

# طیف بینی رزونانس مغناطیسی هسته در زیست شیمی

• استیف چیتام

## آزمایش NMR

طیف بینی رزونانس مغناطیسی هسته، نظیر سایر اشکال طیف بینی، به جذب انرژی توسط هسته های بسیاری از اتمها در مولکولهای مورد مطالعه بستگی دارد. هسته های بسیاری از ایزوتوپهای اتمی، هنگامی که در میدان مغناطیسی قرار داده شوند، تابش الکترومغناطیس را در ناحیه فرکانس رادیویی جذب می کنند. نمونه هایی از هسته های فعال NMR شامل هیدروژن ( $^1\text{H}$ )، دوتریم ( $^2\text{H}$ )، کربن - ۱۳ ( $^{13}\text{C}$ )، فسفر - ۳۱ ( $^{31}\text{P}$ )، نیتروژن - ۱۴ ( $^{14}\text{N}$ ) و نیتروژن - ۱۵ ( $^{15}\text{N}$ ) می باشد. این بحث بر روی کاربرد تکنیکهای NMR پروتون ( $^1\text{H}$  NMR) برای مطالعه ساختار درشت مولکولها در محلول متمرکز خواهد شد در حالی که عبارت پروتون به ایزوتوپ هیدروژن دارای جرم واحد یک اشاره دارد.

آزمایشهای NMR میدان بالا با تکنیکی مشهور به NMR تبدیل فوریه ( $^* \text{FT-NMR}$ ) انجام می شود. پیام یک پروتون در  $\text{FT-NMR}$  به صورت موج سینوسی میرا که به تنهایی القای آزاد  $^{**} \text{FID}$  شهرت دارد، آشکار می شود. پیام به صورت تابعی از زمان است و طیف را یک طیف در قلمرو زمان می خوانند.

داده های NMR، معمولاً به صورت طیفهای در قلمرو فرکانس نمایش داده می شوند. با تبدیل فوریه، داده های خام از قلمرو زمان به قلمرو فرکانس تبدیل می شود.

یک طیف ساده NMR شامل نموداری از فرکانس پیام بر حسب شدت پیک است. شدت نسبی یا مساحت یک پیک در طیف NMR با شماره هسته های موجود در گروه جذب کننده در آن فرکانس متناسب است. یعنی، برای مثال، سه پروتون گروه  $\text{CH}_3$  یک پیام خواهند داد که سه برابر شدت یک پروتون تک می باشد. موقعیت یک پیک در طیف NMR به پیرامون مغناطیسی پروتون بستگی دارد. میدان مغناطیسی یک دستگاه NMR، ایستاست. بنابراین، پروتون در یک دستگاه ۵۰۰ مگاهرتز، تابش الکترومغناطیسی را تقریباً در ۵۰۰ مگاهرتز جذب خواهد کرد. خوشبختانه، تمام پروتونها دقیقاً در فرکانس دستگاه طیف سنج انرژی جذب نمی کنند. حضور ابرالکترونی

ساختار نوکلئیک اسیدها و پروتئینها، به طور سنتی، با تکنیکهای پرتو - ایکس تعیین شده است (۱). ساختارهای پراش پرتو - ایکس لیف و پراش پرتو - ایکس بلور، ارزش فراوانی در فهم ما از ساختار و عملکرد درشت مولکولها داشته اند (۱). اساس رمز ژنتیکی نهفته در ساختار  $\text{DNA}^*$  بامدل ساخته شده بر اساس الگوهای پراش پرتو - ایکس لیف تعیین شده است. صورتبندیهای گوناگون  $\text{DNA}$  (نوع  $\text{DNA}$  A، B، Z) و بسیاری ساختارهای پروتئینی با تحلیل بلورنگاری پرتو - ایکس روشن شده است.

یکی از پرسشهایی که همواره درباره ساختارهای به دست آمده از تحلیل پرتو - ایکس بلورها مطرح می شود، این است که ساختار مولکول در بلور چگونه به ساختار آن در محلول ربط پیدا می کند. ساختارهای بلور، نمایشهایی ایستا از مولکولها به دست می دهند، در حالی که مولکولها در محلول در حرکت دائمی هستند، به علاوه، امکان واپیچیدگی ساختار بلور در اثر نیروهای مربوط به پیچیده شدن مولکولها در بلور نیز وجود دارد.

به علت مسائل خلاصه شده در بالا، تکنیکهایی که می توانند ساختار مولکولی را در محلول تحلیل کنند، ابزارهای ارزشمندی برای درک چگونگی ارتباط ساختار مولکولی با عملکرد هستند. در دسترس بودن مینی کامپیوترهای ارزان که با پیشرفت آهنرباهای ابررسانای میدان بالای تجارتي همراه شده، دسته مهمی از تکنیکهای تجربی رزونانس مغناطیسی هسته را که می تواند اطلاعات دقیق درباره مشخصات ساختاری و دینامیک درشت مولکولها به دست دهد، پدید آورده است. اکنون، قدرت میدان مغناطیسی طیف سنجهای تجارتي با آهنرباهای ابررسانا از ۴۷ تا ۶۰۰ مگاهرتز است. میدانهای مغناطیسی با قدرت بالاتر، حساسیت بیشتری پدید می آورند و بیشتر آزمایشهای انجام شده بر روی درشت مولکولها با دستگاههای ۴۰۰ تا ۶۰۰ مگاهرتز صورت گرفته است.

در این بازنگری، ماهیت آزمایش NMR، فنون استفاده شده، نوع اطلاعات ساختاری و دینامیکی به دست آمده، و چگونگی بررسی و پالایش ساختارها با استفاده از تکنیکهای گرافیک کامپیوتر، همراه با داده های NMR، مورد بحث قرار می گیرد.

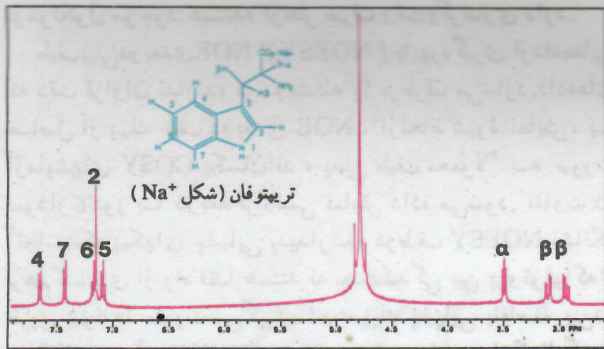
\* FT-NMR مخفف Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance

است. - م.

\*\* FID مخفف Free Induction Decay است. - م.

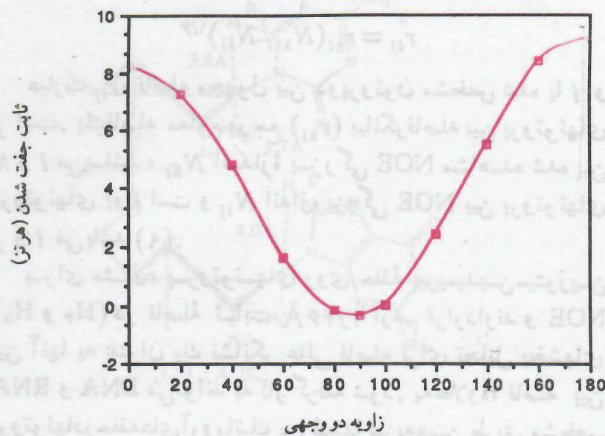
• استاد دانشکده داروسازی دانشگاه تولدو

\* DNA مخفف Deoxyribonucleic acid است. - م.



شکل ۱. طیف NMR پروتون تريپتوفان در  $D_2O$ . ساختار و سيستم شماره گذاری تريپتوفان در شکل نشان داده شده است. گمارش رزونانسهای پروتون تريپتوفان در بالای بيکها مشخص شده است. بيامهای پروتونهاى روى نيتروژن، به علت تبادل با  $D_2O$  در طيف ديده نمی شوند.

