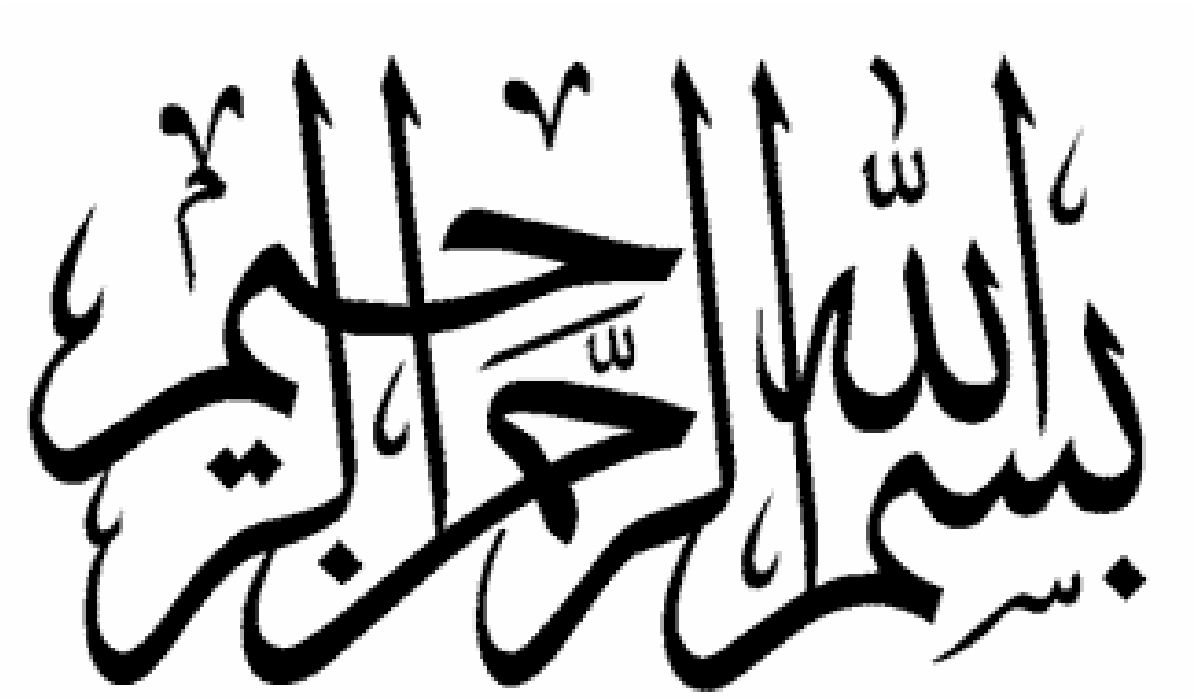
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه شیمی

پایان‌نامه‌ی دکتری رشته‌ی شیمی گرایش شیمی‌فیزیک

تغییرات ساختاری و آلرژی زایی پروتئین بتالاکتوگلوبولین گاوی بر اثر شوک حرارتی، قنددار کردن و جهش و بررسی خصوصیات پیوندی آن با سروتونین و آراچیدونیل سروتونین

استادان راهنما:

پروفسور عبدالخالق بردبار

پروفسور توماس هارتل

پژوهشگر:

اصغر طاهری‌کفرانی

شهریورماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه شیمی

پایان نامه‌ی دکتری رشته شیمی گرایش شیمی‌فیزیک

آقای اصغر طاهری‌کفرانی

تحت عنوان:

اثر شوک حرارتی و قنددار کردن بر تغییرات ساختاری، پیوندی و آلرژی‌زایی پروتئین بتالاکتوگلوبولین گاوی

در تاریخ ۱۳۹۰/۶/۲۳ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱ - استاد راهنمای پایان نامه	دکتر عبدالخالق بردبار	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر توماس هارتل	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۳- استاد داور خارج گروه	دکتر لیندسی سویر	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۴- استاد داور خارج گروه	دکتر علی‌اکبر موسوی‌موحدی	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۵- استاد داور خارج گروه	دکتر دمیتری لویتسکی	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۶- استاد داور خارج گروه	دکتر علی اکبر صبوری	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۷- استاد داور داخل گروه	دکتر مجید موسوی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۸- استاد داور داخل گروه	دکتر رضا امیدیان	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا

امضای مدیر گروه

دکتر اسماعیل شمس سولاری

تقدیم به سمبل صبر و ایثار، پدرم

گنجینه محبت و صمیمیت، مادرم

و جلای زندگانیم، همسرم

سپاسگزاری:

منت خدای را عز و جل که طاعتش موجب قربتست و به شکر اندرش مزید نعمت. هر نفسی که فرو می‌رود ممد حیاتست و چون بر می‌آید مفرح ذات. پس در هر نفسی دو نعمت موجود است وبر هر نعمتی شکری واجب

از دست و زبان که بر آید کز عهده شکرش بدر آید

حمد و سپاس بیکران خداوند منان را که در پناه الطاف خاصه اش توفیق آن را یافتم تا در راه کسب علم و دانش قدمی هر چند ناچیز بردارم.

