

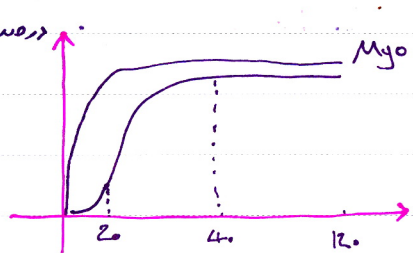
Hemoglobin: در وسط آن Fe وجود دارد که می تواند با O و H_2S دهد. **حلقه چهارم**

Myoglobin: نوع تک زنجیره هموگلوبین است. می تواند به واسطه پیوند سیمایی که با حلقه **Hem** دارد می تواند با O اتصال برقرار کند و ظرفیت Fe را تغییر دهد و برای به هم لگش با O به کار می رود.

هموگلوبین در **RBC** ها دیده می شود اما میوگلوبین در عضلات و بافت ها دیده می شود.

شباهت: هموگلوبین هم مثل میوگلوبین حلقه **Hem** دارد. ما در هموگلوبین **4** حلقه **Hem** داریم که به معنای **4** زنجیره است که براندر به هم لگش این **4** زنجیره یک نوع عملکردی را فراهم می کند که **2** به **2** این زنجیره ها با هم شباهت دارند (**2 α** , **2 β**)

خطی که از درصد اشباع می شود منظور همجیت آماری می باشد. هموگلوبین در خون **4** و خون وظیفه O رساندن دارد، چون هموگلوبین در خون زیاد است وظیفه دارد که هر لحظه در هر شرایطی بتواند با O اتصال برقرار کند و آنرا با خود حمل کند و اتصال خود را باز کند و O را به بافتها بدهد.



پس وظیفه $\circ$ رسانایی به بافت با همولوئین است. پس همولوئین باید بتواند به اندازه کافی به فشار $\circ$ بافتها احساس باشد پس همولوئین باید هفتای له فشار $\circ$ کم شد متوجه شود $\circ$ متصل به خود را آزاد کند و به بافت برساند پس وظیفه انتقال $\circ$ با همولوئین است.

میولوئین ادوات کلی است که می توان تحت فشار مناسب با $\circ$ انتقال برقرارند و تا زمانی که تحت همان فشار است می تواند را نگه دارد. پس ماهیچه تا یک بازه زمانی محدود است ذخیره در بین داریم.

میولوئین در فشارهای کمتر از همولوئین به $\circ$ تحلیج دارد و از $\circ$ اسباع می شود. مثلاً می توان گفت در فشار $\circ$ 3 هم میولوئین ها از $\circ$ اسباع اند. (همولوئین به میولوئین $\circ$ می رساند) یکی از زمان هایی که میولوئین به یک همولوئین می آید جایی است که خون ریزی شدید باشد که میولوئین روی طاری آید و جایگزین همولوئین می شود. همولوئین تا یک فشاری تحلیج ندارد

با $\circ$ اسباع شود اما میولوئین از $\circ$ ن اول باید سبب سیریه $\circ$ را می گیرد و اسباع می شود. در فضای ریه چون $\circ$ fresh air زیاد است فشار $\circ$ بالایی باشد پس از قلب و ریه خون منقبض شده و فشار آن کمتر و کمتری شود. مالکسم فشار بین در ریه است

بافت ها چون طاری شد فشار $\circ$ آنها کمتر از ریه است پس همولوئین باید بتواند از منطقه پر فشار $\circ$ به منطقه کم فشار برسد و به فشار معین که رسید $\circ$ را رها کند و از فشار $\circ$ 2 به پایین اصلاحی خواهد $\circ$ را برای خود نگه دارد به همین علت منقبض همولوئین

سلولی است. در همولوئین رفتار تعاونی یا $\circ$ co-operation قابل مشاهده است. 4 حلقه $\circ$ Hem به صورتی است که به راحتی قابل دسترس نیست پس فشار باید زیاد باشد تا $\circ$ بتواند به $\circ$ Hem برسد. ساختار چهارم $\circ$ Hem حاوی تواردونه اند

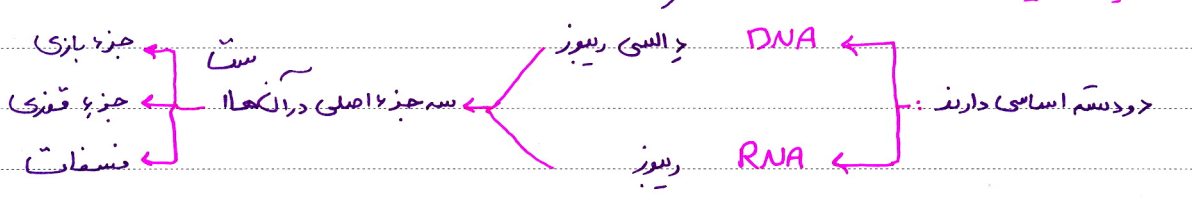
در معرفن دیر نشین پس $\circ$ option باید زیاد باشد تا $\circ$ بتواند نفوذ کند. حال به محض نفوذ $\circ$ ، ظرفیت $\circ$ Fe تغییر می کند پس کل ساختار همولوئین تغییر می کند یعنی جهت گیری $\circ$ تغییر می اید

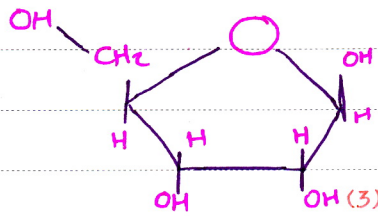
و از آن به بعد $\circ$ را اختوبه می رسد و اسباع می شود در میولوئین یک $\circ$ Hem وجود دارد که خیلی دور نیست و به محض دیدن اسباع می شود.

T-structure: اول همولوئین است که همه پیوندها در آن سخت است.

R-structure: ساختاری که $\circ$ می تواند با آن شود و انتقال برقرارند.

تولید اسیرها:

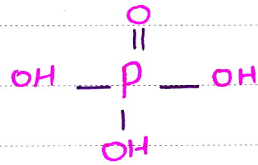




- حنجره بازی می تواند یک حلقه ای یا دو حلقه ای باشد. اگر دو حلقه ای باشد **پورین** و اگر یک حلقه ای باشد **پیریمیدین** به آن می گویند.

- قند یا دی اسکریبوز و یا ریبوز می باشد. هر چینی که پیوند **ose** داشته قند است. **OH(3)** می تواند تغییر دهنده **H** تبدیل شود. هنگامی که **OH** به **H** تبدیل شود **O** از دست داده (وقتی از سرانجام خارج شود و یا چینی از دست دهنده دی به آن اضافه می کنیم) پس چون **O** از دست داده دی اسکریبوز می باشد.

پس تفاوت **DNA** و **RNA** در تفاوت قندهای آن می باشد و این ها می توانند به صورت مستقیم به یک نرود ضعیف متصل شوند.



- **DNA** و **RNA** در قندها و بازهای نیتروژنی تفاوت دارند. واحدهای سازنده می توانند با توانی ها متفاوتی با هم اتصال برقرار کنند. در **DNA** دوز پیچیده ای است می توانند **2** زنجیره اتصال برقرار کنند. باز  ضعیف

- هر دو باز دلفواه نمی توانند مقابل هم قرار بگیرند و این قابلیت تنها برای بازهای خاصی وجود دارد.

★ در **DNA** فقط **A** با **T** و **C** با **G** می تواند اتصال برقرار کند.

★ در **RNA** فقط **A** با **U** و **C** با **G** می تواند اتصال برقرار کند.

← احتمالاً بار **DNA** و **RNA** منفی است چون دارای نرود ضعیفی هستند.

