرکت می کنند. ماده پیش رونده به دو صورت متصل می شود: (۱) توسط نیروی کند کننده که باعث می شود، اتصال یا جذب صورت گیرد و (۲) ممکن است بخشی از آن پیوند شود ولی این بخش پیوند ثابتی ندارد بلکه با کم شدن غلظت، اتصال آنها نیز کاهش می یابد. سرعتی که ماده مورد نظر در حال حرکت است، به قدرت اتصال بستگی دارد یعنی هر چقدر اتصال محکم تر باشد، حرکت کند تر می شود. واضح است مولکول ها را در صورتی می توان جدا کرد که آنها جذب های همدمای متفاوتی داشته باشند.

انواع کروماتوگرافی جذبی

کروماتوگرافی جذبی از یک فاز مایع متحرک و یک فاز جامد ثابت تشکیل شده است. البته یک مورد استثنا در مورد کروماتوگرافی گاز _ مایع وجود دارد. جداسازی یا بر روی ستون ها انجام می گیرد یا روی لایه های نازک. جدول (۴-۱) در مورد مواد جاذب متداول و موارد مصرف آنها اشاره می کند.

یکی از انواع مهم کروماتوگرافی جذبی، کروماتوگرافی تعویض یونی است. این نوع کروماتوگرافی بستگی به ماده ای دارد که می خواهیم مورد آزمایش قرار دهیم، بنابراین جاذب می تواند متفاوت باشد که به این ترتیب ماده حل شده در فاز متحرک روی جاذب تثبیت می شود. حرکت مولکول ها تا فاز متحرک جدیدی اضافه نشود، شروع نخواهد شد. وقتی جذب سطحی بسیار قوی صورت گیرد، رها شدن ماده حل شده از ماتریکس مشکل می شود. اساس کار تا حدی در این نوع کروماتوگرافی با سایر انواع کروماتوگرافی ها تفاوت می کند. به هر حال باید به خاطر داشت که کروماتوگرافی تفکیکی و جذبی تا حدی بستگی به این دارد که جذب در کاغذ باشد یا به لایه نازکی از مواد دیگر و یا این که می خواهیم عمل کروماتوگرافی را روی ژل انجام دهیم و همین موضوع در عمل اختلافی را به وجود می آورد.

تهیه ستون ها

متداول ترین راه برای ثابت نگه داشتن فاز ثابت یا محافظ، ستون است. در کروماتوگرافی ستونی، یک لوله وجود دارد که از ماده ای پر شده است که فاز ثابت به علاوه یک حلال را تشکیل می دهد. سپس، حجم کوچکی از یک نمونه را روی فاز ثابت قرار می دهند و اجازه داده می شود وارد ستون گردد. به این عمل، بار گذاری ستون[1] گویند.سپس حلال را می ریزند (فاز متحرک) (شکل ۴-۳). حال شستشوی ستون شروع می شود[2]. با عبور مواد مختلف از ستون، این مواد از هم جدا شده و هنگامی که حجم های مشخصی از مایع از ستون عبور می کند، این مواد تفکیک شده در پساب ظاهر می شود. حجم کل ماده (هم جامد و هم

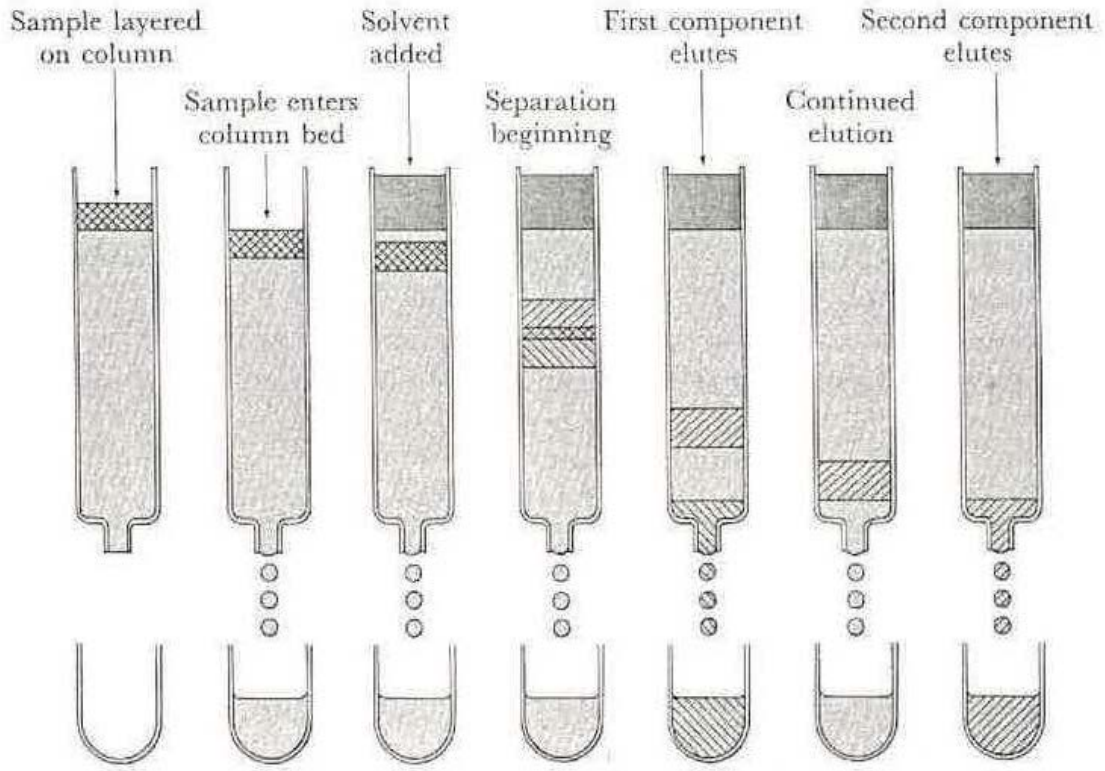
[1] Louding
[2] Eluting

مایع) را در ستون حجم کل[1] گویند. حجم کل فاز متحرک یعنی مایع موجود در ستون را حجم مایع[2] یا حجم ابقا شده[3] یا حجم نگه داشته شده[4] می نامند. به حجمی از مایع که می بایست اضافه شود تا مقدار قابل ملاحظه ای از جسم حل شونده در پساب به وجود آید را حجم شسته شده[5] می گویند. روشی که به وسیله آن ژل داخل ستون ساخته می شود را آماده سازی[6] گویند. آنچه که باید با دقت زیاد انجام شود این است که ژل کاملاً همگن باشد یعنی آماده سازی به صورتی انجام شود که ژل بدون حباب و ترک باشد. جریان نا هموار ناشی از ناهمگونی ژل را کانال سازی[7] گویند. اثری که کانال سازی ممکن ا ست به وجود آورد این است که یک ماده در چند پیک ظاهر شود. این امر ناشی از حرکت سریع فاز متحرک به سمت پایین ستون است و ماده حل شونده سریع در داخل کانال به نقطه جدیدی سقوط می کند. مایعی که از ستون خارج می شود، معمولاً به صورت بخش های جدا از هم و با استفاده از یک جمع کننده خودکار[8]، همان طور که در شکل (۴-۴) نشان داده شده، جمع آوری می شوند.

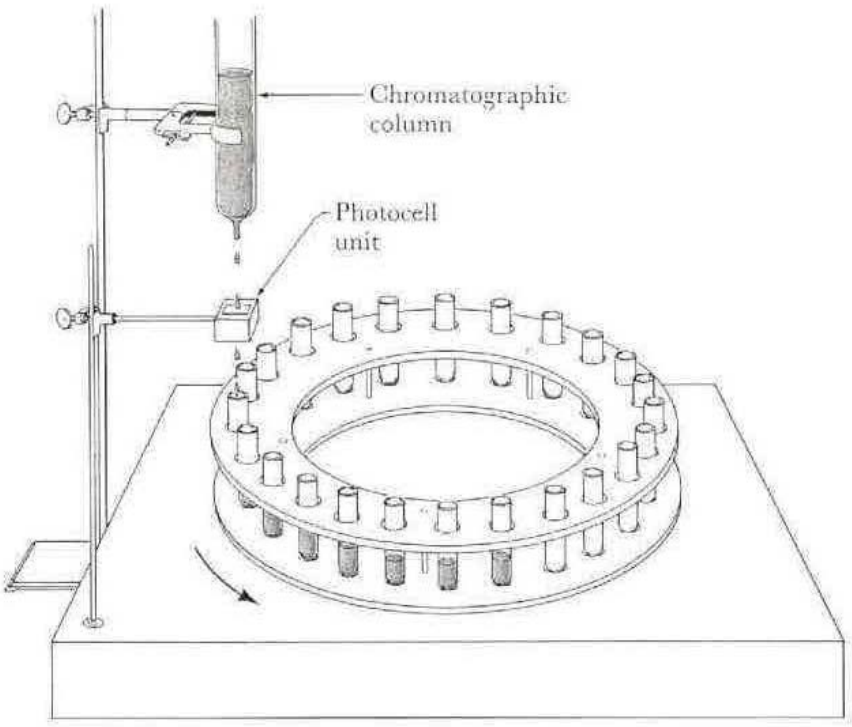
در خاتمه کار، ترکیبات جدا شده را شناسایی کرده و با روش های خاصی، مایع موجد در هر لوله را مشخص می کنند. مثلاً می توان شناسایی مواد به دست آمده را با سنجش های طیفی، روش های شیمیایی، مواد رادیو اکتیو و غیره انجام داد. در مواردی که تحلیل به وسیله جذب نوری انجام می گیرد، از یک اسپکتوفتومتر اتوماتیک استفاده می شود. نمونه از میان یک لوله عبور می کند

[1] Bed volume
[2] Void volume
[3] Retention volume
[4] Hold- up
[5] Elution volume
[6] Packing
[7] Channeling
[8] Automatic collector

و چگالی نوری در یک طول موج مناسب اندازه گیری شده و روی یک ضبط کننده گرافیکی (نگاره) ترسیم می گردد.



شکل۴- ۳ کروماتوگرافی ستونی



شکل ۴- ۴ یک جمع کننده خودکار

ستون ها را به سه طریق شستشو می دهند: در ساده ترین روش، یک حلال، به طور دائم از میان ستون عبور می کند. این متداول ترین روش در کروماتو گرافی تعویض یونی و ژل کروماتوگرافی است.

اگر هدف، تخلیص باشد، از شستشوی مرحله ای[1] استفاده می شود. ستون را با یک حلال شستشو می دهند و این شستشو ادامه می یابد تا زمانی که یک حجم از پیش تعیین شده به دست آید. سپس دومین حلال افزوده می شود. مزیت این روش این است که شرایط می توانند به گونه ای طراحی شوند که یک ماده ویژه، در حجم کوچکی خارج گردد. به عنوان مثال: مخلوطی از مواد را در نظر بگیرید، مثلاً یکی از آنها (X) است که توسط حلال A با تأخیر زیاد و بقیه با تأخیر کمی خارج شوند. X توسط حلال B با تأخیر کمی خارج شود از این رو، اگر ستون به طور کامل با حلال A شسته شود، بیشتر مواد از ستون خارج می شوند اما ماده X

[1] Batch elution or stepwise

همچنان متصل به ستون باقی می ماند. اگر توسط حلال B ستون را شستشو دهیم، X در یک حجم نسبتاً کوچک به سرعت از ستون خارج می شود.

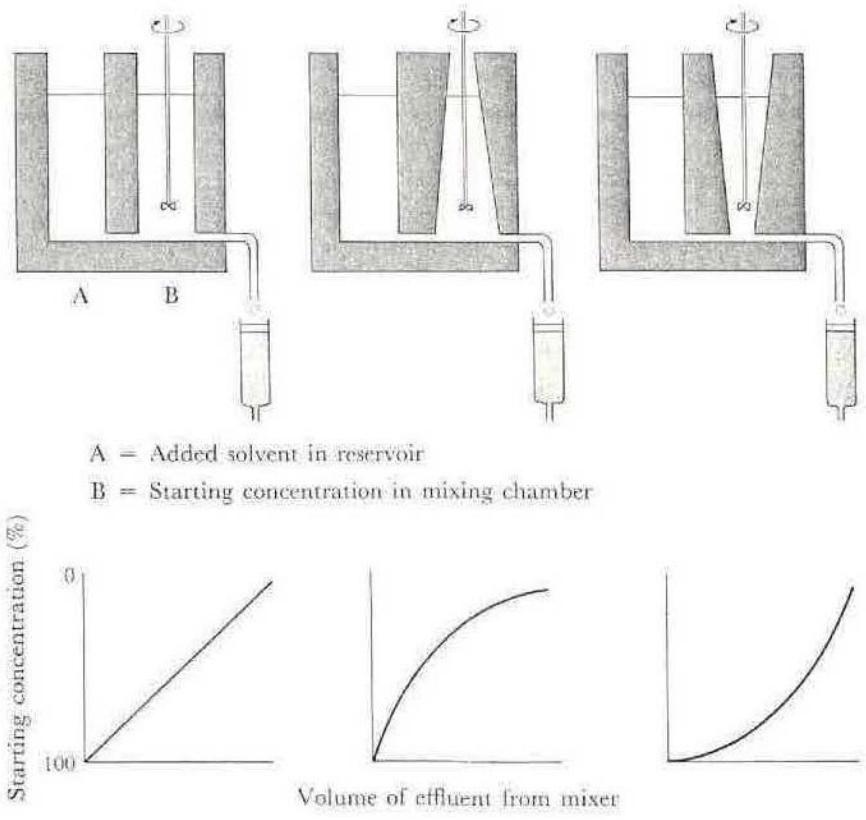
روش سوم خارج کردن مواد با استفاده از شیب شستشو[1] می باشد که هم شامل تغییر نسبت های دو حلال و هم با افزایش غلظت یک یا چند ترکیب در حلال (مثلاً غلظت نمک) است. افزایش غلظت نمک در حلال روش شستن ستون های جذبی و تعویض یونی است. شیب غلظت به طوری که در شکل ۴-۵ نشان داده شده، توسط یک دستگاهی به نام شیب ساز تهیه می شود. یک شیب ساز، شامل دو مجرا، یک مخزن و یک مخلوط کن است که این دو مجرا از قاعده به هم وصل اند. یکی از مخزن ها حاوی حلال غلیظ تری است.

مایع مخلوط کن از دستگاه شیب ساز خارج شده و وارد ستون می شود. از آنجا که سرهای هیدرو استاتیک باید برابر باشند، به طور هم زمان، مایع از مخزن جریان می یابد و به مخلوط کن می رود. اگر محفظه ها شکل یکسان داشته باشند، شیب خطی است. شیب های مقعر ومحدب را به صورتی که در شکل ۴- ۵ نشان داده شده، می توان تهیه کرد.

کروماتوگرافی کاغذی

کروماتوگرافی تفکیکی را می توان به روی ستونی از سلولز انجام داد. کروماتوگرافی کاغذی یکی از روش هایی است که در آن قسمت محافظ، سلولز است که به شکل ورقه ای از کاغذ می باشد.سلولز حاوی حجم بسیار زیادی آب است حتی اگر به صورت کاملاً خشک شده در آید. تفکیک شدن و تجزیه شدن بین آب اتصالی و حلال پیش رونده اتفاق می افتد.حلال به کار رفته نیز ممکن است آب باشد تا در این مورد نیز عمل جذب سطحی صورت گیرد. مسلما، برخی از اثرات جذبی وجود دارند چون ساختار فیزیکی آب اتصالی، از آب آزاد بسیار متفاوت است، تفکیک رخ می دهد.

[1] Gradiant elution



شکل ۴-۵ دستگاه شیب ساز برای ایجاد شیب شستشو

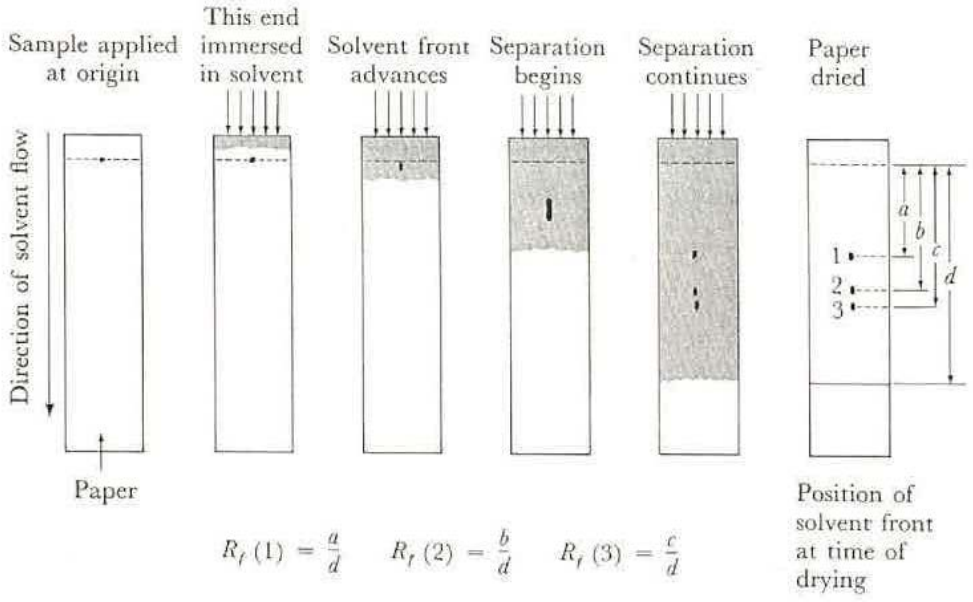
روش های عملی برای کروماتوگرافی کاغذی

همراه با تغییر شکل محافظ (از ستون به کاغذ)، روش کار نیز تغییر می کند. در کروماتوگرافی کاغذی پسابی وجود ندارد و مواد به وسیله جایگاه های آنها روی کاغذ مشخص می شوند (البته بعد از این که تا فاصله معینی حرکت کرد).

یک حجم اندک (حدود ml ۲۰ – ۱۰) از محلول حاوی مخلوط جدا شونده در نقطه ای که علامت زده شده قرار می دهند. (شکل ۴- ۶) و می گذارند تا خشک شود. این نقطه، مبدأ را تعیین می کند. سپس کاغذ را در یک فضای بسته قرار می دهند و یک انتهای آن را در یک حلال مناسب فرو می برند. کاغذ شروع به جذب فاز متحرک می کند و با کشیده شدن حلال توسط کاغذ، نمونه نیز از نقطه مبدأ حرکت کرده و در حقیقت حل می شود. این عمل باعث می شود که اجزای تشکیل دهنده ترکیب مورد نظر در جهت جریان حلال، حر کت کند (توجه داشته باشید به علت این که نمونه قبل از این که بتواند حرکت کند باید حل

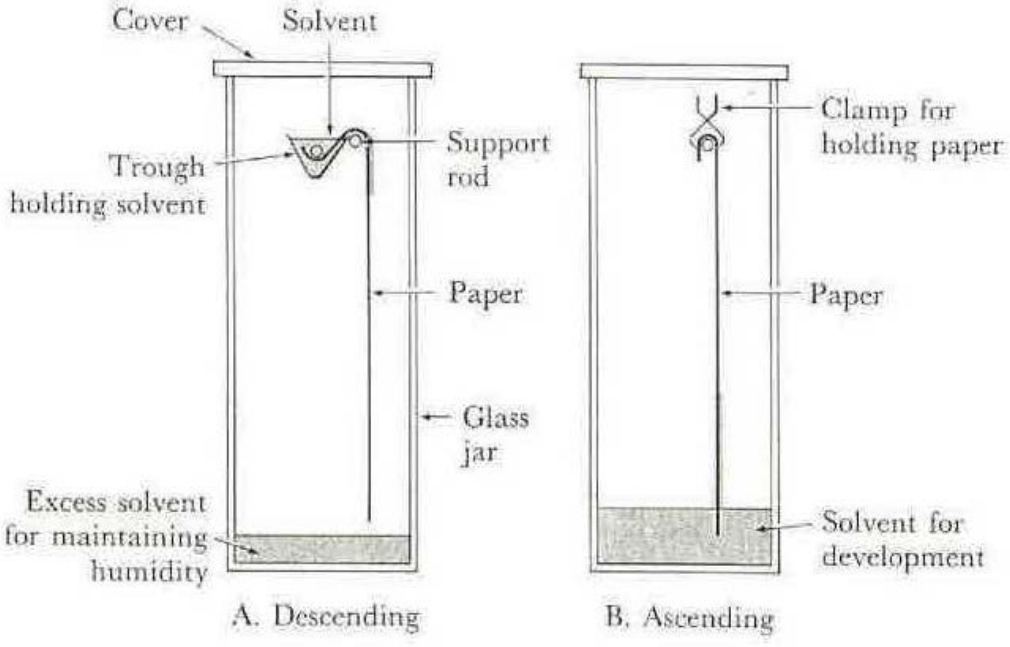
شود که خود این عمل عاملی است برای تعیین جدا سازی ترکیبات). میزان حلالیت ماده بستگی به فاز متحرک دارد. بعد از این که حلال (جلوتر از مواد مورد نظر حرکت کرده) (شکل ۴- ۶ را ببینید) به نقطه نزدیک انتهای دیگر کاغذ رسید، کاغذ را برداشته و خشک می کنند. در این حالت با روش های رنگامیزی باید نقاط به دست آمده را تعیین کرد و موقعیت آنها را علامت گذاری نمود. فاصله طی شده مربوط به یک نقطه و حلال جلوتر را با R_f نشان می دهند. مقادیر R_f بستگی به ماده، کاغذ و حلال دارد.

کروماتوگرافی کاغذی را می توان هم توسط جریان رو به بالا و هم توسط جریان رو به پایین حلال انجام داد. در اینجا، تفاوت کوچکی وجود دارد بین کیفیت کروماتوگرام و انتخاب این دو بر حسب انتخاب شخصی انجام می گیرد. کروماتوگرافی رو به پایین ۲ مزیت دارد : (۱) سریعتر انجام می شود. چون نیروی جاذبه به حرکت حلال کمک می کند. (۲) برای جداسازی موادی که مقدار آن بسیار کم است ممکن است R_f کوچک شود، لذا نیاز به عمل طولانی خواهد داشت که با این روش تفکیک نقاط بهتر انجام می شود. تنها اشکال این عمل آن است که باید مراقب بود تا اتصالات قطع نشوند. گردوغبار یا تماس ضعیف در جایی که کاغذ از روی محافظ عبور می کند منجر به جریان ناهمگون می کند، در نتیجه موجب رگه رگه شدن جریان می گردد.

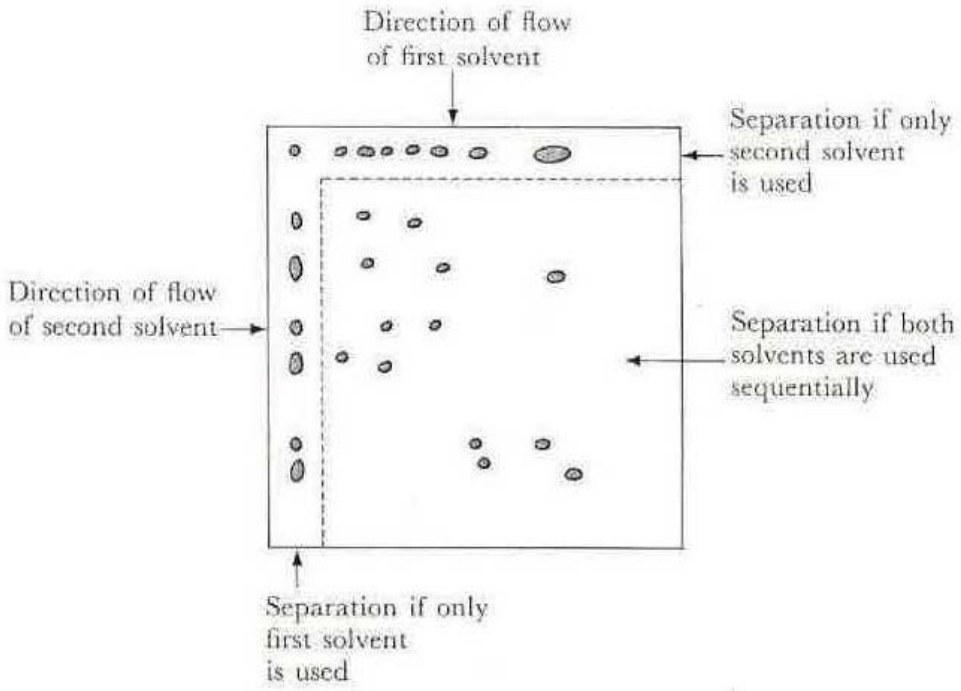


شکل ۴-۶ کروماتوگرافی کاغذی

یکی از انواع کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی کاغذی دوبعدی است. در این روش، بعد از آن که کروماتوگرافی در یک جهت به پایان رسید، کاغذ را خشک می کنند و سپس با استفاده از یک حلال دیگر، از سمت راست نقطه شروع جریان قبلی، دوباره کروماتوگرافی می کنند (شکل ۴- ۸). در این روش، موادی که قادر نبودند در حلال اولی جداشوند، در حلال دومی از هم جدا می شوند.



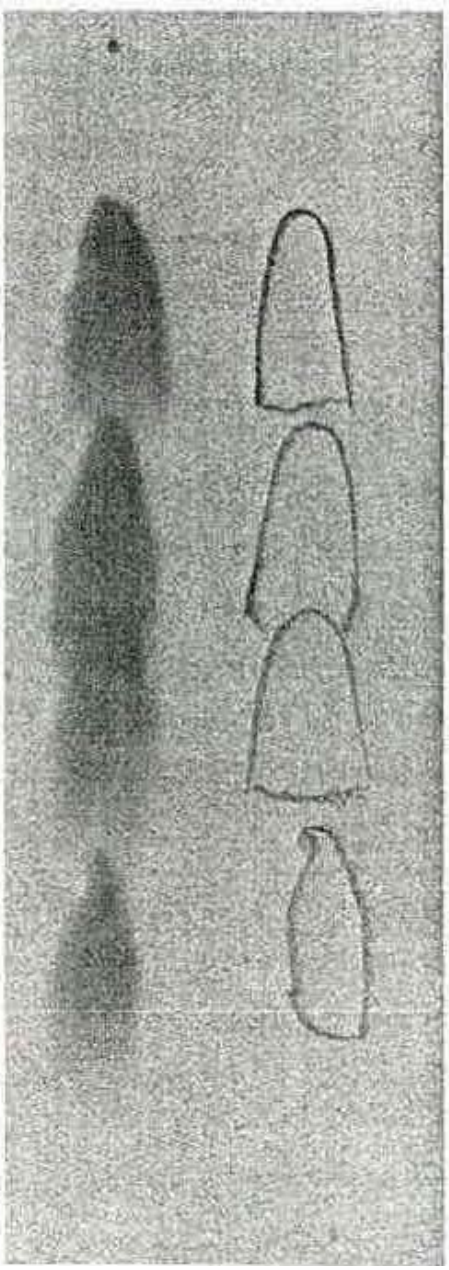
شکل ۴- ۷ کروماتوگرافی کاغذی پایین رو و بالا رو



شکل ۴- ۸ کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی

تعیین و تشخیص نقاط

نقاط روی کروماتوگرام را می توان از روی رنگ آنها، فلورسانس بودن آنها و واکنش های شیمیایی که بعداً روی کاغذ توسط اسپری کردن معرف های مختلف اتفاق می افتد و یا به وسیله فعالیت رادیو اکتیویته جستجو کرد (شکل ۴- ۹).



شکل ۴- ۹ جداشدن چهار آمینو اسید به وسیله کروماتوگرافی کاغذی. کاغذ را خشک کرده با نینهیدرین رنگ ظاهر می شود. نقطه شروع توسط یک نقطه نشان داده شده است. در ستون سمت راست محل هر آمینو اسید ترسیم گردیده است.

جستجوی اتورادیوگرافی نقاط با فیلم اشعه X نیز صورت می گیرد. تشخیص معمولاً بر پایه مقایسه با R_f های شناخته شده استاندارد صورت می گیرد. شستشو معمولاً همراه با بریدن نقاط و خیساندن آنها در حلال مناسب انجام می شود. این کار اغلب به روش های کمی صورت می گیرد.

روش انگشت نگاری: روش به خصوصی از کروماتوگرافی کاغذی برای مطالعه پروتئین ها

یک مساله مهم در زیست مولکولی، تشخیص یک پروتئین تخلیص شده یا تشخیص محل آمینو اسید تغییر یافته در یک پروتئین جهش یافته است. روش انگشت نگاری توسط ورنون اینگرام[1] کامل شد. او از روش نسبتاً ساده ای استفاده کرد.

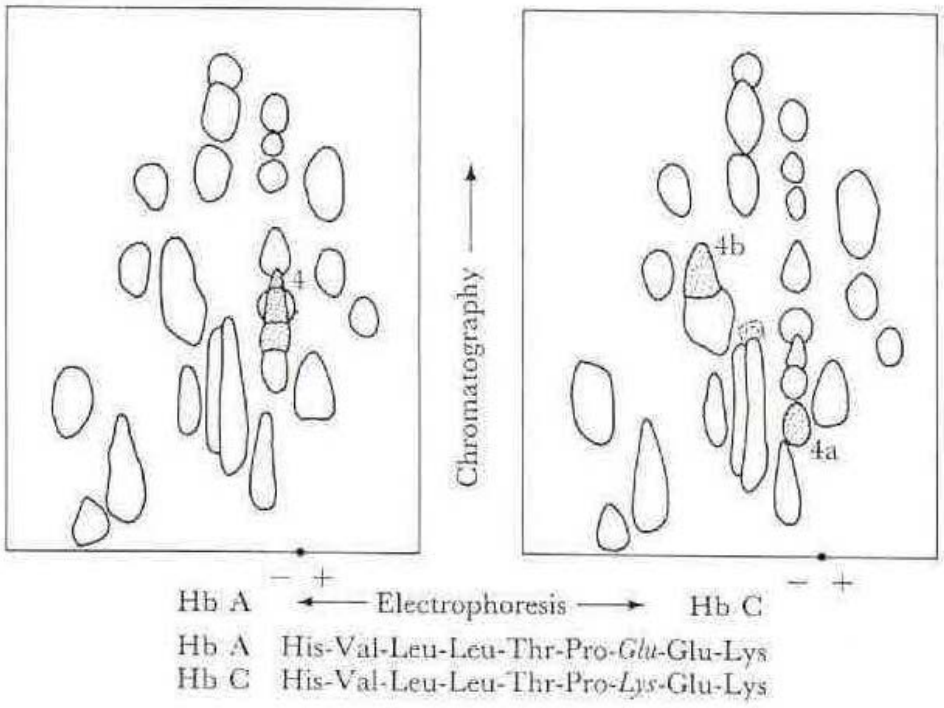
اگر یک پروتئین تحت شرایط معین، به وسیله پروتئاز های گوناگون هضم شود (آنزیم هایی که پیوندهای پپتیدی را می شکنند)، پپتیدهای کوچک به وجود می آیند. تعداد و نوع پپتیدها بستگی به پروتئین ها و پروتئازهای ویژه دارد (به عنوان مثال، پروتئاز ممکن است شکستگی خاصی در آمینو اسید ویژه ای یا گروهی از آمینو اسیدها به وجود آورد). پپتیدها را می توان به وسیله کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی جدا کرد. این نقشه پپتیدی را انگشت نگاری می نامند که مثالی از آن در شکل ۴- ۱۰ نشان داده شده است.

انگشت نگاری یک پروتئین جهش یافته که فقط یک آمینو اسید آن تغییر کرده تفاوت زیادی با انگشت نگاری همان پرو تئین وقتی به صورت طبیعی باشد، خواهد شد (شکل ۴- ۱۰). اگر تغییر آمینو اسید روی محل اثر پروتئاز بی تأثیر باشد، یک نقطه در انگشت نگاری نا پدید می شود و یک نقطه جدید ظاهر می گردد. اگر این آمینو اسید تغییر یافته، روی جایگاه اثر پروتئاز تاثیر گذارد، چندین نقطه ظاهر می شوند. با شستشو دادن نقاط طبیعی و جهش یافته و تعیین ترکیب آمینو اسید هر کدام، آمینو اسیدهای مبادله شده را می توان تعیین کرد (این کار را می توان روی کاغذ کروماتوگرافی به وسیله هیدرولیز کامل آنزیمی آمینو اسیدها انجام داد).

روش انگشت نگاری کاربردهای زیادی در زیست شناسی مولکولی داشته است که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد :

[1] Vernon Ingram

ثابت می کند که پروتئین مثلاً (A) محصول تقسیم شدن یک پروتئین بلندتر (B) است. اگر همه نقاط در یک انگشت نگاری پروتئین A در پروتئین B یافت شوند، مثل این است که پروتئین A، بخشی از ترادف آمینو اسیدهای پروتئین B باشد. از این رو، یا با افزودن اسید های آمینه، پروتئین B از پروتئین A ساخته شده، یا A به وسیله هیدرولیز از پروتئین B استخراج شده، معمولاً، مطالعات سینتیکی سنتز A و B می تواند این احتمالات را از یکدیگر تمیز دهد.



شکل ۴-۱۰) هضم دو هموگلوبین مختلف انسان توسط تریپسین. بعد از کروماتوگرافی کاغذی دو بعُدی با استفاده از روش الکتروفورز آزمایش فوق اثبات شد. پپتیدی که در هموگلوبین A مشخص شد، در هموگلوبین C حذف گردید و دو پپتید جدید 4a و 4b ظاهر شد. تغییر Glu به Lys باعث هضم پپتید ۴ توسط تریپسین شده است.

تعیین هویت آمینو اسیدهای جاسازی شده به وسیله انواع مختلف tRNA های سرکوبگر

جهش های ویژه ای باعث ایجاد نقص در ترادف آمینو اسیدهای انتهای زنجیر (یا خاتمه) می شوند.این آمینو اسیدهای انتهایی در حضور مولکول های tRNA سرکوبگر[1] به صورتی برگردانده می شوند که باعث جایگزین شدن یک آمینو اسید در جایگاه انتهایی (خاتمه) نا بالغ شده و بنابراین به سنتز ادامه داده و به پایانه طبیعی دست می یابند. پروتئینی که به وجود می آید دارای یک آمینو اسید جایگزین شده است. با انگشت نگاری این پروتئین ها می توان آمینو اسید جاسازی شده توسط هر یک از tRNA های سرکوبگر را تعیین کرد.

شناسایی تغییرات بازی ایجاد شده به وسیله عوامل جهش زای ویژه

از آنجا که کدهای ژنتیکی به خوبی شناسایی شده اند، امکان شناسایی تغییرات بازی ایجاد شده که باعث تولید جهش های ویژه می شود، وجود دارد. به عنوان مثال، یک عامل جهش زا را در نظر بگیرید که باعث ایجاد تغییرات متناوب از فنیل آلانین به ایزولوسین می شود. ترادف های سه تایی کد کننده برای فنیل آلانین روی DNA عبارتند از AAA و AAG و برای ایزولوسین عبارت است از TAA و TAG و TAT. از آنجا که در بیشتر جهش ها فقط یک باز تغییر می یابد، یک عامل جهش زای ویژه، باعث جایگزینیT به جای A خواهد شد.

کروماتوگرافی لایه نازک

برای سهولت جدا سازی مواد مختلف، روش های جدیدی پیشنهاد گردید و یکی از روش های ساده و ارزان کروماتوگرافی لایه نازک[2] (TLC) است. کروماتوگرافی کاغذی سریعتر از کروماتوگرافی ستونی است ولی چون کاغذ ها را می بایست فقط از محصولات سلولزی تهیه کرد، برای مواد غیر قطبی ارزش چندانی ندارد.کروماتوگرافی لایه نازک همان مزیت های کاغذ را دارد اما

[1] Suppressor
[2] Thin- layer chromatography

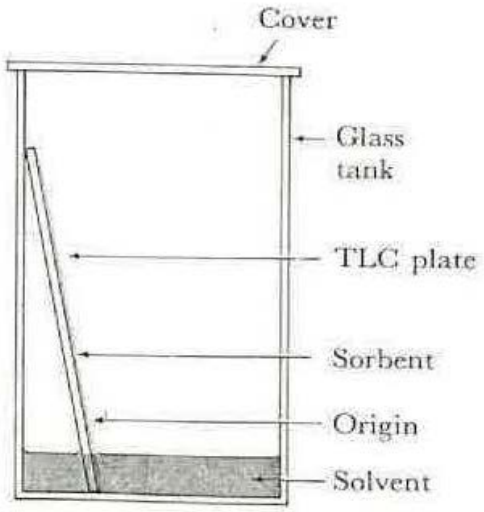
استفاده از هر ماده ای را که بتواند به خوبی تقسیم شود و تشکیل یک لایه پوشاننده را بدهد، ممکن می سازد.این شامل مواد غیر آلی مثل ژل سیلیکا، اکسید آلومینیم و سیلیکات منیزیم و مواد آلی نظیر: سلولز، پلی آمید و پودر پلی اتیلن می شود.

در کروماتوگرافی لایه نازک، فاز ساکن یک لایه ای است (۰/ ۵ mm – ۰/ ۲۵) که قابلیت جذب دارد و به صورت یکنواخت بر روی سطح شیشه یا صفحه پلاستیکی، پخش شده است .صفحات را به روش زیر آماده می کنند (اگرچه صفحات آماده از انواع مواد جذب کننده وجود دارد و از نظر تجاری در دسترس هستند و استفاده عمومی دارند).

ماده جذب کننده[1] در حلال های مختلف ساخته می شود و می توان حلال ویژه ای برای آن انتخاب کرد. برای نمونه های بسیار کوچک، یک لام میکروسکوپ را در محلول حاوی ماده جاذب فرو می برند، در نتیجه روی لام، یک لایه نازکی از ماده جاذب قرار می گیرد. برای کروماتوگرافی نمونه های بزرگتر، چندین لایه از ماده جاذب روی شیشه قرار می دهند.

برای تهیه صفحه کروماتوگرافی، محلولی که حاوی ماده جاذب است را با استفاده از وسیله ای که ضخامت ماده جاذب روی آن مشخص شده، روی شیشه ریخته و ماده جاذب به طور یکنواخت پخش می شود. آنگاه شیشه را خشک می کنند. با استفاده از یک میکروپیپت از نمونه روی صفحه شیشه ای حاوی ماده جاذب یک لکه می گذارند. صفحه TLC را در محفظه ای قرار می دهند که شامل حلال است (شکل ۴– ۱۱). بعد از این که حلال به نقطه بالا رسید، صفحه را از محفظه برداشته و خشک می کنند. اگر نتیجه کار مطلوب باشد، صفحه خشک شده را از سمت گوشه های راست توسط حلال دوم (کروماتوگرافی دو بعدی) دوباره کروماتوگرافی می کنند.

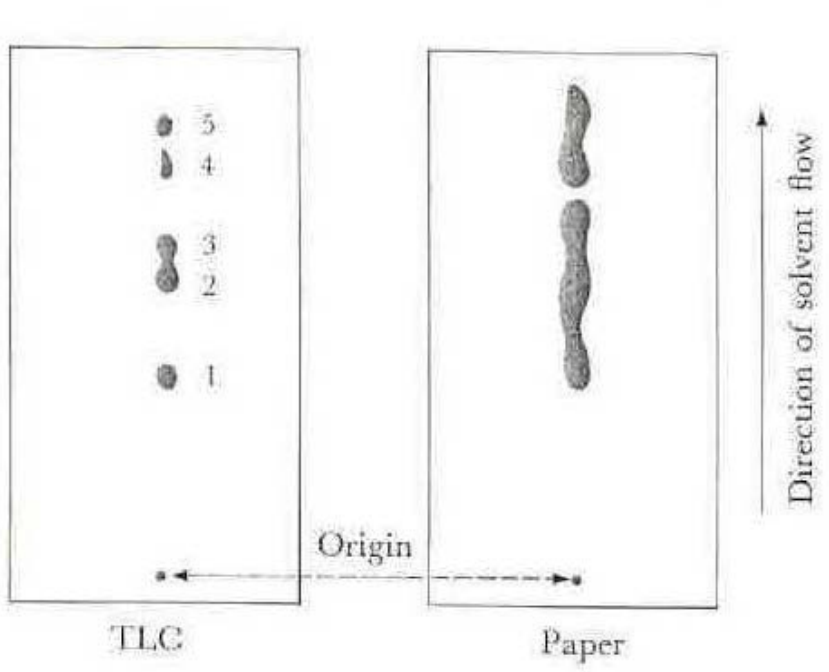
[1] Sorbent



شکل ۴- ۱۱ کروماتوگرافی لایه نازک

نقاط ایجاد شده در کروماتوگرافی کاغذی یا به واسطه رنگ طبیعی خود آنها قابل تشخیص هستند یا به وسیله مواد فلورسانس، و یا به وسیله اسپری کردن واکنشگرهای متعدد که می توانند با مواد موجود در نقاط روی صفحه واکنش داده و رنگ ایجاد کنند. اسپری های مورد استفاده در این عمل و برای ایجاد رنگ عبارتند از : نینهیدرین برای اسید های آمینه، ردامین B برا ی چربی ها، کلرید آنتیموان برای استروئید ها و ترپنوئید ها، اسید سولفوریک گرم برای اغلب مواد آلی، پرمنگنات پتاسیم در اسید سولفوریک برای هیدروکربن ها، انیسالدهید[1] در اسید سولفوریک برای کربوهیدرات ها، بخار برمین برای اولفین ها و غیره. مواد جدا شده روی صفحه کروماتوگرافی را می توان تراشید و پودر حاصل را در حلال مناسب حل کرد (شکل ۴- ۱۲).

[1] Anisaldehyde



شکل ۴-۱۲ مقایسه جداسازی ترکیبات مختلف توسط کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک:
(۱) ادنین، (۲) ادنوزین ، (۳) هیپوگزانتین ، (۴) اینوزین ، (۵) یوریدین.
(ماده جاذب سلولز و حلال آب است)

کروماتوگرافی لایه نازک موارد استفاده زیادی دارد زیرا در مقایسه با کروماتوگرافی کاغذی یا ستونی فواید زیر را دارا است :

قدرت حلالیت بیشتر (چون نقاط کوچکترند)، سرعت بیشتر جداسازی، انتخاب طیف وسیعتر مواد به عنوان مواد جاذب و یافتن آسانتر مواد و جدا کردن راحت مواد از کروماتوگرام.

دو عامل در افزایش قدرت حلالیت کروماتوگرافی لایه نازک موثرند: اولی، نسبت وزن ماده جاذب به وزن ماده حل شده یعنی به نسبت ۱ از ماده حل شده به $۱۰^{۴}$ – $۱۰^{۳}$ از ماده جاذب است در حالی که در ستون کروماتوگرافی این نسبت به طور طبیعی۱ : ۵۰ است. دوم این که، چون می توان ماده جاذب را بسیار نازک تهیه کرد (کمتر از mm ۰/۱)، نسبت سطح به حجم بسیار بالا است، یک منطقه فعال بزرگ برای یک مقدار داده شده از جاذب به وجود می آید. ذراتی با چنین اندازه کوچکی را نمی توان در

ستون ها استفاده کرد زیرا وزن ماده باعث فشردگی و مسدود شدن وکند شدن جریان می شود. این عمل باعث پخش شدن ماده حل شده می شود در نتیجه پخش مواد حل شده افزایش می یابد.

کروماتوگرافی کاغذی به مواد سلولزی محدود می شود و یا آن دسته از مواد نادری که می توان از آنها کاغذ تهیه کرد. کروماتوگرافی لایه نازک محدودیت کمتری دارد. اگر چه حتی برای کروماتوگرافی با موادی که می توانند به صورت کاغذ در بیایند، کروماتوگرافی لایه نازک برتری دارد زیرا سریع تر است و حلالیت بهتری دارد. مشکلی که در مورد کاغذ ها وجود دارد این است که ساختار فیبری آنهاست. خاصیت موئینگی یکپارچه فیبرها منجر به افزایش اندازه لکه می شود. مواد به کار رفته در کروماتوگرافی لایه نازک را می توان با ساییدن نرم کرد تا ساختار فیبری کاهش پیدا کند. با کاهش نقاط (لکه ها) به دست آمده، زمان انجام آزمایش کاهش می یابد زیرا زمان کمتری صرف می شود تا لکه ها از هم جدا شوند. کروماتوگرافی لایه نازک معمولاً در مدت چند دقیقه انجام می شود. این امر یک مزیت ویژه است برای مثال اگر نمی دانیم کدام حلال برای این عمل کروماتوگرافی مفید است، می توان در مدت یک روز تمام حلال های موجود را آزمایش کرد و به حلال مورد نیاز دست یافت.

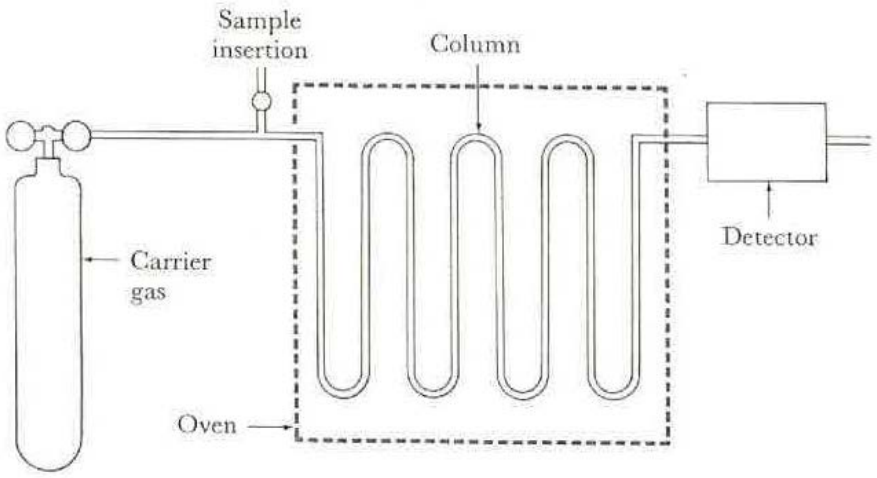
اندازه کوچکتر لکه ها به این معنی است که ماده موجود در یک نقطه غلیظ تر است، بنا براین مقدار کمتری از ماده قابل جستجو است. در حقیقت، برای بیشتر مواد، کروماتوگرافی لایه نازک حدود ۵۰ تا۱۰۰ برابر حساستر از کروماتو گرافی کاغذی است و نمونه های کوچکی تا حدود یک نانومول قابل اندازه گیری هستند. در مورد آمینو اسیدها، مقدار ماده مورد نیاز یک دهم همان ماده با کروماتوگرافی کاغذی است. اگر نمونه های کوچک پروتئین های خالص شده برای تحلیل آمینو اسید یا پپتید خیلی کم باشد، کروماتوگرافی لایه نازک روش مفیدی است. برای نوکلئوتید ها، حدود یک صدم میزان مورد نیاز نسبت به کروماتوگرافی کاغذی مصرف می شود.

