عزل هرمون اللبتين من البلازما وتقدير وزنه الجزيئي باستخدام التقنيات الحياتية

د. ذكرى علي علوش
قسم الكيمياء / كلية العلوم
جامعة الموصل

د. قصي عبد القادر الجلبي
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة الموصل

د. نوال ذنون يونس*
قسم العلوم التمريضية الأساسية
كلية التمريض / جامعة الموصل

الاستلام ١٨ / ٠٦ / ٢٠٠٧ **القبول** ٠٣ / ٠٣ / ٢٠٠٨

Abstract

The research include the isolation of leptin hormone from plasma of female by gel filtration chromatography technique using separating column 100×2Cm containing Sephadex G - 75 produced 5 bands where number 5 showed leptin concentration 0.5ng/ml.

The apparent molecular weight of leptin had been determined by gel filtration chromatography technique using Sephadex G - 75, and by SDS electrophoresis, the results showed that the apparent molecular weight for the band number 5 of leptin hormone was 15750±353 Dalton and 16000 Dalton respectively.

الملخص

تضمن البحث عزل هرمون اللبتين من بلازما الدم لأنثى وذلك باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود الفصل ذي الأبعاد 2×100سم الحاوي على هلام Sephadex G -75 وأظهرت النتائج ان الحزمة البروتينية الخامسة المفصولة من البلازما تحتوي على فعالية لهرمون اللبتين والتي كانت مساوية إلى تركيز 0.5 نانوغرام/مل.

* بحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحثة نوال ذنون يونس.

كما قدر الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون اللبتين المفصول باستخدام تقنيتي كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G - 75 وتقنية الهجرة الكهربائية بوجود مادة الـ SDS. أظهرت النتائج ان الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الخامسة لهرمون اللبتين مساوية إلى 353±15750 دالتون و 16000 دالتون على التوالي.

المقدمة

يستخدم بلازما الدم plasma ومصل الدم serum في تقدير هرمون اللبتين إلا ان مستواه في المصل أعلى من مستواه في البلازما بحوالي ٢٠% وكذلك مستواه لدى الإناث أعلى من مستواه لدى الذكور. (1)، وحددت النسبة الطبيعية لمستويات اللبتين في مصل الدم نسبة إلى الأنسجة الدهنية فقد كانت لدى النساء أعلى بحوالي ٢.٥ مرة منها لدى الرجال وكانت في النساء النحيفات 3.7 ± 7.4 نانوغرام / مل وفي الرجال النحيفين 1.8 ± 3.8نانوغرام / مل، (2)، كما وجد الباحث Snehalatha وآخرون (3) ان مستواه في النساء 10.9 نانوغرام / مل وفي الرجال 3.6 نانوغرام / مل.

تمكن الباحثون عام 2002 من استخدام اللبتين في علاج داء السكر حين وجدوا انه يقلل من مقاومة الأنسولين ويمنع من تجمع الدهون في الجسم.(4)

يستخدم اللبتين علاجاً للسمنة وللتقليل من وزن الجسم في الأشخاص المصابين بنقص اللبتين خلقيا فهو يزيد من أكسدة الأحماض الدهنية وتأيض الكلوكوز عن طريق فعالية بروتين كاينيز الذي يزيد من فعالية انزيم ادينوسين أحادي الفوسفيت الحلقي كاينيز cAMP kinase .(5)

كما ان القصور في اللبتين يسبب تأخير البلوغ عند الأطفال ولكلا الجنسين ويظهر تأثيره عند بداية البلوغ في المرأة إذ يزداد في مرحلة قبل الطمث، فهرمون اللبتين يفرز كذلك من المشيمة ويؤدي دوراً مهماً في تنظيم تأيض الدهون خلال مدة الحمل إذ يلاحظ زيادة في إفرازه من الأنسجة الدهنية وخاصة خلال مدة الحمل المتأخر (5،6).

