الکتروفورز هموگلوبین

الکتروفورز استات سلولز – سیترات آگار

اصول- روش کار- خطاها

ترجمه : دکتر کتایون خداوردیان

آزمایشگاه مرجع سلامت

الکتــروفــورز

الکتروفورز عبارت است از حرکت يك جسم باردار در يك ميدان الکتريکي در PH معين.
پروتئين ها درPH ايزو الکتريک خود دارای بارهای منفی ومثبت برابرند، بنابر اين در PH قليائی دارای بار منفی شده وبطرف قطب مثبت حرکت می کنند. در طی اين حرکت جدا سازی صورت ميگيرد. هموگلوبين نرمال در افراد بالغ (HbA) ، در بافر قليايي داراي شارژ منفي است و به طرف آند حرکت مي کند .
جداسازی بيشتر انواع هموگلوبين هاي غيرطبيعي ازهموگلوبين A بدليل ساختمان غير طبيعي آنها که معمولا" يك آمينواسيد جايگزين آمينو اسيد ديگرشده است ، بر اساس تغيير در شارژ الکتريکي شان صورت می گيرد.
جدا سازی الکتروفورتيک روشی ساده برای شناسائی مقدماتی بسياری از هموگلوبين ها می باشد.

***الکتروفورز استات سلولز جهت بررسي هموگلوبينوپاتی*ها** :

انواع مختلف حامل (Supporting media) وجود دارد که حامل های سلولزی از متداول ترين آنها می باشد.
مزايا: سهولت استفاده ،جدا سازی سريع هموگلوبين های A، F ،S وC (با جذب کم)،حمل آسان ونگهداری طولانی مدت با قرار دادن در کيسه پلاستيکی
معايب: عدم شناسائی اجزائی از هموگلوبين با غلظت کم،عدم جدا سازی همه انواع هموگلوبين بخصوص هموگلوبين های ناپايدار.هم چنين هموگلوبين های F وA در کنار هم جدا می شوند که ممکن است مقادير کم هر يک در برابر مقدار بالای ديگری قابل جدا سازی نباشند.

- **آماده سازي نمونه**

- نمونه مورد استفاده در الکتروفورز ، هموليزات است که ترجيحا" از گلبولهاي قرمز شسته شده تهيه مي شود. يك جداسازي خوب الکتروفورتيك ، عموما" از هموليزاتی با غلظت هموگلوبين در محدوده ۳-۲ گرم در دسی ليتربدست می آيد.
- ضد انعقاد مصرفی EDTA , ACD , CPD يا Heparin می باشد وخون دردمای ۴درجه به مدت۱۰ روزقابل نگهداری است. (خون هاي هپارينه در طول نگهداري ممکن است تشکيل لخته های بسيار کوچک بدهند .)

- در صورت استفاده از کیت، مطابق با دستورالعمل آن عمل کرده و از محلول لیزکننده داخل کیت جهت تهیه همولیزات استفاده مي کنیم .

- در صورتیکه بیمار مشکوك به یك هموگلوبینوپاتي از نوع ناپایدار باشد ، سلولها فقط باید با آب مقطر لیزگردند و از حلالهای آلی جهت تهیه همولیزات نباید استفاده شود چون باعث رسوب وتغییر ماهیت این هموگلوبین ها میشود.

- **تجهیزات**

۱- مخزن الکتروفورز : داراي مخازن نگهداري بافروپل هایي است که استات سلولز روي آن قرار مي گیرند.

۲- منبع تغذیه : باید دستگاه یك ولتاژ ثابت جریان مستقیم داشته باشد و داراي اتصال زمین باشد تا مانع شوك به کاربر شود. مجهز به تایمر ۶۰-۰ دقیقه ، قادر به تأمین ولتاژ ۴۵۰ و کلید قطع و وصل اتوماتیك باشد ، بطوری که تا قطع کامل جریان برق امکان باز نمودن درب مخزن وجود نداشته باشد.

۳- محیط استات سلولز : باید با اطمینان از عدم پارگي محیط (Medium) به آن دست بزنیم. معمولا" استات سلولز به یك ورقه پلاستیك متصل مي شود.

۴- اپلیکاتور: نمونه گذاري میتواند با هر وسیله مناسبي که بتواند ۰.۵ µl -۱از نمونه را در سطح محیط قرار دهد انجام گیرد . مقادیر نمونه گذاري شده باید یکسان باشد.

۵- بافر TEB – این بافرعموما" در محدوده ۸/۴-۹/۲ = PH استفاده میشود بافر مرسوم دارای PH=۸/۴ است.

