بسم الله الرحمن الرحيم

٤١٧٩
٩٠١
جبر

٣٩٣٨٤

۱۳۸۰ /۱۱/ ۲۴

کتابخانه مرکزی و مرکز اطلاعات علمی ایران
تحویل سورای

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

استخراج و تخلیص IgM، IgG و فاکتورهای روماتوئید IgMRF و IgGRF و آنالیز ساختاری آنها به روش دو رنگ نمایی دورانی

نگارش:

محمدعلی نصیری خلیلی

016223

استاد راهنما:

دکتر بیژن رنجبر

۳۹۳۸٤

استاد مشاور:

دکتر منوچهر میرشاهی

شهریور ۱۳۸۰

۳۹۳۸۴

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعـضـای هیـئـت داوران نـسـخـهٔ نـهایی پایان نامه خـانم/ آقای محمدعلی نصیری‌خلیلی

تحت عنوان: **استخراج و تخلیص ایمنوگلوبولینهای M و G و فاکتور روماتوئید و آنالیز ساختاری آنها به روش دور رنگ‌نمایی دورانی** ***(CD)***

را از نظر فرم و محتوات بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد مورد تایید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر بیژن رنجبر	استادیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر منوچهر میرشاهی	استادیار	
۳- استاد ناظر	آقای دکتر قورچیان	استادیار	
۴- استاد ناظر	آقای دکتر حسین نادری‌منش	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر حسین نادری‌منش	استادیار	

بسمه تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ زیست شناسی بیوشیمی *است که در سال* ۱۳۸۰ *در دانشکدهٔ* علوم پایه *دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر* بیژن رنجبر ، *مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر* منوچهر میرشاهی *و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر* ـــــ *از آن دفاع شده است.»*

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهداکند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب محمدعلی نصیری دانشجوی رشته بیوشیمی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: محمدعلی نصیری خلیلی

تاریخ و امضا:

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

همسر فداکار و دختر مهربانم کیمیا

تشکر و قدردانی

باتقدیر و سپاس از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر بیژن رنجبر که در طول تحقیق از راهنمائیهای ارزندهٔ ایشان بهره بردم.

با تشکر از اساتید محترم، آقایان دکتر منوچهر میرشاهی، دکتر حسین نادری منش و دکتر قورچیان که مشاوره و نظارت پایان نامه را به عهده داشتند.

با سپاس از تمامی اساتید بخش زیست شناسی و هم دوره ای های خوبم آقایان امین زاده، موسوی، کدیور، مهرنژاد، سعیدی نیا و خانم ها شمسی پور، زهرایی، مرادیان، خاکی و بهادری.

چکیده

در مطالعه حاضر، تخلیص IgM، IgG و فاکتورهای روماتوئید IgMRF و IgGRF به ترتیب از پلاسمای انسانی و سرم یک بیمار آرتریت روماتوئید انجام گرفت و سپس آنالیز ساختاری آنها، بطور مقایسه‌ای با استفاده از روش «دو رنگ نمایی دورانی» مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از بررسی ساختاری IgM، IgMRF ، IgG و IgGRF در غیاب و در حضور غلظتهای مختلف SDS (سدیم دودسیل سولفات) و DTAB (دو دسیل تری متیل آمونیوم بروماید) نشان داد که SDS، پایداری بنای فضایی IgM و IgG را افزایش می دهد و در مقابل، SDS در IgMRF و IgGRF آنها را پایدار نکرده است. در حضور DTAB، پایداری بنای فضایی هرچهار مولکول IgM ، IgMRF، IgG و IgGRF کاهش نشان داده‌اند.

همچنین یافته‌های حاصل از مطالعه ساختاری ایمنوگلوبولینهای مذکور در غیاب لیگاند، به پایداری بیشتر IgMRF و IgGRF نسبت به IgM و IgG دلالت دارد.

