مجله دانشکده پزشکی تهران
شماره نهم و دهم ، بهمن و اسفندماه ۶۶، صفحه ۱۵۹

کمپلکس پذیرنده انسولین ــ لیپوزوم

دکتر: مهدی نصرت‌آبادی ــ دکتر ناصر ملک‌نیا ــ دکتر سیاوش گرایش‌نژاد ــ دکترحسن محمدیها

مقدمه:

هورمونهای پلی پپتیدی و کاته کولامینها به پذیرنده‌ای (Receptor) در سطح سلولی متصل شده‌و کمپلکس هورمون ــ پذیرنده را می‌سازند ، که در نتیجه عامل موثر (Effector) در سطح داخلی سلول موجب سنتز پیامبر دوم و یا سوم [آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP)] میگردد . در نتیجه این عمل آنزیم پروتئین کیناز فعال شده موجب فسفریله کردن بعضی آنزیمها میشود که منجر به‌فعال یا بی اثر شدن آنزیم خواهد شد ، و از طرفی سبب سهولت در امر ترابری مواد از غشاء سلولی میگردد (۱ــ۲ــ۳ــ۴ــ۵ــ۶ــ۷و۸) . عمل بیشتر هورمونهای پروتئینی در غیاب‌کلسیم مهار میشود ، ولوآنکه قدرت‌افزایش وکاهش cAMP مختل‌نشده باشد (۹) . بنابراین‌کلسیم‌ازطریق متصل شدن‌به کالمودولین Calmodulin ممکن است یک دستور دهنده نهائی در ترشح و عمل هورمون باشد (۱۰و۱۱) .

با توجه به شرح فوق مشاهده میشود ، پذیرنده یکی از ارکان اصلی در نحوه اثر هورمون است . در عدم ترشح هورمون میتوان به وسیله ای هورمون را وارد بدن ساخت ولی در اثرمختل شدن عمل یافقدان‌پذیرنده ، وجودهورمون بی اثر خواهد بود (۱۲ــ ۱۳ــ ۱۴ــ ۱۵ــ ۱۶ــ ۱۷ــ ۱۸ ــ ۱۹و۲۰) .

پذیرنده ها بطورکلی شامل‌ترکیب پروتئینی که‌برای تشخیص هورمون مهم میباشد (۲۰ــ ۲۱و۲۲) ، فسفولیپیدی (۲۳و۲۴) و کربوهیدرات میباشند (۱۶) . وزن ملکولی این ترکیبات بین ۲۰۰ تا ۵۵۰ هزار متغیر است . پذیرنده انسولین که به صورت تقریبا" خالص تهیه شده دارای وزن ملکولی تقریبی ۲۰۰ هزار میباشد (۱۶) . این ترکیب گلیکوپروتئینی دارای ساختمان‌اولیگومریک بوده و احتمالا" دارای چهار یا بیشتر جایگاه برای پیوند هورمون است (۱۳ ۱۸و ۱۹) .

هرگونه تغییری در پذیرنده انسولین اعم ازتعداد پذیرنده ها ، میل ترکیبی و شکل فضائی موجب اختلال‌در پیوند هورمون پذیرنده خواهد شد که نتیجه آن بی اثر شدن هورمون میباشد .

با اطلاع از اینکه در سالهای اخیر آنزیمهای گوناگون راکه فقدان آنها در انسان مشاهده میشود ، بوسیله لیپوزومها (وزیکولهائی با دولایه فسفولیپیدی) وارد سلول ساخته اند (۲۵ــ۲۶ــ۲۷) ، هدف ازاین‌تحقیق خالص‌سازی پذیرنده های‌انسولین و واردساختن آنها بدرون لیپوزومها است و درآینده شایداین عمل راه گشائی‌برای وارد ساختن پذیرنده های‌انسولین در سطح سلولهای مورد نظر باشد . بدین جهت در این بررسی با روشهای مختلف پذیرنده انسولین در حد مناسبی خالص گردید و در لیپوزومی که ساخته شده بود وارد گردید .

گروه بیوشمی دانشکده پزشکی ــ دانشگاه تهران

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]

روش کـــــار

۱ـ خالص سازی پذیرنده هـــــا :

برای خالص سازی پذیرنده ها تا بحال روشهـــای مختلفی بکار میرفت که عبارت بودند از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (سفادکس G50) (۲۸) ، تعویض یون دی‌اتیل آمینو اتیل‌سلولز (DEAE ــ سلولز) و غیره‌که دراین بررسی روشها مورد تائید قرا رنگرفت .

