شناسایی ترکیب و تسلسل امینو اسیدها در مالیکول‌های پروتئین

پوهنیار محمدطاهر امین‌زی

دیپارتمنت کیمیای عضوی، پوهنځی کیمیا، پوهنتون کابل، کابل، افغانستان
ایمیل: mt.aminzai@gmail.com

چکیده

امینو اسیدها واحدهای ساختمانی تمامی پپتایدها و پروتئین‌هایی اند که بسیاری از خواص مهم فزیولوژیکی آن‌ها را تعیین می‌نمایند. امینو اسیدها در تجزیه غذا، رشد و ترمیم انساج بدن، ساخت هورمون، منبع انرژی، نگهداری سالم پوست، مو و ناخن، عضله‌سازی و تقویت سیستم ایمنی بدن کمک می‌کنند. بیش از ۵۰۰ نوع امینو اسیدهای مختلف در طبیعت شناخته شده است؛ اما تنها ۲۰ نوع آن‌ها در ترکیب و سنتز پروتئین سهم می‌گیرند. تعیین ترتیب و تسلسل امینو اسیدها در یک پروتئین یا پپتاید اطلاعات مفیدی جهت درک ساختمان و فعالیت‌های فزیولوژیکی آن‌ها ارایه می‌نماید. در این مقاله‌ی مروری، روش‌های کیمیاوی مختلف مانند تجزیه ادمن، سنگر و هم‌چنین معرف‌های کیمیاوی مختلف مانند ننهایدرین، کاربوکسی پپتایداز و هایدرازین برای شناسایی ترکیب و تسلسل امینو اسیدها در مالیکول‌های پروتئین به بررسی گرفته شده اند.

اصطلاحات کلیدی: امینو اسید؛ پپتاید؛ پروتئین؛ تسلسل امینو اسیدها؛ فعالیت‌های فزیولوژیکی

Structure and Sequence Determination of Amino Acids in Protein Molecules

Jr. Teaching Asstt. Mohammad Tahir Aminzai

Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Kabul University, Kabul, Afghanistan
Email: mt.aminzai@gmail.com

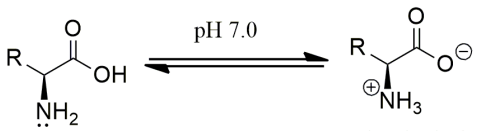
Abstract

Amino acids are the building blocks of all peptides and proteins, determining many critical physiological properties. Amino acids help break down food, grow and repair body tissue, make hormones, provide energy, maintain healthy skin, hair, and nails, build muscle, and boost one's immune system. In nature, there are over 500 different amino acids. However, only 20 of them are involved in protein synthesis. Identifying the amino acid sequence of a protein or peptide provides valuable information for understanding its structure and physiological functions. In this review article, different chemical methods, such as Edman and Sanger degradation, as well as different chemical reagents, such as ninhydrin, carboxypeptidase, and hydrazine, to identify the composition and sequence of amino acids in protein molecules, have been reviewed.

Keywords: Amino Acid; Peptide; Protein; Amino Acids Sequence; Physiological Functions

مقدمه

امینو اسیدها مالیکول‌های عضوی هستند که عمدتاً از نایتروجن، کاربن، هایدروجن و آکسیجن تشکیل شده اند. امینو اسیدها برای سنتز پروتئین‌های بدن و سایر مرکبات مهم نایتروجن‌دار مانند کراتین، هورمون‌های پیپتایدی و برخی انتقال‌دهنده‌های عصبی مورد نیاز هستند (۱). یک امینو اسید از یک گروپ القلی امین ($-NH_2$)، یک گروپ اسیدی کاربوکسیلیک (-COOH) و یک زنجیر جانبی (-R) ساخته شده است (۲). مهم‌ترین امینو اسیدها از نوع الفا هستند که درآن‌ها گروپ $-NH_2$، -COOH و گروپ جانبی R به کاربن الفا متصل می‌باشد (۳) که در امینو اسیدهای مختلف، قیمت R متفاوت می‌باشد (جدول۱). در محلول آبی با pH خنثی، گروپ کاربوکسیلیک امینو اسیدها به گروپ کاربوکسیلیت تفکیک شده و گروپ امین که به‌عنوان یک القلی عمل می‌کند، توسط پروتون جدا شده از گروپ کاربوکسلیک، پروتونیت می‌گردد. بنابراین، شکل برجسته امینو اسیدها از یک آنیون کاربوکسیلیت ($-COO^-$) و یک کتیون آمونیوم (NH_4^+) ساخته شده و به‌نام شکل آیون دوقطبی یا شکل زویتریتی (Zwitterion ion) نامیده می‌شود (شکل۱) (۴).