فقط **DNA**
تیمین
دی اسکریبوز

DNA, RNA
سایتوزین، گوانین، آدنین
نرود ضعیفات

فقط **RNA**
یوراسیل
قند و ضعیفات: ریبوز

تألف در مورد روش ساخت **FTIR** صحبت شد. آنون در مورد روش ساخت دیتی به نام **chromatography** صحبت

کنیم:

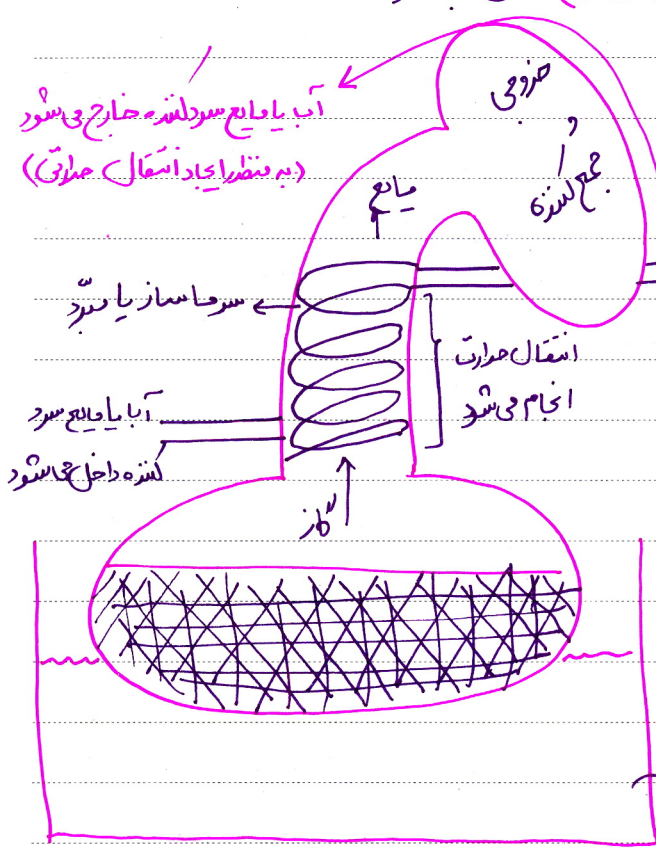
chromatography: جداسازی مواد بر اساس ویژگی های متفاوت اجزاء و مواد. این روش طی اندک اختلاف های مختلف با ویژگی های فانی افتا نشان جداسازی کنیم.

← **سیمای**: بر اساس اینکه چه نوع اسید آمینه ای به کار رفته و **pH** چقدر است، پروتئین می تواند بارها

متفاوت داشته باشد. این بارها در گروه های عاملی می آید ← **Functional groups** و در همین اساس پروتئین و آنش های **Reactivity** های متفاوتی از خود نشان می دهند.

← **فیزیکی**: وزن مولی، **macular**، دمای جوش **Boiling point**، دمای انجماد **freezing point**

، انفعال پذیری، **Solubility** ← اساس جداسازی



در این روش مایع را درون مخزن ریخته و به آن حرارت می دهیم. چیزی که به نقطه جوش خود می رسد، شروع به بخیر شدن می کند. و از لوله بالا می رود که در انتهای آن جمع کننده است. در لوله میبرد و وجود دارد که از لوله میبرد آب یا سرد کننده دارد. مایع می شود و از سرد کننده خارج می شود و این باعث می شود تا ماده ای که بخیر شده سرد شود و به صورت مایع در جمع کننده جمع شود. این روش به طور مثال متوجه می شویم که مایع $\frac{1}{3}$ جبرش را از دست داده و اتفاقات بالابرای رخ می دهد. یعنی $\frac{1}{3}$ و $\frac{2}{3}$ مایع از دست می افتد. متفاوت اند و چقدر است که از هر کدام جدا شود **FTIR** داریم.

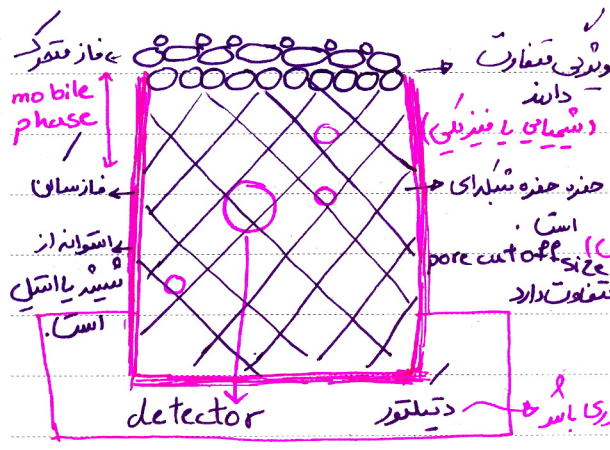
حرارت می دهیم

برج تقطیر

انواع کروماتوگرافی

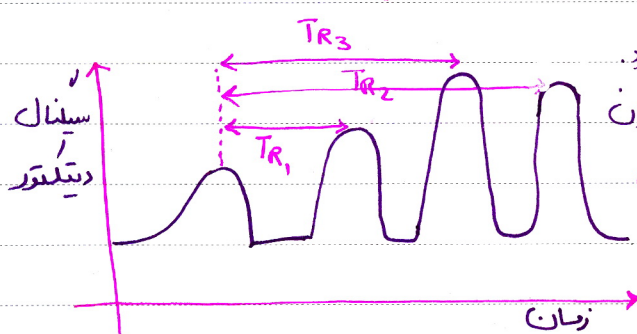
A - کروماتوگرافی ستونی column chromatography

در این روش ستون یا محفظه‌ای داریم که داخل آن را از ازل یا پلیمرهایی از جنس خالص و با ویژگی معین پر کردیم (شبه‌بازل خالص) یا پلیمرهایی از جنس خالص و با ویژگی معین پر کردیم (اصولاً پلیمرها).
 حلال قلوئی ناشناخته را درون استوانه می‌ریزیم. (معمولاً آب یا محلول نمک).
 سایرهای متفاوت اند. معینی از اسیدها، نمک‌های مختلف، شکر، نشاسته،
 معنی جدا کردن و بار متفاوت دارند.



در این روش یک فاز ثابت داریم که ستون است و یک فاز متحرک داریم که همان حلال ناشناخته است. به این فاز متحرک **mobile phase** می‌گویند. از این جا با خلوط ناشناخته را به سامانه معرفی می‌کنیم و به آن زمان می‌دهیم تا مواد خلوط داخل استوانه شود. پس شبه‌هایس که ابتدا حرکت کنند. (سبک‌ترین یا سبک‌ترین) می‌توانند در حفره‌ها بمانند و اگر سبک‌ترین باشند از سیستم خارج می‌شوند. این مواد در زمان‌های متفاوتی از سیستم خارج می‌شوند. و ماکول‌های بزرگ‌تر سریع‌تر خارج می‌شوند. بنابراین خروجی این دستگاه بر حسب زمان است.

در خروجی این کروماتوگرافی، **detector** قرار می‌دهند که محرزآوری است و بر اساس زمان، سیگنال **detector** را رسم می‌کنند. همیشه در ارزیابی‌ها استاندارد سازی داریم. به این صورت که ما موادی یا مخلوطی که به کروماتوگرافی معرفی می‌کنیم، در حلالی، حل می‌کنیم و انتظار داریم که ذرات حلال آنقدر کوچک باشند که خیلی راحت از شبه خارج شود (هیچ کدام از حفره‌ها یا شبه‌ها ساکن نمی‌مانند). پس انتظار داریم که سیگنال انتظاری داشته باشیم. پس انتظار داریم که سیگنال اول می‌بینیم حلال باشد. پس یک اول را یک مرجع می‌گیریم.



لحظه اول در کروماتوگرافی حلال (یا یک مرجع) خارج می‌شود. پس از آن بر اساس برهم‌کنش‌هایی که اتفاق می‌افتد می‌توان یک‌های متفاوتی را با سرعت‌های متفاوت **detect** کنیم. یا ماده‌ای که با آن داخل استوانه را پر می‌کنیم متفاوت دارد.

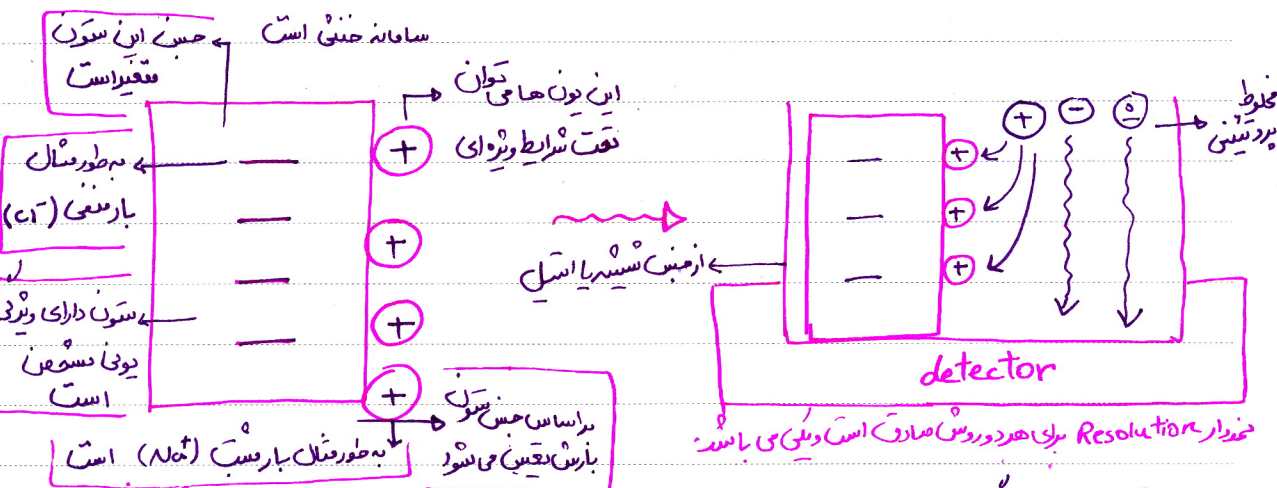
Pore cutoff size

★ آن چمله طریقه‌های جداسازی دارد **HPLC** است.

