● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال هفتم، شمارهٔ ۱ (پی‌درپی ۲۵)، صفحه ١٤ الی ۲۱، زمستان ۱۳۸۳
دریافت:۸۲/٤/۲۵ پذیرش: ۸۲/۱۱/۲

استخراج و تخلیص فریتین از بافت کبد

دکتر رضا بهجتی اردکانی[۱*]، دکتر محمدرضا صادقی[۲]، رویا قدس[۱]، علی احمد بیات[۳]، دکتر محمود جدی تهرانی[۴]

۱- عضو هیأت علمی پژوهشکده ابن سینا ۲- استادیار گروه غدد و تولید مثل پژوهشکده ابن سینا ۳- کارشناس زیست شناسی مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال ۴- استادیار گروه ایمونولوژی پژوهشکده ابن سینا

سابقه و هدف: مولکول فریتین با وزن مولکولی ۴۵۰ کیلودالتون، پروتئین اصلی ذخیره کننده آهن می‌باشد که از ۲۴ زیرواحد شامل زنجیره‌های سبک و سنگین تشکیل شده است و هر مولکول آن می‌تواند ۴۵۰۰ اتم آهن فریک را در خود ذخیره نماید. هدف این مطالعه، تعیین تخلیص فریتین با درجه خلوص بالا جهت استفاده در سیستم‌های تشخیصی و تحقیقاتی می بلشد.

مواد و روشها: در این مطالعه با استفاده از حرارت دادن بافت هموژنیزه شده کبد در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد، رسوب دادن با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون با سفادکس G-200، فریتین از این بافت استخراج و تخلیص گردید. به منظور افزایش درجه خلوص فریتین کروماتوگرافی چرخشی مورد استفاده قرار گرفت. پروتئین حاصل، در ژل پلی‌آکریلامید در مجاورت سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز گردید (SDS-PAGE). از آزمون الایزا و رنگ‌آمیزی ژل با پتاسیم فری‌سیانید برای اطمینان از حصول فریتین و از رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره جهت اطمینان از درجهٔ خلوص فریتین استفاده شد. جهت تائید وجود زیرواحدهای ۱۹ و ۲۱ کیلودالتون، فریتین حاصله در شرایط احیاء در حضور ۲- مرکاپتو اتانول الکتروفورز شد.

یافته‌ها: در این روش فریتین کاملاً خالص بدست آمد و بازده این روش ۱۰۰ میکروگرم فریتین به ازای هر گرم بافت تازه کبد بود. الکتروفورز فریتین در شرایط احیاء در حضور ۲- مرکاپتو اتانول، وجود زیرواحدهای ۱۹ و ۲۱ کیلودالتون را در این پروتئین تائید نمود.

نتیجه‌گیری: روش مورد استفاده جهت استخراج و تخلیص فریتین از بافت کبد منجر به تولید فریتین با درجه خلوص بسیار بالا گردید که برای استفاده در زمینه‌های تشخیصی و تحقیقاتی مناسب بوده و بازده این روش نسبت به مطالعات دیگر قابل قبول می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ***فریتین، تخلیص، کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون، کروماتوگرافی چرخشی .***

مقدمه

فریتین پروتئین اصلی ذخیره‌کننده آهن در درون سلول می باشد که برای اولین بار توسط Laufberger در سال ۱۹۳۷ جدا و کریستالیزه شد (۱). این پروتئین نقشی کلیدی در متابولیسم این عنصر بازی می‌کند. توانایی فریتین در ذخیره آهن نقشی دوگانه شامل مسمومیت‌زدایی آهن و ذخیره آن را به این مولکول می‌دهد. هر مولکول فریتین ۲۴ زیرواحد دارد که با یکدیگر پوششی توخالی را ایجاد می‌کنند. این مولکول می‌تواند حداکثر تا ۴۵۰۰ اتم آهن سه ظرفیتی را به صورت ترکیب غیر آلی در خود جای دهد. مولکول

▣ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۲۰۰۲۵ از اعتبارات سازمان مدیریت و برنامه ریزی کشور تأمین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]