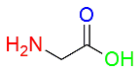
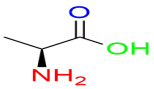
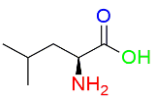
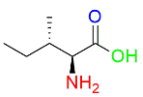
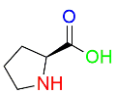
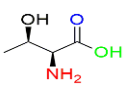
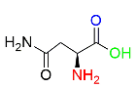
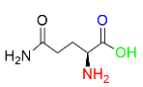
شکل۱: ساختمان کیمیاوی و آیون دوقطبی امینو اسیدها

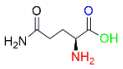
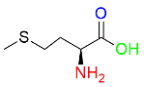
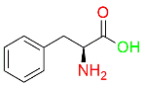
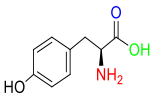
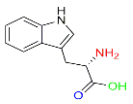
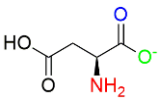
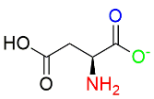
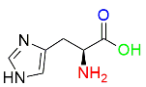
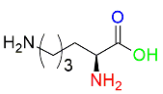
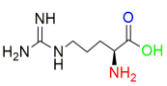
تمام امنیواسیدها به استثنای گلایسین کایرل بوده، چون به کاربن α چهار گروپ مختلف متصل (در مورد گلایسین، گروپ R یک اتوم هایدروجن است) می‌باشند. همه‌ی آن‌ها به جز گلایسین دارای یک یا دو مرکز نامتقارن هستند و بنابراین، می‌توانند به دو شکل (D- و L-) فعال نوری (Enantiomers)، که فعالیت های فیزیولوژیکی و بیولوژیکی متفاوتی دارند، موجود باشند. تمام پروتئین‌های طبیعی موجود در موجودات زنده از امینو اسیدهای L تشکیل شده اند (۲).

زنجیر جانبی (گروپ R) ویژگی‌های کیمیاوی و فزیکی امینو اسیدها را تعیین می‌کند. دو دسته‌ی عمده از امینو اسیدها وجود دارد که براساس ماهیت آب‌دوست یا آب‌گریز و یاهم براساس قطبی بودن و یا غیرقطبی بودن زنجیر جانبی طبقه‌بندی می‌شوند. اطلاعات در مورد ویژگی‌های آب‌گریز یا آب‌دوست زنجیرهای جانبی امینو اسیدها ممکن برای شناسایی نوعیت کیمیاوی یک پروتئین خاص یا یک موقعیت خاص از یک پروتئین استفاده شود. امینو اسیدها در تولید انزایم‌ها، هورمون‌های مانند انسولین، هورمون رشد، گلوکاگون، آدرنالین و تایروکسسین دخیل می‌باشند (۵). برخی از امینو اسیدها مسیرهای میتابولیزم کلیدی را تنظیم می‌کنند که برای ترمیم حجرات، رشد، تولید مثل و سیستم ایمنی

بدن ضروری هستند (۴). بنابراین، امینو اسیدها عمل‌کردهای مهمی در تغذیه و سلامت بدن دارد و مصرف آن‌ها در رژیم غذایی ضروری است. زیرا کم‌بود آن‌ها باعث کاهش ساخت پروتئین می‌شود که در نهایت منجربه بیماری‌های مختلف در بدن می‌گردد.

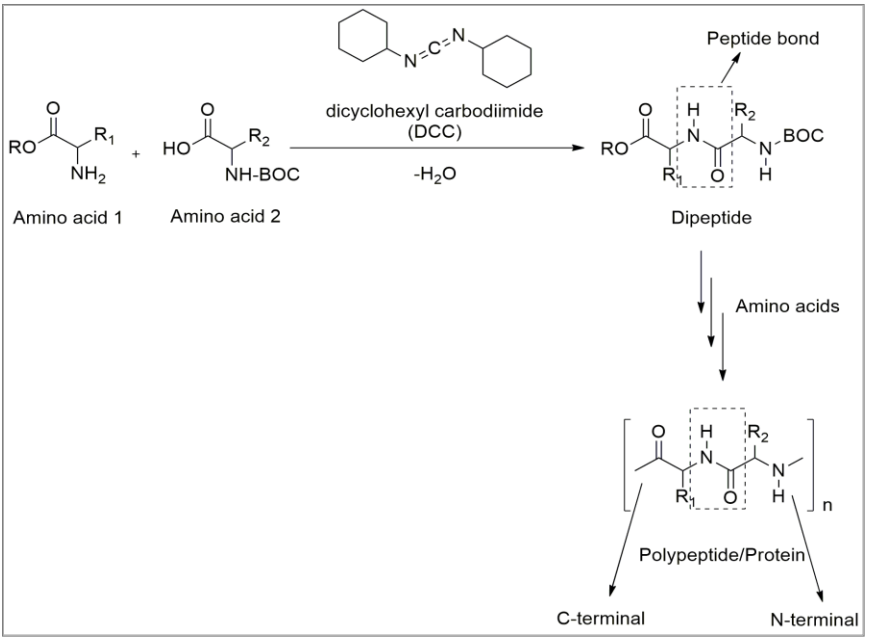
جدول ۱: نام، ساختمان و مشخصات امینو اسیدهای طبیعی (۱-۳، ۵)