بر اساس اینکه ما چه فشاری را استفاده می‌کنیم **(low, medium, high)** باید فاز ثابت را انتخاب کنیم. یعنی فاز ثابت بتواند فشار اعمالی را تحمل کند و حالت و جریانی **یابی** خودش تغییر نکند. اگر فشار سبب متلاطم شدن شعله‌ها شود **pore cut off size** فاز ثابت و شعله تغییر می‌کند این **دیده می‌شود** و ما می‌خواهیم یک **الگوی** از پیش تعیین شده و قابل پیش بینی داشته باشیم. بعد از چپ ما می‌توانیم زمانی که مخلوط **خروجی** دارد دست‌ها می‌شود **Mixer** داشته باشیم که هم جلا را با نمونه‌ها خوب ترکیب کند و هم احتمال نمونه‌ها طوطا بد نواخت و یک دست شوند تا اگر دما و توانی تحت عمل دایره قرار گیرد و جداسازی بر اساس ویژگی ذاتی ماده باشد. سعی نه می‌شود رادرون آن می‌بینیم معمولاً از جنس سیلیکون یا استیل است و می‌شود هم می‌تواند قبل از کولکسیل یا سولفونیل و ... باشد.

تولید اسیدها به علت داشتن گروه **آ** بارشان منفی است پس **DNA** و **RNA** احتمالاً بار منفی خواهند داشت.

■ Ion exchange chromatography B → در دما و توانی حالت یا تعویض یونی



در این روش سعی می‌کنیم با ویژگی معین مشخص را درون محفظه‌ی سیلیکون یا استیل می‌بینیم. (سیون) یا بار مخالف جنس ماده است. ما مخلوط پروتئین داریم که هم دارای مثبت، منفی و صفر است. حال مخلوط را در محفظه‌ی ریزیم، بار منفی توسط سیون که بار هم ناممن (منفی) دارد، دفع می‌شود پس یک نیروی دافعه الکتروستاتیکی آنرا جل می‌دهد و سریعتر به سمت خارج هدایت می‌کند. پس انتظاری رود در کروماتوگرافی اولین پیک که بعد از پیک حامل مشاهده می‌شود، مربوط به بارهای منفی باشد.

در این روش داخل محفظه سینه ای یا استیل، ستونی از جنس متغیر وجود دارد که بر اساس جنس، ستون می تواند بار منفی داشته باشد (مثبت، منفی، خنثی). برای این در لحظه اول ستون Reality خیلی برای نشان دهد، این ستون را باید سری بارهای مخالف بار ستون خنثی می کنیم. حال می خواهیم با ستونی که ذاتاً بار منفی دارد، پروتئین ها را منفی کنیم و می دانیم که پروتئین ها به دلیل انواع اسیدهای آمینه هایی که در آن ها به کار رفته می تواند مثبت، منفی و خنثی باشند. اگر چنانچه بار پروتئین با اسید آمینه ای باشد که بارش هم نام با ستون باشد (در این جا بار منفی است) به دلیل رادرفس می کشد. (این ملکول ها بزرگ اند معنی ملکول های حلال پیلایس را زده اند) و با سرعت بیشتری از سامانه خارج می شود. پس اولین پیلایس از پیلایس حلال، مربوط به ملکول هایی با جرم بیشتر و بار هم نام با ستون است. ملکول یا پروتئینی که بار خنثی دارد تمایلی به دفع یا جذب ندارد و بر اساس ویژگی ذاتی خودش حرکت می کند و از سامانه خارج می شوند و پیلایس بعدی مربوط به پروتئین های بدون بار است.

بر اساس الکتروستاتیکی های مختلف که مواد دارند، می تواند جاذبه های مختلفی بهم داشته باشند. درست است که برای الیوم بارها نام نام پیلایس را جنب می کشد اما قدرت این جاذبه می تواند متفاوت باشد (به الکتروستاتیکی سبکی دارد) بار مثبتی که روی ستون برای خنثی کردن آن قرار می گیرد (مثلاً $+Na$) به گونه ای انتخاب می شود که ذره ای با بار نام هم نام با ستون (+) بیاید، جاذبه بیشتری با ستون داشته باشد. حال اگر بار مثبت وارد شده باشد، تمایل دارد تا به جای (مثلاً) با ستون اسفند بماند. به این علت است که ستون را خنثی می کنیم تا کمی تأخیر در خروج یون ها داشته باشیم (با ای و آلش) می توان یک تغییر یا shift زمانی را مشاهده کرد.

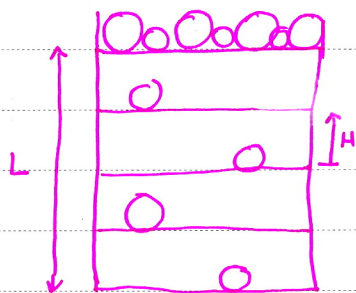
مسئله ای که وجود دارد این است که مواد یا ذرات مثبت با ستون و الیون داده، به نقل می شوند و قطعاً آن ها را شناسایی نکرده است. پس برای حل این مشکل و شناسایی و detect بارهای مثبت، در آخر یک محلول شوینده می زنیم که بار مثبت خیلی قوی تری دارد یا چند بار مثبت دارد و دوباره این ذرات مثبت شوینده با ذرات مثبت پروتئین روی ستون تقویت می شود (Bxchange سیستم می شود) و از سامانه خارج می شود. آخرین پیلایس مربوط به این بارها است. اگر چنانچه به ما اطلاعات ضمنی در مورد پروتئین داده باشند، ما این ستون را بر اساس PI پروتئین ها انتخاب می کنیم. از PI پروتئین ها در اختیار ما باشد، خیلی راحت تر می توانیم جنس ستون را انتخاب کنیم. اگر ما بر اساس PI و بار خالص پروتئین ها جنس ستون را انتخاب کنیم، می توانیم به راحتی خالص سازی را انجام دهیم. موضوع دیگری که در این کورس مطرح است این است که: ساختار را طوری انتخاب کنیم که پایداری سینه ای پروتئین را بر هم نزن. مثلاً پیوند داتی با پروتئین نه چنانکه به هم پیوسته ای بتوان آن ها را جدا کرد.

طایفی داریم که مخلوطی از مابرای جداسازی می دهند آنزیم است. آنزیم **Katalytic Activity** دارد
(طایفی ضروری) یعنی سرعت واکنش را زیاد می کنند در اشباع باقی می ماند. پس آنزیم برای ما مهم است پس از خالص سازی هم آنزیم باقی بماند. **(چیزی به آنزیم نباید اضافه یا از آن کم شود تا فعالیتش عوض نشود)** بنابراین **pH** دارای اهمیت بالایی است. **(در این روش)** چون به محض تغییر **pH**، آنزیم فعالیت کاتالیتیک خود را از دست می دهد و **pH** روی ساختار دوم و سوم پروتئینی تأثیری ندارند **(روی پیوندهای هیدروژنی)** و به همین دلیل دارای اهمیت بالایی اند.

کاربرد این روش: ۱. خالص سازی ۲. می توانند این ستون را با ماده ای بیولوژیک مثل **DNA** باردار یا عامل دار کنند و به هم لگن **DNA** و پروتئین را بررسی کنند ← برای بررسی به هم لگن **DNA** و پروتئین به کاری رود. **(همچون پیلک بلور تر بوده معنی به هم لگن محکم تر بوده است)**
 از این کروماتوگرافی تعویض یونی برای ترمین سفتی آب یا حذف یون های مازاد آب هم استفاده می کنند.
 مثلاً برای حذف Ca^{2+} و Mg^{2+} ستونی با بار منفی انتخاب می کنند و با سدیم Na^{+} غنی می کنند و سپس Ca^{2+} و Mg^{2+} که دوبار مثبت دارند با Na^{+} تعویض یا **Exchange** می شوند و سفتی آب رونق می شود.