فریتین مهره‌داران دارای دو نوع زیرواحد می‌باشد. یکی زنجیره سنگین (H-chain) با وزن مولکولی ۲۱ کیلودالتون و دیگری زنجیره سبک (L-chain) با وزن مولکولی ۱۹ کیلودالتون. در پستانداران زنجیره‌های L و H حدوداً ۵۴٪ با هم تشابه دارند در حالی که زنجیره‌های H درحدود ۹۰٪ و زنجیره‌های L درحدود ۸۵٪ با هم تشابه دارند. فریتین عضلات، تیموس و گلبول‌های قرمز خون انسان از ۲۰ زنجیره سنگین و ۴ زنجیره سبک تشکیل شده است. فریتین کبد و طحال دارای ۳-۲ زنجیره سنگین و ۲۲-۲۱ زنجیره سبک می‌باشد و فریتین قلب، مغز و لنفوسیت‌ها بین این‌دو است. فریتین سرم تماماً از زنجیره سبک تشکیل شده است. به علت تشابه بیشتر فریتین کبد و طحال با فریتین سرم و ذخایر بالای فریتین در این دو عضو، از آنها برای استخراج فریتین استفاده می‌شود (۱).

باندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی متعدد در درون و بین زیرواحدها باعث پایداری فریتین در برابر حرارت شده است و روش معمول تهیه فریتین حرارت دادن بافت هموژنیزه شده کبد در دمای ۷۵-۷۰ درجه سانتیگراد می‌باشد (۲). فریتین را می‌توان با روش‌های مختلفی مثل کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون (۳)، کروماتوگرافی تعویض یونی (۴) و حرارت دادن بافت هموژنیزه شده در مجاورت متانول (۵) تخلیص نمود. نقطه ایزوالکتریک فریتین برابر ۴/۸، وزن مولکولی آن ۴۵۰ کیلودالتون و ضریب رسوب آن ۱۸s-۱۷ می‌باشد(۶). فریتین را در میکرو ارگانیسم‌ها (۷) و گیاهانی مانند سویا (۸) نیز می‌توان پیدا نمود.

فریتین سرم قابل اعتمادترین شاخص ذخایر تام آهن بدن می‌باشد (۹). لذا اندازه‌گیری آن به طور معمول توسط پزشکان درخواست می‌شود. علاوه بر این فریتین در تهیه آنتی‌بادی‌های منوکلونال و پلی‌کلونال ضد فریتین (۱۰)، تهیه استانداردهای کیت‌های تشخیصی (۱۱)، حامل مولکول‌های کوچک در ایمونیزاسیون (۱۲)، ایجاد بار منفی بر سطح سلول جهت مطالعه غشاء سلولی (۱۳) و مارکر پروتئینی در میکروسکوپ الکترونی به علت دانسیته الکترونی بالا (۱۴) کاربرد دارد. با توجه به کاربرد وسیع فریتین در زمینه‌های تشخیصی و تحقیقاتی و هزینه بسیار بالای فریتین عرضه شده توسط شرکت‌های خارجی، این سوال مطرح است که آیا می‌توان فریتین را با هزینه پایین و بازده و خلوص بالا تخلیص نمود؟ این تحقیق برای پاسخ به این سوال طراحی و اجرا گردیده است.