في حين تمكن الباحث Lewandowski وآخرون (7) من فصل ثلاث أنواع من الحزم، الحزمة الأولى هي للبتين المرتبط والثانية هي لمستقبلات اللبتين والثالثة هي للبتين الحر.

يهدف البحث الحالي إلى محاولة عزل هرمون الل بتين من بلازما الدم وتقدير وزنه الجزيئي الذي يعتمد على نوع الهرمون فيما إذا كان حرا أو مرتبطاً باستخدام التقنيات الحياتية وذلك لعدم وجود دراسات سابقة حول الهرمون ولاستخدامه مستقبلاً في معالجة السمنة وداء السكري.

الجزء العملي

١- النماذج المستخدمة :

تم الحصول على بلازما الدم لأنثى (متبرعة عمرها ٣٠ عاماً وغير متزوجة) بالتعاون مع مصرف الدم في الموصل.

٢- عزل هرمون اللبتين من بلازما الدم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي :

استخدمت طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال عمود الفصل ذي الأبعاد 2×100 سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G - 75 على ارتفاع ٩٤ سم، لعزل هرمون اللبتين إذ استخدم٢ مل من نموذج البلازما المركز وتبع ذلك ١ مل من الماء المقطر للغسل، وتم استرداد المواد البروتينية بمعدل جريان 60 مليليتر /ساعة وبمعدل ٢.٥ دقيقة لكل جزء من جامع الأجزاء الذي يعمل على نظام الدقائق ، وتمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس الامتصاص عند طول موجي ٢٨٠ نانومتر باستخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (Ultraviolet and Visible Spectrophotometer) وقياس تركيز هرمون اللبتين في الأجزاء المفصولة.

٣- تقدير الوزن الجزيئي :

أ) <u>تقنية الترشيح الهلامي</u> :

تم الاعتماد على طريقة الباحث Andrews(8) وذلك باستخدام طريقة الترشيح الهلامي في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون اللبتين المعزول باستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد 2 x 100سم من الحزمة البروتينية الخامسة التي أظهرت تركيز للهرمون الحاوي لمادة الهلام Sephadex G-75 على ارتفاع ٩٤ سم وتم إمرار عدد من المركبات المعلومة الوزن الجزيئي وتتراوح أوزانها الجزيئية بين 204-2000000 دالتون لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي V_i Internal Volume لكل مادة وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبيات V_o Void Volume .

ب) <u>تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام (SDS – PAGE)</u> :

اتعبت طريقة الباحث ي Bryan و Wilson (9) باستخدام Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) بإمرار مركبات ملعومة الوزن الجزيئي تتراوح أوزانها الجزيئية بين 12.500-67000 دالتون ضمن مجال كهربائي، حيث ان (SDS) يعمل على الإحاطة بالشحنات في المجاميع المختلفة المرتبطة بـهذه المركبات المراد فصلها ضمن المجال الكهربائي لذلك فان الفصل يعتمد بشكل رئيس على الوزن الجزيئي للمركبات التي تفصل بهذه الطريقة.

