مجله دانشکده پزشکی تهران
آذر و دی ماه ۱۳۶۷ـ صفحه ۳۳

کروماتوگرافی دو بعدی اسیدهای آمینه در مایعات بیولوژیک بعد از فیلتراسیون

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

مقدمه

به لحاظ اهمیت بسزائی‌که واحدهای سازنده پروتئین ها یعنی اسیدهای آمینه در افراد سالم و بیمار دارا می‌باشندلذا تفکیک آنها از یکدیگر در موارد متعددی ازجمله تعدادی ازبیماریهای ارثی که بعلت کمبود یک یا چند آنزیم به وقوع میپیوندند دارای ارزش بسزائی است به همین سبب استفاده از وسائلی‌که تهیه و کاربردآن برای همگان میسربوده وآنان را از بکار گیری وسایل مدرن تا حدی بی نیازنماید روشی است که در این مقاله ارائه شده است .

خلاصه

برای جداسازی اسیدهای آمینه مایعات بیولوژیک از روش لایه نازک دوبعدی 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

ابتداءلوله دیالیزبه 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 خشک‌نموده یک انتهای آنها را گره زده و ۳ میلی لیتر از مایع بیولوژیکی مورد آزمایش توسط پیپت 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 صاف‌نشده‌حاوی ملکولهای درشت پروتئین برای‌آزمایش الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفته و از بقیه صاف شده‌برای آزمایشات‌کروماتوگرافی دوبعدی‌استفاده میگردید (۴و۷و۸) .

ازپلیت ۱۰×۱۰ سلولز در این بررسی استفاده گردید ،مقدار نمونه کاملا "بستگی به نوع‌مایع بیولوژیکی داشته و درنهایت 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 میلی‌لیتر

* ـ استادیاران گروه آموزشی‌بیوشیمی دانشکده‌پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران .
** ـ متخصص بیوشیمی بالینی آزمایشگاه بهداری ژاندارمری جمهوری اسلامی ایران ـ میدان انقلاب تهران .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

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 M بوتانول ، ۳۵ میلی لیتراستن ۷ میلی لیتر اسیداستیک و ۲۲ میلی لیترآب مقطر بوده که در ابتداء بصورت دو محلول مجزای A شامل ۳۵لیتر M بوتانول و ۳۵ میلی لیتر استن و B شامل ۷ میلی لیتر اسید استیک و ۲۳ میلی لیترآب مقطر بودند و هنگام مصرف به نسبت ۲۸ میلی لیتراز محلول A و ۱۲ میلی لیتر ازمحلول 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 ۰/۵ 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 لیتراستن حل و برای رنگ‌آمیزی پلیت ها مورد استفاده قرار میگرفت . هریک‌از پلیت ها پس از نمونه گذاری ۲ بار و هربار بمدت یکساعت بدین ترتیب کروماتوگرافی می‌گردیدندو در پایان اولین کروماتوگرافی پس از خشک شدن پلیت آنرا در بعد دیگر (۹۰ درجه چرخش) قرار داده ومجددا" عمل کروماتوگرافی بمدت یکساعت ادامه داده می‌شد .پلیت ها پس ازخشک شدن با کمک نین هیدرین و با استفاده از اسپری رنگ آمیزی شده وآنها را بمدت ۳۰ دقیقه در اتو و۱۰۰ درجه سانتی گراد بمنظورظهور 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 ایزوپروپانون ۳۰% حل نموده سپس کروماتوگرام انجام داده و نتایج آنها را مقایسه نموده در ذیل کروماتوگرام چند نمونه ارائه می‌گردد .