مواد و روشها

استخراج و تخلیص فریتین از بافت کبد گوسفند و انسان: ابتدا با استفاده از پودر سفادکس G-200 (Pharmacia, Lot#: 8024) ستون کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون با ابعاد ۸۵×۱/۷ سانتی‌متر و حجم فضای مرده(Void volume) معادل۴۰میلی‌لیتر تهیه شد(۱۵). با توجه به محدودیت تهیه کبد انسان و نظر به تشابه ساختمانی فریتین انسان و گوسفند (۱)، ابتدا سیستم تخلیص فریتین از کبد گوسفند به روش Crichton و همکارانش (۳) با کمی تغییرات اجرا و بهینه سازی شد و در مرحله بعد، پس از کسب موافقت کمیته اخلاق پزشکی، مقداری از بافت کبد انسان، از سازمان پزشکی قانونی کشور تهیه شد و قبل از استفاده، از نظر آلودگی با HIV، HBV و HCV مورد مطالعه قرار گرفت تا از عدم آلودگی آن اطمینان حاصل گردد. پس از شستشوی کامل بافت کبد با آب و جدا نمودن عروق و کپسول آن، در هموژنایزر کاملاً هموژنیزه شد. بافت هموژنیزه شده به ۴ حجم Phosphate Buffered Saline (PBS) اضافه شد و سپس در حمام آب ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از سرد و ته نشین شدن پروتئین‌های دناتوره شده، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ g سانتریفوژ شد. محلول روئی، با فیلتر واتمن شماره ۳ فیلتر شد و با افزودن تدریجی همان حجم سولفات آمونیوم اشباع شده، به اشباع ۵۰٪ (نیمه اشباع) رسید و در طول شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. با این عمل، فریتین و بعضی از پروتئین‌های دیگر به حالت غیر محلول در می‌آیند و رسوب می‌کنند. روز بعد محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵۰۰g سانتریفوژ شد و رسوب آن در ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. محلول حاصل در برابر بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار با pH=۷/۲ به مدت ۱ شبانه‌روز دیالیز شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد و محلول روئی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد. سپس این محلول به ستون کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون اضافه گردید و بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH=۷/۲ به وسیله پمپ پریستالتیک با سرعت ۸ میلی‌لیتر در ساعت از ستون عبور داده

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]

شد. بافر خروجی ستون، پس از خروج حجم فضای مرده، از دستگاه Uvcord SII (Amersham Pharmacia Biotech، ساخت سوئد) که کیفیت خروج پروتئین‌ها از ستون را به صورت منحنی رسم می‌کند عبور نموده و به وسیله دستگاه جمع کننده اتوماتیک (Fraction collector) (Amersham Pharmacia Biotech FRAC-200، ساخت سوئد) در فرکشن‌های مجزا جمع‌آوری شد. لازم به ذکر است که شرایط بهینه که در بالا ذکر شد، پس از چندین بار کروماتوگرافی در شرایط مختلف بدست آمد.

الکتروفورز محصول کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون روی ژل پلی‌آکریلامید: با توجه به اینکه در کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون مولکول‌های بزرگ مثل فریتین بلافاصله پس از خروج حجم فضای مرده و با قله (peak) اول خارج می‌شوند، پروتئین‌های موجود در فرکشن‌های مربوط به قله اول کروماتوگرافی، روی ژل پلی‌آکریلامید ۷/۵٪ در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) الکتروفورز شدند و رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو انجام گردید (۱۶).

آزمون الایزا جهت تأیید وجود فریتین در قله اول کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون: فرکشن‌های مربوط به قلهٔ اول کروماتوگرافی (حاوی فریتین گوسفندی) یکجا جمع‌آوری شد و با استفاده از کیت Radio-immuno assay (RIA) از نظر وجود فریتین مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود که آیا کیت‌های تجاری قادر به شناسایی فریتین گوسفندی هستند یا نه؟ در ضمن یک آزمون الایزای غیر مستقیم جهت بررسی وجود فریتین گوسفندی در محلول پروتئینی فوق طراحی گردید. بدین صورت که پس از اندازه‌گیری غلظت پروتئین در محلول مذکور به روش برادفورد (۱۷)، محلول با غلظت پروتئینی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به میزان۵۰ میکرولیتر در هر چاهک پلیت الایزا کوت شد. سپس پلیت الایزا با PBS-Tween بلاک شد. به علت تشابه بعضی از اپی‌توپ‌های فریتین گوسفند و انسان (۱) برای لایه دوم از سرم موش ایمن شده با فریتین انسانی با رقت ۱:۲۵۰ استفاده شد. از کونژوگهFab)2-Sheep anti Mouse-HRP) نیز به عنوان لایه سوم استفاده گردید. جهت تولید رنگ از سوبسترای اورتو فنیل دی‌آمین (OPD) استفاده شد و میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Anthos 2020، ساخت اتریش) قرائت شد. در مورد فریتین بدست آمده از کبد انسان نیز، فرکشن‌های مربوط به اولین قله یکجا جمع‌آوری گردید و به منظور تأیید وجود فریتین در آن و همچنین محاسبه بازده تخلیص فریتین با روش فوق، با استفاده از کیت الایزای فریتین محصول شرکت «پادتن علم»، غلظت فریتین اندازه‌گیری شد.