خالص سازی کامل پذیرنده های انسولین بوسیلـه کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی طبق روش اولفسکی انجام شد (۳) دراین روش غشاءهای کبدی محلول شده درمحلول ۲% تریتون ۱۰۰X (۵۲)بمدت ۴۰ دقیقه در ۲۴ درجه‌سانتی گراد تکانداده شده و سپس در۱۰۰۰۰۰g بمدت ۷۰ دقیقه سانتریفوژ گردید . مایع روئی در تامپون تریس ۰/۰۵M ، (PH ۷/۴) که حاوی ۰/۲% تریتون میباشد دیالیز گشت . رسوب زیاد حاصله با سانتریفوژ خارج شد . در تهیه ستون‌از یک گرم سفاروز فعال شده CNBr بالHCl 1mM اسه بارشسته شد (ژل اسید ml/g ۲۰۰) . برای پیوند انسولین به سفاروز فعال شده، ۱۰ میلی گرم انسولین گاوی در حضور تامپـــون ۰/۲ M سیترات سدیم ، ۰/۷ M کلرور سدیم ، ۶ M اوره (PH ۶/۴) قرار گرفت (۳۱) .

۱۰ میلی لیتر ازمایع روی سانتریفوژ شده بآهستگی در۴۰ درجه سانتی گراد بر روی یک ستون (پی پت پاستور با حجم کل ۱/۳میلی لیتر) کروماتوگرافی شد ، ستون قبلا" باتامپون ۰/۱M بیکربنات سدیم (PH ۸/۴) شسته و بمدت ۲ ساعت باتامپون تریس ۰/۰۵ M ،حاوی ۱% تریتون ۱۰۰ـ X به حالت تعادل درآورده شده بود .قبل ازشروع کارستون با تامپون فوق یکبارشسته شد و حدود ۵۰ لوله که هرکدام حاوی ۱ میلی لیتر بودند، جمع آوری گردید . عمل‌استخراج از لوله ۳۷ به بعد با تامپون ۰/۰۵ Mاستات سدیم (PH ۶) محتوی ۴/۵ M اوره و ۰/۱ درصد تریتون انجام شد . پس‌از افزودن تامپون برروی ستون عمل استخراج بمدت ۱۵ دقیقه قطع شد . میزان پروتئین با روش لوری Lowry (۲۹) و پیوند اختصاصی انسولین‌I125 با روش پلی اتیلن گلیکوکول (۳۲) تعیین و منحنی‌تغییرات رسم شد .

۲ـ ساختن لیپوزوم :

برای ساختن لیپوزومها از روش Ryman و همکاران (۲۵) استفاده شد . لسیتین ــ کلسترول ــ دی ستیـــل فسفات به نسبت۱ : ۲ : ۱۰ مولار دریک میلی لیتر کلروفرم تحت گاز ازت و دستگاه خلاء (مدلTHEL CO 29) خشک گردید . لیپید خشک شده در تامپون ۵mM (PH ۷/۴) و یا در تامپونی که درRIA انسولین بکار میرود به حالت‌تعلیق درآمد .

۳ـ داخل سازی پذیرنده های انسولین بدرون لیپوزومها :

در داخل سازی از روش بانگام وهمکاران) (۳۲) استفاده شد که در این روش ماده را (مثل انسولین ،آنزیم پذیرنده های انسولین و غیره) به لیپوزومها اضافه کرده و بمدت ۳۰ دقیقه در دستگاه تکاندهنده قرار میدهند .برای یکنواخت و دو لایه شدن ، لیپوزومها به مدت یک دقیقـه تحت تاثیر اولتراسون با راندمان ۵۰ قرار گرفتند (۳۲) .

برای آگاهی از راه یافتن ماده بدرون لیپوزوم از انسولین دارای ید رادیواکتیو استفاده گردید . لیپوزوم ۳ ساعت در ماکریمم ۱۰۰/۰۰۰z با استفاده از روتور T-50 سانتریفوژ گردید (اولتراسانتریفوژ بکمن مدل(L5-50) و سپس داخل سازی در ته نشست لیپوزومها به صـــورت رادیواکتیو مورد بررسی قرار گرفت . چون قسمت بیشتری از ترکیب ،داخل لیپوزومها نمی‌گردد با استفاده‌از روشهای ژل فیلتراسیون ــ سانتریفوگاسیون و دیالیز قسمتهای‌اضافی برداشته شد .