رابطه کاربوس



شکل ۲. رابطه کاربوس. نمایش گرافیکی معادله اولیه کاربوس که نشان دهنده تغییر ثابت جفت شدن سه پیوندی  $^3J_{HH}$  با زاویه می باشد. متحنی نشان داده شده از رابطه  $^3J_{HH} = 8 \cos^2 \phi - 0.28 \phi$  برای هنگامی که  $0^\circ < \phi < 90^\circ$  و  $^3J_{HH} = 8 \cos^2 \phi + 0.28 \phi$  برای هنگامی که  $90^\circ < \phi < 180^\circ$  باشد، محاسبه شده است.

حاضر، شکلهای گوناگونی از معادله اولیه کاربوس وجود دارد که هر يك شامل پارامترهایی برای برازش\* دقیق بین داده‌های محاسبه شده و داده‌های تجربی در يك سيستم معین هستند. به ویژه، تغییری که اخیراً توسط آلتونا و همکارانش داده شده، تحلیل حلقه‌های ریبوزودزوکسی ریبوز در  $^{**}RNA$  و  $DNA$  را ممکن می‌سازد (۳). معادله اخیر، رابطه اولیه کاربوس را با گنجاندن يك عبارت اصلاحی برای به حساب آوردن اثر الکترونکاتیوی بر روی ثابت جفت شدن سه پیوندی ( $^3J_{HH}$ ) در قدها گسترش داده است.

\* برازش معادلی برای to fit به معنی جور شدن و برازندگی. - م.

\*\* RNA مخفف Ribonucleic acid است. - م.

پروتونها در يك مولکول، ميدانهای مغناطیسی ثانویه‌ای القای کند که میدان القا شده واقع در هسته را تغییر می‌دهند. بنابراین، فرکانس پروتونها در يك مولکول نسبت به فرکانس فرستنده تا حدود چند قسمت در میلیون\* (ppm) جابه‌جایی شوند. فرکانس رزونانس پروتونها نسبت به يك معیار درونی یا بیرونی برحسب قسمت در میلیون گزارش می‌شود و فرکانس يك پروتون معین نسبت به معیار به جابه‌جایی شیمیایی آن پروتون شهرت دارد و با حرف یونانی δ نمایش داده می‌شود. معمولی‌ترین معیار داخلی به کار رفته برای نمونه‌های غیر آبی، تترا متیل سیلان (TMS) است. در آب انحلال پذیر نیست و نمونه آبی زیست مولکولها معمولاً نسبت به پروتونهاى متیل ۲،۲ - دی‌متیل - ۲ - سیلاپنتان - ۵ - سولفونات (DDS) یا ۳ - تری‌متیل سیلیل پروپیونات - ۲،۲،۳،۳ -  $d_4$  (TSP) سنجیده می‌شوند. محل رزونانس پروتونهاى ماده معیار را طبق قرارداد، صفر ppm می‌گیرند.

يك طيف نمونه از تريپتوفان (شکل  $Na^+$ ) که در  $D_2O$  به دست آمده و نسبت به معیار بیرونی DSS سنجیده شده در شکل ۱ نشان داده شده است. بيامهای تريپتوفان در دو ناحیه پدیدار می‌شوند. بيامهای میدان بالا، بین ۳٫۶ تا ۲٫۸ ppm از پروتونهاى آلفاتیک  $\alpha$  و  $\beta$  هستند. بيامهای میدان پایین، بین ۷ تا ۷٫۸ ppm از پروتونهاى آروماتیک می‌باشند (شکل ۱). بيام بزرگتر در مرکز طيف در ۴٫۸ ppm مربوط به بقایای  $H_2O$  یا  $HOD$  موجود در نمونه است. پروتونهاى روى نيتروژن با حلال  $D_2O$ ، تبادل سریع انجام داده و با دوتریم که در همان فرکانس، تابش جذب نمی‌کند و در آزمایشهای NMR پروتون قابل مشاهده نیست، جانشین می‌شوند. هر يك از پروتونهاى تبادل نا پذیر تريپتوفان با بيامی در طيف NMR نمایش داده شده‌اند. هر بيام پروتون (بجز H روی کربن شماره ۲) شامل يك مجموعه خط است. بيام هر يك از پروتونهاى  $\beta$ ، برای مثال، شامل چهار خط می‌باشد. چندگانگی خطوط مشاهده شده برای هر يك از پروتونها ناشی از جفت شدن اسپین - اسپین است. پدیده جفت شدن، نتیجه برهم کنشهای بین الکترونهاى يك پروتون و الکترونهاى پروتونهاى همسایه است. جفت شدن از طریق پیوندها صورت می‌گیرد زیرا به الکترونهاى پیرامون هسته‌ها مربوط می‌شود، و جفت شدن بین پروتونهاى که با چهار پیوند یا بیشتر از هم جدا شده باشند قابل تشخیص نیست. درجه جفت شدن بین هسته‌ها را ثابت جفت شدن می‌نامند و برای پروتونها، معمولاً، بین صفر تا ۱۵ هرتز است. ثابت جفت شدن، فقط يك ثابت است و با افزایش یا کاهش قدرت میدان مغناطیسی تغییر نمی‌کند. بنابراین، دو پروتون با ثابت جفت شدن ۸ هرتز دارای همان جفت شدگی در يك طيف سنج ۲۰۰ مگاهرتز و در يك طيف سنج ۵۰۰ مگاهرتز هستند.

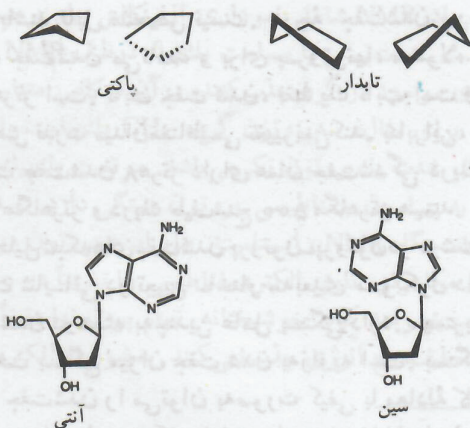
تحلیل شبکه‌های جفت شدن پروتون-پروتون در درشت مولکولها اهمیت شایانی در تعیین ساختار سه بعدی مولکول دارد. میزان جفت شدن دو هسته به چندین عامل بستگی دارد. مهمترین نکته در این بحث بستگی میزان جفت شدن به زاویه است. بستگی زاویه‌ای ثابت جفت شدن را می‌توان به صورت کیفی با معادله کاربوس که به صورت نمودار در شکل ۲ نمایش داده شده، نشان داد (۲). در حال

\* ppm مخفف parts per million است. - م.

## تعیین ساختار مولکولی در محلول با NMR

اولیگونوکلئوتیدهای کوتاه مارپیچ دوگانه DNA سه خانواده عمده از صورتبندیهای DNA (شکلهای A، B، و Z) را با استفاده از 2D NMR می‌توان به سهولت تشخیص داد. هر شکل DNA با دو خاصیت صورتبندی مشخص می‌شود؛ جمع‌شدگی قند و پیوند یگانه گلیکوزیدی. حلقه‌های پنج‌تایی سیر شده، مسطح نیستند بلکه شکلهای پاکتی و تابدار مربوط به شکلهای جمع‌شده را به خود می‌گیرند. شکل پاکتی بیانگر یک صورتبندی است که در آن چهار اتم در یک صفحه و اتم پنجم در بالا یا در پایین این صفحه قرار می‌گیرد. شکل تابدار دارای دو اتم در بالا و پایین صفحه پدید آمده از سه اتم می‌باشد. به علاوه، باز ممکن است دو جهت گیری سین و آنتی را با چرخش حول پیوند گلیکوزیدی، نسبت به قند به خود بگیرد (۱). شیوه‌های جمع‌شدگی قند و شکلهای سین و آنتی در شکل ۶ نمایش داده شده‌اند. در شکل سین، باز به سوی قند جهت گیری کرده است، در حالی که در شکل آنتی، باز از قند روی برگردانیده است (۱). تغییر در صورتبندی منجر به پیدایش تفاوت در رابطه فضایی بین پروتونهای باز و قند می‌شود. این تفاوت‌های رابطه فضایی پروتونها را می‌توان برای مشخص کردن صورتبندی چند پارهای کوتاه، با استفاده از تحلیل NMR، مورد استفاده قرار داد.

