Archive of SID

مقاله پژوهشی

تخلیص بتالاکتوگلوبولین از شیر گاو و مطالعه آنتی ژنیسیته آن

دکتر تیرنگ نیستانی *، دکتر محمود جلالی **، دکتر محمد پزشکی *، دکتر سیدعلی کشاورز ******
دکتر فریدون سیاسی **، دکتر محمدرضا اشراقیان ***، دکتر اسدالله رجب *******

چکیده:

بتا لاکتوگلوبولین (BLG) یکی از پروتئین های اصلی لاکتوسرم در شیر نشخوارکنندگان به ویژه گاو و غیر نشخوارکنندگان مانند اسب می باشد . این پروتئین نسبتاً در برابر دما و تغییرات pH مقاوم است و شواهدی حاکی از جذب BLG بصورت دست نخورده در روده انسان هستند . تراوایی روده در دوران شیرخوارگی بیشتر است . لذا در نوزادان شیر خوار که با شیرگاو یا شیر خشک هایی که از شیر گاو تهیه شده اند تغذیه می شوند ، جذب یک پروتئین بیگانه به صورت دست نخورده به داخل خون ممکن است سبب تحریک واکنشهای ایمنی و بعضاً بروز عوارضی به صورت زودرس (آلرژی غذایی) یا دیررس در کودک گردد . در غالب مطالعات انجام شده ، BLG به همراه کازئین بعنوان آلرژن اصلی شیر گاو معرفی شده است . نظر به اهمیت این پروتئین ، تخلیص آن برای مطالعات ایمونولوژیک و سرولوژیک و نیز راه اندازی روشهای آزمایشگاهی (مانند ELISA و RAST) برای کاوشهای دقیق تر تشخیصی ضرورت می یابد . BLG بعنوان یک مارکر با وزن مولکولی نسبتاً پائین (~۱۸ KDa) برای برخی آزمونهای آزمایشگاهی نیز کاربرد دارد. هدف از انجام این مطالعه معرفی روشی ساده و نسبتاً کم هزینه برای تخلیص BLG با حفظ ویژگیهای آنتی ژنیک آن می باشد.

با جداسازی کازئین از شیر چربی گرفته شده با استفاده از اسید کلریدریک ، لاکتوسرم بدست آمد . گلوبولین های لاکتوسرم با استفاده از سولفات آمونیوم نیم اشباع رسوب داده شد . نمونه حاصله به دو روش ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض آنیونی با دی اتیل آمینو اتیل سلولز DEAE-C تخلیص گردید. خلوص نمونه با روشهای الکتروفورز و HPLC و آنتی ژنیسیته آن با روشهای ELISA ، وسترن بلاتینگ و مهار ELISA تائید گردید .

بتالاکتوگلوبولین در ژل فیلتراسیون با اوج دوم و در کروماتوگرافی تعویض آنیونی گلوبولین های رسوب داده شده با سولفات آمونیوم و نیز لاکتوسرم با اوج دوم از ستون خارج شد.

نتایج حاصله حاکی از خلوص بالا و حفظ آنتی ژنیسیته نمونه تخلیص شده بودند.

کلید واژه ها: آنتی ژنیسیته / بتا لاکتوگلوبولین / پروتئین های شیر گاو / تخلیص پروتئین

* عضو هیأت علمی گروه تغذیه و بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** دانشیار گروه تغذیه و بیوشیمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** استاد گروه تغذیه و بیوشیمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** استادیار گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** متخصص کودکان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه:

در گذشته ای نه چندان دور ، تغذیه نوزاد با غذای مصنوعی بسیار خطرناک و با میرایی بالایی همراه بود . هنگامی که اهمیت پاستوریزاسیون و خلوص آبی که به شیر گاو افزوده می شد شناخته شد ، خطرات تغذیه مصنوعی به نحو چشمگیری کاهش یافت با این حال علیرغم همه دقتها و احتیاط ها ، برخی از شیر خوارانی که با غذای حاوی شیر گاو تغذیه می شدند خوب رشد نمی کردند و دچار نشانه های وخیم گوارشی و حتی کلاپس (Collapse) می شدند . بعدها معلوم شد که پروتئین های بیگانه شیرگاو مسئول این نشانه ها بوده اند(۱) . هنوز هم ارزش تغذیه ای بالای پروتئین های شیرگاو و سهولت دسترسی به آنها موجب تثبیت موقعیتشان به عنوان منبع اصلی پروتئین برای شیرخواران در کشورهای پیشرفته غربی گردیده است . از این رو آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته پروتئین های شیرگاو همچنان از مسائل مهم در تغذیه شیرخواران بوده است (۱).

