Archive of SID

Original Article

Effective purification of human chorionic gonadotropin and its subunits from pregnant women urine

Moradi A[1], Mirshahi M[2*]

1- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I. R. Iran.
2- Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

Received August 18, 2012; Accepted December 5, 2012

Abstract:

Background: Human chorionic gonadotropin (hCG), containing 30% sugar by molecular weight, is an important glycoprotein in pregnancy to keep the fetus. Nowadays, hCG has been used as the basis for the contraceptive vaccines. This study aimed to increase the hormone purity and shorten its purification time.
Materials and Methods: For hCG purification, urine samples of 2-3 month pregnant women were collected and precipitated using sodium benzoat, acetic acid and acetone. The concentrated hCG was run on Concanavalin A column (Con-A) and eluted using D-Glucose and D-Mannose. To isolate the purified α and β subunits of hCG, the Con-A column was run on DEAE-Sepharose 4B column. The purity of hCG and its subunits was confirmed by SDS-PAGE and validated by ELISA and Immunoblotting.
Results: The concentrated urine sample and purified hCG sample were compared with the standard hCG control sample from Organon company, in terms of molecular weight and purity, using SDS-PAGE method and silver nitrate staining. Concentrated sample was identical to standard sample in number of additional bands, in which additional bands were removed after hCG purification. hCG hormone and its subunits were approved using the monoclonal antibodies against the α and β chains using ELISA and Western blot.
Conclusion: According to the results of this study, hCG can be isolated from other parts of hCG and other glycoproteins using D-Glucose before D-Mannose.

Keywords: Human chorionic gonadotropin, Purification, Chromatography

*** Corresponding Author.**
Email: Mirshahi@modares.ac.ir
Tel: 0098 912 327 4065
Fax: 0098 21 828 84717

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences March, 2013; Vol. 17, No 1, Pages 71-79

Please cite this article as: Moradi A, Mirshahi M. Effective purification of human chorionic gonadotropin and its subunits from pregnant women urine. ***Feyz*** 2013; 17(1): 71-9.

www.SID.ir

Archive of SID

تخلیص هورمون hCG از ادرار زنان باردار و جداسازی زیرواحدهای آن

علی مرادی [۱]، منوچهر میرشاهی [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: هورمون hCG از گلیکوپروتئین‌های مهم دوران بارداری جهت حفظ جنین است که تقریبا ۳۰ درصد وزن مولکولی این هورمون را قند تشکیل می‌دهد. امروزه از این هورمون در درمان و هم‌چنین ساخت واکسن‌های ضد بارداری استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر سعی در افزایش میزان خلوص و کوتاه کردن مسیر تخلیص این هورمون است.

مواد و روش‌ها: جهت تخلیص هورمون hCG از نمونه ادرار زنان باردار دو تا سه ماهه استفاده شد. نمونه جمع‌آوری شده توسط بنزوات سدیم، اسید استیک و استون رسوب‌دهی و تغلیظ گردید. با عبور نمونه تغلیظ شده از ستون کانکاناوالین A (Con-A) و جدا-کننده‌های دی‌گلوکز و دی‌مانوز، hCG تخلیص گردید. با عبور نمونه hCG تخلیص شده از ستون DEAE-Sepharose 4B، زیرواحدهای آلفا و بتای هورمون جداسازی گردید. خلوص نمونه‌ها به‌وسیله SDS-PAGE و صحت آنها با روش الایزا و ایمونوبلاتینگ بررسی شد.

نتایج: نمونه تغلیظ شده به‌دست آمده از ادرار و نمونه hCG تخلیص شده از ستون کانکاناوالین A، با استاندارد hCG از شرکت ارگانون از نظر وزن مولکولی و میزان خلوص با روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مقایسه شدند. نمونه تغلیظ شده شبیه نمونه استاندارد و دارای تعدادی باند اضافی بود که باندهای اضافی بعد از تخلیص hCG حذف گردید. تایید هورمون hCG و زیرواحدهای آن با استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال ضد زنجیره α و β به روش الایزا و وسترن بلات انجام گرفت.

نتیجه‌گیری: استفاده از قند دی‌گلوکز قبل از دی‌مانوز توانست باعث جداسازی hCG از سایر قطعات hCG و گلیکوپروتئین‌ها شود.

واژگان کلیدی: کوریونیک گنادوتروپین انسانی، خالص سازی، کروماتوگرافی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۲، صفحات ۷۹-۷۱

مقدمه

هورمون کوریونیک گنادوتروپین انسانی یا hCG (Human chorionic gonadotropin)، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۶۷۰۰ دالتون بوده که ۳۰ درصد وزن مولکولی این هورمون را قندها تشکیل می‌دهند. هورمون hCG متعلق به خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی TSH، FSH و LH می‌باشد، امّا برخلاف این سه هورمون که توسط هیپوفیز ترشح می‌شوند hCG درطول دوران بارداری توسط سلول‌های سنسیتیوتروفوبلاست جفت ترشح می‌شود. میزان این هورمون با تشکیل سلول‌های سن‌سیتیوتروفوبلاست افزایش پیدا می‌کند؛ به‌طوری‌که در هفته دهم بارداری به حداکثر میزان خود رسیده و بعد از آن میزان این هورمون کاهش می‌یابد تا اینکه در هفته بیست و یکم به یک پانزدهم حداکثر میزان خود می‌رسد و تا پایان دوران بارداری با نوسانات خیلی کم در همین سطح باقی می‌ماند [۳-۱].

