

بسمه تعالی

جزوه بیوفیزیک دکتر راحله ترابی

ماکرومولکول: مولکول های بزرگ حیاتی که از طریق ایجاد پیوند کوالان بین مونومرها ایجاد می شوند.

۴ نوع مونومر که ۴ نوع ماکرومولکول را می سازند: اسید آمینه < پروتئین، بازهای نوکلئوتید > اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای چرب < لیپیدها، مونوساکاریدها > کربوهیدرات ها

پروتئینها

پروتئینها: ماکرومولکولهایی که با ایجاد پیوند پپتیدی بین زیر واحدهای اسید آمینه تشکیل شده اند.

نقش های ممکن برای یک پروتئین: کاتالیتیکی مثل آنزیم، ذخیره ای مثل میوگلوبین، تنظیمی مثل هورمون ساختمانی مثل کلاژن، ناقل مثل هموگلوبین، انقباضی مثل اکتین، محافظتی مثل فاکتورهای انعقاد خون

اسیدهای آمینه: تمام اسید های آمینه شامل یک کربن آلفا است که به دو گروه آمینو و کربوکسیل متصل شده است. تفاوت انواع اسیدهای آمینه در گروه جانبی آنها ست. ۲۰ نوع اسید آمینه واحدهای اصلی پروتئین ها هستند.

فراوانی آمینو اسیدها در ساختمان پروتئین ها به دو عامل بستگی دارد: تعداد کدهای ژنتیکی و وزن مولکولی اسید آمینه.

اسیدهای آمینه به تفکیک گروه:

اسید آمینه قطبی شامل: آسپارژین، گلوتامین، سرین، ترئونین.

اسید آمینه دارای بار شامل: لیزین، آرژنین، آسپارات، گلوتامین.

اسیدهای آمینه غیر قطبی شامل: گلیسین، سیستوئین، میتوئین، پرولین.

اسیدهای آمینه آلیفاتیک شامل: آلانین، لوسین، ایزو لوسین، والین.

اسید آمینه آروماتیک شامل: هیستیدین، فنیل آلانین، تیروزین، تریپتوفان

پیوند پپتیدی: یک نوع اتصال است که از واکنش گروه کربوکسیل یک اسید آمینه با گروه آمین اسید آمینه دیگر و همراه با خروج یک مولکول آب است.

باقی مانده (**Residue**): به اسید آمینه شرکت کننده در ساختمان پروتئین باقی مانده می گویند. زیرا ضمن شرکت در پیوند پپتیدی ۱۸ دالتون (یک مولکول آب) از آن جدا می شود.

ساختار اول: توالی اسیدهای آمینه را ساختار اول پروتئین می گویند همان ساختار شیمیایی پروتئین است که از ایجاد پیوند کوالان میان اسیدهای آمینه حاصل می شود به عبارتی نیروی نگهدارنده ساختار اول پروتئین یک نیروی شیمیایی است.

با شکستن این پیوند پروتئین به پپتید اسیدهای آمینه آزاد تبدیل می شود.
ساختار دوم: این ساختار دارای دو شرط اساسی است - 1: منظم باشد و - 2 تکرارپذیر باشد. نیروی نگهدارنده ساختار دوم پیوند هیدروژنی است. شامل مارپیچ آلفا (α Helix) و صفحات بتا (β - sheet).

ساختار سوم:

همان ساختار فضایی پروتئین دارای بخش های بی نظم و تصادفی است که عامل پایدارکننده این بنای فضایی برهم کنش های ضعیف نظیر پیوندهای هیدروژنی و پیوندهای هیدروفوب یا آب گریز، برهم کنش الکتروستاتیک و نیروی وان در والس است. این برهم کنشهای ضعیف کنار یکدیگر قرار گرفته و ساختمان سوم پایداری را ایجاد می کند. معمولا ساختمان فعال پروتئین است.

ساختار چهارم:

معمولا مربوط به پروتئین هایی است که بیش از یک زیرواحد پلی پپتیدی دارند در ساختار چهارم موقعیت هر زیر واحد مشخص است. مثال: هموگلوبین دارای 4 زیرواحد است که هر کدام از این زیرواحدها به تنهایی دارای ساختمان های اول، دوم و سوم می باشد این 4 زیر واحد با بسته های دیگر مرتبط می باشند. نیروی نگهدارنده ساختمان چهارم همان برهم کنش های ضعیف ساختمان سوم است. گاهی پیوند دی سولفیدی در ساختمان چهارم وجود دارد.

نیروهای ضعیف پایدارکننده ماکرومولکول ها

قدرت: وان در والس > هیدروژنی > الکترواستاتیک > کووالان
پیوند الکترواستاتیکی:

همان جاذبه ی کونومی (بین بارهای مثبت و منفی واحد) بین بارهای مخالف موجود در ساختمان است که به آن پل نمکی نیز می گویند. و در پروتئین ها این بارهای مخالف مربوط به اسیدهای آمینه باردار شدت کننده در ساختمان است. مثل اسید آمینه آسپارات که منفی و آرژنین که مثبت است. در شرایط معمولی انرژی پیوند 10 تا 30 kJ/mol است. ولی در شرایط هیدروفوب انرژی پیوندی ممکن است بیشتر از این باشد.

وان در والس: ناشی از جاذبه ی بین دو قطبی های دائمی می باشد انرژی برهم کنش به طور نسبی ضعیف و بین 2 تا 1 kJ/mol می باشد

برهم کنش های هیدروفوب: کنار هم آمدن گروه های مولکول های غیرقطبی یا بخش های غیرقطبی ماکرومولکول در محیط آبی ناشی از برهم کنش هیدروفوب یا آب گریز است تمایل زیاد مولکول زیاد و مولکول آب به یکدیگر سبب می شود که مولکولهای غیرقطبی موجود در محلول را از بین خود رانده و برای حداقل رساندن تماس نامناسب آب و مولکولهای غیرقطبی را مجتمع می نماید لازم به ذکر است مولکول آب در اطراف مولکول های غیرقطبی ساختمان منظمی دارد.

پیوند هیدروژنی: پیوند میان هیدروژن با یکی از اتم های الکترون گاتیو مثل فلور، کلر نیتروژن و اکسیژن می باشد. این پیوند در مقایسه با کووالان ضعیف است قدرت پیوند هیدروژنی در حدود 10 تا 30 kJ/mol است.
در یک پیوند هیدروژنی دور اتم الکترون گاتیو، یکی دهنده هیدروژن دیگری گیرنده هیدروژن است.

اتم الکترونگاتیو متصل به هیدروژن را دهنده هیدروژن و اتم الکترونگاتیو واجد جفت الکترون غیرپیوندی را گیرنده هیدروژن می نامند

قدرت پیوند هیدروژنی یکی به فاصله هیدروژن از اتم گیرنده هیدروژن و دیگری به زاویه بین هیدروژن اتم دهنده با امتداد اتم دهنده و گیرنده هیدروژن بستگی دارد.

پیوند هیدروژنی پیوندی جهت دار است بدین معنا که در شرایط خاصی این پیوند واجد بیشترین استحکام خواهد بود. در شرایطی که اتم های دهنده و گیرنده هیدروژن و اتم هیدروژن، هم راستا باشند. پیوند هیدروژنی دارای بیشترین استحکام و پایداری است.

آب

در ساختار یخ هر مولکول آب با چهار مولکول دیگر پیوند هیدروژنی برقرار می کند و مولکولها در فضا ثابت می باشند. در شرایط مایع، هر مولکول آب به طور متوسط با 3 مولکول دیگر آب پیوند هیدروژنی دارد. علت روان بودن آب: پیوندهای هیدروژنی بین مولکول های آب دارای نیمه عمری بین 10^{-8} و 10^{-9} ثانیه می باشند. و در آب مایع گروه های کوچک مولکول های آب با نیمه عمر کوتاه وجود دارد که به وسیله پیوند هیدروژنی به هم مربوط می شوند. به این شبکه های پویای مولکول های آب که با اتصال هیدروژنی به یکدیگر مربوط اند اصطلاحاً خوشه های متغیر می گویند و آب به صورت خوشه های متغیری است که آرایش موزائیکی اش دائماً در تغییر می باشد و در واقع روانی آب نیز از همین پدیده ناشی می شود.

چنانچه در مولکول بر اثر توزیع نامتقارن الکترون ها، دو انتهای مثبت و منفی ایجاد شود، این مولکول دو قطبی نامیده می شود. مولکول آب نیز دو قطبی بوده و می توان با مولکول های دیگر آب یا پیوندهای دو قطبی دیگر پیوند هیدروژنی برقرار کند

علت عدم تقارن فضایی مولکول آب دو علت است: دو قطبی بودن مولکول آب و هیبریداسیون.

دوقطبی بودن: با وجود اینکه مولکول های آب دارای بار خالص می باشند (در حالت تفکیک نشده) اما توزیع ابر الکترونی بر روی آنها یکنواخت نبوده بلکه پیرامون اتم اکسیژن دارای تراکم بیشتری است در نتیجه اتم اکسیژن بار منفی جزئی و هر کدام از دو اتم هیدروژن بار مثبت جزئی پیدا می کنند.

هیبریداسیون: ۶ الکترون لایه ظرفیت اکسیژن قبل از شرکت در پیوند با هیدروژنها در آخرین سطح انرژی اتم خود ، هیبریداسیون انجام می دهد و به این شکل در می آید $1s^2 2s^2 2p_x^2 2p_y^1 2p_z^1$ که در آخرین سطح آن دو اوربیتال هیبریدی نیمه پر و دو اوربیتال پر وجود دارد که به وسیله نیمه پرها با ۲ اتم H دو پیوند تشکیل می دهد و آب را بوجود می آورد، یعنی آب ساختمان چهار وجهی فضایی دارد. بنابراین زاویه در آن باید $109^\circ 28'$ باشد. اما زاویه مولکول آب کوچکتر است (۱۰۴,۵).

علت کوچکتر بودن زاویه مولکول آب این است که جفت الکترونها غیر پیوندی موجود بر روی اتم اکسیژن که تنها تحت تاثیر جاذبه یک هسته قرار دارند، نسبت به جفت الکترونها پیوندی مولکول آب که تحت تاثیر دو هسته

قرار گرفته‌اند، آزادترند و در اطراف اکسیژن ، فضای بیشتری را اشغال می‌کنند. در نتیجه به هم نیروی دافعه وارد می‌کنند و از هم دور شده و با نزدیک شدن به جفت الکترونها پیوندی به آنها نیروی دافعه وارد نموده، آنها را به هم نزدیکتر می‌سازند و به این وسیله تقارن الکترونی مولکول را به هم می‌زنند و آن را نامتقارن و قطبی می‌سازند. به همین دلیل مولکول آب به صورت یک چهار وجهی فضایی نامتقارن و قطبی است.

خواص فیزیکی و شیمیایی آب: ظرفیت گرمایی بالا، کشش سطحی بالا، گرمای نهان تبخیر بالا، نقطه جوش و ذوب بالا

ظرفیت گرمایی عبارت است از میزان گرمایی که لازم است به یک جسم داده شود تا دمای آن به میزان یک درجه سانتیگراد افزایش یابد.

علت بالاتر بودن ظرفیت گرمایی آب در حالت مایع نسبت به حالت جامد این است که در حالت مایع آب، مولکولها به وسیله‌ی پیوندهای قوی هیدروژنی به یکدیگر متصل هستند. برای سست کردن این پیوندها نیاز به دادن انرژی و گرمای زیادی داریم و در نتیجه ظرفیت گرمایی آب زیاد می‌باشد. اما در یخ، آرایش مولکولها به نحو دیگری است، مولکولهای آب به صورت شش ضلعی‌هایی کنار هم قرار می‌گیرند طوری‌که یک فضای خالی بین این شش ضلعیها به وجود می‌آید. در ضمن هنگام تبدیل آب به یخ یک سری پیوندهای هیدروژنی شکسته می‌شوند تا بتواند آرایش جدید را به خود بگیرد. حال انرژی اندکی برای تخریب این ساختمان مورد نیاز است، در نتیجه ظرفیت گرمایی یخ کمتر از ظرفیت گرمایی آب می‌باشد .

گرمای نهان ذوب: مقدار گرمایی که در فشار ۱ اتمسفر یخ صفر درجه می‌گیرد تا به آب صفر درجه تبدیل شود $\Delta H = +5.9 \text{ kJ/mol}$

گرمای نهان تبخیر: مقدار گرمایی که در فشار ۱ اتمسفر آب می‌گیرد تا بدون تغییر دما، به بخار تبدیل شود $\Delta H = +44 \text{ kJ/mol}$

دو خاصیت قطبیت و بالا بودن ثابت دی الکتریک (ϵ) آب سبب میشود که آب به عنوان مهمترین حلال زیستی برای انواع ترکیبات قطبی، نمکها، ترکیبات آمفی پاتیک و غیرقطبی معرفی شود.

ثابت دی الکتریک عددی است که با توانایی یک ماده برای حمل جریان متناوب نسبت به توانایی خلا برای حمل جریان متناوب مرتبط می‌باشد. توان ایجاد شده بوسیله ی حضور این مستقیماً متناسب با ثابت دی الکتریک ماده می‌باشد.

رابطه کلمب: $F = q_1 q_2 / r^2 \epsilon$. نیروی جاذبه بین دو یون با بار مخالف (F)، q_1 , q_2 بار الکتریکی دو یون، r فاصله دو یون ، ϵ ثابت دی الکتریک محیط. نیروی F جاذبه ی بین کاتیونها و آنیونهایی که در محیطی با ثابت دی الکتریک خاص غوطه ورنند، با ثابت دی الکتریک نسبت عکس دارد. هر چه ثابت دی الکتریک بیشتر باشد، جاذبه ی

آنیونها و کاتیونهای تشکیل دهنده ی ماده ی جامد یونی در آن کمتر بوده، راحت تر از هم جدا شده و در آن حلال راحت تر حل می شوند.

ترکیبات آمفی پاتیک به علت حضور گروههای آب دوست و آبگریز به صورت همزمان به سهولت توسط مولکول های آب پراکنده شده و تولید میسل می کنند. این برهم کنش ها ناشی از رسیدن به حداقل انرژی و افزایش پایداری از لحاظ ترمودینامیکی است.

پروتئین ها که دارای گروههای اسیدی و بازی متعدد هستند را پلی آمفولیت می نامند.

اسید های نوکلئیک در pH فیزیولوژیک فقط بار منفی دارند پلی الکترولیت نامیده می شوند.

به پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک که مولکول های بزرگ با گروههای واجد بار متعدد هستند ابر یون یا ماکرو یون می گویند. هر ابر یون در محلول بوسیله ابری از یون های کوچک با بار مخالف مخلوط می شود باعث کاهش برهمکنش بین ابر یون ها می شود. افزایش قدرت یونی محیط با افزودن نمک به محلول ابر یون باعث افزایش حلالیت آن می شود.

عواملی که بر روی ثابت انحلال پروتئین ها تاثیر دارند pH: قدرت یونی خواص دی الکتریک حلال حرارت.

pH

چگونگی تشکیل یون هیدرونیوم: اتم هیدروژن معمولی دارای یک پروتون، یک الکترون و فاقد نوترون است. در نتیجه یون هیدروژن (H^+) تنها دارای یک پروتون بوده و به همین دلیل به آن پروتون نیز می گویند. به واسطه ی کوچک بودن شعاع یون هیدروژن (H^+)، چگالی بار الکتریکی روی آن بسیار زیاد بوده و این یون از واکنش پذیری بالایی برخوردار است. به همین دلیل در محیط آبی نمی تواند آزاد باشد و بلافاصله جفت الکترون ناپیوندی اکسیژن آب را به صورت داتیو جذب نموده و به شدت آبپوشیده می شود و تبدیل به یون هیدرونیوم (H_3O^+) می گردد.

تعریف pH: چون غلظت یون $[H^+]$ و یا غلظت یون $[OH^-]$ بسیار کم است. (10^{-14} - 0) بیان غلظت های مختلف $[H^+]$ با اعداد توان دار مشکل است. سورنسون در سال ۱۹۰۹ پیشنهاد کرد بجای غلظت ها کولگاریتم (log یا منهای لگاریتم) - (log استفاده شود. و آنرا pH (Puissant de Hydrogen) خواند در نتیجه با تعریف او pH عبارتست از: $pH = -\log [H^+]$

تعریف اسید و باز: نظریه برونشتد (bronshted) اسید ماده ای است که پروتون می دهد و باز ماده ای است که پروتون می گیرد. آمین ها خاصیت پروتون گیرندگی دارند پس باز هستند پس بنابراین NH_3^+ چون پروتون تولید میکند اسید است.

اسید های آمینه هم دارای عامل اسید $-COOH$ و هم عامل قلیا $-NH_2$ - میباشند محلول آنها را آمفولیت گویند یعنی در محیط اسیدی خاصیت اسید و در محیط بازی خاصیت باز دارند.

بافر یا تامپون: محلولهائی که با اضافه نمودن اسید یا باز تغییرات pH آنها ناچیز است که دو حالت دارند.

از یک اسید ضعیف و نمک این اسید با یک باز قوی یا از یک باز ضعیف و نمک این باز با یک اسید قوی

سیستم های تامپونی بدن: ۱- سیستم های بیکربنات ۲ - سیستم فسفات ۳- سیستم G-6-P و ATP در قدرت تامپونی سلول

پروتئین ها با عوامل بازی و اسیدی درمقابل یونهای H^+ و OH^- اضافی قرار گرفته تغییرات pH را مانع می شوند.

دلیل تغییر نکردن pH بافر: در موقع ساختن بافر مشاهده کردیم که چون اسید ضعیف (AH) و نمک این اسید ضعیف (ANa) استفاده میکنند. مقدار A^- بسیار زیاد است. اگر مقداری اسید اضافه کنیم (H^+) با A^- ترکیب شده اسید ضعیف ساخته و یونیزه نمی شود چون یون H^+ در محیط زیاد است پس pH تغییر نمی کند بر عکس اگر مقداری باز بیافزائیم (OH^-) یا (H^+) اسید ضعیف ترکیب شده (AH) و آب تولید میکنند، در اینحالت محیط با آب رقیق شده در اینحالت اسید ضعیف تجزیه شده یون H^+ ایجاد میکند در این صورت باز هم pH ثابت است.

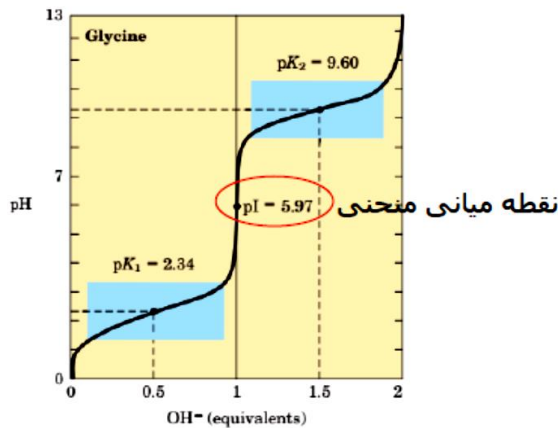
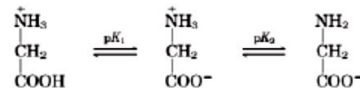
در pH خنثی قدرت پروتون دهنده گی و پروتون گیرندگی مساویند. آن pH را **pH ایزوالکتریک** اسید آمینه نامند. در **PH** ایزوالکتریک بار مثبت و منفی باهم برابر است. یعنی درواقع می توان گفت اسید آمینه فاقد بار الکتریکی است ، به این حالت فرم دیونی گفته می شود. در PH ایزوالکتریک مولکول ها دارای بار خاصی نبوده و هیچ نیروی الکترواستاتیکی وجود ندارد که آنها را از هم دفع کند به همین دلیل مولکول ها میل به تجمع در رسوب دارند ولی با تغییر PH ایزوالکتریک ایجاد بار شده و مولکول های پروتئین همدیگر را دفع می کنند.

چگونگی تعیین pH ایزوالکتریک: محور مختصاتی رسم می کنیم که محور X (افقی) نشان دهنده ی OH^- و محور Y (عمودی) نشان دهنده ی PH است. اسید آمینه را در PH کاملاً اسیدی حل میکنیم؛ اسید آمینه در PH خیلی پایین (اسیدی) به صورت فول پروتون است OH^- ، را به آرامی افزایش می دهیم که منجر به افزایش PH می شود (به سمت قلیایی شدن پیشروی می کند). در جایی علی رغم اینکه اینکه OH^- را بالا می بریم، PH تغییری نمی کند. این عدم تغییر PH در دو نقطه اتفاق می افتد: PH- به جایی می رسد که کربوکسیل پروتون از دست می دهد؛ و از طرفی هم داریم OH^- را افزایش می دهیم، پس PH ثابت می ماند و مقاومت نشان داده می شود. در نقطه ی دوم: در این نقطه NH_3^+ پروتون از دست می دهد. این دو نقطه همان یونهای قبل و بعد از فرم دو یونی است. در این محور به تعداد یونهای قابل یونیزاسیون، پله وجود دارد. برای محاسبه ی PI باید قبل و بعد از فرم دو یونی را

جمع و تقسیم بر ۲ کنید.
$$pI = \frac{1}{2}(pk_1 + pk_2)$$

• نقطه ایزوالکتریک

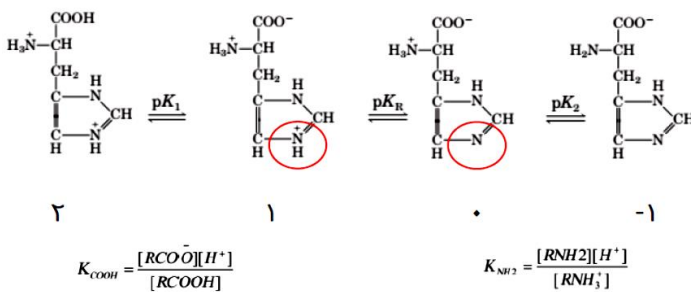
- pH که در آن بار الکتریکی خالص آمینواسید صفر است
- عدم تحرک در میدان الکتریکی



$$pI = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2)$$

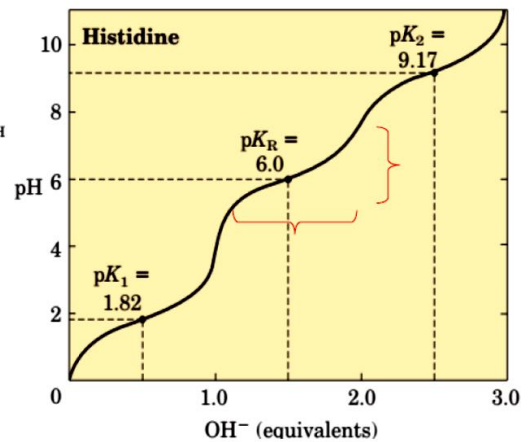
$$\frac{1}{2} (2.34 + 9.60) = 5.97$$

- اسیدهای آمینه باردار منحنی تیتراسیون متفاوت دارند- زنجیره جانبی قابل یونیزاسیون
- اسیدهای آمینه بازی (مثال هیستیدین)



$$P_I = \frac{PK_R + PK_3}{2}$$

$$= \frac{6.6 + 9.17}{2} = 7.58$$

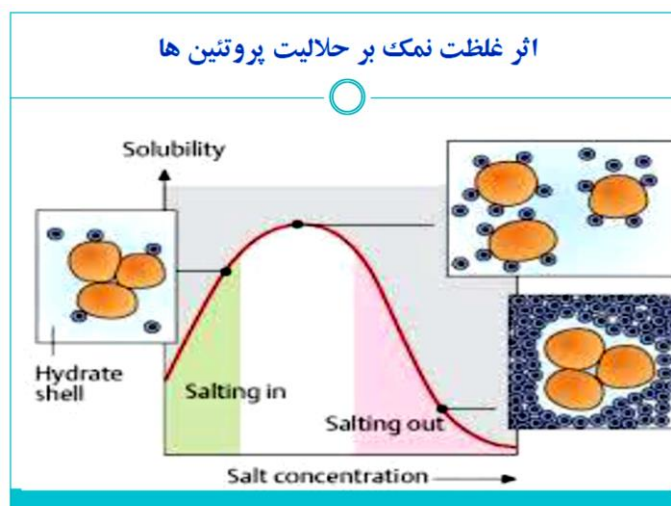


■ تنها اسیدآمینه دارای گروه قابل یونیزه با pKa نزدیک pH خشی

افزایش قدرت یونی محیط با افزودن نمک به محلول ابر یون باعث افزایش حلالیت آن می شود

به پدیده انحلال محلول پروتئینی با افزایش غلظت نمک محلول **Salting in** می گویند. آبپوشیده شدن یونها نقش مهمی در افزایش حلالیت ماکرو یون دارد

اگر غلظت نمک محلول پروتئینی خیلی زیاد شود، مولکولهای آب اطراف گروههای قطبی و باردار سطح پروتئین جدا شده، و آب یونها را احاطه می کند. و پروتئین رسوب می کند. **Salting out** رخ می دهد.



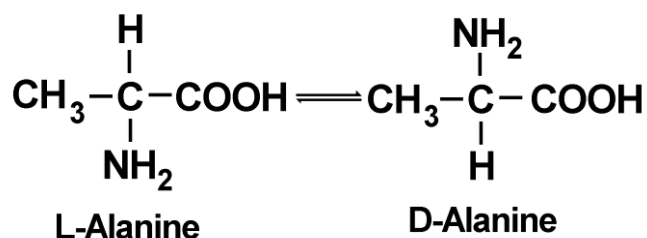
تأحدی با افزایش حرارت می توان انحلال پروتئین را افزایش داد . در دمای بیش از ۵۰ درجه بیشتر پروتئین ها دناتوره می شوند . تمامی پروتئین ها در درجه حرارت های پایین پایدارند.

ساختار پروتئین

در ساختمان اسیدهای آمینه، جزدرگلايسين که دو گروه H یکسان است، کربن آلفا α به چهار گروه اتمی متفاوت متصل شده است به آن اتم کربن، کربن کایرال یا نامتقارن یا انیزوتروپ می گویند. چنین کربنی، فعال نوری نامیده می شود؛ بدین معنی که نورپلاریزه صفحه ای را منحرف می کند. ایزولوسین و ترئونین دارای 2 اتم کربن نامتقارن هستند.

ایزومری در اسیدهای آمینه: دو ایزومر نوری

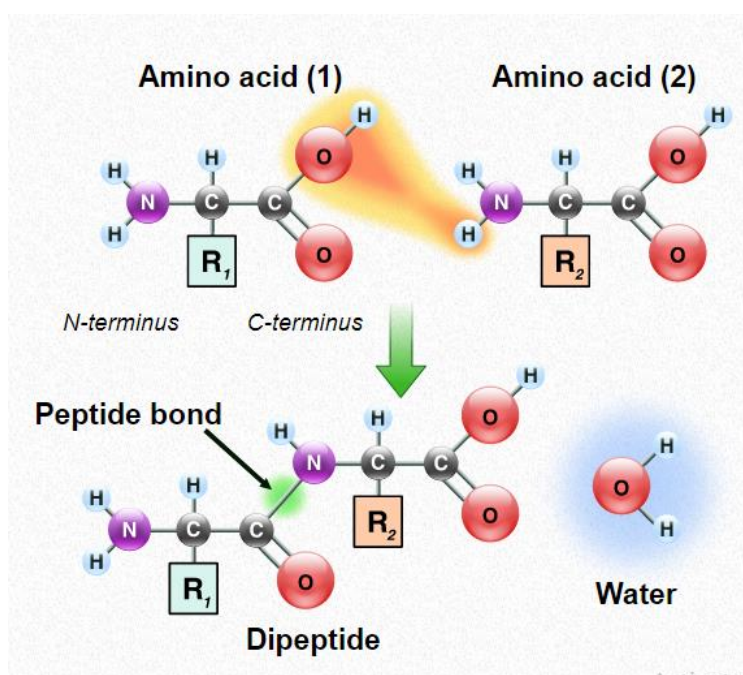
مطابق قرار داد اگر ساختمان فضایی یک اسید آمینه را در نظر بگیریم، چنانچه عامل NH_2 که به کربن آلفا متصل است در طرف چپ باشد، می گوئیم که این اسید آمینه از نوع L است و هرگاه عامل NH_2 در طرف راست کربن آلفا قرار گیرد، گوئیم که این اسید آمینه از نوع D است. برخلاف قندهای طبیعی که از نوع D هستند، اسیدهای آمینه طبیعی همگی از نوع L هستند. این ایزومرهای نوری را ایزومرها را انانتیومر می گویند.



مخلوط راسمیک مخلوطی برابر از آنانتیومرها به مخلوط راسمیک موسوم است. یک مخلوط راسمیک از نظر نوری غیر فعال است. هنگامی که آنانتیومرها بایکدیگر مخلوط شوند، چرخش حاصل از یک مولکول به وسیله چرخش برابر و مخالف آنانتیومر خود خنثی می‌شود.

پیوند پپتیدی

دو مولکول اسید آمینه می‌توانند بطور کووالان از طریق یک پیوند آمیدی یا پیوند پپتیدی به یکدیگر متصل شده و ایجاد یک دی پپتید کنند. این پیوند با برداشت عناصر یک مولکول آب (دهیدراتاسیون) از گروه α -کربوکسیل یک اسید آمینه و α -آمینوی اسید آمینه دیگر ایجاد می‌گردد.



خصوصیات پیوند پپتیدی

۱. بطور جزئی دارای خصوصیات پیوند دوگانه می‌باشد .

۲. نسبتاً قطبی می‌باشد

۳. ایزومری گروه های اطراف آن از نوع ترانس و پا یدار است .

۴. تنها پیوند قبل از اسید آمینه پرولین می تواند سیس یا ترانس باشد زیرا از نظر انرژی پایداری هر دو یکسان است. ولی نسبت ترانس به سیس ۴ به ۱ دیده می شود

۵. آنزیم سیس-ترانس پرولیل ایزومراز باعث تسهیل تبدیل فوق می شود .

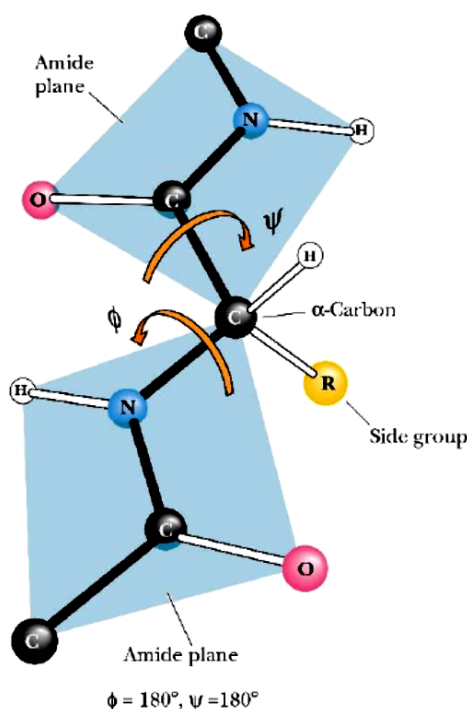
۶. پیوند پپتیدی خواص حدواسط پیوند یگانه و دوگانه را داراست (بدلیل هیبرید رزونانس)

هر چند متوسط وزن مولکولی ۲۰ اسید آمینه معمول در حدود ۱۳۸ می باشد، اسیدهای آمینه کوچکتر در پروتئین ها فراوانتر هستند؛ در صورتیکه نسبت وجود اسیدهای آمینه مختلف را در پروتئین ها در نظر بگیریم آنگاه وزن مولکولی متوسط به ۱۲۸ نزدیک می گردد. از آنجایی که برای ایجاد هر پیوند پپتیدی، یک مولکول آب (وزن مولکولی برابر ۱۸) برداشت می شود، وزن مولکولی متوسط یک ریشه اسید آمینه موجود در پروتئین ها برابر ۱۱۰ خواهد بود. با تقسم وزن مولکولی بر ۱۱۰ می توان تعداد حدودی ریشه های اسید آمینه موجود در یک پروتئین ساده فاقد گروه شیمیایی دیگر را محاسبه نمود.

$$N = \frac{Da \text{ وزن مولکولی}}{110}$$

✓ یافته‌های پاولینگ و کوری

اساس مباحث تاخوردگی به مطالعات لینوس پاولینگ و همکارش رابرت کوری از انستیتو تکنولوژی کالیفرنیا بر می گردد. آنها در یافتند که:



۱- کربن های ریشه های آمینواسیدی مجاور توسط سه پیوند کوالان با نظم $C\alpha-C-N-C\alpha$ از هم جدا می شوند.

۲- مطالعات با اشعه X نشان داد که پیوند C-N پپتیدی کمی کوتاهتر از پیوند C-N موجود در یک آمین ساده است و اتم های موجود در یک پیوند پپتیدی در یک صفحه آمیدی قرار دارند. عبارتی یک رزونانس اشتراک نسبی دو جفت الکترون بین اکسیژن کربونیل و نیتروژن آمیدی وجود دارد.

۳- از یک $C\alpha$ تا $C\alpha$ دیگر ۶ اتم گروه پپتید طوری (در یک صفحه) قرار می گیرند که اتم کربونیل نسبت به هیدروژن آمیدی در موقعیت ترانس می باشند.

□ پیوندهای پپتیدی C-N به علت داشتن خصوصیت نسبی پیوند دوگانه چرخش آزادانه ندارند. ولی چرخشی که حول $C\alpha-C$ و $N-C\alpha$ وجود دارد در حالت پلیمری نقطه مشترکی برای چرخش حول $C\alpha$ بین صفحات متوالی پپتیدی ایجاد می کند.

به زاویه ای که حول نیتروژن و کربن آلفا است اصطلاحاً ϕ گفته می شود.

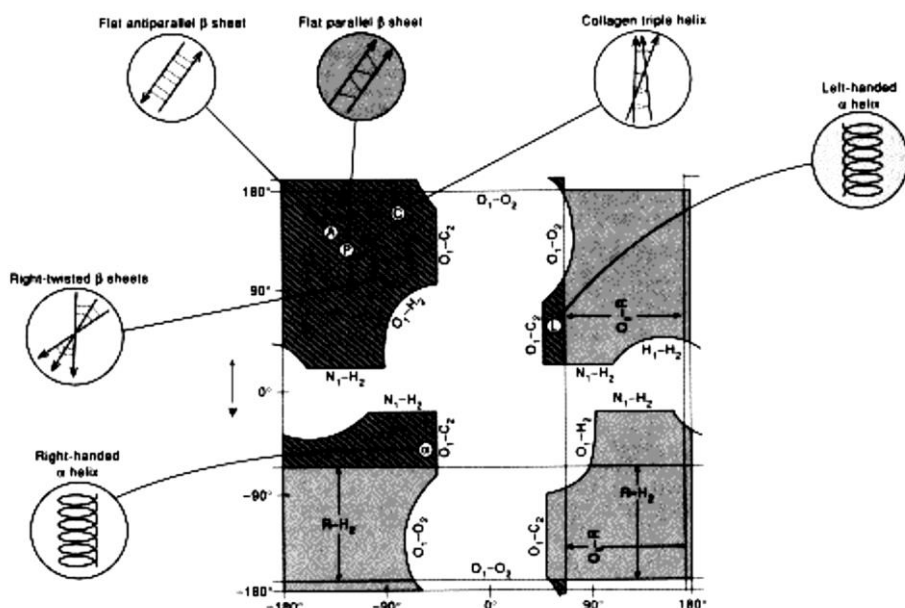
به زاویه ای که حول پیوند کربن آلفا و کربن کربونیل است اصطلاحاً سای (ψ) گفته می شود.

به زاویه ای که حول پیوند پپتیدی است اصطلاحاً امگا (ω) گفته می شود. اتصال بین اتم کربن گروه کربونیل و اتم نیتروژن گروه پپتیدی ($-NH-CO-$) دارای خاصیت پیوندهای دوگانه است و آزادی چرخش در اطراف این پیوند وجود ندارد.

نمودار رامانچاندرا: زاویه ی بین ψ و ϕ روی شکل فضایی تاثیر می گذارد. اینکه ψ و ϕ چقدر است، به ممانعت فضایی بستگی دارد که گروه R ایجاد می کند؛ و در نهایت این زاویه ها هستند که باعث تشکیل ساختار دوم می شوند. هر گاه محور X ها با ϕ محور Y ها با ψ مشخص شود و مقادیر آنها در هر کدام از اسیدهای آمینه شرکت کننده در ساختار پروتئین ها را مشخص کنیم، نقشه ای ایجاد می شود که بنام نقشه ساختمان فضایی یا نمودار رامانچاندرا معروف است. عبارتی هر اسید آمینه ای مجموعه از مقادیر این دو زاویه را به خود اختصاص می دهد و هیچ دو اسید آمینه ای نقشه دقیقاً یکسانی ندارند و مثل اثر انگشت در انسان خاص همان اسید آمینه هستند!

☑ نمودار رامچاندرا:

حال که زاوای Φ و Ψ بازه گسترده ای دارند، این سوال مطرح می شود کدام مقادیر از این زاوایا در پروتئین ها مجاز (Allowed) است یعنی عملاً مشاهده می شود؟ و کدام مقادیر از این زاوایا در پروتئین ها غیرمجاز (Forbidden) نیست؟ و اصلاً چرا برخی زاوایا مجاز و برخی غیرمجاز هستند؟



☐ رامچاندرا مقادیر مجاز هر دو زاویه Φ و Ψ را بصورت گرافیکی به نمایش در آورد که به افتخار نام او آن نمودار رامچاندرا می گویند. در زاوای مجاز، اتم ها و گروه های شیمیایی موجود حداقل همپوشانی فضایی را دارند اما در زاوای غیرمجاز، بدلیل همپوشانی فضایی، دافعه و در نتیجه ناپایداری را برای آنها بدنبال دارد از اینرو این زاوایا مطلوب نیستند.