برای درک بهتر مکانیسمهای واکنشهای افزایش حساسیت ، مطالعه خواص آنتی ژنیک و مولکولی آنتی ژن های غذایی همواره ضرورت داشته است و برای این منظور می باید این آنتی ژن ها را بطور خالص در اختیار داشت (۲). از سویی دیگر ، با در اختیار داشتن آنتی ژن های خالص ، امکان اندازه گیری آنتی بادی اختصاصی ضد آنها به روش ایمنی ـ آنزیمی(ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay یا با استفاده از مواد پرتوزا Radio-Allergosorbent Test (RAST) نیز فراهم می آید(۳). دراین میان، آنتی ژنهای شیر از اهمیت بسزایی برخوردارند چراکه از یک سو در بسیاری از جوامع پروتئین های شیر گاو منبع اصلی پروتئین برای شیر خواران هستند و از سویی دیگر واکنشهای افزایش حساسیت ناشی از این پروتئین ها تنها محدود به واکنشهای نوع I (با میانجیگری IgE) نیستند و ممکن است به اشکال مختلف تظاهر یابند (۴). بتالاکتوگلوبولین (BLG) که یکی از پروتئین های لاکتوسرم می باشد ، به طور طبیعی به شکل دیمر ۳۶ کیلو دالتونی وجود دارد . هر زیر واحد متشکل از یک پلی پپتید ۱۶۲ ریشه ای است . این مولکول که دو پل سولفیدی و یک سیستئین آزاد دارد ، دارای دو ایزوفرم اصلی A و B می باشد که تنها در دو جهش نقطه ای برروی ریشه های ۶۴ و ۱۱۸ اختلاف دارند (اسید آسپارتیک و والین در BLG-A و گلیسین و آلانین در BLG-B) (۵). مقاومت نسبی BLG به هیدرولیز اسیدی و پروتئازها سبب می شود که قسمتی از پروتئین های خورده شده در مجرای گوارشی به صورت دست نخورده باقی بمانند و امکان دارد این مولکولها همراه با قطعات حاصل از هضم ، جذب شوند و به صورت آنتی ژن عمل نمایند. در واقع پس از مصرف شیر گاو توسط مادر می توان BLG را در شیر وی پیدا نمود و همین مساله ممکن است سبب کولیک در شیر خوار گردد (۶).

امروزه برای تفکیک و تخلیص BLG و سایر پروتئین های شیر گاو از روشهای کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) (۷)، کروماتوگرافی سریع پروتئین (FPLC) و دیگر روشهای کروماتوگرافی (۸) و ایزوالکتریک فوکوسینگ (۹) استفاده می شود. به تازگی روشی با استفاده از اولترافیلتراسیون با رآکتور آنزیمی برای تخلیص BLG در صنایع معرفی شده است (۱۰). غالب این روشها بسیار پرهزینه و بعضاً وقت گیر هستند . هدف ازانجام این مطالعه راه اندازی روشی ساده ، سریع، در دسترس و نسبتاً کم هزینه برای تخلیص BLG از شیرگاو با حفظ ویژگیهای آنتی ژنتیکی آن می باشد .

روش کار:

برای تخلیص BLG ابتدا با سانتریفوگاسیون از شیر چربی گیری شد سپس با استفاده از اسید هیدروکلریک ، کازئین جداسازی گردید و لاکتوسرم حاصله برای کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت . همچنین گلوبولین ها به روش رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۵۰٪ از بقیه پروتئین ها تفکیک و کروماتوگرافی شد . خلوص و آنتی ژنیسیته پروتئین با استفاده از روشهای الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید SDS-PAGE, HPLC, ELISA ، وسترن بلاتینگ و مهار ELISA تائید گردید .

الف) آماده سازی نمونه

برای جداسازی کازئین از روشBoyer(۱۱) با مختصر

www.SID.ir

Archive of SID

تغییراتی استفاده شد . ۵۰ میلی لیتر شیر پاستوریزه ۲/۵٪ چربی در سانتریفوژ یخچال دار با دور g ۱۶۰۰۰ بمدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد ، سانتریفوژ و سپس با اسپاتول چربی گیری شد . سپس pH نمونه با اسید کلریدریک ۱۲M و ۰/۵M طی دو مرحله ابتدا به ۵ و سپس به ۴/۵ رسانده شد .

مرحله نخست کاهش pH به سرعت انجام گردید تا حتی الامکان از رسوب پروتئین های لاکتوسرم به همراه کازئین جلوگیری شود. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در بن ماری شیکردار در ۴۰ درجه سانتیگراد ، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در g ۱۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد . سپس مایع رویی با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ و سپس فیلتر کارتریج ۰/۴۵ µ m صاف گردید . مقدار پروتئین لاکتوسرم به روش برادفورد (۱۲) تعیین و تا زمان آزمایش (کمتر از یک هفته) در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگاهداری شد . گلوبولین های نمونه با سولفات آمونیوم نیم اشباع در ۴ درجه سانتیگراد رسوب داده و پس از دیالیز در مقابل بافر فسفات ۰/۰۲M با pH ۸/۶ یا بافر تریس ۰/۰۵M با pH ۶/۵ ، لیوفیلیزه شد و تا زمان آزمایش در ۸۰- درجه سانتیگراد نگاهداری گردید .

