Analysis of Molecular Interactions Using the Thermophoresis Method and its Applications in Neuroscience and Biological Processes

Sara Azizishalbaf[1], Asadollah Asadi[2*], Arash Abdolmaleki[3, 4]

[1]Basic Science Research Center, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3]Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran
[4]Bio Science and Biotechnology Research center (BBRC), Sabalan University of Advanced Technologies (SUAT), Namin, Iran

Article Info:

Received: **24 Oct 2018** ***Revised:*** **7 Feb 2019** ***Accepted:*** **20 Apr 2019**

ABSTRACT

Introduction: Molecular interactions play an important role in the phenomenon and biological processes. In fact, any cellular biological process ranged from genetic replication to the production of various proteins to the transmission of neurological, hormonal, membrane involves collections of molecular interactions that occur continuously. Interference in each of these processes at every stage of molecular interaction may be caused by various diseases. Therefore, their careful study can improve our understand of biological phenomena and lead to the emergence of new methods for the treatment of many diseases, in particular, the diseases of the nervous system. For this purpose, various biophysical and biochemical methods have been developed. Among them, infrared laser-based methods are very useful and important. Thermophoresis is one of these methods, which has been considered in recent years by medical, pharmaceutical, neuroscience, regeneration and biology scientists. This method is based on the direct movement of molecules in a temperature slope. This type of movement greatly depends on the biophysical properties of the molecule, including size, load, and solvent layer. Micro-scale modifications in this specification can affect the properties of the molecule under the influence of temperature. ***Conclusion:*** Thermophoresis is an easy, accurate, and fast method for analyzing the behavior of molecules. For this purpose, in the present study, we discussed the various theoretical and practical details as well as the various advantages and disadvantages of measuring the tendency of small molecules, such as ions and biochemical molecules.

Key words:

1. Molecular Biology
2. Biological Phenomena
3. Nervous System Diseases

***Corresponding Author:** Asdollah Asadi

E-mail: *asad.asady@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

تجزیه و تحلیل تعاملات مولکولی با استفاده از روش ترموفورز و کاربردهای آن در علوم اعصاب و فرایندهای زیستی

سارا عزیزی شالباف[۱]، اسداله اسدی[۲*]، آرش عبدالملکی[۳،۴]

[۱]مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۲]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۳]گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران
[۴]مرکز پژوهشی علوم زیستی و زیست فناوری، دانشگاه فناوری‌های نوین سبلان، نمین، ایران

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲ آبان ۱۳۹۷ **اصلاحیه:** ۱۸ بهمن ۱۳۹۷ **تاریخ پذیرش:** ۳۱ فروردین ۱۳۹۸

چـــــکیده

مقدمه: تعاملات مولکولی نقش مهمی را در پدیده‌ها و فرایندهای زیستی ایفاء می‌کنند. درواقع هر فرایند زیستی در سلول از همانندسازی ماده ژنتیکی گرفته تا ساخت انواع پروتئین‌ها به‌منظور انتقال پیام‌های عصبی، هورمونی، غشا شامل مجموعه‌ای از تعاملات مولکولی هستند که به صورت پیوسته رخ می‌دهند. تداخل در هرکدام از این فرایندها، در هر مرحله از تعاملات مولکولی ممکن است توسط بیماری‌های مختلفی ایجاد شود. بنابراین مطالعهٔ دقیق آن‌ها می‌تواند شناخت ما از پدیده‌های زیستی را بهبود بخشد و منجر به ابداع روش‌های نوین در درمان بسیاری از بیماری‌ها خصوصاً بیماری‌های سیستم عصبی گردد. بدین منظور روش‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی مختلفی ابداع شده است. در بین آن‌ها روش‌های مبتنی بر لیزر فروسرخ بسیار پر مزیت و مهم می‌باشند. ترموفورز یکی از این روش‌ها است که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه دانشمندان حوزهٔ پزشکی، داروسازی، علوم اعصاب، پزشکی‌ترمیم و زیست‌شناسی قرار گرفته است. این روش بر اساس حرکت مستقیم مولکول‌ها در شیب دمایی است. این نوع حرکت به طور چشم‌گیری به خصوصیات بیوفیزیکی مولکول از جمله اندازه، بار و لایهٔ حلال‌پوشی بستگی دارد. تغییرات در مقیاس میکرو در این خصوصیات می‌تواند خصوصیات مولکول تحت نفوذ شیب دمایی را تحت تأثیر قرار دهد. ***نتیجه‌گیری:*** ترموفورز روشی آسان، دقیق و سریع برای تجزیه و تحلیل رفتار مولکول‌ها است. بدین منظور در این مقاله جزئیات مختلف نظری و عملی و همچنین مزایا و معایب مختلف سنجش میزان تمایل مولکول‌های کوچک همچون یون‌ها و مولکول‌های زیستی مورد بحث قرار گرفت.

کلید واژه‌ها:
۱. زیست‌شناسی مولکولی
۲. پدیده‌های زیستی
۳. بیماری‌های سیستم عصبی

* **نویسنده مسئول:** اسداله اسدی
آدرس الکترونیکی: *asad.asady@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

مقدمه

تمامی فرایندهای داخل سلولی و خارج سلولی در موجودات زنده به واسطهٔ میان‌کنش‌ها و تعاملاتی که بین مولکول‌های زیستی مختلف صورت می‌گیرد انجام می‌شوند. به عبارت دیگر این تعاملات مولکولی هستند که به صورت سلسله مراتبی انجام می‌شوند تا در نهایت فرایند خاصی در موجود زنده انجام شود و در نتیجهٔ آن‌ها موجود زنده بتواند با محیط پیرامون خود سازگاری داشته باشد (۱). بسیاری از این فرایندها برای طبیعت موجودات زنده مرسوم هستند، برای مثال همانندسازی DNA یا تولید پروتئین‌های مختلف، اما در برخی موارد نقص در مسیر این فرایندهای زیستی و یا رخداد فرایندهای غیرطبیعی می‌توانند عواقبی برای موجود زنده داشته باشند و سبب ایجاد بیماری شوند. بنابراین تجزیه و تحلیل این میان‌کنش‌ها و تعاملات می‌تواند گام مؤثری در شناخت فرایندهای زیستی داشته باشد که در نهایت منجر به دستیابی به روش‌های نوین برای درمان بیماری‌های مختلف می‌شود (۲). به‌منظور مطالعهٔ این میان‌کنش‌ها، روش‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی متنوعی ارائه شده‌اند. به‌عنوان مثال می‌توان به روش‌های سنجش تغییر جابه‌جایی الکتروفورزی که برای مطالعهٔ تعاملات درشت مولکول‌ها، کالری‌متری تیتراسیون هم‌دما، قطبش فلورسانسی و تشدید رزونانس سطحی که به‌منظور دستیابی به پارامترهای کمی اتصالات مولکولی استفاده می‌شوند، اشاره کرد. البته لازم به ذکر است که هرکدام این روش‌ها معایبی از جمله حساسیت نسبتاً کم برخی از آن‌ها، نیاز داشتن به مقادیر زیاد نمونه و نیز در برخی موارد زمان‌بر بودن روش را دارند (۳، ۴).

در اینجا به معرفی و توضیح روشی بیوفیزیکی تحت عنوان ترموفورز[1] می‌پردازیم که برای اولین بار توسط لودویگ[2] توصیف شد (۵، ۶). این روش بر مبنای جابه‌جایی مستقیم ذرات بر اثر شیب دمایی است. مولکول‌ها در شیب دمایی بسته به اندازه، بار و لایهٔ حلال‌پوشی حرکت می‌کنند. در اثر تعامل لیگاند با مولکول، حداقل یکی از این پارامترها تغییر خواهد کرد. حتی کوچک‌ترین تغییرات در این پارامترها می‌توانند در جابه‌جایی ترموفورزی مولکول مشاهده و بررسی شود (۷).

