مجله دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران
Archive of SID
سال ۶۲، شماره ۱۱، صفحات ۸۹۴ تا ۹۰۱، (۱۳۸۳)

جداسازی میوگلوبین از قلب حیوانات و مقایسه آن با استاندارد میوگلوبین تجارتی

دکتر صدیقه شمس* - دکتر ملیحه برازنده تهرانی** - دکتر لادن گوهری*** - دکتر مهری کدخدایی*

* دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

** دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

مقدمه: بیماریهای قلبی عروقی از جمله انفارکتوس میوکارد از مهمترین علل مرگ و میر در دنیا می‌باشد که علاوه بر مشکلات روحی و اجتماعی هزینه بسیار بالایی برای کشورها دربردارد. مسلماً کوتاه کردن زمان استقرار علائم تا شروع درمان عامل مهمی در کاهش مرگ و میر و موثر بودن درمان می‌باشد که لازمه آن استفاده از روشهای تشخیصی سریع و دقیق است. از جمله این روشها اندازه‌گیری میوگلوبین در خون بیماران می‌باشد. میوگلوبین ترکیب پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۱۸۰۰۰ دالتون است که ۳-۲ ساعت بعد از آسیب سلول‌های قلبی میزان آن در سرم افزایش می‌یابد. این افزایش سریعتر از آنزیم‌های قلبی نظیر CK و LDH می‌باشد. همچنین در صورت عدم مثبت شدن آزمایش میوگلوبین ۱۰- ۶ ساعت بعد از شروع علائم، وقوع انفارکتوس میوکارد رد می‌شود. بدین ترتیب استفاده از این آزمایش به دلیل تشخیص سریعتر بیماری و شروع به موقع درمان و یا بر عکس رد وقوع انفارکتوس و ترخیص بیمار از بخش مراقبت‌های ویژه کمک اقتصادی زیادی به بیمار و سیستم بهداشتی کشور می‌نماید. متأسفانه انجام این آزمایش در کشور ما روتین نیست که شاید یکی از دلایل آن نداشتن استاندارد این ماده باشد. هدف ما در این طرح پیاده کردن روش جداسازی میوگلوبین از قلب حیوانات و مقایسه آن با استاندارد تجارتی بود تا در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد

مواد و روش‌ها: برای اینکار بافت قلب گوسفند و موش صحرایی را پس از هموژنیزه کردن در سولفات آمونیوم اشباع مورد استفاده قرار دادیم و میوگلوبین را به کمک ستون کروماتوگرافی تعویض یون (کربوکسی متیل سفادکس) و استفاده از بافرهای فسفات و تریس با pH های متفاوت جدا نمودیم و برای تائید وزن مولکولی میوگلوبین جدا شده و در صد خلوص آن از روشهای اندازه گیری طیف جذبی ، ژل فیلتراسیون ، ژل الکتروفورز (SDS- PAGE) و روش ایمونولوژیکی (Cardiac M)استفاده نمودیم.

یافته‌ها، نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: نتایج بدست آمده جداسازی دو ایزوفرم میوگلوبین از قلب گوسفند با وزن مولکولی حدود ۱۷۰۰۰ و ۱۴۵۰۰ و میوگلوبین موش صحرایی با وزن مولکولی ۱۴۵۰۰ دالتون را نشان داد درجه خلوص در بیشتر موارد بیش از ۹۰٪ بود. استاندارد تجارتی مورد استفاده میوگلوبین قلب اسب از شرکت Sigma بود که یک باند با وزن مولکولی حدود ۱۷۰۰۰ را نشان می‌داد.

www.SID.ir

مقدمه

بیماریهای قلبی عروقی از جمله انفارکتوس میوکارد از بزرگترین علل مرگ و میر در دنیا می‌باشد که علاوه بر مشکلات روحی و اجتماعی هزینه بالایی نیز برای کشورها در بر دارد. یک از اصلی‌ترین راه‌های کاستن از مرگ و میر در این مورد تشخیص سریع و دقیق و شروع به موقع درمان است. زمان ایده آل برای درمان بیماران ٦٠-٣٠ دقیقه بعد از وقوع حادثه است از آنجا که حدود ٢٥٪ بیماران مبتلا به درد قفسه سینه بدون علائم تیپک هستند و حتی نوار قلب طبیعی دارند انفارکتوس میوکارد آنها به موقع تشخیص داده نمی‌شود و حتی درصدی از آنها بدون تشخیص از اورژانس مرخص می‌شوند که این امر آنها را در ریسک بالاتر مرگ و میر و یا عوارض ناشی از انفارکتوس قرار می‌دهد (١،٢).

