بررسی انواع کلاژن جفت های ایرانی به منظور تعیین میزان استاندارد برای کلاژن های جفتی

رقیه عباسعلی پور کبیره[۱]، حسین محجوب[۲]

یافته / سال ششم/ شماره ۲۰

چکیده

مقدمه: تغییرات در شکل کلاژن های بافتی همراه با بعضی اختلالات ژنتیکی و متابولیکی گزارش شده است. این تغییرات با اندازه گیری زنجیره های کلاژن از طریق الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) به طور کمی تخمین پذیر است. این مطالعه به منظور یافتن ارتباط بین کلاژن های جفت انسانی طبیعی و ترم ایرانی و تعیین میزان استاندارد برای کلاژن های جفتی میزان کلاژن، توتال پروتئین، درصد زنجیره های کلاژن ها و حرکت الکتروفورتیکی صورت گرفته است.

مواد و روشها: بدین منظور برای استخراج کلاژن نوع IV تعداد پنج جفت طبیعی و ترم (۳۸ هفته ای) فقط یک بار و برای استخراج کلاژن نوع I+III تعداد پنج جفت طبیعی و ترم (۳۸ هفته ای) دو بار تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند. مراحل استخراج کلاژن ها با الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات کنترل شد.

یافته ها: در این بررسی معلوم شد بین میزان کلاژن نوع IV جفت و پروتئین توتال، مقدار ضریب همبستگی ($r = 0.993$) و بین وزن جفت بعد از شستشوی کامل با میزان کلاژن نوع I + III ضریب همبستگی ($r = 0.77$) دارد .

نتیجه گیری: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که میزان زنجیره α1 کلاژن نوع III حدود ۲۳درصد کلاژن تام است.

واژه های کلیدی: کلاژن نوع IV ، کلاژن نوع I + III، الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید، جفت انسان

۱- عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

۲- عضو هیئت علمی گروه آمار زیستی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان

www.SID.ir

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

مقدمه

بافت همبند بافتی است که در ساختمان اعضای بدن شرکت دارد و مسئول فرم و شکل بدن حیوانات است (۱). کلاژن ها که فراوان ترین پروتئین بدن پستانداران هستند (۲) ساختمان بافت همبند را مستحکم کرده و در شکل گیری، شیموتاکسی، چسبندگی سلولی، تجمع و پیوستگی پلاکت ها برای هموستاز و ترومبوژنز دخالت دارند (۳،۴،۵). بافت همبند و جزء مهم آن کلاژن به علت توزیع فراوان بافتی اهمیت خاصی دارد (۲).

اختلال در هر یک از واکنش های شیمیایی که در ایجاد ساختمان کامل کلاژن نقش دارند ، سبب پیدایش خواص مکانیکی غیر طبیعی می شود (۱،۳). بیماری های ژنتیکی کلاژن به علت تظاهرات بالینی متعدد و ایجاد اختلالات مهم در بدن توجه فراوان محققین را جلب کرده است. این بیماری ها یا به علت اختلال در واکنش های شیمیایی بیوسنتز کلاژن و نقص در تکمیل ساختمانی کلاژن است و یا به علت کاهش در مقدار سنتز کلاژن و کمبود کلاژن های بافت همبند می باشد (۱،۴). در بیماری ارثی استئوژنز ناقص[1] در بافت های همبند (استخوان، پوست، تاندون، چشم، گوش و دندان) کلاژن نوع I کاهش می یابد و فیبروبلاست های جدا شده از پوست نسبت به فیبرو بلاست های نرمال مقدار کلاژن نوع III بیشتری در invitro سنتز می کنند (۳،۵). در حالی که در سندرم اهلرز-دانلوس[2] نوع IV میزان سنتز کلاژن نوع III در بافت های همبند (پوست و سیستم عروقی) کاهش می یابد. در نوزادان نارس به علت کمبود آنزیم هیدروکسی پرولین اکسیداز، دفع ادراری هیدروکسی پرولین زیاد است و کلاژن استخوان از دست می‌رود. از جملـه تغییـرات آسیب شناختی همـراه با فرآیند پیـری، از دست رفتـن کلاژن و پروتئوگلیکان ها است. در سندرم زودرس پیری، ظرفیت رشد فیبرو بلاست ها کاهش می یابد.

