مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۱۲۰-۱۱۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

افزایش هضم پذیری شیر در اثر پیش تیمار بتا لاکتوگلوبولین شیر با شکل نوترکیب سیستم تیوردوکسین/ گلوتاتیون گیاهی

Increased digestibility of milk beta-lactoglobulin by treatment with a plant recombinant glutathione/ thioredoxin system.

طاهره شهریاری فارفانی*، آذر شاه پیری

Tahere Shahriari-Farfani*, Azar Shahpiri

گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

Agricultural Biotechnology Dept., Agriculture Faculty, Isfahan University of Technology, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: tahereshahriari2015@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۱)

چکیده

بتالاکتوگلوبولین (BLG) یکی از بزرگترین آلرژن های شیر گاو است که باعث هضم کم شیر می شود. وجود دو پیوند دی‌سولفیدی هضم این پروتئین را کاهش داده است. به نظر می رسد استفاده از احیاکننده‌هایی که بتوانند باندهای دی سولفیدی موجود در این پروتئین را احیاء کنند، هضم پذیری این پروتئین را افزایش می دهند. بدین منظور در این مطالعه از سیستم گلوتاتیون/ تیوردوکسین گیاهی برای افزایش هضم پذیری BLG استفاده شد. تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی‌سولفیدردوکتازهای هستند که در تنظیم اکسیداسیون/ احیاء سلولی دخالت دارند که خود توسط گلوتاتیون (GSH) احیاء می شوند. در این مطالعه با در دست داشتن باکتری تراریخته مقدار قابل توجهی از این پروتئین ها تولید و خالص سازی شد. برای احیاء BLG از سیستم نوترکیب تیوردوکسین/ گلوتاتیون گیاه برنج به نام سیستم GSH/OsTrx20 استفاده شد. بدین منظور BLG ابتدا با اجزای این سیستم همراه با GSH در دماهای مختلف ٤، ۲۵ و۳۷ درجه سانتیگراد پیش تیمار شد. سپس BLG با تریپسین مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. میزان هضم پذیری BLG با استفاده از ژل SDS-PAGE و RP-HPLC بررسی شد. نتایج نشان داد که پیش تیمار BLG با استفاده از سیستم GSH/OsTrx20 به طور قابل توجهی بر هضم پذیری آن با آنزیم تریپسین مؤثر بوده است.

واژه‌های کلیدی

گلوتاتیون،
بتالاکتوگلوبولین،
هضم‌پذیری،
تریپسین،
کروماتوگرافی مایع فاز معکوس

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

مقدمه

بتالاکتوگلوبولین (BLG) نقش انتقال دهندهٔ مولکول‌های هیدروفوب کوچک از قبیل رتینوئیدها، اسیدهای چرب، داروها و ویتامین‌ها را بر عهده دارد (Powis *et al.* 2000). در ساختار BLG دو پیوند دی‌سولفیدی و یک سیستئین آزاد در موقعیت ۱۲۱ وجود دارد. وجود باندهای دی سولفیدی در BLG دلیل هضم پذیری کم این پروتئین در سیستمهای گوارشی جانوران و همچنین حساسیت زایی این پروتئین است (Creamer *et al.*2004). به نظر می رسد استفاده از احیاکننده‌هایی که بتوانند باندهای دی سولفیدی موجود در این پروتئین را احیاء کنند، هضم پذیری این پروتئین را افزایش داده و باعث کاهش حساسیت زایی آن شود. استفاده از عوامل شیمیایی احیاکننده مانند دایتیوتریتول (DTT) می تواند هضم پذیری این پروتئین را افزایش دهد (Patanaude *et al.*2004). با این حال به دلیل سمی بودن این مادهٔ شیمیایی، استفاده از آنزیم های طبیعی می تواند جایگزین مناسبی باشد. در مطالعات گذشته از سیستم تیوردوکسین (Trx) / تیوردوکسین ردوکتاز وابسته به NADPH (NTR) با منشأ جانوری برای افزایش هضم پذیری BLG استفاده شده است (Val *et al.*1999).

تیوردوکسین‌ها (Trxs)، دی‌سولفیدردوکتازهای کوچک و فراوانی هستند که در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت-های عالی یافت شده‌اند و در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند (Alberse 1997). آنزیم‌های Trx با توالی آمینواسیدی WCG PC (A/P) در جایگاه فعال خود شناخته می‌شوند. این آنزیم‌ها به کمک سیستئین‌های موجود در جایگاه فعال و از طریق احیاء برگشت‌پذیر باندهای دی‌سولفیدی در فرآیندهای متعدد اکسیداسیون/ احیاء شرکت می‌کنند. بر خلاف جانوران در گیاهان ایزوفرم های متعددی از این پروتئین وجود دارد که بر اساس محل قرار گیری و نحوه احیاء به چند دسته اصلی(f, m, h, o, x, y) تقسیم می شوند (Nuruzzaman *et al.*2008). بزرگترین دسته، Trx h ها می باشند که به سه زیر گروه I، II و III تقسیم می شوند. دو زیرگروه I وII وابسته به NADPH بوده و بوسیله NTR که وابسته به کوآنزیم NADPH است احیا می شوند. بر خلاف این دو زیر گروه، زیر گروه III که برای اولین بار در درخت سپیدار مورد شناسایی قرار گرفت در مسیر وابسته به گلوتاتیون (GSH) احیا می شوند (Geha *et al.* 2003). در مطالعات قبلی ما دو ژن کد کننده NTR از گیاه برنج به نام های NTR A و NTR B و همچنین سه ژن کد کننده Trxh از این گیاه در باکتری اشرشیاکلی مورد همسانه سازی قرار گرفت و شکل های نوترکیب این پروتئین در باکتری *Escherichia coli* تولید و خالص سازی شد (Eslampanah *et al.* 2014) . مطالعات بعدی نشان داد که ایزوفرم های OsTrx1 و OsTrx23 با دو هر دو ایزوفرم OsNTR A وOsNTRB احیا شدند. در حالی که ایزوفرم OsTrx20 ، با این دو ایزوفرم احیا نشد بلکه با گلوتاتیون احیا شده (GSH) احیا گردید. زیرا اعضای زیرگروه III دارای جایگاه غیرمعمول $_{53}$WCTPC$_{57}$ هستند (Maeda *et al.*2003).