☐ با نقشه رامچاندرا می توان محدوده زاوایی که در آن ساختمان های مجاز دوم

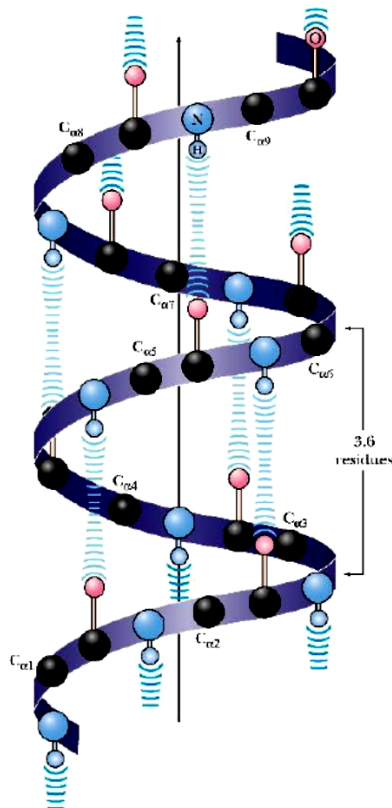
پروتئین تشکیل می شوند را نیز مشخص نمود که البته این ساختارها در ادامه به تفصیل بررسی خواهند شد.

۲- ساختمان های دوم (Secondary structure)

ساختمان های دوم به نظم های موضعی گفته می شود که پروتئین در حین تاشدگی به کمک پیوندهای هیدروژنی به خود می گیرد. بدین صورت که ریشه i با ریشه $i+n$ پیوند هیدروژنی برقرار می کند. پس می توان گفت که ساختمان دوم در واقع ارتباط ساختمان اول با خودش است. نظم پذیری، پایداری و تکرار سه ویژگی اساسی ساختمان های دوم است. همانطور که گفتیم ساختمان دوم پروتئین ها خود به چند دسته تقسیم می شود:

۱-۲- مارپیچ ها (Helix). هرگاه اتم هیدروژن متصل به نیتروژن ریشه آمینواسیدی (i) با اتم اکسیژن متصل به کربونیل ریشه آمینواسیدی ($i+n$) در سمت انتهای آمین پیوند هیدروژنی تشکیل دهد، رشته پپتیدی حول یک محور فرضی پیچیده و به شکل یک مارپیچ در می آید. این پیچش می تواند بصورت راست گردان یا چپ گردان باشد. اینکه ریشه چندم با چندمین ریشه بعد از خودش پیوند هیدروژنی تشکیل دهد انواع مارپیچ ایجاد می شود که فراوانترین و مهمترین مارپیچ موجود در پروتئین ها مارپیچ آلفا است. چون در این نوع مارپیچ از پیوندهای هیدروژنی درونی بطور مطلوب استفاده می شود. لذا ابتدا به تشریح این مارپیچ می پردازیم سپس اشارتی هم بر سایر مارپیچ ها خواهیم داشت.

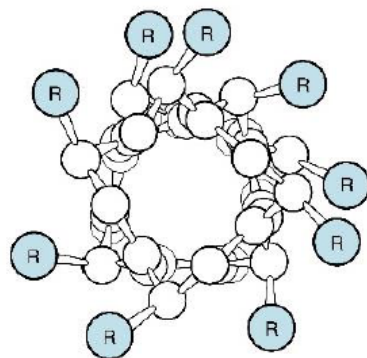
-ساختار مارپیچ آلفا (α -Helix) آلفا هلیکس:



□ **مارپیچ آلفا (α -helix).** در این مارپیچ، اولین آمینواسید (i) با آمینواسید پنجم یعنی چهار ریشه بعد از خودش ($i+4$) پیوند هیدروژنی برقرار می کند. تمام پیوندهای پپتیدی موجود در مارپیچ α در تشکیل چنین پیوندهای هیدروژنی شرکت می کنند به استثناء ۴ ریشه موجود در هر انتهای مارپیچ.

- ریشه های آمینواسیدی در این مارپیچ دارای کنفورماسیون هایی با Ψ برابر -45° تا -50° و Φ برابر -60° می باشند.

- در هر دور از این مارپیچ، ۳/۶ ریشه وجود دارد که در مجموع ۱۳ اتم در هر حلقه ای که این ۳/۶ ریشه در اثر پیوند هیدروژنی ایجاد می کنند حضور دارند از اینرو به مارپیچ آلفا، مارپیچ ۳/۶_{۱۳} نیز گفته می شود.



- چرخش مارپیچ α در تمام پروتئین ها راست گردان بوده و مارپیچ چپ گردان در پروتئین ها مشاهده نشده است.

- در این ساختمان اسکلت پلی پپتیدی حول یک محور فرضی به طور محکم پیچیده شده و گروه های جانبی R ریشه های اسید آمینه به سمت خارج اسکلت قرار گرفته اند.

- طول واحد تکراری یک چرخش مارپیچ α حدود $5/4 \text{ \AA}$ در طول محور طولی می باشد.

□ عواملی که بر پایداری مارپیچ آلفا تاثیر می گذارند عبارتند از:

۱- دفع (یا جذب) الکترواستاتیک بین ریشه‌های آمینواسیدی متوالی دارای گروه‌های R باردار

اگر زنجیره‌های جانبی ریشه‌های آمینواسیدی متوالی دارای بار الکتروستاتیکی یکسان باشند یقیناً موجب ناپایداری ساختمان مارپیچ آلفا می شوند اما اگر دارای بار الکتروستاتیکی غیریکسان باشند یقیناً موجب پایداری ساختمان مارپیچ آلفا می شوند.

۲- حجم گروه‌های R مجاور

هر چه زنجیره‌های جانبی دو ریشه که کنار یکدیگر قرار می گیرند بزرگ باشند در اثر همپوشانی فضایی و بدنبال آن دافعه، موجب ناپایداری مارپیچ می شوند اما اگر زنجیره‌های جانبی دو ریشه مذکور کوچک باشند دافعه کمتری داشته و به پایداری مارپیچ کمک می کنند.

۳- واکنش‌های متقابل بین زنجیره‌های جانبی (R) اسیدهای آمینه‌ای که به فاصله ۳ یا ۴ ریشه از یکدیگر فاصله دارند

از آنجاییکه بین زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها در چرخش یک مارپیچ α در فاصله ۳ (و گاهی ۴) ریشه‌ای آن آمینواسیدها برهمکنش‌های متقابل مهمی صورت می گیرد لذا زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها می توانند سبب پایداری یا ناپایداری ساختمان مارپیچ آلفا شوند.

بطور مثال، دو آمینواسید دارای بار مثبت و منفی که به فاصله ۳ ریشه‌ای از هم قرار می گیرند می توانند یک جفت آیون-کاتیونی ایجاد کنند که خود موجب پایداری ساختمان مارپیچ آلفا می شود. یا اینکه دو آمینواسید آروماتیک که به فاصله ۳ ریشه‌ای از هم قرار می گیرند می توانند واکنش متقابل آبگریز و اندروالس که خود موجب پایداری ساختمان مارپیچ آلفا می شود.

۴- وجود ریشه‌های Gly و Pro

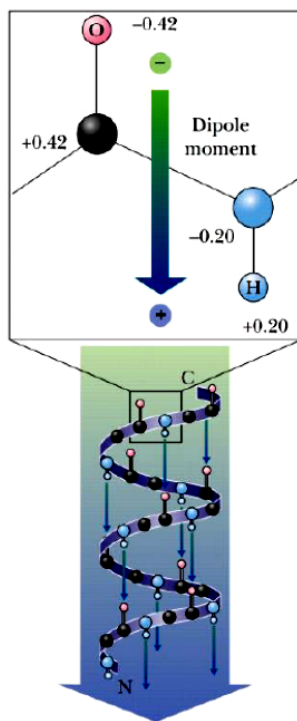
پرولین به دو علت موجب ناپایداری مارپیچ آلفا می شود. اول اینکه Pro با غیر ممکن کردن چرخش حول پیوند N-C α (به یاد دارید که اتم نیتروژن قسمتی از یک حلقه است) منجر به ایجاد یک خمیدگی در مارپیچ آلفا و در نتیجه ناپایداری آن می شود. دوم اینکه، اتم N ریشه ی Pro موجود در اتصال پپتیدی فاقد هیدروژن برای برقراری پیوند هیدروژنی است. لذا Pro بندرت در مارپیچ آلفا قرار می گیرد.

گلیسین نیز به دو علت اثر منفی بر پایداری مارپیچ آلفا دارد. اول اینکه گلیسین دارای انعطاف پذیری کنفورماسیونی بیشتری نسبت به سایر آمینواسیدها می باشد و در نتیجه ناپایداری آن می شود. دوم اینکه، پلیمر گلیسین تمایل به ایجاد ساختمان‌های فتری متفاوت از مارپیچ آلفا دارد. بنا به دلایل ذکر شده، پرولین و در درجه بعد گلیسین آمینواسیدهایی هستند که کمتر از سایر آمینواسیدها در مارپیچ آلفا شرکت می کنند. در حالیکه گلوتامات اسید آمینه‌ای است که بیشتر از سایر آمینواسیدها در مارپیچ آلفا شرکت می کند.

مطالعات دقیق پلی آمینواسیدها (پلیمرهایی که در آن تمام آمینواسیدهای سازنده آن یکسان هستند) نشان داده اند که آمینواسیدها خاص تمایل دارند که مارپیچ آلفا تشکیل دهند، در حالی که دیگر آمینواسیدها احتمال کمتری دارد که مارپیچ آلفا تشکیل دهند. به عنوان مثال، پلی آلانین و پلی لوسین به آسانی ساختارهای مارپیچ آلفا تشکیل می دهند. در مقابل، پلی آسپارتیک اسید و پلی گلوتامیک اسید، که در pH ۷ بار منفی بسیاری دارند به دلیل دافعه بار قوی بین گروه های R در طول زنجیره پپتیدی، تنها ساختارهای تصادفی را تشکیل می دهند.

با این حال، در pH ۱/۵-۲/۵ که در آن زنجیره‌های جانبی پروتونه و در نتیجه بدون بار هستند، گونه‌های اخیر می توانند به صورت خودبخودی ساختارهای مارپیچ آلفا تشکیل دهند. در روشی مشابه، پلی لیزین در مقادیر pH کمتر از ۱۱، که در آن دافعه بارهای مثبت از تشکیل مارپیچ ممانعت می کند، یک پیچک تصادفی تشکیل می دهد. در pH ۱۲، که در آن یک زنجیره پپتیدی پلی لیزینی خنثی است، به راحتی مارپیچ آلفا تشکیل می دهد.

۵- واکنش متقابل بین ریشه‌های آمینواسیدی موجود در دو انتهای قطعه مارپیچی و دو قطبی ذاتی



دقت کنید در هر پیوند پپتیدی دو قطبی کوچکی ایجاد می شود که از طریق پیوندهای هیدروژنی مارپیچ به یکدیگر اتصال داشته و منجر به ایجاد یک دو قطبی خالص و به سمت پایین مارپیچ شده که طول مارپیچ را افزایش می دهد. در نتیجه بارهای نسبی مثبت بر روی انتهای آمینو و بارهای نسبی منفی بر روی انتهای کربوکسیل مارپیچ قرار می گیرد. به همین دلیل است که مشاهده می شود آمینواسیدهای با بار منفی، بیشتر در نزدیکی انتهای آمینو مارپیچ و آمینواسیدهای با بار مثبت بیشتر در نزدیکی انتهای کربوکسیل مارپیچ قرار می گیرند. این امر باعث ایجاد واکنش متقابل پایدار کننده می شود. از اینرو وجود یک اسید آمینه با بار مثبت در انتهای آمینو و یا با بار منفی در انتهای کربوکسیل باعث ناپایداری مارپیچ می گردد.

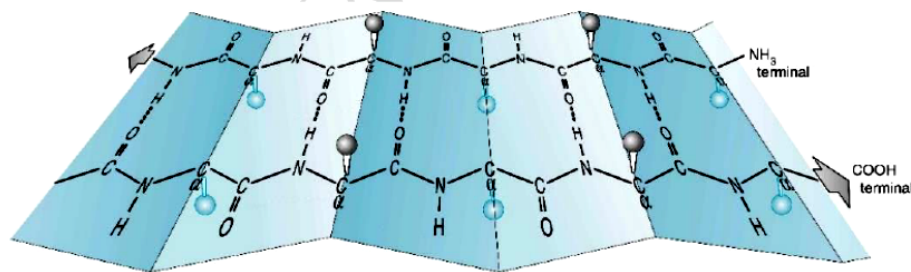
با بررسی ۵ عاملی که بر پایداری مارپیچ آلفا تاثیر می گذارند می توان به این نتیجه رسید که تمامی پلی پپتیدها قادر به ایجاد مارپیچ آلفای پایدار نمی باشند. لذا حیث المجموع توالی آمینواسیدی (نوع ریشه ها و وضعیتشان نسبت به یکدیگر) بر پایداری مارپیچ پایداری آترا تعیین می کند. البته عوامل محیطی مانند pH را نیز نایستی نادیده گرفت. بطور مثال، پلیمرهای Arg-Lys در pHهای بسیار بالا و Asp-Glu در pHهای بسیار پایین مارپیچ تشکیل می دهند.

□ سایر مارپیچ های موجود در پروتئین ها

۱- مارپیچ 3_{10} (3_{10} -helix). در این مارپیچ راست گردان، اولین آمینواسید (i) با آمینواسید چهارم یعنی سه ریشه بعد از خودش ($i+3$) پیوند هیدروژنی برقرار می کند. در هر دور از این مارپیچ، ۳ ریشه وجود دارد که در مجموع ۱۰ اتم در هر حلقه ای که این ۳ ریشه در اثر پیوند هیدروژنی ایجاد می کنند حضور دارند از اینرو به آن مارپیچ 3_{10} گفته می شود.

۲- مارپیچ π (π -helix). در این مارپیچ راست گردان، اولین آمینواسید (i) با آمینواسید ششم یعنی پنج ریشه بعد از خودش ($i+5$) پیوند هیدروژنی برقرار می کند. در هر دور از این مارپیچ، ۴/۴ ریشه وجود دارد که در مجموع ۱۶ اتم در هر حلقه ای که این ۴/۴ ریشه در اثر پیوند هیدروژنی ایجاد می کنند حضور دارند از اینرو به مارپیچ π ، مارپیچ ۴/۴ نیز گفته می شود.

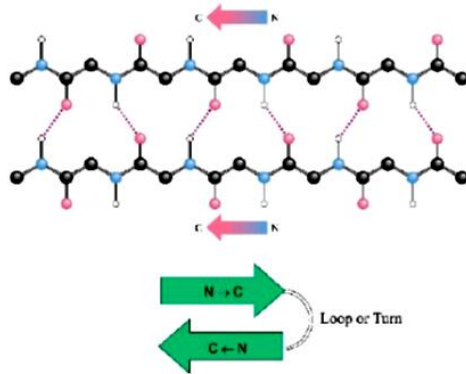
۲-۲- صفحه های پلیسه ای بتا (β sheets)



□ تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین قطعات مجاور زنجیره پلی پپتید موجب ایجاد صفحه زیگزاکی می شود که چون پس از مارپیچ α کشف شد به آن صفحه پلیسه ای (زیگزاکی) β گفته می شود. در

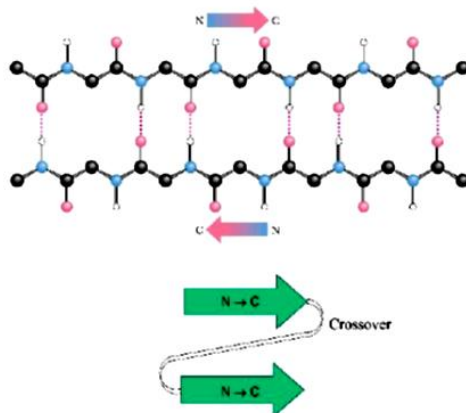
این صفحات، گروه های R در جهت های مخالف در دو سطح بالا و پایین صفحه پلیسه ای خارج شده و یک الگوی متناوب ایجاد می کنند.

□ انواع کنفورماسیون β



الف- ناهمسو: زنجیره‌ها دارای جهت آمینو به کربوکسیل هستند که توسط یک قوس (Loop) یا پیچ (Turn) به یکدیگر متصل می‌شوند.

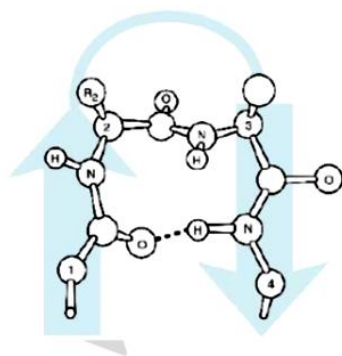
ب- همسو: زنجیره‌ها دارای جهت آمینو به کربوکسیل یکسان هستند که توسط یک اتصال متقاطع (Crossover) به یکدیگر متصل می‌شوند.



- دوره تکراری در همسو $(6/5 \text{ \AA})$ کوتاه‌تر از ناهمسو $(7 \text{ \AA})$ بوده و این دو الگوهای پیوندهای هیدروژنی متفاوتی دارند. بطوریکه پیوندهای هیدروژنی موجود در صفحه β همسو نسبت به صفحه β ناهمسو زاویه داشته لذا پیوندهای ضعیفتری دارد. در نتیجه صفحه β ناهمسو پایدارتر از همسو است.

□ وقتی قرار باشد دو یا چند صفحه β در نزدیکی هم در داخل یک پروتئین قرار بگیرند گروههای R ریشه‌های آمینواسیدی موجود در سطوح تماسی می‌بایست نسبتاً کوچک باشند. به همین دلیل والین آمینواسیدی است که بیشتر از سایر آمینوسیدها در صفحه‌های β شرکت می‌کند. لذا اینکه β -کراتین‌ها نظیر فیروئین ابریشم و فیروئین تارهای عنکبوت بسیار غنی از Gly و Ala می‌باشند به این دلیل است که این دو آمینوسید دارای کوچکترین R هستند که به صورت یک در میان در توالی‌های بزرگی قرار می‌گیرند.

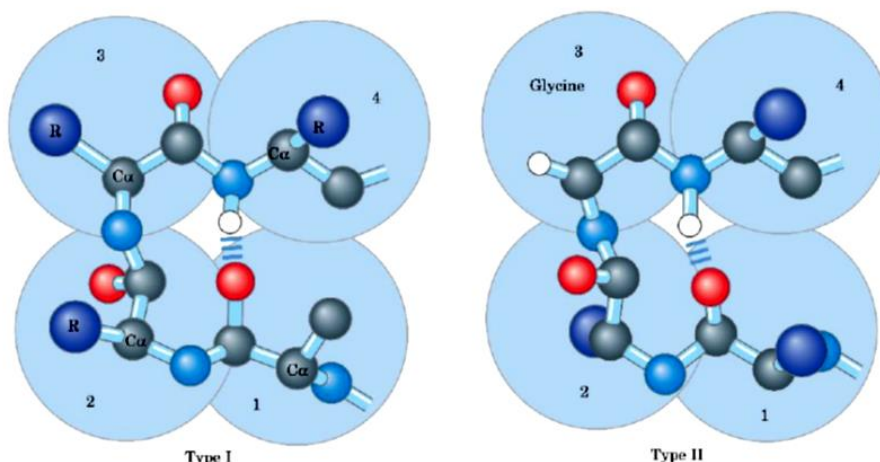
۳-۲- انواع پیچ‌ها (Turns)



۱- پیچ بتا (β -turn) یا پیچ سخت یا خمیدگی β : این نوع پیچ عمدتاً در صفحات β موجود در سطح پروتئین مشاهده شده و دو انتهای دو قطعه مجاور یک صفحه موازی و ناهمسوی β را به یکدیگر متصل می‌کند. این نوع پیچ که دارای یک ساختار 180° می‌باشد عمدتاً از چهار ریشه اسیدآمینو با زنجیره‌های جانبی کوچک مانند Gly، Pro و Ala تشکیل شده است که در آن اکسیژن کربونیل ریشه اسیدآمینو اول با هیدروژن گروه آمینو ریشه اسید آمینو چهارم (i با $i+3$) پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند. در حالیکه ریشه‌های دوم و سوم با یکدیگر پیوند هیدروژنی برقرار نمی‌کنند اما می‌توانند با محیط آبی اطراف پروتئین پیوند هیدروژنی برقرار نمایند.

□ آمینوسیدهای Gly (به دلیل کوچکی و انعطاف‌پذیری) و Pro (به دلیل اینکه پیوندهای پپتیدی حاوی نیتروژن ایمینوپرولین بسادگی کونفیگوراسیون سیس را انتخاب نموده و چون این کونفیگوراسیون برای چرخش سریع مناسب است) دو ریشه آمینواسیدی هستند که به وفور در پیچ‌های β دیده می‌شوند. برعکس، این دو ریشه در مارپیچ α دیده نمی‌شود. توجه این امر این است که این دو ریشه موجب ایجاد فشارهایی می‌شوند که ساختمان‌های مختلف دوم را ناپایدار می‌سازد.

در حدود ده تپ پیچ بتا مختلف (I', II', III, III', IV, V, VI و VII) وجود دارد. این تپ ها بر اساس اختلاف در زوایای Ψ و Φ و معیارهای دیگر تعریف می شوند. در ادامه، ما دو کلاس رایج (با فراوانی بالا) را برایتان تشریح می نمایم.



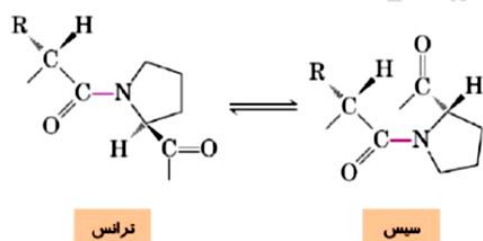
الف- پیچ بتا تیپ I. در این نوع پیچ، چهار ریشه آمینواسید مختلف می توانند در این ساختار شرکت کنند و عموماً گلوسین ریشه سوم می باشد. در این نوع پیچ، پرولین مجاز به قرار گرفتن در موقعیت $i+2$ نیست بلکه در موقعیت $i+1$ قرار می گیرد. زوایای دئیدرال این نوع پیچ بصورت $\Phi_1 = 0^\circ$, $\Phi_2 = -90^\circ$, $\Psi_2 = -30^\circ$, $\Psi_3 = -60^\circ$ می باشد.

ب- پیچ بتا تیپ II. در این نوع پیچ، همیشه Gly به عنوان ریشه سوم وجود دارد. زوایای دئیدرال این نوع پیچ بصورت $\Phi_1 = 0^\circ$, $\Phi_2 = +90^\circ$, $\Psi_2 = 120^\circ$, $\Psi_3 = -60^\circ$ می باشد.

همانطور که از زوایای دئیدرال بالا و مقایسه دو تصویر زیر مشاهده می فرمایید یکی دیگر از تفاوت های بین پیچ بتا نوع I و نوع II در Ψ_2 و Φ_3 شان می باشد.

فراوانی پیچ بتا تیپ I دو تا سه برابر تیپ II است.

گلوسین و در درجه بعد پرولین اسید آمینه هایی هستند که بیشتر از سایر اسید آمینه ها در پیچ β شرکت می کنند.



در پیوند پپتیدی و انواع پپتیدها اشاره شد که تقریباً ۹۹/۹٪ از پیوندهای پپتیدی، اکسیژن کربنیل و هیدروژن متصل به نیتروژن نسبت به یکدیگر در حالت کونفیگوراسیون ترانس قرار می گیرند. اما در ۶٪ از پیوندهای پپتیدی X-پرولین که عمدتاً هم در پیچ های بتا مشاهده می شود، کونفیگوراسیون سیس ایجاد

می شود. چون کونفیگوراسیون سیس قدرت چرخش سریعی دارد. واکنش تبدیل این دو کونفیگوراسیون به یکدیگر توسط آنزیم پرولیل سیس-ترانس ایزومراز (PPI) کاتالیز می گردد.

۲- پیچ گاما (γ -turn): در این نوع پیچ، سه ریشه اسید آمینه مختلف می توانند در این ساختار شرکت کنند که در آن اکسیژن کربونیل ریشه اسید آمینه اول با هیدروژن گروه آمینی ریشه اسید آمینه سوم ($i+2$ با $i+1$) پیوند هیدروژنی برقرار می کند.

۳- پیچ آلفا (α -turn): در این نوع پیچ، پنج ریشه اسید آمینه مختلف می توانند در این ساختار شرکت کنند که در آن اکسیژن کربونیل ریشه اسید آمینه اول با هیدروژن گروه آمینی ریشه اسید آمینه پنجم ($i+4$ با $i+1$) پیوند هیدروژنی برقرار می کند.

۴- پیچ پای (π -turn): در این نوع پیچ، شش ریشه اسید آمینه مختلف می توانند در این ساختار شرکت کنند که در آن اکسیژن کربونیل ریشه اسید آمینه اول با هیدروژن گروه آمینی ریشه اسید آمینه ششم (i با i+5) پیوند هیدروژنی برقرار می کند.

□ مرسوم است که در تمام ساختمان های پروتئینی، بخش هایی از زنجیره پلی پپتیدی که نمی توانند همانند مارپیچ α و صفحه های β به عنوان ساختمان دوم تعریف شوند، فنر (Coil) یا فنر تصادفی (Random coil) نامیده می شوند. هر دو این اصطلاحات گمراه کننده هستند. چون هر طور در نظر بگیریم، بسیاری از این بخش ها نه پیچش هستند و نه تصادفی بلکه این ساختارها کوچک تر از آن هستند که همانند ساختمان های دوم بسیار سازمان یافته و پایدار باشند. از اینرو آنها را جزء ساختمان های دوم بحساب نمی آورند.

۳- ساختمان سوم (Tertiary structure)

ساختمان سوم به حالت سه بعدی که پپتید بعد از تاخوردگی به خود می گیرد گفته می شود که گاهی به آن ساختمان کروی نیز گفته می شود. عبارت دیگر در ساختمان سوم، ریشه های آمینواسیدی که در ساختمان های اول و دوم از هم دور بودند پس از تاخوردگی در کنار یکدیگر قرار می گیرند. علاوه بر پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای دی سولفیدی، یونی و هیدروفوبی نیز در شکل گیری این ساختمان نقش مهمی دارند. □ پروتئین هایی که از یک زنجیره (پلی) پپتیدی تشکیل شده اند نهایتاً به ساختمان سوم می رسند.

□ ساختمان های فوق دوم یا موتیف (Motif) یا پیچ خوردگی واقعی

فرض کنید ما جاده ها، خیابان ها، کوچه ها و ساختمان ها هر کدام یک نوع ساختمان دوم باشند. خوب، حالا تعدادی از اینها را با نظم و رابطه کنار هم بچینید. آنگاه شما یک شهرک خواهید داشت. حال، هرگاه چند ساختمان دوم را نظم بخصوصی در کنار هم متصل کنیم شبیه همان شهرک می شود که با آن موتیف گفته می شود. پس موتیف، آرایش بخصوص پایدار عناصر متعدد ساختمان دوم و اتصالات بین آنها را بیان می کند.

□ بهمین صورت، منطقه هایی که خود از چند شهرک تشکیل شده اند، در مجموع یک کلان شهر بزرگ را می سازند و هر منطقه به نوعی است که می تواند بعنوان یک شهر کوچک و حتی مستقل نیز عمل کند. حال، پلی پپتیدهایی که بیش از چند صد ریشه آمینواسید دارند به دو یا چند منطقه کروی پایدار مستقل، تا (folde) می شوند که به هر منطقه کروی یک دومن (Domain) گفته می شود. مانند تروپونین C که دارای ۲ دومن می باشد.

◀ گاهی، دومن ها پس از جدا شدن از پروتئین نیز می توانند ماهیت سه بعدی خود را حفظ کنند.

◀ دومن های یک پروتئین عملکردهای مجزایی دارند مانند اتصال به مولکول های کوچک یا برهمکنش با پروتئین های دیگر.

◀ پروتئین های کوچک معمولاً یک دومن دارند یعنی دومن، خود پروتئین است.

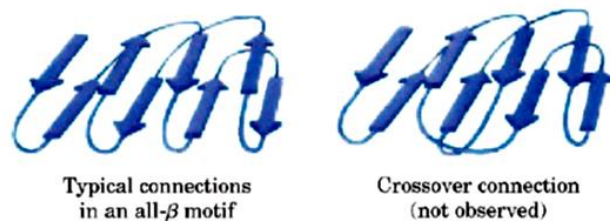
□ برای اینکه چند ساختمان دوم کنار هم قرار بگیرند پلی پپتیدها قطعاً باید خمیدگی و پیچ و تاب هایی را متحمل شوند که تحت تاثیر مجموعه ای از فشارهای شیمیایی و فیزیکی است. نمونه ای از قوانین پیچ خوردگی مهمی که برای توصیف برخی موتیف های ساده بکار می روند در زیر آمده است:



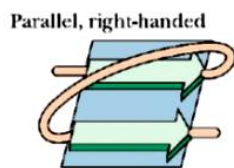
۱- برهمکنش های آبگریز. این برهمکنش ها سهم عمده ای در پایداری پروتئین ها دارند. بدین صورت که تدفین زنجیره R ریشه ها جهت دوری از محیط آبی به دو لایه از ساختمان های دوم نیاز دارد. دو موتیف ساده قوس β - α - β loop و گوشه α - α corner می توانند این دو لایه را ایجاد می کنند.

۲- برهمکنش بین مارپیچ های α و زنجیره های β . مواقعی که مارپیچ های α و زنجیره های β در کنار یکدیگر قرار می گیرند عموماً لایه های ساختاری متفاوتی دارند. دلیل این امر این است که ستون یک بخش پلی پپتیدی از کنفورماسیون β نمی تواند با مارپیچ α یی که در کنار آن قرار گرفته است به راحتی پیوند هیدروژنی برقرار کند.

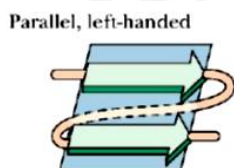
۳- فشردده شدن. بخش هایی از پلی پپتید که در ساختمان اول نزدیک یکدیگر قرار دارند، در ساختمان پیچ خورده در کنار یکدیگر فشرده می شوند. گرچه بخش هایی از پلی پپتید که در ساختمان اول دورتر از یکدیگر هستند می توانند در ساختمان پیچ خورده در کنار یکدیگر قرار بگیرند اما برای وقوع این امر الزامی وجود ندارد.



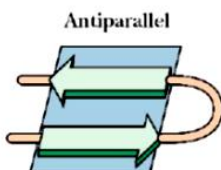
۴- عدم ایجاد تقاطع یا گره. اتصالات بین عناصر ساختمان دوم نمی تواند تقاطع یا گره ایجاد نماید. مانند اتصالات نوعی که در یک موتیف همه β مشاهده می شود.



Parallel, right-handed



Parallel, left-handed



Antiparallel

۵- پیچ راست گرد برای کنفورماسیون β پایدار. زمانی که دو صفحه β موازی توسط یک رشته متقاطع (رابط) به یکدیگر متصل می شوند این تقاطع اکثراً بصورت راست گرد بوده و بندرت بصورت چپ گرد مشاهده می شود. چون اتصالات راست گرد کوتاهتر از نوع چپ گرد بوده و با زوایای کوتاهتری خم می شوند که این امر تشکیل آنها را تسهیل می کند.



β Barrel



Twisted β sheet

همچنین، زمانی که چندین قطعه از صفحات β در کنار هم قرار می گیرند، پیچش هر صفحه β منجر به پیچش مشخص کل ساختار تشکیل شده می گردد. دو نمونه از ساختار منتجه، بشکه β (β Barrel) و صفحه β (Twisted β sheet) پیچ خورده هستند که هسته اصلی بسیاری از ساختارهای بزرگتر را می سازند.

Folding

منظور از Folding، تاخوردگی پروتئین و بدست آوردن شکل نهایی و سه بعدی و فضایی است.

حداقل 75 رزیدو برای آغاز فرایند فولدینگ پروتئین ها ضروری است.

پارادوکس لوینتال: در هنگام فولد شدن پروتئین رمان کافی برتی امتحان تمام کانفورماسیون های احتمالی وجود ندارد. برای یک زنجیره پلی پپتیدی به طول ۱۰۰ اسیدآمینه میلیاردها سال زمان می برد. پس مسیر هدفدار و خاصی برای مسیر تاخوردگی پروتئین وجود دارد.

1. در هنگام فولد شدن یک پروتئین زمان کافی برای امتحان کردن همه کانفورماسیون های احتمالی ندارد.

2. پروتئین ۱۰۰ اسیدآمینه را تصور کنید و برای هر اسیدآمینه دو کانفورماسیون تصور کنید بنابراین 2^{100} یعنی

1.27×10^{30} احتمال وجود دارد. هر گاه برای هر کانفورماسیون 10^{-13} ثانیه زمان لازم باشد زمان لازم برای بدست

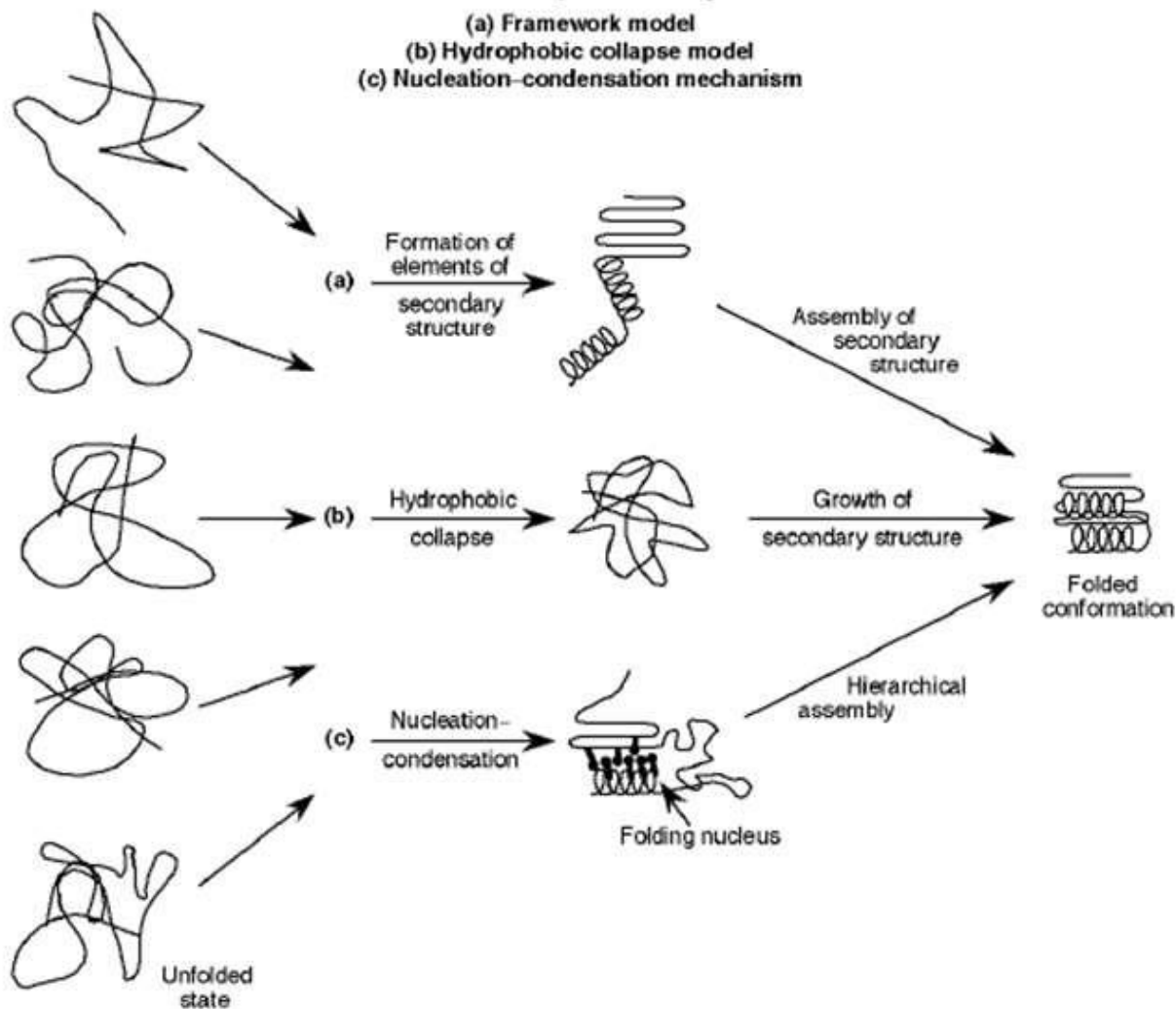
آوردن فولد صحیح:

$$(10^{-13} \text{ sec}) (1.27 \times 10^{30}) = 1.27 \times 10^{17} \text{ sec} = 4 \times 10^9 \text{ years}$$

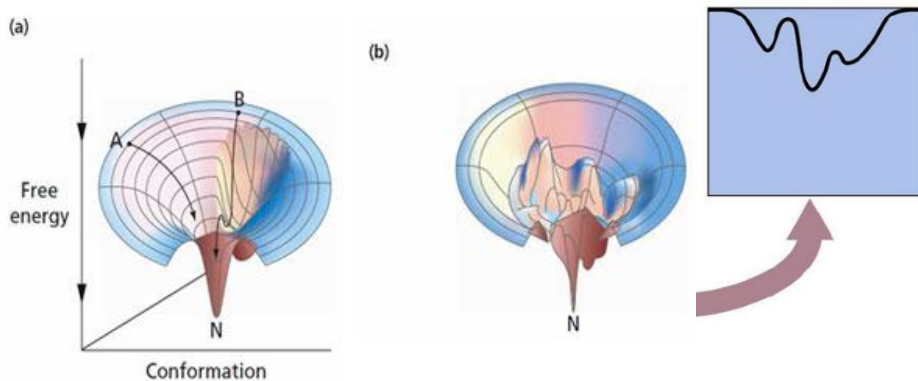
3. بنابراین مسیر هدفدار و خاصی برای فولد شدن صحیح پروتئین نیاز است که توسط مولکول های خاصی بنام چاپرون

محقق می شود.

