

کروماتوگرافی دو بعدی اسیدهای آمینه در مایعات بیولوژیک بعد از فیلتراسیون

دکتر اسماعیل علمی آخونی* - دکتر محمود دوستی* - دکتر ایرج زنگنه**

مقدمه

به لحاظ اهمیت بسزایی که واحدهای سازنده پروتئین ها یعنی اسیدهای آمینه در افراد سالم و بیمار دارا می‌باشند لذا تفکیک آنها از یکدیگر در موارد متعددی از جمله تعدادی از بیماریهای ارثی که بعلت کمبود یک یا چند آنزیم به وقوع می‌پیوندد دارای ارزش بسزایی است به همین سبب استفاده از وسائلی که تهیه و کاربرد آن برای همگان میسر بوده و آنان را از بکارگیری وسایل مدرن تا حدی بی نیاز نماید روشی است که در این مقاله ارائه شده است.

خلاصه

برای جداسازی اسیدهای آمینه مایعات بیولوژیک از روش لایه نازک دو بعدی پس از فیلتراسیون استفاده شده و با این روش اسیدهای آمینه تمام مایعات بیولوژیکی بدن مانند سرم خون و ادرار و اسپرم و مایع آمینوتیک و همچنین مایع نخاع مشخص گردیدند.

ابتدا ملکولهای درشت پروتئین و پلی پپتیدهای مختلف مایعات بیولوژیک فوق الذکر توسط لوله های نیمه تراوی سلوفان جدا گردیدند.

روش و چگونگی کار

ابتداء لوله دیالیزه قطعات ۱۵ سانتی متری تقسیم و داخل بشر حاوی آب مقطر دیونیزه قرار داده می‌شدند و پس از نیم ساعت لوله ها را خارج کرده و با دستمال کاغذی تمیز خشک نموده یک انتهای آنها را گره زده و ۳ میلی لیتر از مایع بیولوژیکی مورد آزمایش توسط پمپ تمیز از انتهای دیگر سلوفان وارد می‌شد. سپس سلوفان ها در داخل لوله آزمایش بصورتی قرار داده می‌شدند که دو انتهای لوله های مزبور خارج از لوله آزمایش قرار گیرند و پس از قرار دادن چوب پنبه بر سر لوله ها بمدت ۴۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شوند سپس لوله ها را خارج کرده و مایع صاف نشده حاوی ملکولهای درشت پروتئین برای آزمایش الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفته و از بقیه صاف شده برای آزمایشات کروماتوگرافی دو بعدی استفاده میگردد (۷ و ۴ و ۸): از پلیت ۱۰×۱۰ سلولز در این بررسی استفاده گردید، مقدار نمونه کاملاً بستگی به نوع مایع بیولوژیکی داشته و در نهایت این مقدار از ۳/۵ میکرولیتر تجاوز نمی‌کرده است. حلالهای فاز مایع کروماتوگرافی متشکل از دو گروه بودند الف: حلال شماره یک (تاتک شماره ۱) ۳۵ میلی لیتر

* - استادیاران گروه آموزشی بیوشیمی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران.

** - متخصص بیوشیمی بالینی آزمایشگاه بهداری، زاندارمری جمهوری اسلامی ایران - میدان انقلاب تهران.

اختلاف داشتند که آن نیز ناشی از کمبود تغذیه یا فقرغذایی و یا فعالیتهای بدنی آن افراد بوده و همچنین در آن مدت حدود ۵۰۰ ارار افراد مختلف پس از فیلتراسیون مورد آزمایش قرار گرفت فقط در ۵ مورد سیستمیوری مشاهده گردید که مقدار اسیدهای آمینه اورنیتین و لیزین و هموستتین و سیتروکلین و آرژینین در آنها بیش از حد طبیعی بوده ۱۰ مورد از مایع آمینوتیک مربوط به خانمهای حامله نیز امتحان بعمل آورده و اسیدهای آمینه مربوط به آنها عبارت بودند از لوسین و فنیل آلانین، تریپتوفان، والین، ۳، متیل هیستیدین، سرین، گلیسین، هیستیدین، سیستین، سیستین، هموسیستین، آرژینین و اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک و نیز ۱۰ مورد اسپرم افراد سالم پس از فیلتراسیون مورد آزمایش کروماتوگرافی دو بعدی قرار گرفت و اسیدهای آمینه زیر در آنها مشخص گردید.