کروماتوگرافی گاز _ مایع

در انواع کروماتوگرافی تفکیکی که تا به حال شرح دادیم، نمونه در یک فاز متحرک مایع حمل می شود که از یک فاز ساکن مایع عبور می کند، مایع به وسیله جذب، غیر متحرک می شود (به وسیله حمایت یک جامد). در کروماتوگرافی گاز_ مایع[1] (GLC) فاز متحرک یک گاز است، فاز ساکن مجدداً یک مایع جذب شده به سطح داخلی یک لوله یا ستون و یا ممکن است به یک محافظ جامد مثل پودر تفلون، یا دانه های ریز شیشه ای باشد.

به عنوان مثال، دانه های شیشه ای را در یک محلول پلی اتیلن موجود در حلال اتر فرو می برند. وقتی که اتر بخار شود هر دانه با پلی اتیلن گلیکول پوشیده می شود. در دماهای به کار رفته برای کروماتوگرافی گاز – مایع، پلی اتیلن گلیکول ذوب می شود و روی دانه ها مثل یک فیلم مایع قرار می گیرد. نمونه انتخاب شده برای کروماتوگرافی روی این ماده قرار می گیرد و توسط گازهای بی اثر مثل هلیوم، آرگون یا نیتروژن پس از تبخیر حرکت خواهد کرد. بنابراین نمونه را در کوره حرارت می دهند. این مخلوط گازی از لوله عبور می کند (شکل ۴– ۱۳). برای انجام آزمایش از ستون لوله ای شکل با قطر تقریباً ۰/۵ cm و طول ۱ تا۲۰ متر استفاده می شود. گاهی از لوله های موئین با طول ۳۰ تا ۱۰۰ متر یا لوله هایی با طول ۲ کیلومتر استفاده می شود. ترکیبات بخار شده به طور دائم یکدیگر را بین فاز متحرک گازی و فاز ساکن مایع، مطابق با ضریب تفکیک شان پخش می کنند و به این وسیله کروماتوگرافی می شوند. در انتهای ستون یک آشکار ساز مناسب قرار دارد.

[1] Gas- liquid chromatography



شکل ۴-۱۳ دستگاه کروماتوگرافی گاز – مایع

شناسایی مواد خروجی

از سه نوع آشکار ساز به طور معمول در کارهای تحلیلی استفاده می شود: سل[1] قابلیت هدایت گرمایی (حساسیت حدود μg ۱۰)، آشکار ساز یونی آرگون (حساسیت حدود μg $۱۰^{-۵}$) و آشکار ساز یونی شعله ای (حساسیت حدود μg $۱۰^{-۵}$). عمل سل قابلیت هدایت گرمایی بر پایه این اصل است که مقاومت الکتریکی یک سیم، بستگی به دما دارد. اگر یک گاز با یک سرعت ثابت از یک سیم داغ عبور کند سیم تا دمای تعیین شده به وسیله سرعت جریان و قابلیت هدایت گرمایی گاز، سرد می شود. از این رو در سرعت ثابت جریان، دما و مقاومت ثابت باقی می مانند و مشخص هستند. حال اگر ترکیب گاز تغییر کند، قابلیت هدایت گرمایی گاز تغییر می کند در نتیجه مقاومت آن نیز تغییر می نماید. معمولاً منحنی آن به روی یک دستگاه ثبت منحنی بر حسب زمان جریان گاز رسم می شود.

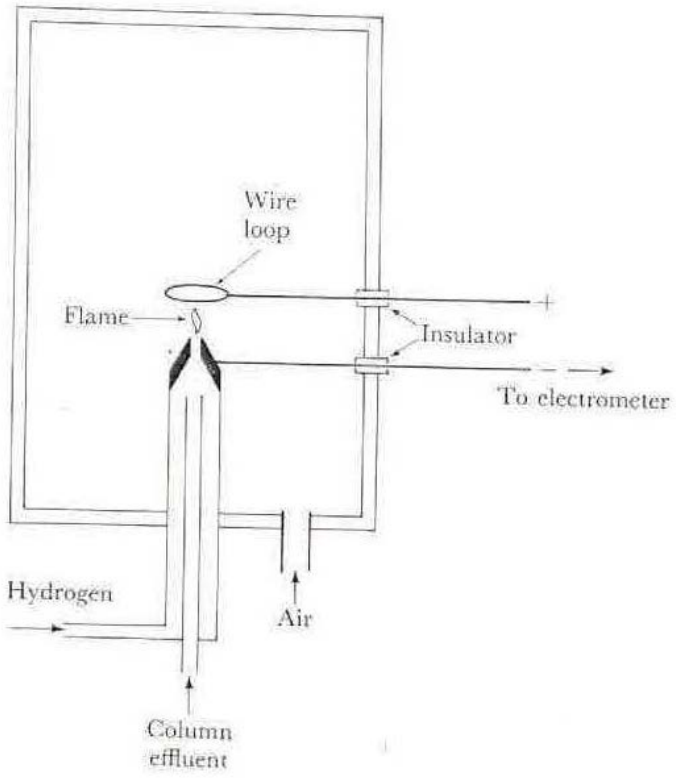
دریک آشکار ساز یونی آرگون، گازآرگون از محفظه آشکارساز عبور می کند که شبیه شمارشگر گایگر ـ مولر است. در این روش گاز آرگون توسط ذرات بتا بمباران می شود. گاز آرگون در اثر برخورد ذرات بتا به الکترون های اوربیتالی در نتیجه یک الکترون از دست می دهد و تبدیل به یون مثبت می شود. الکترون حاصل (که بار منفی دارد) به طرف آند حرکت می کند و یون مثبت آرگون به کاتد نزدیک می شود. یون مثبت آرگون هنگام حرکت به سمت کاتد، یک الکترون را دریافت کرده و خنثی می

[1] Cell

گردد. حال فرض کنید نمونه مورد نظر گاز بوتان باشد که در اثر حرارت دادن به وجود آمده است. گاز بوتان دارای پتانسیل یونیزاسیون کمتری نسبت به گاز آرگون است. یون های مثبت آرگون با بوتان نیز می توانند برخورد کرده و یک الکترون از بوتان بگیرند و خنثی شوند پس یون مثبت بوتان به وجود می آید. این یون به طرف کاتد (قطب منفی) حرکت کرده و یک الکترون بر می دارد در نتیجه خنثی می شود. انرژی حاصل از این عمل باعث شکستن مولکول بوتان شده و تولید اشعه x می کند و یون های آرگون بیشتری به وجود می آیند. این امر در تولید دائم یون ها کمک می کند (خودشان یون های بعدی را تولید می کنند). بنابراین یک جریان ثابت توسط لوله گایگر _ مولر ایجاد می شود. شکستن پیوندهای شیمیایی باعث می شوند که جریان بین الکترون ها کاهش یابند.

جریان فوق اندازه گیری شده و به صورت تابعی از زمان رسم می شود. یک کالیبراسیون نیز به عنوان آشکار ساز انتهایی مورد نیاز است. حساسیت این نوع آشکار ساز μg ۱/ ۰است.

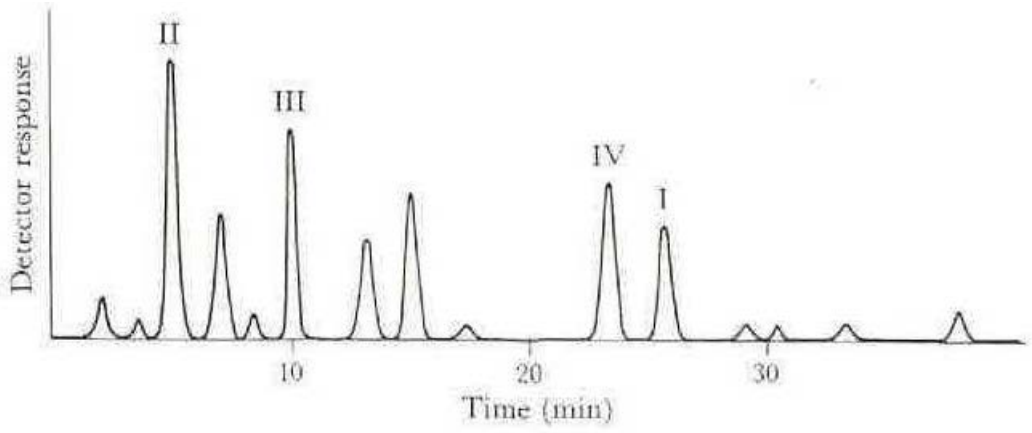
آشکار ساز یونی شعله ای به طور شماتیک در شکل ۴-۱۴ نشان داده شده است.گاز هیدروژن با هوا در حضور ستون خروجی می سوزد. هر مقدار کربنی که در نمونه وجود داشته باشد سوخته و به دی اکسید کربن تبدیل می شود. به دلایلی که معلوم نیست، الکترون ها و یون های منفی تولید می شوند و به صورت یک جریان آشکار می شوند که این جریان تبدیل به اختلافات پتانسیل می شود. این آشکار ساز به صورت خطی عمل می کند از mg ۰/۰۱ تا mg ۵ از ماده مورد نظر را مشخص کرده و اتم های کربن را نیز می توان تعیین نمود. یک نوع کروماتوگرام گازی در شکل ۴-۱۵ نشان داده شده است.



شکل ۴-۱۴ آشکار ساز شعله ای

تعیین مقدار مواد و تشخیص آنها با استفاده از کروماتوگرافی گاز – مایع

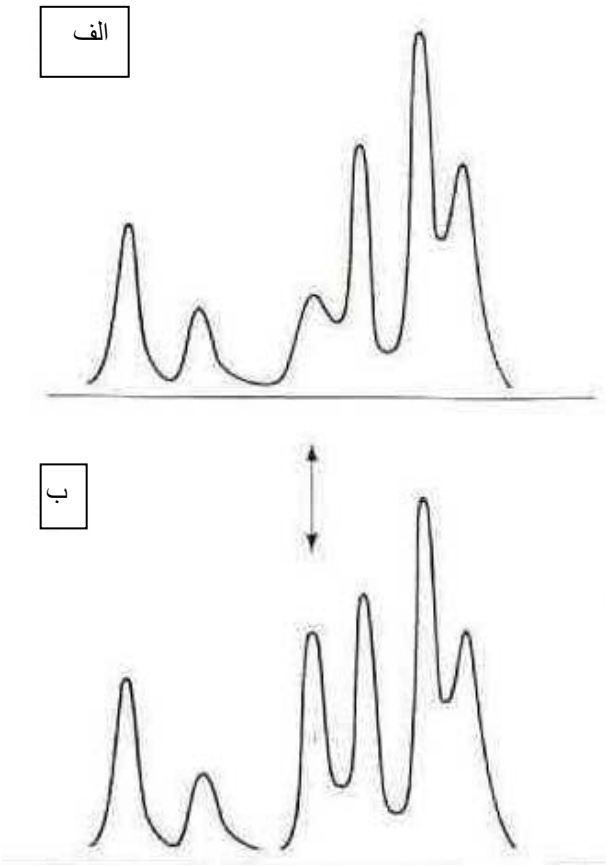
هر آشکارسازی مقدار ماده خارج شده از ستون را به عنوان تابعی از زمان بیان می کند. اگر چه، به طور مستقیم هویت ماده ای که یک پیک ویژه را تولید می کند، نشان نمی دهد و یا مقدار موجود در پیک را بیان نمی کند ولی روش های مختلفی برای تشخیص پیک ها وجود دارند. به عنوان مثال، اگر مواد موجود در یک مخلوط شناخته شده باشند (و هدف کروماتوگرافی تعیین مقدار هر یک از اجزا باشد)، ما باید یک نمونه معلوم که شامل تمام مواد موجود در ماده مجهول است، تهیه می کنیم. در این نمونه مقدار هر یک از مواد را می دانیم. حال در دستگاه کروماتوگرافی گاز – مایع قرار داده و پیک ها را به دست می آوریم. یک بار دیگر این عمل را انجام داده منتهی مقدار یکی از مواد را افزایش می دهیم در نتیجه پیک حاصل از کروماتوگرافی تغییر کرده و به این ترتیب می توان متوجه شد که کدام یک از پیک های مجهول متعلق به این ماده بود (شکل ۴– ۱۶).



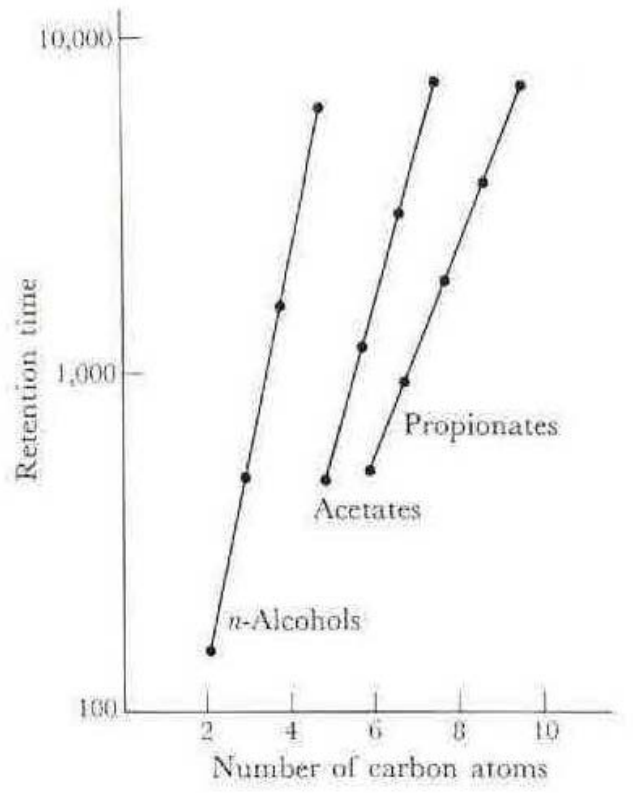
شکل ۴-۱۵ گاز کروماتوگرافی استرهای متیل اسیدهای چرب که از کبد موش صحرایی با تزریق ۲۵ mM گلوکز و ۲ mM آراشیدونات تهیه شده است (I)پنتا دکانوآت (II) قبل از هموژنیزه کردن اضافه شد و عصاره کبد جهت اندازه گیری اسید های چرب از نمونه اولیه به دست آمد. متیل هپتا دکانوآت (III) به مخلوط قبل از گاز کروماتوگرافی اضافه شد. از آشکار ساز شعله ای استفاده گردید. پیک (IV) وقتی حیوان اسید های چرب آزاد به آنها داده شوند، به وجود می آید.

اگر پیک ها، قسمت هایی از یک سری هومولوگ باشند (به عنوان مثال، اتیل استراز های اسید های چرب)، لگاریتم زمان تأخیر

(به عنوان مثال، زمان بین تزریق نمونه و ظهور آن روی آشکار ساز) به صورت تابعی از تعداد اتم های کربن رسم می شود (شکل۴- ۱۷) و معمولاً یک خط مستقیم به دست می آید. با افزودن یک یا ۲ سری هومولوگ استاندارد، یک کالیبراسیون برای کروماتوگرام به دست می آید. البته، این روش فقط موقعی استفاده می شود که تمام مواد، اجزای یک سری هومولوگ باشند.



شکل ۴-۱۶ تشخیص پیک در اثراضافه کردن مواد با استفاده از گاز کروماتوگرافی. مخلوط حاوی (۱) فنل، (۲) O _ کرزول، (۳)p _ کرزول (۴) m _ کرزول، (۵) ۲و ۴ _ زیلنول (۶) ۲و۵ _ زیلنول. (الف) نمونه فوق کروماتوگرافی شد در (ب) p- کرزول اضافه گردید.



شکل ۴-۱۷ منحنی ها نشان می دهند که لگاریتم زمان تأخیری با تعداد اتم های کربن به طور خطی تغییر می کند.

تعیین هویت مواد مجهول مشکل است ویک روش عمومی برای این کار وجود ندارد. گاهی جریان گاز به داخل محلول های مورد آزمایش وارد شده و تشکیل حباب می دهد که ایجاد رنگ های ویژه ای مربوط به گروه های خاصی را می کند (مثلاً الکل، آلدهید و غیره). روش دیگر شامل تناوب شیمیایی و دوباره کروماتوگرافی کردن در مقابل استاندارد های مختلف یا تحلیل به وسیله دیگر روش های فیزیکی است. این کار وقتی انجام می شود که مواد به کار رفته قابل حدس زدن باشند. البته، در شناسایی مواد، معمولاً لازم است که از یک آشکارسازی استفاده شود که باعث تخریب مواد مورد نظر نگردد (به عنوان مثال سل قابلیت هدایت گرمایی).

تعیین کمی مقدار ماده موجود در یک پیک یک روند رو به جلو نیست. برای هر ترکیب داده شده، مقدار ماده متناسب با سطح پیک است. اگر چه نسبت ثابت با هر ماده تغییر می یابد. از این رو، قبل از همه لازم است که قادر باشیم ماده موجود در پیک را

شناسایی کنیم. بعد از آن برای تعیین کمّی لازم است که منحنی استاندارد تهیه شود که در آن، مقادیر مختلف یک ماده ویژه کروماتوگرافی می شود و یک منحنی برحسب سطح پیک نسبت به مقدار ماده رسم شود.

مزیت های کروماتوگرافی گاز _ مایع

جداسازی مواد به خوبی توسط روش کروماتوگرافی گاز – مایع انجام می شود. حساسیت و سرعت آن فوق العاده است. $۱۰^{-۱۲}$ گرم برای بسیاری از مواد قابل جستجو است. از آنجا که سرعت پیشرفت کروماتوگرام ها بستگی به سرعت انتشار بین فاز های متحرک و ثابت دارد و به علت این که سرعت انتشار گاز ها بیشتر از مایعات است، کروماتوگرام گازی تقریباً هزار برابر زودتر از کروماتوگرافی ستونی انجام می شود. از این رو، جداسازی در کمتر از یک دقیقه پایان می پذیرد. با استفاده از یک آشکار ساز غیر مخرب و غلیظ کردن نمونه ها در پایان مجموعه، قادر خواهیم بود از کروماتوگرافی گاز – مایع استفاده کنیم.

کاربرد های کروماتوگرافی گاز _ مایع

کروماتوگرافی گاز – مایع را می توان با هر ماده ای که قابل فعال شدن باشد، انجام داد. این شامل هزاران ترکیب آلی می شود. مواد غیرفعال را نیز می توان آزمایش کرد در صورتی که به مواد فعال تبدیل شوند. این کار به وسیله اکسیداسیون، اسیدی کردن یا قلیایی کردن و غیره انجام می شود. کاربرد اصلی در نمونه های زیستی عبارت است از جداسازی الکل ها، استرها، اسیدهای چرب و آمین ها. از این رو، در مطالعه مواد حد واسط در متابولیسم و کار بر روی مکانیسم های واکنش آنزیم ها، ارزش ویژه ای دارد. این روش در تشخیص ترکیبات موجود درعطر ها و جستجوی مواد آفت کش در مواد زیستی کاربرد فراوانی داشته است.

کروماتوگرافی گاز – مایع نقش مهمی در تحلیل های مواد آلی دارد. به عنوان مثال کربن و هیدروژن را می توان با دقت ۰/۵ و ۰/۱ در صد تعیین کرد. این کار به وسیله سوزاندن نمونه در یک جریان اکسیژن بدون CO_2 و H_2O و تعیین مقدار CO_2 و H_2O انجام می شود. همچنین می توان گروه هایی که وظیفه مشخصی در یک ترکیب دارند را شناسایی نمود. به عنوان مثال گروه های آلکوکسی[1] را می توان با یُد دار کردن ترکیب مورد نظر و تشکیل آلکیل یُدید[2] که به راحتی مشخص می شود، تعیین

[1] Alkoxy
[2] Alkyl iodiede

کرد. موقعیت یک پیوند دوگانه را نیز می توان به وسیله شکستن پیوند به وسیله اکسیداسیون یا از تولید و کروماتوگرافی محصولات تعیین نمود.

کروماتوگرافی با استفاده از ژل

ژل کروماتوگرافی[1] (گاهی اوقات کروماتوگرافی غربال مولکولی می گویند) یک نوع مخصوص کروماتوگرافی تفکیکی است که در آن جداسازی بر پایه اندازه مولکولی است.

مقدمه :

اصول ژل کروماتوگرافی کاملاً ساده است. یک ستون را از ذرات کوچک یک ماده ثابت که منافذ ریزی دارد تهیه می کنند. اگر محلولی حاوی مولکول هایی با قطرهای متفاوت باشد، مولکول های کوچکتر می توانند وارد منافذ ژل شده و دیرتر از ستون خارج شوند (شکل ۴- ۱۸). ولی مولکول های بزرگتر در فضاهای بین ذرات ژل قرار گرفته و به راحتی عبور می کنند چون توسط مواد داخل ستون نگه داشته نمی شوند. مولکول های کوچکتر وارد منافذ ژل شده و در داخل و خارج ذرات ژل پخش می شوند و با کاهش اندازه مولکولی، انتشار آنها افزایش می یابد. با استفاده از این روش، هم زمان با پایین آمدن ذرات از ستون، حرکت آنها کاسته می شود.

چون مواد سازنده ژل، مولکول های نمونه را جذب نمی کنند، احتمالاً نفوذ، عامل اصلی تعیین سرعت حرکت در ستون است. از این رو مولکول ها از ستون به علت کاهش اندازه آنها خارج می شوند. اگر شکل آنها ثابت باشند (به عنوان مثال، کروی یا میله ای)، با کاهش جرم مولی می توان انتظار داشت که دیرتر از ستون خارج شوند.

در تحلیل جزئیات راه کار ژل کروماتوگرافی، واضح است که طرز قرار گرفتن مولکول ها تأثیر می گذارد. اگر چه عامل اصلی، به تنهایی رفتار کروماتوگرافی مولکول ها را توضیح نمی دهد. عامل مهم دیگر بار الکتریکی مولکول ها است، اگر چه فقط در قدرت های یونی بسیار پایین هنگامی که مولکول های کوچک بسیار بار دار با وجود قطر کافی منافذ بیرون از آنها می مانند، اثر بار

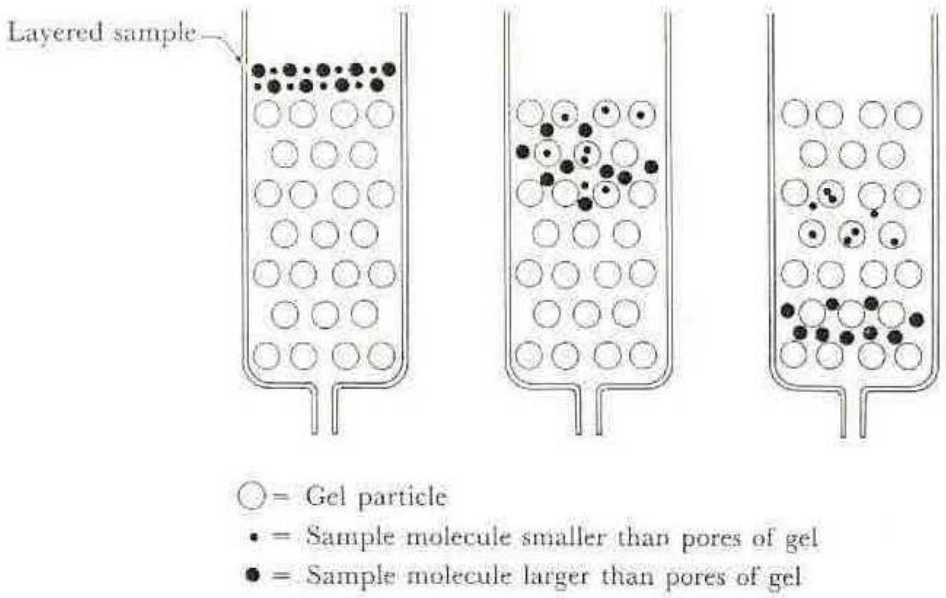
[1] Gel chromatography

الکتریکی خود را نشان می دهد. احتمالاً این امر ناشی از دافعه الکترواستاتیکی بین مولکول ها است، بنابراین با کاهش تعداد مولکول ها در یک منفذ همراه است. در قدرت های یونی بسیار پایین، به طور روشن، تأثیرات جذبی با چند نوع ژل وجود دارد.

مواد ژل کروماتوگرافی

ژل یک شبکه سه بعدی درست می کند که معمولاً ساختار آن تصادفی است. ژل های به کار رفته به عنوان وضعیت فضایی مولکولی شامل پلیمر های عرضی که عموما خنثی هستند، با ماده ای که مورد تحلیل قرار می گیرد واکنش نمی دهند و بی بار هستند. فضای داخل ژل با مایع پُر شده و این مایع بیشتر حجم ژل را پُر می کند. ژل های به کار رفته سه نوع اند: دکستران، آگاروز و پلی آکریل آمید. این نوع ژل ها برای محلول های آبی کاربرد دارند. دکستران پلی ساکاریدی است که از مازاد گلوکز تخمیر شده به وسیله سوکرز مصرفی میکروارگانیسم لوکونوستوک مزانتروئیدس به وجود می آید. دکستران با درجات مختلف پیوند های عرضی جهت کنترل اندازه منافذ ساخته می شود و به صورت دانه های خشکی با درجات متفاوتی از ظرافت عرضه می شوند که وقتی به آنها آب اضافه شود، متورم می شوند. تورم روندی است که به وسیله آن منافذ با مایعی که باید به عنوان شستشو به کار رود، پُر شوند. این ماده تحت نام تجاری سفادکس در دسترس است.

آگاروز (که از جلبک های دریایی خاص به دست می آید) پلیمر خطی D – گالاکتوز و ۳ و۶ _ انیدرو – ۱– گالاکتوز است که ژل در می آید. این ژل به وسیله پیوند های هیدروژنی و بدون کمک اتصالات عرضی ایجاد می شود. این ماده در آب جوش حل می شود و وقتی سرد شود به صورت ژل در می آید. غلظت ماده موجود در ژل، اندازه منافذ را تعیین می کند که این منافذ بسیار بزرگتر از منافذ سفادکس هستند. اندازه منافذ این ژل آن را برای جداسازی پروتئین های بزرگ کروی یا مولکول های بزرگ خطی مانند DNA مناسب می سازد. آگاروز به عنوان یک ژل جامد غیر قابل استفاده است زیرا سرعت جریان در آن بسیار کم است. بنابراین به عنوان دانه های سفاروز توسط شرکت فارماسیا و بیو– ژل A توسط شرکت Bio- Rad به فروش می رسد.



شکل ۴–۱۸ جداسازی دو مولکول از میان ستونی که حاوی ژل با منافذ ریز است.

ژل های پلی آکریلامید به وسیله اتصال های عرضی آکریلامید با N و N– متیلن – بیس – آکریلامید تهیه می شوند. اندازه منفذ به وسیله درجه اتصال عرضی تعیین می شود. این ژل ها با ژل های دکستران و آگاروز فرق دارند زیرا آنها به طور یک در میان دارای یک گروه کربوکسیل آمید قطبی روی اتم های کربن هستند. اما خاصیت جداسازی آنها مانند ژل های دکستران است. ژل های پلی آکریلامید که با نام Bio- gel P به فروش می رسند (Bio- Rad laboratories)، به نظر می رسد که مانند دکستران ها مفید باشند، اگر چه کمتر به طور متناوب مورد استفاده قرار می گیرند. آنها مزیتی علاوه بر دکستران ها دارند از این جهت که از نظر تجارتی با طیف وسیعی از اندازه های منافذ در دسترس هستند. دانه های منفذ دار شیشه ای (Bio – Glas, Bio- Rad laboratories) که اخیراً برای محلول های آبی مورد استفاده قرار می گیرند، امروزه، انجام آزمایش با آنها محدود شده است.

ژل هایی که در بالا توضیح داده شد، در آب و یا حلال های آلی گلیکول، فرمآمید و دی متیل سولفوکسید متورم می شوند. این ژل ها را نمی توان در الکل خالص، هیدروکربن ها و بسیاری از حلال های آلی قطبی و غیر قطبی، متورم کرد. اگر چه، موادی

مثل چربی ها، استروئیدها و ویتامین های خاص را راحتتر می توان در این حلال ها به دست آورد. چندین ژل برای این منظور به وجود آمده اند. برای انجام ژل کروماتوگرافی با استفاده از حلال های آلی غیر قطبی، ژل پلی استیرنی ساخته شده که می توان در آن پیوندهای عرضی به وجود آورد به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار می گیرد (شرکت شیمیایی DOW را styrage Bio –beads, Bio- Rad laboratories). برای حلال های آلی قطبی، ژل سفادکس متیله شده (methylated sephadex) وجود دارد. از یک هیدروکسی پروپیل مشتق شده از دکستران با پیوندهای عرضی (sephdex LH) می توان هم برای حلال های قطبی و هم حلال های غیر قطبی استفاده کرد.

جدول ۴– ۲ موادی که در ژل کروماتوگرافی استفاده می شوند.

مواد و نام تجاري	محدوده وزن مولكولي
دكستران:	
سفادكس G- 10	۷۰۰
سفادكس G- 25	۱۰۰۰ – ۵۰۰۰
سفادكس G- 75	۳۰۰۰ – ۷۰۰۰۰
سفادكس G- 200	۵۰۰۰ – ۸۰۰۰۰۰
پلي آكريلاميد:	
بيو – ژل P- 2	۲۰۰ – ۲۰۰۰
بيو – ژل P- 6	۱۰۰۰ – ۶۰۰۰
بيو – ژل P- 150	۱۵۰۰۰ – ۱۵۰۰۰۰
بيو – ژل P- 300	۶۰۰۰۰ – ۴۰۰۰۰۰
آگاروز:	
سفاروز 2B	۲×۱۰^{۶} – ۲۵×۱۰^{۶}
سفاروز 4B	۳×۱۰^{۶} – ۳×۱۰^{۵}
بيو – ژل A- 0.5 M	۳۰۰۰۰ – ۵۰۰۰۰۰
بيو – ژل A- 150 M	۵×۱۰^{۶} – ۱۵۰×۱۰^{۶}

اندازه منافذ، حدود جرم مولی ترکیبات تفکیک شده را تعیین می کند. درجدول ۴–۲ بعضی از مواد مورد استفاده در ژل کروماتوگرافی آمده اند. معمولاً در انتخاب ماده مناسب هیچ مشکلی وجود ندارد. اگر چه، دانه های ژل در اندازه های مختلف تولید می شود: بزرگ، متوسط، نازک و بسیار نازک. هر قدر دانه (یا اندازه ژل) بزرگتر باشد، سرعت جریان بیشتر است و حل شدن مجدد ضعیفتر. از این رو، اگر حداکثر انحلال مجدداً مورد نیاز باشد از دانه های ژل بسیار ریز استفاده می شود. به عنوان مثال، در کارهای تحلیلی از دانه های کوچک برای اغلب کارهای آماده سازی که در آن ستون ها بزرگ نیستند و سرعت جریان را

نمی توان تغییر داد، استفاده می شود. از ذرات بزرگتر برای آماده سازی وسیع که در آنها دوباره حل شدن کمتر از زمان اهمیت دارد، استفاده می شود.

مزیت های ژل کروماتوگرافی

برای جداسازی مولکول هایی که جرم مولی آنها متفاوت است، ژل کروماتوگرافی به دلایل زیر بهتر است:

(۱) از آنجا که رفتار کروماتوگرافی همه مواد روی ژل ها از دما، pH ، قدرت یونی و ترکیب تامپون مستقل است کروماتوگرافی را می توان تحت هر شرایطی انجام داد. برای موادی که بسیار ناپایدار هستند (مثل آنزیم ها) ایجاد شرایط پایدار در این نوع کروماتوگرافی چندان مشکل نیست.

(۲) از آنجا که هیچ جذبی توسط ژل صورت نمی گیرد، مواد بسیار ناپایدار تحت تأثیر کروماتوگرافی قرار نمی گیرند. به عنوان مثال، بعضی از آنزیم ها به وسیله اتصال به سطوح جذبی یا رزین های تعویض یونی، غیر فعال می شوند ویا تغییر می یابند.

(۳) در این کروماتوگرافی پخش منطقه ای نسبت به دیگر روش های کروماتوگرافی کمتر است (به دلایلی که معلوم نیست).

(۴) حجم خروجی (یعنی جحمی که ماده حل شده همراه با حلال خارج می شود) به روش ساده جرم مولی گزارش می شود.

تخمین جرم مولی

در مورد انواع مختلفی از ژل ها دیده شده که موقعیت یک پارامتر، K در مقابل لگاریتم M (جرم مولی) به جز در مورد مولکول های بسیار کوچک و بسیار بزرگ یک خط مستقیم به وجود می آورد (شکل ۴- ۱۹). امروزه، تنها موارد انحراف، ترکیبات آروماتیک کوچک، مولکول های به شدت باردار در قدرت های یونی بسیار پایین (کمتر از ۰/۰۱) و تعداد کمی مولکول های میله ای شکل مثل کلاژن و فیبرینوژن هستند. در فرمول زیر K چنین تعریف شده می شود:

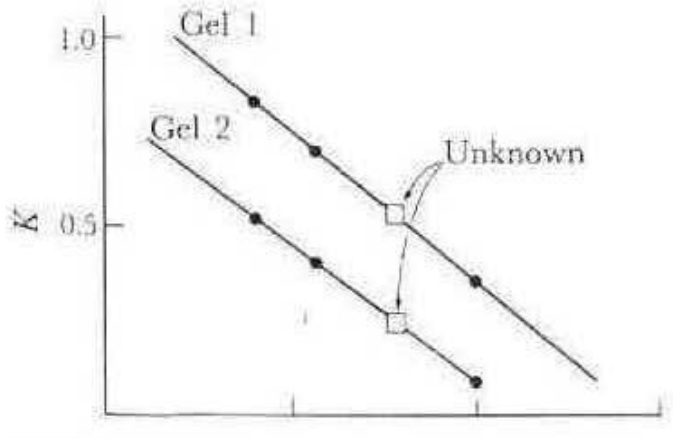
$$K = \frac{V_e - V_o}{V_s}$$

در فرمول فوق V_e حجم حلال مورد نیاز برای خروج مولکول مورد نظر است، V_o حجم خالی یا حجم مورد نیاز برای خروج مولکولی است که به سرعت از ستون خارج شده است و V_s حجم فاز ثابت می باشند. در ژل کروماتوگرافی، حجم ژل (که اغلب بیشتر از منافذش می باشد) را با V_s نشان می دهند. V_o معمولاً به وسیله عبور دادن ماده خروجی با وزن مولکولی بالا مثل دکستران بلو،از میان ستون، اندازه گیری می شود. V_t حجم کل ستون است.

$$V_t = V_s + V_o$$

$$V_s = V_t - V_o$$

در مورد پروتئین های کروی و بسیاری از کربوهیدرات ها، این روش، هنگامی که انواع مختلف سفادکس و Bio-gel P استفاده می شوند بسیار معتبر است. از همه مهمتر، به موازات سنجش پروتئین، می توان M را از عصاره های سلولی تفکیک نشده نیز تخمین زد، در حالی که اغلب روش ها به نمونه های بسیار خالص احتیاج دارند. از این رو، تعیین M، به طور ساده نیاز به چندین مولکول M شناخته شده دارد تا منحنی با خط مستقیم به دست آید. دقت این عمل حدود ۱۰٪ است.



شکل ۴-۱۹ تعیین جرم مولی پروتئین با استفاده از دو ژل مختلف.

تعیین پخش یک ماده در ژل به خصوصیات پلیمرهای طبیعی و سنتزی بستگی دارد. باز هم در روش های فیزیکی مثل سانتریفیوژ کردن، نیاز به ماده خالص داریم. اگر چه، با ژل کروماتوگرافی تعیین پخش فقط به وسیله سنجش مقدار ماده، به عنوان تابعی از حجم خروجی امکان پذیر است. این کار به وسیله آماده سازی یک منحنی کالیبراسیون و استفاده از یک تصحیح ریاضی برای ناحیه پخش قابل انجام است.

کاربردهای ژل کروماتوگرافی

اصولاً، ژل کروماتوگرافی یک روند جداسازی است و کاربرد وسیع در خالص سازی آنزیم ها وپروتئین های دیگر و تفکیک اسید های نوکلئیک دارد. ژل های دکستران برای پروتئین های ناپایداری که قبلاً توضیح داده شدند ارزش مخصوصی دارند. در هنگام آماده سازی، از دکستران ها و پلی آکریلامیدها در حجم های مختلفی مثلاً در حد چندین لیتر استفاده می شوند. برای اهداف صنعتی، از ستون هایی با حجم ۱۰۰۰ لیتر استفاده شده است. مولکول RNA در بعضی از ویروس ها، به طور موفقیت آمیز تفکیک و خالص شده اند (به وسیله ژل های آگاروز).

در مقیاس های وسیع خالص سازی ماکرومولکول ها که در آن انواع مختلف روندهای تفکیک مورد نیاز است، اغلب لازم است نمک ها حذف گردند، تامپون ها را تغییر داد، غلیظ کرد و موادی مثل فنل و دترژانت های به کار رفته در جداسازی و تخلیص اسید های نوکلئیک را از محیط پاک کرد.این کار، اتلاف وقت است (مثلاً با رسوب دهی) و به این دلیل می تواند در عدم وجود نمونه های ناپایدار نتیجه دهد. در این موارد ژل کروماتوگرافی یک راه بسیار سریع را برای به انجام رسانیدن این عمل فراهم می سازد. به عنوان مثال نمک ها و مولکول های کوچک را به سرعت می توان حذف نمود زیرا آنها به وسیله همه ژل ها نگه داشته می شوند. تعویض تامپون را می توان فقط با عبور دادن یک محلول ماکرومولکولی از یک ستون که قبلاً با تامپون مورد نظر متعادل شده باشد، انجام داد. از آنجا که ماکرومولکول ها از روی ژل راحتتر از ترکیبات اصلی تامپون عبور می کنند، اگر تامپونی مناسب انتخاب شود، این ماکرومولکول های به آسانی خارج می شوند. غلیظ کردن ماکرو مولکول ها را به آسانی می توان با اضافه کردن ذرات ژل خشک و استفاده از نوع ماده ای که اندازه منافذش کمتر از مولکول های مورد آزمایش باشد انجام داد. به محض این که ذرات متورم می شوند، آب جذب می کنند ولی ماکرومولکول ها جذب آنها نمی شوند، بنابراین یک روش بسیار

خوب برای تغلیظ ماکرومولکول ها می باشد. در بیشتر روند های تغلیظ ماکرومولکول ها، مشکلی که وجود دارد آن است که نمک ها هم غلیظ می شوند و نمک بیش از حد می تواند منجر به تغییر بعضی ماکرومولکول ها گردد (گاهی باعث دناتوره شدن پروتئین ها می شوند). اگر از این نوع ژل ها استفاده شود، هیچ مشکلی به وجود نمی آید چون نمک ها را مانند آب جذب می کنند.

مثال های ویژه از ژل کروماتوگرافی

۱ _ در سنتز شیمیایی شناساگر های مختلف، معمولاً لازم است که محصول از واکنش گرها جدا شود. به عنوان مثال، برای آماده سازی آنتی بادی های فلورسنت، می توان آن را با ماده ایزو تیو سیانات فلورسانت ترکیب کرد در نتیجه پروتئینی خواهیم داشت که یک ماده فلورسنت به آن متصل است. حال باید آن را از ایزوتیو سیانات هایی که وارد واکنش نشده اند، جدا کرد. این کار را می توان به وسیله سفادکس، با به کار بردن ژل هایی که پروتئین های بزرگ را در حجم زیاد از خود عبور می دهند، انجام داد. البته پروتئین هایی که در این واکنش شرکت نکرده اند را نمی توان از پروتئین های مورد نظر جدا نمود. در کل، برای روش آنتی بادی فلورسنت، این عمل معمولاً لازم نیست.

۲_ در سنجش آنزیم ها یا تعیین کوفاکتور مورد نیاز، آماده سازی آنزیم، اغلب شامل باز دارنده هایی (مهار کننده هایی) با اندازه مولکولی کوچک (یا خود کوفاکتور ها) هستند. همچنین، در مطالعات فیزیکی بعضی مولکول ها (مثلاً، در اسپکتروسکوپی فلورسنت)، مواد مزاحم ممکن است وجود داشته باشند. چنین مولکول های کوچکی به آسانی توسط دکستران یا ژل های پلی آکریلامید حذف می شوند.

۳_ اگر مولکولی با جرم مولی زیاد باعث آلوده کردن مولکول های کوچکتر در مخلوط، شده باشد، در چنی مواردی دکستران های با منافذ کوچک مفید خواهند بود. همچنین، اغلب پروتئین ها باید از اسیدهای نوکلئیک رها شوند، این کار را اغلب می توان با استفاه از ژل آگاروز که از همه پروتئین ها ممانعت به عمل می آورد و اسیدهای نوکلئیک را عبور می دهد، انجام داد.

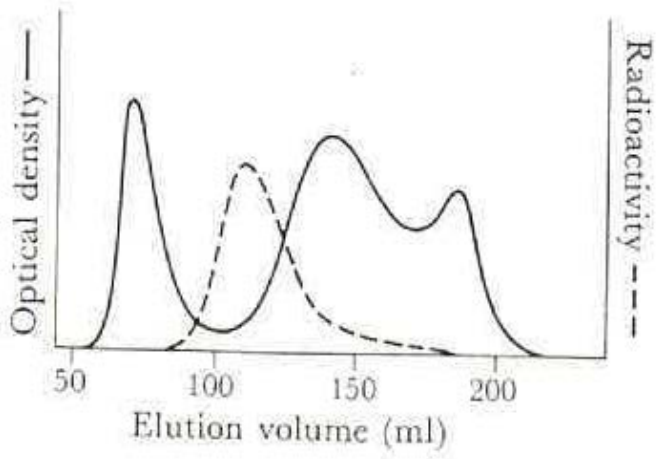
۴_ در اکثر تجزیه و تحلیل های فیزیکی مربوط به اسیدهای نوکلئیک، نمونه مورد نظر باید عاری از پروتئین باشد. این کار نیز به سادگی انجام پذیر است.

۵ _ عمومی ترین کاربرد ژل کرو ماتوگرافی در خالص سازی پروتئین ها است. برای خالص کردن یک پروتئین از یک عصاره سلولی، لازم است که توالی از روند های جداسازی که بر پایه پارامتر هایی مثل قابلیت حلالیت در محلول های ویژه، بار الکتریکی، جرم مولی و غیره هستند، استفاده شوند. مرحله ای که درآن جداسازی بر حسب اندازه انجام می گیرد، اغلب از ژل کروماتوگرافی استفاده می شود. ژل کروماتوگرافی یک ابزار با ارزش تحلیلی است. تعیین جرم مولی یک مثال مهم آن است. مثال های دیگر عبارتند از :

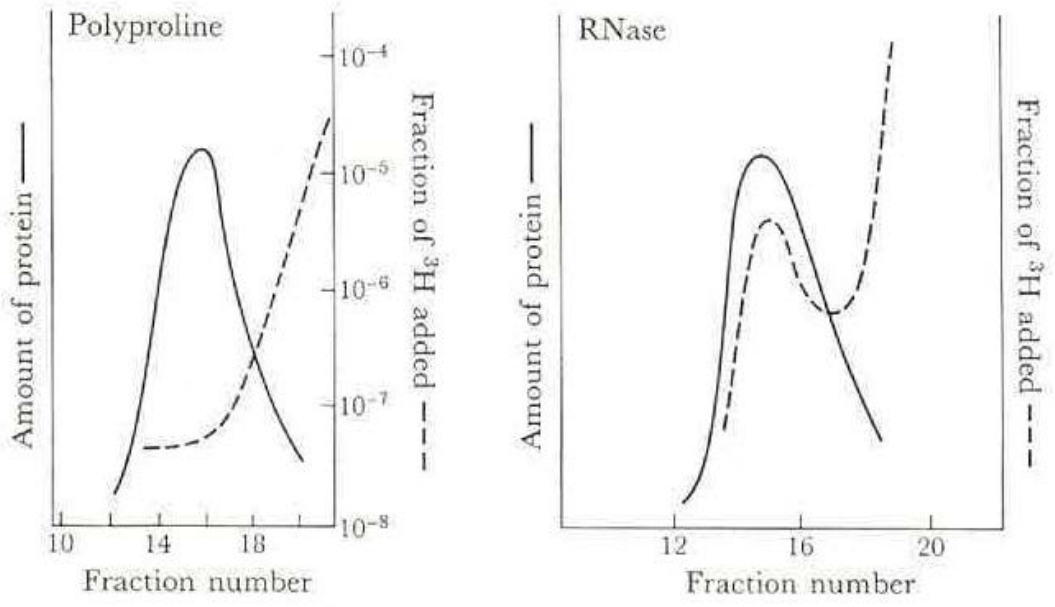
الف _ در مطالعه متابولیسم RNA، بخش های مختلف RNA به وسیله سانتریفیوژ منطقه ای مشخص می شوند و یا حتی به وسیله الکتروفورز های ژل پلی آکریلامید هم می توان انجام داد. ژل کروماتوگرافی با آگاروز نیز کاربرد فراوانی دارد. یک مثال از آن در شکل ۴- ۲۰ نشان داده شده است.

ب_ بخش های پروتئین پلاسما اغلب باید به طور کمّی در تشخیص بیماری های خاص تعیین شوند. این کار مستقیماً به وسیله ژل های دکستران انجام می شود.

ج_ روش تعویض تریتیوم برای تعیین محل های فعال پروتئین یا DNA – برای انجام این عمل درشت مولکول ها را خیلی سریع از ^3H_2O جدا می کنند. این کار در ظرف ۱۰ ثانیه با استفاده از ژل های بار دار قابل انجام است. زیرا ^3H_2O به طور محکم در همه ژل ها نگه داشته می شوند. اگر کوچک ترین اندازه منفذ به کار برده شود، درشت مولکول ها به سرعت خارج می شوند. یک مثال در شکل ۴ – ۲۱ نشان داده شده است.



شکل ۴- ۲۰ جداسازی اسیدهای نوکلئیک با استفاده از کروماتوگرافی روی سفاروز. سلول های KB را با پلی ویروس نشان دار شده P^{32} آلوده کرده سپس سلول های لیز شده و اسید های نوکلئیک خالص شدند. در طول موج ۲۶۰ nm اسید های نوکلئیک کل تعیین گردیدند.RNA پولیو توسط رادیو اکتیو مشخص شد. پیک ها از چپ به راست به ترتیب عبارتند از: DNA سلول KB، RNA پولیو، مولکول rRNA سلول های KB، tRNA سلول های KB.