آزمایشهای NMR، امکان تعیین ترتیب نوکلئوتیدها در چند پارهای کوتاه را فراهم می‌سازد. وقوع NOE ها در یک زنجیر DNA، دارای جهت گیری معین است. با استفاده از الگوی تماسهای NOE می‌توان «ترتیب» یک چندپار DNA را تعیین کرد، یعنی ترتیب بازها را به دست آورد. پروتونهای H1 قند در شکل A و B مولکول DNA تقریباً هم‌فاصله ( $\sim 4.0 \text{ \AA}$ ) از پروتونهای H8- اگر باز یک پورین باشد- یا H6- اگر باز پیریمیدین باشد- باز خودشان و H8 یا H6 نوکلئوتید 5' - نه 3' - هستند. گمارش مارپیچ از نوکلئوتید 5' آغاز می‌شود زیرا هر نوکلئوتید بجز آنکه در 5' قرار دارد دارای دو پیک چلیپایی NOE خواهد بود. در مارپیچهای دست راستی DNA پروتونهای H1، H2'/H2'' به پروتونهای H8 و H6 باز همسایه 3' - نه به باز همسایه 5' - NOE



شکل ۶. صورتبندیهای پاکتی و تابدار حلقه‌های پنج‌تایی. صورتبندیهای سین و آنتی دزوکسی آدنوزین.

در مولکول موجود هستند، از نظر صرف وقت، گرفتاری دارد. طیف بینی دو بعدی NOE\* (NOESY) با بهره‌گیری از داده‌هایی که دقت فراوان ندارند، هر دو مسئله را برطرف می‌سازد. داده‌های حاصل از یک طیف دو بعدی NOE، از لحاظ شیوه نمایش، با آزمایشهای COSY یکسان‌اند، یعنی طیف معمولاً به صورت نمودار کانتور با دو بعد فرکانسی نمایش داده می‌شود. تفاوت در آنجاست که پیکهای چلیپایی پدیدار شده در طیف NOESY نشانگر برهم‌کنشهای از راه فضا هستند نه جفت‌شدگی بین پروتونها که از طریق پیوندها صورت می‌گیرد. شدت پیک چلیپایی با فاصله بین دو پروتون پدید آورنده پیک چلیپایی متناسب است. انتگرال گیری شدت پیکهای چلیپایی، امکان تعیین فاصله بین پروتونها را می‌دهد. رشد شدت یک پیک چلیپایی NOE به صورت خطی به فاصله مربوط نیست اما با عکس توان ششم فاصله ( $1/r^6$ ) بستگی دارد. ساده‌ترین راه برای تعیین فاصله بین دو پروتون، مقایسه شدت پیک چلیپایی NOE بین آن دو پروتون باشد یک پیک چلیپایی NOE حاصل از دو پروتون با فاصله معلوم است. این رابطه را می‌توان به صورت کمی با معادله زیر نمایش داد (۹):

$$r_{ij} = r_{kl} (N_{kl} / N_{ij})^{1/6}$$

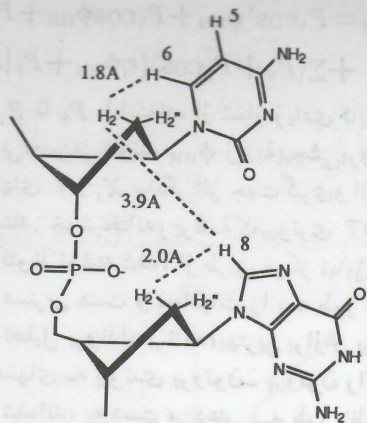
عبارت  $r_{ij}$ ، فاصله مجهول بین دو پروتون مشخص شده با  $i$  و  $j$  است. یک فاصله معلوم مرجع ( $r_{kl}$ ) بیانگر فاصله بین پروتونهای  $k$  و  $l$  می‌باشد،  $N_{kl}$  اندازه بزرگی NOE مشاهده شده بین پروتونهای  $k$  و  $l$  است و  $N_{ij}$  اندازه بزرگی NOE بین پروتونهای  $i$  و  $j$  می‌باشد (۹).

برای مثال، پروتونهای روی حلقه پیریمیدین سیتوزین ( $H_6$  و  $H_5$ ) در فاصله ثابت  $4.4 \text{ \AA}$  از هم قرار دارند و NOE بین آنها به عنوان یک نشانگر عالی فاصله برای تحلیل بخشهای RNA و DNA می‌تواند به کار گرفته شود. به علاوه، فاصله بین پروتونهای در حلقه‌های آروماتیک پروتئینها نیز به همین طریق مشخص هستند.

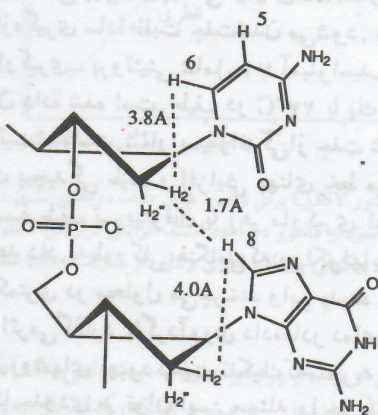
لازم به یادآوری است که معادله به صورتی که در بالا فرمول بندی شده است، دقیقاً درست نیست. سرعت رشد NOE، در حقیقت پدیده‌ای وابسته به فاصله است نه شدت یک NOE تکی، و اندازه گیریهای سرعت رشد NOE از لحاظ نظری اندازه گیریهای دقیقتری از فاصله را به دست می‌دهد. به هر حال، مسائل عملی که هنگام سنجش تکوین NOE در یک زیست مولکول با آنها روبرو هستیم، چشمگیرند. چندین اندازه گیری شدت NOE در نقاط زمانی متفاوت برای تعیین دقیق آن ضروری است، و در فاصله‌های زمانی کوتاه، هنگامی که مقدار رشد NOE کوچک می‌باشد، نسبت پیام به نوفه طیفها ممکن است امکان تعیین دقیق NOE را ندهد. خوشبختانه، خطاهای پدید آمده هنگام استفاده از ساده سازی بالا، به طور کلی، در مقایسه با خطاهای آزمایش، بزرگ نیستند (۹). همچنین، هنگام استفاده از شدت NOE یا از سرعت رشد NOE برای تعیین فاصله، اغلب فرضیهایی در باره آسایش پروتونها به عمل می‌آید که ممکن است بر دقت تعیین فاصله اثر بگذارد (۹).

\* NOESY مخفف Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy است. - م.

می‌دهد. در مقابل، بین پروتونهای متیل تیمیدین و پروتونهای HA/H6 بقایای 5' و نه بقایای 3' پدیده NOE رخ می‌دهد. پس از گمارش ترتیب باز، می‌توان صورتبندی DNA را تعیین کرد.



شکل B مولکول DNA قند جمع شده C3'/C5' اندو



شکل A مولکول

شکل ۷. نمودار نشان دهنده صورتبندیهای قندها و موقعیت نسبی بازها در شکلهای A و B مولکول DNA. پروتونهای مورد نظر بر روی قند و بازها شماره گذاری شده‌اند و فاصله‌های بین پروتونها برحسب آنگستروم نشان داده شده است (برگرفته از مرجع ۱۰). در شکل B مولکول DNA، کربن شماره ۲ بالای صفحه حلقه قرار دارد و صورتبندی را C3'/C5' اندومی نامند، در حالی که در شکل A مولکول DNA کربن شماره ۳ در بالای صفحه حلقه قرار دارد و به C3'/C5' اندو شهرت دارد.

پروتئین، بیشتر تفاوت دارند تا صورتبندیهای DNA. گوناگونی خصیصه‌های ساختاری در پروتئینها، اغلب به کارگیری آزمایشهای NMR دیگری علاوه بر آزمایشهای NOESY و COSY را می‌طلبد.

