دانشکده رازی

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی

گرایش بیوشیمی

تحت عنوان:

کلونینگ و بیان آلرژن *Che a 1* گرده گیاه سلمه

اساتید راهنما:

دکتر سیروس قبادی

دکتر فاطمه واحدی

استاد مشاور:

دکتر مجتبی سنکیان

نام دانشجو:

مریم محدث فر

مهر ماه ۱۳۸۸

چکیده:

کلونینگ و بیان آلرژن Che a 1 به عنوان مهمترین آلرژن گیاه سلمه

Chenopodium Album (سلمه در فارسی) یک علف هرز متعلق به Chenopodium ها که به صورت خودرو در تمام طول سال رشد می کند. گرده *Chenopodium Album* عامل اصلی آلرژی درایران است. مهمترین آلرژنهایی که به *Chenopodium Album* نسبت داده شده اند عبارتند از : *Che a 1*، *Che a 2* و *Che a 3*. هدف از این کار کلون کردن *Che a 1* داخل باکتری *Escherichia coli* (*E. coli*) برای تولید آلرژن نوترکیب می باشد. کلونینگ، تولید و خالص سازی آلرژن نوترکیب درباکتری *E. coli* *یک روش اقتصادی درتهیه مقادیر زیاد پروتئین خالص شده برای مقاصد درمانی است.* برای کلون کردن این آلرژن،ابتدا از گرده گیاه برای استخراج RNA استفاده گردید.سپس با cDNA ساخته شده از RNA استخراج شده از گرده گیاه *Chenopodium Album* ، واکنش زنجیره ای پلی مرازی گذاشته شد. سپس کلونینگ با ورود cDNA ساخته شده به داخل پلاسمید pET21b(+) و ترانسفرم کردن آن داخل باکتری *E.coli* سویه TOP10 انجام شد. برای بررسی کلونینگ انجام گرفته پلاسمید های حاوی *Che a 1* تولید شده تعیین توالی گردیدند. نتیجه آزمایشات، وجود قطعه *Che a 1* را در پلاسمید های قرار گرفته در باکتری *E. coli* سویه TOP 10تایید می کرد. نتیجه سکانس های بدست آمده شباهت زیاد این توالی را با توالی موجود در GenBank نشان می داد. در نتیجه cDNA آلرژن اصلی گرده گیاه *Chenopodium Album*، *Che a 1 با موفقیت کلون شد.در این مطالعه برای اولین از سیستم پروکاریوتی برای کلون کردن Che a 1 استفاده گردید.*

کلمات کلیدی: آلرژن، گیاه سلمه، کلونینگ

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول	
مقدمه	
۱-۱- آلرژی	۲
۱ -۱-۱- تعریف آلرژن	۲
۱-۱-۲- طبقه بندی آلرژن‌ها	۲
۱-۱-۲-۱- آلرژن‌های خانگی	۲
۱-۱-۲-۲- آلرژن‌های گرده ها	۳
۱-۱-۲-۲-۱- گرده ها (پولن ها)	۳
۱-۱-۳- علایم آلرژی	۳
۱-۱-۴- نحوه تشخیص آلرژی	۴
۱-۱-۵- درمان آلرژی	۴
۱-۱-۶- گیاه سلمه	۴
۱-۱-۷- آلرژی به گردهٔ گیاهان	۵
۱-۱-۷-۱- علایم بالینی	۵
۱-۱-۸- طبقه بندی آلرژن‌های گیاهی از دیدگاه مولکولی	۷
۱-۱-۸-۱- ابر خانواده کاپین	۷
۱-۱-۸-۲- ابر خانواده پرولامین	۷
۱-۲- روش‌های تخلیص پروتئین‌ها	۷
۱-۲-۱- استخراج پروتئین	۸
۱-۲-۲- روش‌های تخریب سلولی	۸
۱-۲-۲-۱- روش-های ملایم	۸
۱-۲-۲-۲- روش‌های شدید	۸
۱-۲-۳- تغلیظ عصاره حاوی پروتئین	۱۰

عنوان	صفحه
۱-۲-۴- تکنیک های مورد استفاده در تخلیص پروتئین ها	۱۲
۱-۲-۴-۱- کروماتوگرافی	۱۲
۱-۲-۴-۱-۱- کروماتوگرافی تعویض یون	۱۳
۱-۲-۴-۱-۲- کروماتوگرافی بر اساس پیوندهای آب گریزی	۱۳
۱-۲-۴-۱-۳- کروماتوگرافی میل جذبی	۱۴
۱-۲-۴-۱-۳-۱- کروماتوگرافی میل جذبی با استفاده از لیگاندهای مصنوعی	۱۵
۱-۲-۵-۱-۳-۲- کروماتوگرافی میل جذبی با استفاده از عناصر فلزی	۱۷
۱-۲-۵-۱-۳-۳- کروماتوگرافی میل جذبی با استفاده از ترکیبات بیولوژیکی نشاندار	۱۹
۱-۳- کلونینگ	۲۰
۱-۳-۱- جداسازی DNA و RNA	۲۱
۱-۳-۱-۱- شکستن سلول	۲۱
۱-۳-۱-۲- رسوب دادن اسید های نوکلئیک	۲۱
۱-۳-۱-۳- جدا کردن	۲۲
۱-۳-۱-۴- رسوب پروتئین ها	۲۲
۱-۳-۱-۵- جدا کردن DNA و RNA از هم	۲۲
۱-۳-۱-۶- رسوب با اتر	۲۲
۱-۳-۱-۷- جداسازی قطعات DNA	۲۲
۱-۳-۱-۸- تعیین غلظت DNA استخراج شده	۲۳
۱-۳-۲- تولید و تکثیر DNAدر آزمایشگاه	۲۳
۱-۳-۲-۱- سنتز شیمیایی	۲۳
۱-۳-۲-۲- PCR	۲۳
۱-۳-۲-۲-۱- دمای ذوب (TM)	۲۴
۱-۳-۲-۲-۲- مخلوط پرایمرها	۲۵
۱-۳-۲-۲-۳- انواع DNA پلی مراز ها	۲۵
۱-۳-۲-۲-۳-۱- DNAپلی مراز Taq	۲۵

