

الکتروفورز روی ژل نشاسته

روش نوین در مطالعه پروتئین‌ها و گروه‌های سرمی خون

نوشته: دکتر پرویز رصدی

مقدمه - بین روش‌های گوناگونی که برای شناختن پروتئین‌های پلاسما معمول می‌باشد الکتروفورز یا کوچ کردن (۱) مولکول‌های پروتئین تحت اثر میدان الکتریکی که در ۱۹۳۷ توسط تیزلیوس (۲) کشف گردیده بمنوان یکی از سودبخش‌ترین روش‌های تجزیه‌ای در شیمی اجسام درشت مولکول (۳) شناخته شده است. (6,2,1)

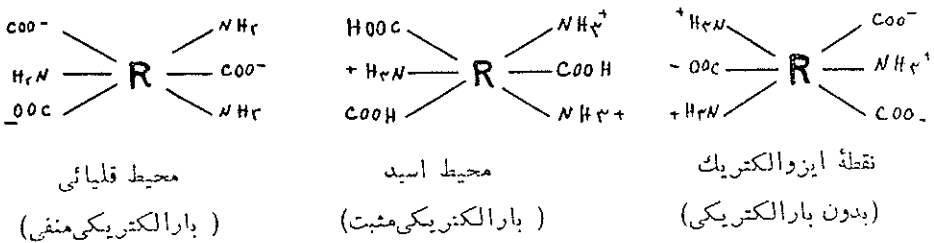
اساس - الکتروفورز عبارت از حرکت در آمدن و جا بجا شدن پروتئین‌ها در حوزه الکتریکی است، این امر از طرفی تابع درشتی مولکول، شکل مولکول و بار الکتریکی آن بوده و از طرف دیگر تابع شرایط محیط مانند PH، قدرت یونی، حرارت، و اختلاف سطح جریان الکتریکی می‌باشد. ابتدا باید دید که پروتئین‌ها چگونه و در چه شرایطی تحت اثر میدان الکتریکی جا بجا می‌گردند؟

میدانیم که پروتئین‌ها از ترکیب مولکول‌های چندی از اسیدهای آمینه که توسط پیوندهای پپتیدی بیکدیگر متصل گردیده اند حاصل می‌شود. ترکیب و اجتماع این آمینو- اسیدها بر حسب اینکه دارای عامل اسید و یا آمین آزاد باشد با آنها خاصیت آمفوتری (۴) می‌بخشد و اینگونه پروتئیدها در صورتیکه در برخی شرایط تحت اثر میدان الکتریکی قرار گیرند می‌توانند کوچ نموده و جا بجا گردند.

* Électrophorese en Gel d'Amidon .

- 1- Migration. 2- Tiselius. 3- Macromolecules
- 4- Amphotere

برای روشن شدن مطلب يك مولکول پروتیدی را در نظر میگیریم که زنجیره طویل پلی پپتیدی آن با حرف R وریشه های انتهائی آن بصورت گروعه های آزاد کاربوکسیل (COOH) و یا آمینه (NH_2) نمایانده شود این مولکول پروتیدی بر حسب اینکه در محیط اسید و یا قلیائی قرار گیرد مانند يك اسید آمینه یونیزه شده و بر حسب PH محیط میتواند مانند يك اسید و یا يك قلیائی عمل نماید .



چنانکه مشاهده میشود مولکول پروتیدی در محیط قلیائی بار منفی یافته و بسمت قطب مثبت میگراید برعکس در محیط اسید بسمت قطب منفی کوچ خواهد نمود. در حالت خاصی که بار های مثبت و منفی این مولکول متعادل میگردد مولکول از لحاظ الکتریکی خنثی بوده و تحت اثر میدان الکتریکی جا جا نخواهد گردید (نقطه ایزوالکتریك (۵) که نقطه اختصاصی و مشخص پروتئین و یا گروه پروتئینی میباشد. این نقطه بسیار نزدیک بنقطه ایزویونیک میباشد که در آن عوامل اسید و یا قلیائی يك مولکول بیک نسبت یونیزه میگردند (9).

هر اندازه که از نقطه ایزوالکتریك يك پروتئین بالاتر رویم بهمان نسبت عامل اسید آن بیشتر یونیزه گشته و بار مولکولی پروتئین بیشتر از پیش منفی میشود، در این صورت بسمت قطب مثبت خواهد گرازد. بنابراین پس از آنکه مدنی از عبور جریان الکتریکی در مخلوط پروتئین گذشت پروتئین های مختلف از یکدیگر مجرا شده و غریک بواسطه قابلیت تحرك الکتروفورزی مخصوص بخود متمایز خواهند گردید .

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

۱- الکتروفورز آزاد یا مرزی (۶) هر چند این روش طریقه خوبی برای تجزیه و تحلیل مواد مشکله يك مجموعه پروتئینی است با اینحال مشکلات چندی را دارا میباشد .

5- Point isoelectrique.

6- E. Libre du E. de Frontières.

برخی از این مشکلات صرفاً جنبه عملی دارند چنانکه گرانی بهای دستگاه آزمایش، مقدار سرم مورد لزوم و مدت نسبتاً طولانی که باید صرف آزمایش شود موارد استعمال این روش را در آزمایشهای معمولی محدود میسازند.