با توجه به گزارش های قبلی مبنی بر افزایش هضم پذیری BLG با استفاده از سیستم های احیا کننده Trx های وابسته به NTR و NADPH جانوران، هدف این تحقیق ارزیابی تأثیر Trx h با منشأ گیاهی بر روی هضم پذیری BLG است. بدین منظور از شکل نوترکیب OsTrx20 از گروه III استفاده شد. این ایزوفرم با حضور GSH بدون نیاز به آنزیم تیوردوکسین ردوکتاز و NADPH احیا می شود.

مواد و روش‌ها

استفاده از سویه های مهندسی شده

در این تحقیق از سویه‌ی R-Trx20 استفاده شد. این سویه در گذشته با انتقال پلاسمید pET15b حاوی ژن کدکننده OsTrx20 به سویه بیانی *E.coli* به نام Rosetta (DE3) ساخته شده بود (Papzan *et al.*, 2012). باکتری حاصله در صورت القاء با IPTG قادر به تولید پروتئین‌نوترکیب His–OsTrx20 بود (Papzan *et al.* 2011).

بیان پروتئین نوترکیب OsTrx20

سلول‌های باکتری شاهد (حاوی پلاسمید pET15b فاقد ژن) و سویه اصلی (حاوی پلاسمید pET15b-OsTrx20) در ۸۰ میلی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کلرامفنیکل (۵ میلی‌گرم بر لیتر) و بر روی انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. هنگامی که OD_{600} به ۰/۷ رسید، IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside) به عنوان ماده‌ی القاگر به غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به محیط‌های کشت اضافه شد. به منظور تایید تولید پروتئین نوترکیب در فواصل زمانی مختلف نمونه برداری از سوسپانسیون باکتریایی در ویال‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری صورت گرفت. سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤°C سانتریفوژ شدند. بعد از آن، محلول رویی ویال‌ها دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول تریس–اسید کلریدریک ۱۰ میلی‌مولار (pH ۸) سوسپانسیون گردید. به منظور استخراج پروتئین‌های محلول، دیواره سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) تخریب شد. سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤°C صورت پذیرفت و فاز رویی آن جهت بررسی میزان بیان پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ بارگذاری گردید. به منظورتولید پروتئین در مقیاس بالاتر کل محیط کشت باقی مانده بعد از ٤ ساعت رسوب داده شد. جهت استخراج پروتئین محلول به روش بالا از دستگاه اولتراسونیک (Hielscher, UP50H) در دمای ٤°C استفاده شد.

خالص سازی پروتئین ها

خالص سازی پروتئین ها با استفاده از کروماتوگرافی جذبی انجام شد. بدین منظور پروتئین محلول استخراج شده از ستونهای His-Trap HP (ساخت شرکتGE Healthcare) که از قبل با استفاده از بافرA بارگذاری (ایمیدازول ۰/۱ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۰/۳ میلی مولار تریس – اسید کلریدریک ۸، pH) به تعادل رسیده بودند، عبورداده شدند. جهت شستشوی پروتئین های باند شده غیر اختصاصی میزان ۰/۱ میلی لیتر از مخلوط بافر B فیلتر شده سرد شامل (ایمیدازول ٤۰۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۵۰۰ میلی مولار و ۰/۳ میلی مولار تریس– اسید کلریدریک ۸، pH) و بافر A فیلتر شده سرد با نسبت ۱۰٪ بافرB و ۹۰٪ بافرA بر روی ستون بارگذاری شد و اجازه داده شد تا از ستون خارج شود. سپس جهت جداسازی پروتئین هدف ۰/۱ میلی لیتر بافری حاوی ٤۰٪ بافر B و٦۰ ٪ بافرA بر روی ستون بارگذاری شد و هر میلی لیتر خروجی ستون در لوله های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری لوله های اپندورف ریخته بر روی یخ در دمای ٤ °C نگهداری شدند. کیفیت خلوص پروتئین خارج شده در ویالها با استفاده از SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت پروتئینهای نوترکیب با استفاده از روش تعیین جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و قانون بیر– لمبرت تعیین شد.

