

تكوين ذاتي:



متتالية الأحماض الأمينية في البروتينات Séquençage des protéines

مقتطف من كتاب علوم الحياة. بروتينات و أنزيمات، م. بعزيز، 2013

Extrait du livre Sciences de la vie. Protéines et Enzymes, M. Baaziz, 2013

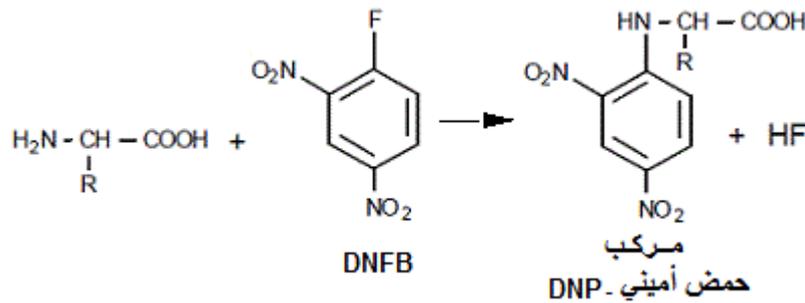
<http://www.takween.com/transition-secondaire-superieur/proteines-enzymes-sommaire.html>

التعرف على البنية الأولية للبروتينات يتم من خلال ثلاثة مراحل مهمة.

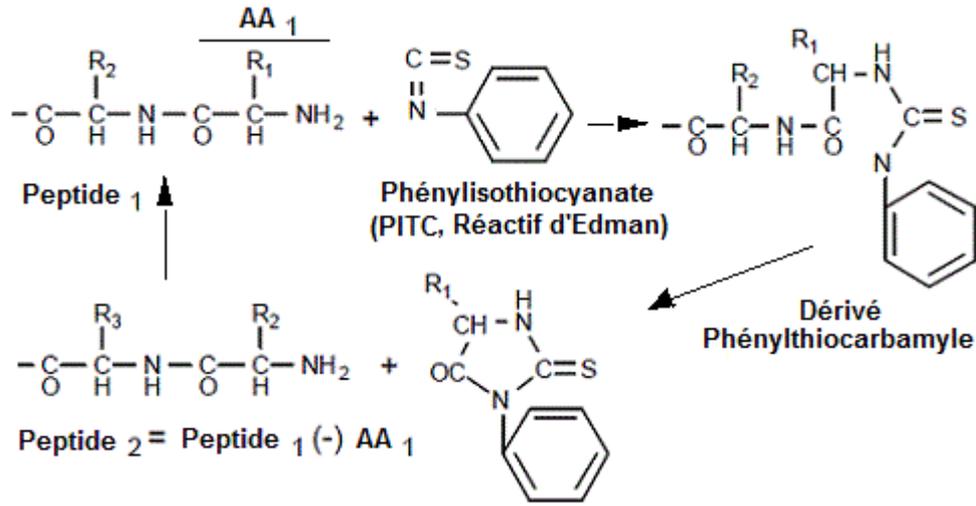
- **المرحلة الأولى.** في حالة البروتينات الرباعية البنية (بروتينات عديدة الوحدات)، يتم أولاً فك الوحدات فيما بينها بفعل عامل pH بحضور اليوريا 8M (Urée 8 M) زائد الكوانيديين 6M (Guanidine 6 M) أو بواسطة تركيز مرتفع من الملح.
- **المرحلة الثانية.** بعد عزل الوحدات، يتم قطع القناطر الكبريتية إما بواسطة الحمض الفورمي (Acide formique) الذي يحدث مجموعات SO₃ التي تحد من تكون القناطر S-S أو باختزال و ألكلة القناطر S-S و ذلك بإضافة 2-مركابتوإثانول الذي يعيد خلق مجموعات SH، مع المعالجة بأسيتات اليود (Iodoacétate) أو الأكريلونتريل (Acrylonitrile) اللذان يقومان بتغيير SH و يعيقان إعادة تكون القناطر S-S.
- **المرحلة الثالثة.** التعرف على متتالية الأحماض الأمينية.

التعرف على الأحماض الأمينية في طرفي N و C للبروتين يتم بطريقتين مختلفتين، الطريقة الكيميائية و الطريقة الأنزيمية.