این روش مزایای فراوانی دارد. با در دسترس داشتن مقدار کمی نمونه می‌توان تجزیه و تحلیل را با این روش انجام داد. محدودیتی برای وزن و اندازهٔ مولکول‌ها ندارد. اندازه‌گیری را می‌توان در محیط‌های مختلفی چون محلول‌های مختلف، بافرها، عصارهٔ سلولی، مایع مغزی -نخاعی و نیز خون انجام داد. همچنین دستگاه آن به گونه‌ای طراحی شده که به راحتی قابل حمل و جابه‌جایی است (۸-۱۰) با توجه به مزایایی که از این روش ذکر شد، در مهر و موم‌های اخیر به یک روش قدرتمند به‌منظور تجزیه و تحلیل طیف وسیعی از میان‌کنش‌ها و تعاملات مولکولی شامل پروتئین -پروتئین، پروتئین -پپتید، پروتئین -دی ان ای، پروتئین -مولکول‌های کوچک و پروتئین -غشا به کار گرفته می‌شود (۱۰-۱۲).

دیدگاه نظری ترموفورز

مفهوم ترموفورز طبق تعریف لودویگ به شیب دمایی در محلول آبی مولکول‌های زیستی اطلاق می‌شود. این شیب دمایی منجر به جریان حرارتی و در نتیجه جریان مولکول‌ها نیز می‌شود. به عبارتی در محلول هم جریان دما و هم جریان جرم انجام می‌شود. میزان این جریان مولکولی متناسب با غلظت ماده و شیب دمایی خواهد بود:

$$j = -cD_T \, grad \, T$$

در این معادله j جریان مولکول، c غلظت ماده، D_T ضریب توزیع دمایی و grad T نیز شیب دما را نشان می‌دهند.

در حالت گذار steady state جریان ترموفورزی با جریان جرم برابر می‌شود و جریان مولکولی به صورت زیر خواهد بود:

$$j = -D \, grad \, c$$

که در این معادله نیز D نشان‌دهندهٔ ضریب توزیع می‌باشد.

با این حساب تغییرات ترموفورزی اعمال شده در غلظت را می‌توان از نسبت ضرایب توزیع به دست آورد. این نسبت را ضریب سورت[3] می‌نامند:

$$S_T = \frac{D}{D_T}$$

وجود اختلاف دمای ΔT در حالت گذار steady state در محیط منجر به تقلیل مولکول‌های حل‌شده در ناحیه‌ای که دمای آن بالاست می‌شود. این تغییر در غلظت را می‌توان از رابطهٔ زیر محاسبه کرد:

$$C_{\text{گرما}} / C_{\text{سرما}} = \exp(-S_T \Delta T)$$

که C نشانهٔ غلظت مولکول‌ها در نواحی گرم و سرد نمونه است (۹).

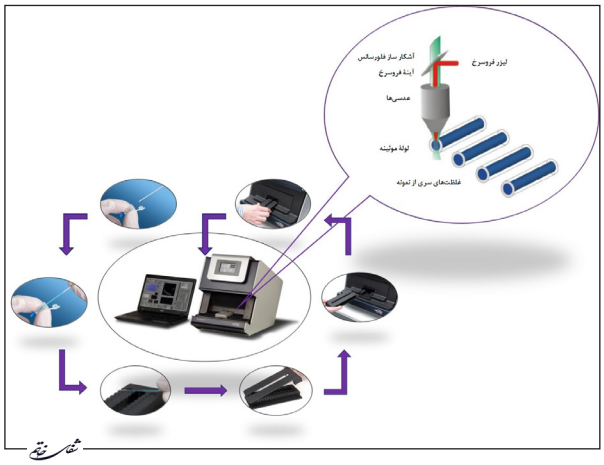
اجزا و نحوهٔ کارکرد دستگاه

هر روش آزمایشگاهی دارای اجزا و تجهیزاتی است که

[1] Microscale thermophoresis
[2] Ludwig
[3] Soret

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]
[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

متناسب با هدفی که دنبال می‌کند طراحی شده است. دستگاه ترموفورز نیز از این قاعده مستثنا نیست. همان‌طور که در تصویر ۱ مشخص است مهم‌ترین اجزای دستگاه ترموفورز لیزر فروسرخ، آینهٔ دورنگ نما[4]، عدسی‌ها و لوله‌های موئینه[5] هستند. برای انجام آزمایش، محلول نمونهٔ موردنظر را در رقت‌های خاص و سری تهیه کرده و در لوله‌های موئینه ریخته می‌شوند. سپس این لوله‌های موئینه که حاوی غلظت‌های سری هستند در مکان در نظر گرفته شده در دستگاه قرار داده می‌شوند.



تصویر ۱- شکل دستگاه و نحوهٔ قرارگیری نمونه در آن. جزئیات و اجزای دستگاه مطابق تصویر می‌باشد.

زمانی که لیزر فروسرخ روشن می‌شود، حرارت آن توسط آینهٔ دورنگ نما در جهت نشر فلورسانس هدایت می‌شود. در ادامه، عدسی‌ها قرار دارند. نحوهٔ کار دستگاه بدین‌صورت است که لیزر فروسرخ از طریق همان عدسی که برای آشکارسازی فلورسانس به کار می‌رود، بر روی نمونه متمرکز می‌شود. این نوع ترتیب قرارگیری اجزای دستگاه در ارائهٔ بسیار دقیق خصوصیات ترموفورزی بسیار حائز اهمیت است. این آزمایش به‌صورت تیتراسیون انجام می‌شود. غلظت مولکول نشان‌دار شده ثابت و کمتر از یک نانومولار در نظر گرفته می‌شود. اما غلظت مولکول دیگر متغیر است. در طول واکنش فلورسانس نرمال (نسبت فلورسانس اولیه[6] به فلورسانسی که بعد از روشن شدن لیزر فروسرخ اندازه‌گیری می‌شود) گزارش می‌گردد. اگر غلظت X به‌عنوان غلظتی از مولکول نشان‌دار شده که به مولکول هدف متصل شده است، می‌توان فلورسانس نرمال را طبق فرمول زیر به غلظت نسبت داد:

$$Fnorm\ 5(1 - x)\ Fnorm(unbound) + x\ Fnorm(bound)$$

در این معادله جملهٔ اول فلورسانس مولکول‌های متصل نشده و جملهٔ دوم نشان‌دهندهٔ فلورسانس مولکول‌های متصل شده (کمپلکس) است. بنابراین طبق این معادله می‌توان از اختلاف این دو جمله کسر مولکول‌های متصل شده و در نتیجه ثابت توزیع واکنش را به دست آورد (۱۵-۱۳، ۵).

یکی از مزیت‌های روش ترموفورز این است که برای القای حرارت به نمونه از لیزر فروسرخ استفاده می‌شود. لیزر فروسرخ با دقتی در حدود میلی کلوین منجر به گرم شدن نمونه می‌شود که این مورد در مقایسهٔ خصوصیات ترموفورزی غلظت‌های سری نمونه بسیار مهم است. از طرفی، با توجه به اینکه لیزر فروسرخ بر روی نمونه متمرکز می‌شود، می‌تواند در محدودهٔ میکرومتری منجر به افزایش دمای نمونه شود و این برای تجزیه و تحلیل سریع ترموفورز بسیار مهم است. حرکت مولکول‌ها در محلول به انتشار بستگی دارد. لیزر فروسرخ با حرارت‌دهی موضعی سبب اختلاف دما در محلول شده و این اختلاف دما باعث حرکت مولکول‌ها در جهت همگن‌سازی دما در محلول می‌شود. کل روند اصلی آزمایش می‌تواند در ۳۰ ثانیه انجام شود. به این ترتیب که یک ثانیه پس از آنکه لیزر فروسرخ روشن شد، انرژی در موضع جذب می‌شود و توزیع دمایی به حالت تعادل می‌رسد و دمای حالت گذار از یک درجهٔ کلوین به ده درجهٔ کلوین (حدوداً ۲ الی ۶ درجه به طور معمول) افزایش می‌یابد. پس از این افزایش سریع دما خیز دمایی (MST)[7] ترموفورز در محلول گرادیان یا شیب غلظتی ایجاد می‌کند (۱۴، ۱۳).

