الکتروفورز روی ژل نشاسته

روش نوین درمطالعه پروتئین‌ها و گروههای سرمی خون

نوشته : دکتر پرویز رصدی

مقدمه ـ بین روشهای گوناگونی که برای شناختن پروتئین‌های پلاسما معمول میباشد الکتروفورز یا کوچ کردن(۱) مولکولهای پروتئین تحت اثرمیدان الکتریکی که در ۱۹۳۷ توسط تیزلیوس(۲) کشف گردیده بعنوان یکی ازسودبخش ترین روشهای تجزیه‌ای درشیمی اجسا درشت مولکول (۳) شناخته شده است . (6,2,1)

اساس ـ الکتروفورزعبارت‌ازبحرکت درآمدن وجا بجا شدن پروتئین‌هادرحوزه‌الکتریکی است،این امرازطرفی‌تابع درشتی‌مولکول ، شکل‌مولکول وبارالکتریکی‌آن بوده وازطرف دیگر تابع شرایط محیط مانند PH ، قدرت‌یونی، حرارت، واختلاف سطح جریان الکتریکی‌میباشد . ابتدا باید دید که پروتئین ها چگونه و در چه شرایطی تحت اثر میدان الکتریکی جابجا میگردند ؟.

میدانیم که پروتئین‌ها ازترکیب مولکولهای چندی ازاسید های‌آمینه‌که توسط پیوندهای پپتیدی بیکدیگرمتصل‌گردیده اند حاصل میشود . ترکیب واجتماع‌این‌آمینو ـ اسیدها برحسب اینکه دارای عامل‌اسید ویاامین‌آزاد باشد بآنها خاصیت آمفوتری(۴) میبخشدواینگونه‌پروئیدها درصورتیکه در برخی شرایط تحت اثر میدان الکتریکی قرارگیرند میتوانند کوچ نموده و جابجاگردند .

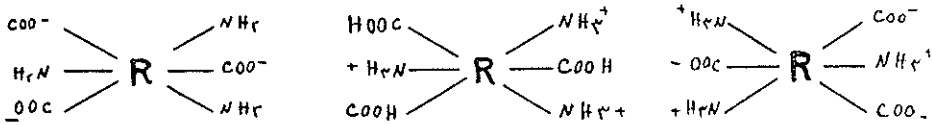
* Èlectrophorese en Gel d'Amidon .

1- Mjgration. 2- Tiselius. 3- Macromolecules

4- Amphotere

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

برای روشن شدن مطلب یك مولکول پروتیدی را در نظر میگیریم که زنجیره طویل پلی پپتیدی آن باحرف R وریشه های انتهائی آن بصورت گروههای آزاد کاربوکسیل (COOH-) و یا آمینه (NH_2-) نمایانده شود این مولکول پروتیدی برحسب اینکه درمحیط اسید ویاقلیائی قرارگیرد مانند یك اسیدآمینه یونیزه شده وبرحسب PH محیط میتواند مانند یك اسید ویایك قلیائی عمل نماید .



محیط قلیائی (بارالکتریکی منفی) — محیط اسید (بارالکتریکی مثبت) — نقطهٔ ایزوالکتریك (بدون بارالکتریکی)

چنانکه مشاهده میشود مولکول پروتیدی درمحیط قلیائی بارمنفی یافته وبسمت قطب مثبت میگراید برعکس درمحیط اسید بسمت قطب منفی کوچ خواهد نمود. در حالت خاصی که بار های مثبت ومنفی این مولکول متعادل میگردندمولکول ازلحاظ الکتریکی خنثی بوده وتحت اثرمیدان الکتریکی جابجا نخواهدگردید (نقطه ایزوالکتریك(۵) که نقطه اختصاصی ومشخص پروتئین ویا گروه پروتئینی میباشد. این نقطه بسیار نزدیك بنقطه ایزویونیك میباشندکه در آن عوامل اسید ویاقلیائی یك مولکول بیك نسبت یونیزه میگردند (9).

هراندازه که ازنقطه ایزوالکتریك یك پروتئین بالاتررویم بهمان نسبت عامل اسید آن بیشتریونیزه گشته وبارمولکولی پروتئین بیش ازپیش منفی میشود، در اینصورت بسمت قطب مثبت خواهدگرائید. بنابراین پس ازآنکه مدتی ازعبورجریان الکتریکی درمخلوط پروتئین گذشت پروتئین های مختلف از یکدیگر مجزا شده وهریك بواسطه قابلیت تحرك الکتروفورزی مخصوص بخود متمایزخواهندگردید .

روش آزمایش — دو روش کلی برای انجام این آزمایش معمول میباشد :

۱ــ الکتروفورز آزاد یا مرزی(۶) هرچند این روش طریقه خوبی برای تجزیه وتحلیل مواد مشکله یك مجموعه پروتئینی است با اینحال مشکلات چندی را دارا میباشد .

5- Point isoelectrique.

6- E. Libre du E. de Frontiéres.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

برخی ازاین مشکلات صرفاً جنبه عملی دارند چنانکه گرانی بهای دستگاه آزمایش ، مقدارسرم مورد لزوم ومدت نسبتا طولانی که باید صرف آزمایش شودموارد استعمال این‌روش‌را درآزمایشهای معمولی محدود میسازند .

مشکل دیگراینکه چون‌این‌آزمایش براساس ضریب انکسار نورگوناگون گذارده‌شده‌است بوسیله آن نمیتوان اجزاء متشکله برخی از ترکیبات متعدد سرم مانند مجموعه های لیپیدی ـ گلوسیدی ومتالو- پروتئین (۷) را تشخیص داد (6)

۲ـ الکتروفورزمنطقه‌ای(۸) : نظر باینکه جابجا شدن مولکولهای پروتئین در محیط مایع کاملا بطورمستقیم صورت نمیگیرد برای انجام آزمایش جسم جامدی را انتخاب نموده‌اند که مایع ازخلال آن‌بتواند جریان پیداکند. یکی‌ازاین‌اجسام که‌بعلت واجد بودن‌دستگاه موئینه(۹) مورد استعمال بسیاردارد‌کاغذ است چنانکه امروزه دردنیا نتایج عالی الکتروفورزروی‌کاغذراچه درکارهای وابسته بزیست شناسی بالینی وچه در پژوهشهای شیمی، فیزیولوژی و یاصنعتی بخوبی می شناسند.

تقریباً همزمان باکشف الکتروفورزروی‌کاغذگوردون(۱۰) در ۱۹۵۰ ژل‌ژلوزرا بجای کاغذ برای این‌آزمایش انتخاب نمود و با این ابداع پیشرفت بزرگی را درالکتروفورزآغاز و راهی‌را برای پژوهشهای نوین (ایمونو ـ الکتروفورز(۱۱) باز نمود (2و6) .