شماره	نام	مشخصات	نوعیت	ساختمان	سمبول	مخفف
۱	گلایسین (Glycine)	غیرقطبی	نیمه ضروری		G	Gly
۲	الانین (Alanine)	غیرقطبی	غیر ضروری		A	Ala
۳	ویلین (Valine)	غیرقطبی	ضروری		V	Val
۴	لیوسین (Leucine)	غیرقطبی	ضروری		L	Leu
۵	ایزو لیوسین (Isoleucine)	غیرقطبی	ضروری		I	Ile
٦	پرولین (Proline)	غیرقطبی	غیر ضروری		P	Pro
۷	سیرین (Serine)	قطبی	نیمه ضروری		S	Ser
۸	تریونین (Threonine)	قطبی	ضروری		T	Thr
۹	اسپارگین (Asparagine)	قطبی	غیر ضروری		N	Asn
۱۰	گلوتامین (Glutamine)	قطبی	غیر ضروری		Q	Gln

۱۱	سیستین (Cysteine)	قطبی	نیمه ضروری		C	Cys
۱۲	میتیونین (Methionine)	غیرقطبی	ضروری		M	Met
۱۳	فینایل الانین (Phenylalanine)	غیرقطبی	ضروری		F	Phe
۱۱۴	تایروسین (Tyrosine)	قطبی	نیمه ضروری		Y	Tyr
۱۵	تریپتوفین (Tryptophan)	غیرقطبی	ضروری		W	Trp
۱۶	اسپارتیت (Aspartate)	اسیدی	غیر ضروری		D	Asp
۱۷	گلوتامیت (Glutamate)	اسیدی	غیر ضروری		E	Glu
۱۸	هیستدین (Histidine)	القلی	نیمه ضروری		H	His
۱۹	لایزین (Lysine)	القلی	ضروری		K	Lys
۲۰	ارژنین (Arginine)	القلی	نیمه ضروری		R	Arg

پروتئین‌ها از ۲۰ نوع امینو اسید ساخته شده که هر کدام آن خواص کیمیاوی متفاوتی دارند(۱،۲). یک مالیکول پروتئن از یک زنجیر طولانی از این امینو اسیدها ساخته شده است که هر امینو اسید طریق

رابطه پیپتایدی کووالانسی به امینو اسید هم‌جوار خود متصل هستند، یکی از روش‌های مهم سنتز پروتین در شکل ۲ توضیح گردیده است(٦،٧،٨).



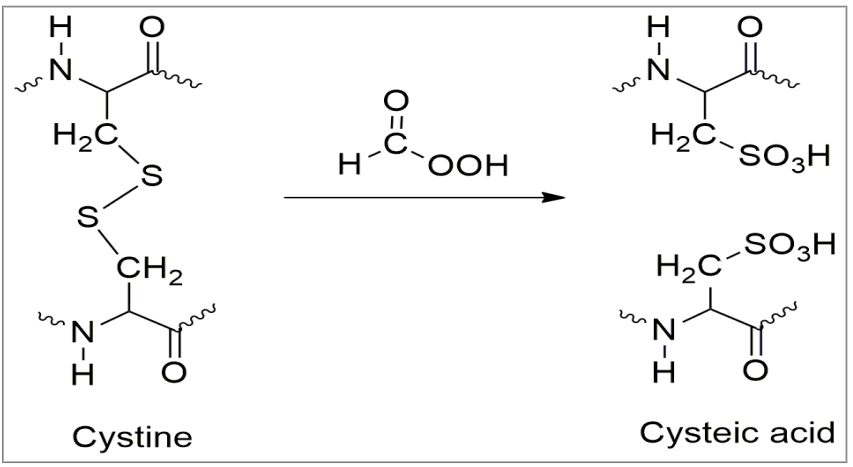
شکل ۲: تعامل تشکیل رابطه پیپتایدی (پولی پیپتاید ویا پروتئین)

بنابراین، پروتئین‌ها به‌عنوان پولی پپتاید نیز شناخته می‌شوند. هزاران پروتئین مختلف شناخته شده اند که هر کدام آن ترتیب و تسلسل خاص از امینو اسیدها را دارند. بنابراین، دانستن تسلسل امینو اسیدها در یک مالیکول پروتئین دانشمندان را قادر می‌سازد تا وظیفه یک پروتئین را پیش‌بینی کنند. هم‌چنان یک تعداد تغییرات را در ساختمان پروتئین ایجاد کنند، به‌طور مثال، یک امینو اسید خاص را اضافه ویا هم جای‌گزین نمایند و در نتیجه اصلاح‌سازی می‌توان فعالیت بیولوژیکی یک پروتئین خاص را افزایش داد. برای این هدف در سال ۱۹۴۵، سنگر یک روش سه‌مرحله‌ای را برای شناسایی، اندازه‌گیری کمی و مشخص کردن امینو اسیدهای نهایی در انسولین ایجاد کرد(۹). سپس در سال ۱۹۵۰، ادمن روش جدیدی را برای تعیین تسلسل امینو اسیدها پیشنهاد کرد که اکنون بنام میتود تجزیه ادمن یاد می‌گردد (۱۰). در سال ۱۹٦۷، ادمن و همکارش جفری، میتود ادمن خودکار (automation) را معرفی کردند که عملیه تعیین تسلسل امینو اسیدها را سریع‌تر ساخت. روش تجزیه ادمن بهتر از روش سنگـــر ثابت شده است، زیرا روش سنگـــر از انزایم‌هـــا برای شکستن پروتئین به زنجیرهای مختلف استفاده می‌کرد، درحالی‌که روش ادمن مستقیم‌تر می‌باشد. این میتود شامل چندین روش دیگر نبوده، فقط یک مرحله بارها و بارها تکرار می‌شود. در سال‌های اخیر برای دریافت تسلسل امینو اسیدها بیشتر از

طیف سنجی کتلوی (Edman degradation-mass spectroscopy) و یا مخلوط با تجزیه ادمن استفاده می‌گردد (۱۱،۱۲،۱۳).