در مقابل حدود نیمی از بیماران با علائم تیپک ، مبتلا به انفارکتوس نیستند که در صورت تشخیص با ترخیص هر چه زودتر از بخش مراقبت های ویژه کمک اقتصادی زیادی به آنها می‌شود و به همین دلیل دسترسی به روشهای سریع و دقیق تشخیصی هم به دلیل اقتصادی و هم مهم‌تر از آن کاربرد روش‌های مراقبتی صحیح از بیماران و کاستن از میزان مرگ و میر ضروری است (٣،٤).

اندازه‌گیری مارکرهای متداول در سرم بیماران نظیر LDH, CK و CKMB برای تائید وقوع حادثه در ساعت‌ها و یا روزهای قبل می‌باشد. اما برای ارزیابی بیمار با درد قفسه سینه و بستری در بخش اورژانس کمک کننده نیست و نیاز به مارکرهای حساس‌تری برای تشخیص سریع‌تر وجود دارد. هر چند نوار قلب از ویژگی زیادی برخوردار است ولی به اندازه کافی حساس نیست. در سال‌های اخیر مارکرهای بیوشیمیایی جدیدی نظیر میوگلوبین، تعیین غلظت CK-MB Mass تروپونین I و T برای تشخیص زود هنگام انفارکتوس میوکارد و تمایز آن از آنژین قفسه صدری و دردهای غیر قلبی قفسه سینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (٥). میوگلوبین ترکیب پروتئینی با وزن مولکولی حدود ١٨٠٠٠ دالتون می‌باشد که وظیفه انتقال اکسیژن را در بافت‌ها به عهده دارد. پس از آسیب بافتی از جمله آسیب سلول‌های قلب میزان میوگلوبین سریعاً در سرم افزایش می‌یابد و این افزایش چند ساعت زودتر از آنزیمهای قلبی مشاهده می‌شود (٦). همچنین شواهدی در دست است که نشان می‌دهد میوگلوبین اختصاصاً از صدمات غیر قابل برگشت و بافت‌های نکروتیک آزاد می‌شود و در حالات ایسکمیک افزایشی از آن در سرم مشاهده نمی‌شود (٧) و بنابراین اندازه‌گیری میوگلوبین مارکر حساسی در تشخیص انفارکتوس میوکارد می‌باشد (٨). میوگلوبین ٢ ساعت بعد از بوجود آمدن آسیب در سرم افزایش می‌یابد و تا حداکثر ٢٤ ساعت به حالت نرمال برمی‌گردد و در صورتیکه ٦ تا ١٠ ساعت بعد از شروع علائم افزایشی نشان ندهد یا به عبارتی منفی باشد وقوع انفارکتوس میوکارد ردمی‌شود (٩). بدلیل اختصاصی نبودن میوگلوبین هرگونه افزایش میوگلوبین باید در ارتباط با سابقه بیمار، فعالیت فیزیکی ارزیابی شود و در صورتی که مشخص شود هیچ صدمه عضلانی و اختلال شدید کلیوی وجود ندارد به احتمال قوی آسیب قلبی به وقوع پیوسته است (٦).

متأسفانه در کشور ما انجام این آزمایش روتین نمی‌باشد که شاید یکی از دلایل آن نداشتن استاندارد این ماده باشد. در حال حاضر این ماده توسط شرکت Sigma تهیه می‌شود و بسته به منشأ تهیه ٣٤/٨ پوند به ازای ١ گرم میوگلوبین قلب اسب و ٧٩/٦ پوند به ازای ٢٥٠ میکروگرم میوگلوبین قلب انسان به فروش می‌رسد. هدف ما از این طرح پیاده کردن روش استخراج میوگلوبین از قلب حیوانات و مقایسه آن با استاندارد خارجی بود تا در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد و لوازم مورد نیاز

جهت کروماتوگرافی تعویض یون و ژل فیلتراسیون کربوکسی متیل سفادکس C25 و سفادکس G50 ساخت کارخانه Pharmacia خریداری شده از شرکت بیوژن، معرف

