Archive of SID

جداسازی و تخلیص هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) از ادرار خانمهای باردار

* دکتر امید رجبی، **دکتر عبدالرضا وارسته ،*** دکتر محمد رضا حسیندخت،
****دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز
*گروه داروسازی صنعتی دانشکده داروسازی مشهد و مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی
** مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*** بخش شیمی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد
****گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی مشهد و مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی

خلاصه

هدف از این مطالعه یافتن بهترین روش برای جداسازی هورمون hCG از ادرار و در نهایت تخلیص آن می باشد. روش های مختلفی برای جداسازی این هورمون از ادرار پیشنهاد شده است. در این مطالعه روش های جذبی (جذب بر روی کریستال اسید بنزوئیك)، ترسیبی (ترسیب با استفاده از استن سرد) و اولترافیلتراسیون (با استفاده از فیلتر مسطح) با یکدیگر مقایسه شده اند. جهت تخلیص هورمون hCG به ترتیب از ستون های کروماتوگرافی تعویض آنیونی (DEAE Sephadex A50) و ژل فیلتراسیون (Sephadex G100) استفاده شد.

هورمون خالص شده با استفاده از تکنیك وسترن بلاتینگ شناسایی شد. خلوص و جرم ملکولیhCG (حدود ۵۰۰۰۰ دالتون) و زیر واحدهای آن (۳۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ دالتون) با استفاده از روش الکتروفورز SDS PAGE تعیین گردید. وجود اسید سیالیك بر روی هورمون خالص شده و زیر واحد هایش با استفاده از کیت شناسایی اسید سیالیك بر روی غشاء مورد تایید قرار گرفت. ضریب خاموشی مولی هورمون hCG خالص شده در آب مقطر ($cm^{-1}.mole^{-1}$ ۱۰۴۲۰) تعیین گردید.

راندمان به دست آمده از روش های مختلف جداسازی هورمون hCG از ادرار برای روش های جذب سطحی بر روی کریستال های اسید بنزوئیك، ترسیب با استن سرد و اولترافیلتراسیون با استفاده از فیلتر مسطح به ترتیب ۵۶/۶٪، ۸۸/۶٪ و ۹۲/۳٪ محاسبه شد. پتانسی هورمون خالص شده با استفاده از روش های ایمونولوژیك ۱۷۵۶۰ IU/mg به دست آمد.

کلمات کلیدی: hCG ، روش جذبی، روش ترسیبی، کروماتوگرافی تعویض یونی

مقدمه

هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) عضوی از خانواده چهار گانه هورمون های گلیکوپروتئین بدن آدمی است. سایر أعضاء این خانواده عبارتند از:Thyrotropin (TSH)، Follicotropin (FSH) و Lutropin (LH). این هورمون ها از ۲ زیر واحد α و β تشکیل و بصورت غیر کووالان بهم متصل شده اند. زیر واحد α این هورمون ها از لحاظ ساختمانی مشابه بوده و تفاوت آنها در زیر واحد β می باشد (۷، ۱۵) .

حداکثر غلظت سرمی و ادراری هورمون hCG در طی هفته های ۱۰ الی ۱۲ حاملگی بوده و غلظت آن در خون و ادرار در این زمان به mg/lit ۸-۲ می رسد(۱۴). حذف اسید سیالیك باعث از دست رفتن فعالیت بیولوژیکی هورمونhCG

www.SID.ir

Archive of SID

می شود(۵ و ۲۲). روش های مختلفی برای به دست آوردن هورمون خالص پیشنهاد شده است. تمام آنها دارای ۲ مرحله جداسازی و تخلیص می باشند.

طبق فهرست منتشر شده از سوی معاونت غذایی و دارویی وزارت بهداشت ایران، این هورمون از جمله داروهای وارداتی محسوب می شود که در داخل کشور با مشکلات ساخت همراه است. تنها توزیع کننده آن در کشور شرکت داروپخش است. بر اساس اطلاعات به دست آمده از نمایندگی آن در استان خراسان سالانه بیش از دو میلیون و هشتصد هزار دلار ارز برای خرید این دارو و توزیع در شبکه کشور مصرف می گردد.

هدف از مطالعه حاضر، مقایسه روش های مختلف برای جداسازی و در نهایت تخلیص این هورمون می باشد.