نتیجه

آزمایش کروماتوگرافی دوبعدی روی مایعات‌بیولوژیک پس از انجام فیلتراسیون بر روی ۳۰ مورد سرم افراد طبیعی انجام‌گرفت و کلیه ۲۰ اسید آمینه طبیعی در سرم افرادمزبور مشاهده و فقط از نظر کمی در بعضی اسیدهای آمینه با هم اختلاف داشتندکه آن نیز ناشی از کمبود تغذیه یا فقرغذائی و یا فعالیتهای بدنی آن افراد بوده و همچنین درآن مدت حدود ۵۰ ادرار افرادمختلف پس از فیلتراسیون موردآزمایش قرارگرفت فقط در ۵ موردسیستینوری مشاهده گردیدکه مقدار اسیدهای آمینه اورنیتین و لیزین و هموسستئین و سیترولین و آرژینین در آنها بیش از حد طبیعی بوده ۱۰ مورد از مایع آمینوتیک مربوط به خانمهای حامله نیز امتحان بعمل آورده واسیدهای آمینه مربوط به آنها عبارت بودند از لوسین و فنیل‌آلانین ،تریپتوفان ،والین ،۳ متیل‌هیستیدین ، سرین ، گلیسین ، هیستیدین سیستین ، سیستئین ، هموسیستئین ، آرژینین و اسید آسپارتیک ، اسید گلوتامیک و نیز ۱۰ مورد اسپرم‌افراد سالم پس ازفیلتراسیون موردآزمایش‌کروماتوگرافی دوبعدی 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 :

پروتئین هایکی ازمهمترین مواد آلی‌مورد نیازبدن انسان هستند و می‌توانند در کاتابولیسم و آنابولیسم شرکت نمایند یعنی این مواد انرژی زا 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 L می‌باشند ولی در حدود ۲۵اسید آمینه در ساختمان پروتئینها شرکت دارند که بوسیله پیوند پپتیدی CO-NH- با هم ترکیب شده و مولکولهای پپتیدی ، پلی ــ پپتیدی و پروتئینها را تشکیل می‌دهند .

علاوه بر اعمال فوق بعضی از اسیدهای آمینه در سنتز هورمونها ، ویتامین ها ، ملانین هیستامین ، موادقندی و چربی شرکت دارند . از این تعداد اسیدهای آمینه‌طبیعی فقط ۸ عدد آنها ضروری می‌باشند . زیرا بدن قادر به سنتز آنها نمی‌باشد و بایستی بوسیله مواد غذائی به بدن برسند که عبارتند از والین ، لوسین ، ایزولوسین ، تره اونین ،

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

لیزین تریپتوفان ، فنیل آلانین ، میتونین (۱و۶) .

اگر اسیدهای فوق به اندازه کافی به بدن نرسند رشد و ترمیم بدن دچار اختلال می‌شود . بقیه اسیدهای آمینه که بدن قادر به سنتز آنها نمی‌باشد و کاهش آنها در بدن دیده نمی‌شود بنام اسیدهای آمینه غیر ضروری موسومند (۳) .

نقص در متابولیسم هریک از اسیدهای آمینه طبیعی باعث بیماری می‌شود که اکثرا " در اثر نقص ژنتیکی و فقدان آنزیمهای لازم برای متابولیسم آنها حاصل می‌شوند .

مهمترین بیماریهای متابولیسمی اسیدهای آمینه عبارتنداز فنیل‌کتون‌اوری ، بیماری آلکاپتنوری ، هموسیستینوری ، آلبینیسم ، بیماری سیستینوری ، بیماری شربت افرای ادرار و بیماری سیستینوز می‌باشد (۵و۶) .