هورمون hCG از دو زیرواحد آلفا و بتا تشکیل شده است که توسط باندهای غیر کوالان هیدروژنی و هیدروفوب به‌هم متصل‌اند. زیرواحد آلفا در تمام هورمون‌های گلیکوپروتئینی این خانواده مشابه است. این زیر واحد شامل ۹۲ اسید آمینه با وزن مولکولی ۱۴۷۰۰ دالتون، پنج پل دی‌سولفید و دو زنجیره جانبی اولیگوساکاریدی به صورت N-link در موقعیت آمینو اسیدی ۵۲ و ۷۸ می‌باشد. زیرواحد بتا در خانواده این هورمون‌های گلیکوپروتئینی با هم فرق می‌کند؛ بنابراین فعالیت بیولوژیکی هر هورمون توسط زیرواحد بتای آن مشخص می‌شود. این زیرواحد شامل ۱۴۶ اسید آمینه با وزن مولکولی ۲۳۰۰۰ دالتون، شش باند دی‌سولفید و شش زنجیره قندی، دو زنجیره به شکل N-link و چهار زنجیره به شکل O-link می‌باشد. اتصالات قندی در ترشح، تجمع، پایداری و فعالیت بیولوژیک و تصفیه هورمون hCG نقش مهمی را بازی می‌کنند [۸-۴]. در داخل سرم و ادرار زنان باردار در طول دوران بارداری، علاوه بر هورمون hCG به شکل کامل (فاقد شکستگی)، اشکالی از هورمون به‌صورت تجزیه شده (زیرواحدهای آلفا و بتای آزاد) و شکسته شده (Nicked-hCG) یافت می‌شود. شکستگی اکثرا در ناحیه آمینواسیدی ۴۷ و ۴۸ از زیرواحد بتا و در اثر آنزیمی به نام الاستاز لوکوسیت انسانی که توسط نوتروفیل‌ها ترشح می‌شود، اتفاق می‌افتد [۱۱-۹]. این

[۱] استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

[۲] دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

***نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی

تلفن: ۰۹۱۲ ۳۲۷۴۰۶۵ **دورنویس:** ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۷۱۷

پست الکترونیک: Mirshahi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۱/۹/۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

شکستگی باعث ناپایداری مولکول hCG و در نتیجه تجزیه سریع‌تر آن می‌شود. در اثر این شکستگی زیرواحد بتای آزاد شکسته و زیرواحد آلفای آزاد به‌دست می‌آید. زیرواحد بتای آزاد شکسته در کلیه تصفیه شده و به قطعه نهایی به نام هسته بتا (β-Core fragment) تبدیل می‌شود که در ادرار به مقدار زیادی یافت می‌شود [۱۳،۱۲]. اندازه‌گیری هورمون hCG و قطعات آن امروزه در امر تایید بارداری [۱٤]، تشخیص اختلالات بارداری از قبیل سندروم داون [۱۵]، سقط خود به‌خودی و بارداری‌های خارج رحمی [۱] و تشخیص سرطان‌های تروفوبلاستیک (سرطان کوریون و مول مهاجم) و غیرتروفوبلاستیک (سرطان ریه، مثانه، پانکراس، سینه) استفاده می‌شود [۱۷،۱٦،۲]. هم‌چنین، از کاربردهای دیگر این هورمون می‌توان در درمان افرادی که مشکل تخمک گذاری دارند، ساخت واکسن‌های ضدبارداری برای کنترل جمعیت [۲۲-۱۸] و درمان کاپوسی سارکوما (ks) را نام برد [۲٤،۲۳]. با توجه به کاربرد فراوان هورمون hCG در امرتشخیص و درمان، تخلیص این هورمون و قطعات آن با روش‌های کم‌هزینه و با بازدهی بالا، ضروری به‌نظر می‌رسد. تا به امروز تکنیک‌های مختلفی برای جداسازی هورمون hCG، زیر واحدها و قطعات آن صورت گرفته است، اما در تمام این تحقیقات بالاترین خلوص به‌دست آمده در حد استاندارد ارگانون است و از روش‌های طولانی و زمان‌بر استفاده شده است [۲۸-۲۵]. در این تحقیق سعی شده است تا با افزایش درجه خلوص و کوتاه کردن مسیر در رفع این مهم، قدمی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌های مورد استفاده در این مطالعه از منابع زیر می‌باشند: استاندارد hCG (Organon, Netherland)، آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی نشان‌دار شده با (HRP) (Immunotech, Frances)، بازدارنده سوی‌بین‌تریپسین، دی‌گلوکز، دی‌مانوز، O-Phenylenediamine OPD و DAB 3,3′-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, USA) و سایر مواد از شرکت (Merck, Germany)، سانتریفوژ (Beckman J2-MI, USA)، پمپ پریستالتیک (Watson marlow 505S, Germany)، الایزا ریدر (Anthos 2020, Germany).

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های ادرار صبح پنج فرد باردار دو تا سه ماهه حاملگی در داخل ظروف حاوی ۰/۰۵ درصد سدیم آزید جهت جلوگیری از رشد باکتری و یک میلی‌گرم بر لیتر سوی بین‌تریپسین به‌عنوان مهارکننده سرین پروتئازها جمع‌آوری شد [۲۵].

تغلیظ نمونه

برای تغلیظ نمونه‌های ادرار جمع‌آوری شده، ابتدا مواد نامحلول نمونه به‌وسیله سانتریفوژ با دور ۱٤۰۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه حذف گردید. بعد از حذف املاح نامحلول، ۲۵ گرم نمک بنزوات سدیم به ازای هر لیتر به نمونه اضافه گردید. pH نمونه با اسید استیک به ٤ رسانده شد. رسوب شیری رنگ تشکیل شده با دور ۱٤۰۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه جمع‌آوری گردید. رسوب حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر استون به ازای هر لیتر نمونه حل شده و سپس سانتریفوژ گردید و پس از حذف محیط روئی، رسوب به‌دست آمده جهت انجام مراحل بعدی نگهداری شد. از آن‌جایی‌که هورمون hCG در آب به راحتی حل می‌شود، رسوبات به‌دست آمده در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به ازای هر لیتر نمونه به‌مدت ۸ ساعت حل گردیدند. سپس با دور ۱۸۰۰۰g، به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی که حاوی هورمون hCG است جمع‌آوری گردید. برای خلوص بیشتر می‌توان رسوب‌دهی را با استون یا اتانول ادامه داد. در این تحقیق از استون استفاده شد؛ بدین صورت که به میزان دو برابر حجم نمونه، به نمونه استون اضافه گردید رسوب سفید رنگ تشکیل شده با سانتریفوژ با دور ۱۸۰۰۰g، به‌مدت ۳۰ دقیقه جدا گردید، سپس در داخل آب مقطر حل گردید (کلیه مراحل فوق در ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد) [۲٦].