مشکل دیگری آنکه چون این آزمایش بر اساس ضریب انکسار نورگونگون گذارده شده است بوسیله آن نمیتوان اجزاء متشکله برخی از ترکیبات متعدد سرم مانند مجموعه های لیپیدی - گلوئیدی و متالو - پروتئین (۷) را تشخیص داد (۶)

۲- الکتروفورز منطقه‌ای (۸): نظر باینکه جایجا شدن مولکولهای پروتئین در محیط مایع کاملاً بطور مستقیم صورت نمیگیرد برای انجام آزمایش جسم جامدی را انتخاب نموده اند که مایع از خلال آن بتواند جریان پیدا کند. یکی از این اجسام که به علت واجد بودن دستگاه موئینه (۹) مورد استعمال بسیار در کاغذ است چنانکه امروزه در دنیا نتایج عالی الکتروفورز روی کاغذ را چه در کارهای وابسته بزیست شناسی بالینی وجه در پژوهشهای شیمی، فیزیولوژی و یاصنعتی بخوبی می شناسند.

تقریباً همزمان با کشف الکتروفورز روی کاغذ گوردون (۱۰) در ۱۹۵۰ زل زلوز را بجای کاغذ برای این آزمایش انتخاب نمود و با این ابداع پیشرفت بزرگی را در الکتروفورز آغاز و راهی را برای پژوهشهای نوین (ایمونو - الکتروفورز (۱۱) باز نمود (۶ و ۲).

زلوز مزیت بزرگی نسبت بکاغذ دارد و آن اینستکه هر چند که بظاهر جسم جامدی بنظر میرسد ولی نظر باینکه ۹۸ درصد آنرا مایع تشکیل میدهد میتوان الکتروفورز منطقه‌ای را در شرایط تجربی مشابه با آنچه را که تیزلیوس پیشنهاد نموده انجام داد.

بالاخره در ۱۹۵۵ برای اولین بار اسمی تیز (۱۲) الکتروفورز روی زل نشاسته را پیشنهاد و از این تاریخ ببعد در این روش بسبب کاربردهای مخصوص آن تغییر و تکامل حاصل شده است. بزرگترین فایده این روش تجزیه و تحلیل پروتئین های پلاسمائی بوده و امروز تنها روشی است که بوسیله آن توانسته اند، ۲۴ نوع پروتئین را در پلازما مشخص سازند در حالیکه بروشهای قبلی (الکتروفورز آزاد و یا الکتروفورز منطقه‌ای روی کاغذ، زلوز و استات سلولوز) بیش از ۵ الی ۶ نوع پروتئین را نمیتوان متمایز ساخت.

بکار بردن زل نشاسته در الکتروفورز بدلیل زیر بر کاغذ رجحان دارد:

الف - وجود ۸۵ درصد آب در زل، کوچ کردن پروتئینها را بنحو مطلوب آسان میسازد.

7- C. Metalloprotéiques.

8- E. de Zone. 9- Système de Capillaires. 10- Gordon.

11- Immuno-Électrophorèse. 12 Smithies.

ب- ضعف قدرت یونی (۰/۳) قدرت انحلال پروتئین را بالا میبرد ؛
ج- جذب سطحی پروتئین‌ها بوسیله ژل نشاسته کمتر از کاغذ است .

د- بالاخره وبخصوص اندازه خلل وفرج ژل مانند پروتئین‌ها بوده و بنا براین پدیده پالایش نیز به کوچ کردن الکترومانیتیک اضافه میشود یعنی با این روش عبور جریان الکتریکی ازخلال ژل نشاسته نه تنها سبب کوچ کردن پروتئین‌ها بسمت قطب مثبت خواهد گردید بلکه خود ژل نیز مانند یک پالایه واقعی عمل کرده پیشرفت مولکولهای بسیار درشتراکند خواهد ساخت بنابراین محل قرارگرفتن اجزاء کلاسیک پروتئین (پلاسمائی (آلبومین ، آلفا و بتا و گاما گلوبولین‌ها) با آنچه را که درالکترو فورز روی کاغذ و یا ژلوز دیده میشود فرق خواهد داشت . بدین ترتیب پدیده‌های مضاعف یعنی کوچ کردن و پالایش سبب میشود که یک گروه گلوبولینی که دارای قابلیت تحرك یکسانی هستند بوسیله ژل نشاسته بتعدادی، اجزاء مشکله تقسیم گردیده ودرخاتمه آزمایش به نسبت درشتی مولکولهایشان در نقاط مخصوص مستقر گردند (5 و 7)

روش و لوازم کار :

الف - مولد برق معمولاً دستگاه یکسوکننده جریان (۱۳) را طوری انتخاب میکنند که حداکثر بتواند جریان مداومی با ۳۰۰ ولت و ۳۰ میلی آمپر تولید وبعلاوه ورود جریان شهر را به دستگاه تنظیم نماید. البته تمام مولدهائی که بتوانند جریانی با شدت ۱۵ میلی آمپر و ۱۵۰ ولت تولید نمایند برای آزمایش کافی خواهد بود .

ب- دستگاه الکترو فورز معمولاً دستگاه کلاسیک برای الکتروفورز روی کاغذ (نوع الفور (۱۴) و یا دستگاه ایمنو - الکترو فورز (نوع گرابار - ژوآن (۱۵) و یا بالاخره دستگاهائی که میتوان چند نوع آزمایش را با آن انجام داد (نوع زی - گرواد (۱۶) بکار میبرند .
ج- قالب ژل-نمونه‌های چندی ساخته اند که ابعاد آنها برحسب کاربستهای مختلف محاسبه شده است در اینجا تنها بشرح دونمونه از قالب ژل که مورد استعمال زیادی دارند اکتفا میشود.

۱- قالب ساده که تنها برای تجزیه ۲ نمونه سرم ساخته شده و عبارت از مخزن پلاستیکی است که از سه قطعه که هر یک بضخامت ۳ میلیمتر میباشد تشکیل شده است در قطعه روئی یا در پوش قالب سوراخهائی تعبیه شده است که محل دخول پلهای ارتباطی است .