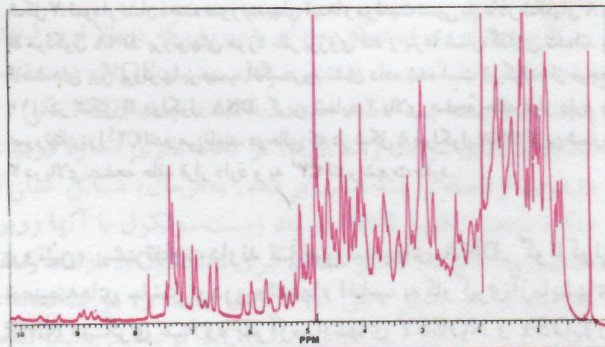
الگوی شدتهای NOE در شکل A، در مقایسه با شکل B مولکول DNA، متفاوت است (۱۰). مولکول DNA شکل A با جمع‌شدگی قند اندو C3' مشخص می‌شود و فاصله درون مولکولی H6 یا H8 با H2' (۳.۸ Å) در مقایسه با فاصله بین نوکلئوتیدی (۱.۷ Å)، بزرگتر است (شکل ۷) (۱۰). برای شکل B مولکول DNA، عکس این مطلب صادق است. تفاوت شدتهای بین تماسهای درون نوکلئوتیدی و بین نوکلئوتیدی میان پروتونهای H2' و H8 یا H6 باز، روش حساسی برای تشخیص تمایز بین مارپیچهای شکل A و شکل B در اختیار می‌گذارد.

ترتیبهای دارای پورینها و پیریمیدینهای متناوب می‌توانند مارپیچ دست چپی اختیار کنند و به شکل Z مولکول DNA شهرت دارند. پیریمیدینها دارای پیکربندی آنتی و جمع‌شدگی قند اندو C3' می‌باشند. پورینها دارای پیوند گلیکوزیدی سین و جمع‌شدگی قند اندو C3' هستند. بنا بر این، الگوی مشاهده شده برای تماسهای NOE با آنچه برای مارپیچهای دست راستی مشاهده شد تفاوت چشمگیری دارد و به سهولت با NMR قابل تشخیص است. اولیگونوکلئوتیدهای دارای شکل Z، در محلول، با شکل B در حال تعادل اند. تبدیل B به Z در چند پارهای کوتاه می‌تواند با تغییر ترتیب پیریمیدین-پورین با غلظت بالاتر نمک یا با افزایش متانول صورت گیرد (۱۱ و ۱۲). در چنین شرایطی تبادل بین شکلهای B و Z مولکول DNA آهسته می‌باشد و دو دسته پیام جداگانه، یکی برای شکل B و یکی برای شکل Z، مشاهده خواهد شد. آزمایش ۲D NOE، همچنین می‌تواند تبادل آهسته بین این اجزاء را رصد کند. پیکهای چلیپایی بین پروتونهای شکل B و پروتونهای مربوط در شکل Z پدیدار می‌شوند. برای مثال، در ترتیب ۲D (GCGCGC)، پروتون H8 گوانیدین 5' در شکل B یک پیک چلیپایی با پروتون H8 گوانیدین 5' در شکل Z نشان می‌دهد. بنا بر این، گمارش پروتونهای اولیگونوکلئوتید در شکل B به طور تصادفی پروتونهای همسان شکل Z را مشخص خواهد کرد (۸ و ۱۷). در حالی که این روش گمارش به خوبی کار می‌کند، دیگر شیوه‌های گمارش نیز امکان‌پذیر هستند که به تبادل بین شکلهای B و Z متکی نمی‌باشند (۱۳ و ۱۴).

مطالعات NMR بر روی DNA فقط به تعیین شکل DNA اولیگونوکلئوتید محدود نمی‌باشد. مطالعات برهم‌کنشهای دارو-DNA و برهم‌کنشهای پروتئین-DNA از قلمروهای دارای اهمیت روزافزون در NMR هستند. NMR می‌تواند اطلاعات مهمی در ساختار کمپلکسهای دارو-نوکلئوتید و در باره تغییرات

$${}^2J_{HH} = P_1 \cos^2 \phi_{HH} + P_2 \cos \phi_{HH} + P_3 + \sum \{P_4 + P_5 \cos^2(\epsilon_i \phi_{HH} + P_6 |\Delta X_i|)\}$$

پارامترهای  $P_1$  تا  $P_6$  با استفاده از شمار زیادی ثابت جفت شدن به صورت تجربی تعیین می‌شوند،  $\phi_{HH}$  زاویه پیچشی پروتون-پروتون است و عبارتهای  $\epsilon$  و  $X_i$  بیانگر اثر جهت گیری و الکترونکاتیوی استخلاف هستند. خوشبختانه، برنامه کامپیوتری PSEUROT که توسط لیو و آلتونا نوشته شده، از طریق مرکز تبادل برنامه شیمی کوانتومی در دسترس هست و محاسبات را به طور خودکار انجام می‌دهد (۴). تحلیل برون داد برنامه، بهترین برازش بین صورت بندی قند و جفت شدنهای سه پیوندی پروتون- پروتون را که به صورت تجربی تعیین شده‌اند، به دست می‌دهد. به طور نظری، می‌توان صورت بندی اسکلت قند- فسفات چندپارهای DNA و RNA را با تحلیل شبکه جفت شدن و اندازه ثابت جفت شدن تعیین کرد. در عمل، این کار حتی برای چندپارهای کوتاه نیز امکان پذیر نیست. خطوط رزونانسی پهن و پیچیدگی طیفهای DNA و پروتئین، اغلب مانع اندازه گیری ساده ثابت جفت شدن می‌شود. در شکل ۳، طیفی از زهر مار کبری- پروتئینی شامل ۷۱ آمینواسید- برای نمایش این نکته نشان داده شده است. طیف در  $43^\circ\text{C}$  با یک طیف سنج ۴۵۰ مگاهرتز ثبت شده است. شمار بسیار اندکی از جفت شدنهای جداگانه را به علت پیچیدگی طیف و افزایش پهنای خط می‌توان شناسایی کرد. مقایسه طیف تریتوفان با زهر مار کبری این نکات را بهتر نشان خواهد داد. به طور کلی، هنگامی که مولکولها بزرگتر می‌شوند، با سرعت کمتری در محلول می‌چرخند و این پدیده بر سرعت آسایش پروتونها اثر می‌گذارد. با گردآوری داده‌ها در دمای بالاتر ( $45^\circ\text{C}$ ) و با اعمال روشهای بهبود کیفیت تفکیک که منجر به تیز شدن خطها می‌شود، تا حدودی می‌توان این مسئله را حل کرد. در حقیقت، گمارش پروتون و تحلیل ساختار  $\alpha$ - بونگاروتوکسین، زهر دیگری



شکل ۳. طیف NMR پروتون زهر مار کبری. پیامهای پروتونها بهتر هستند و گستره بزرگتری از جاه جایی شیمیایی را نسبت به هر یک از آمینواسیدها اشغال می‌کنند. علت این امر آن است که در محلول، پروتئین با سرعت کمتری نسبت به مولکولهای کوچک آمینواسید می‌چرخد. حرکت مولکولی کندتر منجر به افزایش پهنای خط NMR شده و بر سرعت بازگشت پروتونها از حالت برانگیخته به حالت برانگیخته نشده اثر می‌گذارد. این اطلاعات می‌تواند در مطالعات حرکت مولکولی و دینامیک پروتئینها و DNA مفید باشد. طیف نشان داده شده با دستگاه NMR ۴۰۰-MHz و اریان در  $43^\circ\text{C}$  گرفته شده است. روشهایی برای بهبود تفکیک پیامها اعمال شده است.

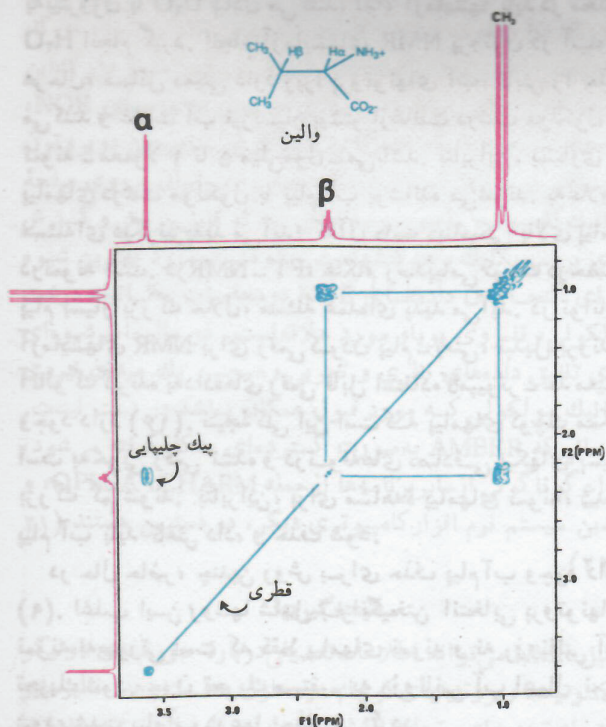
از مار کبری که دارای ۷۴ آمینواسید است، به تازگی گزارش شده است (۵ و ۶).