عنوان	صفحه
۱-۳-۲-۲-۳-۲- DNA پلی مراز Pfu	۲۵
۱-۳-۲-۲-۴- یون منیزیم	۲۶
۱-۳-۲-۲-۵- مشکلات آلودگی	۲۶
۱-۳-۳- خالص سازی محصولات PCR	۲۷
۱-۳-۴- برش مولکول‌های DNA	۲۸
۱-۳-۴-۱- Type I restriction-modification system	۲۸
۱-۳-۴-۲- Type II restriction-modification system	۲۸
۱-۳-۴-۲-۱- انتهای چسبنده	۲۹
۱-۳-۴-۲-۲- انتهای صاف	۲۹
۱-۳-۴-۳- Type III restriction-modification system	۳۰
۱-۳-۵- اتصال مولکول‌های DNA	۳۰
۱-۳-۵-۱- دستکاری انتهاهای مولکول‌ها	۳۱
۱-۳-۶- حامل‌های کلون کردن PCR	۳۱
۱-۳-۶-۱- پلاسمیدها	۳۲
۱-۳-۶-۲- باکتریوفاژها (ویروس باکتری)	۳۲
۱-۳-۶-۳- کازمیدها	۳۲
۱-۳-۶-۴- فاسمیدها	۳۲
۱-۳-۷- روش های وارد کردن حامل ها به داخل میزبان	۳۳
۱-۳-۷-۱- ویروس‌ها و باکتریوفاژها	۳۳
۱-۳-۷-۲- ترانسفورماسیون	۳۳
۱-۳-۷-۳- الکتروپورشن	۳۴
۱-۳-۷-۴- تفنگ ذره‌ای یا تفنگ اسید نوکلئیک	۳۴
۱-۳-۷-۵- اتصال پروتوپلاسمی	۳۵
۱-۳-۷-۶- تزریق بسیار کم محلول حاوی DNA	۳۵
۱-۳-۸- سیستم های حامل کلون کردن PCR	۳۵

عنوان	صفحه

۱-۳-۸-۱-کلون کردن TA ۳۵

۱-۳-۸-۲- کلون کردن انتهای صاف ۳۶

۱-۳-۸-۳- کلون کردن قطعات حاصل از PCR طولانی ۳۶

۱-۴- هدف از انجام این تحقیق ۳۷

فصل دوم

مواد و روش ها

۲-۱- فهرست مواد مورد استفاده ۴۰

۲-۲- فهرست دستگاه های مورد استفاده ۴۲

۲-۳- طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت کلون نمودن توالی کد کننده ژن آلرژن Che a 1 گیاه سلمه ۴۳

۲-۳-۱- پرایمر Forward ۴۴

۲-۳-۲- پرایمر Reverse ۴۴

۲-۴- جمع آوری گرده گیاه سلمه ۴۴

۲-۵- استخراج RNA از گرده گیاه سلمه ۴۵

۲-۶- حذف DNA موجود در RNA استخراج شده ۴۵

۲-۷- ساخت cDNA از Total RNA ۴۶

۲-۸- تکثیر اختصاصی ژن کد کننده آلرژن Che a 1 گیاه سلمه با استفاده از پرایمر اختصاصی ۴۶

۲-۹- انجام PCR بهینه شده برای تکثیر Che a 1 با استفاده از آنزیم pfu پلی مراز ۴۸

۲-۱۰- انجام کلونینگ و تائید کلون های حاوی پلاسمید کلون شده ۴۹

۲-۱۱- جداسازی و خالص سازی باند PCRمورد نظر از ژل آگارز ۵۰

۲-۱۲- برش مضاعف محصول PCR توسط آنزیم Xho 1 و Not 1 ۵۱

۲-۱۳- آماده سازی pET21b (+) بمنظور ایجاد انتهای چسبنده برای واکنش لیگاسیون با آنزیم های محدودالاثر Not 1 و Xho 1: ۵۲

۲-۱۴- خالص سازی پلاسمید استخراج شده از ژل ۵۴

۲-۱۵- برش پلاسمید های خالص شده با آنزیم های Not 1 و Xho 1 ۵۴

عنوان	صفحه

۲-۱۶- انجام واکنش لیگاسیون برای کلون کردن قطعه Che a 1 (bp 507) داخل pET21b (+) ۵۵