نتایـــج و بحـــث :

در خالص سازی پذیرنده های انسولین بوسیلـه کروماتوگرافی روی ــ سلولز طبق نتایج حاصل قبل از عبور دادن غشاء محلول شده از ستون به ازاء هر میلی گـــرم پروتئین $7/3\times10^{3}$ cpm انسولین رادیواکتیو به آن‌پیونـد میشود،در حالیکه بعد از آنکه غشاء محلول شده از ستـون عبور داده شد در لوله ۳۲ که حداکثر پیوند انسولین‌دارای ید ۱۲۵ به پذیرنده‌اش مشاهده میشود ، به ازاء هرمیلـی گرم پروتئین $9/4\times10^{4}$ cpm انسولین رادیواکتیو پیونـد شده بودکه در ایـن حـالت خالص سازی به میزان دوازده مرتبـه افـزایش نشـان می‌دهـد

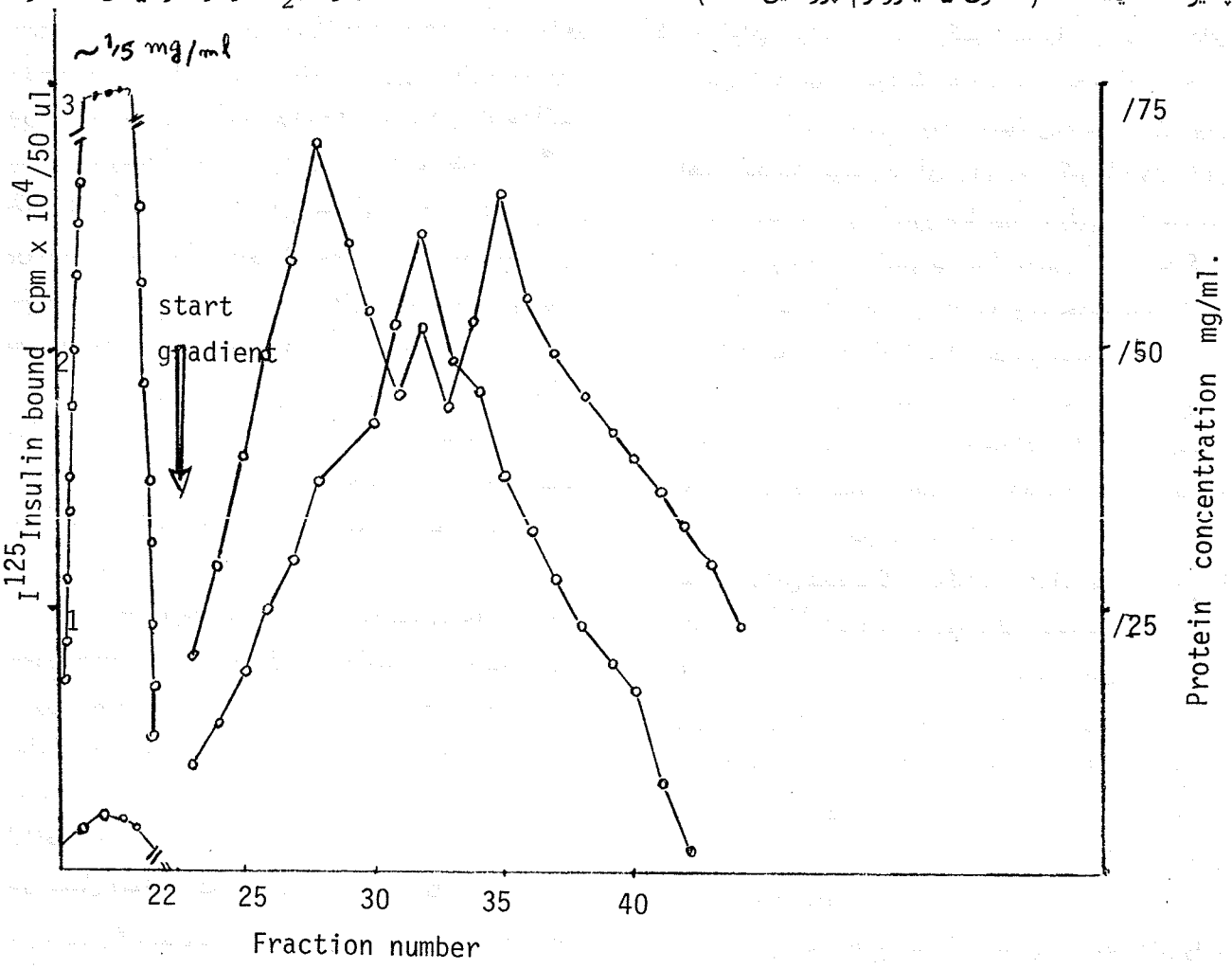
* Virconic cell disrupter model 16-850

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]

در خالص سازی پذیرنده های انسولین بـــــروش کروماتوگرافی همانطوریکه در منحنی زیر مشاهده میشود در چهار لوله ۳۸، ۳۹، ۴۰ و ۴۱ پذیرنده های انسولین خارج شده اند. میزان پیوند انسولین رادیواکتیو در هر لوله بـا روش پلی اتیلن گلیکوکول اندازه گیری شد و نشانداد که قبل از بکار بردن نمونه بر روی ستون به ازاء هر میلی گرم پروتئین 7×10^{3} cpm انسولین رادیواکتیو پیوند میشود. بعد از دیالیز و تغلیظ چهارلوله بوسیله کیسه های سلوفان و تامپون فسفات ۰/۱ M (PH 7.4) میزان پروتئین تعیین میشود و نشان میدهد که در هر میلی لیتر آن ۵۰ میکروگرم پروتئین پذیرنده وجود دارد. میزان پیوند انسولین I^{125} بـــا پذیرنده تعیین شده نشان میدهد که به ازاء هر ۱۰۰ میکرولیتر پذیرند تغایظ شده (محتوی ۵ میکروگرم پروتئین است)