انواع مختلف کلاژن در invivo شناسایی شده است و در دهه اخیر از بسیاری از محققین جفت انسان به عنوان ماده اولیه جهت استخراج و مشخص کردن انواع مختلف کلاژن ورد استفاده کرده اند (۱۰). جفت که یک ارگان واسطه بین مادر و جنین است به علت غنی بودن از کلاژن توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است (۱۱،۱۲). نظر به اینکه بعد از اولین هضم آنزیمی کلاژن نوع IV و بعد از دومین هضم آنزیمی کلاژن نوع I + III جفت انسان استحراج می شود و حرکت الکتروفورتیکی آن در الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات۳ (SDS-PAGE)[3] قابل بررسی است (۹)، کلاژن نوع IV و کلاژن نوع I + III تعدادی جفت که از نظر علم مامایی بعد از زایمان طبیعی و ترم تشخیص داده شده استخراج و از نظر میزان کلاژن خالص، میزان پروتئین کل و حرکت التروفورتیکی بررسی کرده تا بتوانیم همانند پروتئین های سرم در صد معینی را بطور نسبی بیان کنیم و یک میزان استاندارد برای کلاژن های جفت گزارش نماییم.

مواد و روشها

مواد شیمیایی:

اتانل ۹۸٪، اسید فرمیک۹۹٪، کوماسی بریلیانت بلو G-250، اسید سیتریک و سیترات سدیم نوع Dihydrat Crystalin، استاندارد پروتئین با وزن ملکولی بالا، پپسین با فعالیت ۰/۷ Fipunit /mg، سود سوز آور و کلرید سدیم از جمله موادی بود که همه از شرکت سیگما[4] تهیه شد .

شستشو و آماده نمودن بافت:

برای انجام هر گونه کار بر روی جفت لازم است ابتدا شستشوی کافی روی آن صورت گیرد تا خون آن کاملا" پاک شود. چون کلاژن پروتئین نامحلول و تقریبا" پایدار است

1-Osteogenesis Imperfecta 2-Ehlers-Danlos type IV
3-Sodium Dodesyl Poly Acryl amid Gel Electrophoresis
4. Sigma

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

بنابراین شستشو را می توان در محیط ۴ درجه سانتیگراد و در زمان طولانی انجام داد (۹). خلاصه روش به شرح زیر است:

ابتدا بند ناف، کیسه آمنیون و کوریون را از جفت جدا کرده و سپس آن را با یک بیستوری به قطعات بسیار کوچک تقسیم کردیم. جفت قطعه قطعه شده را برای شستشو به ترتیب در محلولهای زیر قرار دادیم :

- ۲۰۰ میلی لیتر محلول مایع حاوی ۸ درصد اتانل، نمک کلرید سدیم به غلظت ۶ گرم بر لیتر و مقداری سلولز
- محلول سیترات سدیم ۰/۰۵ مولار و PH= ۷/۲
- محلول اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار و PH=۸/۲
- محلول اسید فرمیک ۰/۰۵ مولار

بعد از انجام مراحل شستشو بافت های سفید شده بدست آمد که آماده هضم آنزیمی بودند.

استخراج کلاژن نوع IV از بافت جفت:

برای جداسازی این نوع کلاژن، بافت جفت فقط یک بار تحت هضم آنزیمی قرار می گیرد (۹). خلاصه روش به شرح زیر است:

۰/۰۱ گرم از پپسین نوع Fipunit /mg ۰/۷ در ۲۰ میلی لیتر اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار حل شد و بافت های شستشو داده شده برای هضم آنزیمی به مدت ۲۴ ساعت در آن قرار گرفت، عمل هضم آنزیمی در محیط ۱۰ درجه سانتیگراد و در حال تکان خوردن محلول انجام گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر برای خنثی کردن اثر پروتئازی پپسین به آن اضافه شد و محلول با اضافه کردن سود ۴ نرمال از حالت اسیدی به PH=۷/۵ تغییر پیدا کرد و بعد از ۲۴ ساعت سانتریفوژ گردید. رسوب دور ریخته شد و محلول رویی که حاوی کلاژن نوع IV بود، نگه داشته شد. رسوب گیری پروتئین ها با افزایش غلظت نمک به ترتیب در دو PH خنثی و اسیدی انجام شد. در PH =۷/۵ غلظت نمک به ۱/۲ مولار و در PH =۲/۸ غلظت نمک به ۰/۶ مولار رسید. بعد از طی مراحل فوق رسوب حاصله که حاوی کلاژن نوع IV بود با سانتریفوژ جدا گردید و توتال پروتئین آن را به وسیله روش برادفورد[1] اندازه گیری شد (۱۰).

