۱-دکتر علیرضا فرخ ، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران
۲-دکتر هادی فرخ ، پزشک، ریاست سابق مرکز بهداشت شهرستان فومن، استان گیلان
۳-پروین آقازادگان ، نویسنده همکار
۴-دکتر محمد رضا فرخ ، پزشک، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران
۵-آیشن آقازادگان، کارشناس و محقق بیولوژی
۶-علی آقازادگان، علاالدین آقازادگان، الناز آقازادگان، نویسندگان همکار

پروتئین، از خالص سازی تا آزمایش آن در خون

خالص سازی پروتئین به مجموعه ای از فرآیندها گفته می شود که در آن یک یا تعداد اندکی از پروتئین ها از یک ترکیب پیچیده که ممکن است سلول، بافت یا موجود زنده کامل باشد، خالص می گردد. برای این که بتوانیم عملکردها، ویژگی های ساختاری و برهم کنش های پروتئین مورد نظرمان را دریابیم ابتدا لازم است تا آن را خالص کنیم. در فرآیند خالص سازی، قسمت پروتئینی و غیرپروتئینی از هم جدا می شوند. بیشترین چالش مربوط به زمانی است که پروتئین مورد نظر باید از سایر پروتئین ها جدا شود. مراحل خالص سازی وابسته به اندازه پروتئین، ویژگی های فیزیکوشیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت زیستی پروتئین مورد نظراست. محصول پایانی فرآیند تخلیص، پروتئین جداسازی شده نام دارد. معمولاً فرآیند تخلیص پروتئین، شامل فیلتراسیون و یک یا چند مرحله کروماتوگرافی است. با استفاده از روش هایی مانند کروماتوگرافی و بهینه سازی آن، مولکول های خالص تر بدست می آید و تحقیقات دقیق تری انجام می گیرد. در نتیجه، با تخلیص مولکول مورد نظر، می توان از آن در صنایع مختلف از جمله پزشکی استفاده کرد. خالص‌سازی پروتئین (Protein purification) به مجموعه ای از فرآیندها گفته می‌شود که در آن یک یا تعداد اندکی از پروتئین‌ها از یک ترکیب پیچیده (که ممکن است سلول، بافت یا موجود زنده کامل باشد) خالص می‌شود. مراحل خالص‌سازی معمولاً به اندازه پروتئین، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت بیولوژی پروتئین مورد نظر بستگی دارد. محصول نهایی فرآیند تخلیص، پروتئین جداسازی شده (protein isolate) نام دارد.

تعریف پروتئین

پروتئین‌ها ماکرومولکول‌های زیستی هستند که عملکردهای اساسی مانند نقش هورمونی، آنزیمی و ساختاری را در بدن بر عهده دارند. اکثر پروتئین ها از پلیمرهای خطی ساخته شده از مجموعه‌ای تا ۲۰ اسید آمینه مختلف ساخته شده‌اند. همه اسیدهای آمینه دخیل در ساختمان پروتئین‌ها، دارای ویژگی‌های ساختاری مشترکی از جمله یک کربن آلفا، یک گروه آمین، یک گروه کربوکسیل و یک زنجیره جانبی با ساختار متغیر هستند. اسیدآمینه پرولین به دلیل ساختار حلقه‌ای غیرمعمول خود با دیگر اسیدهای آمینه متفاوت است. زنجیره‌های جانبی آمینو اسیدهای استاندارد که در لیست اسیدهای آمینه استاندارد ذکر شده‌اند، دارای تنوع زیادی در ساختارها و خواص شیمیایی هستند. این اثر ترکیبی تمام زنجیره‌های جانبی آمینو اسید در یک پروتئین است که در نهایت ساختار سه بعدی و واکنش شیمیایی آن را تعیین می کند. اسیدهای آمینه موجود در یک زنجیره پلی‌پپتیدی با پیوندهای پپتیدی مرتبط می‌شوند. به محض اتصال در زنجیره پروتئین، یک آمینواسید جداگانه باقی‌مانده نامیده می‌شود و مجموعه پیوند یافته اتم‌های کربن، نیتروژن و اکسیژن به عنوان زنجیره اصلی یا ستون فقرات پروتئین شناخته می‌شوند.