لوسین، ایزولوسین، فنیل آلانین، تریپتوفان، والین، تره‌اونین، ۱، متیل هیستیدین، آلانین، سرین، هیستیدین، اسید گلوتامیک، سیستین، آرژینین و اسید آسپارتیک.

بحث:

پروتئین‌هایکی از مهمترین مواد آلی مورد نیاز بدن انسان هستند و می‌توانند در کاتابولیسم و آنابولیسم شرکت نمایند یعنی این مواد انرژی را و انرژی خواه هستند و در اثر آنزیمهای پروتئاز دستگاه گوارش هیدرولیز شده و به واحدهای ساختمانی خود یعنی اسیدهای آمینه تبدیل می‌شوند (۲).

تعداد اسیدهای آمینه طبیعی ۲۰ عدد هستند که همگی از نوع II می‌باشند ولی در حدود ۲۵ اسید آمینه در ساختمان پروتئینها شرکت دارند که بوسیله پیوند پپتیدی CO-NH- با هم ترکیب شده و مولکولهای پپتیدی، پلی پپتیدی و پروتئینها را تشکیل می‌دهند.

علاوه بر اعمال فوق بعضی از اسیدهای آمینه در سنتز هورمونها، ویتامین‌ها، ملانین هیستامین، مواد قندی و چربی شرکت دارند. از این تعداد اسیدهای آمینه طبیعی فقط ۸ عدد آنها ضروری می‌باشند. زیرا بدن قادر به سنتز آنها نمی‌باشد و بایستی بوسیله مواد غذایی به بدن برسند که عبارتند از والین، لوسین، ایزولوسین، تره‌اونین،

پیریدین و ۳۵ میلی لیتر دی اکسان و ۱۵ میلی لیتر محلول آمونیاک و ۱۵ میلی لیتر آب مقطر بودند که مدت یکساعت بحال خود گذاشته شده تا فضای داخل تانک از بخار مخلوط محلولهای فوق اشباع گردد. ب: حلال شماره ۲ (تانک شماره ۲) حاوی مخلوطی از ۳۵ میلی لیتر بوتانول، ۳۵ میلی لیتر استن ۷ میلی لیتر اسیداستیک و ۲۲ میلی لیتر آب مقطر بوده که در ابتداء بصورت دو محلول مجزای A شامل ۳۵ لیتر بوتانول و ۳۵ میلی لیتر استن و B شامل ۷ میلی لیتر اسید استیک و ۲۳ میلی لیتر آب مقطر بودند و هنگام مصرف به نسبت ۲۸ میلی لیتر از محلول A و ۱۲ میلی لیتر از محلول B را در تانک شماره ۲ ریخته و بشدت تکان دادن و سپس بمدت یکساعت بحال خود گذاشته می‌شد تا فضای تانک از بخار مایع اشباع گردد. برای تهیه نین هیدرین ۵/۵ گرم پودر نین هیدرین را در ۱۰۰ میلی لیتر از مخلوط اتانول و اسید استیک به نسبت (۹۸ میلی لیتر اتانول و ۲ میلی لیتر اسید استیک) و یا ۱۰۰ میلی لیتر استن حل و برای رنگ آمیزی پلیت‌ها مورد استفاده قرار میگرفت. هریک از پلیت‌ها پس از نمونه گذاری ۲ بار و هربار بمدت یکساعت بدین ترتیب کروماتوگرافی می‌گردیدند و در پایان اولین کروماتوگرافی پس از خشک شدن پلیت آنرا در بعد دیگر (۹۰ درجه چرخش) قرار داده و مجدداً عمل کروماتوگرافی بمدت یکساعت ادامه داده می‌شد. پلیت‌ها پس از خشک شدن با کمک نین هیدرین و با استفاده از اسپری رنگ آمیزی شده و آنها را بمدت ۳۰ دقیقه در اتو ۱۰۰ درجه سانتی گراد بمنظور ظهور اسیدهای آمینه قرار داده می‌شد و در نتیجه اسیدهای آمینه به رنگ بنفش در نقاط مختلفی از پلیت مشاهده می‌گردیدند بجز اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین که برنگ قهوه‌ای تظاهر می‌نمودند و اسیدهای آمینه را بطور انفرادی در الکل ایزوپروپانول ۳۰٪ حل نموده سپس کروماتوگرام انجام داده و نتایج آنها را مقایسه نموده در ذیل کروماتوگرام چند نمونه ارائه می‌گردد.