دستگاهها و مواد

دستگاهها : تانك الکتروفورز عمودی و سیستم ترانسفر جهت وسترن بلاتینگ (شرکت پایا پژوهش توس ، ایران)، پمپ پریستالتیك (مدل C5002689) و کالکتور (مدل C4002617 ، Pharmacia ، سوئد)، سانتریفوژ (Aventi ،Beckman ،آمریکا)، سانتریفوژ (شرکت بهداد، ایران)، پمپ اولترافیلتراسیون (مدل XX2800230، میلی پور)، غشاء مسطح (10K-Mini TAN-S، میلی پور)، دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CECIL،Aquarius ،انگلستان)، دستگاه لیوفیلیزاتور (Labconco ،آمریکا) ، غشاء از جنس نیتروسلولز (کیسه دیالیز) با ut off =10000 (سیگما،آمریکا).

مواد: مواد لازم جهت الکتروفورز (Bio Rad ،آمریکا)، کیت اندازه گیری کیفی hCG از ادرار به روش آگلوتیناسیون (شیم آنزیم، ایران) ، کیت اندازه گیری کمی هورمون hCG به روش الایزا (BIOTECX ، آمریکا)، کیت شناسایی کیفی اسید سیالیك (Immun-Blot) و برای شناسایی گلیکو پروتئینها (BioRad،آمریکا)، مارکر جرم ملکولی ، آنتی بادی مونوکلنال علیه زیر واحد β با منشاء موشی (IgG) (Sigma ،آمریکا) ، آنتی بادی ضد ایمونوگلوبین موشی با منشاء خرگوشی کونژوگه با آنزیم پروکسیداز (BioRad ،آمریکا)، ژلهای کروماتوگرافی DEAE Sephadex A50, Sephadex G100 (شرکت pharmacia ،سوئد) ، ۳ و ۳ دی آمینو بنزیدین تتراهیدروکلراید (BioRad ،آمریکا)، سایر مواد شیمیایی از کارخانه Merck ،آلمان.

روش کار

تهیه ادرار

برای تهیه ادرار با تیتر بالای hCG ، از خانم های باردار در اوایل ماه سوم کمك گرفته شد. این خانم ها ابتدا مورد معاینات پزشکی قرار گرفته و پس از تایید سلامتی مادر و جنین (جهت اجتناب از جمع آوری هورمون غیر طبیعی)، جمع آوری ادرار در داخل ظروف پلاستیکی با گنجایش ۱ لیتر، حاوی ۱۰۰ mg پودر سدیم آزید به عنوان عامل جلوگیری از عفونت انجام شد. این نمونه ها پس از جمع آوری و اطمینان از وجود هورمون در آن ها تا زمان جداسازی هورمون در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند(۲).

تعیین مقدار کیفی هورمون

وجود یا عدم وجود هورمون در ادرار اولیه و در تمام مراحل تخلیص با استفاده از کیت شناسایی hCG به روش آگلوتیناسیون مشخص شد.

تعیین مقدار کمی هورمون

تعیین مقدار کمی هورمون به روش الایزا با حساسیت 5mIU/ml صورت گرفت.

جداسازی هورمون از ادرار

برای جداسازی hCG از ادرار مسیرهای مختلفی مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های به دست آمده در هر مسیر از لحاظ میزان ماده خام (کل ماده استحصال شده اعم از هورمون و سایر مواد)، پروتئین تام وhCG مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ترسیب با استن سرد- انحلال مجدد در بافر و ترسیب با الکل (۲): دو حجم استن سرد(۴°C) به یك حجم ادرار سرد(۴°C) به آرامی اضافه شد پس از به هم زدن به مدت یك ساعت در همین دما، رسوبات با سانتریفوژ در دور

www.SID.ir

Archive of SID

۳۰۰۰ g جمع آوری و پس از شستشوی با استن خالص تحت گاز نیتروژن در دمای محیط خشک و در ۲۰°C- نگهداری شدند. رسوب خشک شده در بافر تریس فسفات ۰/۰۵ مولار با pH= ۸/۸ (بافر A)حل شد (هر ۵ گرم رسوب در ۲۰ میلی لیتر بافرA حل شد). پس از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون حاصله با دور ۳۰۰۰ g ترسیب داده شد و محلول شفاف فوقانی جدا گردید. به این محلول تا (V/V) ۴۰٪ اتانل سرد (۴°C) افزوده شد و به مدت۲ ساعت در ۴ °C مخلوط شد. پس از سانتریفوژ (با شتاب ۳۰۰۰ g)محلول فوقانی جدا و به آن تا (V/V)۸۰٪ الکل سرد اضافه گردید. در اثر افزودن اتانل رسوبی در محلول ایجاد گردید. رسوب حاصل ۳ مرتبه با اتانل (V/V)۸۰٪ شسته و پس از انحلال آن در بافر A (هر ۱ گرم رسوب در ۲ میلی لیتر از بافرA) لیوفیلیزه شد و در یخچال نگهداری گردید.