آسایش هسته‌ها و بازگشت به تعادل، پس از تحریک با یک تب فرکانس رادیویی، به صورت نمایی رخ می‌دهد. سرعت این پدیده با دو مکانیسم اصلی آسایش که دارای ثابت زمان  $T_1$  و  $T_2$  هستند، مشخص می‌شود (۷). زمان آسایش  $T_1$  بیانگر سرعتی است که هسته‌های تحریک شده به تعادل ترمودینامیکی باز می‌گردند (۸). پهنای خطهای طیفی با  $1/T_2$  متناسب است. بر اساس اصل عدم قطعیت، اگر زمان آسایش  $T_2$  بسیار کوتاه باشد، خطها پهن خواهند شد. درشت مولکولهایی که با سرعت کم می‌چرخند دارای زمان آسایش  $T_2$  کوتاه هستند. نمونه‌های جامد را می‌توان مثال نهایبی به حساب آورد که در آنها زمانهای آسایش در حدود میکروثانیه هستند و پهنای چند کیلو هرتز خطها نیز معمول است. نتیجه کلی این عامل و عاملهای دیگر، نظیر افزایش گر انرژی حلال، افزایش پهنای خط طیفی در طیف NMR زیست مولکولهاست. فرایندهای دینامیک گوناگون شامل حرکت مولکولی و تبادل شیمیایی نیز بر آسایش اثر گذاشته و فرایندهایی با سرعت حدود  $10^{-7}$  تا  $10^{-12}$  ثانیه به طور مستقیم بر  $T_1$  و  $T_2$  اثر می‌گذارند (۸).

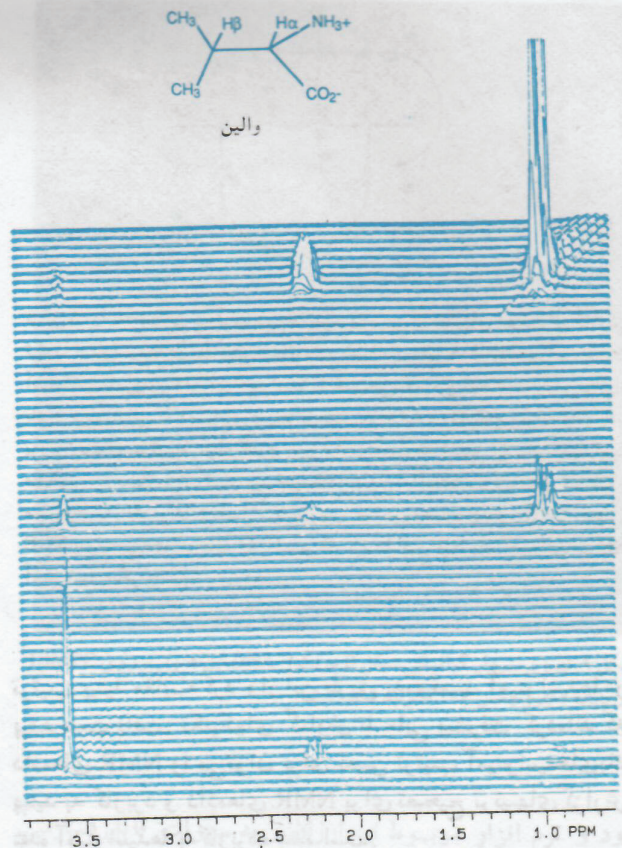
مسئله اصلی در تحلیل طیفهای NMR مولکولهای زیست شناختی، پیچیدگی طیفهاست. حتی اولیگونوکلئوتیدها و پپتیدهای کوتاه، اغلب دارای پیامهای همپوشیده هستند. برای برطرف کردن این مسائل و تحلیل طیفهای پپتیدها و اولیگونوکلئوتیدها، از طیف بینی دو بعدی NMR استفاده می‌شود.

#### طیف بینی دو بعدی NMR (۲D NMR)

امروزه، انواع گوناگونی از تکنیکهای ۲D NMR برای مطالعه درشت مولکولها در محلول به کار گرفته می‌شوند. همان طور که از نام این تکنیک بر می‌آید، در آزمایشهای دو بعدی، داده‌ها را در طول دو محور فرکانس، به جای یک محور، نمایش می‌دهند. داده‌های تولید شده از یک طیف دو بعدی، اغلب، به صورت نمودار کانتور نمایش داده می‌شود که در آن شدت رزونانسها با شمار ترازهای کانتور مشخص می‌گردد. بنابراین، نمایش داده‌ها به نقشه کانتور معمولی برای نشان دادن خصیصه‌های جغرافیایی شباهت دارد که در آن افزایش تراز کانتور به معنای افزایش بلندی است. یک طیف دو بعدی NMR در حقیقت شامل دسته‌ای از طیفهای تک بعدی است که بر روی هم چیده شده باشند. یک طیف دو بعدی «نمودار چیده شده» آمینواسید و این که نشان می‌دهد هر یک از طیفها متشکل از نمودار دو بعدی است، در شکل ۴ نمایش داده شده است. این طیف را با نمودار کانتور همان طیف در شکل ۵ مقایسه کنید. نمودار کانتور، طیف را چنان نمایش می‌دهد که گویی از بالا به آن نگریسته می‌شود. طیف تک بعدی نمونه در بالا و در کنار نمودار کانتور دو بعدی برای کمک به گمارش پیامها ترسیم شده است. طیف دو بعدی شامل نمایش قطری پروتئینی است که طی آزمایش دارای همبستگی چلیپایی نبوده‌اند. فرکانس یک پیک بر روی قطر، در هر دو بعد فرکانس ( $F_1$  و  $F_2$ )، یکسان است. برای نمونه، موقعیت قطری پروتون  $\alpha$  در  $366 \text{ ppm}$  در  $F_1$  و  $F_2$  واقع شده است. جفت شدن بین پروتونها با پیکهای چلیپایی خارج از قطر مشخص شده است.



شکل ۵. نمودار کانتور COSY برای والین. همان طیف دوبعدی نشان داده شده در شکل ۴ به صورت نمودار کانتور در آمده است. افزایش ترازهای کانتور به معنای افزایش بلندی است. پیکهای چلیپایی قطری و دور از قطر نشان داده شده‌اند.



شکل ۴. نمودار چیده شده COSY (طیف بینی همبسته) برای والین. هریک از طیفهای که مجموعه اطلاعات دوبعدی را پدید آورده، نشان داده شده است.

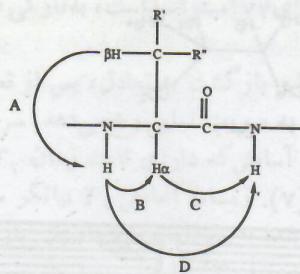
مورد فاصله بین هریک از پروتون‌ها را به دست نمی‌دهد. همین‌طور، طیفهای COSY، داده‌هایی در مورد اینکه کدام باز به یک قند یا کدام حلقه آروماتیک به یک زنجیر پپتید متصل است، پدید نمی‌آورد. چنین اطلاعاتی برای تعیین صورتبندی و ترتیب اولیگونوکلئوتیدها و پروتئینها در محلول ضرورت دارد. برای به دست آوردن اطلاعات مربوط به فاصله، تکنیک دیگری از NMR به کار گرفته می‌شود که از اثر هسته‌ای اورهاوزر\* (NOE) بهره می‌گیرد (۸).

