



پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک

(کارشناسی ارشد بیوشیمی)

دکتر بهزاد لامع‌راد دکتر سعید رضایی‌زارچی

بسم الله الرحمن الرحيم

پیشگفتار ناشر

کتاب‌های دانشگاه پیام نور حسب مورد و با توجه به شرایط مختلف یک درس در یک یا چند رشته دانشگاهی، به صورت کتاب درسی، متن آزمایشگاهی، فرادرسی، و کمک درسی چاپ می‌شوند.

کتاب درسی ثمره کوشش‌های علمی صاحب اثر است که براساس نیازهای درسی دانشجویان و سرفصل‌های مصوب تهیه و پس از داوری علمی، طراحی آموزشی، و ویرایش علمی در گروه‌های علمی و آموزشی، به چاپ می‌رسد. پس از چاپ ویرایش اول اثر، با نظرخواهی‌ها و داوری علمی مجدد و با دریافت نظرهای اصلاحی و متناسب با پیشرفت علوم و فناوری، صاحب اثر در کتاب تجدیدنظر می‌کند و ویرایش جدید کتاب با اعمال ویرایش زبانی و صوری جدید چاپ می‌شود.

متن آزمایشگاهی (م) راهنمایی است که دانشجویان با استفاده از آن و کمک استاد، کارهای عملی و آزمایشگاهی را انجام می‌دهند.

کتاب‌های فرادرسی (ف) و **کمک درسی** (ک) به منظور غنی‌تر کردن منابع درسی دانشگاهی تهیه و بر روی لوح فشرده تکثیر می‌شوند و یا در وبگاه دانشگاه قرار می‌گیرند.

مدیریت تولید محتوا و تجهیزات آموزشی

فهرست مطالب کتاب

پیشگفتار هشت

فصل ۱. ساختار پروتئین‌ها ۱

پروتئین چیست؟ ۱

خصوصیات آمینو اسیدها ۲

یونیزاسیون گروه‌های آمینی و کربوکسیلی در آمینو اسیدها و پپتیدها ۳

یونیزاسیون زنجیره‌های جانبی ۱۰

تعادل یونیزاسیون در پروتئین‌ها ۱۲

زنجیره‌های جانبی قطبی ۱۶

ترکیبات پروتئین‌ها ۲۰

ترکیبات آمینواسیدها ۲۰

پیش‌بینی خصوصیات پروتئین‌ها از روی ترکیبات آمینواسیدها ۲۴

بسیاری از پروتئین‌ها بیش از بیست آمینو اسید طبیعی دارند ۲۶

فلزات و سایر گروه‌های پروستتیک ۳۰

ساختار اولیه پروتئین‌ها ۳۴

پیوندهای دی سولفیدی و سایر اتصالات تقاطعی ۳۶

ساختار اولیه و تجزیه و تحلیل ساختارهای دوم و سوم ۴۰

ساختار اولیه و پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم ۴۴

توالی‌ها و تجزیه و تحلیل عملکرد آنها ۴۸

مقایسه توالی‌ها در بین پروتئین‌های نزدیک به هم ۵۱

پروتئین‌های جهشی: هموگلوبین ۵۶

فصل ۲. پایداری ساختار پروتئین‌ها ۵۹

مقدمه ۵۹

۶۰	بررسی ترمودینامیکی در مورد تاخوردگی پروتئین‌ها
۶۲	نیروهایی که در تاخوردگی پروتئین‌ها دخالت دارند
۶۳	اثر آبگریزی (هیدروفوبیک)
۶۳	پیوندهای هیدروژنی
۶۴	آنتروپی مربوط به آرایش مولکولی
۶۴	سایر عوامل پایدارکننده پروتئین
۶۵	ارزیابی تأثیر عوامل مختلف
۶۵	اثر آبگریزی
۶۸	آنتروپی آرایش مولکولی
۶۹	نتایج

فصل ۳. تغییر در مولکول‌های پروتئین

۷۱	مقدمه
۷۵	ADP-ریبوزیلاسیون رشته‌های اکتین باعث القای دپلمریزاسیون می‌شود
۷۶	یوبی کوئیتینه شدن
۷۶	Ub ساختار و محل اتصال
۷۸	نحوه اتصال یوبی کوئیتین به پروتئین هدف
۷۸	نقش یوبی کوئیتین
۸۲	فسفوریلاسیون
۸۴	مکانیزم عمل فسفوریلاسیون
۹۲	گلیکوزیلاسیون
۹۵	آسیلاسیون

فصل ۴. ساختار اسیدهای نوکلئیک

۹۹	خصوصیات نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها
۱۰۶	ترکیبات اسیدهای نوکلئیک
۱۰۶	قوانین چارگاف و DNA
۱۰۷	ترکیبات RNA
۱۰۹	سایر ترکیبات اسیدهای نوکلئیک
۱۱۱	ساختار اولیه
۱۱۱	ساختار زنجیره کووالانی
۱۱۳	ترادف اسیدهای نوکلئیک
۱۱۵	استنباط ساختار دوم با قیاس از روی ترادف tRNA
۱۱۷	اطلاعات ترادفی و تجزیه و تحلیل ساختار و عملکرد
۱۲۰	روش‌هایی برای مقایسه مستقیم ترادف‌ها
۱۲۵	ساختار دوم اسیدهای نوکلئیک
۱۲۶	خصوصیات جفت شدن بازها در اسیدهای نوکلئیک دورشته‌ای