استخراج کلاژن نوع I+III از بافت جفت:

برای جداسازی کلاژن نوع I+III بافت جفت دو بار تحت هضم آنزیمی قرار می گیرد (۱۱). خلاصه روش به شرح زیر است:

۰/۰۱ گرم از پپسین نوع Fipunit/gr ۹۰۰۰ در ۷۰ میلی لیتر اسید فرمیک ۰/۵ مولار حل شد و بافت مورد نظر برای اولین هضم آنزیمی به مدت ۶ ساعت در آن قرار گرفت. سپس ۰/۰۱ گرم از همان آنزیم پپسین برای دومین هضم آنزیمی به محلول اضافه شد. هر دو مرحله هضم آنزیمی در محیط ۴ درجه سانتی گراد و در حال تکان خوردن مخلوط انجام گرفت. بعد از آن که یک شب از دومین هضم آنزیمی گذشت، مخلوط با دور ۱۰۰۰۰g به مدت یک ساعت سانتریفوژ شد.

۶۵ میلی لیتر مایع رویی جدا شد و سپس پروتئین های موجود در محلول رویی با افزایش غلظت نمک رسوب داده شد. ۴/۶۲ گرم نمک در محیط ۴ درجه سانتیگراد و در حال تکان خوردن اضافه گردید تا غلظت نمک در محلول به ۱/۲ مولار برسد. بعد از ۶ ساعت تکان خوردن، رسوب پروتئینی حاصله که حاوی کلاژن نوع I + III بود را با سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰g و به مدت یک ساعت از محلول جدا گردید و پروتئین کل آن به روش برادفورد اندازه گیری شد (۱۰).

الکتروفورز بر پایه ژل سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید (SDS-PAGE):

نمونه های مراحل مختلف استخراج و تخلیص با الکتروفورز بر پایه ژل ۵٪ پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) به روش Laemilli (۱۱) کنترل شد. برای بررسی باندهای پروتئینی، ژل های الکتروفورز شده در دستگاه دانسیومتر LKB-2202 در طول موج ۶۲۸/۵ نانومتر اسکن گردید.

1. Bradford

Archive of SID

www.SID.ir

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

یافته ها

آنزیم پپسین باعث حل شدن کلاژن غشای پایه و جدا شدن آن از بافت جفت می شود. چون پپسین نواحی غیر مار پیچ سه گانه کلاژن را پروتئولیز می کند، زنجیره های α1 و α2 کلاژن نوع IV به قطعاتی با وزن ملکولی متفاوت شکسته می شود. پپسین، پروتئین های دیگر جفت را حل می کند و به سوپر ناتانت می‌آورد. بنابراین پروتئین اندازه گیری شده بعد از هضم آنزیمی، مجموع پروتئین کلاژن و سایر پروتئین ها است (جدول ۱).

جدول ۱ : وزن بافت جفت‌ها از ابتدا تا مرحله آخر تخلیص

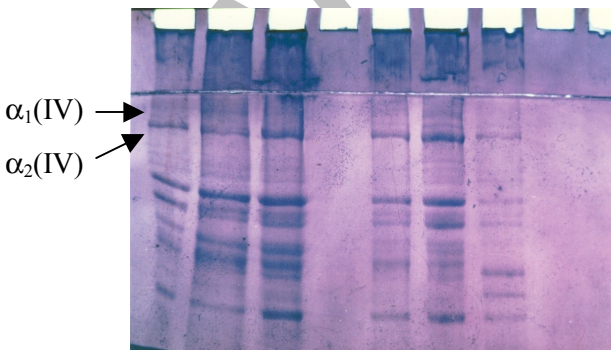
مراحل مختلف پروسه استخراج و تخلیص کلاژن نوع IV	وزن بافت (گرم)					میانگین	انحراف معیار	فاصله اطمینان ٪۹۵
	۱	۲	۳	۴	۵			
وزن اولیه جفت	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۰	۱۰
وزن جفت سفید شده بعد از آخرین مرحله شستشو	۷/۰۴	۷/۸۴	۸/۷۷	۷/۷۵	۸/۵۸	۷/۹۹	۰/۶۹	(۸/۸۶ و ۷/۱۳)
وزن جفت بعد از هضم آنزیمی	۷/۵۶	۸/۰۴	۸/۲۳	۸/۰۰	۸/۷۲	۸/۱۱	۰/۴۲	(۸/۶۳ و ۷/۵۹)
وزن رسوب پروتئین حاصل از افزایش غلظت نمک تا ۱/۲ مولار	۰/۸۳	۰/۶۲	۰/۴۱	۰/۵۷	۰/۵۲	۰/۵۹	۰/۱۵	(۰/۷۸ و ۰/۴۰)
وزن رسوب پروتئین حاصل از افزایش غلظت نمک تا ۰/۶ مولار	۰/۴۳	۰/۴۶	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۲۴	۰/۳۶	۰/۰۹	(۰/۴۷ و ۰/۲۵)
میزان پروتئین توتال بعد از افزایش غلظت نمک تا ۰/۶ مولار mg / ml	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۳۱	۰/۲۹	۰/۲۰	۰/۳۲	۰/۰۸	(۰/۴۲ و ۰/۲۲)