جذب سطحی بر روی اسید بنزوئیک(۱۶): به هر لیتر ادرار ۵۰ گرم اسید بنزوئیک افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴°C مخلوط گردیدند. رسوبات حاصله با استفاده از سانتریفوژ با شتاب (g) ۶۶۰ جدا شد. رسوب حاصل از هر لیتر ادرار در ۳۰۰ میلی لیتر استن ریخته شد. نتیجه این اختلاط انحلال اسید بنزوئیک در استن و ترسیب یك رسوب پروتئینی در کف ظرف بود که با سانتریفوژ (با شتاب ۳۰۰۰g) جدا شد (تمام مراحل فوق در دمای ۴°C انجام شد).این رسوبات پس از جمع آوری، تحت گاز نیتروژن در دمای اطاق خشک و در دمای۲۰°C- نگهداری شدند. رسوب خشک شده مطابق روش فوق الذکر رسوب گیری مجدد، شستشو، لیوفلیزه و نگهداری شد.

استفاده از اولترافیلتراسیون : در این تحقیق از اولترافیلتراسیون بعنوان یك روش ابداعی و جایگزین برای روشهای سنتی جداسازی استفاده شد. قبل از اقدام به اولترافیلتراسیون، ادرار از کاغذ صافی واتمن ۴۲ و سپس از صافی غشایی با قطر منفذ ۰/۴۵μm عبور داده شد تا از عدم وجود ذرات معلق که باعث گرفتن غشاء اولترافیلتراسیون می گردند اطمینان حاصل گردد.

هر لیتر ادرار به این روش تا ۲۰ میلی لیتر تغلیظ گردید. ادرار تغلیظ شده با ۲ برابر حجم خود استن سرد رسوب داده شد. تمام مراحل فوق در دمای ۴°C انجام گرفت. رسوبات حاصله تحت گاز نیتروژن و در دمای اطاق خشک گردیدند و در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. رسوب خشک شده مطابق روش فوق الذکر رسوب گیری مجدد، شستشو، لیوفلیزه و نگهداری شد.

تخلیص هورمون استخراج شده از ادرار(۳، ۴، ۱۰، ۱۲)

جهت تخلیص هورمون استخراج شده از ستون های کروماتوگرافی DEAE Sephadex A-50 و Sephadex G100 به ترتیب با ابعادcm ۲/۵ × ۶۰ وcm ۱/۳ × ۱۸۰ استفاده گردید.

مواد جدا شده از ادرار، حاصل از ۳ روش جذبی، ترسیبی و اولترافیلتراسیون پس از تعیین مقدار هورمون با یکدیگر مخلوط شده و برای مرحله تخلیص استفاده شدند.

استفاده از کروماتوگرافی تعویض آنیونی : پس از انحلال ۱۰ گرم پودر لیوفیلیزه در آب مقطر (هر ۱۰۰ میلی گرم پودر در ۱ میلی لیتر آب مقطر)، محلول حاصل در برابر آب مقطر در ۴°C دیالیز شد. طول مدت دیالیز ۴۸ ساعت بود و در طی آن ۲ مرتبه آب مقطر موجود در ظرف تعویض شد. محلول فوق مستقیما برروی ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE Sephadex A50 ریخته و با بافر A شستشو داده شد. جهت بدست آوردن hCG خالص از گرادیان پله ای نمك طعام با غلظت های ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۱۵ و ۰/۲ مولار استفاده شد. سرعت جریان ml/min ۵ تنظیم گردید. خروجی ستون به صورت واحدهای ۲ میلی لیتری جمع آوری شده و جذب آنها در طول موج nm ۲۸۰ تعیین گردید.

استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون : فراکسیون های حاوی hCG جمع آوری و پس از لیوفیلیزه شدن در ۱/۵ میلی لیتر بافرA حل و از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون Sephadex G100 عبور داده شد. سرعت جریان بافر ml/min ۲ تنظیم شد. خروجی ستون بصورت واحدهای ۲

www.SID.ir

Archive of SID

میلی لیتری جمع آوری و جذب آنها در طول موج ۲۸۰ nm تعیین شد.حجم های دینامیکی ستون (V0,Vt) به ترتیب با استفاده از محلول حاوی ۱۰۰۰ واحد ویتامین B_{12} در ۱ میلی لیتر آب مقطر و محلول ۱٪ دکستران بلو در آب مقطر تعیین شدند(۲).

آنالیز نمونه ها

تعیین میزان پروتئین، هورمون جدا شده و بازده مراحل مختلف جداسازی : تعیین مقدار پروتئین تام به روش برادفورد انجام شد (۶). مقدار βhCG به عنوان شاخصی از میزان هورمون استخراج شده به روش الایزا اندازه گیری شد. برای اندازه گیری میزان βhCG ،رقت های سریالی از هورمون تهیه و تعیین مقدار شد. از تقسیم کردن میزان هورمون جدا شده بر میزان هورمون اولیه موجود در ادرار بازده روش به دست آمد.

الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید(SDS-PAGE): برای بررسی خلوص نمونه ها از تکنیک SDS PAGE استفاده شد . ژل پلی آکریلامید مورد استفاده ۱۲/۵٪ و نحوه ساخت و اجرای عملیات الکتروفورز بر اساس روش غیر مستمر Laemmli انجام شد (۱۱). رنگ آمیزی و رنگ زدایی ژل با استفاده از کوماسی بریلیان بلو و بر اساس روش منتشر شده در مجله Biotechniques انجام گرفت (۱۹).

تعیین وزن مولکولی: برای تعیین وزن ملکولی باندهای حاصل از نمونه های تخلیص شده، از رسم نمودار لگاریتمی وزن مولکولی پروتئین های استاندارد در استاندارد وزن ملکولی استفاده شد . با رسم لگاریتم وزن ملکولی پروتئین های استاندارد در برابر Rf آنها استفاده شد. جرم ملکولی hCG بصورت intact و بصورت تفکیک شده به زیر واحدها بصورت جداگانه به دست آمد.(۲۱).

شناسایی هورمون تخلیص شده توسط وسترن بلاتینگ(Western Blotting): پس از الکتروفورز ژل باندهای پروتئینی حاصل، با استفاده از روش انتقال مرطوب در ولتاژ ۱۰۰ ولت طی یکساعت به غشاء نیترو سلولز منتقل شدند. پس از اشباع محل های خالی این غشاء با محلول BSA-TBS (محلول حاوی ۵٪ از BSA در بافر تریس-هیدروکلراید با مولاریته ۰/۰۱ و نمک طعام ۰/۱۵M با pH= ۷/۶)، در مجاورت رقت۰/۰۱ از آنتی بادی اختصاصی مونوکلونال علیه زیر واحد β در این بافر برای مدت ۳ ساعت قرار گرفت. سپس این غشاء در TBS شسته و در مجاورت آنتی بادی دوم قرار گرفت. آنتی بادی دوم شامل آنتی بادی ضد ایمونوگلوبولین موشی با منشاء خرگوشی کونژوگه شده با آنزیم پروکسیداز با رقت۰/۰۱ درTBS بود. آنتی بادی متصل به آنزیم پراکسیداز با استفاده از مخلوطی از ۶۰ µl از آب اکسیژنه ۳۰٪ در ۱۰۰ ml از TBS و ۶۰ µg از ۳و۳ -دی آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید در ۲۰ ml متانل سرد، قابل روئیت شد. با انداختن این غشا به داخل آب مقطر واکنش ایجاد رنگ متوقف شد(۱۸).

شناسایی کیفی اسید سیالیک برروی غشاء نیتروسلولز : در این قسمت نیز همانند روش وسترن بلاتینگ ابتدا الکتروفورز و سپس انتقال پروتئین از ژل به کاغذ نیتروسلولز انجام شد و مطابق دستوراتی که در کیت شناسایی اسید سیالیک شرکتRio Rad آمده عمل نموده و باندهای پروتئین های حاوی اسید سیالیک برروی کاغذ نیتروسلولز آشکار شدند. اساس کار این کیت مبتنی بر ایجاد باند شیمیایی بین آنزیم آلکالین فسفاتاز با اسید سیالیک است(۱۷).