$4/1\times10^{4}$ انسولین رادیواکتیو پیوند میشود، که این میزان پیوند به ازاء هر میلی گرم آن $4/1\times10^{4}\times10^{2}$ cpm میباشد. چنانچه نسبت $\frac{4/1\times10^{4}\times2}{7\times10^{3}}$ نشان میدهد در اینحالت عمل خالص سازی تا حدود ۱۱۰۰ مرتبه صورت گرفته است که درمقایسه با خالص سازی بر روی DEAE ـ سلولز رقم بسیار بزرگی است.

در این روش برای اعتماد از پیوند شدن انسولین به سفاروز فعال شده آنرا چندین بار با تامپون مربوطه شسته و حاصل شستشو از نظر پروتئینی مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین برای آنکه بقیه گروه های فعال باقیمانده احتمالی در سفاروز پوشیده شوند از یک محلول یک مول اتانول و یا گلیسین استفاده شدو چندین بار (حداقل سه بار) سفاروز ـ انسولین شسته شده، بدین ترتیب NH_2 موجود در گلیسین بقیه عوامل



partial purification of insulin receptor of liver-cell membranes on DEAE-cellulose.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]

فعال باقیمانده سفاروز ـ انسولین را می‌پوشاند. برای اعتماد بیشتر که گروه فعال دیگری در انسولین ـ سفاروز باقی نمانده است، ازستون، هموگلبین رقیق شده عبور داده شد (۸۰ میکروگرم هموگلبین در هر ۱۰۰ میکرولیتر) و در صورت پیوند شدن هموگلبین به انسولین ـ سفاروز، احتمال وجود گروه فعال باقیمانده میرفت.

در داخل سازی پذیرنده های انسولین به لیپوزومها نتایج نشانداد که میتوان میزان ۱۲ تا ۱۴% درون لیپوزوم داخل کرد (لیپوزومهائی که با استفاده ازلسیتین ـ کلسترول دی ستیل فسفات تهیه شده اند). سونیکاسیون لیپوزومها در حضور انسولین رادیواکتیو هیچگونه اثری بر روی دخول آن ندارد و فقط موجب کوچک شدن لیپوزومها و دولایه شدن لیپوزومهای چند غشائی میشود (۳۰)، بطوریکه درحد متوسط 10^5 cpm انسولین رادیواکتیو در حضور و عدم حضور سونیکاسیون بیش از ۱۴% آن بدرون لیپوزومها وارد نمیشود. در این بررسی چهار لوله ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱ را که حداکثر میزان پذیرنده انسولین در آنها میباشد توسط دستگاه* در خلاء تغلیظ شد. در هر میلی لیتر این محلول ۴ میلی گرم پروتئین (پذیرنده انسولین) وجود داشت. طبق منحنی زیر غلظتهای مختلف پذیرنده در مجاورت لیپوزومها و میزان معین انسولین رادیواکتیو (10^5 cpm) قرار گرفت.

همانطوریکه درمنحنی سینتیک پذیرنده‌های انسولین مشاهده میشود در غلظت ۶۰۰ میکروگرم که معادل ۳۸۰۰۰ CPM پیوند انسولین رادیواکتیو به پذیرنده میباشد حداکثر (۳۸%) داخل سازی کمپلکس پذیرنده انسولین رادیواکتیو مشاهده میشود.

همانطوریکه قبلا" شرح داده شد در حالت عادی بدون حضور پذیرنده حداکثر ۱۴% انسولین رادیواکتیو بدرون لیپوزوم راه میابد، لذا تفاوت ۳۸% از ۱۴% که معادل ۲۴% است نشان‌دهنده دخول پذیرنده‌های انسولین به درون لیپوزومها است. بدین ترتیب که بطور متوسط به ازاءهر ۱۸۰ میلی گرم مخلوط لیپید (لستین ـ کلسترول ـ دی ستیل فسفات) که برای تهیه لیپوزوم بکار میرود میتوان ۰/۶ میلی گرم پذیرنده انسولین را بدرون آنها وارد ساخت. در تجربه دیگری غلظتهای مختلف از پذیرنده های انسولین در مجاورت لیپوزومها همراه با میزان معین انسولین رادیواکتیو قرارگرفت (پذیرنده هائی که با روش کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی جدا شده بودند). منحنی تغییرات سنتیک پذیرنده های انسولین (شکل زیر) در اینحالت نشان میدهد درغلظت ۷ میکروگرم پذیرنده که حداکثر میزان پیوند انسولین است حداکثر میزان داخل سازی پذیرنده های انسولین به درون لیپوزوم نیز مشاهده‌گردید. در اینحالت پذیرنده های انسولین که توسط کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی خالص شده بودند تا میزان ۳۴ درصد قابل دخول بدرون لیپوزومها بودند.