- *طرز تهیه بافر* (Tris – EDTA – Boric Acid (TEB :

- پودر تریس هیدروکسي متیل آمینومتان	۱۰/۲گرم
- EDTA	۰/۶گرم
- اسید بوریك	۳/۲گرم
- آب مقطر تا حجم	۱۰۰۰ میلی لیتر

بافر فوق تا قبل از کدورت و تغییر رنگ در دمای ۴ درجه قابل مصرف است.

- **رنگ**

در الكتروفورز استات سلولزمی توان از هر نوع رنگ آميزي مناسب پروتئين ها استفاده نمود. به طـور اعـم با رنگ (W/V) Panceau S ۰/۳-۰/۵ درصد كـه داراي۵ درصد (W/V) تري كلرواستيك اسيد می باشد نتايج خوبي مشاهده مي می گردد.

- پانسو S ، ۳۰۰-۵۰۰ ميليگرم

تری كلرو استيک اسيد ، ۵ ميليگرم

آب مقطر تا ۱۰۰ ميلی ليتر

- Counter staining: جهت افتراق پروتئين هاي هم از غير هم(Hem)، نوار را می توان با يك رنگ ويژه هم(Hem) ،Counter stain كرد . براي اين منظور از بنزيدين استفاده مي شود كه بدليل كارسينوژنيك بودن آن ساير رنگهاي ويژه هم (Hem) مانند :

O - tolidine dihydrochloride

O – dianisidine (3 , 3´ dimethoxybenzidine)

نيزتوصيه مي شود.

- **محلول هاي رنگ بر ، آب گير ، شفاف كننده**

۱) اسيد استيك (V/V) ۳-۵ درصد (رنگ بر)

۲) متانول۹۵ -۱۰۰ درصد (آب گير)

۳) اسيد استيك در متانول (V/V)۲۰درصد (شفاف كننده)

با چند بار تعويض در اسيد استيك ۳-۵ درصد ، زمينه را بي رنگ كنيد.

- **روش كار**

روش كار بر اساس دستور العمل هر توليدكننده صورت می گيرد. مراحل زير بطور معمول در اكثر روش ها اجرا می شود:

۱) نوار استات سلولز را به آرامي در بافر فرو ببريد تا از ايجاد حباب هوا جلوگيري كند.(اشباع كردن در بافر)

۲) دو مخزن تانک را به طور مساوي با بافر پر كنيد.

۳) نوار اشباع شده را از بافر خارج نموده و به سرعت بين دو ورقه كاغذ جاذب الرطوبت قرار داده ورطوبت اضافي را به طور يكنواخت بگيريد.

۴) نمونه هاي همولیزات را بر روي استات سلولز ، در طول يك خط و در فاصله يك سوم طول ورقه از لبه كاغذ قرار دهيد. نتايج خوب عموما" با مقادير ۰/۵-۱ميكرو ليتراز همولیزات مشاهده مي شود.

۵) نوار استات سلولز را طوري بر روی پل مخزن قرار دهيد كه محل نمونه گذاري به كاتد نزديكتر باشد.

۶) مطمئن شويد سمت استات سلولزنوار به طرف بافر (پائين) است.

۷) ولتاژ ۲۵۰-۴۰۰ ولت (عموما" ۳۵۰) را در زمان مورد نظر برقرار كنيد .(بسته به نوع و اندازه نوار استات سلولز و كارخانه توليدكننده متغير است.)

۸) پس از زمان مورد نظر ، نوار را از مخزن بيرون آورده ، بر اساس دستور العمل درون كيت رنگ آميزي ، شفاف و خشك كنيد.

- **ملزومات حركت**

* كنترل

در هر بار الكتروفورز استات سلولز بايداز يك نمونه كنترل حاوي هموگلوبين های A , F , S , C در كنار نمونه های بيماران استفاده نمود..

- نوسانات كم جريان برق ، شماره سريالهاي مختلف بافر ونوار استات سلولز ، ممكن است سبب تغييرات كم در سرعت حركت در الكتروفورز شود.

- الگوي حركت نمونه هاي مجهول را بايد با همولیزات نمونه كنترل درهمان نوار مقايسه نمود.

* جدا سازی

با هر شماره سريال جديد استات سلولز ، نمونه هايي كه حاوي تركيبي از هموگلوبين هاي F , A و F , S هستند بايد نمونه گذاري شوند و جداسازي مناسب هموگلوبين ها بر روي نوار استات سلولز آزمايش شود. تفكيك واضح اين هموگلوبين ها بايد با يك ناحيه شفاف كوچك بين آنها مشخص شود. ممكن است لازم باشد غلظت هموگلوبين ها را در نمونه كاهش داده يا زمان و ولتاژ را جهت مشاهده تفكيك دقيق باندها تنظيم شود.

