اتصال کووالانسی ترکیبات ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین و ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین به پروتئین لیزوزیم تخم مرغ و آلبومین گاوی برای واکنش های بیواورتوگونال

حمیدرضا کلهر*، محسن رضایی
دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۰۶ تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۴/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۳۱

چکیده

واکنش های بیواورتوگونال به واکنش هایی گفته می شود که بدون تداخل با فرآیندهای عادی شیمیایی سیستم های زنده انجام می گیرد. از جمله شرایط اصلی برای واکنش های بیواورتوگونال، انجام پذیری در آب به عنوان حلال، pH بیولوژیک، دمای محیط، غلظت پایین و غیر سمی بودن واکنش گرها را می توان نام برد. یکی از ساده ترین راه های اطمینان از انجام پذیری واکنش های بیواورتوگونال اتصال یک ترکیب فلوئورسنت از طریق پیوند کوالانسی به پروتئین است. در این پروژه دو مشتق جدید فلوئورسین شامل ۵(۶)آسیل کلرید فلوئورسین و ۵(۶)تیوفنول فلوئورسین سنتز شدند و واکنش پذیری پروتئین آلبومین سرم گاو (BSA) و لیزوزیم با این ترکیبات در شرایط بیولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. از مزایای این مشتق ها می توان به گزینش پذیری بالا نسبت به آمینو اسید لایسین، سرعت بالا و غلظت پایین واکنشگر اشاره کرد. پروتئین متصل شده به ترکیب فلوئورسنت با دو روش کروماتوگرافی اندازه طردی و دیالیز از مولکول های متصل نشده مشتق فلوئورسین جداسازی شد. انجام واکنش با استفاده از ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید بررسی گردید. پروتئین های متصل شده در دستگاه gel documentation تصویر سازی گردید و با رنگ آمیزی کماسی آبی مقایسه گردید. همچنین برای اطمینان از واکنش گروه آمین پروتئین، واکنش پذیری ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین در pH=7 و pH=9 با پروتئین BSA بررسی شدند.

کلمات کلیدی : واکنش های بیو اورتوگونال، ۵(۶)تیوفنول فلوئورسین، ۵(۶)آسیل کلرید فلوئورسین، واکنش استگلیش، لیزوزیم، ژل اکتروفورز.

۱- مقدمه

از میان بیش از ۳۰۰ اسید آمینه طبیعی موجود، تنها ۲۲ اسید آمینه به عنوان مونومرهای سازنده پروتئین وجود دارند[۱]. پروتئین شامل بازه وسیعی از گروه های عاملی که شامل الکل، تیول، تیواتر، کربوکسیلیک اسید، کربوکسامید و غیره هستند که به صورت یک زنجیره در پروتئین بهم متصل گردیده اند و طیف وسیعی از عملکردهای آن را تشکیل می دهند. یکی از ساده ترین راه های بررسی واکنش پذیری گروه های عاملی در پروتئین، اتصال کووالانسی آنها به یک گروه فلوئورسنت است[۲-۴].

***نویسنده مسئول**: استادیار، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران Kalhor@sharif.edu

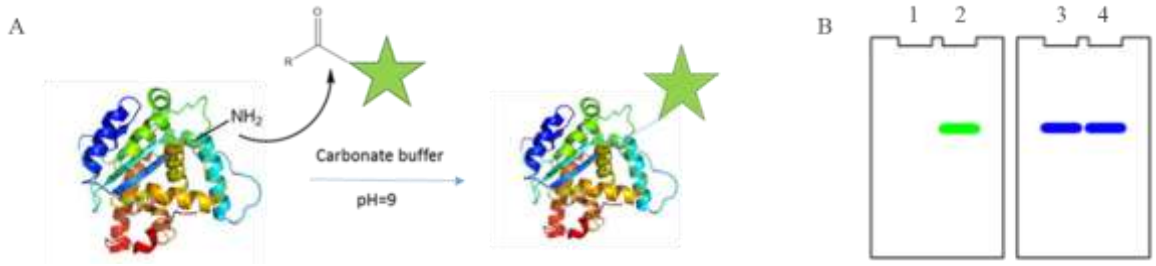
معمولا آمینواسید لایسین در پروتئین ها از واکنش پذیری خوبی برای اتصال کووالانسی با گروه فلوئورسنت برخوردار است. واکنش آمینواسید لایسین در پروتئین با N- هیدروکسی سوکسینایمید (NHS) استر یکی از شناخته شده ترین واکنش ها برای اصلاح شیمیایی پروتئین است[۵].

آمین پروتونه نشده، نوکلئوفیل ترین گروه عاملی در پروتئین است و پروتونه شدن به صورت تصاعدی این واکنش پذیری را کاهش می دهد. در pH حدود ۹ تقریبا تمام آمین های نوع اول موجود در سطح پروتئین که شامل آمین انتهایی و آمینو اسید لایسین می باشند، در فرم پروتون نشده هستند. بسته به شرایط واکنش، اصلاحات شیمیایی گزینشی آمین می تواند با ترکیبات شیمیایی متنوعی از جمله استرهای فعال شده[۶]، ایزوتیوسیانات ها[۷]، آلدهیدها[۸] و غیره صورت گیرد.

تکنیک های آشکارسازی با استفاده از ترکیبات فلوئورسنت، نقش اساسی در پیشرفت های مدرن دارویی و بیولوژی ایفا می کند.از انواع مختلف ترکیبات فلوئورسنت برای شناسایی یون های مختلفی مانند آمونیوم و ... نیز استفاده می شود[۹]. از مزایای استفاده از ترکیبات فلوئورسنت می توان به حساسیت بالا، ایمنی، گزینش پذیری، سرعت بالا و تجدید پذیری اشاره کرد. این ترکیبات فلوئورسنت تنها محدود به ترکیبات آلی نمی شوند و تا کنون ترکیبات آلی فلزی بسیاری نیز برای واکنش های بیواورتوگونال استفاده شده اند[۱۰]. در میان ترکیبات فلوئورسنت، فلوئورسین یکی از مشهورترین و پر کاربردترین این ترکیبات است که جز دسته ای از ترکیبات به نام زانتین قرار می گیرد[۱۱-۱۳]. فلوئورسین نخستین بار در سال ۱۸۷۱ توسط شیمی دان آلمانی وون بایر از واکنش رزورسینول و فتالیک انیدرید به نسبت ۲ به ۱ در مجاورت کاتالیست اسیدی (روی کلرید و یا اسید سولفوریک) در دمای بالا (تقریبا ^{o}C ۱۸۰) و بدون نیاز به حلال سنتز شد[۱۴]. امروزه با گذشت بیش از صد سال همچنان مشتقات فلوئورسین نقش اساسی در انواع تکنولوژی های زیستی ایفا می کند.