۲- قالب استاندارد C. F که از جنس پلکسی گلاس (۱۷) (یکنوع رزین صنایع شفاف که بعنوان شیشه نشکن بکار میرود) بوده و دارای درپوش وناودانی است که میتوان ژل را عرضاً بدو قسمت نمود .

13- Redresseur. 14- Elphor. 15- Grabar-Jouan.

16- J. Groulade. 17- Plexiglass.

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

- ۱- درمورد قالب نوع اول نوارهایی از کاغذ صافی را که بابعاد ۱۰ در ۱۲۰ سانتیمتر است طوری مانند اکوردتون ۱۲ بار تا میکنند که بطول ۱۰ و عرض یکسانتیمتر درآید .
- ۲- برای قالب استاندارد C.F. پلهای ارتباطی را از یک ورقه کاغذ ضخیم مانند نوع مخصوصی (۱۸) از صافی آمیان (۱۹) انتخاب مینمایند (۵).

مواد مورد لزوم :

الف- تامپون برای مخازن الکترو فورز (تامپون I) عبارت از تامپون برات باغلظت مولکولی (۲۰) ۳ / و PH ۸٫۴ میباشد که آنرا بدینسان تهیه میکنند : ۱۸/۶ گرم اسید بوریک را در مقداری آب مقطر حل کرده ۶۰ سانتیمتر مکعب از سود نرمال بآن افزوده سپس حجم آنرا با آب مقطر بیک لیتر میرسانند.

ب- تامپون برای ساختن ژل نشاسته (تامپون II) عبارت از تامپون برات است که غلظت آن بسته بمیزان نشاسته ای که بکار برده میشود فرق مینماید. معمولاً غلظت مولکولی آن ۰٫۳ و PH آن ۸٫۹ میباشد آنرا بدین ترتیب تهیه مینمایند که ۱٫۸۶ گرم اسید بوریک را در کمی آب مقطر حل کرده و ۱۲ سانتیمتر مکعب سود نرمال بآن افزوده سپس حجم آنرا با آب مقطر بیک لیتر میرسانند.

ج- مواد رنگ کننده (۲۱)

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

محلول رنگ بر (۲۳) که دارای فرمول زیر است : متانول یک حجم آب مقطر ۵ حجم اسید استیک یک حجم.

۲- رنگ کننده در محیط آب و اسید استیک : برای الکترو فورز روی ژل نشاسته میتوان رنگ کننده های مائی را که برای الکترو فورز روی ژلوز استعمال میشوند بکار برد . برای اینکار محلول یک گرم در لیتر از مواد رنگ کننده، پروتئین (مانند آمید و شوارتز B ۱۰ و یا سبز لومیر (۲۴) را در حلال زیر (استات دوسدیم ۶٫۸ گرم اسید استیک ۳۰ سانتیمتر مکعب و

18- Cofram Mab C3. 19- Amiante. 20- Molarité.

21- Colorants. 22- Amidoshwartz. 23- Solvant de

Dècoloration. 24- Vert Lumière.

آب مقطر مقدار کافی برای يك لیتر تهیه مینمایند. زدودن رنگ زمینه زل را با آب استیک ۵ در صد انجام میدهند.

د- 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 ایراکه باین منظور در بازار باسامی مختلف (۲۶) موجود است بکار برد مقدار نشاسته و غلظت آن و غلظت مولکولی مناسب تامیون روی بر حسب شیشه نشاسته قید شده است (۵).

۱- ساختن زل نشاسته

الف- دوپل کاغذی از کوفرام (۲۷) را که بابعاد ۸ در ۸ سانتیمتر بریده اند در تامیون I (دارای غلظت مولکولی ۳ / %) تر نموده و آنرا پیش از ریختن زل در قالب استاندارد قرار میدهند در صورتیکه قالب نوع اول را بکار برند انجام این مرحله از آزمایش موردی نخواهد داشت.

ب- در يك ارلن میریکننجایش ۵۰۰ سانتیمتر مکعب مقادیر لازم از نشاسته و تامیون II را میریزند (این مقدار که برای پر کردن يك قالب استاندارد کافی است روی بر حسب شیشه نشاسته برای ۱۵۰ سانتیمتر حجم کلی از تامیون II قید شده است و در صورتیکه قالب اولی را بکار برند ۱۵۰ گرم نشاسته و ۱۰۰ سانتیمتر مکعب تامیون II کافی خواهد بود).

ارلن میرا حداقل مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکانیای دورانی میدهند تا اینکه سوسپانسیون یکنواختی از نشاسته و تامیون بدست آید سپس ارلن میرا مستقیماً روی شعله گاز گرفته و بدون اینکه تکانیای دورانی را متوقف سازند آنرا حرارت میدهند (البته اینکار را ممکنست بوسیله آزیباتور 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 و حبابهای هوا در آن ظاهر میگردد در اینموقع حرارت را قطع و دهانه ارلن میرا به خرطوم تخلیه (۲۸) مربوط میسازند تا با ایجاد خلأ حبابهای موجود در زل را خارج سازد. پس از چند لحظه دیده میشود که از تعداد حبابهای عواکسته میشود در این هنگام خرطوم تخلیه را بر میدارند اینکار سبب میشود که در ارلن میر فشار شدید و ناگهانی ایجاد شده و سبب ترکیدن حبابهای هوا که بسطح زل

25- Starch-Hydrolysed

26- Connaught Medical Research Laboratories, Toronto Canada.
Bender et Hobein Laboratoriums Gerate Arzneimittel H.D. München.