شکل ۴- ۲۱ آزمایش تعویض ^3H . پلی پرولین و RNAase به مدت چندین ساعت در ^3H_2O اینکوبه شدند تا حداکثر تعویض انجام شود. نمونه را در H_2O قرار داده و در زمان های مختلف توسط ستون سفادکس G- 2γ جداسازی پروتئین و ^3H_2O انجام شد. در منحنی سمت چپ ^3H دیده نمی شود ولی در سمت راستRNAase پیوند شده به ^3H وجود دارد.

دــ ژل کروماتوگرافی را می توان در مطالعه اتصال بین پروتئین ها و مولکول های کوچک مورد استفاده قرار داد. این عمل به وسیله جداسازی محصول از واکنشگرها یا به وسیله عبور دادن پروتئین از ستونی که با مولکول کوچک به تعادل رسیده صورت می گیرد. با یک محاسبه ساده می توان اتصال های تثبیت شده را تعیین کرد. ارزش زیاد ژل کروماتوگرافی در مطالعه تعادل شیمیایی، آن است که یک ستون ژل می تواند در طیف وسیعی از غلظت ها، pH، قدرت یونی و حرارت انجام شود زیرا اندازه منفذ ژل تحت تاثیر این عوامل قرار نمی گیرد.

کروماتوگرافی ژل لایه نازک

همان طور که قبلاً بیان شد، کروماتوگرافی لایه نازک مزیت هایی مثل جداسازی سریع، حساسیت زیاد و تجهیزات ساده دارد. این روش به سرعت جانشین کروماتوگرافی کاغذی به عنوان یک روش تحلیلی شد.کروماتوگرافی ژل لایه نازک (**TLG**)[1] از این جهت به کروماتوگرافی لایه نازک شبیه است که یک لایه نازک از ماده روی یک صفحه شیشه ای پخش می شود، نمونه به صورت لکه در می آید و یک فاز متحرک لایه را طی می کند. اگر چه، اختلاف های مهمی بین این دو وجود دارد :

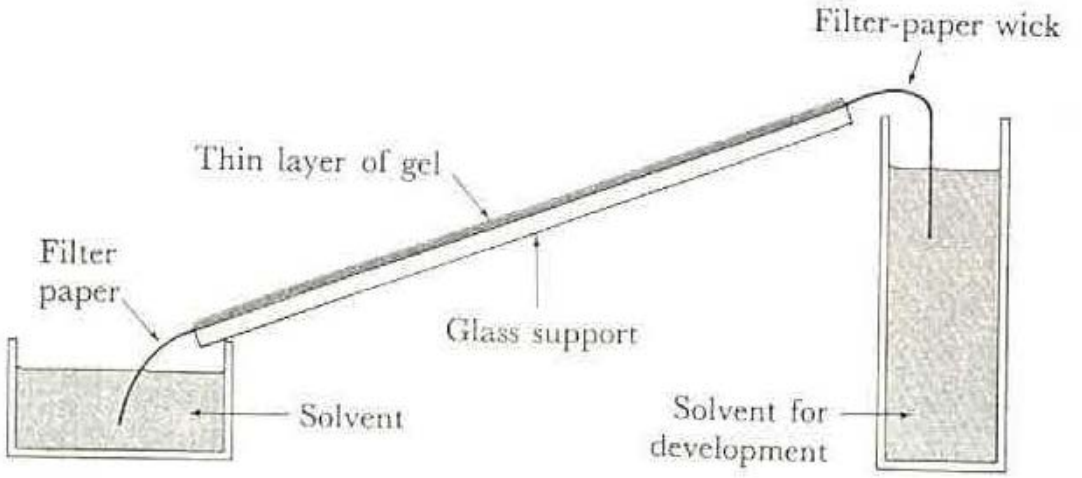
۱ _ در کروماتوگرافی لایه نازک، ماتریکس را قبل از استفاده نمونه خشک می کنند. اگر چه، ژل ها را نمی توان خشک کرد چون به راحتی دوباره آب جذب می کنند، ولی در کروماتوگرافی ژل لایه نازک، نمونه روی یک لایه مرطوبی که با حلال مناسب متعادل شده به صورت لکه لکه در می آید.

۲_ کروماتوگرافی لایه نازک به وسیله یک فاز متحرک بالارو (یا پائین رو) انجام می شود درحالی که در کروماتوگرافی ژل لایه نازک روش پایین رو استفاده می شود. صفحه را در یک محفظه محکم و متصل به یک مخزن در دو انتها با پل های کاغذ صافی قرار می دهند (شکل ۴- ۲۲). مایع از میان لایه باسرعتی که توسط زاویه مشخصی تعیین می شود (معمولاً $^{\circ}$ ۲۰) عبور می کند. مانند کروماتوگرافی لایه نازک، جریان، قبل از این که ماده به مخزن پایینی برسد تمام می شود اگر چه، در اینجا یک جریان دائمی مایع وجود دارد، بنابراین برخلاف کروماتوگرافی لایه نازک، در این روش هیچ حلال جلویی وجود ندارد. بنابراین اندازه گیری مقادیر$\mathbf{R_f}$ نخواهیم داشت و موقعیت ها را با اضافه کردن استاندارد ها اندازه گیری می کنند.

[1] Thin layer gel chromatography

کاربردهای TLC

کروماتوگرافی لایه نازک اصولاً برای آمینو اسیدها، قندها، الیگوساکارید ها، چربی ها و سایر مولکول های کوچک استفاده می شود. ژل کروماتوگرافی لایه نازک برای پروتئین ها، چربی ها، اسید های نوکلئیک، و سایر مواد آب دوست بزرگ مناسب است.



شکل ۴- ۲۲ **کروماتوگرافی ژل لایه نازک**

مهمترین کاربرد کروماتوگرافی لایه نازک در تعیین جرم مولی پروتئین و پپتیدها است. آزمایش هایی شبیه به آنچه که در شکل ۴- ۱۹ مشاهده می فرمایید می توان طراحی کرد.

ژل کروماتوگرافی لایه نازک در تشخیص های کلینیکی برای جستجو پروتئین های بیماری زا در سرم خون، مایع مغزی نخاعی و ادرار استفاده می شود. البته این روش در سنجش خلوص پروتئین ها، آنزیم ها و غیره استفاده می شود. مطلب در مورد کروماتوگرافی لایه نازک محدود است، ولی استفاده از این روش رو به فزونی است.

کروماتوگرافی تعویض یونی

یک تعویض کننده یونی، جسم جامدی است که گروه های شیمیایی بارداری دارد که به آنها یون ها به طور الکترواستاتیکی متصل اند، این جسم جامد می تواند جای این یون ها را یا یون های دیگر محلول آبی عوض کند. تعویض کننده های یونی را می توان در ستون کروماتوگرافی برای جداسازی مولکول ها بر حسب بارشان استفاده کرد.

اصول کروماتوگرافی تعویض یونی آن است که مولکول های بار دار، به طور برگشت پذیری به تعویض کننده های یونی متصل می شوند بنابراین با تغییر محیط یونی، این مولکول های بار دار می توانند به ستون متصل یا از آن خارج شوند. جداسازی روی تعویض کننده های یونی، معمولاً طی دو مرحله انجام می شود: ابتدا، مواد مورد نظر را به تعویض گر متصل می کنیم، این عمل تحت شرایطی انجام می شود که یک اتصال پایدار و محکم تری ایجاد شود، سپس ستون به وسیله تامپون هایی با pH هایی مختلف یا قدرت یونی متفاوت شسته می شود و ترکیبات تامپون، برای اشغال جایگاه های اتصال با ماده متصل شده رقابت می کنند.

خواص تعویض کننده های یونی

یک تعویض کننده یونی، معمولاً یک شبکه سه بعدی است که حاوی گروه های بارداری است که با هم پیوند های کووالانی داده اند. اگر یک گروه دارای بار منفی باشد، یون های مثبت را مبادله می کند و یک تعویض کننده کاتیونی است. یک نوع گروه به کار رفته در تعویض کننده های یونی گروه سولفونیک، SO_3^- است. اگر یک H^+ این گروه متصل شود، گفته می شود که تعویض کننده به فرم اسیدی است، به عنوان مثال می تواند یک H^+ را با یک Na^+ یا دو H^+ رابا یک Ca^{2+} عوض کند. گروه اسید سولفونیک را یک تعویض کننده قوی کاتیون اسیدی می نامند. سایر گروه های متداول هیدروکسیل فنل و کربوکسیل هستند که هر دوی آنها تعویض کننده های کاتیون اسیدی ضعیفی هستند.

اگر گروه باردار مثبت باشد (مثلاً یک گروه آمینی) یک تعویض کننده قوی آنیونی است. معمولاً تعویض کننده های آنیونی ضعیف گروه های آروماتیک یا گروه های آلیفایتک آمینی هستند. ماتریکس می تواند از مواد مختلفی ساخته شود. متداول ترین مواد به کار رفته عبارتند از: دکستران، سلولز و پلیمرهایی از جنس استیرن و وینیل بنزن که در آن دی وینیل بنزن با رشته های پلی استیرن و هم با گروه های باردار پیوند عرضی برقرار کرده است. جدول ۴- ۳ ترکیب شیمیایی برخی از تعویض کننده های یونی متداول را نشان می دهد.

ظرفیت یک تعویض کننده یونی، توانایی آن را برای برداشتن یون های قابل تعویض، اندازه گیری می کند و معمولاً به صورت میلی اکی والان های گروه های قابل تعویض در میلی گرم وزن خشک بیان می شود.این عدد توسط شرکت سازنده تعیین می شود و مهم است زیرا، اگر ظرفیت بیش از حد افزایش یابد یون ها بدون ایجاد اتصال از ستون عبور می کنند.

$$\text{ظرفیت} = \frac{\text{میلی اکی والان های گروه های قابل تعویض}}{\text{وزن حشک بر حسب میلی گرم}}$$

ظرفیت در دسترس عبارتست از ظرفیتی است که روش کار تحت شرایط ویژه تجربی (مثلاً pH ، قدرت یونی) در حال انجام است. (اثر pH شبیه اثر تعویض کننده های یونی قوی است).

جدول ۴- ۳ خصوصیات تعویض کننده های یونی مختلف.

Matrix	Exchanger*	Functional group	Trade name
Dextran	SC	Sulfopropyl	SP-Sephadex
	WC	Carboxymethyl	CM-Sephadex
	SA	Diethyl-(2-hydroxypropyl) aminoethyl	QAE-Sephadex
	WA	Diethylaminoethyl	DEAE-Sephadex
Cellulose	C	Carboxymethyl	CM-cellulose
	C	Phospho	P-cel
	A	Diethylaminoethyl	DEAE-cellulose
	A	Polyethyleneimine	PEI-cellulose
	A	Benzoylated-naphthoylated, diethylaminoethyl	DEAE(BND)-cellulose
	A	*p*-Aminobenzyl	PAB-cellulose
Styrene-divinyl-benzene	SC	Sulfonic acid	AG 50
Acrylic	WC	Carboxylic	Bio-Rex 70
Phenolic	SC	Sulfonic acid	Bio-Rex 40
Epoxyamine	WA	Tertiary amino	AG-3

*C, cationic; A, anionic; S, strong; W, weak.

قدرت یونی نیز مهم است زیرا یون های کوچک نزدیک به گروه های بار دار با مولکول نمونه، برا ی دست یابی به این گروه ها رقابت می کند. این رقابت کاملاً موثر است. هرچه ضریب نفوذ پذیری بیشتر باشد، بیشتر می تواند با گروه های باردار مواجه شود. تخلخل ماتریکس نیز مهم است زیرا گروه های باردار هم در داخل و هم در بیرون ماتریکس وجود دارند. ممکن است مولکول های بزرگ قادر به نفوذ به منافذ نباشند، بنابراین با افزایش اندازه مولکولی ظرفیت کاهش می یابد. تخلخل رزین های پلی استیرن با میزان پیوند عرضی که توسط دی وینیل بنزن به وجود می آید تعیین می شود (با افزایش مقدار دی وینیل بنزن، قطر

منافذ کاهش می یابد) تعویض کننده های یونی مناسب با اندازه های مختلف ذرات ساخته می شوند که اندازه خانه[1] نامیده می شوند. خانه کوچکتر یعنی نسبت به حجم بالا تر بنابراین ظرفیت افزایش یافته و زمان لازم جهت انجام تعویض برای یک حجم داده شده تعویض کننده کاهش می یابد.

چنین مجموعه ای از تعویض کننده ها با چنین توانایی های متفاوتی نظیر بار، ظرفیت، تخلخل، اندازه خانه ها، انتخاب مناسب تعویض کننده را برای انجام یک جداسازی ویژه، مشکل می سازد. چگونگی انتخاب نوع ماده ستون و شرایطی مناسب برای ایجاد اتصال و خروج در قسمت های بعد توضیح داده می شود.

انتخاب تعویض کننده یونی

اولین انتخاب این است که تعویض کننده ی مورد نظر آنیونی باشد یا کاتیونی. اگر موادی که باید به ستون متصل شوند یک نوع بار داشته باشند. (مثلاً، مثبت یا منفی)، انتخاب واضح است. اگرچه بسیاری از مواد (مثلاً پروتئین ها) برحسب pH، حامل هر دو نوع بار یا یک نوع بار هستند.در چنین مواردی عامل اصلی، پایداری ماده درpH معین است. بیشتر پروتئین ها یک طیف pH پایداری دارند (یعنی pH ای که دناتوره نشوند) که در آن pH ، آنها هم بار مثبت دارند و هم بار منفی. از این رو، اگریک پروتئین در pH های بالاتر از نقطه ایزوالکتریک پایدار باشد، باید از یک تعویض کننده آنیونی استفاده شود، اگر درpH های زیر نقطه ایزو الکتریک پایدار باشد، یک تعویض کننده کاتیونی مورد نیاز است. انتخاب بین تعویض کننده های قوی و ضعیف نیز بر پایه اثر pH روی بار و پایداری است. به عنوان مثال، اگر یک ماده اسیدی ضعیف که به pH بسیار بالا یا بسیار پایین برای یونی شدن نیاز دارد از یک تعویض کننده یونی قوی استفاده می شود زیرا در pH های خیلی زیاد کار می کند. اگر ماده پایدار نباشد، تعویض کننده های یونی ضعیف ترجیح دارند. تعویض کننده های یونی ضعیف برای جداسازی مولکول های با بار زیاد از آنهایی که بار کمی دارند مناسب ترند زیرا یون های بار دار ضعیف معمولاً موفق به ایجاد اتصال نمی شوند. در عمل از تعویض کننده های ضعیف بیشتر استفاده می شوند. تعویض کننده های سفادکس و بیوژل مزیت ویژه ای برای درشت مولکول هایی دارند که در قدرت یونی پایین ناپایدار می باشند.

[1] Mesh size

انتخاب تخلخل و اندازه خانه ها

مولکول های کوچک روی ماتریکس هایی با اندازه منفذ کوچک به بهترین وجه جدا می شوند (با مقدار پیوند های عرضی زیاد) زیرا ظرفیت در دسترس زیاد است، در حالیکه درشت مولکول ها به منفذی با اندازه بزرگ نیاز دارند. بیشتر تعویض کننده های یونی (به استثنای سفادکس) فرصت تطبیق دادن تخلخل با جرم مولی را ندارند.

تعویض کننده های یونی سلولزی ثابت شده که بهترین نوع برای خالص سازی مولکول های بزرگی نظیر پروتئین ها و پلی نوکلئوتید ها هستند. این امر به این دلیل است که ماتریکس رشته ای است، و از این رو همه گروه های عمل کننده روی سطح قرار دارند و حتی به بزرگ ترین مولکول ها نیز دسترسی دارند.

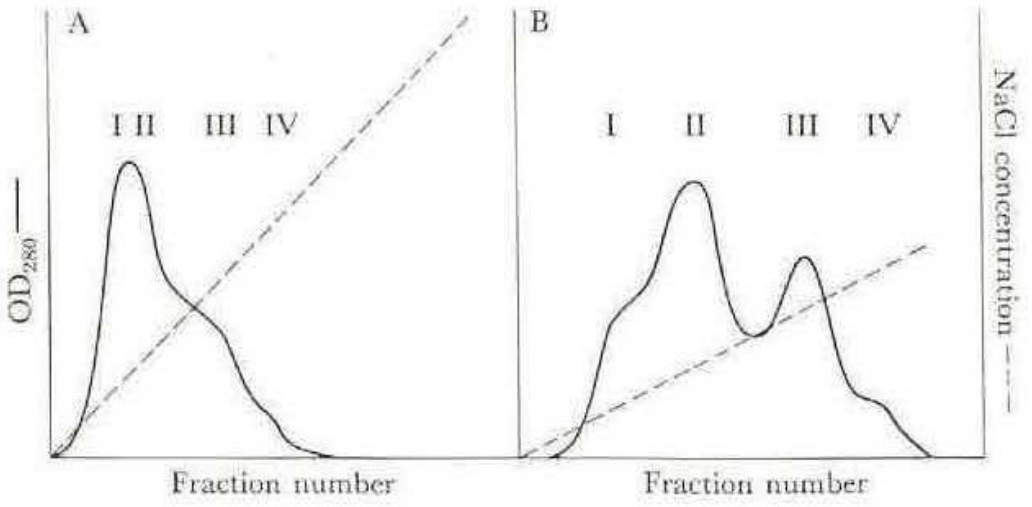
انتخاب یک اندازه خانه مناسب معمولاً مشکل است. اندازه خانه کوچک، تجزیه را افزایش می دهد ولی باعث کاهش سرعت جریان می شود، که باعث افزایش پخش منطقه ای شده و تجزیه کاهش می یابد. از این رو، اندازه خانه مناسب به طور تجربی تعیین می شود.

انتخاب pH، تامپون و شرایط یونی

از آنجا که تامپون ها خودشان دارای یون می باشند پس می توانند خودشان هم تعویض شوند و در pH هم تاثیر گذارند.. بنابراین در این نوع کروماتوگرافی باید به نقش تامپون ها توجه شود مثلاً استفاده از تامپون های کاتیونی با تعویض کننده های آنیونی و یا تامپون های آنیونی با تعویض کننده های کاتیونی ممکن است مشکلاتی به جود آورند. از آنجا که قدرت یونی یک عامل اتصال است، یک تامپون باید به گونه ای انتخاب شود که ظرفیت تامپونی زیادی داشته باشد تا نیازی نباشد که قدرت یونی آن بالا رود. بنابراین، برای بهترین جداسازی، به طور کل مشخص شده که شرایط یونی به کار رفته برای به کار بردن نمونه در ستون (که شرایط شروع نامیده می شود) باید به شرایط لازم برای خروج نزدیک باشد.

روش های عملی برای استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی

در کروماتوگرافی تعویض یونی ماده مورد نظر با تعویض کننده و مواد بار دار موجود در حلال ارتباط دارد. از این رو، ماده متصل شده می تواند با تغییر pH، خارج شود، لذا با تغییر بار ماده و یا با افزودن مواد رقابتی که نمک ها از جمله آنها است، یک نمونه جدا می شود. از آنجا که مواد مختلف خواص الکتریکی متفاوتی دارند، شرایط جداسازی بستگی به پیوند مولکولی دارد و برای دست یابی به جداسازی خوب، روش های انتخاب شده مهم است مثلاً روش شیب قدرت یونی دائمی یا روش خروج حلال به صورت مرحله ای. معمولاً از شیب pH استفاده نمی شود چون تنظیم یک شیب pH بدون افزایش همزمان قدرت یونی مشکل است. برای یک تعویض کننده یونی، هم pH و هم قدرت یونی به تدریج افزایش می یابند یا ممکن است قدرت یونی به تنهایی افزایش یابد. برای یک تعویض کننده کاتیونی، هم pH و هم قدرت یونی افزایش می یابند. انتخاب حقیقی روند خروج معمولاً نتیجه تجربه و خطا است البته با در نظر گرفتن پایداری ماده مورد نظر. به عنوان مثال، درمورد مواد ناپایدار، نگه داشتن pH ثابت مهم است. شکل ۴-۲۳ یک نوع کروماتوگرام تعویض یونی را با استفاده از شیب خروج نشان می دهد. برای جداسازی موادی که شبیه هم هستند، خروج می تواند بدون تغییرpH یا تغییر قدرت یونی انجام گیرد. به عنوان مثال، فرض کنید که شرایط یونی طوری انتخاب شده باشند که اتصال یک مولکول با بسیاری از جایگاه های اتصال آن قدر ضعیف باشد که احتمال اینکه جدایی همزمان اتفاق بیافتد بسیار کم است. بنابراین، مولکول در تعادل با تعویض کننده است و با یک سرعت محدود به سمت پایین ستون حرکت می کند.

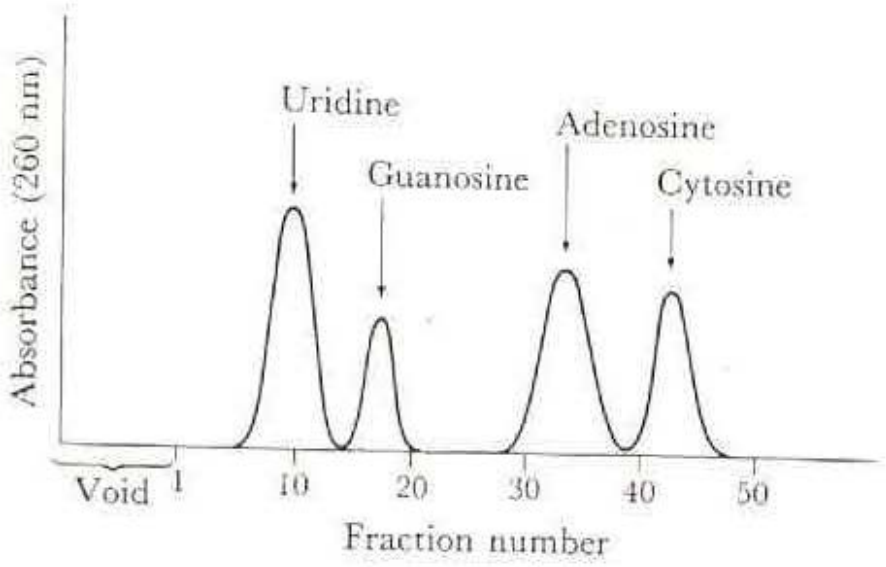


شکل ۴- ۲۳ جداسازی چهار پروتئین به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی روی DEAE – سلولز، در اینجا از روش مرحله ای شیب NaCl استفاده شده است. در A شیب غلظت NaCl تندتر از B می باشد. پروتئین I و IV در B مشخص شده اند.

بنابراین مولکول هایی که تفاوت کمی در گرایش به سمت تعویض کننده دارند با سرعت های متفاوتی مهاجرت می کنند و به این ترتیب از هم جدا می شوند (شبیه کروماتوگرافی جذبی است). یک تغییر ساده این روش شرایط شروع[1] نامیده می شود که در آن، نمونه جذب می شود و در همان محلول از ستون خارج می گردد. معمولاً اگر سرعت جریان بسیار آهسته باشد، تفکیک بهتر صورت می گیرد. گرچه، با کاهش سرعت جریان، مشکل پخش به وجود می آید و تفکیک به خوبی انجام نمی شود. سرعت مناسب جریان معمولاً به طور تجربی تعیین می شود. شکل ۴- ۲۴ یک نوع کروماتوگرام انجام شده به وسیله روند شرایط شروع را نشان می دهد.

در تعیین شرایط خروج باید در نظر داشته باشیم که چگونه مایع خروجی روی سنجش ماده تاثیر می گذارد. به عنوان مثال، اگر از تحلیل های طیفی استفاده می شود، تامپون نباید در محدوده طول موج مورد نظر جذب شود. اگر نمونه قرار است که بر پایه خاصیت رادیو اکتیویته آن به وسیله یک شمارشگر گایگر سنجش شود، تامپون های فرار، مانع از پنهان شدن رادیو اکتیویته در کریستال های ناشی از خشک کردن تامپون می شود.

[1] Starting- condition procedure



شکل ۴- ۲۴ جداسازی نوکلئوزید های RNA توسط کروماتوگرافی روی RNA .50W4X Dowex مورد نظر با آلکالین فسفاتاز تیمار شده در نتیجه فسفات های انتهایی خارج می گردند. سپس روی ستون منتقل می شود. در این آزمایش، حلال حاوی فرمات آمونیوم M ۰/۴ در pH برابر با ۴.است. جذب آنها در nm ۲۶۰ مورد سنجش قرار گرفت.

کاربرد کروماتوگرافی تعویض یونی

در اصل، هر گونه ماده بارداری می تواند روی یک تعویض کننده یونی، کروماتوگرافی شود. تعویض کننده های رزینی بیشترین استفاده را برای مولکول های کوچک آلی دارند و حتی می توانند برای جداسازی یون های فلزی استفاده شوند (مثلاً، Ca^{2+} از Mg^{2+}). پروتئین ها و پلی ساکاریدها بیشتر به وسیله تعویض کننده های سلولزی، دکستران و پلی آکریلامید جدا می شوند. تعویض کننده های دکستران و پلی آکریلامید به طور گسترده ای برای جداسازی نوکلئوتید ها، آمینو اسیدها و دیگر مولکول های کوچک زیستی کار برد دارد.

روش های ویژه در کروماتوگرافی اسیدهای نوکلئیک وپروتئین هایی که به اسید های نوکلئیک متصل اند

مولکول های پیچیده نظیر پروتئین ها و اسیدهای هسته ای دارای انواع مختلف گروه های فعال و جایگاه های اتصال هستند در نتیجه تخمین رفتار آنها روی مواد کروماتوگرافی استاندارد مشکل است. در مقابل، روندهای کروماتوگرافی ابتکاری که برپایه تداخل های مولکولی ویژه هستند گسترش یافته اند. در زیر چند نمونه آورده می شود:

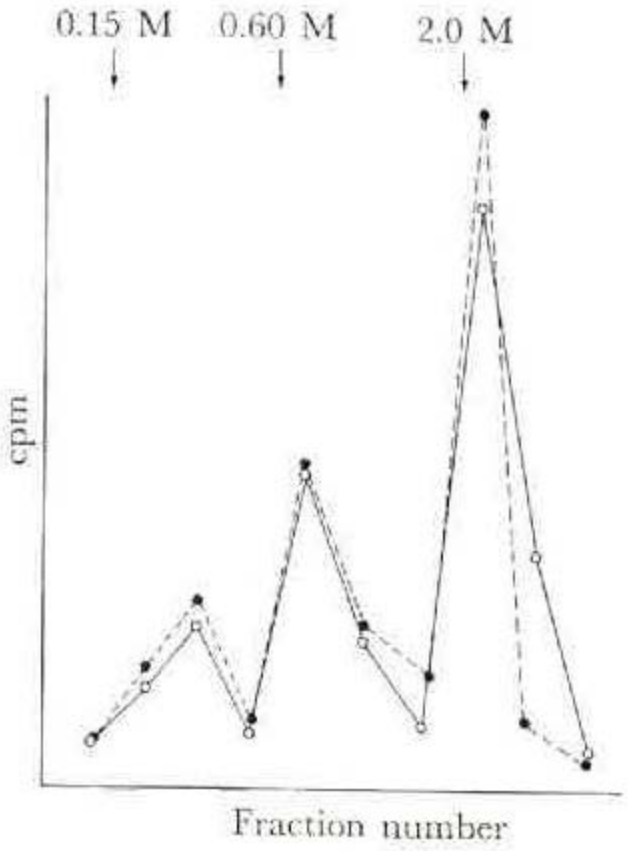
کروماتوگرافی DNA- سلولز

بسیاری از پروتئین هایی که به DNA متصل می شوند را می توان توسط روش کروماتوگرافی DNA- سلولز جدا کرد. برای آماده سازی DNA- سلولز از مخلوط کردن پودر سلولز با یک محلولی از DNA تک رشته یا دو رشته و سپس خشک کردن آن مخلوط در خلأ استفاده می کنند. مکانیسم اتصال DNA به سلولز معلوم نیست. با استفاده طولانی، ستون هایی که از این ماده ساخته شده اند تمایل به از دست دادنDNA پیدا می کنند، برای جلوگیری از این عمل، پودر سلولز - DNA را گاهی در اتانول قرار می دهند و نور ماورا بنفش رابه شدت به آن می تابانند. به این ترتیب از طریقی ناشناخته، DNA به طور شیمیایی متصل به سلولز باقی می ماند.

کروماتوگرافی DNA– سلولز اصولا برای خالص کردن پروتئین های متصل به DNA استفاده می شود. مخلوطی از پروتئین ها در یک تامپون با قدرت یونی کم (که در آن پروتئین هایی که قابلیت اتصال به DNA را دارند می توانند جذب DNA شوند) از ستون گذرانده می شوند. سپس ستون را شسته در نتیجه پروتئین های غیر اتصالی پاک می شوند وبا یک شیب افزایش قدرت یونی خارج می گردند. به این ترتیب پروتئین هایی که اتصال ضعیف تری دارند زودتر خارج می شوند.

ابتدا این روش به وسیله بروس آلبرتس[1] برای جستجوی پروتئین های متصل بهDNA در E.coli آلوده شده با فاژ T_4 به کار برده شد. یک مثال از این کار در شکل ۴- ۲۵ نشان داده شده است.

[1] Bruce Alberts

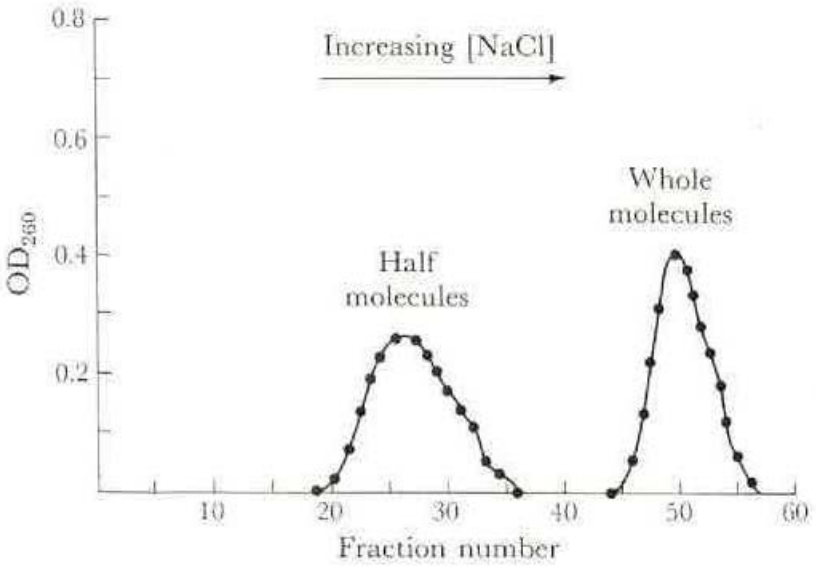


شکل ۴- ۲۵ مثالی از کروماتوگرافی DNA- سلولز. سلول های E.coli را با فاژ T_4 در محیط کشت حاوی لوسین _ ^{14}C قرار داده شد. محیط کشت دیگری حاوی لوسین _ ^{3}H با فاژ T_4 موتانت در ژن ۳۲ آلوده گردید. پروتئین ها خالص شدند سپس باهم مخلوط شده و رو ی ستون حاوی DNA- سلولز تک رشته ای قرار داده شد. حلال خروجی از روش مرحله ای NaCl با غلظت های M ۰/۱۵، M ۰/۶ و M ۲ استفاده شد. در پیک سوم کمبود لوسین _ ^{3}H را مشاهده می کنید یعنی این فراکسیون حاوی روتنین ژن ۳۲ نشان دار شده با ^{14}C است. دایره های توپر ^{3}H و توخالی ^{14}C هستند.

این روش به صورت یک مرحله استاندارد در خالص سازی پلیمرها، نوکلئاز ها، گیرنده ها و غیره در آمده است. از آنجا که هم DNA تک رشته ای و هم دو رشته ای می توانند مورد استفاده قرار گیرند، پروتئین ها را بر این اساس از هم جدا می کنند.

ستون های MAK (Methyle Albumin – Kieselgur)

سرم آلبومین متیله شده به kieselgur جذب می شود[1] و محکم متصل می گردد. ژزف مندل و آلفرد هرشی[2] نشان دادند ستون هایی که از این ماده تهیه می شوند می توانند به DNA تک رشته ای و دو رشته ای و RNA متصل شوند و با افزایش شیب قدرت یونی در تامپون (به عنوان شوینده)، پروتئین های مورد نظر جدا می شوند. با استفاده از شرایط مختلف، این روش برای جداسازی DNA ها بر پایه جرم مولی، ترکیب باز ها و درجه گلیکوزیله شدن، جدا کردن DNA تک رشته ای از دو رشته ای، جدا کردن DNA دو رشته ای با انتهای تک رشته از آنهایی که چنین انتهایی ندارد، جدا کردن tRNA از rRNA و بالاخره جدا کردن انواع tRNA ها از یکدیگر به کار برده می شود. یک مثال از کاربرد این ماده در ستون فوق را می توانید در شکل ۴- ۲۶ مشاهده نمایید.



شکل ۴- ۲۶ جداسازی مقادیر برابر از T_2DNA کامل و نصف شده توسط کرو ماتوگرافی MAK. مولکول های نصف شده با روش برش هیدرودینامیکی به دست آمده اند. برای خروج ماده از روش شیب غلظت NaCl استفاده شد. مولکول های بزرگ تر پیوند محکم تری داده و غلظت های NaCl بیشتری را لازم دارند.

[1] Diatomanceous earth
[2] Joseph Mandell and Alfered Hershey

ستون های Histon - Kieselgur

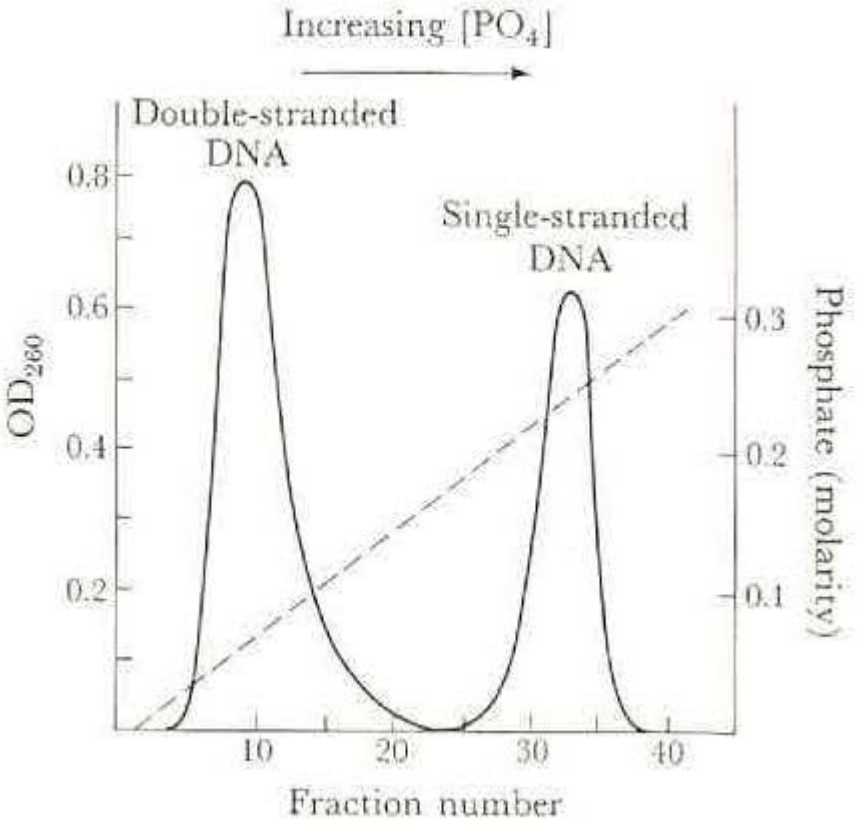
هیستون ها نیز به kieselgur جذب می شوند. از آنجا که هیستون ها با DNA دو رشته ای (نه تک رشته ای یا RNA) تشکیل کمپلکس می دهند، می توان DNA دو رشته ای را با این روش خالص کرد.

اگر با افزایش قدرت یونی خارج شود، DNA بر حسب نوکلئوتیدها جدا می شود و DNA ای که تراکم بالای گوانین ـ سیتوزین دارد زودتر خارج می شود.

کروماتوگرافی هیدروکسی اپتیت

هیدروکسی اپتیت[1] (HA) یک ماده کریستالی است با ترکیب $Ca_{10}(PO_{4})_{6}(OH)_{2}$ که از کریستال های $CaHPO_4.2H_2O$ تهیه می شود. ستون های هیدروکسی اپتیت موادی را متصل می کنند که با کلسیم واکنش می دهند، شامل DNA، RNA، نوکلئوهیستون، پلی و الیگو نوکلئوتید ها و فسفوپروتئین ها. مسلم است که اتصال به وسیله گروه های فسفات در ماده اتصالی انجام می شود زیرا به غلظت فسفات کم نیاز دارد و خروج فقط به وسیله افزایش غلظت تامپون های فسفات انجام می شود. یک مزیت ویژه با اسیدهای نوکلئیک آن است که به جرم مولی DNA بستگی ندارد. مخلوط های زیر به طور موفقیت آمیزی روی هیدروکسی اپتیت از هم جدا می شوند: DNA دو رشته ای از تک رشته ای، DNA گلیکوزیله شده از غیر گلیکوزیله شده، هیستون های هسته ای مختلف از یکدیگر، RNA ریبوزومی از ویروسی، و RNA تک رشته ای از دو رشته ای. یک مثال از کاربرد هیدروکسی اپتیت در شکل ۴– ۲۷ نشان داده شده است.

[1] Hydroxyapetite



شکل۴- ۲۷ جداسازی DNA تک رشته ای و دو رشته ای به وسیله کروماتوگرافی روی هیدروکسی اپتیت برای خروج ماده از شیب غلظت فسفات استفاده شده است.

کروماتوگرافی تمایلی

کروماتوگرافی تمایلی[1] اتصال بین ماده مورد نظر با مولکولی که اتصال اختصاصی به آن دارد (لیگاند) است. ماده ستون با جفت شدن کووالانی یک مولکول اتصالی (که ممکن است یک ماکرومولکول یا یک مولکول کوچک باشد) به ماتریکس نامحلول ساخته می شود. سپس ماده مورد نظر در محلول، جذب مواد موجود در ستون می شود.. برای این که کروماتوگرافی میل ترکیبی با موفقیت انجام شود به موارد زیر باید توجه شود:

[1] Affinity chromatography

(۱) ماتریکس باید از جنس ماده ای باشد که خودش مولکول ها را تا حد قابل ملاحظه ای جذب نکند،

(۲) لیگاند باید بدون تغییر در خواص اتصالش، جفت شود،

(۳) لیگاند باید به گونه ای انتخاب شود که اتصالش نسبتاً محکم باشد زیرا، اگر چه اتصال ضعیف تأخیر را افزایش می دهد، ممکن است برای این که جداسازی به نتیجه برسد کافی نباشد،

(۴) خروج بدون تخریب نمونه باید ممکن باشد.

مفید ترین ماده ماتریکس آگاروز است (سفاروز .Farmacia Fine Chemicals Inc) زیرا حداقل جذب را دارد، خلوص جریان خوب را بعد از جفت شدن حفظ می کند، و قدرت یونی و pH خیلی زیاد را به خوبی (M ۰/۷ کلرید گوانیدیم و اوره که اغلب برای خروج موفق نیاز هستند) تحمل می کند.خریداری آگاروزی که به آن عواملی برای جفت شدن پروتئین ها، غشا ها،و استروئید ها یا کانکاناوالین A [1] داشته باشد، این امکان را به ما می دهد تا بتوانیم مواد فوق را جدا کنیم. کاربرد اصلی کروماتوگرافی تمایلی تا به امروز، خالص سازی پروتئین ها، غشاها، و پلی ساکارید ها بوده است.مثال هایی از کاربرد آن به شرح زیر است :

خالص سازی پروتئین ها :

با اتصال سوبسترا یا کوفاکتور آنزیم در ماتریکس ستون کروماتوگرافی می توان یک آنزیم خاصی را در محلولی حاوی چندین آنزیم یا پروتئین مختلف جدا کرد.

خالص سازی آنتی بادی ها :

این کار به طور عمده با سیانوژن بروماید – سفاروز که به آن آنتی ژن های مختلفی جفت شده اند انجام می شود مثل پروتئین ها، ویروس ها، یا BSA جفت شده با هاپتن ها، این روش انتخاب برای خالص سازی آنتی بادی است.

[1] Concanavalin A

خالص سازی غشاها و ذرات حاوی مواد شناخته شده :

غشاهایی که به آنها یک هورمون متصل است می توانند با استفاده از سفاروز جفت شده با آن هورمون خالص شوند، ویروس آنفولانزا، که حاوی نور آمینیداز روی سطحش می باشد، نیز با استفاده از سفاروزی که به آن مهار کننده های نورآمینیداز جفت شده است، خالص می شود.

خالص سازی گلیکوپروتئین ها

این عمل توسط سفاروز حاوی کونکاناوالین A انجام می شود.

جداسازی سلول های ویژه جانوری

این کار با استفاده از آگلوتینین های جفت شده به کونکاناوالین A یا فیتوهماگلوتینین انجام می شود. به عنوان مثال، بعضی از سلول های توموری القا شده به وسیله ویروس می توانند از سلول های طبیعی جدا شوند زیرا سلول های تومور به سفاروز متصل شده به کونکاناوالین A ، محکم تر متصل می شوند.

تمرین

۱ – در کروماتوگرافی تعویض یونی از poly styrene sulphonated gel استفاده شد. مولکول هایی با بارهای مثبت و منفی را از ستون عبور دادیم. پس از عبور مولکول های دارای بار منفی از ستون، حال برای خارج شدن مولکول های دارای بار مثبت .....

الف) pH محلول شوینده را کااهش می دهند.

ب) pH محلول شوینده را افزایش می دهند.

ج) مقدار نمک (NaCl) موجود در محلول شوینده را کاهش می دهند.

د) مقدار نمک (NaCl) موجود در محلول شوینده را زیاد می کنند.

۲ – ظرفیت تعویض کننده یونی برابر است با .....

الف) میلی اکی والان گروه های قابل تعویض تقسیم بر میلی گرم وزن خشک آن

ب) میلی اکی والان گروه های قابل تعویض تقسیم بر یک گرم وزن خشک آن

ج) یک گرم از وزن خشک تعویض کننده تقسیم بر میلی اکی والان گروه های تعویض کننده

د) یک گرم از وزن خشک تعویض کننده ضربدر میلی اکی والان گروه های تعویض کننده

۳ – کدام یک از گزینه های زیر صحیح است؟

الف) از ستون MAK (methylated albumin Kieselgur) برای جدا کردن DNA ویروس T_4 استفاده شد.

ب) از ستون HA (hydroxyl apatite) برای جدا سازی هیستون ها استفاده می شود.

ج) از ستون Histon- Kieselgur برای جدا کردن DNA تک رشته ای از RNA استفاده می شود.

د) پاسخ های (ب) و (ج) صحیح هستند.

۴ – برای تعیین وزن مولکولی یک پروتئین از ..... استفاده می کنند.

الف) SDS- PAGE

ب) ژل فیلتراسیون

ج) PAGE

د) پاسخ های (الف) و (ب) هر دو صحیح هستند.

۵ – وقتی از دو روش کروماتوگرافی کاغذی و کروماتوگرافی لایه نازک برای جدا سازی نوکلئوزیدها استفاده شد (فاز ثابت برای هر دو روش سلولز بود) مشاهده گردید که جدا سازی با روش ..... بهتر است.

۶ - در روش کروماتوگرافی گاز – مایع (GLC) می دانیم که فاز متحرک گاز است. فاز ثابت چیست؟ نام آن را بنویسید؟

۷ – با استفاده از کروماتوگرافی GLC منحنی زمان تاخیر (retention time) علیه تعداد اتم های کربن را رسم کردیم. آزمایش با الکل ها را انجام دادیم هر چه تعداد اتم های الکل افزایش یافت ، زمان تاخیر ..... شد.

۸- مخلوطی از ۴ پروتئین زیر را داریم:

پروتئین	M_r	pH_I
Cytochrome C	۱۲۰۰۰	۹/۳
Asparaginase	۲۲۰۰۰	۵/۲
Deoxyribonuclease I	۳۱۰۰۰	۸/۷
Transglobulin	۴۹۰۰۰	۶/۲

این پروتئین ها از ستون DEAE- cellulose (یک تعویض کننده آنیونی است) در pH برابر ۷/۴ عبور دادیم. پروتئین هایی که با ژل پیوند ندادند از ستون عبور کرده و بر حسب اندازه مولکولی خارج شدند ولی آنهایی که پیوند دادند در

ستون ماندند. مابین پروتئین هایی که بر اساس جرم مولی از ستون خارج شدند آنکه از همه سنگین تر بود اول خارج شد و بعد از آن (دومی) ..... بود.

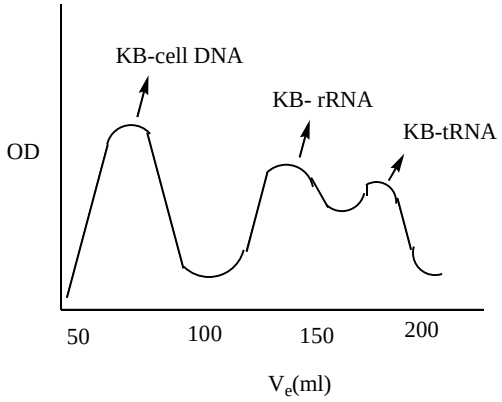
الف) cytochrome C

ب) deoxyribonuclease I

ج) asparaginase

د) transglobulin

۹ – سلول های KB (سلول های سرطانی انسانی human carcinoma) را توسط poliovirus (فلج کودکان) آلوده کردیم (فسفات آن رادیواکتیو بود ^{32}P) . سلول ها لیز شدند و سپس اسیدهای نوکلئیک را خالص نمودیم. پس از ژل کروماتوگرافی در nm ۲۶۰ کل اسیدهای نوکلئیک سلولی مشخص گردید (منحنی زیر).



در آزمایش ذکر شده ، برای تشخیص polio RNA چگونه عمل کردند؟

۱۰ – از ستون های Histone- Kieselgur برای جدا سازی چه ترکیباتی استفاده می شود؟ وقتی ترکیب مورد نظر به ستون متصل شد ، برای این که آن ترکیب از ستون جدا شود چه عملی باید انجام داد؟

منابع:

Fisher, L. 1969. "An Introduction to Gel Chromatography," *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, edited by T. S. Work and E. Work. American Elsevier.

Helferich, F. 1962. *Ion Exchange.* McGraw-Hill.

Ingram, V. M. 1959. "Abnormal Human Haemoglobins. 1. The Comparison of Normal Human and Sickle-Cell Haemoglobins by 'Fingerprinting.'" *Biochim. Biophys. Acta* 28:539–545. The development of fingerprinting.