معمولاً، دو نوع طیف NOE برای بررسی ساختار زیست مولکولی به کار برده می‌شود. طیفهای تفریقی NOE، طیفهای تک بعدی هستند که در آنها یک پروتون در مولکول به طور انتخابی با تابش دهی در فرکانس رزونانس آن برانگیخته می‌شود. انتقال انرژی به پروتونهای مجاور، هنگام بازگشت پروتونها به حالت پایه‌ای خود، با فرایندهای وابسته به زمان و فاصله صورت می‌گیرد. انتقال انرژی بین پروتونها به پیدایش اثر NOE منجر می‌شود. طیفهایی که در آنها پروتونها تحریک شده بودند از طیفهایی که در آنها برانگیختگی اعمال نشده بود کسر شده و یک طیف تفریقی پدید می‌آید. این تکنیک می‌تواند اطلاعات بسیار دقیقی در مورد فاصله به دست دهد (۹). دشواری این تکنیک در آن است که تابش دهی انتخابی یک پیک در طیفهای شلوغ درشت مولکولها دشوار و اغلب غیر ممکن است. به علاوه، تابش دهی هریک از پیامهای پروتونی فراوانی که

جفت شدن پروتونهای  $\alpha$  و  $\beta$  با دو پیک چلیپایی که به طور متقارن در دو طرف قطر قرار گرفته‌اند، نشان داده شده است. موقعیت پیک چلیپایی نسبت به هریک از بعدهای فرکانس متفاوت است. یک پیک چلیپایی در  $F_1$  بر روی  $2.25 \text{ ppm}$  و  $F_2$  بر روی  $3.6 \text{ ppm}$  واقع شده است در حالی که پیک چلیپایی دیگر در  $3.6 \text{ ppm}$  بر روی  $F_1$  و  $2.25 \text{ ppm}$  بر روی  $F_2$  قرار دارد. جایگیری متقارن پیکهای چلیپایی به گمارش طیفها کمک می‌کند زیرا هر زوج پروتون جفت شده را می‌توان با یک مربع که بین پیکهای قطری و پیکهای چلیپایی ترسیم می‌شود به هم متصل کرد. این نکته در شکل ۵ با مربعی که بین پروتون  $\beta$  و پروتونهای گروه متیل والین ترسیم شده، نمایش داده شده است. طیفهای نشان داده شده در شکلهای ۴ و ۵، طیفهای \* COSY هستند. COSY نام مصطلح طیف بینی همبسته است (۷). طیفهای COSY، اطلاعاتی در مورد الگوهای جفت شدن در یک مولکول به دست می‌دهند. هر آمینواسید در یک پپتید یا حلقه قند در یک اولیگونوکلئوتید دارای یک سیستم اسپین پروتونهاست که به هم دیگر جفت شده‌اند. مشخص کردن سیستمهای اسپین در پپتیدها و نوکلئوتیدها، شناسایی هریک از آمینو اسیدها و قندها را امکان پذیر می‌سازد. با وجود این، طیفهای COSY اطلاعاتی در

\* NOE مخفف Nuclear Overhauser Effect است. - ۴ -

\* COSY مخفف Correlated Spectroscopy است. - ۴ -



شکل A. رابطه متقابل پروتونها در يك پیوند پپتیدی. آزمایشهای مفید برای گمارش ترتیب آمینواسیدها در يك پپتید نشان داده شده‌اند. مسیر A، ارتباط بین پروتون  $\beta$  آمینواسید با پروتون NH آن آمینواسید را نشان می‌دهد. این اطلاعات را می‌توان از يك آزمایش رالی به دست آورد. يك آزمایش COSY در  $H_2O$  می‌تواند NH را با پروتون  $\alpha$  - مسیر  $\beta$  - مربوط کند و بدین ترتیب مجموعه اسپین را برای آمینواسید مشخص سازد. بالاخره، ترتیب آمینواسیدها در پپتید را با استفاده از داده‌های NOESY مسیرهای C و D، می‌توان تعیین کرد. پروتون  $\alpha$  آمینواسید به پروتون NH با مجاور NOE نشان می‌دهد - مسیر C. مسیر D، ارتباط بین NH يك آمینواسید و NH آمینواسید دیگر را نمایش می‌دهد.

ترتیب پپتید مقایسه کرد و از این طریق به موقعیت آمینواسیدها در پپتید دست یافت. تکنیکهای گمارش تا جایی پیشرفت کرده‌اند که داده‌های NMR را می‌توان برای تعیین ترتیب آمینواسیدهای يك پپتید به کاربرد و داده‌های NMR برای تصحیح ترتیبهای گزارش شده آمینواسیدها به کار برده شده است.

الگوهای متفاوت تا شدگی پپتیدها منجر به نزدیک شدن فضایی آمینواسیدهایی می‌شود که در ترتیب قرار گرفتن آنها روی زنجیر پپتید از هم دور هستند. داده‌های NOE به پیدا کردن نزدیکی این آمینواسیدها در فضا کمک می‌کند. اطلاعات مربوط به نزدیکی آمینواسیدها در فضا، همراه با داده‌های مربوط به ترتیب و جفت شدن پروتون می‌تواند در مجموع ساختار سه بعدی کلی پپتید را به دست دهد.

### الگوسازی کامپیوتر و تحلیل NMR

ساختن الگو، در فهم ما از ساختار درشت مولکولی، اهمیت فراوانی داشته است. پیچیدگی ساختار درشت مولکولی، تجسم آن را دشوار می‌سازد. الگوسازی کامپیوتری ساختار درشت مولکولی با استفاده از تکنیکهای گرافیک کامپیوتر به صورت وسیله ارزشمندی در تعیین ساختار درشت مولکولی در آمده است. چندین سیستم گرافیک کامپیوتر برای الگوسازی ساختار پروتئین و DNA در دست است. این سیستمها، از لحاظ کیفیت (و قیمت!) نمایش گرافیکی، بسیار تفاوت دارند. در شکل ۹ تصویر گرافیک کامپیوتری «انتهای پایین» شکل B مولکول DNA نشان داده شده است. این تصویر با استفاده از برنامه استیل (Still) به نام ماکرومدل بر روی کامپیوتر VAX۷۸۵ بازسازی شده است. تصویر بر روی يك کامپیوتر شخصی IBM که از نرم افزار پایانه تکترونیکس ۴۱۰۷ استفاده می‌کند نمایش داده شده است. گرچه کیفیت گرافیک با کیفیت پایانه گرافیک تفکیک بالا قابل مقایسه نیست، نمایش یقیناً دارای کیفیت کافی هست تا به صورت وسیله‌ای مفید برای تحلیل ساختار به کار

به نیتروژن با  $D_2O$  تبادل می‌کنند، لذا، آزمایشها باید در محلول  $H_2O$  انجام گیرد. انجام آزمایشهای NMR پروتون در آب، به هر حال، مسائل معینی دارد زیرا پروتونهای آب، تابش را جذب می‌کنند و غلظت آب نیز بسیار بیشتر از غلظت درشت مولکول در نمونه - معمولاً ۱ تا ۵ میلی‌مول - می‌باشد. بنابراین، بسیاری از پیامهای درشت مولکول با پیام آب پوشانده می‌شوند. به علاوه، مسئله‌ای دیگر نیز پدید می‌آید؛ که آن دامنه دینامیکی بالای پیامها در نمونه است. در FT-NMR، هنگام رصدیامی کوچک در حضور پیام بسیار بزرگ حلال، مسئله عمده‌ای پدید می‌آید. در توانایی آزمایشهای NMR برای رقمی کردن پیام - یعنی، تبدیل پرونداد آنالوگ گیرنده به داده‌های رقمی قابل استفاده کامپیوتر - حد معینی وجود دارد (۱۶). نتیجه کلی این است که پیامهای کوچک ممکن است به خوبی رقمی نشده و در نوفه‌های تصادفی پیکهای بسیار بزرگ گم شوند. بنابراین، برای مشاهده پیامهای نمونه، شدت پیام آب باید کاهش داده و حذف شود.

در حال حاضر، چندین روش برای حذف پیام آب وجود دارد (۹). اغلب این روشها شامل برانگیختن انتخابی پروتونهای نمونه به صورتی است که فقط پیامهای نمونه و نه رزونانس آب تحریک شود. چون تحریک مستقیم به رزونانس آب اعمال نمی‌شود، شدت پیام آب در عمل حذف می‌گردد.