کلید واژه ها : ایمنوگلوبولین ، آرتریت روماتوئید ، دورنگ نمائی دورانی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول – مقدمه

۱-۱- خصوصیات فیزیکو شیمیایی و بیولوژیک ایمنوگلوبولین ۲

۱-۲- ساختمان IgM ٤

۱-۳- ساختان ایمنوگلبولین G ٦

۱-٤- اتصال ایمنوگلبولین به پروتئین A استافیلوکوکی ۸

۱-٥- اتصال ایمنوگلبولین به پروتئین G استرپتوکوکی ۹

۱-٦- آرتریت روماتوئید ۹

۱-٦-۱- دلایل احتمالی بیماری ۱۲

۱-٦-۲- فیزیوپاتولوژی بیماری آرتریت روماتوئید ۱۳

۱-٦-۲-۱- زمینه ژنتیک بیماری ۱۳

۱-٦-۲-۲- شناسایی آنتی ژن بیماری ۱۳

۱-٦-۲-۳- آنتی ژن بیماری روماتوئید ۱٤

۱-٦-۲-٤- تشکیل کمپلکس ایمنی ۱٥

۱-٦-۲-٥- تداوم التهاب و فعل و انفعالات ایمنی ۱٦

۱-٦-۳- تست‌های آزمایشگاهی ۱٦

۱-٦-٤- انتی سایتوکین در درمان بیمارات آرتریت روماتوئید ۱۷

۱-٦-٤-۱- TNF ۱۷

۱-٦-٤-۲- STNFR (گیرندهٔ TNF به حالت محلولی) ۱۷

۱-۷- روشهای تخلیص ۱۸

عنوان **صفحه**

۱-۷-۱- روشهای متداول تخلیص IgM انسانی ۱۸

۱-۷-۲- تخلیص IgG ۱۹

۱-۷-۳- روشهای متداول تخلیص فاکتورهای روماتوئید ۲۰

۱-۸- روشهای کروماتوگرافی ۲۱

۱-۸-۱- کروماتوگرافی تمایلی ۲۱

۱-۸-۱-۱- ماتریکس کروماتوگرافی ۲۲

۱-۸-۱-۲- لیگاند غیرمتحرک شونده ۲۳

۱-۸-۱-۳- اتصال لیگاند به ماتریکس ۲۳

۱-۸-۱-٤- فعال کردن ماتریکس ۲۳

۱-۸-۱-٥- اتصال لیگاند به ماتریکس ۲٤

۱-۸-۱-٦- نحوهٔ کاربرد ژل برای کروماتوگرافی ۲٤

۱-۸-۲- ژل فیلتراسیون ۲٥

۱-۹- مطالعات ساختمانی ۲۷

۱-۹-۱- بررسی ترمودینامیکی IgM و RF IgM ۲۷

۱-۹-۲- ساختمان IgM و RF IgM در محلول ۲۸

۱-۹-۳- اثرات میزان گالاکتوزیلاسیون و سیالیلاسیون در فعالیت اتوآنتی بادی RFIgG ۳۰

۱-۹-٤- بررسی کنتیکی میانکنش فاکتورهای روماتوئیدی با IgG ۳۱

۱-۱۰- مطالعه پایداری پروتئین‌ها ۳۲

۱-۱۱- غیرطبیعی کردن پروتئینها و اهمیت آن ۳۳

۱-۱۲- مواد فعال سطحی ۳٥

۱-۱۲-۱- اثر مواد فعال سطحی بر پروتئینها ۳٦

عنوان صفحه

فصل دوم – مواد و روشها

۲-۱- اهداف و زمینه تحقیق ۳۹

۲-۲- تهیه پلاسما ۳۹

۲-۲-۱- تهیه پلاسما از افراد سالم ۳۹

۲-۲-۲- تهیه سرم بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید ٤٠

۲-۳- صاف کردن پلاسما ٤٠

۲-۳-۱- مواد و وسایل ٤١

۲-۳-۲- روش کار ٤١

۲-٤- آماده سازی کیسه دیالیز ٤٢

۲-٤-۱- وسایل لازم ٤٢

۲-٤-۲- مواد مورد نیاز ٤٢

۲-٤-۳- روش کار ٤٢