تعیین ضریب خاموشی هورمون تخلیص شده در آب مقطر : محلول مایی hCG دارای ۲ طول موج ماکزیمم جذب است (۲۰۵ و ۲۷۵ نانومتر). برای محاسبه ضریب خاموشی مولی هورمون تخلیص شده، محلولهای با غلظت های مولی متفاوت بین۸/۶۷ الی ۲۶ میکرومولار در آب مقطر تهیه شد و جذب آنها در طول موج ۲۷۵ nm توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد. شیب نمودار جذب در برابر غلظت مولی هورمون، ضریب خاموشی مولی این ماده می باشد(۸).

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون آماری: در این مطالعه، از آزمون آماری ANOVA برای مقایسه بین گروهها استفاده شد.

نتایج

همانطوری که قبلا ذکر گردید نمونه های ادراری در ظرف های ۱ لیتری جمع آوری و نگهداری شدند. این نمونه ها به ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم و به لحاظ مقدار هورمون مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج موجود در جدول شماره ۱ نشان می دهد که بین این گروهها تفاوت معنی داری وجود ندارد (P> ۰/۰۵).

جدول شماره ۱ : میانگین و انحراف معیار استاندارد میزان hCG ادرای در هر یک از گروه های سه گانه

گروه	تعداد	میانگین میزان هورمون (IU/Lit)	انحراف معیار استاندارد(SD)
۱	۱۰	۳۰۰۶۹	۶۲۹۳/۵
۲	۱۰	۲۹۶۲۷	۶۵۰۹/۴
۳	۱۰	۳۰۴۷۴	۶۳۱۹/۳

روش استفاده از استن سرد بیشترین ماده خام جامد را ایجاد می کند. بین روش های بکار رفته در این مطالعه از نظر میزان ماده خام به لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود دارد (P< ۰/۰۰۱) .

میزان درصد پروتئین موجود در ماده خام جدا شده از ادرار به روش های مختلف تعیین و با یکدیگر مقایسه شده اند. نتایج حاکی از آن است که در روش اولترافیلتراسیون با اینکه وزن ماده خام بسیار کمتر از ۲ روش دیگر است ولی این ماده حاوی مقادیر زیادی پروتئین (بیش از ۸۰ درصد) می باشد. بین روش ترسیب با استن و جذب توسط بنزوئیك اسید تفاوت معنی داری از لحاظ میزان پروتئین در ماده خام جدا شده از ادرار ملاحظه نمی گردد (P> ۰/۰۵).

نتایج حاصل از تعیین وزن ماده خام به دست آمده پس از ترسیب و شستشو با اتانل به روش های مختلف نشان می دهد که وزن ماده خام به دست آمده از روش ترسیب با استن سرد و جذب بر روی اسید بنزوئیك بیش از روش اولترافیلتراسیون است (P< ۰/۰۰۱) ، در حالی که تفاوت معنی داری بین دو روش ترسیب با استن و جذب سطحی توسط اسید بنزوئیك وجود ندارد (P> ۰/۰۵) .

در رابطه با پتانسی ماده خام نهایی در هر روش، نتایج ازتفاوت معنی داری بین روش اولترافیلتراسیون با سایر روشها حکایت دارد(P< ۰/۰۰۱) ، این در حالی است که تفاوت معنی داری بین پتانسی مواد خام به دست آمده از روش جذب سطحی بر روی اسید بنزوئیك وترسیب با استن سرد ملاحظه نمی شود. (P> ۰/۰۵).

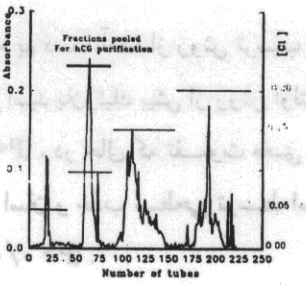
میزان هورمون استخراج شده از ادرار در هر روش را می توان از حاصل ضرب وزن ماده خام نهایی در پتانسی آن به دست آورد. نتایج نشان می دهند که بین روش ترسیب با استن سرد و اولترافیلتراسیون تفاوت معنی داری وجود ندارد (P> ۰/۰۵)، ولی بین این دو روش و روش جذب سطحی توسط اسید بنزوئیك تفاوت معنی داری وجود دارد (P< ۰/۰۰۱)

این مطالعه نشان می دهد که به لحاظ بازده بین روش های تزسیب با استن سرد و اولترافیلتراسیون تفاوت معنی داری وجود ندارد (P> ۰/۰۵)، ولی بین این دو روش و روش جذب سطحی توسط اسید بنزوئیك تفاوت معنی داری وجود دارد(P< ۰/۰۰۱) .