ژلوزمزیت بزرگی نسبت بکاغذ دارد و آن اینستکه هرچند که بظاهرجسم جامدی بنظر میرسد ولی نظرباینکه ۹۸ درصد آنرا مایع تشکیل میدهد میتوان الکتروفورز منطقه‌ای‌را در شرایط تجربی مشابه باآنچه راکه تیزلیوس پیشنهاد نموده انجام داد .

بالاخره در۱۹۵۵ برای اولین باراسمی‌تیز(۱۲) الکتروفورزروی ژل نشاسته‌راپیشنهاد وازاین تاریخ ببعد دراین روش بسبب کاربستهای مخصوص آن تغییر وتکامل حاصل شده است . بزرگترین فایده این روش تجزیه و تحلیل پروتئین های پلاسمائی بوده و امروزتنها روشی‌است که بوسیله‌آن توانسته اند ۲۴ نوع پروتئین‌را درپلاسما مشخص سازند درحالیکه بروشهای قبلی (الکتروفورزآزاد ویا الکتروفورزمنطقه‌ای روی‌کاغذ، ژلوزواستات سلولوز) بیش‌از۵الی۶ نوع پروتئین را نمیتوان متمایز ساخت .

بکار بردن ژل نشاسته درالکترو فورز بدلایل زیر برکاغذ رجحان دارد :

الف ـ وجود ۸۵ درصدآب درژل ،کوچ‌کردن پروتئین‌ها را بنحو مطلوب‌آسان میسازد .

7– C· Metalloprotéiques.

8– E. de Zone. 9– Systéme de Capillaires. 10– Gordon.

11– Immuno–Électrophorése· 12 Smithies.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

ب ـ ضعف قدرت یونی (۰/۰۳) قدرت انحلال پروتئین را بالا میبرد :

ج ـ جذب سطحی پروتئین‌ها بوسیله ژل نشاسته کمتر ازکاغذ است .

د ـ بالاخره وبخصوص اندازه‌خلل وفرج ژل مانند پروتئین‌هابوده وبنابراین پدیده‌پالایش نیزبه‌کوچ‌کردن الکتروما نیتیك اضافه میشود یعنی بااین روش عبور جریان الکتریکی‌ازخلال ژل نشاسته نه تنها سبب‌کوچ‌کردن پروتئین‌ها بسمت قطب مثبت خواهدگردید بلکه خود ژل نیز مانند یك پالایه واقعی عمل‌کرده پیشرفت مولکولهای بسیار درشتراکند خواهد ساخت بنابراین محل قرارگرفتن اجزاءکلاسیك پروتئین پلاسمائی (آلبومین ، آلفا وبتا وگاماگلوبولین‌ها) باآنچه راکه درالکترو فورز روی‌کاغذ ویا ژلوز دیده میشود فرق خواهد داشت . بدین ترتیب پدیده‌های مضاعف یعنی‌کوچ‌کردن وپالایش سبب میشودکه یك‌گروه‌گلوبولینی‌کـه دارای قابلیت تحرك یکسانی هستند بوسیله ژل نشاسته بتعداد، اجزاء مشکله تقسیم‌گردیده ودرخاتمه آزمایش به نسبت درشتی مولکولهایشان درنقاط مخصوص مستقرگردند (5 و 7)

روش ولوازم‌کار :

الف ـ مولد برق معمولا دستگاه یکسوکننده جریان (۱۳) را طوری انتخاب میکنندکه حداکثر بتواند جریان مداومی با ۳۰۰ ولت و۳۰ میلی‌آمپرتولید وبعلاوه ورود جریان شهر را به دستگاه تنظیم نماید.البته تمام مولدهائیکه بتوانند جریانی باشدت ۱۵ میلی آمپر و۱۵۰ ولت تولید نمایند برای آزمایش‌کافی خواهد بود .

ب ـ دستگاه الکترو فورز معمولا دستگاه‌کلاسیك برای الکتروفورز روی‌کاغذ (نوع‌الفور (۱۴) ویا دستگاه ایمونو ـ الکترو فورز (نوع‌گرابار ـ ژوآن(۱۵) ویا بالاخره دستگاههائی که میتوان چند نوع آزمایش را باآن انجام داد (نوع ژی .گرولاد (۱۶) بکار میبرند .

ج ـ قالب ژل ـ نمونه‌های چندی ساخته‌اندکه ابعاد آنها برحسب کاربستهای مختلف محاسبه شده‌است دراینجا تنها بشرح دونمونه ازقالب ژل‌که مورد استعمال زیادی دارند اکتفا میشود.

۱ ـ قالب ساده‌که‌تنها برای تجزیه ۲ نمونه سرم ساخته شده وعبارت از مخزن پلاستیکی است‌که از سه قطعه‌که هریك بضخامت ۳ میلیمتر میباشند تشکیل شده است در قطعه روئی یا در پوش قالب سوراخهائی تعبیه شده است‌که محل دخول پلهای ارتباطی است .

۲ ـ قالب استاندار C. F که از جنس پلکسی‌گلاس (۱۷) (یکنوع رزین صناعی شفاف که بعنوان شیشه نشکن بکار میرود) بوده ودارای درپوش وناودانی است‌که میتوان ژل را عرضاً بدوقسمت نمود .

13– Redresseur. 14– Elphor. 15– Grabar–Jouan.
16– J. Groulade. 17– Plexiglass.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

د ــ پلهای ارتباطی ــ برای مــرتبط ساختن قالب حاوی ژل به مخازن الکترو فورز بسته بنوع قالب اجسام زیر را بکار میبرند :

۱ــ درمورد قالب نوع اول نوارهائی ازکاغذ صافی راکه بابعاد ۱۰ در ۱۲۰ سانتیمتر است طوری مانند اکوردئون ۱۲ بار تامیکنندکه بطول ۱۰ وعرض یکسانتیمتر درآید .

۲ــ برای قالب استاندار C.F پلهای ارتباطی را ازیك ورقه کاغذ ضخیم مانند نوع مخصوصی (۱۸) از صافی آمیانت (۱۹) انتخاب مینماید (5).

مواد مورد لزوم :

الف ــ تامپون برای مخازن الکترو فورز (تامپون I) عبارت از تامپون برات باغلظت مولکولی (۲۰) ۳ ٪ و PH ۸٫۴ میباشدکه آنــرا بدینسان تهیه میکنند : ۱۸/۶ گرم اسید بوریك را در مقداری آب مقطر حل کرده ۶۰ سانتیمتر مکعب از سود نرمال بآن افزوده سپس حجم آنرا باآب مقطر بیك لیتر میرسانند.

ب ــ تامپون برای ساختن ژل نشاسته (تامپون II) عبارت از تــامپون بــراته است کــه غلظت آن بسته بمیزان نشاسته ایکه بکاربرده میشود فرق مینماید. معمولا غلظت مولکولی آن ۰٫۰۳ و PH آن ۸٫۹ میباشدآنرا بدین ترتیب تهیه مینمایندکه ۱٫۸۶ گــرم اسید بــوریك را در کمی آب مقطر حل کرده و ۱۲ سانتیمتر مکعب سود نرمال بآن افزوده سپس حجم آنراباآب مقطر بیك لیتر میرسانند.