27- Cofram. 28- Trompe à Vide.

آمده اند گردد بدین ترتیب مخلوط نیمه شفافی (۲۹) بدست می آید که آنرا در قالبهای مربوطه میریزند.

(لازم بتذکار نیست که باید قالبها را پیش از ریختن زل 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 زل سرد شده و یکپارچه گردد و بکار آزمایش آید. نکته مهم که باید بآن توجه داشت اینستکه همواره زل نشاسته را باید تحت یک شرایط (درطرف یک شکل و یک اندازه در یک مدت زمان معین و غیره) تهیه نمود (۵ و ۸).

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

الف - روش کاغذ : یک قطعه کاغذ مخصوص (۳۰) را که ابعاد ۱۶ در ۶ / ۰ سانتیمتر بریده اند با ۰۳ ر۰ سانتیمتر مکعب سرم آغشته مینمایند و آنرا در شکاف عرضی که بوسیله تیغ صورت تراشی در زل داده اند قرار میدهند.

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

- مخلوط خمیر مانندای که از امتزاج سرم مورد آزمایش با نشاسته هیدرولیز یافته بدست میآورند بدین ترتیب که در یک شیشه ساعت (۳۱) ۰/۳ الی ۰/۴ سرم مورد آزمایش و مقدار کافی تامپون برات و نشاسته برای بدست آوردن خمیر نسبتاً مایعی میریزند.

- یا اینکه مخلوط زله مانندای را بترتیب زیر تهیه مینمایند : در یک بشر کوچک ۱۵ گرم نشاسته مجلول (ساخت کارخانه مرگ (۳۲) را با ۵ سانتیمتر مکعب تامپون II مخلوط کرده و آنرا تا نزدیک جوش حرارت میدهند سپس میگذارند که در حرارت ۵۰ درجه سرد گردد و بالاخره یک حجم از آنرا با هم حجم خود از سرم مورد آزمایش ممزوج مینمایند بدین ترتیب غلظت نشاسته در این مخلوط برابر ۱۵ در صد یعنی تقریباً معادل غلظت زل نشاسته برای الکتروفورز خواهد بود پس از پر کردن حفره ها برای جلوگیری از تبخیر زل نشاسته را از یک صفحه پلکسی گلاس می پوشانند . در این هنگام زل آماده برای آزمایش خواهد بود (۷ و ۵).

الکتروفورز - قالب حاوی زل را بین دو مخزن دستگاه طوری قرار میدیم که حفره حاوی سرم مورد آزمایش در سمت قطب منفی قرارگیرد سپس اختلاف پتانسیلی بمقیاس ۴ ولت برای

29_ Translucide.

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

هر سانتیمتر از طول ژل بین دو قطب الکتریکی تعیین می نمایند.
مدت آزمایش ۱۶ ساعت خواهد بود (۵).

ثابت کردن، بریدن ژل و رنگ آمیزی - همینکه الکتروفورز پایان یاف ژل نشاسته را از قالب خارج نموده و آنرا مدت ۳۰ دقیقه در آب استیک ۵ در صد ثابت می نمایند این امر سبب میشود که از تردی و شکنندگی ژل کاسته گردد سپس بکمک دستگاه مخصوصی که کناره آن ۳ میلیمتر ارتفاع دارد و بکمک سیم فولادی مانند سیم ویولون ژل را از عرض بدو ورقه ضخامت ۳ میلیمتر برش میدهند. سپس سطوح این قطعات را مدت یک دقیقه در مخلوط آمید و شو آرتز، الکل و اسید استیک رنگ نموده و آنرا با محلول متانول، آب و اسید استیک چند بار متوالی شستشو میدهند، در عرض ۲ الی ۳ ساعت پروتئین ها بصورت لکه های برنگ آبی تیره در یک زمینه آبی فوق العاده کم رنگ پدیدار خواهند شد (۵).

تفسیر الکتروفورگرام (۳۳) همانگونه که قبلا شرح داده شد طرز تقسیم و پخش شدن اجزاء مشکله یک پروتئین در الکتروفورز روی نشاسته با آنچه را که در روی کاغذ بدست می آید تفاوت دارد روی این اصل بتا-۱ گلوبولین ها (۳۴) (دارای وزن مولکولی ۱۵۰۰۰۰) از محل قرار گرفتن بتالیپوپروتئین ها (۳۵) (دارای وزن مولکولی ۱۵۰۰۰۰۰) چندین سانتیمتر فاصله دارند آلفا-۲ گلوبولینها (۳۶) نیز بدو قسمت تقسیم شده است :