Mandell, J. D., and A. D. Hershey. 1960. "A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids." *Analyt. Biochem.* 1:66–77. MAK chromatography was first described here.

فصل ۵

الکتروفورز

پس از مطالعه کامل این فصل شما باید با مطالب زیر آشنا شوید:

۱. **الکتروفورز کاغذی**
۲. **الکتروفورز نوار استات**
۳. **ژل الکتروفورز**
۴. **ژل پلی آکریلامید و ژل پلی آکریلامید- آگاروز الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک**
۵. **دیسک الکتروفورز در ژل های پلی آکریلامید**
۶. **الکتروفورز پیوسته**
۷. **ایزو الکتریک فوکوسینگ**
۸. **ایمونو الکتروفورز**

مقدمه

بحث در مورد تئوری مربوط به الکتروفورز پیچیده و ناقص است، لذا در این فصل اصول الکتروفورز برای انجام بعضی از روش های مربوط به آن ذکر می گردد.

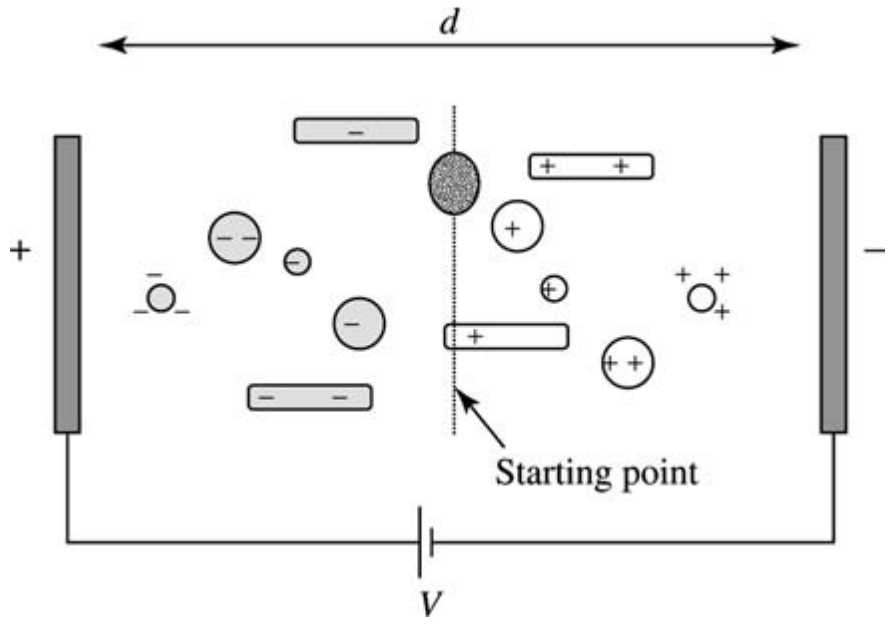
از بسیاری جهات، الکتروفورز شبیه رسوب دادن است. اگر ذره ای با بار q داشته باشیم، در میدان الکتریکیE ذره با یک سرعت ثابت V حرکت می کند که به وسیله نیروی الکتریکی، E q به تعادل می رسد. کشش گرانروی، fv، که در آن f ضریب اصطکاک می باشد، عبارتست از

$$\mathbf{E\,q} = \mathbf{fv} \qquad (۱)$$

سرعت **U**، به صورت سرعت در واحد میدان برابر است با :

$$U = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \qquad (۲)$$

سرعت به ضریب اصطکاک بستگی دارد و تابعی از چند پارامتر فیزیکی مولکول ها است.اگر چه، محیط نگه دارنده به طور طبیعی یک محیط عایق نیست بلکه الکترولیتی از یون های بار دار و بیانگر پیچیدگی زیاد است ولی اطلاعاتی درباره اندازه و شکل مولکول به ما می دهد. پیچیدگی اصلی آن است که یک ذره بار دار در یک الکترولیت که یون ها را جذب می کند، معلق می شود و از این رو به وسیله محیط یونی احاطه می گردد (شکل ۵– ۱).



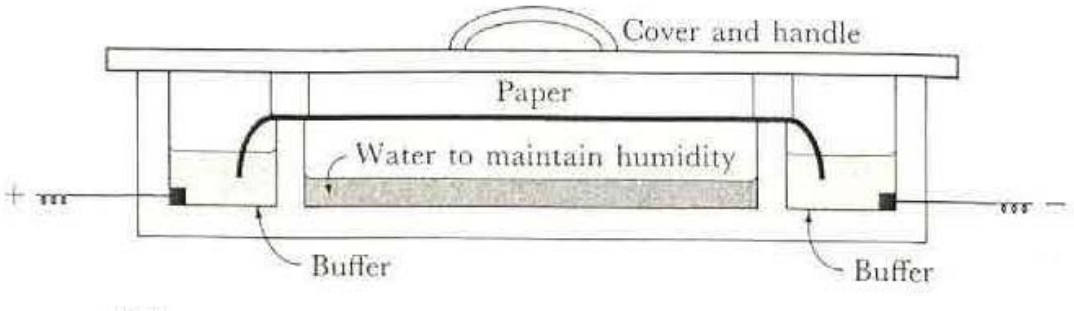
شکل ۵- ۱ اساس فیزیکی الکتروفورز. مولکول ها در یک میدان الکتریکی یا نیروی میدان E که بستگی به بار های الکتریکی، جرم و شکل مولکول دارد، حرکت می کنند. توجه داشته باشید که هر چه مولکول ها کوچکتر و دارای بار الکتریکی بیشتر باشد، سریعتر به سمت الکترود بار مخالف می روند. مولکول هایی که از لحاظ بار یکسان هستند ولی شکل آنها متفاوت باشند، حرکت آنها در میدان متفاوت خواهد شد.

تعادل مواد در این محیط یونی تا حدودی هم به وسیله میدان و هم به وسیله سرعت ذره به هم می خورد. تا امروز، تئوری الکتروفورز برای بیان این پیچیدگی ها کافی نبوده است. برای کسب اطلاعاتی درباره ساختار درشت مولکول ها، الکتروفورز روش چندان مفیدی نیست. ولی یک ابزار اولیه و تحلیلی بسیار مفید است زیرا قادر است مولکول های مختلف را از هم جدا کند. به هر حال، از لحاظ تئوری اصل کارکرد الکتروفورز صحیح است (یعنی سرعت با q افزایش و با f کاهش می یابد و برای مولکول ها بدون بار صفر است) در حقیقت، شرایط مطلوب برای جداسازی مواد به طور تجربی تعیین می شود.

انواع الکتروفورز

الکتروفورز کاغذی

شکل ۵- ۲ یک نوع الکتروفورز کاغذی با ولتاژ کم (۲۰ v / cm) را نشان می دهد. یک باریکه کاغذی را در محلول تامپون فروبرده سپس روی دستگاه قرار داده شد. درپوشی روی کاغذ گذاشته تا از خشک شدن آن جلوگیری به عمل آید سپس ولتاژ مورد نظر به دستگاه داده می شود. وقتی جداسازی کامل شد، کاغذ را خارج کرده و خشک می کنند. اگر نمونه دارای مواد کافی باشد، می توان آن را توسط رنگ یا فلورسانس ایجاد شده شناسایی کرد و در غیر این صورت رنگ آمیزی می کنند. اگر اندازه گیری کمّی مورد نظر می باشد، از روش اسپکتوفتومتری می توان استفاده نمود. در این صورت بهتر است رنگ استفاده شده را خارج کرد چون خود ماده رنگی نیز دارای وزن می باشد (حدود ۲۰ ٪). اگر نمونه رادیواکتیو است، لکه حاصل را بریده و توسط دستگاه شمارشگر رادیو اکتیو مقدار آن تعیین می شود.



شکل ۵- ۲ الکتروفورز کاغذی با ولتاژ پایین

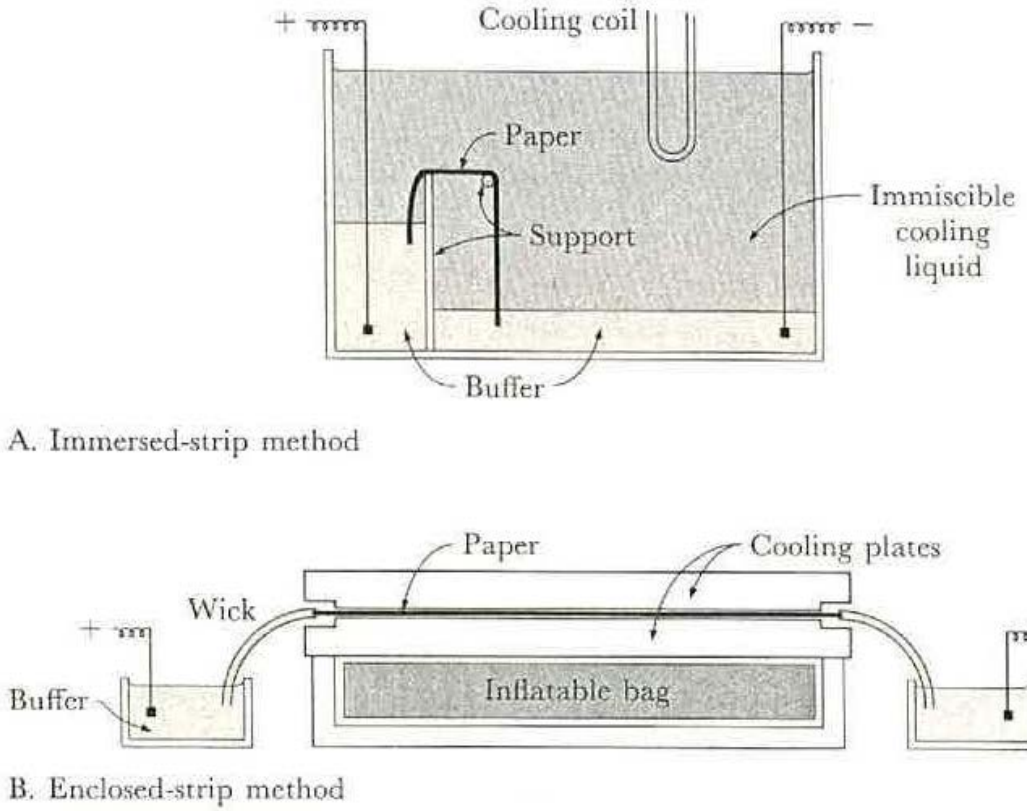
یک راه کار مفید عبارتست از نشاندار کردن لکه ها با مواد رادیو اکتیو تا معلوم شود کدام ماده فعالیت رادیو اکتیو دارد. الکتروفورز کاغذی با ولتاژ پایین، برای تشخیص پروتئینی است که در مخلوطی از چند پروتئین وجود دارد و روی آنها جدا سازی نسبی صورت گرفته است.

الکتروفورز کاغذی با ولتاژ پایین برای مولکول های کوچک مناسب نیست (مثل آمینو اسیدها و نوکلئوتید ها) زیرا بار الکتریکی آنها کم است در نتیجه حرکت آنها نیز کند می شود (جداسازی آنها آهسته انجام می گیرد). اندازه کوچک آنها منجر به پخش آنها می گردد. در الکتروفورزهای کاغذی با ولتاژ بالا، سرعت جداسازی با استفاده از یک شیب پتانسیل ۲۰۰ v / cm افزایش

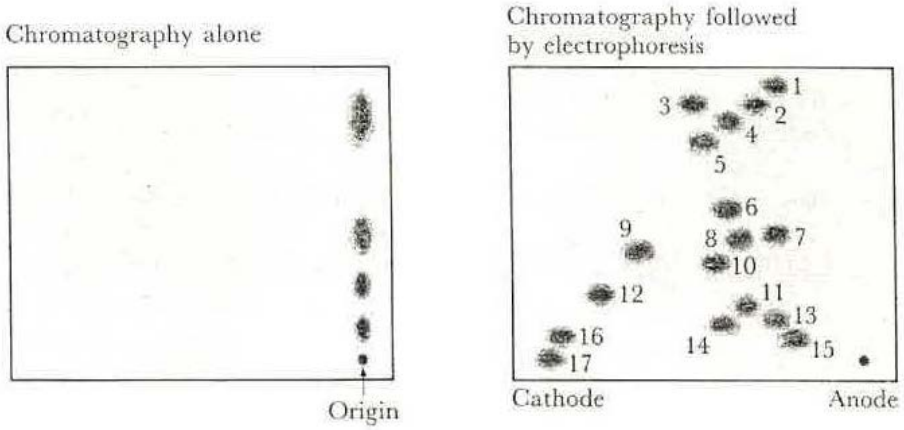
می یابد. ولتاژ بالا، جریان بالایی ایجاد می کند، که باعث گرم شدن کاغذ می شود بنابراین باید کاغذ را سرد کرد. این عمل را می توان با فرو بردن کاغذ در یک حجم زیاد از یک مایع یا قرار دادن کاغذ روی سطح شیشه ای سرد انجام داد. روش نوار غوطه ور شده [1] (شکل ۵- ۳) خیلی کم استفاده می شود زیرا خنک کننده های مورد نیاز (از قبیل تولوئن، تتراکلرید کربن یا روغن های مختلف) سمی وگاهی قابل اشتعال هستند. روش نوار حصار شده[2] ، روش مناسبتری است (شکل ۵- ۳) . توجه داشته باشید که کاغذ در تامپون غوطه ور نمی شود. بعد از این که الکتروفورز تمام شد، کاغذ را خشک می کنند و نقاط مورد نظر را مانند روش ولتاژ پایین مشخص می نمایند.

الکتروفورز کاغذی با ولتاژ بالا برای تعیین آمینو اسیدها و پپتید ها است. جداسازی کامل مخلوط اغلب با یک الکتروفورز ولتاژ بالا امکان پذیر نیست و با روش کروماتوگرافی دو بعدی همراه است و ابتدا نمونه الکتروفورز می شود وسپس از سمت راست، کاغذ را ۹۰ درجه می چرخانند و مجدداً کروماتوگرافی می کنن (شکل ۵- ۴).

[1] Immersed- strip
[2] Enclosed- strip



شکل ۵- ۳ دو روش الکتروفورز با ولتاژ بالا.



شکل ۵- ۴ کروماتوگرافی دوبعدی همراه با الکتروفورز.

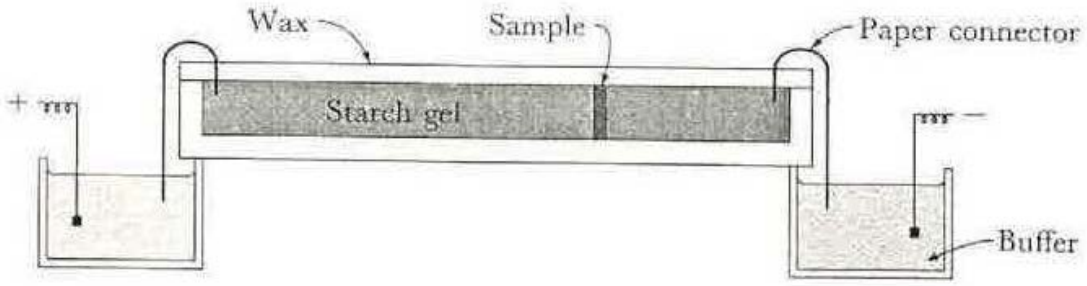
الکتروفورز نوار استات

بسیاری از درشت مولکول های زیستی جذب سلولز می گردند این عمل به وسیله گروه های هیدروکسیل انجام می شود. جذب شدن از حرکت ممانعت بعمل می آورد بنابراین موجب دنباله دار شدن لکه ها یا باندها می گردد که این عمل باعث کاهش جداسازی می شود. با به کار بردن استات سلولز به جای کاغذ می توان از این امر جلوگیری کرد زیرا بیشتر هیدروکسیل ها به گروه های استات برگردانده شده اند که عموماً غیر جاذب هستند. حذف این انحراف باعث افزایش جداسازی شده به گونه ای که جداسازی ها در ولتاژ کم سریعتر انجام می شود. این حقیقت که لکه ها کوچکتر هستند نیز به معنی این است که ماده موجود در لکه غلیظ تر شده و آشکار سازی آن آسانتر می شود. جذب اندک استات سلولز نیز باعث کاهش لکه دار شدن زمینه می گردد، بنابراین حساسیت آشکارسازی افزایش می یابد.

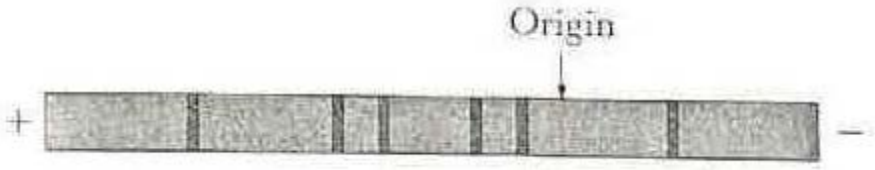
دو مزیت دیگر استفاده از استات سلولز این است که ماده ای است شفاف، بنابراین در تشخیص توسط اسپکتوفتومتری یک ماده مناسب است و در حلال های مختلف به آسانی حل شده خروج ماده آسان می شود. برای به دست آوردن حداکثر تفکیک، روش ژل الکتروفورز بهتر است.

ژل الکتروفورز

به کار بردن ژل هایی مثل نشاسته، پلی آکریلامید، آگاروز و آگاروز آکریلامید به عنوان محیط نگه دارنده باعث افزایش جداسازی، به خصوص برای پروتئین ها و اسید های نوکلئیک می شود. به دلایلی که معلوم نیست انتشار بسیارکم صورت گرفته و عمل جداسازی در ژل کروماتوگرافی به خوبی انجام می شود. ابتدایی ترین کار روی ژل الکتروفورز با ژل های نشاسته انجام شد. شکل ۵- ۵ یک نوع الکتروفورز ژل نشاسته را نشان می دهد. ژل حاوی نشاسته سیب زمینی است که دانه های نشاسته در اثر حرارت در تامپون مناسب باد کرده اند. ژل به صورت افقی قرار داده شده است.



شکل ۵– ۵ ژل الکتروفورز با نشاسته.



شکل ۵– ۶ ژل الکتروگرام پروتئین های جدا شده توسط نشاسته.

در این روش شکافی به وسیله لبه تیغ به وجود آورده ونمونه را در آن می گذارند. سپس شکاف به وسیله موم یا گریس بسته می شود و ولتاژ مناسب تنظیم می گردد. بعد از الکتروفورز، ژل نیمه جامد را برداشته و آن را به دو یا سه لایه برش می دهند، در نتیجه هر کدام از لایه ها لکه دار شده می شوند. ترکیبات مختلف به صورت مجموعه ای از نوارها روی ژل ظاهر می شوند (شکل ۵– ۶). ژل های نشاسته امروزه کمتر مورد استفاده قرار می گیرند و ژل های پلی آکریلامید بهتر هستند.

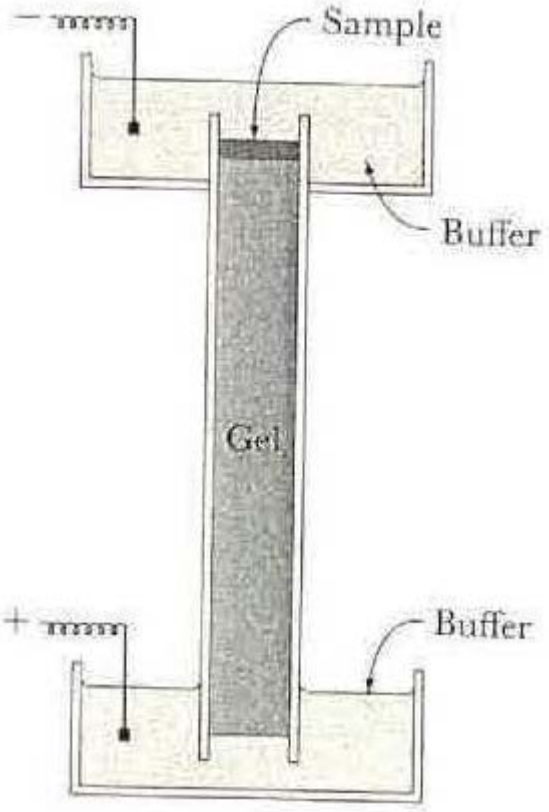
ژل های پلی اکریلامید جانشین ژل های نشاسته شده اند زیرا غربال کردن مولکولی را می توان کنترل کرد. در این ژل ها جذب پروتئین ها ناچیز است. در حال حاضر، پلی آکریلامید مؤثرترین محیط برای پروتئین ها و مولکول های RNA کوچک است (برای اسید های نوکلئیک، منافذ پلی آکریلامید خیلی کوچک هستند، آگاروز و آگاروز _ آکریلامید مناسبترند). منافذ ژل آکریلامید به وسیله اتصال عرضی با N و N´ _ متیلن بیس آکریلامید قابل کنترل است.

دو روش مختلف برای الکتروفورز ژل آکریلامید وجود دارد: ستونی و سطحی (شکل های ۵- ۷ تا ۵- ۱۰) روش استفاده از ژل الکتروفورز سطحی به سرعت جانشین ژل های ستونی شد زیرا تعداد زیادی از نمونه ها را می توان به طور هم زمان الکتروفورز کرد. الکتروفورز ژل پلی آکریلامید احتمالاً روان ترین و مفید ترین سیستم الکتروفورزی برای تحلیل و جداسازی درشت مولکول ها است.

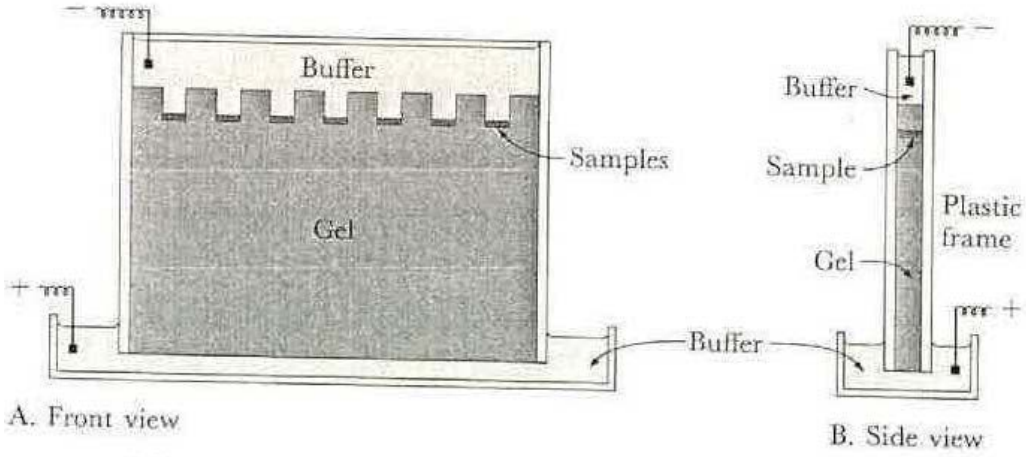
ژل الکتروفورز SDS

دو دانشمند به نام های کلاوس وبر[1] و مری اسبورن[2] نشان دادند که جرم مولی بیشتر پروتئین ها به وسیله سرعت حرکت آنها در ژل های پلی آکریلامید که حاوی سدیم دو دسیل سولفات (SDS) هستند، قابل اندازه گیری می باشتد. در pH طبیعی، در حدود ۱ ٪ SDS و M ۰/۱ مرکاپتو اتانول، بیشتر پروتئین های چند زنجیره ای به SDS متصل شده و از هم جدامی شوند، اتصال های دی سولفیدی توسط مرکاپتواتانول شکسته می شوند، ساختار چهارم پروتئین ها از بین می رود و ترکیباتی شامل زیر واحدهای پروتئین ها به وجود می آیند. SDS یک شکل فضایی با چرخش های تصادفی تشکیل می دهد. پروتئین هایی که به این روش تیمار شده اند به گونه ای رفتار می کنند که همه ی آنها دارای بار الکتریکی یکسان می شوند. مقدارSDS متصل در واحد وزن پروتئین به طور ثابت باید برابر $\frac{g\ SDS}{g\ protein}$ ۱/۴ باشد.

[1] Klaus Weber
[2] Mery Osborn

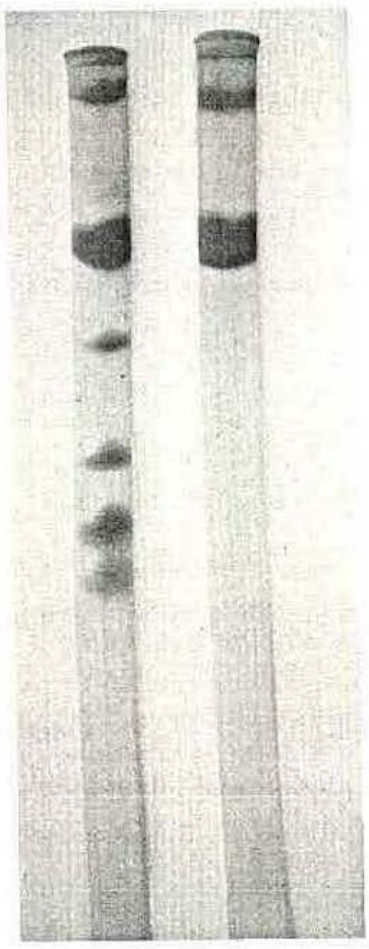


شکل ۵- ۷ ژل الکتروفورز لوله ای

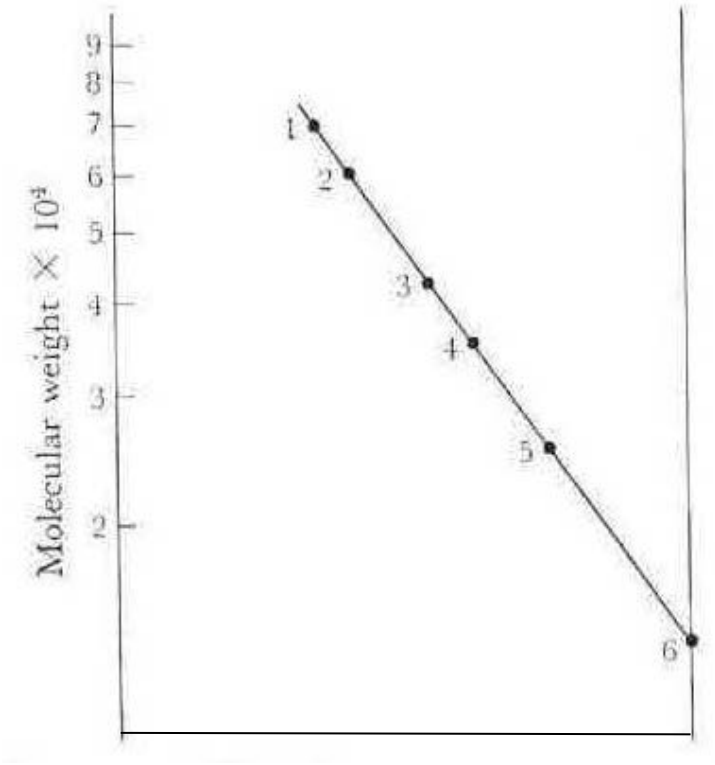


شکل ۵- ۸ ژل الکتروفورز تخت. مشاهده ژل: (A) از جلو، (B) از پهلو

در حقیقت مقدار بار به جای اینکه به وسیله بارآمینو اسید تعیین شود به وسیله SDS مشخص می گردد. در نتیجه حرکت فقط به جرم مولی بستگی دارد زیرا تحت تأثیر غربال مولکولی ژل قرار می گیرد. اگر از پروتئین هایی با جرم های مولی معلوم، الکتروفورز شوند نوارهایی مشخص به وجود می آیند (شکل ۵- ۹) و نمودار نمایش جرم مولی بر حسب فاصله حرکت به صورت خط مستقیم می باشند (شکل ۵- ۱۰). از این رو اگر پروتئین مجهولی الکتروفورز شود، جرم مولی مجهول را می توان با دقتی حدود ۱۰٪ - ۵٪ محاسبه کرد. در شکل های فوق از حروف اختصاری SDS PAGE استفاده شده است. این حروف



شکل ۵- ۹ نتایج الکتروفورز پروتئین در SDS. در سمت چپ ویروس پولیوما تخریب شده و سمت راست پروتئین کپسید ویروس هستند. از ژل آکریلآمید در SDS استفاده شده است. دو نوار پایین هیستون ها هستند.



فاصله ای که حرکت کرده است

شکل ۵- ۱۰ SDS PAGE برای تعیین جرم مولی پروتئین ها. (۱) BSA، (۲) کاتالاز، (۳) اوآلبومین، (۴) کربوکسی پپتیداز A، (۵) کیموتریپسینوژن، (۶) لیزوزیم.

نشاندهنده poly acrylamide gel electrophoresis است.

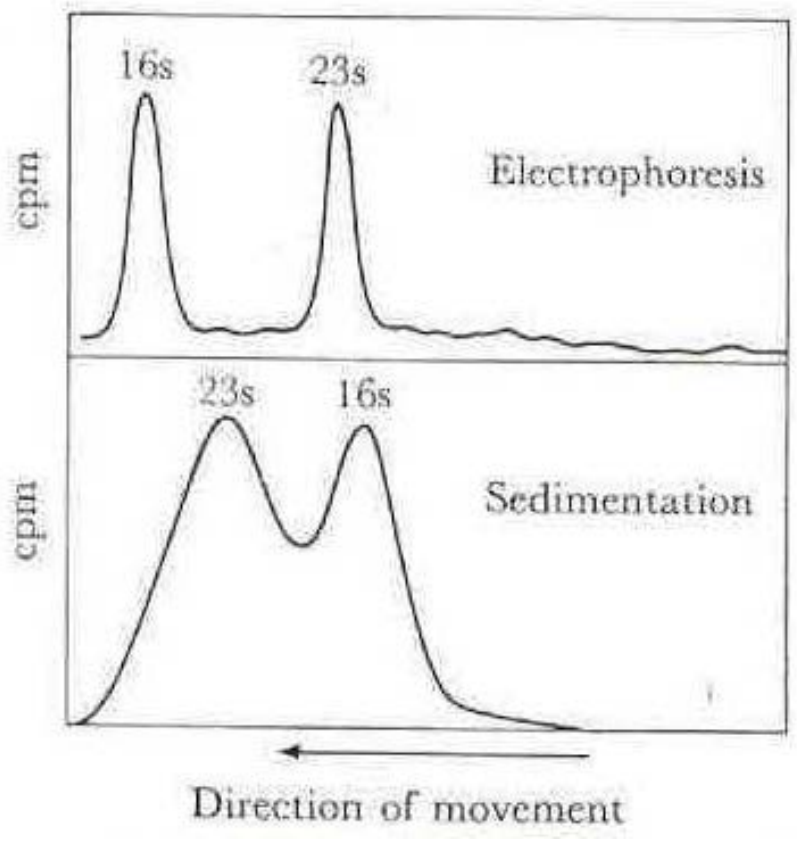
بیشترین دقت هنگامی حاصل می شود که مقادیر معلوم برای M به مجهول شبیه باشد. این روش متداول ترین راه تخمین جرم مولی واحد های پروتئین است (اگر چه ژل کروماتوگرافی لایه نازک احتمالاً ارزش مساوی خواهد داشت).

توجه داشته باشید که روش ژل SDS برای تعیین این که آیا گروه های S-S حضور دارند نیز کاربرد دارد زیرا اگر آنها وجود داشته باشند، قابلیت تحرک به این بستگی خواهد داشت که پروتئین به وسیله مرکاپتواتانول که عامل شکننده پیوند دی سولفید است تیمار شده باشد.

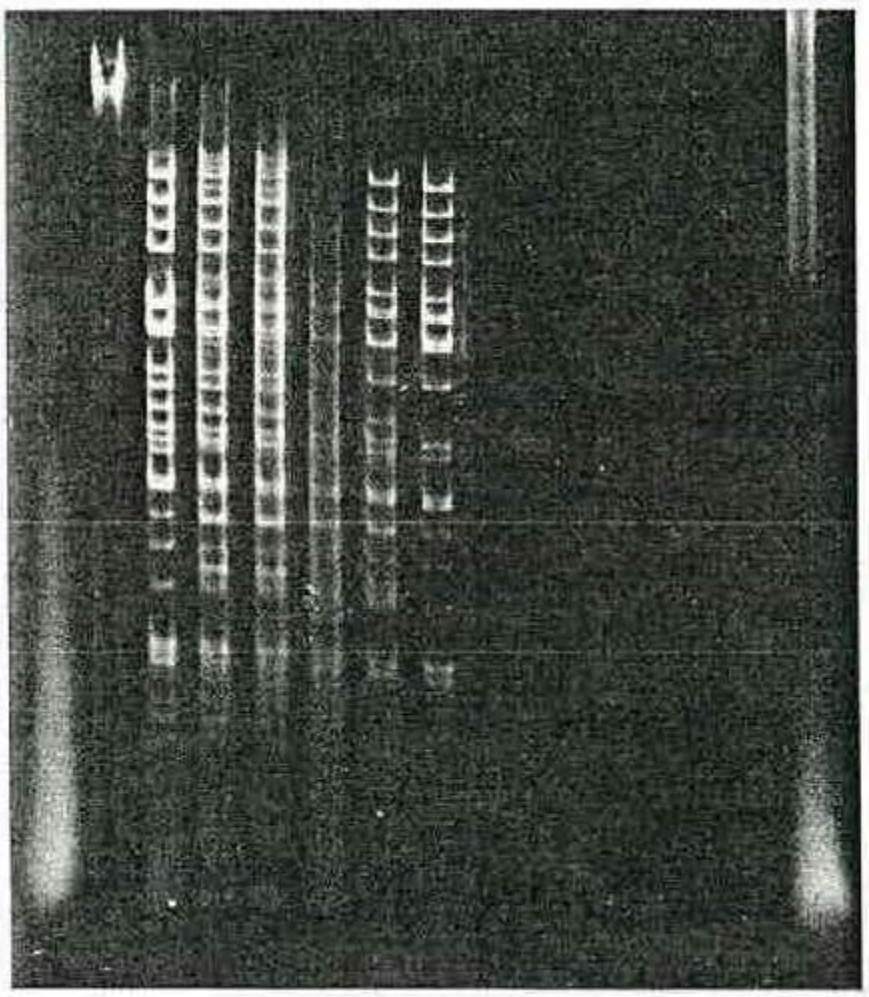
ژل پلی آکریلامید و ژل پلی آکریلامید- آگاروز الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک

در الکتروفورز اسید های نوکلئیک، اثر غربال مولکولی فاکتور اصلی در جداسازی است زیرا نسبت بار به جرم تقریباً مانند همه پلی نوکلئوتیدها است. از این رو، مولکول های کوچک سریعتر از مولکول های بزرگ حرکت می کنند. از آنجا که مولکول های اسید نوکلئیک موجود، به طور طبیعی خیلی بزرگ هستند اندازه منافذ ژل باید بزرگ باشد بنابراین ژل باید کمی رقیقتر باشد. برای محکم نگه داشتن ژل ها، به خصوص برای مولکول های بزرگ ($M > 5 \times 10^6$)، آگاروز (یک پلی ساکارید متخلخل) اضافه می شود، گاهی اوقات فقط از آگاروز به تنهایی استفاده می شود. الکتروفورز را می توان در نوع تخت یا نوع ستونی انجام داد. برای مولکول های RNA (از جمله mRNA و rRNA)، جداسازی توسط این روش بهتر از ساتنریفوژ کردن است (شکل ۵- ۱۱) و مسلماً الکتروفورز روش بهتری است. به علاوه، فاصله مهاجرت متناسب است با M. بنابراین اگر دو نمونه استاندارد موجود باشد، M قابل اندازه گیری است.

جداسازی روی پلی آکریلامید و آگاروز نیز برای DNA تک رشته ای تا میزان $M = 50 \times 10^6$ بسیار خوب است. اگر چه، از آنجا که DNA دو رشته ای بسیار فشرده است، تهیه ژل هایی با اندازه کافی جهت عبور مولکول DNA بزرگتر از $M = 8 \times 10^6$ امکان پذیر نیست. شکل ۵- ۱۲ سطح یک ورقه از ژل حاوی مولکول هایDNA جدا شده در آگاروز را نشان می دهد.



شکل ۵- ۱۱ مقایسه PAGE و سانتریفوژ با استفاده شیب سوکرز برای rRNA.



شکل ۵- ۱۲ الکتروفورز تخت با DNA. هضمDNA فاژ λ با استفاده از آنزیم های محدود کننده Hin2 و Hin3 و ژل دارای ۱/۴ ٪ آگاروز است.

به دلایلی که معلوم نیست، در سیستم های تامپونی مشخص، مولکول هایDNA تک رشته ای نه تنها با توجه به اندازه آنها جدا می شوند بلکه بر اساس اصول دیگری که هنوز معلوم نیست نیز این جدا سازی صورت می گیرد. به عنوان مثال، دو رشته پلی نوکلئوتید واسرشت شده مربوط به DNA های فاژ E.coli را می توان در آگاروز ۰/۶ درصد و تامپون فسفات تریس از هم جدا کرد.

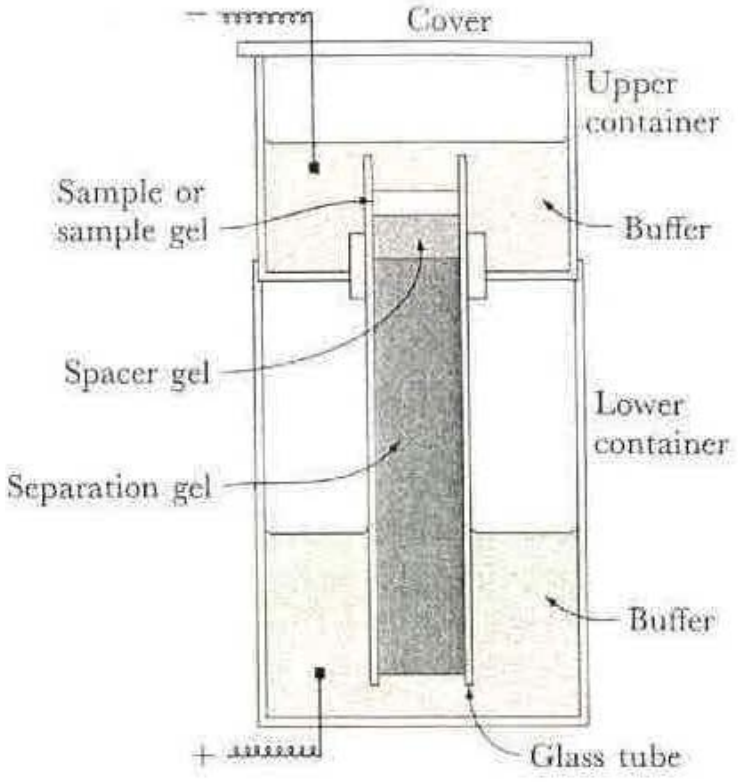
کاربرد جالب دیگر پلی آکریلامید ژل الکتروفورز، جدا شدن مولکول های DNA حلقوی از خطی است. یافتن غلظتی از ژل که فقط به مولکول های خطی اجازه نفوذ به ژل را بدهد امکان پذیر است (جرم مولی مشخص است) زیرا اندازه منافذ آنقدر کوچک است که فقط مولکول های خطی که به صورت طولی وارد می شوند قابل نفوذ به ژل می باشند. هنوز به طور جدی این روش مورد بهره برداری قرار نگرفته است. نوار های اسید نوکلئیک با روش های مختلفی روی ژل ها قابل آشکار شدن هستند. میزان رادیو اکتیویته با روش بریدن ژل، حل کردن آن در NaOH ۰/۵ M یا H_2O_2 و استفاده از یک شمارشگر مواد رادیو اکتیو قابل اندازه گیری است.

مشاهده DNA دو رشته ای با افزودن رنگ فلورسانس بروماید اتیدیوم بسیار آسان تر است (شکل ۵- ۱۲). این نوع رنگ می توانند DNA، RNA و پروتئین ها را مشخص نمایند به طوری که هر کدام را به یک رنگ متفاوت در می آورند.

دیسک الکتروفورز در ژل های پلی آکریلامید

از الکتروفورز صفحه ای برای به دست آوردن تفکیک مطلوب استفاده می شوند (همان طور که خواهید دید منظور از دیسک، اتصالاتی نیست که از این روش ایجاد می شوند، بلکه در حقیقت سیستم از pH های مختلف استفاده می کند که منجر به یک ولتاژ منقطع می شود). با این روش نمونه را که از لایه نازک اولیه (mm ۲- ۱) تشکیل شده به یک منطقه شروع با ضخامت ۱ تا μ ۱۰۰به طوری که در شکل ۵- ۱۳ نشان داده شده، می رسد. توجه داشته باشید که سیستم ژل در یک ستون عمودی تهیه می شود و دارای ۳ ناحیه مجزا است: منطقه بالایی یا ژل نمونه، منطقه میانی یا ژل فاصله دهنده و بالاخره منطقه ژل جداکننده می باشد. ژل های نمونه و فاصله دهنده رقیقتر از (با اندازه منافذ بزرگتر) ژل جدا کننده هستند و در یک تامپون با قدرت یونی کمتر و pH متفاوت تهیه می شوند. اندازه بزرگتر منفذ در ژل های بالاتر به این معنی است که از حرکت مولکول ها کمتر ممانعت بعمل آورد و حرکت آنها نسبت به زمانی که در ژل جدا کننده باشد سریعتر است. به طور مشابه، قدرت یونی کمتر به معنی مقاومت الکتریکی بالاتر است بنابراین میدان الکتریکی (V/cm) در منطقه بالاتر بزرگتر است و موجب می شود که مولکول ها سریعتر از زمانی که در ژل پایینتر باشند، حرکت کنند. مقدار pH نیز همان اثر را روی تحرک دارد. این حرکت سریع از ژل های بالا تر منجر به تجمع ماده در مرز بین ژل های فاصله دهنده و جدا کننده می شود. توجه داشته باشید که ترکیبات به دلیل قابلیت

تحرک روی هم جمع می شوند (بنابراین، ژل فاصله دهنده را گاهی ژل توده کننده گویند). همچنانکه مولکول ها از ژل جدا کننده پایین می روند برحسب تحرک آنها از هم جدا می شوند. در پایان عمل، ژل را از داخل لوله شیشه ای بیرون آورده و نوارها را می توان با روش های مختلف تشخیص داد:



شکل ۵- ۱۳ دیسک الکتروفورز

ابتدا، می توان ژل را با فرو بردن در رنگ و به دنبال آن شستشوی زیاد ژل در جهت پاک کردن رنگ غیر اتصالی، رنگ آمیزی نمود (در بعضی موارد رنگ آمیزی را می توان به روش الکتروفورز انجام داد زیرا در روند رنگ آمیزی، رنگ به طور کووالانی به پروتئین متصل شده و پروتئین به ژل متصل می شود). هنگامی که میدان الکتریکی دوباره اعمال شود، رنگ غیر اتصالی برای خروج آزاد است. اگر لازم باشد، می توان از ژل عکس گرفت یا حتی اگر اطلاعات کمی مورد نیاز باشد، رنگ جذب شده را

می توان با یک چگالی متر ضبط کننده اندازه گیری کرد. دوم این که، می توان ژل را از جهت افقی به چندین لایه برش داد که هر کدام را از نظر میزان رادیو اکتیویته، فعالیت آنزیمی، چگالی نوری در طول موج های مشخص سنجش نمود.

سوم، اگر مواد مورد نظر رادیو اکتیو باشند، می توان ژل را از جهت عمودی برش داد و به وسیله اتورایو گرافی سنجش کرد. کاربردهای اصلی دیسک الکتروفورز، تعیین درجه خلوص یک پروتئین خالص مفروض و تحلیل ترکیبات یک مخلوط با جداسازی بسیار بالا است (اگر ترکیبات بسیار زیادی وجود داشته باشند).

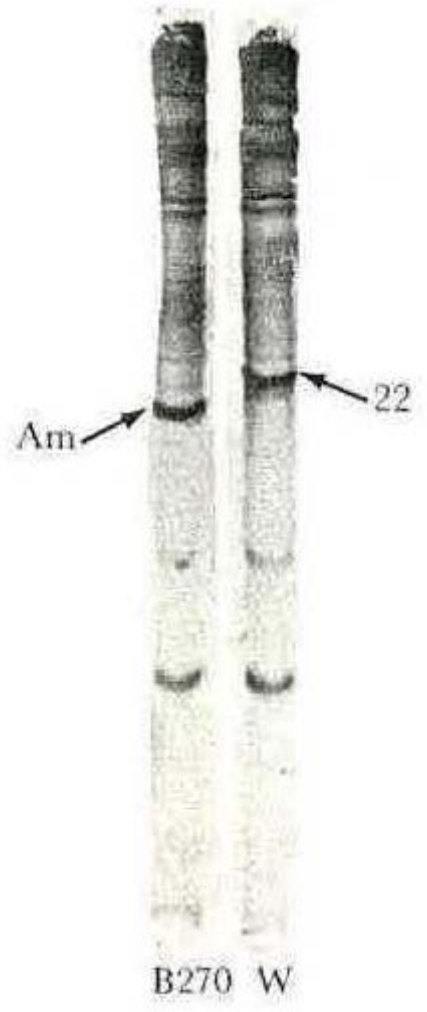
خلوص، یک اصطلاح نسبی است زیرا ناخالصی ها آنقدر کم هستند که قابل آشکار شدن نیستند. بنابراین، در آزمایش های تعیین خلوص باید مقدار بسیار زیادی از پروتئین به کار برده شود. از آنجا که حد آشکار سازی به وسیله رنگ آمیزی حدودμg ۱ می باشد، برای مشاهده این که چیزی ۹۹ ٪ خالص است لا اقل μg ۱۰۰ از آن باید به کار برده شود و تنها زمانی این مقدار کافی خواهد بود که ناخالصی فقط شامل یک پروتیئن باشد. حتی در تراکم بسیار بالا (mg ۱/۰ – ۰/۵) ممکن است ناخالصی ها در pH مشخص یا تامپون حل نشده باشند. از این رو، برای اطمینان داشتن در مورد خلوص، معمولاً لازم است که چندین تامپون و چندین pH مختلف به کار رود.

مثال زیر استفاده از دیسک الکتروفورز را برای یک مخلوط پیچیده روشن می سازد.