چنانچه نتایج حاصله نشانداد خالص سازی پذیرنده های انسولین با DEAE-سلولز در حد کم است (۱۲ بار) و هنوز مواد دیگری همراه پذیرنده میباشند که در هنگام مطالعه سینتیک پذیرنده‌ها ایجاد واکنش متقابل میکنند. کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی تقریبا" پذیرنده های انسولین را تا میزان نزدیک به ۱۱۰۰ مرتبه خالص ساخت.

درداخل سازی پذیرنده انسولین به درون لیپوزومها مشاهده شد که انسولین دارای I^{125} حداکثر تا میزان ۱۴% قادر به ورود به درون لیپوزومها میباشد ولی در غلظتهای مختلف پذیرنده های انسولین با انسولین I^{125} حداکثر داخل سازی تا ۳۸% افزایش یافت، و نتیجه‌نشانداد که به میزان ۲۴% پذیرنده های انسولین خالص شده با DEAE-سلولز را میتوان درون لیپوزومها جای داد. بدین معنی که در غلظت ۶۰۰ میکروگرم پذیرنده حداکثر داخل سازی صورت میپذیرد و در صورتیکه غلظت پذیرنده از این میزان هم بالاتر رود اثر بر داخل سازی ندارد. چنانچه پذیرنده‌های انسولین خالص شده با کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی را با انسولین I^{125} مجاور لیپوزومها قرار دهند حداکثر میزان داخل سازی ۴۸%است که در این حالت داخل سازی تا میزان ۳۴ درصد صورت میگیرد. غلظت پذیرنده در این شرایط ۷ میکروگرم است. طبق نتایج قبلی افزایش غلظت بر میزان داخل سازی نمی‌افزاید. چنین نتیجه میشود که پذیرنده های انسولین را همانند انسولین میتوان در درون لیپوزومها جای داد.

سئوالاتی مطرح است که میتوان پذیرنده های وارد شده را با لیپوزومهااز طریق ورید تجویز کرد و آنها راببدن انتقال داد، واکنش کمپلکس پذیرنده ـ لیپوزوم در سطح

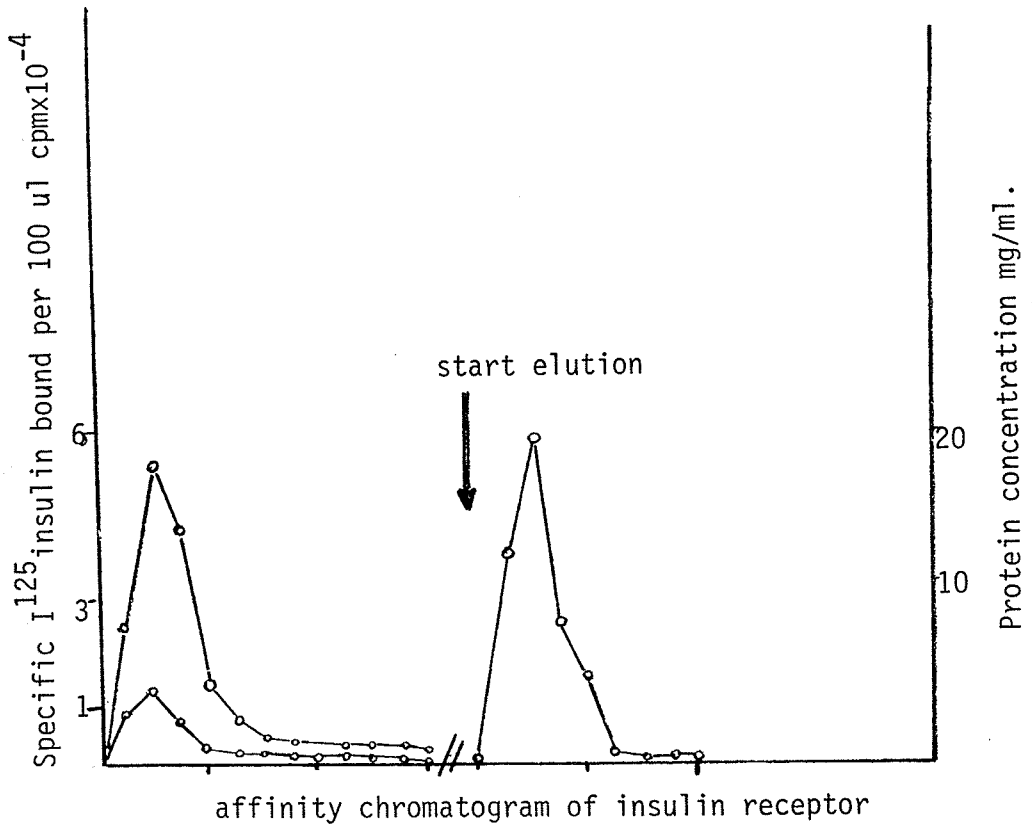
* Thel. Co model 29 GCA precision Scientific