Archive of SID
www.SID.ir

فولین سیوکالتو Folin-Cieoculto جهت اندازه گیری پروتئین به روش لوری ساخت کارخانه Sigma، مواد لازم برای ژل الکتروفورز(SDS-PAGE) شامل اکریلامید ، بیس اکریلامید، تمد، پرسولفات آمونیم ، کوماسی بریلیانت بلو R_{250} ، برومونل بلو ، ۲- مرکاپتواتانل ، سدیم دودسیل سولفات (SDS) خریداری شده از شرکت بیوژن، کیسه دیالیز با cutoff point وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون، استاندارد میوگلوبین ازشرکت Sigma، مارکرپروتئین از شرکت Sigma، سایر مواد شامل فسفات سدیم منوبازیک ، تریس ، پتاسیم فری سیانايد ، سوکروز ساخت کارخانه Merck، ستون کروماتوگرافی به ابعاد مختلف از شرکت pharmacia، دستگاه الکتروفورز ساخت شرکت اختریان

محلولهای مورد نیاز

بافرA: بافرفسفات ۰/۱ مول در لیتر pH=6.5 حاوی ۱ میلی مول درلیتر EDTA

بافرB : بافرفسفات ۵۰ میلی مول درلیتر pH=6.0

بافرC: بافرتریس هیدروکلراید ۲ مول در لیتر pH=8.5

بافرE : سولفات آمونیم ۷۰٪ اشباع در بافر A

بافر فسفات ۱۰ میلی مول درلیتر pH=7.0 جهت ژل فیلتراسیون

روشهای مورد استفاده

کروماتوگرافی تعویض یون (CM-S) جهت جداسازی میوگلوبین از قلب گوسفند و موش صحرایی

ژل فیلتراسیون (سفادکس G50) جهت مقایسه وزن مولکولی میوگلوبین جدا شده با استاندارد تجارتی میوگلوبین

ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) جهت تعیین وزن مولکولی و درجه خلوص میوگلوبین جداشده و مقایسه با استاندارد

منحنی جذب نوری جهت شناسایی پروتئین جدا شده از قلب گوسفند

روش ایمونولوژیکی Cardiac M برای شناسایی پروتئین جدا شده از قلب گوسفند

اندازه گیری غلظت پروتئین (روش اصلاح شده لوری) جهت تعیین بازده و نیز مشخص کردن حجم نمونه لازم جهت الکتروفورز

Archive of SID

روش جداسازی

الف) تهیه بافت هموژنیزه قلب

قلب تازه گوسفند را پس از تمیز کردن وجداسازی کامل چربی ومواد زائد وزن نموده و به قسمت‌های کوچکتری تقسیم نمودیم. بخشی از آن را برای ادامه کار مورد استفاده قرار داده وبقیه را فریز کردیم.

درمورد موش صحرائی بدلیل کوچکی قلب تعداد ۱۵-۱۰ عدد قلب را مورد استفاده قرار دادیم. موش ها قبلاً در تحقیقات دیگری مورد استفاده قرار گرفته بودند و قلب آنها فریز شده بود . بافت قلب گوسفند را به قطعات بسیار کوچک تقسیم نموده و با ۱/۵ برابر حجم خود بافر E در مخلوط کن قرار داده و آن را هموژنیزه نمودیم. برای این کار بعد از هر ۴۵- ۳۰ ثانیه مخلوط کردن نمونه ۵-۴ دقیقه دستگاه را خاموش کردیم تا بافت بخوبی خیس بخورد. این عمل را تازمانی که یک مخلوط هموژنیزه و یکدستی از نظر قوام و رنگ بدست بیاید ادامه دادیم. برای بدست آوردن نتیجه بهترلازم است این عمل در Cold room (٤ درجه) انجام شود. پس از هموژنیزه کردن بافت ، آن را در دور ۱۲-۱۰ هزار در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و در ٤°C سانتریفوژ نمودیم. مایع رویی به کمک پشم شیشه جدا شده و محلول قرمز رنگ حاصل که اکسی میوگلوبین می‌باشد با افزودن حدود ۱ گرم پتاسیم فری سیانید به ازای هر گرم وزن بافت تازه قلب به فری میوگلوبین که پایدارتر است تبدیل می‌شود. این عمل به کمک همزن در C ° ٤ و به مدت ۱ ساعت انجام شد. سپس محلول را در کیسه دیالیز از قبل آماده شده ریخته و در بافر B دیالیز کردیم.

مدت زمان دیالیز حدود ۲٤ ساعت می‌باشد. دراین مدت دوبار بافر تعویض گردید و بعد از دیالیز، روی کیسه پودر سیلیکاژل ریخته تا مایع درون کیسه تغلیظ گردد. محلول دیالیز و تغلیظ شده تعیین حجم شده و جهت انجام

www.SID.ir

کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت. درصورتی که همه نمونه همان روز مورد استفاده قرار نگیرد می‌توان آن را فریز نمود.