مثال : تجزیه و تحلیل پروتئین های ساخته شده هنگام آلوده شدن باکتری E.coli به وسیله فاژ T_4

اگر E.coli به وسیله فاژT_4 ، آلوده شود، تعداد بسیار زیادی از پروتئین های واسطه فاژ ساخته می شوند. مقادیر نسبی هر کدام و زمان ساخته شدن آنها به وسیله دیسک الکتروفورز (بااستفاده از یک ماده رادیو اکتیو) مطالعه شده اند. اگر مخلوطی از همه پروتئین های یک سلول آلوده شده به فاژ T_4 ، الکتروفورز و سپس رنگ آمیزی شوند، ژل تقریباً به طور پیوسته رنگ شده و نوارهای مشخصی روی آن نخواهیم دید زیرا هزاران پروتئین حضور دارند. در اثر آلوده کردن باکتری به فاژ T_4 ، سنتز پروتئین های میزبان متوقف می شود. بنا براین، اگر آلوده سازی در حضور ^{3}H- leucine ، انجام شود، هیچ پروتئین باکتریایی رادیو اکتیو نخواهد شد. از این رو، برای مطالعه ترتیب ساخته شدن پروتئین های فاژ در طول آلوده شدن و در زمان های مختلف، از نوکلئوتید رادیواکتیو ^{3}H- leucine استفاده شد. در این روش چند دقیقه بعد از هر بار افزودن ^{3}H- leucine ، سلول ها جمع

آوری شدند. سپس پروتئین های سنتز شده را خالص کردند و دیسک الکتروفورز انجام دادند. نوارهای مختلف در زمان های متفاوت مورد مطالعه قرار گرفتند. این عمل با فاژ موتانت و فاژ وحشی انجام شد. فاژ موتانتی که می توانست فقط بخشی از یک پروتئین را بسازد مورد مطالعه قرار داده شد. با استفاده از روش فوق مشاهده شد که یک نوار حذف شد (مثلاً نوار شماره ۲۲ در شکل ۵- ۱۴ در فاژ نوع وحشی) ولی نوار دیگری ظاهر گردید (مثلاً نوار Am در فاژ موتانت شکل ۵- ۱۴). این نوار متعلق به ژن جهش یافته است. با استفاده از تعداد زیادی از این جهش ها، هر نوار قابل تعیین بود، به این طریق، ترتیب ساخته شدن پروتئین های مختلف معلوم شد. ضروری است تأکید کنیم که این تحلیل در حضور همه پروتئین های باکتریایی انجام شد ولی به دلیل این که آنها رادیو اکتیو نبودند، مشاهده نشدند.



شکل ۵- ۱۴ ژل های مربوط به.پروتئین های الکتروفورز شده در E.coli آلوده به T_4 . (W) نوع وحشی و نوع موتانت با (B270) نشان داده شده اند. این ژل ها مربوط به پروتئین های سر فاژ هستند. سلول های آلوده شده بعد از ۱۰ تا ۱۲ ساعت توسط ^{3}H- leucine نشاندار شدند، پروتئین ها استخراج شده و روی ژل آلکریلامید در حضور اوره قلیایی الکتروفورز گردیدند. نوار شماره ۲۲ که پروتئین اصلی مربوط به قسمت سر فاژ است در فاژ موتانت حذف شده و به جای آن نوار جدیدی کمی پائینتر ظاهر شد.

الکتروفورز پیوسته

در الکتروفورز پیوسته[1] ، یک نمونه به طور پیوسته از یک جهت اضافه می شود و با جریان حلال و به طور عمودی در یک میدان الکتریکی حرکت می کند. این عمل به وسیله کاغذ صافی به عنوان ماده نگهدارنده انجام می شود شکل (۵- ۱۵). یک ورقه بزرگ کاغذی به صورتی که در شکل نشان داده شده، بریده و بین دو ورقه Lucite [۲] قرار می دهند. لبه بالایی کاغذ در مخزن تامپون قرار دارد و در آغاز کاغذ به طور کامل توسط تامپون مرطوب می شود. تا زمانی که مخزن پر است، تامپون به طور دائم به وسیله جریان باریک از کاغذ پایین می آید و از نقاط دندانه دندانه ای به داخل لوله های جمع کننده می چکد. در بالای کاغذ، نمونه مورد نظر به طور پیوسته اضافه می شود، یک سرنگ خودکار این عمل را انجام می دهد. میدان الکتریکی تغییر مکان افقی ثابت ایجاد می کند، که اندازه هر کدام از آنها به میزان و اثر حرکت بستگی دارد. عوامل تعیین کننده جداسازی، عبارتند از سرعت جریان تامپون، سرعت اضافه شدن نمونه، ولتاژ به کار رفته، و pH و ترکیب یونی تامپون می باشند. شرایط ایده آل معمولاً با چندین بار آزمایش به دست می آید. این سیستم به طور موفقیت آمیزی در جدا کردن پروتئین ها، پپتید ها، اسید های آمینه، مولکول های کوچک دیگر، و یون های غیر آلی به کار رفته است.

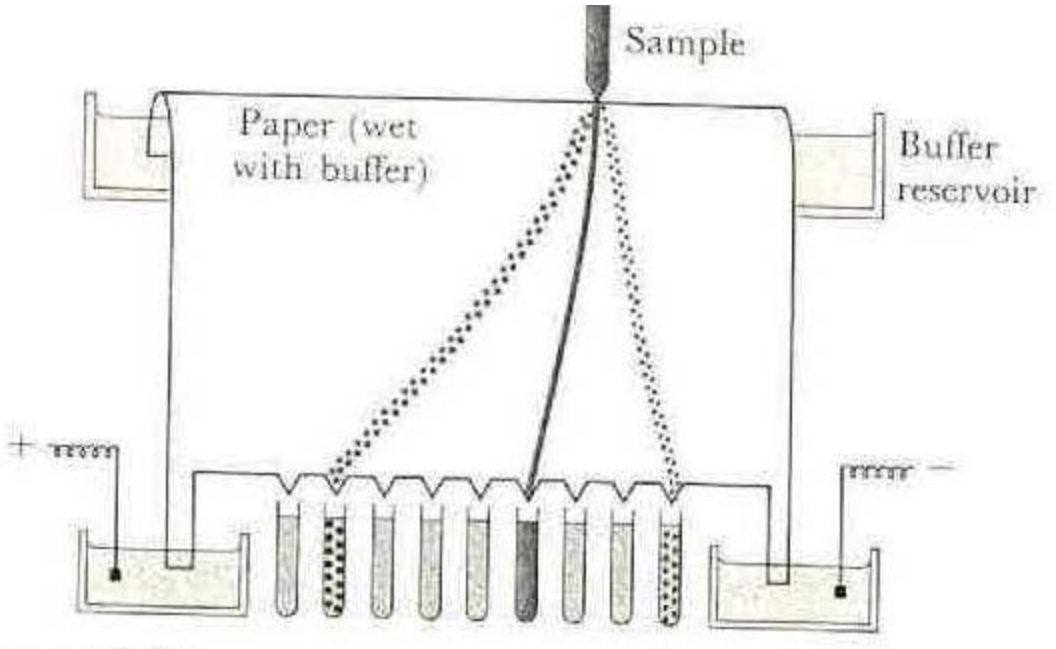
در مورد بعضی مواد، جذب شدن به کاغذ، مشکل جدی است.برای جلوگیری از آن، شخصی به نام کورت هنینگ[۳] سیستمی را ارائه داد که نیازی به ماده نگه دارنده نداشت.

---

[1] Continuous (curtain) electrophoresis

[۲] _ نام تجارتي ماده صمغ مانند از ترکیب چندین مولکول methyl methacrylate به دست مي آید.

[3] Kurt Hanning



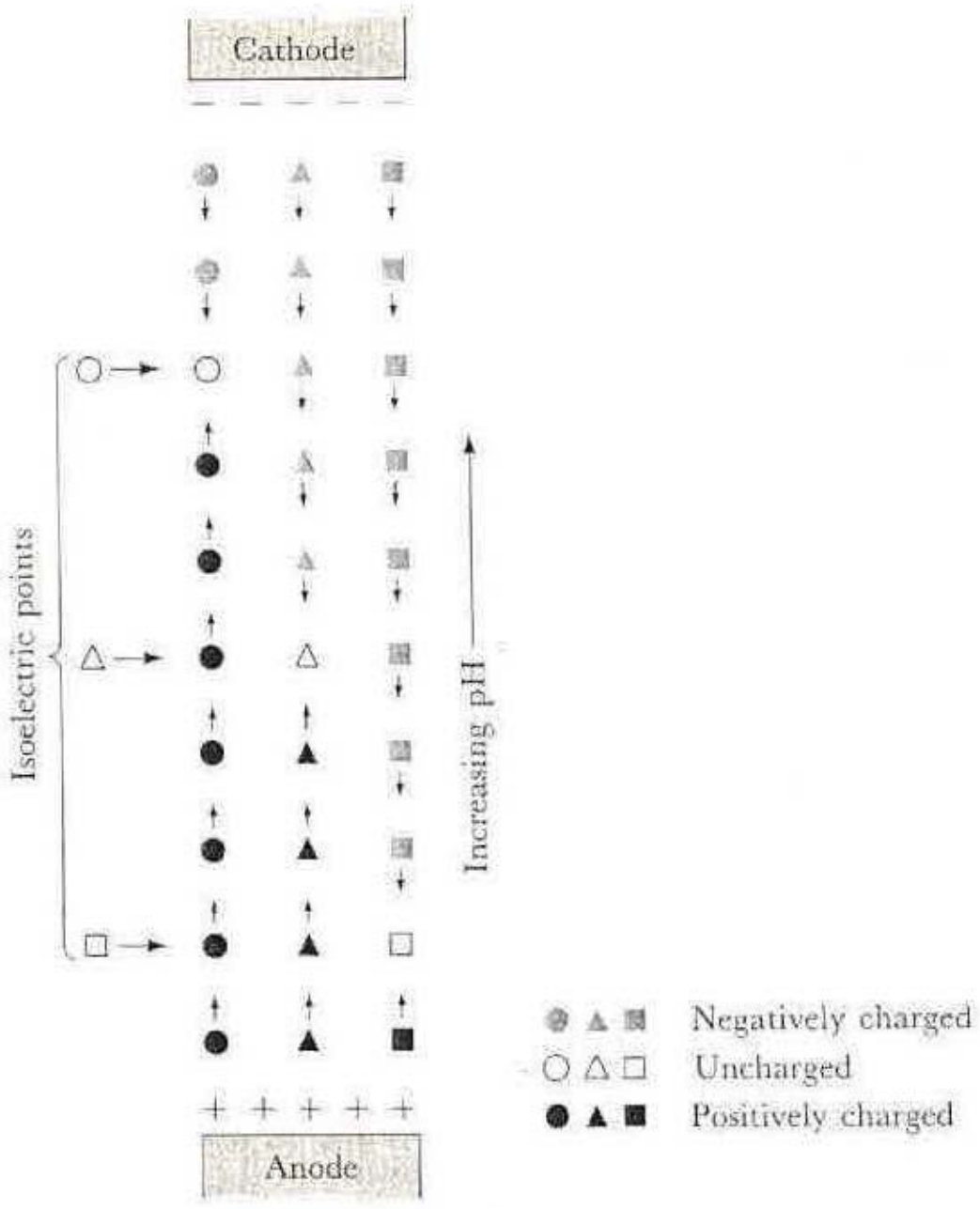
شکل ۵- ۱۵ الکتروفورزپیوسته.

در این سیستم، روشی که در آن تامپون از مخزنی که یک جریان دائمی بین دو صفحه شیشه ای بسیار نزدیک به هم ایجاد می کند به کار برده می شود. به طور دقیق دما کنترل شده و نمونه از فضای باریک بین صفحه ها جریان انتقالی را کاهش می دهد. یک سری روزنه های مخروطی در قاعده، اجازه می دهند که فراکسیون های مختلفی جمع آوری شوند.این تجهیزات پر خرج کاربرد وسیعی نداشته اند اما امکان جداسازی عالی پروتئین ها، پپتیدها، و سلول های مختلف خونی را ایجاد کرده اند. (مثلاً، آنتی بادی تولید شده توسط لنفوسیت های انسانی از لوکوسیت ها و ماکروفاژها به وسیله همین ابزار جدا شده است).

ایزو الکتریک فوکوسینگ

آمفولیت ها ترکیباتی هستند که حاوی پلی آمینو – پلی کربوکسیلیک اسید می باشند و جرم مولی کمی دارند. با توجه به آنچه که در مورد آمفولیت ها گفته شده خود پروتئین ها نیز آمفولیت هایی هستند که دارای گروه های بار دار مثبت و گروه های بار دار منفی می باشند. همه آمفولیت ها این خاصیت را دارند که بار آنها وابسته به pH است، آنها در pH پایین بار مثبت دارند و در pH بالا دارای بار منفی هستند، و در مورد هر آمفولیت، می توان pH خاصی را پیدا کرد که در آن pH، آمفولیت های مورد نظر بدون بار باشند. این pH را pH ایزو الکتریک می نامند. در نقطه ایزو الکتریک، آمفولیت در یک میدان الکتریکی حرکت نمی کند. اگر یک پروتئین در یک شیبpH قرار داده شود، مولکول ها حرکت کرده ودر محلی که بدون بار شوند یعنی نقطه ایزوالکتریک توقف می کنند. پس اگر چندین پروتئین در مخلوطی داشته باشیم ، به محض این که هر کدام از پروتئین ها به نقطه ایزو الکتریک خود رسید متوقف شده و در آن محل تجمع می یابد. پس حرکت پروتئین ها در یک شیب pH را ایزوالکتریک کانونی یا ایزو الکتریک فوکوسینگ گویند که شبیه روش سانتریفوژ کردن با شیب غلظت است.روند حرکت دو پروتئین متفاوت در ایزوالکتریک کانونی را در شکل ۵- ۱۶ مشاهده می فرمایید.

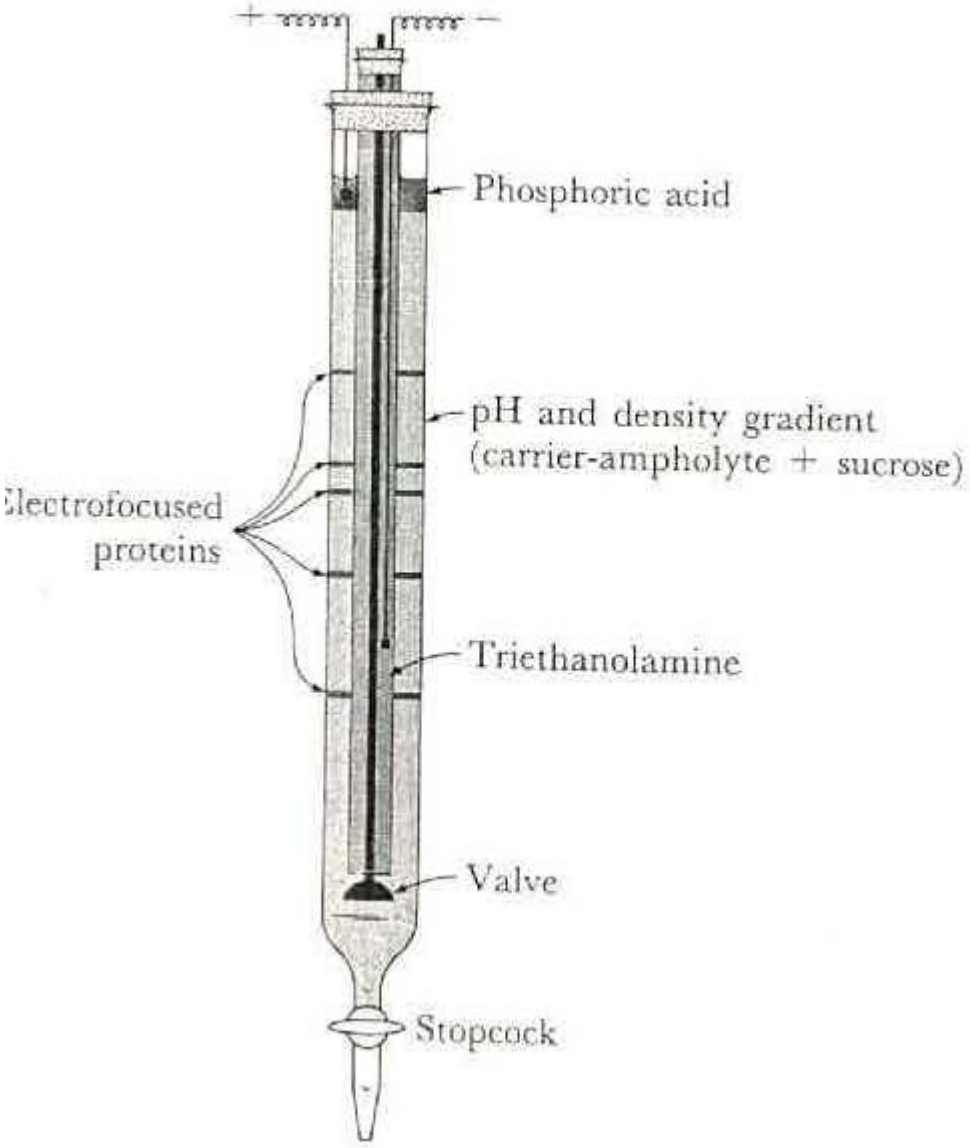
شیب pH توسط یک روش نا معمول ایجاد می شود. اگر به روش ساده مخلوط کردن دو تامپون با pH های متفاوت که بتوانند در هم نفوذ کنند یا به روش مخلوط کردن دو تامپون به روش استاندارد تهیه شیب های غلظت ، بخواهیم شیب pH به وجود آوریم، مطمئناً شیب ایجاد شده در یک میدان الکتریکی پایدار نمی ماند. یون های موجود در تامپون در میدان الکتریکی حرکت کرده و فراکسیون سازی انجام نمی شود مگر این که درشت مولکول ها سریع تر از آن که شیب pH دچار آشفتگی شود شود حرکت می کردند. این روش برای تولید یک شیب pH پایدار شامل پلی آمفولیت های سنتزی با جرم مولی پایین (۶۰۰ – ۳۰۰) که یک محدوده وسیع نقاط ایزو الکتریک را پوشش می دهد، می باشد. این پلی آمفولیت ها معمولاً مخلوطی از پلی مرهای آمینو آلیفاتیک و اسید های کربوکسیلیک هستند (Ampholine , LKB Industries , Inc).



شکل ۵- ۱۶ فر آیند حرکت ایزو الکتریک فوکوسینگ.

یک شیب pH با مخلوطی از آمفولیت ها در آب مقطر که نقاط ایزو الکتریک آن یک محدوده کوچک را پوشش می دهد شروع می شوند. قبل از ایجاد یک میدان الکتریکی،pH سیستم ثابت است وبرابر میانگین آمفولیت ها در محلول است.هنگامی که میدان

برقرار شود، آمفولیت ها شروع به حرکت می کنند.به دلیل ظرفیت های تامپونی شان یک شیبpH تدریجا ایجاد می شود. به زودی هر ذره در این شیب قرار می گیرد و در نقطه ای که منطبق بر نقطه ایزو الکتریک خودش می باشد، رسوب می کند. اگر مخلوطی شامل پروتئین هایی با نقاط ایزو الکتریک متفاوت باشد، در جهات منطبق بر نقاط ایزو الکتریک شان حرکت می کنند و تا زمانی این عمل ادامه دارد که غلظت و ظرفیت تامپونی پروتئین (که آن هم آمفولیت است) منطبق با pH ایزوالتریک آنها باشد. وسایل به کار رفته در شکل ۵- ۱۷ نشان داده شده است. شیب pH در یک ستون شیشه ای آب سرد تشکیل می شود که شامل یک لوله کاتد ویک کاتد است. لوله را به وسیله غلظت یکنواختی از آمفولیت های تهیه شده در یک شیب غلظتی ساکاروز برای حذف انتقال گرما، پر می کنند.



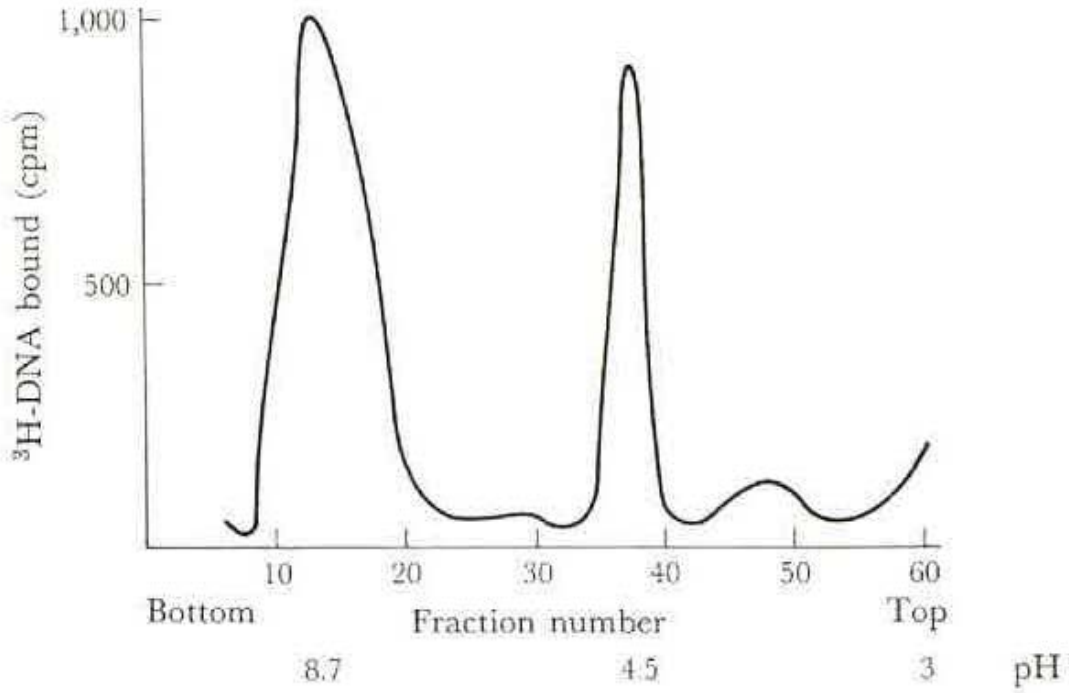
شکل ۵- ۱۷ ایزوالکتریک فوکوسینگ.

ماده نمونه در سوسپانسیون پلی آمفولیت وجود دارد. لوله ای که به قطب منفی (کاتد) متصل است را با یک باز قوی (مثلاً تری اتانول آمین) پر می کنند و بخش اصلی ستون را به وسیله اسید فسفریک می پوشانند، این لایه اسیدی به قطب مثبت (آند) متصل است. به دنبال برقرار شدن صد ها ولت اختلاف پتانسیل بین الکترود ها، دریچه واقع در ته لوله کاتد باز می شود.پلی

آمفولیت هایی که بار منفی دارند و نزدیک به کاتد هستند به سمت آند حرکت خواهند کرد. یک تا سه روز بعد، سیستم متعادل می شود و پروتئین ها برحسب نقاط ایزوالکتریک شان در شیب pH پخش می گردند.سپس شیر پایین لوله را باز کرده و تمام محتویات لوله را در لوله های مختلف جمع آوری می کنند.

پروتئین های مختلف را می توان به وسیله اسپکتوفتومتری، فعالیت آنزیمی، یا رادیواکتیویته مشخص نمود. از ایزوالکتریک فوکوسینگ برای تجزیه و تحلیل پروتئین ها و همچنین بعنوان یک روند آماده سازی استفاده می شود شکل ۵– ۱۸. روش ایزو الکتریک فوکوسینگ دو مزیت ویژه دارد : (۱) جداسازی هایی که با روش های دیگر قابل مشاهده نبودند با این روش انجام شد و نتیجه بسیار خوبی داد، (۲) پروتئین هایی که به طور قابل توجهی غلیظ هستند

ممکن است با روش های دیگر نتوان آنها را از هم جدا کرد، متوجه شدند که این روش بهتر عمل می کند.

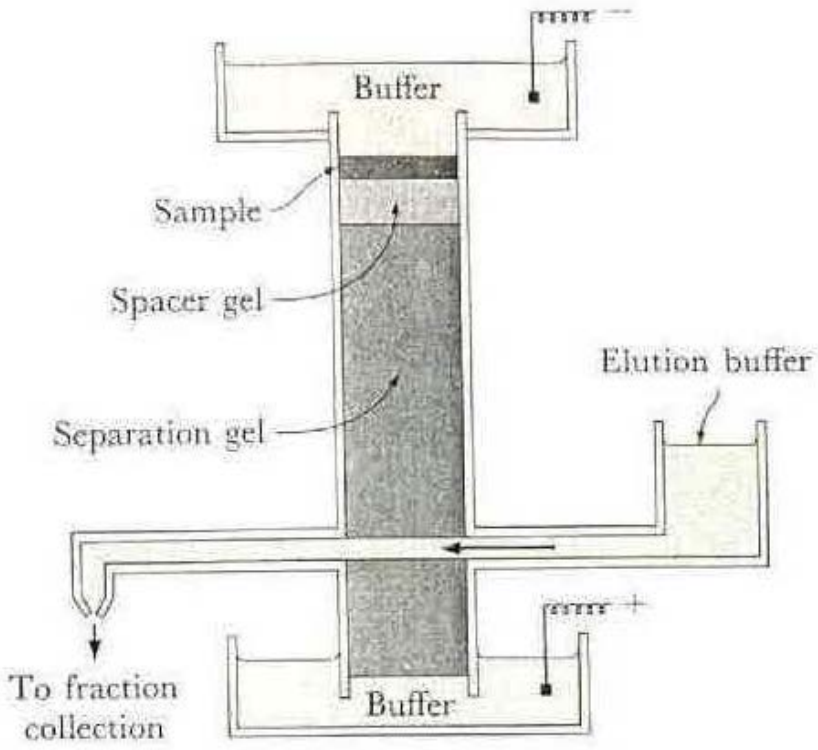


شکل ۵- ۱۸ ایزوالکتریک فوکوسینگ آنزیمی با روش های دیگر کروماتوگرافی خالص کردند ولی وقتی با روش ایزو الکتریک فوکوسینگ خالص سازی را انجام دادند، دو آنزیم مختلف با دو فعالیت آنزیمی به دست آوردند.

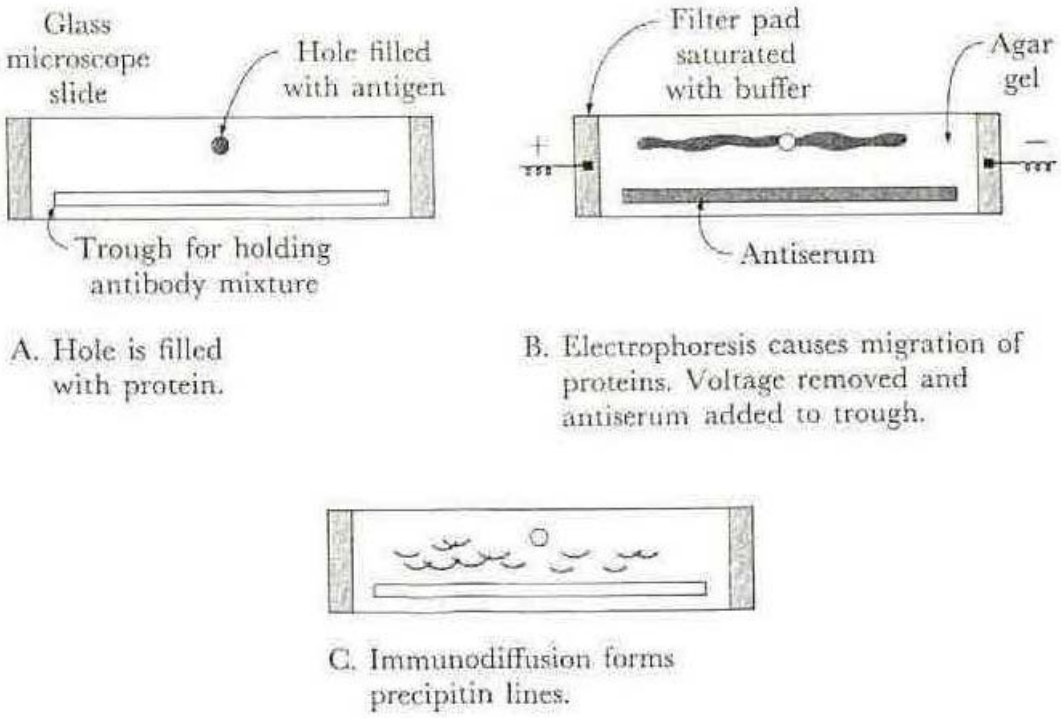
ایمونوالکتروفورز

همان طور که پیش از این بیان شد، موادی با تحرک یکسان را غالبا می توان با کروماتوگرافی دو بعدی یا به وسیله کروماتوگرافی و سپس الکتروفورز از هم جدا کرد. بدین وسیله، جداسازی بر اساس دو خاصیت ممکن می شود. ایمونوالکتروفورز نیزسیستم دوگانه را فراهم می آورد : ابتدا، مولکول ها به وسیله الکتروفورز از هم جدا می شوند و سپس به وسیله انتشار ایمنی آشکار می شوند.

معمولاً الکتروفورز را به طور افقی روی یک صفحه حاوی آگار یا آگاروز به صورتی که در شکل ۵- ۱۹ نشان داده شده است انجام می دهند. یک لایه یکنواخت آماده می شود و یک چاله برای آنتی ژن و یک چاله بلند برای آنتی بادی کنده می شود. مخلوط آنتی ژن را در چاله قرار می دهند و صفحه را الکتروفورز می کنند.د رطول مدت آزمایش ، مولکول ها در هر دوجهت حرکت می کنند، فواصل بین مولکول ها، برحسب قابلیت تحرک آنها و نوع بار شان ایجاد می شود. هنگامی که الکتروفورز به پایان رسید، آنتی سرم را به چاله بلند اضافه می کنند.هم آنتی سرم وهم آنتی ژن در ژل منتشر می شوند.اگر واکنش آنتی ژن – آنتی بادی اتفاق بیافتد یک منحنی رسوبی قابل رویت تشکیل می شود (شکلC ۵- ۲۰). این راه کار، تعیین تعداد آنتی ژن های تولید کننده آنتی بادی و مقادیر وابسته به هر کدام را ممکن می سازد.



شکل ۵- ۱۹ الکتروفورز در مقیاس بزرگ



شکل ۵- ۲۰ ایمنوالکتروفورز

تمرين

۱ - چرا الكتروفورز را بايد در محلول حاوي غلظت كم نمك انجام داد؟ كدام يك از پاسخ هاي زير صحيح است:

الف) براي اين كه در محلول داراي قدرت يوني زياد هدايت جريان الكتريكي بيشتر شده و جريان الكتريكي بسيار
زياد مي شود در نتيجه حرارت كاهش مي يابد.
ب) براي اين كه در محلول داراي قدرت يوني زياد هدايت جريان الكتريكي بيشتر شده و جريان الكتريكي بسيار
زياد مي شود در نتيجه حرارت افزايش مي يابد.
ج) براي اين كه نمك باعث حل كردن يا رسوب دادن تركيبات مي گردد.
د) پاسخ هاي (الف) و (ج) هر دو صحيح هستند.

۲ - كدام يك از جمله هاي زير صحيح است:

الف) در الكتروفورز و كروماتوگرافي دو بعدي ، اگر ابتدا الكتروفورز را انجام داده و سپس كروماتوگرافي كنيم ،
نتايج با انجام عمل معكوس كاملا تفاوت خواهد كرد.
ب)) در الكتروفورز و كروماتوگرافي دو بعدي ، اگر ابتدا الكتروفورز را انجام داده و سپس كروماتوگرافي كنيم ،
نتايج با انجام عمل معكوس هيچ تفاوت نخواهد كرد.
ج)در الكتروفورز و كروماتوگرافي دو بعدي ، pH تاثيري ندارد.
د) هر سه مورد فوق صحيح هستند.

۳ – در آزمایش با استفاده از ژل فیلتراسیون ، اگر پروتئینی با جرم مولی ۱۰۰ KDa در V_0 (void volume) خارج شد. حال پروتئینی با جرم مولی ۲۰۰ KDa در ..... می تواند خارج شود.

الف) در void volume

ب) بعد از void volume

ج) بین void volume و V_t (total volume)

د) در V_t (total volume)

۴ – جدول زیر خالص سازی آنزیمی را در ۵ مرحله نشان می دهد:

مرحله	کل پروتئین (میلی لیتر)	فعالیت آنزیم (U)	فعالیت ویژه (U/mg)
۱ – استخراج	۱۲۰۰۰	۱۲۰۰۰۰	۱۰
۲ – رسوب دادن با آمونیوم سولفات	۶۰۰۰	۱۱۴۰۰۰	۱۵
۳ – ژل فیلتراسیون	۱۰۰۰	۷۰۰۰۰	۷۰
۴ – کروماتوگرافی میل ترکیبی	۱۰۰	۵۰۰۰۰	۵۰۰
۵ – کروماتوگرافی تعویض یونی	۷۰	۳۵۰۰۰	۵۰۰

حال به ۴ سوال زیر پاسخ دهید:

الف) بهترین مرحله برای حفظ فعالیت آنزیم ، کدام مرحله بود؟ مرحله .....

ب) بالاترین افزایش فعالیت ویژه در کدام مرحله اتفاق افتاد؟ مرحله .....

ج) بیشترین کاهش فعالیت آنزیم در کدام مرحله بود؟ مرحله .....

د) تخلیص آنزیم احتمالا در کدام مرحله کامل شده بود؟ مرحله .....

۵ – در خالص سازی آنزیم در سوال ۵ ، در مرحله ۳ معلوم شد که جرم مولی آنزیم برابر ۶۰۰۰۰ است. وقتی در مرحله ۵ به جای این که کروماتوگرافی تعویض یونی انجام دهیم از روش SDS – PAGE استفاده کنیم، دو نوار (bands) با جرم مولی ۴۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ مشاهده گردید. با توجه به مشاهده فوق ، کدام یک از پاسخ های زیر صحیح است:

الف) این آنزیم هنوز به صورت خالص به دست نیامد.

ب) معلوم شد که توسط پروتئازها تجزیه نسبی در آن صورت گرفته است.

ج) باید جرم مولی کمتر از آنچه که در مرحله ۳ حدس زده شد (یعنی ۶۰۰۰۰) داشته باشد.

د) این آنزیم یک هترودیمر با دو زیر واحد غیر مساوی است.

منابع

1. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2013) Lehninger Principles of Biochemistry (sixth edition). Macmillan.
2. vanHolde, K.E., Curtis Johnson, W. and Shing Ho, P. (2006) Principles of Physical Biochemistry (second edition). Pearson.

فصل ۶

سیستم ایمونولوژیکی

پس از مطالعه کامل این فصل شما باید با مطالب زیر آشنا شوید:

۱. **آماده سازی آنتی بادی**
۲. **واکنش های آنتی بادی- آنتی ژن**
۳. **واکنش های ایمنی مفید در سمنجش های زیستی**
۴. **واکنش های رسوبی با استفاده از انتشار در ژل**
۵. **سنجش کمپلمان**
۶. **سنجش های مهاری با استفاده از تثبیت کمپلمان و آگلوتیناسیون غیر فعال**
۷. **سنجش رادیو ایمونولوژی**
۸. **سنجش ایمونو رادیومتری**

مقدمه

به دنبال تزریق کردن یک ماده خارجی به حیوانی بزرگتر، آنتی بادی (Ab) تولید می شود که با آن ماده خارجی واکنش می دهد.آنتی بادی ها پروتئین هایی هستند که در سرم خون یافت می شوند و دسته ای از پروتئین های سرم هستندکه به ایمونوگلوبین ها معروفند. هر ماده ای که بتواند تولید آنتی بادی را تحریک کند آنتی ژن نامیده می شود (Ag). آنتی بادی و آنتی ژن به طور اختصاصی عمل می کنند و هر آنتی بادی با آنتی ژن مخصوصی واکنش می دهد. هاپتن ماده ای است که خودش به تنهایی تولید آنتی بادی نمی کند بلکه با یک نوع آنتی بادی اختصاصی هاپتن واکنش می دهد.بیشتر هاپتن ها مولکول هایی با جرم مولی پایین (کمتر از ۱۰۰۰) هستند. هنگامی که از طریق شیمیایی با ایجاد پیوندهای کووالانی، هاپتن را به یک ماده ایمونوژنیک وصل کنیم، و آن را به یک حیوان تزریق نماییم، آنتی بادی بر علیه این مجموعه ساخته می شود (مثلاً خرگوش).آنتی بادی تولید شده برعلیه یک ماده مثلاً

x (که می تواند یک آنتی ژن یا هاپتن باشد) را آنتی x می نامند. کمپلکس آنتی بادی – آنتی ژن را به صورت

Ab-Ag می نویسند.علاوه بر آنتی ژن اصلی، مواد دیگری هم وجود دارند که با یک نوع آنتی بادی ویژه ، واکنش می دهند، گر چه با کارآیی کمتری انجام می شود. این واکنش ضعیف تر را یک واکنش تقاطعی می نامند (cross-reaction). یک نوع از این واکنش های تقاطعی هنگامی اتفاق می افتد که آنتی ژنA تا حدودی با آنتی بادی B واکنش دهد و آنتی ژن B تا حدودی با آنتی بادیA واکنش دهد. واکنش غیر تقارن تقاطعی هم وجود دارد یعنی آنتی ژنA با آنتی بادی B واکنش بدهد، ولی بین آنتی ژن B با آنتی بادی A واکنشی به وجود نیآید.

از آنجا که آنتی بادی ها پروتئینی هستند، در دیگر حیوانات ماهیت آنتی ژنیک یا تحریک کنندگی سیستم ایمنی را دارند. به عنوان مثال، آنتی بادی مشاهده شده در سرم خرگوش را می توان به یک بز تزریق کرد و شاهد تولید یک آنتی بادی باشیم. آنتی بادی بز با آنتی ژنی که باعث تحریک تولید آنتی بادی خرگوش شده واکنش نمی دهد بلکه فقط با آنتی بادی خرگوش واکنش می دهد. به این سیستم آنتی آنتی بادی (goat antirabbit antibody) هم می گویند. وقتی فعالیت زیستی یک ماده توسط یک آنتی بادی متوقف شود، گفته می شود که آنتی ژن خنثی شده است.

آماده سازی آنتی بادی

از آنجا که به دنبال تزریق ماده خارجی به یک حیوان، درخون حیوان آنتی بادی تولید می شود، لذا می توان با خون گرفتن از آن حیوان، آنتی بادی تولید شده بر علیه آنتی ژن یا بر علیه هاپتن الحاق شده به یک ایمونوژن را به دست آورد. به علت اختصاصی بودن واکنشAb-Ag ، لزومی ندارد که آنتی بادی خاصی را جداسازی کنیم.از این رو، در بیشتر کارهای ایمونولوژیکی، سرم خون به دست آمده (پس از سانتریفوژ کردن و دور ریختن رسوب) که حاوی یک نوع آنتی بادی خاص باشد را آنتی سرم می نامند.زمانی که یک هاپتن الحاق شده به آلبومین برای تولید آنتی هاپتن به حیوانی تزریق شود، در بدن حیوان، آنتی سرم آلبومین ساخته می شود. اگر به عنوان مثال آنتی بادی بر علیه DNA پرتو دیده توسط uv ساخته شود، آنتی بادی تولید شده فقط بر ضد DNA پرتو دیده فعال است. اگر آنتی بادی دیگری در سرم خون باشد که ما به آن نیازی نداریم باید حذف شود. این کار به وسیله جذب انجام می شود.به این صورت که آنتی ژن علیه آنتی بادی ناخواسته، به سرم اضافه شده و ترکیب Ab-Ag ایجاد می شود.تحت شرایط مناسب این کمپلکس را به وسیله سانتریفوژ کردن جدا می کنند افزودن مجدد آنتی ژن باعث کاهش در میزان آنتی بادی می شود. گاهی یک آنتی بادی خالص مورد نیاز است، که می توان آن را با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی به دست آورد.

آماده سازی یک آنتی هاپتن مراحل خاصی احتیاج دارد. از آنجا که هاپتن خودش به تنهایی آنتی ژنیک (تحریک کننده سیستم ایمنی) نیست، آن را به ماده ای که یک ایمونوژن قوی باشد مثل سرم آلبومین گاوی (BSA) یا پلی پپتید های خاص سنتز ی متصل می کنند و سپس مجموعه این دو را به خرگوش تزریق می نمایند.گاهی اوقات این اتصال مشکل به وجود می آورد، زیرا هاپتن باید حداقل یک گروه فعال داشته باشد تا بتواند با گروه های فعال موجود در پروتئین (مثل، آمینو، کربوکسیل، فنولیک، ایمیدازول، سولفیدریل، انیدولیل، و گوانیدینو) تحت شرایط شیمیایی متصل شود. در غیر این صورت، یک مشتق شیمیایی از هاپتن باید ساخته شود تا این الحاق صورت گیرد. جدول (۱) لیست هاپتن هایی که بر علیه آنها آنتی بادی ساخته شده است را نشان می دهد.

واکنش آنتی بادی – آنتی ژن

بعد از این که یک آنتی بادی تهیه شد، تنها با مخلوط کردن آن با آنتی ژن مربوطه در یک تامپون کمپلکس آنتی ژن – آنتی بادی به دست می آید. واکنش آنتی بادی – آنتی ژن معمولاً در pHخنثی انجام می شود. برای ممانعت از دناتوره شدن پروتئین آنتی بادی، محیط باید ایزوتونیک باشد.

جدول ۶- ۱ هاپتن هایی که آنتی بادی آنها ساخته شده اند

Peptide hormones	Insecticides
Nonpeptide hormones	Carbohydrates (e.g., glucose, maltose, lactose)
Coenzymes	Catecholamines
Vitamins	Lipids
Drugs	Steroids
Toxins	Nucleic acid constituents
Carcinogens	Plant hormones

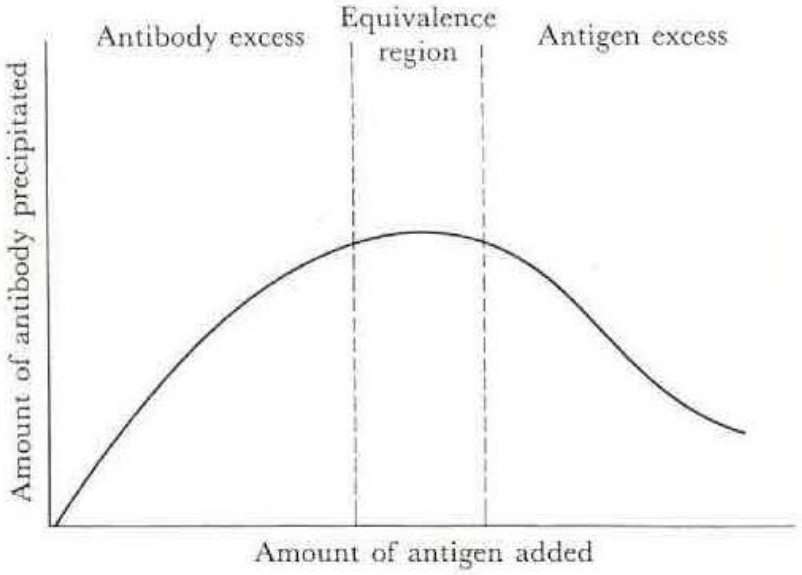
واکنش های ایمنی مفید در سنجش های زیستی

تحت شرایط ویژه، افزودن آنتی بادی به محلولی حاوی آنتی ژن ایجادکمپلکس کرده و رسوب می کند.مقدار آنتی بادی رسوب داده شده به وسیله مقادیر مختلف آنتی ژن، بستگی به نسبت آنتی ژن – آنتی بادی دارد و به آن منحنی رسوب گویند (شکل ۶- ۱). رسوب حاصل به نوعی قابلیت برگشت پذیری تفکیک کمپلکس آنتی بادی – آنتی ژن است. برگشت پذیری به این معنی است که وقتی رسوب تشکیل شد، با تغییر نسبت آنتی ژن به آنتی بادی مجدداً ممکن است رسوب از بین برود. در نواحی که به

صورت آنتی بادی اضافی و منطقه تعادل مشخص شده، تمام آنتی ژن ها رسوب کرده اند. از این رو رسوب دادن با آنتی بادی اضافی را برای خارج ساختن موادی ویژه از محلول می توان به کار برد. به عنوان مثال، اگر مخلوطی از پروتئین های رادیو اکتیو داشته باشیم، مقدار یک پروتئین ویژه (مثلاً A) را می توان با افزودن آنتی A و رسوب سازی، تعیین کرد. نسبت میزان ماده قابل رسوب به کل رادیو اکتیویته منجر به فراکسیون وزنی پروتئین A در مخلوط می شود.به این دلیل همان طور که بعدا خواهیم دید واکنش رسوب دهی بخش مهمی از سنجش رادیو ایمونو است.

واکنش های رسوبی با استفاده از انتشار در ژل

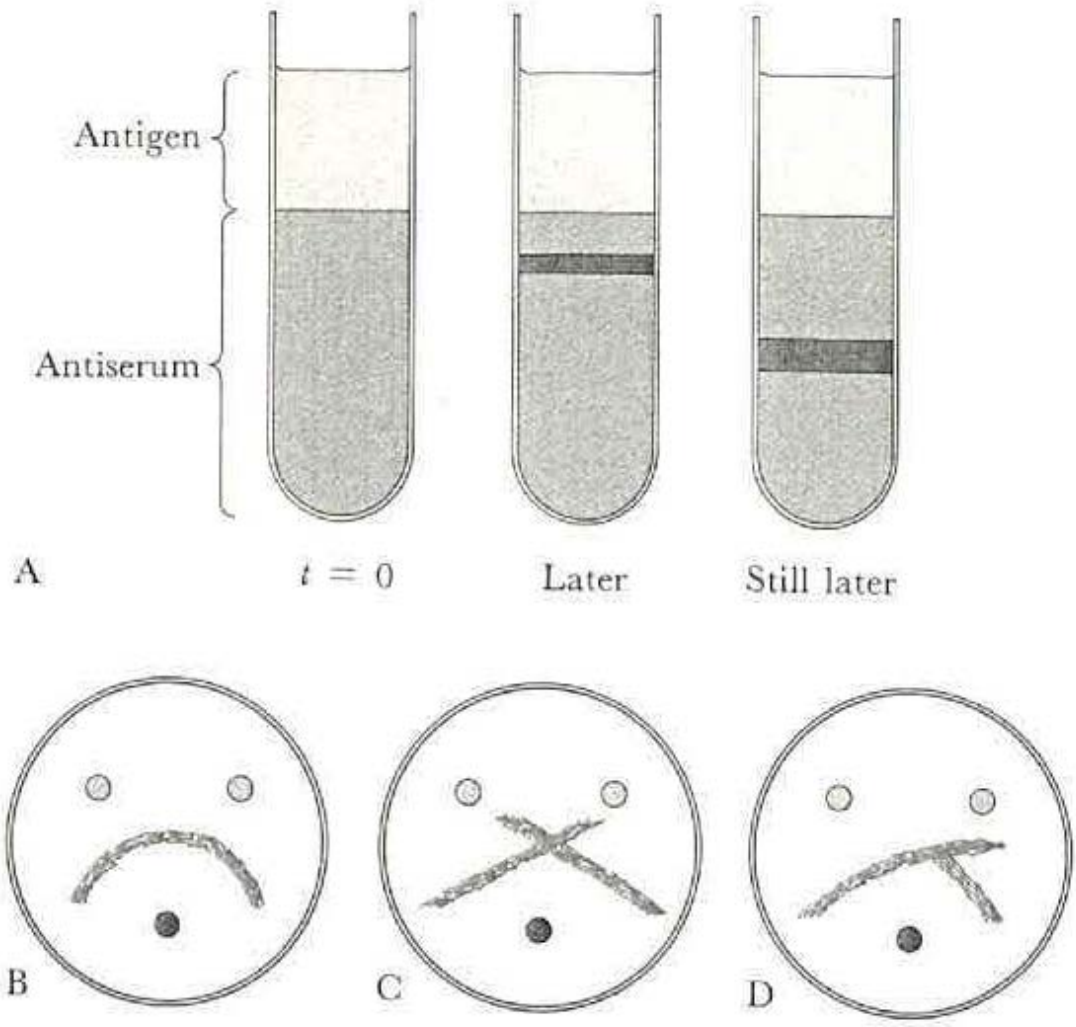
واکنش های رسوبی در ژل های آگار هم رخ می دهند (شکل A ۲). یک لوله آزمایش را با آگار که محتوی آنتی سرم است پر می کنند و روی آن را با آنتی ژن می پوشانند.آنتی ژن به سمت داخل در آگار منتشر می شود و رسوبی در آگار تشکیل می شود. دربخش بالایی لوله، میزان رسوب کم است زیرا میزان آنتی ژن د رآنجا بالا است (شکل A ۶-۲ رابببنید) با انتشا ر دائمی رو به پایین آنتی ژن رسوب بیشتر می شود.