۲-۱۷- کامپتنت نمودن باکتری E.coli طبق روش تغییر یافته اینو ۵۶

۲-۱۸- ترانسفرم نمودن باکتری های TOP 10 کامپتنت شده توسط پلاسمید pET21b (+) ۵۷

۲-۱۹- استخراج پلاسمید ۵۷

۲-۲۰- تعیین توالی قطعه وارد شده ۵۸

۲-۲۱- بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب ۵۸

۲-۲۲- وارد نمودن پلاسمید نوترکیب pET21b (+) Che a 1 درون باکتری E.Coli BL-21 ۵۸

۲-۲۳- کشت باکتری نوترکیب و بیان پروتئین نوترکیب Che a 1 ۵۹

۲-۲۴- بررسی پروتئین بیان شده با روش SDS-PAGE ۵۹

۲-۲۵- رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو ژل پلی آکریل آمید ۶۲

۲-۲۶- رنگبری ژل پلی آکریل آمید ۶۲

۲-۲۷- بیان پروتئین نوترکیب در مقیاس بالا ۶۲

۲-۲۸- خالص سازی پروتئین نوترکیب به روش متال افینیتی کروماتوگرافی ۶۲

۲-۲۹- خالص سازی پروتئین Che a 1 بیان شده ۶۳

۲-۳۰- دیالیز پروتئین تخلیص شده ۶۳

۲-۳۱- بررسی آلرژنیسیته Chea 1 با استفاده از سرم افراد بیمار حساس به گرده گیاه سلمه ۶۵

فصل سوم

نتایج

۳-۱- استخراج RNA ۶۸

۳-۲- تهیه cDNA و انجام PCR اختصاصی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۶۹

۳-۳- جداسازی باند PCR مورد نظر از ژل آگارز ۷۰

۳-۴- آماده سازی محصول PCR ۷۱

۳-۵- استخراج پلاسمید pET21b (+) ۷۲

۳-۶- آماده سازی پلاسمید استخراج شده ۷۴

عنوان

صفحه

۳-۷- انجام واکنش لیگاسیون و ترانسفرمه کردن باکتری داخل E. coli (TOP 10) ۷۵

۳-۸- تایید قطعه کلون شده توسط استخراج پلاسمید و انجام الکتروفورز ۷۵

۳-۹- بیان پروتئین نوترکیب Che a 1 ۷۶

۳-۱۰- بررسی آلرژنیسیته rChea1با استفاده از سرم افراد بیمار حساس به گرده گیاه سلمه ۷۷

فصل چهارم

نتایج

۴-۱- بحث ۸۰

۴-۱-۱ علت ترانسفورم اولیه در E.coli TOP10 ۸۳

۴-۱-۲ E.coli BL21 Star (DE3) ۸۴

۴-۲- پیشنهادات ۸۷

منابع ۸۹

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱- شمایی از دستگاه French pressure مورد استفاده برای استخراج پروتئین ۹

شکل ۱-۲- شمایی ازآسیاب کلوئیدی مورد استفاده برای استخراج پروتئین ۱۰

شکل ۱-۳- استفاده از گلوله های شیشه ای در محفظه ای مجهز به همزن و سرد کن برای استخراج پروتئین ۱۰

شکل ۱-٤- مقایسه دو مولکول پروتئین با مناطق هیدروفیلیک متفاوت.مناطق آبی رنگ مشخص کننده میزان آبدوست بودن پروتئین می باشد. ۱۱

شکل ۱-۵- شمایی از دیالیز جهت خروج نمک‌های مورد استفاده در رسوب دادن پروتئین ۱۲

شکل ۱-٦- کروماتوگرافی تعویض یونی ۱۳

شکل ۱-۷- کروماتوگرافی میل جذبی ۱۴

شکل ۱-۸- الگو برداری از پروتئین ۱۵

شکل ۱-۹- A: منطقه کلید گلوتاتیون S ترانسفراز متشکل از سه اسید آمینه فنیل آلانین، گلایسین و گلوتامین.
B: منطقه کلید لیگاند مصنوعی متشکل از سه مولکول فنیل آلانین، تری آذین و گلوتامین ۱۶

شکل ۱-۱۰- مراحل ساخت لیگاند مصنوعی متشکل از سه مولکول فنیل الانین، تری آذین و گلوتامین ۱۷

شکل ۱-۱۱- استفاده از عناصر فلزی در کروماتوگرافی میل جذبی ۱۷

شکل ۱-۱۲- ستونهای کروماتوگرافی میل جذبی توسعه یافته حاوی مس ستونهای توسعه یافته از ظرفیت بالایی برخوردارند که این امر نیاز به شفاف سازی اولیه را از بین می برد. در مرحله C با انجام عملیات شستشو مقادیری از مس که به صورت متصل نشده وجود دارند خارج می‌شود. در مرحله D بیومس وارد ستون می‌شود. در مرحله E بیومس در ستون وجود دارد و در مرحله F و G که در شکل نشان داده نشده است شستشو در جهت عکس ورود مواد انجام می‌شود تا ذرات سلولی و تکه های سلولی خارج شوند. در مرحله H شوستشو توسط ایمیدازول انجام می‌شود تا پروتئین مورد نظر تخلیص گردد و سپس ستون توسط EDTA احیاء شده و به‌وسیله NaOH شسته می‌شود.(Lim, 2007) ۱۸