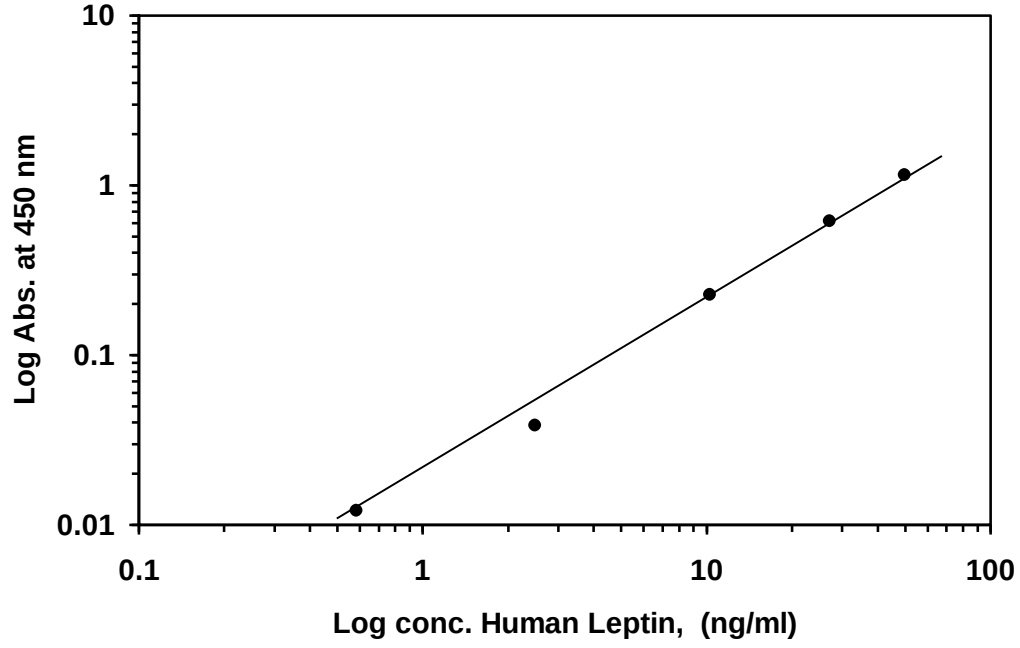
٤- تقدير كمية هرمون اللبتين في مصل الدم بطريقة الأليزا

Determination of Serum Leptin Hormone in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

تم تقدير هرمون اللبتين في مصل الدم باستخدام عدة التحليل kit من شركة Diagnostic systems laboratories, Inc. الأمريكية.

المبدأ Principle

تم تقدير هرمون اللبتين في مصل الدم بطريقة الأليزا عن طريق التنافس بين الأجسام المضادة للهرمون الموجودة في حفر شريحة التخافيف الدقيقة والأجسام المضادة المرتبطة بانزيم HRP horseradish peroxidase على مواقع الارتباط بمستضدات اللبتين الموجودة في مصل الدم وبعد عمليات الغسل ب المحلول Wash buffer لإزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة يتم إضافة محلول المادة الأساس للانزيم التي ترتبط بالانزيم لتكون محلولا ازرق اللون يتحول إلى اللون الأصفر بعد إضافة محلول حامض الكبريتيك ليوقف التفاعل، وتتناسب شدة اللون طرديا م ع تراكيز مستضدات الهرمون الموجودة في مصل الدم التي تقاس الامتصاصية لها عند الطول الموجي ٤٥٠ نانومتر ، ويتم تحديد تراكيز اللبتين في نماذج مصل الدم من خلال المنحني القياسي له الذي تتناسب من خلاله تراكيز اللبتين للمحاليل القياسية له طرديا مع الامتصاصية كما موضح في الشكل (١) .



الشكل ١ : المنحني القياسي النموذجي لهرمون اللبتين.