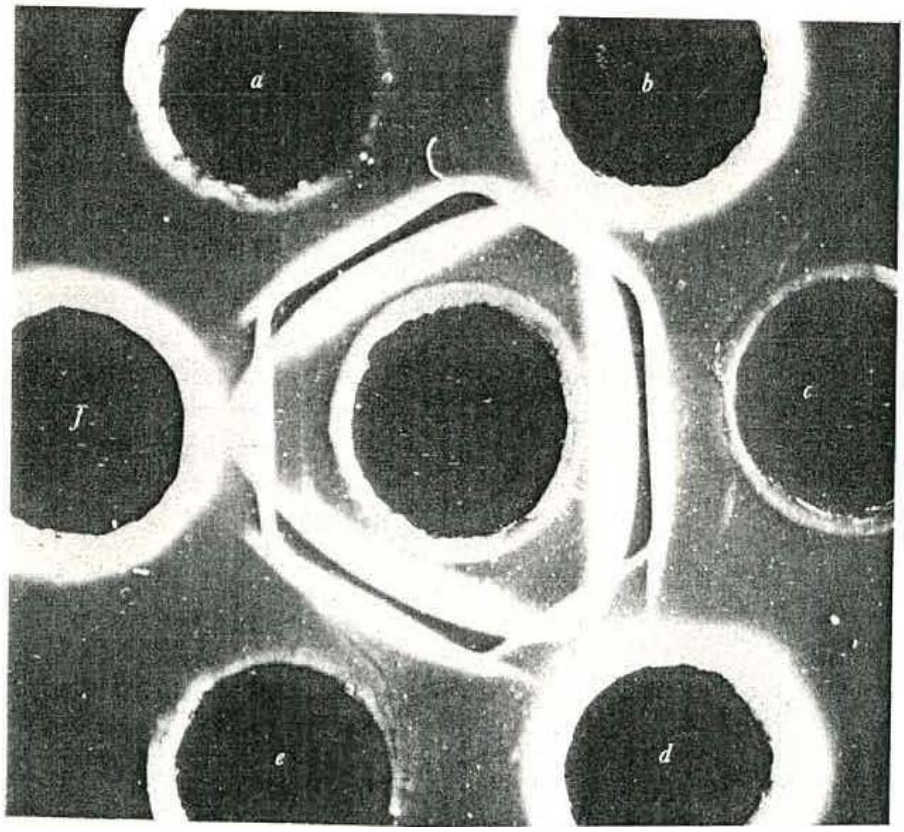


شکل ۶– ۱ منحنی رسوب. مقدار آنتی بادی ثابت و مقدار آنتی ژن دائما زیاد می شود. بعد از اینکوبه کردن آنها در مدت معین، مخلوط سانتریفوژ شد. با اندازه گیری آنتی بادی باقی مانده در مایع رویی، مقدار آنتی بادی رسوب شده مشخص می شود. در ناحیه " آنتی بادی اضافی " تمام آنتی ژن ها رسوب کردند یعنی در مایع رویی آنتی بادی اضافی وجود دارد. در ناحیه "آنتی ژن اضافی " اغلب آنتی بادی ها به شکل رسوب در نیامده اند و مایع رویی حاوی مخلوط آنتی ژن و آنتی بادی می باشد .

علت آن است که هنگام حرکت به جلو، آنتی بادی بیشتر ی در برابر آنتی ژن قرار می گیرد، در حالی که در سمت دیگر، آنتی ژن بیشتری وارد می شود، زیادی آنتی ژن رسوب را حل می کند. اگر آنتی ژن و آنتی بادی مخلوط هایی از چند گونه واکنش دهنده باشند، چندین نوار رسوبی تشکیل می شود.به طوری که هر نوار متعلق به یک نوع واکنش آنتی ژن – آنتی بادی می باشد. بنابراین اگر، دو آنتی ژن ضریب انتشار یکسانی داشته باشند و غلظت آنتی ژن ها و آنتی بادی ها یکسان باشد، فقط یک نوار دیده می شود.

اطلاعات بیشتر را می توان به وسیله روش انتشار مضاعف ouchtery long به دست آورد که این روش در شکل (B-D ۶–۲) نشان داده شده است.یک پلیت آگار که دارای ۳ چاه است، دو تا از آنها را با آنتی ژن پر کرده و سومی را با آنتی سرم پر می کنند.انتشار در تمام جهات چاهک ها به وجود می آید. در محلی آنتی بادی به آنتی ژن برسد، یک خط رسوبی ظاهر می شود.


Antigen
Antiserum
A
$t = 0$
Later
Still later
B
C
D



شکل ۶- ۲ انتشار آنتی ژن و آنتی بادی در ژل و ایجاد رسوب

اگر دو چاهک آنتی ژن دارای آنتی ژن های متفاوت باشند، دو خط غیر وابسته هستند و به طوری که در شکل C ۶-۲ نشان داده شده همدیگر را قطع می کنند. اگر واکنش تقاطعی بین آن دو، وجود داشته باشد، طرحی مطابق شکل (D ۶-۲) به وجود می آید. منطقه کوچک بالای منحنی در شکل (D ۶-۲) را مهمیز می نامند و معمولاً نقاطی متمایل به سمت آنتی ژنی که فعالیت کمتری دارد، ایجاد می کند. در واکنش های متفاوت، ضعیف، اما تقاطعی مربوط به دو آنتی ژن، دو نوار تقاطعی به طوری که در شکل (C ۶-۲) نشان داده شده ایجاد می کند که ممکن است با مواد مستقل اشتباه شود. روند ouchterlony را می توان برای تعیین این که آیا ماده مجهول،همان ماده معلوم است یا نه به کار برد زیرا اگر چنین باشد نتیجه ای مطابق شکل (B ۶-۲) حاصل می شود.

سنجش کمپلمان (Complement fixation assay)

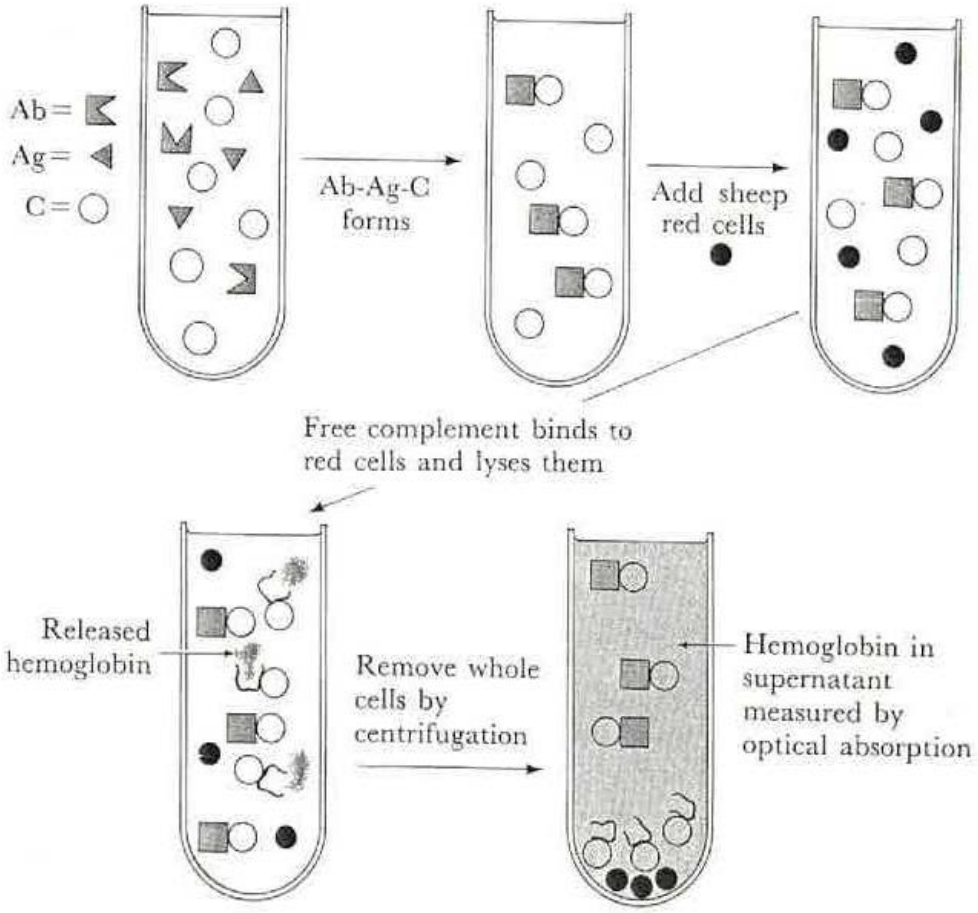
سرم خون شامل گروهی از پروتئین ها است که ایمونوگلوبین نیستند و به مجموعه آنها کمپلمان یا Ć گفته می شود.کمپلمان با آنتی ژن یا آنتی بادی به تنهایی واکنش نمی دهد بلکه با کمپلکس های آنتی ژن –آنتی بادی واکنش می دهد. به دلایلی که معلوم نیست، کمپلمان با کمپلکس های هاپتن _ آنتی بادی واکنش نمی دهد.

سنجش تثبیت کمپلمان برای یک واکنش آنتی ژن –آنتی بادی بر پایه این اصل است که کمپلمان به وسیله کمپلکس آنتی ژن – آنتی بادی تثبیت می شود و میزان کمپلمان آزاد کاهش می یابد. اگر آنتی ژن مربوط به عوامل خاصی روی سطح گلبول های قرمز باشد، افزودن کمپلمان منجر به لیز شدن سلول می شود. این لیز شدن را می توان به آسانی در سلول های قرمز خون مشاهد ه کرد، اگر سلول های سالم را سانتریفوژ کنیم، پیگمان هموگلوبین قرمز رنگ در ته لوله جمع می شود، اگر همولیز رخ داده باشد، هموگلوبین در مایع رویی ظاهر می شود و می توان مقدار آن را با اندازه گیری جذب در mM ۵۴۱ مشخص نمود. برای رسم منحنی استاندارد از سرم خوکچه هندی به عنوان منبع کمپلمان، سلول های قرمز گوسفند و آنتی بادی های خرگوش برعلیه سلول های قرمز گوسفند استفاده می شود. سنجشی که در شکل ۶- ۳ نشان داده شده است به طور طبیعی در دو مرحله انجام می شود.

۱_ آنتی بادی، آنتی ژن و مقدار معینی کمپلمان را مخلوط کرده و کمپلکس آنتی بادی- آنتی ژن – کمپلمان تشکیل

می شود. در این مرحله، کمپلمان در کمپلکس آنتی بادی – آنتی ژن تثبیت می شود.

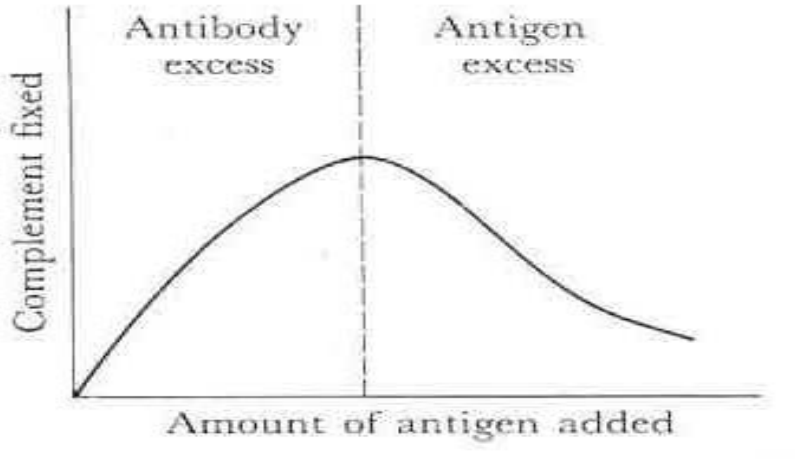
۲ _ سپس گلبول های قرمز گوسفند دارای آنتی بادی خاصی از خرگوش را به مخلوط اضافه می کنند. در این مرحله کمپلمان آزاد موجود در محلول به گلبول های قرمز متصل می شوند و باعث لیز کردن گلبول های قرمز می گردند. مخلوط را سانتریفوژ کرده و توسط دستگاه اسکتروفتومتر در طول موج nm ۵۴۱ جذب اندازه گیری می شود.



شکل ۶– ۳ تثبیت کمپلمان. مقادیر آنتی بادی و آنتی ژن مساوی است ولی مقدار کمپلمان اضافی ریخته می شود. گلبول های قرمز گوسفند قبلاً با آنتی بادی خرگوش پوشیده شده اند. از آنجا که همولیز شدن به کمپلمان آزاد نیاز دارد (که در واکنش اولیه آنتی بادی – آنتی ژن مصرف نشده بود)، میزان هموگلوبین مایع رویی بیانگر میزان کمپلمان باقی مانده است. توجه داشته باشید که افزایش واکنش آنتی بادی –آنتی ژن به معنی کاهش لیز است.

تثبیت کمپلمان را می توان برای اندازه گیری میزان یک آنتی ژن مشخص موجود در یک مخلوط کمپلکس با حساسیت بالا، به کار برد. شکل (۴) منحنی مربوط به میزان کمپلمان تثبیت شده را علیه آنتی ژن اضافه شده، نشان می دهد. میزان کمپلمان تثبیت شده با افزایش آنتی ژن در ناحیه " آنتی بادی اضافی " زیاد می شود ولی میزان کمپلمان تثبیت شده در ناحیه " آنتی ژن اضافی

" با افزایش آنتی ژن کاهش می یابد. از این رو، برای اندازه گیری میزان یک آنتی ژن ویژه، به صورت زیر عمل می شود.ابتدا، یک منحنی استاندارد مانند آنچه که در شکل ۶- ۴ مشاهده می شود، با استفاده از مقادیر معلوم آنتی ژن رسم می کنند.سپس مقدار جذب را خوانده و از روی آن مقدار کمپلمان تثبیت شده مشخص می شود. حال برای تعیین مقدار آنتی ژن مجهول (توجه داشته باشید اگر خطی که از روی محور y ها یعنی محور تثبیت کمپلمان به سمت محور x ها رسم کنید به دو نقطه روی منحنی برخورد خواهد کرد) محل مشخص شده را توسط خطی به منحنی متصل می نماییم. اگر آنتی ژن مجهول را رقیق کنیم معلوم می شود که کدام قسمت از منحنی مربوط به مقدار آنتی ژن است.



شکل ۶- ۴ منحنی تثبیت کمپلمان استاندارد. به مقادیر ثابت آنتی بادی و کمپلمان، مقادیر مختلفی آنتی ژن اضافه می شود. بعد از گرما گذاری گلبول های قرمز گوسفند و آنتی بادی علیه گلبول های قرمز گوسفند اضافه شد. بعد از دومین گرماگذاری، مخلوط سانتریفیوژ شده و گلبول های قرمز سالم خارج می شود. مقدار هموگلوبین را توسط جذب در nm ۵۴۱ اندازه گیری می کنند.

انجام این کار ضروری است زیرا اگر از یک محلول رقیق استفاده شود، مشخص نمی شود که آیا میزان کمپلمان تثبیت شده مربوط به ناحیه آنتی بادی اضافی یا آنتی ژن اضافی است.

سنجش تثبیت کمپلمان تقریباً ۵۰ تا ۱۰۰ بار حساس تر از واکنش رسوب دهی است. در این روش مقادیر بسیار کم

آنتی ژن یعنی حدود µg ۰/۰۱ امکان پذیر است. تنها مشکلی که ممکن به وجود آید این است که در بعضی از مخلوط هایی که برای سنجش آنتی ژن ویژه ای صورت می گیرد، ممکن است حاوی موادی باشد که کمپلمان را بی اثر کنند (مواد ضد کمپلمان) یا این که همولیز را تحریک نمایند.

سنجش های مهاری با استفاده از تثبیت کمپلمان و آگلوتیناسیون غیر فعال

بعضی از مواد باعث ممانعت از انجام واکنش های آنتی بادی – آنتی ژن می شوند که از همین موضوع استفاده کرده و می توان آنها را مورد سنجش قرار داد. این موضوع به خصوص در سنجش هاپتن ها مفید است، زیرا هاپتن ها آنتی بادی واکنش داده در نتیجه تثبیت کمپلمان صورت نمی گیرد. بنا براین، نمی توان هاپتن ها را به طور مستقیم با تثبیت کمپلمان سنجش کرد. اگر یک واکنش آنتی بادی – آنتی ژن طوری تنظیم شده باشد که همه آنتی بادی ها با آنتی ژن اشباع شوند (یعنی در ناحیه آنتی ژن اضافی باشیم) و تمام کمپلمان ها تثبیت گردند ، آن گاه هر عاملی که بتواند به آنتی بادی متصل شده بدون این که باعث تثبیت کمپلمان شود، می تواند به عنوان یک کاهش در میزان کمپلمان تثبیت شده، آشکار شود. از این رو، اگر یک هاپتن همراه با یک آنتی ژن که با آن واکنش تقاطعی می دهد، اضافه شود، می تواند با آنتی ژن برای اشغال جایگاه های اتصال آنتی بادی رقابت کند و میزان کمپلمان تثبیت شده را کاهش دهد.

$$Ab + Ag + C \rightarrow Ab.Ag.C$$

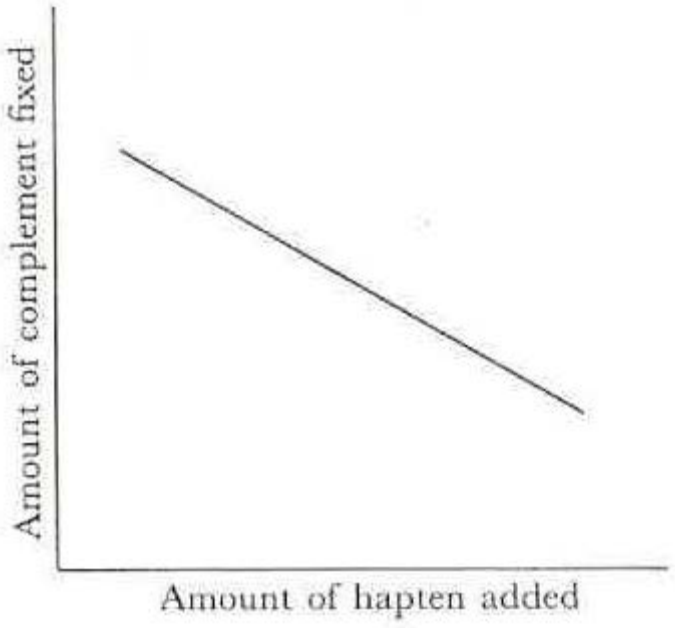
$$Ab + H + C \rightarrow Ab.H + C$$

با افزودن مقادیر متفاوت یک هاپتن معلوم به یک مخلوط آنتی بادی – آنتی ژن معلوم، می توان یک منحنی استاندارد رسم کرد و آن ر برای اندازه گیری مقداری از همان هاپتن در یک مخلوط، مورد استفاده قرار داد. این روند را آزمایش ممانعت تثبیت کمپلمان می نامند.مثالی از آن در شکل (۶– ۵) نشان داده شده است.

این نوع روش را " سنجش بازدارندگی " می نامند وباید به خاطر داشت که سنجش باز دارندگی نمی تواند برای آنتی ژن ها یا حتی آنتی ژن های واکنش گر تقاطعی به کار برده شود زیرا در هر دو حالت کمپلمان تثبیت می شود و دیگر نمی توان با استفاده از ممانعت از تثبیت کمپلمان عمل نمود.

آنتی ژن ها را می توان به وسیله آزمون بازدارندگی، با استفاده از پدیده آگلوتیناسیون سنجش کرد. به این معنی که با همان روشی که رسوب دهی کمپلکس های آنتی بادی – آنتی ژن رخ می دهد، باکتری ها و سلول های موجود در سوسپانسیون نیز تشکیل توده می دهند (آگلوتیناسیون) به شرطی که آنتی بادی ها مستقیما بر ضد ترکیبات سطحی سلول ها باشند. این واکنش را آگلوتیناسیون غیر فعال می نامند. آنتی ژنی که بر ضد آن قبلاً یک آنتی بادی ساخته شده است را به سطح سلول های قرمز خون متصل می کنند یا گاهی اوقات آنها را به ذرات پلی استیرن متصل می نمایند. جفت شدن آنتی ژن ممکن است به وسیله جذب یا پیوند های کووالانسی انجام می شود. اضافه کردن مستقیم یک آنتی بادی که بر علیه آنتی ژن متصل شده به سطح گلبول قرمز (یا ذرات دیگر) تهیه شده، ممکن است که با سلول ها یا ذرات، ایجاد توده کند. در این روش با اضافه کردن آنتی ژن به توده فوق رقابت ایجاد شده و از تشکیل توده ممانعت به عمل می آید..

دو روشی که در بالا ذکر شد قبلاً بسیار متداول بود ولی امروزه از روش های حساس تری که در زیر توضیح خواهیم داد بیشتر استفاده می شوند.

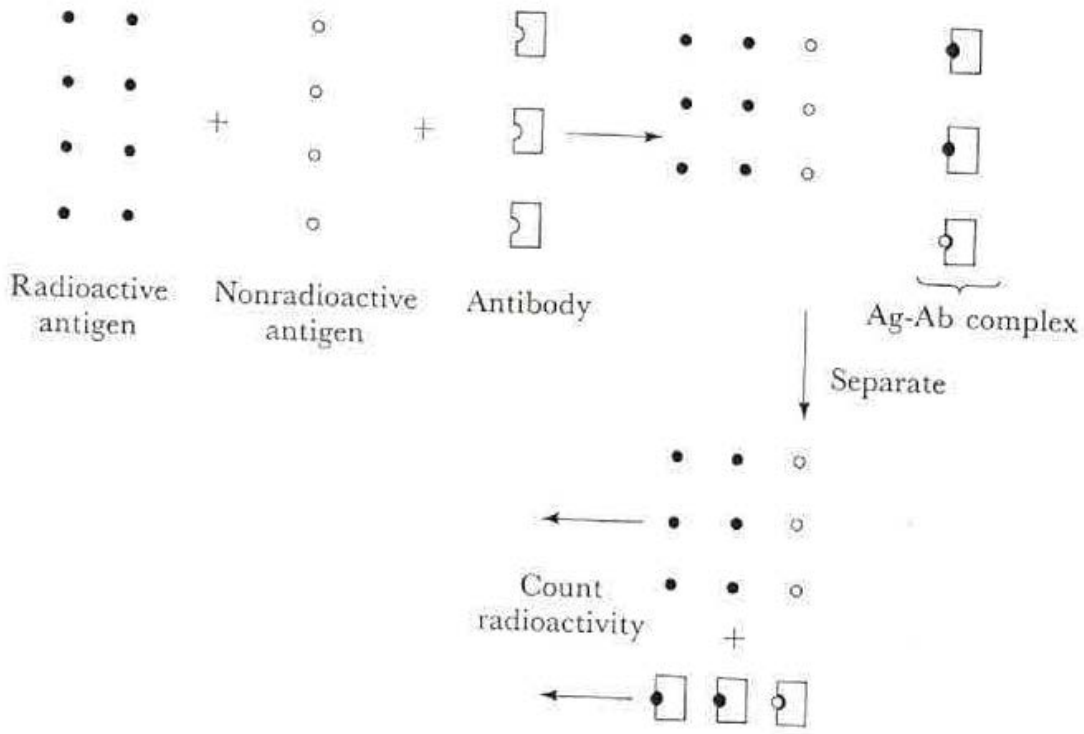


شکل ۶- ۵ سنجش مهار تثبیت کمپلمان.

سنجش رادیو ایمونو لوژی (Radioimmunoassay)

یکی از روش های ایمونولوژیکی بسیار حساس سنجش رادیو ایمونولوژیکی (RIA) است که مقادیر بسیار کوچک مواد غیر رادیو اکتیو را مشخص می نماید. حساسیت آن برابرهمه سنجش های کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری شناخته شده است. کاربرد اصلی آن در یافتن مولکول ها یی است که (۱) نمی توانند در محیط زنده با مواد رادیو اکتیو نشان دار کرد، (۲) نمی توانند با آنتی بادی خاصی ترکیب شوند و کمپلمان تثبیت شده ایجاد نمایند، (۳) هویت آنها ناشناخته است اما می توانند واکنش تقاطعی دهند و در نتیجه با آنتی ژن های معلوم رقابت می کنند. اصول آن به طور شماتیک در شکل ۶- ۶ نشان داده شده است. آنتی بادی (Ab) ضد آنتی ژن (Ag) به وسیله آنتی ژن رادیو اکتیو (Ag^*) اشباع می شود. اگر Agغیر رادیو اکتیو، همراه با Ag^* به Ab افزوده شود، با افزایش نسبت Ag/ Ag میزان Ag^* یافت شده در کمپلکس Ab-Ag کمتر خواهد شد. (میزان Ag-

Abافزایش می یابد و میزان Ag^*– Ab کاهش خواهد یافت) به عنوان مثال، اگر ۱ = Ag^* / Ag باشد، تنها Ag^* در پیوند شرکت خواهد کرد، اگر ۲ = Ag^* / Ag باشد، تنها ⅓ آن در پیوند شرکت می کنند و الی آخر. اگر کمپلکس Ag^* – Ab را بتوان به طور فیزیکی از Ag^* جدا کرد، میزان Ag را می توان تعیین نمود.

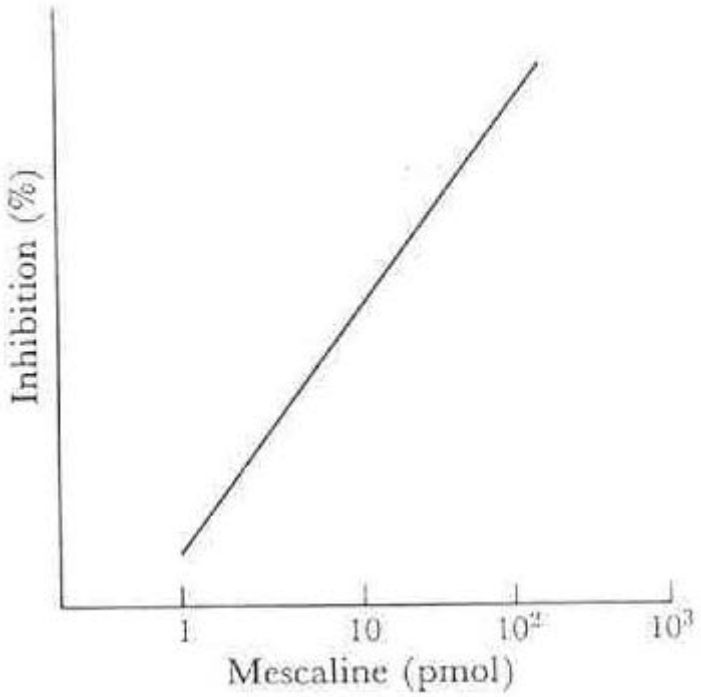


شکل ۶– ۶ اصول سنجش رادیو ایمونو لوژیکی

برای اندازه گیری Ag، یک منحنی استاندارد باید رسم کرد (شکل ۶– ۷). این کار را می توان با مخلوط کردن مقدار ثابتی از Ab و Ag^* و قرار دادن مخلوط در یک سری لوله آزمایش انجام داد. مقادیر معلوم از Ag به هر کدام اضافه می شود.هنگامی که واکنش کامل شد، Ag^* – Ab را از Ag^* جدا می کنند که به این ترتیب نموداری به دست می آید که بر حسب رابطه رادیو اکتیویته در Ag^* – Ab جمع آوری شده نسبت به مقدار Ag افزوده شده است (شکل ۶– ۷). برای تعیین مقدار Ag در یک نمونه ، مقداری از نمونه را به مخلوط Ag^* – Ab (به همان اندازه که برای منحنی استاندارد داشتیم) اضافه می کنند، Ag^* – Ab

جمع آوری شده و رادیو اکتیویته سنجیده می شود، و میزان Ag از روی منحنی استاندارد خوانده می شود. این کار با هر نمونه ای قابل انجام است و تا زمانی که چیزی در مخلوط نباشد که در واکنش Ag^* – Ab دخالت کند، اعتبار دارد.

جدا کردن Ag^* – Ab از Ag^* به طور تجربی به دو طریق انجام می شود.



شکل ۶– ۷ منحنی استاندارد برای سنجش رادیو ایمونولوژی.آنتی بادی علیه مزکالین ومزکالین نشان دار شده با I^{125} همراه با مقادیر مختلفی از مزکالین غیر نشان دار مخلوط شد. مهار رسوب رادیواکتیو توسط مزکالین اضافه شده، منحنی فوق را به وجود آورد. توجه داشته باشید محور x لگاریتمی است.

الف) روش چارکول فعال پوشیده شده با دکستران (Dextran- coated activated charcoal)

چارکول فعال شده توانایی کاربری وسیعی برای جذب مولکول های کوچک دارد.پروتئین ها و کمپلکس $Ab - Ag^*$ را نیز جذب می کند هر چند که این کار به آرامی و سرعت کمتری انجام می شود.چارکول به وسیله پلی ساکارید دکستران پوشش داده می شود که در این صورت Ab و $Ab - Ag^*$ قادر به جذب نیستند. از این رو، اگر چارکول پوشیده شده با دکستران به مخلوطی شامل Ag^* آزاد و $Ab - Ag^*$ اضافه شود، پس از سانتریفوژ کردن Ag غیر پیوندی رادیواکتیو (Ag^*) رسوب کرده و $Ag^* - Ab$ رادیو اکتیو درمحلول رویی دیده می شوند.این یک روش راحت و سریع است که در شکل (A ۶– ۸) نشان داده شده است.

ب) روش آنتی بادی مضاعف (Double - antibody method)

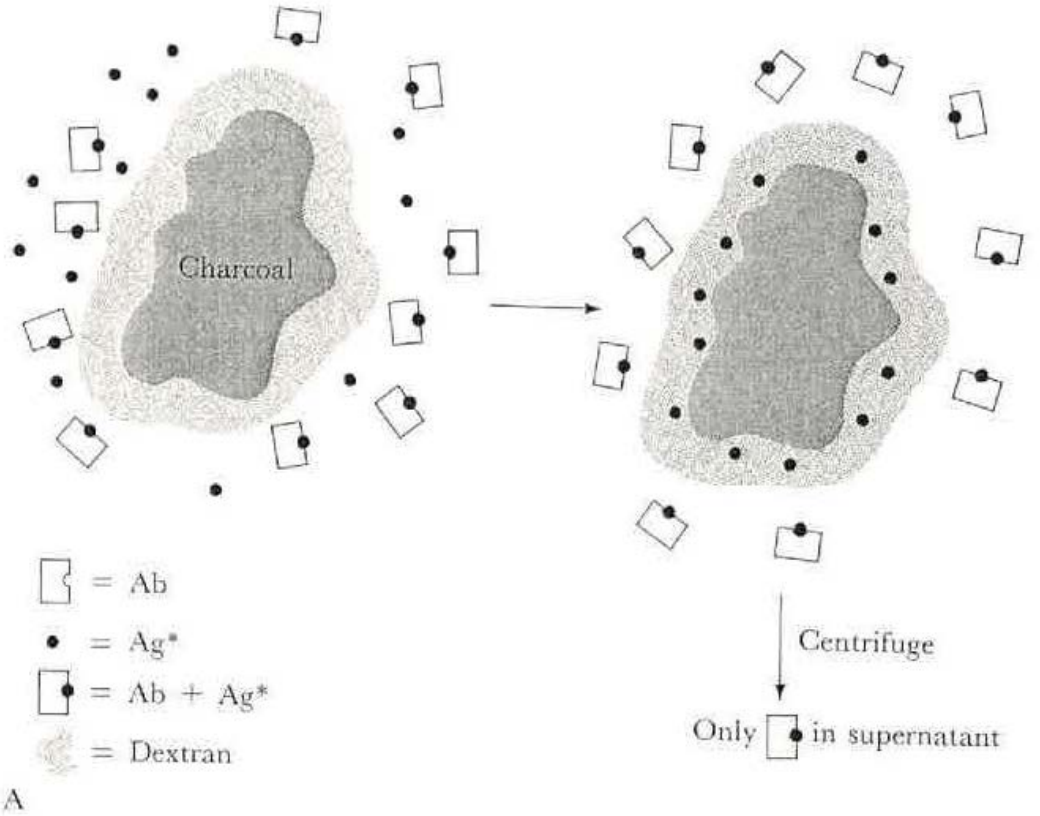
برای تهیه آنتی بادی از خرگوش استفاده می شود. گاما گلوبولین خرگوش در حیوانات دیگر تحریک کننده سیستم ایمنی است و برای تولید پادتن گاماگلوبولین خرگوش از بز، گوسفند، اسب و گاو استفاده شده است. افزودن آنتی سرم بز بر علیه گاما گلوبولین خرگوش منجر به تشکیل رسوب می شود . که می توان این رسوب را به وسیله سا نتریفوژ جمع آوری نمود. (شکل B ۶– ۸) از این رو، روند زیر به کار می رود.هر لوله برای تولید منحنی استاندارد به کار می رود و به لوله های نمونه (که همه آنها قبلاً برای تولید $Ab - Ag^*$ گرماگذاری شده اند) پادتن ضد Ab خرگوش که توسط بز ساخته شده (در نقطه تعادل واکنش رسوب) افزوده می شود (به طور معمول ۱۶ تا ۴۸ ساعت طول می کشد). بعد از گرماگذاری، نمونه را سانتریفوژ می کنند. $Ab - Ag^*$ در رسوب یافت می شود، Ag^* آزاد در محلول رویی وجود دارد. این روش بسیار ساده است ولی به نگه داری حیوانات بزرگی به عنوان منبع آنتی سرم نیازدارد.

آزمایش رادیو ایمونولوژی با دیگر آزمایش های ایمونولوژی فرق دارد. از این جهت که آنتی ژن رادیو اکتیو مورد نیاز است. ^3H

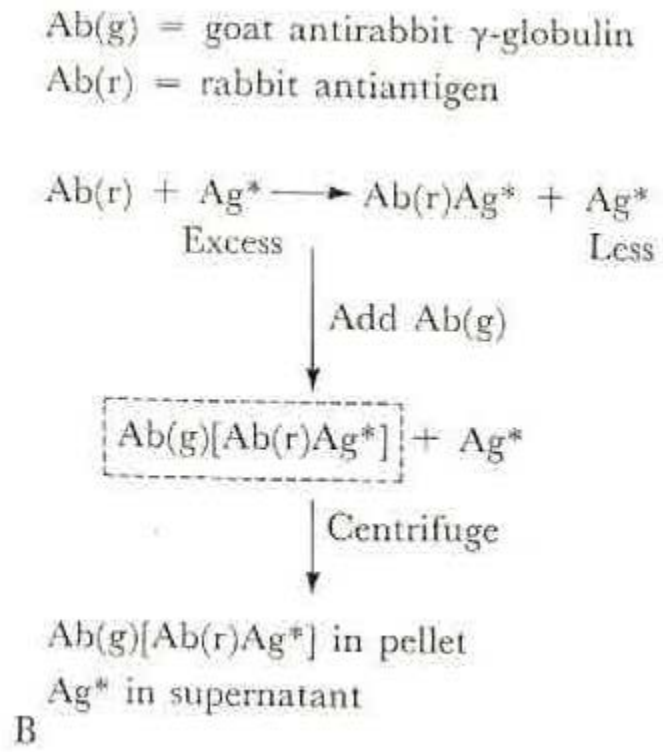
مناسب یا ترکیب ^{14}Cنشان دار را می توان خریداری نمود و یا از پیش ماده های نشان دار، آنها را سنتز کرد. معمولاً آنتی ژن یا هاپتن را به وسیله ^{125}I یا ^{131}I ید دار می کند، مزیت خاصی در استفاده از ^{125}I وجود دارد زیرا این ایزوتوپ یک ساطع کننده

قوی اشعه گاما است. ساطع کننده های β را باید به وسیله شمارش گر جرقه ای شمارش کرد وبه علت این که در یک آزمایش رادیوایمونولوژی، ممکن است نمونه مورد نظر دارای مقداری پروتئین باشد، آماده سازی آنتی ژن های ید دار شده معمولاً کار ساده ای نیست، به خصوص به این علت که لازم است که به ماده هیچ آسیبی نرسد که روی آنتی ژن اثر بگذارد. ید دار کردن پروتئین هایا یک گروه آمینو، یا هاپتن هایی که یک گروه آمینو دارند، را می توان با واکنش توسط I – ۳ – (۴– هیدروکسی فنیل) ـ پروپیونیک اسید N – هیدروکسی سوکسینید استر، انجام داد. برای پروتئین هایی که دارای تیروزین هستند یا هاپتن هایی با یک گروه فنولیک، حلقه آروماتیک را می توان به طرق مختلفی ید دار نمود.اسیدهای نوکلئیک را نیز می توان به وسیله واکنش با سیتوزین ید دار نمود.

در بعضی از موارد، گروه های فعالی وجود ندارد که بتوان مستقیما آنها را ید دار نمود، در این گونه موارد، ابتدا ترکیب را به تیروزین یا هیستامین متصل می کنند و سپس بخش الحاق شده را ید دار می نمایند.



A

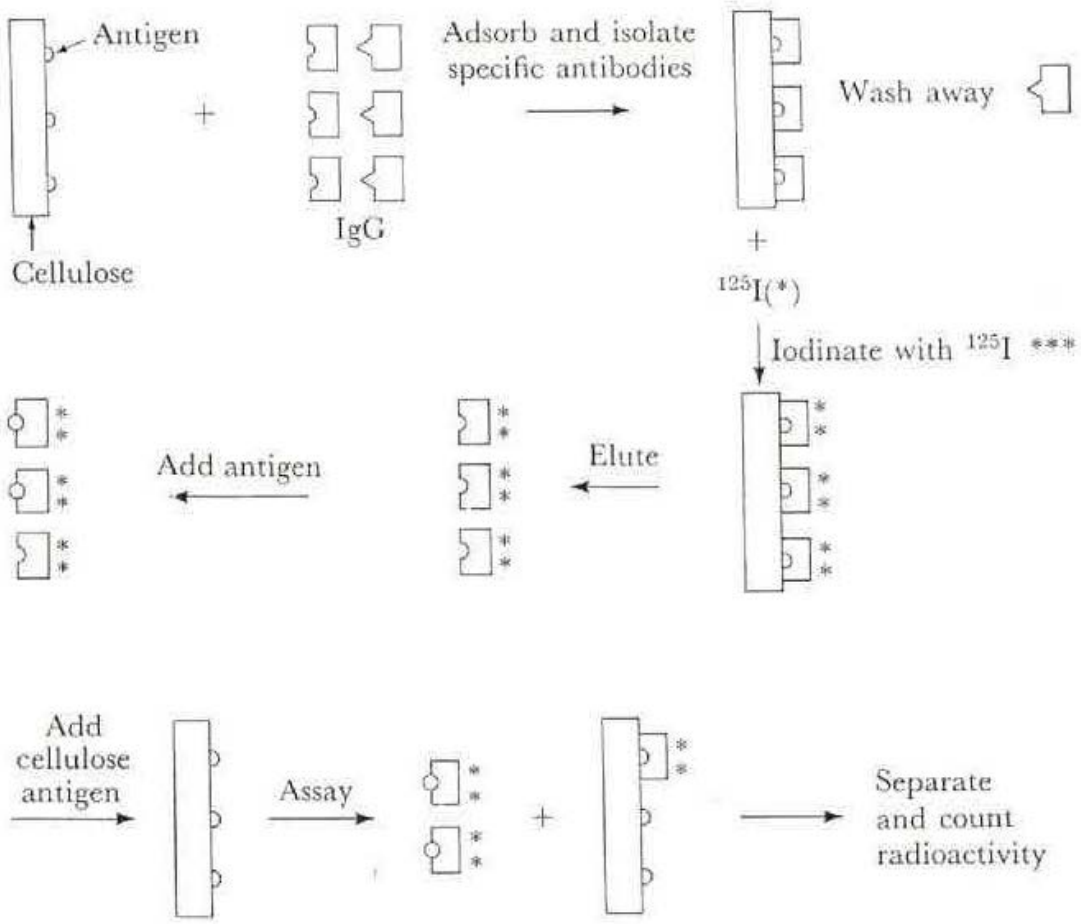


شکل ۶– ۸ روش هایی برای جدا کردن $Ab - Ag^*$ از Ag^* (A) روش چارکول پوشیده شده با دکستران (چون Ag^* مولکول کوچکی است می تواند در دکستران وارد شود). (B) روش آنتی بادی مضاعف.

سنجش ایمونو رادیو متری (The immunoradiometric assay)

در بعضی از موارد امکانات لازم برای تهیه یک آنتی ژن رادیو اکتیو وجود ندارد.سنجش ایمونو رادیو متریک (IRA)، امکان سنجش چنین مواردی را فراهم می آورد.این روش توسط نمودار (۹) بهتر روشن می شود. آنتی ژن خالص به ماده پایداری مثل سلولز، متصل یا جفت می شود. ایمونوگلوبولین (IgG) به دست آمده از سرمی که دارای یک آنتی ژن ویژه برای آنتی بادی است، افزوده می شود.آنتی بادی های جذب نشده را به وسیله شستشو پاک می کنند و آنتی ژن مخصوص آنتی بادی جذب شده را به وسیله ید رادیو اکتیو، ید دار می کنند. (توجه داشته باشید که بر خلاف IRA، در این جا آنتی بادی به جای آنتی ژن، ید دار می شود). آنتی بادی رادیو اکتیو را سپس از روی ماده جاذب پاک کرده و در سنجش به کار می برند.جهت سنجش، Ab^* را

با آنتی ژنی که باید تعیین شود، مخلوط می کنند، این کار به وسیله آنتی بادی اضافی انجام می شود. (در IRA، از Ag اضافی استفاده می شد) سپس مخلوط را به سلولزی که حاوی Ag است، اضافه می کنند، تنها Ab^* واکنش نداده می تواند به سلولز متصل شود. Ab^* واکنش داده را به وسیله شستشو پاک کرده و شمارش می کنند. در این جا مبنای اندازه گیری، مقدارAg است. سنجش ایمونو رادیو متریک به طور وسیعی هنوز به کار نمی رود اما در آینده مسلما این طور نخواهد ماند.



شکل ۶- ۹ اصول سنجش ایمونورادیو متریک.

مثال هایی از روش های ایمونولوژیکی به کار رفته در سنجش های زیستی

مثال های زیر را می توان برای تعداد زیادی از آزمایش ها به کار برد. توجه داشته باشید که در برخی موارد، روش ایمونولوژیکی به طور کیفی به کار برده می شود و روشی بسیار حساسی است. از این روش برای اندازه گیری کمی و دقیق استفاده می شود.

مثال ۱ _ تشخیص و رده بندی باکتری های مختلف به وسیله آگلوتیناسیون.

بسیاری از باکتری های جدا شده در طبیعت یا به دست آمده از بیماران را می توان به وسیله رسوب دادن یا آگلوتیناسیون با آنتی بادی های خاص بر ضد سویه های معلوم، تعیین هویت کرد (شکل ۱۰) واکنش را هم می توان به وسیله مشاهده کردن توده با میکروسکوپ نوری یا به وسیله تغییراتی در تیرگی یک سوسپانسیون اندازه گیری شده به وسیله اسپکتروفوتومتری، آشکار ساخت.

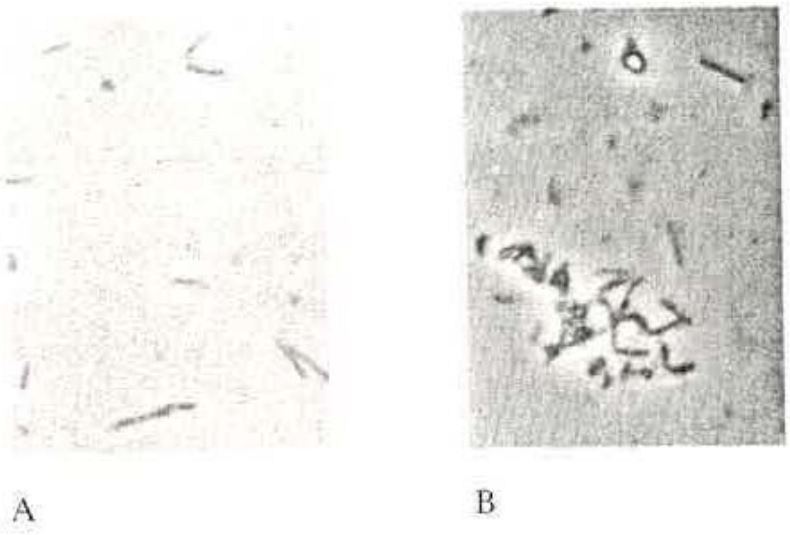
مثال ۲ _ تشخیص ویروس ها به وسیله ممانعت از هماگلوتیناسیون القا شده به وسیله ویروس.