۱۲۸.....	ساختار اسیدهای نوکلئیک ماریپچ دوتایی
۱۳۳.....	تفاوت بین ساختار RNA و DNA
۱۳۶.....	سایر ماریپچ‌های پلی نوکلئوتیدی
۱۳۷.....	ساختار سوم اسیدهای نوکلئیک
۱۴۸.....	نیروی استکینگ در بازهای tRNA
۱۴۹.....	خواص شیمیایی و بیوشیمیایی و ساختار سوم tRNA^{Phe}
۱۵۳.....	ساختار سوم در DNA
۱۵۵.....	ساختار چهارم
۱۵۹.....	فصل ۵. اندرکنش پروتئین‌های تنظیمی با DNA
۱۵۹.....	مقدمه
۱۶۱.....	پروتئین کرو
۱۶۴.....	پروتئین سرکوبگر لاندا
۱۶۹.....	پروتئین CAP
۱۷۱.....	منابع

پیشگفتار

در دهه گذشته بعضی از روش‌های آزمایشگاهی موجب تغییرات زیادی جهت کشف پدیده‌های شگرف طبیعت شد مثل تفرق اشعه x ، الترا سانتریفیوژ، و الکتروفورز و غیره. در این کتاب سعی شده است که با وجود روش‌های آزمایشگاهی بسیار پیچیده جدید تا حدی در مورد درشت مولکول‌های زیستی (که در اینجا منظور فقط اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها هستند) و کمپلکس‌هایی که ایجاد می‌کنند، مورد توجه قرار گیرند. این درشت مولکول‌ها حاوی شکل‌ها، کانفورماسیون، ساختار، تغییرات کانفورماسیونی، حرکت، اندرکنش‌های بسیاری هستند که بحث در مورد آنها بسیار مفصل‌تر از آنچه در این کتاب آمده، خواهد بود. هدف ما بررسی اصول و مفهوم کلی این مولکول‌های شگفت‌آور است که در حقیقت قلب زیست‌شناسی مولکولی را تشکیل می‌دهند. این اصول و نتایج حاصل از آن توسط علومی مثل فیزیک، شیمی، و زیست‌شناسی به دست آمده‌اند.

امروزه پروتئومیکس، ژنومیکس، ترانس کریپتومیکس، و متابولومیکس یعنی روش‌های آمیکس (omics-) هنوز نسبتاً جدید هستند. جالب است که این فناوری‌ها با سرعت زیاد جای خود را در پژوهش‌های مختلف باز کرده‌اند و امیدواریم که خصوصیات بیشتری در مورد درشت مولکول‌ها نشان دهند.

دانشجویانی که می‌خواهند سفر علمی خود را آغاز کنند و وارد آزمایشگاه‌های تحقیقاتی شوند، نیاز به اطلاعات اولیه دارند که یکی از این نوع اطلاعات مخصوصاً در بیوشیمی ساختار و عملکرد اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌باشند.

ما صادقانه امیدواریم که این مطالب موجب گرایش و تحریک شما جهت میل به کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه گردند. در نتیجه شما برای کشف معجزات طبیعت ترغیب شوید و در اینجا است که ما (نویسندگان کتاب) به هدف خود رسیده‌ایم.

مؤلفان کتاب

بهار ۱۳۹۱

فصل ۱

ساختار پروتئین‌ها

پروتئین چیست؟

همه ما می‌دانیم که باید پروتئین بخوریم، ولی این پروتئین چیست و چرا باید خورده شود؟ بسیاری از غذاها پروتئین دارند، منابع پروتئینی می‌توانند گوشت (گاو، گوسفند و ماهی)، تخم مرغ، لبنیات، آجیل، دانه‌های گیاهی و غیره باشند.

پروتئین‌ها متشکل از آمینو اسیدها هستند که در همین فصل به‌طور مفصل در مورد ساختار و عملکرد آنها صحبت خواهد شد. مطالعه پروتئین‌ها و عملکرد آنها در واقع موجب فهم بهتر سلول‌ها و موجودات می‌شود که در ادامه، دلایل اهمیت آنها آمده است.

۱. پروتئین‌ها به‌عنوان کاتالیزور عمل می‌کنند و فرایندهای متابولیکی را در سلول انجام می‌دهند.

۲. پروتئین‌ها نقش ساختاری در داخل و خارج سلول دارند.

۳. پروتئین‌ها در یک سلول ممکن است به‌عنوان پیام^۱ ترشح شده و در بخش‌های خارج سلولی^۲ ذخیره شوند، سپس توسط سلول‌های دیگر شناسایی شوند.

۴. آنها به‌عنوان گیرنده^۳ باعث انتقال اطلاعات از قسمت‌های خارج سلول به داخل سلول می‌شوند.

1. Signal
2. Extracellular
3. Receptor

۵. آنها ممکن است به صورت ترکیبات پیام‌رسان داخل سلولی^۱ عمل کنند و روی گیرنده‌ها اثر بگذارند.

۶. پروتئین‌ها تشکیل دهنده‌های اصلی ماشین بیان ژن‌ها هستند و تعیین‌کننده بیان ژن‌های به‌خصوصی می‌باشند. آنها در ترجمه mRNA به پروتئین دخالت دارند.

۷. پروتئین‌ها در انجام عمل همانندسازی DNA، نوترکیب DNA، بریدن RNA^۲ و پیرایش^۳ دخالت دارند.

به‌طور کل، پروتئین‌ها متنوع‌ترین درشت مولکول در سیستم‌های زنده هستند. بنابراین عملکردهای مهمی در تمام فرایندهای زیستی به‌عهده دارند. موارد ذکر شده در فوق فقط جزئی از عملکردهای پروتئین‌ها را نشان می‌دهند و اگر بخواهیم نقش‌های پروتئین‌ها را در موجودات زنده ذکر کنیم باید از ساختار اولیه آنها یعنی آمینو اسیدها شروع کنیم و کم‌کم به عملکرد آنها برسیم.