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

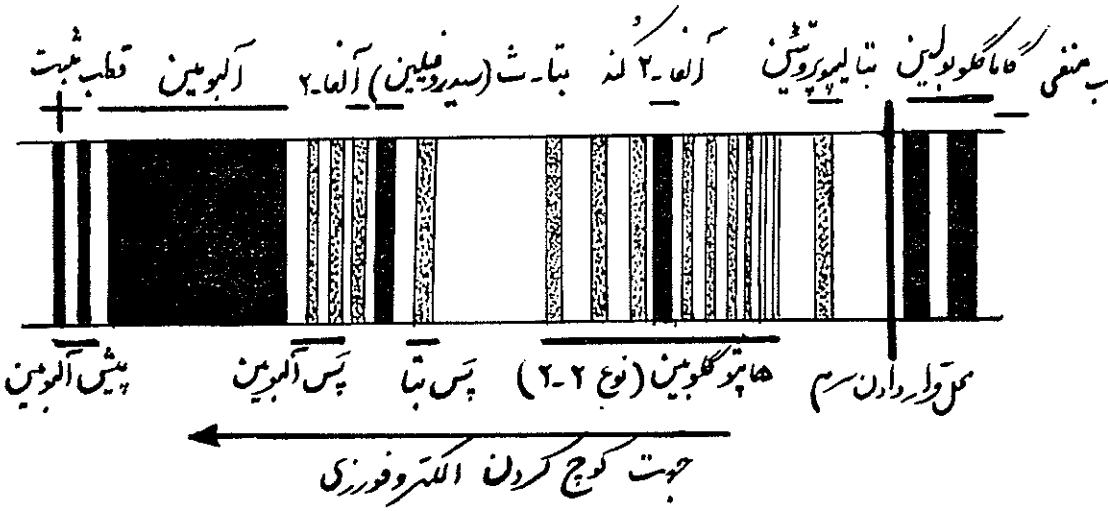
۲- یک نوار آلفا-۲ کند (۴۰) که شامل آلفا-۲- ماکروگلوبولین با وزن مولکولی ۹۰۰۰۰۰ است.

بالاخره یک سلسله نوارهای بینابینی که بین بتا و آلفا-۲- کند قرار دارند و عبارت از هاپتوگلوبین های II با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰۰ هزار میباشد.

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

- یک منطقه بنام پیش آلبومین (۴۱) که شامل ۲ و بندرت سه نوار میباشد پیش آلبومین ها سرشار از تریتوفان (۴۲) بوده و از اینرو قدرت تحریک سریعتری دارند نواریکه نزدیک منطقه آلبومین قرار دارد عبارت از اوروزوموکوئید (۴۳) میباشد.

33. Électrophorégramme. 34_ β_1 Globuline 35_ β Lipoproteines.
36_ α_1 Globuline 37_ Fast Alpha-2 38_ Haptoglobine :
39_ Cèruloplasmine. 40_ Slaw-Alphar. 41_ Prè-Albumine
42_ Tryptophane. 43_ Orosomucoide.



آلبومین‌ها : در صورتیکه تامیون برات بکار برده باشند بصورت نوار بسیار گسترده‌ای دیده میشود و در صورتیکه تامیون تری سیترات پولیک (۴۴) بکار برند (به‌گروه ترانسفرین یا سیدروفیلین (۴۵) مراجعه شود) این نوار کاملاً یکنواخت خواهد گردید

منطقه پس آلبومین (۴۶) که از دو قسمت تشکیل شده ، آنکه نزدیک منطقه آلبومین قرار دارد آلفا-۱ - گلیکوپروتئین (۴۷) میباشد.

یک نوار آلفا - ۲ - گلوبولین یا - ۲ - سریع که شامل هاپتوگلوبین I و سرولوپلاسمین است.

یک یا دو نوار بنام بتا-۱ (سیدروفیلین یا ترانسفرین) که تعداد وضع آنها مشخصی نگردهای ترانسفرین است.

یک نوار بنام پس‌بتا گلوبولین که از دسته بتا گلوبولین‌ها است.

یک سلسله نوار بتعداد ۴ یا ۵ عدد که از دسته هاپتوگلوبین II است (در اشخاصی که مربوط بگروههای ۲-۲ و ۱-۲ میباشد).

یک نوار بسیار تیره رنگ که عبارت از آلفا - ۲ کند که نام دیگر آن ماکروگلوبولین شولتز (۴۸) میباشد.

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

يك نوار بتالیوپروتئین:

محل گذاردن سرم (۴۹).

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

کاربستهای الکتروفورز روی ژل نشاسته :

۱- تشخیص گروههای سرمی (۵۰): گروههای سرمی بمجموعه‌ای از اسواع سرم اطلاق میشود که از نقطه نظر انتقال ارثی يك پروتئین بخصوص با یکدیگر تفاوت دارند. در حال حاضر سه دسته از آنها را می‌شناسند:

الف- گروه سرمی هایپوگلوبین.

ب- گروه سرمی سیدروفیلین یا ترانسفرین. این دو دسته از گروههای سرمی را بوسیله قدرت تحريك الكترو فورزی شناخته‌اند.

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

در اینجا نظر باهیمیتی که این سه دسته گروههای سرمی در توارث (۵۲) و انسان شناسی (۵۳) دارا بوده و امکانات تازه‌ای را برای مطالعات در این رشته از علوم باز نموده‌اند بی‌مناسبت نیست از آنکی بشرح آنها پرداخته شود (5 و 6 و 10).

الف- گروههای هایپوگلوبین: اولین شاهد و مثال برای سیستم گروههای سرمی است که در آن اختلاف و تفاوت بین افراد بشر مربوط به پروتئین‌های سرمی آنها میباشد این اختلاف بطور ارثی منتقل گشته و در اثر وجود دوزن آللومرف (۵۴) که - اواسمی تیز (۵۵) و فورد واکس (۵۶) در ۱۹۵۵ آنها را بصورت $hp1$ و $hp2$ فرض نموده‌اند میباشد که پیوند آنها با یکدیگر سه نوع زئوتیپ (۵۷) بشرح زیر ایجاد میکند: تیپ $Hp1-1$ که زئو تیپ آن $hp1hrp1$ است تیپ $HP2.2$ که زئو تیپ آن $hp2hrp2$ میباشد و بالاخره تیپ $Hp2-1$ که زئو تیپ آن $hp2hrp1$ میباشد (شکل ۲)

هایپوگلوبین‌های $Hp1$ و $Hp2$ عبارت از کلیکوپروتئین‌هایی هستند از دسته آلفا - ۲. گلوبولین‌ها که در زمره پروتئین‌های اسیدپلازما بوده و حاوی ۳۰ درصد گلوسیمینا هستند. هایپوگلوبین با هموگلوبین ترکیب شده و ایجاد ترکیب با ثباتی مینماید.