جلسه ششم

اندازه آنزیم در ستون کروماتوگرافی لایه لایه رول را روی هم بگذاریم و کاری کنیم که مللک ها در طبقات مختلف محبوس به انتساب شوند که از لایه عبور کنند. اگر لایه ای هم استجابی به وجود آورده باشد در لایه های بعدی این استباه جدیدی شود و بایلهای **sharp** تری ما به دست می آوریم. برای آن که بتوانیم پیل **sharp** تری بدست آوریم، به جای این که رول یک دست و یک پاچیه را در استوانه و غار سگانه بزنیم: ① طبقه اول رول می گذاریم و دوم اسلایدهای توانیم ② از آن اندازه حذف ایجاد کنیم. **اندازه های که برای chromatography** انتساب می کنیم ارتفاع ستون **H** باشد و ارتفاع کلی ستون **L** باشد:



$$N = \frac{L}{H}$$

ی
 تعداد لایه ها
 کروماتوگرافی ستونی

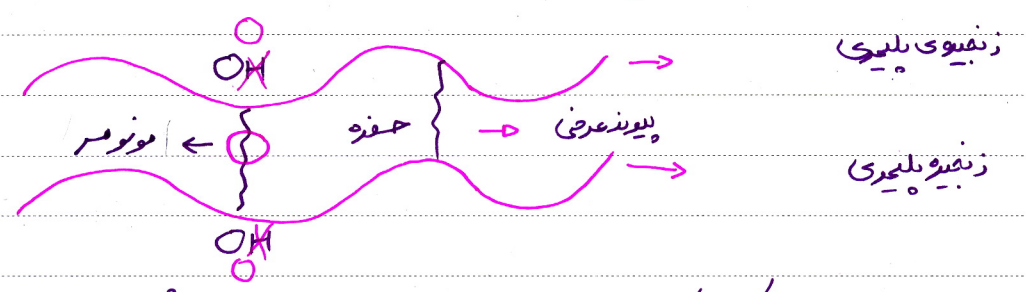
برای اینکه پیل **sharp** تر باشد،
 باید **N** را افزایش دهیم.

cation: انیونهای مثبت یا کاتیون را باید با رزین منفی (مثلاً رزین با سیم) مینمایانند. این رزینها معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند. این رزینها معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند.

Anion: آنیونهای منفی یا آنیون را باید با رزین مثبت (مثلاً رزین با سیم) مینمایانند. این رزینها معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند.

Ion Exchange chromatography

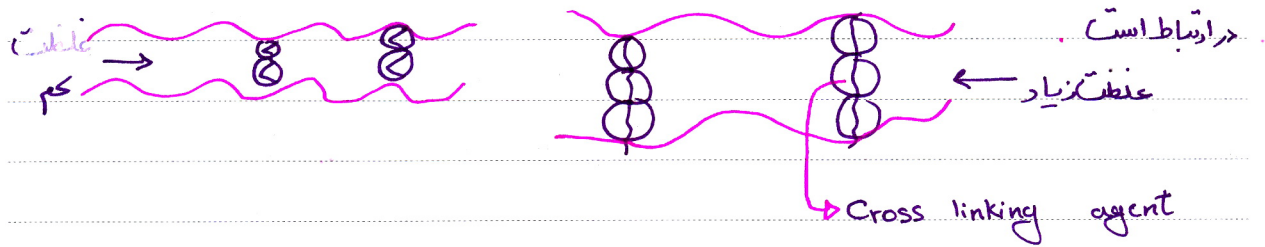
Gel chromatography: در این روش یک ماتریس ژل مانند حفره ها مشهود است. در این ماتریس ژل مانند حفره ها مشهود است.



این رزینها معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند. این رزینها معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند. این رزینها معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند.

cross linking agent: ماده ای که می تواند پیوند عرضی ایجاد کند و سیمها را به هم متصل کند. این ماده می تواند پیوند عرضی ایجاد کند و سیمها را به هم متصل کند. این ماده می تواند پیوند عرضی ایجاد کند و سیمها را به هم متصل کند.

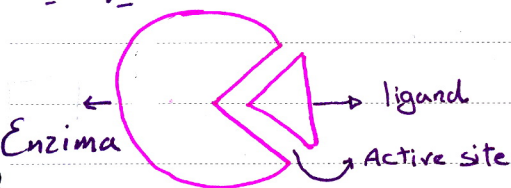
polymerisation: فرآیند تشکیل پلیمر است. این فرآیند معمولاً با سیمهای مثبت (مثلاً سیمهای مثبت) مینمایانند.



برای این که در دو حالتی مسبقاً DNA و پروتئین دلیلی و یا یک آنزیم و یک **Substrate** هم تعامل دارند از **affinity chromatography** استفاده می کنند.

ما انواع مختلفی از پروتئین ها را داریم. پروتئین ها مثل لایون می توانند نقش ساختاری داشته باشند. مثل هورمون نقش انتقال خون را داشته باشند. می توانند حفری یا کردی باشند یا... اما یکی از نقش های که پروتئین ها می تواند به خود بپذیرد نقش آنزیمی است. آنزیم ها به صورت کاملاً اختصاصی عمل می کنند و عملی که آن ها و آنش های طبیعی که در بدن ما اتفاق می افتد. با سرعت بسیار بیشتری انجام می شود و به عبارتی سرعت این واکنش ها را 6 برابر افزایش می دهند. (این به این معنی نیست که واکنش بدون آنزیم انجام نمی شود. بلکه سرعتش در حضور آنزیم 6 برابر افزایش می یابد) آنزیم مستقیماً نام جایگاه فعال یا **Active site** دارد. جایگاه فعال معمولاً شکل مشخصی دارد. دو نقطه وجود دارد:

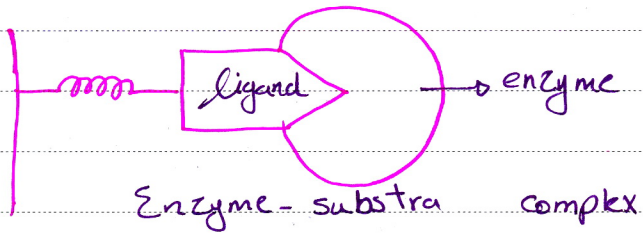
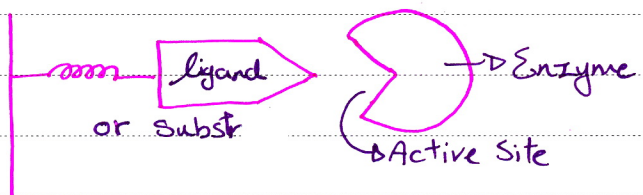
1. سطح جایگاه فعال مشخص است و با لیگاند مثل قفل و کلید عمل می کند. 2. با نزدیک شدن لیگاند به جایگاه فعال آنزیم، کمی شکل جایگاه فعال تغییر می کند و به صورت اختصاصی با هم اتصال برقرار می کنند. ما می توانیم آنزیم های مرتبط داشته باشیم. مثلاً جیست پروتئین باشند، یا لیگ پروتئین باشند که مسئول از آن فلز باشند یا نوکلئیک اسید یا... باشد اما **Base** آنزیم پروتئینی است. **Active site** تعابیری



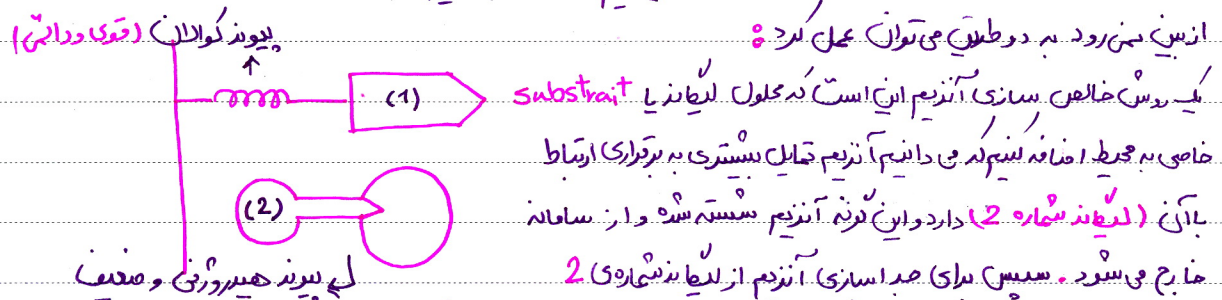
مغالت دستهای از لیگاند های خاص مناسب است. برای بررسی نوع آنزیم ناشناخته باید به روش زیر عمل کرد:

Affinity chromatography: در این روش مسیری داریم که لیگاند هایی که برای ما شناخته شده است را قرار می دهیم (به صورت لوله ای که پیوند ضعیفی نسبت اتصال برقرار می کنیم). در واقع ماترین را در این روش اصلاح سطحی می کنیم و مولکول را که لیگاند یا **Substrate** جدا نمی دهد می تواند با آنزیم اتصال برقرار کند به صورت اتصال دائمی یا کوتاه به ماترین **Bond** می کنیم (دقیقاً می کنیم) ما می توانیم ببینیم آنزیم ناشناخته به چه لیگاندی تمایل و اتصال برقرار می کند. (هدف)

حاصل به این بستر، محلول آنزیم را معرفی می کنیم. این جابجاییه فعال آنزیم مشابه صنعت **Reactive** لیگاند باشد، احتمال برقراری اتصال وجود دارد. این اتصال برقرار شد و آنزیم به لیگاند تمایل نشان داد، کپی لکس آنزیم - سابسیت استیل می شود.