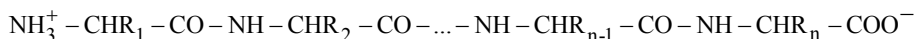
خصوصیات آمینو اسیدها

واحدهای سازنده اصلی پروتئین‌ها α -۲۰ آمینو اسید هستند. ساختار، نام‌ها، و علائم اختصاری آنها که شامل سه حرف می‌باشد، در شکل ۱-۱ آمده است. بیست آمینو اسید همگی دارای کربن - α هستند که مرکز نامتقارن (کربن کایرال) آنها می‌باشد (به استثنای گلیسین). در هنگام سنتز پروتئین‌ها یا پپتیدها روی ریبوزوم، آرایش فضایی گروه‌های اطراف این مرکز باید به صورت ایزومر فضایی L باشد (شکل ۱-۱). توجه داشته باشید که D- آمینو اسیدها به ندرت در پپتیدها دیده می‌شود روی ریبوزوم‌ها ساخته نمی‌شوند.

دو آمینو اسید وجود دارند که دارای دو مرکز نامتقارن هستند، یعنی مرکز α و مرکز دیگر روی کربن β است. آرایش فضایی آنها نیز ثابت است (شکل ۱-۱). آمینو اسیدهایی که دارای کربن β نامتقارن هستند به نام‌های آلو ایزولوسین^۴ و دیگری آلو ترئونین^۵ هستند.

1. Intracellular
2. Splicing
3. Editing
4. Alloisoleucin
5. Allothreonin

اساس ساختار کووالانی پروتئین از زنجیره‌های پلی پپتید است:



برای نشان دادن زنجیره‌های پپتید همیشه از سمت چپ به راست می‌نویسند یعنی سمتی که گروه NH_3^+ دارد، اولین آمینو اسید است. بنابراین، اگر اولین آمینو اسید ایزولوسین باشد (Ile) نشان می‌دهد که ایزولوسین باقی‌مانده^۱ انتهای N- است (به آن انتهای آمینی نیز می‌گویند). اگر آخرین آمینو اسید گلوتامیک اسید باشد، باقی‌مانده انتهایی C- را تشکیل می‌دهند (به آن انتهای کربوکسیلی نیز می‌گویند). توجه داشته باشید که وقتی مولکول‌ها با از دست دادن مولکول آب به هم متصل شوند و تشکیل پلیمر دهند به هر یک از آنها باقی‌مانده گویند.

یونیزاسیون گروه‌های آمینی و کربوکسیلی در آمینو اسیدها و پپتیدها

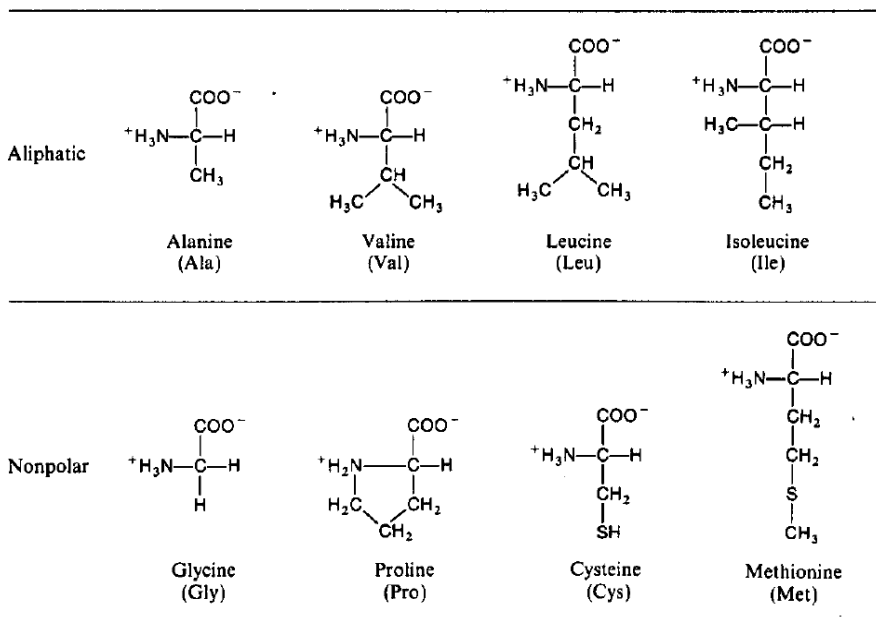
آمینو اسیدهایی که در شکل ۱-۲ نشان داده شده‌اند به شکل یونی (در pH برابر ۷) می‌باشند. در این pH گروه آمینی- α پروتونه می‌شوند ولی گروه کربوکسیل به صورت دپروتونه^۲ باقی می‌ماند. بنابراین، اغلب آمینو اسیدها در pH ۷، خنثی هستند یعنی بار ندارند، ولی آنها به شکل زوئتریون^۳ یعنی $\text{NH}_3^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-$ وجود دارند یا منظور این است که مومنتوم دو قطبی بزرگی دارند. چهار آمینو اسید وجود دارند که در زنجیره جانبی آنها در pH ۷، بار اضافی دیده می‌شود. این چهار آمینو اسید عبارت از: Asp و Glu با بار منفی، Lys و Arg با بار مثبت می‌باشند.