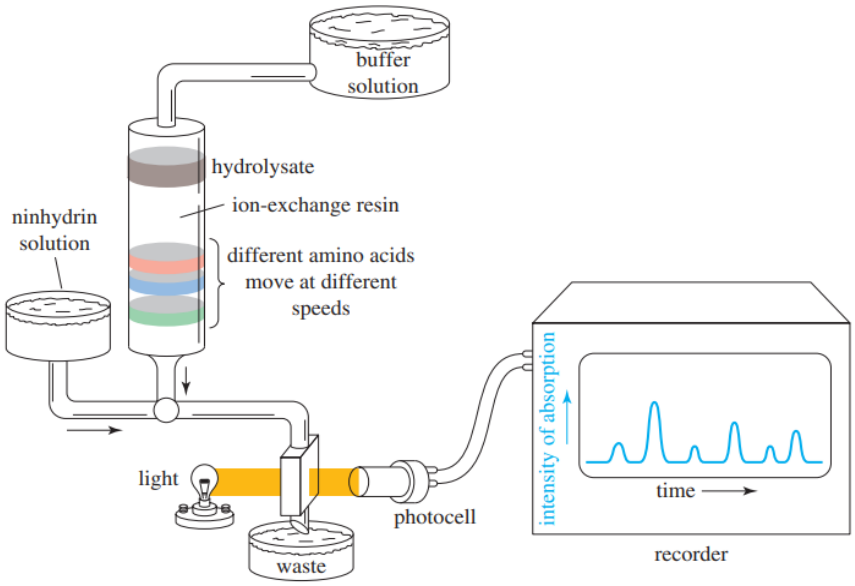
تعاملات کیمیاوی برای شناسایی تسلسل امینو اسیدها

هر پروتئین یا پپتاید از یک تسلسل خطی خاص از امینو اسیدها تشکیل شده است(۷). ساختار اولی پروتئین به‌طور معمول از انتهای امینو (N-terminal) شروع می‌شود و تا انتهای کاربوکسیل (C-terminal) ادامه می‌یابد (شکل ۲). اولین مرحله جهت تشخیص ساختمان پروتئین، شکستن تمام روابط دای سلفایدی بین زنجیرهای پروتین توسط پرواوکسی فارمیک اسید می‌باشد (۸). زنجیرهای پپتایدی بدست آمده سپس به‌طور جداگانه تجزیه و تحلیل می‌گردد (شکل ۳).



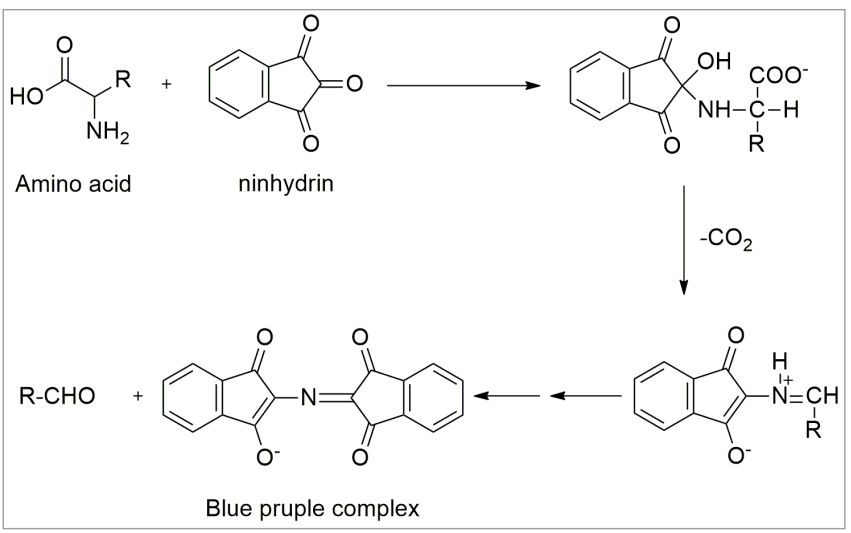
شکل ۳: اکسیدیشن روابط دای سلفاید یک پروتین توسط پرواکسی فارمیک اسید

بعد از این‌که پل‌های دای سلفایدی شکستانده شدند و زنجیرهای پپتایدی جداگانه جدا و خالص گردیدند، سپس ساختمان هر زنجیر باید شناسایی شود. اولین قدم برای شناسایی ساختمان یک زنجیر کوتاه پولی پپتاید (۵۰ امینو اسید) اینست که تعیین کنید کدام امینو اسید و به چه نسبت در زنجیر پولی پپتاید وجود دارند. برای این کار، زنجیر پپتایدی در نتیجه جوشاندن آن به مدت ۲۴ ساعت در ٦ مولار HCl بطور کامل هایدرولیز گردد (۱۴). سپس مخلوط امینو اسیدهای حاصل شده روی ستون تحلیل‌کننده امینو اسید (Amino acids analyzer) قرار داده شود (شکل ۴).