الكواشف Reagent

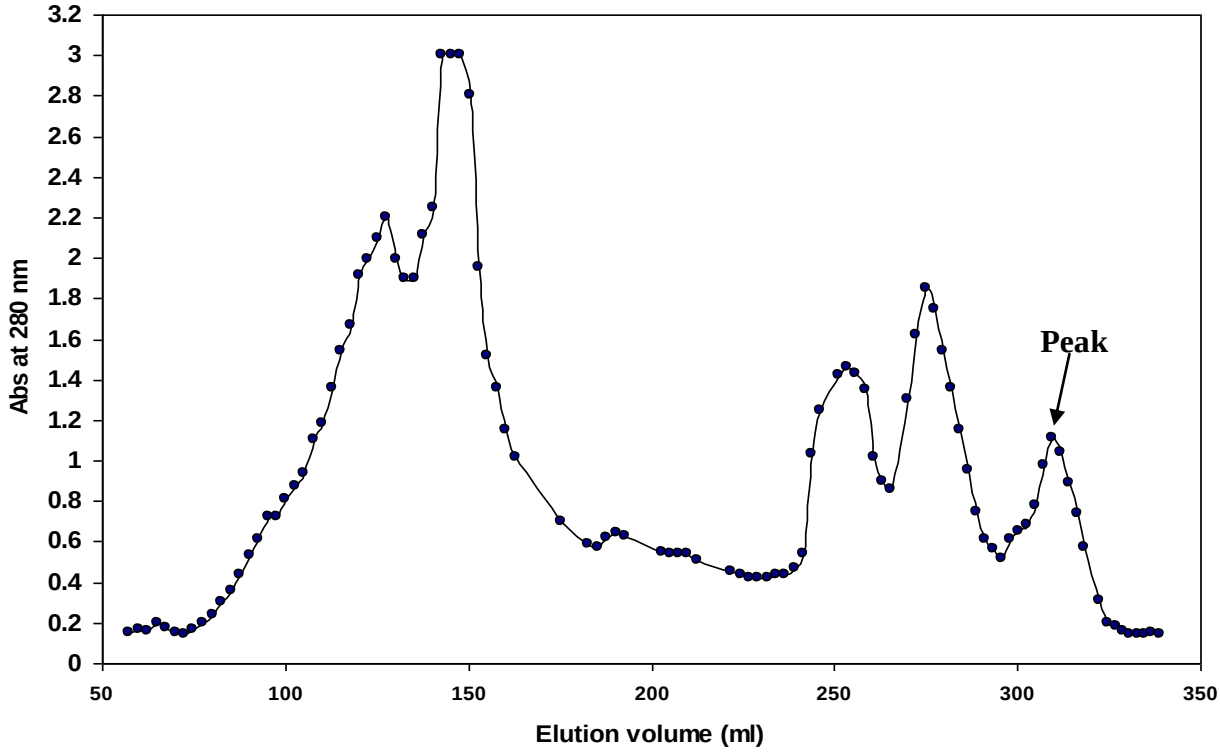
١. الأجسام المضادة للبتين في مواقع حفر شريحة التخافيف الدقيقة.
٢. **المحاليل القياسية** : تحتوي هذه المحاليل على خمس عبوات تحتوي عل تراكيز اللبتين بين 50-0.5 نانوغرام / مل في المحلول المنظم .
٣. **محاليل السيطرة** : وهي عبوتان تحتوي كل منهما على ٠.٥ مل بتركيز واطئ 0.6 ± 2 نانوغرام / مل ، وبتركيز عال 2.5 ± 10 نانوغرام / مل .
٤. **الأجسام المضادة المرتبطة بالانزيم** : يحضر المحلول بتخفيف 240 مايكرولتر من محلول الأجسام المضادة المرتبطة بالانزيم في ١٢ مل من المحلول المنظم Assay Buffer .
٥. **المحلول المنظم** Assay Buffer .
٦. **محلول المادة الأساس** : يحتوي على محلول Tetramethylbenzidine (TMB) في المحلول المنظم الستريت مع بيروكسيد الهيدروجين .
٧. **محلول الغسل Wash solution** : يحضر بتخفيف العبوة ٦٠ مل في ١٥٠٠ مل من deionized water .
٨. **Stopping solution** : وهو عبوة واحدة تحتوي على ١١ مل من 0.2 مولاري من حامض الكبريتيك.

طريقة العمل Procedure

١. ترقم شريحة التخافيف الدقيقة ثم تضاف إلى هذه المواقع ٢٥ مايكرولتر من كل من المحاليل القياسية والسيطرة، ونماذج مصل الدم.
٢. إضافة ١٠٠ مايكرولتر من محلول Assay Buffer إلى مواقع شريحة التخافيف ثم تحضن في الهزاز shaker بسرعة 700-500 دورة/دقيقة عند درجة حرارة الغرفة مدة ساعتين.
٣. إزالة المحلول بالنقر على ظهر الشريحة ثم تغسل خمس مرات بمحلول الغسل وبمقدار 0.35مل في كل مرة.
٤. إضافة ١٠٠ مايكرولتر من المحلول الانزيمي ا لمحضر ثم توضع الشريحة في الهزاز shaker مدة ساعة.
٥. إزالة المحلول من الشريحة ثم غسلها بمحلول الغسل خمس مرات باستخدام جهاز الغسل washer.
٦. إضافة ١٠٠ مايكرولتر من محلول TMB وتوضع الشريحة في الـ shaker مدة 10 دقائق.
٧. إضافة ١٠٠ مايكرولتر من محلول حامض الكبريتيك لإيقاف التفاعل ثم تقرأ الامتصاصية للمحاليل خلال 30 دقيقة باستخدام جهاز reader عند ٤٥٠ نانومتر.