درود بیکران خود را نثار خانواده‌ام می‌نمایم که با پایه گذاری خشت خشت بنای فکریم مرا در زمینه تحصیل یاری کرده و هر چه دارم از وجود مقدسشان است. از پدر، مادر و همسر مهربانم که در کلیه مراحل تحصیل از هیچ کوششی دریغ ننموده و متحمل زحمات زیادی شده‌اند، نهایت سپاس و تشکر را دارم.

مراتب سپاس خویش را از استادان راهنمای خوب و عالیقدر پروفسور توماس هارتل از مرکز تحقیقات کشاورزی نانت فرانسه و پروفسور عبدالخالق بردبار از دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت ها و راهنمایی‌های بیدریغشان اعلام می‌نمایم. همواره عزت و سرافرازی هر چه بیشتر ایشان را از خداوند متعال خواستارم.

از استادان و متخصصان صاحب نظر خارج از گروه پروفسور لیندسی سویر از دانشگاه ادینبورگ اسکاتلند، پروفسور دمیتری لویتسکی از دانشگاه نانت فرانسه، پروفسور علی اکبر موسوی موحدی و پروفسور علی اکبر صبوری از مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران و نیز از استادان و متخصصان صاحب نظر داخل گروه دکتر رضا امیدیان و دکتر مجید موسوی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از کلیه دوستان عزیزم در کلیه مقاطع به خصوص هم‌آزمایشگاهی‌ها و دوستان عزیزم در مرکز تحقیقات کشاورزی نانت فرانسه و دانشگاه اصفهان که در پیشبرد این پایان‌نامه مرا یاری نموده‌اند و نیز کارکنان و کارمندان گروه شیمی دانشگاه اصفهان و اساتید و تکنسین های مرکز تحقیقات کشاورزی نانت فرانسه به خصوص دکتر جان-مارک چوبرت، دکتر جان-شارل گودین، ایوان چویست، میشل دالاگراندا، هانیترا رابینسونا و ... که در طول مدت تحصیل از همکاری و مساعدت ایشان بهره‌مند بوده‌ام، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

چکیده

بتالاکتوگلوبولین (β-Lg) پروتئینی از گروه پروتئین‌های لیپوکالین و پروتئین اصلی آب‌پنیر شیر گاو می باشد. ساختار β-Lg از دو پیوند دی‌سولفیدی و یک سیستئین آزاد در موقعیت ۱۲۱ تشکیل شده است. عملکرد بیولوژیکی این پروتئین هنوز شناخته شده نیست، ولی نقشی بالقوه برای آن درحمل اسیدهای چرب در داخل دستگاه گوارش پیشنهاد شده است. β-Lg همچنین یکی از عوامل اصلی ایجاد حساسیت در شیر گاو است. حرارت دادن یکی ازمعمول‌ترین فن‌آوری‌هایی است که بشر برای تهیه محصولات لبنی استفاده می‌کند. علیرغم استفاده مکرر از حرارت دادن، هنوز هم آثار حرارت بر روی β-Lg و ساختار آن، بر روی چگونگی تشخیص آن توسط IgE بیماران دارای آلرژی به شیر گاو، به طور کامل شناخته نشده است. ازآنجایی که ممکن است β-Lg در طی حرارت دادن، توسط قندهای کاهشی موجود در شیر بر اثر واکنش مایلارد اصلاح گردد، پروتئین‌های قنددار شده در حضور شش قند کاهشی تولید شدند. توصیف ساختاری پروتئین‌های اصلاح شده توسط حرارت و قنددار شدن با روش‌های مختلفی مانند CD و الکتروفورز انجام شد و نتایج قابل قبول حاصل از این روش‌ها نشان داد که اصلاحات ساختاری، باعث ایجاد تغییراتی در خواص آنتی‌ژنی یا واکنش‌پذیری ایمنی این پروتئین غذایی مهم خواهد داشت. تشکیل پیوند IgE با β-Lg طبیعی و مقایسه آن با β-Lg حرارت داده شده در بیمارانی که به شیر گاو حساسیت داشتند در محدوده دمایی $^{\circ}C$ ۹۵–۶۵ به وسیله آزمایشات ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. از دست رفتن ساختارهای دوم و سوم β-Lg توسط حرارت دادن در دماهای بالاتر از $^{\circ}C$ ۷۵، منجر به کاهش احتمال شناسایی آن توسط IgE شد که البته واکنش‌پذیری آن در بیماران مختلف متفاوت بود. همچنین پیوند شدن IgE بیماران دارای آلرژی به شیر گاو و β-Lg های قنددار شده نیز اندازه‌گیری شد و کاهش پیوند شدن IgE بر روی بتالاکتوگلوبولین‌های قنددار شده با درجه بالا، نیز مشاهده گردید. در طول این تحقیق تولید β-Lg نوع وحشی (WT) و β-Lg جهش‌یافته Cys121Ser با استفاده از مخمر *Pichia pastoris* انجام شد. جهش Cys121Ser مانع از تجمع برگشت‌پذیر β-Lg بر اثر حرارت می‌شود. پیوند شدن IgE بیماران دارای حساسیت به شیر گاو با β-Lg طبیعی، WT و جهش یافته Cys121Ser نیز توسط آزمایشات ELISA اندازه‌گیری گردید. در بخش آخر این تحقیق، برهمکنش سروتونین و یکی از مشتقات آن، آراچیدونیل سروتونین (AA-5HT)، با β-Lg با استفاده از روش‌های دورنگ نمایی دورانی (CD) و اندازه‌گیری‌های شدت فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. ثابت تمایل تشکیل پیوندی برای برهمکنش 5-HT/β-Lg بین 10^{5} و 10^{6} M^{-1} است، درحالی که برای کمپلکس AA-5HT/β-Lg بین 10^{4} و 10^{5} M^{-1} است. این مقادیر با اندازه‌گیری‌های شدت فلورسانس به دست آمد. ثابت‌های تمایل تشکیل پیوندی در محیط هیدرواتانولی (۲۵٪ اتانول) برای هر دو لیگاند بیشتر بود. برهمکنش‌های بین 5-HT/β-Lg و AA-5HT/β-Lg ممکن است با فرآیند اجتماع خود به خودی (تشکیل میسل) توسط لیگاند و نیز پروتئین رقابت کند. بر اساس نتایج حاصل از دورنگ نمایی دورانی فرابنفش نزدیک و دور، این لیگاندها هیچگونه اثر قابل توجهی بر ساختار دوم β-Lg ندارند، اما آنها به طور ویژه ساختار سوم بتالاکتوگلوبولین را ناپایدار می‌کنند. پیوند شدن این لیگاندها با β-Lg ممکن است یکی از مکانیسم‌های جانبی تنظیم مقدار سروتونین و مشتقاتش در حیوانات شیر خوار باشد.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتوگلوبولین، برهمکنش، آلرژی، اصلاح پروتئین، سروتونین.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و پیشینه تحقیق ۱