شکل ۱-۱۳- نحوه اتصال پروتئین نشاندار با پلی هیستیدین، به رزین حاوی فلزات ۱۹

شکل ۱-۱٤- مکانیسم جدا شدن پروتئین نشانداراز فلز ۲۰

شکل ۱-۱۵- مکانیسم واکنش لیگاز ۳۱

شکل ۱-۱٦- چگونگی ورود قطعات پلاسمید در اثر بار الکتریکی به سلول ۳۴

شکل ۱-۱۷- تفنگ ذره ای ۳۴

شکل ۳-۱- الکتروفورز RNA در ژل آگارز ۱/۵ ٪. باندهای RNA ریبوزومی 18S و 25S در قسمت میانی، باندهای RNA تخریب شده در پایین و DNA در بالای ژل. M: شاخص وزن مولکولی. ۱: RNA قبل از مرحله تخریب DNA.۲: RNA بعد از مرحله تخریب DNA ۶۸

شکل۳-۲- الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز۱/۵٪. M: شاخص وزن مولکولی ۱ کیلو جفت بازی،۱: قطعه bp ۵۰۴ تکثیر یافته توسط پرایمر های اختصاصی ۶۹

شکل ۳-۳- الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز. شکل الف : محصول PCR برش خورده از ژل آگارز ۱/۵٪. شکل ب : محصول PCR بعد از خالص سازی از ژل آگارز ۱/۵٪ ۷۰

شکل ۳-٤- الکتروفورز محصول خالص شده bp ۵۰۴ از ژل آگارز M٪۱/۵ : شاخص وزن مولکولی، 1: محصول خالص شده bp ۵۰۴ روی ژل آگارز بعد از برش های آنزیمی توسط Not1 و Xho1 ۷۱

شکل ۳-۵- نقشه وکتور pET21b (+) ۷۲

شکل ۳-٦- استخراج پلاسمید. جدا کردن پلاسمید های سوپر کویل از انواع شکسته ۷۳

شکل۳-۷-M: شاخص وزن مولکولی. ۱ کیلو جفت بازی 1: الکتروفورز پلاسمید pET21B 1: پلاسمید برش خورده بعد از هر دو برش آنزیمی ۷۴

شکل ۳-۸- الکتروفورز پلاسمید های استخراج شده از ژل آگارز ۱٪.M: شاخص وزن مولکولی 1: پلاسمید خالص استخراج شده بدون قطعه *Che a 1*. 2،3،4و5: پلاسمید های استخراج شده حاوی قطعه Che a 1 ۷۵

شکل۳-۹- بیان پروتئین *Che a 1* نوترکیب گیاه سلمه (ژل SDS-PAGE رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو). M: شاخص وزن مولکولی 1:;کلون حاوی پلاسمید بدون قطعه ژن *Che a 1*. 2: کلون حاوی قطعه ژن *Che a 1* بدون IPTG. 3,4,5: کلون حاوی قطعه ژن *Che a 1* بعد از افزودن IPTG ۷۶

شکل۳-۸- ایمونوبلاتینگ *Chea1* با سرم افراد حساس به گرده گیاه سلمه. M: شاخص وزن مولکولی. 1: ایمونوبلاتینگ پروتئین تخلیص شده *rChea1* با سرم فرد پریک منفی. 2 : واکنش افراد حساس به گرده گیاه سلمه دارای پریک مثبت با rChea1 ۷۷

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- مقادیرمواد تشکیل دهنده واکنش PCR۴۶

جدول ۲-۲- پارامترهای ترموسایکلرجهت تکثیر اختصاصی cDNA آلرژن *Che a 1* با استفاده از پرایمراختصاصی ۴۷

جدول ۲-۳- محتوای بهینه واکنش PCR برای تکثیر *Che a 1* با استفاده از *pfu* پلی مراز ۴۸

جدول ۲-٤- شرایط بهینه واکنش PCR برای تکثیر Che a 1 با استفاده از *pfu* پلی مراز ۴۸

جدول ۲-۵- محتوای واکنش برش آنزیمی محصول PCR با Not 1 ۵۱

جدول ۲-٦- محتوای واکنش برش آنزیمی محصول PCR با Xho 1 ۵۱

جدول ۲-۷- شرایط بهینه برش اول آنزیمی پلاسمید با آنزیم Not 1 ۵۴

جدول ۲-۸- شرایط بهینه برش دوم آنزیمی پلاسمید با آنزیم Xho *1* ۵۴

جدول ۲-۹- شرایط بهینه برای انجام واکنش لیگاسیون ۵۵

جدول ۲-۱۰- مقدار مواد مورد نیاز جهت تهیه ژل جدا کننده و ژل متراکم کننده ۶۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱ آلرژی

آلرژی یک عملکرد نامناسب سیستم ایمنی است که به عنوان یک پاسخ به آنتی ژن‌های بی ضرر که آلرژن نامیده می شوند ایجاد میشود. آلرژی از کلمه یونانی Allos به معنی "دیگر" و ergon به معنی "کارکردن" گرفته شده است (Zuerche, 2006). در واقع آلرژی یک پاسخ التهابی عمومی یا سیستمیک به آلرژن ها می باشد.

۱-۱-۱ تعریف آلرژن

تعریف کلی آلرژن عبارتست از پروتئینی که توانایی حساس کردن فرد را از طریق تولید IgE داشته باشد و پس از برخورد مجدد با آن پروتئین، پاسخ آلرژیک ایجاد شود. واکنش متقابل میان آلرژن ها و IgE در واقع شالوده بیماری‌هایی مانند رینیت، سینوزیت، آسم، کهیر، اگزما، درماتیت، آنافیلاکسی و بعضی اختلالات گوارشی می باشد. اغلب آلرژن‌ها پروتئین هستند. اکثر آلرژن‌های گیاهی، پروتئین های ذخیره ای (سویا، بادام زمینی) ومهار کننده های پروتیناز (گندم ،برنج و سویا) می باشند. علاوه بر این تعدادی پروتئین مرتبط با بیماری زایی در میوه های تازه و سبزیجات به عنوان آلرژی غذایی وجود دارد.