النتائج والمناقشة

استخدمت تقنية الترشيح الهلامي في عملية فصل هرمون اللبتين من بلازما الدم بعد تركيزه بواسطة التجفيد (Lyophilization)، وبعد عملية فصل المركبات البروتينية لبلازما الدم المركز على عمود الفصل تبين ظهور خمس حزم كما مبين في الشكل (٢).



الشكل ٢: المظهر الجانبي لروغان بلازما الدم بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد 100x2 سم والحاوي على هلام Sephadex G – 75 على ارتفاع ٩٤ سم وبسرعة جريان ٦٠ مل/ساعة

وكانت حجوم الروغان لقمم هذه الحزم كما يأتي :

حجم روغان قمة البلازما للحزمة الاولى = 125مل

حجم روغان قمة البلازما للحزمة الثانية = ١٤٤ مل

حجم روغان قمة البلازما للحزمة الثالثة = ٢٥٦ مل

حجم روغان قمة البلازما للحزمة الرابعة = ٢٧٥ مل

حجم روغان قمة البلازما للحزمة الخامسة = ٣١٢ مل

ومن خلال متابعة تركيز هرمون اللبتين بعد عملية الفصل تبين ان الحزمة البروتينية الخامسة لبلازما الدم تحتوي على فعالية لهرمون اللبتين والذي كان 0.5 نانوغرام/مل.

١- تقدير الوزن الجزيئي :

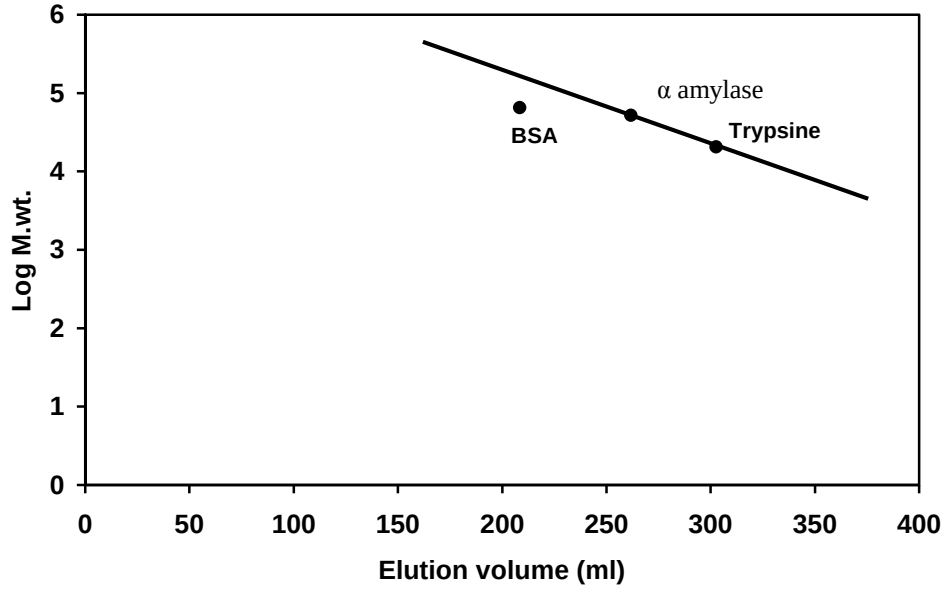
١-١ تقنية الترشيح الهلامي

تم الاعتماد على طريقة الباحث Andrews (8) وذلك باستخدام طريقة الترشيح الهلامي في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون اللبتين من الحزمة البروتينية الخامسة التي أظهرت تركيز للهرمون كما استخدم للغرض نفسه عمود الفصل والجدول (١) يبين المواد التي مررت على عمود الفصل الحاوي لمادة الهلام Sephadex G-75 وأوزانها الجزيئية وحجوم روغانها.