از آنجایی که pH یکی از متغیرهای مهم محیطی در مطالعات مربوط به پروتئین‌هاست، بنابراین هنگام بررسی آن پروتئین باید بدانیم که pH در کدام محل آمینو اسید تیترو می‌شود و چطور این pH توسط تلفیق آمینو اسیدها به پروتئین موجب تغییر بار آن می‌گردد. این اطلاعات برای آمینو اسیدها و پپتیدهای کوچک توسط تیتراسیون پتانسیومتری به دست می‌آیند. پروتون‌ها ممکن است به مولکول اضافه یا خارج شود، در نتیجه pH محلول مشخص می‌شود. برای پروتئین‌های دست نخورده، اگر به مقدار کافی پروتئین داشته باشیم، تیتراسیون با روش پتانسیومتری تقریباً یک روش ساده‌ای است. به

1. Residue
2. Deprotonated
3. Zwitterion

هرحال، تفسیر نتایج مشکل است، چون معلوم نیست کدام باقی‌مانده (در میان آن همه باقی‌مانده‌های مشابه) در ناحیه خاصی موجب منحنی تیتراسیون گردید. در این صورت باید روش دیگری را بعد از انجام تیتراسیون باقی‌مانده‌ها انتخاب کرد.

از آنجایی که هر باقی‌مانده در پروتئین یا پپتید با باقی‌مانده جانبی‌اش پیوند پپتیدی تشکیل می‌دهد، لذا خاصیت زوئتریون را از دست می‌دهد. و باقی‌مانده‌های انتهایی پپتید و زنجیره‌های جانبی باید مورد توجه قرار گیرند. دو عامل ممکن است روی تیتراسیون اثر بگذارند. این دو عامل اندرکنش‌های الکترواستاتیکی به‌وسیله اختلاف در ساختار شیمیایی منطقه‌ای، و اندرکنش‌های ترمودینامیکی به‌وسیله جفت شدن تعادلی یونیزاسیون و کفورماسیون به‌وجود می‌آیند. اختلاف بین انتهایی -N یا انتهایی -C پروتئین و گروه‌های آمینی و کربوکسیلی مربوط به آمینو اسیدهای آزاد را باید مورد توجه قرار داد. جاذبه الکترواستاتیکی بزرگی بین NH_3^+ و COO^- در آمینو اسیدهای آزاد در pH ۷ به‌وجود می‌آید. اگر بخواهیم یک پروتون از NH_3^+ خارج کنیم یا یک پروتون به COO^- اضافه نماییم، باز هم بررسی آن پپتید کار مشکلی خواهد بود (در جدول ۱-۲ تعادل یونی الیگو آلانین را مشاهده می‌کنید).



Aromatic	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{CH} \\ \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Histidine (His)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ Phenylalanine (Phe)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Tyrosine (Tyr)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{CH} \\ \quad \backslash \\ \text{N} \quad \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ Tryptophan (Trp)
Polar	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Asparagine (Asn)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Glutamine (Gln)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Serine (Ser)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Threonine (Thr)
Charged	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$ Lysine (Lys)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}-\text{H} \\ \\ \text{C}=\text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Arginine (Arg)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$ Aspartate (Asp)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{O}^- \end{array}$ Glutamate (Glu)

شکل ۱-۱. ساختار بیست آمینو اسید طبیعی در pH برابر ۷. تمام آنها روی صفحه کربن- α . گروه آمینی و هیدروژن در بالای صفحه قرار می‌گیرند، در حالی که گروه کربوکسیل و زنجیره جانبی در زیر صفحه در نظر بگیرد.

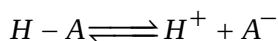
اثرات بار در Ala یا $(\text{Ala})_2$ یا $(\text{Ala})_4$ را می‌توان چنین مطالعه نمود. اندرکنش بین بارهای انتهایی پپتید از اهمیت خاصی برخوردارند. پیوست ۱-۱ مروری بر اصول تعادل یونیزاسیون دارد. در این قسمت نحوه استفاده از اطلاعات تیتراسیون و محاسبه انرژی اندرکنش الکترواستاتیک را مشاهده می‌کنید.

جدول ۱-۱. تعادل یونی برای بعضی از الیگو آلانین‌ها

Equilibria		pK ₁	pK ₂
$\text{NH}_3^+ - \underset{\text{Ala}}{\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COOH}} \xrightleftharpoons{1} \text{NH}_3^+ - \underset{\text{Ala}}{\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COO}^-} \xrightleftharpoons{2} \text{NH}_2 - \underset{\text{Ala}}{\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COO}^-}$		2.34	9.69
$\text{NH}_3^+ - \underset{\text{Ala-Ala}}{\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COOH}} \xrightleftharpoons{1} \text{NH}_3^+ - \underset{\text{Ala-Ala}}{\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COO}^-}$			
$\xrightleftharpoons{2} \text{NH}_2 - \underset{\text{Ala-Ala}}{\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{COO}^-}$		3.12	8.30
$^+ \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} \xrightleftharpoons{1} ^+ \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}^- \xrightleftharpoons{2} \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}^-$		3.39	8.03
$^+ \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} \xrightleftharpoons{1} ^+ \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}^- \xrightleftharpoons{2} \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}^-$		3.42	7.94

بیوست ۱-۱ اصول تعادل یونیزاسیون

واکنش یونیزاسیون زیر از رابطه اسیدهای ضعیف به دست آمده است. این واکنش تعادلی دارای ثابت تفکیک K_a است:



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[H-A]}$$

اگر بخواهیم ثابت تفکیک (K_a) را به صورت pK_a نشان دهیم، خواهیم داشت:

$$PK_a = -\log K_a$$

در رابطه هندرسون - هاسل باخ وقتی غلظت اسید برابر با غلظت نمک آن باشد، چنین می‌شود:

$$PH = PK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$[A^-] = [HA]$$

$$PH = PK_a + 0$$

بنابراین:

$$PH = PK_a$$

می‌شود. ثابت تفکیک بستگی دارد به انرژی آزاد تفکیک استاندارد یعنی فرمول زیر:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a$$

ΔG° تغییرات انرژی آزاد بین محصولات (H^+ و A^-) و واکنشگر ($H-A$) است. در این واکنش، محصولات و واکنشگر در حالت استاندارد (یعنی در محلول آبی برابر با ۱ M باشند) قرار دارند. تغییرات انرژی آزاد واقعی در واکنش‌های یونیزاسیون معمولاً در شرایط دیگری انجام می‌شوند:

$$\Delta G_{ioniz} = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[H^+][A^-]}{[H-A]}$$

بنابراین موقعی که محصولات و واکنشگر در حالت تعادل باشند، خواهیم داشت:

$$\Delta G_{ioniz} = 0$$

فرض کنید که واکنش یونیزاسیون با سایر فرایندها یا واکنش‌ها جفت شده باشد. برای مثال، پیوند پروتون به A^- موجب تغییر اندرکنش A^- با بعضی از گروه‌های دیگر

در مولکول می‌شود. اگر تغییرات انرژی آزادی که در این نوع واکنش‌ها دخالت دارند را با ΔG_c نشان دهیم، در اینجا c از کلمه جفت شدن^۱ آمده است. بنابراین، تغییرات انرژی آزاد کل به صورت زیر درمی‌آید:

$$\Delta G_{Tot} = \Delta G_{ioniz} + \Delta G_c = \Delta G^\circ + \Delta G_c + RT \ln \frac{[H^+][A^-]}{[H - A]}$$

اگر اجازه بدهیم که سیستم به حالت تعادل برسد، در این صورت خواهیم داشت:

$$\Delta G_{Tot} = 0$$

وقتی نصف اسید یونیزه شود غلظت H^+ برابر می‌شود با:

$$[H^+]_{1/2} = e^{-(\Delta G^\circ + \Delta G_c)/RT}$$

بنابراین pK'_a ظاهری برابر می‌شود با:

$$pK'_a = -\log[H^+] = \frac{\Delta G^\circ + \Delta G_c}{2.303RT}$$

اگر در مدلی که برای یک سیستم خاص ارایه شده، جفت شدن وجود نداشته باشد، pK_a برابر می‌شود با:

$$pK_a = \frac{\Delta G^\circ}{2.303RT}$$

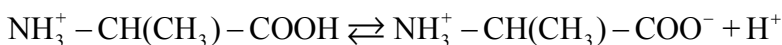
بنابراین، از اختلاف دو pK_a ها، تغییرات انرژی آزاد جفت شدن را می‌توان تعیین کرد:

$$\Delta G_c = 2.303RT (pK'_a - pK_a)$$

اگر بخواهیم این نتایج را برای اندرکنش الکترواستاتیک گروه‌های COO^- و NH_3^+ در آمینو اسید آلانین محاسبه کنیم، باید از اطلاعاتی که در جدول ۱-۲ داده شده، استفاده نماییم. pK_a برای تفکیک یک H^+ از COO^- (زمانی که خود آلانین بارگذاری نشده باشد) را می‌توانیم از تیتراسیون $(\text{Ala})_4$ که برابر با ۳/۴۲ است، حساب کنیم و pK_a' (زمانی که آلانین به تنهایی باشد و بارگذاری گردد) را برابر ۲/۳۴ می‌گیریم. چون RT برابر تقریباً $0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ در حرارت اتاق است، پس داریم:

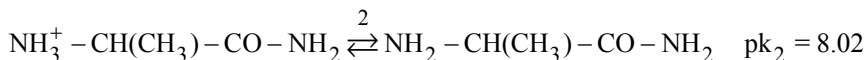
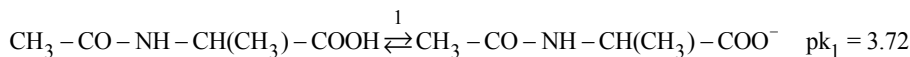
$$\Delta G_c = (2.303)(0.6)(2.34 - 3.42) = -2.5 \text{ kcal mole}^{-1}$$

بنابراین برای واکنش:



واکنش‌های بین NH_3^+ و COO^- موجب کاهش انرژی آزاد مولکول به مقدار $2/5 \text{ kcal mole}^{-1}$ می‌شود. این عمل باعث می‌گردد که تفکیک راحت‌تر انجام شود (یعنی pK_a پایین می‌آید).

تیتراسیون پتانسیومتری نمی‌تواند مستقیماً مشخص کند که کدام موقعیت در مولکول در حال تیتراژ شدن است. برای کسب اطلاعات در این مورد می‌توان از روش‌های اسپکتروسکوپی یا استفاده از ترکیبات شیمیایی مشابه کمک گرفت. برای مثال، ترکیبات مشابه زیر اجازه می‌دهند که مقادیر pK_a گروه‌های آمینی و کربوکسیلی مربوط به الیگو آلانین را تعیین کنیم:



با توجه به جدول ۱-۱ وقتی پیوند پپتیدی افزایش می‌یابد، pK_1 نیز زیاد می‌شود و برعکس pK_2 کاهش می‌یابد. اگر بتوان این آزمایش را با تمام ۲۰ آمینو اسید انجام داد و پیوند پپتیدی بین آمینو اسیدهای مختلف را مورد مطالعه قرار داد بدین ترتیب مقادیر

مختلفی از pK_1 و pK_2 با گروه‌های R متفاوت به دست آورد. این داده‌ها به ما کمک می‌کند تا نوع آمینو اسیدهایی که با هم پیوند پپتیدی دارند را تعیین نماییم. این آزمایش انجام شده و شما می‌توانید در مقاله (Dixit, S.B. et.al., 1996) با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف مشاهده کنید.