ج ــ مواد رنگ کننده (۲۱)

۱ــ رنگ کننده در محیط الکل و اسید استیك که بفرمول زیر میباشد؛ آمید و شوارتز (۲۲) ۱۰ گرم و متانول (الکل متیلیك) ۵۰۰ سانتیمتر مکعب آب مقطر ۵۰۰ سانتیمتر مکعب اسید استیك گلاسیال ۱۰۰ سانتیمتر مکعب.

محلول رنگ بر (۲۳) که دارای فرمول زیر است : متانول یك حجم آب مقطر ۵ حجم و اسید استیك یك حجم.

۲ــ رنگ کننده درمحیط آب واسید استیك : برای الکترو فورز روی ژل نشاسته میتوان رنگ کننده‌های مائی راکه برای الکترو فورز روی ژلوزاستعمال میشوند بکار برد . برای اینکار محلول یك گرم در لیتر از مواد رنگ کننده پروتئین (مانندآمید و شوارتز B ۱۰ و یا سبز لومیر (۲۴) را در حلال زیر (استات دوسدیم ۶٫۸ گرم اسید استیك ۳۰ سانتیمتر مکعــب و

18_ Cofram Mab C3. 19_ Amiante. 20_ Molaritè.
21_ Colorants. 22_ Amidoshwartz. 23_ Solvant de Dècoloration. 24_ Vert Lumiàre.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

آب مقطر مقدارکافی برای یك لیتر تهیه مینمایند . زدودن رنگ زمینه ژل را با آب استیك ۵ در صد انجام میدهند.

د ـ نشاسته هیدرو لیز یافته (۲۵) میتوان آنرا از نشاسته سیب زمینی بدست آورد ولی چون هیدرو لیز آن عمل دقیقی میباشد بهتر است نشاسته هیدرو لیز یافته ایرا که باین منظوردر بازار باسامی مختلف (۲۶) موجود است بکار برد مقدار نشاسته و غلظت آن و غلظت مولکولی مناسب تامپون روی بر چسب شیشه نشاسته قید شده است (5).

۱ ـ ساختن ژل نشاسته

الف ـ دوپل کاغذی از کوفرام (۲۷) راکه بابعاد ۸ در ۸ سانتیمتر بریده اند در تامپون I (دارای غلظت مولکولی ۳ ٪) تر نموده وآنرا پیش از ریختن ژل درقالب استاندار قرار میدهند در صورتیکه قالب نوع اول را بکار برند انجام این مرحله از آزمایش موردی نخواهد داشت.

ب ـ در یك ارلن میربکنجایش ۵۰۰ سانتیمتر مکعب مقادیر لازم از نشاسته وتامپون II را میریزند (این مقدارکه برای پرکردن یك قالب استاندارکافی است روی برچسب شیشه نشاسته برای ۱۵۰ سانتیمترحجم کلی از تامپونII قید شده است و در صورتیکه قالب اولی رابکار برند۱۵ گرم نشاسته و ۱۰۰ سانتیمترمکعب تامپون IIکافی خواهد بود).

ارلن میررا حداقل مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکانهای دورانی میدهند تا اینکه سوسپانسیون یکنواختی از نشاسته و تامپون بدست آید سپس ارلن میررا مستقیماً روی شعله گازگرفته وبدون اینکه تکانهای دورانی را متوقف سازندآنرا حرارت میدهند (البته اینکار را ممکنست بوسیله آزیتاتور الکتریکی نیز انجام داد) پس از چند لحظه سوسپانسیون بصورت یکپارچه در می آید ولی حرارت را تا آغاز جوشش سوسپانسیون در حالیکه حرکات دورانی ادامه دارد دنبال می کنیم. در ابتدای جوشش توده یکپارچه نشاسته دوباره مایع گشته وحبابهای هوا درآن ظاهر میگردد در اینموقع حرارت را قطع و دهانه ارلن میررا به خرطوم تخلیه (۲۸) مربوط میسازند تا با ایجاد خلاء حبابهای موجود در ژل را خارج سازد . پس از چند لحظه دیده میشودکه از تعداد حبابهای هواکاسته میشود در این هنگام خرطوم تخلیه را برمیدارند اینکار سبب میشود که در ارلن میر فشار شدید و ناگهانی ایجاد شده و سبب ترکیدن حبابهای هوا که بسطح ژل

25_ Starch-Hydrolysed.

26_ Connaught Medical Research Laboratories. Toronto Canda. Bender et Hobein Laboratoriums Gerate Arzneim H.D. München.

27_ Cofram. 28_ Tromipe à Vide.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

آمده‌اند گردد بدین ترتیب مخلوط نیمه شفافی (۲۹) بدست می‌آید که آنرا در قالبهای مربوطه میریزند.

(لازم بتذکار نیست که باید قالبها را پیش از ریختن ژل با روغنهای خنثی مانند پارافین مایع چرب نمود) سپس روی در پوش قالب چند وزنه سنگین قرار میدهند و آنرا مدت ۶ ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار میدهند تا ژل سرد شده و یکپارچه گردد و بکار آزمایش آید.

نکته مهم که باید بآن توجه داشت اینستکه همواره ژل نشاسته را باید تحت یك شرایط (درظرف یك شکل و یك اندازه در یك مدت زمان معین و غیره ....) تهیه نمود (8 و 5).

۲ـ گذاردن سرم مورد آزمایش : بچند صورت ممکنست انجام شود:

الف ـ روش کاغذ : یك قطعه کاغذ مخصوص (۳۰) را که ابعاد ۶ر۱ در ۶ /. سانتیمتر بریده‌اند با ۰۳ر۰ سانتیمتر مکعب سرم آغشته مینمایند و آنرا در شکاف عرضی که بوسیله تیغ صورت تراشی در ژل داده‌اند قرار میدهند.

ب ـ در ۶ سانتیمتری یکی از دو سر قالب (سمت قطب منفی) بکمك منگنه فلزی مخصوص و یا بوسیله تیغ صورت تراشی دو حفره بطول ۲۵ و ضخامت ۲ میلیمتر در ژل ایجاد کرده و سپس آنها را با یکی از ترکیبات زیر پر مینمایند:

ـ مخلوط خمیر مانندی که از امتزاج سرم مورد آزمایش با نشاسته هیدرولیز یافته بدست میآورند بدین ترتیب که در یك شیشه ساعت (۳۱) ۳ /. الی ۴ /. سرم مورد آزمایش و مقدار کافی تامپون برات و نشاسته برای بدست آوردن خمیر نسبتاً مایعی میریزند.