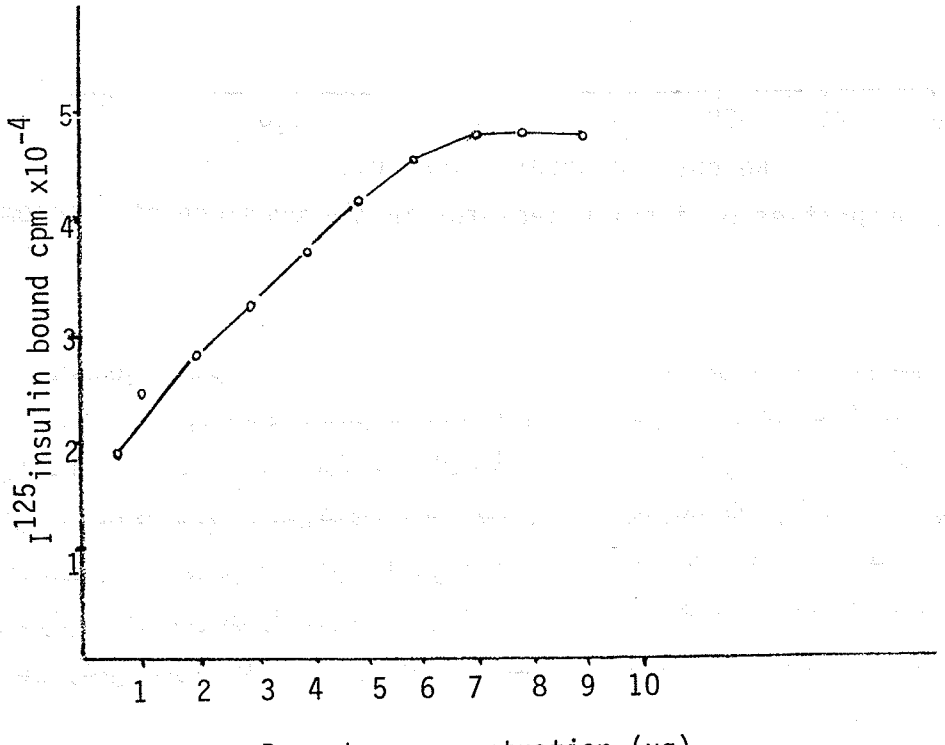
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]

سلولی چگونه است و آیا میتوان پذیرنده های انسولین را بتوسط لیپوزومها در غشاء سلول جای داد .

آیا شایسته ترنیست که لیپوزومها را از لیپید بافت مورد مطالعه تهیه کرد و به توسط آنها پذیرنده را انتقال داد .