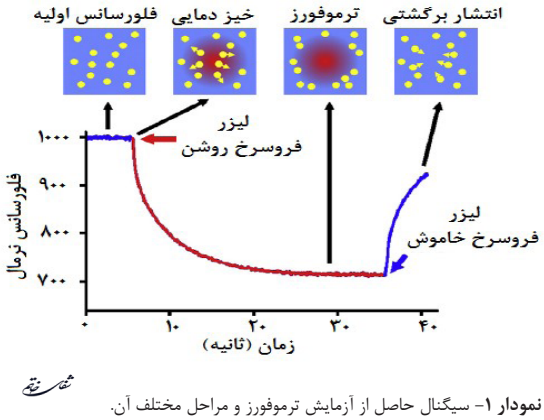
تفسیر سیگنال‌ها

همان‌طور که در بخش قبل اشاره شد در روش ترموفورز از رنگ‌های فلورسانسی استفاده می‌شود. به‌منظور نشان‌دارکردن مولکول پذیرنده، این رنگ‌ها به بخش خاصی از مولکول متصل می‌شوند. در طول آزمایش تغییرات ایجاد شده در این رنگ‌ها توسط آشکارساز مشخص می‌گردد. نتایج حاصل به صورت نموداری که تغییرات فلورسانسی را در طول زمان نشان می‌دهد نمایش داده می‌شوند. این نمودار حاوی چند مرحله است که از هرکدام می‌توان اطلاعات خاصی از تعاملات مولکولی استخراج کرد. این مراحل بر حسب گام زمانی و اینکه لیزر فروسرخ خاموش یا روشن باشد از یکدیگر متمایز می‌شوند (نمودار ۱). این مراحل به ترتیب شامل فلورسانس اولیه (فلورسانس نمونه پیش از روشن نمودن لیزر فروسرخ)، خیز دمایی (تغییرات فلورسانسی در ثانیهٔ اولی که نمونه با لیزر فروسرخ گرم می‌شود و هنوز حرکات ترموفورزی مولکول آغاز نشده است)، ترموفورز (مرحله‌ای که حرکات ترموفورزی آغاز می‌شود)، خیز دمایی معکوس (که بعد از خاموش کردن لیزر و سرد شدن نمونه ایجاد می‌شود و نمونه دچار انتشار معکوس

[4] Dichroic
[5] Capillary
[6] Initial fluorescence
[7] MST T-jump

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]
[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

یا بازگشتی[8] می‌شود). از هر کدام از این مراحل می‌توان اطلاعات خاصی را در رابطه با میزان تمایل مولکول‌ها و نحوهٔ اتصال آن‌ها به دست آورد که در ادامه به هرکدام از آن‌ها خواهیم پرداخت.



نمودار ۱- سیگنال حاصل از آزمایش ترموفورز و مراحل مختلف آن.

فلورسانس اولیه

در ابتدای آزمایش که مولکول‌ها به صورت یکنواخت در محلول پراکنده‌اند و هنوز لیزر فروسرخ روشن نشده است، سیگنال فلورسانس اولیه به دست می‌آید که آن را به صورت F اولیه نشان می‌دهند. بنابراین در این مرحله می‌توان اطلاعاتی را در رابطه با تعاملات مولکولی به دست آورد که مستقل از مراحل وابسته به لیزر فروسرخ می‌باشند. مدت زمان این مرحله در حدود ۵ ثانیه است. معمولاً، در تجزیه و تحلیل آزمایش ترموفورز، با توجه به اینکه محلول نمونهٔ مورد نظر به صورت دستی تهیه می‌شود ممکن است مقدار فلورسانس اولیه بین ۵ الی ۱۰ درصد متغیر باشد. اما با توجه به اینکه در آزمایش ترموفورز تغییرات نسبی فلورسانس اندازه‌گیری می‌شود، تغییرات کوچک در فلورسانس اولیه تأثیری در نتیجهٔ آزمایش نخواهد داشت. در برخی از موارد، فلورسانس اولیه ممکن است تغییراتی در حالت اتصال مولکول را گزارش دهد. به عبارتی ممکن است تعاملات مولکولی در این مرحله رخ داده و باعث تغییراتی در فلورسانس اولیه شوند. دستگاه ترموفورز به گونه‌ای طراحی شده که تغییرات در شدت فلورسانس بسیار دقیق اندازه‌گیری شود. بنابراین اگر میان‌کنش دو مولکول منجر به تغییرات بسیار ناچیز در شدت فلورسانس شوند می‌توان به راحتی آن را اندازه‌گیری کرد. این تغییرات ممکن است باعث تغییرات الکتروستاتیکی در رنگ فلورسانس در هنگام تشکیل کمپلکس شود و در صورت امکان می‌توان ثابت تجزیه را از تغییراتی که در فلورسانس اولیه رخ می‌دهد محاسبه کرد. تغییرات بسیار شدید و غیرقابل انتظار در این مرحله نیز می‌توانند اشاره به تجمع مولکول‌های متصل یا غیر متصل قبل از اتمام آزمایش داشته باشد (۹، ۱۳، ۱۶).

خیز دمایی

این مرحله زمانی رخ می‌دهد که لیزر فروسرخ روشن شود و نمونه به‌سرعت در کمتر از یک ثانیه حرارت‌دهی می‌شود. در واقع در این مرحله می‌توان با تغییر دمای ذاتی فلورسانس میزان تمایل مولکول‌ها را اندازه‌گیری کرد. دمای ذاتی رنگ فلورسنتی به تغییرات محیطی وابسته است. به عبارتی تغییر در دمای نمونه ممکن است منجر به تغییراتی در شدت شود که به علت تغییر در جذب فلورسانس، نیمه‌عمر فلورسانس، میزان کوانتوم و جابه‌جایی طیف فلورسانسی منتشر شده باشد. این تغییرات نیز به ویسکوزیته و محیط رنگ یعنی سازگاری موضعی و ترکیب آمینواسیدی پروتئین و محلول اطراف آن بستگی دارد. برای مثال زمانی که مولکول در موقعیتی نزدیک به رنگ فلورسانسی به پروتئین نشان‌دار شده با رنگ فلورسانسی متصل شود یا تغییرات کانفورماسیونی در نزدیکی موقعیت رنگ در پروتئین ایجاد کند، این اتصال سبب تغییرات دمایی نیز در نمودار فلورسانس می‌شود که در این مرحله قابل تشخیص است. پس طبق مطالبی که به آن‌ها اشاره کردیم، می‌توانیم بگوییم که خیز دمایی به وسیلهٔ اثرات موضعی یا محلی ایجاد می‌شود. با توجه به تعاملات گزارش شده بین رنگ‌های فلوروسنت و تریپتوفان‌های پروتئین، بالاترین حد این اثر در بازهٔ ۱ الی ۲ نانومتر می‌باشد. این پدیده اطلاعات زیادی در رابطه با نوع اتصال و جایگاه آن ارائه می‌دهد. این حساسیت خیز دمایی می‌تواند توسط رنگ فلورسنتی انتخاب شده تعدیل شود.

