

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# دانشگاه پیام نور

پایان نامه  
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد  
در رشته بیوشیمی

دانشکده علوم  
گروه زیست شناسی

تعیین ترکیب گلیکوزیلاسیون در گلیکوپروتئین  
هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا

استاد راهنما: دکتر معصومه توسی خیری

استاد راهنمای همکار: دکتر حبیب‌الله ناظم

استاد مشاور: دکتر بهرخ فرمند

نگارش: خدیجه شیرمحمدی

مرداد ۱۳۸۸



انواع گلیکوزیلاسیون تقسیم بندی گلیکوپروتئین‌ها و	۲-۲-۲
.....	۷
نوع گلیکوزیلاسیون از	۲-۲-۲-۱
.....	O
.....	۸
گلیکوزیلاسیون در شبکه‌ی آندوپلاسمی	۲-۲-۲-N
.....	(ER)
.....	۹
پردازش گلیکان در شبکه‌ی آندوپلاسمی	۲-۲-۲-۱
.....	۱۰
نقش گلیکوزیلاسیون در شبکه‌ی آندوپلاسمی	۲-۲-۲-۲
.....	۱۰
گلیکوزیلاسیون و تا خوردگی پروتئین در شبکه‌ی آندوپلاسمی	۲-۲-۲-۳
.....	۱۱
تأثیر بخش‌های قندی روی ویژگی گلیکوپروتئین‌ها	۲-۲-۳
.....	۱۲
نقش بخش‌های قندی در اندرکنش سلول- سلول و سلول - ماتریکس	۲-۳-۱
.....	۱۳
نقش بخش‌های قندی در جهت‌گیری پروتئین‌ها به ارگانل‌های گوناگون	۲-۳-۳
.....	۱۳
نقش قندها در انتقال مواد	۲-۳-۴
.....	۱۴
نقش قندها در تنظیم فعالیت هورمونی و آنزیمی	۲-۳-۵
.....	۱۴
نقش بخش‌های قندی در محافظت پروتئین‌ها در برابر پروتئولیز	۲-۳-۶
.....	۱۴

۲-۲-۳-۷- اثر بخش کربوهیدراتی در پایداری گلیکوپروتئین-ها	۱۵
۲-۲-۳-۸- اثر بخش کربوهیدراتی در حلالیت پروتئین-ها	۱۵
۲-۲-۳-۹- مثال‌هایی از مطالعات تأثیر بخش قندی روی ویژگی پروتئین‌ها	۱۵
۲-۳-۳- ویروس‌ها و گلیکوزیلاسیون	۱۷
۲-۳-۱- گلیکوزیلاسیون و چرخه‌ی زندگی ویروس	۱۷
۲-۳-۲- گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های ویروس	۲۰
۲-۳-۱- N-linked گلیکوزیلاسیون	۲۰
۲-۴-۲- ساختار کلی و اعمال گلیکوپروتئین هم‌گلوتینین ویروس آنفلوانزا	۲۴
۲-۴-۱- ساختار HA طبیعی	۲۴
۲-۴-۲- پیوند به رسپتور	۲۶
۲-۴-۳- فیوژن غشایی	۲۸