برای پژوهشگران شیمی همواره انجام واکنش های آلی در شرایط بیولوژیک و بر روی بیومولکول ها چالشی بزرگ محسوب می شود. بسیاری از واکنش های شناخته شده آلی مانند آمیناسیون کاهشی آلدهیدها[۸]، واکنش جفت شدن دی آزونیوم [۱۵]، واکنش مانیخ[۱۶]، واکنش مایکل[۱۷] و بسیاری از واکنش های ساده تا پیشرفته آلی در شرایط بیولوژیک و بر روی پروتئین ها انجام شده است و روز به روز به این تعداد افزوده می شود. از شرایط اصلی واکنش های بیواورتوگونال می توان به حضور آب به عنوان حلال اصلی، pH طبیعی، دمای محیط (حداکثر ^{o}C ۴۰)، غلظت پایین واکنشگرها و غیر سمی بودن آنها اشاره کرد. در pH=9 آمین فعال ترین هسته دوست داخل پروتئین است. به طور کلی می توان از خاصیت نوکلوئوفیلی گروه های عاملی موجود در پروتئین مخصوصا گروه آمین آمینواسید لایسین و گروه تیول آمینواسید سیستئین برای اتصال ترکیب فلوئورسنت و در نتیجه فلوئورسنت کردن پروتئین استفاده کرد که این اتصال به راحتی از طریق روش ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید قابل مشاهده است. برای اینکه پروتئین ها در ژل الکتروفورز دیده شوند، می توان از رنگ آمیزی کماسی آبی یا نقره نیترات استفاده

کرد و یا پروتئین را با ترکیبات فلوئورسنت به طور کووالانسی متصل گرداند. با استفاده از روش in gel fluorescence اتصال این ترکیبات به پروتئین مورد ارزیابی قرار می گیرد. همانطور که در شکل ۱ دیده می شود، اتصال کوالانسی مولکول های کوچک فلوئورسنت به پروتئین می تواند برای تشخیص آن بر روی ژل استفاده گردد. یکی از استفاده های بارز برچسب زدن پروتئین ها با مولکول های فلوئورسنتی استفاده آن بر روی پروتئین های کل بافت یا ارگانیسم (پروتئوم) است که با انکوبه کردن پروتئوم با ماده سنتزی فلوئورسنتی، پروتئینی که با آن ماده واکنش می دهد قابل تشخیص و جداسازی می باشد [۱۸و ۱۹].



شکل ۱) A) طرح کلی اتصال ترکیب فلوئورسنت به پروتئین. B) بررسی اتصال ترکیب فلوئورسنت به پروتئین از طریق روش ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید ۱) پروتئین متصل نشده به ترکیب فلوئورسنت و ۲) پروتئین متصل شده به ترکیب فلوئورسنت در زیر لامپ فرا بنفش ۳و۴) رنگ آمیزی پروتئین با رنگ کماسی آبی

در این پروژه ابتدا ترکیب ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین سنتز شد و سپس با استفده از آن دو مشتق جدید فلوئورسین شامل ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین (Thioflu) و ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین (Acflu) سنتز گردید. تیواسترها و آسیل کلریدها در گذشته برای واکنش پذیری با آمین ها به عنوان الکتروفیل مورد استفاده قرار میگرفتند. در این پروژه واکنش پذیری گروه لایسین دو پروتئین شامل آلبومین سرم گاو و لیزوزیم در pH=9 و در بافرهای آبی بررسی شد. لیزوزیم متصل شده به فلوئورسین با استفاده از کیسه دیالیز ۱۲ kD از مولکول های فلوئورسین واکنش نداده جداسازی شد.

۲-بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده

تمامی مواد شیمیایی از شرکت مرک، سیگما، بیو بیسیک و حلال ها از شرکت قطران شیمی تهیه و بدون نیاز به خالص سازی مجدد، مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور بررسی پیشرفت واکنش از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با صفحه آلومینیومی و سیلیکاژل F254 60- با ضخامت ۰/۲۵میلیمتر (مرک) و لامپ فرابنفش ۲۵۴ نانومتر استفاده گردید. طیف های IR با دستگاه طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه MBB Bommem, MB-100 با استفاده از قرص KBr ، در دامنه عدد موج 4000 cm^{-} 400-^{1} گزارش گردیده است. همچنین طیف های ^{1}HNMR با دستگاه A Bruker (DRX-500 Avance) در حلال DMSO با استاندارد داخلی TMS با ۱۶ اسکن به دست آمده است.

۲-۲- سنتز مشتقات فلوئورسین

۲-۲-۱- سنتز ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین

برای سنتز ترکیب ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین مقدار ۰/۲۲ گرم رزورسینول ۲ (۲ میلی مول) و ۰/۱۹ گرم ۱، ۲، ۴ بنزن تری کربوکسیلیک ۱و۲ انیدرید ۲ (۱ میلی مول) در شرایط بدون حلال و در دمای ۲۰۰-۱۸۰ C^{o} قرار داده شد. سپس ۰/۱۳ گرم کلرید روی خشک (۰/۱ میلی مول)، طی پنج دقیقه اضافه گردید. پس از بررسی پیشرفت واکنش توسط TLC در حلال ۱:۲ اتیل استات: هگزان نرمال، واکنش پس از نیم ساعت متوقف گردید. برای خالص سازی رسوب حاصل در ۵۰ mL اتیل استات همراه با حرارت حل گردید. با ۱۰ mL آب مقطر و ۳۰ mL اتیل استات استخراج گردید. فاز آلی جمع آوری شد و توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان تبخیر گردید. رسوب حاصل به وسیله ۵۰ mL کلروفرم شسته شد. سپس با کاغذ صافی، صاف گردید. رسوب حاصل ۲ مرتبه با ۵۰ mL آب شسته شد. رسوب حاصل بدون نیاز به تبلور مجدد در آون و در دمای ^{o}C ۱۰۵ به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. محصول پودر قرمز رنگ و با بازده ۶۱٪ بود.