تتجلى الطريقة الكيميائية للتعرف على سلسلة الأحماض الأمينية لبروتين معين في ربط الأطراف بمركبات كيميائية متخصصة تتفاعل لتعطي معقدات يتم عزلهم والتعرق على الحمض الأميني الطرفي المحمل. في هذا الإطار تدخل طريقة سانجر (Méthode de Sanger) وطريقة إدمان (Méthode d'Edman). الطريقة الأولى تكشف عن الطرف N للبروتين بتفاعل DNFB (Dinitrofluorobenzène) مع طرف الأمين الحر ليعطي مركب بيبتيد-DNP أو بروتين-DNP الذي يتم عزله و حلماته للتعرف على الحمض الأميني في طرف N (أنظر الرسم التالي).



كما يوضحه الرسم التالي، تعتمد طريقة إدمان الحديثة العهد، على ربط طرف N للبروتين بمادة فينيل إزوتيو سيانات (Phénylthiocyanate, PITC).



كروماتوغرافيا

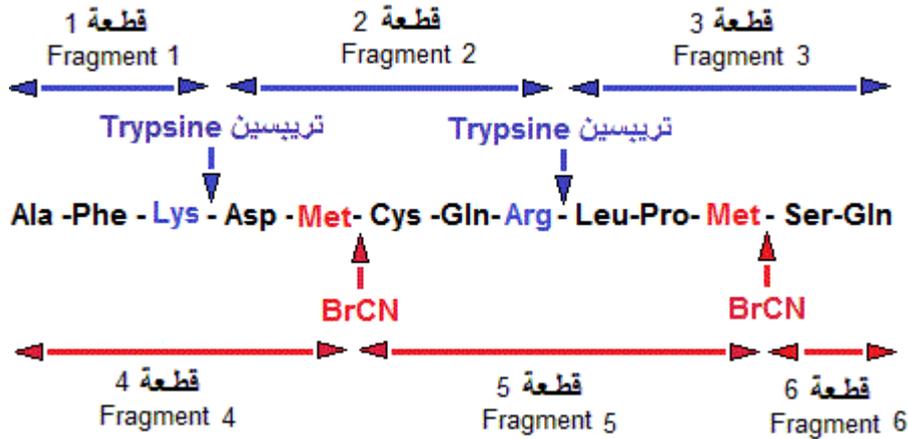
هكذا ينشأ معقد بيتيد N-فينيل تيوكرباميل (phénylthiocarbamyle) الذي يتم عزله ومعرفة الحمض الأميني المرتبط فيه. كطريقة كيميائية أخرى لمعرفة متتالية الأحماض الأمينية في البيبتيدات، يستعمل برومور السيانوجين (Bromure de cyanogène, BrCN) الذي يقوم بقطع الروابط البيبتيدية من الجانب C النهائي التي توجد بعد الميتيونين.

تكمّن الطريقة الأنزيمية للتعرف على الأحماض الأمينية بطرف N و طرف C لبروتين معين في حلماة أطراف البروتين أو البيبتيد بأنزيمات متخصصة في قطع الطرف N أو الطرف C للبروتين (أنزيمات حلماة البروتينات خارجيا، exonucléases). هكذا يفصل أنزيم كاربوكسيبيبتيداز البنكرياس (Carboxypeptidase pancréatique) الحمض الأميني بطرف الكربون النهائي ويقوم أنزيم أمينوبيبتيداز (Aminopeptidase) بقطع الروابط البيبتيدية بالطرف N لكل الأحماض الأمينية باستثناء البرولين.

التعرف على متتاليات الأحماض الأمينية في البروتينات يتم بواسطة الحلماة الجزئية (Hydrolyse partielle) للسلاسل البيبتيدية حتى تنتج عدة أطراف ثنائية أو ثلاثية أو رباعية البيبتيد التي قد توصل إلى معرفة المتتالية البيبتيدية الأصلية بعد إعادة تركيب الأطراف البيبتيدية القصيرة. تتطلب الحلماة الأنزيمية الجزئية للبيبتيد استعمال أنزيمات متخصصة في قطع روابط بيبتيدية معينة داخل السلاسل (بيبتيدازات داخلية، endopeptidases). هكذا، يفضل البيبسين (Pepsine) فك الروابط البيبتيدية من الجانب N النهائي (جانب اليسار) التي تضم وظيفة أمين للثيروزين أو الفينيل ألانين زائد التريبتوفان واللوسين و الحمض الأسبارتي و الحمض الجلوتامي، باستثناء حالة وجود البرولين على اليسار. يقطع التريبسين (Trypsine) الروابط من الجانب C النهائي (جانب اليمين) التي تضم وظيفة كاربوكسيل للأرجنين أو الليزين، باستثناء حالة وجود البرولين على اليمين. يفصل الكيموتريبسين (Chymotrypsine) الروابط من الجانب C النهائي التي تضم وظيفة كاربوكسيل للفينيل ألانين أو التريبتوفان أو الثيروزين، باستثناء حالة وجود البرولين على اليمين. يقطع أنزيم الترموليزين (Thermolysine) من الجانب N النهائي الروابط التي تضم الأحماض الأمينية النافرة للماء مثل اللوسين أو الإزولوسين أو الفالين، باستثناء حالة وجود البرولين على اليسار.