انواع الگوی فولدینگ: الگوی چهارچوب (Frame Work)، الگوی سقوط هیدروفولیک (Hydrophobic Collapse). الگوی هسته زایی تجمع (Nucleation Condensation)

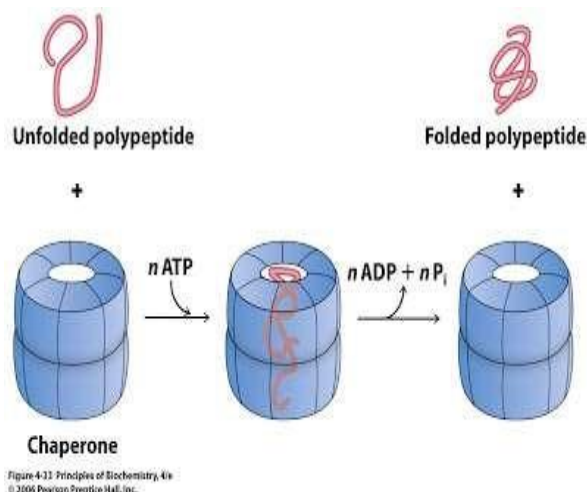


قیف انرژی: مسیر تا شدن پروتئین از حالت تا نشده به طبیعی را می توان مشابه حرکت از بالا به پایین در سطح یک قیف ناهموار تصور کرد. شکل طبیعی یک پروتئین، از نظر ترمودینامیکی پایدارترین حالت برای آن می باشد. هر پروتئین تمایل دارد از حالتی ناپایدارتر به حالتی پایدارتر تغییر کنند. به این ترتیب، مسیر تا شدن یک پروتئین از حالت تا نشده به حالت طبیعی، مشابه مسیری از لبه یک قیف به سمت درون آن است. این مسیر ممکن است به طور کامل سراسیب باشد، ولی ممکن است در مناطقی از این قیف نیز چاله هایی (کمینه های نسبی سطح انرژی) وجود داشته باشد.



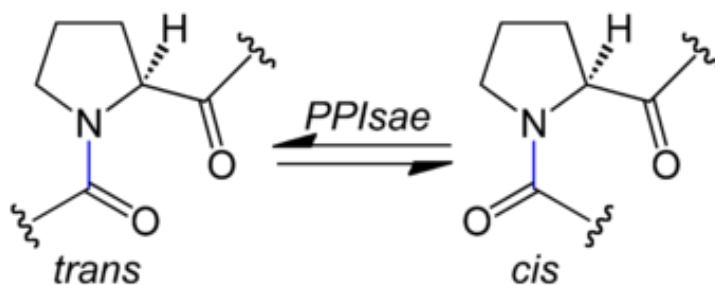
عوامل هدایت Folding: ۱- چپرون ها ۲- پروتئین دی سولفید ایزومراز: (PDI)، ۳- پرولیل سیس ترانس ایزومراز، ۴- پروتئین های شوک حرارتی

چاپرون ها خود پروتئین های کوچکی هستند که از همان ابتدا که پروتئین ساخته می شود یک اتصالات ضعیفی با پروتئین دارند تا از folding آن جلوگیری کند تا زمانی که همه ی پروتئین به طور کامل سنتز شود و از اتصالات غلط جلوگیری می کنند. عملکرد: کمک در فولدینگ پروتئین، جلوگیری از aggregation



پروتئین دی سولفید ایزومراز: پیوندهای دی سولفیدی که به شکل غلط شکل گرفته اند را می شکنند و سبب تشکیل پیوندهای دی سولفیدی صحیح می شود.

پرولیل سیس ترانس ایزومراز: پیوندهای پپتیدی بین اسیدآمینوهای مختلف به صورت ترانس سنتز می شود. اما در یک موقعیت خاص مانند turn ها لازم است پیوند پپتیدی بین اسیدآمینو پرولین و اسید آمینو ماقبلش توسط این آنزیم به حالت سیس تبدیل شود تا پروتئین بتواند شکل صحیح فضایی خود را بدست آورد.



پروتئین های شوک حرارتی که تحت شرایط استرس زا به خصوص افزایش دمای محیط در درون سلول افزایش می یابند، اغلب دارای خاصیت ATPase اند.

پروتئین های فاقد فولدینگ به عنوان پروتئین های غیر عملکردی و یا بد عملکرد عمل می کنند که ممکن است منجر به ایجاد بیماری شوند مثال آمیلوئیدها در بیماری آلزایمر: آمیلوئید پروتئینی غنی از آلفا هلیکس در حالت طبیعی در سلول های مغزی. در بیماری آلزایمر تبدیل به حالت غنی از صفحات بتا : تجمع درسلول ها و رسوب

عوامل از دست دادن فولدینگ پروتئین ها: عدم وجود عوامل حمایت کننده، عدم پروتئین چاپرون ، تغییر در دما ، تغییر در pH

تخریب پروتئین های غیرطبیعی: در حالت طبیعی، پروتئین های غیر طبیعی یا فاقد فولدینگ از طریق مسیر یوبی کوئتین پروتئازوم تخریب می شوند. مسیر: افزوده شدن تعداد زیادی از یوبی کوئتین به صورت کووالان به پروتئین هدف توسط سه آنزیم با مصرف ATP به عنوان نشان تجزیه پروتئازومی یک پروتئین سیتوپلاسمی

دنا تورا سیون

دنا تورا سیون : تغییر ماهیت یا تغییر در حالت طبیعی (Native) ساختمان پروتئین، دنا تورا سیون نامیده میشود. ممکن است برگشت پذیر (Reversible) یا برگشت ناپذیر (Irreversible) باشد.

برگشت پذیر: به هم ریختگی ساختمان ۲ و ۳ و احیاناً ۴ پروتئین (مثل قرار گیری در محلول اسید رقیق مانند اسید معده)

برگشت ناپذیر: به هم ریختگی ساختمان اول پروتئین (مثل قرار گیری در محلول اسید HCl ۶ مولار)

اثرات دنا تورا سیون پروتئین ها: (۱) کاهش حلالیت، (۲) افزایش حساسیت پروتئین به عمل آنزیمها، (۳) کاهش فعالیت بیولوژیک پروتئینها، (۴) افزایش ویسکوزیته ذاتی پروتئینها، (۵) افزایش فعالیت نوری، (۶) کاهش کریستالیزاسیون پروتئین ها

ترکیبات دنا توره کننده: دترجنت ها ، اوره، حلال های آلی، DTT و مرکاپتواتانول، اسید فرمیک و اسید پرفرمیک شوینده ها = سورفکتانت = دترجنت ها Detergents: بخش هیدروکربنی این ترکیبات ضمن ایجاد برهم کنش با بخش های هیدروفوب پروتئین ها باعث تضعیف و تداخل این برهم کنش ها شده و در نتیجه ساختمان سوم پروتئین ها را دچار تغییر خواهد کرد.

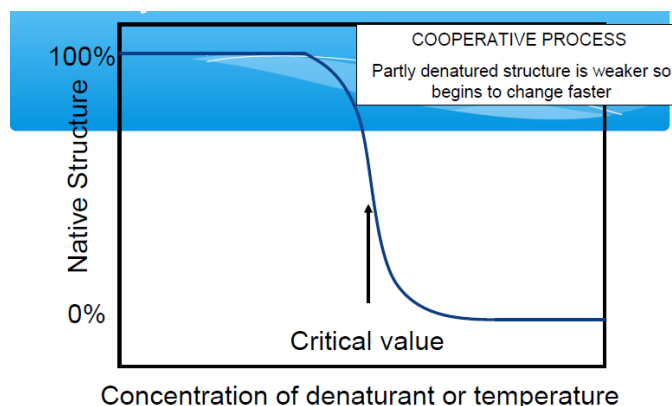
اوره (۱ مولار): باعث شکستن پیوندهای هیدروژنی و احتمالاً میانکشی های هیدروفوبیک می شود.

حلال های آلی مانند اتانل و اتیلن گلیکول: باعث ایجاد پیوند هیدروژنی با ریشه های قطبی زنجیره جانبی در سطح پروتئین هاست

DTT و مرکاپتواتانول: باعث شکست برگشت پذیر پیوندهای دی سولفیدی می شوند.

اسید فرمیک و اسید پرفرمیک: باعث شکست برگشت ناپذیر پیوندهای دی سولفیدی می شوند.

فرآیند تعاونی در دناتوراسیون: تغییر ناپیوسته و تدریجی در فرآیند دناتوراسیون، حالت سیگموئیدی نمودار



دمای ذوب (Melting Point): دما در نقطه میانی نمودار دناتوراسیون حرارتی، دمایی که در آن نیمی از مولکول ها دناتوره شده اند.

نمک های مختلف تاثیر متفاوتی بر دمای ذوب دارند : برخی پایدارکننده و باعث افزایش دمای ذوب و برخی ناپایدار کننده و کاهنده دمای ذوب

دناتوراسیون پروتئین: دناتوراسیون بر اثر سرما

دناتوراسیون pH: دناتوراسیون در اثر تغییرات pH: تغییر pH منجر به یونیزاسیون زنجیره های جانبی اسید آمینه، تغییر پل های نمکی و پیوند های هیدروژنی و نهایتاً تغییر ساختار پروتئین می شود.

تعیین توالی و نوع اسیدهای آمینه در پپتیدها: از طریق هیدرولیز پیوندهای توسط اسید ، باز یا آنزیم

هیدرولیز اسیدی: هیدرولیز کامل پروتئین ها در حضور اسیدهای قوی. معایب: تخریب اسیدهای آمینه ای مثل Trp ، Thr ، Ser و یا تبدیل اسیدهای آمینه مثل Gln و Asn به Glu و Asp

هیدرولیز بازی یا قلیایی: با جوشاندن در محیط NaOH غلیظ انجام می شود. هیدرولیز قلیایی فقط برای شناسایی اسید آمینه تریپتوفان انجام می گیرد که در هیدرولیز اسیدی ناپایدار است. معایب: تجزیه اسیدهای آمینه سرین، ترئونین، آرژنین و سیستئین راسمیزاسیون اسیدهای آمینه ها (تبدیل دو ایزومر D و L به همدیگر)

هیدرولیز آنزیمی: در داخل سلول هیدرولیز پیوند پپتیدی به وسیله گروه خاصی از آنزیم ها به نام پپتیدازها (peptidases صورت می گیرد که به عناوین (proteinase و یا پروتئیناز (protease پروتئاز نیز شناخته می شوند.

هیدرولیز آنزیمی نسبت به هیدرولیز اسیدی آهسته تر صورت می گیرد.

پپتیدازها به دو صورت وجود دارند: اگزوپپتیدازها **Exopeptidases** و اندوپپتیدازها **Endopeptidases**

اگزوپپتیدازها که باعث هیدرولیز اسیدهای آمینه انتهایی شده و به دو گروه تقسیم می شوند : **Amino****peptidases** آمینوپپتیدازها و **Carboxypeptidases** کربوکسی پپتیدازها.

اندوپپتیدازها پیوندهای پپتیدی را در داخل یک زنجیر پلی پپتیدی هیدرولیز می کنند.

میکروسکوپ

بررسی و کشف قوانین فیزیکی حاکم بر عالم حیات مستلزم تفکیک عناصر در ساختمان سلول به عنوان کوچکترین و اساسی ترین واحد حیات است.

از آنجا که چشم قادر به دیدن اجسام با ابعاد کمتر از 0.1 میلی متر نمی باشد و اندازه بیشتر سلول ها کتر از 0.1 میلی متر است، بنابراین این اجسام از طریق میکروسکوپ قابل مشاهده اند. رابرت هوک اولین مشاهده کننده ساختار سلول است.

میکروسکوپ نوری

یک میکروسکوپ نوری معمولی شامل:

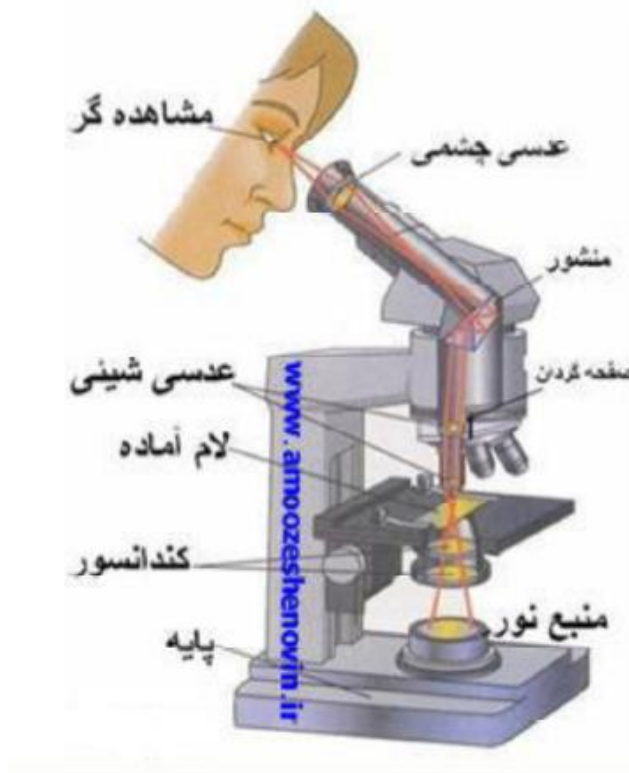
منبع تولیدکننده نور

کندانسور برای متمرکز ساختن نور

نگه دارنده نمونه

عدسی شیئی (objective) برای متمرکز کردن تصویر

عدسی چشمی (ocular) برای تصویر کردن نمونه روی چشم یا فیلم عکاسی



عدسی شیئی یا ابژکتیو:

مهمترین بخش میکروسکوپ است که از تعدادی عدسی تشکیل شده است. تعداد این عدسی ها ۴، ۸ و گاه ۱۶ عدد است که پشت سر هم قرار گرفته و با هم ترکیب شده اند. عمل کلی ابژکتیو تشکیل اولین تصویر از جسم است. این تصویر بزرگتر از جسم، معکوس و حقیقی است.

عدسی چشمی یا اکولار:

از تعدادی عدسی محدب یا دوکوژ ساخته شده است در مجموع کار زره بین را انجام می دهد. اکولر از تصویر ایجاد شده به وسیله ابژکتیو تصویری مجازی مستقیم و بزرگتر درست می کند. درشت نمایی: نسبت اندازه تصویر به اندازه جسم را درشت نمایی هر سیستم نوری می گویند. برای میکروسکوپ سه نوع درشت نمایی وجود دارد:

- حاصلضرب درشتنمایی ابژکتیو در اکولر و لوله میکروسکوپ

$$GM = G_{ob} \times G_{oc} \times G_T$$

درشتنمایی تجارتي

- حاصلضرب شماره مدخل (NA) ابژکتیو در هزار

$$GM = NA \times 1000$$

درشتنمایی مفید

- تقسیم عدد ۲۵۰ میلیمتر فاصله رویت واضح با چشم به فاصله کانونی

$$GM = \frac{250mm}{fobmm}$$

درشتنمایی مخصوص

شماره مدخل (NA) یا زاویه گشودگی یا میزان کارایی ابژکتیو (Numerical aperatue)

$$NA = n \sin \alpha$$

n: ضریب شکست محیط واقع بین جسم و ابژکتیو

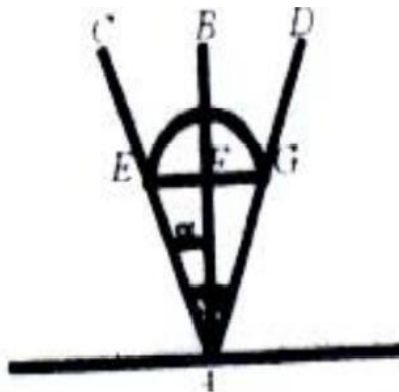
α : نیم زاویه مخروط روشنایی که با قطر عدسی ابژکتیو نسبت مستقیم دارد.

درشت نمایی با فاصله ابژکتیو با جسم رابطه عکس دارد.

هرچه درشت نمایی بیشتر شود. فاصله ابژکتیو با جسم کمتر می شود. مخروط کوتاه می گردد و 2α به 180°

درجه نزدیکتر می گردد اما هرگز در رویت واضح ابژکتیو با جسم مماس نمی گردد.

حداکثر ممکن $NA = 1.6$ است.



قدرت تفکیک: (Resolution) کوچکترین فاصله قابل تشخیص بین دو نقطه واقع بر یک سطح را که به وسیله

یک سیستم نوری قابل رویت باشد.

هرچه مقدار عددی توان تفکیک کمتر باشد، قدرت تشخیص بالاتر است.

برای تعیین توان تفکیک از معادله آبه استفاده می کنند:

$$d = \Sigma = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{0.61\lambda}{NA}$$

d : توان تفکیک عدد 0.61 مقدار ثابت محاسبه شده و λ طول موج نور به کار گرفته شده برای کم کردن مقدار d دو راه وجود دارد:

کاهش طول موج یعنی از طول موج های کوتاه تر استفاده شود.

بزرگ کردن NA که میزان تغییرات آن محدود و نزدیک به $1/6 - 0.9$ است.

عملاراه اصلی برای بهتر کردن توان تفکیک استفاده از طول موج های کوتاهتر است.

مقایسه درشت نمایی و قدرت تفکیک در میکروسکوپ های نوری و الکترونی:

قدرت تفکیک در هردو رابطه مستقیمی با طول موج نور با پرتو الکترونی دارد که به جسم تابیده می شود.

توان تفکیک در میکروسکوپ نوری : 2000 انگستروم

توان تفکیک در میکروسکوپ الکترونی 5 انگستروم است

10^{-10} متر

میزان درشت نمایی در میکروسکوپ نوری حداکثر 3000 برابر است.

در میکروسکوپ الکترونی 1000000 برابر است.

مزیت میکروسکوپ الکترونی به میکروسکوپ نوری

- بزرگنمایی بالاتر
- قدرت تفکیک بسیار عالی
- میدان دید بالا

میکروسکوپ الکترونی

در سال 1924 دبر گلی به کوتاه بودن طول موج پرتوهای الکترونی پی برد.

بکسال بعد شخصی به نام بوض به این ضیه دست یافت که ی میدان مغناطیسی مناسب پرتوهای الکترونی را در کانون متمرکز می کند.

از اینجا بود که اولین ذهنیت ایجاد میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت.

در سال 1931 میکروسکوپ الکترونی توسط روسکا و نول ساخته شد.

اجزا و چگونگی عملکرد میکروسکوپ الکترونی از رابطه زیر به دست می آید:

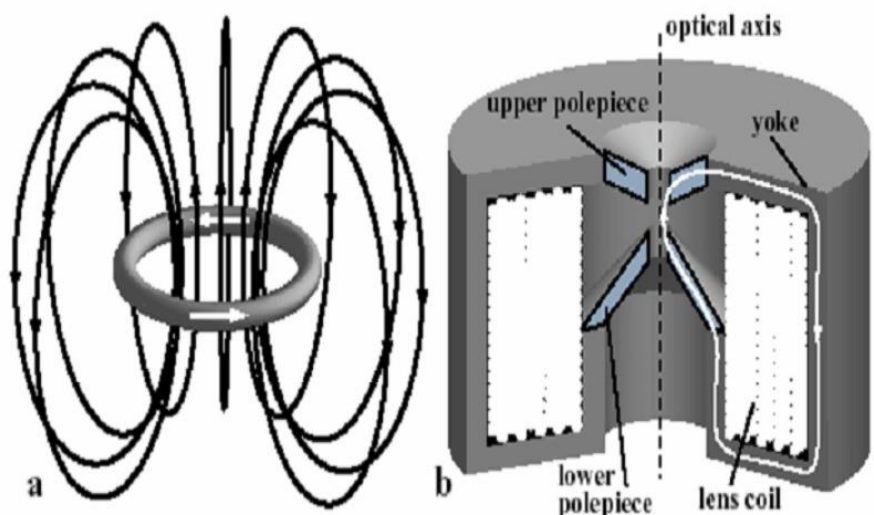
$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

h ضریب پلانک $۱۰^{-۳۴} \times ۱۵$ ژول بر ثانیه

V سرعت الکترونها $۱۰^۶ \times ۱۵$ متر بر ثانیه

m جرم الکترون ددر سرعت **v** برابر با $۱۰^{-۳۷} \times ۱/۰۵$

λ برابر می شود با $۰/۰۴$ آنگستروم



a) schematic representation of the magnetic field lines around a circular current carrying coil; b) a magnetic yoke concentrates the field lines near the center of the coil and provides a particular geometry to the field.

نگه دارنده نمونه یک حفاظ سیمی است که گرید نامیده می شود.

به جای عدسی شیشه ای عدسی های الکترو مغناطیسی وجود دارند. که شامل پوشش آهنی هستند که درون شان سیم پیچ های مسی وجود دارد.

برای داشتن درشت نمایی بالا عدسی هایی با فاصله کانونی کم نیاز است.

از درون سیم پیچ های مسی جریان الکتریکی عبور می کند.

با تغییر جریان می توان فاصله کانونی را کاهش داد.

تفنگ الکترونی

کاتد: یک رشته تنگستن داغ با عمل انتشار

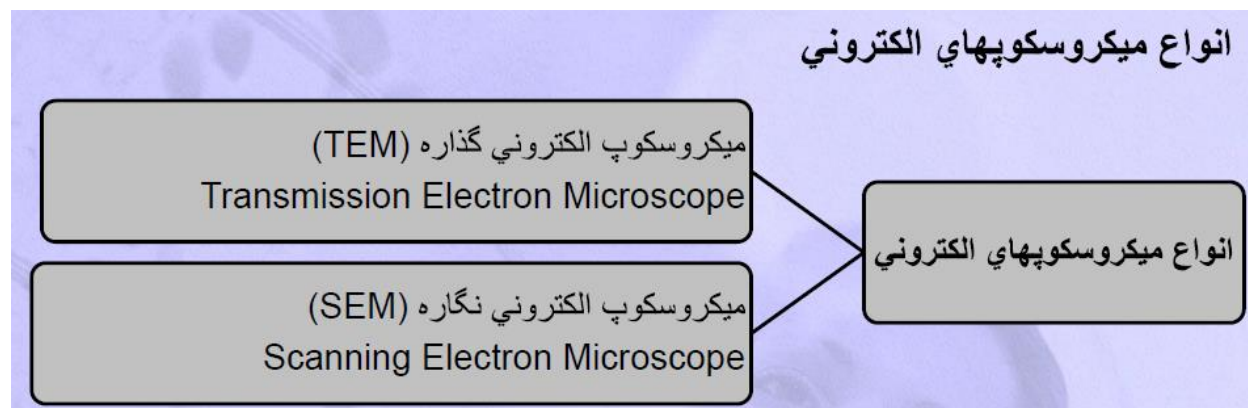
آند : دارای پتانسیل بیشتر از کاتد برای جذب الکترون ها به طرف خود و دارای منفذی کوچک برای عبور الکترون ها

نکته نمونه ها بایستی نازک باشند

ضخامت مواد ارگانیک باید کمتر از ۱۰۰۰ آنگستروم باشد.

چون هنگام برخورد الکترون ها به نمونه انحرافی ایجاد می شود که ضخامت مقطع باعث تشدید این پراکندگی می شود. پراکندگی الکترون ها تشکیل تصویر را مختل می کند.

مشکل اساسی میکروسکوپ الکترونی " به علت قرار گرفتن نمونه ها در خلا نمی توان سلول زنده را مطالعه کرد.



اساس کار هر دو آنها مبنی بر پرتاب الکترون به سمت نمونه است.
در نوع گذاره:

تصویر به واسطه عبور الکترون ها از نمونه تشکیل می شود.

اغلب برای مطالعه ساختارهای داخل سلولی مورد استفاده قرار می گیرد.
در نوع نگاره:

تصویر توسط بازتابش الکترون ها از سطح نمونه تشکیل می شود.

اغلب برای مطالعه سطوح سلول ها و موجودات زنده و مشاهده تصویر سه بعدی سطح نمونه ها به کار می رود.
میکروسکوپ الکترون گذاره

در مقابل کاتد، آند آغشته به املاح پتاسیم به صورت صفحه بشقاب مانند قرار دارد.

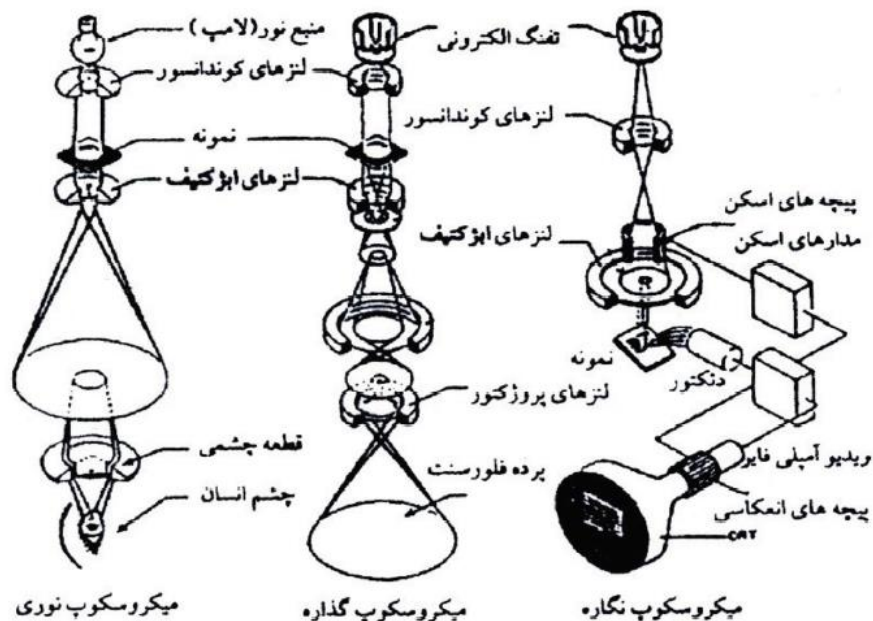
بین کاتد و آند اختلاف پتانسیلی بین ۵۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ ولت برقرار می شود.

با این اختلاف پتانسیل، الکترون ها با شتاب از کاتد به سمت آند شلیک می شود.

الکترون ها از سوراخ آند که در حکم دیافراگم بوده و قابل تنظیم می باشد عبور می کند.

دسته الکترون ها مقابل کندانسور میرسند.

در برخورد دسته الکترونی با نمونه، بخشی از الکترون ها پراش یافته برخی از نمونه می گذرند که الکترون های گذارنده نامیده می شود.



شکل ۱-۱ مقایسه مسیر نوری و الکترونی در میکروسکوپ های نوری، TEM و SEM

الکترون ها پس از عبور از عدسی های الکترومغناطیسی به نام ابژکتیو و پروژکتور، روی یک صفحه از جنس پلاتین . سیانور باریم یا سولفید روی می تابند و آن را از حالت فلوئورسانس در آورده و به این ترتیب از جسم تصویر قابل رویت می دهند.

توان تفکیک میکروسکوپ الکترونی گذاره ۲-۴ آنگستروم است.

با میکروسکوپ گذاره، می توان به درشتنمایی هایی تا ۵۰۰۰۰۰ برابر دست یافت.

یکی از مسایل عنده در کشاهده نمونه ها تهیه برشهای بسیار نازک است.

این کار طولانی و پرهزینه بوده و نیاز به دقت زیادی دارد.

میکروسکوپ الکترونی نگاره

پس از میکروسکوپ الکترونی گذاره ساخته شد.

تفاوت اساسی آن با میکروسکوپ گذاره:

در میکروسکوپ نگاره به جای الکترون های گذرنده از جسم، در تشکیل تصویر از الکترون های پراش یافته از سطح جسم و نیز الکترون هایی که در اثرتابشدسته الکترون های اولیه و تحریک سطح نمونه، از سطح نمونه رها و پرتاب می شود ، به نام الکترون های ثانویه نامیده می شوند، استفاده می گردد.

تصویر در گذاره بر روی صفحه فلوئورسانس تشکیل می شود در حالی که در میکروسکوپ نگاره تصویر بر روی صفحه تلویزین تشکیل می شود.

نگاره با اختلاف پتانسیل کمتری کار می کند.

توان تفکیک آن ۱۵-۳۰ انگستروم است.

الکترون های ثانویه و الکترون های پراش یافته به وسیله دتکتور جذب می شود و ایجاد نور یا فوتون می کنند. انرژی نورانی تبدیل به جریان الکتریکی می شود که به وسیله تقویت کننده (آمپلی فایر) تقویت و سپس وارد یک یا دو لامپ تلویزیونی یا لامپ اشعه کاتدی شده و تصویر نهایی را می سازد. اطلاعاتی که میکروسکوپ های SEM در اختیار می گذارد:

- اطلاعات توپوگرافی نمونه: خصوصیات سطوح
- مورفولوژی: شکل، اندازه و نحوه قرارگیری ذرات در سطح جسم
- ترکیب اجزایی که نمونه را می سازند.



تئوری جذب نور توسط ماده (مولکول ها)

موج الکترومغناطیس موجی مرکب عرضی شامل یک موج الکتریکی و یک موج مغناطیسی که ارتعاش آنها در جهت عمود بر هم دیگر است.

این امواج جزء امواج با شکل سینوسی می باشند که دارای خصوصیات مشابه زیر هستند:

دامنه: فاصله قله موج تا خط مبدا است.

سرعت موج: مقدار آن در خلاء برابر مقدار زیر است $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$. (سرعت امواج الکترومغناطیس در یک محیط معین همیشه ثابت است)

طول موج: Wavelength λ : فاصله بین دو تکرار مشابه در هر موج (مثلاً فاصله دو قله موج از یکدیگر) که بر حسب واحد طول متر یا میکرون بیان می شود.

فرکانس: Frequency ν : تعداد سیکل ها در واحد زمان (1/s) است واحد قراردادی آن هرتز Hz می باشد.

ارتباط سه پارامتر اخیر به این صورت است: $c = \nu \times \lambda$

ارتباط طول موج با فرکانس و انرژی هر موج:

$c = \nu \times \lambda$ پس $\lambda = c/\nu$ فرکانس هر موج، با طول موج آن رابطه عکس دارد.

از طرفی رابطه ربرو بین فرکانس و انرژی وجود دارد. $E = h \nu$ که h ثابت پلانک برابر با $6.626 \times 10^{-34} \text{ J/s}$

است. پس به جای $\lambda = c/\nu$ می توان نوشت $\lambda = c/(E/h)$ یعنی $\lambda = ch/E$

پس انرژی هر موج، با طول موج آن رابطه عکس دارد.

ماهیت نور

نور در مفهوم موجی شامل میدان های نوسان گر الکتریکی و مغناطیسی عمود بر هم است که به صورت سینوسی در یک جهت در فضا پخش می شود.

پرتویی که میدان الکتریکی و مغناطیسی آن در یک صفحه نوسان می کند پرتو پلاریزه نامیده می شود.

نور غیر پلاریزه شامل نوسان میدان الکتریکی در تمام جهات می باشد.

ماهیت ماده:

ماده از مولکول ها و مولکول ها از اتمها و اتمها از الکترون وهسته تشکیل شده اند. دو نوع حرکت برای ذرات بنیادی قائل هستیم.

الکترون ها و پروتون ها به عنوان ذرات باردارند.

هر ذره باردار ایجاد میدان الکتریکی می کند.

حرکت الکترون در اوربیتال یک میدان برایش تعریف می شود. این حرکت به میدان الکتریکی منسوب می شود.

حرکت اسپینی: هر ذره باردار که حول محور خود بچرخد ایجاد میدان مغناطیسی می کند.

حرکت اوربیتالی: به میدان الکتریکی منسوب می شود.

حرکت اسپینی: به میدان مغناطیسی منسوب می شود.

در درون اتم میدان الکتریکی و مغناطیسی یافت می شود پس ماهیت نور و ماده یکسان است. میدان الکتریکی

نور و ماده می تواند همدیگر را تقویت یا تضعیف کنند. پس با هم برهمکنش دارند.

سرنوشت برخورد پرتو الکترومغناطیس با ماده:

(۱) جذب نور absorption

(۲) نشر نور emission

(۳) پراکنش نور scattering جهت انتشار نور عوض می شود

اینکه کدام برهمکنش رخ دهد بستگی به انرژی نور دارد.

انرژی نور :

$$\text{معکوس طول موج (امگا)} = hc\omega = h \frac{\text{سرعت نور } C}{\text{طول موج } \lambda} = h\nu \text{ (فرکانس نور)} \quad \text{ثابت پلانک } h = \text{انرژی امواج نور } E$$

در برخورد پرتو الکترومغناطیس با ماده 2 رویداد اتفاق می افتد: پخش نور که در آن جهت انتشار عوض می شود و دیگری جذب نور که سبب انتقال انرژی به ماده می شود احتمال نسبی هر یک از دو فرآیند پخش و جذب به خواص مولکولی خاصی که تحت تابش قرار می گیرد وابسته است. اگر انرژی جذب شود مولکول برانگیخته می شود یا در حالت برانگیخته EXCITED قرار می گیرد.

به مولکول یا بخشی از مولکول که در اثر جذب انرژی برانگیخته می شود کروموفور می گویند یعنی لازم نیست در یک مولکول تمام بخش های آن قابلیت جذب نور داشته باشند بلکه بخش هایی خاصی از مولکول می توانند خاصیت کروموفوری داشته باشند.

جذب نور : ۱- انرژی جنبشی ۲- نشر نور

نشر نور: الف) فلورسانس ب) فسفورسانس

نوری که به ماده برخورد کرده و جذب آن می شود باعث تبدیل ماده از حالت پایه به حالت برانگیخته می شود و می تواند ۲ سرنوشت داشته باشد. انرژی جنبشی و نشر نور

۱- انرژی جنبشی: مولکول در حالت برانگیخته انرژی خود را به مولکول های دیگر مانند مولکول های حلال انتقال می دهد.

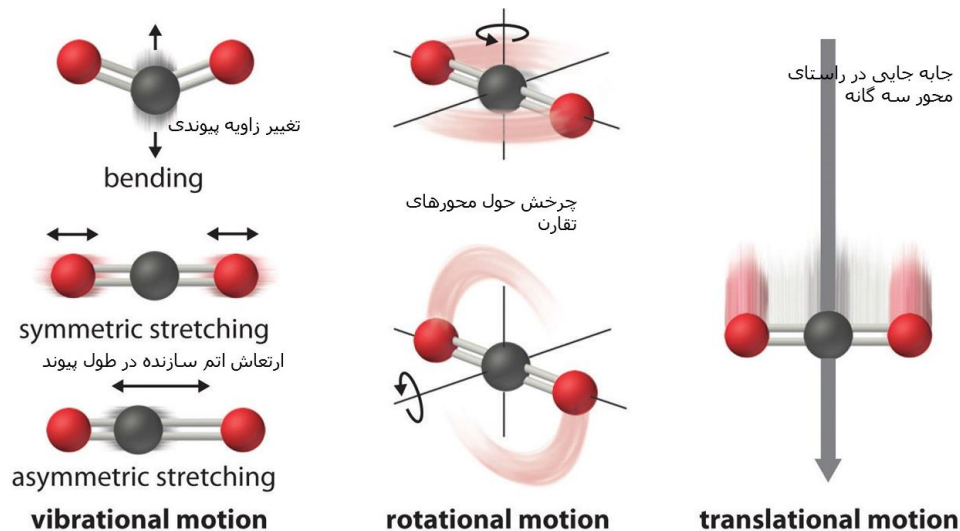
۲- نشر: در آن ماده نشر نور روی می دهد یعنی بخشی از نور که جذب کرده مجدداً به صورت نور ساطع می کند که خودش به رو فرم فورسانس و فسفو سانس روی می دهد در هر صورت شدت نور عبور کرده کمتر از نور تابیده شده است زیرا مقداری از شدت به خاطر جذب توسط کروموفور کاسته می شود.

هر مولکول دارای 3 سطح انرژی است:

(۱) الکترونی، (۲) لرزشی (۳) چرخشی

هر مولکول را در نظر بگیریم از نظر سطوح یا ترازهای انرژی دارای 3 سطح انرژی است:

(1) الکترونی (2) ارتعاشی (3) چرخشی



برای مولکولی که N تا اتم دارد $3N$ درجه آزادی دارد.

از این $3N$ ۳ تاش حرکت انتقالی است. $3t$ روی سه محور X, Y, Z می تواند حرکت کند.