ساختار پروتئین ها

بیشتر پروتئین‌ها بعد از سنتز، ساختارهای سه بعدی منحصر به فردی پیدا می‌کنند که به عنوان ساختار طبیعی آن‌ها شناخته می‌شود. اگرچه بسیاری از پروتئین‌ها می‌توانند به طور خود به خودی و بر اساس خصوصیات اسید آمینه‌های سازنده خود و میان‌کنش آن‌ها با یکدیگر، ساختار سه بعدی خاصی پیدا کنند، اما برخی دیگر برای سازمان‌یابی نهایی و ایجاد فرم عملکردی فعال و طبیعی خود، به کمک مولکول‌هایی به نام «چاپرون‌ها» (Chaperones) نیاز دارند. چاپرون‌ها گروهی از پروتئین‌ها هستند که عملکردهای مختلفی دارند اما کار اصلی آن‌ها اتصال به پروتئین‌های غیربومی، جلوگیری از تجمع غیر اختصاصی آن‌ها و کمک به ایجاد ساختار سه بعدی پروتئین‌ها است. پروتئین‌ها بر اساس میزان پیچیدگی و سازمان‌یابی، ۴ ساختار دارند:

ساختار اولیه: توالی اسید آمینه پروتئین و به صورت یک پلی‌آمید یا پلی پپتید خطی است.

ساختار ثانویه: تکرار منظم ساختارهای محلی تثبیت شده، که به دلیلی وجود پیوندهای هیدروژنی و پیوندهای دی سولفیدی شکل می‌گیرد. متداول‌ترین نمونه ساختار ثانویه پروتئین‌ها مارپیچ آلفا، صفحات بتا، turnها و لوپ‌ها هستند. از آنجا که ساختارهای ثانویه، محلی هستند، بسیاری از مناطق با ساختار ثانویه متفاوت می‌توانند در یک مولکول پروتئین منفرد وجود داشته باشند.

ساختار سوم: شکل کلی یک مولکول پروتئین و حاصل کنار هم قرار گرفتن چندین ساختار ثانویه در کنار یکدیگر است. ساختار سوم به طور کلی با فعل و انفعالات غیرمحلی، اتصالات آب‌گریز و آب دوست، پل‌های نمکی، پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای دی‌سولفید و یا تغییرات پس از ترجمه ایجاد می‌شود. ساختمان سوم پروتئین‌ها، عملکرد اساسی و نهایی آن‌ها را تعیین می‌کند.

ساختارچهارم: ساختاری است که توسط چندین مولکول پروتئین (زنجیره‌های پلی‌پپتیدی) تشکیل شده است که زیر واحدهای پروتئینی گفته می‌شوند و به عنوان یک مجموعه پروتئینی واحد عمل می‌کنند.

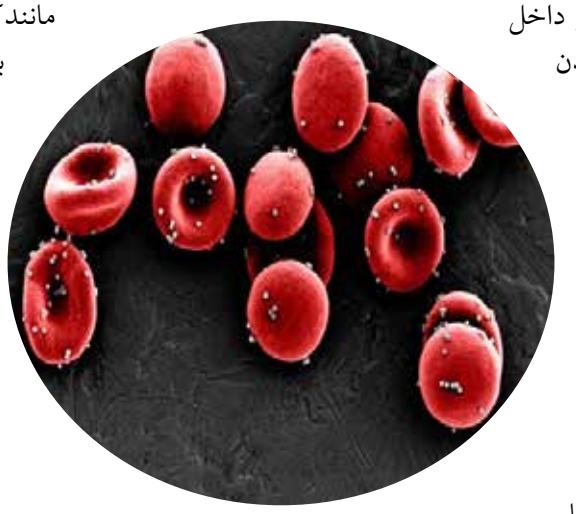
ساختار کوینری: جایگاه‌های فعال سطح پروتئین هستند که فضای داخلی سلول شلوغ را سازمان می‌دهد. ساختار کوین گذرا و لحظه‌ای است و به فعل و انفعالات

درون سلولی و میان کنش‌هایی که با ماکرومولکول‌ها و سایر ترکیبات سلولی ایجاد می‌شود، بستگی دارد.