۲-۵- تخلیص IgM انسانی ٤٣

۲-۵-۱- رسوبدهی ٤٣

۲-۵-۱-۱- تعیین شرایط بهینه تغلیظ ٤٣

۲-۵-۱-۱-۱- مواد و وسایل ٤٣

۲-۵-۱-۱-۲- تهیه سولفات آمونیوم کاملا اشباع ٤٤

۲-۵-۱-۱-۳- تهیه پلی اتیلن گلیکول ٦٠٠٠ (استوک ٢٤ درصد) ٤٤

۲-۵-۱-۱-٤- رسوبدهی با سولفات آمونیوم (غلظت نهایی ٤٥ درصد اشباع) ٤٤

۲-۵-۱-۱-۵- رسوبدهی با پلی اتیلن گلیکول ٦٠٠٠ (غلظت نهایی ٦ درصد اشباع) ٤٤

۲-۵-۱-۱-٦- رسوب اثوگلوبولین ٤٥

۲-۵-۱-۱-۷- رسوبدهی متوالی با سولفات آمونیوم و پلی اتیلن گلیکول ٤٥

عنوان **صفحه**

۲-۵-۱-۱-۷-۱- رسوبدهی با سولفات آمونیوم (غلظت نهایی ۳۰ درصد اشباع) ٤٥

۲-۵-۱-۱-۷-۲- رسوبدهی با سولفات آمونیوم (غلظت نهایی ٤٥ درصد اشباع) ٤٦

۲-۵-۱-۱-۷-۳- رسوبدهی با پلی اتیلن گلیکول ٦۰۰۰ (غلظت نهایی ٦ درصد).... ٤٦

۲-۵-۲- روشهای کروماتوگرافی ٤٦

۲-۵-۲-۱- کروماتوگرافی تمایلی ٤٦

۲-۵-۲-۱-۱- تهیه ستون کروماتوگرافی تمایلی با سفاروز 4B فعال شده..... ٤٦

۲-۵-۲-۱-۲- کروماتوگرافی تمایلی پروتئین G- سفاروز ٤٨

۲-۵-۲-۱-۳- کروماتوگرافی تمایلی پروتئینی A- سفاروز ٤٩

۲-۵-۲-۲- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون.....٤٩

۲-۵-۲-۲-۱- طرز تهیه ستون سفادکس G-200..... ٥۰

۲-۵-۲-۲-۱-۱- مواد و وسایل ٥۰

۲-۵-۲-۲-۱-۲- روش ٥۰

۲-٦- تخلیص فاکتورهای روماتوئید RFIgM و RFIgG..... ٥۱

۲-٦-۱- کروماتوگرافی تمایلی IgG- سفاروز ٥۱

۲-٦-۱-۱- تهیه ستون IgG- سفاروز ٥۱

۲-٦-۱-۲- روش خالص سازی.....٥۱

۲-٦-۲- کروماتوگرافی تمایلی پروتئین G- سفاروز ٥۲

۲-۷- محاسبه غلظت ایمنوگلوبولینها ٥۳

۲-۸- شرایط تگهاداری نمونه‌های پروتئینی..... ٥۳

۲-۸-۱- نگهداری ایمنوگلوبولینهای IgM و IgG انسانی ٥۳

۲-۸-۲- نگهداری فاکتورهای روماتوئید RFIgM و RFIgG..... ٥٤

۲-۹- الکتروفورز SDS-PAGE..... ٥٤

۲-۹-۱- وسایل و دستگاههای مورد استفاده ۵۵
۲-۹-۲- مواد مورد نیاز ۵۵
۲-۹-۳- محلولهای مورد نیاز و طرز تهیه آنها..... ۵۵
۲-۹-٤- روش کار..... ٥٦
۲-۹-٥- رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید ۵۸
۲-۹-٥-۱- مواد مورد نیاز..... ۵۹
۲-۹-٥-۲- محلول‌های مورد استفاده..... ۵۹
۲-۹-٥-۳- روش کار ۵۹
۲-۱۰- دو رنگ نمایی دورانی ۵۹
۲-۱۰-۱- کاربردهای روش دو رنگ نمایی دورانی (CD)..... ٦۱
۲-۱۰-۲- بررسی غیرطبیعی شدن شیمیایی IgM، IgG و فاکتورهای روماتوئید RFIgM و RFIgG با CD ٦۲