۳ یا ۲ درجه آزادی حرکت چرخشی (r) دارد. اگر مولکول خطی باشد ۲ درجه آزادی دارد. اگر مولکول غیرخطی باشد ۳ درجه آزادی دارد.

اگر مولکول خطی باشد $3N-6$ حرکت ارتعاشی (v) دارد.

اگر مولکول غیرخطی باشد $3N-5$ حرکت ارتعاشی دارد.

مثال: $n=1$ درجه آزادی $3n=3$ هر سه مربوط به حرکت انتقالی است و چرخش ندارد.

مولکول تک اتمی فقط دارای حرکت انتقالی است و ارتعاش و چرخش ندارد.

مثال: $N=2$ N_2, Cl_2, O_2, CO

$$3N=3 \times 2=6$$

مولکول دو اتمی یک شیوه ارتعاش از نوع کششی دارد، فشرده یا کشیده می شود.

در مورد CO زاویه پیوندی نداریم. طول پیوند تغییر می کند (دو اتم مثل فنر به هم نزدیک یا دور می شوند)

۳ حرکت انتقالی، ۲ حرکت چرخشی و ۱ حرکت ارتعاشی.

مثال: CO_2 $N=3$

$$3N=3 \times 3=9 \quad 3t \quad 2r \quad 4v$$

کشش متقارن: $O=C=O$



کشش نامتقارن: $O=C=O$



خمش در صفحه مولکولی $O=C=O$

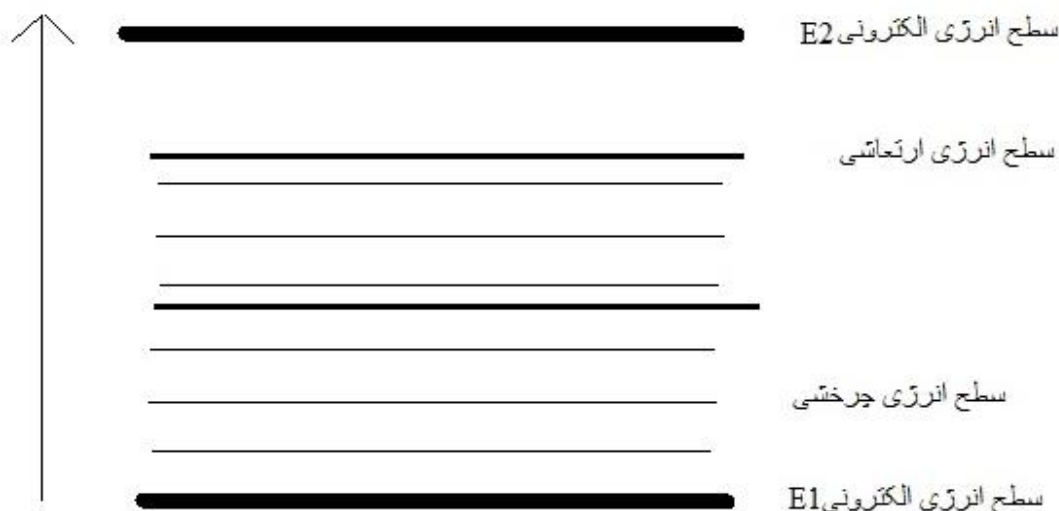
خمش خارج صفحه $O=C=O$

این دو خمش از نظر انرژی یکسان اند پس طیف IR آن ۳ تاست چون ۲ تا هم انرژی هستند در اشعه زیر قرمز ارتعاشات را بررسی می کنیم. به ازای هر ارتعاش یک پیک. چون هر ارتعاش انرژی متفاوتی دارد.

(1) سطوح الکترونی : این سطح مهمترین سطح انرژی ماده می باشد و بیانگر موقعیت انرژی و آرایش فضایی مولکولها می باشد مثال : انتقال الکترون از یک اوربیتال به اوربیتال دیگر باعث تغییر در سطوح الکترونی ماده می باشد.

(2) لرزشی : سطح انرژی اصلی یا الکترونی دارای سطوح انرژی فرعی بنام سطوح ارتعاشی است و این سطوح مشخص کننده نحوه ارتعاش یک مولکول می باشد که به دلایلی نظیر خم شدن یا کشیده شدن یک پیوند کوالان حامل می شود.

(3) سطح چرخشی : سطوح ارتعاشی دارای چندین سطح فرعی تراز انرژی می باشد که به آن سطوح چرخشی گویند این سطح باعث تغییر در جهت حرکت اسپین الکترون می شود.



حال می خواهیم بدانیم کدام یک از طول موج های الکترومغناطیس باعث ایجاد تغییر در سطوح مختلف انرژی می شود.

طیف الکترومغناطیس شامل طول موجهای بسیار بلند رادیویی تا امواج فوق العاده کوتاه اشعه ایکس و گاما می باشد. فرکانس این امواج در محدوده ای بین 10 تا 10^{24} Hz و طول موج آنها از 10^7 تا 10^{16} متغیر است. طیف امواج الکترومغناطیس پیوسته است و نمی توان با یک مرز مشخص این امواج را از هم جدا کرد. علاوه بر خصوصیات مشترک این امواج (انعکاس، شکست، انکسار، پخش و...) هر بخش از این امواج دارای خصوصیات خاص خود نیز می باشد که باعث کاربردهای متفاوت آنها نیز شده اند.

مروری بر امواج الکترومغناطیس و کاربرد های آنها در علوم زیستی:

تابش الکترومغناطیس به نواحی طبقه بندی شده است که در جهت افزایش فرکانس این نواحی به قرار زیر هستند.

ناحیه فرکانس رادیویی . ($3 \times 10^6 - 3 \times 10^{10} \text{ Hz}; 10\text{m} - 1\text{cm}$)

طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای (n.m.r) (و رزونانس اسپین الکترون e.s.r) در این ناحیه قرار دارد. تغییر انرژی حالت ناشی از وارونه شدن اسپین هسته n.m.r (یا الکترون e.s.r) (بوده و در حدود 0.001-10 ژول بر مول است. از nmr در علوم زیستی برای شبیه سازی ماکرومولکول های کوچک استفاده می شود.

ناحیه ریز موج ۲ .: ($3 \times 10^{10} - 3 \times 10^{12} \text{ Hz}; 1\text{cm} - 100\mu\text{m}$)

طیف سنجی چرخشی در این ناحیه قرار دارد. تغییر انرژی حالت ناشی از جهش بین حالات انرژی چرخشی بوده که فاصله آنها چند صد ژول بر مول است.

ناحیه زیر قرمز ۳ .: ($3 \times 10^{12} - 3 \times 10^{14} \text{ Hz}; 100\mu\text{m} - 1\mu\text{m}$)

طیف سنجی رتعاشی در این ناحیه قرار می گیرد. تغییر انرژی حالت ناشی از جهش بین حالات انرژی ارتعاشی بوده که فاصله آنها در حدود 104 ژول بر مول است. طیف سنج رامان مشابه این طیف سنج ها عمل می کنند.

ناحیه مرئی و فرا بنفش ۴ .: ($3 \times 10^{14} - 3 \times 10^{16} \text{ Hz}; 1\mu\text{m} - 10\text{nm}$)

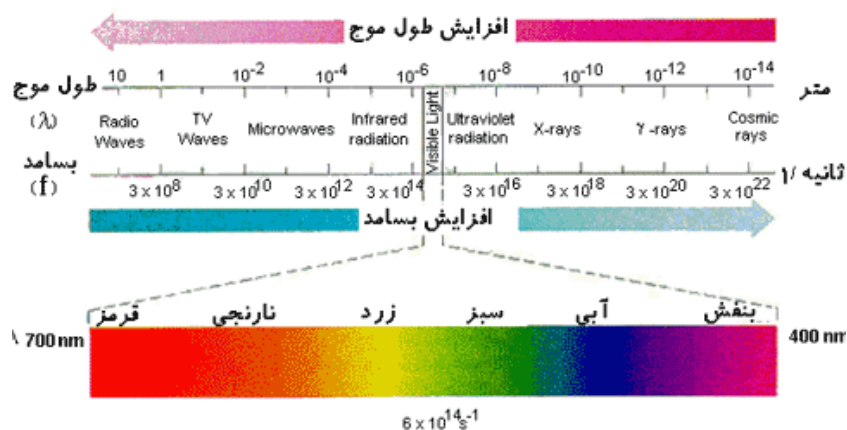
طیف سنجی الکترونی در این ناحیه قرار دارد و تغییر انرژی حالت ناشی از جهش بین حالات الکترونی بوده که طی آن یک الکترون ظرفیتی از حالتی به حالت دیگر منتقل می شود. این تغییر انرژی حدود چند صد کیلو ژول برمول است. از این بخش از امواج الکترومغناطیس در طیف سنج های uv-visible استفاده می شود.

ناحیه اشعه ۵ . X: ($3 \times 10^{16} - 3 \times 10^{18} \text{ Hz}; 10\text{nm} - 100\text{pm}$)

تغییر حالت از الکترون های داخلی اتم یا مولکول منشاء می گیرد. این تغییر انرژی حدود ده هزار کیلو ژول بر اتم (یا مولکول) می باشد. از این طیف از پرتو های الکترومغناطیس برای پیش گویی ساختار پروتئین ها استفاده می شود.

ناحیه اشعه ۶ . γ : ($3 \times 10^{18} - 3 \times 10^{20} \text{ Hz}; 100\text{pm} - 1\text{pm}$)

تغییر انرژی حالت ناشی از نوآرانی ذرات هسته ای بوده و حدود 1011-109 ژول بر اتم گرم است.



پرتو الکترومغناطیس: طیف وسیعی از طول موج ها را در بر میگیرد که از یک سو امواج 0,1 و از سوی دیگر پرتوی گاما با طول موج 10^{-11} متر است. رادیویی با طول موج اذارای محدوده (10^{10}) پرتوهای متعددی هستند که در اثر برخورد با ماده حالت های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی ایجاد می کند هر نانومتر 10^9 متر می باشد.

برخورد پرتو با هر طول موج با (ظرفیت انرژی و فرکانس متفاوت) یک سری اطلاعات ویژه در اختیار پژوهشگران قرار می دهد و مثال ← پرتوی ماکروویو که طول موج 10^5 تا 10^6 نانومتر موجب چرخش مولکول پرتو IR با طول موج 10^3 تا 10^5 نانومتر موجب ارتعاش مولکول و پرتو الکترونی با طول موج 10^1 تا 10^3 نانومتر موجب برانگیخته الکترونی و پرتو گاما با طول موج های کمتر از یک نانومتر موجب برانگیخته هسته ای می شود.

برای مطالعه هر یک از این خواص دستگاه ویژه ای نیاز است تا بتوان طیف برخورد پرتو با ماده را بدست آورد و در اثر برخورد پرتو الکترومغناطیس با ماکرومولکول های حیاتی می توان اطلاعات ساختمانی و عملکردی مطالعات انرژی ماکرومولکول ها را در محیط بررسی کرد.

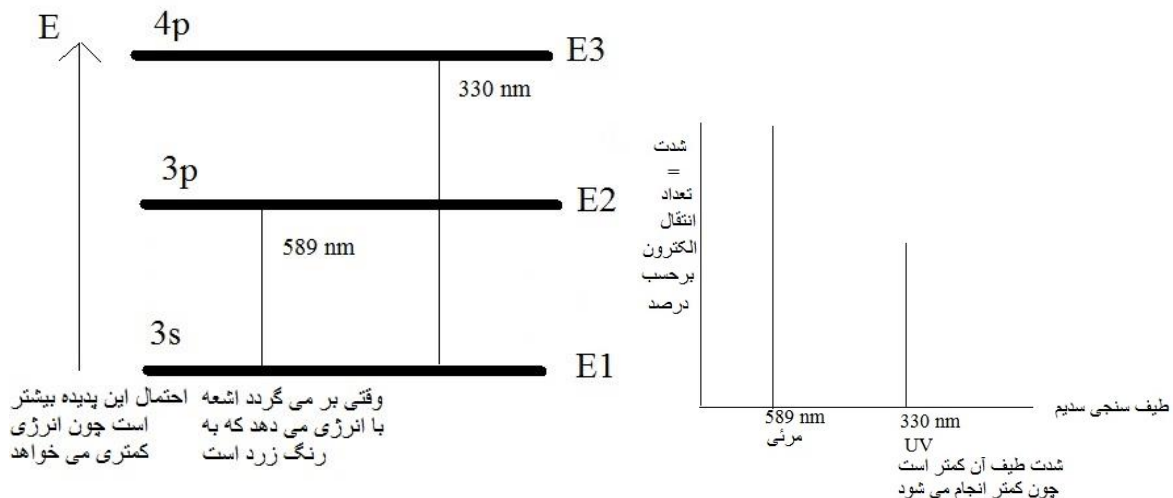
طیف سنجی از دو دیدگاه اتمی و مولکولی

دیدگاه اتمی: تغییر سطوح انرژی الکترون ها داریم.

در مورد سدیم (اتم) (Na) آرایش $1s^2 2s^2 2p^6 3s^1$

سدیم تحریک شده Na^* آرایش $1s^2 2s^2 2p^6 3p^1$

سدیم دوبار تحریک شده Na^{**} آرایش $1s^2 2s^2 2p^6 4p^1$



خطوط طیفی تیز است و پهنایشان کم است. یک نقطه نیست ولی نسبت به خطوط مولکول ها ظریف اند. پس خطوط طیفی اتمی باریک است.

چرا خطوط طیف مولکولی پهن می شود.

۱- اما در مورد مولکول ها علاوه بر تغییر سطح تراز انرژی الکترونی، تراز انرژی الکترونی ارتعاشی و چرخشی هم داریم. پس در طیف سنجی خطوط پهن می شود. پس خطوط طیف مولکولی پهن می شود.

۲- یکی دیگر از عوامل پهن شدن منحنی طیفی در مولکول ها: برخورد مولکول هاست. در محلول مولکول های مختلف دائم به هم برخورد می کنند و انتقال انرژی انجام می شود. مولکول ها به هم انرژی انتقال می دهند و باعث پهن تر شدن منحنی طیف مولکول می شود.

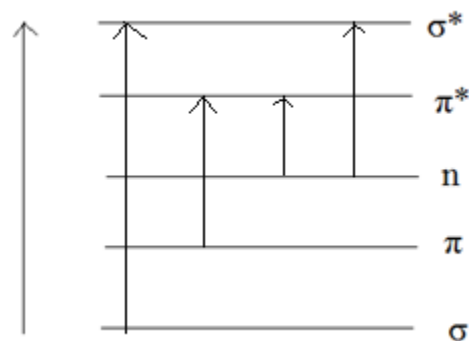
مثلا در فاز گازی برخورد پایین تر است اما در فاز مایع برخوردها بیشتر می شود و به دما هم بستگی دارد.

دیدگاه مولکولی

انتقال الکترونی بین سطوح انرژی یکی از پدیده هاست. در مولکول اوربیتال مولکولی داریم نه اتمی. وقتی دو اوربیتال روی یک محور به سمت هم نزدیک می شوند با هم هم پوشانی ایجاد می کنند و در اثر این هم پوشانی اوربیتال مولکولی ایجاد می شود. اوربیتال مولکولی سیگما وقتی هم جهت باشند. در کنار هر یک اوربیتال پیوندی و یک اوربیتال ضدپیوندی هم ایجاد می شود. در هر اوربیتال مولکولی فقط دو الکترون می تواند قرار گیرند. وقتی در هر کدام دو الکترون باشد، دو تا در اوربیتال مولکولی پیوندی و دو تا در اوربیتال مولکولی ضدپیوندی قرار می گیرند.

گاه اوربیتال ها از بغل هم پوشانی می کنند. وقتی محورشان موازی باشد. برخی از اوربیتال های مولکولی در پیوند مشارکت ندارند، اوربیتال های مولکولی غیرپیوندی اند که با N نشان می دهیم.

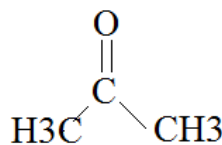
از ترکیب اتم ها با هم که مولکول ها ایجاد می شوند، ۵ اوربیتال مولکولی ایجاد می شود.



برای هر کدام از این انتقالات انرژی لازم است که توسط اشعه UV-Visible فراهم می شود.
 مثال: در مورد مولکول CH_4 : بین C و H پیوند از نوع سیگماست. چون اوربیتال های اتمی H کروی است که از هر جهتی نسبت به P هم جهت است و سیگما تشکیل می شود و در اثر اشعه UV-Visible از σ به σ^* می رود و انرژی مورد نیاز ۱۲,۴ نانومتر است.

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} = hc\omega$$

انتقالات الکترون از σ به σ^* به فوتونی احتیاج دارد که طول موج اس ۱۲,۴ نانومتر است.



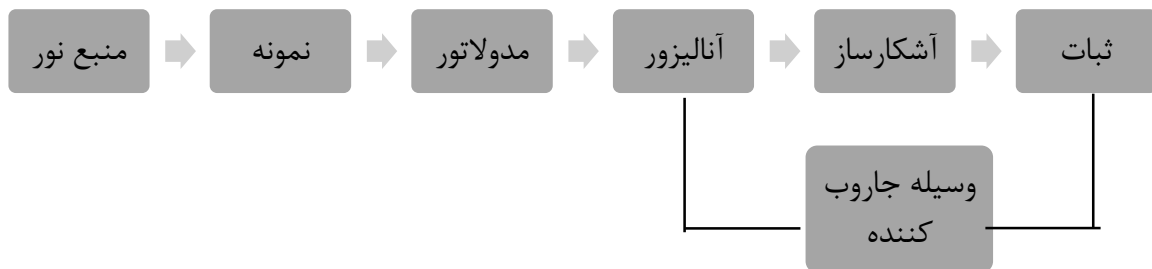
مثال: در مورد استون

$n \rightarrow \sigma^*$

213 nm

انتقال از n به σ^* الکترون های غیرپیوندی اکسیژن
 انتقال از π به π^* (یکی از پیوندهای دوگانه σ و یکی π است).
 در ن

شکل عمومی دستگاه طیف سنجی



اسپکتروفتومترها گرچه طرح های مختلفی دارند ولی همگی شامل یک منبع نور برای تولید نور، یک جا نمونه شفاف به نام سل، یک مدولاتور، آنالیزور آشکارساز، ثبت و جاروب کننده هستند.

مدولاتور: وسیله چرخانی که به صورت متناوب نور را دریافت می کند. این امکان را فراهم می کند که از برق متناوب استفاده کنیم.

آنالیزور: کارش تفکیک امواج است برحسب طول موج

آشکارساز: برحسب طول موج نورهایی که با طول موج های مختلف که عبور می کنند پیدا بشوند. اگر احتیاج به تقویت دارد تقویت شود تا قابل ثبت شود.

ثبات : ثبت طول موج

جاروب کننده: هر نوری که آنالیزور تشخیص بدهد و از آن عبور کند ، جاروب کننده طول موج را اعلام می کند.

هر چیزی که ثبت می شود احتیاج به حالت دوبعدی دارد.

وسیله جاروب کننده مختصات X و آشکارساز Y را اعلام می کند به ثبات.

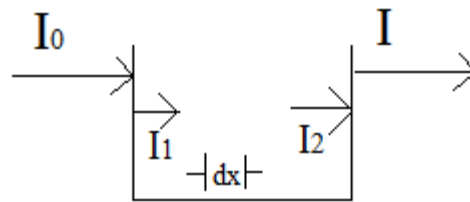
عمل دستگاه به این صورت است در یک طول موج خاص نوبه محفظه ی شاهد که می تواند یک حلال باشد تابیده و میزان نور عبوری آن سنجیده و جذب آن تعیین شود پس همان نور به نمونه تابیده و جذب آن معین می شود با کم کردن جذب شاهد از نمونه مقدار جذب نمونه مورد نظر بدست می آید این عمل در برخی از دستگاه به صورت اتوماتیک انجام می گیرد.

دستگاه هایی که از نور سفید استفاده می کنند اکثرا اینگونه اند. در دستگاه های NMR آنالیزور استفاده نمی کنیم چون از طول موج مشخص استفاده می کنیم منبع نور تک فام ایجاد می شود. منبع نور آنالیزور هم هست.



از بین تمام روش های اسپکتروسکوپی، UV-Visible بیشترین کاربرد را در روش کمی دارد به علت سادگی و ارزانی.

نمونه که تحت تابش نوری با شدت I_0 قرار می گیرد محل برخورد اشعه اول خود ظرف نمونه (شیشه یا کوآرتز) شدت نور تحت تاثیر قرار خواهد گرفت و شدت نور از I_0 به I_1 می رسد. نور با شدت I_1 وارد محلول و از مسیر محلول رد می شود و به طرف دیگر ظرف برخورد می کند و شدت اش کاهش یافته و با شدت I خارج می شود.



نسبت I به I_0 را ترانسمیتانس خارجی یا اکسترنال می گویند. $T_e = \frac{I}{I_0}$

نسبت I_2 به I_1 را ترانسمیتانس داخلی یا اینترنال می گویند. $T_i = \frac{I_2}{I_1}$

اگر ظرف از جنس کوآرتز باشد، $I_0 = I_1$ ، $I = I_2$ و چون برهم کنشی با UV-Visible ندارد، پس $T_e = T_i$ نمونه شدت نور را چگونه از I_0 به I می رساند؟

درفاصله کوچک مثل dx نوری که از آن عبور می کند، شدت اش به اندازه dI تغییر می کند.

هر چه شدت نور بیشتر، کاهش بیشتر

$$-dI \propto I dx$$

هرچه طول مسیر نور بیشتر کاهش بیشتر

$$-dI = k \cdot I \cdot dx \rightarrow \int -\frac{dI}{I} = k \int dx \rightarrow \int_{I_0}^I -d \ln I = k \int_0^x dx$$

$$-\ln \frac{I}{I_0} = kx \rightarrow -2.3 \log \frac{I}{I_0} = A = \text{Absorbance} \quad \text{جذب}$$

هر چه نور بیشتر توسط نمونه جذب شود نسبت I به I_0 کوچکتر و جذب بیشتر

$$A = \frac{k}{2.3} x \rightarrow A = ax$$

a متناسب است با غلظت گونه ای که نور را جذب می کند $a \propto C$

$$a = \epsilon C$$

$$A = ax \rightarrow A = \epsilon C x$$

رابطه بیر لامبرت

A دیمانسیون ندارد چون $\log$ یک کمیت است. آنچه در توان عدد قرار می گیرد فاقد دیمانسیون است.

احتمال جذب نور با یک طول موج معین توسط ضریب جذب مولی مولکول در طول موج نور مورد نظر مشخص می شود اگر نور با شدت (I_0) از محلول با ضخامت L به واحد سانتی متر و غلظت مولی C عبور نماید شدت نور عبوری I از قانون بیر لامبرت پیروی می نماید.

رابطه بین نمونه جذب کننده نور و جذب نور:

اگر طول مسیر نور برابر یک سانتی متر باشد و غلظت نمونه یک مول بر لیتر mol/L $A = \epsilon$

ϵ جذب نمونه ای است که غلظت اش 1 mol/L در طول مسیر نور 1 cm باشد. که به آن جذب مولار یا ضریب جذب مولار یا ضریب خاموشی مولی می گویند.

$$\text{دیمانسیون } \epsilon \leftarrow \frac{1}{C x} \leftarrow \frac{1}{M \text{ cm}} \leftarrow M^{-1} C m^{-1}$$

مثال: ۲۸٪ نوری با طول موج ۳۴۰ nm در اثر برخورد با محلولی NADH عبور می کند. ضریب خاموشی NADH ۶/۲۲ می باشد. غلظت محلول NADH با فرض یک سانتی متر پیمودن میسر نور چقدر است؟

$$T = \%20.8 \rightarrow =0.208$$

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log T = -\log 0.208 = 0.682$$

$$C = \frac{A}{\epsilon x} = \frac{0.682}{(6.22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}) (1 \text{ cm})} = \frac{0.682}{6.22} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{cm}^3} \right) = \frac{0.682}{6.22} (10^{-6} \text{ mol})(10^{-3} \text{ L})^{-1}$$

$$C = \frac{0.682}{6.22} \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} = 0.11 \times 10^{-3} \text{ (M)} = 0.11 \text{ (mM)}$$

مثال: الف جذب محلول 1mM (میلی مولار) ب 1μM محلول NADH در x=1 در صد عبور نور در هر محلول چقدر است؟

$$\epsilon = \frac{A}{Cx} = \frac{1}{\frac{\text{mol}}{\text{Liter}} \text{ cm}} = \frac{\text{Lit}}{\text{mol.cm}}$$

NADH در 342 nm بیشترین جذب را دارد $\epsilon = 6.22 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^2$
جواب: الف

$$A = \epsilon C x$$

$$A = 6.22 (\mu\text{mol. cm}^2) (1 \text{ cm}) (1 \text{ mM}) = (6.22) \times (10^{-6} \text{ mol})^{-1} (\text{cm}^2) (1 \text{ mM}) (1 \text{ cm}) = 6.22 \times 10^3 \times (10^{-3} \text{ L}) (\text{L}^{-1})$$

$$A = 6.22 \quad A = -\log T \quad T = \frac{I}{I_0} = 6.03 \times 10^{-7} \quad I = 6.03 \times 10^{-5} \% I_0 = \text{درصد عبور نور}$$

ب) 0

$$A = \epsilon C x = (6.22 \mu\text{mol.cm}^2)(1 \text{ cm}) (1 \mu\text{M}) = 0.00622 = -\log \frac{I}{I_0} \rightarrow I = 0.986 I_0 = 98.6 \% I_0$$

گاه حالتی به وجود می آید که بیشتر از یک نمونه جذب کننده نور در ظرف باشد در این حالت رابطه بیرلامبرت به صورت زیر نوشته می شود:

$$A = x \sum_i \epsilon_i C_i$$

مثال: بنزن و تولوئن دارای ضریب خاموشی مولی زیر هستند :

	$\epsilon \text{ 255 nm M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon \text{ 269 nm M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
تولوئن	۲۱۰	۲۶۷
بنزن	۲۳۴	۱۲۵

$$A_{255 \text{ nm}} = 0.800 \quad A_{269 \text{ nm}} = 0.269$$

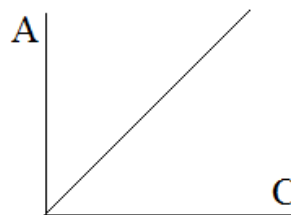
چنانچه مخلوطی از بنزن و تولوئن داشته باشیم به طوری که جذب نور در طول موج 255 nm برابر با 0.800 و جذب نور در 269 nm برابر با 0.267 باشد غلظت تولوئن را حساب کنید:

$$A_{255 \text{ nm}} = x.C_b.\epsilon_b + x.C_T.\epsilon_T \rightarrow C_b = 2.63 \text{ mM}$$

$$A_{269 \text{ nm}} = x.C_b.\epsilon_b + x.C_T.\epsilon_T \rightarrow C_T = 0.88 \text{ mM}$$

برای تعیین ϵ از رابطه بیرلامبرت $A = \epsilon Cx$ استفاده می کنیم.

اگر A را در مقابل C رسم کنیم شیب خط ϵx خواهد بود. اگر $x=1$ باشد، ϵ محاسبه می شود.



برای تهیه نمودار استاندارد تعداد حداقل ۸ غلظت از محلول تهیه شود، به طوری که حداکثر جذب مربوط به غلیظ ترین نمونه از ۰/۸ بیشتر نشود. هنگامی که غلظت نمونه بیشتر از مقدار مورد نظر باشد ممکن است رابطه خطی $A = \epsilon Cx$ نتواند رابطه A را با C تعیین نماید زیرا اگر غلظت زیاد باشد زمانی که ضخامت محلول 1 CM باشد ضریب جذب مولی ثابت نبوده و به صورت تابعی از غلظت خواهد بود. $A = \epsilon \cdot C \cdot x + b$. در این موارد گفته می شود که محلول از قانون بیر-لامبرت انحراف نشان می دهد. دو نوع انحراف مثبت و منفی وجود دارد.

زیرا چنانچه بهم پیوستن مولکول ها رخ دهد در آن صورت نمودار A در مقابل C از حالت خطی خارج می شود و افت می نماید. که به انحراف منفی از قانون بیر-لامبرت موسوم است و در مواردی ممکن است با انحراف مثبت از قانون بیر-لامبرت را بطله خطی به سمت توان های بیشتر C جابجا شود.

چندین مورد دیگر انحراف از قانون بیرلامبرت وجود دارد به طور مثال در محلول بیشتر مولکول ها با افزایش غلظت دایمر یا پلی مر تشکیل می شود طیف دایمرها ممکن است با نומרها متفاوت باشد. که این موضوع می تواند سبب انحراف مثبت یا منفی از قانون بیرلامبرت شود.

مثال دیگر: تجمع در غلظت بالاست ه به علت بزرگی تجمع حاصله نور پخش شده و نتیجه ی آن کاهش نور عبور کرده است که انحراف مثبت را از قانون بیر-لامبرت نشان می دهد.

مجمع شدن ممکن است سبب برهم کنش های الکترونی شده که ضریب جذب مولی را افزایش یا کاهش می دهد. فرایندهای دیگری انحراف از قانون بیر لامبرت را سبب می شوند نظیر غیر طبیعی شدن پروتئین در غلظت های کم یا انجام واکنش های شیمیایی در غلظت های بالا.

از آنجایی که در بیوشیمی بیشتر مطالعات مولکولی بر روی مولکول های محلول انجام می شود کلیه مولکول ها هنگامیکه در حلال ها حل شده اند جذب آنها اندازه گیری می شود.

بخش هایی از مولکول که قادر به جذب پرتو با طول موج معینی هستند و دچار تحریک الکترونی می شوند به کروموفور معروفند. کروموفورهای مختلف قادر به جذب فوتون های مختلف هستند. اگر برای یک کروموفور مقادیر جذب در طول موج های مختلف تعیین شوند طیفی به دست می آید. هر طیف حداقل دارای یک طول موج است که مقدار جذب در آن طول موج برای کروموفور حداکثر است. این طول موج به طول موج ماکزیمم

یا λ_{max} معروف است. λ_{max} و ضریب جذب ترکیبات مهم بیولوژیکی مشخص شده اند. با افزایش غلظت محلول مقدار ϵ برای یک طول موج معین ثابت نمی ماند که علت وقوع آن پراکنش نور است. بهم پیوستن مولکول ها به طور غیربرگشت پذیر در خصوص پروتئین ها و وقایع دیگری سبب این وابستگی ϵ به غلظت است.

طول موج حداکثری نامند که معمولا ضریب جذب مولی در آن λ_{max} مربوط به ماکزیمم پیک جذبی را طول موج اندازه گیری می شود.

فاکتورهای موثر بر خواص جذبی کروموفورها:

۱- ساختمان شیمیایی مولکول: ساختمان شیمیایی مولکول تعیین کننده طیف جذبی است.

۲- عوامل محیطی: عوامل محیطی متعددی از قبیل pH، قطبیت حلال یا مولکول های مجاور و جهت گیری کروموفورهای مجاور تغییرات قابل ملاحظه ای در λ_{max} و ϵ ایجاد می کنند. این اثرگذاری محیطی اساس بررسی ماکرومولکول ها از طریق تیتراسیون و تغییر محیط آنها و مطالعه اسپکتروسکوپی جذبی خصوصیات ماکرومولکول های بیولوژیکی می باشد.

الف) اثر pH حلال: تغییر pH حالت یونیزاسیون کروموفورهای قابل یونیزاسیون را تغییر می دهد. با افزایش pH گروه OH تیروزین یونیزه می شود و λ_{max} و ϵ تیروزین افزایش می یابند.

ب) اثر قطبیت: اثر پلاریته یا قطبیت برای کروموفورهای قطبی (بخصوص اگر مولکول شامل اکسیژن، نیتروژن و یا گوگرد باشد) به گونه ای است که در حلال های هیدروکسیلیک قطبی (از قبیل الکل ها و آب) مقدار λ_{max} در طول موج های کوتاهتری نسبت به حلال های غیرقطبی رخ می دهد.

ج) اثرات جهت یابی (Orientation): اشکال هندسی ماکرومولکول ها اثر فراوانی بر λ_{max} و ϵ دارند. بهترین مثال این اثر در اسیدنوکلیک وجود دارد که مقدار ϵ برای نوکلئوتید آزاد بیشتر از نوکلئوتید در تک رشته و به همین ترتیب در دورشته DNA است. علت آن می تواند آرایش یافتن بازها به موازات هم باشد که سبب کاهش λ_{max} و کاهش جذب مولی می شود.

قواعد تجربی برای تغییر طیف جذبی ماکرومولکول های حیاتی:

۱- اگر اسید آمینه تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و هستیدین از محیط قطبی به محیطی با قطبیت کم تر داخل شوند مقادیر ϵ و λ_{max} آن ها افزایش پیدا می کند. بنابراین:

الف: اگر طیف مربوط به اسید آمینه های ذکر شده که در پروتئین وجود دارند در یک حلال قطبی دارای ϵ و λ_{max} بزرگتری از این دو پارامتر برای همان اسید آمینه یا اسیدهای آمینه، در همان حلال می باشد، این نکته نشان می دهد که اسید آمینه مورد بحث در بطن هیدروفوب مولکول پروتئین قرار دارد.

ب: اگر طیف یک پروتئین به تغییرات قطبیت حلال حساس است، اسیدآمینه ای که تغییر در ϵ و λ_{max} برای آن وجود دارد در سطح پروتئین واقع شده است.

۲- با تیتراسیون گروه تیتروشونده (به طور مثال OH در تیروزین، ایمیدازول در هیستیدین و SH در سیستئین) هم ϵ و هم λ_{max} تغییر یافته و افزایش می یابند بنابراین:

الف: اگر تغییرات pH برای یکی از این اسیدآمینه ها بصورت آزاد سبب این تغییرات می شود اما برای اسیدآمینه واقع در پروتئین سبب تغییر طیف نمی شود، اسیدآمینه مورد بحث در بطن مولکول قرار دارد.

ب: اگر تغییرات طیف به عنوان تابعی از pH دارای مقدار pka مشابه تیتراسیون اسیدآمینه آزاد را داشته باشد نشان می دهد که اسیدآمینه مورد نظر در سطح واقع شده است.

ج: اگر تغییرات طیف به عنوان تابعی از pH دارای مقدار pka است که اختلاف زیادی با مقدار pka مربوط به اسیدآمینه آزاد است، نشانگر احاطه شدن اسیدآمینه مورد نظر در یک محیط قطبی است.

۳- مقادیر ϵ برای بازهای آلی پورین و پیریمیدین، در صورتی که سیستم های حلقوی آنها موازی و نزدیک تر شوند (Stacking بیشتر)، کاهش می یابد. بنابراین مقدار ϵ در این سیستم ها به شرح زیر است: باز آلی واقع در پلی نوکلئوتید تک رشته stacked شده > باز آلی در پلی نوکلئوتید تک رشته stacked نشده > باز آلی آزاد.

۴- پراکنش نور (Stacking) از برخورد نور با ذره و تغییر جهت آن حاصل می شود. برای حذف پخش نور پراکنده از نور جذب شده (سهم پراکنش و جذب نور بستگی به ویژگی مولکول دارد) برای سوسپانسیون ها، مقادیر جذب در مقابل $\frac{1}{\lambda^4}$ ترسیم می شود، با توجه به تناسب پراکنش نور با $\frac{1}{\lambda^4}$ ، پخش خطی نمودار مربوط به پراکنش نور است با برون یابی آن می توان مقدار جذب را در λ_{max} تصحیح کرد.

کاربردهای طیف سنجی:

۱- شناسایی مواد به وسیله ی طیف سنجی: بسیاری از مواد دارای طیف مشخص هستند که توسط اندازه گیری طیف کامل و یا سنجش نسبت جذب در طول موج های مختلف شناسایی می شوند. به طور مثال یکی از اولین کارهایی که برای تعیین ترکیب بازهای DNA انجام گرفت بدین صورت بود که DNA در ابتدا هیدرولیز شده و سپس بازهای آن توسط کروماتوگرافی جدا می شوند بعد از آن بازهای جدا شده از روی λ_{max} آن ها مورد شناسایی قرار می گیرند. λ_{max} آدنین 265 تیمین 264 و گرانین 275 و سیتیزین 267 است.

۲- تعیین غلظت: مهمترین استفاده از بخش جذب اندازه گیری غلظت است با در اختیار داشتن ضریب جذب مولی ϵ و جذب نمونه A می توان غلظت آن را تعیین کرد. به طور مثال محلولی با غلظت 50 میکروگرم/میلی لیتر در طول جذب 260 nm دارای جذب 1 است می توان پیش بینی کرد اگر محلول از این ماده دارای جذب 0,5 باشد غلظت آن 25 میکرو خواهد بود.

۳- سنجش واکنش شیمیایی (پیشرفت واکنش و سرعت انجام واکنش): در طی فرآیند شیمیایی ممکن است جذب یکی از مواد اولیه یا محصولات تغییر کند که به این دلیل می توان آن فرآیند شیمیایی را سنجش نمود به طور مثال: در هیدرولیز آنزیمی باز در پلی نکلئوتید است از این جهت ϵ باز آزاد بیشتر از ϵ پلی نکلئوتید، می دانیم که هیدرولیز پلی نوکلئوتید به مونوفونوکلئوتید جذب را افزایش می دهد بنابراین اگر آنزیم نوکلئاز به پلی نوکلئوتید اضافه شود جذب با گذشت زمان افزایش می یابد که این افزایش مشخصه رخداد هیدرولیز است.