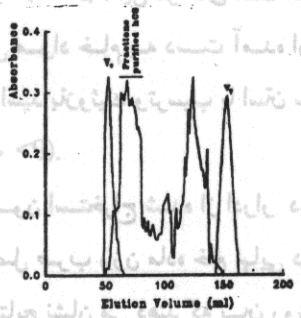
همانطوری که ذکر گردید و در شکل شماره ۱ ملاحظه می شود فراکسیون حاویhCG در بافری با غلظت۰/۱ مولار کلرور سدیم از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی جدا می گردد. در شکل شماره ۲ فراکسیون حاوی hCG که از ستون ژل فیلتراسیون عبور داده شده نمایش داده شده است خلوص این نمونه نیز در شکل شماره ۵ نشان داده شده است وجود اسید سیالیك بر روی غشا به صورت لکه قهوهای رنگی خود را نشان می دهد، این لکه در محل hCG دست نخورده و زیر واحدهای آن ملاحظه می گردد (شکل شماره۷).

www.SID.ir

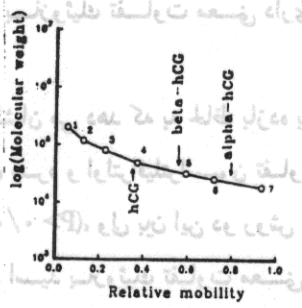
Archive of SID



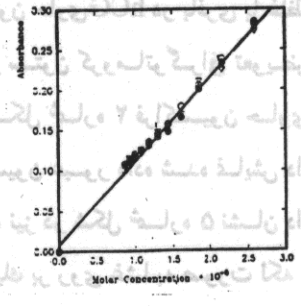
شکل ۱: جداسازی hCG از ادرار خانمهای باردار با استفاده از DEAE Sephadex A-50



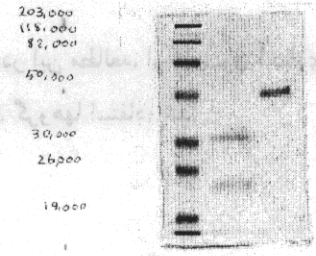
شکل۲: خالص سازی hCG توسط ستون حاوی Sephadex G-100 از فراکسیون حاوی هورمون، تهیه شده از ستون حاوی DEAE Sephadex A-50



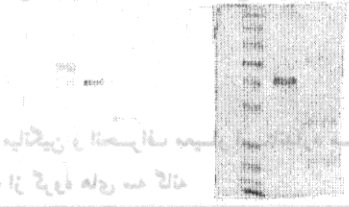
شکل۳: تخمین وزن مولکولی hCG و زیر واحدهای آن توسط روش الکتروفورز روی ژل SDS-Polyacrylamide



شکل ٤: تخمین ضریب خاموشی hCG خالص شده در آب.

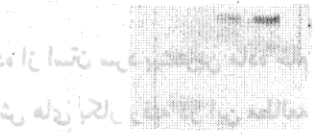


شکل ٥: الکتروفورز hCG و زیر واحدهای آن روی ژل SDS-Polyacylamide

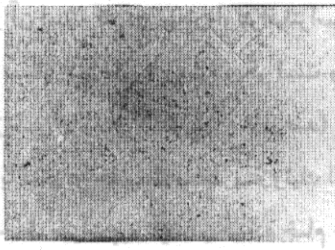


۱	۰/۱		
۲	۰/۱	۷۷۲۸۲	۲\۴۰۵۹
۲	۰/۱	۷۷۲۰۶	۲\۴۱۶۲

شکل ٦: وسترن بلاتینگ hCG و زیر واحدهای آن



شکل ۷: نشان دار کردن اسید سیالیک برروی غشاء



شکل ۸: تشکیل کریستال در رسوب در روش ترسیب با استن سرد (x۲۰۰)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه بین روشهای مختلف جداسازی هورمون hCG از ادرار