^{1}HNMR (500MHz, DMSO-d^{6}) δ(ppm): 13.43 (2H, s), 10.04 (4H, s), 8.29 (1H, s), 8.19 (1H, d), 8.17 (1H, s), 8.10 (1H, d), 7.54 (1H, d), 7.29 (1H, d), 6.58 (4H, d), 6.51 (4H, q), 6.45 (4H, q)
IR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3069, 1697, 1600, 1453

۲-۲-۲- سنتز ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین

برای سنتز ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین مقدار ۰/۳۷۰ گرم ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین (۱ میلی مول) و ۰/۲۲ گرم تیوفنل (۲ میلی مول) و ۰/۱۲ گرم ۴ - دی متیل آمینو پیریدین (۰/۱ میلی مول) به یک بالون واکنش ۱۰۰ mL اضافه گردید. پس از افزودن ۳ mL دی متیل فرمامید (DMF) به عنوان حلال، محتویات بالون در حمام یخ قرار گرفت. به آن ۰/۳ گرم دی سیکلوهگزیل کربودی ایمید (DCC) (۱/۵ میلی مول) اضافه گردد. بعد از ۱۵ دقیقه واکنش در دمای محیط قرار گرفت. ضمن پیگیری روند پیشرفت واکنش توسط TLC در حلال ۱:۲ اتیل استات:هگزان نرمال، واکنش بعد از شش ساعت انجام گردید. برای خالص سازی، نمونه صاف گردید تا رسوب مشتق اوره تشکیل شده جدا گردد. محلول با ۲۰ mL آب مقطر و ۴۰ mL اتیل استات استخراج گردید. فاز آلی با دستگاه تبخیر کننده چرخان خارج گردید. محصول توسط ستون کروماتوگرافی سلیکا ژل، در حلال ۳:۱ هگزان نرمال : اتیل استات جداسازی شد و سپس حلال توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان خارج گردید. بازده واکنش ۳۶٪ محاسبه شد.

^{1}HNMR (500MHz, DMSO-d^{6}) δ(ppm): 10.18 (4H, s), 8.43 (1H, d), 8.32 (2H, m), 8.22 (1H, d), 7.59 (2H, m), 7.54 (4H, d), 7.53 (4H, m), 7.51 (2H, d), 6.71 (4H, s), 6.68 (4H, d) 6.58 (4H, d)
IR (KBr), $\bar{\upsilon}$ (cm^{-1}): 3089, 1683, 1662, 1556, 1493

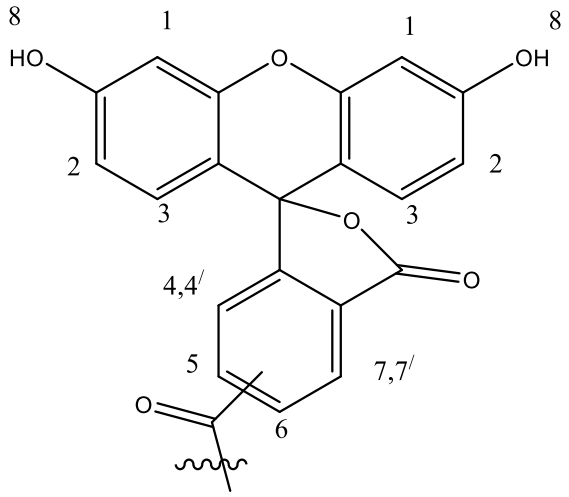
۳-۲-۲- سنتز ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین

برای سنتز ترکیب ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین مقدار ۰/۷۵ گرم ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین (۲ میلی مول) و ۳ mL تیونیل کلرید در شرایط بدون حلال و دمای محیط به بالون واکنش ۱۰۰mL اضافه شد. تیونیل کلرید دارای سمیت بسیار بالایی است و تمام مراحل واکنش باید زیر هود انجام شود. بعد از مدت ۶ ساعت به منظور خالص سازی و خروج تیونیل کلرید، محصول توسط ۱۰ mL هگزان نرمال شسته شد. رسوب با کاغذ صافی جمع آوری شد و بدون نیاز به تبلور مجدد، به مدت ۵ ساعت در دمای ۷۰ درجه قرار گرفت. بازده واکنش ۹۰٪ بود.

^{1}HNMR (500MHz, DMSO-d^6) δ(ppm): 9.32 (4H, s), 8.41 (1H, d), 8.31 (1H, d), 8.29 (1H, d), 8.19 (3H, m), 8.15(1H, d), 6.73 (4H, d), 6.7 (4H, d), 6.22 (4H, s).

IR (KBr), ῡ (cm^{-1}): 2956, 1706, 1599, 1537, 1456

۳-۲- مقایسه داده های طیفی ترکیبات سنتزی



جدول ۱) مقایسه جابه جایی شیمیایی ترکیبات سنتزی در طیف ^{1}HNMR

ترکیب/H_n	۱	۲	۳	۴	۴'	۵	۶	۷	۷'	۸
۵(۶) کربوکسی فلوئورسین	۶/۴۵	۶/۵۱	۶/۵۸	۷/۲۹	۷/۵۴	۸/۱	۸/۱۷	۸/۱۹	۸/۲۹	۱۰/۰۴
۵(۶) تیوفنول فلوئورسین	۶/۵۸	۶/۶۸	۶/۷۱	۷/۵۴	۷/۵۹	۸/۲۲	۸/۳۲	۸/۳۲	۸/۴۳	۱۰/۱۸
۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین	۶/۲۲	۶/۷۰	۶/۷۳	۸/۱۰	۸/۱۹	۸/۱۹	۸/۲۹	۸/۳۱	۸/۴۱	۹/۳۲

۲-۴- تهیه بافرها

۲-۴-۱- بافر کربنات

۲/۱ گرم سدیم هیدروژن کربنات داخل ۴۰۰ mL آب مقطر حل شد pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک و سود برابر ۹ تنظیم شد و سپس به حجم ۵۰۰ mL رسانده شد.