بررسی قابلیت احیای OsTrx20 در حضورGSH

جهت بررسی فعالیت پروتئین نوترکیب OsTrx20 در حضور GSH از انسولین به عنوان سوبسترا در واکنشی به حجم ۳۰۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار بافر پتاسیم فسفات ۷ pH،۰/۲ میلی‌مولار EDTA، ۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انسولین و ۲۰ میلی-مولار GSH تهیه شد. واکنش با غلظت ۵ میکرومولار Trx شروع شد. میزان جذب در طول موج ٦۵۰ نانومتر به مدت ۱۰۰ دقیقه ثبت شد و نمودار مربوطه رسم شد. قابل ذکر است که واکنشی حاوی تمام اجزاء واکنش به غیر از پروتئین Trx به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد.

پیش تیمار BLG با سیستم GSH/OsTrx20 وهضم آنزیمی با ترپسین

واکنشی به حجم ۱۵۰ میکرولیتر حاوی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BLG، ۲۰ میلی‌مولار GSH، ۱۰۰ میلی‌مولار بافر پتاسیم فسفات با pH ۷ تهیه شد. واکنش با افزودن ۵ میکرومولار پروتئین OsTrx20 شروع شد. سپس به مدت یک ساعت در دماهای ۲۵°C و ۳۷°C و به صورت شبانه در دمای ٤°C با تکانه ۱۵۰ دور در دقیقه پیش تیمار شدند. در نهایت آنزیم ترپسین با غلظت نهایی ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر (نسبت پروتئین به آنزیم ۱:۱۰۰) به واکنش افزوده شد و به مدت ٦ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفت. این آزمایش در ۳ تکرار متوالی انجام شد. مقدار ۳ میکرولیتر از هر واکنش روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. قابل ذکر است که واکنشی با تمام اجزاء به غیر از OsTrx20 و GSH به عنوان واکنش کنترل در نظر گرفته شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

بررسی BLG با استفاده از نرم‌افزار image J

به منظور مقایسه شدت باندها از نرم‌افزار Image J/FIJI 1.46 استفاده شد. میانگین شدت نسبی باند نمونه‌های تیمار شده با سیستم GSH/Trx با میانگین شدت نسبی باند BLG بدون هر گونه تیمار (۱۰۰ درصد) و نمونه شاهد که فاقد سیستم Trx بود با آزمون LSD در نرم‌افزار SAS مورد مقایسه قرار گرفت.

بررسی هضم‌پذیریBLG با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

پروتئین‌ها، از تکنیک HPLC فاز معکوس (RP- HPLC) استفاده شد. بدین منظور هضم پذیری BLG تیمار شده با سیستم GSH/OsTrx20در دمای ۳۷°C به همراه نمونه شاهد که حاوی تمام اجزای واکنش به غیر از سیستم Trx بود ارزیابی شدند. نمونه‌ها از فیلتر با منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از آنها روی ستون C18 (۱۵۰×۴/۶mm) و اندازه ذرات ۵ میکرون،Pico. Tag, Waters) با روش خطی -گرادیانت با سرعت ۰/۳ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای۲۰ درجه سانتیگراد انجام شد. بدین صورت که فاز متحرک شامل حلال A (۱۰ درصد حجمی استونیتریل و ۰/۱ درصد حجمی تری‌فلورو استیک اسید) و حلال B (۹۰ درصد حجمی استونیتریل و ۰/۱ درصد حجمی تری‌فلورو استیک اسید) بود. در روش گرادیانت، فاز متحرک به مدت ۳ دقیقه ۱۰۰ درصد حلال A و ۴۵ دقیقه ۱۰۰ درصد حلال A تا ۵۰ درصد حلال B، ۵ دقیقه ۵۰ درصد حلال B تا ۷۰ درصد حلال B و ۵ دقیقه ۷۰ درصد حلال B و ۵ دقیقه ۷۰ درصد حلال B تا ۱۰۰ درصد حلال A روی ستون بارگذاری شد.

نتایج و بحث

بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب OsTrx20

القای باکتری ها با IPTG، فاز محلول پروتئین از باکتری ها استخراج شد و آنالیز کل پروتئین محلول بر روی ژل SDS-PAGE صورت گرفت. با توجه به وجود منطقه کد کننده پلی هیستیدین (His-Tag) در بالا دست جایگاه کلون سازی در پلاسمید pET15b پروتئین های نوترکیب حاصل دارای دنباله پلی هیستیدین در انتهای آمینو هستند. وزن مولکولی پیش بینی شده برای پروتئین His-OsTrx20 نوترکیب ۱۷/۵۴ کیلودالتون بود. وجود باندهای پلی پپتیدی با وزن مولکولی مورد نظر بر روی ژل، تولید پروتئین های نوترکیب His-OsTrx20 در مقایسه با سویه کنترل را تأیید کرد. شدت این باند با گذشت زمان تا ٤ ساعت پس از القا افزایش پیدا کرد (شکلA ۱)

پروتئین های استخراج شده از باکتری با استفاده از کروماتوگرافی جذبی بر روی ستون های حاوی رزین نیکل (Ni^{+2})، خالص سازی شد و سپس به منظور ارزیابی کیفیت خالص سازی پروتئین پس از خالص سازی بر رویSDS-PAGE بارگذاری شد (شکل B ۱). عدم وجود باندهای اضافی نشان دهنده کیفیت بالای خالص سازی است.