افزایش درجه خلوص فریتین با استفاده از کروماتوگرافی چرخشی (Recycling chromatography): جهت افزایش درجه خلوص فریتین، کروماتوگرافی چرخشی انجام شد (۱۸). بدین صورت که ۱ میلی‌لیتر از فریتین که قبلاً تخلیص و تغلیظ شده بود، به ستون کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون اضافه شد و بافر خروجی ستون پس از عبور از پمپ پریستالتیک و دستگاه UVcord SII مجدداً وارد ستون شد تا روند جداسازی بهبود یابد. پس از دو مرحله عبور نمونه از ستون، بافر خروجی ستون به وسیله جمع کننده اتوماتیک در ۱۵ فرکشن مجزا جمع‌آوری شد.

الکتروفورز محصول کروماتوگرافی چرخشی: فرکشن‌های ۱۲-۱ روی ژل پلی‌آکریلامید در مجاورت SDS با گرادیان ۱۵-۵٪ الکتروفورز شد و رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو انجام شد(۱۹). برای تعیین میزان خلوص فریتین حاصل از این روش، پس از الکتروفورز فرکشن شماره ۹ (حاوی فریتین) از کروماتوگرافی چرخشی، رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره انجام شد (۲۰). در ضمن، برای مقایسه میزان خلوص فریتین تخلیص شده در این تحقیق و فریتین خالص محصول شرکت Diagnostic Biotech (Lot#: F212)، این دو پروتئین روی ژل پلی‌آکریلامید در حضور SDS الکتروفورز شدند و رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو انجام گرفت. برای تایید وجود فریتین، علاوه بر الایزا از رنگ‌آمیزی با پتاسیم فری‌سیانید که یک روش اختصاصی برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌های حاوی آهن غیر هِم (Non–heme iron) در ژل پلی‌آکریلامید است نیز استفاده گردید. این روش قادر است تا ۱ میکروگرم فریتین، ۱۰۰ میکروگرم ترانسفرین و ۳ میکروگرم فردوکسین را ردیابی کند. در این روش، باند مربوط به پروتئین‌های حاوی آهن non-heme به رنگ آبی در می‌آید. این روش از روش رنگ‌آمیزی Ferene S اختصاصی‌تر است و آلبومین سرم گاوی (BSA) را رنگ‌آمیزی نمی‌کند (۲۱). فرمول واکنش به این صورت است:

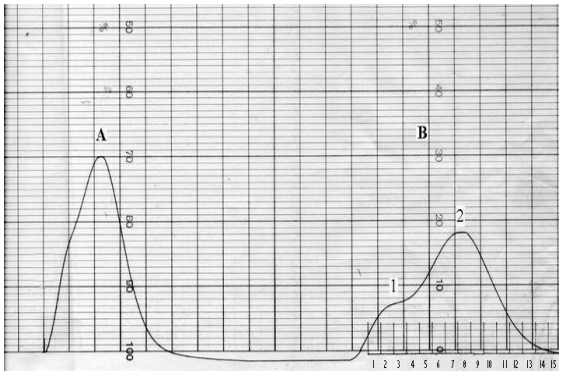
[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]

$Fe^{2+}+ K_3Fe(CN)_6 \rightarrow KFe[Fe(CN)_6]$ (Royal Blue)$+2K^+$

برای رنگ‌آمیزی با پتاسیم فری‌سیانید، پس از الکتروفورز این پروتئین روی ژل پلی‌آکریلامید، ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پتاسیم فری‌سیانید (0.1M K3Fe(CN)6, 0.05M Tris–HCl, 0.1M NaCl, pH 7.5) در تاریکی حرکت داده شد. سپس ژل در محلول ظهور رنگ (10% Methanol, 10% Trichloroacetic Acid) که بلافاصله قبل از استفاده تهیه شده بود، قرار داده شد تا رنگ آبی باند فریتین ظاهر شود. این محلول چند بار عوض شد تا پتاسیم فری‌سیانید باقی‌مانده کاملاً خارج شود و زمینه ژل بی‌رنگ شود (۲۱). به منظور ارزیابی وزن مولکولی زیرواحدهای فریتین تخلیص شده، این پروتئین در شرایط احیاء در حضور ۲- مرکاپتو اتانول الکتروفورز شد.