۲-۴-۲- بافر فسفات

۳/۷ گرم سدیم دی هیدروژن فسفات یک آبه و ۱۳/۷ گرم سدیم فسفات دو آبه در ۹۰۰ mL آب مقطر حل شد و pH با استفاده از اسید کلریدریک و سود برابر ۷ تنظیم شد و سپس به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

۲-۵- برقراری پیوند کووالانسی پروتئین با مشتقات فلوئورسین

مقدار ۵ میلی گرم پروتئین در ۱ mL بافر کربنات حل گردید. ۱۰ میلی گرم از ماده فلوئورسنت در ۱ mL DMF حل شد و سپس از استوک تولید شده ۱۰ میکرولیتر به محلول پروتئین اضافه شد و با دستگاه ورتکس به مدت ۳ ثانیه محلول پروتئینی مخلوط گردید. در دمای محیط به مدت دو ساعت برای ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین و مدت ۱۰ دقیقه برای ترکیب ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین قرار داده شد. با استفاده از روش ژل الکتروفورز SDS-PAGE، اتصال کووالانسی مشتقات فلوئورسین به پروتئین بررسی شد.

۲-۶- جدا کردن پروتئین لیزوزیم از مولکول های فلوئورسین متصل نشده به پروتئین

۲-۶-۱- با استفاده از روش دیالیز

به پروتئین لیبل شده ۱۰ میکرولیتر اتانول آمین اضافه شد تا ترکیبات فلوئورسین واکنش نداده کاملا مصرف شوند. سپس در کیسه دیالیز (۱۲ کیلودالتونی) و بشر حاوی بافر فسفات به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

۲-۶-۲- با استفاده از ستون اندازه طردی

برای جدا سازی پروتئین لیزوزیم با اندازه حدود ۱۶ KD ستون اندازه طردی سفادکس G-25 (اندازه مش ۲۰ -۸۰ میکرومتر) مناسب است. نمونه حاوی پروتئین را بر روی ستون قرار گرفت و سپس از بافر فسفات به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. فرکشن ها از ستون جمع آوری شد. اولین فرکشن خارج شده حاوی پروتئین نشان دار شده است. با ژل الکتروفورز حضور پروتئین در فرکشن های مختلف بررسی و فرکشن های حاوی پروتئین جداسازی شدند.

۲-۷- اتصال ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین به پروتئوم

سلول اشرشیا کولای (E.Coli) به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ^{o}C ۳۷ و محیط LB رشد داده شد و سپس سلول ها در دستگاه اولتراسونیک در لایسیز بافر لیز گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از پروتئوم باکتری با ۸۰۰ میکرولیتر بافر کربنات مخلوط گردید و به آن

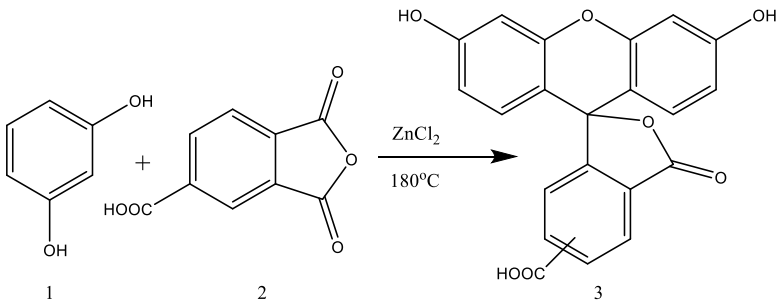
۱۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی گرم ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین در میلی لیتر DMF، اضافه شد. به مدت ۳ ثانیه محلول ورتکس شد و به مدت ۲ ساعت واکنش انجام گردید.

۸-۲- الکتروفورز پلی اکریل آمید پروتئین

برای ساختن لایه جدا کننده ژل الکتروفورز ۱۲٪ پلی اکریل آمید، مقادیر ۴/۷ mL آب، ۲/۶۴ mL اکریل آمید ۳۰٪، ۲/۵ mL تریس ۱/۵ M (pH=6.8) ، ۱۰۰ میکرولیتر SDS ۱۰٪ ، ۵۰ میکرولیتر APS ۱۰٪ و ۳۰ میکرولیتر TEMED و برای ساختن لایه متراکم کننده ژل الکتروفورز ۵٪ پلی اکریل آمید، مقادیر ۳ mL آب، ۰/۶۶ mL اکریل آمید ۳۰٪، ۱/۲۶ mL تریس ۱/۵ M (pH=8.8)، ۵۰ ماکرولیتر SDS ۱۰٪، ۲۵ میکرولیتر APS ۱۰٪ و ۳۰ میکرولیتر TEMED مخلوط گردید.