ـ یا اینکه مخلوط ژله مانندی را بترتیب زیر تهیه مینمایند : در یك بشر کوچك ۵ر۱ گرم نشاسته محلول (ساخت کارخانه مرگ (۳۲) را با ۵ سانتیمتر مکعب تامپون II مخلوط کرده و آنرا تا نزدیك جوشش حرارت میدهند سپس میگذارند که درحرارت ۵۰ درجه سرد گردد و بالاخره یك حجم از آنرا با هم حجم خود از سرم مورد آزمایش ممزوج مینمایند بدین ترتیب غلظت نشاسته در این مخلوط برابر ۵ر۱ در صد یعنی تقریباً معادل غلظت ژل نشاسته برای الکترو فورز خواهد بود پس از پر کردن حفره‌ها برای جلوگیری از تبخیر ژل نشاسته را از یك صفحه پلکسی گلاس می پوشانند . در این هنگام ژل آماده برای آزمایش خواهد بود (7 و 5).

الکتروفورز ـ قالب حاوی ژل را بین دو مخزن دستگاه طوری قرار میدهیم که حفره حاوی سرم مورد آزمایش در سمت قطب منفی قرار گیرد سپس اختلاف پتانسیلی بمقیاس ٤ ولت برای

29_ Translucide.
30_ Arches. 31_ Verre de Montre 32_ Merck.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

هر سانتیمتر از طول ژل بین دو قطب الکتریکی تعیین مینمایند.
مدت آزمایش ۱۶ ساعت خواهد بود (5).

ثابت کردن ، بریدن ژل و رنگ آمیزی ـ همینکه الکتروفورز پایان یافت ژل نشاسته را از قالب خارج نموده وآنرا مدت ۳۰ دقیقه درآب استیك ۵ در صد ثابت مینمایند این امرسبب میشودکه از تردی و شکنندگی ژل کاسته گردد سپس بکمك دستگاه مخصوصی کـه کناره آن ۳ میلیمتر ارتفاع دارد و بکمك سیم فولادی مانند سیم ویولون ژل را از عرض بدو ورقه بضخامت ۳ میلیمتر برش میدهند. سپس سطوح این قطعات را مدت یك دقیقه درمخلوط آمید وشوآرتز، الکل و اسید استیك رنگ نموده وآنرا با محلول متانول، آب و اسید استیك چند بار متوالی شستشو میدهند، در عرض ۲ الی ۳ ساعت پروتئین‌ها بصورت لکه‌هائی برنگ آبی تیره در یك زمینه آبی فوق العاده کمرنگ پدیدار خواهند شد (5).

تفسیر الکتروفورگرام (۳۳) همانگونه که قبلا شرح داده شد طرز تقسیم و پخش شدن اجزاء مشکله یك پروتئین در الکتروفورز روی نشاسته باآنچه راکه در روی کاغذ بدست می‌آید تفاوت دارد روی این اصل بتا ـ ۱ ـ گلوبولین‌ها (۳٤) (دارای وزن مولکولی ۱۵۰۰۰۰) از محل قرارگرفتن بتالیپوپروتئین‌ها (۳۵) (دارای وزن مولکولی ۱۵۰۰۰۰۰) چندین سانتیمتر فاصله دارند آلفا ـ ۲ ـ گلوبولینها (۳۶) نیز بدو قسمت تقسیم شده است :

۱ ـ یك نوار آلفا ۲ ـ سریع (۳۷) که حاوی هاپتوگلوبین I (۳۸) و سرولوپلاسمین (۳۹) میباشد.

۲ ـ یك نوار آلفا ـ ۲ کند (٤۰) که شامل آلفا ـ ۲ ـ ماکروگلوبولین با وزن مولکولی ۹۰۰۰۰۰ است.

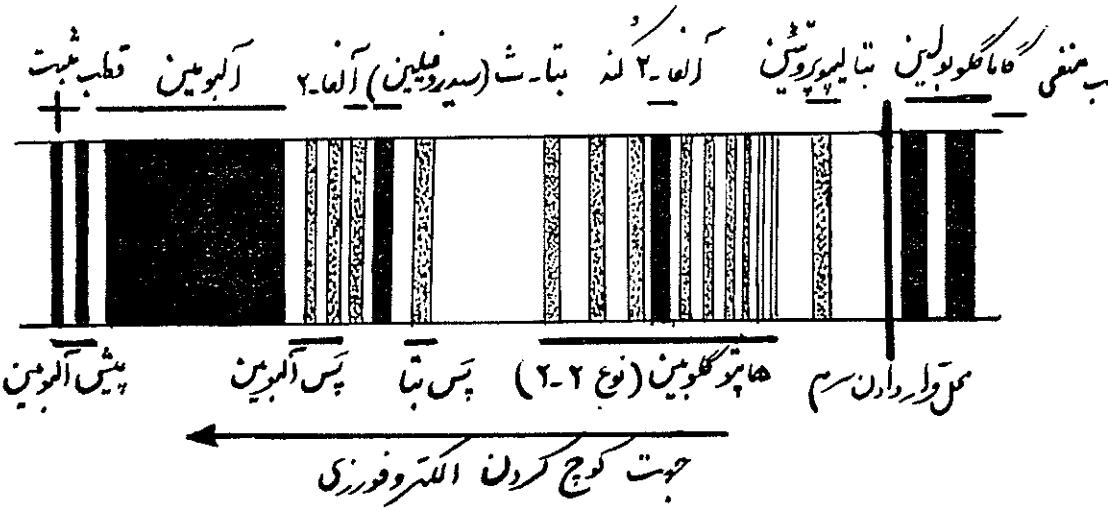
بالاخره یك سلسله نوارهای بینابینی که بین بتاوآلفا ـ ۲ ـ کند قرار دارند وعبارت از هاپتوگلوبین‌های II با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰۰ هزار میباشند.

در شکل (۱) اگر از قطب مثبت بسمت قطب منفی بنگریم بترتیب مناطق زیر رامشاهده خواهیم نمود :

ـ یك منطقه بنام پیش آلبومین (٤۱) که شامل ۲ و بندرت سه نوار میباشد پیش آلبومین‌ها سرشار از تریپتوفان (۴۲) بوده و ازاینرو قدرت تحرك سریعتری دارند نواریکه نزدیك منطقه آلبومین قرار دارد عبارت از اوروزوموکوئید (۴۳) میباشد.

33. Électrophorégramme. 34_ β_1 Globuline 35_ β Lipoproteines.
36_ α_2 Globuline 37_ Fast Alpha-2 38_ Haptoglobine :
39_ Cèruloplasmine. 40_ Slaw-Alphar. 41_ Prè-Albumine
42_Tryptophane. 43_ Orosomucoide.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]



آلبومین‌ها : در صورتیکه تامپون برات بکار برده باشند بصورت نوار بسیار گسترده‌ای دیده میشود و در صورتیکه تامپون تری سیترات پولیك (۴۴) بکار برند (به‌گروه ترانسفرین‌یا سیدروفیلین (۴۵) مراجعه شود) این نوارکاملا یکنواخت خواهدگردید

منطقه پس‌آلبومین (۴۶)که از دو قسمت تشکیل شده ،آنکه نزدیك منطقه‌آلبومین قرار دارد آلفا-۱-گلیکوپروتئین (۴۷) میباشد.