بین محصول نهایی و مقدار پروتئین تام ضریب همبستگی برابر با (r = ۰/۹۹۳) بوده است که نشانه ضریب همبستگی بالا است. نتایج درصد باند های پپتیدی کلاژن نوع ۴، پنج جفت طبیعی و ترم در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- درصد باند های پپتیدی کلاژن نوع IV پنج جفت طبیعی و ترم

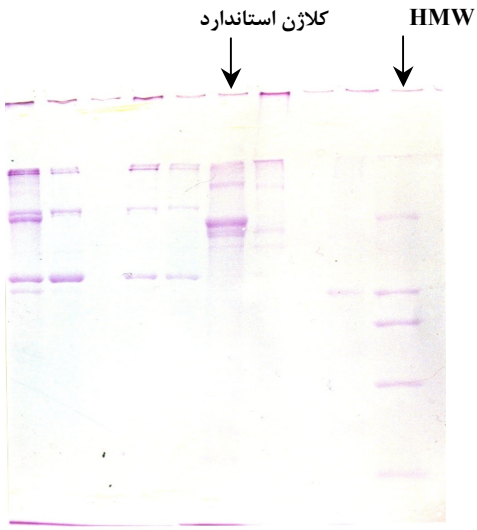
شماره نمونه	درصد باند های پپتیدی		
	باند اول	باند دوم	باند سوم
۱	۴۰/۵۱	۲۱/۴۵	۳۸/۰۳
۲	۵/۹۶	۳۵/۵	۵۸/۵۰
۳	۱/۵۱	۱۶/۲۷	۸۲/۲۱
۴	۲۲/۵۹	۶۱/۵۰	۱۵/۸۹
۵	۳/۱۳۲	۴۷/۸۹	۴۸/۹۶

محاسبات آماری نتایج نشان داد که در نمونه های بررسی شده بین میزان کلاژن ها (نوع ۴) و در صد باند های پپتیدی رابطه ای وجود ندارد. برای بررسی زنجیره های کلاژنی، کلاژن نوع ۴ به دست آمده از ۵ جفت طبیعی و ترم را روی ژل ۵٪ آکریل آمید الکتروفورز SDS-PAGE کردیم و ژل‌ها را با کوماسی بریلانت بلو رنگ آمیزی نمودیم (شکل ۱و۲).



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی کلاژن نوع IV از جفت های طبیعی و ترم روی ژل ۵٪ با رنگ آمیزی کوماسی بریلانت بلو

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com



شکل ۲- مقایسه کلاژن نوع IV استخراج شده و کلاژن نوع IV استاندارد و پروتئین با وزن ملکولی بالا(HMW)

ژل های الکتروفورز شده را اسکن و درصد زنجیره های پپتیدی را به دست آوردیم (جدول ۳).