تخلیص هورمون hCG

تخلیص هورمون hCG با عبور نمونه تغلیظ شده به روش رسوب دهی از ستون کروماتوگرافی کانکاناوالین A (Con-A) با اندازه ۱×۵cm انجام گردید. ستون Con-A با ۲۰ حجم از بافر تعادل حاوی تریس‌کلرید هیدروژن ۲۵ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار، کلرید کلسیم ۱۰ میلی‌مولار و کلرید سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۷/٤ به تعادل رسید. نمونه تغلیظ شده به‌روش رسوب‌دهی علیه بافر تعادل به‌مدت یک شبانه روز در دمای c ٤° دیالیز گردید و با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. سپس ستون به‌ترتیب با قندهای گالاکتوز، فروکتوز و دی‌گلوکز نیم‌مولار و محلول جداکننده دی‌مانوز نیم‌مولار با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه جداسازی شد. نمونه‌ها در هر مرحله به حجم یک میلی‌لیتر جمع‌آوری شده و جذب آنها

www.SID.ir

Archive of SID

در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب علیه تعداد نمونه‌ها رسم گردید [۲۹-۲۶].

جداسازی زیرواحد آلفا و بتای هورمون hCG

جهت جداسازی زیرواحد آلفا و بتا، نمونه hCGی خالص شده از ستون Con-A از ستون DEAE-Sepharose 4B با اندازه ۱×۵ cm عبور داده شد. ستون مورد نظر با ۲۰ حجم از بافر تعادل حاوی گلایسین ۰/۰٤ مولار و اوره ۸ مولار با ۷/۵ pH به تعادل رسید. پس از به تعادل رسانیدن نمونه با بافر فوق، pH نمونه با اسیدکلریدریک ۲ نرمال به ٤/۵ رسانده شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد برای جدایی کامل زیرواحدهای آلفا و بتا انکوبه گردید. سپس pH نمونه با سود ۰/۵ نرمال به ۷/۵ pH اصلاح گردید و با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد و ستون با بافر تعادل تا رسیدن جذب به صفر شستشو گردید. جداسازی با استفاده از محلول گلایسین ۰/۲ مولار، اوره ۸ مولار و کلرید سدیم ۰/۵ مولار با ۷/۵ pH و سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد [۳۲-۳۰]. نمونه‌ها با حجم یک میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید و جذب نمونه‌ها در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و نمودار مربوطه (جذب علیه تعداد نمونه‌ها) رسم گردید.

جداسازی و تخلیص باند حد واسط زیر واحد آلفا و بتا

نمونه hCG به‌دست آمده از ستون Con-A علاوه بر باندهای زیر واحد آلفا و بتا دارای یک باند اضافی گلیکوپروتئینی در ناحیه حدواسط بین زیر واحدهای آلفا و بتا است که در SDS-PAGE به‌طور واضح دیده می‌شود (شکل شماره ۲) [۳۳]. جهت جداسازی این باند به روش زیر اقدام شد: برای جداسازی از ستون DEAE-Sepharose 4B با اندازه ۱×۵ cm استفاده گردید. نمونه مورد نظر برای عبور از ستون علیه بافر تعادل (0.05 M Tris/HCl, pH 8.4) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه روز دیالیز گردید. پس از به تعادل رسیدن ستون با ۲۰ حجم از بافر تعادل، نمونه دیالیز شده با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از ستون با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه عبور داده شد. جدا سازی باند حد واسط با اعمال گرادیان نمکی بین صفر تا یک مولار Nacl با سرعت ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام گردید. نمونه‌ها با حجم یک میلی‌لیتر جمع‌آوری شده و جذب آنها در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و نمودار مربوطه رسم گردید.

تأیید نمونه‌های hCG، زیرواحد آلفا و بتا از طریق الایزا و وسترن بلات الایزا: در این روش، از هر یک از نمونه‌های خالص شده (hCG، زیر واحد آلفا و بتا) در بافر PBS با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌های پلاک الایزا اضافه شد. به یکی از چاهک‌ها به‌عنوان کنترل منفی نمونه آلبومین اضافه گردید، بقیه مراحل طبق پروتکل انجام شد [۳٦-۳٤]. آنتی‌بادی‌های اولیه علیه زیرواحد آلفا (Anti α-hCG) و علیه زیرواحد بتا (Anti β-hCG) با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شدند. جهت خواندن از سوبسترای OPD و طول موج ٤۹۲ نانومتر استفاده شد و نمودارهای مربوطه رسم گردید [۳٦] (تمام مراحل فوق در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید). در روش وسترن زیرواحد آلفا، بتا و نمونه hCG به‌طور هم‌زمان تحت شرایط SDS-PAGE، ژل ۱۲/۵ درصد، ولتاژ ۱۲۰، به‌مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز شدند. بقیه مراحل طبق پروتکل انجام شد [۳٦-۳٤]. بعد از انتقال باند، غشاهای نیتروسلولز به‌صورت نوارهایی بریده و هر نوار به‌طور جداگانه در داخل لوله‌های درب‌دار قرار گرفت. هر لوله به‌طور جداگانه با هر یک از آنتی‌بادی‌های اولیه آلفا، بتا و مخلوطی از هر دو آنتی‌بادی به میزان سه میلی‌لیتر با غلظت دو میکروگرم در میلی‌لیتر مجاور شد. بعد از یک ساعت مجاورت با آنتی بادی‌های اولیه، نوارهای بلات شده با محلول شستشو، سه مرتبه شستشو شده و سپس آنتی‌بادی ثانویه به میزان سه میلی‌لیتر با رقت ۱/۲۰۰۰ به هر لوله اضافه گردید. رنگ-آمیزی با استفاده از محلول دی‌آمینوبنزیدین (DAB) انجام شد [۳٦].