شکل ۴: ستون تحلیل‌کننده امینو اسیدها (۸)

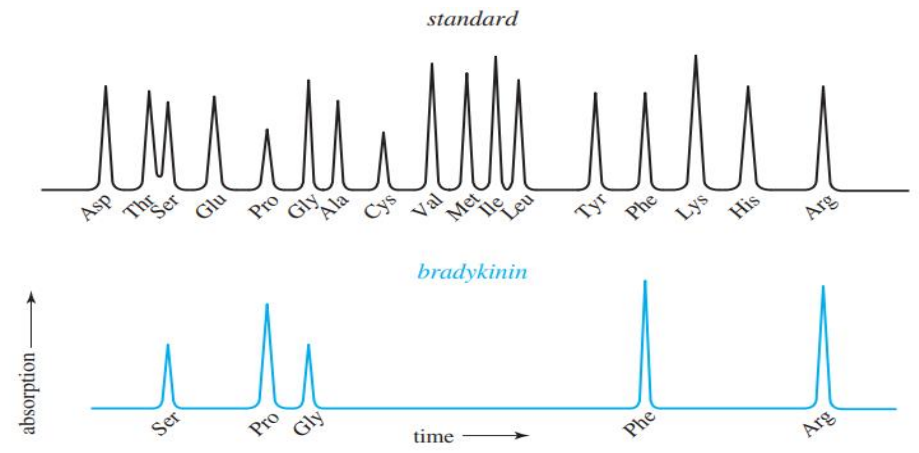
ستون تحلیل‌کننده‌ی امینو اسید حاوی محلول نن هایدرین بوده که با گروپ امین امینو اسیدها تعامل نموده و یک کامپلکس آبی بنفش را تشکیل می‌دهد (شکل ۵) (۱۶).



شکل ۵: تعامل نن هایدرین با امینو اسیدها

جذب نور توسط اسکن کشف‌کننده UV به تابع از زمان ثبت و چاپ می‌شود. زمان لازم برای عبور هر امینو اسید از ستون (زمان ماندگاری آن) به شدت تعامل آن امینو اسید با رزین تبادل ایونی بستگی دارد

(8). امینو اسیدهای موجود در نمونه با مقایسه زمان ماندگاری آن‌ها با مقادیر شناخته شده آن شناسایی می‌شوند (شکل ٦).

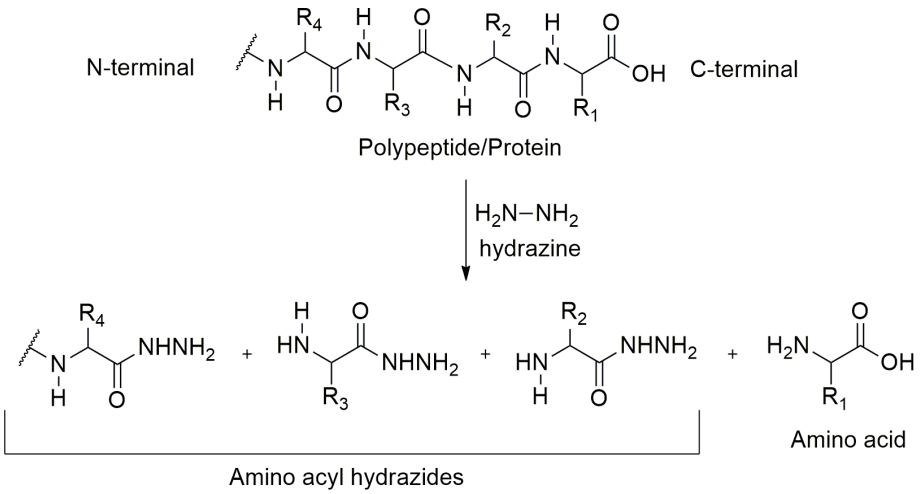


شکل ٦: تعیین تسلسل برادی کینین (Bradykinin) انسانی با استفاده از تحلیل‌کننده امینو اسیدها (۸)

توسط تحلیل‌کننده امینو اسیدها، می‌توان نوع امینو اسید موجود در یک پپتاید را تعیین کرد، اما تسلسل آن‌ها را که به کدام ترتیب به یک‌دیگر متصل اند، نشان نمی‌دهد. برای شناسایی تسلسل امینو اسیدها باید یک زنجیر پپتایدی طوری هایدرولیز گردد که تنها یک امینو اسید از آن جدا گردد و متباقی زنجیر به حالت اصلی‌اش باقی بماند. امینو اسید را می‌توان از انتهای گروپ امین آزاد (ترمینال N) و یا انتهای گروپ کاربوکسیل آزاد (ترمینال C) جدا کرد (۸).

