جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

جداسازی فیبرونکتین از پلاسما

دکتر دردی قوجق ♣

فیبرونکتین ، پروتئینی است ، که با بسیاری از ترکیبات خارج سلّولی وارد واکنش می‌شود . فیبرونکتین ، یک پلاسما پروتئین است و به عنوان پروتئین سطحی فیبروبلاست شناسایی شده است ؛ که به ژلاتین متّصل می‌گردد . برای انجام این تحقیق ، نمونه پلاسما از بیمارستان شهید دکتر بهشتی و شهید یحیی‌نژاد ، تهیّه گردید . نمونهٔ تهیّه شده در دور ۲۵۰۰ ، به مدّت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد . محلول سوپرنیتانت بدست آمده به کروماتوگرافی ستونی ، حاوی ۱۵ میلی لیتر سفارز ـ ژلاتین انتقال داده شد . محلول بدست آمده از کروماتوگرافی ، توسّط الکتروفورز افقی ، با ژل اکریل‌آمید ۱۰ درصد ، جداسازی گردید . نتایج بدست آمده نشان داد ، که فیبرونکتین پلاسما ، به ژلاتین متصل می‌گردد و توسط این روش از سایر ترکیبات سرم جدا می‌شود ؛ بطوریکه یک باند ، پس از اجرای الکتروفورز از محلول بدست آمده ، از کروماتوگرافی مشاهده شد . وزن مولکولی پروتئین بدست آمده ، با استفاده از وزن مولکولی پروتئین‌های استاندارد ، برابر با ۲۷۱۰۰۰ دالتون بود . نتایج این پژوهش ، در شناسایی بهتر خصوصیّات بیوشیمیایی فیبرونکتین کمک خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی : *فیبرونکتین ؛ ژلاتین ؛ افنیتی کروماتوگرافی ؛ الکتروفورز .*

♣ – مدیر گروه بیوشیمی و بیوفیزیک علوم پزشکی بابل

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدّمه

در سال ۱۹۷۳، پروتئینی با وزن مولکولی بالا به نام فیبرونکتین، در سطح کشت فیبروبلاست‌های طبیعی یافت شد. فیبرونکتین، از فیبروبلاست‌های طبیعی ایجاد شده و وارد محیط کشت می‌شوند. فیبروبلاست‌های تغییر فرم یافته، فاقد فیبرونکتین هستند. فرم پلاسمایی فیبرونکتین، به عنوان پروتئین پلاسما، از سال ۱۹٤۸ تحت عنوان گلوبولین غیر محلول سرد، به دلیل واکنش آن با کرایوفیبرینوژن شناسایی شده است(۱). فیبرونکتین، به عنوان گلیکوپروتئین چسبندهٔ خون، در سطح سلّولی و در ماتریکس خارج سلّولی یافت شده است. فیبرونکتین سطح سلّولی و پلاسمایی خیلی به هم شبیه هستند، امّا در بارهٔ خصوصیّات آنها، اطّلاعات کمی وجود دارد(۲). فیبرونکتین، جزء ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ سطح سلّولی بسیاری از سلّولهای طبیعی است، امّا در سطح سلّولهای تغییر فرم یافتهٔ ویروسی یا شیمیایی و در بسیاری از سلّولهای سرطانی، مقدار آن کاهش یافته و یا وجود ندارد (۳). فیبرونکتین، یک گلیکوپروتئین بزرگ است و از نظر ساختمان، حاوی سه ناحیهٔ پپتیدی مشابه و تکراری است. بخشهایی از نواحی خارجی آن، سبب می‌شود که فیبرونکتین، چسبندگی سلّول به سلّول و یا سلّول به غشاء داشته باشد، همچنین نقش پاتوژنی داشته و به سلّولهای پستانداران و به ماتریکس خارج سلّولی متّصل می‌گردد و در پاتوژنز عفونت‌ها نقش دارد(٤). مشخّص شده است که فیبرونکتین، در ایجاد چسبندگی سلّولهای سرطانی به لامینای پایه، نیز نقش دارد(۵). همچنین معلوم شده است، روند گسترش نئوپلاسم، به بیان ژن فیبرونکتین ارتباط دارد (٦ و ۷). هدف این تحقیق، بررسی اتّصال برگشت‌پذیر فیبرونکتین، به ژلاتین و استفاده از این خاصیّت برای جداسازی و خالص‌سازی فیبرونکتین، از پلاسمای انسان است. نتایج این مطالعه به درک بهتر خصوصیّات بیوشیمیایی فیبرونکتین کمک مؤثّری خواهد نمود.