پروتئین‌ها مولکول‌هایی با ساختار ثابت و غیرمنعطف نیستند. علاوه بر این سطوح ساختمانی که ذکر شد، ممکن است پروتئین‌ها درحین عملکردهایشان در سلول، در حالت‌های مختلفی سازمان‌یابی شوند. در این بازآرایی‌های عملکردی، ساختمان‌های سوم یا چهارمی که به وجود می‌آیند تحت عنوان «کانفورماسیون» (Conformation) شناخته می‌شوند و تغییر حالت بین کانفورماسیون‌های مختلف، تغییرات ساختاری نام دارد. چنین تغییراتی غالباً با اتصال مولکول سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم (ناحیه فیزیکی پروتئینی که در تجزیه شیمیایی شرکت دارد) ایجاد می‌شوند. پروتئین‌های محلول نیز از طریق لرزش حرارتی و برخورد با سایر مولکول‌ها دچار تغییرات ساختاری می‌شوند.

تغییرات پس از ترجمه پروتئین ها

پس از سنتز پروتئین در داخل سلول، معمولاً با اضافه شدن گروه‌های عملکردی مانند قندها یا فسفات، به زنجیره پلی‌پپتیدی، تغییراتی در آن اتفاق می‌افتد. این تغییرات ممکن است عملکردهای خاصی را در پروتئین ایجاد کنند. یک روش آسان برای بررسی اثر این تغییرات در ساختار و عملکرد پروتئین، استفاده از طیف سنجی جرمی است که با آن می‌توان در نمونه سیگنال‌های پروتئینی اصلاح شده و اصلاح نشده را مشاهده کرد.



تغییرات پس از ترجمه دو نوع عمده دارند:

شکسته شدن پیوندهای پپتیدی: اصلاحات پس از ترجمه، آنزیم‌های تخصصی به نام پروتئازها، اسیدهای آمینه خاص یک پروتئین را تشخیص می‌دهند و پیوند پپتید مرتبط را می‌شکنند، در نتیجه ساختار اولیه را به صورت برگشت ناپذیر اصلاح می‌کنند.

اضافه شدن یا حذف شدن گروه‌های عملکردی به زنجیره‌های جانبی آمینو اسیدها: زنجیره‌های جانبی اسید آمینه پروتئین معین با واکنش‌های آنزیمی اصلاح‌کننده یا خود به خود تشکیل می‌شوند (غیر آنزیمی). نمونه‌هایی از اصلاحات زنجیره جانبی زیاد است اما موارد متداول آن شامل اکسیداسیون، آسیلاسیون، گلیکوزیلاسیون (افزودن گلیکان یا قند)، متیلاسیون و فسفوریلاسیون هستند. هر دو نوع تغییرات پس از ترجمه، کنترل مثبت و منفی بر عملکرد پروتئین یا آنزیم و نقش تنظیمی در سلول دارند.

انواع پروتئین ها

می‌توان پروتئین‌ها را بر پایه ی ساختمان سوم آن‌ها به سه گروه اصلی تقسیم کرد:

پروتئین های کروی: تقریباً تمام پروتئین‌های محلول، کروی و شامل بسیاری از آنزیم‌ها هستند.

پروتئین های خطی: اغلب نقش ساختاری دارند مانند کلاژن که جزء اصلی بافت همبند است یا کراتین که در ناخن و مو وجود دارد.

پروتئین های غشایی: پروتئین‌های غشایی غالباً به عنوان گیرنده یا کانال‌هایی برای عبور مولکول‌های قطبی یا باردار از غشای سلول عمل می‌کنند.

یک نوع خاص از پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی پروتئین ها، که در برابر حمله مولکول‌های آب محافظت نمی‌شود و در نتیجه فرآیند آب‌گیری را خودش انجام می‌دهد دهیدروژن‌ها هستند که عملکرد دهیدروژنیاسیون را انجام می‌دهند و باعث آب‌گیری از اطراف پروتئین می‌شوند.

دامین پروتئین

دامین یا دومین پروتئین بخش‌های حفاظت شده از ساختار سوم پروتئین هستند که می‌توانند به صورت مستقل از سایر بخش‌های پروتئین، عملکرد داشته باشند. پروتئین‌ها به طور معمول چندین دامین اختصاصی دارند که هر یک عملکرد خاص خود را انجام می‌دهند و ممکن است در خانواده‌ای از پروتئین‌ها مشترک باشند. به عنوان

مثال، دومین SH3، از ۶۰ ریشه آمینواسیدی تشکیل شده است که در مولکول‌های فسفولیپاز و چندین تیروزین کیناز سیتوپلاسمی همچون ABL1 و تیروزین - پروتئین کیناز CSK وجود دارد.