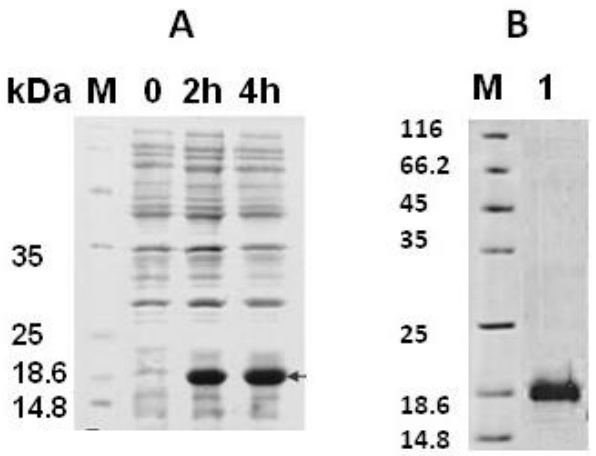
به منظور تعیین غلظت پروتئین های نوترکیب خالص شده، ابتدا میزان جذب نمونه های پروتئینی در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شدند و ضریب خاموشی مولی آنها با استفاده از نرم افزار ProtParam در پایگاه اطلاعاتی Expassy ۱۷۰۸۵ بر مولار بر سانتیمتر محاسبه شد و در نهایت در فرمول بیر- لمبرت قرار داده شدند. غلظت پروتئین نوترکیب OsTrx20 ۳۵/۵ میکرومولار تخمین زده شد.

برهمکنش پروتئین های نوترکیب با گلوتاتیون

با استفاده از GSH به عنوان منبع احیا کننده اولیه در آزمون انسولین، در واکنش حاوی ایزوفرم OsTrx20 انسولین احیا شد. در حالیکه در واکنش شاهد احیای انسولین مشاهده نشد (شکل۲). سرعت واکنش معادل شیب نمودار در ناحیه خطی در نظر گرفته شد. بدین ترتیب سرعت احیای OsTrx20 با GSH ۰/۰۱۲ Δ۶۵۰/دقیقه بود. زمان شروع واکنش برای واکنش اصلی ۲۳ دقیقه بود. لازم به ذکر است که بر اساس گزارش های قبلی ایزوفرم‌های زیرگروه سوم Trxh می‌توانند توسط سیستم گلوتاردوکسین نیز احیا شوند (Geha *et al.* 2003)، بنابراین با توجه به قرار داشتن ایزوفرم OsTrx20 در زیرگروه سوم از Trx h گیاه برنج، احیاء آن توسط GSH می‌تواند تأییدی بر این موضوع باشد.

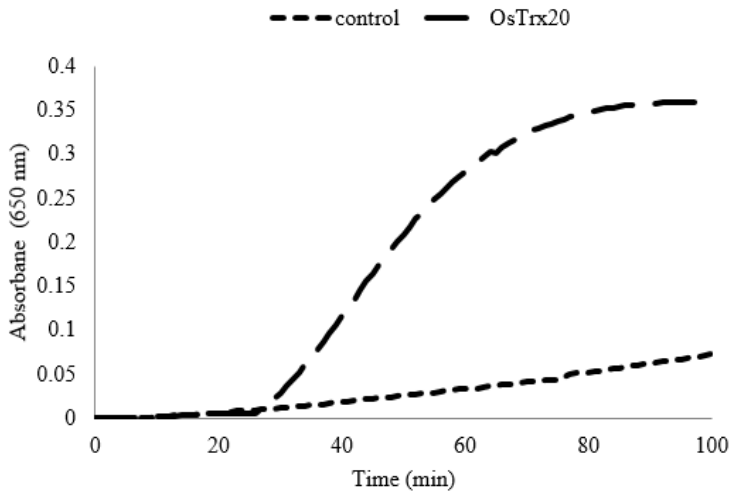
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]



شکل۱- تأیید بیان پروتیئن نوترکیب OsTrx20 (A) و خالص سازی آن (B) روی ژل SDS-PAGE. M: مارکر پروتئینی شکل A: چاهک1: پروتئین محلول استخراج شده بدون تلقیح IPTG چاهک2: پروتئین محلول استخراج شده پس از ۲ ساعت تلقیح IPTG چاهک 3: پروتئین محلول استخراج شده پس از ٤ ساعت تلقیح IPTG شکلB: His- OsTrx20.

Fig. 1. SDS–PAGE analysis for verification of expression and purification of recombinant proteins. Total soluble protein extracted from *E.* coli harboring pET15b-OsTrx20 before addition of IPTG and 2 or 4 h after addition of IPTG. b Purified HisOsTrx20.



شکل ۲- فعالیت آنزیمی پروتئین های OsTrx20 در واکنش با انسولین به عنوان سوبسترا در حضور GSH

Fig. 2. Insulin reduction by OsTrx20 in the presence of GSH.