ب) جداسازی میوگلوبین با استفاده از ستون CMS

از یک ستون کروماتوگرافی به ابعاد ٤٠ cm × ١/٥یا (٢٥ Cm × ٢/٥) که باژل کربوکسی متیل سفادکس (که حداقل به مدت ٢٤ ساعت دربافر B خیسانده و متورم شده بود) استفاده نمودیم.

جهت اکی‌لیبره کردن ستون و دیالیز نمونه نیز از بافر B در ٤°C استفاده نمودیم بعد از قراردادن نمونه روی ستون ، بافر A برای شستشوی ستون وجداسازی میوگلوبین مورد استفاده قرارگرفت زمانی که باند میوگلوبین در قسمت پائینی ستون ظاهر شد شستشوی ستون متوقف گردید این عمل در Cold room در ٤°C و باسرعت ml/h ٢٠ انجام شد.

بدین ترتیب که ابتدا ستون حاوی ژل کربوکسی متیل سفارکس را با ١/٥-١ لیتر بافر B اکی لیبره نمودیم. سپس حدود mg ١٠٠ فری سیانید پتاسیم به نمونه از قبل هموژنیزه، دیالیز و تغلیظ شده قلب گوسفند یا موش اضافه نموده و به آرامی حداکثر معادل ٥٪ حجم ستون نمونه روی ژل قرار دادیم. اضافه کردن فری سیانید برای حفظ میوگلوبین درحالت پایدارتر فریک می‌باشد. پس از جذب نمونه روی ژل بافر A به ستون اضافه می‌شود. این بافر به کمک پمپ به آرامی وارد ستون گردید.

بعد از عبور حدود ٧٠-٥٠ میلی لیتر بافر A باند قهوه ای رنگ میوگلوبین در قسمت پائینی ستون ظاهر شد. معمولاً پروتئین‌های غیر هم و اضافی فری‌سیانید از ستون خارج می‌شوند و سیتوکروم و هموگلوبین باقی مانده درنمونه روی ستون برجا می‌ماند. باخارج کردن ژل از ستون باند قهوه ای رنگ در ظرف جداگانه‌ای جمع‌آوری شده و با کمی بافر B مخلوط شد و مجدداً به ستون باریکتری منتقل گردید. دراین مرحله بافر C که حاوی تریس هیدروکلراید با pH=8.5 بود از ستون عبور داده شد. میوگلوبین به صورت فراکسیونهای قهوه رنگی از ستون خارج و جمع‌آوری گردید. این عمل چندین بار تکرار گردیدو فراکسیون های جدا شده از ستون جهت کارهای بعدی فریز شده ویا درصورت امکان ادامه کار درهمان روز انجام می‌شد. جهت تائید و شناسائی میوگلوبین جدا شده روش‌های ژل الکتروفورز DS-PAGE ، جذب نوری در ٤٠٩ نانومتر، ژل فیلتراسیون و روش ایمونولوژیکی Cardiac M استفاده گردید (٨).

Archive of SID

روش های شناسایی

١- **طیف جذبی:** طیف جذبی فراکسیونهای جداشده در طول موج های ٤٠٠-٢٠٠ نانومتر بررسی شد.

الف)ژل فیلتراسیون Gel filtration chromatography

از یک ستون Cm ٤٠ × ١/٥ که باژل سفادکس G50 از قبل آماده پر شده بود استفاده گردید (٨) . بافر فسفات ١٠ میلی مول در لیتر با pH=7 برای دیالیز نمونه ، اکی لیبره کردن ستون و شستشوی آن بکار رفت حجم نمونه cc ١ بود کروماتوگرافی در Cold room انجام گرفت جهت تعیین حجم ستون از دکستران و کرومات پتاسیم استفاده شد.

ب)پلی اکریلامید ژل الکتروفورزیس به همراه سدیم دودسیل سولفات SDS-PAGE

روش اصلاح شده Weber & Osborn(1962) مورد استفاده قرارگرفت (١٠). از ژل ١٢/٥درصد صفحه ای به ابعاد cm ١٤× ١٠ و ژل Stacking ٣ درصد به ارتفاع ٢ سانتی متر استفاده گردید.

نمونه های تعیین مقدار شده از نظر غلظت پروتئین(١٣) به نسبت ١ به ٣ با بافرتخریب کننده حاوی مرکاپتواتانل مخلوط شده و به مدت ٢-١ دقیقه در آب جوش قرارداده شد.