۲-۴-۳-۱- ساختار هم‌گلوتینین در pH فیلوژن	۲۸
غشایی.....	
۲-۴-۳-۲- واکنش بین HA و غشاهای سلولی و نقش آن در پیشرفت فیلوژن غشایی.....	۳۱
۲-۴-۴- ساختار HA کمپلکس شده با یک آنتی‌بادی خنثی-کننده	۳۳
.....	
۲-۵- بخش کربوهیدراتی هم‌گلوتینین ویروس آنفلوانزا.....	۳۵
.....	
۲-۵-۱- سایت‌های گلیکوزیلاسیون هم‌گلوتینین.....	۳۷
.....	
۲-۵-۱-۱- نقش‌های مختلف سایت‌های گلیکوزیلاسیون حفاظت شده‌ی HA	۳۸
.....	
۲-۵-۱-۲- نقش‌های مختلف سایت‌های گلیکوزیلاسیون ناحیه‌ی سر هم‌گلوتینین.....	۴۰
.....	
۲-۵-۲- اهمیت گلیکوزیلاسیون هم‌گلوتینین برای فعالیت‌های بیولوژیکی ویروس آنفلوانزا.....	۴۱
.....	
۲-۵-۲-۱- گلیکوزیلاسیون و اثر پروتئازها روی هم‌گلوتینین.....	۴۲
.....	
۲-۵-۲-۲- گلیکوزیلاسیون و اثر آن روی اتصال به رسپتور و ره‌ایش ویروس.....	۴۳
.....	
۲-۵-۲-۳- گلیکوزیلاسیون و اثر آن روی فعالیت آنتی‌ژن-آنتی‌بادی هم‌گلوتینین.....	۴۵
.....	
۲-۵-۲-۴- گلیکوزیلاسیون و اثر آن روی فعالیت فیلوژن هم‌گلوتینین.....	۴۵
.....	
۲-۵-۲-۵- گلیکوزیلاسیون و اثر آن روی تا‌خوردگی هم‌گلوتینین.....	۴۶
.....	
۲-۵-۲-۶- اثر گلیکوزیلاسیون روی اندرکنش فاکتور ایمنی.....	۴۶
.....	



- ۳-۱-۱-۲- روش فعال سال کردن لوله‌ی دیالیز.....  
 ۶۰.....
- ۳-۱-۱-۳- روش تغلیظ.....  
 ۶۰.....
- ۳-۲- تعین غلظت پروتئین.....  
 ۶۱.....
- ۳-۲-۱- روش اصلاح ششدهی لوری: پترسون.....  
 ۶۱.....
- ۳-۲-۱-۱- وسایل مورد نیاز.....  
 ۶۲.....
- ۳-۲-۱-۲- محل‌هول‌های مورد نیاز.....  
 ۶۲.....
- ۳-۲-۱-۲-۱- تهیه محل‌هول C.T.C.....  
 ۶۳.....
- ۳-۲-۱-۲-۲- تهیه محل‌هول A.....  
 ۶۳.....
- ۳-۲-۱-۲-۳- تهیه محل‌هول B.....  
 ۶۳.....
- ۳-۲-۱-۲-۳- روش کار.....  
 ۶۳.....
- ۳-۲-۲- چند نکته مهم در مورد روش لوری.....  
 ۶۵.....

۳-۳- تست هماگلوتیناسیون HA (Hemagglutination test) assay

۶۵.....

۳-۳-۱- وسایل و مواد

لازم.....

.....

۶۵..

۳-۳-۲- روش کار

.....

.....

۶۶.....

۳-۴- استخراج گلیکوپروتئین های سطحی پوشش ویروس

آنفلوانزا.....

۶۷.....

۳-۴-۱- وسایل و مواد

لازم.....

.....

۶۷.....

۳-۴-۱-۱- بافر TES pH

7.4.....

۶۷.....

۳-۴-۱-۱- روش تهیه

buffer.....

۶۷.....

۳-۴-۱-۲- بافر استخراج 7.4 pH Extraction buffer

.....

۶۸.....

۳-۴-۱-۲- روش تهیه بافر

استخراج.....

۶۸.....

۳-۴-۲- روش استخراج گلیکوپروتئین

.....

۶۸.....

۳-۴-۳- تغلیظ محلول حاوی

گلیکوپروتئین.....

۷۱.....

Western Blot و SDS-PAGE - ۵-۳

.....  
۷۱.....

SDS- -۱-۵-۳

.....PAGE

.....  
۷۱.....

SDS-PAGE -۱-۱-۵-۳ مواد و وسایل مورد نیاز برای

.....  
۷۲.....

SDS-PAGE -۲-۱-۵-۳ محلول‌های مورد استفاده در الکتروفورز

۷۲.....