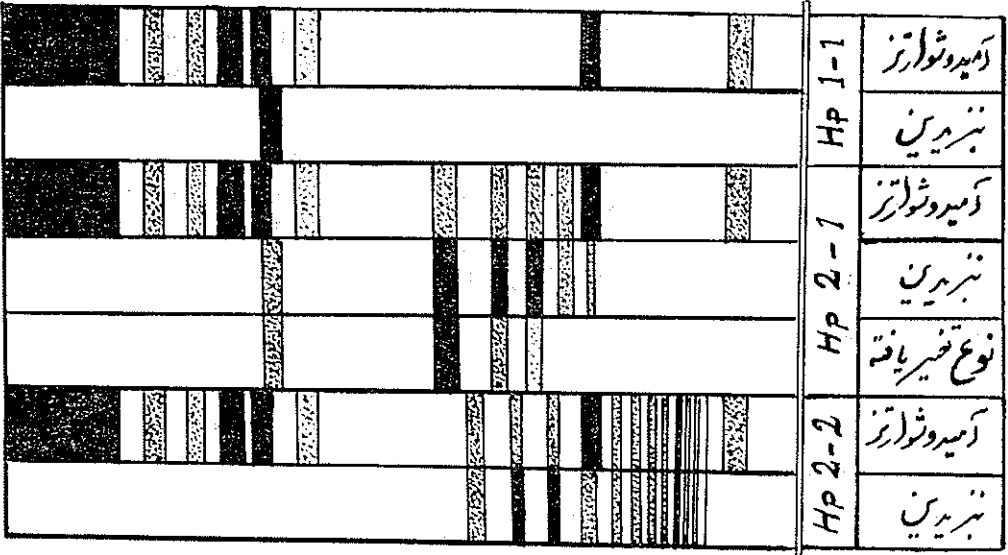
49- Dépôt Du Sérum. 50- Groupes Sanguins Sériques.

51- Gamma Globuline. 52- Génétique. 53- Anthropologie.

54- Fènes Allelomorphes. 55- O. Smithies. 56- N. Ford walker.

57- Genotype.

مکن در این رسم بتالیپروپتین آلفا کنده پس بتا بتا ثبات آلفا پس آلبومین آلبومین



منطقه ها تترگلوبین ها
 جهت کوچ کردن

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 پلی-مری (۶۰) از نوع اول دانست زیرا ترکیب شیمیائی آنها مشابه میباشد. یکی بودن خاصیت آنتی ژنی هاپتوگلوبین ها این نکته را ثابت میکند که اختلافاتشان مربوط بساختمان مولکولی آنها است و این موضوع گروههای سرمی را از گروههای خونی کاملاً جدا میسازد زیرا در سیستم گروههای خونی اختلافات ایمونولوژیکی وجود دارد. سه نوع گروه هاپتوگلوبین را میتوان با رنگ آمیزی بوسیله آمید و شوارتز بشرح زیر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-11-23]

از یکدیگر تشخیص دارد.

تیپ 1- Hp 1 بوسيله يك نوار منفرد (آلفا - ۲ سریع) مشخص میشود و مجموعه آن در ناحیه بتاگلوبولین‌ها قرار دارد.

در تیپ 2- Hp 2 این نوار وجود نداشته ولی‌ها پتوگلوبین بوسيله ۳ الی ۴ نوار که بین آلفا ۲- کند و بتاگلوبولین‌ها قرار دارند مشخص میگردد.

–بالاخره در تیپ 1- Hp 2 نوارهای مربوط به 1- Hp 1 و 2- Hp 2 باهم دیده میشود که اندکی بیشتر سمت قطب مثبت گرانیده‌اند (شکل ۲) در صورتیکه قبلا سرم را با هموگلوبین مخلوط کرده باشند تشخیص گروه‌ها پتوگلوبین آسانتر خواهد شد زیرا همانطوریکه قبلا گذشت‌ها پتوگلوبین با هموگلوبین ایجاد ترکیب باثباتی مینماید که واجد خواص پراکسیدازی (۶۱) بوده و سهولت آنرا میتوان بوسيله بنزیدین (۶۲) شناخت.

روش آزمایش: الکترو فورزرا روی سرمی که با آن هموگلوبین افزوده‌اند انجام میدهند (هموگلوبین ۲۰۰۰ M/ را بنسبت $\frac{۲}{۱}$ حجم سرم با آن مخلوط مینمایند) پس از انجام آزمایش و بریدن ژل و ثابت کردن آن در آب استیک ۵ در صد مجموعه‌ها پتوگلوبین را با معرفهای زیر نمودار میسازند:

– معرف A که بفرمول زیر میباشد: متانول ۳۵۰ سانتیمتر مکعب بنزیدین ۰/۵ گرم تامیون استات-اسید استیک با PH ۶٫۴ پنجاه سانتیمتر مکعب و آب مقطر مقدار کافی برای پانصد سانتی‌متر مکعب .