٢٠-٥ میکروگرم پروتئین در حجمی معادل ٥٠- ٢٥ میکرولیتر درمحل نمونه گذاری قرارداده شد الکتروفورز با ولتاژ ثابت ١٥٠ ولت به مدت ٤-٣ ساعت انجام گردید. پس از اینکه مارکر برومونفل بلو تقریباً به انتهای ژل رسید جریان قطع گردیده و ژل‌ها به مدت ٢ ساعت در کوماسی بریلیانت بلو رنگ شدند و سپس یک شب در محلول رنگ

www.SID.ir

قرار داده شدند. برا ی نگه‌داری ژل‌ها از اسید استیک ۷/۵ در صد استفاده گردید.

ج)ژل فیلتراسیون Gel filtration chromatography

از یک ستون Cm ٤٠ × ١/٥ که باژل سفادکس G50 از قبل آماده پر شده بود استفاده گردید (۸). بافر فسفات ۱۰ میلی مول در لیتر با pH=7 برای دیالیز نمونه ، اکی لیبره کردن ستون و شستشوی آن بکار رفت حجم نمونه cc ۱ بود کروماتوگرافی در Cold room انجام گرفت جهت تعیین حجم ستون از دکستران و کرومات پتاسیم استفاده شد.

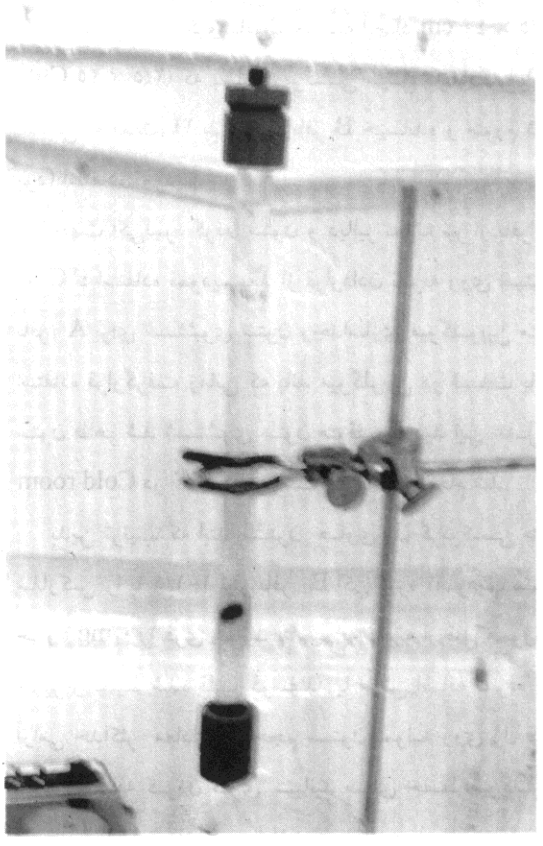
د) روش ایمونولوژیکی

با استفاده از کیت Cardiac M ساخت کارخانه Roche انجام شد. دراین روش از دوآنتی بادی مونوکلونال اختصاصی برای میوگلوبین استفاده می‌شود. یکی از آنتی‌بادی‌ها با طلا نشان دار شده و دیگری متصل به بیوتینیل می‌باشد. آنتی بادی ها با میوگلوبین موجود در نمونه کمپلکس ساندویچی تشکیل می‌دهند. درصورت مثبت بودن تست خط قرمزرنگی درمنطقه واکنش بوجود می‌آید و اضافی آنتی بادی درمحل کنترل جمع میشود که ایجاد خطی مشخص بیانگر صحت کار می‌باشد. هرچه میزان میوگلوبین بیشتر باشد خط قرمز پررنگتر خواهد بود. قسمت نوری دستگاه شدت رنگ را می‌سنجد که با محاسبات انجام شده به صورت غلظت بیان می‌شود. این روش کمتراز ng/ml ۳۰ را به صورت Low و بالاتر از ng/ml ۷۰۰ را به صورت high نشان می‌دهد.

یافته‌ها

میوگلوبین از قلب گوسفند و موش صحرائی توسط کروماتوگرافی ستونی (تعویض یون) حاوی رزین کربوکسی متیل سفادکس جدا گردید. برای تائید و تشخیص میوگلوبین جداشده از روش های مختلف استفاده شد. نتایج بشرح زیر می‌باشد. طیف جذبی : طیف جذبی فراکسیونهای جدا شده بررسی شد. فراکسیونهای جداشده در ٤٠٩ نانومتر که اختصاصی برای میوگلوبین می‌باشد جذب نوری بالایی داشتند (تصویر شماره۱).