اغلب لازم است که هم در آزمایشگاه و هم در کلینیک تشخیص طبی، ویروس ها را تعیین هویت کنیم. این عمل را می توان به سادگی با یک سنجش ممانعت نمونه، انجام داد. رده های مشخصی از ویروس ها قادرند که گلبول های را به فرم توده در آورند (هماگلوتیناسیون). اگر یک ویروس مخصوص باعث آگلوتیناسیون می شود، با افزودن یک آنتی بادی بر ضد آن ویروس، Ab به ویروس متصل شده بنابر این آگلوتیناسیون صورت نمی گیرد. اگر کسی مجموعه ای از آنتی بادی های علیه بسیاری از ویروس ها را داشته باشد، می تواند ویروس خاصی را شناسایی کند.

مثال ۳ _ آشکار سازی گنادوتروپین ها در ادرار زنان باردار به وسیله سنجش ممانعت و آگلوتیناسیون غیر فعال.

ذرات پلی استیرن را می توان به وسیله گنادوتروپین انسانی پوشش داد که گنادوتروپین، هورمونی است که در ادرار زنان باردار یافت می شود. افزودن یک آنتی گنادوتروپین باعث می شود که این ذرات پوشیده شده تشکیل توده می دهند (شکل ۶- ۱۰). این توده ها را می توان به آسانی به وسیله یک میکروسکوپ نوری دید. اگر ادرار مربوط به یک زن باردار قبل از اضافه کردن

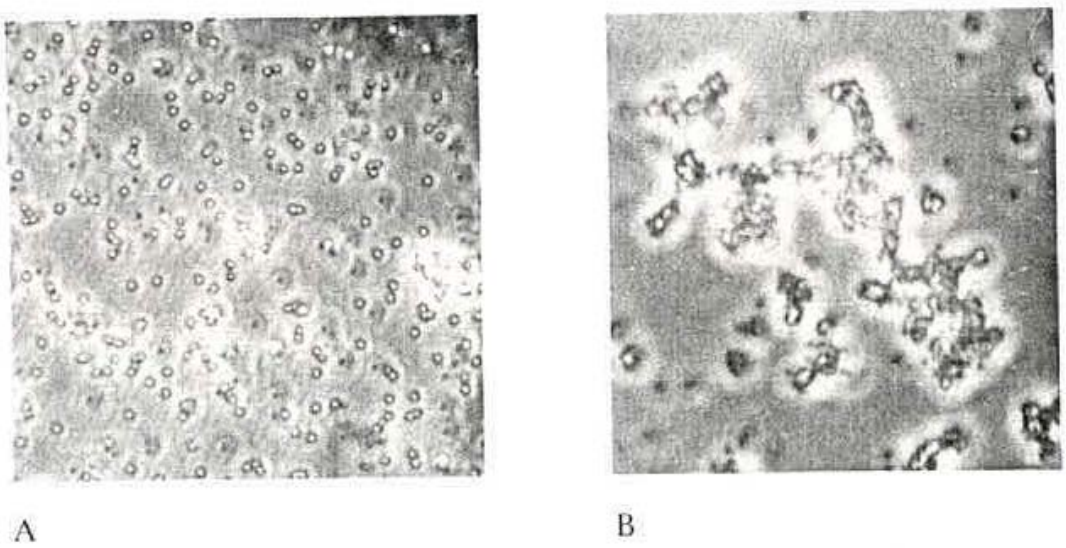
Ab به این ذرات پوشش داده شده، افزوده گردد، گنادوتروپین موجود در ادرار برای دست یابی به جایگاه های آنتی بادی، با ذرات رقابت می کند و بنابراین ذرات به هم متصل نمی شوند. این روش یک روش مفید برای تشخیص حاملگی است.



شکل ۶- ۱۰ گنادوتروپین ادرار باعث ممانعت از تشکیل توده می شوند.

مثال ۴ _ انداز ه گیری ساخته شدن رشته های دم باکتریوفاژ در باکتری E. coli ، با استفاده از یک سنجش باز دارندگی.

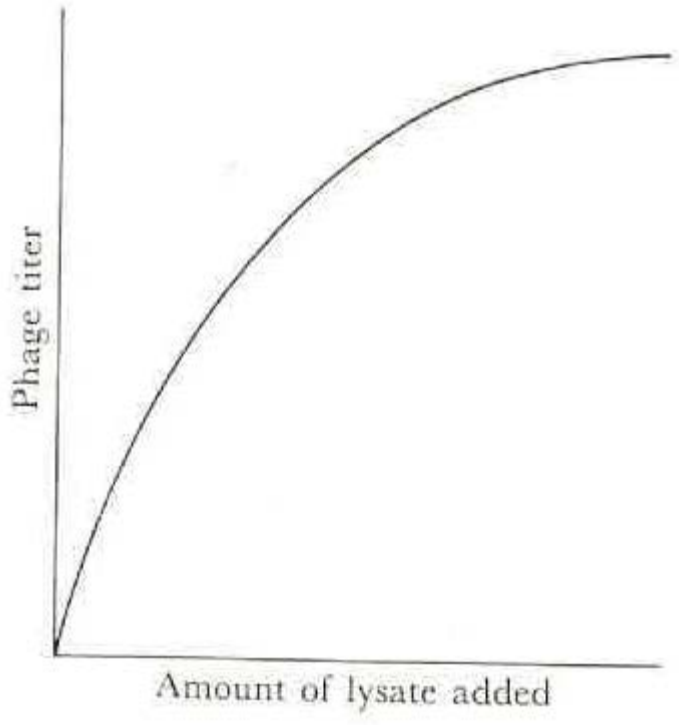
آنتی بادی های تهیه شده بر ضد باکتریوفاژ T ۲ در E. coli ، مستقیما بر ضد رشته های دم T ۲ عمل می کنند، از این رو، با افزودن آنتی T ۲ ، از نفوذ فاژ به میزبان جلوگیری بعمل می آید. این مثالی است از خاصیت غیر فعال کردن ویروس ها توسط آنتی بادی ها. سنتز داخل سلولی رشته های دم را می توان با تهیه عصاره های سلولی در زمان های مختلف بعد از گرماگذاری، و مخلوط کردن محلول با آنتی T ۲ و سپس افزودن فاژ، دنبال کرد. اگر رشته های دم وجود داشته باشند، به آنتی T ۲ متصل می شوند و آنتی T ۲ ، تیتر می شود (منظور این است که ممانعت بعمل می آورد) و فاژ نجات می یابد. از این رو، تعداد فاژ ماندنی بعد از این تیمار، بیانگر میزان رشته های دم در عصاره است. (شکل ۶- ۱۱) این سنجش ممانعت در تحقیقات فاژی به عنوان سنجش قدرت بلوکه کردن سرم معروف است.



شکل ۶- ۱۱ سنجش قدرت ممانعت سرم.

مثال ۵ _ سنجش سنتز DNA فاژ ۴ T در E. coli آلوده شده به وسیله تثبیت کمپلمان.

آنتی بادی های ضد DNA گلیکوزیله دناتوره را می توان تهیه کرد. DNA باکتریوفاژ ۴ T مربوط به E coli. ، دارای ۵ _ هیدروکسی متیل سیتوزین گلیکوزیله شده به جای سیتوزین است بنابراین از DNA E. coli قابل تمایز است زیرا DNA فاژ ۴ T با آنتی بادی ها واکنش می دهد. با استفاده از تثبیت کمپلمان، دوره سنتز DNA فاژ ۴ T در طول آلوده سازی، با آماده ساختن عصاره های سلولی، دناتوره شدن DNA گلیکوزیله دناتوره شده (شکل ۶- ۱۲) همراه است.



شکل ۶- ۱۲ اندازه گیریDNA سنتز شده توسط فاژ T۴ در E. coli .

مثال ۶ _ تاثیر مواد دناتوره کننده بر DNA.

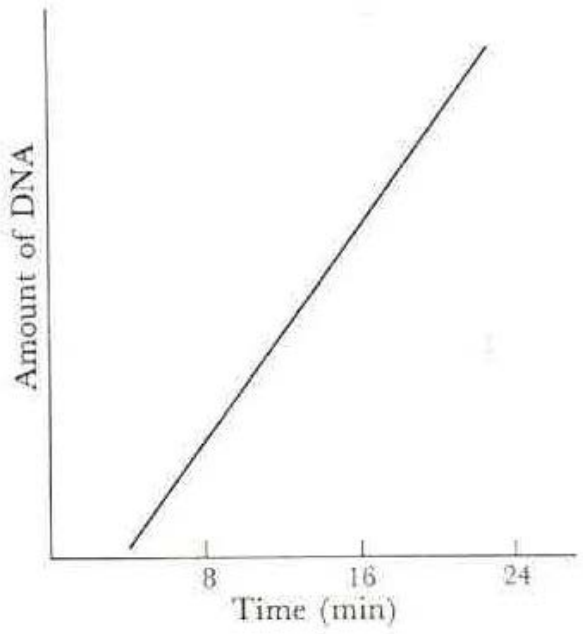
DNA دناتوره شده معمولاً با افزایش جذب نوری در nm ۲۶۰ مشخص می شود. دناتوره کردن را می توان با روش های ایمونولوژیکی نیز تعیین کرد. اگر آنتی بادی علیه DNA دناتوره شده تهیه کنیم، بنابراین آنتی بادی مورد نظر فقط با DNA دناتوره شده واکنش می دهد. به این تربیب ، تاثیر تعداد زیادی از مواد دناتوره کننده به وسیله تثبیت کمپلمان، سنجش شده اند.وسعت مواد دناتوره کننده به وسیله تابعی از غلظت DNA دناتوره شده تعیین شده اند (جدول ۶- ۲).

جدول ۶- ۲ غلظت موادی که موجب ۵۰ ٪ دناتوره شدن (در °C ۷۳ و قدرت یونی ۰/۰۴۳) DNA باکتریوفاژ T۴ در E. coli شده اند در جدول زیر آمده است. برای تعیین اعداد به دست آمده از روش تثبیت کمپلمان استفاده شده است.

مثال ۷ _ تعیین هویت پروتئین بتای فاژ λ در E. coli

اگر E. coli به وسیله فاژ λ آلوده شود، مقدار زیادی از یک اندونوکلئاز ساخته می شود. این نوکلئاز خالص شده و نوکلئاز ضد λ تهیه می شود. هنگامی که از روش نفوذ پذیری ouchterlong استفاده می شود (شکل۶- ۱۴)، دو نوار به وجود می آید که بیانگر وجود حداقل دو پروتئین در نمونه خالص است. یک نوار توسط محصول ژن همانند سازی exo تولید می شود. دیگری محصول ژن دیگری به نام بتا است. پروتئین بتا با اندونوکلئاز تشکیل کمپلکس می دهد ولی فعالیت آنزیمی مشخصی در محیط آزمایشگاه ندارد.

ساخته شدن و کنترل ژنتیکی آن با استفاده از سنجش ایمونودیفوژن مطالعه شده است، زیرا روش سنجش دیگری برای پروتئین بتا وجود ندارد.



شکل ۶- ۱۴ آنالیز ouchterlony فاژ اگزونوکلئاز λ در E. coli و پروتئین بتای آن.

مثال ۸ _ آشکارسازی DNA پلی مراز III E. coli در حضور پلی مراز I با استفاده از خنثی کردن.

اگر دو آنزیم در واکنش های مشابهی شرکت داشته باشند، معمولاً سنجش یکی در حضور دیگری مشکل است. اگر چه، در سنجشDNA پلی مراز ها، فعالیت پلی مراز I را در عصاره سلولی می توان با افزودن آنتی پلی مراز I قبل از افزودن عصاره به مخلوط واکنش، حذف نمود. از قدرت خنثی سازی یک آنتی بادی می توان به عنوان یک ابزار بیوشیمیایی استفاده کرد

تمرین

۱- در روی سلول های خاصی در انسان پروتئینی (یا Ag) وجود دارد که نباید علیه آن آنتی بادی در سرم خون باشد. پزشک سرم خون فرد مورد نظر را به ما داده و می خواهد بداند که آیا آنتی بادی علیه آن پروتئین خاص وجود دارد یا نه؟ برای پاسخ به سوال پزشک روی سرم خون فرد همان پروتئین خالص شده را ریخته و کمپلمان و سپس (antibody - sheep red blood cell) Ab-SRBC اضافه می کنیم.

الف) اگر همولیز صورت گرفت پس تست منفی و آنتی بادی وجود ندارد.

ب) اگر همولیز صورت گرفت پس تست منفی است و آنتی بادی وجود دارد.

ج) اگر همولیز صورت نگرفت پس تست مثبت است و آنتی بادی وجود ندارد.

د) هر سه مورد فوق صحیح هستند.

۲- فرض کنید مخلوطی از دو پروتئین را داریم. آنتی سرم علیه این مخلوط را تهیه کردیم. اگر هر دو پروتئین موجود در مخلوط دارای جرم مولی یکسانی باشند وقتی از روش Ouchterlony استفاده کردیم دو نوار به شکل نعل اسبی به جای یک نوار به دست آمد.

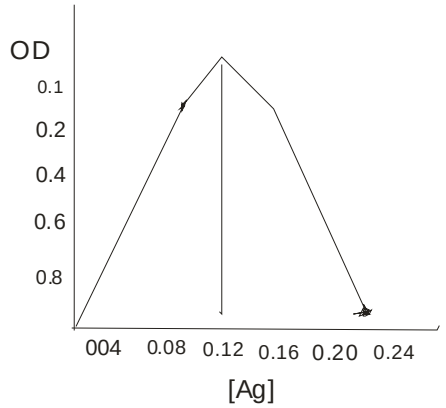
الف) علت این است که غلظت پروتئین ها با هم فرق داشت. ج) ضریب نفوذ پذیری آنها با هم فرق داشت.

ب) پروتئین ها دناتوره شده بودند. د) هر سه جواب فوق صحیح هستند.

۳- در آزمایش تثبیت کمپلمان ، منحنی OD (در ۵۴۱ نانومتر) را در برابر Ag رسم کردیم (شکل زیر) مقدار یک میکرولیتر از Ag مجهولی را به آن اضافه نمودیم ، OD برابر ۰/۶ شد. با رقت ۱ : ۱ از Ag مجهول ،OD برابر ۰/۴ گردید. غلظت مجهول اولیه (بر حسب میکروگرم) چقدر است؟

الف) ۰/۰۴ ج) ۰/۰۸

ب) ۰/۲ د) ۰/۱۶



۴ – محاسن آزمایش RIA(radioimmuno assay) با استفاده از روش آنتی بادی مضاعف عبارت است از:

الف) قادر است مقادیر بسیار کم مواد غیر رادیواکتیو را تشخیص دهد و برای تعیین مولکول هایی است که نمی توان در in-vitro نشاندار کرد.

ب) برای موادی که نمی توانند با کمپلمان تثبیت شوند و تشخیص آنها مشکل ست ولی می توانند واکنش تقاطعی داده و با Ag رقابت کنند.

ج) برای موادی است که نمی توانند واکنش تقاطعی دهند

د) هر دو جواب (الف) و (ب) صحیح هستند.

۵ – بعضی از ویروس ها قادرند که گلبول های قرمز خون را به شکل توده در آورند. از این خاصیت استفاده کرده و می توان ویروس خاصی را تعیین نمود. کدام یک از روش های زیر صحیح است:

الف) ویروس مورد نظر را به گلبول قرمز اضافه کرده سپس آزمایش تثبیت کمپلمان انجام دهیم.

ب) اگر ویروس مورد نظر توانست گلبول قرمز را لیز کند پس نوع ویروس مشخص می شود.

ج) آنتی بادی علیه ویروس تهیه کرده و سپس آنتی بادی را به ویروس اضافه می کنیم ، اگر هماگلوتیناسیون (به شکل توده) صورت نگرفت ، نوع ویروس مشخص می گردد.

د) از هر سه روش فوق می توان استفاده کرد.

منابع

1. Freifelder,D. (1982) Physical biochemistry, applications to biochemistry and molecular biology. W.H. Freeman and Comapany.
2. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2013) Lehninger Principles of Biochemistry (sixth edition). Macmillan.
3. vanHolde, K.E., Curtis Johnson, W. and Shing Ho, P. (2006) Principles of Physical Biochemistry (second edition). Pearson.

فصل ۷

اسپکتروسکپی جذبی

پس از مطالعه کامل این فصل شما باید با مطالب زیر آشنا شوید:

۱. **تعیین مقدار پروتئین با استفاده از روش اسپکتروسکپی**

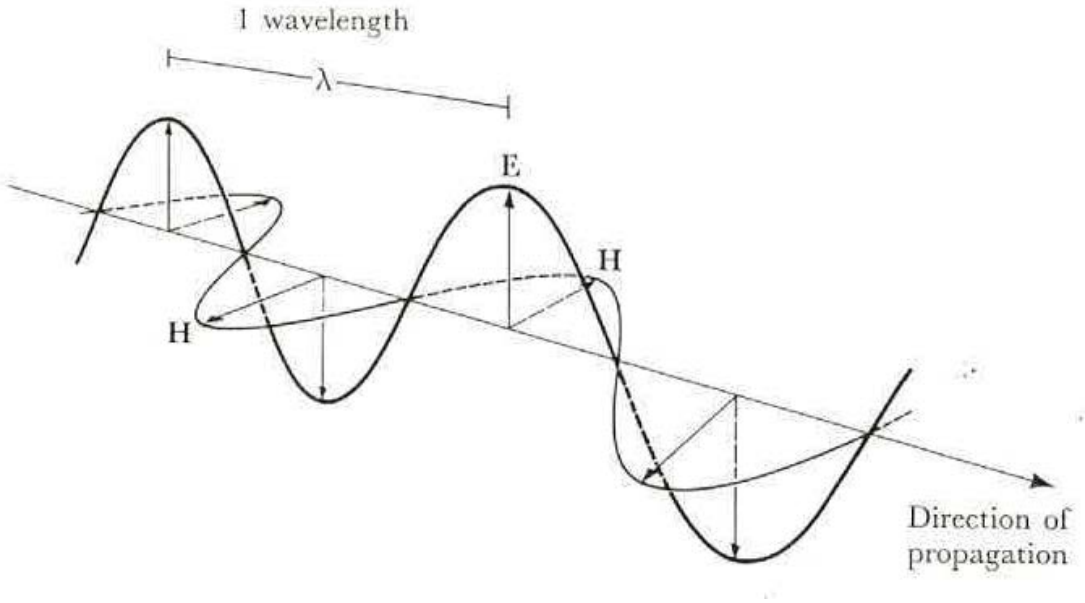
۲. **مثال هایی برای تعیین مقادیر DNA باکتریها و T_m آنها و غلظت باکتریها**

۳. **کاربردهای اسپکتروسکپی جذبی با استفاده از نور مریی و UV**

۴. **دناتوره و رناتوره کردن DNA باکتریوفاژها**

مقدمه

مولکول ها نور را جذب می کنند. طول موج جذب شده بستگی به ساختار و محیطی دارد که مولکول در آن قرار گرفته است. این خاصیت موجب می شود که اسپکتروسکپی جذبی یک وسیله مفیدی برای تعیین خصوصیات ماکرومولکول های کوجک و بزرگ شوند. نور دارای میدان الکتریکی و مغناطیسی است که عمود بر هم به طور سینوسی حرکت می کنند (شکل ۷- ۱).



شکل ۷- ۱ انتشار امواج الکترومغناطیسی در فضا. بردارهای E و H عمود بر هم هستند.

انرژی موج (E) برابراست با :

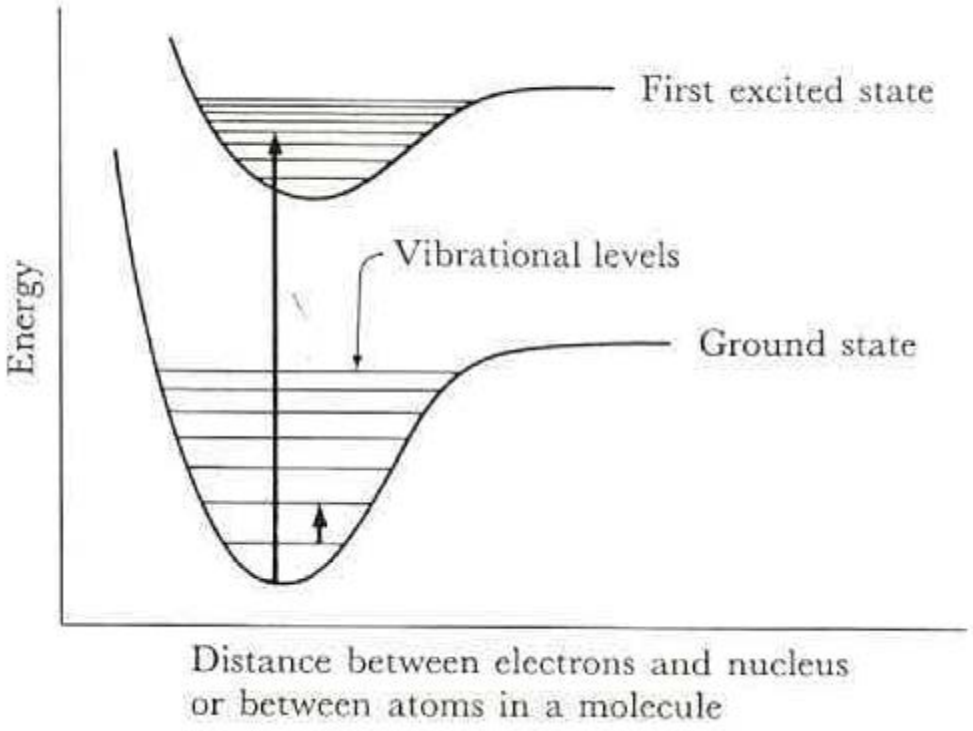
$$E = \frac{hc}{\lambda} = h\upsilon$$

در فرمول فوق h ثابت پلانک که برابر erg sec $^{-۲۷}$ ۱۰ × ۶/۶۲ ، c سرعت نور برابر cm/sec ^{۱۰} ۱۰ × ۳ ،

λ طول موج بر حسب سانتیمتر، و υ فرکانس می باشند. اگر نوری به مولکولی برخورد کند یا پخش می شود یا جذب

می گردد. اگر انرژی نور جذب مولکول شود، مولکول به حالت برانگیخته می رود. به مولکولی یا قسمتی از مولکول که بتواند انرژی نور را جذب کرده و برانگیخته شود کروموفور (chromophore) گویند.

این انرژی معمولاً تبدیل به انرژی حرارتی می شود (مثلاً سینتیکی) که این عمل توسط بخورد مولکول برانگیخته شده با مولکول دیگر (مثلاً مولکول حلال) صورت می گیرد. در بعضی از مولکول ها با انتشار فلورسانس همراه است. در هر دو صورت، شدت نور منتشر شده در اثر برخورد کروموفورها، کمتر از شدت نور اولیه است (شکل ۷- ۲).



شکل ۲ سطوح انرژی در دو حالت پایه و برانگیخته شده. سطوح انرژی ارتعاشی به صورت خط های افقی نشان داده شده اند. فلش بزرگتر انتقال الکترونی را از حالت پایه به جهارمین سطح حالت برانگیخته نشان می دهد. فلش کوچکتر انتقال ارتعاشی ما بین سطوح انرژی حالت پایه را مشخص می کند.

مولکول برانگیخته شده می تواند مقدار معینی انرژی (کوانتا) داشته باشد. این انرژی را سطوح انرژی مولکول گویند. سطوح انرژی ارتعاشی (مثلاً پیوندهای کووالانسی مختلف خمیده یا کشیده) ارتعاش مولکول را نشان می دهد. در مورد سطوح چرخشی چون مربوط به جذب نیست در این جا بحث نمی شود.

انرژی جذب، مقدار جذبی است که از اختلاف بین سطوح مختلف انرژی حاصل می شود.

$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1}$$

در فرمول فوق E_1 سطح انرژی قبل از جذب و E_2 سطح انرژی بعد از جذب را نشان می دهند. تغییر سطوح انرژی را انتقال (transition) گویند. اگر انتقال بین حالت پایه و هر سطح ارتعاشی در اولین حالت برانگیخته شده باشد، در محدوده UV و مرئی می شود. اگر بین سطوح ارتعاشی باشد IR می گردد.

احتمالً جذب در یک طول موج را molar extinction coefficient در آن طول موج گویند. جذب نور از قانون بیر لامبر (Beer- Lambert law) تبعیت می کند.

I_0 = شدت نور اولیه

I = شدت نور منتقل شده

$-dI$ = کاهش کوچک شدت نور منتقل شده

k = عدد ثابت برای ماده خاص

$\frac{dI}{I}$ = فراکسیون شدت نور جذب شده

$$-\frac{dI}{I} = kcdl$$

$$\frac{dI}{I} = -kcdl$$

طول l یعنی مسیری که نور از کوویت (یا cell) عبور می کند را بخواهیم بین صفر تا l محاسبه کنیم جنین می شود:

$$\int_0^I \frac{dI}{I} = -kc\int_0^l dl$$

فرمول فوق بعد از انتگرال گیری چنین می شود:

$$\ln\frac{I}{I_0} = -kcl$$

$$\ln\frac{I_0}{I} = kcl$$

$$2.3\log\frac{I_0}{I} = kcl$$

$$\log\frac{I_0}{I} = \frac{k}{2.3}cl$$

در فرمول فوق به جای $\frac{k}{2.3}$ که هر دو اعداد ثابتی هستند ε یا ضریب جذب را می گذاریم:

$$\log\frac{I_0}{I} = \varepsilon cl$$

اگر غلظت بر حسب مولاریته باشد، ضریب جذب مولار (ε_m) خواهیم داشت و اگر غلظت بر حسب $\frac{g}{lit}$ باشد، ضریب جذب ویژه یا ε_s نامیده می شود. بالاخره اگر غلظت بر حسب w/v ٪ باشد، با $\varepsilon_{1\%}$ نمایش داده می شود. جذب یا A (absorption) که گاهی با OD (optical density) نشان می دهند، برابراست با :

$$\log \frac{I_0}{I} = A = OD$$

اگر قطر کوویت (cuvette) یا لوله ای که ماده مورد نظر را داخل آن ریخته ایم برابر یک باشد، پس ۱ = l و خواهیم داشت:

$$A = \varepsilon\, c$$

مثال: محلولی حاوی ماده کروموفور g/lit ۲ در کوویت یک سانتیمتری را در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار دادیم. این محلول ۷۵٪ از نور را منتقل می کند. (الف) شدت نور منتقل شده (I) را تعیین کنید ؟ (ب) شدت نور منتقل شده را وقتی مقدار کروموفور برابر g/lit ۴ و g/lit ۱ باشد؟ (ج) اگر جرم مولی (MW) ماده کروموفور برابر ۲۵۰ باشد، ضریب جذب (ε_m) چقدر می شود؟

حل : (الف)

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_s\, c\, l$$

$$\log \frac{1}{0.75} \varepsilon_s\, (2)(1)$$

$$\log 1.333 = 2\, \varepsilon_s$$

$$0.125 = 2\, \varepsilon_s$$

$$\varepsilon_s = 0.0625$$

(ب)

$$\log \frac{100}{I} = (0.0625)(4)(1)$$

$$\log 100 - \log I = 0.25$$

$$2 - 0.25 = \log I$$

$$1.75 = \log I$$

$$I = 56.2\%$$

$$\varepsilon_m = \varepsilon_s \times MW = (0.0625)\,(250) = 15.63 \qquad (ج)$$

تعیین مقدار پروتئین

روش های اسپکتروسکپی مختلفی برای تعیین غلظت پروتئین وجود دارند. روش بیوره (Biuret) بر اساس واکنش

با Cu^{2+} می تواند با پپتید ها در محلول قلیایی ایجاد رنگ ارغوانی در طول موج ۵۴۰ nm نماید. روش بیوره برای محلول های حاوی ۱۰ – ۰/۵ mg پروتئین مناسب است.در روش بیوره موادی مثل تیول ها (thiols)، NH_4، ممکن است تداخل ایجاد نمایند که با رسوب دادن پروتئین توسط اسید تری کلرواستیک ۱۰٪ و دو باره حل کردن پروتئین در سود یک نرمال مشکل حل می شود. روش دوم استفاده از روش Lowry می باشد. در این روش رنگ در اثر احیای معرف فسفومولیبدات – فسفوتنگستات (Folin- Ciocalter phenol reagent) توسط آمینو اسید های تیروزین حاصل می شود. روش Lowry برای محلول های حاوی ۴۰۰ – ۲۰ µg پروتئین مناسب است.

اغلب پروتئین ها جذب مشخصی در طول موج ۲۸۰ nm دارند که مربوط به آمینو اسیدهای تیروزین، تریپتوفان و

فنیل آلانین می باشد. جذب در ۲۸۰ nm برای غلظت ۰/۵ – ۰/۱ mg/ml پروتئین در عدم حضور مواد مداخله کننده حاصل می شود. پروتئین خالص شده ممکن است دارای اسیدهای هسته ای باشد که در ۲۶۰ nm جذب دارند. رابطه تعیین غلظت پروتئین در حضور اسیدهای هسته ای چنین است:

$$[protein]_{mg/m.} = 1.55\ A_{280}^{1cm} - 0.76\ A_{260}^{1cm}$$

تمام پروتئین ها در ۲۳۰ nm جذب دارند چون این جذب مربوط به پیوندهای پپتیدی می باشد. برای پروتئین های دارای غلظت ۱۰۰ – ۱۰ µg می توان رابطه زیر را بکار برد:

$$[protein]_{\mu g/ml} = 144(A_{215}^{1cm} - A_{225}^{1cm})$$

گاهی ترکیبات معدنی مزاحمت ایجاد می کنند مثلاً باعث می شوند پروتئین در سود ۰/۱ نرمال حل نشود. برای حل این موضوع پروتئین را در سود ۵ mM حل نمایید.

مثال: غلظت پرتوتئین را در (الف) محلول رقیق نشده، (ب) محلول رقیق شده تعیین کنید؟

محلول	جذب (۲۸۰ نانومتر)	جذب (۲۶۰ نانومتر)	جذب (۲۲۵ نانومتر)	جذب (۲۱۵ نانومتر)
رقیق نشده	۰/۳۵	۰/۲	--	--
رقیق شده ۱۰ : ۱	--	--	۰/۲	۰/۴۷

حل: (الف) $[protein]_{mg/m.} = 1.55\ A_{280}^{1cm} - 0.76\ A_{260}^{1cm}$

$= (۱/۵۵)\ (۰/۳۵) - (۰/۷۶)\ (۰/۲) = ۰/۳۹۱$ mg/ml

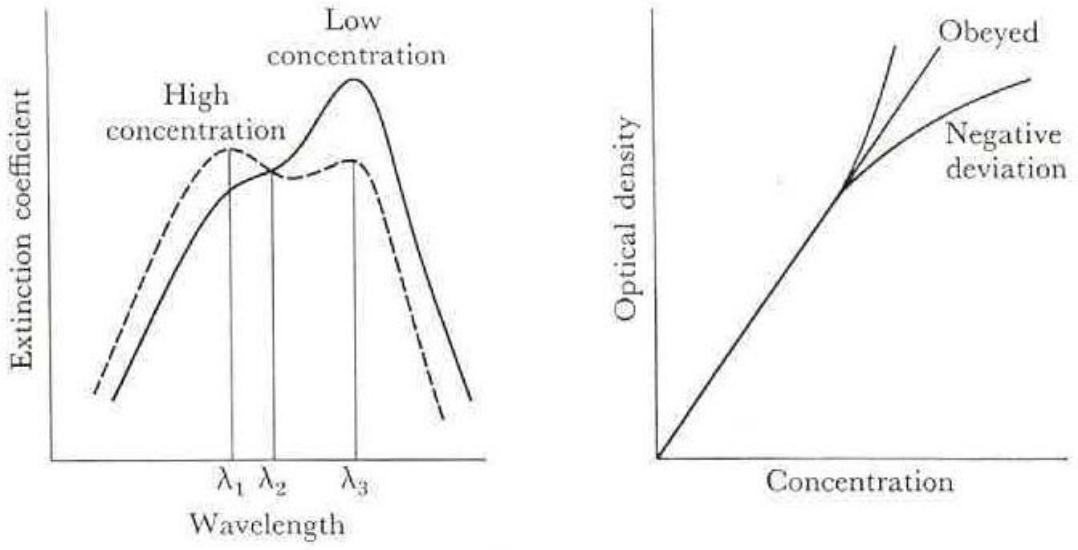
$$[protein]_{\mu g/ml} = 144(A_{215}^{1cm} - A_{225}^{1cm})$$

$= ۱۴۴\ (۰/۴۷ - ۰/۲) = ۳۸/۹$ µg/ml

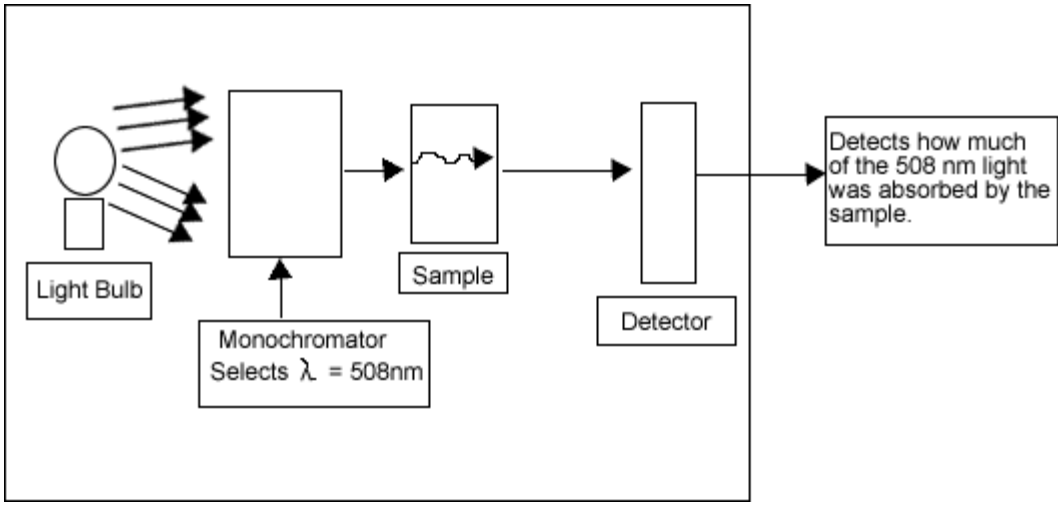
گاهی غلظت ماده مورد نظر خیلی زیاد است (C) و چون ε تابع C می باشد لذا از قانون بیر لامبر تبعیت نمی کند. این موضوع ممکن است بعلت پخش نور باشد یا تغییرات ساختاریمولکول مثلاً دیمر شدن (dimerization)، تجمع مواد (aggregation) و تغییرات ساختاری دیگر. در غظت کم مشکلی ایجاد نمی شود ولی در غلظت زیاد ممکن است حداکثر طول موج جذب در دو نقطه مختلف باشد (شکل ۷- ۳). دو طول موج حداکثر در غلظت زیاد ماده دیده می شوند (λ_1 و λ_3). در λ_2 تغییری در ε مشاهده نمی شودکه این نقطه را نقطه ایزوبستیک (isobestic) گویند. در شکل ۳ سمت راست، انحراف منفی در λ_3 دیده می شود و انحراف مثبت در λ_1 می بینید ولی λ_2 از قانون بیر لامبر تبعیت می کند.

معمولاً از منحنی جذب علیه طول موج می توان حداکثر جذب را (λ_{max}) تعیین کرد. سپس از منحنی جذب علیه غلظت (C) شیب خط که برابر ε است، تعیین می گردد. دستگاه اسپکتروفتومتر را در شکل ۷- ۴ مشاهده می فرمایید.

بعضی از مواد دارای چندین حداکثر جذب (λ_{max}) در طول موج های مختلف هستند (شکل ۷- ۵). جدول ۱ حداکثر جذب در طول موج های مختلف بعضی از ترکیبات را ذکر کرده است.



شکل ۷- ۳ انحراف مثبت و منفی از قانون بیر لامبر و دلایل آن. در شکل سمت چپ تغییر منحنی به واسطه افزایش غلظت را مشاهده می کنید که اغلب در اثر پلیمریزاسیون صورت می گیرد. در λ_2 تغییری در ضریب جذب دیده نمی شود که به آن نقطه ایزوبستیک گویند. در شکل سمت راست انحراف از قانون بیر لامبر را مشاهده می فرمایید.



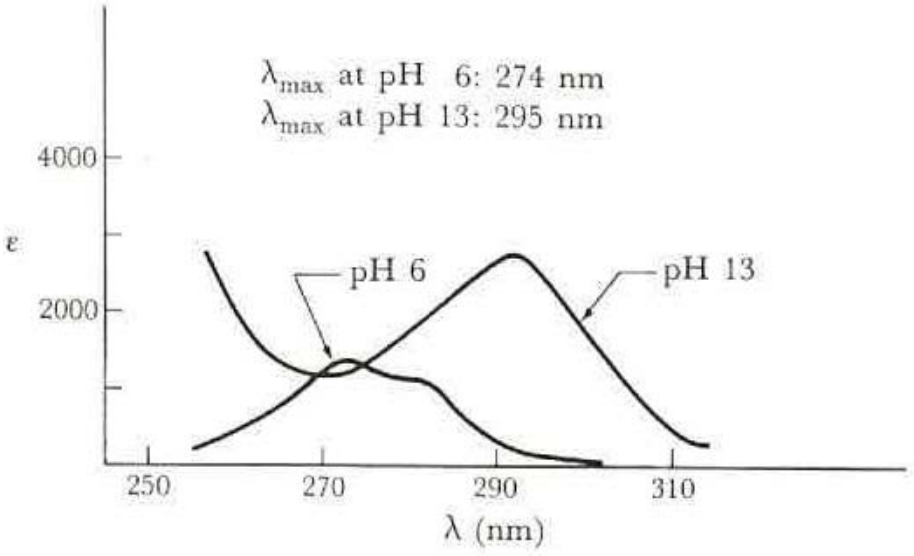
شکل ۷– ۴ دستگاه اسکتروفتومتر. نور از یک لامپ خارج شده و از میان منوکروماتور برای انتخاب طول موج معیین عبور می کند. دو کوویت یکی در جایگاه نمونه و دیگری در جایگاه مرجع گذاشته می شوند. نور از کوویت عبور کرده و به phototube می رسد که پشت آن یک دستگاه ثبت کننده گذاشته شده است.

جدول ۷- ۱ حداکثر جذب و ضریب جذب بعضی از مواد زیستی:

Molecule	λ_{max}(nm)	ε at $\lambda_{max}(\times 10^{-3})$
Tryptophan*	280	5.6
	219	47.0
Tyrosine*	274	1.4
	222	8.0
	193	48.0
Phenylalanine*	257	0.2
	206	9.3
	188	60.0
Histidine*	211	5.9
Cysteine*	250	0.3
Adenine	260.5	13.4
Adenosine	259.5	14.9
Guanine	275	8.1
Guanosine	276	9.0
Cytosine	267	6.1
Cytidine	271	9.1
Uracil	259.5	8.2
Uridine	261.1	10.1
Thymine	264.5	7.9
Thymidine	267	9.7
DNA	258	6.6
RNA	258	7.4

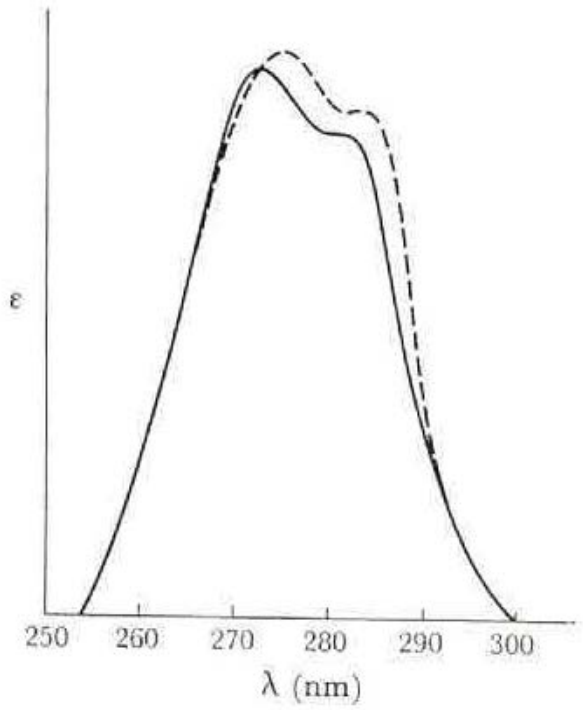
عواملی که روی جذب مواد اثر دارند عبارتند از:

۱ – pH – منحنی تیروزین در دو pH مختلف (۶ و ۱۳) رسم شده است. شما فکر می کنید که اختلاف منحنی درشکل ۵ به چه علت است؟



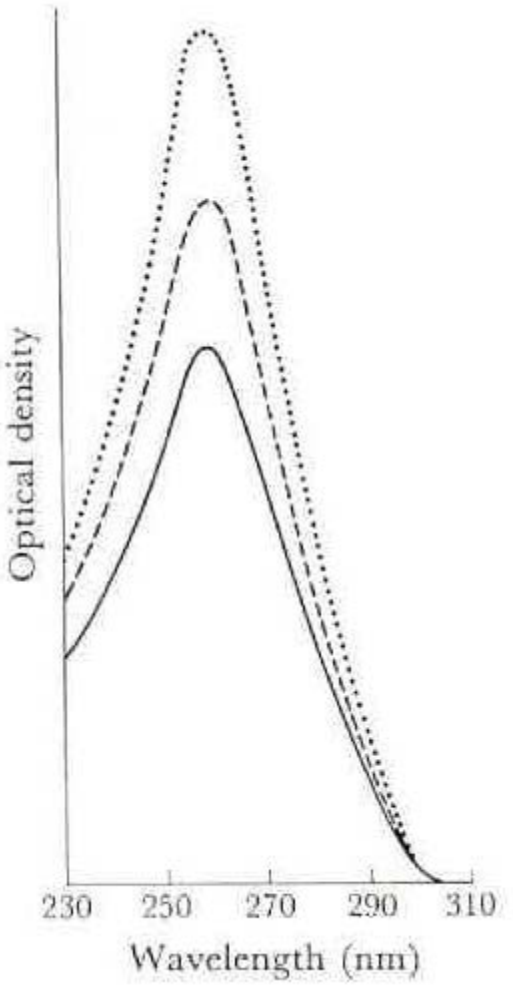
شکل ۷– ۵ منحنی جذب تیروزین در pH ۶ و ۱۳.

۲ – اثر حلال های قطبی – بعضی از مواد در محلول ۲۰٪ اتیلن گلیکول که کمتر قطبی است مشاهده می شود (شکل ۷– ۶) λ_{max} افزایش یافته است. به طور کل مولکول هایی که دارای O ، N و S هستند در حلال های قطبی هیدروکسیلی، حداکثر طول موج آنها کاهش می یابد.



شکل ۷– ۶ اثر حلال قطبی روی منحنی تیروزین. حلال ها H_2O (با خط پر رنگ) و پلی اتیلن (خط چین) نشان داده شده اند. افزایش λ_{max} در حلال کمتر قطبی قالل توجه می باشد.

۳ – اثر نظم و جهت دادن مولکول ها – منحنی های DNA باکتریوفاژ T_4 در غلظت مساوی را در شکل ۷– ۷ مشاهده می کنید. هر چه ساختار مولکول DNA مرتب تر می شود (ordered)، OD کاهش می یابد که به این عمل هیپوکرومیسیته (hypochromicity) گویند.



شکل ۷– ۸ طیف DNA باکتریوفاژ T7. DNA دو رشته ای (خط پر رنگ)، DNA تک رشته ای (خط چین) و بعد از هیدرولیز به صورت نوکلئوتیدهای آزاد (نقطه چین) نشان داده شده اند.

تغییراتی که توسط ماکرمولکول ها به وجود آید ممکن است باعث تغییر در منحنی جذب شوند. این تغییرات عبارتند از:

۱ – اگر آمینو اسیدهای تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و هیستیدین به محیط کمتر قطبی منتقل شوند، λ_{max} و ε افزایش می یابند که از این موضوع نتایج زیر حاصل می شوند:

الف) اگر در منحنی جذب پروتئینی، آمینو اسید آن در حلال قطبی قرار گیرد، λ_{max} و ε آن بیشتر از λ_{max} و ε همان آمنیو اسید در حالت آزاد (در همان حلال) می گردد. معلوم می شود که آن آمینو اسید در داخل پروتئین به صورت

دفن شده (buried) قرار دارد و توسط آمینو اسیدهای غیر قطبی احاطه شده است.

ب) اگر در منحنی فوق، پروتئین مورد نظر نسبت به قطبی بودن یا نبودن حلال حساس است، آمینو اسیدهایی که

λ_{max} و ε آنها تغییر نشان داده بودند باید در سطح پروتئین باشند.

۲ – اگر گروه های قابل تیتر شدن در آمینو اسیدهای پروتئین خاص باردار شوند (مثل OH تیروزین، ایمیدازول هیستیدین، SH سیستئین)، λ_{max} و ε افزایش می یابند. از این موضوع می توان چنین تنیجه گرفت :

الف) اگر تغییری در منحنی دیده نشد (با توجه به pH تیتراسیون آمینو اسید آزاد) ، آن کروموفور باید در داخل پروتئین (دفن شده) و در ناحیه غیر قطبی باشد.

ب) اگر در منحنی مورد نظر نغییراتی در اثر تغییر pH به وجود آمد و گروه قابل یونیزه شدن دارای همان pK

آمینو اسید آزاد بود پس آمینو اسید مربوطه در سطح پروتئین قرار دارد.

ج) اگر در منحنی مورد نظر تغییراتی در اثر تغییر pH به وجود آمد ولی گروه قابل یونیزه شدن دارای همان

pK که در آمینو اسید آزاد وجود دارد، نبود پس آن آمینو اسید در محیط قطبی قرار دارد مثلاً تیروزین توسط

گروه های کربوکسیلی احاطه شده است.