نتیجه

آزمایش کروماتوگرافی دو بعدی روی مایعات بیولوژیک پس از انجام فیلتراسیون بر روی ۳۰ مورد سرم افراد طبیعی انجام گرفت و کلیه ۲۰ اسید آمینه طبیعی در سرم افراد مزبور مشاهده و فقط از نظر کمی در بعضی اسیدهای آمینه با هم

سازی آنها از همدیگر با روش کروماتوگرافی یک بعدی امکان پذیر نیست .

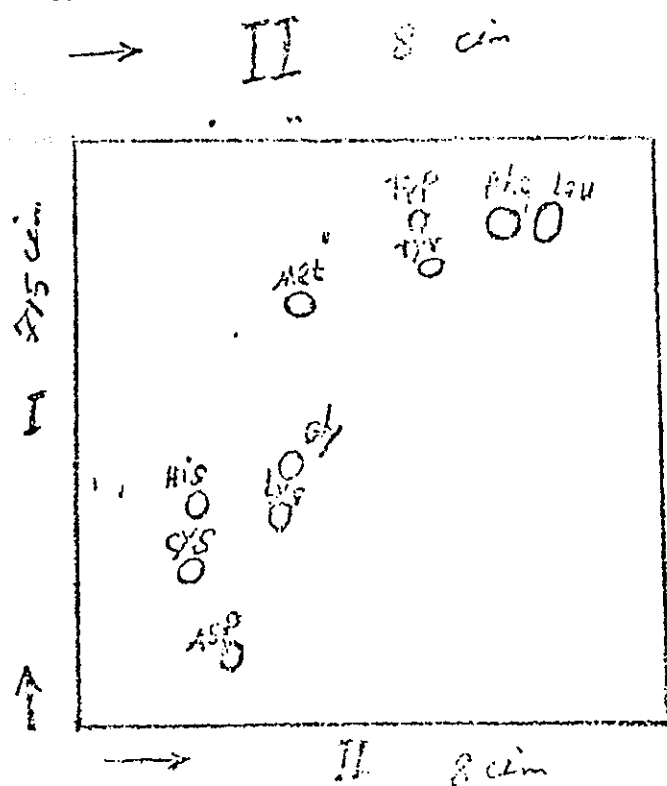
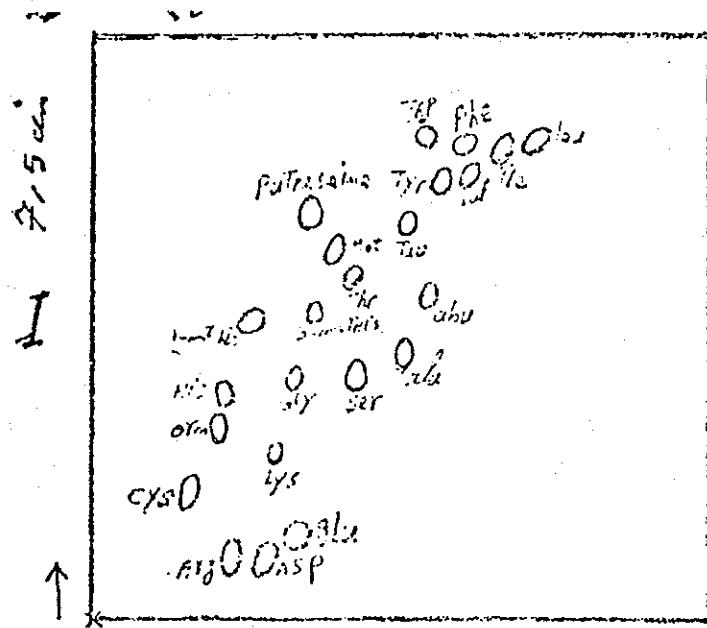
لذا از بین روشهای مختلف کروماتوگرافی برای جداسازی اسیدهای آمینه روش کروماتوگرافی دو بعدی روی پلیت سلولز پس از جداسازی پروتئین ها و مولکولهای درشت با استفاده از لوله های سلوفان بسیار مناسب است زیرا اولاً " جواب حاصله دقیق است . ثانياً " مدت آزمایش زیاد طولانی نیست و در یک زمان میتوان چهار نمونه بیولوژیکی مختلف را مورد آزمایش قرار داد . ثالثاً " مواد مورد نیاز آن نسبت به سایر روشها در دسترس تر است و به دستگاههای گرانقیمت و پیچیده نیازی ندارد .