۴- مطالعه دنا تورا سیون پروتئین: اگر پروتئین دنا توره شود، در صورت دوحالته بودن سیستم، فرم طبیعی (N) به فرم غیرطبیعی (D) تبدیل می شود. $N \leftrightarrow D$

جذب D با N متفاوت است. بنابراین متناسب با تبدیل N به D جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر نیز تغییر می کند که حاصل این تغییرات یک منحنی سیگموئید است. از قسمت اول و خطی نمودار سیگموئید خطی عبور داده می شود که به خط N یا طبیعی مرسوم است. از ناحیه خطی انتهایی نمودار سیگموئیدی نیز خطی موسوم به خط D یا دنا توره می گذرد. امتداد این خطوط در نواحی تغییر فاز سبب می شود که رفتار مولکول در غلظت دنا توره کننده در ناحیه تغییر فاز به صورت طبیعی و غیرطبیعی نشان داده شود. تقسیم فاصله نمودار تجربی تا خط N به فاصله خط D از N در همان نقطه به کسر دنا توره کننده (F_d) موسوم است. ثابت تعادل دنا تورا سیون k_d عبارت است از:

$$k_d = \frac{F_d}{1 - F_d}$$

از طرفی $\Delta G^\circ = -RT \ln k$ که ΔG° تغییرات انرژی آزاد گیبس است. R ثابت جهانی گازها و مقدار آن در سیستم اندازه گیری SI برابر با $8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ می باشد و T دمای مطلق است.

۵- تعیین حالت های یک سیستم میکروسکوپی

۶- بررسی اتصال لیگاند به ماکرومولکول

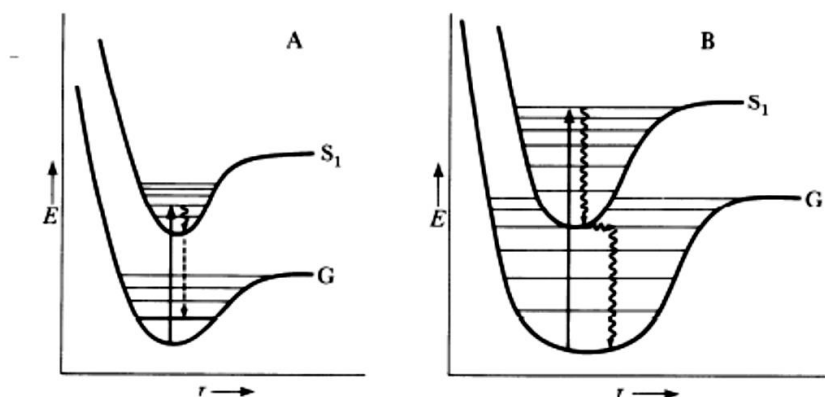
فلورسانس (Fluorescence)

جذب اولیه یک فوتون توسط مولکول سبب می شود یک حالت الکترونی تحریک شده ایجاد شود. مولکول تحریک شده ممکن است بواسطه برخورد با مولکول های اطراف انرژی را از دست بدهد که این انتقال از طریق قرار گرفتن در یک سطح انرژی ارتعاشی پایین تر انجام می شود. اگر مولکول های محیط قادر به پذیرش مقدار زیاد انرژی نباشد، آن می تواند سبب تابش شود که این عمل نشر خودبخودی نامیده می شود. بنابراین در نشر فوتون، طول موج فوتون نشر یافته نسبت به طول موج فوتون جذب شده بیشتر است. طیف نشری در حقیقت طیف فلورسانس نامیده می شود.

تئوری ساده فلوئورسانس

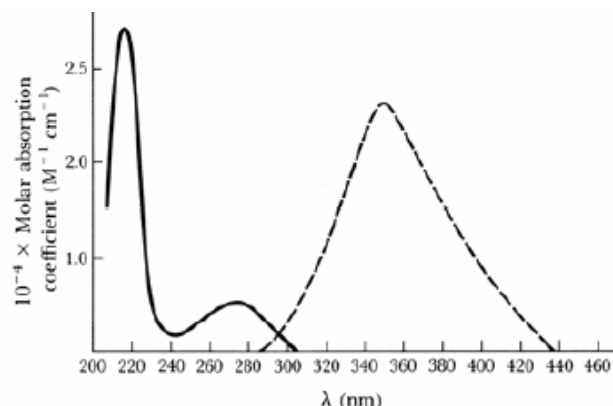
می دانید که یک مولکول می تواند تنها مقادیر منفصل انرژی را داشته باشد. انرژی تابیده شده به یک مولکول می تواند تنها وقتی جذب شود که مولکول بتواند با جذب آن از سطح انرژی پایه به سطح انرژی برانگیخته انتقال یابد. اگر مولکول در حالت پایه الکترونی (در تراز) G قرار داشته و انرژی جذب شده بیشتر از مقدار انرژی مورد نیاز باشد برای رسیدن به اولین تراز الکترونی برانگیخته (S_1) باشد، انرژی اضافی به صورت انرژی ارتعاشی جذب مولکول شده و مولکول در یکی از ترازهای ارتعاشی تراز الکترونی برانگیخته قرار خواهد گرفت.

این انرژی ارتعاشی به زودی در اثر برخورد با مولکول های حلال به صورت گرما هدر خواهد رفت و مولکول به پایین ترین تراز ارتعاشی تراز برانگیخته الکترونی سقوط خواهد کرد. حال مولکول برانگیخته می تواند از طریق نشر نور فلوئورسانس و یا به وسیله انتقال غیرتابشی به حالت پایه بازگردد. دیاگرام سطوح انرژی الکترونی و ارتعاشی دو کروموفور مختلف را در شکل زیر می بینید. در بخش (A) مولکول کروموفور به وسیله نشر نور از تراز الکترونی برانگیخته به تراز الکترونی پایه بازمی گردد، در حالی که در بخش (B) مولکول کروموفور به وسیله یک انتقال غیرتابشی از تراز الکترونی برانگیخته به تراز الکترونی پایه باز می گردد:



شکل (۸-۱): دیاگرام سطوح انرژی دو کروموفور. G و S_1 به ترتیب نشان دهنده حالات پایه و برانگیخته (خطوط ضخیم) می باشند. ترازهای ارتعاشی با خطوط نازک نشان داده شده اند. (A) این مولکول به وسیله انتقال نشان داده شده در دیاگرام (خط باریک ممتد) قادر به فلوئورسانس می باشد. پس از برانگیخته شدن، مولکول با پایین آمدن از ترازهای ارتعاشی (فلش موج دار) به پایین ترین تراز ارتعاشی حالت برانگیخته سقوط می کند و سپس با نشر نور (فلش منقطع) به حالت پایه باز می گردد. (B) این مولکول قادر به فلوئورسانس نمی باشد زیرا ترازهای ارتعاشی G بالاتر از پایین ترین سطح S_1 است. از اینرو، یک انتقال غیرتابشی (فلش موج دار افقی) از S_1 به تراز ارتعاشی G و بازگشت غیرتابشی متعاقب آن به پایین حالت G (فلش موج دار عمودی) روی می دهد.

چون انرژی در تراز برانگیخته به صورت انرژی گرمایی به هدر رفته است، در نتیجه نور نشر شده دارای انرژی کمتر (طول موج بلندتر) از نور تابیده شده خواهد بود. از اینرو فلئوئورسانس همیشه دارای طول موج بالاتری از طول موج نور تهییج کننده است. به عنوان مثال، طیف جذبی و فلئوئورسانس تریپتوفان در شکل زیر نشان داده شده است:



شکل (۸-۲): طیف‌های جذبی و فلئوئورسانس تریپتوفان. خط ممتد نشان‌دهنده ضریب جذب مولی به عنوان تابعی از طول موج و خط منقطع نشان‌دهنده طیف نشری تریپتوفان می‌باشد.

در برگشت به تراز پایه (G) ممکن است مولکول به ترازهای ارتعاشی مختلف تراز الکترونی پایه بازگردد. در نتیجه، نور نشر شده دارای طول موج‌های به هم نزدیکی خواهد بود و این پدیده موجب پهن شدن طیف فلئوئورسانس می‌گردد. همان‌طور که گفته شد، مولکول برانگیخته ممکن است به طرق غیرتابشی نیز به تراز پایه بازگردد.

احتمال وقوع فلئوئورسانس توسط بازدهیا محصول کوانتومی (Quantum Yield) با (Q) نشان داده می‌شود و عبارت است از:

نسبت تعداد فوتون‌های نشر شده به تعداد فوتون‌های جذب شده اطلاق می‌شود:

$$Q = \frac{\text{تعداد فوتون های نشر شده}}{\text{تعداد فوتون های جذب شده}}$$

محصول کوانتومی تابع دو عامل محیط و داخلی مولکول قرار می‌گیرد. فلئوئورفر بخشی از مولکول است که در اثر تحریک قادر به نشر پرتو است. پروتئین‌ها دارای تعدادی فلئوئورفور مناسب هستند. از بهترین اسید آمینه‌هایی که دارای Q بالایی است، تریپتوفان است. بنابراین فلئورسانس تریپتوفان متداول است. بطور کلی فلئورهای مناسب دارای حلقه آروماتیک بشدت سخت (Fairly rigid) می‌باشند.

اثر محیط مولکول که سبب کاهش مقدار Q است به کوانچینگ (Quenching) معروف است.

در مباحث بیولوژیکی کوانچینگ به علت سه عامل بوجود می‌آید.

۱-کوانچینگ ناشی از برخورد های مولکولی که سبب می شود انرژی برانگیختگی به صورت تبادل انرژی بین مولکول ها از بین برود.

۲-واکنش شیمیایی نیز سبب از دست رفتن انرژی تحریک می شوند.

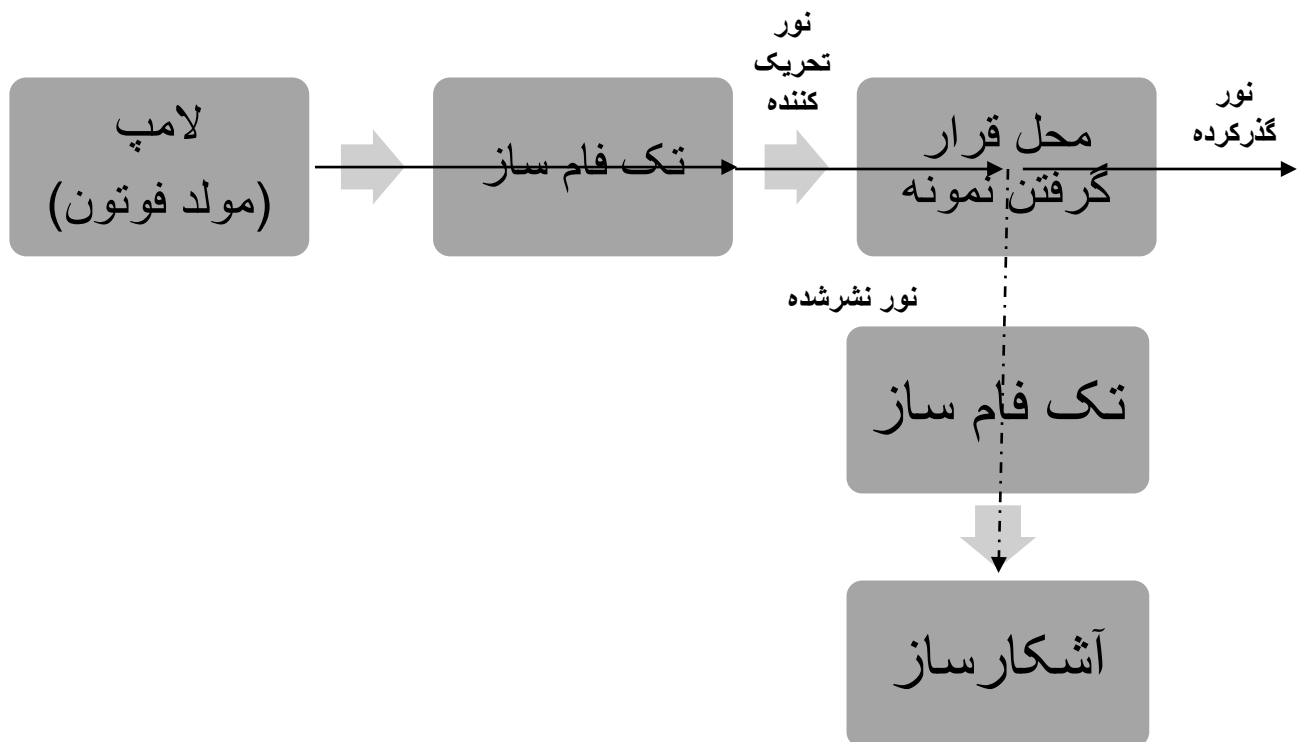
۳-Resonance transfer

عوامل متعددی بر سه عامل فوق اثر می گذارند. عبارتند از حلال، ترکیبات حل شونده (موسوم به Quencher)، دما، pH، گروه های شیمیایی همسایه، غلظت فلوروفور برای پروتئین های فلورسانس ذاتی $\text{Phe} < \text{Tyr} < \text{Trp}$ است زیرا محصول کوانتومی به همین ترتیب تغییر می کند.

با توجه به اینکه فلورسانس Trp و Tyr به محیط آنها بستگی دارد بنابراین از تغییرات فلورسانس به منظور بدست آوردن اطلاعاتی در مورد درجه انعطاف پذیری، فواصل بین مولکولی و ضریب نفوذ چرخشی آنها استفاده کرد. فلوروفورها گروه مولکولی را توصیف می کند که فلورسانس انجام می دهند. تعداد فلوروفورهای طبیعی در بیولوژی نسبتاً کم است که شامل تریپتوفان، بازهای پیریمیدین، NADH، t-RNA و کلروفیل می باشد. مواد سنتزی که در مطالعات فلورسانس به کار می روند بسیار متنوع اند. شدت فلورسانس و λ_{max} خیلی به محیط حساسیت نشان می دهند. ترکیباتی نظیر ۱-انیلو-۸-نفتالین سولفانات (ANS)، ۱-دی متیل-آمینونفتالین-۵-سولفانات (DNS) و مشتقات کلردار آن مانند کلراید، ۲-پاز-تولودین نفتالین-۶-سولفانات (TNS) فلوروفورهای خوبی هستند که در محیط آبی Q ضعیفی دارند اما هنگامی که در محیط غیرقطبی واقع می شوند Q آنها افزایش می یابد و طیف آنها به سمت طول موج های کوتاهتر جابجا می شود. از ANS برای تغییرات هیدروفوبیسته پروتئین استفاده می شود، افزایش فلورسانس پروتئین در حضور ANS نشانگر هیدروفوب شدن سطح پروتئین می باشد.

دستگاه فلورسانس

دستگاه فلورسانس شامل بخش های از جمله مولد فوتون، یک تک فام ساز جهت انجام تحریک و یک محل قرار گرفتن نمونه است. با توجه به اینکه نور نشر شده از فلورسانس در هر جهتی می تواند از نمونه خارج شود. سنجش آن در جهت خروج نور تحریک کننده (تابیده شده) صورت نمی گیرد. زیرا در این صورت نوری که از پرتو تابانده شده و جذب نشده و از نمونه می گذرد با نور نشر شده (ناشی از برگشت حالت تحریک به حالت پایه) با هم دیگر سنجیده می شوند. بنابراین در فلورسانس نور نشده را در مسیری عمود بر جهت تابش نور تابانده شده سنجش می کنند. در مسیر نشر شده یک تک فام ساز وجود دارد و سرانجام آشکارساز شدت نور تک فام را اندازه گیری می کند.



طیف سنجی Infra Red (مادون قرمز)

ناحیه کمتر از امواج مرئی در اصول طیف سنجی، ناحیه مادون قرمز است.

یک مولکول دارای حرکات مختلفی است. شامل الکترونی، چرخشی و ارتعاشی.

حرکت ارتعاشی شامل کشیده شدن یا فشرده شدن طول پیوند (حرکت کششی) و بزرگ و کوچک شدن زاویه پیوند (حرکت خمشی) می شود.

برای مولکول خطی $2N-5$ و برای مولکول خطی $2N-6$ حرکت ارتعاشی وجود دارد.

ساده ترین ارتعاش در یک مولکول ساده دو اتمی است.

$$3 \times (2) - 5 = 1$$

انرژی ارتعاش از فرمول زیر تبعیت می کند:

$$E = h\nu \left(V + \frac{1}{2} \right)$$

H: ثابت پلانک، ν : فرکانس (تعداد دفعاتی که در واحد زمان طول پیوند کشیده یا فشرده می شود)، **V:**

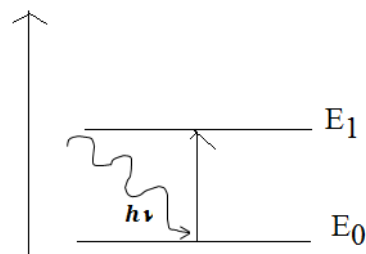
عدد کوانتومی ارتعاش، $\frac{1}{2}$: با فرض اینکه نوسانگر ما هماهنگ باشد به همان اندازه که کشیده می شود، به همان اندازه نیز فشرده می شود.

$$V: 0, 1, 2, 3, \dots$$

$$\text{در } V=0 \leftarrow E = \left(\frac{1}{2} \right) h\nu \leftarrow \text{مولکول در حالت پایه انرژی است.}$$

در $V=1 \leftarrow E = (\frac{3}{2}) h\nu \leftarrow$ مولکول $h\nu$ انرژی می گیرد تا از E_0 به E_1 برسد.

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu$$



یک محدودیت در انتقال داریم : $\Delta V = \pm 1$: از نظر کوانتوم مولکول اجازه ندارد یکباره دو سطح تراز انرژی تغییر کند.

اگر ارتعاش را در یک مولکول دو اتمی هماهنگ در نظر بگیریم به این معناست که وقتی طول پیوند کشیده یا فشرده شود یک اندازه است. اما در واقعیت نوسانگر هماهنگ نیست پس رابطه انرژی تغییر می کند. با فرض هماهنگ بودن:

$$E = h\nu(V + \frac{1}{2}) \rightarrow \frac{E}{hc} = \frac{h\nu}{hc}(V + \frac{1}{2}) \rightarrow \omega_v = \omega_e (V + \frac{1}{2})$$

ω_v : عدد موج معادل هر سطح انرژی و ω_e : عدد موج مربوط به نوسانگر هماهنگ
 ω_v تابعی از ω_e است.
 نوسانگر ناهماهنگ:

$$\omega_v = \omega_e (V + \frac{1}{2}) \rightarrow \omega_v = \omega_e (V + \frac{1}{2}) - x_e \cdot \omega_e (V + \frac{1}{2})^2$$

x_e ثابت ناهماهنگی : میزانی از ناهماهنگی نوسانگر
 اگر $x_e = 0$ باشد نوسانگر هماهنگ است.

به آن اندازه که می کشیم فشرده نمی تواند شود. زیرا نیروی دافعه هسته نمی گذارد.
 فرض : در بخشی از مولکول C-H باشد:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad K = \text{ثابت فنر}$$

$$\mu = 1.53 \times 10^{-27} \text{ Kg} \rightarrow \mu = \frac{m_H \cdot m_C}{m_H + m_C} = \frac{1 \text{ U} \cdot 12 \text{ U}}{1 \text{ U} + 12 \text{ U}}$$

جرم کربن $1 \text{ U} = 1.66 \times 10^{-27} \text{ Kg} = \frac{1}{12}$ جرم کربن m_C : جرم هیدروژن m_H :

به فرض هماهنگ بودن

$$K = \text{ثابت پیوند} = 500 \text{ N.m}^{-1} = 500 \text{ Kg.S}^{-2}$$

$$\nu = \frac{1}{2 \times 3.14} \sqrt{\frac{500 \text{ Kg.S}^{-2}}{1.53 \times 10^{-27} \text{ Kg}}} = 9.1 \times 10^{13} \text{ Hz}$$

در هر ثانیه 9×10^{13} بار دو اتم به هم نزدیک می شود.

$$\omega = \frac{1}{\lambda} = 1 / \frac{c}{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{9.1 \times 10^{13}}{c} = 3.33 \text{ cm}^{-1}$$

ω از جنس طول نیست = واحدی از انرژی است

$$\omega = 2167 \text{ cm}^{-1} \quad \nu = 6.5 \times 10^{13} \text{ S}^{-1} \quad k = 1902 \text{ Nm}^{-1} \quad \text{C=O در مورد}$$

ω مضربی از ۱۰۰۰ است معمولا.

ν تابع جرم است و تغییر نمی کند ولی k تغییر می کند.

توزیع بولتزمن :

در هر سطح یک تعداد مولکول است تعداد مولکول ها در تراز انرژی E_1 نسبت به تعداد مولکول ها در تراز انرژی E_0

ارتباط بین تعداد ذرات یک گروه و اختلاف انرژی آن گروه با بقیه را نشان می دهد:

N_0 تعداد ذراتی که در سطح پایین انرژی وجود دارند

N_1 تعداد ذراتی که در سطح بالای انرژی وجود دارند

اختلاف انرژی بین دو سطح در دمای T برابر است با ΔE

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{e^{-E_1/kT}}{e^{-E_0/kT}} = e^{-\Delta E/kT} = e^{-h\nu/kT} = e^{-hC\omega/kT} \quad k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1} \quad \text{ثابت بولتزمن}$$

T = دمای مطلق (کلوین)

T چقدر باشد که $0/1 = \frac{N_1}{N_0}$ باشد <<<<< کلوین $T = 626.6 \text{ K} = 353.5^\circ \text{C}$ دمای خیلی بالایی است.

در دمای اتاق به ندرت در E_1 هستند.

مثال: $\Delta E = 0$ نسبت $\frac{N_1}{N_0}$ را حساب کنید.

$$\blacktriangleright N_1 = N_0 e^{\frac{-\Delta E}{KT}}$$

$$\blacktriangleright \frac{N_1}{N_0} = e^0$$

$$\blacktriangleright \frac{N_1}{N_0} = 1$$

$$\blacktriangleright N_1 = N_0$$

مثال: $\Delta E = \infty$ نسبت $\frac{N_1}{N_0}$ را حساب کنید.

$$\blacktriangleright N_1 = N_0 e^{\frac{-\Delta E}{kT}}$$

$$\blacktriangleright \frac{N_1}{N_0} = e^{-\infty}$$

$$\blacktriangleright \frac{N_1}{N_0} = \frac{1}{e^{\infty}}$$

$$\blacktriangleright \frac{N_1}{N_0} = 0$$

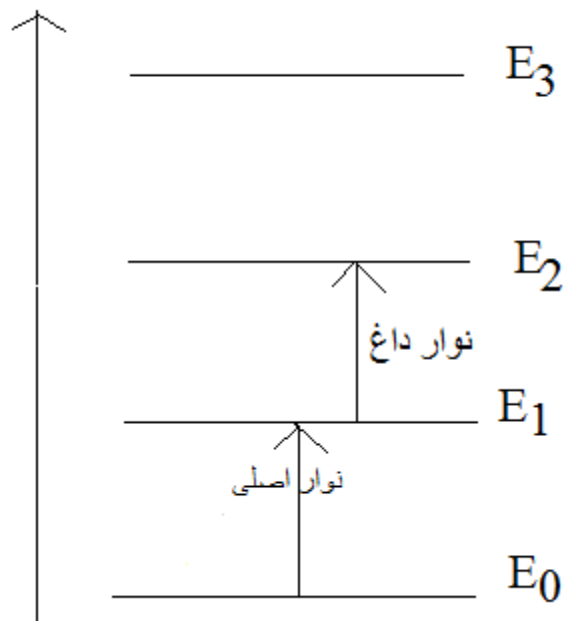
$$\blacktriangleright N_u = 0$$

همه ذرات در سطح انرژی پایین خواهند بود

اگر می خواهیم مولکول را با پرتوافشانی برانگیخته کنیم باید انقدر انرژی بدهیم که از سطح تراز انرژی E_0 به E_1 برود. برای اینکه به E_2 بروند باید انرژی بیشتری بدهیم.

نوارهای طیفی از انتقال E_0 به E_1 شدیدتر است = نوار اصلی Band.

از E_1 به E_2 دیده نمی شود ط وقتی تعداد مولکول ها زیاد باشد دیده می شود. در دمای خیلی بالا جمعیتی که در E_1 هستند به E_2 منتقل می شوند. که به این نوار نوار داغ می گویند.



در طیف سنجی IR: منبع نوری احتیاج داریم که انرژی لازم را فراهم کند که از یک سطح انرژی به سطح دیگر انرژی انتقال یابند. منبع نور این دستگاه در محدوده انرژی $400-14285\text{ cm}^{-1}$ هستند.

$<400\text{ cm}^{-1}$ Far-IR اطلاعات محدودی می دهد.

$400-4000\text{ cm}^{-1}$ Mid-IR در عمل بیشتر با این ناحیه سرکار داریم.

$4000-14285\text{ cm}^{-1}$ Near-IR اطلاعات محدودی می دهد.

Mid-IR: $400-1800$, $1800-4000$

$400-1800$:Finger print تفسیر ندارد. ناحیه اثر انگشت یا

برای هر مولکول مختلف متفاوت است. براساس آن می توان مولکول را با کامپیوتر شناسایی کرد.

وقتی یک طیف IR از یک مولکول می گیریم در ناحیه $400-1800$ خیلی شلوغ است ولی در $1800-4000$ خلوت است. یک مولکول تعداد زیادی پیوند و زاویه پیوند دارد. هر ارتعاش یک نوار اصلی دارد. پس ناحیه $400-1800$ شلوغ است.

وقتی از یک نمونه طیف IR می گیرند از نمونه جامد استفاده می کنیم. چون ارتعاش مطلق را در نمونه جامد داریم. برای رتعاش خالص از نمونه جامد استفاده می کنیم.

حرکت انتقالی در نمونه جامد نداریم حرکت انتقالی در گاز و کمی در مایع داریم. طیف های حلال اختلال ایجاد می کنند.

محلول جامد: برای تهیه نمونه، باید نمونه رقیق شود و تعداد مولکول ها در نمونه کمتر شود. برای این منظور از KBr استفاده می کنیم به عنوان حلال جامد. چون ناحیه ارتعاش آن خارج از 400-4000 است.

پودر نمونه جامد را با پودر KBr مخلوط و قرص می سازند لایه جامد را به عنوان سل در دستگاه IR می گذاریم.

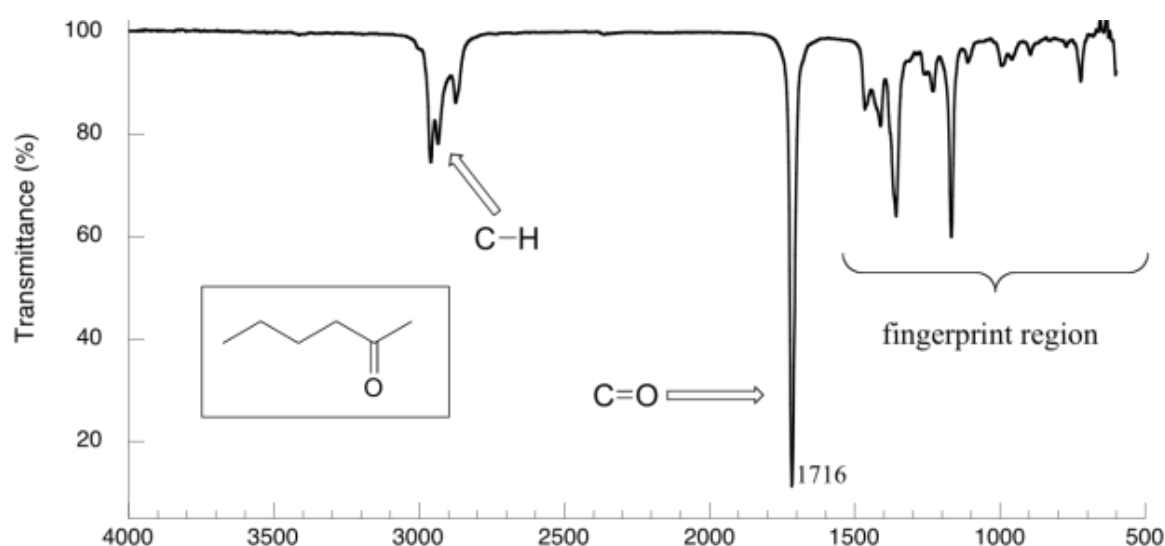
علاوه بر KBr از NaCl و نمک های دیگر می توان استفاده کرد.

KBr چند ویژگی دارد: ارزان، در دسترس، ارتعاش آن خارج از 400-4000. با خلوص خوبی در اختیار داریم.

پیوند O و H دچار کشش شود نواری ایجاد می کند که در ۳۴۰۰ ظاهر می شود.

نوار C=O خیلی مهم است در پروتئین ها خیلی واضح است.

می توانیم گروه های عاملی را با IR، کشف کنیم ولی تعداد نمی توانیم بگوئیم. طیف سنجی IR وقتی استفاده می کنیم که در بخشی از مولکول دچار مشکل هستیم.

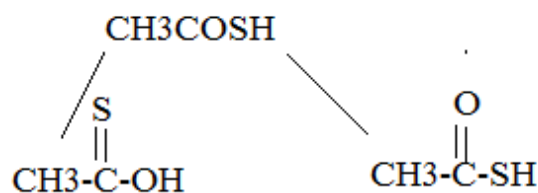


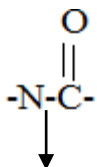
مثال: یک اسید استیک داریم. CH_3COOH به جای یکی از اکسیژن ها سولفور نشسته باشد. CH_3COSH حال سوال این است که اکسیژن سولفور نشسته است.

C=O 1730 cm^{-1}

S-H 2600 cm^{-1}

C=S 1100 cm^{-1}





پیوند پیتیدی

طیف IR محلول های پروتئینی پیچیده است. بخش مهم بخش آمیدی است.

کشش N-H: ۳۳۰۰ A: و ۳۱۱۰ B: هر دوی نوار ها مربوط به کشش NH است.

طیف سنجی رامان: RAMAN

از لحاظ مطالعات بدست آمده شبیه IR است. در طیف سنجی رامان ارتعاش را بررسی می کنیم. اگر یک ارتعاش در IR مطالعه شود این ارتعاش باید حتما باعث تغییر ممان دوقطبی مولکول شود. کشش متقارن در IR قابل مطالعه نیست. اما در رامان قابل مطالعه است. در رامان اساس ایجاد ممان دوقطبی موقت نیست بلکه اساس هرگونه تغییر در ابر الکترونی است. با کشش یا فشرده شدن پیوند ابر الکترونی جابجا و پراکندگی نور اتفاق می افتد. پراکندگی نور را می توان مطالعه کرد.

چرا آسمان آبی است: پراکندگی زمانی اتفاق می افتد که طول موج نور بیشتر از اندازه ذره باشد نور مرئی ۴۰۰-۷۸۰ است. پس نور با مولکول هوا برخورد می کند. ابعاد ذرات خیلی کمتر از طول موج نور است پس نور پراکنده می شود. میزان پراکندگی نور متناسب است با $\frac{1}{\lambda^4}$ نور آبی برابر بیشتر پراکنده می شود.

در مه پدیده انکسار نور رخ می دهد که مستقل از طول موج است همه نور ها به یک اندازه دچار انکسار می شود. در مولکول ها با مراکز تقارن ارتعاشات شان هم در IR و هم در رامان فعال است. در مولکول ها بدون مرکز تقارن ممکن است ارتعاشاتی پیدا شود که در هر دو فعال باشد.

یک نور با طول موج $h\nu$ برخورد بدیم با یک مولکول که دارای تراز انرژی است. چند اتفاق می تواند رخ دهد.

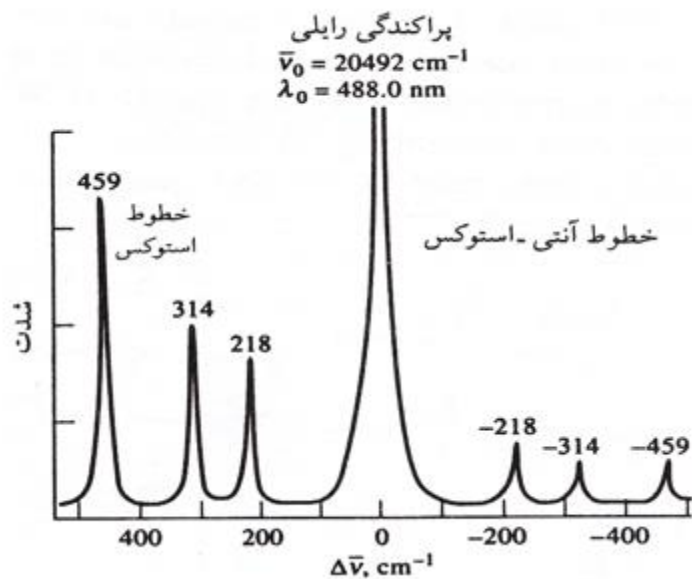
۱- فقط تغییر جهت رخ می دهد $\nu = \nu'$ به این پراکنش پراکندگی رایلی می گویند: پراکندگی که جهت فوتون تغییر می کند بدون تغییر در سطح انرژی.

۲- بخشی از انرژی را به سیستم می دهد و خود دچار تغییر جهت می شود. $\nu' < \nu$ پراکندگی استوکس: ضمن تغییر جهت در فضا بخشی از انرژی را به سیستم بدهد.

۳- اگر سیستم در حالتی ناپایدار بوده و قبلا انرژی گرفته باشد فوتون که به آن می رسد انرژی را از آن گرفته و نیز جهت آن تغییر می کند آنتی استوکس: $\nu' > \nu$

در مولکول بیشتر فضای خالی است بیشتر انحراف نور (رایلی) اتفاق می افتد. بین استوکس و آنتی استوکس ، استوکس بیشتر اتفاق می افتد.

در رامان سه خط خواهیم دید ارتفاع خط رابلی خیلی شدید است و اطلاعاتی به ما نمی دهد چون اندر کنشی رخ نداده است. اندرکنش استوکس و آنتی استوکس رخ می دهد مربوط به ترازهای انرژی ارتعاشات مولکول است. چون خیلی ضعیف اند باید تقویت شوند پس منبع نور خیلی قوی مثل لیزر لازم است میلیاردها فوتون لازم است. نور لیزر تعداد فوتون زیادی برای ما تولید می کند.



اساس لیزر : LASER : Light Amplification by Stimulate Emission Radiation

یک سیستم دارای تراز انرژی تحت تاثیر نور چه اتفاقی ممکن است.

وتی جذب اتفاق بیافتد و به تراز بالاتر رفت باید برش گردانیم با تحریک فوتون. اگر خودش بر گردد نشر خودبخود نور اتفاق می افتد. تراز های انرژی عمری دارند پس باید با تحریک با فوتون دیگری آن را برگردانیم از نظر کوانتومی طول موج این فوتون باید با طول موج نور تحریک کننده اولیه برابر باشد تا بتواند به تراز انرژی خودش برگردد.

در لیزر منبعی از مولکول های تحریک شده داریم یک فوتون به این منبع بزنیم دریایی از فوتون دریافت می کنیم. خلاصه: تقویت نور توسط نشر تحریکی تابش LASER در سیستم رامان منبع لیزر است. در رامان وجود آب تداخلی ایجاد نمی کند برعکس IR.

در IR و رامان در هر دو ارتعاشات را بررسی می کنیم. در IR جذب نور و در رامان پراکنش نور (استوکس و آنتی استوکس) مطالعه می شود. نوع نگاه فرق می کند.

تکنیک Circular Dichorism : CD دو رنگ نمایی دورانی

تفاوت با تکنیک های دیگر: دو نوع نور استفاده می شود پس دو نوع منبع نور داریم. نور چپگرد و راستگرد. برخی مولکول ها مرکز Chiral دارد نور راستگرد یا چپگرد را فقط جذب می کند.

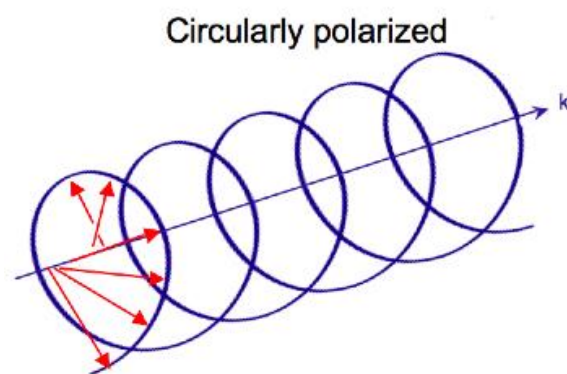
مولکول کایرال چیست؟

مولکول به طور ذاتی و به واسطه ی ساختار ویژه اش کایرال باشد.

مولکول توسط یک پیوند کوالان به یک مرکز کایرال متصل شده باشد.

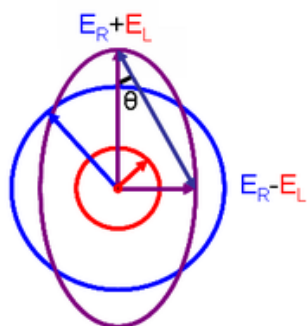
مولکول در یک محیط نامتقارن قرار گرفته باشد.

اگر نور چپگرد و راستگرد بتابانیم ولی با نمونه برخورد نداشته باشد یک نور دایره ای خواهیم داشت.