ب) کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

برای این منظور از یک ستون به طول ۶۵cm و قطر داخلی ۱/۶ cm ، ژل Sephadex G-50 و بافر فسفات ۰/۰۲M با pH ۸/۶ استفاده شد . نمونه هایی که قبلاً در مقابل همین بافر دیالیز شده بودند به ستون تزریق شدند . میزان جریان ۱۰ میلی لیتر در ساعت ، غلظت و حجم نمونه به ترتیب mg ۱۵-۸(برحسب روش برادفورد) در ml ۲-۱/۵ و اندازه فراکسیون ها حدود ml ۲ بود . جذب نوری فراکسیون ها در nm ۲۸۰ اندازه گیری شد .

پ) کروماتوگرافی تعویض آنیونی

برای کروماتوگرافی تعویض آنیونی از یک ستون به طول cm ۶ و قطر داخلی ۱cm ، ژل دی اتیل آمینو اتیل سلولز DEAE-C به حجم ml ۵ و بافر تریس ۰/۰۵M با pH ۶/۵ استفاده شد . نمونه هایی که قبلاً در مقابل همین بافر دیالیز شده بودند به ستون تزریق گردیدند . میزان جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه ، مقدار و حجم نمونه به ترتیب mg ۱۲-۱۰ (برحسب روش برادفورد) در ml ۵-۳ بود . برای تفکیک اجزای پروتئینی نمونه از جریان بافر تریس ۰/۰۵M با pH ۶/۵ و شیب غلظتی کلرید سدیم (۰/۱ ، ۰/۲ ، ۰/۳ ، ۰/۴ مولار) به صورت مرحله ای Stepwise استفاده گردید . مدت زمان شستشو یا الوسیون Elution در هر مرحله ۱۰ دقیقه بود. همچنین ستون پس از تزریق نمونه و نیز پس از پایان مرحله آخر شیب غلظتی (۰/۴M) به ترتیب به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه با جریان بافر تریس شستشو داده شد . اندازه فراکسیون ها حدود ۱ml بود.

ت) شرایط کروماتوگرافی تعویض آنیونی به روش HPLC

برای HPLC از روش Manji و همکاران استفاده شد (۱۳). به طور خلاصه ستون Mono Q HR 5/5، فشار ۳/۵-۴/۰MPa میزان جریان ۲ml/min در دمای اتاق به کار گرفته شد . از آب مقطر بدون یون به عنوان بافر A و استات سدیم ۰/۷M با pH ۶/۳ به عنوان بافر B با شیب مرحله ای Stepwise Gradient به صورت زیر استفاده گردید : (۱) ۱۷/۵ دقیقه ۱۰٪ بافر B (۲) ۳ دقیقه شیب ۲۸٪ تا ۲۱٪ بافر B (۳) ۲/۵ دقیقه ۳۹٪ بافر B (۴) ۲/۵ دقیقه شیب ۶۰٪ تا ۵۵٪ بافر B (۵) ۲/۵ دقیقه ۱۰۰٪ بافر B . مقدار پروتئین تزریقی ۵۰-۲۵ میکروگرم (برحسب روش برادفورد) در حجم ۵۰-۳۵ میکرولیتر بود .

ث) تهیه آنتی سرم

به موشهای نرجوان خالص ازنژادBALB/C (w~۱۵g) در چهار نوبت (فاصله تزریق های اول و دوم ۲ هفته و فواصل تزریق های بعد هرکدام یک هفته) به صورت داخل صفاقی محلول استاندارد BLG (Fluka) تزریق شد . مقدار تزریق در چهار نوبت به ترتیب ۲۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در ml ۰/۲-۰/۱ بود . در تزریق اول ادجوان کامل فروند و در تزریق دوم ادجوان ناقص فروند (هردو از Sigma) به کار گرفته شد . تزریق های بعدی بدون ادجوان بودند (۱۴). دو روز پس از آخرین تزریق از شبکه عروقی پشت حدقه چشم حیوانها ، تحت بیهوشی عمومی با دی اتیل اتر خون گیری شد . نمونه های خون یک ساعت در دمای اتاق نگاهداری و سپس در rpm ۳۵۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند . نمونه های سرم هر۳یا ۴ سر موش با هم آمیخته و به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

سرم آمیخته Pooled Serum برای آزمایشهای بعدی استفاده گردید .