۱-۱-۲ طبقه بندی آلرژن‌ها

آلرژن‌ها به گروهی از پروتئین‌ها تعلق دارند و دارای عملکرد بیولوژیک متفاوتی می باشند، این پروتئین‌ها به سه گروه اصلی تقسیم می شوند که عبارتند از:

۱-۱-۲-۱آلرژن‌های خانگی[1]

آنزیم ها (پروتئازها)، پروتئین‌های متصل شونده به لیگاند یا لیپوکالین، آلبومین‌ها، تروپومیوزین‌ها و پروتئین های متصل شونده به کلسیم.

۱-۱-۲-۲ آلرژن‌های گرده ها[2]

[1] In door
[2] Out door

پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی[1]، پروتئینهای متصل شونده به کلسیم، مهار کننده تریپسین، پکتات لیاز،[2] آلرژنهای غذایی حیوانی و گیاهی.
اعضاء این خانواده عبارتند از: پروتئین انتقال دهنده غیر اختصاصی لیپیدها (nsLTPs)، پروفیلین‌ها، پروتئین-های ذخیره‌ای دانه‌ها و تروپومیوزین (Breiteneder, 2000).

۱-۱-۲-۲-۱ گرده ها (پولن ها)

سلول‌های جنسی نر گیاهان هستند که برای باروری گیاه ضروری می باشند و معمولاً متوسط اندازهٔ آنها کمتر از قطر موی انسان است. برخی از گرده های گیاهان، به علت پوشش خاص خود سنگین بوده و توسط حشرات حمل می شوند و در نتیجه ایجاد آلرژی نمی‌کنند. اما گرده‌های علف‌های هرز که سبک هستند و توسط باد تا مسافت‌های طولانی جابجا می‌شوند، بسیار آلرژی زا هستند.

علایم آلرژی فصلی در اوایل بهار ناشی از گرده گیاهانی مانند: بلوط، غان، چنار، زبان گنجشک، سرو و گردو می باشد. در اواخر بهار و اوایل تابستان علایم آلرژی، ناشی از گرده علف‌های هرزی مانند: تیموتی، پنجه مرغی، علف یاغی، یونجه و تُرشک می باشد. اواخر تابستان علایم آلرژی توسط گردهٔ علفهای هرزی مانند: تاج خروس، تاج خروس سفید، علف شور و توق یا زردینه ایجاد می شود. البته شرایط آب و هوایی هر منطقه می تواند این دوره های زمانی را اندکی تغییر دهد.

۱-۱-۳ علایم آلرژی

دامنه علایم آلرژی غذایی از علایم بسیار خفیف و منطقه‌ای همانند سندرم آلرژی دهانی یا کهیر تماسی که چند ساعت بعد از خوردن ماده آلرژی زا بروز می‌کند، تا علایم سیستمیک تهدید کننده زندگی مانند شوک آنافیلاکسی که بلافاصله بعد از خوردن ماده آلرژی زا ظهور می‌کند، متغییر می‌باشد. شدت یک واکنش آلرژیک غذایی به فاکتورهای مختلفی شامل میزان آلرژن جذب شده، نوع آلرژن، هضم آلرژن در دستگاه گوارش، شرایط سلامت فرد، ورزش فیزیکی، مصرف الکل و نوشیدنی‌های سرد و مصرف داروهایی مثل داروهای ضد التهابی غیراسترویدی می باشد (Lidholm, 2006).

۱-۱-٤ نحوه تشخیص آلرژی

اولین قدم در تشخیص آلرژی، گرفتن شرح حال دقیق بیمار می باشد(van, 2007). بعد از گرفتن سابقه بیمار، ارزان‌ترین و ساده ترین روش تشخیص تست پوستی می باشد. اساس کار آزمون پوستی وارد کردن مقدار کمی آلرژن به داخل اپیدرم می باشد . با ایجاد تماس بین عصاره آلرژن و IgE اختصاصی متصل

[1] pathogenesis related protein
[2] pectate lyases .

بر روی سلول‌های ماستوسیت پوستی، ماستوسیت‌ها را وادار به آزاد سازی مواد درون گرانول‌هایشان می نماید، در نتیجه بعد از ۱۰-۲۰ دقیقه اریتم (بدلیل اتساع عروق) و ویل[1] (به دلیل افزایش نفوذپذیری عروق) و خارش (بدلیل تحریک انتهای اعصاب این ناحیه) ایجاد می گردد(van, 2007. van, 2006). در اینصورت حضورIgE اختصاصی این آلرژن، بر روی ماستوسیت‌ها به اثبات میرسد. در تستهای پوستی تکنیک و میزان پایداری آلرژن بکار برده شده، مهمتر از نحوه انجام تست می باشد. برای انجام تست پوستی پریک از عصاره های گلیسرینه با رقت‌های ۱:۲۰ یا ۱:۴۰ همراه با کنترل مثبت (هیستامین) و کنترل منفی (سالین) استفاده می¬شود (Dupont, 1998)

۱-۱-۵ درمان آلرژی

راه‌های درمان آلرژی عبارتند از (Hill, 2001):

۱- اجتناب از آلرژن یا مواد محرک (Van, 2006. Dupont, 1998, Nowak, 2006)

۲- درمان دارویی (Sampson, 2004)

۳- ایمونی درمانی (Marks, 1993)

۴- تنظیم سیستم ایمنی (Marks, 1993).