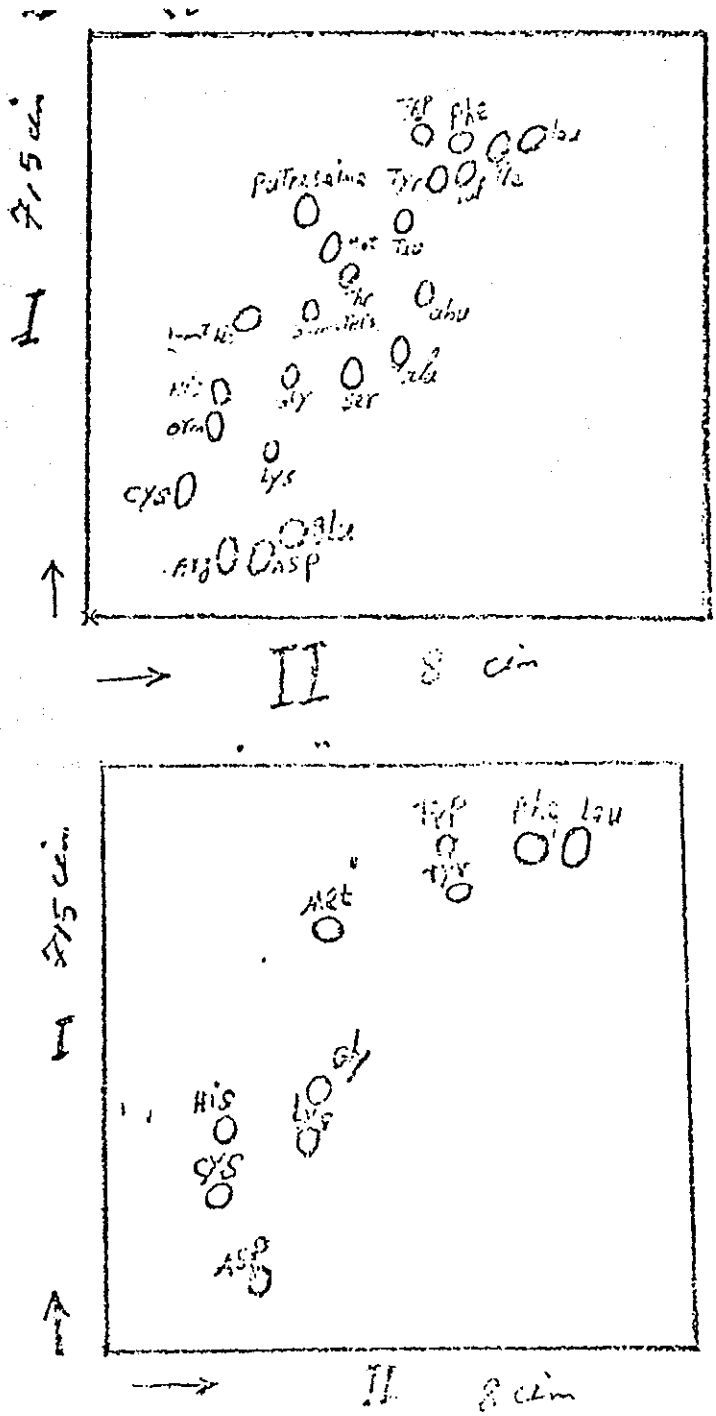
برای بررسی و جدا سازی اسیدهای آمینه در مایعات بیولوژی روشهای مختلفی وجود دارد . ولی هریک دارای معایبی بوده و نیازمند وسائلی گرانقیمت وموادی هستند که دسترسی به آنها مشکل است ، علاوه برآن جداسازی اسیدهای آمینه با کرماتوگرافی یک بعدی غیر ممکن بوده زیرا با این روش تنها یک ماده را میتوان از محلولی جدا نمود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

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

در خاتمه پیشنهاد می‌شود 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 .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

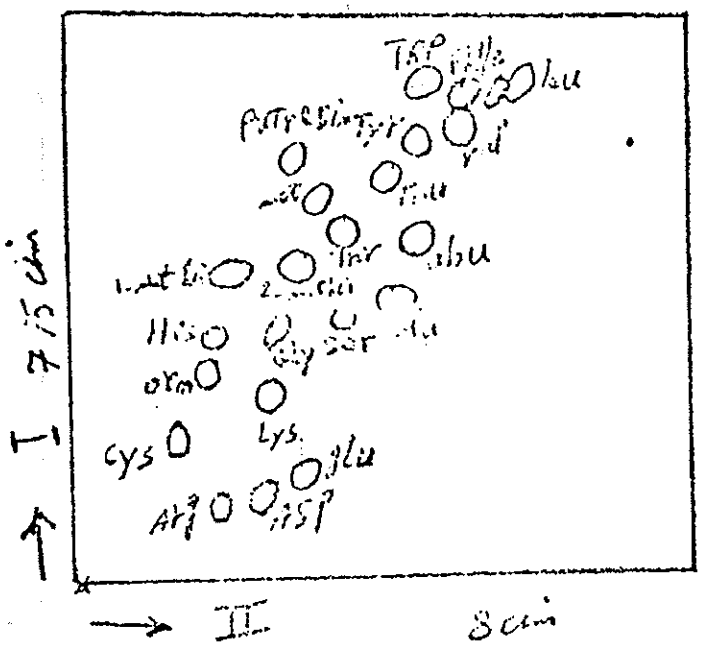
استاندارد مرگ : که حاوی ۲۲ اسید آمینه و بعد از اولین حرارت تظاهر شـــدنـــــد .