ج) سنجش ایمنی - آنزیمی (ELISA)

چاهکهای میکروپلیت ۹۶ خانه ای (Nunc) ، با ۱۰۰ میکرولیتر محلول BLG تخلیص شده در بافر فسفات نمکی (PBS) ۰/۱۵M با pH ۷/۲ به غلظت ۱۰µg/ml پر شد . روی پلیت محکم بسته و یک شب در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگاهداری شد . پس از شستشوی چاهکها با PBS/Tween 20 از آنتی سرم تهیه شده در مرحله قبل ، در چاهکهای میکروپلیت رقت سریال تهیه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد . پس از شستشو ، کنژوگه گوسفندی HRP ضد ایمونوگلوبولین موش با رقت مناسب به حجم ۱۰۰µl به چاهکها منتقل و مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد . از ارتوفنیلن دیامین (OPD) به عنوان سوبسترا استفاده گردید و نتایج در طول موج ۴۹۲nm قرائت شد . نمونه ها به صورت دو تایی Duplicate آزمایش شدند و میانگین جذب نوری در دو چاهک ، بعنوان جذب نوری در آن نمونه محسوب شد.

چ) SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

برای الکتروفورز از ژل جداکننده ۳٪ و ژل رانینگ با شیب غلظتی ۲۰-۶/۵٪ و جریان ۱۵۰ ولت بمدت تقریباً ۶ ساعت در دمای اتاق استفاده شد . عمل بلاتینگ در ۴۵ mA بمدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق انجام پذیرفت . پروتئین تخلیص شده در مراحل پیشین که الکتروفورز و برروی کاغذ نیتروسلولز بلات شده بود ، به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد و با حرکت ملایم همزن Rotator ، با آنتی سرم موشی مجاور شد. عیار آنتی سرم دست کم ۴ برابر عیار بدست آمده در ELISA انتخاب گردید . پس از مجاورت نوارها با کنژوگه HRP گوسفندی ضد ایمنو گلوبولین موش تهیه شده در بخش ایمنی شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران ، با رقت مناسب بمدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق ، نوارها با استفاده از سوبسترای دی آمینو بنزیدین DAB(Sigma) ظاهر شدند .

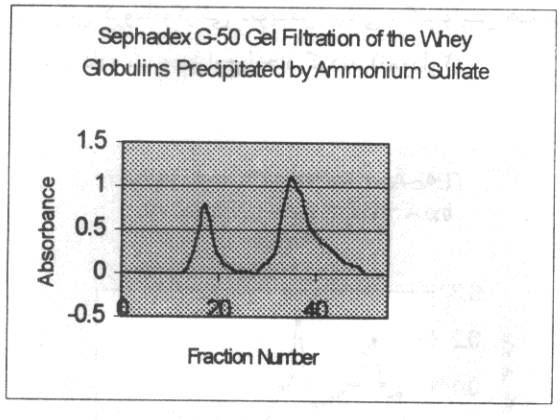
د) ELISA Inhibition

میکروپلیت ۹۶ خانه ای به روش گفته شده در قسمت (ج) با محلول استاندارد BLG پوشانده Coat شدند . آنتی سرم با رقت مناسب در لوله های اپندروف با غلظتهای متفاوت بتالاکتوگلوبولین تخلیص شده و استاندارد (۱/۱۷-۳۰۰µg/ml) در حجم نهایی ۲۰۰µl به مدت یکساعت در دمای اتاق انکوبه شد . سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این آنتی سرمها به چاهکهای میکروپلیت منتقل و ما بقی مراحل ELISA به طریق پیش گفته در قسمت (ج) انجام گردید . برای محاسبه میزان تشابه آنتی ژنیک یا همان واکنش متقاطع Cross Reactivity ، منحنی مهار ELISA ترسیم شدو غلظتی از آنتی ژن که در آن ۵۰٪ مهار رخ داده بود برای پروتئین تخلیص شده (CP50%) واستاندارد(CSt50%) تعیین گردید . سپس درصد واکنش متقاطع از واسطه زیر محاسبه شد(۱۵).

$$\frac{C_{St}50\%\ (\mu g/ml)}{C_{P}50\%\ (\mu g/ml)} \times 100$$

نتایج:

گلوبولین های رسوب داده شده با سولفات آمونیوم در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون دو اوج peakبه دست دادند (نمودار ۱) .