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۱-۱- خواص عمومی شیر ۳

۱-۱-۲- ترکیب شیر ۴

۱-۱-۳- پروتئین های شیر گاو ۵

۱-۱-۴- پروتئین های آب پنیر ۸

۱-۲- بتالاکتوگلوبولین شیرگاو ۹

۱-۲-۱- ساختار مولکولی β-Lg گاوی ۱۰

۱-۲-۲- ساختار β-Lg گاوی در محلول آبی ۱۳

۱-۲-۳- خالص سازی بتالاکتوگلوبولین ۱۴

۱-۲-٤- پایداری در دستگاه گوارش ۱۵

۱-۲-۵- اثر دما بر روی بتالاکتوگلوبولین گاوی ۱۶

۱-۲-۶- اثر فشار بر روی β-Lg گاوی ۱۸

۱-۲-۷- اثر غیرطبیعی شدن شیمیایی بر روی β-Lg گاوی ۲۰

۱-۲-۸- بررسی تغییرات ساختاری پروتئین حرارت دیده به وسیله الکتروفورز با ژل پلی اکریلامید ۲۲

۱-۲-۹- پیوند شدن لیگاند به β-Lg ۲۴

۱-۲-۹-۱- انتقال دارو توسط β-Lg ۲۶

۱-۲-۱۰- نقش سیستئین (Cys121) آزاد بر ساختار β-Lg ۳۰

۱-۳- حساسیت ۳۱

۱-۳-۱- تولید IgE ۳۲

۱-۳-۲- حساسیت غذایی ۳۳
۱-۳-۳- مواد غذایی حساسیت زا ۳۴
۱-۳-۴- حساسیت به شیر گاو و بتالاکتوگلوبولین ۳۴
۱-۳-۵- اثر فراوری شیر بر روی حساسیت زایی شیر گاو ۳۶
۱-۴- هدف از این تحقیق ۳۷

فصل دوم: مواد و روش ها ٤٠
۲-۱- مواد مورد استفاده ۴۰
۲-۱-۱- خالص سازی پروتئین بتالاکتوگلوبولین از شیر گاو ۴۱
۲-۱-۲- آماده سازی پروتئین های حرارت داده شده ۴۱
۲-۱-۳- آماده سازی پروتئین های قند دار شده ۴۲
۲-۱-٤- آماده سازی پروتئین های جهش یافته ۴۳
۲-۱-۴-۱- طراحی جهش و تکثیر کلونی ۴۴
۲-۱-٤-۲- وارد کردن پروتئین به *P. Pastoris* ۴۶
۲-۱-۵- خالص سازی پروتئین ۴۷
۲-۱-۵-۱- کروماتوگرافی تبادل یونی ۴۷
۲-۱-۵-۲- کروماتوگرافی اندازه طردی ۴۸
۲-۱-۶- هضم پپتید ۴۸
۲-۲- روش ها ۴۸
۲-۲-۱- آزمایش های الکتروفورز ۴۹
۲-۲-۲- اندازه گیری های دورنگ نمایی دورانی ۵۱
۲-۲-۳- آزمایش های HPLC ۵۲

۲-۲-٤- آزمایش های طیف سنجی جرمی بتالاکتوگلوبولین نوترکیب ۵۳
۲-۲-۵- تهیه سرم بیماران دارای آلرژی نسبت به شیر گاو ۵۳
۲-۲-۶- آزمایشات رنگ سنجی ELISA ۵۴
۲-۲-۷- آزمایشات فلوریمتری ELISA ۵۵
۲-۲-۸- ELISA رقابتی ۵۶
۲-۳- آزمایش های پیوند شدن لیگاند ۵۸
۲-۳-۱- اندازه گیری های فلورسانس حالت پایا ۵۸
۲-۳-۲- طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی ۵۹
۲-۳-۳- اندازه گیری ثابت تمایل پیوندی ۵۹
۲-۳-۴- آزمایش های رقابتی ۶۰
۲-۳-۵- آزمایش های اولترافیلتراسیون ۶۱