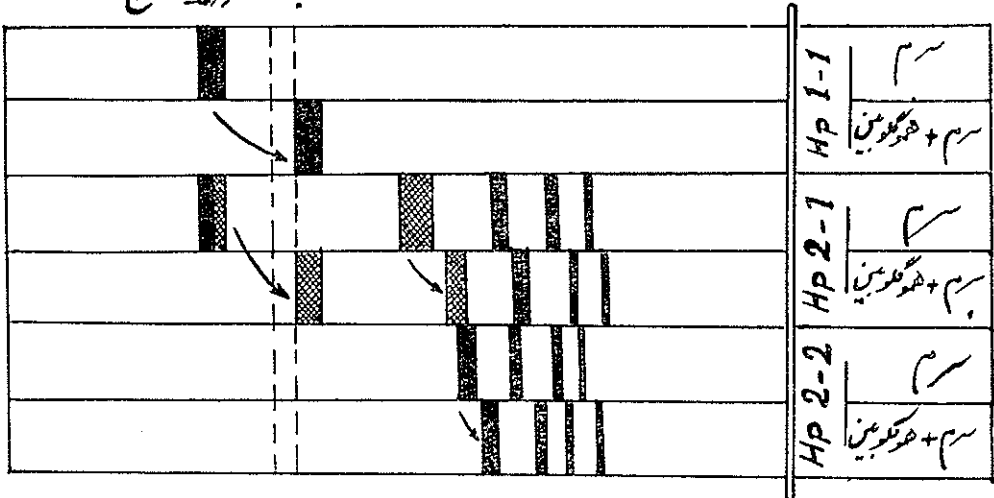
معرف B که عبارت از آب اکسیژنه ۲۰ حجمی میباشد . قطعات ژل را مدت ۱۵ دقیقه در مخلوطی که در همان هنگام با ۱۸۰ سانتیمتر مکعب معرف A و ۲۰ سانتیمتر مکعب معرف B ساخته‌اند قرار داده سپس با آب استیک ۵ درصد شستشو مینمایند.

این روش را بطریق ساده‌تری نیز میتوان انجام داد باین معنی که قلم موئی را به‌محلول زیر که همان موقع میسازند آغشته نموده روی ژل میمالند يك قرص بنزیدین بی‌اکسید دو باریم (ساخت کارخانه مرک) را با ۵ سانتیمتر مکعب اسید استیک گلاسیال و ۵ سانتیمتر مکعب آب مقطر مخلوط میسازند باین روش مجموعه‌ها پتوگلوبین - هموگلوبین بصورت نوارهایی ب رنگ آبی در زمینه سفید ظاهر میشود (شکل ۳).

تعیین گروه‌های‌ها پتوگلوبین در برخی افراد (بخصوص در نژاد سیاه و یا کودکان کمتر از ۴ ماه بعلت عدم کفایت مقدار این پروتئین مشکل میباشد). اخیراً انواع دیگری از این دسته گروه‌های سرمی را متمایز ساخته‌اند مانند نوع Hp 2-1 (۶۳) که بسیار نادر است (شکل ۲)

محل قرار دادن سرم

بتا (آند) سیخ



و دیگر نوع جانس (۶۴) و نوع Hpca که بسیار استثنائی میباشند و فورژن Hp1 بر طبق مطالعه درمحل مختلف بقرار زیر است :

در اروپائیا ۴۰ درصد در آفریقائیا ۷۰ درصد و کمتر از ۳۰ درصد در آسیائیا است. و فورژوهای هاپتوگلوبین در ۱۹۰۰ مورد که در شمال شرقی فرانسه مورد مطالعه قرار گرفته ارقام زیر را نشان میدهد: Hp1-1 ۱۸٫۳۶ درصد، Hp 2-1 ۴۸٫۵۲ درصد و Hp 2-2 ۳۳٫۱۰ درصد (۱۰٫۶۵۰۳) .

ب- گروههای ترانسفرین : نمودار ایندسته از گروههای سرمی که در ۱۹۵۹ کشف شده است تغییرات گلوبولینهای بتا-۱ (سیدروفیلین یا ترانسفرین) میباشد . برای تعیین و تشخیص ایندسته از گروههای سرمی الکترو فورژ را روی ژل نشاسته بروش عمودی و یا بطریق قبلی ولی بصورت زیر انجام میدهند :

در قالبها تامپون برات کلاسیک با غلظت مولکولی ۳. میریزند در حالیکه ژل را با تامپون بفرمول زیر که PH آن ۸٫۶۵ میباشد میسازند . تری هیدروکسی متیل - آمینومتان (۶۵) با غلظت مولکولی ۰٫۷۶ و اسید سیتریک با غلظت مولکولی ۰٫۰۵ در اکثر سرمهای مورد مطالعه

64- Johnson.

65- Tris Hydroxymethyl-Amiuno Methane.

گروههای سرمی را پیچیده تر ساخته است (10, 5, I).

ج - گروههای گاما گلوبولین - هما نظوری که قبلاً گذشت ایندسته از گروههای سرمی را تنها بوسیله آزمایشهای سرم شناسی میتوان شناخت اولین فاکتور ایندسته از گروههای سرمی که سیستم G.m نامیده میشود در ۱۹۵۶ توسط گراب (۶۷) کشف و عامل $G.m(a)$ نامیده شد نامبرده مشاهده نمود که سرم برخی از مبتلایان به پلی آرتریت مزمن پیشرونده (۶۸) قادر است گلوبولهای قرمز Rh مثبت را که از نوعی آنتی کورنا کامل (۶۹) آنتی Rh پوشیده شده اند آگلوتینه نماید در واقع اینگونه سرمهای آنتی Rh عامل $G.m(a)$ را به همراه دارد که روی گلوبول ثابت میشود و بکمک آن میتوان سرم آنتی $G.m(a)$ را جستجو نمود ۵۰ تا ۶۰ درصد اروپائیهها ۹۶ر۴ درصد اسکیموها (۷۰) و ۱۰۰ درصد افراد سنکالی (۷۱) $G.m(a)$ مثبت هستند یعنی سرمشان قادر است ایجاد وقفه در آگلوتیناسیون نماید. هاروب (۷۲) در ۱۹۵۹ فاکتور دیگری از ایندسته را بنام $G.m(b)$ شرح و نشان داد که ۸۱٫۵ درصد اروپائیهها $G.m(b)$ مثبت میباشد. تعداد دیگری از انواع ایندسته از گروههای سرمی مانند $G.m(x)$ که اکثراً همراه با $G.m(a)$ است و فاکتور $G.m(Like)$ را در نژادهای سیاه و فاکتور $Inv.$ را که اندکی بانوع قبلی تفاوت دارد و توسط روپارتز (۷۳) کشف شده تاکنون شناخته اند.