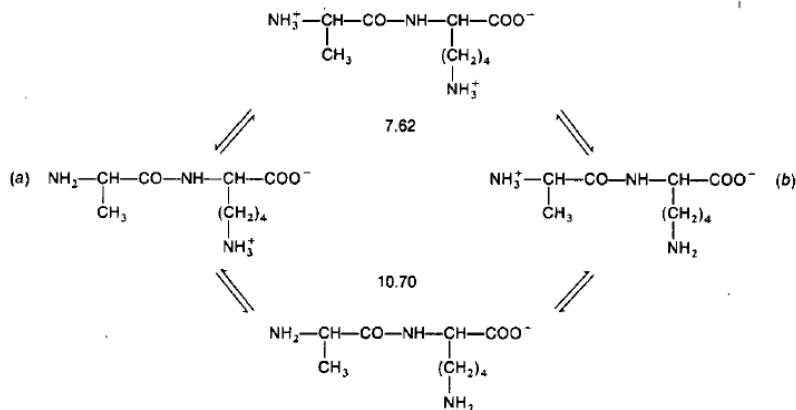
یونیزاسیون زنجیره‌های جانبی

موقعی که زنجیره‌های جانبی حضور داشته باشند، اطلاعات در مورد تیتراسیون کامل می‌شود. اگر $pH < 2$ باشد، لیزین بیشتر به صورت زیر دیده می‌شود:



تیتراسیون لیزین سه مقدار pK_a را نشان می‌دهد. یکی از آنها $2/18$ است که شبیه آلانین یونیزاسیون گروه کربوکسیلی را نشان می‌دهد. مقدار pK_a لیزین کمی کمتر از آلانین (که برابر با $2/34$ بود) است. دلیل آن این است که جاذبه الکترواستاتیکی بیشتری بین COO^- و گروه جانبی آن یعنی NH_3^+ وجود دارد (یونیزاسیون بعدی در pK_a های $8/9$ و $10/28$ اتفاق می‌افتد که مربوط به pK_a گروه آمینی- α و گروه آمینی- ϵ می‌باشد) اما نمی‌توان این موضوع را سریع مشخص کرد و باید از ترکیبات مدلی دیگر استفاده نمود.

در یونیزاسیون $Ala - Lys$ سه مرحله را می‌توان دید که دارای مقادیر به ترتیب $3/22$ ، $7/62$ ، و $10/70$ است. اولین عدد مربوط به گروه کربوکسیل است که آن را می‌توان در $Ala - Ala$ و همچنین $Ala - Lys$ مشاهده کرد. برای دو یونیزاسیون دیگر دو امکان وجود دارد: (۱) گروه آمینی- α قبل از این که زنجیره جانبی بتواند پروتون خود را از دست بدهد، قادر به از دست دادن آن خواهد شد، یا (۲) ممکن است زنجیره جانبی قبل از گروه آمینی- α یک پروتون از دست بدهد.



برای تشخیص ترکیبات a و b، دو دلیل می‌توان عنوان کرد. آمین‌های آلکیل اولیه دارای مقادیر pK_a بالاتری نسبت به آمین‌های متیل جانشین شده α -کربونیل هستند. برای مثال، pK_a ماده n- بوتیل آمین (n- butylamine) برابر با ۱۰/۵۹ است در حالی که آمین مربوط به α - آمینو اسیدی که توسط عوامل الکترواستاتیکی بارگذاری نشده باشد در pH حدود ۸ تیتر می‌شود (همان‌طور که در جدول ۱-۱ مربوط به الیگو آلانین مشاهده می‌کنید). این دلایل بیشتر به ترکیب a نزدیک هستند (که در این صورت به خاطر جاذبه الکترواستاتیکی گروه آمینی به گروه کربوکسیل، pK_a گروه آمینی - ϵ باید کمی بیشتر از بوتیل آمین باشد). همچنین گروه α - NH_3^+ باید در حضور ϵ - NH_3^+ باردار تیتر شود در نتیجه مقدار pK_a آن باید کمتر از گروه آمینی - α در Ala - Ala باشد، این پیشگویی‌ها با مقادیر مشاهده شده، مطابقت داشت. اگر ترکیب b صحیح باشد، باید توضیح داده شود چرا گروه آمینی - α در Ala - Ala در pK_a برابر با ۸/۳۰ تیتر می‌شود، در حالی که در Ala - Lys که زنجیره جانبی آن بار نداشته باشد، در pK_a برابر با ۱۰/۷۰ تیتر می‌گردد. راهی برای توضیح آن نیست و ترکیب b ماده مناسبی نیست.