یك نوار آلفا - ۲ - گلوبولین یا - ۲ سریع که شامل هاپتوگلوبین I وسرولوپلاسمین است.

یك یادو نوار بنام بتا-۱ (سید روفیلین یا ترانسفرین)که تعداد ووضع آنها مشخص گروههای ترانسفرین است.

یك نوار بنام پس‌بتاگلوبولین‌که از دسته بتاگلوبولین‌ها است.

یك سلسله نوار بتعداد ۴ یا ۵ عددکه از دسته هاپتوگلوبین II است (در اشخاصی‌که مربوط بگروههای ۲-۲ و ۲-۱ میباشند).

یك نوار بسیار تیره رنگ‌که عبارت ازآلفا -۲ کندکه نام دیگر آن ماکروگلوبولین شولتز (۴۸) میباشد.

44- Poulik. 45- Transferrine ou Siderophiline. 46- Post-Albumine. 47- Alpha -1- Glycoprotèine. 48 - Macroglobuline de Schultze.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

یك نوار بتالیپوپروتئین.

محل گذاردن سرم (۴۹).

بالاخره در سمت قطب منفی ناحیه گاما گلوبولین‌ها واقع شده که شامل دو نوار میباشد (1 و 2 و 5 و 6 و 7).

کاربستهای الکتروفورز روی‌ژل‌نشاسته :

۱ــ تشخیص گروههای سرمی (۵۰) :گروههای سرمی بمجموعه‌ای از انواع سرم اطلاق میشود که از نقطه نظر انتقال‌ارثی یك پروتئین بخصوص با یکدیگر تفاوت‌دارند. درحال‌حاضر سه دسته ازآنها را می‌شناسند؛

الف‌ــ گروه سرمی هاپتوگلوبین.

ب‌ــ گروه سرمی سیدروفیلین یا ترانسفرین . این دو دسته ازگروههای سرمی‌را بوسیله قدرت تحرك الکترو فورزی شناخته‌اند.

ج‌ــ گروه گاما گلوبولین (۵۱) که بوسیله روشهای سرم شناسی شناخته شده است.

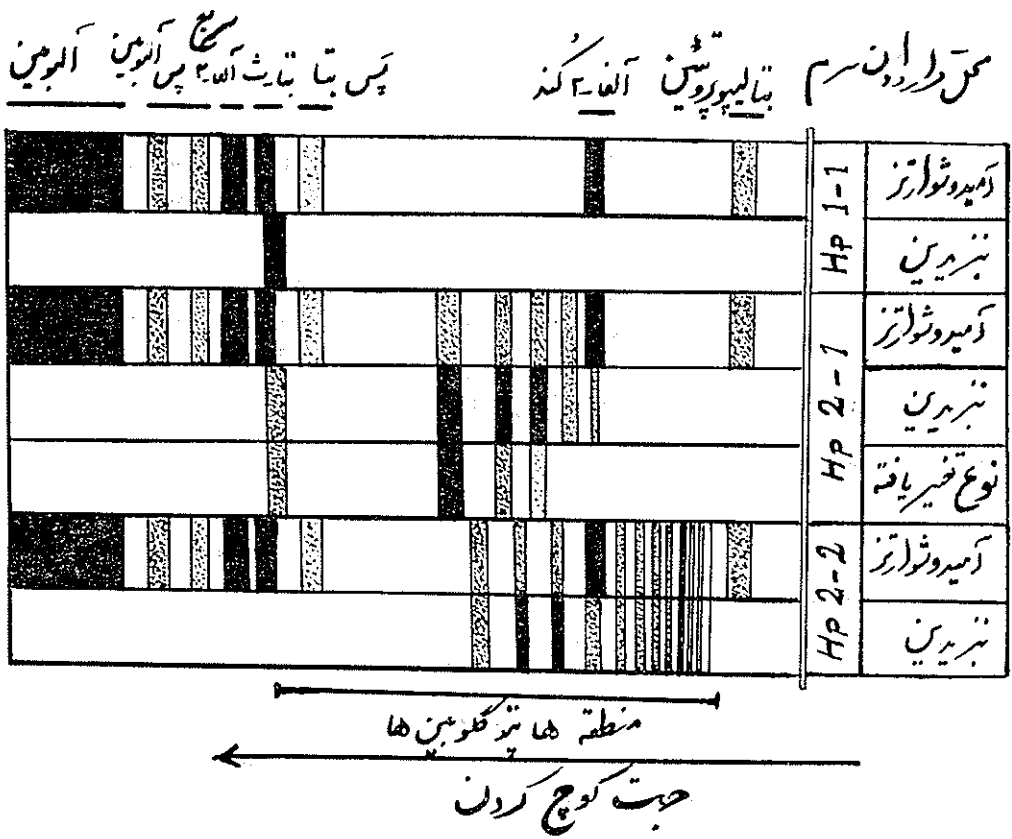
در اینجا نظر باهمیتی که این سه دسته گروههای سرمی در توارث (۵۲) و انسان شناسی (۵۳) دارا بوده وامکانات تازه‌ای را برای مطالعات دراین‌رشته از علوم بازنموده‌اند بی‌مناسبت نیست اندکی بشرح آنها پرداخته شود (5 و 6 و 10).

الف‌ــ گروههای‌هاپتوگلوبین: اولین شاهد و مثال برای سیستم گروههای سرمی است که درآن اختلاف و تفاوت بین افراد بشر مربوط‌به پروتئین‌های سرمی‌آنها میباشد این‌اختلاف بطور ارثی منتقل گشته و در اثر وجود دوژن آللومرف (۵۴) که ــ اواسمی تیز(۵۵) و فورد واکر (۵۶) در ۱۹۵۵ آنها را بصورت hp1 و hp2 فرض نموده‌اند میباشدکه پیوندآنها با یکدیگر سه نوع ژنوتیپ (۵۷) بشرح زیر ایجاد میکند؛ تیپ Hp1-1 که ژنو تیپ آن hP1،hp1 است تیپ HP2-2 که ژنو تیپ‌آن hp2،hp2 میباشد و بالاخره تیپ Hp2-1 که ژنو تیپ‌آن hp2،hp1 میباشد (شکل ۲)

هاپتوگلوبین‌های Hp2،Hp1 عبارت ازگلیکوپروتئین‌هائی هستند از دسته‌آلفا ـ۲ـ گلوبولین‌ها که‌درزمره پروتئین‌های‌اسیدپلاسمابوده وحاوی ۳۰درصدگلوسیدمیباشند.هاپتوگلوبین با هموگلوبین ترکیب شده و ایجاد ترکیب با ثباتی مینماید.