الجدول (١) : العلاقة بين الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد لمستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي.

اسم المادة	الوزن الجزيئي دالتون	حجم الروغان مل
الدكستران الازرق BlueDextran	2000000	104.5
البومين مصل البقر BSA	67000	209
انزيم الفا – اميليز α-Amylase Enzyme	58000	262.3
انزيم التربسين Trypsin Enzyme	23000	303.2
التريتوفان Trypto Phan	204	364

وعند رسم حجم الروغان Elution Volume لكل مادة في مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الخامسة المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي والموضحة في الشكل (٢) إذ كان حجم الروغان للحزمة ٣١٢ مل وتشير النتائج من المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي التقريبي الشكل (٣) إلى ان الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون اللبتين يساوي 353.5±15750 دالتون.

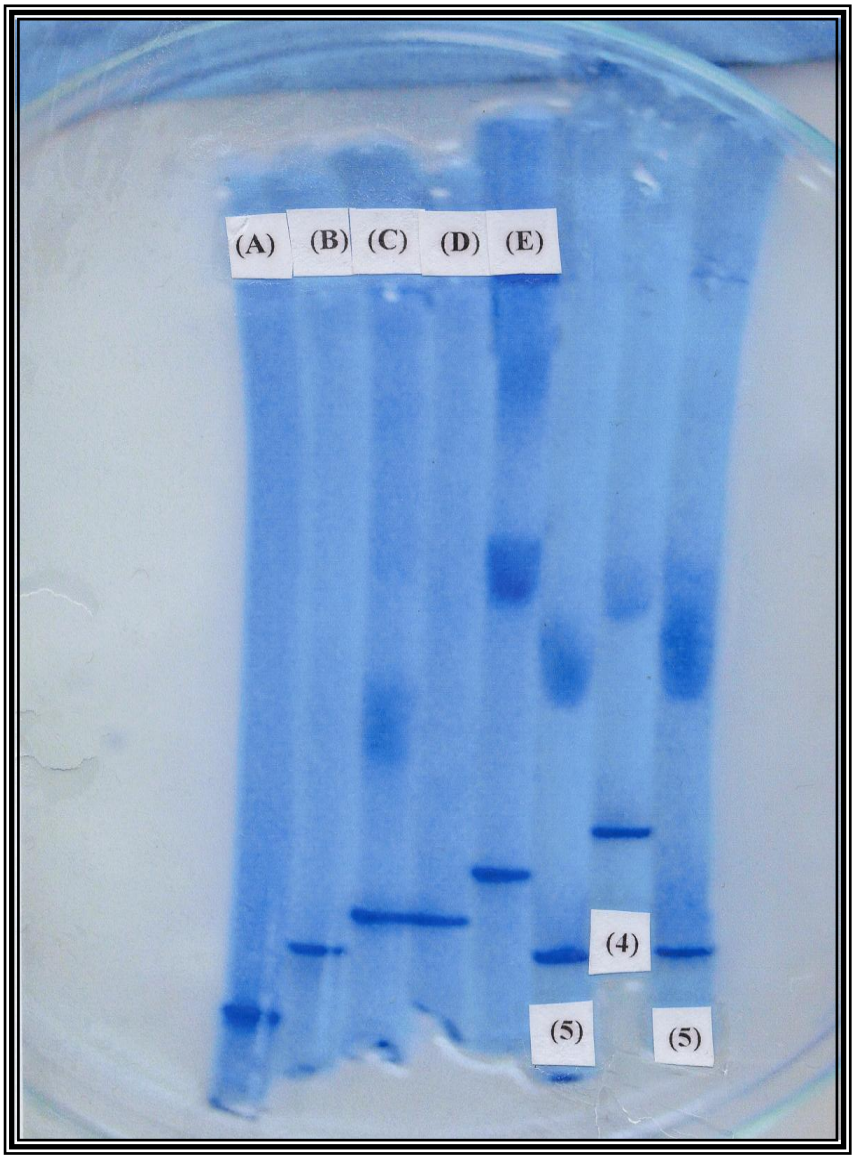


الشكل ٣ : المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي

١-٢ تقنية الهجرة الكهربائية SDS-PAGE