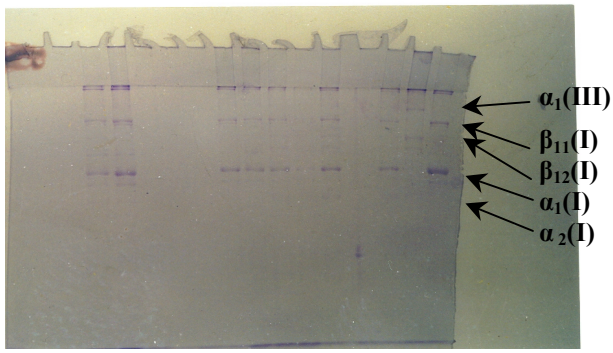
نتایج حاصل از استخراج کلاژن نوع I + III در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان می دهد بین وزن بافت بعد از آخرین مرحله شستشو و محصول نهایی ضریب همبستگی برابر با ۰/ ۷۷ بوده است.

زنجیره های کلاژن های به دست آمده را به صورت ذکر شده فوق الکتروفورز و رنگ آمیزی نمودیم (شکل ۳و۴)

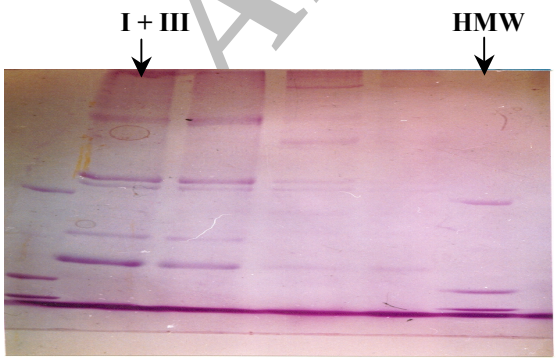
بعد از اسکن نمودن ژل ها در صد باند ها را به دست آوردیم (جدول ۴). محاسبات آماری نتایج نشان داد که در نمونه های بررسی شده میزان زنجیره α1 (III) حدود ۲۳ درصد کلاژن تام است.

جدول ۳ : وزن بافت جفت‌ها از ابتدا تا مرحله آخر تخلیص

مراحل مختلف فرآیند استخراج و تخلیص کلاژن نوع I+III	وزن بافت (گرم) ۱	۲	۳	۴	۵	میانگین	انحراف معیار	فاصله اطمینان ٪۹۵
وزن اولیه جفت	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۰	۱۰
وزن جفت سفید شده بعد از آخرین مرحله شستشو	۷/۰۱	۸/۲۱	۷/۳۶	۷/۱۲	۸/۰۵	۷/۵۵	۰/۵۵	(۸/۲۳ و ۶/۸۷)
وزن جفت بعد از دومین هضم آنزیمی	۷/۱۲	۸/۴۰	۷/۵۶	۷/۲۳	۸/۲۳	۷/۷۱	۰/۵۸	(۸/۴۳ و ۶/۹۹)
وزن رسوب پروتئین حاصل از افزایش غلظت نمک تا ۱/۲ مولار	۵/۱۰	۶/۳۴	۶/۰۰	۵/۳۵	۵/۷۰	۵/۷۰	۰/۴۹	(۶/۳۱ و ۵/۰۸)
میزان پروتئین تام بعد از افزایش غلظت نمک تا ۲ / ۱مولار mg/ml	۰/۰۵۱	۰/۰۲۰	۰/۰۵۵	۰/۰۵۷	۰/۰۵۰	۰/۰۴۷	۰/۰۱۵	(۰/۰۲۸و۰/۰۶۵)



شکل۳ - الگوی الکتروفورزی کلاژن نوع I + III از جفت های طبیعی و ترم روی ژل ۵٪ با رنگ آمیزی کوماسی بریلانت بلو



شکل ۴- مقایسه کلاژن نوع I + III استخراج شده با کلاژن I + III استاندارد و پروتئین با وزن ملکولی بالا (HMW)

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

جدول ۴- درصد باند های پپتیدی کلاژن نوع I + III پنج جفت طبیعی و ترم

شماره نمونه باندهای پپتیدی	درصد باندهای پپتیدی				
	α_1 (III)	β_{11} (I)	β_{12} (I)	α_1 (I)	α_2 (I)
۱	۴۰/۴۵	۱۳/۸۴	۱۲/۸۱	۲۰/۴۳	۱۲/۳۹
۲	۲۱/۲۰	۱۲/۷۰	۱۰/۸۵	۳۵/۸۷	۱۹/۳۶
۳	۲۰/۱۱	۵/۷۸	۵/۷۰	۵۰/۹۹	۱۷/۴۰
۴	۱۷/۴۳	۲ /۲۶	۲/۱۸	۵۳/۹۲	۲۴/۱۸
۵	۱۶/۵۲	۹ /۲۹	۱۲/۸۰	۴۲/۷۸	۱۸/۵۸