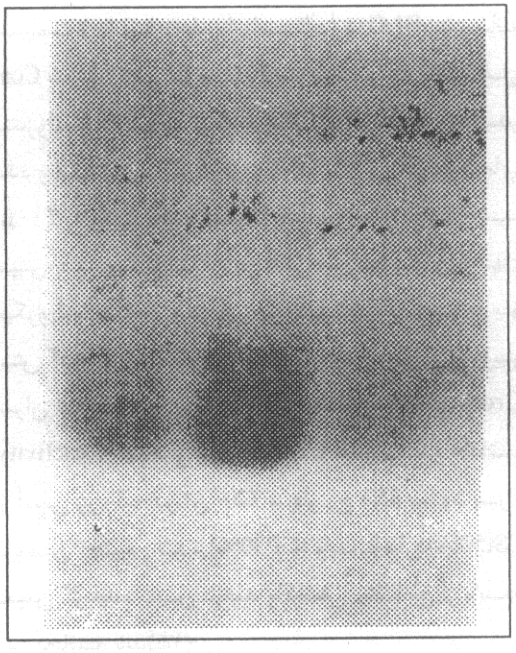


نمودار ۱: کروماتوگرام پروتئین های رسوب داده شده با سولفات آمونیوم نیم اشباع در ژل فیلتراسیون با سفادکس G-50 . در اوج دوم بتالاکتوگلوبولین به طور خالص حاصل می گردد

در اوج نخست آلبومین سرم (BSA)با حجم مرده یا Void Volume بیرون می آید و با اوج دوم بتالاکتوگلوبولین به طور خالص حاصل می گردد (تصویر ۱).

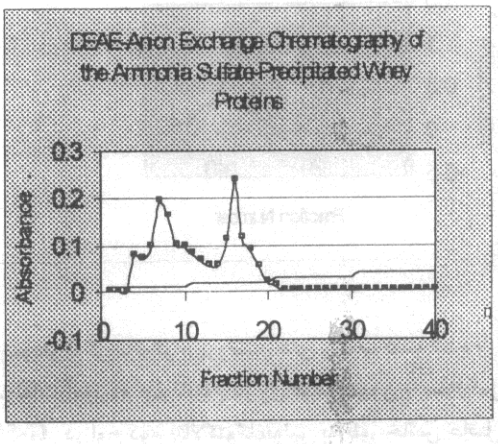
www.SID.ir

Archive of SID



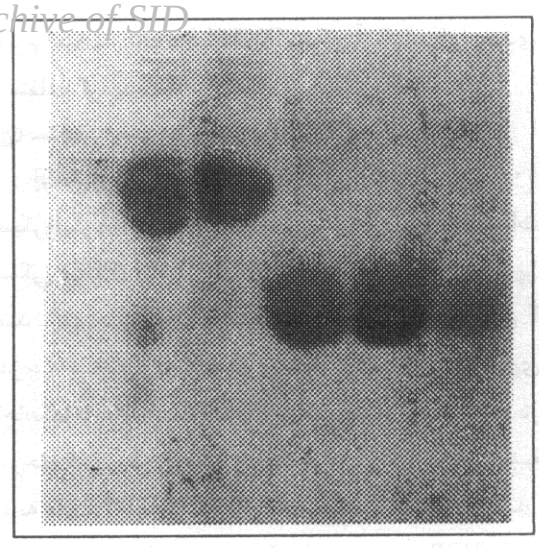
تصویر ۱: الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید -SDS PAGE . از چپ به راست بتالاکتوگلوبولین BLG استاندارد (Fluka) ۱۵μg ، BLG تخلیص شده با کروماتوگرافی تعویض آنیونی ۱۰μg ، BLG تخلیص شده با ژل فیلتراسیون ۵μg ، رنگ آمیزی پانسو- اس .

در روش کروماتوگرافی تعویض یونی ، گلوبولین های رسوب داده شده دو اوج ایجاد کردند (نمودار۲).



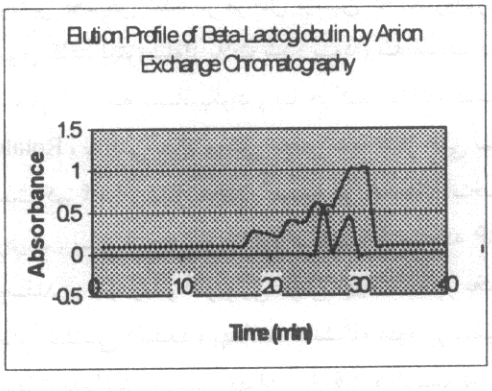
نمودار ۲: کروماتوگرام پروتئین های رسوب داده شده با سولفات آمونیوم نیم اشباع در کروماتوگرافی تعویض آنیونی با DEAE-C . اوج دوم مربوط به بتالاکتوگلوبولین است .

اوج نخست مربوط بـه ALA و اوج دوم از آن BLG بـود (تصاویر ۱و۲) .