مشاهده پروتونهای نیتروژن در نمونه‌های آبی، امکان گمارش ترتیبی استخوانبندی پپتید را می‌دهد. در اصل، پروتونهای  $\alpha$  می‌توانند از طریق طیفهای COSY، به پروتونهای  $\beta$  مربوط شوند. نخستین گمارش پروتئینها فقط با استفاده از داده‌های COSY و NOE انجام گرفت؛ به هر حال، همپوشانی زیاد بین پروتونهای  $\alpha$  در پپتیدهای بزرگ، گمارش را دشوار خواهد ساخت (۸). نوع دیگری از آزمایش دوبعدی NMR، یعنی آزمایش رالی (RELAY)، به طور گسترده‌ای در گمارش پپتیدها، برای جلوگیری از رویاروشدن با این مسئله، به کار می‌رود. در آزمایش رالی، پیکهای چلیپایی نه تنها بین پروتونهایی که مستقیماً جفت شده‌اند، بلکه، همچنین، بین پروتونهایی که به طور مستقیم جفت نشده‌اند نیز رخ می‌دهد. در استخوانبندی پپتید، پروتون روی نیتروژن با پروتونهای  $\alpha$  جفت شده و پروتونهای  $\alpha$  نیز با پروتونهای  $\beta$  جفت شده‌اند. بنابراین، در چنین تحلیلی دو دسته پیکهای چلیپایی COSY بین NH و پروتونهای  $\alpha$  و بین پروتونهای  $\alpha$  و  $\beta$  پدید می‌آید. در آزمایش رالی، يك پیک چلیپایی اضافی بین پروتونهای  $\beta$  و پروتون دوردست NH رخ خواهد داد (۸). این آزمایش، امکان گمارش مستقیم زنجیرهای جانبی آمینواسیدها به NH يك پیوند پپتیدی، حتی در صورتی که پروتونهای  $\alpha$  قابل مشاهده نباشند، را فراهم می‌سازد. با استفاده از این داده‌ها و داده‌های NOESY، می‌توان گمارش ترتیب آمینواسیدها را عملی ساخت. پروتون  $\alpha$  آمینواسید به پروتون NH بقایای آمینواسید بعدی، NOE نشان خواهد داد. NOE‌های بیشتری نیز ممکن است بین پروتونهای  $\beta$  يك آمینواسید و NH آمینواسید مجاور، همچنین، بین دو پروتون NH مشاهده شود. در شکل ۸ پیوستگیهای پیش بینی شده بین آمینواسیدهای مجاور در COSY، RELAY، و NOE نمایش داده شده است. با استفاده از این اطلاعات، ترتیب آمینواسیدها را می‌توان پیدا کرد و با

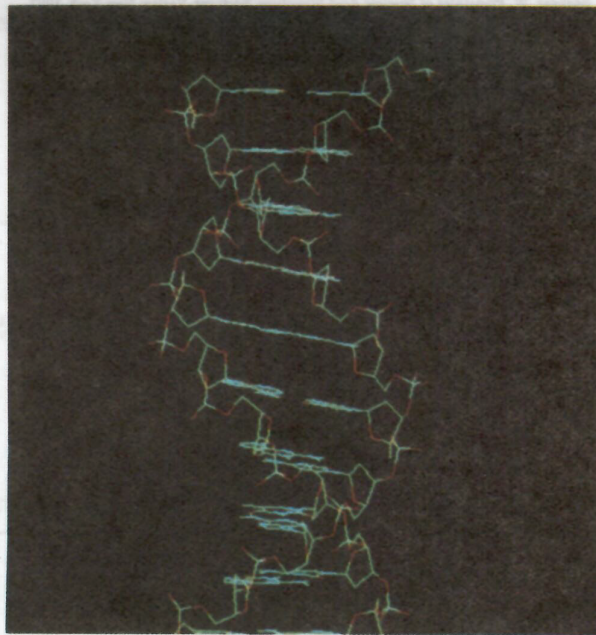
می دهد. داده های مربوط به فاصله بین پروتونها که با آزمایشهای دقیق NOE به دست آمده باشد به کامپیوتر داده می شود، آن گاه محاسبات برای دقیق کردن ساختار به عمل می آید. امتیاز بزرگ این تکنیک تحلیلی آن است که داده های حاصل از تماسهای NOE، داده های محلول هستند و میانگین نزدیکترین تماس بین دو پروتون را منعکس می سازند. سپس، ساختار حاصل را می توان بر روی صفحه گرافیک کامپیوتر، به صورت سه بعدی دید که قابل چرخش و گسترش برای بررسی یکایک برهم کنشهاست. پژوهش در مورد بهترین شیوه برای گنجاندن داده های NOE در محاسبات مکانیک درشت مولکولی، قلمروی پویا و مورد علاقه است. در حال حاضر شیوه ای برای تلفیق داده های نظری و تجربی و همچنین یک میدان نیروی مکانیک مولکولی که مورد قبول همگان باشد در دست نیست. در حالی که AMBER به صورت گسترده ای به کار گرفته می شود، انواع گوناگونی از سایر برنامه ها از جمله CHARM، OPLSA، و چندین سیستم نرم افزار کامپیوتری دیگر، در دسترس هستند (۲۱ و ۲۲).

### نتیجه گیریها

تحلیل NMR می تواند اطلاعات تفصیلی درباره صورتبندی اولیه نوکلئوتیدها و پروتئینهای کوچک در محلول به دست دهد. نظیر سایر روشهای تجزیه ای، تحلیل NMR نیز دارای کاربردهایی محدودی است. در حال حاضر، اطلاعات تفصیلی را فقط درباره اولیه نوکلئوتیدها و پروتئینهای کوچک با وزن مولکولی ۱۵۰۰۰ دالتون یا کمتر می توان به دست آورد (۶). البته، این محدودیت نمی تواند مانع مطالعه سیستمهای بزرگتر شود، اما کیفیت داده ها با افزایش اندازه مولکولی کاهش می یابد. محدودیت دیگر این است که NMR، به نسبت، یک روش تجزیه ای دارای حساسیت کم است. حتی قدرتمندترین دستگاههای NMR به غلظتهای حدود میلی مول از نمونه نیاز دارند. بنابراین، مسئله های مربوط به تجمع درشت مولکولها وجود دارد.

تحلیل NMR، علی رغم این محدودیتها، به صورت ابزاری معمول برای بررسی ساختار درشت مولکولهای کوچک در محلول در آمده است. خصیصه منحصر به فرد این روش آن است که اطلاعاتی درباره ساختار مولکول در محلول به دست می دهد. NMR، همچنین، روشی عالی برای کشف پویایی پروتئینها و DNA در اختیار می گذارد. آینده برای آزمایش نوکلئیک اسیدها و پروتئینها با NMR درخشان است. تکنیکهای جدید NMR دوبعدی به صورت مستمر برای ساده سازی تحلیل طیفهای پیچیده NMR به کار گرفته می شوند. در واقع، اخیراً تکنیکی برای انجام آزمایشهای سه بعدی NMR برای کمک به تحلیل ساختار پروتئینها معرفی شده است (۱۶). تکنیکهای تجربی جدید، همراه با کامپیوترهای توانمندتر و دستگاههای NMR دارای میدان مغناطیسی بالاتر، بدون تردید، کاربردهایی این تکنیک را در آینده گسترش خواهد داد. ترجمه عیسی یآوری

• Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Biochemistry  
Steve Cheatham  
*Journal of Chemical Education*, February 1989



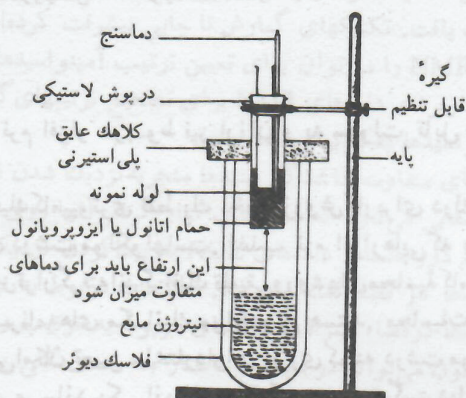
شکل ۹. تصویر نمودار گرافیکی شکل B مولکول DNA. این تصویر بر روی IBMPC در پایانه تکترونیکس ۴۱۰۷ تولید شده است.