خصوصیات کوانتومی رنگ‌ها به‌شدت تحت تأثیر قطبیت محلول یا محیط و بنابراین ترکیب مولکول زیستی قرار دارند. علاوه بر آشکارسازی خصوصیات استاتیکی محیط اطراف رنگ، این مرحله می‌تواند میزان سختی و استحکام داربست و ساختار مولکول دیپول‌ها را نیز آشکار کند. استحکام و سختی ساختار پروتئین معمولاً تحت تأثیر تعاملات و اتصالات تغییر می‌کند و ممکن است سخت‌تر یا منعطف‌تر شود که این پدیده سبب تغییر میزان فلورسانس در این مرحله می‌شود که می‌تواند اتصال و کیفیت آن را مشخص کند. سیگنال‌های T-jump و ترموفورز می‌توانند به راحتی از هم جدا شوند، زیرا اثراتی که منجر به تغییرات ناشی از دما در فلورسانس و همچنین خود حرارت می‌شود، فرایندهای سریع هستند که تقریباً بلافاصله پس از روشن شدن لیزر فروسرخ اتفاق می‌افتد. لازم به ذکر است که این مرحله از آزمایش به قطر داخلی لولهٔ موئینه بسیار حساس است، بنابراین در انتخاب نوع لولهٔ موئینه باید دقت لازم به کار گرفته شود (۹، ۱۳، ۱۶).

[8] Back diffusion

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]
[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

ترموفورز

این مرحله از آزمایش ترموفورز برای ارزیابی اطلاعات واکنش بسیار مناسب است. ترموفورز در بازهٔ زمانی متفاوتی از خیز دمایی رخ می‌دهد و اساساً مرحله‌ای است که فرایند انتشار در آن صورت می‌گیرد و معمولاً یک ثانیه بعد از روشن کردن لیزر فروسرخ رخ می‌دهد. تغییرات در خصوصیات ترموفورزی گونه‌ای که با رنگ فلورسنتی نشان‌دار شده است منعکس‌کنندهٔ تغییراتی است که بر تحرک ترموفورزی (DT) و ضریب توزیع (D) تأثیر دارند. این تغییرات شامل تغییرات در اندازه، بار و لایهٔ حلال‌پوشی مولکول می‌باشند. این تغییرات همانند تغییرات رخ داده در مرحلهٔ خیز دمایی به صورت موضعی نیستند بلکه تغییرات کلی مولکول نشان‌دار شده با رنگ فلورسانس را شامل می‌شود. یکی از مهم‌ترین مزیت‌های این روش این است که نه تنها به تغییرات اندازهٔ کمپلکس در پاسخ به تعاملات و اتصالات بستگی دارد بلکه به تغییرات در بار و لایهٔ حلال‌پوشی نیز بستگی دارد. بنابراین، خواص ترموفوریتی تغییر می‌کنند، حتی اگر یک ترکیب مولکولی، پپتید یا حتی یون با پروتئین نشان‌دار فلورسنتی بسیار بزرگ‌تر تعامل داشته باشد.

به‌منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده، نسبت مقادیر فلورسانس ۳۰ ثانیه بعد از روشن کردن لیزر فروسرخ و یک ثانیه بعد از روشن کردن لیزر محاسبه می‌شود و نمودار آن در مقابل غلظت مولکول نشان‌دار شده رسم می‌شود. به این ترتیب فلورسانس نرمال مرحلهٔ خیز دمایی را شامل نمی‌شود و تنها تغییرات فلورسانسی القا شده به وسیلهٔ تحرک ترموفورزی (تغییرات غلظتی) را شامل می‌شود. به‌منظور اینکه خیز دمایی در تجزیه و تحلیل‌ها دخیل باشد می‌توانیم نسبت فلورسانس اولیه به فلورسانس ۳۰ ثانیه پس از روشن کردن لیزر فروسرخ را به دست آورده و نمودار آن را محاسبه کنیم. باید توجه داشت که لازم نیست ترموفورز به‌منظور دستیابی به ثابت توزیع به حالت پایدار یا steady state برسد (۱۶، ۱۳، ۹).

انتشار بازگشتی

پس از اینکه لیزر فروسرخ خاموش شد، شیب دمایی به‌سرعتی که ایجاد شده بود از بین می‌رود. به محض اینکه گرادیان دمایی به‌عنوان نیروی محرکه ترموفورز برطرف شد، گرادیان غلظتی نیز برطرف می‌شود. مدت زمان لازم برای رسیدن به یک توزیع همگن مولکول‌ها بستگی به سرعت انتشار و اندازهٔ مولکول‌ها دارد. بنابراین انتشار برگشتی برای تشخیص تغییرات اندازهٔ مولکول بسیار مناسب است. در اصل این فرایند شبیه به روش (FRAP)[9] است و می‌توان قطر هیدرودینامیکی مولکول را اندازه‌گیری کرد. علاوه بر این اطلاعات دیگری که از این مرحله می‌توان به دست آورد این است که اگر فرایند ما به گونه‌ای باشد که در آن هیچ‌گونه تغییری در اندازهٔ مولکول انتظار نداریم (برای مثال در اتصال مولکول‌های کوچک)، اما این تغییر در آزمایش پدید آمد، در آن صورت آزمایش بیان‌کنندهٔ تجمع مولکولی است (۱۶، ۱۳، ۹).

عوامل و شرایط بهینه برای انجام آزمایش ترموفورز

به‌منظور اینکه آزمایش ترموفورز در شرایط بهینه انجام شود نیاز است که برخی شرایط در نظر گرفته شود و اجزای مختلف دستگاه نیز کنترل شوند. مواردی که در نتیجهٔ آزمایش تأثیرگذارند و باید به آن‌ها اهمیت داد عبارت‌اند از:

۱- شدت فلورسانس

شدت فلورسانس به طور چشمگیری با توجه به نوع فلئورفر، توالی DNA و پروتئین و محل فلئورفر در مولکول متفاوت است. قرار دادن یک فلئورفر نزدیک به جایگاه میان‌کنش می‌تواند منجر به یک آزمایش حساس و دقیق شود. همچنین با توجه به هدف و نوع آزمایش، فلئوفور باید از این نظر که با سوبسترا بر سر جایگاه اتصال رفتار رقابتی نداشته باشد نیز تست شود.

۲- شدت لیزر

شدت لیزر در تنظیم شیب دمایی تأثیر دارد. با تغییر تنظیمات شدت لیزر از ۱۰ الی ۱۰۰ درصد، به طور میانگین می‌توان سبب افزایش ۲ الی ۶ درجه‌ای دما شد. برای دستیابی به کیفیت مطلوب داده‌ها، شدت لیزر باید با توجه به نوع تعاملات مولکولی انتخاب شود.

۳- نوع بافر

نوع بافر مورد استفاده نیز ممکن است در توانایی آشکارسازی تعاملات تأثیرگذار باشد. بافرهای با درصد کم نمک منجر به اختلاف بیشتر در خصوصیات ترموفورزی مولکول می‌شوند. می‌توان سیستم مورد نظر را از نظر خصوصیات بافری بهینه کرد. بنابراین توصیه می‌شود که از بافرهای مختلف به‌منظور وضوح بیشتر سیگنال‌های تعامل استفاده شود. البته مایعات زیستی همانند خون و عصارهٔ سلولی نیز می‌توانند در ترموفورز مورد استفاده قرار گیرند.

۴- نوع لوله‌های موئینه

جنس لوله‌های موئینه باید به گونه‌ای باشد که مولکول‌های نمونه دچار چسبندگی به دیواره‌های آن نشود. بر اساس نوع نمونه، لولهٔ مویینه می‌تواند آب‌دوست، آب‌گریز و یا ساده باشد.

[9] Fluorescence recovery after photo bleaching

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

۵- دمای واکنش

انجام واکنش را می‌توان با دما کنترل کرد. انجام ترموفورز در دماهای مختلف می‌تواند اطلاعات مهمی از واکنش در اختیار قرار دهد. محدودهٔ تغییرات دما در ترموفورز بین ۲۰ الی ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد است (۱۵).