- **فتوتيپ**

منظوراز فنوتيپ، هموگلوبين های عمده ای است که به فرم باند مجزا درالکتروفوراستات سلولز قابل مشاهده می باشند.

- در گزارش هموگلوبينوپاتي ها ، هموگلوبيني که غلظت آن بيشتر است ، ابتدا نوشته مي شود . وقتي غلظت HbA بيشتر است ، الگوي فرم هتروزيگوت آن مثلا" در سيکل سل هتروزيگوت يا HbC هتروزيگوت به صورت HbAC يا HbAS نوشته ميشود.

-اگر دو نوع هموگلوبين تقريبا" در مقادير مساوي حضور داشته باشند. آن يکي که از نظر باليني اهميت بيشتري دارد اول نوشته مي شود. مثلا" (HbSC)

-هموگلوبينوپاتي هايي نظير HbS هموزيگوت يا HbS / β - thal اغلب با يك افزايش در HbF همراه شده اند. اين مسئله قسمتي از ژنوتيپ نيست (بلکه مسئله اي جبراني است .) البته به جز در HPFH* .

- در برخي موارد تشخيص انواع هموگلوبينوپاتي ها از يکديگر مشکل است مثلا" در شکل (β° - thal) ، HbA کاملا" غايب است والگو HbS / β°thal از نوع هموزيگوت HbS غير قابل تشخيص است .

- **ژنوتيپ**

ترکيب اختصاصی آلليک ژن يا مجموعه ژنها در سطح DNA می باشد.

شرح بيان ژنتيکي کامل انواع هموگلوبين ها ، نياز به روش هاي آزمايشگاهي تائيدی ، مطالعات خانواده گي (شجره نامه) و مطالعات باليني دارد.

- **منابع خطا**

تشخيص قطعي هموگلوبينوپاتي بر اساس الکتروفورز در PH واحد امکان پذيرنمی باشد در عين حال اين روش با وجود مشخص نمودن هموگلوبينهای مختلف، مقدار کمی وصحيح هر هموگلوبين را نيز نشان نمی دهد. اما تفاوت های آشکار را ميتوان تخمين زد.

۱) کدورت و آلوده گي بافر ، بافر با PH يا قدرت يوني نامناسب .

۲) آلوده گي چاهکهاي نمونه گذاري ، اپليکاتور، blotter ها (کاغذهاي جاذب الرطوبت) ، يا آلوده گي پليت استات سلولز با گرد و خاك ، خون يا ساير پروتئين ها .

۳) کدورت يا مستهلك شدن (تغيير رنگ) هموليزات :

- همولیزات کهنه ، حاوي استروماي گلبول قرمز، یا آلود گي باکتریال ممکن است جداسازي شان خیلي ضعیف باشد ، آرتفکت بدهند و یا باندهاي هموگلوبین به صورت Smear دیده شوند. (تفکیك نشوند)
- تشکیل همولیــزات قهــوه اي رنگ ممکن است مربوط به ایجاد مت هموگلوبین در نمونه هاي کهنه و یا نمونه هایي که بطور مناسب نگهداري نشده اند باشد. در صورت وجود مت هموگلوبین در نمونه خون، باندهاي کوچکي در سمت کاتدیك باندهاي هموگلوبین اصلي دیده مي شود

باافزودن یك قطره سیانید پتاسیم (KCN)۵ درصد به همولیزات، مت هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین تبدیل مي شود ، در نتیجه اگر مت هموگلوبین به عنوان آرتفکت در نمونه وجــود داشته باشد (در نمونـــه اي که به خــوبي نگهداري نشده) باند ضعیف مت هموگلوبین دیگر دیده نمي شود. با این روش مي توان جوابهاي مبهم و گیج کننده را از بین برد و یك جواب واضح بدست آورد.

۴) مکش نامناسب بافر درنوار استات سلولز ، سبب حبس شدن هوا یا پوسته پوسته شدن ورقه مي شود.

۵) blotting نامناسب نوارهای استات سلولز ، سبب خشك شدن استات سلولز یا باقي ماندن رطوبت روي آن مي شود.

۶) تأخیر در : الف) نمونه گذاري روي نوارهاي blot شده ، ب) در برقراري جریان الکتریسته ، ج) در بیرون آوردن نوارها از مخزن ، د) در رنگ آمیزي نوارها بعد از الکتروفورز ← سبب ایجاد خطا مي شود.

۷) مقدار نمونه گذاري نامناسب باشد . (خیلي زیاد یا کم)

۸) قراردادن نمونه ها بطور نامناسب بر روي نوار استات سلولز سبب ایجاد خطا مي شود. نمونه ها باید نسبت به مرکز به صورت کاتدیك قرار گیرند تا فضاي مناسب را جهت حرکت هموگلوبین به سمت آند فراهم کنند.