رود و نرم افزار مربوط نیز ارزان و به سهولت قابل دسترسی است.

گرافیک کامپیوتری فقط یک بخش از روش کار برای درک ساختار سه بعدی درشت مولکولهاست. اغلب نرم افزارهایی که به تازگی در دسترس قرار گرفته اند گرافیک تلفیقی و روشهای محاسبه کامپیوتری شامل برنامه های مکانیک مولکولی هستند. محاسبات مکانیک مولکولی امکان تعیین ساختار دارای انرژی کمینه درشت مولکولها را فراهم می سازد. یکی از برنامه هایی که به صورت گسترده ای برای محاسبه انرژی درشت مولکولها به کار رفته برنامه AMBER می باشد (۱۹). بسیاری از نرم افزارها امکان گنجاندن مستقیم محدودیتهای فاصله ای به دست آمده از داده های NOE در محاسبه را می دهند. بنابراین، می توان داده های به دست آمده از NMR در باره فاصله پروتونها را برای محدود ساختن پروتئینهای معینی در فاصله ای ثابت در واقع محدود ساختن پروتئینهای معینی در با این کار، پروتئین یا DNA، چنان محدود می شود که محاسبات نتواند آن پروتونها را به صورت چشمگیری از مقادیر به دست آمده تجربی جا به جا کند ولی بتواند ساختار را در انرژی کمینه - یعنی محتملترین انرژی - تثبیت کند. مسئله ای که این روش تحلیل دارد این است که اساساً درشت مولکول را به صورت یک ساختار ایستا در نظر می گیرد. در محلول، مولکولها و اتمهای تشکیل دهنده آنها در حرکت دائمی هستند. بنابراین، استدلال شده است که روش بهتر برای الگوسازی سیستمهای درشت مولکولی، استفاده از محاسبات دینامیک محدود شده مولکولی است (۲۰). محاسبات دینامیک محدود شده مولکولی، امکان شبیه سازی حرکت مولکولی در درشت مولکول و پالایش ساختار مولکول جهت سازگارش با داده های تجربی NMR را

1. Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer-Verlag: New York, 1987.
2. Karplus, M. *J. Chem. Phys.* 1959, 30, 11.
3. Rinkel, L. J.; Altona, C. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1987, 4, 621.
4. Quantum Chemistry Program Exchange, Department of Chemistry, Indiana University: QCPE Program number 463.
5. Basus, V. J.; Billeter, M.; Love, R. A.; Stroud, R. M.; Kuntz, I. D. *Biochemistry* 1988, 27, 2763.
6. Basus, V. J.; Scheek, R. M. *Biochemistry* 1988, 27, 2772.
7. Crossman, W. R.; Carlson, R. M. K., Eds. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*; VCH: New York, 1987.
8. Wurthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
9. Gronenborn, A. M.; Clore, G. M. *Prog. NMR Spectros.* 1985, 17, 1.
10. Hasnoot, C. A. G.; Westernh, H. P.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1984, 2, 345.
11. Feigon, J.; Wang, A.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Nucl. Acids Res.* 1984, 12, 1243.
12. Cavailles, J. A.; Neumann, J. M.; Taboury, J.; d'Estaintot, L.; Huynh-Dinh, T.; Igoien, J.; Tran-Dinh, S. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1984, 1, 1347.
13. Genest, D.; Mazeau, K.; Ptak, M. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 1987, 5, 67.
14. Orbons, L. P. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Altona, C. *Eur. J. Biochem.* 1986, 160, 131.
15. Cheatham, S.; KooE, A.; Hurley, L.; Barkley, M. D.; Remers, W. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 583.
16. Lindon, J. C.; Ferrige, A. G. *Progr. NMR Spectros.* 1990, 14, 27.
17. Strop, P.; Wider, G.; Wurthrich, K. *J. Mol. Biol.* 1983, 166, 641.
18. Wemmer, D. E.; Kumar, N. V.; Mettrione, R. M.; Lazdunski, M.; Drobny, G.; Kallenbach, N. R. *Biochemistry* 1986, 25, 6842.
19. Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. *J. Comp. Chem.* 1986, 7, 230.
20. Clore, G. M.; Gronenborn, A. M.; Brunger, A. T.; Karplus, M. *J. Mol. Biol.* 1985, 186, 435.
21. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olason, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* 1983, 4, 187.
22. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1657.
23. Griesinger, C.; Sorensen, O. W.; Ernst, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 7227.

### يك دستگاه ساده برای ایجاد دمای پایین



دما یکی از مهمترین پارامترهای مؤثر در فرایندهای فیزیکی و شیمیایی است. بنابراین لازم است که این فرایندها در دمای ثابت انجام شوند. به علاوه، در طی یک بررسی وابسته به دما، رسیدن به دماهای مختلف نیز مورد نظر است.

دماهای عادی و بالاتر، معمولاً با به کار بردن حمامهایی که گرمای آنها با برق تنظیم می شود، قابل حصول است. همچنین استفاده از یک حمام آبیخ برای ایجاد  $0^{\circ}\text{C}$  نسبتاً آسان است. اما برای ایجاد دماهای پایین، کنترل کننده های واقعاً پرهزینه و ویژه ای استفاده می شوند. ما، ترتیبی ساده و کم هزینه برای ایجاد دماهای پایین با حجمهای کوچک، پیشنهاد می کنیم. این دستگاه در شکل مقابل نشان داده شده است. دستگاه شامل یک فلاسک دیوتر به طول 30 cm و قطر 10 cm می باشد.

حدود یک سوم فلاسک، با نیتروزن مایع پر شده و با یک کلاهک مناسب، از جنس پلی استیرن پوشیده می شود. یک لوله شیشه ای یکنواخت به طول 15 cm و قطر 5 cm به عنوان حمامی استفاده می شود که یک سوم آن توسط مایعی با نقطه انجماد پایین، مثل اتانول یا ایزوپروپانول پر شده است. این لوله، به یک پایه قابل تنظیم، محکم بسته شده و از طریق کلاهک پلی استیرن، در فلاسک دیوتر آویزان است. باید مطمئن شد که نیتروزن قابل ملاحظه ای به بیرون نشت نمی کند. این حمام لوله ای شکل، با یک درپوش لاستیکی پوشانده می شود. لوله نمونه و دماسنج، از طریق درپوش لاستیکی به داخل حمام فرو برده می شوند. باید به جای دماسنج شیشه ای از یک دماسنج مقاوم استفاده شود. دماسنج شیشه ای، اگر مستقیماً در داخل لوله نمونه، گذاشته شود، ممکن است به عنوان بهم زن عمل نماید. دمای حمام، به فاصله میان حمام و سطح نیتروزن مایع بستگی دارد. اگر سیستم، در مقابل اتلاف نیتروزن، به خوبی محافظت شود، برای مدت 2 تا 3 ساعت، تغییر سطح قابل توجهی مشاهده نخواهد شد. معمولاً 15 دقیقه طول می کشد تا نمونه به دمای ثابتی برسد. کاهش فاصله بین حمام و سطح نیتروزن، دما را کاهش می دهد. هنگامی که دماهای متفاوتی مورد نیاز باشد، به منظور داشتن نتایج بهتر و سریعتر، در جهت کاهش دما پیش روید. این دستگاه، برای تعیین انحلال پذیری برخی نمونه های مایع، قبل از بررسی های NMR در دمای پایین، استفاده شده است. این دستگاه می تواند در آزمایشگاههای آموزشی، کاربرد زیادی داشته باشد. همچنین در بررسی های زیست شناختی، که اعمال کنترل شده دمای پایین، بر نمونه لازم باشد، می تواند مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهشهای ابرسانایی و گستره وسیعی از پژوهشهای شیمی، نیز ممکن است به خوبی کاربردهایی پیدا کند. به هر حال این دستگاه می تواند دماهای نسبتاً ثابتی را در گستره  $140^{\circ}\text{K}$  تا  $265^{\circ}\text{K}$  فراهم آورد.

ترجمه محمدجلال الدین طهوریان