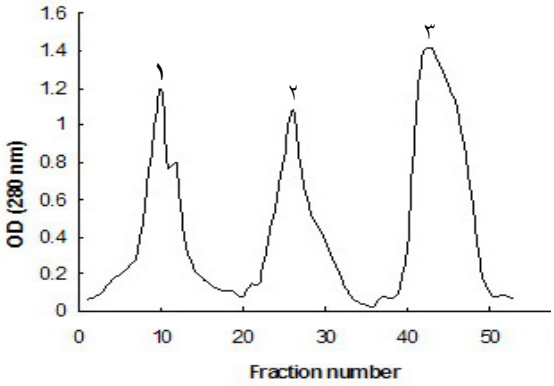
نتایج

تخلیص هورمون hCG

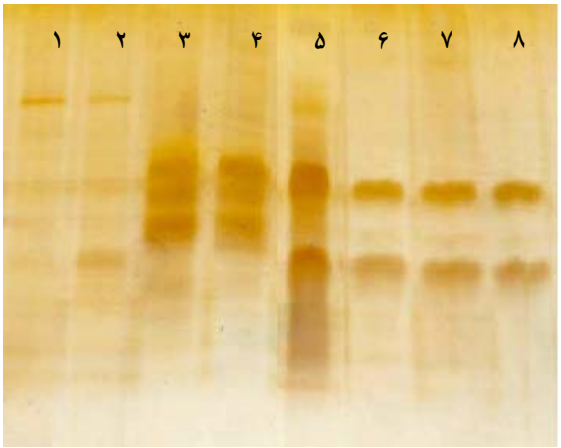
با عبور نمونه تغلیظ شده ادرار از ستون Con-A در نمودار شماره ۱، هورمون hCG و سایر گلیکوپروتئین‌های موجود در نمونه به ستون متصل شده، در حالی‌که پروتئین‌های غیر گلیکوزیله همراه با عبور نمونه و بافر تعادل به‌عنوان flow through از ستون خارج شدند؛ پیک ۱. در ادامه با شستشوی ستون با محلول قند دی‌گلوکز؛ پیک ۲ و با قند دی‌مانوز؛ پیک ۳ جدا گردید. رسم جذب نمونه‌های به‌دست آمده علیه تعداد نمونه‌ها نشان داده شده است. نمونه‌های به‌دست آمده از ستون Con-A همراه با استاندارد hCG تحت شرایط ژل SDS-PAGE، ۱۲/۵ درصد و غیراحیایی به‌مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز گردیدند و سپس ژل مربوطه به‌روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (شکل شماره ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



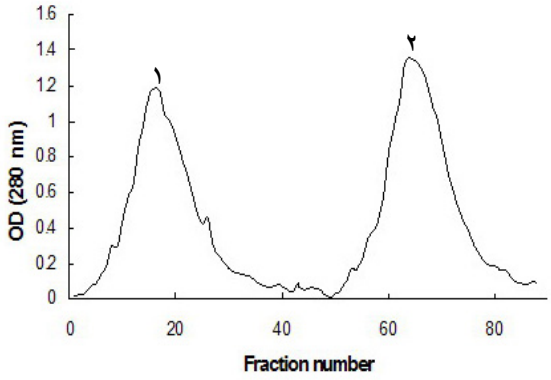
نمودار شماره ۱- خالص سازی هورمون hCG با استفاده از ستون Con-A. پیک ۱: Flow through (پروتئین‌هایی که با عبور نمونه به ستون متصل نشده‌اند)، پیک ۲: جداسازی با دی‌گلوکز یک مولار، پیک ۳: جداسازی با دی‌مانوز یک مولار



شکل شماره ۱- ژل SDS-PAGE (۱۲ درصد، غیر احیایی با رنگ آمیزی نیترات نقره) مربوط به خالص سازی هورمون hCG با استفاده از ستون Con-A. ستون‌های ۱ و ۲ در ژل مربوط به پیک ۱ از نمودار ۱ می‌باشد (پروتئین‌های غیر گلیکوزیله)، ستون‌های ۳ و ٤ در ژل مربوط به پیک ۲ از نمودار ۱ می‌باشد که توسط قند دی‌گلوکز جدا گردید، ستون ٥ مربوط به استاندارد hCG (Organon) است، ستون‌های ٦، ۷ و ۸ در ژل مربوط به پیک ۳ از نمودار ۱ می‌باشد که توسط قند دی‌مانوز جدا گردید (مربوط به hCG).