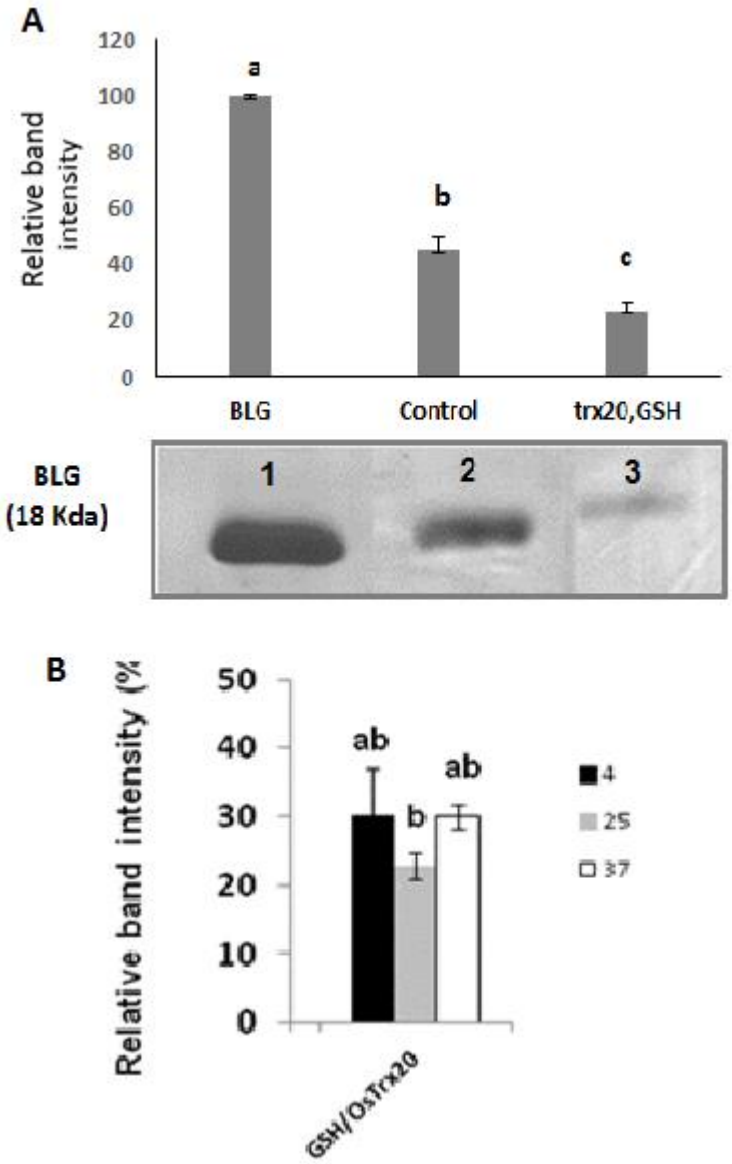
اثرپیش تیمار سیستم‌های GSH/Trx بر هضم‌پذیری BLG با تریپسین

پس از تیمار BLG با سیستم GSH/OsTrx20، BLG برای هضم در معرض آنزیم تریپسین قرار گرفت. سپس محصول هضم آنزیمی به همراه BLG ی هضم شده با تریپسین بدون پیش تیمار با سیستم GSH/OsTrx20 و همچنین BLGی اولیه بدون هضم بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. شدت باند BLG با استفاده از نرم افزار Image J کمی سازی شد و مورد مقایسه قرار گرفت. اثر پیش‌تیمار سیستم‌های مختلف GSH/OsTrx20 بر میانگین شدت نسبی باندها که نشان دهنده هضم‌پذیری BLG با آنزیم تریپسین بود با آزمون LSD مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که به طور متوسط ۵۰ درصد از BLG تیمار شده با آنزیم تریپسین بدون استفاده از پیش تیمار GSH/OsTrx20 با آنزیم تریپسین هضم شد. با این وجود میزان هضم پذیری BLG پس از پیش تیمار با GSH/OsTrx20 به ۷۵ درصد رسید. این

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

نتایج نشان می دهد که میزان هضم پذیری در اثر تیمار با GSH/OsTrx20 به طور معنی داری افزایش می یابد که این موضوع می تواند حاکی از اثر این سیستم در شکستن باندهای دی سولفیدی BLG و در نتیجه افزایش هضم پذیری آن در برابرتریپسین باشد (شکل ۳).

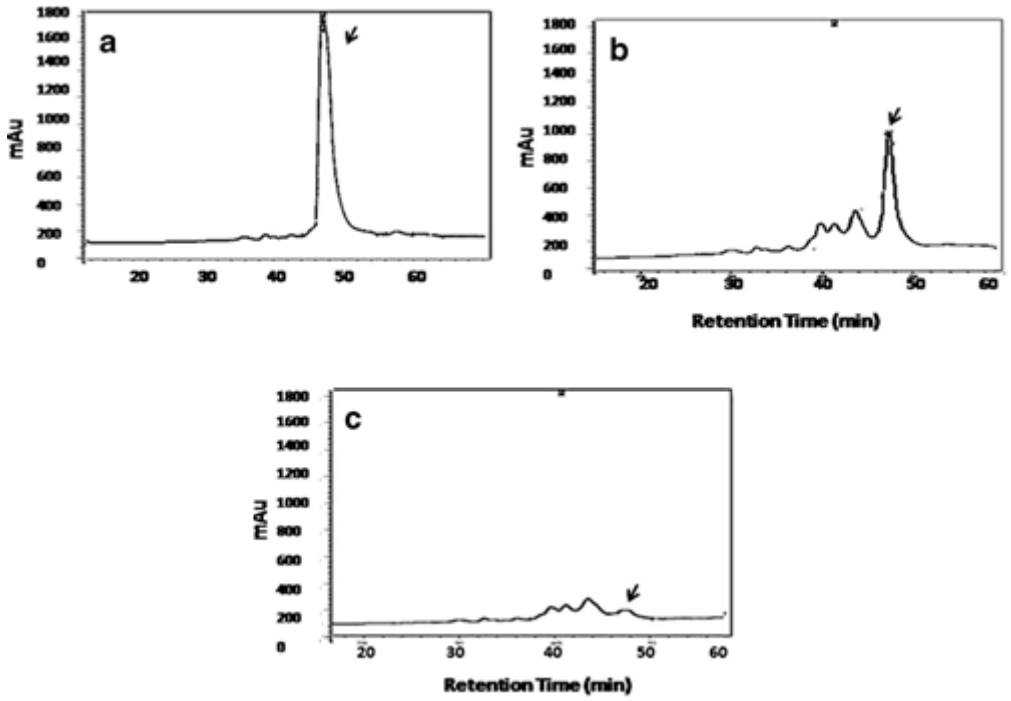
با توجه به اینکه اثر احیایی GSH/OsTrx20 در دماهای مختلف ممکن است متفاوت باشد سه دمای مختلف جهت پیش تیمار مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس شدت باندهای به دست آمده به نظر می رسد اختلاف معنی داری بین دماهای مختلف اعمال پیش تیمار وجود ندارد.