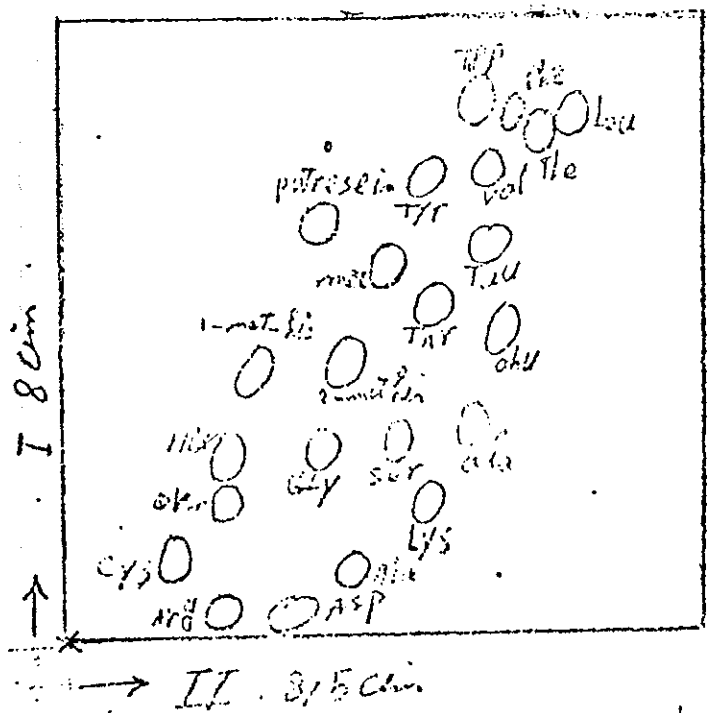


کروماتوگرافی ۱۰ نمونه از اسید آمینه که بعنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