SDS-PAGE -۱-۲-۱-۵-۳ بافر

..... نمونه

.....  
۷۲.....

Separating یا Resolving ژل برای 1.5 M بافر -۲-۲-۱-۵-۳

۷۳.....

Stacking ژل 0.5 M بافر -۳-۲-۱-۵-۳

.....  
۷۳.....

Running buffer -۴-۲-۱-۵-۳

.....  
۷۴.....

30% تهیه اکریلامید و بیس اکریلامید -۵-۲-۱-۵-۳

.....  
۷۴.....

0.05 % رنژ کوماسی بلو -۶-۲ -۱-۵-۳

.....  
۷۴.....

SDS-PAGE مام انج روش -۳-۱-۵-۳

.....  
۷۴.....

SDS-PAGE -۲-۵-۳ وس

..... بلات

.....  
۷۵.....

Western blot مواد و وسایل مورد نیاز برای	۳-۲-۱-۵	۷۵
.....		
محل‌های مورد نیاز برای وسترن	۳-۲-۲-۵	۷۶
.....		
Blotting buffer بـلـوتـینـگ	۳-۲-۲-۱-۵	۷۶
.....		
PH 7.5 TBS بـلـوتـینـگ	۳-۲-۲-۲-۵	۷۶
.....		
washing TBS - T یـا مـحـلـول	۳-۲-۲-۵-۳	۷۶
.....		
blocking BSA / TBS - T یـا مـحـلـول	۳-۲-۲-۴-۵	۷۶
.....		
Panceau S مـحـلـول پـانـسـو	۳-۲-۲-۵-۵	۷۶
.....		
Western blotting اـنـجـام رـوش	۳-۲-۵-۳	۷۷
.....		
انتقال یا ترانسفرکردن پروتئین‌ها از ژل به	۳-۲-۳-۱-۵	۷۷
غشاء		
نیتروسولولز		
.....		
مشاهدی باندهای	۳-۲-۲-۵-۳	۷۷
.....		
پروتئینی		
.....		
HA واکشنش تأیید کننده باندها	۳-۲-۳-۵-۳	۷۷
.....		
نکاتی که در هنگام وسترن بلات باید مورد توجه	۳-۲-۴-۵	۷۸
قرار		
گیرد		
.....		

۳-۶- رنگ آمیزی (PAS) Schiff- periodic acid مخصوص گلیکوپروتئین-ها ۷۹.....

۳-۶-۱- محل هـ و مواد مورد نیاز.....  
۸۰.....

۳-۶-۱-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه معرف Schiff.....  
۸۰.....

۳-۶-۱-۲- روش تهیه معرف Schiff.....  
۸۰.....

۳-۶-۲- روش رنگ آمیزی گ-.....  
۸۱.....

۳-۷- electroelution گلیکوپروتئین از ژل.....  
۸۱.....

۳-۷-۱- revers staining.....  
۸۲.....

۳-۷-۱-۱- محل هـ ی مواد مورد نیاز.....  
۸۲.....

۳-۷-۱-۱- روش تهیه ی محل هـ ایمیدازول.....  
۸۲.....

۳-۷-۱-۲- روش رنگ آمیزی گ-.....  
۸۲.....

۳-۷-۲- الکتروالوشن.....  
۸۲.....

- ۳-۷-۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز.....  
 ۸۲.....
- ۳-۷-۲-۲- روش کار.....  
 ۸۲.....
- ۳-۷-۲-۳- رسوب دادن گلیکوپروتئین.....  
 ۸۳.....
- ۳-۷-۲-۳-۱- مواد لازم.....  
 ۸۳.....
- ۳-۷-۲-۳-۲- روش کار.....  
 ۸۳.....
- ۳-۸-۱- دگلیکوزیلاسیون گلیکوپروتئین با trifluoromethanesulphonic acid (TFMS).....  
 ۸۳.....
- ۳-۸-۱-۱- مواد و وسایل مورد نیاز.....  
 ۸۵.....
- ۳-۸-۱-۲- روش کار.....  
 ۸۵.....
- ۳-۸-۲-۱- دگلیکوزیلاسیون یون.....  
 ۸۵.....
- ۳-۸-۲-۲- خنثی کردن TFMS اضافه.....  
 ۸۵.....
- ۳-۸-۲-۳- جدا کردن پلیپپتید از قندها.....  
 ۸۶.....