فصل سوم: نتایج و بحث ٦٢
۳-۱- تهیه بتالاکتوگلوبولین قنددار شده از شیر گاو ۶۲
۳-۱-۱- تعیین درصد پیشرفت واکنش قنددارشدن ۶۴
۳-۲- تهیهٔ پروتئین های نوترکیب WT/β-Lg و β-Lg جهش یافتهٔ Cys121Ser ۶۶
۳-۲-۱- تخلیص پروتئین های نوترکیب ۶۷
۳-۲-۱-۱- کروماتوگرافی تبادل یونی ۶۸
۳-۲-۱-۲- کروماتوگرافی اندازه طردی (SEC) ۶۹
۳-۳- بررسی خواص بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده و قنددار شده با استفاده از الکتروفورز ۷۱
۳-۳-۱- نتایج الکتروفورز بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده با ژل اکریلامید طبیعی ۷۱
۳-۳-۲- نتایج SDS-PAGE پروتئین بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده ۷۳

۳-۳-۳- نتایج SDS-PAGE بتالاکتوگلوبولین قنددارشده.....۷۵

۳-۴- بررسی خواص بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده و قنددار شده با استفاده از روش دو رنگ نمایی دورانی ۷۷

۳-۴-۱- نتایج دو رنگ نمایی دورانی ناحیهٔ فرابنفش دور برای بتالاکتوگلوبولین حرارت داده شده.....۷۸

۳-۴-۲- نتایج دورنگ نمایی دورانی ناحیه فرابنفش نزدیک برای بتالاکتوگلوبولین حرارت داده شده.....۸۱

۲-٤-۳- نتایج دورنگ نمایی دورانی ناحیه فرابنفش دور برای بتالاکتو گلوبولین قنددار شده.....۸۳

۳-۵- بررسی خواص پروتئین های نوترکیب WT و جهش یافته CYS121SER.....۸۵

۳-۵-۱- نتایج SDS-PAGE و HPLC پروتئین های نوترکیب β-Lg.....۸۵

۳-۵-۲- نتایج طیف سنجی جرمی بتالاکتوگلوبولین نوترکیب.....۸۶

۳-۵-۳- نتایج آزمایش های دورنگ نمایی دورانی پروتئین های نوترکیب ۸۹

۳-۵-٤- اثر هضم پپتیدی بر بتالاکتوگلوبولین نوترکیب.....۹۰

۳-٦- نتایج آزمایشات ELISA بر روی پروتئین های بتالاکتوگلوبولین.....۹۱

۳-٦-۱- پاسخ و واکنش سرم بیماران دارای CMA به بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده ۹۱

۳-٦-۲- پاسخ و واکنش سرم بیماران دارای CMA، به بتالاکتوگلوبولین قنددار شده.....۹۶

۳-٦-۳- پاسخ و واکنش سرم بیماران به بتالاکتوگلوبولین نوترکیب WT و Cys121Ser.....۱۰۲

۳-۷- برهمکنش بتالاکتوگلوبولین با سروتونین و آراچیدونیل سروتونین.....۱۰۳

۳-۷-۱- رفتار سروتونین و آراچیدونیل سروتونین در محلول های آبی و تعیین CMC.....۱۰۳

۳-۷-۲- اثر برهمکنش های پروتئین – لیگاند بر ساختار بتالاکتوگلوبولین ۱۰۸

۳-۷-۳- ثابت تمایل پیوندی، تعداد لیگاند پیوند شده و جایگاه پیوندی 5-HT و AA-5HT به بتالاکتوگلوبولین.....۱۱۱

۳-۷-۴- نتایج آزمایشات رقابتی پیوند شدن رتینول و سروتونین به بتالاکتوگلوبولین ۱۱۶

۳-۷-۵- نتایج آزمایش های اولترافیلتراسیون پیوند شدن سروتونین به بتالاکتوگلوبولین ۱۱۷

۳-۷-٦- نتایج پیوند شدن سایر داروها به بتالاکتوگلوبولین..... ۱۲۰
۳-۸- جمع بندی نتایج و نتیجه گیری نهایی..... ۱۲۱
منابع و مأخذ ۱۲٦

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱) دنباله های آمینواسیدی پروتئین β-Lg نوع A. ۱۱

شکل ۱-۲) (A) ساختار β-Lg گاوی مونومر که در آن ۸ رشته β غیرموازی(A-H) یک حفره هیدروفوب تشکیل می دهند که اطراف آن حلقه های انعطاف پذیر AB، CD، EF و GH قرار دارند. (B) ساختار β-Lg گاوی دیمر که در آن دو پروتئین مونومر با تشکیل پیوند هیدروژنی از طریق آمینواسیدهای ۱۴۶-۱۵۰، تجمع یافته و دیمر β-Lg را ایجاد می کنند. ۱۲