49ــ Dépot Du Sérum. 50ــ Groupes Sanguins Sèriques.
51ــ Gamma-Globuline. 52ــ Gènètique. 53ــ Anthropologie.
54ــ Fànes Allelomorphes. 55ــ O. Smithies. 56ــ N. Ford walker.
57ــ Genotype.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]



هاپتوگلوبین I عبارت از پروتئین همکن (۵۸) با وزن مولکولی در حدود ۱۰۰ هزار میباشد در صورتیکه هاپتوگلوبین II ناهمکن (۵۹) بوده و درحقیقت میتوان آنرا پلی‌مری (۶۰) از نوع اول دانست زیراترکیب‌شیمیائی آنها مشابه میباشد. یکی‌بودن‌خاصیت آنتی‌ژنی هاپتوگلوبین‌ها این نکته را ثابت میکندکه اختلافاتشان مربوط بساختمان مولکولی آنها است و این موضوع گروههای سرمی را ازگروههای خونی‌کاملا جدا میسازد زیرا در سیستم گروههای خونی اختلافات ایمونولوژیکی وجود دارد.

سه نوع‌گروه هاپتوگلوبین را میتوان با رنگ‌آمیزی بوسیله‌آمید و شوارتز بشرح زیر

58– Homogéne. 59– Hétérogéne 60– Polymére

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

از یکدیگر تشخیص دارد.

تیپ Hp 1 ــ 1 بوسیله یك نوار منفرد (آلفا ـ ۲ سریع) مشخص میشود و مجموعه آن در ناحیه بتاگلوبولین‌ها قرار دارد.

در تیپ Hp 2ــ2 این نوار وجود نداشته ولی‌هاپتوگلوبین بوسیله ۳ الی ٤ نوار که بین آلفا ـ۲ کند و بتاگلوبولین‌ها قرار دارند مشخص میگردد.

ـبالاخره در تیپ HP 2 ــ 1 نوارهای مربوط به HP 1 ـ 1 و HP 2 ـ 2 باهم دیده میشود که‌اندکی‌بیشتر بسمت قطب مثبت گرائیده‌اند (شکل ۲)در صورتیکه‌قبلاسرم را باهموگلوبین مخلوط کرده باشند تشخیص گروه‌ها پتوگلوبین آسانترخواهدشدزیرا همانطوریکه قبلاگذشت هاپتوگلوبین‌با هموگلوبین‌ایجاد ترکیب باثباتی مینماید که واجد خواص‌پراکسیدازی (۶۱) بوده و بسهولت‌آنرا میتوان بوسیله بنزیدین (۶۲) شناخت.

روش‌آزمایش: الکترو فورزرا روی سرمی‌که بآن هموگلوبین افزوده‌اند انجام میدهند (هموگلوبین M/ ۲۰۰۰ رابنسبت $\frac{۲}{۱۰}$ حجم سرم باآن مخلوط‌مینمایند)پس از انجام‌آزمایش و بریدن ژل و ثابت‌کردن‌آن درآب استیك ۵ در صد مجموعه‌هاپتوگلوبین را با معرفهای زیر نمودار میسازند:

ـمعرف A که بفرمول زیر میباشد : متانول ۳۵۰ سانتیمتر مکعب بنزیدین ۰/۵ گرم تامپون استات‌ــاسید استیك‌با PH ۶ر٤ پنجاه سانتیمتر مکعب وآب مقطر مقدارکافی برای پانصدسانتی‌متر مکعب .

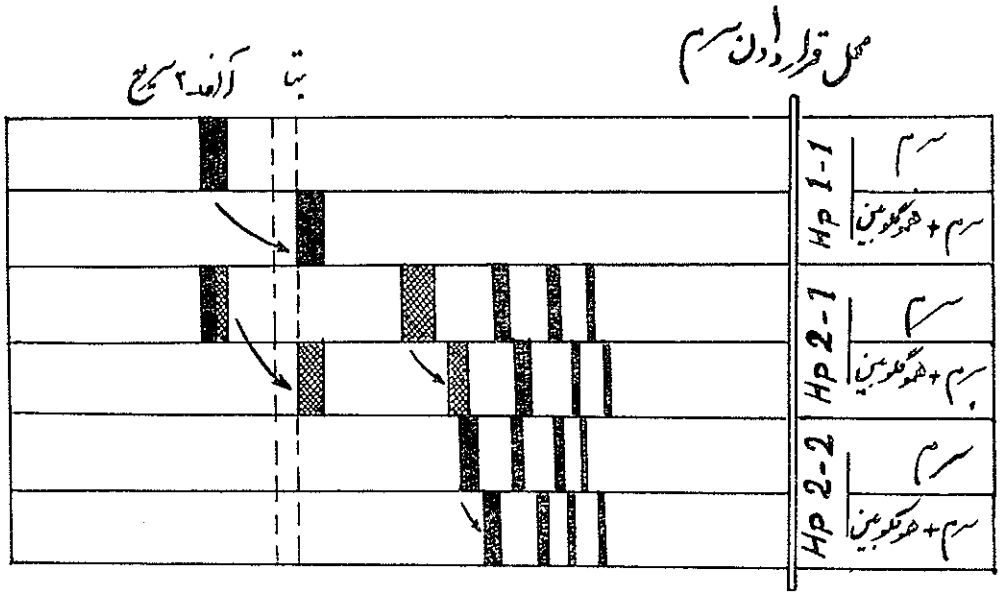
معرف B که عبارت ازآب اکسیژنه۲۰ حجمی میباشد . قطعات ژل‌را مدت ۱۵ دقیقه درمخلوطی‌که درهمان هنگام با ۱۸۰ سانتیمتر مکعب معرف A و ۲۰ سانتیمتر مکعب معرف B ساخته‌اند قرار داده سپس باآب استیك ۵ درصد شستشو مینمایند.

این روش را بطریق ساده‌تری نیز میتوان انجام داد باین معنی‌که قلم موئی را به‌محلول زیرکه همان موقع میسازند آغشته نموده روی ژل میمالند یك قرص بنزیدین بی‌اکسید دوباریم (ساخت‌کارخانه مرك) را با ۵ سانتیمتر مکعب اسید استیك‌گلاسیال و۵ سانتیمتر مکعب‌آب مقطر مخلوط میسازند بااین روش مجموعه‌هاپتوگلوبین ــ هموگلوبین بصورت نوارهائی برنگ آبی درزمینه سفید ظاهر میشود (شکل ۳).