۱-۱-٦ گیاه سلمه

گیاه سلمه، علف هرزی است که در تمام طول سال به صورت خودرو در نواحی بیابانی و نیمه بیابانی کشور های عربستان صعودی، ایران و کویت می روید. این گیاه از شدت آلرژی زایی بالایی برخوردار است. به نظر می رسد منشاء اصلی آلرژی زا در این گیاه گرده و برگهای آن باشند بطوری‌که آلرژی های وابسته به پولن در تمام گونه های این گیاه دیده می شوند. برگ‌های اغلب گیاهان این گونه موجب دو حالت اصلی آلرژی می شود. برگ‌های له شدهٔ آن گازهای آلی فّراری تولید می کند که در صورت استنشاق موجب سرگیجه می شوند و همچنین در صورت تماس با پوست موجب حساسیت پوستی می گردند. این گیاه علف هرزی است یکساله، ایستا به ارتفاع۳۰ تا ۱۸۰ سانتیمتر که ساقهٔ آن صاف، شیاردار و منشعب است. برگ‌ها متناوب و سطح زیرین آنها متمایل به سفید و طول آنها ۲/۵ تا ۷/۵ سانتیمتر است، حاشیهٔ برگ‌ها صاف، لوبدار و یا موجدار می باشد. گل آذین هرمی شکل، گلها کوچک و متمایل به سبز و بدون دم‌گل هستند. پراکنش آن در استان های گرگانف اصفهان، تهران، بلوچستان، خراسان می‌باشد.

[1] Weal

۱-۱-۷ آلرژی به گردهٔ گیاهان

۱-۱-۷-۱ علایم بالینی

گرده گیاهان به عنوان مهم‌ترین عامل آلرژی زا در محیط خارج از محل سکونت شناخته شده است. در فردی که به گردهٔ گیاهان آلـرژی ندارد، گـرده‌هایی که با تنـفس وارد بیـنی می شـوند، به سمت حـلق رفتـه و پس از آن یـا بـلعیـده می شوند و یا با سرفه خارج می گردند. اما در فرد آلرژیک، به محض اینکه گردهٔ مسئول آلـرژی در تماس با مخـاط بینی قرار می گیرد یکسری واکنش‌هـای زنجیره‌ای آغاز می‌شوند که در نهایت منجر به آزادسازی هیستامین و سایر واسطه‌های شیمیایی از ماست‌سل‌ها می گردد، این مـواد شیمیایی منجر به اتساع عروق خونی کوچک موجود در بینی می شوند که نتیجهٔ آن التهاب، قرمزی و گرفتگی بینی است. هیستامین همچنین باعث خارش و سوزش بینی و افزایش ترشح موکوس (خلط و ترشحات مخاطی) می‌گردد. سایر واسطه های شیمیایی مانند پروستاگلاندین ها و لکوترین ها هم می توانند باعث بروز برخی علایم آلرژی شوند. در افـرادی که به گـردهٔ گیاهان حساسیت دارند، علایم آلـرژی به‌صورت‌های متفاوتی بروز می‌کنند. شـایعترین علایم و نشانه های آلرژی به گردهٔ گیاهان موارد زیر می باشند:

- عطسه که معمولاً همراه با آبریزش بینی است.
- سرفه
- خارش چشم ها، بینی و گلو، اشک ریزش.
- کونژکتیویت (التهاب ملتحمهٔ چشم).
- هالهٔ آلرژیک (حلقه های سیاه رنگ اطراف پلک تحتانی چشم ها که به علت اختلال در تخلیهٔ خون وریدی سینوس‌ها اتفاق می افتد).
- سلام آلرژیک (برخی از کودکان مبتلا به آلرژی، بعلت آبریزش بینی به‌طور مداوم با پشت دست، بینی خود را به سمت بالا می رانند که این حالت را سلام آلرژیک می نامند).

علایم در برخی از افراد به تدریج به سمت آسم پیشرفت می‌کنند که یک مشکل جدی تنفسی است. اگر این حالت هرساله در فصل گرده افشانی گیاهان تکرار شود منجر به مزمن شدن آسم خواهد شد. نشانه های آسم شامل سرفه، خِس خِس سینه و کوتاهی نفس به علت تنگ شدن راه‌های هوایی و افزایش تولید موکوس است. آسم می‌تواند ناتوان کننده و حتی کشنده باشد. اگر خس خس سینه و کوتاهی نفس همراه با آبریزش چشم و بینی باشند، نشانهٔ درگیری شدید راههای هوایی است و برای رفع علایم باید درمان طبی انجام گیرد

گاهی افتراق بین سرماخوردگی و آلرژی مشکل است زیرا بسیاری از علایم در هر دو بیماری مشابه و مشترک هستند. البته تفاوت‌هایی نیز وجود دارد که در امر تشخیص صحیح به پزشک و بیمار کمک می‌کند. سرمـاخوردگی یک بیماری عفـونی است و منشأ ویـروسی دارد به همین علت تب خفیف تا متوسطی