فصل سوم – نتایج

۳-۱- تخلیص IgM ٦٦
۳-۱-۱- تغلیظ متوالی با سولفات آمونیوم (غلظت نهایی ۳۰٪ اشباع)، سولفات آمونیوم ٤٥٪ و پلی اتیلن گلیکول ٦٪..... ٦٦
۳-۱-۲- کروماتوگرافی تمایلی پروتئین G– سفاروز (SPG)..... ٦۸
۳-۱-۳- کروماتوگرافی تمایلی پروتئین A– سفاروز (SPA)..... ۷۰
۳-۱-٤- ژل فیلتراسیون ۷۲
۳-۲- تخلیص فاکتورهای روماتوئید RFIgM و RFIgG..... ۷٤
۳-۲-۱- کروماتوگرافی تمایلی IgG– سفاروز ۷٤
۳-۲-۲- کروماتوگرافی تمایلی پروتئین G– سفاروز (SPG)..... ۷۷

عنوان **صفحه**

۳-۳- بررسی غیرطبیعی شـدن شـیمیایی IgM ، IgG و فاکتورهـای روماتوئید RF IgM و RFIgG توسط روش دو رنگ نمایی دورانی ۷۹

بحث و پیشنهادات ۹۱

پیشنهادات ۱۰۳

منابع و مراجع ۱۰٤

فهرست جداول

عنوان جدول **صفحه**

جدول ۱-۱- مشخصات فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک ایمنوگلوبولینهای انسان ۳

جدول ۱-۲- خواص بیولوژیکی زیر کلاسهای IgG انسانی ۷

جدول ۱-۳- واکنش پروتئین A با کلاسها و زیرکلاشهای ایمنوگلوبولین گونه‌های مختلف.. ۱۰

جدول ۱-٤- میزان اتصال ایمنوگلوبولینهای مختلف به پروتئین A و G ۱۱

جدول ۱-۵- ویژگیهای انواع سفادکس G ۲۷

جدول ۱-٦- پارامترهای غیرطبیعی شدن حرارتی IgM و RFIgM و قطعات Fab و FC آنها ۲۸

جدول ۱-۷- پارامترهای ترمودینامیکی و حالات حد واسط IgM ، RF IgM و
قطعات Fab آنها ۲۸

جدول ۱-۸- پارامترهای ساختمانی نمونه‌های ایمنوگلوبولین در محلول..... ۲۹

جدول ۳-۱- مقادیر درصدی ساختارهای دوم IgM در غیاب و در حضور غلظتهای
مختلف SDS ۸۰

جدول ۳-۲- مقادیر درصدی ساختارهای دوم IgM در غیاب و در حضور غلظتهای
مختلف DTAB ۸۰

جدول ۳-۳- مقادیر درصدی ساختارهای دوم RFIgM در غیاب و در حضور غلظتهای
مختلف SDS ۸۰

جدول ۳-٤- مقادیر درصدی ساختارهای دوم RFIgM در غیاب و در حضور غلظتهای
مختلف DTAB ۸۱

عنوان جدول **صفحه**

جدول ۳-۵- مقادیر درصدی ساختارهای دوم IgG در غیاب و در حضور غلظتهای مختلف SDS ۸۱

جدول ۳-٦- مقادیر درصدی ساختارهای دوم IgG در غیاب و در حضور غلظتهای مختلف DTAB ۸۱

جدول ۳-۷- مقادیر درصدی ساختارهای دوم RFIgG در غیاب و در حضور غلظتهای مختلف SDS ۸۲

جدول ۳-۸- مقادیر درصدی ساختارهای دوم RFIgG در غیاب و درحضور غلظتهای مختلف DTAB ۸۲