آنزیم هایی که با لیگاند واکنش نمی دهند، از محیط خارج می شوند. حال موضوع این است آنزیم هایی که با لیگاند یا **Substrate** اتصال برقرار کردند را جلوه از سامانه خارج کنیم یا بست بیاوریم. برای سلسله این **Complex** که به آسانی از بین نمی رود به دو طریق می توان عمل کرد:



Dialysis انجام می دهیم. به ترتیب که لیگاند 2 و آنزیم در این **reactivity** شان نسبت به هم کمی شود و آنزیم از **Substrait** جدا می شود و بر اساس وزن مولکولی از یکم خارج می شوند و این گونه این دورا جدا سازی می کنیم.

روش دیگر این است که ما می داریم پروتئین ها و آنزیم ها و ما **pH** خاص فعالیت شان دارند آن چه که تالون بردی شد **pH** و دمای معینی رخ می داد.

اگر ما به سیستم خلک اضافه کنیم یعنی **pH** را تغییر دهیم یا حرارت به سیستم دهیم یعنی دما را تغییر دهیم، **(البته این مقدار باید بسیار کم باشد تا ساختار دهم و سوم آنزیم یا پروتئین تغییر ندهد و بتوان دوباره آنرا به حالت اول بازگرداند)**

Conformation

Substrate

۷ فضای اشغالی که در دایره مناسب انتقال با لایه ۷ سبب واز سامانه سسته شده و خارج می شود و بعد از خروج دما و pH را (هر کدام که تغییر داده بودیم) به حالت اول بازمی گردانیم و البته ما آنرا خالص را خواهیم داشت. (تغییری که اعمال می کنیم باید مقابل بازگشت باشد و برای هر آن رنج Range مشخص و محدود دارد که آنرا از آن محدوده تغییر خارج شود، ساختار آنرا می شود و بعضی از طبیعتش خارج شده و ۸ می شود)

denature

۱ پلی دیر از ریبونوکلئیک اسیدهاست. پروتئین ها در pH های خاصی می توانند باردار شوند و به صورت طبیعی بار نوکلئیک اسیدها مثل RNA و DNA منفی است. از این ماهیت برای جداسازی مولد ناشناخته استفاده می کنیم می دانیم اگر به بار در جهت مشخصی میدان اعمال کنیم، بارهای توانسته حرکت کنند مثلاً بار + جذب قطب - شود. می یا برعکس این بارها می توانند بر اساس نیرویی که محبوس وادری شود می توانند جذب یک قطب شوند پس ما یک نیروی القوی را به اسم F به آن وارد می کنیم که به بار ذره و میدان القوی تبدیل داد. پس نیروی القوی که هر ذره در یک میدان می بیند به بار و قدرت میدان القوی تبدیل دارد.

$$F = QE$$

ما نیاز داریم در step های مختلف وادرا سانسازی کنیم، پس جلوی حرکت مواد مانع می گذاریم و محافظت می کنیم از اینکه مواد به راحتی حرکت کنند. به این مقوله وادرا در بستری قرار می دهیم (مثل کاغذ یا زل) و این بستری نیروی محافظت کننده یا اصطلاحی در مقابل جریان یا بی یون ها اعمال می کند. پس ما یک نیروی محافظت کننده خواهیم داشت که برابر است با ضریب اصطکاک در سرعت آن.

$$F = f \cdot v$$

→ Friction coefficient

اگر چنانچه نیروی القوی استاتیک بر نیروی اصطلاحی غلبه کند، ذره با سرعت ثابتی حرکت می کند چون است و با سرعت ثابتی حرکت می کند. و سلفه نیزه نیروی است که مقاومت می کند در برابر جریان یا بی (ترازوی)

$$F = 6\pi\eta r v$$

$$F_B = F_f \rightarrow QE = 6\pi\eta r v$$

(از این روش برای جداسازی ذرات باردار استفاده می شود)

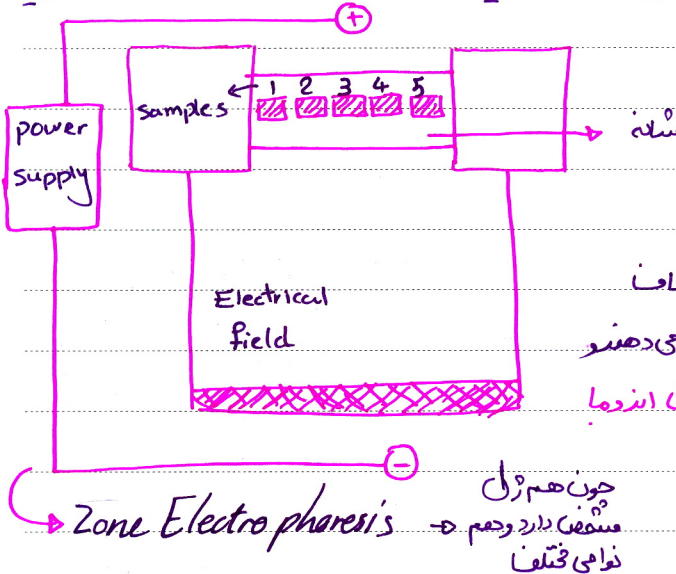
$$U = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi\eta r}$$

تقریب القوی

غلظت محلول ماده

تقریباً الکتروفورزی اجسام متفاوت است ← براساس بار، Q و شعاع r

ابتدا باید ببینیم که ماده در آن حرکت می کند یا جابه جایی دارد یا خیر. این بستگی می تواند به نوعی ژل یا استات سلولز یا شایسته یا ... باشد که هدف ما برای جداسازی ذرات یا پروتئین های خاصی استفاده می شوند. ابزار شایسته فاشنی وجود دارد که در سیستم قرار می دهند و منطقه های فرو رفته ای ایجاد می کند. در این منطقه های فرو رفته **Sample** ها رفته ها رفته می شود. اکنون از بالا به پایین یک فرایند یا ولتاژ مسطح اعمال می شود. دسته به بارش و جبرش آن ذرات شروع به حرکت می کنند و قطعاتی مختلفی از خودشان به جایی می گذارند و ما می فهمیم که با چه سیگن پروتئین های داریم. در این دستگاه معروف از یک نوع **Transpare** یا شفاف استفاده می کنند و سپس **spectrophotometry** انجام می دهند. غلظت هر ردیف را می سنجند. (**Sample** ها متفاوت اند)



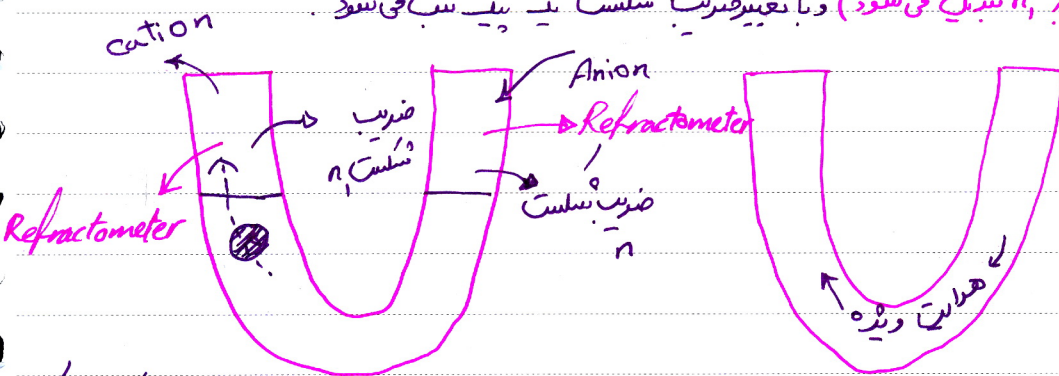
می دانیم که هر **Sample** را در کدام حفره رفته ایم. حرکت ذرات درون این دستگاه تا زمانی است که دیگر نتواند در نیروی اصطکاک غلبه کند و ذرات در این نقاط بمانند.