در خاتمه پیشنهاد می شود با توجه باینکه اسیدهای آمینه اساس ساختمان ، پروتئین ها هستند بهتر است جداسازی و بررسی اسیدهای آمینه موجود در سرم بیماران کبدی و کودکان مبتلا به سوء هاضمه و همچنین اسپرم افراد مبتلا به عقیمی و ناتوانی اسپرماتوزئید با روش کروماتوگرافی دو بعدی روی پلیت سلولز پس از فیلتراسیون انجام گیرد تا اینکه این روش در اثر تجربه زیاد بتواند جوابگوی نیاز بیماران فوق باشد .

لیزین تریپتوفان ، فنیل آلانین ، میتونین (۶۱) .
اگر اسیدهای فوق به اندازه کافی به بدن نرسند رشد و ترمیم بدن دچار اختلال می شود . بقیه اسیدهای آمینه که بدن قادر به سنتز آنها نمی باشد و کاهش آنها در بدن دیده نمی شود بنام اسیدهای آمینه غیر ضروری موسومند (۳) .
نقص در متابولیسم هریک از اسیدهای آمینه طبیعی باعث بیماری می شود که اکثراً " در اثر نقص ژنتیکی و فقدان آنزیمهای لازم برای متابولیسم آنها حاصل می شوند .
مهمترین بیماریهای متابولیسمی اسیدهای آمینه عبارتند از فنیل کتون اوری ، بیماری آلکاپتوری ، هموسیستینوری ، آلبنیسم ، بیماری سیستینوری ، بیماری شربت افرا ادرار و بیماری سیستینوز می باشد (۶۵) .

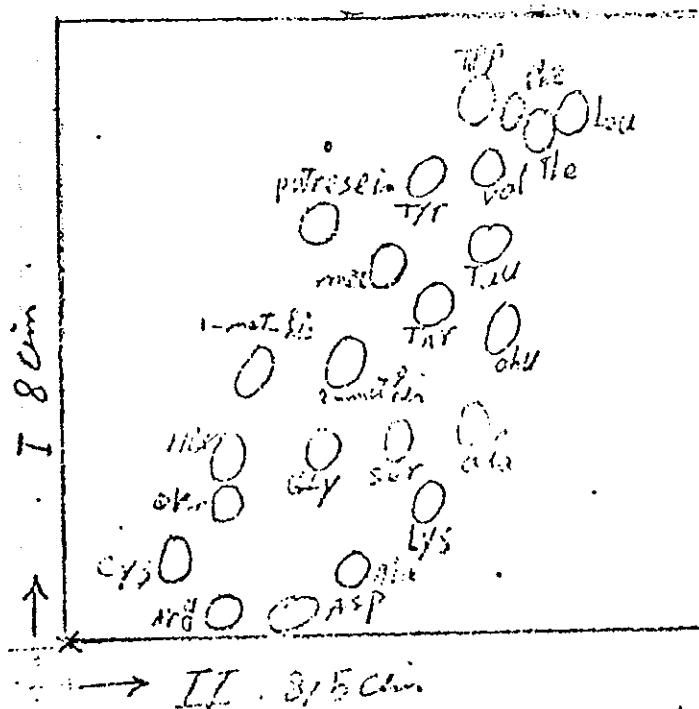
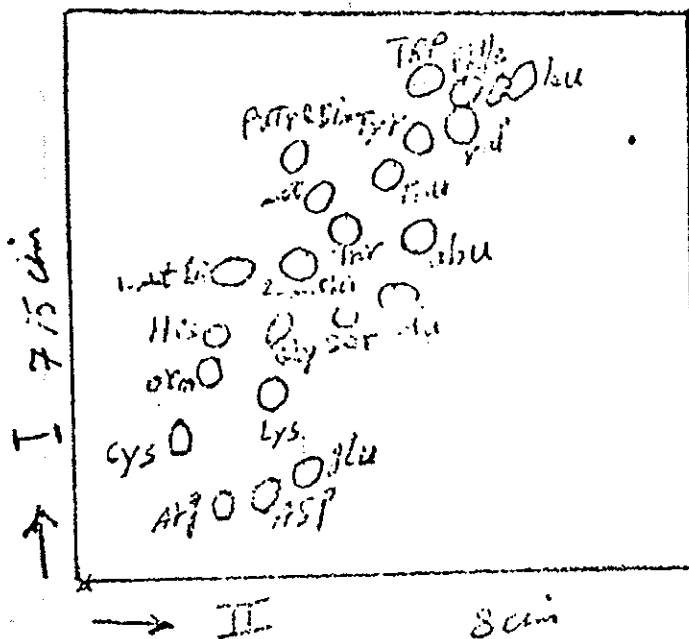
برای بررسی و جدا سازی اسیدهای آمینه در مایعات بیولوژی روشهای مختلفی وجود دارد . ولی هریک دارای معایبی بوده و نیازمند وسائلی گرانقیمت و موادی هستند که دسترسی به آنها مشکل است ، علاوه بر آن جداسازی اسیدهای آمینه با کروماتوگرافی یک بعدی غیر ممکن بوده زیرا با این روش تنها یک ماده را میتوان از محلولی جدا نمود و در مایعات بیولوژی که حداقل بیش از ۱۵ اسید آمینه مختلف وجود دارد ، جدا