بحث

تغییرات در شکل کلاژن های بافتی همراه با بعضی اختلالات ژنتیکی و متابولیکی گزارش شده است که این تغییرات با اندازه گیری زنجیره های کلاژن از طریق الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) به طور کمی تخمین پذیر است (۱۲). سال های زیادی است که الکتروفورز بر پایه ژل پلی آکریل آمید مناسب‌ترین و عملی‌ترین شیوه برای جدا کردن و تعیین کمیت زنجیره های آلفا کلاژن به حساب می آید (۱۳). البته گزارشات جدید تر نشان داده اند که ممکن است HPLC جانشین مناسبی برای این کار باشد (۱۴،۱۵،۱۶). مدتهاست که از اندازه گیری زنجیره های کلاژن به دست آمده درالکتروفورز SDS-PAGE و رنگ آمیزی شده با کوماسی بریلانت بلو برای مقایسه انواع کلاژن در حالت طبیعی و غیر طبیعی استفاده می شود. در مطالعات تغییرات نسبت مقدار کلاژن نوع I به III در نمونه های کوچک بیوپسی تاندون، عروق خونی و پلاگ های آترواسکلروز (۱۷)، مزیت اندازه گیری انواع کلاژن در تعیین مراحل بعضی از بیماری ها مثل التهاب آلوئولی (۱۸)، افزایش قابل توجه میزان کلاژن نوع ۱ و ۴ در بافت های غیر طبیعی کلیوی (۱۹) و هم چنین تعیین نسبت زنجیره های α_1(III) به α_1(I) + α_1(II) در نمونه های بسیار کوچک بیوپسی شده در بررسی غضروف (۲۰) بحث شده است. در بعضی از گزارشات، برای تحلیل کلاژن نوع ۳، روش الکتروفورز SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی کوماسی بریلانت بلو با روش ایمونو بلاتینگ ترکیب شده است. در این روش ترکیبی تغییرات در شکل کلاژن نوع III بافت ها همراه با افزایش سن بررسی شده است (۲۱).

در مطالعه حاضر به منظور یافتن ارتباط بین کلاژن های جفت و تعیین میزان استاندارد برای کلاژن های جفتی، میزان کلاژن، پروتئین کل، درصد زنجیره های کلاژن ها و حرکت الکتروفورتیکی تعدادی جفت طبیعی و ترم ایرانی را بررسی کردیم. در ده نمونه بررسی شده انتظار داشتیم نسبتی بین کلاژن ها وجود داشته باشد و بتوانیم همانند پروتئین های سرم درصد معینی را بطور نسبی بیان نماییم، محاسبات آماری نتایج نشان داد که در نمونه های بررسی شده بین میزان کلاژن ها (نوع ۴) و در صد باند های پپتیدی رابطه ای وجود ندارد؛ ولی میزان زنجیره α1 (III) حدود ۲۳ درصد کلاژن تام است و بین وزن بافت بعد از آخرین مرحله شستشو و محصول نهایی (کلاژن نوع I + III) ضریب همبستگی برابر با ۰/ ۷۷ است. با این حال به نظر می رسد باید نمونه های بیشتری را بررسی کنیم تا بتوانیم یک میزان استاندارد برای کلاژن های جفتی معلوم نماییم و یا میزان متفاوت انواع کلاژن ها را نتیجه گیری کنیم و با مطالعه حالات فیزیولوژیکی کودک در سال های رشد اهمیت هر یک از آنها را در بافت همبند بررسی و رابطه ای بین افزایش یا کاهش انواع کلاژن ها و تظاهرات بالینی نتیجه گیری کنیم

References

1. Smith JR. Pathophysiology, 2nd ed. Philadelphia; WB. Saunders, 1985; 611- 653
2. Smolenski KA, Fallon A, Light N. Investigation of the parameters for reversed-phase high- performance liquid chromatography of collagen types I and III. J Chromatography, 1984; 287: 29-44
3. Blum S. Polyacrylamid gel electrophoresis of native collagen. J Chromatography, 1990; 530: 432-437

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

۱۳. عباسعلی پورکبیره، ر؛ پاسالار، پ. و ملک نیا، ن. الگوی الکتروفورزی کلاژن جدا شده از یک جفت نابالغ و مقایسه آن کلاژن جفت بالغ. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۱، شمارهٔ مسلسل ۲۳