تعیین‌گروههای هاپتوگلوبین دربرخی افراد (بخصوص درنژاد سیاه ویاکودکان‌کمتراز ٤ ماه بعلت عدم‌کفایت مقداراین پروتئین مشکل میباشد).اخیراً انواع دیگری ازاینسته‌گروههای سرمی را متمایز ساخته‌اند مانند نوع Hp 2ـ1 تغییر یافته (۶۳)که بسیار نادر است(شکل۲)

61ـ Peroxydase. 62ـ Bensidine 63ـ Modifié

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]



ودیگر نوع جانس(۶۴) ونوع Hpcα که بسیار استثنائی میباشند وفورژن Hp1 برطبق‌مطالعه درملل مختلف بقرار زیر است :

دراروپائیها ٤٠ درصد درآفریقائیها ۷۰ درصد وکمتر از ۳۰ درصد درآسیائیها است. وفورگروههای‌هاپتوگلوبین در۱۹۰۰مورد که درشمال شرقی فرانسه مورد مطالعه قرارگرفته‌ارقام زیر را نشان میدهد: Hp1—1 ۳۶ر۱۸درصد، Hp 2—1 ۵۲ر٤۸درصد و Hp 2—2 ۱۰ر۳۳ درصد (10،6،5،3) .

ب-گروههای ترانسفرین : نمودارایندسته ازگروههای سرمی‌که در ۱۹۵۹ کشف شده است تغییرات‌گلوبولینهای بتا -۱ (سید روفیلین یاترانسفرین) میباشد . برای تعیین و تشخیص ایندسته ازگروههای سرمی الکترو فورز را روی ژل نشاسته بروش عمودی ویابطریق قبلی ولی بصورت زیر انجام میدهند :

درقالبها تامپون برات‌کلاسیك‌باغلظت مولکولی۳ر. میریزند درحالیکه ژل را باتامپون بفرمول زیرکه PH آن ۸ر۶۵ میباشد میسازند . تری هیدروکسی متیل - آمینومتان (۶۵) با غلظت مولکولی ۰۷۶ر. واسید سیتریك باغلظت مولکولی ۰۰۵ر. دراکثر سرمهای مورد مطالعه

64– Johnson.

65– Tris Hydroxyméthyl–Amiuo Methane.

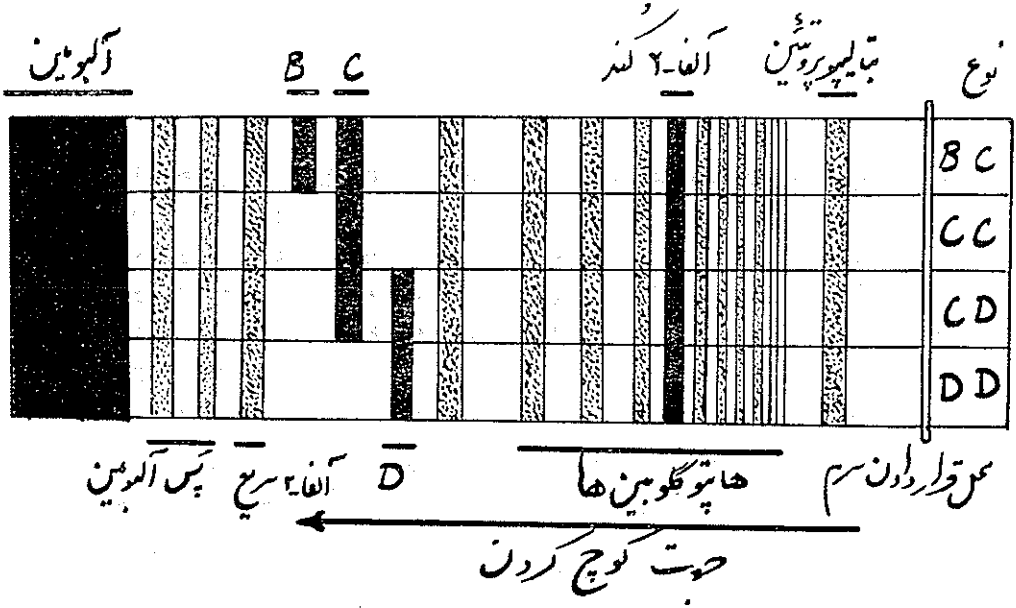
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

نواربتاتاکنون‌یکی بوده واسمی نیزآنرا باعلامت بتا ـ C مشخص‌کرده است دربرخی دیگر دو نوار بشرح زیر دیده میشوند .

۱ـ درسرم برخی اشخاص از نژاد سفید علاوه بـرنوار بتا ـ C یك نوار بسیار سریع که بتاـ B نامیده میشود مشاهده میگردد این‌نوار مضاعف را بندرت(دریك الی۲ درصد موارد) میتوان دید .

۲ـ درسرم برخی افراد افریقائی واسترالیائی نوار بتا ـ C معمولی را همراه با یك نوار بسیارکندکه بتا ـ D نامیده میشود مشاهده‌کرده‌اند دیدن این نوار مضاعف نیز نادر است (تقریبا در ۱۰ درصد افراد استرالیائی و۲ تا ۳ درصد سیاهان افریقائی) .

نوار بتا ـ D ممکنست بتنهائی دیده شود بعلاوه خـود نوارهای بتا ـ C وبتا ـ D نیز ممکنست تغییراتی از نقطـه نظر سرعت جابجا شدن نشان دهند دراکثر اوقات هنگامیکه نوارهای BوD وجود دارند نوار C نیز بهمان اندازه آنها مـوجود میباشد . نوارهای مزبور



نمودارگروههای ترانسفرین میباشند (شکل ۴)وتوارث دراینده‌سته ازگروههای سرمی‌تابع سه ژن آللومرف Tfd,Tfc,Tfb میباشد . پیدایش‌گروههای فرعی (۶۶) D,B این دسته از

66_ Sous groupes

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

گروههای سرمی را پیچیده‌تر ساخته است (10, 5, 1).

ج ـ گروههای گاماگلوبولینـ هما نطوریکه‌قبلا گذشت ایندسته‌از گروههای سرمی راتنها بوسیله آزمایشهای سرم شناسی میتوان شناخت اولین‌فاکتور ایندسته‌از گروههای سرمی‌که سیستم G.m نامیده میشود در۱۹۵۶ توسط گراب(۶۷) کشف وعامل (G.m (a نامیده شد نامبرده مشاهده نمودکه سرم برخی از مبتلایان به‌پلی‌آرتریت مزمن پیشرونده (۶۸)قادراست‌گلبولهای قرمز Rh مثبت راکه از نوعی آنتی‌کورناکامل (۶۹) آنتی Rh پوشیده شده‌اندآگلوتینه نماید درواقع اینگونه سرمهای‌آنتی Rh عامل (G.m (a را بهمراه داردکه روی‌گلبول‌ثابت میشود وبکمك آن میتوان سرم آنتی (G.m (a را جستجونمود ۵۰ تا ۶۰ درصد اروپائیها ۹۶٫٤ درصد اسکیموها (۷۰) و۱۰۰ درصد افراد سنگالی(۷۱) G·m(a) مثبت هستند یعنی‌سرمشان قادر است ایجاد وقفه درآگلوتیناسیون‌نماید .هاروب (۷۲) در۱۹۵۹ فاکتور دیگری ازایندسته را بنام G m (b) شرح ونشان داده‌که ۸۱٫۵درصد اروپائیها G.m (b) مثبت میباشند . تعداد دیگری از انواع ایندسته ازگروههای سرمی مانند G.m (x) که اکثرا همراه با G.m (a) است وفاکتور G.m (Like) را درنژادهای سیاه وفاکتور .Inv راکه اندکی بانوع قبلی‌تفاوت دارد وتوسط روپارتز (۷۳)کشف شده تاکنون شناخته‌اند .