یافته‌ها

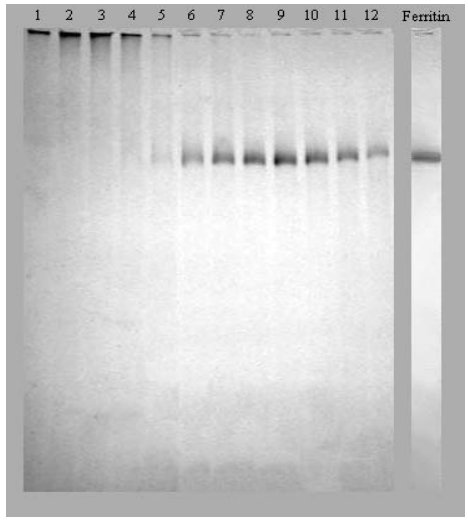
استخراج و تخلیص فریتین از بافت کبد گوسفند و انسان: منحنی رسم شده توسط دستگاه UVcord SII وجود دو قله را در کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون تخلیص فریتین نشان داد (نتایج آورده نشده است). الکتروفورز محصول کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون روی ژل پلی‌آکریلامید: نتایج حاصل از SDS-PAGE نیز نشان داد که فرکشن‌های مربوط به قله اول حاصل از کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون، دارای پروتئینی هستند که از نظر اندازه با مولکول فریتین مطابقت دارد (نتایج آورده نشده است). نتایج آزمون الایزا: کیت اندازه‌گیری فریتین سرم انسانی (RIA) فریتین گوسفندی را مورد شناسایی قرار نداد اما نتیجه الایزای طراحی شده در این تحقیق نشان داد که سرم موش ایمن شده با فریتین انسانی قادر به شناسایی فریتین گوسفندی می‌باشد. نتیجه اندازه‌گیری فریتین انسانی با استفاده از کیت الایزای فریتین محصول شرکت «پادتن علم»، نشان داد که این کیت قادر به شناسایی فریتین تخلیص شده انسانی می‌باشد. بازده تخلیص فریتین در این روش تقریباً ۱۰۰ میکروگرم فریتین به ازای هر گرم بافت تازه کبد انسان بود. افزایش درجه خلوص فریتین با استفاده از کروماتوگرافی چرخشی: نمودار مربوط به این کروماتوگرافی در شکل ۱ مشاهده می‌شود. منحنی اول (A) مربوط به مرحله اول عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی می‌باشد که در طی آن فریتین از ستون خارج شده و مجدداً از سمت دیگر وارد ستون شده است. در مرحله دوم عبور نمونه از ستون کروماتوگرافی، منحنی مربوطه به دو بخش ۱و۲ تفکیک شده است (B) که این مسئله نشان می‌دهد همراه با فریتین، یک پروتئین دیگر نیز وجود داشته است که در مرحله دوم از آن جدا شده است.



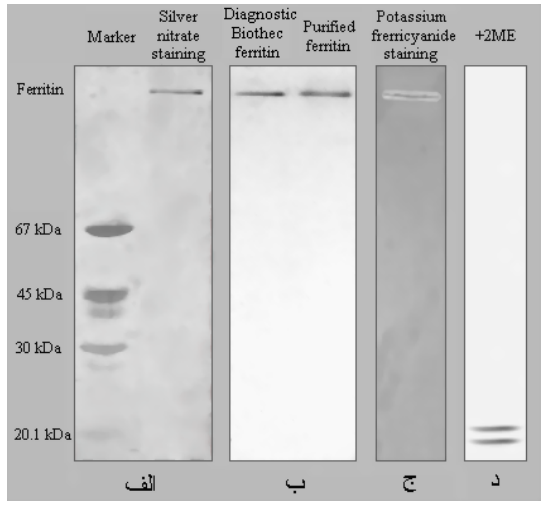
شکل ۱. نمودار کروماتوگرافی چرخشی. منحنی A مربوط به مرحله اول عبور نمونه از ستون و منحنی B مربوط به مرحله دوم عبور نمونه از ستون می‌باشد. در مرحله دوم، منحنی به دو بخش ۱ و۲ تفکیک شده است.