می کنند. بیشتر اوقات از ژل استفاده می شود که حفراتش حالت ندریانی داشته باشند. (**دیسک های متفاوت را به نایس** بلذار) تا جداسازی راحت تر باشد. در یکی از ستون ها رنگ یا **dye** معرفی می کنیم. رنگی که مقاومت صفه های الکتروفورز یا بیشتر در مقابلش کم است و با سرعت بیشتری حرکت می کند و این رنگ می تواند **Reference** یا استاندارد در بررسی ها باشد.

الکتروفورز فرز متحرک → **moving boundary Electrophoresis**
الکتروفورز منطقه ای → **Zone Electrophoresis**

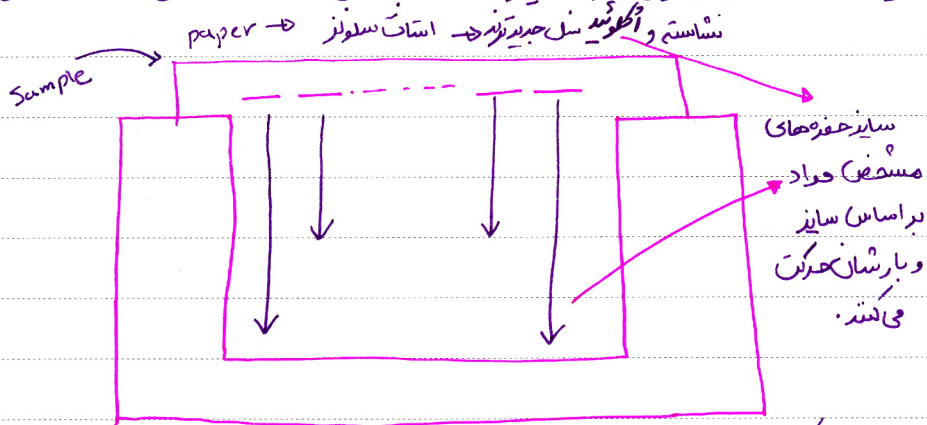
الکتروفورز فرز متحرک: در این روش یک لوله U شکل داریم (شبه فشار سیخ) و درونش محلول ناسخنه مان را رفته ایم. از یک سمت آنند و از یک سمت کاتد را به سیستم معرفی می کنیم. بر اساس میدان که اعمال می شود، اجسام با دار شروع به حرکت در یک سمت می کنند. حرقتی از لوله دستگاهی به نام **Refractometer** قرار دارد **Refractometer** ضریب شکست محیط را اندازه گیری می کند. به این صورت که ذره ای تا باند و بر اساس زاویه ای که دارد ضریب شکست محیط را اندازه گیری می کند.

حال اگر جسمی از مقابلش بلند (مکانی که دستگاه قرار دارد) ضریب شکست دیر ضریب شکست ثابت مبنی (مثلاً n) است. (مثلاً به n تبدیل می شود) و با تغییر ضریب شکست یک یک تبدیل می شود.



این یک ماده حالت مایع است و برای هر نوع ذره متفاوت است. این روش تنها به ما برای شناسایی عمل می کند و به راحتی نمی توان با این روش خالص سازی کرد. روش سفیدی بر اساس هلالیت ویژه می خورد است. (رویا دلیری است) و نتایج سفیدی اعمال می شود که جریان سفیدی به ما می دهد پس بر اساس کاسباتی نوع محلول را تعیین می شود که امروزه از روش اول استفاده می شود.

الکتروفورز نقطه ای: در الکتروفورز نقطه ای می توان از کاغذ یا ژل های با جنس های مختلف مثل استات سلولز استفاده و... استفاده کرد.



الکتروفورز طغزی منفرجه شده است چرا که در آن دوده هایی وجود دارد که احتمال دارد با پروتئین های مثل DNA, RNA یا اسیدهای آمینه برهم کنش کند و خطا ایجاد شود.

امروزه به جای طغزی از استات سلولز استفاده می کنند چرا که دوده هایی که در انتهای استات سلولز وجود دارد و موهای Reactive نیستند و فعالیت این بیشتر است پس تا شریجه ای روی الکتروفورز ندارد.

نسبته و بعد از آن **الکتروفورز** (نقل) پهنای باندی است که سلولزانه در الکتروفورز منطقه‌ای محلول‌های نامشخص اما با شماره‌های مشخص داریم و یک کنترل می‌داریم. این کنترل یک حرکت یا حرکت الکتروفورس یک مشخص دارد. کنترل را می‌شناسیم یک پروتیین با بار و سایز مشخص است. و بر اساس میزان حرکت مانع پروتیین را حدس می‌زنیم به این جهت **Native electropho** می‌زنیم.

دلیلی دست نمی‌زنیم و سعی می‌کنیم که همان را آنالیز کنیم پس

الکتروفورزی که ما به ساختار پروتیین یا هر ماده باید یک یک مشخص به ما بدهد. برای اینکه یک

مشخص داشته باشیم از **Disk Electro phoresis** استفاده می‌شود. در این روش ول یا ستر از سیم‌بند متفاوت تشکیل شده (سایزشان متفاوت است)

یک قسمت اولیه دارد به نام ول نمونه یا **sample gel** قسمت بعدی ول جیلا ساز یا **stacking gel**

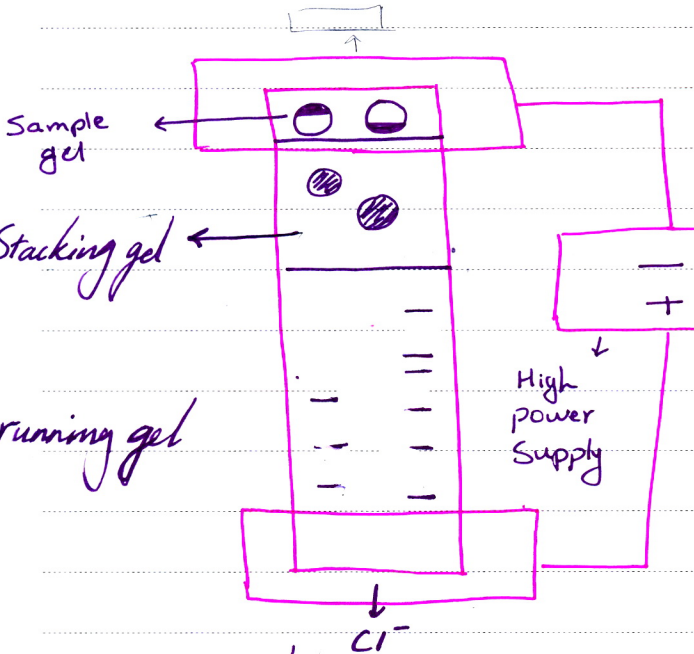
(حد وسط دور) و قسمت آخر ول جیلا کننده انتخابی یا **running gel** است. این ول‌ها سایز

حفره‌های متفاوت و در نتیجه آن مقاومت‌های متفاوتی دارند. سایز حفره‌ای اولی بزرگ و دومی سایز حفره‌ای متوسط و سومی سایز حفره‌ای کوچک دارد.

حال یک منبع **High power** اعمال می‌کنیم. این **High power** در قسمت اول با مقاومت کمتری مواجه است پس با سرعت بیشتری حرکت می‌کند. چون نیروی بیشتری دارند همانطور که این ولتاژ یا این می‌آید به قسمتی می‌رسد که از خود مقاومت زیادی نشان می‌دهد و این جاست که مواد تفاوت‌های سرعتی از خود بروز می‌دهند. در قسمت آخر

که بیشترین مقاومت وجود دارد، به راحتی می‌توان بر اساس سایز و بار ذرات را جدا کنیم. (هر چه بزرگتر باشد یا

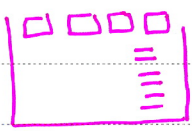
بار خالص داشته باشد، جهت آن حرکت می‌کند)



این ذرات در نقطه‌ای می‌ایستند یعنی نیروهایشان کمتر از اصطکاک می‌شود. حال با یک قسمت پر غلظت یا پرتیغ از یک

نوعی خاص داریم. پس **disk electrophoresis** برای جیلا سازی به کار می‌رود.

جدید ای مثل آلومین، استلوز... (نمونه‌ای که جیلا می‌شود) و بارش مشخص است در **disk electrophoresis** می‌داریم) و همان ولتاژ را اعمال می‌کنیم و **mobility** آن مشخص می‌شود و این آزمایش را برای نمونه‌های



بیشتر با شد احتمال دوبینایی، مایکتر است پس مایک (Carve) لیزر استاندارد می کشیم.