تصویر ۲: الکتروفورز به روش SDS-PAGE . از چپ به راست شیر گاو ، عصاره پروتئین های شیر گاو ، بتالاکتوگلوبولین BLG استاندارد (Fluka) ۱۵ μg ، BLG تخلیص شده با کروماتوگرافی تعویض آنیونی ۱۰μg ، BLG تخلیص شده با ژل فیلتراسیون ۵μg . موقعیت پروتئین های تخلیص شده با پروتئین استاندارد و BLG موجود در شیر گاو همخوانی دارد. رنگ آمیزی کوماسی بلو

زمـان بـازداری Retention Time بتـالاکتوگلوبولیـن استاندارد به روش HPLC اندازه گیری شد . کروماتوگرام های نمونه های تخلیص شده کاملاً با نمونـه اسـتاندارد مطابقت داشت (نمودار۳).

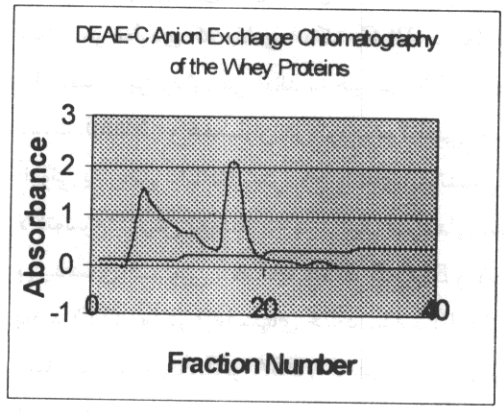


کروماتوگرافی تعویض آنیونی با HPLC . اوج نخست مربوط به ایزوفرم BLG-B و دومی از آن BLG-A می باشد . این الگو هم برای پروتئین استاندارد و هم برای پروتئین های تخلیص شده یکسان بود . برای روش کار به متن مراجعه گردد .

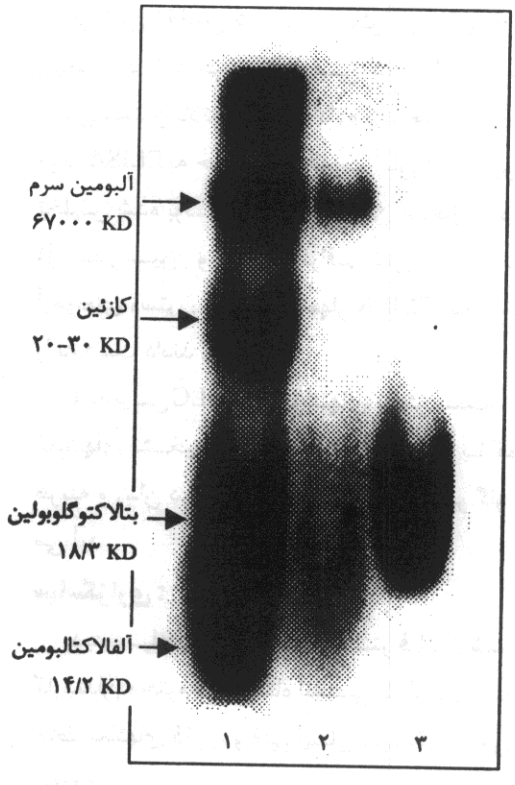
www.SID.ir

Archive of SID

در کروماتوگرافی تعویض آنیونی لاکتوسرم نیز دو اوج به دست آمد . اوج نخست مربوط به BSA و ALA و اوج دوم مربوط به BLG می باشد (نمودار ۴ و تصویر ۳).

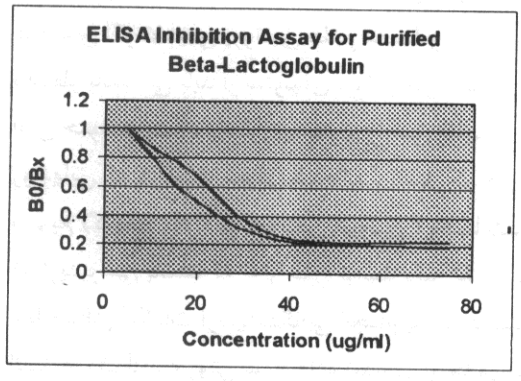


نمودار ۴: کروماتوگرام لاکتوسرم در کروماتوگرافی تعویض آنیونی با DEAE-C . اوج نخست مربوط به آلبومین سرم BSA و آلفالاکتالبومین ALA و اوج دوم مربوط به بتالاکتوگلوبولین BLG است.