۹) بخار شدن زیاد رطوبت نوارها در مدت الکتروفورز (مثلا"بدنبال حرارت بالا ، جریان خیلي بالا و غلظت هاي بالاي بافر) که در این حالت اگر دماي اتاق بالا تراز ۲۵ درجه باشد، خنك کردن دستگاه توسط کیسه یخ(Icebag) ضرورت پیدا مي کند.

۱۰) عدم برداشت لكوسيت ها در بيماران مبتلا به لكوسيتوز ، ممكن است يك باند غيرطبيعي از پروتئين هم (Hem)ايجاد كند.اين باند حركت آنديك سريعتر از هر هموگلوبيني دارد (حتي سريعتر از HbH) و ممكن است ناشی از ميلو پراكسيداز لكوسيتی باشد.

۱۱) در بيماران ديابتي كه تحت كنترل پزشك نيستند ، باندی كه نسبت به HbA كمی آنديك تر است ، به دليل حضور هموگلوبين گليكوزيليت مشاهده مي شود.

الكتروفورز سيترات آگار

درالكتروفورز سيترات آگار جدا سازی هموگلوبين ها بر اساس واكنش متقابل بين هموگلوبين ، آگار و يونهای بافر سيترات صورت می گيرد.

نمونـــه گذاري : •

- نمونه هاي هموليزات را به آرامي به سطح آگار منتقل كنيد.
- نمونه گذاری بايد به فاصله ۳سانتی متر ازانتهاي آنديك و يا در مركزنوار صورت گيرد.
- در هنگام نمونه گذاري از آسيب رساندن به سطح آگار اجتناب كنيد.
- HbS و HbC به طرف آند حركت كرده ، در حاليكه HbA و HbF به طرف كاتد حركت مي كنند.
- در هربار الكتروفورز سيترات آگار باید ازنمونه خون كنترل حاوي هموگلوبين هاي C,S,F,A استفاده كرد وباندهای جدا شده را در مقايسه با نمونه كنترل تفسير نمود.
- در صورتيكه به هموگلوبين Hb Oarab مشكوك هستيد ، بايد از نمونه كنترل حاوی اين هموگلوبين استفاده كنيد.
- در بعضي انواع تجارتي پليت هاي آماده سيترات آگار ، HbO با HbS حركت مي كند.

• **مزاياي روش سيترات آگار**

۱- الكتروفورز سيترات آگار همزمان وجود هموگلوبين ها یC,S,F,A و انواع نادر ديگر را تأئيد مي كند. اين روش بين هموگلوبين هاي O,E,C افتراق مي گذارد و HbS را از انواع نادر ديگر كه مشابه HbS در الكتروفورز قليايي حركت مي كند تشخيص مي دهد.

۲- اين روش تشخيص انواع هموگلوبينوپاتي ها را از طريق نشان دادن مقادير كم HbF و HbA در حضور مقادير زياد ديگر هموگلوبين ها آسان مي كند.

۳- الكتروفورز سيترات آگار به عنوان روش ثانويه براي غربالگری خون بند ناف مفيد است . زيرا HbF را به آساني از HbA و HbS جدا مي كند و مقادير كم هموگلوبين بالغين را كه در زمان تولد وجود دارد آشكار مي سازد.

- **محدوديت هـا**

۱) الكتروفورز سيترات آگار نمي تواند به عنوان يك روش غربالگری اوليه برای شناسائی هموگلوبين هاي غيرطبيعی كمك كننده باشد. چون بسياری از انها على الرغم شارژالكتريكي شان نظيرHbA يا HbF(در موارد مشكوک به واريانت های هموگلوبين فتال) حركت ميكنند.

۲)در صورت تهيه پليت هاي آگار درآزمايشگاه نمی توان آن را به مدت طولاني نگهداري كرد ، چون خراب شده (گاهي اوقات حتي بعد از يكماه) و ضريب اطمينان آنها بايد به طور متناوب با نمونه هاي كنترل چك شوند.

۳) حركت هموگلوبين ها می تواند به عوامل مختلف وگسترده ای (در مقايسه با سايرروشها) نظير غلظت ونوع هموگلوبين، تغييردر خصوصيات بافرو جريان الكتريكی وابسته باشد. لذا استفاده هم زمان از نمونه كنترل بسيار مهم است.

۴) رنگ آميزي های ساده پروتئين نظير پانسو S ، به دليل آنكه جذب آگار مي شوند قابل استفاده نمی باشند.

• منابع خطـا

منابع خطا همانند روش استات سلولز مي باشد.

دانشگاه علوم پزشكی خراسان شمالی
معاونت بهداشتی
اداره امور آزمايشگاه ها