روش	وزن ماده خام اولیه از هر لیتر ادرار (mg)	درصد پروتئین در ماده خام اولیه	وزن ماده خام نهایی پس از شستشو و ترسیب با اتانل (mg/lit)	پتانسی ماده خام نهایی (IU/mg)	میزان هورومون موجود در ماده خام نهایی (IU/lit)	بازده (٪)
ترسیب با استن سرد	۱۵۱۳۰	۰/۵۳۲	۱۱/۵۴۵	۲۳۲۴/۵	۲۶۵۷۴	۸۸/۶
جذب بر روی اسید بنزوئیک	۴۰۵۵	۱/۷۴۳	۶/۶۶۸	۲۵۴۳/۱	۱۶۶۰۶	۵۵/۶
اولترافیلتراسیون	۱۰۶/۳۱	۸۶/۵۵	۵/۱۷	۵۳۵۴	۲۷۷۸۶	۹۲/۳

وزن ملکولی hCG خالص حدود ۵۰ KD دالتون و حدود اوزان ملکولی زیر واحدهای β و α آن به ترتیب عبارتند از: ۳۰KD و ۲۰ KD دالتون (شکل شماره ۳).

پس از انجام وسترن بلاتینگ به روش ذکر شده در قسمت روش کار، ۲ لکه قهوه ای روی غشاء نیتروسلولز مشاهده شد. یکی از لکه ها در محدوده جرم ملکولی ۵۰ KD و دیگری در محدوده ۳۰ KD آشکار گردید، که موید hCG و زیر واحد β آن می باشند(شکل ۶) .

شیب شکل ۴ ضریب خاموشی مولی هورمون خالص شده را نشان می دهد که در حدود $cm^{-1}mol^{-1}$ ۱۰۴۲۰ می باشد.

با استفاده از تکنیک الایزا، پتانسی ماده خالص نهایی حدود IU/mg ۱۷۵۶۰ تعیین شد.

بحث

روش ترسیب با استن سرد از جمله روش های با راندمان بالا است که در مقایسه با روش اولترافیلتراسیون دارای مراحل طولانی تر ونیازمند به تسهیلات بیشتری است. در این روش استن با تغییری که در ثابت دی الکتریک ادرار ایجاد می کند با عث رسوب تمام پروتئین ها و مقداری از املاح کم محلول ادرار می شود، لذا کریستالهای درشت اورات و اگزالات در بین رسوبات کف ظرف ملاحظه می گردد (شکل ۸). این مواد حتی تا مراحل آخر جداسازی، همراه ماده خام می مانند. به هر حال این روش دارای این مزیت هم می باشد که چربی ها و مواد محلول در چربی را از ادرار حذف می کند.

روش جذب سطحی بر روی بنزوئیک اسید بدلیل راندمان پائین آن توصیه نمی شود. این ماده قادر نیست که تمام هورمون موجود در ادرار را به خود جذب کند.

با توجه به نتایج به دست آمده از فرایند جداسازی می توان ادعا کرد که اولترافیلتراسیون در بین سایر روش ها از سهولت و راندمان بالاتری بر خوردار است.

پس از طی فرایند طولانی خالص سازی، در نهایت ماده خالص بدست آمد. با توجه به جرم ملکولی این ماده و اجرام ملکولی زیر واحد های آن و با توجه به نتیجه وسترن بلاتینگ می توان نتیجه گیری کرد که ماده تخلیص شده از خلوص بالایی برخوردار است. نتیجه وسترن بلاتینگ و تست های شیمی فیزیکی بر روی هورمون خالص شده چون تعیین ضریب خاموشی مولی و تعیین ثابت سرعت تفکیک وجود هورمون را تائید می کنند.

میزان ضریب خاموشی مولی هورمون خالص استاندارد ۱۲۰۰۰ می باشد که در قیاس با ضریب خاموشی مولی هورمون خالص شده در این مطالعه (۱۰۴۲۰) اندکی بیشتر است. با توجه به اینکه پتانسی هورمون خالص استاندارد حدود IU/mg ۲۰۰۰۰ می باشد این گمان بوجود می آید که تفاوت در ضرایب خاموشی ممکن است به لحاظ اختلاف در خلوص باشد(۸).