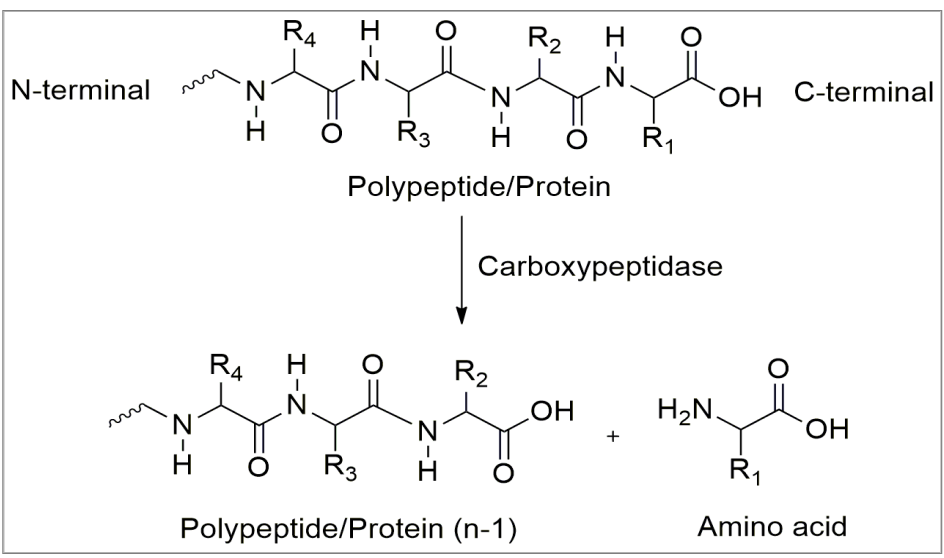
شناسایی تسلسل امینو اسیدها از طرف انتهای گروپ کاربوکسیل (C-terminal)

میتودهای کمتری وجود دارد که عملاً از آن برای شناسایی انتهای کاربوکسیل پروتئین می‌توان استفاده نمود. امینو اسید انتهای گروپ کاربوکسیل را می‌توان با استفاده از یک معرف کیمیاوی (هایدرازین) و یا انزایم کاربوکسی پپتایداز (Carboxypeptidase) تعیین نمود (۱۵). معرف کیمیاوی هایدرازین (Hydrazine) با هر امینو اسید موجود در ساختمان پولی پپتاید به‌جز انتهای کاربوکسیل تعامل نموده، هایدرازیدهای امینو اسایل را تشکیل می‌دهد (شکل ۷) (١٦). بنابراین، انتهای کاربوکسیل به راحتی با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی شناسایی می‌شود.



شکل ۷: تعامل کیمیاوی هایدرازین با پولی پیپتاید جهت شناسایی تسلسل امینو اسیدها کاربوکسی پیپتایداز یک انزایم است که به‌طور خاص رابطه پیپتایدی انتهای کاربوکسیل را هایدرولیز می‌کند و امینو اسید انتهای کاربوکسیل را آزاد می‌کند (شکل ۸).

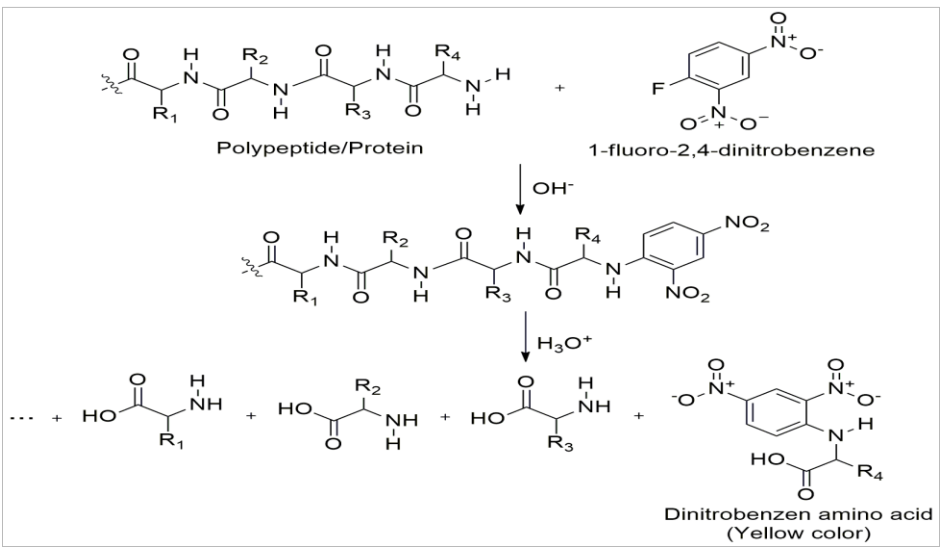
بطور خاص، کاربوکسی پیپتایداز A تمام امینو اسیدهای انتهای کاربوکسیل را به جز Lys، Arg و Pro هایدرولیز می‌کند. کاربوکسی پیپتایداز B امینو اسیدهای Arg و Lys انتهای کاربوکسیل را آزاد می‌کند و کاربوکسی پیپتایداز C امینو اسید Pro انتهای کاربوکسیل را هایدرولیز می‌کند (۱۷).