روش پژوهش

موادّ شیمیایی، ژلاتین و استانداردهای وزن مولکولی پروتئین (آلفا ـ لاکتوآلبومین ۱٤۲۰۰، کربنیک انیدراز ۲۹۰۰۰، آلبومین ٤۵۰۰۰ و اوره‌آز ۲۷۲۰۰۰) از شرکت سیگما تهیّه شد. سفارز 4B ، از شرکت فارماسیا تهیّه گردید. سایر موادّ شیمیایی و محلولها و بافرها در حدّ آزمایشگاهی خالص بوده و از شرکت مرک تهیّه شد. نمونهٔ خون از بیمارستانهای شهید دکتر بهشتی و شهید یحیی‌نژاد گرفته شد.

برای تهیّهٔ نمونه، ابتدا به ۲ میلی لیتر خون تهیّه شده، EDTA ۰/۳ مولار افزوده شد، سپس در دور ۲۵۰۰ به مدّت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی لیتر محلول سوپرنیتانت به کروماتوگرافی ستونی، حاوی ۱۵ میلی لیتر سفارز ـ ژلاتین انتقال داده شد.

افنیتی کروماتوگرافی، از طریق واکنش بین ژلاتین سفارز 4B فعّال شده با سیانو ـ بروموژن توسّط روش Guatrecasas and Anfinsen انجام شد(۸). ۲۵ میلی گرم ژلاتین، به ٤ گرم سفارز 4B فعّال شده با سیانو ـ بروموژن متّصل گردید. کروماتوگرافی پلاسما، در درجه حرارت اتاق و در ستون به ابعاد ۱۵ * ۱/۲ سانتی‌متر، حاوی ژلاتین ـ سفارز در بافر فسفات PH= ۷/۸ و حاوی سیترات سدیم ۰/۰۳ مولار انجام شد. قبل از شروع کروماتوگرافی، ستون با بافر حاوی ۰/۵ درصد آلبومین سرم گاوی شستشو داده شد. سپس اوره ۸ مولار، بافر تریس ۰/٦۰ مولار و PH= ۷/۸ استفاده شد. نمونه‌های با حجم ۱ میلی‌لیتر از ستون جمع‌آوری شد و تا انجام مرحلهٔ بعدی آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

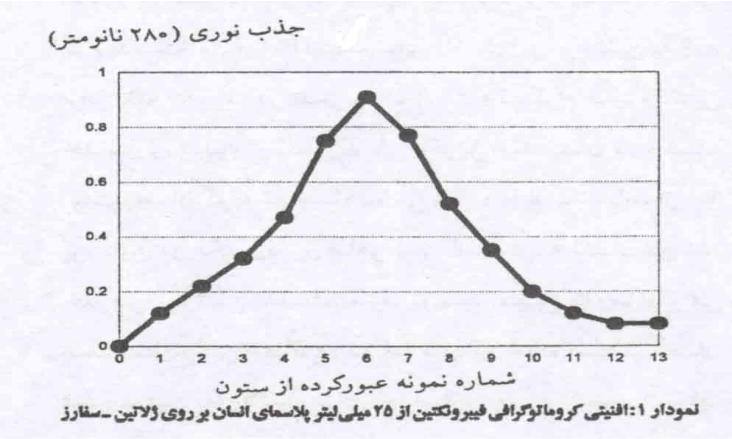
روش انجام الکتروفورز: ژل الکتروفورز افقی (به ابعاد ۰/۸ میلی متر در ۱۰ * ۵ سانتی متر) با استفاده از ژل تفکیک‌کننده، حاوی ۱۰ درصد آکریل‌آمید در حضور SDS (سدیم دو دوسیل سولفات) ۵ درصد در PH= ۸/۲۵ (٤ میلی‌لیتر آب مقطر،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۳/۳ میلی لیتر اکریل‌آمید ۳۰ درصد، ۱/۳ میلی لیتر تریس ۱/۵ مولار PH= ۸/۸۵ ، ۰/۱ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر آمونیوم پر سولفات ۱۰ درصد و ۰/۰۰۲ میلی لیتر تمد) انجام شد. ژل استکینگ، با آکریل‌آمید ۵ درصد (۱/٤ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۳۳ میلی‌لیتر اکریل‌امید ۳۰ درصد، ۰/۲۵ میلی لیتر تریس ۱/۵ مولار با PH= ۷/۳۵ ، ۰/۰۲۰ میلی لیتر SDS ، ۰/۰۲۰ میلی لیتر آمونیوم پر سولفات ۱۰ درصد و ۰/۰۰۲ میلی‌لیتر تمد) استفاده گردید. مدّت زمان انجام الکتروفورز ٤ ساعت بود.