۳-۹- کروماتوگرافی لایه نازک	قندها	۸۶
۳-۹-۱ مواد و وسایل مورد	نیاز	۸۶
۳-۹-۲ روش	کار	۸۶
۳-۹-۲-۱ تهیه	حلال	۸۶
۳-۹-۲-۲ تهیه معرف شش	ساگر	۸۶
۳-۹-۲-۳ تهیه محلول قندهای	استاندارد	۸۷
۳-۹-۲-۴ روش انجام کروماتوگرافی		۸۷
<b>فصل چهارم</b>		
<b>نتایج</b>		
۴-۱- تعیین تیتروسیروس با روش Hemagglutination assay		۸۸
۴-۲- تعیین غلظت پروتئین ویروس		۸۸
۴-۳- تعیین مقادیر بافر استخراج و دترجنت OCG		۹۰
۴-۴- الکتروفورز SDS-PAGE	نتایج	۹۰

۴-۵ - نتایج مربوط به وسترن-

.....  
.....

۹۲

۴-۶ - نتایج مربوط به Revers staining

.....  
.....

۹۳

۴-۷ - نتایج SDS-PAGE بعد از

الکتروالوژن.....  
.....

۹۴

۴-۸ - نتایج مربوط به کروماتوگرافی لایه‌ی نازک

.....  
.....

۹۵

فصل پنجم  
بحث و نتیجه‌گیری  
فصل ششم  
منابع

فهرست جداول

..... عنوان

.....

..... صفحه

جدول ۱-۲- مقایسه‌ی ویژگی‌های سه نوع ویروس آنفلوانزا (A, B, C) ..... ۴

جدول ۱-۴- مقادیر جذب خوانده شده توسط دستگاه ELISA reader Anthos 2020 ..... ۸۸

جدول ۲-۴- میانگین جذب نوری ..... ۹۴

محل .....  
استاندارد .....  
..... ۸۹

جدول ۳-۴- مقادیر RF قندها با توجه به کروماتوگرام قندهای آمینی و خنثی ..... ۹۶

## فهرست تصاویر

عنوان.....	.....
.....	.....
صفحه.....	.....
شکل ۱-۲. مقایسه شکل ساختمانی سه نوع ویروس آنفلوانزا (A, B, C).....	.....
شکل ۲-۲. تصویر سه بعدی ویروس آنفلوانزا.....	.....
.....	.....
شکل ۲-۳. توالی اسیدهای آمینه در محل اتصال زنجیره گلیکانی به پروتئین در N-گلیکوزیلاسیون.....	.....
شکل ۲-۴. O-گلیکوزیلاسیون.....	.....
.....	.....
شکل ۲-۵. N-گلیکوزیلاسیون در یوکاریوت ها.....	.....
.....	.....
شکل ۲-۶. دولیکول دی فسفات الیگوساکارید.....	.....
.....	.....
شکل ۲-۷. مسیر پردازش گلیکان در شبکه آندوپلاسمی و نحوه تاخوردگی گلیکوپروتئین.....	.....
شکل ۲-۸. فرآیند N-گلیکوزیلاسیون و کنترل آن به وسیله ی فعالیت های آنزیمی.....	.....
شکل ۲-۹. مسیر بیوسنتز برای ادامه گلیکوزیلاسیون N-linked در دستگاه گلژی.....	.....
شکل ۲-۱۰. انواع مختلف ساختار های گلیکانی N-linked.....	.....
.....	.....
شکل ۲-۱۱. هتروژنیته ناشی از شاخه دار شدن زنجیره های گلیکانی.....	.....
.....	.....