شکل ۱-۳) جایگاه های پیوندی بتالاکتوگلوبولین؛ (A) حفره کالیکس پروتئین که جایگاه متعارف آن برای طیف وسیعی از لیگاندهای آبگریز است. (B) جایگاه های دوم و سوم پیوندی که جایگاه دوم شامل اغتشاشات دنباله های Trp19، Tyr20، Tyr42، Glu44، Gln59، Gln68، Leu156، Glu157، Glu158 و His161 است و جایگاه سوم شامل دنباله‌های Tyr102، Leu104 و Asp129 می¬باشد. ۲۷

شکل ۱-۴) ساختار مولکولی (A) سروتونین و (B) آراچیدونیل سروتونین. ۲۹

شکل ۱-۵) یک شمای کلی از مکانیسم آلرژی در بدن انسان. ۳۴

شکل ۳-۱) طیف HPLC بتالاکتوگلوبولین نوع A خالص شده از شیرگاو با استفاده از روش مایلارد ۶۳

شکل ۳-۲) ساختار مولکولی قندهای استفاده شده در آزمایشات قنددار شدن. ۶۴

شکل ۳-۳) منحنی استاندارد به دست آمده با استفاده از لوسین ۰/۲۵ – ۲/۰۰ مولار جهت استفاده در آزمایشات OPA و تعیین درجه قنددار شدن ۶۵

شکل ۳-۴) الکتروفورز SDS-PAGE کلونی‌های تولید کننده پروتئین‌های نوترکیب WT و Cys121Ser در حضور β-ME جهت انتخاب بهترین کلونی‌هایی که بیشترین پروتئین را تولید می‌کنند. در این شکل، بهترین کلونی‌ها شماره ۳، ۴ و ۶ بودند که برای تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس بزرگ از آنها استفاده شد ۶۷

شکل ۳-۵) نمودار شستشوی کروماتوگرافی تبادل آنیونی پروتئین بتالاکتوگلوبولین نوترکیب. آنالیز پروتئین‌های مختلف مربوط به هر پیک توسط روش SDS – PAGE انجام گرفت..... ۶۸
شکل ۳-۶) آنالیز SDS – PAGE بخش‌های مختلف کروماتوگرافی تبادل آنیونی پروتئین‌های نوترکیب. بر اساس این شکل، ناخالصی‌های بیشتری پس از انجام کروماتوگرافی تبادل آنیونی در نمونه پروتئین نوترکیب وجود دارد و لذا خالص‌سازی بیشتری نیاز است. ستون اول جرم‌های مولکولی استاندارد را نشان می‌دهد. ۶۹
شکل ۳-۷) نمودار شستشوی کروماتوگرافی اندازه طرد مولکولی محلول تغلیظ شده پروتئین بتالاکتوگلوبولین نوترکیب بعد از کروماتوگرافی تبادل آنیونی. آنالیز بخش‌های مختلف مربوط به هر پیک توسط روش SDS – PAGE انجام گرفت ۷۰
شکل ۳-۸) آنالیز SDS – PAGE بخش‌های مختلف کروماتوگرافی اندازه طرد مولکولی پروتئین‌های نوترکیب. بر اساس این شکل، نمونه پروتئین نوترکیب خالص در ستون‌های ۴، ۵، ۶، و ۷ وجود دارد. ستون اول، پروتئین بتالاکتوگلوبولین نوترکیب بعد از کروماتوگرافی تبادل آنیونی را به عنوان کنترل نشان می‌دهد. ۷۱
شکل ۳-۹) آنالیز Native–PAGE پروتئین β-Lg A که به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴ حرارت داده شده است. ستون Nat مربوط به β–Lg طبیعی است و ستون های ۶۵، ۷۵، ۸۵ و ۹۵ به ترتیب بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده در دماهای ۶۵، ۷۵، ۸۵ و $^{\circ}C$ ۹۵ را نشان می دهند. M نشان دهنده جرم مولکولی استاندارد است. ۷۲
شکل ۳-۱۰) نتایج SDS–PAGE ۱۲٪ بدون حضور عامل کاهنده β–ME، مربوط به پروتئین β-Lg A که به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴ حرارت داده شده است. ستون Nat مربوط به β–Lg طبیعی است و ستون های ۶۵، ۷۵، ۸۵ و ۹۵ به ترتیب بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده در دماهای ۶۵، ۷۵، ۸۵ و $^{\circ}C$ ۹۵ را نشان می دهند. M نشان دهنده جرم مولکولی استاندارد (برحسب kD) است ۷۴

شکل ۳-۱۱) نتایج SDS–PAGE ۱۲٪ در حضور عامل کاهنده β–ME، مربوط به پروتئین β-Lg A که به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴ حرارت داده شده است. ستون Nat مربوط به β–Lg طبیعی است و ستون های ۶۵، ۷۵، ۸۵ و ۹۵ به ترتیب بتالاکتوگلوبولین حرارت دیده در دماهای ۶۵، ۷۵، ۸۵ و $^{\circ}C$ ۹۵ را نشان می دهند. M نشان دهنده جرم مولکولی استاندارد (برحسب kD) است. ۷۵