شکل۳- اثر سیستم احیایی Trx بر هضم پذیری BLG با SDS-PAGE. A. : لاین ۱: BLG تیمار نشده و هضم نشده لاین۲: BLG تیمار نشده با Trx که با تریپسین هضم شده لاین ۳: BLG با سیستم GSH/OsTrx20 در دمای ۲۵C° تیمار شده و سپس با تریپسین تیمار شده B: مقایسه هضم پذیری BLG بعد از پیش تیمار با سیستم Trx در دماهای مختلف.

Fig. 3. Effect of Trx reduction system on digestibility of BLG determined by SDS (12% SDS–PAGE gels). The percent of intact BLG was determined by relative band intensity and shown on vertical axis. a Line 1, BLG (untreated and undigested); line 2, untreated BLG was incubated with trypsin; lines 3, the pretreated BLG with GSH/OsTrx20 at 25 °C was incubated with trypsin. b Comparison of trypsin-digestibility of BLG after pretreatment with different systems at different temperature.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]



شکل ٤- اثر سیستم GSH/OsTrx بر هضم پذیری BLG با استفاده از HPLC. پیکان ها نشانگر پیک مربوط به BLG است. a: BLG تیمار نشده و هضم نشده b: BLG تیمار نشده و هضم شده c: BLG تیمار شده با سیستم GSH/OsTrx20 دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد و هضم شده با تریپسین.

Fig. 4. Effect of GSH/OsTrx1 on digestibility of BLG determined by HPLC analysis. The arrows show the peack of intact BLG. a BLG (untreated and undigested). b Untreated BLG was incubated with trypsin. c The pretreated BLG with GSH/OsTrx20 at 25 °C was incubated with trypsin.

بررسی هضم‌پذیری BLG با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس

به منظور بررسی دقیق‌تر اثر سیستمGSH/OsTrx20 بر هضم-پذیری BLG، هضم‌پذیریBLG های تیمار شده با سیستم Trx در دمای ۳۷°C با روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس (RP-HPLC) مورد آزمون قرار گرفتند. کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد (BLG ی اولیه بدون هضم آنزیمی) که با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دستگاه تزریق شد، در شکل A ٤ نشان داده شده است. در این شکل پیک مربوط به BLG در زمان بازداری ٤٨ دقیقه دیده شد. در شکل B ٤ کروماتوگرام مربوط به BLG ی هضم شده با آنزیم تریپسین بدون استفاده از پیش تیمار و در شکل C ٤ کروماتوگرام حاصل از هیدرولیزBLG ی تیمار شده با سیستم GSH/OsTrx20 نشان داده شده است. BLG ی هضم شده با آنزیم تریپسین ۵۰ درصد سطح زیر پیک را کاهش داده و پیک های جدید کوچکی را در کنار پیک اصلی BLG به وجود آورده است، اما وقتی با سیستم GSH/Trx20 تیمار شد ۸۰ درصد سطح زیر پیک کاهش یافته است. این نتایج با نتایج حاصل از مقایسه میانگین روی ژل SDS-PAGE که تفاوت قابل توجهی بین سیستم Trx و نمونه کنترل بر هضم‌پذیری BLG وجود داشت مطابقت داشت.

Trxها پروتئین هایی هستند که در همه جا حضور داشته و در واکنش های تیول دی سولفید بوسیله دو ریشه سیستئین موجود در جایگاه فعال خود (WCXXC) شرکت می کنند. وجود ریشه های سیستئین به Trx اجازه احیاء باندهای دی سولفیدی پروتئین هدف را می دهند (Gelhaye *et al*. 2004). در گیاهان عالی ایزوفرم های Trx به شش زیرخانواده تقسیم می شوند (Chibani *et al*.2011). ایزوفرم های Trxh بزرگترین زیرخانواده را در گیاهان ایجاد کرده که خود به سه زیر گروه تقسیم می شود. زیرگروه I و II بوسیله NADPH در حضور NTR احیاء می شوند (Gelhaye *et al*. 2004)، در مقابل زیرگروه III شامل ایزوفرم هایی از Trx است که دارای جایگاه فعال غیر معمول (WCXXS) است و بوسیله GSH یا گلوتاتیون احیاء می شود (Gelhaye *et*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

al. 2004). اخیراً در زمینه آنالیزهای پروتئوم برای شناسایی تعدادی از پروتئین های هدف Trxh از گونه های مختلف پیشرفت هایی صورت گرفته است. برای مثال ایزوفرم های Trxh نقش اساسی را در احیاء باندهای دی سولفیدی در پروتئین های ذخیره ای دانه در حال جوانه زنی بازی می کنند که آنها را قابل حل تر و در دسترس تر برای هضم آنزیمی می نماید (Buchanan *et al.* 2005).