اگر با نور چپگرد برهم کنش داده شود: نوری که خواهیم دید بیضی شکل خواهد بود بیضی دو قطر کوچک و بزرگ دارد یک اختلاف در جذب نور راستگرد و چپگرد منجر به ایجاد نور بیضی شل می شود.

$$\Delta A = A_{\text{left}} - A_{\text{right}}$$



هرچه قدر interaction ایجاد شود هرچه بیشتر باشد کشیدگی بیضی بیشتر می شود که با پارامتری به نام θ

تعریف می شود. یک زاویه ایجاد می شود $\theta = \text{tg}^{-1} \frac{b}{a}$ = بیضیواری یا تحت شدگی

واحد θ درجه است (degree). با قواعد مثلثات رابطه ای بین θ و ΔA برقرار می کنند.

$$\theta = 32098 \Delta A$$

داده خام دستگاه CD اندازه گیری می کند θ است.

رابطه بیرلامبرت در CD:

$$A = \epsilon b C \quad \theta = [\theta] b C \quad [\theta] = \frac{\theta}{b C}$$

$$C = \frac{\text{غلظت}}{\text{غلظت}} = \frac{\text{Mol}}{\text{Lit}} \quad \text{بیضیواری مولار} = \text{بیضیواری یک محلول ۱ مولار} \quad [\theta]$$

C را چگونه حساب کنیم چه چیزی در محلول بیولوژیکی هست. پیوندهای پپتیدی در داخل پروتئین جذب نور چیگرد و راستگرد متفاوت داشته باشند.

M = جرم مولکولی پروتئین N: تعداد ریشه های اسید آمینه N-1: تعداد پیوندهای پپتیدی

MRW=Mean Residual Rate= $\frac{M}{N-1}$ میانگین وزن قطعاتی که می تواند جذب داشته باشد.

چند طعه در پروتئین وجود دارد که می تواند جذب داشته باشد.

در پروتئین های مختلف معمولاً MRW=110

$$C = \frac{\text{غلظت گرمی}}{\text{جرم مولکولی}} = \frac{\text{MRW}}{\text{واحد حجم}} \quad [\theta] = \frac{\theta}{b C} \quad [\theta] = \frac{\theta}{b \frac{\text{MRW}}{\text{واحد حجم}}}$$

اگر غلظت پروتئین C باشد در $g \text{ cm}^{-3}$

$$C = \frac{\text{غلظت گرمی}}{\text{جرم مولکولی}} = \frac{\text{MRW}}{\text{واحد حجم}} \quad \text{تعداد مول} = \frac{\text{غلظت مول بر لیتر}}{\text{MRW}} = \frac{g \text{ cm}^{-3}}{\text{MRW}}$$

$$[\theta] = \frac{\theta \text{ MRW}}{b C} \quad \theta: \text{degree} \quad \text{MRW: Mol}^{-1} = (10 \text{ dmol})^{-1} \quad b: \text{cm} \quad C: g \text{ cm}^{-3}$$

$$[\theta] = \frac{\theta 10^{-1} \text{ MRW}}{b C} = \frac{\theta \text{ MRW}}{10 b C} \quad \text{deg. dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \text{ مولار بیضیواری مولار دیمانسین}$$

اگر غلظت $mg \text{ cm}^{-3}$ باشد چون اغلب غلظت پروتئین ها کم است

$$[\theta] = \frac{\theta \text{ MRW}}{10 b 10^{-3} C} = \frac{100 \theta \text{ MRW}}{b C}$$

کاربرد های طیف سنجی CD

✓ مطالعه فرایند تا خوردن و باز شدن پروتئین ها

✓ مطالعه پیوند لیگاند به پروتئین

✓ مطالعه پروتئین های غشایی

✓ مطالعه اسید های نوکلئیک

✓ مطالعه پیوند لیگاند به اسید نوکلئیک

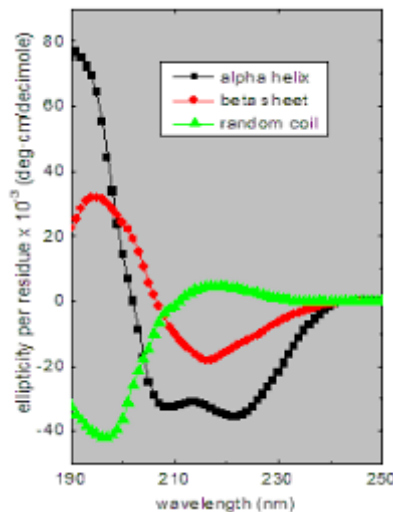
✓ مطالعه بر همکنش پروتئین -اسید نوکلئیک

سه ناحیه مختلف در طیف CD داریم:

Far uv CD ناحیه فرابنفش دور ۱۹۰ تا ۲۵۰ نانومتر

Near uv CD ناحیه فرابنفش نزدیک ۲۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر

Visible CD ناحیه مرئی ۳۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر



ساختار ثانویه را می توان با طیف سنجی CD در ناحیه طیفی "دور-اشعه ماوراء بنفش" (۲۵۰-۴۵۰ نانومتر) تعیین کرد. در این طول موجها ، کروموفور پیوند پپتید است و هنگامی که در یک محیط فولد و منظم قرار دارد، سیگنال بوجود می آید. ساختارهای مارپیچ آلفا ، بتا ، و کویل تصادفی هر یک شکل و بزرگی از طیف CD را ایجاد می کنند. این توسط نمودار بالا نشان داده شده است ، که طیف های پلی لیزین را در این سه شکل مختلف نشان می دهد. کسری تقریبی از هر نوع ساختار ثانویه که در هر پروتئین وجود دارد. از این رو می توان با تجزیه

و تحلیل طیف CD-UV دور آن به عنوان مجموعه ای از چند برابر کسری از این طیف های مرجع برای هر نوع ساختاری تعیین کرد.

چون پیوندهای پپتیدی در پروتئین زیاد است باید از حجم کمی از پروتئین استفاده شود. 0.2 mg.cm^{-3} در ناحیه near-UV باید حجم و غلظت بیشتر استفاده کرد چ.ن اسیدآمینه های آروماتیک مورد مطالعه قرار می گیرد مه تعدادشان در پروتئین کم است 1.5 mg.cm^{-3}

بیضی واری مولار می تواند منفی باشد چون θ می تواند منفی باشد

سیگنال CD مانند تمام تکنیک های طیف سنجی ، به طور متوسط کل جمعیت مولکولی را منعکس می کند. بنابراین ، در حالی که CD می تواند تعیین کند که یک پروتئین حاوی حدود ۵۰٪ آلفا مارپیچ است ، اما نمی تواند تعیین کند که کدام باقیمانده های خاص در قسمت آلفا مارپیچ نقش دارند. از طول موج های شاخص برای تعیین ساختار دوم پروتئین استفاده می شود. نرم افزارهایی وجود دارد که محاسبات را انجام می دهد و درصد می دهد ولی جمع آنها ۱۰۰ نمی شود چون خطایی در محاسبه وجود دارد باید محاسبه نرمایزه شود مثلا جمع ۱۰۵ شده باید از ۱۰۰ حساب کرد که درصد چقدر بوده است.

جزوه بخش بیوترمودینامیک دکتر راحله ترابی

گرما: صورتی از انرژی است که از یک سیستم با دمای بالا به سیستم دیگری با دمای کمتر انتقال می یابد.

گرما ویژه: مقدار گرمای لازم برای افزایش دمای جرم واحد به اندازه ۱ درجه

تعریف بیوترمودینامیک: مطالعات گرما و اثرات آن بر سیستم های بیولوژیکی

اهمیت و تاثیر گرما بر موجودات زنده: جریانات حرارتی در سیستم های زنده از اهمیت بسیار بالایی برخوردارست چرا که گرما، در موجود زنده می تواند منتهی به تغییرات ترمودینامیک شود. چراکه گرما، در موجود زنده می تواند منتهی به تغییرات ساختاری و نهایتا تکاملی شود. گرما با تاثیر در پروفایل بیان ژن ها و تغییراتی در چرخه های سلولی، می تواند منجر به تغییرات ساختاری و رفتاری سلول ها و موجودات زنده شود

سیستم ترمودینامیکی: مقداری از ماده با جرم مشخصی که مورد بررسی قرار می‌گیرد سیستم می‌نامیم.

محیط: آنچه در اطراف یک سیستم ترمودینامیکی واقع شده است.

مطالعه خواص ماکروسکوپی سیستم‌ها شامل حجم، فشار، دما: ترمودینامیک کلاسیک

مطالعه خواص میکروسکوپی ذرات سیستم‌های ترمودینامیکی: ترمودینامیک آماری

خواص مقداری: وابسته به مقدار سیستم هستند؛ هرچه مقدار ماده تشکیل دهنده سیستم بیشتر باشد مقادیر وابسته به این خواص افزایش می‌یابد؛ همانند گرما، جرم، فشار، تعداد اتم‌های سازنده یک مولکول، آنتروپی، آنتالپی، وزن، حجم .

خواص شدتی: وابستگی به مقدار ندارند. معمولاً از نسبت دو خاصیت مقداری بدست می‌آیند. همانند دما، دانسیته، سختی، فشار، غلظت.

فاز: به هر بخش همگن یک سیستم یک فاز می‌گوییم؛ مثلاً سیستم آب و یخ که ناهمگن است و از دو بخش همگن آب و همگن یخ تشکیل یافته است؛ پس دو فاز است در حالیکه سیستم آب و الکل، تک‌فازی است.

جزء: حداقل انواع مستقل که برای تعریف فازهای یک سیستم بکار می‌رود. مثلاً تعداد جزءهای آب خالص، یک است (همگن، تک‌فاز، تک‌جزء) اما سیستم آب و الکل همگن، تک‌فاز و دو جزئی است.

مثلاً یک سلول دارای ۷۰ درصد آب است به علاوه چربی‌های نامحلول در آب (ناهمگن در آب) و سایر مولکول‌های محلول در آب (همگن با آب) شامل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و کربوهیدرات‌ها. بدون در نظر گرفتن مواد معدنی سلول دو فاز ناهمگن و دارای ۵ جزء است.

درجه آزادی: طبق تعریف برابر تعداد متغیرهای مستقل (ابعاد) لازم برای توصیف یک سیستم است، بدون اینکه باعث آشفتگی و تغییر در تعداد فازهای در حال تعادل شوند؛ $F = P + 2 - C$

انواع سیستم‌های ترمودینامیکی:

سیستم‌های منزوی: در این سیستم نه ماده و نه انرژی بین سیستم و محیط تبادل نمی‌شود.

سیستم بسته: در این سیستم فقط انرژی بین سیستم و محیط تبادل می شود. مانند فلاکس چای در بسته

سیستم باز: هم ماده و هم انرژی بین سیستم و محیط تبادل می شود. مانند ظرف آب در باز در حال جوشیدن. موجود زنده: سیستم باز

تعریف تعادل: اگر مقدار خاصیت ترمودینامیکی در تمام نقاط سیستم یکسان باشد می گوئیم سیستم در حال تعادل است

تعریف فرایند: تغییر سیستم از حالتی به حالت دیگر را فرایند می نامند. به این ترتیب می توان گفت اگر یکی از خواص ترمودینامیکی سیستم تغییر کند در حقیقت حالت تعادل اولیه از بین رفته و فرایندی صورت گرفته است. این فرایند ادامه پیدا می کند تا سیستم به حالت تعادل جدید برسد. فرایند آدیاباتیک (بی دررو): فرایندی که انتقال گرما در آن صفر باشد.

با در رو diathermic: سیستم ها توسط دیواره های با در رو diathermic از محیط جدا شوند: رسانش گرمایی دارند

انرژی درونی + انرژی پتانسیل + انرژی جنبشی = انرژی سیستم

آنتالپی سیستم، تابعی ترمودینامیکی است که با مجموع انرژی درونی سیستم و حاصلضرب حجم در فشار آن (در فشار ثابت) در محیط سیستم، هم ارز است. به عبارت دیگر گرمای جذب شده بوسیله واکنشی که در فشار ثابت انجام می گیرد، برابر با تغییر آنتالپی سیستم است. اگر کمیت های W, U, Q به ترتیب گرما، انرژی درونی و کار باشند:

$$dQ = dU + dW \rightarrow dW = PdV \rightarrow dQ = d(U + PV) \rightarrow H = U + PV \rightarrow dQ = d(U + PV) \rightarrow dQ = dH$$

بنابراین هرگاه فرایندی هم فشار بر روی دستگاهی انجام شود گرما داده شده یا گرفته شده از دستگاه با تغییر آنتالپی آن برابر است. از همین رو آنتالپی را محتوای گرمایی دستگاه نیز می نامند.

انتروپی پخش شدن خود به خودی انرژی را نشان می دهد: در یک دمای خاص، چه مقدار انرژی در یک فرایند پخش می شود یا با چه وسعتی پخش می شود میزان کار تورگی یا بی نظمی یک

سیستم که به عنوان معیار خودبخودی واکنش بکار می‌رود، آنتروپی نامیده می‌شود که برحسب K.mol^{-1} لبوده و با S نمایش داده می‌شود:

انتروپی جامد > انتروپی مایع > انتروپی گاز

رابطه ی بین آنتروپی و آنتالپی در یک سیستم بسته: $T \cdot \Delta S = \Delta H$

در این جا، T دمای مطلق، ΔH تغییر در آنتالپی، ΔS تغییر در آنتروپی می‌باشد. مطابق با این معادله، افزایش در آنتالپی یک سیستم باعث افزایش در میزان آنتروپی آن می‌گردد.

قوانین ترمودینامیکی:

قانون صفرم می‌گوید وقتی دو جسم با جسم سومی برابری دما داشته باشند خود آن دو جسم نیز با هم برابری دما دارند و در تعادل گرمائی می‌باشند.

قانون اول به صورت کلی می‌گوید انرژی و ماده به وجود نمی‌آیند و از بین نمی‌روند. تنها شکل شان از جامد، مایع، گاز و پلاسما تغییر میکند.

انرژی داخلی سیستم، بیان‌کننده کل محتوای انرژی یک سیستم است؛ انرژی داخلی هر سیستمی برابر مجموع محتوای انرژی تک تک مولکول‌های سازنده سیستم است.

انرژی هر ملکولی به انواع حرکات ممکن آن برمی‌گردد: هر ملکولی قابلیت انجام سه نوع حرکت را دارد ۱. **حرکت‌های انتقالی:** جابجایی ملکول در راستای محورهای سه گانه ۲. **حرکت‌های چرخشی** یا چرخش ملکول حول محورهای تقارن ۳. **حرکت‌های ارتعاشی** ناشی از ارتعاش اتم‌های سازنده ملکول‌ها در طول پیوندهای درون ملکولی.

(ΔE) تغییر در انرژی سیستم برابر مجموع (q) جریان گرما برسیستم در طول فرآیند و (w) کار انجام‌شده است: $\Delta E = W + q$

مجموع انرژی سیستم و محیط ثابت است، یعنی اگر انرژی سیستم به اندازه ای زیاد شود، انرژی محیط به همین اندازه کم می‌شود؛ برای هر فرایندی انرژی کل سیستم و محیط (در مجموع جهان) ثابت میماند: $\Delta E_{\text{sys}} + \Delta E_{\text{surr}} = 0$

اگر طی انجام فرایندی:

جریان گرمایی از محیط به سیستم وارد شود: ($q > 0$)

جریان گرمایی از سیستم به محیط باشد: ($q < 0$)

اگر سیستم بر محیط کار انجام دهد: ($W < 0$)

اگر محیط بر سیستم کار انجام دهد: ($W > 0$)

پس در حالت کلی تغییر در انرژی درونی یک سیستم طی یک فرایند به دو پارامتر جریان گرمایی و انجام کار بستگی دارد و تابع حالات اولیه (قبل از فرایند) و پس از انجام فرایند (نهایی) است و به مسیر طی آن ارتباطی ندارد $\Delta U = U_{\text{final}} - U_{\text{initial}}$:

قانون دوم ترمودینامیک: کلیه فرایندهای انجام شده در جهان، به سمت افزایش آنتروپی می باشند!

شکل کمی قانون دوم: $S = k_B \ln W$ که S برابر آنتروپی سیستم k_B ثابت بولتزمن و W تعداد جایگاه های احتمالی ذرات و ملکولهای سازنده سیستم یا تعداد حالات سیستم است.

ظرفیت حرارتی

هرگاه مقدار حرارت q به سیستم منتقل شود و دما از T_1 به T_2 تغییر کند؛ رابطه زیر برقرار است:

$$q = C (T_2 - T_1)$$

C؛ ظرفیت حرارتی: ضریبی که وابسته به جنس و وزن و نمونه است

گرمای ویژه: اگر ضریب C برای ۱ گرم از ماده تعریف شده باشد

ظرفیت حرارتی مولی: اگر ضریب C برای ۱ مول از ماده تعریف شده باشد

ظرفیت حرارتی به دمای اندازه گیری بستگی دارد. بنابراین برای تعریف دقیق، باید از دیفرانسیل و تغییرات بینهایت کوچک حرارت و دما استفاده کرد.

باز آرای رابطه بالا به شکل دقیق: $dq = C dT$ و یا $C = dq/dT$

بدین ترتیب حرارت لازم برای انتقال سیستم از دمای T_1 به T_2 عبارت است از:

$$\Delta q = \int_{T_1}^{T_2} C dT$$

انتقال حرارت وابسته به مسیر و روش انتقال؛ انتگرال را فقط در صورتی میتوان حساب کرد که مسیر آن از T_1 به T_2 دقیقاً مشخص باشد؛ ظرفیت حرارتی تابعی از نوع فرایند است

برای فرایند در حجم ثابت: ظرفیت حرارتی در حجم ثابت: $C_V = (dq_V)/dT$

برای فرایند در فشار ثابت: ظرفیت حرارتی در فشار ثابت: $C_P = (dq_P)/dT$

انرژی آزاد: انرژی مفید سیستم است که می تواند به کار تبدیل شود.

انجام پذیری واکنش رابطه تغییرات انرژی آزاد گیبس ضمن واکنش بصورت زیر است

$$\Delta G = \Delta H - TS$$

واکنش تعادلی $\Delta G = 0$ ، واکنش خودبخودی $\Delta G < 0$ ، واکنش غیر خودبخودی $\Delta G > 0$

قانون سوم ترمودینامیک: دردمای صفر مطلق، آنتروپی تمام مواد صفر است.

این قانون صرفاً در مورد ملکولهایی صادق است که از اتم های یکسان تشکیل شده اند؛

چرا که اگر اتم ها یکسان نباشند، دردمای صفر مطلق حتی اگر فرض کنیم هیچ حرکتی وجود نداشته باشد، آرایش اتمهای کاملاً ساکن نسبت به هم متفاوت خواهد بود و این خود درجه ای از آنتروپی بوده و آنتروپی صفر نخواهد بود!

کاربرد های بیوترمودینامیک: تعیین پایداری پروتئین، تعیین T_m به عنوان یک شاخص پایداری، بررسی تغییر فرآیندهای بیولوژیکی، دنا تورا سیون

بدست آوردن پارامترهای ترمودینامیکی

روش مستقیم: روش گرماسنجی: کالریمتری، میکروکالریمتری در کالریمتری روبشی تفاضلی (DSC) • کالریمتری تتیراسیون ایزوترمال (ITC) •

روشهای غیر مستقیم و محاسباتی • طیف سنجی • UV-Vis دیالیز تعادلی

کالریمتری روبشی تفاضلی (DSC)

اساس: تغییر دادن دمای یک نمونه با سرعتی معین

گرمای لازم برای افزایش یک درجه دمای نمونه در فشار ثابت را ظرفیت گرمایی در فشار ثابت (Cp) می گویند.

کار: اندازه گیری ظرفیت گرمایی در فشار ثابت (Cp) از اختلاف Cp نمونه ها می توان به تفاوت آنها با همدیگر پی برد.

در یک نمودار متعارف Cp حداقل 3 بخش قایل رویت است:

بخش خطی نخست: وجود حالت طبیعی (N) ماکرومولکول

یک قله یا یک مینیوموم: ناشی از تغییر فاز به ترتیب در فرآیند گرماگیر و قرآیندهای گرمازا

بخش خطی پایانی: حالت بعد از تغییر فاز (حالت دناتوره) D (پس از دناتوراسیون)

استفاده از اطلاعات بدست آمده از DSC

1. Tm: دمایی که % ۰.۵ مولکول ها تغییر فاز داده اند. معرف پایداری مولکول هاست. (قله در نمودار Cp)

۲. ΔCp دناتوراسیون: امتداد خط N و D در نمودار Cp و اختلاف Cp بر ری خط D از مقدار Cp بر ری خط N در یک دمای معین

۳. دناتوراسیون ΔH : سطح محصور بین دو خط N و D در هر دما به تغییر انتالپی دناتوراسیون که اختلاف گرمای حالت دناتوره از حالت طبیعی را نشان می دهند.

۴. تعیین تعداد دومین ها و زیر دومین ها: اگر در طی تغییر فاز مراحل به اندازه کافی از هم فاصله داشته باشند چند قله ظاهر می شود.

۵. تغییرات در خط N: خط N کاملاً خطی نیست و مربوط به تغییرات کانفرماسیونی توام با تغییرات اندک انرژی مولکول

۶. مطالعه اثر لیگاند: اتصال یا حذف لیگاند باعث تغییرات در نمودار DSC

۷. مطالعه برهمکنش ماکرومولکول ها: تغییرات طیف DSC ناشی از تغییرات پایداری حاصل از برهمکنش ماکرومولکول ها

۸. تغییر فاز لیپیدها: تغییر فاز لیپید خالص و لیپید همراه با پروتئین. برهمکنش لیپید با پروتئین سبب پایداری ساختار لیپید می شود.

۹. مطالعه کشت سلول ها: جمعیت سلول ها در شرایط مختلف

۱۰. مطالعه سیستم های غیربرگشت پذیر

۱۱. مطالعه آب اطراف پروتئین ها

پارامترهای ترمودینامیکی در زیست شناسی

نقطه ذوب (T_m) = تعادل فاز جامد و مایع در فشار ۱ اتمسفر

T_m ماکرومولکولها: دمایی که در آن ۵۰٪ از ماکرومولکول در حالت طبیعی و بقیه غیر طبیعی هستند

بالا بودن T_m نشان دهنده: مقاومت آن در برابر دماست

بالا بودن T_m نشان دهنده: گرمای بالای مورد نیاز جهت تغییر فاز

T_m مانند یک قفل است، هر چه T_m بالاتر باشد؛ قفل ساختاری مولکول در دمای بالاتری باز می شود

دمین های ترانسفرین

در غیاب آهن؛ $T_m = 60$ و 70 درجه

در حضور آهن؛ $T_m =$ بالای 80 درجه

اتصال فلزات مخصوصا کلسیم باعث افزایش T_m و پایدار کننده ماکرومولکولها (پروتئین)

در DNA دو رشته ای افزایش C-G سبب افزایش T_m

اندازه گیری T_m در DSC

T_m = اوج پیک C_p در مقابل T

یک مولکول ممکن است یک T_m داشته باشد؛ یا بخشهای مختلف آن در چند مرحله تغییر فاز دهند؛ چند T_m داشته باشد

– استفاده از تغییرات آنتالپی در تغییر فرایندهای بیولوژیک

موجودات زنده موتورهای هستند که در فشار ثابت کار می کنند .

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT$$

- ▶ ظرفیت حرارتی پروتئین در حالت طبیعی C_{pN}
- ▶ ظرفیت حرارتی پروتئین در حالت غیر طبیعی C_{pD} (دنا توره)
- ▶ ΔC_{pD} ؛ اختلاف C_{pN} و C_{pD}

$$\Delta H_D = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_{pD} dT$$

C_{pN} کوچکتر از C_{pD} بنابراین؛ ΔC_{pD} مثبت؛ بنابراین؛ ΔH_D بزرگتر از صفر و فرایند آندوترمیک (گرماگیر) فرایند اگزوترمیک : گرمازا

مثال: اگر مشخصات زیر را بر حسب کیلوژول بر مول کلوین داشته باشیم؛ مقدار ΔH_D از ۳۴۰ تا ۳۵۰ کلوین را محاسبه کنید

► $C_{pN} = T-3$ $C_{pD} = T+2$

► $\Delta H_D = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_{pD} dT$

► $\Delta H_D = \int_{340}^{350} (T + 2) - (T - 3) dT$

► $\Delta H_D = \int_{340}^{350} 5 dT$

► $\Delta H_D = 5 T$ (from 350 to 340)

► $\Delta H_D = 5 (350- 340)$

► $\Delta H_D = 50 \text{ kJ/mol}$

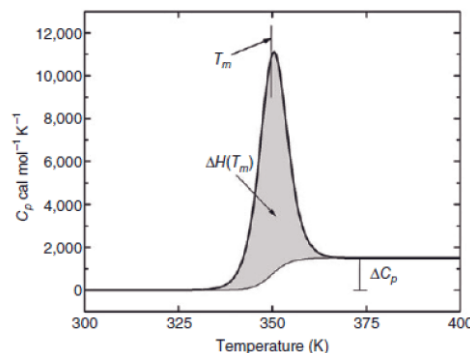
مقدار گرمای تغییر فاز از حالت طبیعی به دناتوراسیون را ΔH_u می گویند

ΔH_d اختلاف گرمای حالت طبیعی و دناتوره را نشان می دهد .

ΔH_u برای پروتئین های مختلف متفاوت

تعیین سهم برهم کنش های یونی ، هیدروژنی و هیدروفوب بر اساس ΔH_u

این نوع آنتالپی که مستقیماً از کالریمتر به دست می آید : آنتالپی (کالریمتری) ($\Delta H \text{ cal}$)



آنتالپی ونت هوف (ΔH_{vh}) (رابطه بین تغییرات دما و ثابت تعادل) با روشهای غیر مستقیم مانند اسپکتروسکوپی به دست می آید • معادله ونت هوف

$$\ln K = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$$

ΔH_{vh} همان مقدار گرمای تغییر فاز از حالت طبیعی به دناتوراسیون

$$\frac{\Delta H \text{ cal}}{\Delta H_{vh}} = k \geq 1$$

$K =$ تعداد حالت‌های سیستم را نشان می‌دهد (متناسب با تعداد دومین‌های پروتئین)

$$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{vh}} = 1 \quad \text{برای سیستم‌های دو حالتی}$$

$K=1$ ؛ یعنی حضور N, D؛

$K=2$ یعنی حضور N, D و یک حد واسطه Intremediate

-استفاده از تغییرات انرژی آزاد

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \text{در حالت تعادل}$$

K ثابت تعادل؛ در فرایند دناتوراسیون تعادلی ماکرومولکول

$$K = \frac{F_d}{1 - F_d}$$

F_d : در هر مرحله از دناتوراسیون، کسری از مولکولها در حالت دناتوره می‌باشد

$$\Delta G^\circ = 0 \quad K = 1 \quad F_d = F_N$$

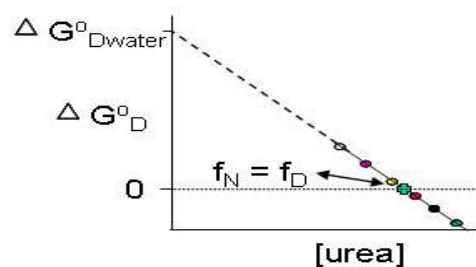
F_N : کسر طبیعی

$D_{\frac{1}{2}}$: غلظتی از دناتوره که در آن $\Delta G^\circ = 0$ ؛ غلظت نیم دناتوره کننده : نشان دهنده مقاومت در برابر

دناتوراسیون شیمیایی

► می‌توان شرایطی را ایجاد کرد که $D_{\frac{1}{2}}$ از این طریق مکانیسم تغییر را مطالعه کرد

► $\Delta G^\circ_{H_2O} : \Delta G^\circ$ غلظت صفر دناتوره کننده؛ بهترین شاخص پایداری پروتئین



$-\Delta S$: شیب نمودار

الکتروفورز:

جداسازی پروتئین های بار دار در میدان الکتریکی طی فرآیندی بنام الکتروموز انجام میگیرد به طور کلی این روش برای تخلیص مقادیر زیاد پروتئین ها مورد استفاده قرار نمی گیرد زیرا معمولا روش های جایگزینی ساده تری وجود داشته و روش های الکتروفورز اغلب دارای اثرات جانبی بر روی ساختمان و بنابراین عملکرد پروتئین ها می باشد.

یکی از مزایای الکتروفورز این است که می توان پروتئین های جدا شده را مشاهده نمود و این به محقق امکان می دهد تا بتواند سریعاً تعداد پروتئین های مختلف موود در مخلوط یا شدت خلوص یک فرآورده ی پروتئینی را برآورد کند. الکتروفورز همچنین امکان تعیینب عضی از خصوصیات مهم پروتئین نظیر نقطه ی الکتریک و حدود وزن مولکولی را فراهم می سازد به طور کلی الکتروفورز پروتئین ها بر روی ژل هایی صورت می پذیرد که از پلی مر پلی اکریل آمید با اتصالات عرضی تشکیل شده است.

نمونه های مختلف در داخل حفره های موجود در بالای ژل پلی اکریل آمید قرار داده می شوند با ایجاد میدان الکتریکی پروتئین ها در داخل ژل به حرکت در می آید.

بعد از الکتروفورز با رنگی نمودن ژل با رنگی نظیر آبی کمانی که پروتئین ها را رنگی نموده و خود ژل را رنگ نمی نماید پروتئین ها را می توان مشاهده نمود باند موجود در ژل یک ۱۴

پروتئین یا یک زیر واحد پروتئینی متفاوت را نشان می دهد پروتئین های کوچکتر سریعتر از پروتئین های بزرگتر در داخل ژل حرکت نموده و بنابراین در نزدیک انتهای پایینی ژل قرار می گیرد.

نشان می دهد خط اول E.COLI پلی مراز را از باکتری RNA این ژل تخلیص آنزیم پروتئین را در عصاره ی خام سلولی نشان می دهد. خطوط بعدی از چپ به راست پروتئین های موجود بعد از هر وحله خالص سازی را نشان می دهد. پروتئین خالص شده دارای چهار زیر واحد بوده که در آخرین خط در سمت راست دیده می شود.

ژل پلی اکویل آمید همانند یک غربال مولکولی عمل نموده و حرکت آنها را تقریباً متناسب با نسبت بار به جرم آن ها آهسته می نماید.

شکل پروتئین ممکن است بر روی حرکت پروتئین اثر نماید ر الکتروفورز نیروی حرکت دهنده ی ماکرومولکول پتانسیل الکتریکی می باشد. حرکت الکتروفوتیک مولکول نسبت (Z) سرعت ذه ی به پتانسیل الکتریکی است. الکتروفوتیک همچنین برابر بار خالص مولکول تقسیم بر ضریب اصطکاک می باشد که تاحدودی شکل پروتئین را نشان می دهد از این رو حرکت پروتئین در یک ژل در هنگام الکتروفورز تابعی از اندازه و شکل آن می باشد.

در یک روش الکتروفوتیک که به طور معمول برای برآورد خلوص وزن مولکولی بکار می رود از دترژنت، سدیم دورسیل سولفات به SDS اکثر پروتئین ها به میزانی اتصال می یابد که تقریباً متناسب با وزن مولکولی SDS برای

هر دو ریشه اسید آمینه می SDS پروتئین است این میزان در حدود یک مولکول اتصال یافته بار خالص منفی زیادی بر پروتئین ایجاد نموده و با خنثی نمودن SDS باشد

SDS بار ابتدایی پروتئین به هر پروتئین نسبت مشا به بار جرم می دهد علاوه بر اتصال کئورماسیون طبیعی پروتئین تحلیل یافته و اکثر پروتئین ها شکل یکسانی پیدا می نماید سبب جدا سازی پروتئین ها تقریبا بر اساس تنها SDS از این رو الکتروفورز در حضور جرم) وزن مولکولی (آنها شده به طوریکه پلی پپتیدهای کوچکت حرکت سریعتری را پیدای نماید بعد از الکتروفورز با افزودن یک رنگ مثل آبی کمانی که به پروتئین ها اتصال یافته و به خود ژل متصل نمی شود و پروتئین ها رویت می گردد.

به این ترتیب می توان پیشرفت یک روش تحلیلص پروتئینی را زیر نظر گرفت . زیرا بعد از هر مرحله جداسازی تعداد باندهای پروتئینی قابل مشاهده بر روی ژل کاهش می یابد در مقایسه با موقعیت پروتئینی با وزن شناخته شده می توان وزن مولکولی یک پروتئین ناشناخته را بدست آورد در صورتیکه پروتئین دارای دو یا چند زیر واحد باشد این زیر واحد از یکدیگر جدا شده و باندهای مربوط به هر زیر واحد باشد این زیر SDS ها در حضور از یکدیگر جدا شده و باندهای مربوط را می توان با الکتروفورز جدا SDS واحدها در حضور نمود.

پلی SDS تخمین وزن مولکولی یک پروتئین حرکت الکتروفرتیک یک پروتئین بر روی ژل ارتباط دارد Mr . اکریل آمید با وزن مولکولی یا پروتئین های استاندارد دارای وزن مولکولی مشخص الکتروفورز می شود A: . شکل خط 1: از این پروتئین ها می تواند برای تخمین وزن مولکولی پروتئین خط دوم ناشناخته استفاده نمود. پروتئین شناخته شده در برابر حرکت آنها الکتروفورز به Mr نمودار الگوریتم B: شکل صورت خطی می باشد که خواندن وزن مولکولی پروتئین ناشناخته از روی این پروتئین را ممکن می سازد.

تمرکز ایزو الکتریک:

یک پروتئین می باشد PI. روشی برای تعیین نقطه ی ایزوالکتریک یا ایزوالکتریک پروتئین توضیحات بیشتر:

پایدار ایجاد می شود- PH 1. بعد از برقراری میدان الکتریکی یک شیب - 2 محلول پروتئین ایجاد شده و میدان الکتریکی مجددا برقرار می شود. خود در طول- PI 3 بعد از رنگ آمیزی مخص خواهد شد کخ پروتئین ها بر حسب مقادیر پخش شده اند PH. شیب این فناوری پروتئین ها را بر اساس نقاط ایزوالکتریک آنها جدا می نماید. با افزودن آمفومیت در حفره PRO در داخل مثال ایجاد می شود. مخلوط PH های مناسب یک شیب پایدارها وارد ژل شده و تا PRO ای در داخل ژل قرار داده می شود. با بکارگیری میدان الکتریکی بار PH=PI خود حرکت می نماید. همان طور که می دانیم در PI برابر با PH رسیدن به خالص پروتئین صفر خواهد بود). توضیح شکل (با اختلاط بازها و اسیدهای آلی دارای وزن مولکولی پایین) آموسیت ها(و انتشار آنها در وجود می آید. PH یک میدان الکتریکی ایجاد شده در عرض ژل یک شیب PI برابر با PH در این قرار داده می شود هر

پروتئین تا رسیدن به PRO وقتی مخلوطی ازهای دارای نقاط ایزوالکتریک PRO خود در داخل ژل حرکت می نماید. بدین ترتیب مختلف به طور متفاوت در داخل ژل انتشار می یابند.

الکتروفورز 2 بعدی:

پروتئین ها ابتدا با استفاده از تمرکز ایزوالکتریک در یک ژل استوانه ای جدا می گردند. پلی اکریل آمید قرار داده شده و پروتئین ها SDS سپس این ژل به طور افقی بر روی ژل بوده و جداسازی عمودی اختلاف در PI جدا می گردند. جداسازی افقی بر اساس تفاوت در SDS اندازه را نشان می دهد، با انجام محتوای تمرکز ایزوالکتریک و الکتروفورز با فرایندی بنام الکتروفورز 2 بعدی میتوان مخلوطی از پروتئین ها را تفکیک نمود. این فرایند روش تجزیه ای حساس تری نسبت به تنها خود روش الکتروفورز می باشد. با تفاوت با PH الکتروفورز 2 بعدی پروتئین های دارای وزن مولکولی مشابه ولی باولی دارای وزن مولکولی متفاوت تفکیک می گردد PH. هایی با مقادیر مشابه PRO ژل تمرکز ایزوالکتریک بر روی ژل پلی اکریل آمید قرار داده می شود.

یکی از جنبه هایی که پلی مرهای زیستی را جلب توجه می کند: باردار بودن الکتریکی آن هاست. نظیر الکترولیت های مولکولی های کوچک، پلی الکترولیت ها بسته به ثابت یونش گردهای اسیدی و بازی آن ها در دسته های قوی و ضعیف طبقه بندی می شوند.

یک پلی الکترولیت ممکن است، یکی چند یا تعدادی پلی اسیدی قوی نظیر اسیدهای نوکلئیک یا یک پلی باز ضعیف مثل: پلی بنزین و یا یک پلی آمونیت مانند پروتئین ها باشد.

روش های تعیین کننده ی بار حمل شده توسط ماکرومولکول ها یا پلی مرهای زیستی از این جهت مفید هستند که شاید بتوان مولکول های مشابه دارای بار الکتریکی متفاوت را با روش مناسب جدا کرد.

مولکول به دو طریق به میدان الکتریکی پاسخ می دهد. اگر حامل بار خالصی باشد در میدان الکتریکی مهاجرت کرده و این اساس مطالعات الکتروفورز است و یا ممکن است مولکول توزیع نامتقارنی از بار داشته باشد یا قطبی باشد که در این حالت میدان الکتریکی درگیری خاصی را برایش بوجود می آید.