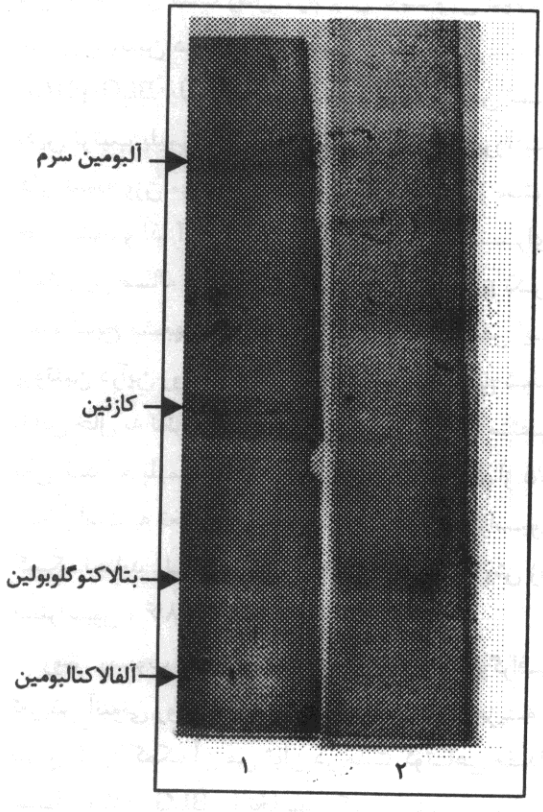


تصویر ۳: الکتروفورز به روش SDS-PAGE برای فراکسیونهای لاکتوسرم در کروماتوگرافی تعویض آنیونی . (۱) مارکر وزن مولکولی، (۲) فراکسیون ۶ متشکل از آلبومین سرم و آلفالاکتالبومین ، (۳) فراکسیون ۱۶ متشکل از بتالاکتوگلوبولین . رنگ آمیزی کوماسی بلو

در آزمون مهار ELISA ، نتایج در مورد پروتئین تخلیص شده به خوبی پروتئین استاندارد مطابقت داشت (نمودار ۵) .



نمودار ۵: آزمون مهار ELISA برای تعیین میزان واکنش متقاطع . تشابه آنتی ژنیک بین بتالاکتوگلوبولین استاندارد (Fluka) (منحنی پائینی) و پروتئین تخلیص شده (منحنی بالائی) ، تقریباً ۱۰۰٪ است . Bx : اتصال آنتی بادی که قبلاً با پروتئین مورد آزمایش انکوبه شده است ، به آنتی ژن Bo : اتصال آنتی بادی در حالت عادی به آنتی ژن .



تصویر ۴: آزمون وسترن بلاتینگ . (۱) چهار پروتئین اصلی شیر گاو . (۲) بتالاکتوگلوبولین تخلیص شده با ژل فیلتراسیون .

www.SID.ir

Archive of SID

بحث:

به طور کلی روش HPLC برای تفکیک پروتئین های شیر روشی است دقیق و نسبتاً سریع اما در عین حال پر هزینه و نیازمند به تخصص و دانش ویژه کاربر . همچنین اگر تخلیص پروتئین ها در مقیاس میلی گرم مد نظر باشد می باید از ستونهای بزرگتر سود جست که این خود هزینه و زمان بیشتری را می طلبد . اما روشهایی که در اینجا معرفی شده اند ، بسیار کم هزینه، سریع (کروماتوگرافی تعویض آنیونی) و با نتایج تکرارپذیر می باشند که به راحتی توسط یک تکنیسین و با حداقل امکانات آزمایشگاهی انجام پذیر هستند . البته هریک از سه روش شرح داده شده در اینجا مزایا و معایب خاص خود را دارند . روش رسوب با سولفات آمونیوم و سپس ژل فیلتراسیون، این حسن را دارد که می توان نمونه را در پایان روز به ستون تزریق کرد و فردای آن روز نمونه تخلیص شده را در اختیار داشت . در این حال ، برخلاف روش کروماتوگرافی تعویض یونی، پروتئین در معرض غلظت بالای نمک قرار نمی گیرد ولی به هر حال مدت زمان لازم برای انجام آن طولانی است و پروتئین در آن بیشتر رقیق می گردد . در pH۸/۶، BLG پلیمریزه می شود (۱۶) و ممکن است بدین ترتیب پلیمر BLG که نسبت به سایر پروتئین های نمونه وزن مولکولی بالاتری دارد زودتر از ستون خارج شود و لذا pH بالا به تخلیص کمک کند. برای آزمون این مساله این آزمایش با بافر با pH ۵/۵ تکرار شد و نتایج مشابهی به دست آمد . لذا تخلیص این پروتئین دراین روش چندان از pH بافر متاثر نمی شود . با این حال به نظر ما ، این مساله این امکان را منتفی نمی کند که پلیمریزاسیون BLG در pH بالاتر از ۸/۵ ممکن است به تخلیص بهتر آن در روش ژل فیلتراسیون کمک نماید . لذا برای تخلیص BLG به روش ژل فیلتراسیون ، pH ۸/۶ توصیه می گردد .