بر اساس نقش مؤثر Trxh در احیای باندهای دی سولفیدی، کاربرد فرم های مختلف نوترکیب سیستم NTR/Trx باکتری *E.Coli* برای بهبود هضم پذیری غذا تا به حال ارزیابی شده است (Del val *et al.* 1999; Faris *et al.* 2008). یکی از اصلی ترین آلرژن های غذا BLG شیر گاو است. ساختار این پروتئین اتصال دو مولکول IgE/Fab به دایمر BLG را نشان می دهد (Niemi *et al.* 2007). اپی توپ BLG حاوی شش قطعه کوتاه از زنجیره پلی پپتیدی است که در زنجیره بتا قرار گرفته و پوشاننده سطحی صاف روی سطح آلرژن است. به علت پایداری BLG در شرایط pH اسیدی، BLG به هضم اسیدی مقاوم بوده و با گذر از معده دست نخورده باقی می ماند (Fuquacy *et al.* 2011; Stanley *et al.*1999). وقتی پروتئین ها با گرما واسرشت می شوند، ساختار سوم خود را از دست می دهند و باعث می شوند که اپی توپ های پروتئین طبیعی که با آنتی بادی ها شناسایی می شوند ناپدید شوند (Song *et al.* 2005). بنابراین، تیمار دمایی هضم پذیری BLG را تغییر می دهد و آن را هضم پذیرتر می کند (Takagi *et al.* 2003).

بر اساس مطالعات انجام شده، حضور دو باند دی سولفیدی در ساختار BLG، یکی از آنها در دسترس بوده و در سطح پروتئین قرار دارد (Cys66-Cys160) و دیگری نزدیک به مرکز پروتئین (Cys106-Cys119) است، فاکتور مهمی در پایداری BLG است (Del val *et al.* 1999). احیاء باندهای دی سولفیدی ساختار BLG را ناپایدار کرده و آن را برای هیدرولیز آنزیمی مستعدتر می کند (Zhao *et al.* 2017). یک مدل سازی با رایانه نشان داده که شکستن باند دی سولفیدی آشکار BLG، کونفورماسیون و دسترسی اپی توپ IgE انسانی را تغییر می دهد (Del val *et al.* 1999). بنابراین یافتن راه های مؤثر و مفید برای احیاء باندهای دی سولفیدی می تواند بسیار مؤثر باشد. تیمار BLG شیر با سیستم NTR/Trx به طور مؤثری باندهای دی سولفیدی را احیاء کرد که منجر به بهبود هضم پذیری و کاهش حساسیت زایی BLG شد (Del val *et al.* 1999). همچنین تیمار پروتئین های گندم و آرد سویا با این سیستم باندهای دی سولفیدی احیاء شد و آنها را برای هضم پروتئولیتیک مستعدتر ساخت و حساسیت آن را کاهش داد (Faris *et al.* 2008; Buchanan *et al.* 1997). بر خلاف، پتانسیل بالای سیستم GSH/Trx گیاهی در احیاء باند های دی سولفیدی، تیمار پروتئین های غذا با سیستم GSH/Trx گیاهی هنوز آزمایش نشده است. بنابراین، در تحقیق حاضر، تأثیر سیستم GSH/Trx گیاهی بر هضم پذیری BLG با آنزیم تریپسین بررسی شد. ایزوفرم OsTrx20 عضو زیرگروه Trxh III است و فقط با گلوتاتیون احیاء می شود (Shaykholeslam *et al.* 2015). تولید و خالص سازی فرم نوترکیب His-OsTrx20 ما را بر آن داشت تا تأثیر سیستم GSH/OsTrx20 را بر هضم پذیری BLG بررسی کنیم.

پیش تیمار BLG با این سیستم احیاکننده هضم پذیری BLG را بهبود بخشید که با تکنیک SDS-PAGE و آنالیز RP-HPLC نشان داده شد. در این مطالعه، ما به این موضوع دست یافتیم که سیستم GSH/Trx گیاهی سیستم مؤثر و مفیدی برای احیاء باندهای دی سولفیدی BLG است. بنابراین، پیش تیمار BLG شیر با این سیستم به طور قابل توجهی منجر به بهبود هضم پذیری BLG آن شد.

منابع

Alberse R. 1997. Food allergens. *Environmental Toxicology* and *Pharmacology*. 4(1-2): 55-60.

Buchanan BB, Adamidi C, Lozano RM, Yee BC, Momma M, Kobrehel K, Ermel R, Frick OL. 1997. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

wheat. Production National Academy of Science 94(10):5372–7377.

Buchanan BB, Balmer Y. 2005. Redox regulation: a broading horizon. Annual Review of Plant Biology 56(1): 187–220.

Chibani K, Wingsle G, Jacquot JP, Gelhaye E, Rouhier N. 2011. Biochemical properties of poplar thioredoxin z. FEBS Letters 34569: 1–6.

Creamer L, Bienvenue A, Nilsson H, Paulsson M, van Wanroij M, Lowe E, Anema S, Boland M, Jimenez-Flores R. 2004. Heat-induced redistribution of disulfide Bonds in milk proteins. Bovine beta-Lactoglobulin. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52(25): 7660-7668.