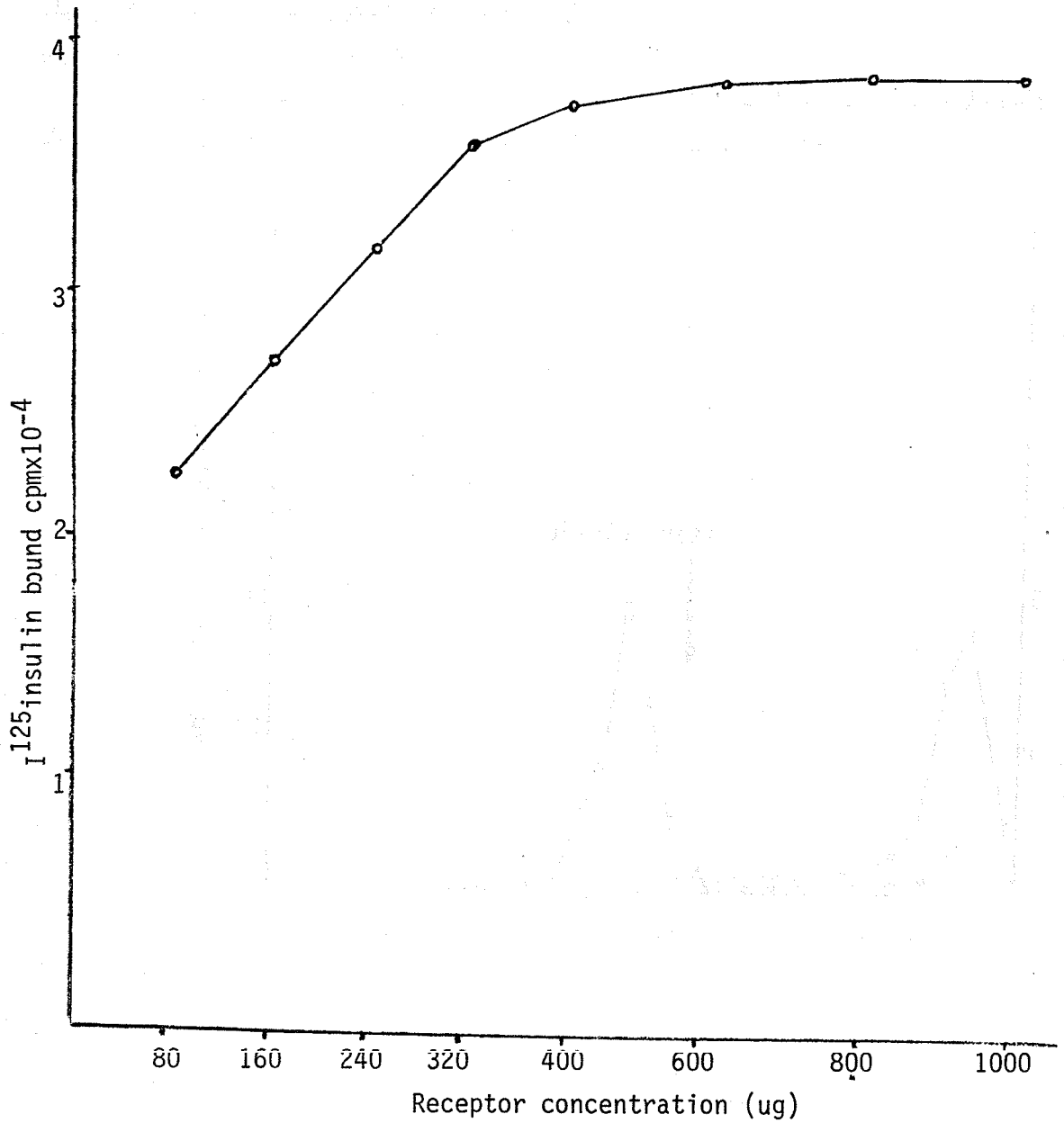
پاسخ به سئوالات مطرح شده در شرایط فعلی بسیار مشکل است واین آینده است که پاسخ های قانع کننده ای فراهم خواهد ساخت .





Kinetic properties of insulin receptor in the presence of liposomes

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]



Kinetic properties of insulin receptor in the presence of liposomes.

خلاصه فارسی

اختلال در پذیرنده های انسولین موجب پیدایش بسیاری ازبیماریهای انسان و حیوان میگردد. برای شناخت بهتر این پذیرنده که نتایج آن پیش گیری و درمان این اختلالات‌است دراین تحقیق باروشهای‌مختلف‌کروماتوگرافی بر روی‌سلولز ـ DEAEژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی بر اساس میل ترکیبی پذیرنده های انسولین خالص گردیدند.

مشاهده گردید که ۱۲ بار خلوص در روش کروماتوگرافی با سلولز ـ DEAE ،با بکار بردن روش کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی به ۱۱۰۰ بار افزایش یافت ـ میزان دخول این پذیرنده ها در لیپوزوم با تهیه لیپوزوم از لسیتین ـ کلسترول و دی ستیل فسفات (۱۰: ۲: ۱) مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده گردید تا میزان ۱۴% انسولین دارای ید رادیواکتیو میتواند وارد در لیپوزوم گردد. در تجربه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]

دیگری که پذیرنده های انسولین بروش کروماتوگرافی سلولز ـ DEAE تاحدی خالص شده بودند حداکثر دخول انسولین I^{125} به لیپوزوم به ۳۸٪ رسید. (غلظت پروتئین پذیرنده در این تحقیق ۶۰۰ میکروگرم بود) بنابراین میزان دخول این پذیرنده ها ۲۴٪ نشانداده شد.

پذیرنده های انسولین خالص شده بـــا روش کروماتوگرافی براساس میل ترکیبی، میزان دخول در لیپوزوم را تا ۴۸٪ افزایش داد.

SUMMARY

Errors in insulin receptors in various pathological conditions needs study of insulin reseptors.Purification and sequence molecular are first considered. For this purpose insulin receptors were purfied by various methods. Liver membrane is solubilized by triton X-100, Chromatography on DEAE-cellulose has demonstrated that insulin receptors can be purified up to about 12 fold. With the use of affinity chromatography it can be purified up to 1100 fold.

To study Whether insulin receptors, like many other compounds can incorporate into liposomes (vesicles with two phospholipid layer), liposomes were prepared by lecithine,cholestrol, dicetyle phosphate in the molar ratio of 1:2:10.