Archive of SID



تصویر ۱- باند جدا شده میوگلوبین روی ستون Sephadex عبور بافر A

۱- ژل الکتروفورزیس SDS-PAGE

در الکتروفورز با ژل اکریلامیدمیوگلوبین جداشده از قلب گوسفند اکثرا" به صورت دو باند مجزا مشاهده شد (باند A و B تصویر شماره۲ ستون ۱۲،۱۰،۸،٦،٥) برخی از فراکسیونها حاوی یک باند می‌باشد (تصویر شماره ۲ ستون های ٤ و ۳).

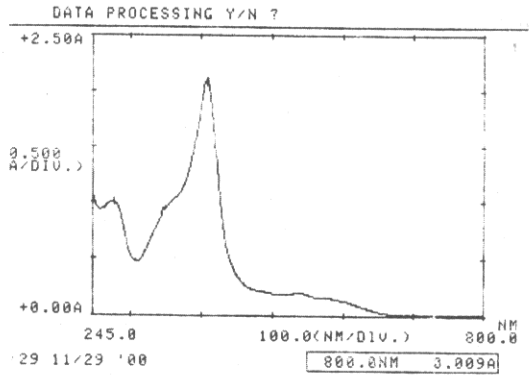
همزمان با الکتروفورز فراکسیون های جداشده، مارکر پروتئینی حاوی سیزده پروتیئن با وزن مولکولی ٦٥۰۰ تا ۲۰٥/۰۰۰ دالتون جهت تعیین وزن مولکولی پروتئینهای جداشده مورد استفاده قرارگرفت (تصویر شماره ۲ ستون۲).

www.SID.ir

Archive of SID

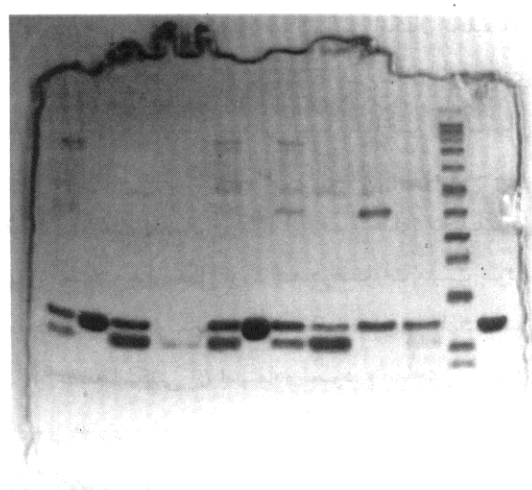
استاندارد تجارتی میوگلوبین قلب اسب (Sigma) نیزمورد استفاده قرارگرفت که با باند A میوگلوبین گوسفند مطابقت داشت (تصویر شماره ٢ ستون ١ و ١١)

اکثراً فراکسیون‌های جدا شده از درجه خلوص نسبتاً بالائی برخوردار بودند. پس از اسکن ژل‌ها درصد باندهای جداشده محاسبه گردید که اغلب دارای خلوص بالای ٩٠٪ بودند (تصویر شماره ٤).



تصویر ٢- طیف جذبی میوگلوبین قلب گوسفند جدا شده $\lambda max=409.280$

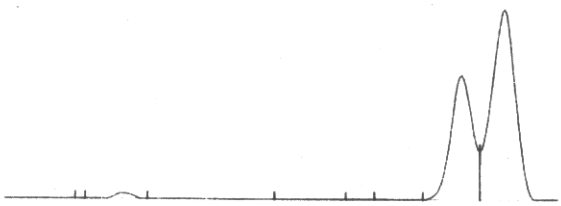
پس از رسم منحنی استاندارد (لگاریتم وزن مولکولی دربرابر Rf پروتیئنهای مختلف)وزن مولکولی پروتئینهای جداشده محاسبه گردید. براین اساس وزن مولکولی باند بالائی (A) ١٧٠٠٠ دالتون و باندپایینی(B) ١٤٥٠٠ دالتون بدست آمد (تصویر شماره ٣).