یافته‌ها

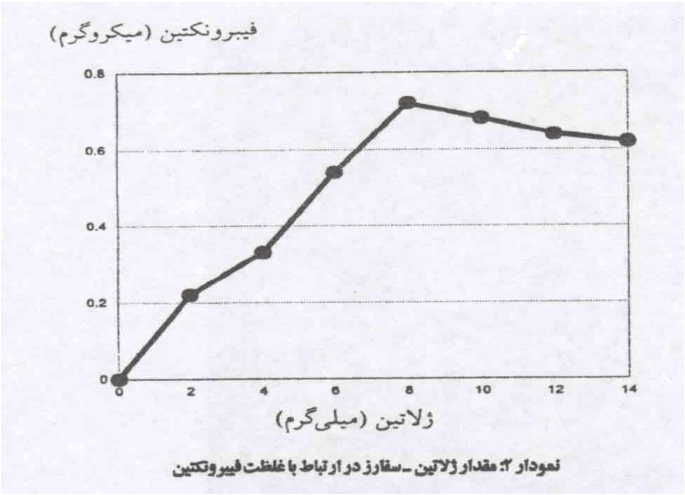
در این تحقیق، روش دو مرحله‌ای برای استخراج فیبرونکتین، از پلاسمای انسان، مورد استفاده قرار گرفت.



نمودار ۱ : افنیتی کروماتوگرافی فیبرونکتین از ۲۵ میلی‌لیتر پلاسمای انسان بر روی ژلاتین ـ سفارز

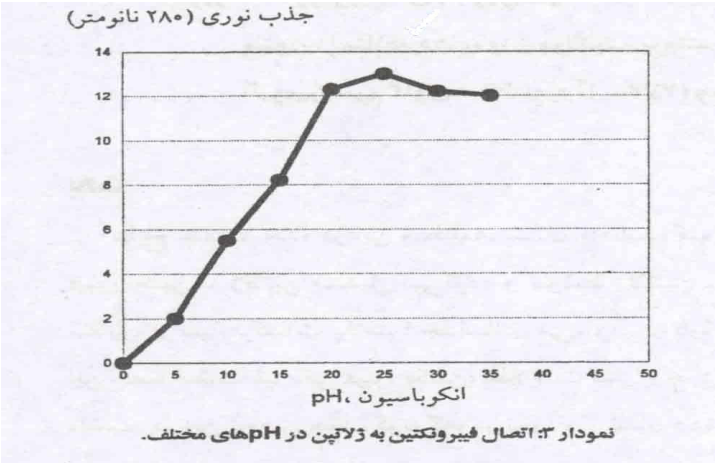
نتیجه اتّصال فیبرونکتین به ژلاتین و جداسازی آن از سایر ترکیبات پلاسما، از حجم ٦ میلی لیتر شروع شد(نمودار ۱).

رابطهٔ بین ظرفیّت مناسب سفارز ـ ژلاتین و مقدار فیبرونکتین، در نموار ۲ نشان داده شده است.