.....	شکل ۲-۱۲. ترايمر هماگلوتينين HA0
.....	.....
.....	شکل ۲-۱۳. ساختار هماگلوتينين متصل به غشاء دو لايه‌ی فسفوليپيدي و ڤروس.....
.....	شکل ۲-۱۴. نحوه اتصال اسيدآمينه‌های جايگاه ڤيوند به رسپتور در هماگلوتينين به سياليک اسيد.....
.....	شکل ۲-۱۵. نقش ڤپتيد فيوژن در فيوژن غشايي.....
.....	.....
.....	شکل ۲-۱۶. مکانيسم انجام فيوژن غشايي.....
.....	.....
.....	شکل ۲-۱۷. چپ) آنتی بادی خنثی کننده F10 کمپلکس شده با ترايمر هماگلوتينين H5، راست) کمپلکس آنتی بادی با مونومر هماگلوتينين H5.....
.....	.....
.....	شکل ۲-۱۸. انواع واحدهای مونوساکاريدی موجود در زنجيره های جانبي اليگوساکاريدی تايپ I و تايپ II هماگلوتينين.....
.....	.....
.....	شکل ۲-۱۹. موتانت‌های GG1 و GG2 و GG1,2.....
.....	.....
.....	شکل ۲-۲۰. تنظيم اتصال و رهائش ڤروس به وسيله گليکوزيلاسيون HA و فعاليت نورامينيداز.....
.....	شکل ۲-۲۱. اندرکنش بين قسمت گليکاني گليکوپروتئين‌های ڤروس و مولکول‌های شناسايی کربوهيدرات.....
.....	.....
.....	شکل ۲-۲۲. اندرکنش HA و NA ڤروس آنفلوانزا با گليکوکونژوگ‌های حاوی سياليک اسيد.....



شکل ۴-۵- وسترن بلات با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد HA روی غشاء نیتروسلولز. ۹۲.....

شکل ۴-۶- ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بعد از انتقال پروتئین‌ها به غشاء نیتروسلولز. ۹۳.....

شکل ۴-۷- رنگ‌آمیزی ژل Reverse SDS-PAGE ۱۲٪ ..... ۹۳.....

شکل ۴-۸- رنگ‌آمیزی کوماسی بریلیانت بلو ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد جهت بررسی HA خالص استخراج شده از ژل ..... ۹۴.....

شکل ۴-۹- کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی لایه‌ی نازک قندهای خنثی. ۹۵.....

شکل ۴-۱۰. کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی لایه‌ی نازک قندهای آمینی. ۹۶.....

## چکیده

ویروس آنفلوانزا متعلق به خانواده اورتومیکسوویروس‌ها<sup>۱</sup> بوده و از سه نوع A، B و C تشکیل شده است. ویروس آنفلوانزای گونه‌ی A و B حاوی دو گلیکوپروتئین سطحی به نام‌های هم‌گلوتینین<sup>۲</sup> (HA) و نورامینیداز<sup>۳</sup> (NA) می‌باشد. HA از یک قسمت کروی به نام سر و یک قسمت میله‌ای به نام ساقه<sup>۴</sup> تشکیل شده است و یک گلیکوپروتئین هموتریمر شامل دو ساب‌یونیت به نام‌های HA1 و HA2 است. HA آنتی‌ژن اصلی در سطح پوشش ویروس می‌باشد. بیشتر عملکردهای HA تحت تاثیر گلیکوزیلاسیون جایگاه‌های ویژه روی HA می‌باشد. از آنجا که گلیکوزیلاسیون HA در فعالیت پیوند به رسپتور سلول میزبان، فعالیت فیوژن<sup>۵</sup>، انتقال ویروس به

<sup>1</sup> Orthomyxoviridae  
<sup>2</sup> Hemagglutinin  
<sup>3</sup> Neuraminidase  
<sup>4</sup> Stem  
<sup>5</sup> Fusion