و قبل از شروع کار به پروتیین ها، سیریم و دود سیل سولفات میزنیم، SDS می آید و پروتیین را تکه تکه می کند (به اجزاء یا پپتیدها می گویند) حال ما آنرا Run می کنیم و سپس پروتیینی که سیریم دود سیل دارد را در الکتروفورز تیرتوی می کنیم و سپس ولتاژ را اعمال می کنیم. وقتی ولتاژ را اعمال کنیم چون پروتیین به اجزاء سازنده خود تقسیم شده هر کدام mobility خاص خود را با بسته بار و جرمی که دارند پیدا می کنند. پس می توانیم بسته به اجزاء پروتیین جرم مولکولی پروتیین را حدس بزنیم، یعنی اجزاء یا پپتیدها را برست آوریم و می توانیم با توجه به این خود داریم بزنیم که جرم مولکولی پروتیین ما چقدر است.

ما می توانیم الکتروفورز تیردیانی انجام دهیم یعنی قسم بیان الکترونی و ولتاژ بالا اعمال کنیم. (اختلاف پتانسیل زیاد اعمال کنیم) هم قبل از آن که ما تیردیانی از پپتیدها با حفرات متفاوت استفاده کنیم، هر چه به سمت انتها کار می رویم حفرات کوچکتر می شوند و مقاومت نیروی اصططائی بیشتر شود و اینگونه را حتمی می توانیم بر اساس سایر ذرات آنجا را جدا کنیم پس ما می توانیم الکتروفورز تیردیانی داشته باشیم که هم بار تاثیر داشته باشد و هم سایر فاکتور.

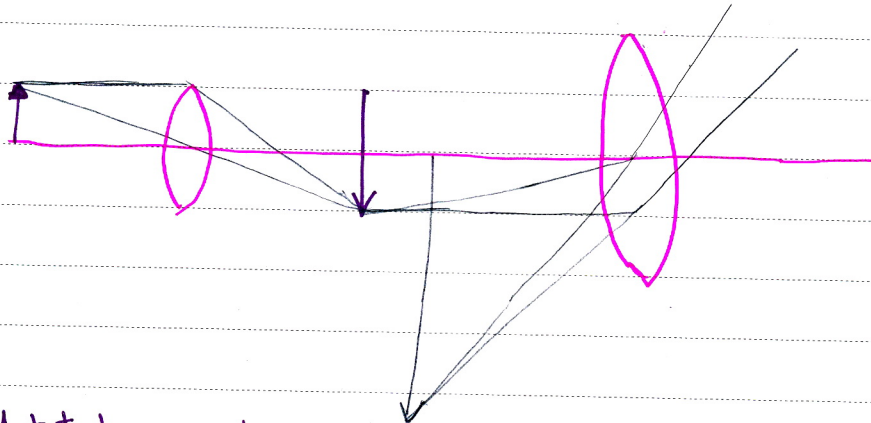
مایکروسکوپی در شش نوع با دو مایکروسکوپی فلورسنت ها:

انواع مایکروسکوپی ها را دانستیم Confocal Microscopy هم بر اساس لیزر کار می کند و هم بر اساس فلورسانس.

در مایکروسکوپی ها قرار می گیریم تا بتوانیم از اجزاء یا پپتیدها جدا کنیم و آنرا می بینیم (فلورسانس) و آنرا می بینیم.

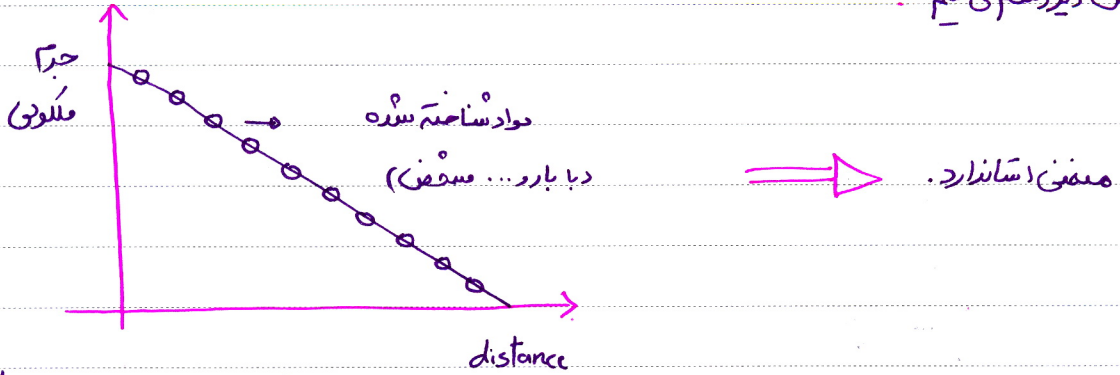
ما همچنین می توانیم از عدسی های مختلف استفاده کنیم.

مثلاً مایکروسکوپی ذرات یک عدسی می تواند دیدنی یک بارش را بزرگ می کند و یک عدسی چینی دارد در عدسی شئی ای این جسم در دو برابر فاصله کانونی عدسی شئی ای قرار می گیرد و یک تصویر حقیقی برای عدسی چینی می سازد و عدسی چینی یک تصویر مجازی برای مایکروسازد.



برای Optical M $M_{total} = M_{objective} \times M_{ocular}$ بزرگنمایی

مختلف زيادی که اطلاعاتشان در دسترس است امتحان می‌کنیم و **mobility** آنها را می‌سنجیم و یک نمودار بروج به شکل زیر رسم می‌کنیم.



بر اساس این نمودار می‌توان مواد نامشخص را با توجه به فاصله و حجم مَلَوَنی شناسایی کرد. این معنی استاندارد یک مَرَعول در اختیار می‌گذارد که ما با **مَلَوَنی** اطلاعات در جدول می‌توانیم حجم مَلَوَنی مواد را می‌سنجیم و می‌توان این گونه مواد را تفکیک کرد.

قسمت **running gel** را می‌توان جدا کرد، نوعی ای که تجمع ماده در آن است، آنها را می‌پزد و جدا می‌کنند و از این قسمت طیف‌سنجی می‌گیرند و غلظت این مواد را می‌توانند محاسبه کنند. با انجام طیف‌سنجی نوع ماده را نیز می‌توان فهمید چرا که هر پروتئین یا اسید آمینه‌ای یک پیک خاص خود را دارد.

جلسه هفتم

یک محب دلیله از الکتروفورز **SDS-PAGE** است.

Sodium Dodecyl sulphate poly Acry Amide Gel Electrophoresis

SDS

سیدم دودسیل سولفات

یک ماده شیمیایی است که می‌تواند با پروتئین‌ها برهم‌کنش شیمیایی انجام دهد و پروتئین‌ها را از یک قشری‌ها اسید آمینه خاصی شوند. با قطعه‌های مسطحی و الکترونیک و یک پروتئین بلند زنجیر را به قطعه‌های کوچک تقسیم می‌کند.

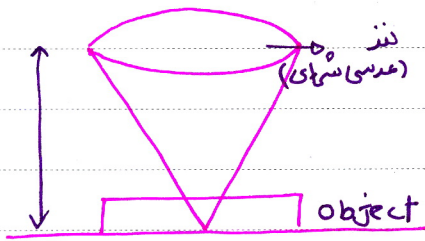
حال به مایه پروتئین ناشناخته داده اندولفته اند وزن مَلَوَنی آنرا تعیین کنند. ما برای تعیین وزن مَلَوَنی یک نمودار استاندارد داریم بر اساس وزن مَلَوَنی مواد که می‌شناسیم (**پروتئین‌های شناخته شده**) و فاصله‌ای که این پروتئین‌ها از نقطه **Injection** طی می‌کنند (**سیدم دودسیل سولفات استاندارد داریم**) هر چه **molecular weight**

Optical M در محدوده طول موج مرئی کار دارند (400-750)

یادآوری: زوَلوس در پروماتوئیدی: یعنی بتوانیم بین دو نقطه تمایز قابل سودیم (دو نقطه نزدیک بهم) در Optical M هم چنین حالتی داریم: مایک d_{min} تعریف می کنیم که برابر با

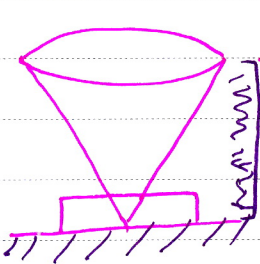
$$d_{min} = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha} \rightarrow \text{طول موج}$$

است.