استاندارد مرگ: که حاوی ۲۲ اسید آمینه و بعد از اولین حرارت تظاهر شدند.



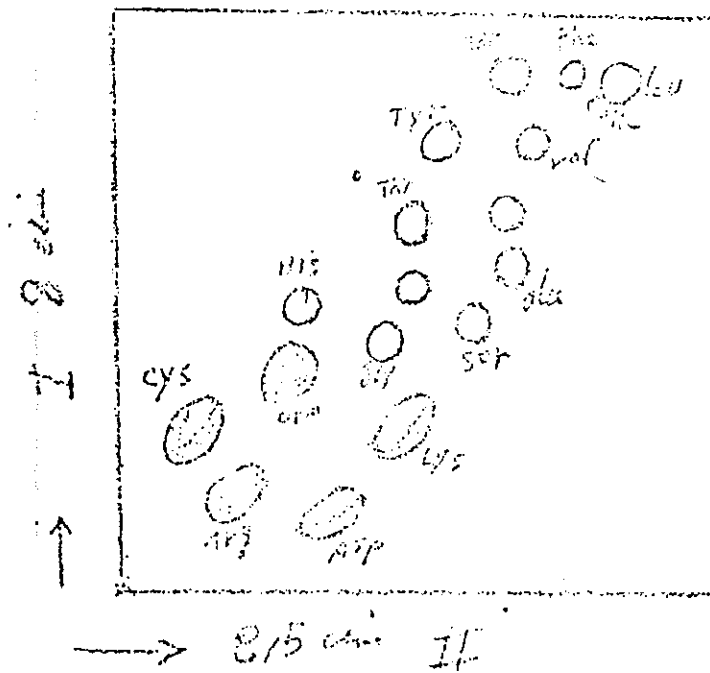
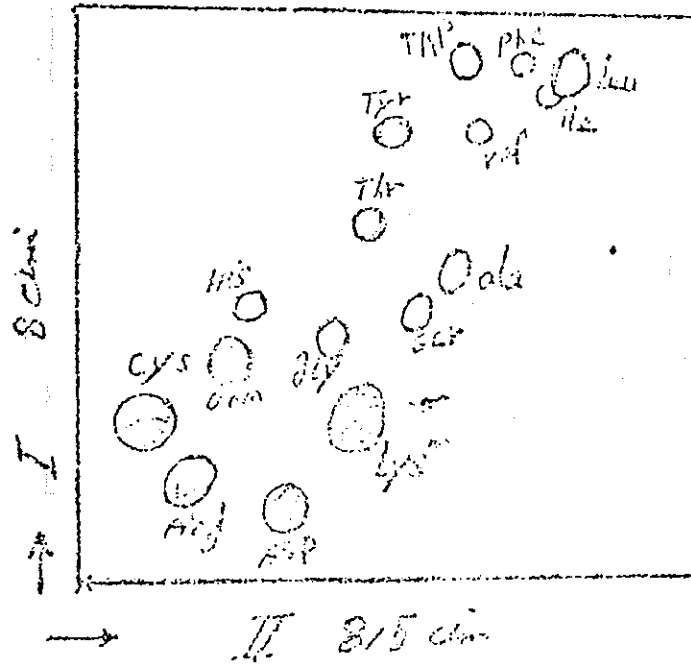
کروماتوگرافی ۱۰ نمونه از اسید آمینه که بعنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است.