الکتروفورز محصول کروماتوگرافی چرخشی: نتیجه الکتروفورز فریتین Recycle شده که در شکل ۲ آمده است، نشان می‌دهد که فریتین(ردیف‌های۱۲-۶) به میزان قابل توجهی از پروتئین سنگین‌تر (ردیف‌های ۵-۱) جدا شده است و درصد خلوص آن نسبت به قبل افزایش یافته است. در رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، به جز باند مربوط به فریتین، باند دیگری مشاهده نمی‌شود (شکل۳-الف). مقایسه فریتین خالص محصول شرکت Diagnostic Biotech با فریتین تخلیص شده به روش فوق نیز نشان‌دهنده برابری خلوص این دو محصول می‌باشد(شکل۳-ب). در رنگ‌آمیزی با پتاسیم فری‌سیانید که قادر است پروتئین‌های حاوی آهن non-heme را ردیابی کند، باند مربوط به فریتین به رنگ آبی درآمده است (شکل ۳-ج). در الکتروفورز فریتین در شرایط احیاء در حضور ۲-مرکاپتو اتانول، فریتین به ۲ زیرواحد کوچک‌تر با وزن مولکولی ۱۹ و ۲۱ کیلودالتون تجزیه شده است که با وزن مولکولی زیر واحدهای سبک و سنگین فریتین مطابقت دارد (شکل ۳-د).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]



شکل ۲. الکتروفورز فرکشن‌های ۱۲-۱ از کروماتوگرافی چرخشی روی ژل گرادیان پلی‌آکریلامید (۱۵٪-۵٪) در حضور SDS. ردیف‌های ۵-۱ مربوط به بخش ۱ منحنی B از شکل ۱ و ردیف‌های ۱۲-۶ مربوط به بخش ۲ منحنی B از شکل ۱ می‌باشد.



شکل ۳. الکتروفورز فریتین تخلیص شده با کروماتوگرافی چرخشی. الف) رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. ب) مقایسه با فریتین انسانی محصول شرکت Diagnostic Biotech. ج) رنگ‌آمیزی با پتاسیم فری‌سیانید. د) الکتروفورز فریتین در حضور ۲- مرکاپتو اتانول و تجزیه فریتین به زیرواحدهایش.