شکل ۳-۱۲) نتایج SDS–PAGE ۱۲٪ بدون حضور عامل کاهنده β–ME، مربوط به پروتئین β-Lg A قنددار شده در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴. ستون Nat مربوط به β–Lg طبیعی و ستون Φ مربوط به β–Lg حرارت دیده در دمای $^{\circ}C$ ۶۰ بدون حضور قند (به عنوان کنترل) است و ستون های Ri، Gl، Ar، La، Ga و Rh به ترتیب بتالاکتوگلوبولین قنددار شده در حضور قندهای ریبوز، گلوکز، آرابینوز، لاکتوز، گالاکتوز و رامنوز را نشان می دهند. M نشان دهنده جرم مولکولی استاندارد (برحسب kD) است. ۷۶

شکل ۳-۱۳) نتایج SDS–PAGE ۱۲٪ در حضور عامل کاهنده β–ME، مربوط به پروتئین β-Lg A قنددار شده در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴. ستون Nat مربوط به β–Lg طبیعی و ستون Φ مربوط به β–Lg حرارت دیده در دمای $^{\circ}C$ ۶۰ بدون حضور قند (به عنوان کنترل) است و ستون های Ri، Gl، Ar، La، Ga و Rh به ترتیب بتالاکتوگلوبولین قنددار شده در حضور قندهای ریبوز، گلوکز، آرابینوز، لاکتوز، گالاکتوز و رامنوز را نشان می دهند. M نشان دهنده جرم مولکولی استاندارد (برحسب kD) است. ۷۷

شکل ۳-۱۴) طیف های CD ناحیهٔ فرا بنفش دور پروتئین β–Lg A طبیعی و حرارت داده شده در دماهای مختلف در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴. ۷۹

شکل ۳-۱۵) طیف های CD ناحیهٔ فرا بنفش نزدیک پروتئین β–Lg A طبیعی و حرارت داده شده در دماهای مختلف در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴. ۸۳

شکل ۳-۱۶) طیف های CD ناحیهٔ فرا بنفش دور پروتئین β–Lg A طبیعی و حرارت داده شده در دماهای مختلف در بافر PBS ۱۰۰ mM با pH ۷/۴. β–Lg های قنددار شده در حضور ریبوز (Rib)، گلوکز (Glu)، آرابینوز (Ara)، لاکتوز (Lac)، گالاکتوز (Gal) و رامنوز (Rha) با β–Lg طبیعی و β–Lg حرارت دیده در دمای $^{\circ}C$ ۶۰ بدون حضور قند (به عنوان کنترل) مقایسه شده اند..... ۸۴

شکل ۳-۱۷) نمودار شستشوی کروماتوگرافی فاز معکوس β–Lg A طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و جهش یافته Cys121Ser. زمان نگهداری هر سه نمونه در این کروماتوگرافی یکسان است و با استفاده از سطح زیر پیک، خلوص هر سه نمونه بالای ۹۵٪ محاسبه گردید. ۸۶

شکل ۳-۱۸) نتایج SDS–PAGE ۱۲٪ در حضور عامل کاهنده β–ME، مربوط به پروتئین β–Lg A طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و جهش یافته Cys121Ser. ستون های ۱ و ۲، β–Lg A طبیعی؛ ستون های ۳ و ۴، β–Lg نوترکیب WT و ستون های ۵ و ۶، β–Lg نوترکیب جهش یافته Cys121Ser را نشان می دهند. همان طور که ملاحظه می شود، هر سه نمونه از خلوص بالایی برخوردارند. M نشان دهنده جرم مولکولی استاندارد (برحسب kD) است ۸۷

شکل ۳-۱۹) نتایج اسپکترومتر جرمی β–Lg A طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و جهش یافته Cys121Ser. بر اساس این طیف ها، جرم های مولکولی β–Lg A طبیعی، WT و Cys121Ser به ترتیب ۱۸۳۴۶، ۱۸۳۴۵ و ۱۸۳۸۹ دالتون ارزیابی شد. ۸۸

شکل ۳-۲۰) طیف های CD ناحیهٔ فرا بنفش (A) دور و (B) نزدیک مربوط به پروتئین β–Lg A طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و جهش یافته Cys121Ser در بافر ۱۰ mM فسفات pH ۶/۷..... ۹۰

شکل ۳-۲۱) نتایج HPLC فاز معکوس که پیشرفت واکنش پپسینولیز β–Lg طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و جهش یافته Cys121Ser بر حسب زمان را مقایسه کرده است. مثلث، β–Lg طبیعی؛ دایره، β–Lg نوترکیب WT و مربع، β–Lg جهش یافته Cys121Ser را نشان می دهند..... ۹۱

شکل ۳-۲۲) نتایج C-ELISA برای β–Lg طبیعی و β–Lg حرارت دیده در دماهای مختلف. در این شکل علامت ناشی از جذب دو آنتی بادی ۳۷ mA و ۹۶ mA بر روی صفحه ELISA که با β–Lg طبیعی و حرارت دیده پیوند شده است، می باشد..... ۹۲

شکل ۳-۲۳) پیوند شدن IgE با β–Lg طبیعی و β–Lg حرارت دیده در دماهای مختلف. در این شکل پیوند شدن IgE سرم ۱۷ بیمار دارای CMA به β–Lg حرارت دیده در دماهای مختلف، با β–Lg طبیعی مقایسه شده است و برای هر پروتئین، مقدار میانگین IgE ویژه به صورت یک خط در داخل شکل قرار دارد..... ۹۳