سرمهای آنتی $G.m$ را نزد ۲۵ الی ۴۰ درصد مبتلایان به پلی آرتریت مزمن و نیز در مسلولین و گاهی در افراد سالم یافته اند که اگر چه عیار آن ضعیف است ولی بسیار اختصاصی میباشد (10).

۲ کاربستهای الکتروفورز روی ژل نشاسته در زیست شناسی بالینی: هر چند که هنوز نتوانسته تغییرات کمی (۷۴) پروتئینها را در موارد مرضی با این روش بنحو مطلوب آزمایش نمایند با اینحال بکمک این روش نتوانسته اند اطلاعاتی در خصوص اندازه مولکول شبه پروتئینهای (۷۵) سرم بدست آورده و ماهیت آنها را از دسته ماکروگلوبولینها معلوم نمایند.

میدانیم که در سرم مبتلایان به میلوم متعدد یا بیماری کاهلر (۷۶) و نیز در ماکروگلوبولینمی والدنشتروم (۷۷) شبه پروتئینهای مهمی دیده میشود. پیش از کشف این آزمایش نتوانسته

67- Grub 68- Polyarthrite Chronique Evolutive.

69- A. Incomplet. 70- les Esquimaux

71- Sénégal. 72- Harobe.

73- Ropartz. 74- Quantitative. 75- Paraprotéine .

76- Myélome multiple ou maladie de kahler.

77- Macroglobulinemie de waldenstrom,

بودند ماهیت این شبه پروتئین‌ها و تفاوت‌های آنها را بوسیله الکتروفورز روی کاغذ معلوم دارند زیرا هر دو بیماری تصویری الکتروفورزی یکسان را نشان می‌دهد باین معنی که یک منحنی نوک‌تیز با اندازه منحنی آلبومین در منطقه بتا یا آلفا گلوبولین‌ها با قدرت جا بجا شدن متغیر که نمودار وجود یک ترکیب غیر عادی (شبه پروتئین) در سرم می‌باشد مشاهده می‌کنند درحالی‌که بوسیله الکتروفورز روی ژل نشاسته این دو نوع شبه پروتئین را که بر حسب درشتی مولکولشان خواص مختلف از خود نشان می‌دهند میتوان از یکدیگر تمیز داد (4, 5).

الف - شبه پروتئین‌های میلوم با خاصیت آنتی‌زنی گاما و یا بتا A-۲ دارای وزن مولکولی کم بوده و با این روش مانند الکتروفورز روی کاغذ بر حسب بار الکتریکی و ابعاد مولکولی‌شان در نقاط مخصوصی از ژل جایگزین میشوند. اکثراً دیده میشود که شبه پروتئین‌های بتا A-۲ از ۲ یا ۳ واحد کوچک‌تر (۷۸) تشکیل یافته است.

ب- ماکرو گلوبولین‌ها که بعلمت بالا بودن وزن مولکولی قادر به عبور از خلال ژل نشاسته نبوده و در همان محل گذاردن سرم بصورت لکه تیره‌ای باقی می‌مانند بنا بر این تضاد بین وجود یک لکه تیره در الکتروفورز روی کاغذ و فقدان آن در ژل نشاسته دلیل ماهیت ماکرو گلوبولینی شبه پروتئین خواهد بود.

بطور خلاصه برای تشخیص دیس پروتئین امی‌ها (۷۹) باید بترتیب بانجام آزمایشهای زیر مبادرت نمود.

- ۱- الکتروفورز روی کاغذ که وجود یا عدم وجود شبه پروتئین را در سرم نشان خواهد داد.
- ۲- تجزیه ایمونو و الکتروفورز که برای پی‌بردن بوجه مشترک شبه پروتئین با گلوبولین‌های گاما و بتا A-۲ و بتا M-۲ لازمست.
- ۳- الکتروفورز روی ژل نشاسته که برای تشخیص گاما یا بتا میلوم، ماکرو گلوبولین‌ها و پروتئین‌های از نوع بنس‌جونس (۸۰) ضروری است.
- ۴- اولتراسانتریفوگاسیون (۷۱): ضریب رسوب در میلوم بعلمت زیاد نبودن وزن مولکولی مشابه ترکیبات گلوبولین‌های عادی می‌باشد درحالی‌که در ماکرو گلوبولین امی بعلمت زیادی وزن مولکولی ضریب رسوب به ۱۷ تا ۱۹ گاهی نیز تا ۲۵ واحد اسود برگ (۸۲) میرسد (4).

78- Sous-unité. 79- Dysprotéinémie. 80- Bence Jones.

81- Ultra-centrifugation. 82- Unité svederg.

RÉFÉRENCES

- 1- Boulanger P. , Polonovski j. et Coll. Biochimie Médicale 6^e Edit. 1961 . Masson et Cie - Edit. Paris Fascicule III Pages 741 - 756 .
- 2- Fine J. M. C 'Électrophorèse 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 .