تصویر شماره ٣- SDS-PAGE pattern از ایزوفورمهای قلب گوسفند (٣،٤،٥،٦،٨،١٠،١٢) ؛ قلب موش صحرایی(٩)، قلب اسب (١،١١) و مارکر پروتئین (٢)

www.SID.ir

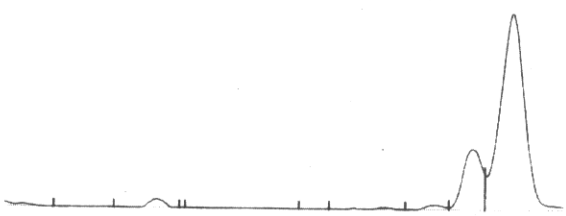
SDS-PAGE Electrophoresis



تصویر ٤- اسکن ژل الکتروفورز از میوگلوبین قلب گوسفند که از ستون CM-Sephaden ایزوله شده است

در مورد موش صحرائی میوگلوبین جدا شده دارای وزن مولکولی ١٤٥٠٠ دالتون ومطابق با باند B میوگلوبین جداشده از قلب گوسفند بود. درجه خلوص باند جداشده ١٠٠ درصد بود (تصویر شماره ٢ ستون ٩ و تصویرشماره ٥).

SDS-PAGE Electrophoresis



تصویر ٥- اسکن ژل الکتروفورز از میوگلوبین قلب موش صحرایی که از ستون CM-Sephaden ایزوله شده است

۳- جهت تائید وزن مولکولی، ژل فیلتراسیون با ستون حاوی سفادکس G50 انجام گردید. ابتدا استاندارد میوگلوبین تجارتی و پس از آن فراکسیون جدا شده از قلب گوسفند مورد استفاده قرارگرفت که تقریباً هر دو استاندارد تجارتی و میوگلوبین جداشده در یک حجم از ستون خارج شدند. که نشان دهنده تطابق بین وزن مولکولی آنها می‌باشد . نکته قابل توجه اینکه هردو باند مشاهده شده روی SDS-PAGE در ژل فیلتراسیون به صورت یک پیک خارج گردید که نشان دهنده حساسیت کمتر ژل فیلتراسیون نسبت به SDS-PAGE برای نشان دادن تفاوت وزن مولکولی دو ایزوفرم می‌باشد.

٤- تست ایمونولوژیکی برای میوگلوبین بر روی چند فراکسیون جدا شده ازقلب گوسفند و موش انجام شد که همگی مثبت بودند.

بحث

این تحقیق در درجه اول نشان داد که روش جداسازی میوگلوبین Sperm whale که درسال ۱۹٦۸ ابداع شده است (١٤) کاملاً مناسب برای جدا نمودن میوگلوبین از قلب گوسفند و موش صحرائی می‌باشد. باتوجه به مطالعات منتشر شده (۸) که دو ایزوفرم از قلب گوسفند راگزارش نموده اند و نیز با انجام تست ایمونولوژیکی و مثبت شدن آن هردوباند مشاهد شده در الکتروفورز فراکسیونهای جداشده مربوط به میوگلوبین میباشد. بنظر می‌رسد با تغییراتی در نحوه جداسازی و دقت بیشتر درکار بتوان دو ایزوفرم را روی ستون از هم جدا نمود.در تحقیقی که در سال ۱۹۹۸ در ژاپن گزارش شده است میوگلوبین عضله اسکلتی Rat شناسایی شده است که یک ایزوفرم اصلی ودو ایزوفرم فرعی از آن گزارش شده است متاسفانه بدلیل عدم دسترسی به اصل مقاله وزن مولکولی آنها برای ما مشخص نیست (۱۵). در تحقیق دیگری در ژاپن در سال ۲۰۰۰ حین کار برای تعیین توالی اسیدهای آمینه نوعی آبزی (Calyptogena Kaikoi) میوگلوبین این جاندار نیز شناسایی شد که وزن مولکولی آن حدود ١٦۰۰۰ دالتون گزارش شده است (١٦).

همانطور که قبلاً گفته شد عمل جداسازی چندین بار تکرار گردید. و فراکسیون های جدا شده جهت کارهای بعدی نگه داری گردید بدلیل مشکلات حین کار و از دست رفتن بخشی از بافت یا محلول هموژنیزه مانند خشک شدن ستون و.... امکان محاسبه بازده در تمام موارد میسر نگردید. در دو مورد محاسبه بازده بعمل آمد که یک بار ۰/٤٥ mg پروتئین به ازای هریک گرم بافت قلب و باردیگر ۱/۳۵ mg/g بافت قلب بود. بنظر میرسد تازه بودن بافت، حفظ شرایط آسپتیک و سرما حین کار و جلوگیری از به هدر رفتن فراکسیون ها و ژل حاوی Mb در افزایش بازده نقش داشته باشد.