اصول اساسی الکتروفورز:

انتقال ذرات بوسیله ی یک میدان الکتریکی را الکتروفورز می گویند این فرایند شبیه به ته نشینی است از آنجایی که الکتروفورز علاوه بر بار مولکولی به جرم آن نیز حساس است راه دیگری را برای جداسازی مخلوطها و تجزیه و تحلیل آن ها فراهم می نماید.

الکتروفورز در فاز محلول انجام می شود که علاوه بر یون های بافر، شامل یون های ناشی از قسمت های باردار خود ماکرومولکول ها است. یعنی ماکرومولکول را به تنهایی نمی توان مطالعه کرد. بلکه مطالعه ی آن در حضور

تعدادی زیادی از یون های دیگر انجام می شود که در میدان موثر و ماکرومولکول تاثیر داشته و سبب مشکل شدن تحلیل می شود.

برای سادگی یک سیستم غیر حقیقی را در نظر می گیریم که ذرات باردار بوده و محیط غیر هادی است که در این حالت با برقراری میدان الکتریکی ذره در راستای میدان حرکت کرده و نیروی مقاومت و سکوزیته از حرکت آن ممانعت می کند پس از برابری این دو نیرو ذره با سرعت ثابت در جهت میدان حرکت خواهد کرد.

تعریف تحرک الکتروفورتیکی: سرعت حرکت ذره در میدان الکتریکی را می گویند با تمام پیچیدگی ها الکتروفورز این روش نتایج خوبی در جداسازی ماکرومولکولها نشان می دهد ولی در پیش بینی و مطالعه ساختمان ماکرومولکول در مفایسه با روش هایی نظیر ته نشینی کارایی کمتری دارد. اگر برابری بار مولکول ها صفر شود (نقطه ی ایزوالکتریک) (ایزوالکتریک، بار pH های پایین تر از pH تحرک الکتروفورتیکی آن صفر می شود. در مولکول مثبت و در نتیجه میدان الکتریکی به سمت الکتروود منفی حرکت می کند.

ایزوالکتریک بار مولکول منفی و جهت حرکت آن به سمت الکتروود PH ، های بالای PH در ایزوالکتریک است.

های مختلف و رسم منحنی PH با اندازه گیری تحریک الکتروفوتیکی ماکرومولکول ها در ایزوالکتریک خواهد بود PH هایی که تحریک الکتروفورتیکی صفر باشد PH ان نسبت به

انواع مختلف الکتروفورز:

موارد استفاده:

موارد استفاده شرایط محیط جداسازی مولکولهای کوچک، اسید آمینه و نوکلئوتید کاغذ فیلتر آغشته به بافر کربن 2 الکتروود قرار میگیرد کاغذ جداسازی پروتئین ها بسته ی از ژل نشاسته که به طورافقی بین 2 الکتروود قرار میگیرد ژل نشاسته ریخته می شود ژل پلی اکریل آمید $slab$ جداسازی پروتئین و نوکلئوتید در لوله یا جداسازی پروتئینهای بسیار بزرگ، اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوتید ریخته می شود ژل آگارز $slab$ در لوله یا

روش انجام کار:

به این ترتیب است که ابتدا باریکه ای از کاغذ را در محلول بافر خیس کرده و سپس دو طرف آن را در ظرف حاوی بافر قرار می دهیم این عمل مانع خشک شدن کاغذ خواهد شد نمونه مورد نظر را وسط کاغذ قرار داده و اختلاف پتانسیل را در طرفین آن برقرار می کنیم.

اگر نمونه مورد نظر شامل اجزا مختلفی باشد، پس از الکتروفورز هر جز می تواند با رنگ مخصوص به خود رنگ آمیزی شود.

الکتروفورز در ولتاژ پایین برای مولکولهای کوچکی نظیر اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها مفید است زیرا کم بورن بارشان سبب تحرک پایین(آهسته جدا شدن)و اندازه کوچکیشان سبب گسترده‌گی انتشار می شود.

واپاشی رادیواکتیو: تبدیل یک هسته ی رادیواکتیو به چندین هسته همراه با گسیل پرتوهای الکترومغناطیس یا ذرات آلفا و ...

تابش های هسته ای به سه شکل : آلفا بتا گاما

مواد رادیواکتیو دو دسته هستند:

ماده پرتوزای طبیعی: آن دسته از مواد پرتوزاست که در طبیعت بصورت ذاتی وجود دارند و انسان در بوجود آمدن آنها نقشی ندارد.

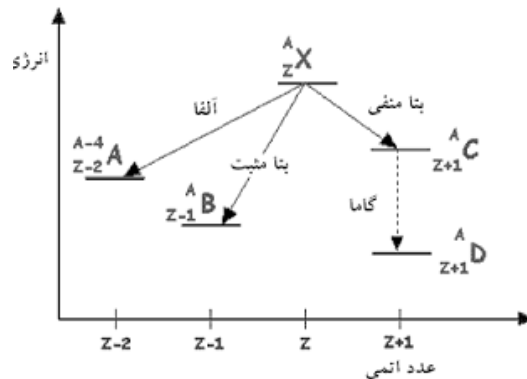
ماده پرتوزای مصنوعی: مواد پرتوزا ساخته دست انسان ها

یونیزاسیون : چنانچه یک الکترون مداری از اتم جداشود به اصطلاح اتم یونیزه می شود و یک جفت یون ایجاد می شود و اتم در این حالت دارای بار مثبت است. همچنین اگر اتمی یک الکترون اضافی دریافت کند دارای بار منفی می شود. پرتو هایی یونیزان با کندن الکترون های یک اتم باعث یونیزه شدن یک اتم می شوند

(Radioactive decay)استحاله های پرتو زا

شمای استحاله :

برای نشان دادن تراز های هسته و روشهای مختلف استحاله از شمای استحاله استفاده می شود. بر طبق قرار داد. در شمای استحاله تراز های مختلف انرژی را با کمک خطوط افقی موازی با یکدیگر و انواع استحاله ها را با خطوط عمودی یا مایل نشان می دهند. اشعه γ با خط عمود، استحاله β^- - خط مایل به سمت راست و استحاله های α ، β^+ و EC نیز با خط مایل به سمت چپ نشان داده می شوند.



شکل ۲-۳ شمای استحاله

واپاشی α (Alpha decay):

ذره آلفا هسته اتم هلیوم ${}^4_2\text{He}$ است که شامل دو پروتون و دو نوترون می باشد. نمونه هایی از مهمترین چشمه های آلفا زای طبیعی عبارتند از رادیوم ${}^{241}\text{R}$ و آمرسیوم ${}^{222}\text{Am}$ ، رادون و بیسموت ${}^{212}\text{Bi}$.

۱. پرتو آلفا ذره ای است که از جمع دو پروتون و دو نوترون تشکیل شده است.
 ۲. به علت سنگینی در یک مسیر مستقیم حرکت می کند و فقط در اثر برخورد مستقیم با هسته منحرف می گردد.
 ۳. انرژی این ذرات بین ۳ تا ۸ میلیون الکترون ولت است. انرژی ذرات آلفا وابسته به نیمه عمر ماده است هرچه نیمه عمر کمتر باشد انرژی بیشتر است و برعکس.
 ۴. بارزترین خصوصیت ذره آلفا گسسته بودن انرژی آن است. یعنی تمام ذرات آلفایی که از یک نوکلئید مشخص خارج می شوند یک یا چند انرژی مشخص دارد.
- مثال: ذرات آلفایی که از رادیوم ${}^{226}\text{Ra}$ خارج می شود 6.71 MeV انرژی دارند. در مورد اورانیوم ${}^{238}\text{U}$ ذرات آلفا به ترتیب ۵،۸۹، ۵،۸۲ و ۵،۶۶ میلیون الکترون ولت می باشند. مشخص بودن مقدار این انرژی برای هر یک از رادیو ایزوتوپ های ساطع کننده آلفا، یکی از عوامل اصلی برای شناسایی آنها از یکدیگر می باشد.
۵. ذرات آلفا نسبتا سنگین هستند و دو بار الکتریکی مثبت دارند که باعث می شود هنگام عبور از نزدیک یک اتم احتمالا چند الکترون از آن کنده و یون های مثبت به وجود می آورند که به این اثر اصطلاحا یونسازی گفته می

شود. مثلاً یک ذره آلفا با انرژی 6.8 Mev می تواند حدود ۲۰۰۰۰۰ یون مثبت در هوا ایجاد کند. یک چنین قدرت یونسازی نشانگر یک آسیب جدی زیستی است.

۶. قدرت نفوذ ذرات آلفا در محیط های متفاوت با هم فرق دارد.

جدول ۱-۳ قدرت نفوذ ذرات آلفا بر حسب میکرون در مواد مختلف

هوا	آب	آلومینیوم	میکا	مس	سرب
۵۷۰۰۰	۷۴	۳۴	۲۹	۱۴	۲

برد ذرات آلفا در ماده بسیار کم و نزدیک به 0.03 mm در بافت بدن می باشد. ذرات آلفا را می توان با یک برگ کاغذ چند سانتی متر هوا و یا دستکش متوقف کرد. به همین دلیل این ذرات کاربرد کمی در تشخیص و درمان دارند.

معمولاً هسته های اتم هایی از خود پرتوی آلفا گسیل می کنند که عدد جرمی آنها بیش از ۱۵ و عدد اتمی آنها بیش از ۸۲ باشد. در اتم هایی که هسته های سبک تری دارند احتمال واپاشی آلفا بسیار کم است.

یعنی نوکلئوتید های آلفا زای طبیعی دارای عدد اتمی بزرگتر از ۸۳ می باشند. علت این امر را می توان افزایش سریعتر نیروهای دافعه الکترو استاتیک (پروتون ها) در مقایسه با نیروهای جاذبه (نوترون ها) در هسته عنوان کرد (به عبارتی کم شدن نسبت N/P)

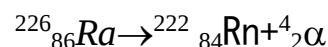
۷. واپاشی آلفا به طور شماتیک در زیر نشان داده شده است.



علامت سوال در شما بیانگر این است که پرتو گاما ممکن است در یک واکنش آلفا زا دیده شود یا نشود.

Q بیانگر میزان انرژی آزاد شده است که به صورت انرژی جنبشی بین عنصر دختر و ذره آلفا تقسیم می شود.

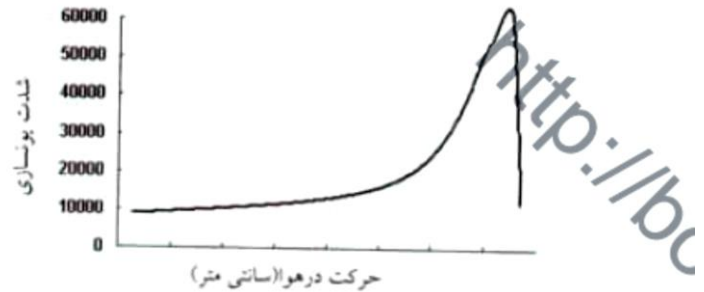
مثال : واپاشی رادیوم به گاز رادون : نیمه عمر واپاشی 1622 سال



در این واپاشی 98.8% از ذرات آلفا به صورت منو انرژی 4.79 mev و 1.2% از ذرات آلفا با انرژی ۴٫۶۱ mev همراه با اشعه گاما با انرژی 0.18 mev می باشد.

نمونه هایی از مهمترین چشمه های آلفا زای طبیعی عبارتند از رادیوم 226Rn رادون 222Rn امرسیوم 241Am و بیسموت 212Bi

منحنی براگ : کاهش شدید یونسازی مخصوص را در انتهای مسیر ذره آلفا نشان می دهد علت این امر آن است که ذره آلفا با از دست دادن کامل انرژی به حالت سکون در آمده و می تواند دو الکترون از محیط اطراف جذب کرده و به اتم هلیوم تبدیل شود.



شکل ۳-۳ یونسازی مخصوص در مسیر حرکت ذره آلفا که به منحنی براگ معروف است.

برد پرتو آلفا

مسیری که اشعه آلفا در هوا طی می کند: برد (R)

رابطه برد و انرژی ذره $R(\text{cm}) = 0.325 E^{3/2} \text{ Mev}$

سرعت پرتو با برد متناسب است: $V^3 = 1.03 \times 10^{27} R(\text{cm})$

برد ذره آلفا در محیط غیرهوا $R_s = \frac{3.2 \times 10^{-4} R \sqrt{A_s}}{\rho_s}$ که ρ_s چگالی محیط و A_s عدد جرمی متوسط محیط

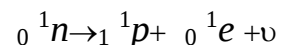
مثال: برد پرتو آلفا با انرژی ۶ Mev در آب و هوا:

$$R(\text{cm}) = 0.325 E^{3/2} (\text{Mev}) = 0.325 \times 6^{3/2} = 4.78 \text{ cm}$$

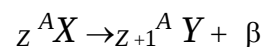
$$R_s = \frac{3.2 \times 10^{-4} R \sqrt{A_s}}{\rho_s} = R_s = \frac{3.2 \times 10^{-4} \times 4.78 \sqrt{18}}{1 \text{ g/cm}^3} = 6.5 \times 10^{-3} = 65 \text{ میکرون}$$

استحاله بتا - Beta decay β

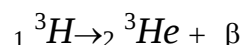
ذره بتا در واقع همان الکترون است که از یک هسته ناپایدار که نسبت N/P بالا دارند طبق واکنش زیر یک نوترون به پروتن تبدیل می شود:



که $\bar{\nu}$ آنتی نوترینو می باشد. عدد اتمی در این واپاشی یک واحد افزایش می یابد اما عدد جرمی تغییر نمی کند.



مثال : واپاشی تریوم:

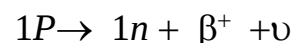


ذرات بتا ساطع شده منو انرژییک نیستند بلکه دارای یک طیف پیوسته از صفر تا ماکزیمم مقدار نظری است (در واقع انرژی حاصل از واپاشی بین ذره بتا ، نوترینو تقسیم شده است.) در استحاله بتا زا میانگین انرژی بیشتر رادیونوکلئوتید ها بین 30 تا ۴۰٪ انرژی ماکزیمم است.) شکل (۲-۲

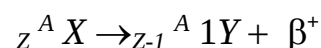
از چشمه های بتا زا می توان استرانسیوم ، ${}_{90}^{90}Sr$ یتریوم ، ${}_{90}^{90}Y$ کربن ، ${}_{14}^{14}C$ فسفر ، ${}_{32}^{32}P$ پرومیتیموم ${}_{147}^{147}Pm$ و کریپتون ${}_{85}^{85}Kr$ را نام برد.

استحاله + β : پوزیترون positron decay

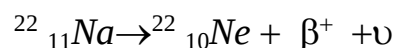
بر عکس استحاله - β ، اگر در هسته ای نسبت تعداد نوترون به تعداد پروتن کمتر از حد تعادل باشد و انرژی لازم برای استحاله α وجود نداشته باشد یک پروتون در داخل هسته به یک نوترون پوزیترون و نوترینو استحاله پیدا می کند.



پوزیترون تمام خصوصیات - β را دارا می باشد اما عکس آن دارای بار مثبت است. طی این واپاشی عدد اتمی هسته دختر مطابق شمای زیر یک واحد کمتر می شود.



مثال : واپاشی سدیم:



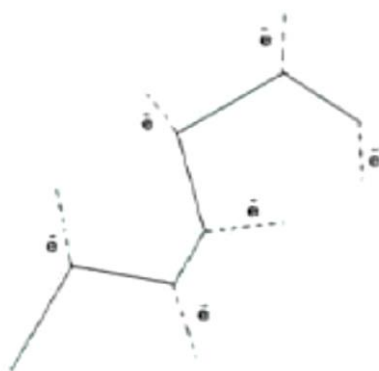
نکته قابل توجه در این واپاشی سرنوشت + β می باشد. این ذره بر خلاف - β ناپایدار است و به محض مجاورت با یک الکترون پدیده فنا Annihilation روی می دهد. در این پدیده جرم هر دو ذره الکترون و پوزیترون (تبدیل به انرژی هم ارز آن 0.511 Mev) برای هر الکترون و در مجموع (1.02 Mev) می شود. که به صورت دو فوتون گاما با انرژی 0.511 mev ساطع می شود.

از تابش کننده های + β می توان فلور ، ${}_{30}^{68}Ga$ ، ${}_{9}^{18}F$ نیتروژن ${}_{7}^{13}N$ و اکسیژن ${}_{8}^{15}O$ را نامبرد.

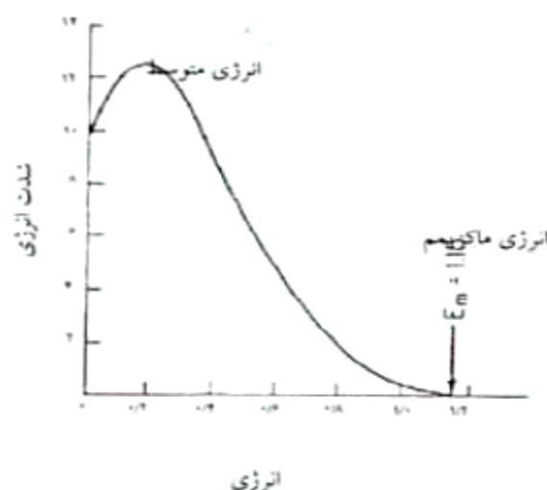
خصوصیت پرتوهای بتا

1. پرتو بتا جرم کمی برابر با جرم یک الکترون دارد.
2. این ذرات به علت سبکی در هنگام عبور از کنار اتم های دیگر به راحتی از مسیر اصلی حرکت خود منحرف می شوند و در نتیجه مسیر حرکت پرتو پراکنده و زیگزاگی است.
3. الکترون ها با توزیع انرژی پیوسته گسیل می شوند . اگر انرژی و اندازه حرکت بقا داشته باشند باید به همراه الکترون ذره دیگر یا نوعی تابش الکترومغناطیس مثل گاما گسیل شود.

4. منحنی توزیع انرژی ذرات بتا پیوسته است و تا یک حداکثر معین تغییر می کند. مقدار انرژی متوسط برای بیشتر مواد ساطع کننده بتا حدود ۱,۳ انرژی حداکثر می باشند.
5. پوزیترون پس از طی مسیر و از دست دادن کامل انرژی به ذره ساکن تبدیل شده و با یک الکترون منفی دیگر ترکیب شده و یکدیگر را نابود می کنند و به پرتو الکترومغناطیس گاما تبدیل می شوند. این عمل را تبدیل ماده به انرژی می نامند که طبق قانون انیشتین $E=mc^2$ به دو تا ۰,۵۱ میلی الکترون ولت تبدیل می شود.
6. ذرات بتا نسبت به آلفا توانایی نفوذ بیشتری دارند که البته زیاد نیست ولی در صورت برخورد خطر بسیار بیشتری دارند. ذرات بتا را می توان با یک ورقه فویل آلومینیوم یا پلکسی گلاس متوقف کرد.
7. برهمکنش با محیط .



شکل ۳-۷ مسیر حرکت بتا به علت سبک بودن زیگزاکی است.



شکل ۳-۸ طیف الکترونها گسیل شده در واپاشی β از ^{210}Bi

برهمکنش با محیط

۱. برهمکنش با هسته های محیط شامل الف-برخورد الاستیک وب-غیر الاستیک
۲. برهمکنش با الکترون های اتم شامل الف-ایجاد گرما ب-یونیزاسیون و ج-برخورد با الکترون لایه داخلی
۳. جذب در ماده
- ۱-بر خورد با هسته:

الف-برخورد الاستیک : یک ذره بتا زمانی که با یک هسته برخورد می کند می تواند به شدت توسط میدان کولومبیک هسته منحرف می شود. اگر برخورد انعطاف پذیر باشد فرآیند پراکندگی رادرفورد نامیده می شود و انرژی الکترون تغییر اندکی می کند.

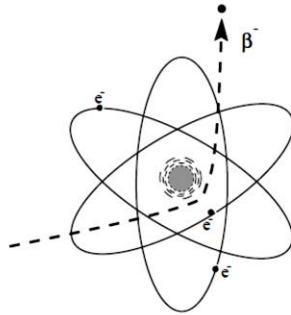


Figure 10
Rutherford Scattering

ب- برخورد غیرالاستیک : اگر بر خورد ناکشسان انجام دهد، در این فرآیند پرتوی بتای منفی با انرژی زیاد به میدان الکتریکی اطراف هسته وارد و در آنجا شتاب می گیرد این عمل باعث می شود که در مسیر حرکت پرتو تغییری ایجاد شود و پرتو بتا منحرف شود که در اثر این عمل یک پرتو الکترومغناطیس با طول موج مشابه با اشعه ایکس به وجود می آید. این تابش حدوداً یک صدم انرژی کل طیف است که به آن اشعه ایکس ترمزی یا برامسترهلوگ گفته می شود. این امر در منحنی جذب بتا به صورت یک دنباله ظاهر می شود.

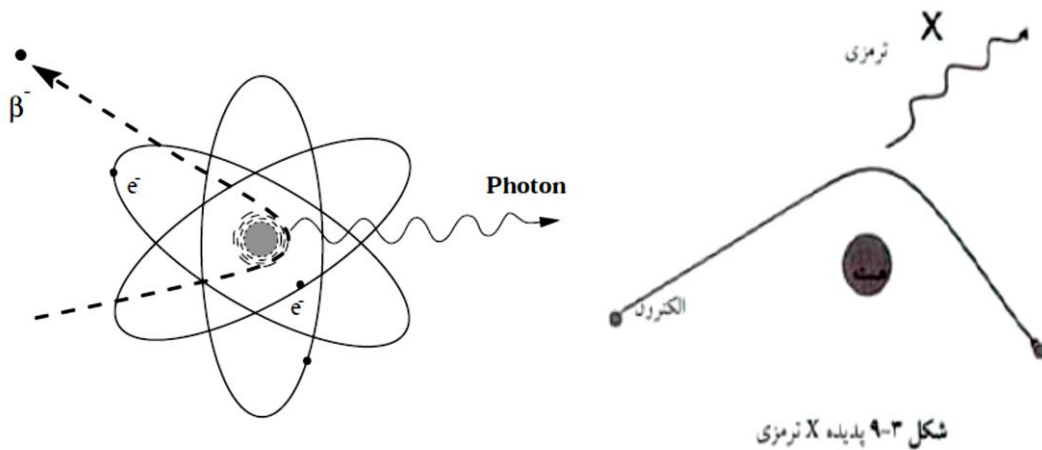


Figure 11 Bremsstrahlung Radiation

شکل ۹-۳ پدیده X ترمزی

۲- برهم کنش بتا با الکترون های اتم ها

الف- ایجاد گرما

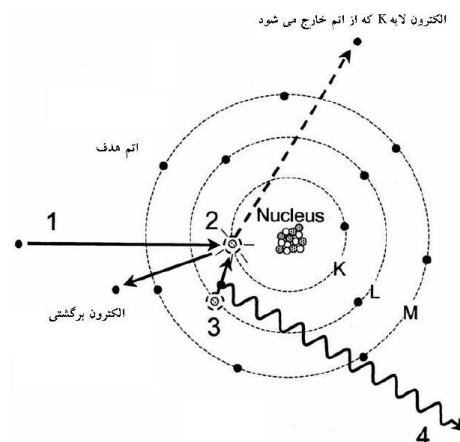
مکانیزم قالب در برخورد پرتوهای بتا برخورد با الکترونهاى لایه های خارجی اتم هدف است. در این حالت معمولاً اتم ها تحریک می شوند یعنی الکترونها با جذب انرژی وارد زیر لایه های بالایی می شوند وقتی که الکترونها به حالت پایه خود بر می گردند انرژی خود را به شکل گرما از دست می دهند

ب- یونیزاسیون:

ذرات با بارهای مخالف همدیگر را می رانند. برخورد بتا با الکترون های اتم های محیط می تواند باعث یونیزاسیون اتم ها شود.

ج- برخورد با لایه داخلی

چنانچه این الکترونها با الکترونهای لایه های داخلی اتم برخورد کنند و انرژی آنها بیشتر از انرژی پیوندی الکترون باشد ، باعث کنده شدن الکترون و در نتیجه ایجاد یک حفره الکترونی در مدار اتم می شوند .این حالت ناپایدار است ، بنابراین یک الکترون از مدارهای بالاتر این جای خالی را پر می کند .نتیجه این انتقال الکترونی ، آزاد شدن فوتونی است که انرژی آن برابر با اختلاف دو لایه الکترونی فوق است. پرتو ایجاد شده با این مکانیزم اشعه ایکس اختصاصی یا خطی گفته می شود .علت این نام گذاری(اختصاصی) اختصاصی بودن این پرتو ها برای هر عنصر می باشد ، همچنین به آنها پرتو های خطی گفته می شود زیرا شدت پرتو وقتی بر حسب انرژی نمایش داده شود به صورت یک خط دیده می شوند. چنانچه الکترون از هر K چنانچه حفره ایجاد شده توسط الکترونهای سریع در لایه K اتم باشد ، به پرتو ایجاد شده ، اشعه اختصاصی لایه K گفته می شود. این قضیه در مورد سایر لایه ها نیز صدق می کند اما به علت اینکه دارای انرژی هایی کمی هستند در نظر گرفته نمی شوند.



شکل ۱-۳ تولید اشعه ایکس اختصاصی

برد پرتوی بتا

برد پرتوی بتا در محیطی با چگالی ρ : برد معادل (R_e) (با توجه به حرکت زیگزاگی پرتوی بتا)

$$R_e = R\rho$$

برد معادل حاصلضرب برد در چگالی محیط

$$R_e (g/cm^2) = 0.542E(\text{Mev}) - 0.133$$

رابطه برد معادل و انرژی ذره:

مثال: برد پرتو بتا با انرژی ۶ Mev در آب و هوا:

$$R_e (\text{cm}) = 0.542E(\text{Mev}) - 0.133 = R_e (\text{cm}) = 0.542 \times 6(\text{Mev}) - 0.133 = 3.119 \frac{g}{cm^2}$$

$$3.119 \frac{g}{cm^2} = \text{برد معادل پرتو بتا با انرژی ۶ Mev}$$

$$R_e = R\rho \quad 3.119 \left(\frac{g}{cm^2}\right) = R \times 1 \left(\frac{g}{cm^3}\right) \quad R = 3.119 (\text{cm})$$

برد ذره بتا در آب

$$\rho_{Air} = \frac{\text{اکسیژن } (\frac{1}{8} \times 32) + \text{نیتروژن } (\frac{4}{5} \times 28)}{\text{حجم یک مول هوا در شرایط متعارف 22400}} = \frac{29}{22400} = 1.3 \times 10^{-2} \left(\frac{g}{cm^3} \right)$$

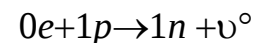
$$R_e = R \rho \quad 3.119 \left(\frac{g}{cm^2} \right) = R \times 1.3 \times 10^{-2} \left(\frac{g}{cm^3} \right) \quad R = 2.4 \times 10^3 \text{ (cm)}$$

مهم: چرا برد پرتو بتا هم انرژی با پرتو آلفا از برد بیشتر است؟

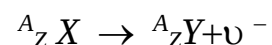
پرتوی یونیزان که به محیط وارد میشود بیشتر انرژی خود را به صورت تحریک و یونیزاسیون از دست می دهد. پرتو با بار الکتریکی و جرم بیشتر در طول مسیر به طور متراکم تری نسبت به پرتو با جرم و بار کمتر در صورتیکه هم انرژی باشند یونیزاسیون و تحریک انجام می دهد. بنابراین پس از طی مسیر کوتاهی انرژی خود را از دست می دهد. این توضیح توجیه کننده برد کمتر پرتو آلفا هم انرژی با پرتو بتا است.

(Electron capture): تسخیر الکترون برای گسیل پوزیترون ، وزن اتم مادر بایستی دست کم به اندازه جرم دو الکترون (یا به طور معادل 1.02mev) از اتم دختر بیشتر باشد. در غیر این صورت کمبود نوترون هسته مادر توسط پدیده تسخیر الکترون EC جبران شود.

در این نوع واپاشی یکی از الکترونهاى مدارى جذب هسته شده و با یکی از پروتونهای هسته به روش زیر ترکیب و یک نوترون را پدید می آورند:



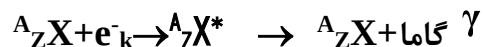
احتمال جذب الکترون از لایه K بیشتر است. در این واپاشی عدد اتمی هسته دختر یک واحد کمتر از هسته مادر است.



طی پدیده تسخیر الکترون جای خالی الکترون توسط الکترونهاى لایه های بالاتر پر می شود که حاصل این انتقال ایجاد پرتو ایکس اختصاصی از اتم دختر است. ذرات بتا می توانند هم با هسته و هم الکترون موادی که از آن عبور می کند واکنش دهد.

واپاشی یا تبدیل داخلی

در این فرآیند یک الکترون مقید به اتم یا هسته اش وارد برهمکنش می شود. زمانی که یک هسته برانگیخته، انرژی خود را به صورت پرتو الکترومغناطیس گاما آزاد کند، اصطلاحاً تبدیل داخلی صورت گرفته است.



پرتو گاما Gamma ray : در بسیاری از استحاله های α و β هسته دختر یا ثانویه در یک تراز یا حالت تحریک شده قرار می گیرند که انرژی اضافی حاصل از انتقال به شکل پایدار به صورت پرتو گاما آزاد می شود. نکته قابل توجه اینکه که هیچ رادیوایزوتوپ طبیعی قادر به تابش اشعه گاما به تنهایی نیست. پرتو های گاما مانند پرتو های ایکس از جنس اشعه الکترومغناطیس می باشد و تنها وجه تمایز این دو پرتو در انرژی های یکسان اختلاف در منبع تولید آنها می باشد.

مروری بر اشعه X

اشعه x (X-ray) در سال 1895 توسط رنتگن (roentgen) (دانشمند آلمانی زمانی که مشغول مطالعه بر روی اشعه کاتدی در لوله کروکس (Crookes tube) (بود کشف شد. این طیف از پرتو های الکترومغناطیس از تبدیل انرژی جنبشی الکترونها به امواج الکترومغناطیس ایجاد می شود. اساس تولید این اشعه بمباران یک عنصر (هدف (Target)) (توسط الکترونها سریع السیر) مثل الکترونهايي که در یک ولتاژ قوی قرار گرفته اند) می باشد.

تولید اشعه X

الکترونهاي سریع السیر در مواجهه با یک اتم با دو مکانیزم کاملاً متفاوت انرژی خود را از دست می دهند این دو فرایند عبارتند از از دست دادن انرژی از طریق تصادم و از دست دادن انرژی از طریق تشعشع که باعث وقوع سه پدیده می شود که در ادامه توضیح داده می شوند . در فرایند تصادف الکترونها ی اتم شرکت دارند و در فرایند دوم هسته اتم هدف دخالت دارند. به طور کلی یک الکترون پر انرژی برای رسیدن به حالت سکون می بایست تعداد بسیار زیادی تصادم را بپذیرد. به عنوان مثال یک الکترون با انرژی 1MeV حدود 10000 برخورد تا زمان سکون انجام می دهد.

ایجاد گرما

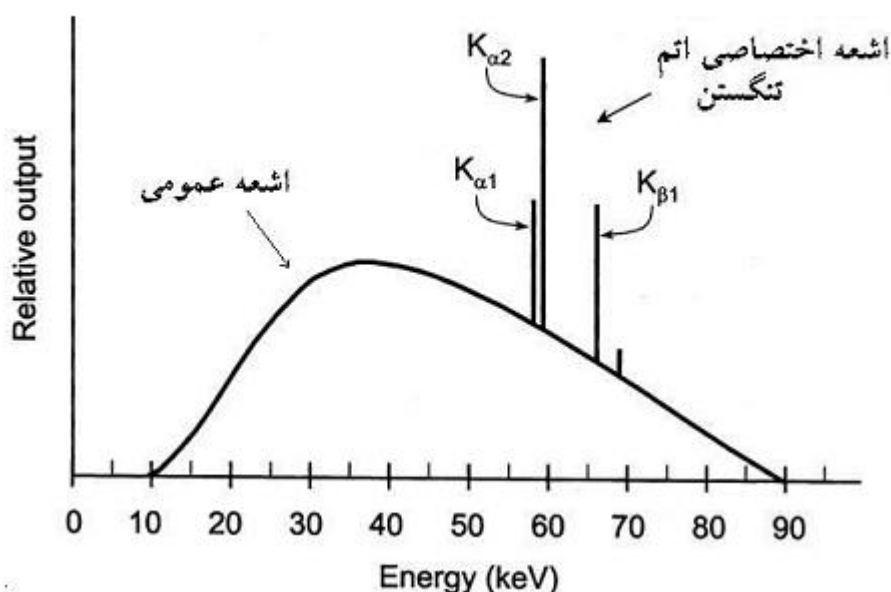
مکانیزم قالب در برخورد الکترونهاي سریع السیر برخورد با الکترونهاي لایه های خارجی اتم هدف است. در این حالت معمولاً اتم ها تحریک می شوند) یعنی الکترونها با جذب انرژی وارد زیر لایه های بالایی می شوند (وقتی که الکترونها به حالت پایه خود بر می گردند انرژی خود را به شکل گرما از دست می دهند. به عنوان مثال در

ولتاژ 99.5 KV ، 60 درصد و در ولتاژ 99 KV، 200 درصد از انرژی حاصل از برخورد الکترونها تبدیل به گرما می شود (بازده دستگاه را پائین می آورد)

طیف اشعه X:

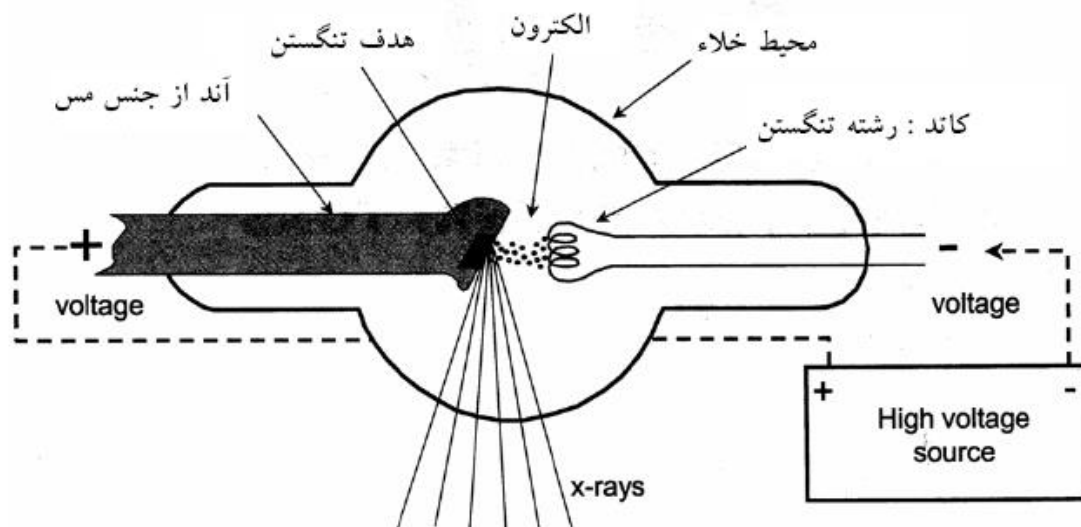
چنانچه طیف اشعه ایجاد شده از یک ماشین تولید کننده اشعه ایکس را رسم کنیم طیفی مختلط بدست می آید. این طیف ترکیبی از دو طیف اشعه است ، طیف خطی line spectrum و طیف پیوسته continuous spectrum.

میله های بلند ناشی از انتقال الکترون به لایه K



تیوپ اشعه ایکس (xray – tube)

تیوپهای تولید اشعه ایکس امروزی با آنچه که اولین بار رونتگن ساخت بسیار تفاوت دارد اما اصول کلی مشابه می باشد.



شکل ۳-۴ نمایش شماتیک تیوپ اشعه ایکس

بخش های دستگاه

اگر بین آند و کاتد اختلاف پتانسیل مناسبی برقرار باشد در اختلاف پتانسیل معینی که به جنس کاتد بستگی دارد الکترون ها از کاتد جدا و به آند گسیل می شوند که به این دسته الکترونی گسیل شده از کاتد به آند اشعه کاتدی می گویند

برای گسیل الکترون مدارالکتریکی در کاتد قرار داده شده که جریانی در حد میلی آمپر از آن می گذرد و سبب گرم شدن کاتدی می گردد. کاتد گرم شده مقداری الکترون آزاد می کند که با توجه اختلاف پتانسیل بین آند و کاتد به سوی آند گسیل می شوند. برای برقراری جریان الکترونی یک مولد الکترون موسوم به تفنگ الکترونی مورد نیاز است.

این مجموعه در درون لوله خلا قرار می گیرند که مسیرهای گسیل عاری از مولکول های هوا باشد. این لوله لوله اشعه کاتدی (Catodic Ray Tube: CRT) است.