جداسازی زیر واحد آلفا و بتای هورمون hCG

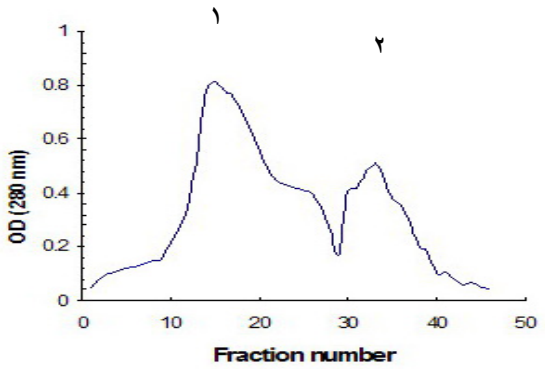
جهت جداسازی و تخلیص زیر واحد آلفا و بتای هورمون hCG از شرایط اوره، حرارت و pH ۷/۵ استفاده گردید. با توجه به pH ایزوالکتریک زیرواحد آلفا، این زیرواحد تحت این شرایط دارای بار خنثی بوده، به‌طوری‌که همراه با عبور نمونه از ستون خارج می‌شود؛ در حالی‌که زیرواحد بتا به‌علت بار مثبت به ستون محکم متصل شده و تحت شرایط نیم مولار نمکی جدا گردید (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- جداسازی زیرواحد آلفا (پیک ۱) و زیر واحد بتا (پیک ۲) با استفاده از ستون DEAE-Sepharose تحت شرایط گرادیان نمکی از صفر تا یک مولار.

جداسازی باند حد واسط زیرواحد آلفا و بتای هورمون hCG

از آنجایی‌که ماهیت این باند برای ما مشخص نبود، از ستون DEAE-Sepharose 4B و گرادیان نمکی برای جداسازی آن استفاده گردید. نمودار به‌دست آمده از این ستون به‌صورت دو پیک مشاهده شد (نمودار شماره ۳)؛ پیک ۱ که با غلظت نمکی ۰/۳ مولار شروع به جدا شدن کرد که حاوی نمونه‌های گلیکوپروتئینی به غیر از باند حد واسط بود، در حالی که پیک دوم با غلظت نمکی ۰/٦ مولار شروع به جدا شدن کرد که حاوی نمونه باند حد واسط بود.



نمودار شماره ۳- جداسازی باند حد واسط زیر واحد آلفا و بتا با استفاده از ستون DEAE-Sepharose با اعمال شرایط گرادیان نمکی از صفر تا یک مولار.

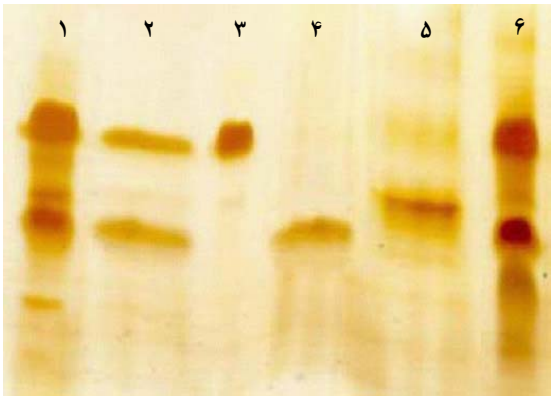
تایید خلوص نمونه‌های hCG، زیرواحد آلفا و بتا و باند حدواسط به‌وسیله الکتروفورز

زیرواحد آلفا و بتای خالص شده از ستون DEAE-Sepharose همراه با استاندارد hCG، hCGی خالص شده از

www.SID.ir

Archive of SID

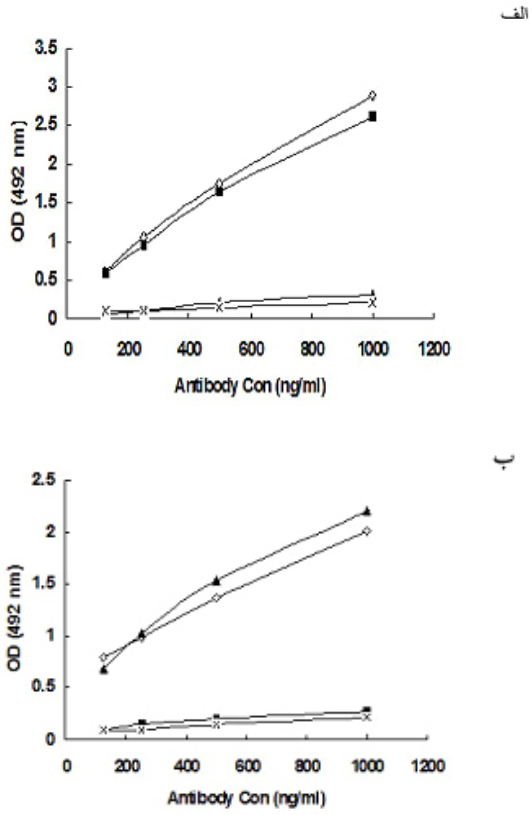
ستون Con-A و hCGی تغلیظ شده به روش رسوب‌دهی تحت شرایط ژل SDS-PAGE، ۱۲/۵ درصد و غیر احیایی به مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز گردیدند و به‌روش نیترات نقره رنگ-آمیزی شدند (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- ژل SDS-PAGE (۱۲ درصد، غیر احیایی با رنگ آمیزی نیترات نقره) جهت مقایسه نمونه های به‌دست آمده به روش تغلیظ سازی و کروماتوگرافی. ستون ۱ نمونه تغلیظ شده از ادرار، ستون ۲ هورمون hCG به‌دست آمده از ستون Con-A، ستون ۳ زیر واحد بتا از ستون DEAE-Sepharose 4B، ستون ٤ زیر واحد آلفا از ستون DEAE-Sepharose 4B، ستون ٥ باند حد واسط زیر واحد آلفا و بتا از ستون DEAE-Sepharose 4B، ستون ٦ استاندارد hCG