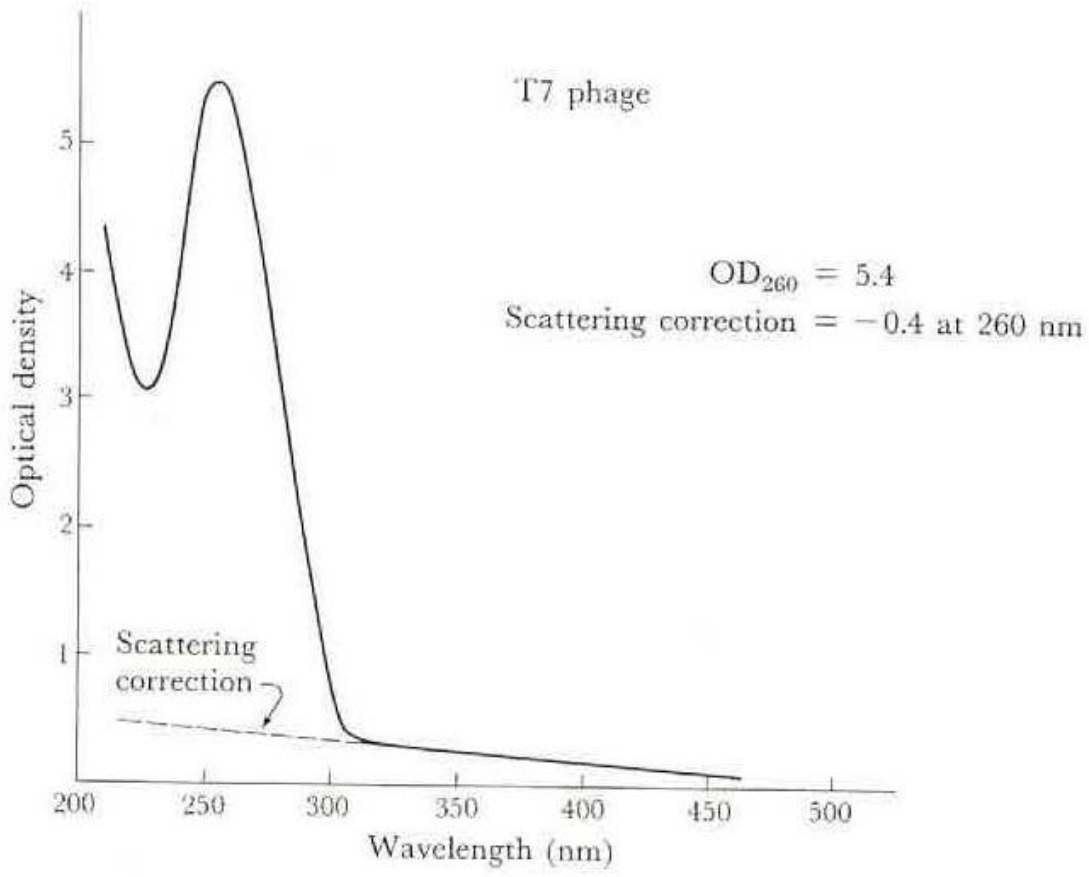
۳ – در پورین ها و پریمیدین ها هر چه حلقه ها نزدیک بهم و موازی باشند ضریب جذب کاهش می یابد. کاهش مقدار ضریب جذب به ترتیب زیر است:

باز در پلی نوکلئوتید دو رشته ای < باز در پلی نوکلئوتید تک رشته ای < باز نیتروژن دار آزاد

کاربردهای اسپکتروسکپی جذبی با استفاده از نور مریی و UV

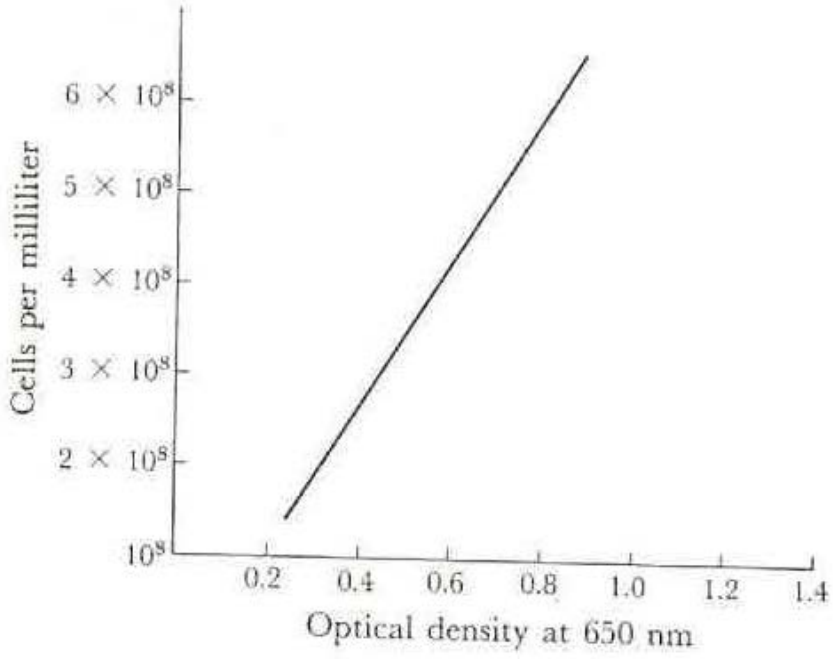
مثال ۱ – استفاده از جذب در تعیین غلظت DNA چنین است: برای DNA دو رشته ای اگر $DNA_{260} = ۱$ باشد، غلظت DNA برابر ۵۰ µg/ml می شود. این مقدار تا OD = ۲ قابل سنجش است و از قانون بیر لامبر تبعیت می کند.

گاهی مجبوریم ذراتی که دارای جذب نوری هستند را در یک سوسپانسیون مورد سنجش قرار دهیم (به جای این که در یک محلول انجام شود). مثلاً مقدار باکتریوفاژ را توسط غلظت DNA آنها تعیین کنیم. باکتریوفاژها نه تنها نور را جذب می کنند بلکه باعث انتشار نور هم می شوند. پس جذب نور آنها واقعی نیست ولی می توان تصحیح کرد. با رسم منحنی OD علیه λ می توان تصحیح زیر را انجام داد. با آلوده کردن E.coli به فاژ T_4 و تعیین اسیدهای هسته ای باکتریوفاژ وقتی $OD_{260} = ۱$ است (شکل ۷–۹) تصحیح انتشار طبق شکل انجام می شود.



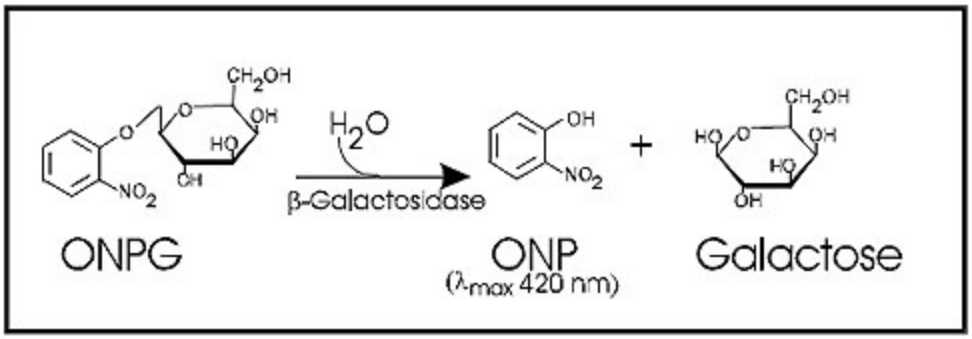
شکل ۷– ۹ طیف DNA باکتریوفاژ در E.coli و تصحیح آن

غلظت باکتری را نیز می توان تعیین کرد. در طول موج خاصی پخش نور (scattering) برای تمام جذب ها صورت می گیرد. در این حالت به جای تصحیح پخش نور باید کالیبراسیون انجام داد و منحنی رسم شده با استفاده از OD تعداد سلول های زنده مقایسه می شوند. این روش برای اندازه گیری دقیق غلظت سلول در واحد حجم مناسب است (شکل ۷– ۱۰).

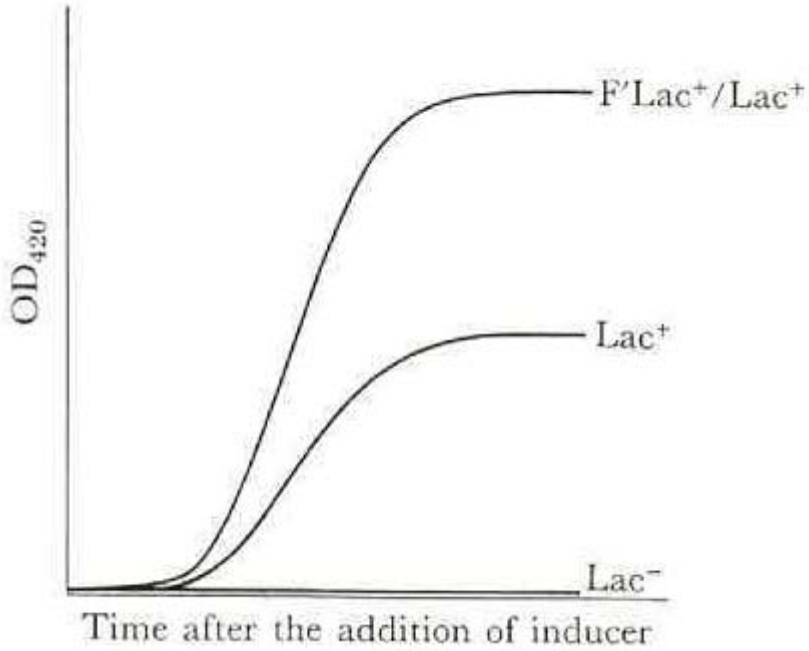


شکل ۷- ۱۰ تعیین غلظت باکتری با استفاده از OD

مثال ۲ آزمایش در مورد واکنش های شیمیایی – در بسیاری از واکنش های شیمیایی در صورت مشاهده تغییر در جذب واکنشگرها در طی عمل واکنش می توان آنها را مورد سنجش قرار داد. برای مثال تعیین فعالیت β- گالاکتوزیدآز در اپرون لاکتوز است. این آنزیم می تواند باعث تبدیل o- نیترو فنیل گالاکتوزید یا ONPG (o- nitrophenyl galactoside) به o- نیترو فنل که دارای جذبی در ۴۲۰ نانومتر است، گردد. پس OD_{420} مقدار هیدرولیز ONPG را نشان می دهد. در محدوده خاصی، سرعت واکنش متناسب است با غلظت آنزیم و به این ترتیب مقدار آنزیم از روش شیب منحنی مربوط به OD علیه زمان هیدرولیز مشخص می شود. (شکل ۷- ۱۱).



سه محیط کشت حاوی باکتری E.coli تهیه می کنیم. اولی به صورت Lac^- و دومی Lac^+ و سومی حاوی دیپلوئیدی که دو کپی از ژن های Lac^+ دارد و در محیط کشت دارای نمک های گلیسرول رشد کرده است. در زمان صفر، القا کننده سنتز β- گالاکتوزیدآز (یعنی IPTG) اضافه می شود. در زمان های مختلف نمونه ها خارج می شوند و با تولوئن تیمار می گردند تا آنزیم رها شود وسلول نیز کشته شود. سپس ONPG اضافه می گردد. نیم ساعت بعد OD_{420} اندازه گیری می شود. آزمایش نشان می دهد که Lac^- فاقد آنزیم و دیپلوییید دو برابر هاپلوییید آنزیم می سازد.



شکل ۷– ۱۱ سنتز β– گالاکتوزیدآز که OD_{420} آن توسط هیدرولیز o– نیتروفنیل گالاکتوزید (ONPG) سنجش شد.

مثال ۳ شناسایی مواد توسط اندازه گیری طیف – اغلب مواد دارای خواص طیفی هستند و می توان آنها را شناسایی کرد. با اندازه گیری طیف کامل یا نسبت مواد در طول موج های مختلف می توان این عمل را انجام داد. مثلاً هنگام کار با DNA می توان DNA هیدرولیز شده را از باز های پورین و پریمیدین با استفاده از روش های کروماتوگرافی از هم جدا کرد. هر باز توسط طیف به دست آمده شناسایی می شود. در زیر طول موج های مخصوص هر باز ذکر شده است:

برای گوانین λ_{max} = ۲۷۵ nm برای سیتوزین λ_{max} = ۲۶۷ nm

برای ادنین λ_{max} = ۲۶۰/۵ nm برای تیمین λ_{max} = ۲۶۴/۵ nm

برای اجتناب از انجام اندازه گیری طیف کامل (که معمولاً انجام می شود) هر یک از بازها می توان با محاسبه نسبت جذب هر یک ازآنها در دو طول موج مختلف پی برد که متعلق به کدام باز می باشد. در زیر نحوه محاسبه آنها ذکر شده است.

ابتدا نسبت $\frac{OD_{250}}{OD_{280}}$ را برای هر یک از بازها به دست آورده سپس با دانستن مقادیر زیر می توان باز مورد نظر را تعیین کرد:

$A = ۲$

$T = ۱/۲۶$

$G = ۱/۶۳$

$C = ۰/۳۱$

پس از شناسایی بازها، مقدار آنها را بر طبق مثال ۱ می توان تعیین کرد. مقادیر ε طبق λ_{max} هر یک از آنها به قرار زیر است:

برای A مقدار $\varepsilon_m = ۱۳/۴ \times ۱۰^{۳}$ است.

برای T مقدار $\varepsilon_m = ۷/۹ \times ۱۰^{۳}$ است.

برای G مقدار $\varepsilon_m = ۸/۱ \times ۱۰^{۳}$ است.

برای C مقدار $\varepsilon_m = ۶/۱ \times ۱۰^{۳}$ است.

مثال: مخلوطی از چهار باز نیتروژن دار را کروماتوگرافی کردیم و ادنین را شناسایی نمودیم. مقدار $OD_{260.5}$ آن برابر ۰/۶۵ شد. غلظت آن را تعیین کنید؟

حل :

$$C = \frac{A}{\varepsilon}$$

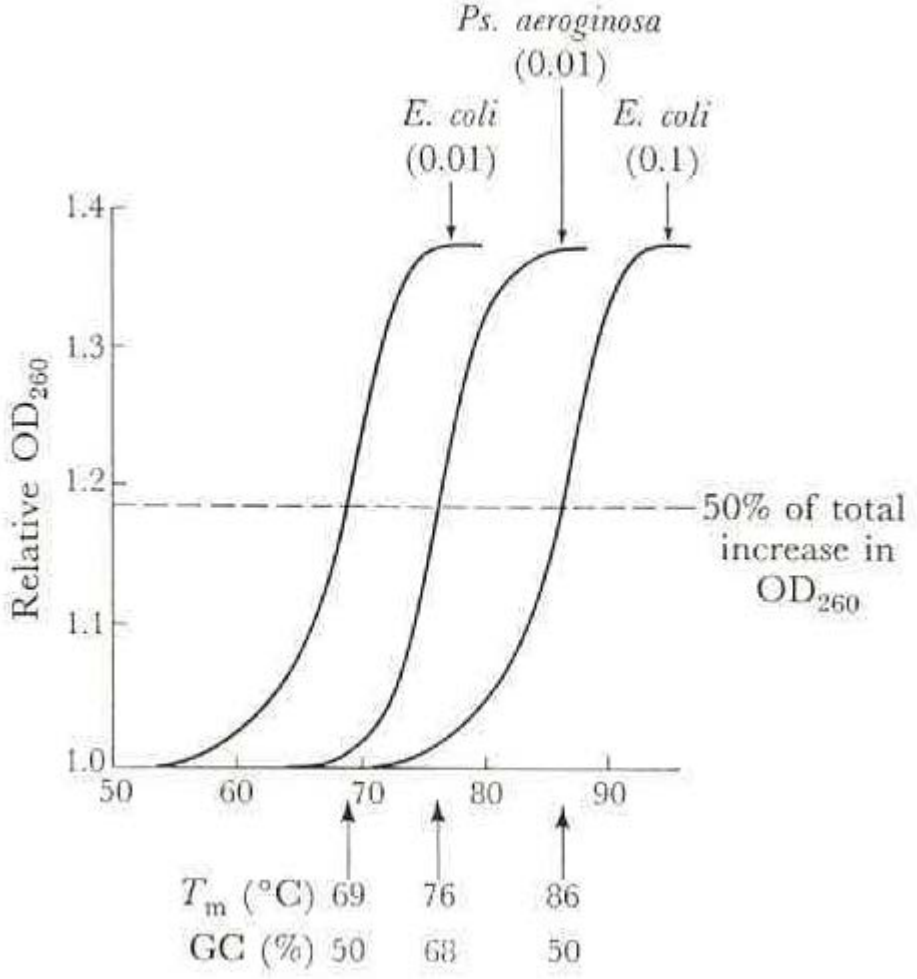
$$C = \frac{0.65}{13.4 \times 10^{3}} \quad M$$

مثال ۴ – دناتوره و رناتوره کردن DNA توسط حرارت – اگر DNA را حرارت دهیم، OD_{260} افزایش می یابد (شکل ۷– ۱۲). به این عمل هیپرکرومیسیته (hyperchromicity) گویند که توسط دناتوره شدن DNA اندازه گیری می شود. این عمل را انتقال حلقه مارپیچ (helix- coil transition) نیز می نامند که اگر حرارت دادن را ادامه دهیم در DNA عمل unstacking اتفاق افتاده و دو رشته DNA از هم باز می شوند. در منحنی شکل ۷– ۱۲ از سه رشته DNA مختلف استفاده شده است. اولی شامل DNA مربوط به E.coli می باشد که مقدار در صد GC

آن ۵۰٪ است و در تامپون فسفات M ۰/۰۱ و pH برابر ۷/۸ قرار دارد. دومی DNA مربوط به سودوموناس ائروژینوس

(*Pseudomonas aeroginosa*) دارای ۶۸٪ GC در همان تامپون وبالاخره سومی DNA مربوط به E.coli (دارای ۵۰٪ GC) در تامپون فسفات M ۰/۱ و pH برابر ۷/۸ می باشد.

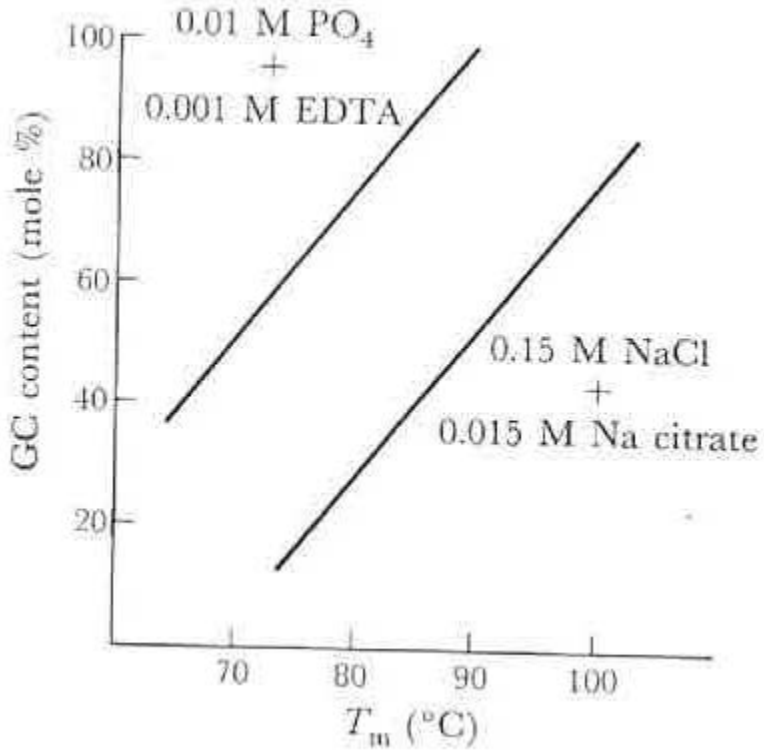
درجه حرارتی که در این تغییر جذبی برابر ۵۰٪ داشته باشیم را (Tm (melting temperature گویند. ملاحظه می شود که با افزایش قدرت یونی محلول، Tm زیاد می شود.



شکل ۷– ۱۲ OD مربوط به سه DNA مختلف و اثر حرارت روی هر یک از آنها (شرح کامل در متن داده شده است).

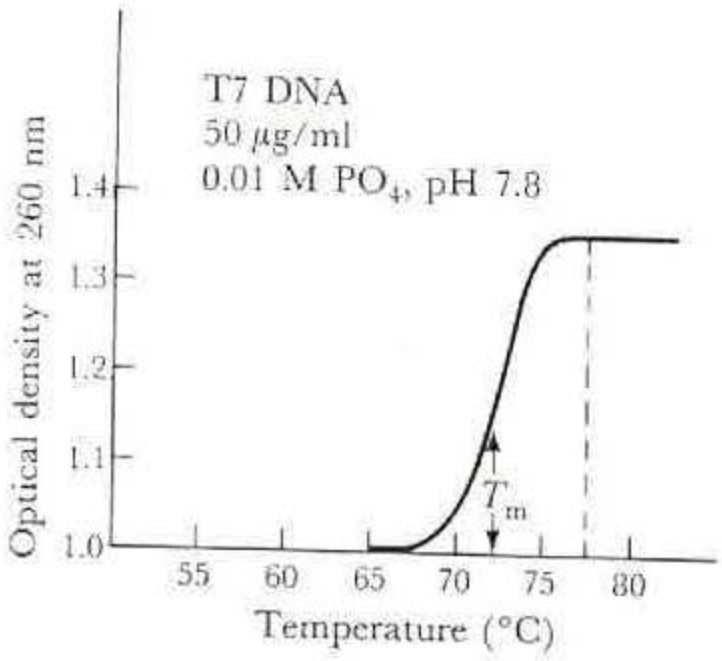
پایداری DNA بستگی به (۱) حرارت، (۲) pH ، (۳) قدرت یونی محلول، (۴) افزودن مولکول های کوچک، (۵) حلال های قطبی و غیر قطبی، و (۶) در صد GC دارد. شش مورد فوق را در زیر شرح می دهیم:

(۱) پایداری حرارتی – با افزایش GC مشاهده می شود که پایداری DNA نیز زیاد می شود (شکل ۷- ۱۳). قدرت یونی محلول می تواند در پایداری بیشتر DNA کمک کند.



شکل ۷- ۱۳ منحنی Tm علیه GC برای مولکول های DNA مختلف. مقادیر Tm برای دو محلول با قدرت یونی مختلف در منحنی ذکر شده است. توجه داشته باشید که شیب خطوط مساوی هم هستند.

(۲) اگر در محلولی حاوی DNA حرارت را تا حدی بالا ببریم که هنوز دو رشته DNA کاملاً از هم باز نشده اند و حرارت را مجددا پایین بیاوریم مشاهده می شود که منحنی روی خودش به سمت پایین حرکت می کند (شکل ۷- ۱۴).



شکل ۷- ۱۴ تغییرات OD_{260} با افزایش حرارت. در این روش حرارت را تا محلی روی منحنی بالا برده سپس به حرارت ۲۵ ̊C رسانده و OD خوانده می شود.

وقتی حرارت را آنقدر بالا بردیم که موقع رناتوره کردن مشاهده شد که منحنی فوق روی خودش بر نمی گردد، در این حالت می گویند hysteresis اتفاق افتاده است.

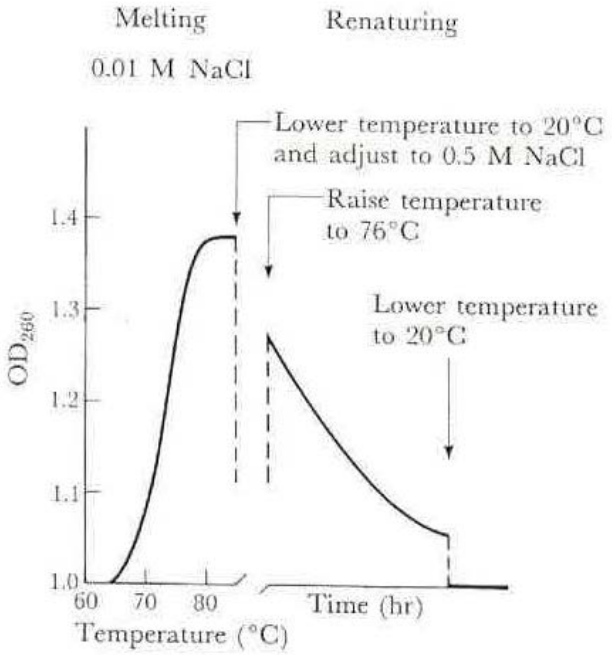
(۳) جدا شدن کامل دو رشته DNA را OTR (optical – transition region) گویند. مثلاً در حرارت ۷۷/۵ ̊C هنوز پیوندهای هیدروژنی درجند باز وجود دارد (شکل ۷- ۱۴) ولی اگر حرارت را به ۸۰ ̊C برسانیم ناحیه OTR خواهیم داشت.

(۴) اگر DNA را در محلولی قرار دهیم که قدرت یونی آن کم باشد (مثلاً NaCl ۰/۰۱ مولار) وقتی حرارت را بالا برده تا جایی که دو رشته کاملاً از هم جدا شوند و سپس حرارت را پایین بیآوریم در نتیجه DNA رناتوره می شود و مجددا DNA ها

دو رشته ای می شوند. آزمایش شکل ۷- ۱۴ را با این DNA دو رشته ای انجام داده یعنی منحنی OD را علیه حرارت رسم می کنیم مشاهده می شود که OD به اندازه ۳۷ در صد افزایش می یابد. اگر همین عمل را در محلولی با قدرت یونی زیاد (مثلاً ۰/۱ M NaCl) انجام دهیم، OD افزایشی برابر ۱۲ در صد را از خود نشان می دهد. علت این است که در محلول دارای قدرت یونی کم بار منفی گروه های فسفات یکدیگر را دفع کرده و دو رشته DNA را از هم جدا نگه می دارد ولی در محلول دارای قدرت یونی زیاد به علت وجود یون های بیشتر این دفع گروه های فسفات کاهش پیدا می کند.

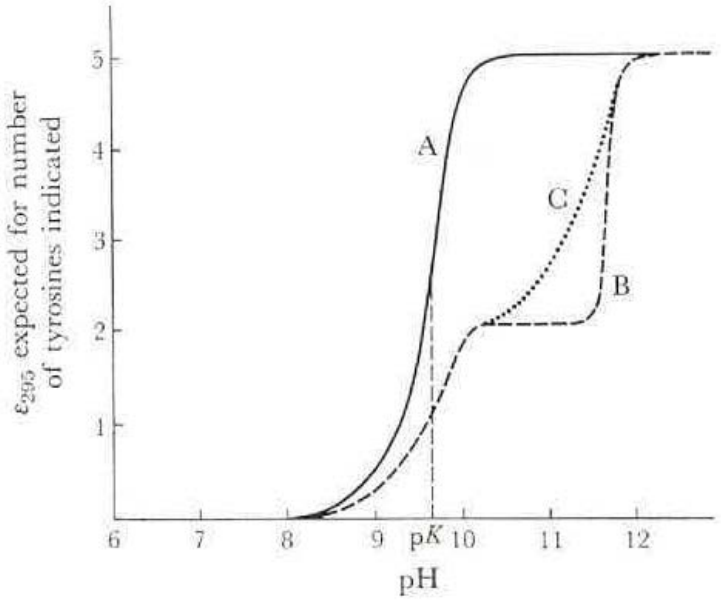
(۵) اگر DNA ای که افزایش OD ۱۲٪ را نشان می دهد را در محلولی با قدرت یونی ۰/۵ تا ۱ و حرارت بالای Tm قرار دهیم و همچنین غلظت DNA هم زیاد باشد، پس از چند ساعت OD به مقدار اولیه (یعنی کاملاً دو رشته ای)

بر می گردد (شکل ۷- ۱۵). با استفاده از این روش می توان عمل رناتوره کردن DNA را انجام داد. در این عمل وقتی DNA را در محلول NaCl ۰/۵ مولار قرار می دهیم، پیوندهای هیدروژنی به صورت تصادفی (رندوم) تشکیل شده و OD کاهش می یابد. وقتی حرارت را تا ۷۶ ̊C بالا ببریم جفت بازها به صورت تصادفی باز می شوند و OD افزایش پیدا می کند. حال حرارت را کم کم پایین می آوریم و تا ۲۰ ̊C می رسانیم در نتیجه جفت بازهای صحیح یکدیگر را پیدا کرده و OD کاهش پیدا می کند. با این روش رناتوره شدن DNA کامل می شود.



شکل ۷– ۱۵ رناتوره کردن DNA باکتریوفاژ T_4 با استفاده از OD_{260} (توضیح کامل را در متن مشاهده می کنید).

مثال ۵ تیتراسیون pH پروتئین ها با استفاده از اسپکتروسکپی – گاهی می خواهیم برای تعیین ساختار پروتئین ها، pK گروه جانبی آمینو اسید پروتئینی را بدانیم. با استفاده از این روش جایگاه آمینو اسید را می توانیم تعیین کنیم. فرض کنید پروتئینی دارای ۵ آمینو اسید تیروزین است. تمام آنها در سطح پروتئین قرار دارند. اگر pH محلولی که پروتئین مورد نظر در آن قرار دارد را افزایش دهیم، در نتیجه تیروزین ها یونیزه می شوند (شکل ۷– ۱۶). در شکل ۷– ۱۶ منحنی A معلوم می شود که تیروزین ها در سطح پروتئین قرار دارند. در منحنی B مشخص شده که ۳ تا از تیروزین ها در داخل پروتئین و در محیط غیر قطبی و ۲ تا در سطح هستند. شیب تند قسمت بالای منحنی نشان می دهد که تیروزین های داخلی در معرض حلال می باشند یعنی پروتئین باز شده (unfold) یا به صورت دناتوره درآمده است. اگر سه تا از تیروزین های داخلی در محیط قطبی باشند، منحنی C به وجود می آید که نشان می دهد این سه تیروزین دارای pK های متفاوتی نسبت به آنهایی که در معرض حلال بودند، دارند.



شکل ۷- ۱۶ منحنی های تیتراسیون pH تیروزین با استفاده از سنجش ε_{295}

مثال ۶ تعیین بعضی از خصوصیات ساختار فضایی پروتئین با روش آمیختگی– حلال (solvent perturbation)

و اختلاف جذب در دستگاه اسپکتروسکپی – اگر آمینو اسیدها را به محیط کمتر قطبی منتقل کنیم، ε و λ_{max} آنها افزایش می یابند. طیف کروموفور بستگی به قطبیت محیط دارد. دو استفاده از این موضوع می توان کرد:

(۱) تعیین قطبیت محیط آمینو اسید داخلی – پروتئین را در حلال قطبی قرار داده و طیف آن را به دست می آوریم این طیف با طیف همان کروموفور به صورت آزاد یک بار در حلال قطبی و بار دیگر در حلال غیر قطبی مقایسه می کنیم. اگر شبیه هر کدام از آنها شد، معلوم می شود در ناحیه قطبی یا غیر قطبی قرار دارد.

(۲) تعیین محل بعضی از کروموفورها در داخل یا خارج پروتئین.

فرض کنید که می خواهیم ببینیم آمینو اسید خاصی در داخل یا سطح پروتیئن قرار دارد. روشی که در زیر توضیح داده می شود به نام روش آمیختگی- حلال می باشد. اغلب پروتئین ها در حلال غیر قطبی حل نمی شوند یا دناتوره می گردند. بنابراین اغلب از

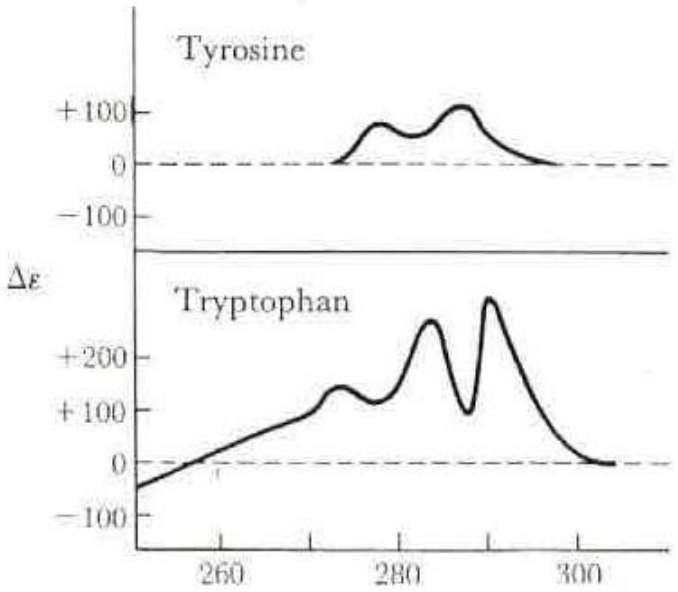
مخلوط ۸۰٪ آب و ۲۰٪ حلال غیر قطبی استفاده می شود مثلاً ۲۰ حجم از حلال های جدول ۲ در کل ۱۰۰ حجم با آب چنین می شود.

در این روش از اسپکتروسکپی اختلاف جذب (difference spectroscopy) استفاده می شود. پس به جای این که اول با استفاده از شاهد جذب را صفر کنیم، در یکی از کوویت ها ماده مورد نظر را در آب و در کوویت دیگر ماده مورد نظر را در حلال آمیخته شده قرار می دهیم. جذب را در هر کدام از طول موج ها می خوانیم منتهی در این جا اختلاف جذب یعنی $\Delta\varepsilon$ را در λ_{max} خاصی تعیین می کنند. اختلاف طیف در ۲۰٪ اتیلن گلیکول و ۸۰٪ آب برای تیروزین و تریپتوفان در شکل ۷– ۱۷ آمده است.

جدول ۷–۲ حلال هایی که در روش آمیختگی – حلال استفاده می شوند.

مایع افزودنی	جامد افزودنی
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Arabitol
Dioxane	Erythritol
Ethanol	Glucose
Ethylene glycol (EG)	Mannitol

Polyethylene glycol (PEG)	Glycerol
Sucrose	
Urea	



شکل ۷- ۱۷ اختلاف طیف تیروزین و تریپتوفان

توجه داشته باشید ممکن است Δε منفی شود. تریپتوفان در آب دارای حداکثر جذب برابر ۲۸۰ nm بود ولی در محلول ۲۰٪ اتیلن گلیکول با آب برابر ۲۹۲ شد. فرض کنید ترادف آمینو اسیدهای پروتئینی را می دانیم و دارای ۵ تریپتوفان است. ابتدا پروتئین را دناتوره می کنیم تا هر ۵ تریپتوفان در سطح قرار گیرند فرض کنید جذب برابر :

$$\Delta OD_{292} = ۱$$

شد مجددا عمل فوق را تکرار کرده و این دفعه با پروتئین طبیعی انجام می دهیم:

$$\Delta OD_{292} = ۰/۶$$

پس با یک تناسب ساده می توان تعداد تریپتوفان های سطحی پروتئین را تعیین کرد یعنی ۵ تریپتوفان اختلاف جذب برابر یک شد پس حال که اختلاف جذبی برابر ۰/۶ داریم، چند تریپتوفان در سطح آن وجود دارد:

$$۰/۶ \times ۵ = ۳$$

روش دیگری که می توان استفاده کرد این است که مواد اکسید کننده مثلاً فرمیک اسید یا پریدیک اسید به پروتئین اضافه کرده در نتیجه گروه ایندول مربوط به تریپتوفان اکسید می شود و جذب نخواهیم داشت. بنابراین اگر تمام تریپتوفان ها در سطح پروتئین باشند، گروه های ایندول اکسید شده و $\Delta OD_{292} = ۰$ می شود.

گاهی کروموفور (مثلاً تریپتوفان) در داخل پروتئین کاملاً دفن نشده بلکه در یک شکاف بسیار کوچک قرار دارد و مولکول حلال نمی تواند وارد شکاف شود در نتیجه حلال کروموفور را ندیده و اختلاف جذب مشاهده نمی شود. قطر مولکول های حلال به صورت زیر است (بر حسب آنگستروم) :

D_2O = ۲/۲ ، dimethylsulfoxide = ۴ ، ethylene glycol = ۴/۳ ، glucose = ۷/۲ ، arabitol = ۶/۴

sucrose = ۹/۴ ، glycerol = ۵/۲ .

تمرین

۱ – محلولی با غلظت ۳۲ µg/ml دارای جرم مولی ۱۰۰ و جذب ۰/۳۲ در ۵۴۰ nm شد (ℓ = ۱ cm) ضریب جذب آن بر حسب ε_m برابر .....گردید.

الف) ۱۰۰۰۰ ج) ۱۰

ب) ۱۰۰ د) ۱۰۰۰

۲– کدام یک از آمینو اسیدهای زیر می توانند پیوند یونی با DNA یا RNA ایجاد کنند؟

الف) اسید گلوتامیک و اسید آسپاراتیک ج) فنیل آلانین و تیروزین

ب) هیستیدین و سرین د) لیزین و آرژنین

۳– از باکتری E.coli، DNA آن را خالص کردیم. می دانیم که مقدار GC آن ۵۰٪ است. این DNA در محلول NaCl ۰/۱۵ مولار و سدیم سیترات ۰/۰۱۵ مولار حل کردیم. منحنی مربوط به تعیین T_m رسم گردید. مشاهده شد که منحنی دو پله ای و دارای دو T_m در ۸۰ ℃ و ۸۸ ℃ شد. محاسبه پله اول نشان داد که ۲۰٪ کل است. دلیل آن .....

الف) دوگروه DNA داریم که ۲۰٪ مربوط به DNA دارای GC ۵۰٪ است.

ب) دوگروه DNA داریم که ۸۰٪ مربوط به DNA دارای GC بیشتر از ۵۰٪ است.

ج) هر دو پاسخ فوق صحیح هستند.

۴ – محلولی حاوی مولکول A دارای جذب در طول موج های مختلف به ترتیب زیر است:

OD_{260} = ۰/۴۵ و OD_{450} = ۰/۰۳ . محلول دیگری حاوی مولکول B دارای جذب OD_{260}=۰/۰۰۴ و OD_{450} = ۰/۸۱ می باشد. ۲ ml از محلول حاوی A را با ۱ ml محلول دارای مولکول B مخلوط کردیم. مقدار جذب این مخلوط برابر OD_{260} = ۰/۳۰ و OD_{450} = ۰/۴۶ گردید. آیا بین مولکول A و B اندرکنشی صورت گرفته است؟

الف) اندرکنش صورت گرفته چون OD_{450} متفاوت گردید.

ب) اندرکنش صورت گرفته چون OD_{260} متفاوت گردید.

ج) اندرکنش صورت نگرفته چون OD_{450} در مخلوط یکسان شد.

د) اندرکنش صورت نگرفته چون OD_{260} در مخلوط یکسان شد.

منابع:

1. Freifelder,D. (1982) Physical biochemistry, applications to biochemistry and molecular biology. W.H. Freeman and Comapany.
2. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2013) Lehninger Principles of Biochemistry (sixth edition). Macmillan.
3. vanHolde, K.E., Curtis Johnson, W. and Shing Ho, P. (2006) Principles of Physical Biochemistry (second edition). Pearson.
4. Sheehan, D. (2009) Physical biochemistry. Wiley- Blackwell.

5. Work, T.S. and Work, E. (1976) Laboratory Techniques (volume 4) North- Holland Publishing Company.

پیوست:

absorbance A measure of the decrease in light transmitted by a sample. Defined as $-\log_e(I/I_0)$ in which I and I_0 are the transmitted intensity and the incident intensity, respectively.

active site The region of a protein in which interaction with another molecule takes place.

adenine A base found in DNA and RNA. Abbreviated A for the free base, rA for adenosine, and dA for deoxyadenosine.

alcohol dehydrogenase An enzyme that catalyzes the following oxidation-reduction reaction:

$$\text{acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftarrows \text{ethanol} + \text{NAD}^+$$

α-carbon of an amino acid The carbon atom to which the amino group is attached.

α-phosphate of a nucleotide The phosphate attached to the sugar.

amino acid sequence The linear order of the amino acids in a polypeptide.

anisotropic Having a physical property that is in some way dependent on direction.

antibody A protein synthesized by an animal in response to a foreign substance.

antigen A substance capable of eliciting antibody formation.

antigenic determinant The particular site or chemical group on an antigen against which antibody is directed.

apoprotein A protein requiring a prosthetic group for activity.

AT pair An adenine residue and a thymine residue joined by hydrogen bonds.

bacteriophage A virus that multiplies only in bacteria.

blue shift of a spectrum Any shift to a shorter wavelength. This term is a misnomer in that a shift to shorter wavelengths of a wavelength maximum in the ultraviolet range is called a blue shift even though the shift is actually away from the blue.

boundary In physical biochemistry, this usually means a region in which the composition of a solution changes.

5-bromouracil A base that can substitute for thymine in DNA; in so doing, the density of the DNA increases. Abbreviated BU for the free base and BUDR for the deoxyriboside.

catenane A structure consisting of at least two circles linked as in a chain.

cell, sample A container for a sample.

chemical shift In nuclear magnetic resonance, the change in resonance conditions of a nucleus caused by a chemical or a physical interaction with other nuclei or with electrons.

chlorophyll The principal photoreceptor in plants.

chloroplast A cell organelle that contains chlorophyll.

codon A sequence of three adjacent nucleotides coding for an amino acid.

cofactor A small molecule essential for the activity of an enzyme; usually distinguished from a prosthetic group by being loosely bound.

collagen A major body protein; found in tendon, bone, and skin.

concanavalin A A plant protein of a class called lectins that binds to α-mannosyl groups on the surface of mammalian cells and causes agglutination.

concatemer A linear polymer consisting of a repeating unit of a polymer; usually refers to DNA molecules of greater than unit length.

concentration gradient A system in which the concentration of a substance changes with time or location.

convection The movement of a liquid caused by local changes in density.

copolymer A polymer containing more than one type of monomer.

curve fitting A process by which many known curves are graphically summed in the right proportions to make an observed curve.

cytosine A base found in DNA and RNA. Abbreviated C for the free base, rC for cytidine, and dC for deoxycytidine.

dalton A unit of molecular weight, the mass of a hydrogen atom. In some chemistry texts, this is called an avogram.

dansyl chloride A chemical that reacts with the amino groups of proteins to form a highly fluorescent compound.

density Mass per unit volume.

density gradient A change in density with position.

density gradient centrifugation The centrifugation of a solution that is layered on or contained in a density gradient.

dichroic Having the absorbance depend on the relative orientation of the plane of polarization of incident light and a molecular axis.

difference spectroscopy A technique whereby a spectrum is obtained by subtracting one spectrum from another.

DNA polymerase I An *E. coli* enzyme capable of copying a single strand of DNA or of filling in gaps; it is not the principal enzyme responsible for synthesizing DNA.

DNA polymerase III An *E. coli* enzyme responsible for the duplication of DNA.

DNA-RNA hybrid A double helix consisting of one strand of DNA hydrogen bonded to an RNA strand by complementary base pairing.

double-sector cell A centrifuge cell containing two sample compartments.

DPN Diphosphopyridine nucleotide; also called nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).

DPNH The reduced form of DPN; also called NADH.

elution The process of removing material from a chromatographic system.

endonuclease An enzyme that makes internal phosphodiester cuts in the sugar-phosphate chain of a polynucleotide.

exonuclease An enzyme that cuts off nucleotides one by one from the end of a polynucleotide strand by breaking phosphodiester bonds.

ferritin An iron-containing protein used as a marker in electron microscopy.

γ-phosphate of a nucleotide triphosphate The phosphate most distant from the sugar.

GC pair A guanine residue and a cytosine residue joined by hydrogen bonds.

glycoprotein A protein to which a carbohydrate is covalently linked.

heme The prosthetic group of hemoglobin.

histone A type of protein rich in basic amino acids found in the chromosomes of all eukaryotic cells except sperm.

hydrolysis The breaking of a molecule into two or more parts by the additon of water.

hydrophilic Having a tendency to bind water molecules.

hydrophobic Having a tendency to repel polar molecules such as water but to bind to nonpolar molecules.

inducer A substance that binds to a repressor and reduces or eliminates its activity.

in vitro Used in reference to an experiment done in a cell-free system.

in vivo Used in reference to an experiment done in living cells.

ionic bond A bond formed by the attraction between a positively charged group and a negatively charged one.

ionic strength A measure of the total amount of free charges per unit volume; for example, a divalent ion contributes twice as much to the ionic strength of a solution as a monovalent ion.

isotropic Having a physical property independent of direction.

ligand A small molecule that binds to a larger molecule.

lipoprotein A protein to which a lipid is covalently attached.

lysis The bursting of a cell by the destruction of its cell membrane or cell wall.

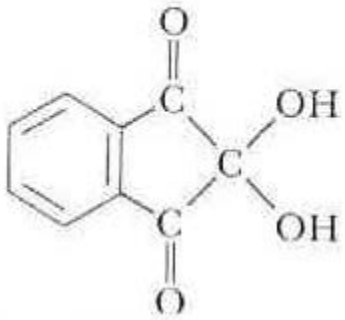
lysozyme An enzyme that lyses certain bacteria by cleaving a polysaccharide component of their cell walls.

melting Denaturation by heat.

melting temperature The temperature at which a melting transition is half complete.

nearest neighbor An adjacent monomer in a polymer.

ninhydrin A substance,



nuclease An enzyme that hydrolyses nucleic acids by breaking phosphodiester bonds.

oligonucleotide A small number of nucleotides joined by phosphodiester bonds.

oligopeptide A small number of amino acids joined by peptide bonds.

operator A sequence of bases in DNA to which a repressor binds.

optically active Having the ability to rotate the plane of polarization of light and to absorb differentially right and left circularly polarized light.

peak The maximum of a curve. The position of the peak usually refers to the x-coordinate. The size of the peak is the y-value.

polymerase An enzyme that joins nucleotides in phosphodiester linkages.

polynucleotide kinase An enzyme that transfers the γ-phosphoryl of adenosine triphosphate to a 5′-OH group of a polynucleotide.

promoter A region of a DNA molecule at which RNA polymerase binds and initiates transcription.

prosthetic group A tightly bound, specific, nonpolypeptide unit required for the biological activity of a protein.

red shift of a spectrum Any shift to longer wavelengths. This term is a misnomer in that a shift to longer wavelengths of a wavelength maximum in the infrared range is called a red shift even though the shift is actually away from the red.

relaxation The return of a system, which was initially at equilibrium but which has been disturbed, to the equilibrium state.

replication fork The Y-shaped region of a chromosome or DNA molecule that is a growing point for DNA replication.

repressor A protein product of a regulatory gene capable of binding to an operator and preventing the initiation of transcription.

resolving power The ability to separate two components.

ribonuclease An enzyme that degrades RNA. Often abbreviated to RNase.

ribosome A complex nucleoprotein on whose surface protein synthesis occurs.

SDS Sodium dodecyl sulfate, a detergent that disrupts most protein-protein and protein-lipid interactions.

single-sector cell A centrifuge cell containing a single sample compartment.

substrate The substance acted on by an enzyme.

Svedberg A unit of sedimentation.

swelling The process by which a dry gel particle imbibes liquid.

thymine A base found in DNA. Abbreviated T for the free base, rT for ribosylthymine, and dT for thymidine.

tRNA The RNA species that recognizes both a codon and an amino acid and carries the amino acid to the growing terminus of a protein. Formerly called sRNA.

uracil A base found only in RNA. Abbreviated U for the free base, rU for uridine, and dU for deoxyuridine.

zwitterion A molecule that can be either positively or negatively charged, depending on the pH.