کروماتوگرافی دو بعدی سرم طبیعی

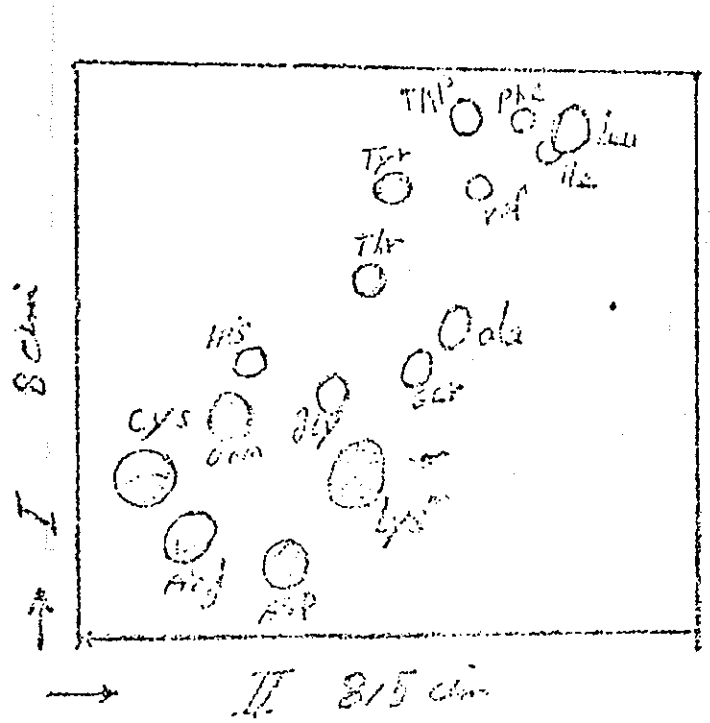


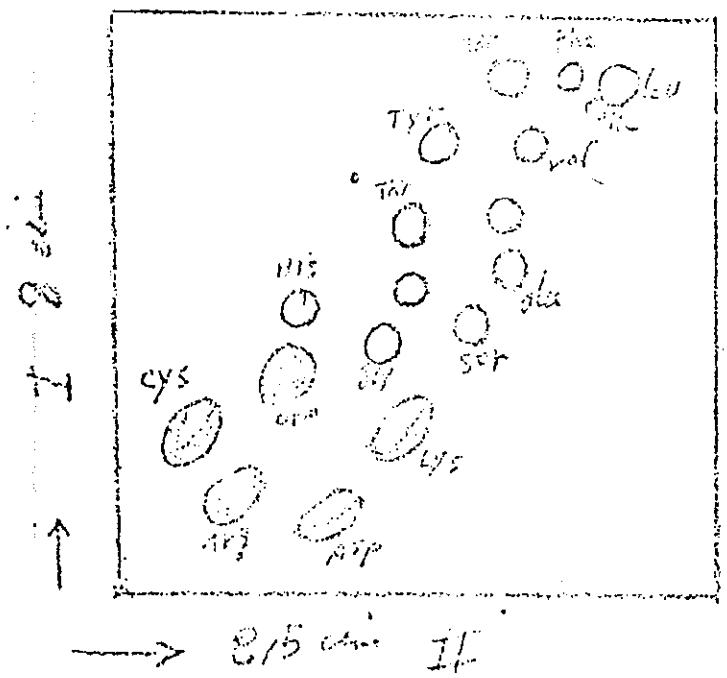


کروماتوگرافی دو بعدی ادرار طبیعی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

کروماتوگرافی ادرار خانم مبتلا به سیستینوری

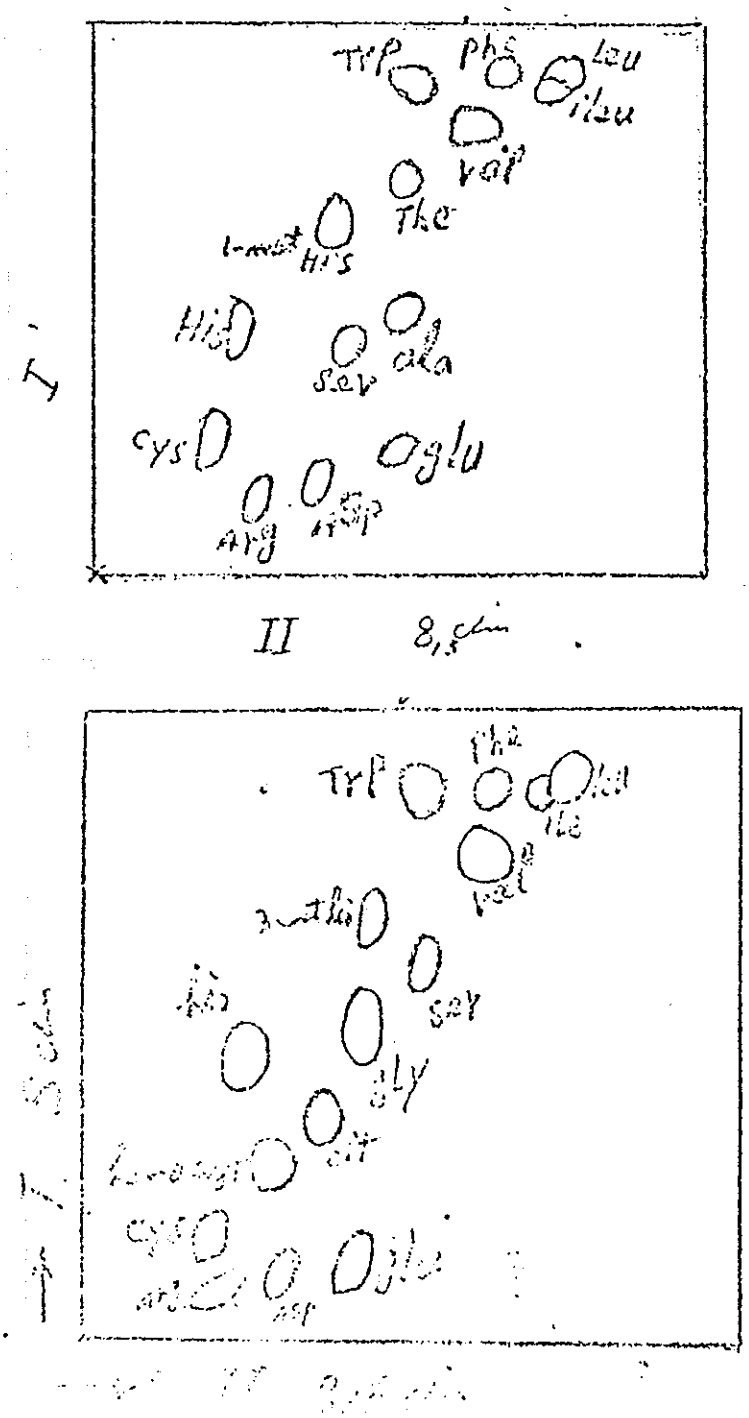




کروماتوگرافی ادرار پسر بچه ۱۳ ساله که مبتلا به‌سیستینوری بوده و ازمادر مبتلا به سیستینوری متولشد شده است .