تایید صحت نمونه‌های hCG، زیر واحد آلفا و بتا توسط الایزا

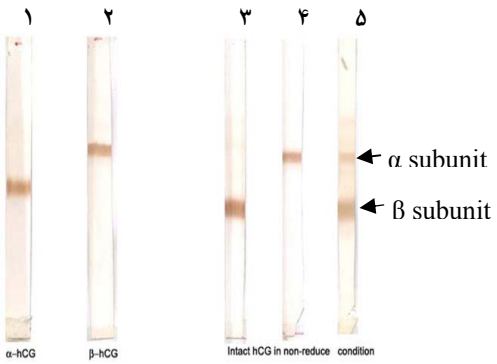
در این آزمایش برای بررسی نمونه‌های به‌دست آمده به ردیف‌های اول و دوم پلاک الایزا زیرواحد آلفا، به ردیف سوم و چهارم زیرواحد بتا و به ردیف پنجم و ششم هورمون hCG اضافه گردید. به ردیف هفتم به‌عنوان کنترل منفی نمونه آلبومین اضافه گردید. در مرحله بعد به ردیف‌های اول، سوم و پنجم آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال ضد آلفا و به ردیف‌های دوم، چهارم و ششم آنتی‌بادی مونوکلونال ضد بتا اضافه گردید. به ردیف هفتم به‌عنوان شاهد، به سه خانه اول آنتی‌بادی مونوکلونال ضد آلفا و به سه خانه بعدی آنتی بادی مونوکلنال ضد بتا اضافه گردید. در پایان با اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه و سوبسترای مربوطه به تمام ردیف‌ها، جذب‌های به‌دست آمده توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شده و نمودارهای مربوطه رسم گردید (نمودار شماره ٤ الف و ب). نتایج در مورد باند حد واسط نشان داده نشده است.



نمودار شماره ٤- مطالعه شناسایی زیر واحدهای آلفا، ■; بتا، ▲ و hCG، ◊، در مقایسه با کنترل منفی: BSA، ×توسط آنتی‌کورهای مونوکلونال الف) ضد آلفا و ب) ضد بتا با روش الایزا

تایید صحت نمونه‌های hCG، زیرواحد آلفا و بتا توسط ایمونوبلات

بعد از ایمونوبلات هم‌زمان نمونه‌های hCG، زیرواحد آلفا و بتا، کاغذ نیتروسلولزی مربوط به هر کدام به‌صورت نوارهایی بریده شده و هر نوار علیه یکی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد آلفا، بتا و مخلوطی از هر دو مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۳). نتایج در مورد باند حد واسط نشان داده نشده است.



شکل شماره ۳- ایمونوبلات hCG و زیر واحدهای آن. نوار ۱ ایمونوبلات زیرواحد آلفای خالص شده علیه مخلوطی از آنتی‌کور ضد آلفا و آنتی‌کور ضد بتا، نوار ۲ ایمونوبلات زیر واحد بتای خالص

www.SID.ir

Archive of SID

شده علیه مخلوطی از آنتی کور ضد آلفا و آنتی کور ضد بتا، نوار ۳ ایمونوبلات hCGی کامل علیه آنتی‌کور ضد آلفا، نوار ٤ ایمونوبلات hCGی کامل علیه آنتی‌کور ضد بتا، نوار ٥ ایمونوبلات hCGی کامل علیه مخلوطی از آنتی‌کور ضد آلفا و آنتی کور ضد بتا

بحث

امروزه از اندازه‌گیری hCG و اشکال آن در تست بارداری، تشخیص اختلالات بارداری و سرطان های تروفوبلاستیک و غیر تروفوبلاستیک استفاده می‌شود. علی‌رغم استفاده از روش ایمونواسی به‌طور وسیع در آزمایشگاه‌ها، کیفیت این سنجش دارای مشکل است که دلیل آن می‌تواند استفاده از کالیبراتورهای سنجش ناخالص باشد [۳۹-۳۷]. آنالیز تعدادی از فرآورده‌های تجاری hCG نشان می‌دهد که اکثر آنها حاوی اشکال تجزیه شده، زیرواحدها و قطعات شکسته شده hCG هستند که استفاده از این نمونه‌های hCG باعث تولید آنتی‌بادی‌های ناخواسته شده، که بالطبع با پایین آمدن کیفیت سنجش همراه است [۳۹،۳۸]. اولین مرحله در خالص‌سازی هورمون hCG از ادرار حذف لیپیدها، نمک‌ها و پپتیدهای کوچک است که در این تحقیق با استفاده از بنزوات سدیم، اسید استیک و استون انجام شد. تا این مرحله در اکثر مقالات ذکر شده است [٤٠]. اما از آنجایی‌که هورمون hCG دارای درصد بالایی از قند است، حلالیت این هورمون در داخل آب بالاست که از این خاصیت استفاده شده و رسوب‌های به‌دست آمده در آب حل گردیدند. سپس، جهت حذف ترکیبات نامحلول سانتریفوژ انجام شد. نمونه به‌دست آمده از این طریق دارای درصد بالایی از hCG بود که در شکل شماره ۱ این نمونه با نمونه شرکت ارگانون مطابقت می‌کند. جهت خالص سازی بیشتر از تکنیک کروماتوگرافی استفاده گردید. از سال ۱۹٦۲ تا به امروز کارهای زیادی با استفاده از تکنیک‌های متفاوت کروماتوگرافی در رابطه با تخلیص هورمون hCG، زیرواحدهای آن و قطعات شکسته شده آن (زنجیره بتای شکسته در ناحیه ٤٧-٤٦ و یا قطعه مرکزی بتا) صورت گرفته است [٤١،٣٣،٣١،٣٠،٢٦،٢٥]. در مورد کارهای انجام شده، بیشتر از تکنیک‌های تغلیظ سازی و کروماتوگرافی مانند HPLC (Reverse phase)، تبادل یونی (DEAE-Sepharose) و ستون تمایلی نسبت به قندها استفاده شده است. کارهای انجام شده با HPLC بیشتر جنبه آنالیتیک و تشخیص کلینیکی داشته و کمتر در مقیاس‌های صنعتی مورد توجه بوده است. از تکنیک HPLC اکثرا برای جداسازی زیرواحد آلفا، بتا و قطعات شکسته شده آن با استفاده از خاصیت هیدروفوبیسیته آنها استفاده گردیده است [٤٢]. در سال ۱۹۹۰ با استفاده از رزین C8 و سفادکس G100 زیرواحدهای هورمون hCG جدا گردید. در این تحقیق از رزین‌های C4 و C18 نیز برای جداساز استفاده گردید که دیده شد کارآیی بالایی ندارند. نمونه‌های به‌دست آمده از رزین C8 و سفادکس G100 در مقایسه با نمونه استاندارد و نمونه ادرار SDS-PAGE شدند که درصد خلوص نسبتاً خوبی را نشان می‌دهند [۲۵]. در مورد کارهای انجام شده با ستون‌های تبادل یونی و تمایلی جواب‌های به‌دست آمده در حد استاندارد hCG از شرکت ارگانون است؛ به‌طوری‌که بر روی ژل علاوه بر زیرواحد آلفا و بتا، باند حد واسط بین دو زیر واحد و تعدادی باند اضافی در پائین زیرواحد آلفا دیده می‌شود (شکل شماره ۲) [۳۱،۲۵،۳۰]. این باندهای اضافی می‌توانند باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی در بدن شوند؛ بنابراین حذف این باندهای اضافی می‌تواند در بهبود استفاده از این هورمون در امر درمان مهم باشد [۲۵]. در کارهای انجام شده با استفاده از ستون میل ترکیبی Con-A فقط از ترکیب قندی دی‌مانوز استفاده شده است، در حالی‌که ما در انجام این تحقیق از سایر قندها مانند گالاکتوز، فروکتوز و گلوکز قبل از استفاده از دی‌مانوز استفاده کردیم که دلیل آن نیز به‌علت وجود متفاوت بودن ترکیب قندی در گلیکوپروتئین‌ها و قطعات مختلف hCG مانند زیرواحد بتا و هسته بتا است [٤٣،٢٦،١٧،٦]. در این تحقیق انتظار می‌رفت که استفاده از این قندها بتواند باعث حذف باندهای اضافی شود. مشاهده شد که در بین این قندها تنها قند دی-گلوکز قادر به جداسازی باندهای اضافی مانند باند حد وسط و سایر گلیکوپروتئین‌ها است. لازم به‌ذکر است از آنجائی‌که امکانات لازم جهت اندازه‌گیری فعالیت بیولوژیک این هورمون موجود نبود، بنابر-این امکان اندازه‌گیری فعالیت مخصوص در حین کار وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