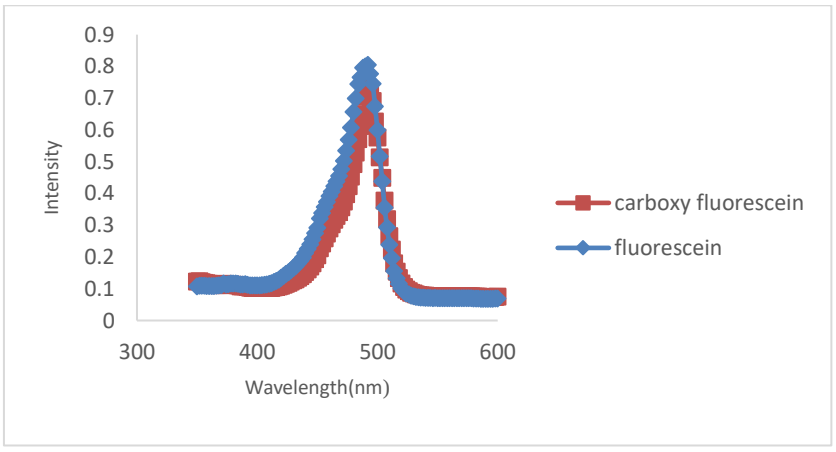
۱-۳- نتایج و بحث

در ابتدای پژوهش ترکیب ۶(۵) – کربوکسی فلوئورسین (۳) از واکنش تری ملیتیک انیدرید (۲) و رزورسینول (۱)، به نسبت مولی ۲:۱ در حضور کاتالیست اسیدی روی کلرید و در گستره دمایی ۱۸۰-۲۰۰C ^{o} و در شرایط بدون حلال سنتز گردید. بازده این واکنش ۶۱٪ بود. (شمای ۱)



شمای ۱) سنتز ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین

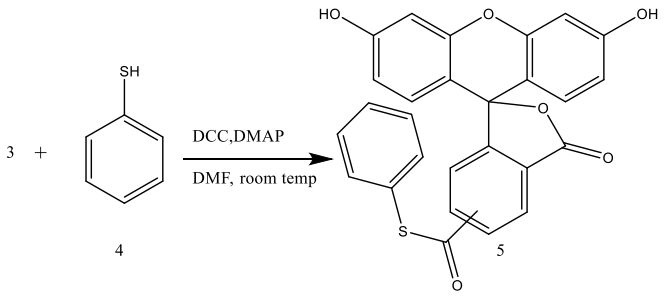
شواهد طیف جذبی نشان می دهد که خواص طیفی فلوئورسین و کربوکسی فلوئورسین مشابه هستند. مقایسه طیف جذبی ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین سنتز شده و فلوئورسین تجاری در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲) مقایسه طیف جذبی ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین و فلوئورسین تجاری (غلظت ۰/۰۰۵ mM)

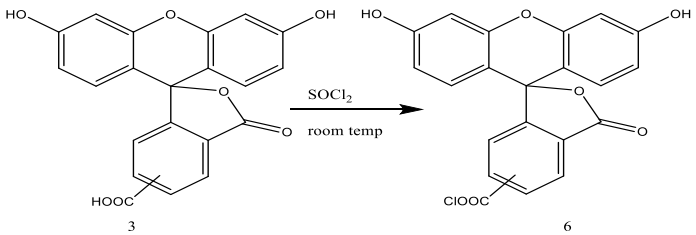
ضریب خاموشی یکی از مشخصات هر ماده در طول موج معین است. برای محاسبه ضریب خاموشی ترکیب ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین در غلظت های mM ۰/۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۰۱۲۵، در آب حل گردید و با توجه به نمودار جذب ماکسیمم بر غلظت، ضریب خاموشی معادل $mM^{-1}.cm^{-1}$ ۸۵/۷۸ در طول موج ۴۹۲ نانومتر محاسبه گردید که این مقدار برای فلوئورسین برابر $mM^{-1}.cm^{-1}$ ۸۰ می باشد [۲۰].

در مراحل بعدی گروه کربوکسی ترکیب ۳ به آسیل کلرید و تیو استر (ترکیب ۵ و ۶) که دارای ترک کننده های مناسبی در واکنش های جانشینی به حساب می آیند، تبدیل شد. توانایی ترکیبات سنتزی در pH=9 برای اتصال کووالانسی به پروتئین در حلال آب (بافر کربنات) و دمای محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش تیواسترهای آلکیلی با آمین های نوع اول به سختی در شرایط بیولوژیک انجام می گیرند و معمولا در حلال آپروتیک قطبی مانند DMF و در حضور کاتالیست انجام می شوند [۲۱]. از این رو واکنش تیوفنول استرکه به مراتب نسبت به تیواسترهای آلکیلی واکنش پذیرتر هستند با آمین پروتئین در شرایط بیولوژیک بررسی شد. ۵(۶) تیو فنول فلوئورسین (Thioflu) از واکنش ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین (۳) و تیوفنول (۴) از طریق واکنش استگلیش سنتز گردید (شمای ۲).



شمای ۲) سنتز ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین (Thioflu)

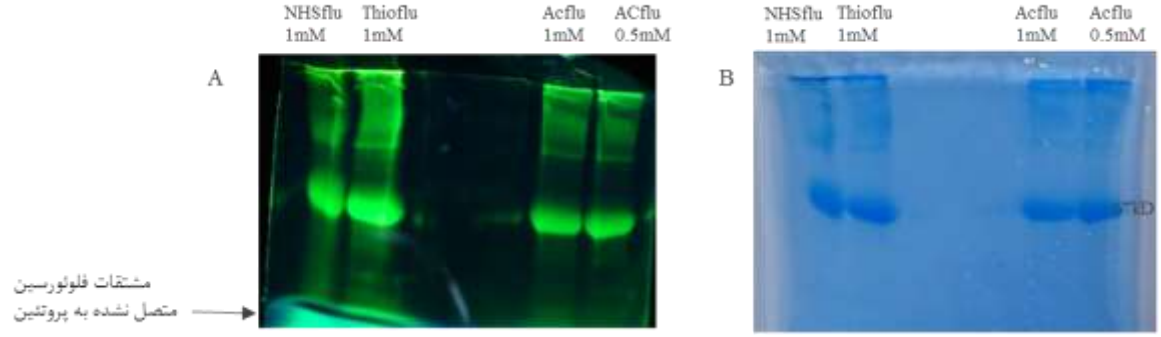
ترکیبات آسیل کلرید با سرعت با آمین ها واکنش می دهند و محصول واکنش گاز هیدروژن کلرید و آمید است. از آنجایی که عموما آسیل کلریدها سریعا با آب واکنش می دهند معمولا در محیط های آبی نمی توان واکنش آنها را انجام داد ولی نشان داده شد که در محیط بیولوژیک آمین پروتئین سریع تر از آب با آسیل کلرید فلوئورسین (Acflu) واکنش می دهد و پروتئین متصل شده نشان دار گردید. دلیل این واکنش پذیری را می توان واکنش سریع آسیل کلرید با آمین نسبت به آب دانست. ترکیب ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین از واکنش۵(۶) کربوکسی فلوئورسین با تیونیل کلرید در دمای محیط سنتز گردید (شمای ۳).