شکل ۸: شناسایی تسلسل امینو اسیدها با استفاده انزایم‌های کاربوکسی پیپتایداز

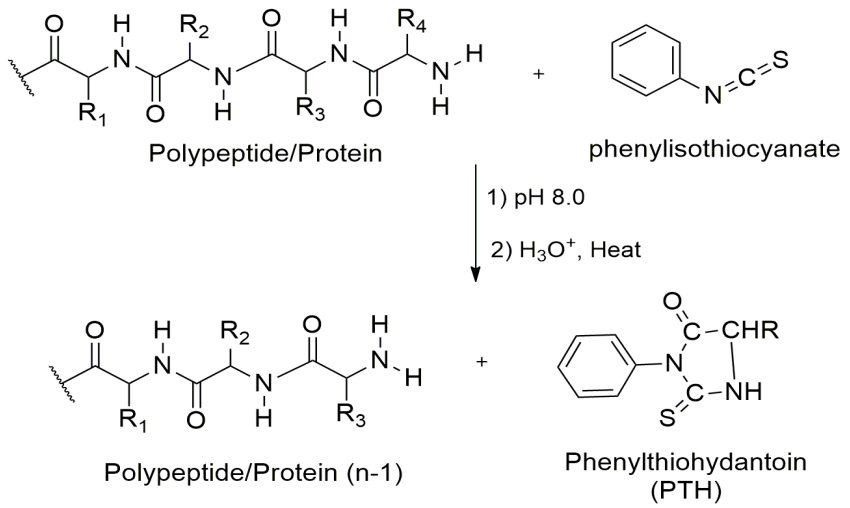
شناسایی تسلسل امینو اسیدها از طرف انتهای گروپ امین (N-terminal)

ترتیب امینو اسیدهای یک پروتئین معمولاً با میتودهای تجزیه سنگر (Sanger) یا ادمن (Edman) تعیین می‌شود. در روش سنگر، 1-fluoro-2،4-dinitrobenzene با امینو اسیدهای انتهای امین امینو اسید یک‌جا شده و در نتیجه کل پروتئین را هایدرولیز می‌نماید (۱۸،۱۹). امینو اسید اصلاح شده N ترمینال در برابر هایدرولیز اسیدی پایدار بوده و می‌توان آن‌را به آسانی شناسایی کرد (شکل ۹). در روش تجزیه ادمن، امینو اسید انتهای امین از یک پولی پیپتاید حذف می‌شود. پروتئین یا پولی پیپتاید حاوی یک گروپ امین آزاد با فینایل ایزوتیوسیانیت تعامل داده شده و در نتیجه امینو اسید انتهای امین به‌شکل یک مشتق فینایل تیوهیدانتوئین حذف می‌شود. بعداً مشتق بدست آمده فینایل تیوهیدانتوین توسط سپکتر UV اش شناسایی می‌شود، در حالی‌که همه روابط پیپتایدی متباقی پولی پیپتاید دست نخورده باقی می‌ماند (شکل ۱۰).



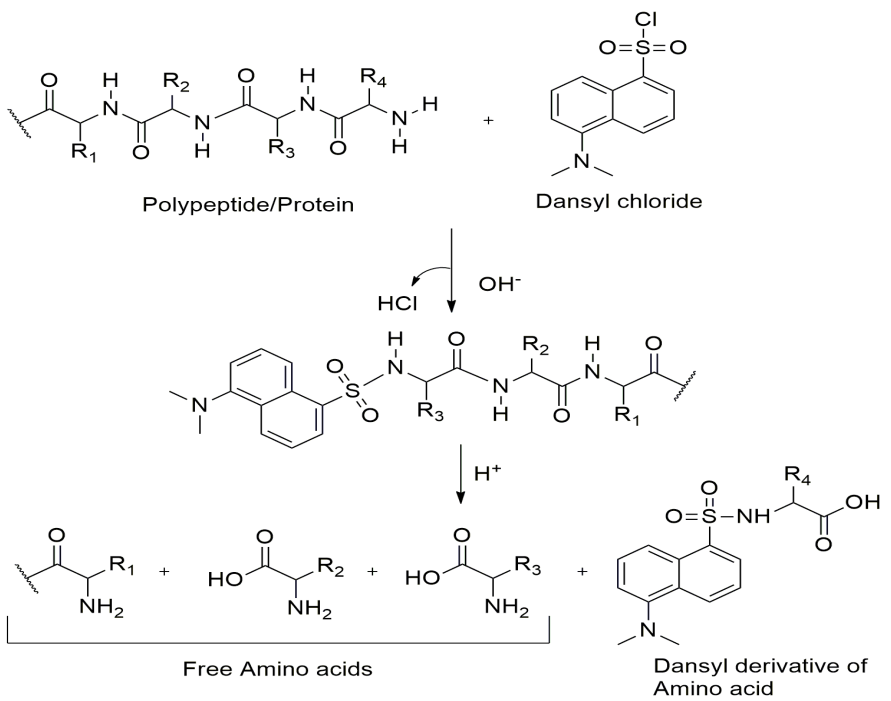
شکل ۹: میتود تجزیه سنگر (Sanger's degradation)

پولی پیپتاید کوتاه شده باقیمانده و دوباره با فینایل ایزوتیوسیانیت تعامل داده شده و امینو اسید بعدی مشخص می‌شود. این روش تا زمانی تکرار می‌شود که تمامی ترتیب پولی پیپتاید یا پروتئین مشخص شود (۱۸،۱۹).