انرژی حاصل از تولید اشعه ایکس

کار الکتریکی: حاصلضرب بارالکتریکی در پتانسیل الکتریکی : $W = Vq$

• بارالکتریکی ذره: بارالکترون : $1/6 \times 10^{-19} \text{ C}$

• انرژی جنبشی معادل کارالکتریکی : $E_k = 1/6 \times 10^{-19} \text{ C V}$

اگر پتانسیل اعمال شده 100 Kv باشد انرژی بدست آمده: $E_k = 1/6 \times 10^{-19} \text{ C} \times 100000 \text{ V} = 100 \text{ Kev}$

اختلاف پتانسیل 100 Kev : انرژی الکترون هنگام رسیدن به آند

اگر جنس آند مناسب باشد الکترون حین عبور از آند انرژی خود را ازدست می دهد : ۹۹٪ به صورت گرما و ۱٪ به صورت اشعه X ترمزی

برای جلوگیری از بیش از گرم شدن: ۱- جنس آند از فلزی با دمای ذوب بالا انتخاب شود ۲- با هدایت گرما از آند به محیط دستگاه خنک شود : گردش فلز مس و مایع روغنی در دستگاه ۳- آند روی یم سطح دوار به منظور تغییر محل برخورد پرتوی کاتدی

خواص عمومی اشعه ایکس

خواص عمومی شباهت کامل به نور معمولی دارد.

تنها مورد اختلاف : از نظر پدیده های مربوط به انرژی فوتون ها و یا بسامد آنها. برای پرتوهای ایکس چندین هزار برابر پرتوهای مرئی

پرتوهای ایکس قسمتی از طیف پیوسته امواج الکترومغناطیسی: طول موج بین ۰۶/۰-۱۲- آنگستروم در پزشکی ۱,۲ تا ۰,۱ آنگستروم که دودسته اند : پرتوها با طول موج بلند و پرتوهای سخت با طول موج کوتاه

پرتوهای نرم قابلیت نفوذ کمتر

پرتوی سخت نفوذ بیشتر

امکان عبور اشعه ایکس از اکثر اشیا

تعیین مشخصات اشعه ایکس بر حسب طول موج ولتاژ سرعت دهنده الکترون یا انرژی آنها

خواص فیزیکی: خواص نوری، خاصیت یونسازی، خاصیت لومینسانس ، خواص دیگر

خواص نوری:

- سرعت انتشار پرتوهای ایکس در خلا همانند نور معمولی $3 \times 10^8 \text{ m/s}$
- شدت آن متناسب با عکس مجذور فاصله
- امکان بازتاب منظم از سطح صیقلی وجود ندارد. به دلیل طول موج کوتاه ناهموازی های سطح
- برای بازتاب اضعه ایکس از بلورهای طبیعی مانند نمک طعام
- شکست پرتوهای ایکس از محیطی به محیط دیگر ضریب شکست: ۱

- پدیده پراش ضمن عبور از بلورها : استفاده در جهت مطالعه ساختمان ماده

خاصیت یون سازی:

- تابش پرتو ایکس به ماده باعث یونیزاسیون برخی مولکول ها و اتم ها حتی اجسام عایق و کم و بیش هادی جریان الکتریسته

- تابش پرتو ایکس در هوا باعث تولید جفت یون و تخلیه الکتریکی

خاصیت لومینسانس:

- اگر به الکترون اتمی انرژی دهیم الکترون تحریک می شود و الکترون به مدار بالاتر می رود در بازگشت همان مقدار انرژی به صورت فوتون تابش می کند.
- در مواد فلورسان الکترون های تحریک شده در یک مرحله به تراز عادی بر نمی گردند بلکه در دو یا چند مرحله این کار را می کنند چنانچه مواد فلورسان تحت تاثیر اشعه ایکس قرار گیرد در مراحل مختلف بلزگشت فوتونی در ناحیه مرئی تابش می کند
- اگر بازگشت به تراز عادی مدت قابل ملاحظه ای طول بکشد فسفرسانس گفته می شود.

خواص دیگر

- تابش اشعه ایکس باعث تغییر رنگ برخی مواد بسته به شدت و مدت تابش
- در اندازه گیری پرتو ایکس استفاده می شود.

خاصیت شیمیایی:

- پرتوهای ایکس : خاصیت احیاکنندگی دارند.
- مهمترین استفاده : پزشکی: صفحات عکاسی در معرض تابش متناسب با شدت نور سیاه می شوند در رادیوگرافی مورد استفاده است.

بیوفیزیک غشا

لیپیدها

اسیدچرب: اسیدهای کربوکسیلیک با زنجیره طویل. دارای یک سر قطبی و یک دم غیرقطبی: ترکیب آمفی پاتیک. انواع اشباع و غیر اشباع

صابون: نمک اسیدچرب. دم غیرقطبی صابون درون قطرات روغن گسترش می یابد در حالی که سر قطبی آنها در مجاورت فاز آبی است. به این ترتیب صابون پوشش هیدروفیلی در اطراف قطرات روغن ایجاد می کند.

اسید چرب اشباع: اسید چربی که تمام پیوندهای کربن به کربن آن از نوع تک پیوند است

اسید چرب غیر اشباع: اسید چربی که دارای حداقل یک پیوند دو گانه در ساختار خود است. پیوندهای دو گانه باعث کاهش نقطه ذوب

عوامل موثر بر نقطه ذوب اسیدچرب: تعداد کربن (رابطه مستقیم) و حضور پیوندهای دو گانه (رابطه عکس)

لیپیدها: دسته ای از ماکرومولکول ها هستند که در حلال های آلی مانند اتر و کلروفرم حل می شوند و در محلول آبی حل نمی شوند

لیپیدها شامل شش خانواده:

لیپیدهای ساده الف: چربی ها و روغن ها (آسیل گلیسرول ها) ب: موم ها (واکس ها)

۲) لیپیدهای کمپلکس الف: فسفولیپیدها ب: گلیکولیپیدها (گلیکواسفگولیپیدها)

۳) سایر لیپیدها مانند استروئیدها، ترئونیدها

اجزای اصلی یک سلول عبارتند از : ۱- غشای سلول، ۲- سیتوپلاسم، ۳- غشای هسته، ۴- هسته

وظایف غشای سلولی

۱. حفظ شکل مشخص سلول و جلوگیری از خروج محتویات آن.
۲. جلوگیری از خروج مواد لازم برای سلول و وارد کردن موادی که سلول لازم دارد.

محدوده سلول را معین کرده و به عنوان سد انتخابی ، مبادله مواد بین سلول و محیط اطرافش را کنترل می کند.

اندوسیتوز Endocytosis

۱- **پینوسیتوز** : در این روش که به آشامیدن سلول نیز موسوم است ابتدا مایعات و مواد محلول و بسیار ریز به رسپتورهای غیر اختصاصی سطح سلول متصل می شوند سپس غشا در آن ناحیه فرو رفته شده و به تدریج با عمق رشد ، فرورفتگی و بهم چسبیدن لبه های آن قسمت فرو رفته به صورت وزیکول در آمده و از غشای سلول جدا شده و در سیتوپلاسم رها می گردد. این وزیکول ممکن است به لیزوزوم پیوسته و تحت تاثیر آنزیم های آن قرار گیرد و یا به عنوان حامل عمل کرده و پس از طی بخش داخلی سلول و پیوستن به غشای مقابل محتویات خود را از سلول عبور می دهند. عبور مواد از دیواره مویرگها نمونه ای از این روش می باشد.

۲- **آندوسیتوز با واسطه رسپتور** : این روش انحصارا برای ورود موادی معین درون سلولهایی معین مورد استفاده قرار می گیرد، نیازمند اتصال ماده با رسپتور اختصاصی مربوطه اش در سطح سلول می باشد. برخی از هورمونها و برخی ویروسها به این طریق وارد سلول می شوند.

۳- **فاگوسیتوز** : فاگوسیتوز در مقایسه با آندوسیتوز با واسطه رسپتور ، روشی غیر اختصاصی است . سلولهای معینی مانند ماکروفاژها با استفاده از این روش ، باکتریها و قارچهای وارد شده به بدن و یا حتی سلولهای آسیب دیده و فرسوده را فاگوسیتوز می کنند.

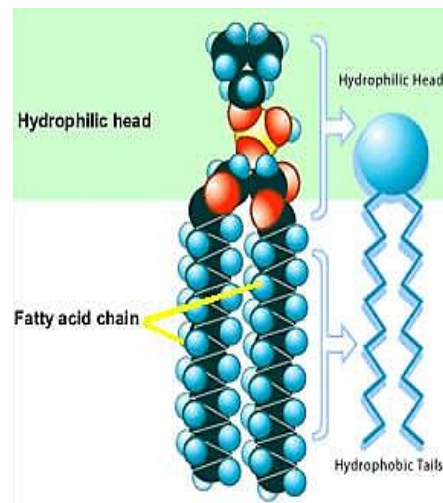
اگزوسیتوز

برعکس آندوسیتوز در عمل اگزوسیتوز مواد از محیط داخل سلول به خارج از سلول انتقال می یابند. این مواد که شامل ذرات ترشحی ساخته شده در سلول و یا مواد باقیمانده حاصل از تجزیه لیزوزوم می باشند به صورت وزیکول ترشحی یا دفعی دیده می شوند. پس از چسبیدن وزیکول ترشحی یا دفعی به غشای سلول ، غشا در محل چسبیدگی از بین می رود و به این طریق محتویات وزیکول به خارج از سلول تخلیه می گردد.

لیپیدهای غشا

لیپیدهای غشایی شامل فسفولیپید (فسفوگلیسرید و اسفنگولیپید) و کلسترول می باشد . فسفولیپیدها مولکولهایی هستند که از یک قسمت سر مانند و یک دنباله متصل به آن تشکیل

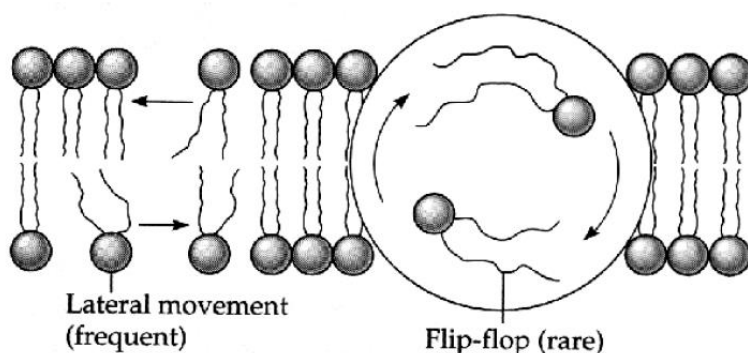
شده‌اند. قسمت سری که به سر قطبی Polar head نیز موسوم است، حاوی گروه فسفات بوده و آب دوست Hydrophilic می‌باشد قسمت دنباله از دو زنجیره اسید چرب تشکیل شده و آب گریز Hydrophobic می‌باشد. دنباله غیر قطبی Non polar tail نیز نامیده می‌شود.



سیالیت غشا

اهمیت سیالیت غشا: بسیاری از فرآیندهای مهم سلولی شامل: حرکت سلولی، رشد سلول، تشکیل اتصالات بین سلولی و اندوسیتوز وابسته به حرکت اجزای غشایی است.

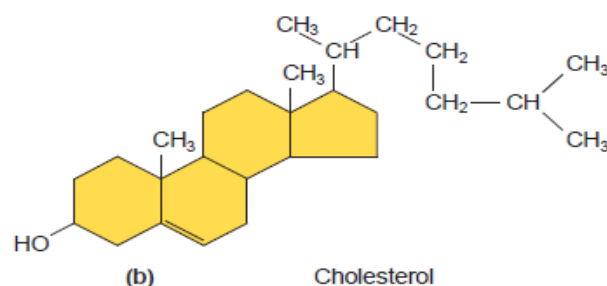
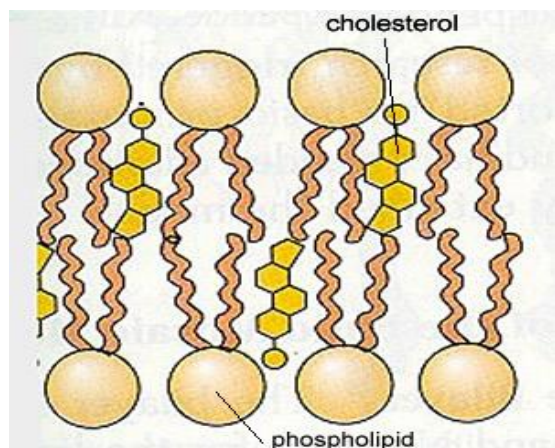
حرکات فسفولیپیدها در غشا باعث سیالیت غشا می‌شود. انواع حرکات فسفولیپیدها: ۱- افقی در یک لایه ۲- حرکت چرخشی در جای خود ۳- حرکت Flip Flop جابجا شدن دو فسفو لیپید در دو لایه



سیالیت غشا وابسته به دو عامل بستگی دارد: میزان کلسترول و سیالیت لیپید

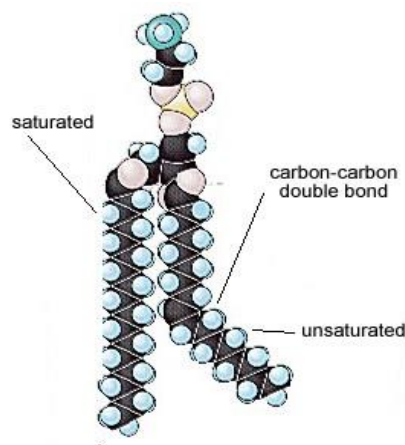
نقش کلسترول در حفظ سیالیت غشا: هرچه کلسترول بیشتر سیالیت غشا نیز بیشتر خواهد بود. مولکول کلسترول بین فسفولیپیدهای غشا قرار گرفته به طوری که گروه هیدروکسیل آن در تماس با محیط آبی بوده و مابقی مولکول در داخل لایه غشا قرار می‌گیرد. در دماهای بالاتر از دمای

انتقالی (دمایی که غشا از حالت منظم به حالت نامنظم در می آید) حلقه استرول این مولکول با زنجیره اسید چرب فسفولیپیدها ارتباط برقرار کرده و حرکت آنها را محدود می کند و در نتیجه سیالیت غشا را کاهش می دهد. از طرفی هنگامی که دما به حدود دمای انتقالی می رسد ارتباط بین کلسترول و زنجیره اسید چرب فسفولیپیدها مانع قرار گیری مرتب آنها در کنار یکدیگر می شود و به این ترتیب سیالیت غشا در دماهای پایین حفظ می شود.



سیالیت لیپیدها نیز به دو عامل بستگی دارد:

۱- درجه اشباع بودن زنجیره های هیدروکربنی : هر چه میزان اشباع بودن اسید چرب کمتر باشد به دلیل فاصله گرفتن اسیدهای چرب از یکدیگر سیالیت غشا افزایش پیدا میکند همچنین غشا در عین اینکه سیال است به طور کامل انسجام دارد.



۲- دمای محیط. افزایش دما سبب افزایش سیالیت غشا میشود چون باعث فاصله گرفتن فسفولیپیدها از یکدیگر میشود.

مواد فعال سطحی surfactants یا Detergent: مواد دوگانه دوستی که شامل یک بخش

چرب و یک قسمت قطبی یا باردار با بار مثبت یا منفی می باشند.

مثال سدیم دودسیل سولفات یا SDS که شامل یک سر انیون و یک دم دوازده کربنه با زنجیر اشباع است.

SDS دترجنت آنیونی است که به اغلب مولکولهای پروتئینی در محلول های مایع و در pH های متفاوت متصل می شود. برای همین "SDS" باعث القاء بار الکتریکی منفی متناسب با اندازه در پلی پتیدها میگردد. در غلظت پایین با برهمکنش الکترواستاتیکی از طریق سر آنیونی سبب ایجاد تغییرات کانفرماسیونی در پروتئین می شود. در غلظت بالا دم چرب آن از طریق برهمکنش هیدروفوب با بخش چرب پروتئین سبب غیرطبیعی شدن آن می شود. "SDS" با تخریب پیوندهای هیدروژنی و بر هم کنش های هیدروفوبی، باعث تخریب ساختمان دوم و سوم پروتئین ها می گردد. کاربرد در الکتروفورز پروتئینهای غشا

پروتئینهای محیطی : در سطح غشا قرار دارند و بسیاری از آنها دارای فعالیت آنزیمی می باشند.

پروتئینهای انتگرال : پروتئینهای درشت مولکولی هستند که مستقیماً در داخل لیپید دو لایه قرار گرفته اند. اندازه این پروتئینها به حدی است که سراسر ضخامت لیپید دولایه را طی می کنند و در هر دو سطح غشا نمایان هستند و یا اینکه تا حدی در ضخامت لیپید دو لایه فرو رفته اند و فقط در سطح داخلی یا خارجی غشا نمایان می باشند. از آنجا که مواد محلول در آب قادر به عبور از لیپید دولایه نمی باشند عقیده بر این است که پروتئینهای سراسری به عنوان کانالهایی برای مبادله مواد محلول در آب از قبیل یونها عمل می کنند.

عملکرد پروتئین ها: کانال و حامل

کانال : غیراختصاصی عمل کرده و در جهت شیب غلظت مواد را جابجا می کند. نسبت به دما حساس نیست. **انواع کانال: نشتی و دریچه دار** شامل دریچه دار ولتاژی، دریچه دار لیگاندی، دریچه دارشیمیایی، دریچه دارشیمیایی وابسته به ولتاژ، کانال های نوع S

حامل: اختصاصی عمل کرده و در خلاف جهت شیب غلظت مواد را جابجا می کند. نسبت به دما حساس است.

کانال نشتی: این کانال ها عبور و مرور را در دو طرف غشا امکان پذیر می کند. مثال کانال نشتی سدیم و پتاسیم.

یون سدیم نسبت به پتاسیم یک لایه الکترونی کمتر دارد. بنابراین شعاع کوچکتري نسبت به یون پتاسیم دارد. هر دو دارای یک بار مثبت هستند. چگالی سطحی بار سدیم بیش از پتاسیم است. پس بیشتر آب پوشیده می شود. پس یون سدیم آب پوشیده بزرگتر از یون پتاسیم آب پوشیده است. دهانه کانال نشتی سدیم انقدر کوچک است که حتی انتظار می رود یون سدیم نتواند از آن عبور کند. وجود بار الکتریکی منفی در سطح داخلی این کانال باعث کشیده شدن یون های سدیم که چگالی بار سطحی بیشتری نسبت به پتاسیم دارد، می شود و انرژی لازم برای حذف لایه های آب آن فراهم می گردد. بنابراین یون های سدیم به راحتی عبور داده می شوند.

کربوهیدراتهای غشا

کربوهیدراتهای غشا از نوع الیگوساکاریدها می باشند. الیگوساکاریدها به کربوهیدراتهای متشکل از چند واحد قندی اطلاق می گردد. الیگوساکاریدها عمدتاً در سطح خارجی غشا و متصل با پروتئینها و لیپیدها یعنی به صورت گلیکوپروتئین و گلیکولیپید دیده می شوند. ترکیبات فوق هم دارای خاصیت آنتی ژنیک می باشند و هم به عنوان رسپتور (گیرنده) در سطح سلول عمل می کنند. وجود رسپتور در سطح سلول باعث می شود که مواد معینی بتوانند وارد سلول شوند و یا سلول نسبت به هورمون معینی که رسپتور آن را دارد عکس العمل نشان دهد.

سیستمهای انتقال از غشا: ۱- انتقال فعال شامل انتقال اولیه و ثانویه . ۲- انتقال غیرفعال شامل انتشار ساده، تسهیل شده و اسمز

انتشار

انواع انتشار: ۱- ساده ۲- تسهیل شده ۳- اسمز

انتشار ساده:

ساده ترین راه برای انتقال مواد، انتشار است. انتشار بر اساس اختلاف غلظت و از غلظت بالا به پایین رخ می دهد. مبادله مواد محلول در چربی، آب، گاز اکسیژن و دی اکسید کربن بین سلول و محیط اطراف انتشار نامیده می شود.

بر اساس قانون فیک، میزان انتشار با میزان اختلاف غلظت متناسب است.

انتشار ساده مواد از بین فسفولیپیدها (مواد محلول در چربی) و یا از طریق کانال (موادی مانند یون ها که محلول در چربی نیستند) انجام می شود.

مواد محلول در چربی به راحتی از دو لایه چربی عبور می کنند. برای آنها یک ضریب توزیع تعریف می شود که با k نشان داده می شود.

$$K = \frac{\text{توانایی حل شدن در چربی}}{\text{توانایی حل شدن در آب}}$$

جریان در انتشار آزاد:

جریان در انتشار آزاد برای نمونه های بدون بار از رابطه **Teorell** بدست می آید:
(جریان = تحرک $\times$ غلظت $\times$ نیروی محرکه)

جریان: تعداد مول های حل شونده ای که در هر ثانیه از هر سانتی متر مربع سطح غشا عبور می کند.

تحرک حل شونده بیانگر سهولت انتقال حل شونده از غشا است.

غلظت مقدار ماده ای است که در فرآیند انتشار شرکت می کند.

نیروی محرکه: منفی گرادیان پتانسیل شیمیایی حل شونده است.

انتشار تسهیل شده:

در صورتی که انتشار مواد با اتصال به مولکولهای دیگر تسریع گردد آن را انتشار تسهیل شده می نامند. چون انتشار تسهیل شده با دخالت پروتئینهای انتگرال صورت می گیرد. پروتئینهای دخیل در این امر را حامل Porter یا انتقال دهنده گویند. مواد بر اساس اختلاف غلظت با حداکثر سرعت جابه جا می شود

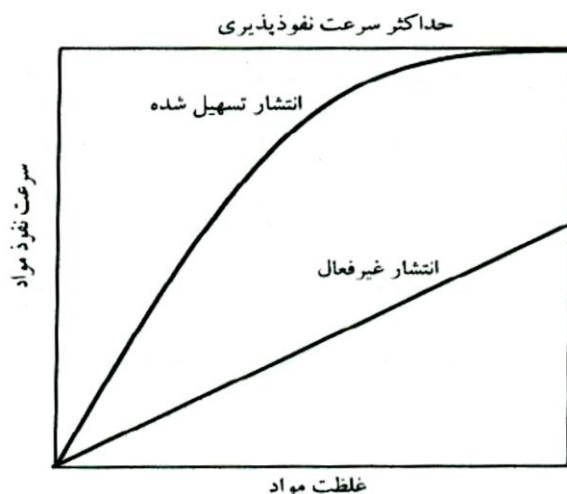
نکته: طبق قانون فیک برای هر دو نوع انتشار ساده و تسهیل شده، با افزایش اختلاف غلظت، میزان انتشار افزایش می یابد، اما برای انتشار تسهیل شده حداکثر انتقال وجود دارد و اگر اختلاف غلظت از حدی بیشتر شد، میزان انتشار دیگر افزایش نمی یابد.

به دو دلیل انتشار تسهیل شده اشباع پذیر است:

با افزایش غلظت، جایگاه های بیشتری اشغال می شوند تا جایی که تمام جایگاه ها پر می شوند. این پروتئین ها برای تغییر شکل به زمان مشخصی احتیاج دارند که این عامل نیز محدود کننده است.

نمودار انتشار ساده: در انتشار ساده افزایش غلظت با افزایش سرعت نفوذ مواد رابطه خطی و مستقیم دارد.

نمودار انتشار تسهیل شده: برای انتشار تسهیل شده نمودار هذلولی بوده و حداکثر انتقال وجود دارد و اگر اختلاف غلظت از حدی بیشتر شد، میزان انتشار دیگر افزایش نمی یابد.



سرعت انتشار خالص به عوامل زیر بستگی دارد:

الف- نفوذپذیری غشا که به ۱- ضخامت غشا، ۲- حل پذیری در چربی ، ۳- تعداد کانال های پروتئینی ، ۴- دما ، ۵- وزن مولکولی و ۶- مقدار نشتی بستگی دارد.

ب- ضریب انتشار : $D = P \times A$ که D نشان دهنده ضریب انتشار و P نفوذپذیری و A مساحت

کل سطح است. ج- اختلاف غلظت، د- اختلاف پتانسیل الکتریکی، ه- اختلاف فشار

سه مرحله جداگانه برای نفوذ مولکول به درون غشا: ۱. انتشار مولکول از محیط خارج سلولی

به غشا ۲. انتشار مولکول در عرض غشا از سطح بیرونی به سمت داخل سلولی ۳. انتشار از سطح

داخل سلولی غشا به درون سلولی

انتشار اسمز:

غشای نیمه تراوا: غشایی که نسبت به آب تراوا و نسبت به برخی مواد ناتراواست.

حرکت خالص آب بر اثر یک اختلاف غلظت برای آب ، از طریق یک غشای نیمه تراوا را اسمز می نامند.

فشار اسمزی: مقدار فشار لازم برای متوقف کردن اسمز به طور کامل را فشار اسمزی گویند.

فشار اسمزی یک محلول به وسیله تعداد ذرات در واحد حجم تعیین می شود و به جرم ذرات بستگی

ندارد. دلیل این موضوع آن است که هر ذره صرف نظر از جرمش، به طور متوسط فشار یکسانی را

به غشا وارد می کند. در واقع ذرات بزرگ که جرم بیشتری از ذرات کوچکتر دارند با سرعت کمتری حرکت می کنند

فرمول فشار اسمزی: $P = CRT$ که در آن T درجه حرارت مطلق ، R ضریب ثابت گازها و C غلظت مواد به مولار است.

محلول ایزوتونیک: محلولی که غلظت مواد نفوذناپذیر برابر مواد داخل سلول دارند.

محلول هیپوتونیک: محلولی که دارای غلظت کمتری از مواد نفوذناپذیر نسبت به مواد داخل سلول هستند.

در این حالت آب از محلول داخل سلول جربان دارد که میزان آن بستگی به هیپوتونیک بودن محلول است.

اگر فشار بیش از تحمل غشا باشد منجر به انهدام سلول و **لیز اسمزی** می شود.

محلول هایپر تونیک: محلولی که دارای غلظت بیشتری از مواد نفوذناپذیر نسبت به مواد داخل سلول هستند.

سلول در این محول آب از دست داده و چروکیده می شود.

تعادل دونان – equilibrium Donnan

اگر دو فاز شامل الکترولیت بوده و یکی از فازها یا هر دو شامل اجزاء بارداری باشند که نتوانند از غشاء عبور کنند، تعادل دو نان مطرح می شود. بعنوان مثال اگر محلولی که شامل پروتئین باردار باشند توسط غشایی غیرقابل نفوذ به پروتئین از محلولی دیگر جدا شود، تعادل دو نان رخ می دهد. ژل باردار شده (پلی الکترولیت) در محلول نمک نیز تعادل دونان را سبب می شود. یونهای محیط خارج می توانند داخل ژل شده و میان ژل به تعادل برسند. در حالی که مولکول های باردار با زنجیر بلند که سازنده ژل می باشند، به صورت کووالان به یکدیگر متصل بوده و نمی توانند وارد نمک شوند.

عامل ایجاد پتانسیل دونان: اختلاف غلظت، نفوذ پذیر بودن یون های موجود در دو طرف غشا و نیمه تراوا بودن غشا برای بعضی از مولکول ها

برای حذف پدیده دونان می توان از **قدرت یونی بالا** (استفاده از نمک های غلیظ یا با یونهای با ظرفیت بالا) و یا **قرار دادن پروتئین ها در pH بدون بار** (pH ایزو الکتریک) که بار در آن خنثی می شود، استفاده کرد.

انتقال فعال Active transport

نقل و انتقال الکترولیتها بین سلول و محیط اطراف آن بر خلاف شیب غلظت و با صرف انرژی انجام می گیرد.

انتقال فعال اولیه: در این نوع انتقال انرژی با مصرف ATP تامین می شود.

مثال انتقال فعال اولیه: هیدروژن: در دو محل از بدن سیستم های انتقال فعال اولیه مهم برای یون های هیدروژن وجود دارد. غدد گاستریک معده و در کلیه ها در بخش قشری این عمل رخ می دهد.

مولکول ATP یک پلی الکترولیت با چهار بار منفی است و باید با کاتیون های دوظرفیتی مانند Ca^{+2} و Mg^{+2} و Mn^{+2} همراه شود. غلظت سه جز ATP و ADP و AMP در سلول معیار مناسبی برای محاسبه ذخیره انرژی سلولی است.



فسفات ه شدن باعث فعال شدن مولکول ها می شود. یعنی مولکول شیمیایی با اتصال به فسفر پرانرژی فعال و آگارگر مسیرهای انرژی زایی میشوند.

فرمول ذخیره انرژی سلول این جوریه:

$$\text{ذخیره انرژی} = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

پمپ سدیم پتاسیم ATPase

به طور همزمان دو یون پتاسیم را به داخل سلول و سه یون سدیم به خارج سلول انتقال می دهد. طی یک چرخه کاری در پمپ یک مولکول ATP تجزیه می شود. این پمپ 6 جایگاه پیوندی دارد. ۲ جایگاه در خارج سلول برای پتاسیم و ۳ جایگاه در داخل سلول برای سدیم و یک جایگاه برای ATP

وظایف این پمپ: ۱- تنظیم حجم سلول ۲. منفی شدن داخل سلول. (این پمپ نوعی پمپ الکترولیتیک است)

یکی از اعمال مهم پمپ سدیم - پتاسیم ایجاد اختلاف الکتریکی بین دو سمت غشا است. به عبارت دیگر وجود گرادیان غلظتی بزرگ پتاسیم از داخل به طرف خارج غشا، یون های پتاسیم اضافه تمایل

برای انتشار به طرف خارج را دارند، بنابراین یک حالت الکتروپوزیتیویته (بار مثبت) در خارج غشا و یک حالت الکترونگاتیویته (بار منفی) در داخل سلول باقی می ماند.

هم انتقالی: پمپ سدیم- پتاسیم، از طریق انتقال فعال اولیه عمل می کند. در نتیجه عملکرد این پمپ، یون های سدیم به خارج سلول منتقل شده، غلظت سدیم در خارج از سلول زیاد و در داخل کم می شود و این حالت باعث گرادیان غلظت بزرگی برای یون سدیم است که خود این گرادیان مانند یک منبع ذخیره انرژی است، بدین معنا که یون های سدیم در خارج غشای سلول تمایل دارند که به داخل سلول انتشار یابند و همین انرژی انتشاری سدیم می تواند سایر مواد را همراه با سدیم از غشا عبور دهد که به این نحوه انتقال ، انتقال فعال ثانویه یا هم انتقالی گفته می شود. هم انتقالی سدیم- گلوکز و یا سدیم-آمینواسید نیز در بسیاری از سلول ها از این شیوه تبعیت می کند. در این هم انتقالی ها، پروتئین حامل خاصی در غشای سلول نقش دارد که در هم انتقالی گلوکز با سدیم ، حامل پروتئینی دارای دو جایگاه اتصال برای یون سدیم و گلوکز است که با اشغال شدن این دو جایگاه توسط سدیم و گلوکز، یک تغییر شکل فضایی در حامل پروتئینی به وجود می آید و یون های سدیم همراه با گلوکز به داخل سلول منتقل می گردند. همین حالت برای هم انتقالی آمینواسید و سدیم نیز وجود دارد

انتقال در دو جهت مخالف: انتقال سدیم و کلسیم در دو جهت مخالف در تمام غشاهای سلولی که در آن یون های سدیم به طرف داخل و یون های کلسیم به طرف خارج سلول حرکت می کنند و هر دو به یک پروتئین انتقالی واحد متصل شده اند.

پتانسیل نرنست: مقدار پتانسیل بین دو سوی غشا که دقیقاً از انتشار خالص یک یون خاص از غشا جلوگیری می کند پتانسیل نرنست نام دارد. هر چقدر نسبت غلظت یون در داخل به غلظت یون در خارج بیشتر باشد تمایل یون ها برای انتشار یافتن در یک جهت بیشتر خواهد بود.

فرمول نرنست:

$$E = -61 \log \frac{[x]_i}{[x]_o}$$

غلظت یک یون خاص در داخل غشا ←
 ← غلظت یک یون خاص در خارج غشا

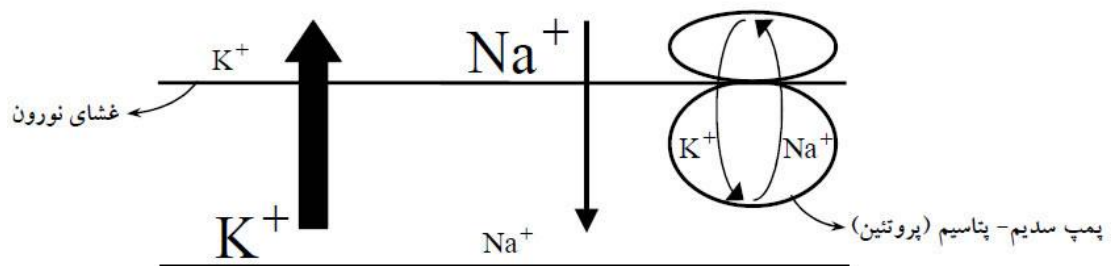
پمپ کلسیم غلظت کلسیم داخل سیتوزول نسبت به محیط خارج سلولی و بخش های معینی از داخل ارگان ها پایین تر است. دونوع پمپ کلسیم وجود دارد یکی در غشای سلولی است و مرتب

کلسیم را به خارج سلول پمپ می کند. دیگری در غشای ارگانل ها که مرتب کلسیم را به درون ارگانل ها پمپ می کند. حاصل عمل هر دو پمپ کاهش غلظت سیتوزولی کلسیم است.

پتانسیل استراحت : به پتانسیل غشا در حالت عادی که سیگنال های عصبی را انتقال نمی دهد ، پتانسیل استراحت گفته می شود.

نحوه ایجاد پتانسیل استراحت:

در حالت پتانسیل استراحت، پتانسیل درون سلول نسبت به بیرون آن منفی است، منظور این است که میزان بارهای مثبت در داخل سلول کمتر از میزان بارهای خارج سلول است. همانطور که در شکل ملاحظه می فرمایید، غلظت یون پتاسیم در داخل سلول بسیار بیشتر از غلظت آن در خارج سلول است و نیز غلظت یون سدیم در خارج سلول بسیار بیشتر از غلظت آن در داخل سلول است. لذا یون های پتاسیم مایل به خروج و یون های سدیم مایل به ورود به سلول هستند؛ اما چون نفوذپذیری غشا نسبت به یون پتاسیم بیشتر است، میزان خروج یون پتاسیم از سلول بیشتر از میزان ورود یون سدیم به سلول است و به همین دلیل هم در حالت آرامش، اختلاف پتانسیل داخل سلول نسبت به خارج آن منفی است. حال برای جلوگیری از کاهش غلظت یون پتاسیم و افزایش غلظت یون سدیم در سلول پمپ سدیم-پتاسیم دائماً این یون ها را با صرف انرژی (انتقال فعال) به جای اولیه ی خود باز می گرداند.



پتانسیل عمل: هر پتانسیل عمل با یک تغییر ناگهانی از پتانسیل استراحت طبیعی که منفی می باشد به یک پتانسیل مثبت غشا می رسد و سپس با برگشت به پتانسیل منفی خاتمه می یابد.

مراحل یک پتانسیل عمل عبارتند از :

۱ - **مرحله استراحت :** این همان پتانسیل استراحت قبل از شروع پتانسیل عمل است.

۲ - **مرحله تحریک یا دیپولاریزاسیون:** در این مرحله ناگهان غشا به یون سدیم نفوذپذیر شده (توسط کانال های سدیمی) و اجازه ورود به یون های سدیم با بار مثبت به داخل غشا داده می

شود. در برخی از سلول ها این میزان مثبت شدن تا بالای صفر میلی ولت نیز می رود اما در اکثر فیبرهای عصبی نازک نزدیک صفر باقی می ماند.

۳- مرحله برگشت یا رپولاریزاسیون: در چند هزارم ثانیه کانال های سدیمی شروع به بسته شدن می کنند و کانال های پتاسیمی بیش از حد باز می مانند.

هر پتانسیل عمل می تواند در هر نقطه ای از یک غشای تحریک پذیر شروع شود. از قسمت های تحریک شده نفوذ پذیری به یون سدیم شروع شده و به طور ناگهانی افزایش می یابد. بارهای الکتریکی مثبت که توسط جریان انتشاری یون های سدیم حمل می شوند از طریق غشای دپولاریزه به طرف داخل و سپس برای چندین میلی متر در هر دو جهت در طول اکسون حرکت می کنند. بنابراین کانال های سدیمی در این نواحی جدید بلافاصله باز می شود و این روند در طول سراسر فیبر سیر می شود

اصل همه یا هیچ:

اگر روند دپولاریزاسیون در صورتی که شرایط مناسب باشد در سراسر طول غشا سیر خواهد شد و اگر شرایط مناسب نباشد ممکن است سیر صورت نگیرد.

انواع سیناپس ها :

سیناپس الکتریکی که در قلب فراوان یافت می شود.

سیناپس شیمیایی که در ارتباط عصب-عصب و عصب-عضله دیده می شود.

مقایسه سیناپس الکتریکی و شیمیایی: در سیناپس الکتریکی یون جابجا می شود و در هر دو طرف سیناپس امکان جابجایی جریان وجود دارد. در سیناپس شیمیایی ماده میانجی شیمیایی رها شده و جریان یک طرفه است.

مراحل انتقال پتانسیل عمل در سیناپس شیمیایی: ۱- پتانسیل عمل در سلول پیش سیناپس ۲- ریزش کلسیم در نزدیکی پایانه ۳- اتصال کیسه های ترشحی به پایانه های پیش سیناپس ۴- ریزش میانجی در فضای بین سیناپس ۵- تنظیم کانال های سدیمی لیگاندی در پایانه پس سیناپسی برای موج تحریکی ۶- ایجاد پتانسیل عمل توسط کانال های ولتاژی سدیم.