بحث

یکی از پایه‌های اصلی تخلیص فریتین استفاده از کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون(size exclusion chromatography) می‌باشد. در کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون، مولکول‌ها براساس اندازه‌شان از یکدیگر جدا می‌شوند. بدین صورت که مولکول‌های بزرگ‌تر زودتر از ستون خارج می‌شوند و مولکول‌های کوچک‌تر در مراحل بعدی خارج می‌شوند. یافته‌های ما نیز نشان داد که فریتین که وزن مولکولی بالایی دارد (۴۵۰ کیلودالتون) با قله اول خارج گردیده است. در نتایج الایزا، همان طور که مشاهده گردید کیت تشخیص فریتین سرم انسان (RIA) قادر به شناسایی فریتین گوسفندی نبود، در حالی که سیستم الایزای طراحی شده در این تحقیق، فریتین گوسفندی را شناسایی نمود. با توجه به اینکه در کیت‌های تشخیص طبی معمولاً از آنتی‌بادی منوکلونال استفاده می‌شود عدم شناسایی فریتین گوسفندی توسط این کیت قابل توجیه می‌باشد زیرا زنجیره‌های سبک و سنگین فریتین انسان و گوسفند به ترتیب ۷۶٪ و ۹۳٪ با هم تشابه دارند و آنتی‌بادی منوکلونال مورد استفاده در کیت احتمالاً بر علیه اپی‌توپی از فریتین انسانی می‌باشد که آن اپی‌توپ در فریتین گوسفندی وجود ندارد اما در الایزای طراحی شده در این تحقیق به علت وجود اپی‌توپ‌های مشترک بین فریتین انسانی و گوسفندی، آنتی‌سرم ضد فریتین انسانی، فریتین گوسفندی را شناسایی نمود. علاوه بر این در رنگ‌آمیزی با پتاسیم فری‌سیانید نیز وجود فریتین که یک پروتئین آهن‌دار است مورد تایید قرار گرفت. در رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، با توجه به حساسیت فوق‌العاده بالای آن در می‌یابیم که فریتین تخلیص شده، از درجه خلوص بالایی برخوردار است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فریتین بدست آمده از این روش، به ویژه وقتی کروماتوگرافی چرخشی انجام شود از میزان خلوص بالایی برخوردار است که با فریتین خالص محصول شرکت Diagnostic Biotech برابری می‌کند. عوامل متعددی در میزان خلوص فریتین دخالت دارند. یکی از این عوامل طول ستون است که هر چه بیشتر باشد تفکیک بهتر انجام می‌شود و بر همین اساس، در کروماتوگرافی چرخشی، با عبور نمونه از درون ستون برای دو یا چند بار، میزان خلوص محصول افزایش می‌یابد. بدیهی است که با افزایش دفعات چرخش می‌توان درجه تخلیص را بهبود بخشید. سرعت مناسب عبور جریان بافر از ستون نیز از عوامل مؤثر در میزان تخلیص می‌باشد. به‌نظر می‌رسد سرعت مناسب بافر، برای ستونی با

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]

ابعاد ستون مورد استفاده در این تحقیق (۸۵×۱/۷ سانتی‌متر)، ۱۰-۸ میلی‌لیتر در ساعت باشد. با استفاده از اولتراسانتریفوژ (g ۹۵۰۰۰) نیز می‌توان خلوص را افزایش داد (۳). راه حل دیگر، استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی می‌باشد (۴). روش دیگری که پیشنهاد می‌شود، استفاده از کروماتوگرافی افینیتی است که در آن آنتی‌بادی ضد فریتین به ماتریکس متصل شده باشد (۲۲).

پس از جستجو در سایت اینترنتی «مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران» تنها یک مورد پایان‌نامه در مورد تخلیص فریتین یافت شد که تخلیص صرفا از کبد گوسفند انجام شده بود و روش آن مشابه روش عمل شده در این مطالعه بود با این تفاوت که از سفادکس G-100 جهت کروماتوگرافی استفاده شده بود (۲۳). بازده تخلیص در مقالات گوناگون، متفاوت ذکر شده است. به طور مثال میزان فریتین تخلیص شده به ازای هر گرم بافت تازه کبد گونه‌های مختلف حیوانات توسط Sobha وهمکارانش ۱۲ میکروگرم (۲۴)، توسط Diez و همکارانش ۱۲۰ میکروگرم (۲۵)، توسط Suryakala و همکارانش۵۲-۸ میکروگرم (۲۶) و توسط Geetha و همکارانش ۲۶-۱۶ میکروگرم (۲۷) بوده است. بازده روشی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است، تقریباً ۱۰۰ میکروگرم فریتین به ازای هر گرم بافت تازه کبد می‌باشد که در مقایسه با موارد فوق، بازده قابل قبولی می‌باشد. این بازده بیانگر مناسب بودن شرایط استخراج فریتین که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد می‌باشد. در پایان چنین نتیجه‌گیری می‌شود که با استفاده از این روش، می‌توان به سادگی و با هزینه مناسب فریتین با درجه خلوص بالا را جهت مصارف و بررسی‌های گوناگون از بافت کبد تخلیص نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر باباشمس که در مراحل مختلف این پژوهش ما را راهنمائی فرمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

****

References

1. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta 1996; 1275: 161-203.