شکل ۱۰: میتود تجزیه ادمن (Edman's degradation)

در میتود دیگر برای شناسایی تسلسل پروتئین از معرف l-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride (دانسیل کلوراید) نیز استفاده می‌شود (۲۰).



شکل ۱۱: تعامل پولی پیتاید با دانسیل کلوراید

در این میتود دانسیل کلوراید با گروپ‌های امین آزاد، پروتئین‌ها همان‌طور که در شکل ۱۱ نشان داده شده تعامل می‌کند. در نتیجه هایدرولیز اسیدی پروتئین اصلاح شده و مخلوط از امینو اسیدهای آزاد

به‌دست می‌دهد. امینو اسید دانسیل در زیر نور UV فلورسنت است و با کروماتوگرافی لایه نازک بر روی ورقه‌های پولی امایدشناسایی می‌شود.

نتیجه‌گیری

امینو اسیدها واحدهای سازنده همه پپتایدها و پروتئین‌ها هستند و بسیاری از خواص مهم آن‌ها را تعیین می‌کنند. تعیین تسلسل ویا ترتیب امینو اسیدها از سمت امین ساختمان پروتئین بنام تحلیل انتهای N معروف است. به‌طور مشابه، تعیین ترتیب امینو اسیدها از سمت کاربوکسیل ساختمان پروتئین به‌عنوان تحلیل انتهای C نامیده می‌شود. امینو اسید در انتهای N را می‌توان به روش‌های مختلفی شناسایی کرد. سه روش پرکاربرد N-terminal عبارتند از روش تجزیه سنگر، روش تجزیه ادمن و استفاده از معرف دانسیل کلوراید می‌باشد. در مقابل روش‌های محدود جهت تحلیل و شناسایی امینو اسیدها از سمت انتهای کاربوکسیل پولی پپتایدها موجود اند. پرکاربردترین روش‌ها عبارت از هایدرازینولیز(Hydrazinolysis) و استفاده از کاربوکسی پپتایداز می‌باشد. پروتئین در هر حجره موجود بوده و برای هر پروسه بیولوژیکی ضروری می‌باشد. بنابراین، شناسایی تسلسل امینو اسیدها در ترکیب پروتئین با ارزش‌ترین اطلاعات در مورد فعالیت‌های پروتئین و درک پروسه‌های حجروی را می‌دهد، چون ویژگی هر پروتئین به تسلسل خاص امینو اسیدهای آن بستگی دارد.

منابع

(1) Akram M, Asif HM, Uzair M, Akhtar N, Madni A, Shah SA, Hasan ZU, Ullah A. Amino acids: A review article. J. Med. Plants Res. 2011;5(17):3997-4000.

(2) Kamble C, Chavan R, Kamble V. A Review on Amino Acids. J. Drug Des. Discov. 2021; 8(3):19–27.

(3) Larsen PO. Physical and chemical properties of amino acids. The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, Amino Acids and Derivatives. 1980; 5(8):225-269.

(4) Bischoff R, Schlüter H. Amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. J. Proteomics. 2012; 75(8):2275-2296.

(5) Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino acids. 2009; 37(1):1-7.

(6) Liljas A, Ehrenberg M. Structural aspects of protein synthesis, 2nd ed. World Scientific. 2013.

(7) Solomons G, Fryhle CB, Snyder SA. Organic Chemistry: Amino acids and proteins, 11th ed. John Wiley & Sons. 2014:1060-1071.

(8) Garrett RH, Grisham CM. Biochemistry. Cengage Learning. 2016:77-101.

(9) Sanger F. Sequences, sequences, and sequences. Annu Rev Biochem. 1988; 57(1):1–29.

(10) Han KK, Belaiche D, Moreau O, Briand G. Current developments in stepwise edman degradation of peptides and proteins. International Journal of Biochemistry. 1985; 17(4):429–45.

(11) Loos T, Mortier A, Proost P. Isolation, identification, and production of posttranslationally modified chemokines. Methods Enzymol. 2009; 461:3–29.

(12) Qian Z, Upadhyaya P, Pei D. Synthesis and screening of one-bead-one-compound cyclic peptide libraries. Peptide Libraries: Methods and Protocols. 2015; 39–53.

(13) Mann M. The rise of mass spectrometry and the fall of Edman degradation. Clin Chem. 2016; 62(1):293–4.

(14) Wade JL, Simek JW. Organic Chemistry, 9th ed. Pearson Education India. 2017.

(15) Bhagavan NV. Medical biochemistry. Academic press. 2002.

(16) Friedman M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. J. Agric. Food Chem. 2004; 52(3):385-406.

(17) Nguyen DN, Becker GW, Riggin RM. Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. J. Chromatogr. A. 1995; 705(1):21-45.

(18) Needleman SB, editor. Protein sequence determination: a sourcebook of methods and techniques. Springer Science & Business Media; 2012.

(19) David L. Lehninger principles of biochemistry. 2008.

(20) Walker JM. The dansyl method for identifying N-terminal amino acids. Methods Mol Biol. 1984; 1:203-2012.