يتم التوصل إلى متتالية الأحماض الأمينية ببسط كل التراكات و النقاطات في الأطراف البيبتيدية الناتجة عن المعالجة الأنزيمية و الكيميائية لعدد البيبتيد. كمثل، نأخذ عدد البيبتيد المكون من 13 حمضا أمينيا مختلفا من بينهم Lys و Arg و Met و الذي خضع للهدم بالتريبسين والمعالجة ب BrCN. يبين الرسم التالي تسلسل الأحماض الأمينية و مواقع الهدم الأنزيمي و القطع ب BrCN، إذ يعطي

التريسين و BrCN، كل على حدة، ثلاثة قطع ببتيدية مختلفة يتم بسطها و إعادة تركيبها للتوصل إلى متتالية الأحماض الأمينية للبيبتيد.



تمرين

- دراسة متتالية الأحماض الأمينية لبيبتيد ب 9 وحدات.

توصل بحث مخبري إلى عزل عديد ببتيدي هام. من أجل معرفة متتالية الأحماض الأمينية التي تشكله، أظهرت التجارب التحليلية النتائج التالية:

التجربة	النتائج
حلمأة حمضية (hydrolyse acide)	Ala2, Arg, Lys2, Met, Phe, Ser2
هدم بالكاربوكسيبيبتياز (digestion à la carboxypeptidase)	Ala
هدم بالتريسين (digestion à la trypsin)	(Ala, Arg), (Lys, Phe, Ser), (Lys), (Ala, Met, Ser)
معالجة ببرومور السيانوجين (traitement au bromure de cyanogène)	(Ala, Arg, Lys2, Met, Phe, Ser), (Ala, Ser)
هدم بالتيرموليزين (digestion à la thermolysine)	(Ala), (Ala, Arg, Ser), (Lys2, Met, Phe, Ser)

استخرج متتالية الأحماض الأمينية لعديد البيبتيد.

جواب

- هدم عديد البيبتيد بالكاربوكسيبيبتياز يوضح أن الحمض الأميني بالجانب C النهائي للبيبتيد هو الألانين (Ala).



- الهدم بالتريسين يمكن من وضع الترتيب الجزئي لإثنين من القطع الأربعة الناتجة. للتذكير، يقطع التريسين الروابط من الجانب C النهائي التي تضم وظيفة كاربوكسيل للأرجنين أو الليزين، باستثناء حالة وجود البرولين على اليمين. ينتج هذا الهدم قطعاً بالجانب C نهائي من

نوع Arg أو Lys. وعليه، نحصل على:

Ala-Arg-(Phe,Ser)-Lys

بالإضافة، الهدم بالتريسين يبين أن حمضا أمينيا من نوع Lys موجود بالجانب C النهائي لحمض أميني Lys أو Arg. يظهر الهدم بالتريسين أن البيبتيد الثلاثي (Ala, Met, Ser) يمثل الجانب C النهائي للبيبتيد (لا يوجد Arg أو Lys في هذه القطعة).
- الهدم ب BrCN، الذي يقطع الروابط البيبتيدية من الجانب C النهائي التي توجد بعد الميثيونين، يمكن من معرفة موقع الميثيونين في البيبتيد الثلاثي:

Met-(Ala, Ser)

لكون الألفين يمثل الجانب C النهائي للبيبتيد (أنظر الهدم بالكابوبيبتياز)، تكون متتالية الأحماض الأمينية الثلاثة للطرف C النهائي للبيبتيد:

Met-Ser-Ala-COOH

- يقطع أنزيم الترموليزين من الجانب N النهائي الروابط التي تضم الأحماض الأمينية النافرة للماء مثل اللوسين أو الإزولوسين أو الفالين، باستثناء حالة وجود البرولين على اليسار وبهذا نتعرف عن موقعهم في الطرفين:

Ala-(Arg,Ser) Phe-(Lys,Lys)-Met-Ser

بهذه المعلومة الأخيرة، يمكن وضع متتالية عديد البيبتيد كالتالي:

Ala-Arg-Ser-Phe-Lys-Lys-Met-Ser-Ala