شمای ۳) واکنش تشکیل ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین (Acflu)

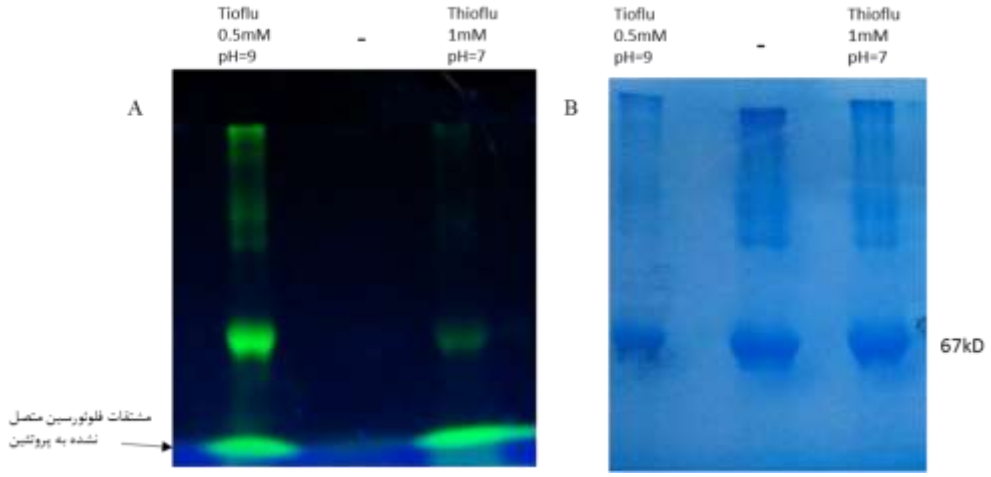
برای تایید ساختارهای ترکیبات ۳ و ۵ و ۶ ازطیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای(^{1}HNMR) استفاده گردید (جدول ۱). همانطور که ملاحظه میگردد پیک جابجایی شیمیایی مشاهده شده در ppm ۱۳/۴۳ که متعلق به هیدروژن گروه کربوکسیلیک اسید از ترکیب ۳ است برای ترکیبات ۵ و۶ که فاقد گروه کربوکسیلک می باشند، مشاهده نمیگردد. در صورتیکه جابجایی شیمیایی سایر پیک ها از هر سه ترکیبب مشابه می باشند. لازم به ذکر است بدلیل تقارن ترکیبات، جابجایی شیمیایی پروتون های معادل یکسان مشاهده شده است. در ضمن این ترکیبات دارای دو ایزومر ۵(۶) هستند که پیک های مرتبط با آنها در طیف ^{1}HNMR در جابجایی شیمیایی ppm ۷ تا ۱۰ مشاهده می گردد.

برای اثبات اتصال مشتقات فلوئورسینی به پروتئین از ژل الکتروفورز SDS PAGE استفاده شد. (شکل ۳). واکنش دو ترکیب تیوفنول فلوئورسین بعد از ۲ ساعت و آسیل کلرید فلوئورسین بعد از ۱۰ دقیقه با پروتئین آلبومین گاوی بررسی گردید. همانطور که مشاهده می گردد هردو واکنشگر در غلظت پایین (۱ mM)، به خوبی به پروتئین بطور کووالانسی متصل گردیدند (شکل ۳).



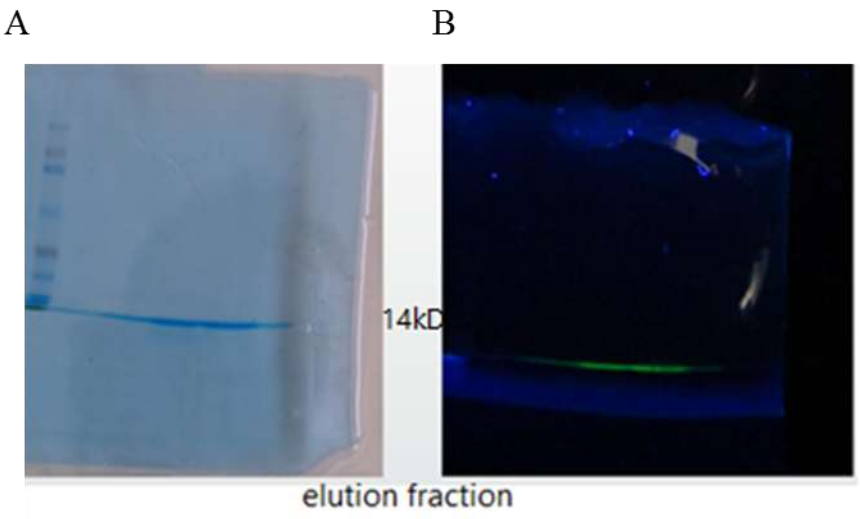
شکل۳) (A تصویرسازی فلوئورسنت پروتئین BSA متصل شده به مشتقات فلوئورسین در بافر کربنات (pH=9) و دمای محیط. (B رنگ آمیزی ژل با استفاده از کماسی آبی. غلظت پروتئین µM ۵۰ است. از ترکیب NHS فلوئورسین به عنوان ترکیب مرجع استفاده شد.