14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem, 1976; 72: 248-254
15. Klasson S. The effect of tissue pretreatment and pepsin levels on the isolation of collagen from human placenta. Collagen Relat Res 1986; 6: 397-408
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685
17. Nakamura K, Inoue S, Abiko S, Aoki H, Takeo K. Improved separation of alpha chains of collagen type I, type III, and type V by non-interrupted electrophoresis using thioglycolic acid as a negatively charged reducer. Electrophoresis, 1989 Jan; 10(1): 29-33
18. Sokolov BP, Sher BM, Kalinin VN. Modified method for peptide mapping of collagen chains using cyanogens bromide-cleavage of protein within polyacrylamide gels. Anal Biochem 1989; 176: 365-367
19. Skinner SJ, Grego B, Hearn MT, Liggins GC. The separation of collagen alpha-chains by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Comparison of column alkyl stationary phases and temperature effects. J Chromatogr. 1984 Jun; 8(308):111-119
20. Van der Rest M, Fietzek PP. A comprehensive approach to the study of collagen primary structure based on high-

4. Chiang TM. Collagen-Platelet intraction. J Thromb Res, 1990; 59: 509-520
5. Kawamoto Y. Procoagulant activity of collagen. J Biochem Biophys 1990; 1053: 361-368
6. Lapiere CM, Nusgens BV. The extracellular matrix and its regulation. Pathol Biol, 1992 Feb;40(2):133-8.
7. Cabral WA, Mertts MV, Makareeva E. Type I collagen triplet duplication mutation in lethal osteogenesis imperfecta shifts register of alpha chains throughout the helix and disrupts incorporation of mutant helices into fibrils and extracellular matrix. J Biol Chem, 2003 Mar 21; 278(12): 10006-12
8. Yang Z, Yu X, Huang F, Xie H. The influence of type I collagen on the cell behavior of human embryonic periosteous osteoblasts. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 2001 Mar; 32(1): 1-4
9. Wang WM, Lee S, Steiglitz BM, Scott IC, Lebares CC, Alen ML, et al. Transforming growth factor-beta induces secretion of activated ADAMTS-2. A procollagen III N-proteinase. J Biol Chem 2003 May 23; 278(21): 19549-19557
10. Tiollier, Jermo. Fibroblast behavior on gels of type I and II human placental collagens. Experimental cell research 1990; 191: 95-104
11. Foidart JM, Tryggvason K, Robey PG, Liotta LA, Martin GR. Biosynthesis of type IV and V (alpha A-alpha B) collagens by human placenta. Coll Relat Res, 1981 Feb; 1(2): 137-50
12. Rajabi MR. Elevated tissue levels of collagenase during dilation of uterine cervix in human parturition. Am. J. Obstet Gynecol, 1990; 163: 499-505

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

performance liquid chromatography. Eur J Biochem, 1982 Jul;125(3):491-496
21. Miller EJ, Narkates AJ, Niemann MA. Amino acid analysis of collagen hydrolysates by reverse-phase high-performance liquid chromatography of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. J Anal Biochem, 1990; 190: 92-97
22. Hanson AN, Bentley JP. Quantitation of type I to type III collagen ratios in small samples of human tendon, blood vessels, and atherosclerotic plaque. Anal Biochem, 1983 Apr 1; 130(1): 32-40.
23. Kirk JM, Heard BE, Kerr I, Turner-Warwick M, Laurent GJ. Quantitation of types I and III collagen in biopsy lung samples from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. Coll Relat Res. 1984 May; 4(3): 169-82.
24. Bellon G, Borel JP. Quantitative evaluation of collagen fractions separated by acrylamide gel electrophoresis: its application for collagen typing in normal and pathological tissues. J Chromatogr. 1988 Dec 9; 433: 81-94.
25. O'Driscoll SW, Commisso CN, Fitzsimmons JS. Type II collagen quantification in experimental chondrogenesis. Osteoarthritis Cartilage, 1995 Sep; 3(3): 197-203.
26. Takasago T, Nakamura K, Kashiwagi S, Inoue S, Ito H, Takeo K. Analysis of collagen type III by uninterrupted sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting: changes in collagen type III polymorphism in aging rats. Electrophoresis.1992 Jun; 13(6): 373-8.

Archive of SID
www.SID.ir
This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com