Experiments have shewn that up to 14% of I^{125}-insulin can incorporate into liposomes. In another experiment various concentrations of insulin receptors,partially purified by DEAE-cellulose chromatography were put in contact with liposomes,showed that the maximum incorporation of I^{125}-insulin receptor complex was about 33%,and this is achieved with a cocentration of 600 ug of receptor protein. Thus up to 24% of insulin receptors can incorporate into liposomes.

Insulin receptors, purified by affinity chromatography also were put in contact with liposomes and showed an incorporation ability of I^{125}-insulin receptor complex in liposomes up to 48%. At this achievement the cocentration of receptor was 7ug(i.e.34% incorporation).

References:

1- Hecther,O. and Calek, A.Jr.,Acta Endocrinol.Suppl.,191,77: 39-49,1974.
2- Sutherland,E.W. and Rall T.W., Pharmacol. Rev. 12:265-299,1960.
3- Stadie, W.C., Haugaard, N.,Marsh,J.B., et al.Am. J. Med. Sci,218:265-274,1949.
4- Bradshaw,R.A. and Frazier,W.A.,Curr. Top.Cell Regul.,12: 1-37, 1977.
5- Catt,K.J. and Dufau,M.L., Annu. Rev. Physiol.,39: 529-557,1977.
6- Cuatrecasas,P.,Annu. Rev. Biochem.,43: 509-538, 1974.
7- Catt,K.J., et al., Biol. Reprod., 14:1, 1976.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]

8- Cuatrecasas, P. and Hollenberg , M.D.,Adv. Protein Chem., 30:251,1976.

9- Grodsky, G.M., in "Harper's Review of Biochemistry", Rodwell,W.W.: Martin,D.W., and Mayes, P.A.(edts), 18th. edi.,Lange(publ.)pp.463-467,1981.

10-Means,A.R., and Dedmam, J.R., Nature, 285:73, 1980.

11-Rasmussen,H., Cell Tissue Interactions,32: 243, 1978.

12-Ferychet,P., and Forguce,E., Diabetes, Suppl. 23: 35-43, 1974.

13-Rabinowitz, D., Ann. Rev. Med. 21: 241-258, 1970.

14-Kahn, C.R., Methods in membrance Biology, 3: 81-146,1975.

15-Flier, J.S., Kahn, J. Roth. and Bar,R.S., Science,190:63-65 1975.

16-Soll,A.H., Kahn,C.R., Neville, D.M. Jr. and Roth,J.J., Clin. Invest., 56: 769-780, 1975.

17-Olefsky, J.and Virginia,C.and Bacon, Soniarbaur., Metabolism,25/2:179-191. 1976.

18-Ginsberg, C. Barryh., Kahn,R. Roth,Jesse. and Pierre de Meyts., Biochem. Biophy. Res. Commun. 73/4: 1068-1074,1976.

19- Ginsberg,B,R., Cohn,M. and Kahn,C.R., Diabetes, Suppl.(1),25:322,1976.

20-Tate,R.L.,Holmes,J.M., Kohn,L.O. and Winond,R.,J. Biol. Chem., 250:6527-6535, 1975.

21-Brien,O.R.D.,Eldeferawi,M.E. and Eldefrawi,A.T.,Annu. Rew. Pharm. 12:19-34, 1972.

22-Lefkowitx,R.J.,Roth,J. and Pastan,I.,Ann. N.Y. Acad.Sci. 185:195-209,1971.

23-Pohl,S.L., Krans,H.J., Kozyreff,L.,Jirnbaumer,L. and Rodbell,M.J. Biol. Chem., 246: 4447-4454, 1971.

24-Cuatrecasa, P., Annu. Rev. Biochem., 43:169-214,1974.

25-Patel,H.M. and Ryman,B.E., FEBS. Lett. 62; 60-63, 1976.

26-Colley, C.M. and Ryman, B.E., Biochem. Soc. Trans.2: 871-872,1974.

27-Patel,H.M. and Ryman,B.,E., Biochem. Soc.Trans.2: 1014-1017, 1974.

28-Cautrecasas,P.,Proc. Natl.Acad.Sci.USA,63:450-457, 1969.

29-Lowry,O.H., Rosebrough.,N.J., Farr,A.L. and Randall,R., J.Biol.Chem.,193:265, 1951.

30- Olefsky,J.M., Crapo,P.A.,Ginsberg,H. and Reaven,G.M., Metabolism 24:495-503, 1975.

31- Cuatrecasa,P. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 69: 1277-1281, 1972.

32- Bangham,A.D., Hill,M.W. and Miller,N.G.A., in: Methods in membrane Biology, Korn E.D. ed. Vol. 1, pp. 1-68, Plenum Press. 1974.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-01-18]