برای اطمینان از واکنش اتصال ترکیبات سنتزی از طریق گروه آمین پروتئین، واکنش تیوفنول فلوئورسین در pH=7 (بافر فسفات) و pH=9 (بافر کربنات) با پروتئین BSA بعد از ۲ ساعت بررسی گردید (شکل۴). در pH=7 گروه تیول آمینو اسید سیستئین و در pH=9 گروه آمین آمینواسید لایسین نوکلئوفیل ترین گروه عاملی در سطح پروتئین هستند. همانطور که در شکل۴ مشاهده می کنید در pH=7 با وجود ۲ برابر بودن غلظت تیوفنول فلوئورسین بازده اتصال کووالانسی بسیار کمتر از pH=9 می باشد.



شکل ۴) اتصال کوالانسی ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین در pH=7 و pH=9 با پروتئین BSA . غلظت پروتئین ۵۰µM . پروتئین در لاین وسط فاقد ترکیب فلوئورسنت است. A) تصویر سازی فلوئورسنت از ژل پلی اکریل آمید B) رنگ آمیزی ژل اکریل آمید با رنگ کماسی آبی

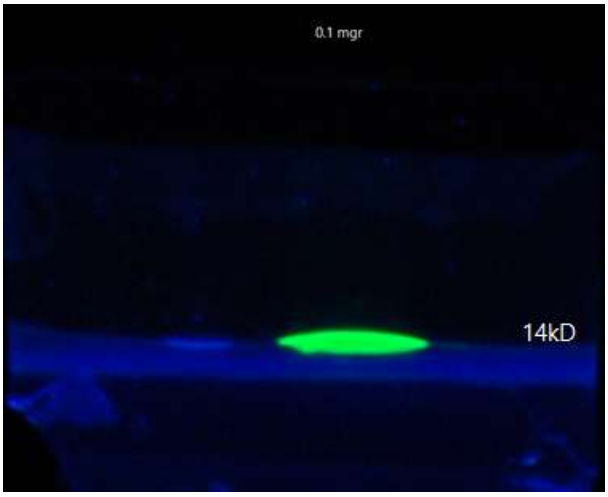
در این پژوهش ترکیب Thioflu به پروتئین لیزوزیم که یک آنزیم با جرم مولکولی kD ۱۴ است، متصل گردید و سپس با استفاده از ستون اندازه طردی G-25 (سایز مش ۲۰-۸۰ میکرومتر) مولکول های واکنش نداده از پروتئین جداسازی شد. برای این جداسازی از بافر فسفات به عنوان فاز متحرک استفاده شد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، اثری از مولکول های کوچک باقی نمانده و جداسازی کامل انجام شده است.



شکل ۵) جداسازی لیزوزیم با استفاده از ستون اندازه طردی G-25. هر چاهک فرکشن های جمع آوری شده از ستون اندازه طردی است A) تصویرسازی با استفاده از دستگاه GEL documentation). B) رنگ آمیزی ژل با استفاده از کماسی آبی

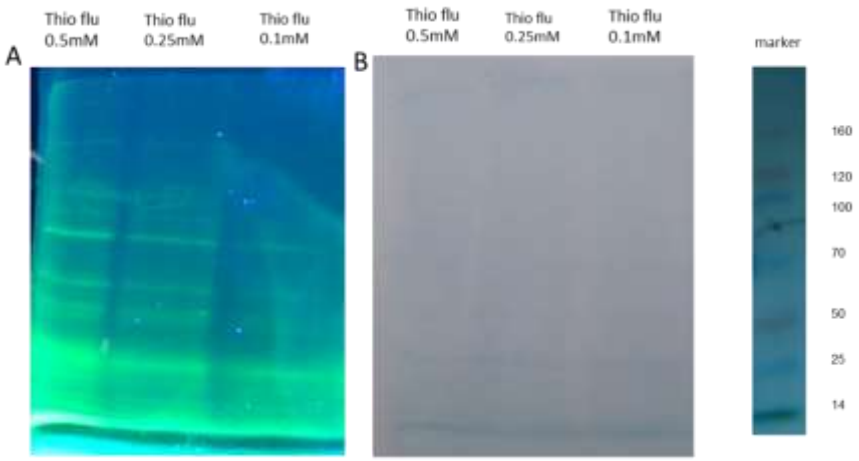
سپس با استفاده از روش لاوری (Lowry) و الکتروفورز غلظت لیزوزیم جداسازی شده حدود ng/mL ۶۱ اندازه گیری شد. متاسفانه غلظت پروتئین بسیار کمتر از حد پیش بینی (mg/mL ۵) بود که دلیل آن را می توان چسبیدن مقداری از لیزوزیم به ستون دانست. درنتیجه از روش دیالیز برای جداسازی لیزوزیم های نشان دار شده استفاده شد که طبق این روش غلظت

پروتئین جداسازی شده بسیار بیشتر بدست آمد. طبق تخمین اعمال شده، ۰/۱ میلی گرم لیزوزیم درچاهک ژل وجود داشته و همانطور که در شکل ۶ مشاهده می شود، عدم وجود مولکول های کوچک فلوئورسنت دلیل بر جداسازی کامل از طریق دیالیز(۱۲ کیلو دالتون) می باشد.



شکل ۶) تصویر فلوئورسانس لیزوزیم متصل شده به فلوئورسین که با دیالیز kD ۱۲جداسازی شده در ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید.

برای پی بردن به میزان توانایی ترکیبات سنتزی در اتصال کواوالانسی به پروتئین های موجود در پروتئوم، واکنش ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین با پروتئوم سلول اشرشیا کولای (E.Coli) بررسی گردید. باکتری اشریشیا کولای کاربرهای بسیاری در تحقیقات زیست شناسی دارد[۲۲-۲۳]. همانطور که در شکل ۷ مشاهده می شود حساسیت روش فلوئورسنتی بسیار بیشتر از روش رنگ آمیزی با رنگ کماسی بلو می باشد. مهمتر اینکه در پروتئوم اشرشیا کولای پروتئین ها و یا آنزیم های وجود دارند که با ترکیب ۵ قابلیت اتصال کووالانسی دارند. در مطالعات آینده می توان با روش MS-MS پروتئین های متصل شده را تعیین هویت کرد.