λ طول موجی است که داریم در آن مایکروسکوپی را انجام می دهیم.
 n ضریب شکست
 α زاویه

از سنی باید یک پروتو بایر و به عدسی شیئی ای بخورد و یک تصویر حقیقی بدهد و سپس به عدسی تصویری بخورد و یک تصویر مجازی ایجاد کنند پس پرتو از منبع نوری می تابند و از جسم پراس می کنند (یعنی جسم پرتو ساطع می کند) به واسطه منبع نوری جسم پرتو نور را پراس می دهد (نور را به سمت عدسی بازی تاباند) حال بیشتر زاویه ای که پرتو بازتابی با عدسی می تاباند را α تعریف کنیم، زاویه ای که پرتو خارج شده از جسم با خط مرکزی عدسی می سازد را α می نویسیم.



این محدوده را معمولاً باید روغن که ضریب شکستی بیشتر از یک داشته باشد ($n \approx 1.5$) تا در این محدوده هوا نباشد تا بتوانند d را کاهش دهند.

حداقل فاصله ای که ما می توانیم تفکیکشان کنیم و دو نقطه مجزای از هم ببینیم d_{min} به طول موجی که ما داریم در آن مایکروسکوپی را انجام می دهیم بستگی دارد، به زاویه ای که جسم با عدسی می سازد بستگی دارد و به ضریب شکست ماده پرکننده بین جسم و عدسی شیئی ای می سازد بستگی دارد. (هرچه d_{min} کمتر باشد زوَلوس بیشتر است)

فرض کنیم یک مایکروسکوپی انجام می دهیم که می توانیم تعیین کنیم چه طول موجی را تابانیم. به نظر شما چه طول موجی مناسب است با فرض اینکه n و α های است یعنی باید سیستم از لحاظ فیزیکی داریم این مایکروسکوپی را انجام می دهیم (نور قوی مناسب است یا کم پ.؟)

طول موج آبی حدود 400 می باشد و طول موج قرمز حدود 610. آبی رزولوشن بیشتری به ما می دهد. این پارامترهای دیگر بلیان باشد نور آبی رزولوشن بیشتری می بینیم.

- نور زردی در کاربردهای خاص به کاری رود که ما تعیین می کنیم فرضاً نور قرمز برابر آبی.
- نور از هر جهتی می تواند بهشتی به خورد کند چرا که پرتو نور در سمتی از فوتون کما است.

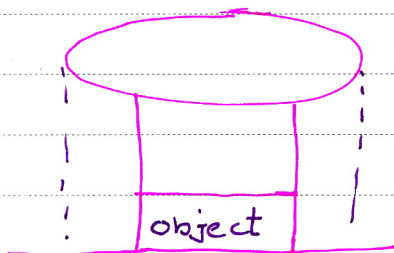
فرض کنیم برای طول موج 400 می توانیم به رزولوشن $17 \mu m$ دست پیدا کنیم. پس می نویسیم $Optical M$ که پس $Sample$ و عدسی را باید روشن بکرده ایم که این روشن روی $optical properties$ تأثیر دارد. روشن ضریب شلست را افزایش می دهد و d را کاهش می دهد و در نتیجه رزولوشن افزایش می یابد.

ما انواع $Optical M$ را داریم:

- 1 : Bright Field M
- 2 : Dark Field M
- 3 : phase contrast M

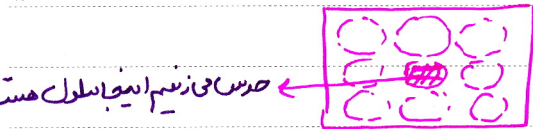
1. Bright Field M :

فرض کنیم یک شی داریم که این شی دارد به لنز ما نزدیک تاباند، لنفون نور از زمینه های اطراف هم به این لنز می خورد و ما هیچ سازوکاری نداریم که نور زمینه اطراف را حذف نکنیم. اطراف نمونه را هم روشن می بینیم.



مسئله که این حالت دارد این است که بعضی از نمونه های ما خیلی **transparent** یا روشن هستند. مخصوصاً وقتی از پاش به آنها نوری تابانیم، مثل سلول ها، وقتی به سلول نگاه می کنیم انطاری رنگ است و وقتی **Bright field** داریم طریکی کنیم نمی توانیم تشخیص دهیم این سلول است یا **plate** است یعنی نمی توانیم هائیم سلول را در تصویر تشخیص دهیم.

در **Bright field** سلول را رنگ می کنیم، مثلاً می خواهیم بعضی چیز سلول سالم و چیز سلول مرده است. یک رنگ مثل تریپان بلو به آن می زنیم که این تریپان بلو نمی تواند با غشاء سلول های زنده برهم کنش انجام دهد پس به آن هیچ کاری ندارد اما غشاء سلول های مرده نسبت به تریپان بلو نفوذ پذیر است و غلظت تریپان بلو در آن سلول ها زیاد می شود. حال فرض کنید یک ظرف سلولی داریم و داریم **Bright field** انجام می دهیم. نهایتاً چشم ما می تواند تا یک حدودی حالت 30 را تصور کند، یعنی یک هاله های ناشی از اختلاف سطح را چشم ما تشخیص می دهد.

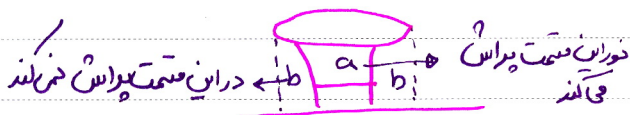


آخایی که در ساختارشان تریپان بلو نفوذ کرده را به راحتی می توانیم تشخیص دهیم و بعضی که در آن قسمت ها سلول مرده وجود دارد. در شمارش سلولی از لام نئوبار استفاده می کنیم. در لام نئوبار یک سری خط وجود دارد که برای شمارش از آنها استفاده می کنیم.

2. Dark field μ

در **DFM** حالت **direct** است یعنی نور را نمی تابانیم انوچیزی سرراش نیاسد که بخواد با آن برهم کنش آن چنانی انجام دهد باید مقدار کم به مسیرش ادامه می دهد. فرض کنید که در این **field** که **sample** ما قرار ندارد ماده آن چنانی نداریم که بتواند نور با آن برهم کنش خاصی انجام دهد و مسیر آنرا عوض کند. پس نور در آن قسمت **unrefracted** می شود. یعنی نور پراش پیدا نکرده است.

نوری که از سمت **sample** می آید چون یک ضخامت دارد و مواد مختلفی داخل هستند موجب می شود که نور با آن مواد برهم کنش کند و مسیر پرتو را احتمالاً عوض کرده و نورهایی که از **sample** می آیند **refracted** می شوند. (یعنی پراش پیدا کرده اند)



در DFM ما دورا به یک شعاعی می تابانیم و می خواهیم فقط نوری را که با **Sample** و الکترون کرده را ببینیم
یعنی فقط می خواهیم **Sample** ها روشن شود و **Sample** را بند بمانی کنیم.
سپس ما یک **unrefracted light** داریم که از زمینه ها می آید و یک **refracted light** داریم که از **Sample**
می آید. حال یک **Ring** در مسیر پرتو می گذارند و **unrefracted light** را حذف می کنند. عملاً انظار از حاشیه ها دوری
که مسیر مستقیم را بدون هیچ اعوجاجی طی می کنند را شناسایی می کنند و آنرا حذف می کنند. حال فقط **Sample** صادر
یک سبتر تاریک، روشن است که می توانیم آنرا **detect** کنیم.

3. **phase contrast M**
یک رینگ استیلی داریم که داخل آن حفره های مسطحی دارد و امواج و پرتوها هم حالت سینوسی دارند و ما می توانیم به
خروج یک فاز یا یک زاویه خاص خود را دارد. یعنی امواج مختلف فازهای مختلفی می توانند داشته باشند و یا اینکه سبتر
به **خاموشها** می توانند اختلاف فازهای مختلفی داشته باشند.

$$y = A \sin(\omega t + kx)$$

فاز

حال اگر در مسیر پرتو یک رینگ قرار دهیم که داخل آن نقاط ترجیحی برای بعضی از فازهای پراش کرده ایجاد شده باشند
پرتوها فقط از آن فازها می توانند رد شوند یعنی خارهای مربوط به زمینه که هیچ پراشی پیدا نکرده اند نمی توانند رد شوند.
به طور خلاصه یعنی یک اختلاف فازی می تواند تفاوت بین پرتوهای پراش پیدا کرده و غیر پراش کرده را تشخیص دهد.

یک دسته دیگر **op-M** ها **immune fluorescen** یا **M confocal** است.