موتیف پروتئین

توالی کوتاه اسیدهای آمینه در پروتئین ها، اغلب به عنوان مکان‌هایی برای شناسایی پروتئین های دیگر عمل می‌کنند. به عنوان مثال، دامین‌های SH3 به طور معمول به توالی‌های چهارتایی که در دو انتهای پرولین وجود داشته باشد، متصل می‌شوند. «موتیف‌ها» (Motifs) ساختارهای فرا ثانویه‌ای هستند که عملکرد خاصی را بر عهده دارند. از آنجایی که تعیین ارتباط بین ساختار اولیه و ساختار سوم پروتئین ها ساده نیست، دو بیوپلیمر ممکن است یا وجود توالی امینو اسیدی متفاوت، یک موتیف مشترک داشته باشند. از طرف دیگر، وجود یک موتیف مشابه لزوماً به معنای ساختار اولیه متفاوت نیست. در پروتئین ها، موتیف ساختاری ارتباط بین عناصری که در ساختمان ثانویه پروتئین دخالت دارند را نشان می‌دهد. موتیف‌های منفرد به طور معمول از چند جزء تشکیل شده‌اند. به عنوان مثال، موتیف «مارپیچ - چرخش - مارپیچ» که فقط سه جزء دارد. اگرچه توالی مکانی این اجزا ممکن است در همه نمونه‌های یک موتیف یکسان باشد، اما ممکن است ساختار اولیه پروتئین حامل موتیف، یکسان نباشد و یا رمزگذاری آن در ساختار DNA مشابه نباشد. علاوه بر عناصر ساختار ثانویه، موتیف‌های ساختاری اغلب شامل حلقه‌هایی با طول متغیر و ساختار نامشخص هستند. موتیف‌های ساختاری ممکن است به صورت تکرارهای پشت سر هم دیده شوند که انواع رایج آن‌ها عبارتند از:

«سنجاق بتا» (Beta hairpin): دو رشته بتای غیرموازی که با چرخش چند اسید آمینه، به یکدیگر متصل می‌شوند.

«کلید یونانی» (Greek key): چهار رشته بتا، سه رشته با ساختار سنجاق سر به هم متصل شده‌اند و رشته چهارم نیز در بالای آن‌ها قرار گرفته است.

«لوپ امگا» (Omega loop): یک حلقه که در آن باقی مانده‌هایی که ابتدا و انتهای حلقه را تشکیل می دهند بسیار به هم نزدیک هستند.

«مارپیچ – لوپ - مارپیچ» (Helix-loop-helix): متشکل از مارپیچ‌های آلفا است که توسط کشش حلقوی اسیدهای آمینه متصل می‌شوند. این نقش و نگار در عوامل رونویسی دیده می شود.

«انگشت روی» (Zinc finger): دو رشته بتا با انتهای مارپیچ آلفا روی هم جمع و به یون روی یا زینک متصل شده‌اند. در پروتئین های اتصال دهنده DNA این ساختار اهمیت فراوانی دارد.

«مارپیچ - چرخش - مارپیچ» (Helix-turn-helix): دو مارپیچ آلفا که با یک رشته کوتاه اسید آمینه به هم متصل شده‌اند. این ساختمان در بسیاری از پروتئین های تنظیم کننده بیان ژن یافت می‌شود. باقیمانده اسید آمینه یک تقارب اتصال آنیونی تشکیل می دهد. موقعیت مناسب، چهار باقی‌مانده اسید آمینه‌ای متوالی یک ویژگی اتصال کاتیونی را تشکیل می دهد.

ادامه این مقاله را در شماره آینده میخوانید.

منابع:

1-https://www.nhs.uk/conditions/total-protein-test.

2-https://medlineplus.gov/lab-tests/total-protein-and-albumin-globulin-a-g-ratio.

3-https://www.mountsinai.org/health-library/tests/total-protein.

4-https://www.healthline.com/health/total-protein.

5-https://www.medicalnewstoday.com/articles/#325320during-pregnancy.

6-Atiyesalamat.com

7-Microbiologynet.com

8-Pgazma.com

9-Radars.org.