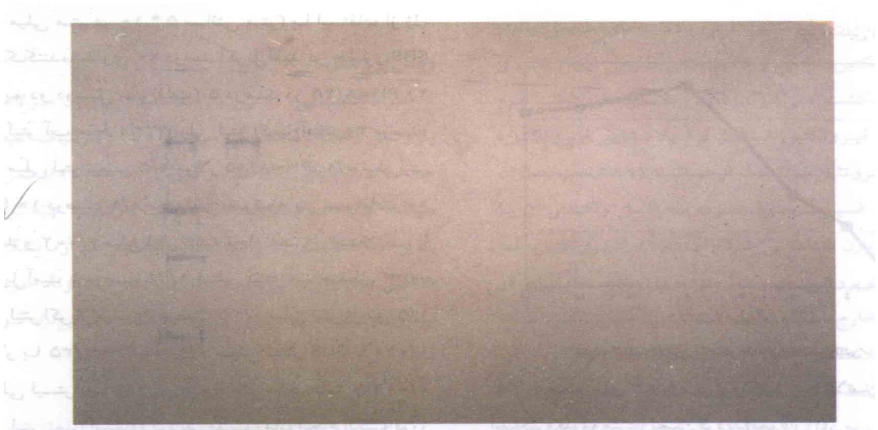
نمودار ۲: مقدار ژلاتین ـ سفارز در ارتباط با غلظت فیبرونکتین

PH اپتیمم برای اتّصال فیبرونکتین به ژلاتین، توسّط اسپکتروفلورومتری تعیین گردید(نمودار ۳).



نمودار ۳: اتصال فیبرونکتین به ژلاتین در pH های مختلف .

همچنین الکتروفورز افقی، ژل آکریل‌آمید محلول بدست آمده از کروماتوگرافی، هموژنیتی فیبرونکتین را نشان داد (تصویر ۱) که فقط یک باند پس از رنگ‌آمیزی ژل بدست آمد. این پروتئین استخراج شده در الکتروفورز، با ژل آکریل‌آمید حاوی SDS ، نیز یک باند نشان داد. وزن مولکولی پروتئین بدست آمده؛ با توجّه به وزن مولکولی پروتئین استاندارد برابر با ۲۷۱۰۰۰ دالتون است. به عنوان نمونه، در یک آزمایش این مطالعه، با ۲۵ میلی لیتر پلاسمای انسان، مقدار ۱۲/۸ میکروگرم فیبرونکتین بدست آمده است؛ که توسّط اتانل ۹۰ درصد رسوب داده شد.



تصویر ۱: الکتروفورز افقی (آکریل آمید ۱۰ درصد) فیبرونکتین پلاسمای انسان، رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو.
ستون ۱ استانداردهای وزن مولکولی پروتئین (آلفا ـ لاکتو آلبومین ۱۴۲۰۰، کربنیک انیدراز ۲۹۰۰۰ ، آلبومین سرم گاوی ۶۶۰۰۰، اوره آز ۲۷۲۰۰۰) و ستون دوم فیبرونکتین پلاسماست.

بحث

نتایج بدست آمده در این مطالعه، نشان داده‌اند؛ که فیبرونکتین به ژلاتین متّصل می‌گردد و توسّط ژلاتین ـ سفارز، از بقیهٔ ترکیبات پلاسما جداسازی می‌شود. در بارهٔ این خصوصیّات فیزیکی فیبرونکتین، اطّلاعات کمی وجود داشت. در این تحقیق همان گونه که، در نمودار ۱ نشان داده شده است؛ شروع جدا شدن فیبرونکتین پلاسمای انسان، از حجم ٦ میلی لیتر آغاز شده است و همان گونه که در نمودار مشخّص شده، جداسازی به خوبی انجام شده است. در این مطالعه، شرایط اپتیمم، برای