کروماتوگرافی دو بعدی سرم طبیعی



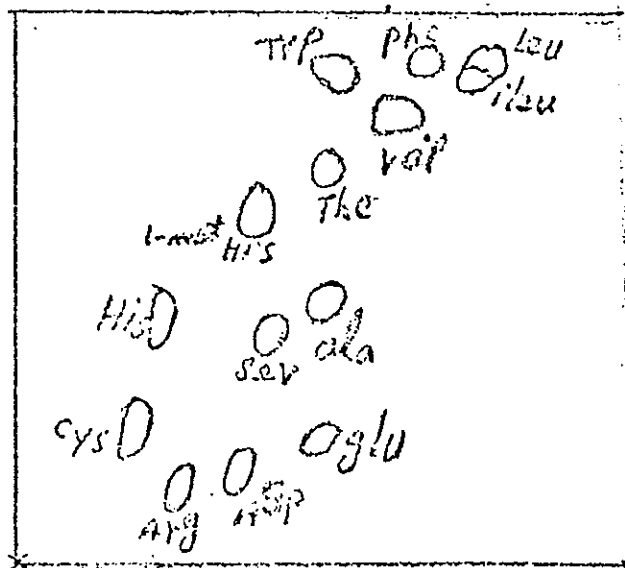
کروماتوگرافی دو بعدی ادرار طبیعی

کروماتوگرافی ادرار خانم مبتلا به سیستینوری

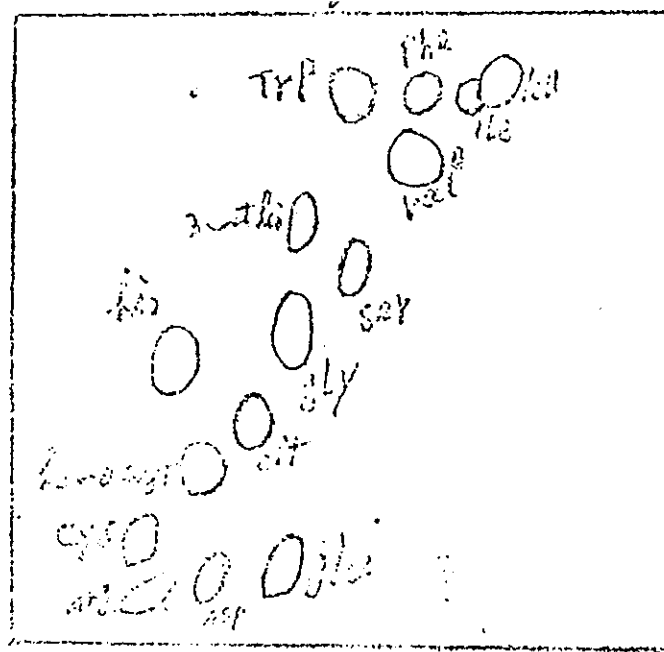


کروماتوگرافی ادرار پسر بچه ۱۳ ساله که مبتلا به سیستینوری بوده و از مادر مبتلا به سیستینوری متولد شده است .