شکل ۳-۲۴) پاسخ و واکنش سه بیمار M ۸۶، M ۹۵ و M ۸۸ به پروتئین های مختلف. در این شکل، پیوند شدن IgE سرم این بیماران دارای CMA، به بتالاکتوگلوبولین طبیعی و حرارت دیده در دماهای مختلف، به صورت منفرد با یکدیگر مقایسه شده است..... ۹۵

شکل ۳-۲۵) آزمایشات مهار پیوندی IgE با β–Lg طبیعی و β–Lg حرارت دیده در دماهای مختلف. در این شکل، مقایسه پیوند شدن IgE مخلوط سرم ۱۷ بیمار دارای CMA به β–Lg حرارت دیده در دماهای مختلف، با β–Lg طبیعی مقایسه شده است..... ۹۶

شکل ۳-۲۶) نتایج C-ELISA برای β–Lg طبیعی و β–Lg های قنددار شده در حضور قندهای مختلف. در این شکل علامت ناشی از جذب دو آنتی بادی mA ۳۷ و mA ۹۶ بر روی صفحه ELISA که با – βLg طبیعی و قنددار شده پیوند شده است، می باشد. ۹۷

شکل ۳-۲۷) پیوند شدن IgE با β–Lg طبیعی و β–Lg قنددار شده در حضور قندهای مختلف. در این شکل پیوند شدن IgE سرم ۱۷ بیمار دارای CMA به β-Lg/Lac، β-Lg/Gal، β-Lg/Glu، β-Lg/Rha، β-Lg/Rib و β-Lg/Ara، با β–Lg طبیعی مقایسه شده است. برای هر پروتئین، مقدار میانگین IgE ویژه به صورت یک خط در داخل شکل قرار دارد. ۹۸

شکل ۳-۲۸) آزمایشات مهار پیوندی IgE با β–Lg طبیعی و β–Lg قنددار شده. در این شکل، مقایسه پیوند شدن IgE مخلوط سرم ۱۷ بیمار دارای CMA به β–Lg قنددار شده در حضور لاکتوز و ریبوز، با β–Lg کنترل مقایسه شده است..... ۹۹

شکل ۳-۲۹) نتایج C-ELISA برای β–Lg طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و Cys121Ser. در این شکل علامت ناشی از جذب دو آنتی بادی mA ۳۷ و mA ۹۶ بر روی صفحه ELISA که با β–Lg طبیعی و نوترکیب پیوند شده است، می باشد. ۱۰۲

شکل ۳-۳۰) آزمایشات مهار پیوندی IgE با β–Lg طبیعی و β–Lg های نوترکیب WT و Cys121Ser. در این شکل، مقایسه پیوند شدن IgE مخلوط سرم ۱۷ بیمار دارای CMA به β–Lg های نوترکیب WT و Cys121Ser با β–Lg طبیعی مقایسه شده است. ۱۰۳

شکل ۳-۳۱) طیف های نشر فلورسانس محلول ۱۰ µM سروتونین (A) و آراچیدونیل سروتونین (B) در حضور غلظت های ۰/۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد اتانول (به ترتیب از a تا f) در بافر ۱۰ mM فسفات pH ۷/۴. طیف های مشابهی در بافر ۱۰ mM گلیسین pH ۲/۰ مشاهده شده است ۱۰۵

شکل ۳-۳۲) طیف های نشر فلورسانس محلول های (A) ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سروتونین (به ترتیب از a تا i) و (B) ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار آراچیدونیل سروتونین (به ترتیب از a تا h)، در بافر ۱۰ mM فسفات pH ۷/۴. طیف هایی با الگوی مشابه در بافر ۱۰ mM گلیسین pH ۲/۰ مشاهده شده است؛ نمودارهای الحاقی در داخل شکل، تغییرات شدت نشر فلورسانس را نسبت به غلظت 5-HT و AA-5HT نشان می دهند. محل تقاطع دو خط راست در هر نمودار، بیانگر نقطه CMC است ۱۰۶

شکل ۳-۳۳) طیف های CD فرابنفش دور ۱۰ µM β-Lg در حضور غلظت های ۰/۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومولار (A) سروتونین و (B) آراچیدونیل سروتونین در بافر ۱۰ mM فسفات pH ۷/۴. طیف های مشابهی برای هر لیگاند در بافر ۱۰ mM گلیسین pH ۲/۰ مشاهده شده است ۱۰۹

شکل ۳-۳۴) طیف های CD فرابنفش نزدیک ۱۰ µM β-Lg در حضور غلظت های ۰/۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومولار (A) سروتونین و (B) آراچیدونیل سروتونین در بافر ۱۰ mM فسفات pH ۷/۴. طیف های مشابهی برای هر لیگاند در بافر ۱۰ mM گلیسین pH ۲/۰ مشاهده شده است ۱۱۰