در فرد مبتلا ایجاد می شود و فرد احساس خستگی، کسالت و درد عضلانی دارد که با استراحت بهبود می-یابد. عطسه، سرفه، آبریزش بینی و چشم، احتقان بینی، التهاب گلو و کاهش حس بویایی و چشایی از علایم شایع در سرماخوردگی هستند. این علایم معمولاً ۳ تا ۵ روز و یا به ندرت ۲ هفته تداوم دارند و سپس فرد کاملاً بهبود می‌یابد. ترشحات بینی در سرماخوردگی معمولاً غلیظ و چرکی هستند. شیوع سرماخوردگی در ماه‌های سرد سال بیشتر است و الگوی دوره ای خاصی ندارد. در مقابل منشاء آلرژی غیرعفونی است یعنی علایم ایجادشده ناشی از تماس با مواد آلرژی زا می باشد که شایع‌ترین این مواد عبارتند از: گردهٔ گیاهان، آلرژن‌های ناشی از مایت موجود در گرد و غبار منزل، آلرژن‌های ناشی از حیوانات خانگی مانند سگ و گربه، کپک ها و .... همانند سرماخوردگی، در آلـرژی بینی (رینیت آلـرژیک) نیز علایم به‌صـورت عطسه (عطسه‌های تکراری)، آبریزش بینی (ترشحات شفاف و آبکی)، آبریزش و خارش چشم، احتقان بینی و گاه سرفه می‌باشد. وجه افتراق ایندو حالت از یکدیگر، تب و احساس کسالت و درد عضلانی است که در آلرژی بینی این موارد وجود ندارد. همچنین علایم آلرژی بینی تا زمانی که فرد در تماس با آلرژن مورد نظر باشد، ادامه دارد و در بسیاری از مـوارد یک الگوی دوره‌ای مشخص را نشـان می دهـد، مثلاً هـر سـال در مـاه یا فصـل مشخصی علایم ظاهر می‌شوند که علت آن گرده افشانی گیاهان در ایام خاصی از سال می‌باشد. فردی که به گـردهٔ گیاه خاصی حساس است همزمان با فصل گـرده افشانی آن گیاه، علایم آلرژی را نشان خواهد داد و از آنجایی که درخت‌ها، علف-ها و گل‌ها در فصـول متفاوتی از سـال گـرده افشـانی می‌کنند بنابراین در بهـار، تـابستان، پاییز و حتی زمستان هم ممکن است علایم آلرژی ایجاد شود. البته افرادی که به آلرژن-های داخل منزل مانند مایت، آلرژن-های حیوانی و یا کپک ها حساسیت دارند معمولاً در تمام طول سال علامتدار می باشند.

علیرغم وجود علایم مشابه در هر دو بیماری آلرژی و سرماخوردگی، الگوی بروز علایم و توالی زمانی آنها و نیز ارتباط با منبع آلرژن به گونه ای است که بسیاری از بیماران، خود به این مسئله پی برده و در موقع مراجعه به پزشک حتی نوع مادهٔ مورد نظر و زمان ایجاد علایم را نیز به درستی بیان می‌کنند. البته باید در نظر داشت که ممکن است هر دو بیماری همزمان با هم وجود داشته باشند.

۱-۱-۸ طبقه بندی آلرژن‌های گیاهی از دیدگاه مولکولی

آلرژن‌های گیاهی بر اساس ویژگی‌های ساختاری و عملکردی تقسیم می شوند. دراین تقسیم بندی پروتئین هایی با ۳۰٪ یکسانی و یا با یکسانی کمتر از ۳۰٪ اما با ساختار و عملکردی مشابه، در یک گروه قرار می گیرند (Breiteneder, 2005, Radauer, 2007).

۱-۱-۸-۱ ابر خانواده کاپین[1]

کاپین ها، پروتئین هایی با عملکردهای متفاوت می‌باشند که از دو موتیف محافظت شده و یک دومین مرکزی با ساختار بتا-خمره‌ای به نام کوپین تشکیل شده‌اند (Breiteneder, 2005, Radauer, 2007).

اعضاء این خانواده عبارتند از:

الف)ویسیلین[2]

ب) لگومین[3]

لگومین، گلوبولین 11s هگزامری است که در ابتدا به‌صورت تریمریک در سیستم ترشحی سلول دیده می¬شود (Breiteneder, 2005, Radauer, 2007)

۱-۱-۸-۲ ابر خانواده پرولامین[4]

اعضاء این ابرخانواده شامل پروتئین هایی هستند که حاوی تعداد زیادی اسید آمینه پرولین و گلوتامین می باشند و همچنین ۸ واحد حفاظت شده سیستئین در آنها دیده می¬شود (Marks, 1993. Radauer, 2007).

اعضاء این گروه عبارتند از:

الف) آلبومین های 2S (Marks, 1993 & Breiteneder, 2005).

ب) Lipid transfer proteins (nsLTPs) (Moller, 1998).

ج)مهارکننده های آلفا- میلاز و پروتئازها (Breiteneder, 2005 & Radauer, 2007).

د) پرولامین غلات (Breiteneder, 2005).