گسترهٔ کاربردی روش ترموفورز

تعیین تمایلات مولکول‌های زیستی به واکنش با دقت بسیار بالا

یکی از مهم‌ترین کاربردهای ترموفورز در زمینهٔ تعیین تمایل مولکول‌ها در تعاملات زیستی می‌باشد. این تعاملات شامل تعامل پروتئین -پروتئین، پروتئین -پپتید، پروتئین -یون، پروتئین –نوکلئیک‌اسید و پروتئین -غشا می‌باشد. این روش دقت بسیار بالایی دارد و قادر است ثابت تجزیهٔ واکنش (Kd) را در غلظت‌های پیکومولار که در داروسازی اهمیت ویژه‌ای دارد تعیین کند. مزیت منحصر به فرد ترموفورز در آشکارسازی تغییرات بسیار کوچک در لایهٔ حلال‌پوشی مولکول است و در نتیجه برای تجزیه و تحلیل‌های مستقل از طبیعت و اندازهٔ مولکول بسیار مناسب است.

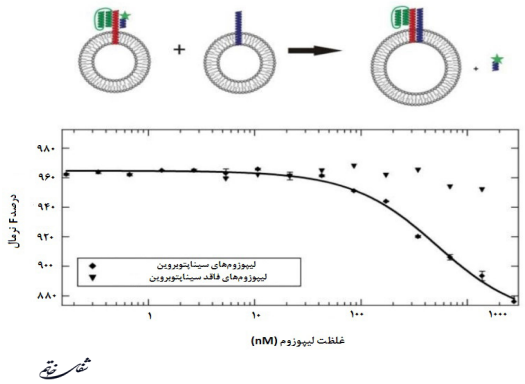
میان‌کنش پروتئین‌های غشایی

همجوشی انواع غشاءها، وزیکول‌ها، لیپوزوم‌ها و میسل‌ها یکی از فرایندهای مهمی است که توجه زیادی به آن می‌شود. در محیط بدن برای اهداف مختلفی از جمله انتقال پیام، انتقال مواد و ارتباطات سلولی کاربرد دارد. در تحقیقات زیستی از این فرایند در زمینهٔ داروسانی استفاده می‌شود (۱۷). بنابراین برای بررسی آن روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که یکی از مفیدترین روش‌ها روش ترموفورز می‌باشد.

همجوشی غشاءها و وزیکول‌ها در انتقال پیام‌های عصبی در موجودات زنده به طور مکرر انجام می‌شود. این همجوشی به واسطهٔ گروهی از پروتئین‌های غشایی انجام می‌شود که SNARE نامیده می‌شوند. پروتئین‌های SNARE نقش کلیدی در فرایند همجوشی غشاءها در موجودات دارند. یکی از مهم‌ترین کاربردهای این پروتئین‌ها در اعصاب است که همجوشی وزیکول سیناپسی با غشای پس‌سیناپسی را در پاسخ به افزایش سطح یون کلسیم وساطت می‌کنند (۱۹، ۱۸).

برای مطالعهٔ چگونگی روند همجوشی، دو غشایی که حاوی پروتئین‌های SNARE سازگار و مکمل هستند را در نظر می‌گیریم. یکی از غشاءهای لیپوزومی حاوی پروتئین SNARE عصبی به نام سیناپتوبروین -۲ (که به اختصار Syb-2 نامیده می‌شود) و غشای دیگر نیز حاوی پروتئین SNAP-25، سینتاکسین -A1 و قطعه‌ای از پروتئین سیناپتووبروین -۲ است که با الکسافلور ۴۸۸ نشان‌دار شده است. با اتصال کامل توالی ۴۷ آمینواسیدی متصل به سینتاکسین -A1 به SNARE کمپلکس سیس تشکیل می‌دهند. به این ترتیب همجوشی دو غشاء انجام شده و سیگنال فلورسانسی آشکار می‌شود.

در نمودار تغییرات فلورسانس نرمال در مقابل غلظت لیپوزوم‌های حاوی سیناپتوبروین (غیرنشان‌دار) مشاهده می‌شود (نمودار ۲). برای انجام تیتراسیون، غلظت لیپوزوم نشان‌دار شده ثابت نگاه داشته می‌شود. در غلظت ۴۵۰ نانو مولار ۵۰ درصد اتصالات انجام می‌شود. تغییرات مشاهده شده در نوسانات ترموفورزی تفکیک قطعهٔ ۴۷ آمینواسیدی را از لیپوزوم نشان‌دار شده در رقابت با سیناپتوبروین که نسبت به این قطعهٔ کوتاه تمایل بیشتری به اتصال با لیپوزوم دارد را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه تعامل به صورت رقابتی است، همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌کنیم در مقایسه با نمودار شاهد که مربوط به لیپوزوم‌های فاقد سیناپتوبروین است، تغییرات ترموفورزی در غلظت‌های پایین لیپوزوم‌های سیناپتوبروین چندان قابل محسوس نیست زیرا مقدار کمی از قطعات ۴۷ آمینواسیدی تفکیک شده‌اند. اما در غلظت‌های بالا این تغییرات بسیار قوی و مشهود است (۱۸، ۱۳).



نمودار ۲- نمودار حاصل از بررسی نحوهٔ میان‌کنش پروتئین‌های غشایی ERANS به وسیلهٔ ترموفورز.

کاربرد ترموفورز در مطالعهٔ میان‌کنش پروپپتید اولیگوپپتیداز و آلفا سینوکلئین (عامل بیماری پارکینسون و دیگر سینوکلئینوپاتی‌ها)

بعد از آلزایمر، پارکینسون شایع‌ترین اختلال عصبی محسوب می‌شود که نه دلیل کاملا واضحی دارد و نه درمان قطعی برای آن وجود دارد. تجمع آلفاسینوکلئین در مغز، مهم‌ترین عامل در بیماری‌های سینوکلئینوپاتی‌ها و دیگر بیماری‌های مرتبط با زوال عقل همانند پارکینسون محسوب می‌شود. در واقع در این بیماری‌ها، پروتئین‌های سینوکلئین به هم می‌چسبند و توده‌هایی به نام اجسام لویی[10] تشکیل می‌دهند که این توده‌ها سبب اختلال در کارکرد سلول‌های عصبی و در نهایت

[10] Lewy bodies

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]
[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