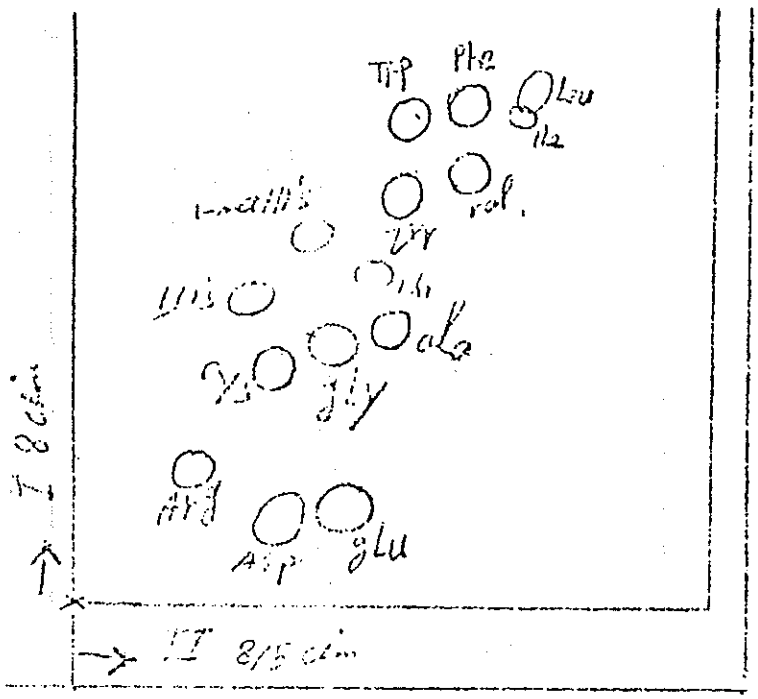
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

کروماتوگرافی اسپرم شخص سالم

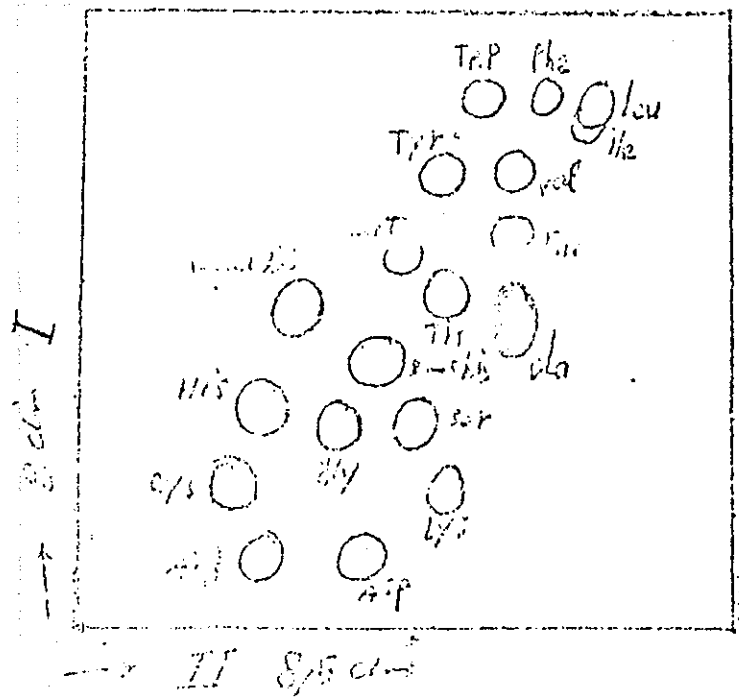


کروماتوگرافی مایع آمینوتیک

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]



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



کروماتوگرافی ادرار شخص بیمار مشکوک به آلانین اوری

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

EFFERENCES

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 Clincal 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 Chinical 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, Chimical Acta, Vol. 110, pp. 227, 1981.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]