Eslampanah H ,Shahpiri A ,Shaykholeslam Esfahani E. 2014. Interaction of recombinant form of NADPH-dependent thioredoxin reductase from rice with thioredoxin from two plant and bacterial sources. Agricultural Biotechnology 6:27-40. (In Farsi with English Abstract).

Faris RJ, Wang H, Wang T. 2008. Improving digestibility of soy flour by reducing disulfide bondswith thioredoxin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(16): 7146–7150.

Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PL. 2011. Encyclopedia of Dairy Sciences (2nd ed.). Cambridge: Academic.

Geha R, Jabara H, Brodeur S. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. Review of National Immunology 3(9): 721-32.

Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB. 2004. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. PNAS 101(40): 14545–14550.

Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot J. P. 2004. The thioredoxin h system of higher plants. Plant Physiology and Biochemistry 42(4): 265–271.

Maeda K, Finnie C, Østergaard O, Svensson B. 2003. Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. European Journal of Biochemistry 270(12): 2633-2643.

Niemi M, Jylhä S, Laukkanen ML, Söderlund H, Kiljunen SM, Kallio JM, Hakulinen N, Haahtela T, Takkinen K, Rouvinen J. 2007. Molecular interaction between a recombinant IgE antibody and the ß-lactoglobulin allergen. Structure 15(11): 1413–1421.

Nuruzzaman M, Gupta M, Zhang C, Wang L, Xie W, Xiong L, Zhang Q, Lian X. 2008. Sequence and expression analysis of the thioredoxin protein gene family in rice. ***Molecular Genetics*** and ***Genomics*** 280(2): 139-151.

Patenaude A, Ven Murthy MR, Mirault M. 2004. Mitochondrial Thioredoxin System: Effects of TrxR2 overexperssion on redox balance, cellgrowth, andapoptosithe. Journal of Biology and Chemistry 279: 27302–27314. DOI: 10.1074/jbc.M402496200.

Powis G, Mustacich D. 2000. Thioredoxin reductase. Review of. Biochemistry Journal 346: 1-8.

Roodgar Nashta M, Shahpiri A. 2012. Effect of substitution of Cys11 by Ser on the activity and dimerization of one of rice thioredoxin isoforms (OsTrx23) using site-directed mutagenesis. Agricultural Biotechnology 7:56-66 (In Farsi with English Abstract).

Shahpiri A, Svensson B, Finnie C. 2009. From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barley seeds. Molecular Plant 2: 378-389.

Shaykholeslam Esfahani, E, Shahpiri A. 2015. Thioredoxin h isoforms from rice are differentiallyreduced by NADPH/thioredoxin or GSH/glutaredoxin systems. International Journal of Biological Macromolecules 74: 243–248.

Song CY, Chen WL, Yang MC, Huang JP, Mao, SJ. 2005. Epitope mapping of a monoclonal antibody specific to bovine dry milk: involvement of residues 66–76 of strand D in thermal denatured betalactoglobulin. Journal of Biology and Chemistry 280(5): 3574–3582.

Stanley J, Bannon G. 1999. Biochemistry of food allergens. Clinical Reviews in Allergy & Immunology 17: 279–291.

Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J. 2003. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. Biological and Pharmaceutical Bulletin 26(7): 969–973.

Val D, Biohon BC, Lozano RM, Buchanan B, Ermel R, Lee Y. 1999. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. Journal of ***Allergy*** and ***Clinical Immunology*** 103: 690-697.

Zhao D, Le T, Nielsen SD, Larsen LB. 2017. Effect of storage on lactase-treated B-casein and B-lactoglobulin with respect to bitter peptide formation and subsequent in vitro digestibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65(38).: 8409–8417.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Increased digestibility of milk beta-lactoglobulin by treatment with a plant recombinant glutathione/ thioredoxin system

Tahere Shahriari-Farfani*, Azar Shahpiri

Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

*Corresponding Author, Email: tahereshahriari2015@gmail.com

Abstract

B-lactoglobulin (BLG) is one of the main allergens in cow's milk that causes it to be digested poorly. BLG structure has two intramolecular disulfide bonds and one free cysteine in cys121 that disulfide bonds are responsible for its low digestibility. It seems that the digestibility of BLG will be increased via the reduction of disulfide bonds. In the present work, the aim was to study the effect of plant glutathione/thioredoxin systems on the digestibility of milk BLG. Thioredoxins (Trxs) are small and abundant disulfide reductase in all organisms. they are reduced with Trx reductase or glutathione reductase or glutathione. Previously the genes encoding plant Trx, OsTrx20 was cloned and heterologously expressed in *E.coli*. In this work this protein was produced and purified in considerable amounts. The interaction of Trx with glutathione (GSH) was confirmed by insulin assay. The result of this assay showed that GSH was able to reduce OsTrx20. Therefore, in this work the effect of GSH/OsTrx20 on the digestibility of BLG was studied. Finally, BLG was pre-treated by GSH/OsTrx20 at 4, 25 and 37°C and then digested with trypsin. The digestibility was studied by using SDS-PAGE and HPLC and allergenicity was studied by ELISA. The results revealed that the GSH/Trx system significantly affects on the BLG digestibility and allergenicity.

Key words: glutathione, beta lactoglobulin, digestibility, allergenicity, reverse phase - liquid chromatography

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.9.5]