سرمهای آنتی G.m را نزد ۲۵ الی ۴۰ درصد مبتلایان به پلی ارتریت‌مزمن ونیزدر مسلولین وگاهی درافراد سالم یافته‌اندکه اگر چه عیار آن ضعیف است ولـی بسیار اختصاصی میباشد (10) .

۲ کاربستهای الکتروفورز روی‌ژل نشاسته‌درزیست شناسی‌بالینی:هرچندکه هنوز نتوانسته تغییرات‌کمی (۷۴) پروتئین‌ها را درموارد مرضی بااین روش بنحو مطلوب آزمایش نمایند بـا اینحال بکمك این روش توانسته‌اند اطلاعاتی درخصوص اندازه مولکول شبه پروتئین‌های(۷۵) سرم بدست آورده وماهیت آنها را از دسته ماکروگلوبولین‌ها معلوم نمایند .

میدانیم‌که درسرم‌مبتلایان به‌میلوم متعدد یا بیماری‌کاهلی(۷۶) ونیزدرماکروگلوبولینمی والدنشتروم (۷۷) شبه پروتئین‌های مهمی دیـده میشود . پیش ازکشف این آزمایش نتوانسته

67– Grub 68– Polyarthrite Chronique Evolutive.

69– A. Incomplet. 70– les Esquimaux

71– Sénégale. 72– Harobe.

73– Ropartz. 74– Quantitative. 75– Paraprotéine .

76– Myélome multiple ou maladie de kahler.

77– Macroglobulinemie de waldenstrom,

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

بودند ماهیت این شبه پروتئین‌ها وتفاوتهای آنهـا را بوسیله الکتروفورز روی‌کاغذ معلوم دارند زیرا هردو بیماری تصویر الکتروفورزی یکسانیرا نشان میدهد باین معنی‌که یك منحنی نوك‌تیز باندازه منحنی‌آلبومین درمنطقه بتا یاآلفاگلوبولین‌ها باقدرت جابجا شدن متغیرکه نمودارروجود یك ترکیب غیرعادی(شبه پروتئین) درسرم میباشد مشاهده میکنند درحالیکه بوسیله‌الکتروفورز روی ژل نشاسته این دونوع شبه پروتئین راکه برحسب درشتی مولکولشان خواص مختلف ازخود نشان میدهند میتوان از یکدیگر تمیز داد (4 , 5).

الف ـ شبه پروتئین‌های میلوم باخاصیت‌آنتی‌ژنی‌گاما ویا بتا۲ـA دارای وزن مولکولی کم بوده وبا این روش مانند الکتروفورز روی‌کاغذ برحسب بار الکتریکی وابعاد مولکولی‌شان درنقاط مخصوصی از ژل‌جایگزین میشوند اکثرا دیده میشودکه شبه پروتئین‌های بتا ۲ـA از ۲ یا ۳ واحدکوچك‌تر (۷۸) تشکیل یافته است .

ب ـ ماکروگلوبولین‌هاکه بعلت بالا بودن وزن مولکولی قادر به عبور از خلال ژل‌نشاسته نبوده ودرهمان محل‌گذاردن سرم بصورت لکه تیره‌ای باقی می‌مانند بنابراین تضاد بین وجـود یك لکه تیره درالکتروفورز روی‌کاغذ وفقدان آن در ژل نشاسته دلیل ماهیت ماکروگلوبولینی شبه پروتئین خواهد بود .

بطور خلاصه برای تشخیص دیس پروتئین امی‌ها(۷۹) باید بترتیب بانجام‌آزمایشهای زیرمبادرت نمـود .

۱ـ الکتروفورز روی‌کاغذکه وجود یاعدم وجود شبه پروتئین‌را درسرم نشان خواهدداد.

۲ـ تجزیه ایمونو والکتروفورزکه برای پی‌بردن‌بوجه مشترك شبه پروتئین باگلوبولین‌های‌گاما وبتاـ ۲ـA وبتا ـ ۲ـM لازمست .

۳ـ الکتروفورز روی ژل نشاسته‌که برای تشخیص‌گاما یا بتا میلوم ، ماکروگلوبولین‌ها وپروتین‌های ازنوع بنس‌جونس (۸۰) ضروری است.

٤ـ اولتراسانتریفوگاسیون(۷۱):ضریب رسوب درمیلوم بعلت زیادنبودن وزن‌مولکولی مشابه ترکیبات‌گلوبولین‌های عادی میباشد درحالیکه در ماکروگلوبولین امی بعلت زیادی وزن مولکولی ضریب‌رسوب به ۱۷ تا ۱۹ وگاهی نیز تا ۲۵ واحداسود برگ(۸۲) میرسد (4) .

78_ Sous-unité. 79_ Dysprotèinemie. 80_ Bence Jones.
81_ Ultra-centrifugation. 82_ Unité svedberg.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]

RÉFÉRENCES

1- Boulanger P. , Polonvski j. et Coll. Biochimie Médicale 6e Edit. 1961 . Masson et Cie - Edit. Paris Fascicule III Pages 741 - 756 .

2- Fine J . M . C'Électrophorése du Plasme, Fascicule XL C.N . T. S. Paris 1960 - 61 .

3- Fine J. M. et Coll . la Presse Med. 3, 14 ' 1962 .

4- Fine J. M la Presse Med . 18 , 893 - 1962

5- Fine J. M. et Moretti J. M. le Pharmacien Biologiste Tome II No 20 345 - 351 .

6- Fine J. M. Trnsfusion Tome 1, No 1, 7- 19 - 1938 .

7- Harteman L. Techniques Modernes le Laboratoire 1961 - 62 3- Edit . 1, Expansion - Editeur Paris Pages 49 - 52

8 - Jonxis J. H. P. and Huisman T. H. J. A Laboratory Manual on Abnormal Haemoglobins 1958 , Blackwell Sientific Publications Page 16 .

9- Sirjean G. Encyclopédie de Biologie Medicale 1954 Cahier 36 , Auteur - Edit. Paris .

10- Soulier J. P. la Presse Med. 8 . 408 - 1962 .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-06-03]