۱-۲ روش¬های تخلیص پروتئین‌ها

۱-۲-۱ استخراج پروتئین

روش استخراج بر اساس منبع پروتئین(باکتریایی، گیاهی و حیوانی-داخل ویا خارج سلولی) متفاوت است. روش مورد نظر باید تا حد امکان ملایم بوده و کمتر منجر به تخریب سلول ویا بافت و آزاد شدن آنزیمهای پروتئولیتیک گردد. استخراج باید بسیار سریع و در درجه حرارت‌های پایین، pH و قدرت یونی مناسب و با حضور بافر مناسب صورت پذیرد تا پایداری نمونه تا حد امکان حفظ گردد. انتخاب بافرها و

[1] Cupin
[2] Vicillins
[3] Legumins
[4] Prolamin

افزودنی‌هایی که در مرحله استخراج مورد استفاده قرار می گیرند باید متناسب با هدف تخلیص باشند. به عنوان مثال در صورتی‌که پروتئین در مقادیر زیاد تولید گردد استفاده از بافرهای ارزان مانند استات یا سیترات به ترکیبات پیچیده ای که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرند ارجحیت دارد (Amersham, 2006) .

۱-۲-۲ روش‌های تخریب سلولی

۱-۲-۲-۱ روش‌های ملایم

- روش اسموتیک[1]: این روش بیشتر برای سلول ها و بافت های کشت داده شده مورد استفاده قرار می‌گیرد و اساس آن قرار دادن سلول‌ها در محلولی با غلظتی کمتر از عصاره سلولی می باشد.
- انجماد و انجماد زدایی متناوب[2]: این روش بیشتر برای باکتری ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. انجماد و انجماد زدایی متناوب، پایداری غشاء سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. روش انجماد نیز معمولا با استفاده از نیتروژن مایع انجام می‌شود.
- استفاده از پاک کننده‌ها: این روش برای مخمرها و قارچها کاربرد بیشتری دارد و در آن معمولا از بافرهای تجزیه کننده و SDS استفاده می‌شود. (Amersham, 2006 & Mee, 2007).

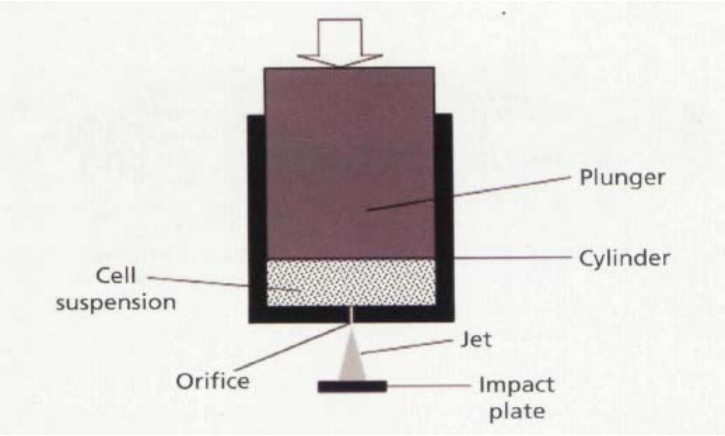
- روش‌های آنزیماتیک: روش‌های آنزیمی برای بافت‌های گیاهی ، سلول‌های باکتریایی و قارچ‌ها کاربرد دارند. در این روش‌ها آنزیم‌هایی مانند لیزوزوم برای باکتری‌ها، سلولاز و پکتیناز برای گیاهان و لیتیکاز برای قارچها مورد استفاده قرار می گیرند.

۱-۲-۲-۲ روش‌های شدید

- استفاده از امواج مافوق صوت: این روش بیشتر برای سوسپانسیون‌های سلولی استفاده می‌شود. در این روش باید توجه داشت که حرارت ایجاد شده به پروتئین آسیب وارد نکند لذا در بین پالس‌ها از فرآیند سرد کردن استفاده می‌شود (Amersham, 2006 & Jonatan, 2006).

[1] Osmotic lysis
[2] Repeated freezing and thawing

- French pressure: این روش معمولا برای استخراج پروتئین از میکروارگانیسم هایی مورد استفاده قرار می‌گیرند که دیواره سلولی دارند. در این روش سلول‌ها با استفاده از نیروی برشی تخریب می شوند. نمایی از دستگاه French pressure در شکل ۱-۱ نشان داده شده است.



شکل ۱-۱- شمایی از دستگاه French pressure مورد استفاده برای استخراج پروتئین

- استفاده از نیروی سایشی هاون: از نیروی مکانیکی سایشی برای تخریب بافت‌های سفت و مقاوم استفاده می‌شود. ساییدن بافت و یا سلول در حضور نیتروژن مایع انجام می‌شود.

- استفاده از ساچمه‌های شیشه‌ای: برای خرد کردن سلول و یا بافت از ساچمه‌های شیشه ای همراه با ورتکس استفاده می‌شود. این روش برای سوسپانسیون‌های سلولی و میکروارگانیسم‌های حاوی دیواره سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Amersham, 2006).

- روش انفجار سلولی[1]: در این روش که بیشتر برای باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها کاربرد دارد، سلول در معرض فشار زیاد گازهایی مثل نیتروژن یا گازهای بی اثر دیگر با فشار حدود ۲۵۰۰ psi قرار می گیرند و فشار به ناگهان افت می یابد. افت فشار گاز سبب می‌شود گازهای محلول به شکل حباب هایی خارج گردند که این امر موجب تجزیه سلولی می‌شود.

- آسیاب کلوئیدی: شمایی از آسیاب کلوئیدی که بیشتر برای سوسپانسیون‌های سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد در شکل ۱-۲ نمایش داده شده است.

[1] Cell Bomb