شکل ۳-۳۵) طیف های نشر فلورسانس محلول (A) ۱۰ µM و (B) ۴۰ µM آراچیدونیل سروتونین در حضور غلظت های مختلف β-Lg در بافر ۱۰ mM فسفات pH ۷/۴. طیف هایی با الگوی مشابه برای 5-HT در این pH و برای هر دو لیگاند در بافر ۱۰ mM گلیسین pH ۲/۰ و نیز در شرایط ۲۵٪ الکل برای هر دو لیگاند در هر دو pH مشاهده شده است. در داخل این شکل، منحنی های خطی 1/ΔF بر حسب 1/[β-Lg] رسم شده اند ۱۱۲

شکل ۳-۳۶) طیف های نشر فلورسانس محلول µM ۵ بتالاکتوگلوبولین در حضور غلظت های مختلف (A) سروتونین و (B) آراچیدونیل سروتونین در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴. طیف هایی با الگوی مشابه برای هر دو لیگاند در بافر mM ۱۰ گلیسین pH ۲/۰ و نیز در شرایط ۲۵٪ الکل برای هر دو لیگاند در هر دو pH مشاهده شده است. غلظت های 5-HT و AA-5HT به ترتیب از ۴۰-۰/۰ و ۵۰-۰/۰ میکرومولار تغییر کردند. در داخل این شکل، منحنی های خطی log [(F0-F)/F] بر حسب log [Ligand] بر اساس معادله ۲-۲ رسم شده اند ۱۱۴

شکل ۳-۳۷) (A) طیف های نشر فلورسانس محلول µM ۵ کمپلکس 5-HT/β-Lg (با نسبت مولی ۱) در حضور غلظت های مختلف رتینول در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴. غلظت رتینول در محلول از ۰ تا ۱۰۰ میکرومولار (نسبت مولی حدود ۲۰) متفاوت بود. طیف های مشابهی برای نشر فلورسانس ۵ میکرومولار کمپلکس retinol/β-Lg (با نسبت مولی ۱) در حضور غلظت های متفاوت از سروتونین در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴، به دست آمد. (B) منحنی خطی log [(F0-F)/F] بر حسب log [retinol] برای تیتراسیون محلول µM ۵ کمپلکس 5-HT/β-Lg در حضور غلظت های مختلف رتینول در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴ که بر اساس معادله ۲-۲ رسم شده است. منحنی های مشابهی برای تیتراسیون µM ۵ کمپلکس retinol/β-Lg در حضور غلظت های متفاوت از سروتونین در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴، به دست آمد ۱۱۸

شکل ۳-۳۸) طیف های نشر فلورسانس محلول µM ۵ پروتئین β-Lg در حضور غلظت های مختلف دوپامین در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴. غلظت دوپامین در محلول از ۰ تا ۵۰۰ میکرومولار (نسبت مولی حدود ۱۰۰) متفاوت بود. طیف های مشابهی برای نشر فلورسانس ۵ میکرومولار β-Lg در حضور غلظت های متفاوت از لیگاندهای آراچیدونیل آمینوبوتیریک اسید و پروستاگلاندین در بافر mM ۱۰ فسفات pH ۷/۴، و برای همگی داروها در بافر mM ۱۰ گلیسین pH ۲/۰، به دست آمد. با افزایش غلظت لیگاندها، نظم خاصی در افزایش و یا کاهش شدت نشر فلورسانس β-Lg مشاهده نشد (در بعضی مواقع کاهش و در بعضی مواقع افزایش شدت نشر فلورسانس β-Lg مشاهده شد) که حاکی از عدم پیوند شدن این لیگاندها به β-Lg است ۱۲۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱) خصوصات لاکتوپروتئین های اصلی ۷

جدول ۱-۲) غلظت پروتئین های اصلی شیر ۹

جدول ۱-۳) روش های خالص سازی پروتئین بتالاکتوگلوبولین از شیر گاو ۱۶

جدول ۱-۴) نامگذاری اشکال مختلف پروتئین ها و تجمعات پروتئینی که توسط روش های مختلف الکتروفورز آنالیز شده است ۲۳

جدول ۲-۱) ترکیب ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲٪ ۵۰

جدول ۲-۲) ترکیب ژل الکتروفورز طبیعی Native-PAGE ۱۰٪ ۵۱

جدول ۳-۱) درجه قنددار شدن β-Lg در حضور قندهای مختلف، به دست آمده با استفاده از روش OPA. ۶۶

جدول ۳-۲) مقادیر ساختار دوم β–Lg A طبیعی و حرارت داده شده در دماهای مختلف بر اساس روش چو و فسمن ۸۰

جدول ۳-۳) مقادیر ساختار دوم β–Lg A طبیعی و قنددار شده در حضور قندهای مختلف بر اساس روش چو و فسمن ۸۵

جدول ۳-۴) مقادیر IC_{50}. حاصل از آزمایشات مهار پیوندی IgE بتالاکتوگلوبولین طبیعی و حرارت دیده در دماهای مختلف ۹۶

جدول ۳-۵) مقادیر IC_{50}. حاصل از آزمایشات مهار پیوندی IgE بتالاکتوگلوبولین کنترل و β–Lg های قنددار شده در حضور لاکتوز و ریبوز ۹۹

جدول ۳-۶) مقایسه بین درجه قنددار شدنβ-Lg و پیوند شدن IgE. نتایج با در نظر گرفتن ۱۰۰٪ پیوند شدن IgE به β-Lg کنترل و مقایسه نمونه های قنددار شده با آن می باشد ۱۰۰