مـرگ آن‌هـا می‌شـوند. عملکـرد اصلـی ایـن پروتئیـن بـه طـور دقیـق مشـخص نیسـت؛ امـا فرضیـات بـر ایـن اسـاس اسـت کـه در انتقـال پیام‌هـای سیناپسـی، بسـته‌بندی و انتقـال وزیکول‌هـای سیناپسـی نقـش دارد. آلفـا سـینوکلئین یـا بـه اختصـار aSyn حـاوی ۱۴۰ آمینواسـید در سـه دومیـن پروتئینـی اسـت: دومیـن N -ترمینـال کـه جهش‌هـای مختلفـی کـه سـبب ایجـاد انـواع پارکینسـون می‌شـوند در ایـن بخـش قـرار دارنـد، بخـش مرکـزی آب‌گریـز کـه در تجمـع و تشـکیل تـوده نقـش مهمـی دارد و در نهایـت دومیـن C -ترمینـال کـه ناحیـهٔ اسـیدی پروتئیـن اسـت و در تشـکیل شـکل‌گیری فیبـری پروتئیـن نقـش دارد. مطالعـات نشـان می‌دهنـد کـه عامـل مهـم در تجمـع ایـن پروتئین‌هـا، پروتئینـی بـه نـام پروپیـل اولیگوپپتیـداز می‌باشـد. پروپیـل اولیگوپپتیـداز یـک پروتئیـن ۸۰ کیلودالتونـی بـا فعالیـت سـرین پروتئـازی اسـت کـه در مغـز و دیگـر بافت‌هـای بـدن وجـود دارد. در مطالعـه‌ای کـه به‌منظـور درک نحـوهٔ تأثیـر پروپیـل اولیگوپپتیـداز در تجمـع آلفاسـینوکلئین‌ها در سـلول‌های عصبـی N2A مـوش انجـام شـد، میان‌کنـش پروپیـل اولیگوپپتیـداز فعـال بـا نـام اختصـاری (PREP) و پروپیـل اولیگوپپتیـداز موتانـت (غیرفعـال) بـا نـام اختصـاری (PREPS554A) بـا روش ترموفـورز مـورد مطالعـه قـرار گرفـت. در ایـن آزمایـش تیتراسـیون مقـدار معینـی از پروپیل اولیگوپپتیـداز فعـال PREP و غیرفعـال (PREPS554A) کـه بـا رنـگ فلورسـانس NT-647 برچسـب‌دار شـده بودنـد بـا غلظت‌هـای مختلفـی از آلفاسـینوکلئین فاقـد برچسـب انجـام شـد. نتایـج حاصـل نشـان دادنـد کـه آلفـا سـینوکلیئن بـا ثابت‌هـای تعـادل ۲/۹۶ میکرومـولار و ۱/۴۱ میکرومـولار بـه ترتیـب بـه پروپیـل اولیگوپپتداز فعـال و پروپیـل اولیگوپپتیداز غیرفعـال متصـل می‌شـود. بـه عبارتـی آلفاسـینوکلئین بـا تمایـل بیشـتری بـه پروپیـل اولیگوپپتیـداز متصـل می‌شـود. بنابرایـن می‌تـوان بـا طراحـی مولکولـی کـه بتوانـد عملکـرد پروتئیـن پروپیـل اولیگوپپتیـداز را مهـار کنـد، از تجمـع آلفـا سـینوکلئین‌ها و در نتیجـه پیشـروی بیمـاری پارکینسـون جلوگیـری کـرد (۲۰).

مطالعـهٔ خصوصیـات بیوفیزیکـی آلفاسـینوکلئین‌ها بـا اسـتفاده از ترموفـورز

در مطالعـهٔ دیگـری به‌منظـور مطالعـهٔ خصوصیـات بیوفیزیکـی مولکول‌هـای آلفاسـینوکلئین، از روش ترموفـورز اسـتفاده شـد. در ایـن مطالعـه بـرای بررسـی تأثیـر انـدازهٔ ایـن مولکـول بـر خصوصیـات ترموفـورزی آن، سـه مـدل آلفاسـینوکلئین مونومـری، اولیگومـری و فیبـری در محلـول بافـری یـک میلی‌مـولار تریـس و PH=۷/۴ مـورد مطالعـه قـرار گرفتنـد. نتایـج نشـان داد کـه بـا افزایـش انـدازهٔ آلفاسـینوکلئین بـا توجـه بـه سـاختار، ضریـب سـورت نیـز افزایـش می‌یابـد. مـوردی کـه در ایـن آزمایـش نسـبت بـه وابسـتگی ضریـب سـورت بـه انـدازه جالـب توجـه بـود، ضریـب نفـوذ حرارتـی مولکول‌هـا بـود. بـه عبارتـی عـلاوه بـر ضریـب سـورت، ضریـب نفـوذ حرارتـی نیـز بـر اسـاس انـدازه و سـاختار ایـن مولکول‌هـا خصوصـاً بـرای سـاختار فیبریـل آلفاسـینوکلئین متفـاوت اسـت.

همچنیـن در مطالعاتـی کـه بـر رفتـار اتصالـی آن‌هـا بـه مولکول‌هـای مختلـف انجـام شـد، مشـخص شـد کـه نسـبت مولکـول برچسـب‌دار بـه بـدون برچسـب نیـز می‌توانـد پارامترهـای تجربـی را تحـت تأثیـر قـرار دهـد. خصوصـاً در مـورد ترکیباتـی مثـل اپی‌گالوکاتچیـن‌گالات یـا بـه اختصـار EGCG کـه می‌تواننـد شـدت فلورسـانس رنـگ را تحـت تأثیـر قـرار دهنـد. اپی‌گالوکاتچیـن‌گالات ترکیـب بـا فرمـول شـیمیایی $C_{22}H_{18}O_{11}$ و محلـول در آب اسـت کـه خاصیـت ضدسـرطانی خصوصـاً در ارتبـاط بـا تومورهـای مغـزی را دارد. در بررسـی میان‌کنـش ایـن مولکـول بـا آلفاسـینوکلئین، مشـخص شـد کـه اگـر نسـبت مولکـول برچسـب‌دار بـه مولکـول بـدون برچسـب، بیـش از حـد بـالا باشـد، خـواص سـطحی و نحـوهٔ پیوسـتگی توده‌هـای α-سـینوکلئین بـه طـور قابـل توجهـی در مقایسـه بـا یـک سـاختار کامـلاً بـدون برچسـب قابـل تغییـر اسـت. مطالعـات نشـان داد کـه در نسـبت بهینـهٔ ۰/۰۲ الـی ۰/۰۳ ثابـت اتصـال EGCE بـه فیبریل‌هـای آمیلوئیـد آلفاسـینوکلئین و اولیگومرهـای آن بـه ترتیـب برابـر ۲/۵±۰/۴ میکرومـولار و ۴/۳±۰/۸ میکرومـولار اسـت. تمایـل اتصـال فیبریل‌هـا در ایـن آزمایـش در قیـاس بـا شـرایطی کـه قـدرت یونـی محلـول بـالا بـود حـدوداً یـک واحـد کمتـر اسـت. در حالـی کـه تمایـل EGCE بـه اولیگومرهـا بیـش از ایـن مشـخص نشـده بـود. چنیـن تغییراتـی در ثابـت اتصـال بـر روی خصوصیـات ترموفـورزی مولکـول تأثیرگذارنـد. بنابرایـن می‌تـوان بـا انجـام ایـن آزمایشـات بـه ایـن تغییـرات پـی بـرد. نتایـج ایـن مطالعـه نشـان داد کـه گونه‌هـای یـک مولکـول کـه دارای خصوصیـات الکتروفـورزی مشـابه هسـتند می‌تواننـد از نظـر خصوصیـات ترموفـورزی بسـیار متفـاوت باشـند و می‌تـوان از ایـن روش بـرای مطالعـهٔ دقیـق خصوصیـات منحصـر بـه فـرد زیسـتی، فیزیکـی و شـیمیایی و همچنیـن رفتـار تعاملـی آن‌هـا در محیط‌هـای مختلـف اسـتفاده کـرد (۲۱).

اسـتفاده از ترموفـورز بـرای توسـعهٔ آنتی‌بادی‌هـای منوکلونـال در درمـان تومورهـای سیسـتم عصبـی

محیـط اطـراف تومورهـا به‌شـدت سـرکوب‌کنندهٔ سیسـتم ایمنـی اسـت و بـه طـور موضعـی پاسـخ‌های ضـد تومـوری لنفوسـیت‌های T را کـه از نفـوذ و گسـترش تومـور جلوگیـری می‌کننـد را تنظیـم می‌کنـد. بـه طـور کلـی لنفوسـیت‌های T به‌منظـور منـع گسـترش تومـور مولکول‌هایـی بـه نـام PD-1 را بیـان می‌کننـد و تومـور نیـز در مقابـل ایـن مولکـول لیگانـد PD-1 یـا بـه اختصـار PD-L1 و PD-L2 را بیـان می‌کننـد و بـه ایـن ترتیـب عملکـرد سیسـتم ایمنـی را خنثـی می‌کننـد. مطالعـات نشـان داده کـه می‌تـوان بـا مسـدود کـردن میان‌کنـش PD-1 و لیگاندهـای آن بـا اسـتفاده از آنتی‌بادی‌هـای منوکلونـال یـا anti-PD-1 و یـا anti-PD-L1، از خنثی‌سـازی عملکـرد سیسـتم ایمنـی در مقابـل انـواع تومورهـا جلوگیـری بـه عمـل آورد. بـرای ایـن