برای پیدا کردن این که کجا گروه آمینی - ϵ در لیزین در یک پپتید تیتر می‌شود، لازم است که از ترکیباتی استفاده کنیم که انتهای آمینی و کربوکسیلی آزاد آنها خیلی دور از زنجیره‌های جانبی باشند تا جاذبه‌های الکترواستاتیکی به وجود نیاورند. برای مثال، در پپتید Ala - Lys - Ala - Ala، سه مقدار pK_a برابر با ۳/۵۸، ۸/۰۱ و ۱۰/۵۸ دیده می‌شوند. دو عدد اول نزدیک به موقعیت‌های $(Ala)_4$ قرار دارند و با گروه آمینی

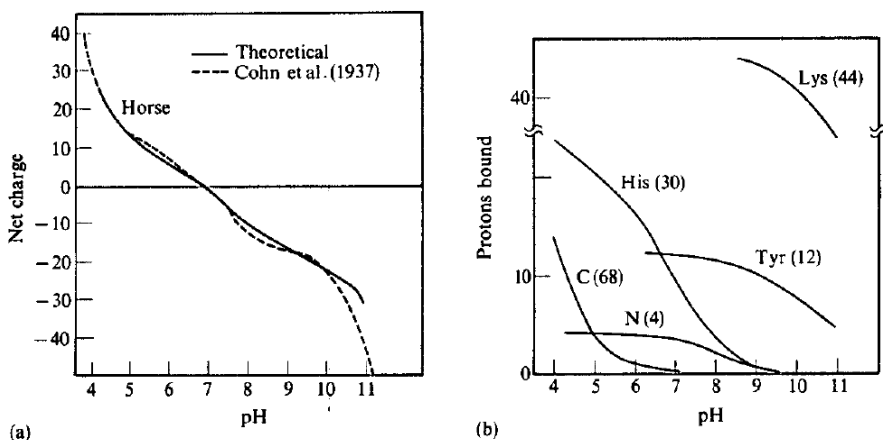
ε - n در بوتیل آمین نمی‌توان مقایسه کرد. به هر حال، در ترکیباتی با کثرت زنجیره‌های جانبی قابل یونیزه شدن، برای مثال، منحنی‌های تیتراسیون خیلی پیچیده‌تر می‌شوند (Lys - Lys - Lys با مقادیر pK_a برابر ۳/۰۶، ۷/۳۴، ۹/۸۰، ۱۰/۵۴ و ۱۱/۳۲)

تبادل یونیزاسیون در پروتئین‌ها

تیتراسیون باقی‌مانده‌ها در یک پروتئین بستگی به ترادف آمینو اسیدها دارد. در ساختارهای دوم و سوم پروتئین‌ها، باید به اندرکنش‌های الکترواستاتیکی تمام بارهای نزدیک به هم توجه کرد. جهت محاسبه این نوع اندرکنش‌ها به صورت کمی تلاش شده است و در بعضی موارد موفقیت‌آمیز بود ولی واقعاً کار دشواری است. هر پلی الکترولیت، یون‌های خنثی اطراف خود را جذب خواهد کرد، این عمل باعث ضعیف شدن همه اندرکنش‌های یونی می‌شود. چگالی یون‌های محیط بستگی به غلظت کلی الکترولیت در محلول دارد، هر چند که به گروه‌های باردار پلیمر نیز بستگی دارد. بنابراین، بعضی از اطلاعات فقط در محل‌های خاصی در ساختار دوم و سوم به دست می‌آیند و روی آنها تیتراسیون اندازه‌گیری می‌شود. در عمل، اگر تمام آنها تیتراسیون پتانسیومتری کلی شوند، اطلاعات به دست آمده خیلی نتیجه‌بخش نخواهد بود.

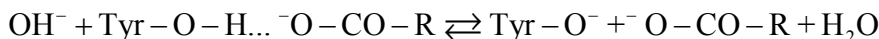
تیتراسیون یون هیدروژن اکسی هموگلوبین اسب را در شکل ۱-۲ مشاهده می‌کنید. برای تفسیر آن بایستی اطلاعاتی در مورد تعادل یونیزاسیون تمام زنجیره‌های جانبی آمینو اسیدهای موجود در پروتئین داشته باشیم. اطلاعات زنجیره‌های جانبی که توسط بارهای مجاور بارگذاری نشده باشند را می‌توان از روی اندازه‌گیری پتید به دست آورد. خلاصه‌ای از محدوده pH را که در آن هر زنجیره جانبی می‌تواند به طور طبیعی تیتراژ شود در جدول ۱-۲ مشاهده می‌کنید. در عمل، pK_a تیتراسیون هر زنجیره جانبی در یک پروتئین با مقادیر مشاهده شده معمولاً حدود یک واحد pH نسبت به مقادیر مورد انتظار تفاوت خواهد داشت. خلاصه‌ای از اطلاعات را در جدول ۱-۳ مشاهده می‌کنید. این تغییرات pK_a با هیسترزیس^۱ یعنی انحراف از منحنی تیتراسیون همراه است. یعنی منحنی تیتراسیون اسیدی نمی‌تواند درست روی منحنی تیتراسیون

قلیایی قرار گیرد. این چنین تأثیراتی که از تیتراسیون برمی‌خیزند موجب تغییرات کنفورماسیون می‌شوند.

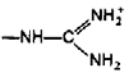
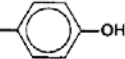


شکل ۲-۱. نمودارهای تیتراسیون pH مربوط به اکسی هموگلوبین اسب در قدرت یونی ۰/۰۲ و حرارت ۲۹ °C. (a) نمودار اطلاعات آزمایشگاهی که تا ۳ واحد بار الکتریکی تغییر داده شد را در مقابل pH مشاهده می‌کنید. در این نمودار سعی شده است که منحنی آن برای خصوصیات یونیزاسیون تمام زنجیره‌های جانبی که بارگذاری نشده باشند توسط اندرکنش‌های الکترواستاتیکی مابین ساختار چهارم پروتئین، محاسبه شدند. (b) محاسبه تعداد پروتون‌های پیوند شده به نیمی از ماده قابل یونیزه در مقابل عملکرد pH را مشاهده می‌کنید. علائم اختصاری به کار رفته عبارتند از: C (یعنی Glu به اضافه Asp) و N (منظور انتهای -N). اعدادی که در نمودار داخل پرانتز می‌بینید، تعداد انواع گروه‌ها را نشان می‌دهند.