2. Bryce CFA, Crichton RR. The subunit structure of horse spleen apoferritin I. The molecular weight of the subunit. J Biol Chem 1971; 246(13): 4198-205.

3. Crichton RR, Milar JA, Cuming LC, Bryce CFA. The organ-specificity of ferritin in human and horse liver and spleen. Biochem J 1973; 131(1): 51-9.

4. Drysdale JW, Munro HN. Small-scale isolation of ferritin for the assay of the incorporation of 14 C-labelled amino acids. Biochem J 1965; 95, 851-8.

5. Cham BE, Roeser HP, Kinkles A, Ridgwag K. A procedure for the purification of ferritin from human liver by heating a methanol-treated homogenate. Anal Biochem 1985; 151(2): 561-5.

6. Harisson PM, Gregory DW. Reassembly of apoferritin molecules from subunits. Nature 1968; 220: 578-80.

7. Ratnayake DB, Wai SN, Shi Y, et al. Ferritin from the obligate anaerobe porphyromonas gingivalis: purification, gene cloning and mutant studies. Microbiology 2000; 146 (Pt 5): 1119-27.

8. Wei J, Theil EC. Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of a plant (soybean). J Biol Chem 2000; 275(23): 17488-93.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]

9. Andrews GA, Chavey PS, Smith JE. Enzyme-linked immunosorbent assay to measure serum ferritin and the relationship between serum ferritin and nonheme iron stores in cats. Vet Pathol 1994; 31(6): 674-8.

10. Chou SF, Chen CY. Monoclonal and polyclonal antibodies against human ferritin, a nonspecific tumor marker. Hybridoma 2001; 20(1): 59-62.

11. Hamwi A, Endler G, Rubi K, Wagner O, Endler AT. Reference values for a heterogeneous ferritin assay and trace ability to the 3rd International Recombinant Standard for Ferritin (NIBSC code 94/572). Clin Chem Lab Med 2002; 40(4): 365-70.

12. Meola A, Delmastro P, Monaci P, et al. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. J Immunol 1995; 154(7): 3162-72.

13. Stanescu R, Peyron J, Stanescu V. Drug action on articular cartilage surface. An in vitro study using mouse femoral heads labeled with cationized ferritin. Clin Rheumatol 1987; 6(2): 162 -9.

14. Anderson KL. Cationized ferritin as a stain for electron microscopic observation of bacterial ultrastructure. Biotech Histochem 1998; 73(5): 278-88.

15. Fischer L. Gel filtration chromatography, 2nd ed, Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1980; pp: 62-136.

16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(259): 680-5.

17. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. Methods Mol Biol 1994; 32: 9-15.

18. Fischer L. Gel filtration chromatography, 2nd ed, Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1980; pp: 129-30.

19. Perusse M, Pascot A, Despres JP, Couillard C, Lamarche B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. J Lipid Res 2001; 42(8): 1331-4.

20. Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1980; 105: 361-3.

21. Leong LM, Tan BH, Ho KK. A specific stain for the detection of nonheme iron proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1992; 207(2): 317-20.

22. Zhang DS, Cao HT, Niu CI, Zhang ZC. The application of monoclonal antibodies to the immunoaffinity purification of human ferritin. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 1996; 28(2): 164-69.

۲۳. حمزه هرزنجی ن. استخراج و تخلیص فریتین ازجگر گوسفند. پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید باهنر کرمان ۱۳۷۶.

24. Sobha G, Suryakala S, Geetha C, Deshpande V. Camel kidney ferritin: isolation and partial characterization. Vet Res Commun 2000; 24(5): 287-97.

25. Diez JM, Agapito MT, Recio JM. Isolation and purification of duck liver ferritin. Rev Esp Fisiol 1985; 41(3): 341-4.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]

26. Suryakala S, Deshpande V. Purification and characterization of liver ferritins from different animal species. Vet Res Commun 1999; 23(3): 165-81.

27. Geetha C, Deshpande V. Purification and characterization of fish liver ferritins. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1999; 123(3): 285-94.

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید چمران، اوین، پژوهشکده ابن سینا، تلفن:۲۴۰۲۰۱۱-۰۲۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1383.7.1.2.5]