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

منظور، در پژوهشی میان‌کنش PD-1-eGFP و PD-L1-eGFP بیان شده در سلول‌های CHO-K1 برای تعیین تمایل کمپلکس‌های ایجاد شده از PD-1 و لیگاند آن PD-L1 در محیط تومور به روش ترموفورز مورد مطالعه قرار گرفت. PD-1 یک گلیکوپروتئین غشایی نوع I است که از ۲۸۸ اسیدآمینه تشکیل شده است. این پروتئین بر سطح سلول‌های CD4+، سلول‌های CD8+، سلول‌های B، سلول‌های T محیطی و سلول‌های عصبی بیان می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که روش ترموفورز روشی بسیار دقیق و ارزشمند برای مطالعهٔ مسیر PD-1 / PD-L1 و همچنین توسعهٔ مسدودکننده‌های این مسیر است. همچنین مشخص شد که می‌توان از پروتئین‌های تخلیص نشده برای مطالعهٔ میان‌کنش انواع مولکول‌ها در روش ترموفورز استفاده کرد (۲۲).

بررسی خصوصیات استوکیومتری واکنش‌های زیستی

پروتئینی به نام EcoSSB یکی از پروتئین‌هایی است که در همانندسازی DNA نقش کلیدی را ایفاء می‌کند. این پروتئین تترامری است که به تک رشته‌های الیگونوکلئوتیدی متصل می‌شود. به‌منظور آشنایی با کاربرد روش ترموفورز در مطالعهٔ خصوصیات استوکیومتری واکنش‌ها، میان‌کنش این پروتئین را با الیگونوکلئوتیدی که حاوی ۳۵ نوکلئوتید است بررسی می‌کنیم (نمودار ۳). در این مطالعه الیگو نوکلئوتید با Cy5 نشان‌دار شده است. ۳۰ نانومولار از این مولکول برای تیتر کردن ۴۰ نانومولار از پروتئین EcoSSB استفاده می‌شود. نمودار حاصل نشان می‌دهد که با افزایش غلظت EcoSS تا ۱۵ نانومولار سیگنال ترموفورز نیز افزایش می‌یابد. سپس تا غلظت ۳۰ نانومولار EcoSSB سیگنال ترموفورز کاهش می‌یابد. این حالت از نمودار نشان می‌دهد که در غلظت ۱۵ نانومولار، هر پروتئین EcoSSB با دو مولکول Cy5-oligo (dT) 35 اشباع می‌شود، یعنی رابطهٔ استوکیومتری ۲: ۱ می‌باشد. اضافه کردن EcoSSB بیش از غلظت ۱۵ نانومولار موجب کاهش جایگاه‌های اشغالی می‌شود، تا اینکه در غلظت ۳۰ نانومولار هر مولکول EcoSSB با یک مولکول Cy5-oligo (dT) 35 اشغال می‌شود (۲۳).

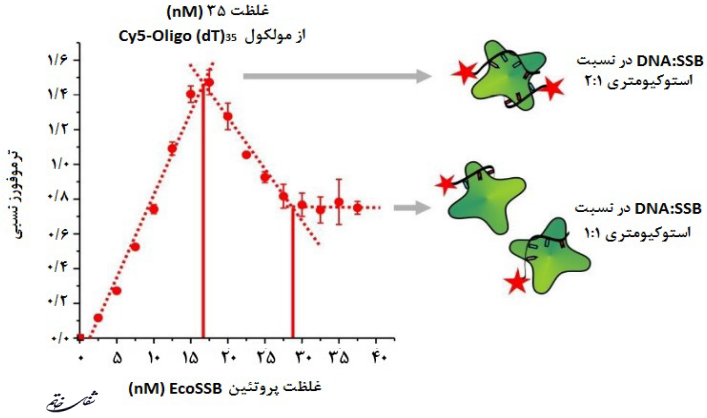
مطالعهٔ سینتیک آنزیم‌ها

ترموفورز روشی ساده و کارآمد برای اندازه‌گیری سینتیک واکنش‌ها نیز محسوب می‌شود (۲۴). با این روش می‌توان سرعت تغییر سوبسترا، اتصال رقابتی مهارکننده‌ها، شرایط بافر یا اثر عوامل دیگری که در سرعت واکنش تأثیر دارند را بررسی کرد.

برای بررسی کاربرد این روش در اندازه‌گیری سینتیک آنزیم‌ها مطالعه‌ای که بر روی آنزیم DNase I انجام شد مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مطالعه دو راه مختلف برای انجام آزمایش اجرا شد. در راه اول فعالیت نوکلئاز را مستقیماً در یک لولهٔ موئینه در سه مرحلهٔ زمانی (مرحلهٔ اول لیزر فروسرخ خاموش بود، مرحلهٔ دوم لیزر روشن و در مرحلهٔ سوم لیزر مجدد خاموش شد) اندازه‌گیری گردید. در راه دوم واکنش را در دوره‌های مختلف انکوباسیون متوقف کرده و سپس در هر دوره آزمایش MST انجام شد. شواهد به دست آمده از هر دو آزمایش تغییرات ترموفورزی وابسته به زمان که دال بر فعالیت اندونوکلئازی DNase I است را نشان داد. با انجام این دو روش و مقایسهٔ نتایج، اثبات شد که از روش ترموفورز علاوه بر استفاده در تعیین و تشخیص تعاملات مولکولی، در مطالعهٔ سینتیک آنزیم‌ها نیز استفاده گردد (۲۵).

مطالعهٔ ساختار پروتئین‌ها (تاخوردگی پر و تئین ها)

از کاربردهای دیگر ترموفورز علاوه بر تعیین و شناسایی تعاملات مولکولی می‌توان به شناسایی و تشخیص خصوصیات تاخوردگی پروتئین‌ها اشاره کرد. نحوهٔ دناتوراسیون پروتئین‌ها در تشخیص استحکام و ساختار تاخوردگی آن‌ها بسیار مهم است. تحلیل فرایند تاخوردگی و دناتوراسیون پروتئین‌ها در طراحی ساختار بهینه و مناسب جهت درمان بیماری‌های گوناگون از جمله بیماری‌هایی که با تاخوردگی غلط پروتئین‌ها در



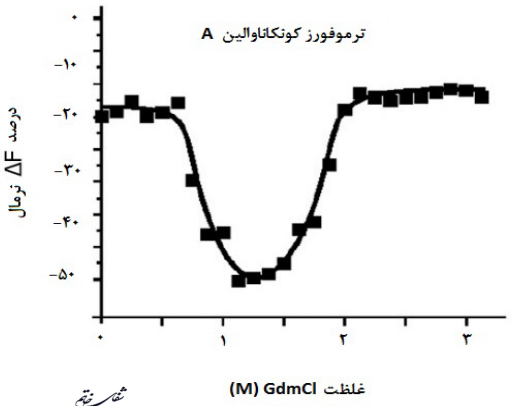
نمودار ۳- بررسی خصوصیات استوکیومتری میان‌کنش پروتئین BSSocE با الیگونوکلئوتید به وسیلهٔ روش ترموفورز.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]
[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

ارتباط است بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

روش ترموفورز یکی از روش‌های مناسب جهت شناسایی فرایند تاخوردگی پیچیدهٔ بسیاری از پروتئین‌ها می‌باشد و حتی با استفاده از این روش می‌توان واسطه‌های ساختاری مختلفی که از تاخوردگی غلط به دست می‌آیند را شناسایی و بررسی کرد.