فرض کنید که زنجیره جانبی آمینو اسیدی مستقیماً در اندرکنش شرکت کرده و موجب پایداری ساختار دوم یا سوم پروتئین شده است. اگر تغییری در یونیزاسیون آن صورت گرفته باشد اندرکنش از بین رفته و از پایداری ساختار پروتئین می‌کاهد. برای مثال، پیوند هیدروژنی یک تیروزین را به عامل کربوکسیلی باقی‌مانده دیگر در نظر بگیرید. تیتراسیون آن چنین است:



جدول ۲-۱. گروه‌های قابل یونیزه شدن در آمینو اسیدها: مقادیر pK_a

Amino acid	α -COOH	α -NH ₃ ⁺	Side chain	pK_a in amino acid	Expected pK_a in a protein
Alanine	2.3	9.9	—	—	—
Arginine	1.8	9.0		12.5	≥ 12
Asparagine	2.0	8.8	—	—	—
Aspartic acid	2.0	10.0	—COOH	3.9	4.4–4.6
Cysteine	1.8	10.8	—SH	8.3	8.5–8.8
Glutamic acid	2.2	9.7	—COOH	4.3	4.4–4.6
Glutamine	2.2	9.1	—	—	—
Glycine	2.4	9.8	—	—	—
Histidine	1.8	9.2		6.0	6.5–7.0
Isoleucine	2.4	9.7	—	—	—
Leucine	2.4	9.6	—	—	—
Lysine	2.2	9.2	—NH ₃ ⁺	10.8	10.0–10.2
Methionine	2.3	9.2	—	—	—
Phenylalanine	1.8	9.1	—	—	—
Proline	2.0	10.6	—	—	—
Serine	2.1	9.2	—	—	—
Threonine	2.6	10.4	—	—	—
Tryptophan	2.4	9.4	—	—	—
Tyrosine	2.2	9.1		10.9	9.6–10.0
Valine	2.3	9.6	—	—	—

NOTE: The pK_a values in most cases are at 25°C. The expected pK_a values in proteins are determined from model compounds in which titration of side chains is decoupled from charge effects of α -substituents.

اگر این اندرکنش در ساختار باز شده باشد، اثر زیادی روی pK_a تیروزین خواهد گذاشت چون انرژی آزاد پیوند هیدروژنی در حدود چندین کیلو کالری می‌شود. اما اگر تیروزین از $R-COO^-$ نتواند به‌طور فیزیکی از هم جدا شود چه اتفاقی می‌افتد؟ مشاهده شده است که این عمل زمانی اتفاق می‌افتد که ابتدا سایر باقی‌مانده‌ها از هم جدا شوند. در این صورت انرژی بیشتری برای یونیزاسیون مصرف می‌شود (حتی اگر این گروه‌ها نزدیک هم باشند و نیروی دافعه بین آنها وجود داشته باشد یعنی بین $O-CO-R$ و $Tyr-O^-$). تغییرات انرژی آزاد برای یونیزاسیون را می‌توان چنین نوشت:

$$\Delta G_{Tol} = \Delta G_{ioniz} + \Delta G_c$$

در فرمول فوق ΔG_{ioniz} تغییرات انرژی آزاد برای یونیزه کردن تیروزین خالص شده است و ΔG_c انرژی آزاد جفت شده که شامل این دو حالت می‌شود یکی از دست دادن پیوند هیدروژنی (دافعه الکترواستاتیکی) و دیگری تغییرات کنفورماسیون. همان‌طور که در پیوست ۱-۱ نشان داده شده است. در آنجا می‌بینید که اثر ΔG_c در تغییر pK_a ، ظاهری می‌باشد. چون $\Delta G_c > 0$ است، مقدار pK_a زیادتر از تیتراسیون مورد انتظار در تیروزین خالص شده می‌شود.

جدول ۳-۱. pK_a درونی مشاهده شده برای گروه‌های قابل یونیزه شدن در بعضی از پروتئین‌ها

Group	Protein	pK_a
Aspartic and glutamic acids	Lysozyme (3 of ~ 16 groups)	D
	β -Lactoglobulin (49 of 51 groups)	4.8
	(2 of 51 groups)	7.3
	Serum albumin	4.0
	Insulin	4.7
Histidine	Myoglobin (6 of 12 groups)	D
	(6 of 12 groups)	6.6
	β -Lactoglobulin	7.4
	Lysozyme	6.8
	Insulin	6.4
	Serum albumin	6.9
Tyrosine	Chymotrypsinogen (1 of 4 groups)	9.7
	(1 of 4 groups)	10.4
	(2 of 4 groups)	P
	Insulin	9.6
	Serum albumin	10.4
Lysine	Ribonuclease (3 of 6 groups)	9.6
	Serum albumin	9.8
	Lysozyme	10.4
	Chymotrypsinogen (3 of 13 groups)	P
Arginine	Insulin	11.9
α -Carboxyl	Insulin	3.6

D = always deprotonated at all pH values where native protein structure can be maintained.

P = always protonated at all pH values where native protein structure can be maintained.

SOURCE: Adapted from R. H. Haschemeyer and A. E. V. Haschemeyer, *Proteins* (New York: Wiley, 1974).