روش رسوب با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض آنیونی روشی است بسیار ساده ، کم هزینه و سریع که به کمک آن می توان در مدت کوتاهی مقدار نسبتاً زیادی BLG را تخلیص کرد . منتهی در این روش پروتئین در معرض غلظت نسبتاً بالایی از نمک قرار می گیرد و لذا لازم است نمونه پس از تخلیص در اسرع وقت دیالیز شود . روش کروماتوگرافی تعویض آنیونی بر روی لاکتوسرم از دو روش پیش گفته سریع تر و آسان تر است منتهی در مقایسه با آنها ، مقدار کمتری BLG را می توان خالص کرد چون در این حال نسبت BLG به کل پروتئین های تزریق شده به ستون ، کمتر است . در مواردی که مقادیر اندک BLG سریعاً مورد نیاز باشد ، این روش می تواند به خوبی کاربرد داشته باشد .Manji و همکاران در کروماتوگرافی تعویض آنیونی به روش HPLC شش اوج را برای پروتئین های لاکتوسرم گزارش نمودند که به ترتیب اسیدهای آمینه ، پپتیدهای کم وزن ، ALA، BSA، BLG-B و BLG-A بودند (۱۳) . ما در آزمایشهای خود با استفاده از روش ایشان نتوانستیم ALAو BSA را از هم جدا کنیم و این دو پروتئین همواره به طور همزمان از ستون خارج می شدند . اما BLG تقریباً به همان صورتی که آن پژوهشگران گزارش کرده بودند ، از دیگر پروتئین ها تفکیک شد. دراین روش دو ایزوفرم BLG-B و BLG-A نیز از هم جدا می شوند .

پروتئین تخلیص شده بدین روش ، ویژگیهای آنتی ژنیک خود را به خوبی حفظ می کند . این مساله با آزمون وسترن بلاتینگ نشان داده شد. همچنین آزمون مهار ELISA به خوبی موید قدرت آنتی ژنیک پروتئین تخلیص شده بود. بتالاکتوگلوبولین حاصل از دو روش ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تعویض آنیونی در آزمونهای وسترن بلاتینگ و مهار ELISA نتایج مشابهی را به دست دادند .

با تخلیص BLG به روشهای پیش گفته، امکان کاوشهای تشخیصی و پژوهشی دقیق تر با کمترین هزینه و زمان در مبتلایان به آلرژی به شیر گاو فراهم می آید .

سپاسگزاری :

بدینوسیله از جناب آقای دکتر فاضل شکری و کارمندان محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی سلولی به خاطر کمکهای فکری و فنی ایشان سپاسگزاری می شود.

منابع:

1. Savilahti E, Kuitunen M. Allergenicity of cow milk proteins. J Pediatr 1992; 121: S12-S20.
2. Stanley JS, Bannon GA. Biochemistry of food allergens. Clin Rev Allergy Immunol 1999; 17: 279-91.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Bahna SL, Gandhi MD. Milk hypersensitivity II. Practical aspects of diagnosis, treatment and prevention. Ann Allergy 1983;50: 295-302.
4. Sampson HA. Adverse reactions to foods. In: Middleton Jr E, Reed C, Ellis E, et al (eds). Allergy, principles and practice. 4th ed. Vol 2. St Louis : Mosby , 1993: 1661-86.
5. Brew K, Castellino FJ, Vanaman TC, et al. The complete amino acid sequence of bovine Alpha-Lactalbumin. J Biol Chem 1970; 245:4570-82.
6. Godovac ZJ, Braunitzer G. Modern aspects of the primary structure and function of Beta-Lactoglobulins. Milchwissenschaft 1987; 42: 294-97.
7. Jakobsson I, Lindberg T, Benediktsson B, et al. Dietary bovine Beta-Lactoglobulin is transferred to human milk. Acta Paediatr Scand 1985; 74: 342-45.
8. Kunz C, Lonnerdal B. Human milk proteins: Separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration and anion-exchange chromatography. Am J Clin Nutr 1989; 49:464-70.
9. Godovac-Zimmermann J, Klostermeyer H. Isolation and rapid sequence characterization of two novel bovine beta-lactoglobulins I and J. J Protein Chem 1996; 15:743-50.
10. Sannier F, Bordenave S, Piot JM. Purification of goat beta-lactalbumin from whey by an ultrafiltration membrane enzymic reactor. J Dairy Res 2000; 67: 43-51.
11. Boyer RF. Modern experimental biochemistry. 2nd ed. Califomia: Benjamin/Cummings, 1993: 243-63.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
13. Manji B, Hill A, Kakuda Y. Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography. J Dairy Sci 1985; 68:3176-79.
14. Dresser DW. Immunization of experimental animals. In: Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, et al (eds). Handbook of experimental immunology. Immunochemistry. 4th ed. Oxford: Blackwell, 1986: 8.1-21.
15. Diziol P. Enzyme immunology Enzyme immunoassays by the ELISA technique. Principles and applications. Mannheim : Boehringer Mannheim 1987 : 11-14.
16. Perez MD, Calvo M. Interactions of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. Dairy Foods 1994; 6: 978-88.

www.SID.ir