Archive of SID

پیشنهادات

از این ترکیب می‌توان به عنوان استاندارد میوگلوبین استفاده کرد که مورد استفاده آن در آزمایشگاههای تشخیص طبی ونیزشرکت‌های سازنده کیت می‌باشد. با بهتر کردن شرایط کار و افزایش درجه خلوص می‌توان از میوگلوبین جدا شده جهت تهیه آنتی‌بادی ضد میوگلوبین استفاده نمود. همچنین با توجه به مشکل بودن استخراج میوگلوبین انسانی از قلب انسان توصیه می‌شود جداسازی میوگلوبین از ادرار انسان صورت پذیراد (۱۱،۱۲).

شناسائی دوایزوفرم برای میوگلوبین امکان تحقیقات بعدی رافراهم می‌کند به این ترتیب که می‌توان آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی برای آنها ساخت وروشهای ایمونواسی اختصاصی و حساس را ابداع نموده همچنین تحقیقاتی درزمینه امکان وجود ایزوفرم های مختلف در بافتهای مختلف بدن بعمل آورد که درصورت مثبت بودن نتیجه در تشخیص وتمایز صدمات بافت‌های مختلف مثل قلب از عضله اسکلتی آن استفاده نمود. و یاحتی راه‌های تشخیصی بهتری برای بیماری‌های عضلانی مختلف ابداع نمود.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مراتب تشکر و قدردانی خود را از اساتید و پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی ، آزمایشگاه شیمی دارویی دانشکده داروسازی و آزمایشگاه مرکز طبی کودکان و مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی اعلام می‌دارند.

www.SID.ir

منابع

1. Mair J., Morandell D, Genser N , et al. Equivalent early sensitivitives of myoglobin, creatine kinanse MB mass, creatine kinase isoform ratios, cardiac tropins I and T for acute myocardial infarction. Clin Chem 1995; 41/9, 1266-1272.

2. Newby L K, Gilber W B , Ohman E M , Christenson R H. Biochemical markers in suspected acute myocardial infarction. Clin Chem 1995; 41/9, 1263-1265.

3. Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Circulation 1993; 88: 750-63.

4. De winter RJ, Koster RW, Sturk A, Sanders GT. Value of myoglobin, troponin T , and CK–MB mass in rulling out an acute myocardial infarction in the emergency room. Circulation 1995; 92: 3401–3407.

5. Mair J, Artner– Dworzak E , Lechleitner P, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immunoturbidimetric assay for myoglobin. Br Heart J 1992; 68: 462–8.

6. Burtis C A , Ashwood E R. Tietz textbook of clinical chemistry; cardiac function third Ed 1999; 1161-1170.

7. Ellis AK, Little T, Xaki Masud AR, Kloclike FJ. Patterns of myoglobin release after reperfusion of injured myocardium. Circulation 1985; 72: 639-47.

8. Wu JT, Pieper RK, Wu LH, Peters JL. Isolation and characterization of myoglobin and its two major informs from sheep heart. Clin Chem 1989; 35/5: 778–782.

9. Bakker AJ, Koelemay MJ, Gorgels JP et al. Troponint and myoglobin at admission : Value of early diagnosis of acute myocardial infarction. Eur Heart J 1994; 15: 45-53.

10. Weber K, Osborn M. The realibility of molcular rate determination by dodecylsulfate–poly acrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem 1969; 224: 4406–12.

11. Kelner MJ, Alexande NM. Rapid separation and identification of myoglobine and hemoglobin in urine by centrifugation through a microconcentration membrane. Clin Chem 1985; 31/1: 112-114.

12. Boultan FE, Huntsman RG. The detection of myoglobin in urine and its distinction from normal and variant hemoglobins. J. Clin Pathol 1971; 24: 816-824.

13. Mary AK, Markwel L, et al. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrance and lipoprotein samples. Analytical Biochemistry 1978; 87: 206-210.

14. Hapner KD, Bradshans RA, Hartxell CR, Gurd FR. Comparison of myoglobins from harbor seal, porpoise and spermwhale. J Biol Chem 1968; 243: 683-9.

15. Enoki ohagay, Ishidate H.Isolation and properties of myoglobin from rat skeletal muscles.Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1998 May; 120(1):183-9.

16. Sunzaki,Kawamichi H, Ohtsuki R, Iwai M ,et al. Isolation and cDNA- derived amino acid sequences of hemoglobin from deep-sea clam Calyptogena Kaikoi, Biochim Biophys Acta 2000 Mar 16; 1478(1):152-8.

www.SID.ir