استفاده از ستون Con-A و جداکننده دی‌گلوکز قبل از دی‌مانوز توانست به افزایش خلوص و کوتاه شدن مسیر خالص-سازی هورمون hCG کمک کند. باند حدواسط بین زیرواحدهای آلفا و بتا نیز طی یک مرحله توسط ستون DEAE-Sepharose و گرادیان نمکی حذف شد و بنابر این باعث خلوص تقریبا صد درصدی هورمون hCG گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه اجراشده در دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. از سرکار خانم زرندی کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی که در تهیه مواد و امکانات آزمایشگاهی همکاری کردند، قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

[1] Buster JE, Simon JA. Placental hormones, hormonal preparation for control of parturition, and hormonal diagnosis of pregnancy, In Endocrinology. 2th ed. Edited by Degroot LJ. WB Saunders Company, USA; 1989. p. 2043-73.

[2] Strauss JF, Gafvels M, King BF. In Endocrinology. 3th ed. Degroot LJ. Published by: WB Saunders Company, USA; 1995. p. 2171-207.

[3] Cole LA. Hyperglycosylated hCG. ***Placenta*** 2007; 28(10): 977-86.

[4] Kobata A, Takeuchi M. Structure, pathology and function of the N-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin. ***Biochem Biophysica Acta*** 1990; 1455 (2-3): 315-21.

[5] Korhonen J, Alfthan H, Ylöstalo P, Veldhuis J, Stenman UH. Disappearance of human chorionic gonadotropin and its α- and β-subunits after term pregnancy. ***Clin Chem*** 1997; 43(11): 2155-63.

[6] Cole LA. Hyperglycosylated hCG. ***Placenta*** 2010; 31(8): 653-64.

[7] Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. ***Nature*** 1994; 369(6480): 455-61.

[8] Manjunath P, Sairam MR. Enhanced thermal stability of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. ***J Biol Chem*** 1983; 258(6): 3554-8.

[9] Kardana A, Cole LA. Human chorionic gonadotropin β-subunit nicking enzymes in pregnancy and cancer patient serum. ***J Clin Endocrinol Metab*** 1994; 79(3): 761-7.

[10] Stenman UH, Tiitinen A, Alfthan H, Valmu L. The classification, functions and clinical use of different isoforms of hCG. ***Hum Reprod Update*** 2006; 12(6): 769–84.

[11] Birken S, Kovolevskaya G, O'Connor J. Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms. ***Mol Cell Endocrinol*** 1996; 125(1-2): 121-31.

[12] Okamoto T, Niu R, Matsuo K, Furuhashi M, Ohsawa M, Mizutani S, et al. Human chorionic gonadotropin β-core fragment is directly produced by cancer cells. ***Life Sci*** 2001; 68(8): 861–72.

[13] Cole LA, Kardana A, Park SY, Braunstein GD. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. ***J Clin Endocrinol Met*** 1993; 76(3): 704-10.

[14] O'Connor JF, Birken S, Lustbader JW, Krichevsky A, Chen Y, Canfield RE. Recent advances in the chemistry and Immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. ***Endocr Rev*** 1994; 15(5): 650-82.

[15] Wenestrom KD, Owen J, Chu DC, Boots L. Free β- hCG subunit versus intact hCG in down syndrome screening. ***Obstet Gynecol*** 1995; 90(3): 370-4.