جداسازی فیبرونکتین از سایر ترکیبات پلاسما با توجّه به ساختمان مولکولی ژلاتین و فیبرونکتین، برای اوّلین بار بدست آمد. همانگونه که در نمودارهای ۲ و ۳ مشاهده می‌شود ظرفیّت مناسب ژلاتین ـ سفارز به غلظت فیبرونکتین پلاسمایی، برابر با ۲۵ میلی گرم بدست آمد و PH اپتیمم برای اتّصال این پروتئین به ژل، برابر با ۷/۸ بود. در تصویر ۱، الکتروفتوگرام فیبرونکتین جداسازی شده، توسّط ژل پلی آکریل‌آمید نشان داده شده است، همان گونه که مشاهده می‌شود؛ فقط یک باند از این پروتئین در الکتروفورز ظاهر شده است؛ که نشان دهندهٔ خلوص پروتئین بدست آمده، توسّط افنیتی کروماتوگرافی است. نتایج این مطالعه، در استفاده از خصوصیّات اتّصال فیبرونکتین به ژلاتین، برای جداسازی فیبرونکتین، از سایر ترکیبات پلاسما با گزارش سایر محققّین، منطبق و قابل مقایسه است(۱، ۲ و ۳). خلوص پروتئین بدست آمده، نشان می‌دهد؛ که ظرفیّت جداسازی و خالص‌سازی روش بکار گرفته شده در این مطالعه، بسیار مناسب بوده است. با توجّه به اهمّیّت فیبرونکتین، در ایجاد چسبندگی سلّولهای سرطانی به لامینای پایه و روند گسترش نئوپلاسم، برای شناسایی بهتر خصوصیّات بیوشیمیایی فیبرونکتین، روش مستقیم جداسازی فیبرونکتین پلاسمای انسان، که در این مطالعه بکار گرفته شده است؛ قابل استفاده خواهد بود. همچنین در آینده این روش، در بررسی فیبرونکتین بافت‌ها و مایعات بیولوژیک موجودات زنده و شناسایی رسپتور فیبرونکتین، کمک مؤثّری خواهد نمود.

Abstract

Isolation of Fibronectin from Muman Plasma

Fibronectin is a protein which has complex binding interaetions with many extracellular matrix components . Being a plasma protein,it is immunologically identified as a major surface protein of normal fibroblasts , which binds with gelatin . After centrifuging human plasma samples at 25000 g for 20 minutes , the supernatamt plasma was applied to a 15 ml gelatin- sepharose column chromatography . SDS-page was performed in slab gels using 15 % acrylamide running gels . Purified fibronectin was obtained from the fractioning of human plasma on gelatin sepharose . When analyzed by SDS-page , fibronectin gave single band at Mr = 271000 dalton .

Key Words : *Fibronectin ; Gelatin ; Chromatography* **.**

منابع

1- Engvall , E . and Ruoslahti , l : Binding of soluble form of fibroblast surface protein , fibronectin , to collagen . int . J . Cancer, 1997 , 20 , 1-5 .

2 - Akiyama , S . K . and yamada , K . M . : The interaction of plasma fibronectin with fibrobalstic cells in suspention . The Journal Biological Chemistry , 1985 , 260 (7) 4492 - 4500.

3 - Bolmer , S . D . and wolf , G . : Stimulation of fibronectin production by retinoic acid in mouse skin . Cancer Research , 1982 , 42 , 4465 - 4472 .

4 - Proctor , R . A . A brief overview of fibronectin structure , function , and Physiology . Rev infection Dis . 1987 , 9(4) , 317 - 321 .

5 - Kuratsu , J . Ishimaru , Y . and Uemura , S . : Possibie roles of adhesive factor , stromal fibronectin , and peanut agglutininrecepto in subarachnoid dissmination of brain tumor cells . Neeurol . Med . chir . Toyyo , 1989 , 29 (2) , 84 - 87 .

6 - David , L . Nesland , J . M . Holm , R . Sobrin , Ho . Simoes , M . Expression of laminin , collagen IV , fibronectin , and type IV collagenase in gastric carcinoma . An immunohistochemical study of 87 Patients . Cancer , 1994 , 73 (3) , 518 - 527) .

7 - Sambrook , F . and Maniatis , A . : Molecular cloning , Alaboratory manual , cold Spring Harber , Laboratory press , csh , 1989 , 1 - 56 .

8 - Cuatrecasas , P . and Anfirnsen , C . B . : Affinity chromatography , Methods in Enzymology , 1989 , 22 , 345 - 378 .

9 - Linder , E . Vaheri , A . rouslahti , E . and Wartiovaoara , J . : Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo . J . EPE . Med . 1975 , 142 , 41 - 49 .

10 - Hynes , R . O . Alteration on cell surface proteins by viral transformation and protheolysis . Proc . Nat Acad . Sci . 1973 , 3170 - 3171 .