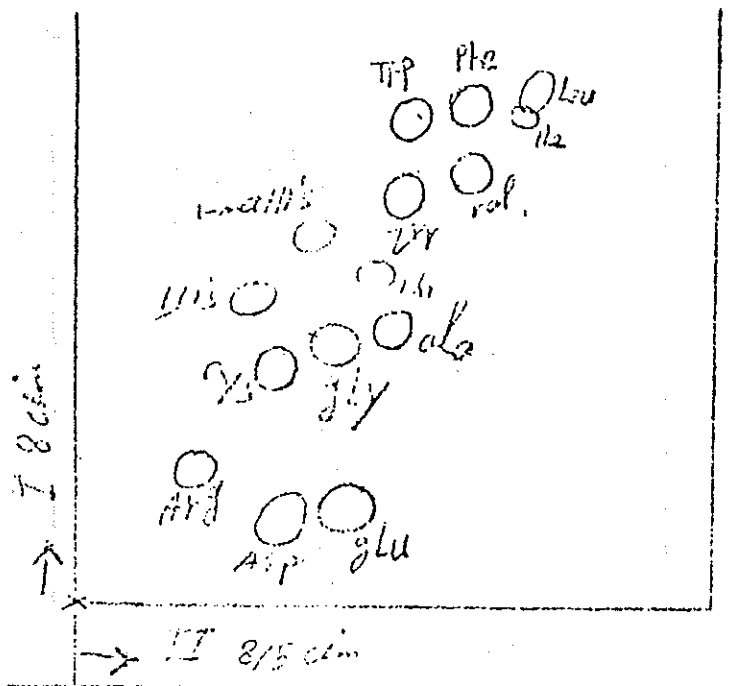
کروماتوگرافی اسیرم شخص سالم



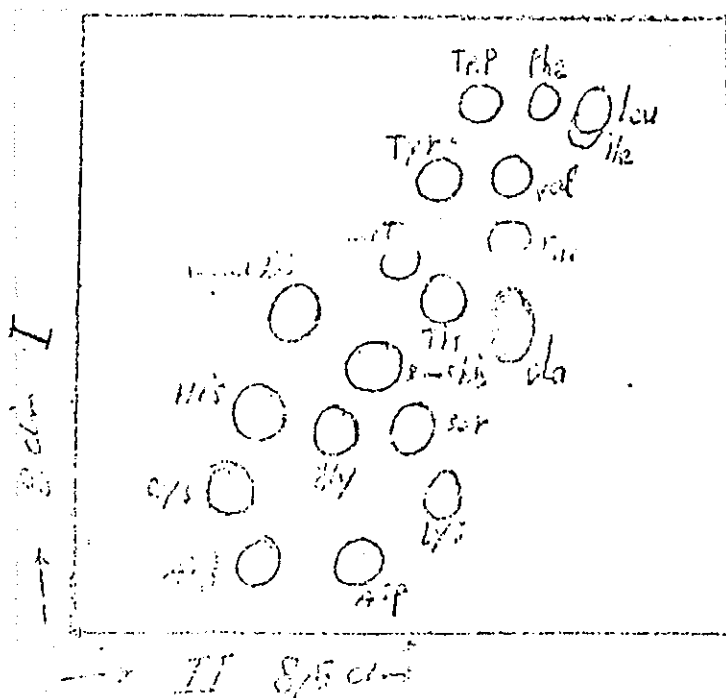
II 8,5 cm



کروماتوگرافی مایع آمینوتیک



کروماتوگرافی مایع نخاع شخصی که بعلت ناراحتی کوی در بیمارستان امام خمینی بستری بوده است .



کروماتوگرافی ادرار شخص بیمار مشکوک به آلانین اوری

REFERENCES

- 1- Harper's. "Review of Phochemistry", pp. 14, and 24, 1983.
2. Harrison's "The metabolic disorders", 1978.
3. Harrison's "The metabolic disorders", 1983.
4. Merck s"Information of thin Layer Chromatography Amino Acids in the Urine".
5. Iomas M. Devlin "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation", pp. 1154, 1982.
6. Smith & Thier "Pathophysiology" pp. 340-1, 1982.
7. S. Marstein and T.L. Perry (Oslo, Norway and Vancouver, Canada).... Studies of amino acid clinical Chincal Acta, Vol. 109, pp. 14, 1983.
8. S.A. Lonky, N. Gochman, S. Smith, G. Bergeron-Lyan and K. Jucohs (Son Diogo CA, U.S.A.), Amino Acids analysis elastin, clinica, Chimal Acta, Vol. 110, pp. 227, 1981.