وجود اسید سیالیک بر روی زیر واحدهای ماده تخلیص شده احتمال فعال بودن بیولوژیکی آن را تقویت می بخشد(۹). گرچه مطالعات اولیه در این مورد، فعال بودن این ماده را به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

in vivo اثبات کرده است، ولی تعیین میزان پتانسی این ماده از جمله امور مهمی است که اهتمام به آن لازم و ضروری است و در مقالات بعدی به آن پرداخته خواهد شد. لذا در حال حاضر استفاده از واژه ماده موثره دارویی به این ماده خالص شده صحیح نمی باشد. کمااینکه از این ماده می توان جهت ساخت آنتی بادی پلی کلونال که در کیت های تشخیص بارداری مصرف دارد، استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مولفین مراتب تشکر و قدر دانی خود را از پرسنل محترم بخش ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، پرسنل محترم آزمایشگاه هورمون شناسی بیمارستان امام رضا(ع)، پرسنل محترم آزمایشگاه های شیمی تجزیه و روش های دستگاهی دانشکده داروسازی اعلام می دارند.

References

1. Aloj S. M., Edelhoch H., Ingham K. C., 1973, The Rate of dissociation and rassociation of subunits of humam chorionic gonadotropin, Arch. Biochem. and Biophys., 159:497-504
2. Andrew K. *et al.*, 1991, Heterogenicity of human Chorionic Gonadotropin (hCG), Endocrinology, 129:1541-1550.
3. Bahl O. P., 1969, Human chorionic gonadotropin . I: Purification and phsicochemical properties, J. Biol. Chem., 244:567-572.
4. Bell J. J., Canfield R. E., and Sciarra J. J., 1969, Purification and characterization of human chorionic gonadotropin, Endocrinology, 84:298-306.
5. Birken S., Koralevcokay G. and O'connor J., 1996, Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms, Mol. Cell. Endocrinol.,125:121-131.
6. Bradford M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principal of protein – day binding, Anal. Biochem.,72:248-252.
7. Fiddes J. C. & Talmadge K., 1984, Structure, expression and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones, Recent Progress in Hormone Research, 40:43-78.
8. Forastieri H., Ingham K. C., 1982, Thermal stability of human chorionic gonadotropin, J. Biological Chemistery, 257: 7976-7981.
9. Gottschalk A., Whitten W. K. and Garham E. R. B., 1960, Inactivation pf follicle-estimulating hormone by enzymic release of sialic acid, Biochim. Biophys. Acta, 38 : 183-184.
10. Goverde B. C., Veen Kamp F. J. N. and Homan J. D. H., 1968, Studies on human chorionic gonadotropin. II: chemical copmosation and its relation to biologcal activity, Acta Endocrinol., 59: 105.
11. Laemmli U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685.
12. Mori K. F., 1970, Anigenic structure of human gonadotropins: importance of proyein moiety to the antigenic structure of human chorionic gonadotropin, Endocrinology, 86: 97-103.
13. Morse J. H., Lustbader J. W., Harrington J. W., Canfield R. E., 1988, Heterogenity of proteins in commercial preparations of human chorionic gonadotropin (hCG) doemonstrated by Western Blotting, Am. J. Reproduct. Immunology and Microbiology, 17: 137-140.
14. O'connor J. F., Birken S., Lustbader J. W., Krichevsky A. Chen Y. and Canfield R. E., 1994, Recent advances in the chemistery and Immunochemistery of human chorionic gonadotropin: Impact on clinical measurements, Endocr. Rev., 15: 650-683.
15. Pierce J. & Parsons T. F., 1981, Glycoproteinhormones: structure and function, Annual Review of Biochemistery, 50: 465-495.
16. Rene' Got et Roland Burillon, 1960, Nouvelle methode de purification de la gonadotropin choriole humain, Biochem. Biophys. Acta., 181: 426-436.
17. Sialic acid labeling on a memberane (protocol 1B) in Immun-Blot kit for glycoprotein detection, Instruction Manual Catalog Number 170-6490
18. Towbin H., Staehlin T., Gordon J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellose sheets: Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 76:4350-4354.
19. Unnameous, 2000, Heating greatly speed coomassie blue staining and destaining, Biotechniques, 28: 426-432.
20. Van 8 Hell H. *et al.*, 1968, Purification, characterization and immunochemical properties of human chorionic gonadotropin, Nature, 211-212.
21. Weber K., Osborn M., 1969, The Reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophresis, J. Biological Chemistry, 244: 4406-4412.
22. Wide L., Lee J. Y. and Rasmussen C., 1994, A change in the isoforms of human chorionic gonadoropin occurs arround the 13th week of gestation, J. Clin. Endocrinol. Metab., 78: 1419-1423.

www.SID.ir