شکل ۷) بررسی واکنش پذیری ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین با پروتئوم سلول اشرشیا کولای (E.Coli) A) تصویر فلوئورسنت با استفاده از دستگاه Gel documentation. B) رنگ آمیزی ژل با استفاده از کماسی آبی

یکی از نکات ارزشمند می تواند مقایسه ساختاری پروتئین لیزوزیم و BSA باشد. هر دو این پروتئین ها به طور عمده از ساختار های دوم مارپیچ آلفا تشکیل شده اند. لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) آنزیمی با جرم تقریبی ۱۴ کیلو دالتون است که از میان ۱۲۹ اسید آمینه ی موجود در آن، ۶ اسید آمینه لایسین است و همگی آنها در سطح آن قرار دارند[۲۴ و ۲۵]. آلبومین سرم گاو (BSA) با وزن تقریبی ۶۷ کیلو دالتون شامل ۵۸۳ اسید آمینه می باشد که ۵۹ اسید آمینه آن لایسین است و از میان آنها ۳۰ تا ۳۵ لایسین در سطح پروئین قرار دارند [۲۶]. وجود تعداد زیادی اسید آمینه لایسسن در سطح این دو پروتئین، اتصال کووالانسی این دو پروتئین را به مشتقات فلوئورسینی سنتز شده، براحتی سبب می گردند. در ضمن، ترکیب ۵(۶) آسیل کلرید فلوئورسین بدلیل داشتن الکتروفیل بسیار فعال، با سرعت بسیار بالا (حدود ۱۰ دقیقه) با پروتئین آلبومین سرم گاو واکنش می دهد. در صورتی که ترکیب ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین با سرعت کمتر (حدود ۲ ساعت) به پروتیئن قابلیت اتصال کووالانسی از خود نشان داد (شکل ۳).

۴- خلاصه

در ابتدای این پروژه ترکیب ۵(۶) کربوکسی فلوئورسین سنتز گردید که از گروه کربوکسیل آن برای تبدیل به گروه های ترک شونده بهتر از قبیل آسیل کلرید و تیو استر استفاده شد. ۲ ترکیب نوین ۵(۶)آسیل کلرید فلوئورسین و ۵(۶) تیوفنول فلوئورسین سنتز گردید که دارای توانایی بالایی برای واکنش با آمین گروه لایسین از پروتئین در pH=9 می باشند. ترکیبات جدید با بازده بالا و سرعت خوب با پروتئین پیوند کوالانسی برقرار کردند که نتایج ژل الکتروفورز پلی اکریل امید این موضوع را تائید کردند. لیزوزیم متصل شده به فلوئورسین با استفاده از ستون اندازه طردی سفادکس و همچنین دیالیز ۱۲ کیلودالتون جداسازی شد تا در صورت نیاز برای کاربردهای دیگر مورد استفاده قرار گیرد. در ضمن نشان داده شد که مشتق تیوفنول فلوئورسین سنتز شده قابلیت اتصال باپروتئین های سلول ای کولای داشته است و هویت پروتئین های واکنشگر در حال بررسی می باشد.

۵- مراجع

[1] Harper's illustrated biochemistry. 28 ed. McGraw-Hill Professional; 2009.

[2] D. A. Shannon, R. Banerjee, E. R. Webster, D. W. Bak, C. Wang, E. Weerapana, *J. Am. Chem. Soc*. **136** (2014) 3330.

[3] L. D. *Burtnick, Biochim. Biophys. Acta*. **791** (1984) 57.

[4] M. L. Conte, S. Staderini, A. Marra, M. Sanchez-Navarro, B. G. Davis, A. Dondoni, *Chem. Commun*. **47** (2011) 11086.

[5] Anton Posch, *Methods in Molecular Biology*. (2015).

[6] G. P. Smith, *Bioconjugate Chem*. **17** (2006) 501.

[7] A. Todrick, E. Walker, *Biochem. J*. **31** (1937), 297.

[8] G. R. Gray, Arch, *Biochem. Biophys*. **163** (1974) 426.

[9] A. Reza, A. Tayyebe, Kh. Javad, *J. Of Applied Chemistry*, **38** (1395) 75, in Persian.

[10] A. Gorfti, *Organometallics*. **15** (1996) 142.

[11] X. Li, H. Ma, S. Dong, X. Duan and S. Liang, *Talanta*. 62 (2004) 367.

[12] X. Li, H. Ma, L. Nie, M. Sun, S. Xiong, *Anal. Chim. Acta*. **515**(2004) 255.

[13] C. Li, T. Dong, Q. Li and X. Lei, *Angew. Chem. Int. Ed*. **53** (2014) 12111.

[14] Bayer, A, *Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen. Ber. Deutsch. Chem*. Ges. **4** (1871) 555.

[15] J. M. Hooker, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc*. **126** (2004) 3718.

[16] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc*. **126** (2004) 15942.

[17] L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Chem. Commun*. **43**(2009) 6583.

[18] D. A. Shannon, R. Banerjee, E. R. Webster, D. W. Bak, C. Wang, E. Weerapana, *J. Am. Chem. Soc*. **136**(2014) 3330.

[19] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu Rev Biochem*. **77** (2008) 383.

[20] J. R. Unruh, G. Gokulrangan, G. S. Wilson, C. K. Johnson, *Photochemistry and Photobiology*. **81** (2005) 682.

[21] N. S. Hansen, N. Bork and K. Stromgaard, *Org. Biomol. Chem*. **12** (2014) 5745.

[22] E. Ghasmei Gorji, N. Monadi, M. Mohseni, *Journal of Applied Chemistry*. **11** (2017) 119.

[23] A. alireza, D. mirsaeed, L. H. Khalil, *J. Of Applied Chemistry*, **44** (1396) 55, in Persian.

[24] D. Morshedi, A. Ebrahim-Habibi , A. Moosavi-Movahedi, M. Nemat-Gorgani, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804** (2010) 714.

[25] M. S. Weiss, G. J. Palm and R. Hilgenfeld, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **56** (2000) 952.

[26] M. Muzaffar Mir, K. Majid Fazili, M. Abul Qasim, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1119** (1992) 261.