[16] Michel RM, Aguilar JL, Arrieta O. Human chorionic gonadotropin as an angiogenic factor in breast cancer during pregnancy. ***Med Hypotheses*** 2007; 68(5): 1035–40.

[17] Nishimura R, Koizumi T, Yokotani T, Taniguchi R, Morisue K, Yoshimura M, et al. Molecular heterogeneity of hCG β-related glycoproteins and the clinical relevance in trophoblastic and non-trophoblastic tumors. ***Int J Gynecol Obstet*** 1998; 60 Suppl 1: 529-32.

[18] Gupta A, Pal R, Ahlawat S, Bhatia P, Singh O. Enhanced immunogenicity of a contraceptive vaccine using divers synthetic carriers with permissible adjuvant. ***Vaccine*** 2001; 19(25-26): 3384-9.

[19] Delves PJ, Iles RK, Roitt IM, Lunda T. Designing a new generation of anti-hCG vaccines for cancer therapy. ***Mol Cell Endocrinol*** 2007; 260-262: 276–81.

[20] Griffin PD, Jones WR, Stevens VC. Anti-fertility vaccines: currentt status and implications for family planning programmes. ***Reprod Health Matters*** 1994; 3:75.

[21] Naz RK, Gupta SK, Gupta JC, Vyas HK, Talwar AG. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. ***Hum Reprod*** 2005; 20(12): 3271–83.

[22] Pal R, and Singh O. Absence of corpus luteum rescus by chorionic gonadotropin in women immunized with a contraceptive vaccine. ***Fertil Steril*** 2001; 76(2): 332-6.

[23] Tavio M, Nasti G, Simonelli C, Vaccher E, Paoli PD, Giacco M, et al. Human chorionic gonadotropin in the treatment of HIV-related kaposi's sarcoma. ***Eur J Cancer*** 1998; 34(10): 1634-7.

[24] Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Huang PL, Kung HF, Blithe DL, et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV component in β-core preparation of human chorionic gonadotropin. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1999; 96(6): 2678-81.

[25] Sakakibara R, Miyazaki S, Shigemura T, Tominaga N, Sakai A, Ishiguro M. Effective purification of human chorionic conadotropin and its subunits from pregnant women's urinary peptides adsorbed on Reverse-phase resin. ***Chem Pharm Bull (Tokyo)*** 1990; 38(5): 1414-6.

[26] Xu B, Zhu Z, Tang Y, Huang O, Wang X. Purification of human chorionic gonadotropin from urine by membrane filtration affinity chromatography with a positively charged membrane. ***Protein Expr Purif*** 1999; 16(2): 221–3.

[27] Birken S, Maydelman Y, Aawinowicz MA. Preparation and analysis of the common urinary from of human's chorionic gonadotropin. ***Methods*** 2000; 21(1): 3-14.

[28] Manjunath P, Sairam MR. Biochemical, biological, and immunological properties of

www.SID.ir

Archive of SID

chemically deglycosylated human choriogonadotropin. ***J Biol Chem*** 1982; 257(12): 7109-15.
[29] Dufau ML, Tsuruhara T, Catt KJ. Interaction of glycoprotein hormones with agarose concavalin A. ***Biochem Biophys Acta*** 1972; 278(2): 281-92.
[30] Birken S, Chen Y, Gawinowicz MA, Lustbader JW, Pollak S, Agosto G, et al. Separation of nicked human chorionic gonadotropin, intact hCG, and βhCG fragment from standard reference preparations and raw urine samples. ***Endocrinology*** 1993; 133(3):1390-7.
[31] Khademi F, Hamzehee K, Mostafaie A, Hajihossaini R. Purification of three major forms of β-hCG from urine and production of polyclonal antibodies against them. ***Clin Biochem*** 2009; 42 (13-14): 1476-82.
[32] Morgan FJ, Canfield RE, Vitocaitis JL, Ross GT. Properties of the subunit of human chorionic gonadotropin. ***Endocrinology*** 1974; 94(6): 1601-4.
[33] Gam LH, Latiff A. SDS-PAGE Electrophoretic Property of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and its β-subunit. ***Int J Biol Sci*** 2005; 1(3): 103-9.
[34] Mostafaei A. Protein gel electrophoresis a guide to theory and prctice. Kermanshah: Yadavaran; 2005. p. 1- 127. [in Persian]
[35] Laemmili UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage T4. ***Nature*** 1970; 227(5259): 680-5.
[36] Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets: procedure and some applications. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1979; 76(9): 4350-4.
[37] Bock JL. HCG assays. A plea for uniformity. ***Am J Clin Pathol*** 1990; 93(3): 432–3.
[38] Cole LA, Kardana A. Discordant results in human chorionic gonadotropin assays. ***Clin Chem*** 1992; 38(2): 263–70.
[39] Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between method variation in human chorionic gonadotropin test results. ***Clin Chem*** 2004; 50(5): 874–82.
[40] Bambra CS. Purification and properties of baboon chorionic gonadotrophin. ***J Reprod Fertil*** 1987; 79(2): 421-30.
[41] Blith DL, Akar AH, Wehmann RE, Nisula BC. Purification of β-core fragment from pregnancy urine and demonstration that it's carbohydrate moieties differ from those of native human chorionic gonadotropin-β. ***Endocrinology*** 1988; 122(1): 173–80.
[42] Susan P, Susana H, Brian BT, Steven B. High Resolution High Performance Liquid Chromatography Fingerprinting of Purified Human Chorionic Gonadotropin Demonstrates that Oxidation Is a Cause of Hormone Heterogeneity. ***Endocrinology*** 1990; 126(1): 199-208.
[43] Shimojo M, Sakakibara R, Ishiguro M. Purification and characterization of high molecular weight hCG from human first trimester placenta. ***Biol Pharm Bull*** 1995; 18(12): 1637-42.

www.SID.ir