به این منظور به مطالعه‌ای که در رابطه با تغییرات خصوصیات ترموفورزی کونکاناوالین A بر اثر غلظت GdmCl انجام شده است اشاره می‌کنیم. کونکاناوالین A متعلق به خانواده‌ای از پروتئین‌ها به نام لکتین است که کاربردهای زیستی مختلفی دارد. برای مثال برای شناسایی سلول‌های سالم و سرطانی کاربرد دارد، در مطالعهٔ گلیکولاسیون سلول‌ها و همچنین تهیهٔ اولیگوساکاریدها و گلیکوپپتیدها در آزمایشگاه با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی کاربرد دارد. در مطالعات پیشین مشخص شده که فرایند دناتوراسیون این پروتئین در سه مرحله انجام می‌شود. مطابق نمودار ۴ دناتوراسیون القا شدهٔ این پروتئین توسط GdmCl نمودار ترموفورزی دو حالت گذار در محدودهٔ ۰/۸ و ۱/۸ مولار از غلظت GdmCl نشان می‌دهد. در غلظت ۱ الی ۱/۶ مولار GdmCl یک واسطهٔ ساختاری پایداری تشکیل می‌شود که ترموفورز آن از حالت کاملاً تاخورده و کاملاً دناتوره شده کونکاناوالین A بیشتر است. همان‌طور که این مطالعه نشان می‌دهد، با توجه به مصرف کم نمونه و زمان اندازه‌گیری کوتاه، MST به‌عنوان یک جایگزین جالب توجه برای تجزیه و تحلیل فرایند دناتوراسیون کمپلکس‌های پروتئینی می‌باشد (۲۵).



نمودار ۴- مطالعهٔ تاخوردگی و دناتوراسیون پروتئین‌ها به وسیلهٔ ترموفورز.

نتیجه‌گیری

در این مقاله با استناد بر مطالعاتی که با استفاده از روش ترموفورز انجام شده بود سعی کردیم این روش را معرفی کرده و به مزایا و کاربردهای مختلف آن اشاره کنیم. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که این روش گسترهٔ کاربرد فراوانی دارد. با استفاده از این روش می‌توان رفتار درشت مولکول‌های زیستی، پلیمرها و حتی مولکول‌های کوچک را در محلول‌های مختلف مورد مطالعه قرار داد. شرایطی که در این روش برای مطالعهٔ مولکول‌ها فراهم می‌شود به محیط طبیعی و بدن موجودات زنده بسیار نزدیک است. از طرفی مقدار نمونهٔ مورد نیاز برای آزمایش بسیار ناچیز و بدون نیاز به تخلیص پروتئین است، همچنین پارامترهای اتصال قابل اندازه‌گیری و تعیین می‌باشند. بنابراین با این روش، جزئی‌ترین تغییراتی که در مولکول در حین واکنش صورت می‌گیرد در زمان کوتاه و با هزینهٔ کمتر تعیین می‌گردد. از این رو، در مطالعات دارویی و درمانی خصوصاً در آسیب‌های عصبی می‌تواند بسیار کاربردی باشد.

منابع

1. Fekri R, Salehi M, Asadi A, Kubicki M. Spectroscopic studies, structural characterization and electrochemical studies of two cobalt (III) complexes with tridentate hydrazone Schiff base ligands: Evaluation of antibacterial activities, DNA-binding, BSA interaction and molecular docking. Applied Organometallic Chemistry. 2018; 32(2): e4019.

2. Miri V, Asadi A, Mansourizadeh F, Sagha M, Ghasem Golmohammadi M. Fabrication and evaluation of the morphology, biodegradability, and chemical characteristics of the nano-fibrous scaffold poly-l-lactic-acid (plla) and its application in neural tissue engineering. Journal of Urmia University of Medical Sciences. 2015; 25(11): 988-97.

3. Seidel SA, Wienken CJ, Geissler S, Jerabek-Willemsen M, Duhr S, Reiter A, et al. Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein–ligand binding. Angew Chem Int Ed Engl. 2012; 51(42): 10656-9.

4. Bao J, Krylova SM, Wilson DJ, Reinstein O, Johnson PE, Krylov SN. Kinetic capillary electrophoresis with mass-spectrometry detection (kce-ms) facilitates label-free solution-based kinetic analysis of protein–small molecule binding. Chembiochem. 2011; 12(17): 2551-4.

5. Breitsprecher D, Schlinck N, Witte D, Duhr S, Baaske P, Schubert T. Aptamer binding studies using microscale thermophoresis. Methods Mol Biol. 2016; 1380: 99-111.

6. Piazza R. Thermophoresis: moving particles with thermal gradients. Soft Matter. 2008; 4(9): 1740-4

7. Entzian C, Schubert T. Studying small molecule–aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). Methods. 2016; 97: 27-34.

8. Duhr S, Braun D. Why molecules move along a

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]

temperature gradient. PNAS. 2006; 103(52): 19678-82.

9. Seidel SA, Dijkman PM, Lea WA, van den Bogaart G, Jerabek-Willemsen M, Lazic A, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. Methods. 2013; 59(3): 301-15.

10. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. Nat Commun. 2010; 1: 100. doi: 10.1038/ncomms1093.

11. Xiong X, Coombs PJ, Martin SR, Liu J, Xiao H, McCauley JW, et al. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. Nature. 2013; 497(7449): 392-6.

12. van den Bogaart G, Meyenberg K, Diederichsen U, Jahn R. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate increases Ca2+ affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold. J Biol Chem. 2012; 287(20): 16447-53.

13. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. Assay Drug Dev Technol. 2011; 9(4): 342-53.

14. Mao Y, Yu L, Yang R, Qu L-b, Harrington PdB. A novel method for the study of molecular interaction by using microscale thermophoresis. Talanta. 2015; 132: 894-901.

15. Asmari M, Ratih R, Alhazmi HA, El Deeb S. Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction. Methods. 2018; 146: 107-19.

16. Bartoschik T, Maschberger M, Feoli A, André T, Baaske P, Duhr S, et al. Microscale thermophoresis in drug discovery. Applied Biophysics for Drug Discovery. 2017: p. 73-99.

17. Asadollahi E, Asadi A, Najafi F, Zahri S, Nasr SMH. Biological properties of pegylated PLA (PLA-PEG-PLA) and its capability for intracellular delivery of poor soluble peptide drug, gramicidin. International Journal of Drug Delivery. 2012; 4(2): 257-65.

18. Van Den Bogaart G, Thutupalli S, Risselada JH, Meyenberg K, Holt M, Riedel D, et al. Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation. Nat Struct Mol Biol. 2011; 18(7): 805-12.

19. Pobbati AV, Stein A, Fasshauer D. N-to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. Science. 2006; 313(5787): 673-6.

20. Savolainen MH, Yan X, Myöhänen TT, Huttunen HJ. Prolyl oligopeptidase enhances α-synuclein dimerization via direct protein-protein interaction. J Biol Chem. 2015; 290(8): 5117-26.

21. Wolff M, Mittag JJ, Herling TW, De Genst E, Dobson CM, Knowles TP, et al. Quantitative thermophoretic study of disease-related protein aggregates. Scientific Reports. 2016; 6: 22829.

22. Magnez R, Thiroux B, Taront S, Segaoula Z, Quesnel B, Thuru X. PD-1/PD-L1 binding studies using microscale thermophoresis. Scientific Reports. 2017; 7(1): 17623.

23. NT020 AN, Breitsprecher D. Protein-DNA interaction analysis, dissection of complex interaction mechanisms by binding mode dependent thermophoresis signals – ssDNA binding to EcoSSB. NanoTemper Technologies.

24. Topf A, Franz P, Tsiavaliaris G. MicroScale thermophoresis (MST) for studying actin polymerization kinetics. Biotechniques. 2017; 63(4): 187-90.

25. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, et al. MicroScale thermophoresis: interaction analysis and beyond. J Mol Struct. 2014; 1077: 101-13.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2024-12-22]

[DOI: 10.29252/shefa.7.3.91]