Sodium Dodecyl Sulphate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

قدر الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون اللبتين من الحزمة البروتينية الخامسة والتي أظهرت فعالية لهرمون اللبتين باستخدام SDS-PAGE واستخدم لهذا الغرض عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي تتراوح أوزانها الجزيئية بين 67000-12.500 دالتون كما موضح في الشكل (٤).



الشكل (٤) : صورة الهجرة الكهربائية الحاوية على الـ SDS .

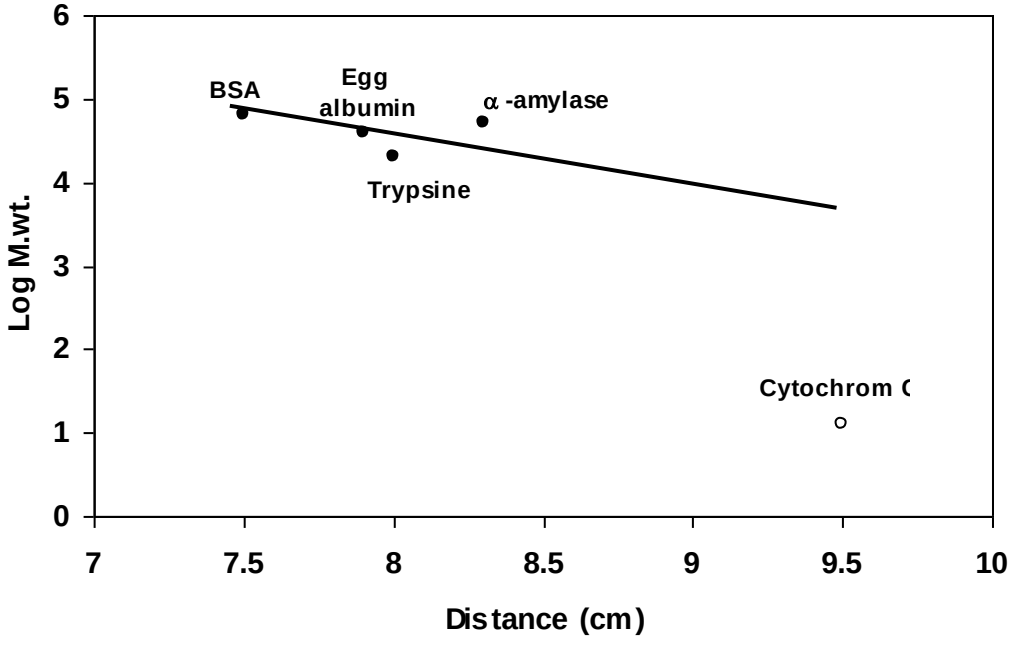
المواد القياسية: (A) سايتوكروم C، (B) تربسين، (C) البومين البيض، (D) ألفا-أميليز، (E) BSA .
(4) و (5) تمثل الحزم البروتينية الأخيرة المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي.

يبين الجدول (٢) المسافات التي قطعتها العينات واوزانها الجزيئية وعند رسم المسافة المقطوعة لكل مادة في مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الخامسة والتي مررت مرتين بهذه التقنية فكانت المسافات التي قطعتها هـ ي 8.7,8.5 سم اخذ معدل المسافة المقطوعة للحزمة فكان ٨.٦ سم والموضحة في الشكل (٤).

الجدول (٢) : العلاقة بين الوزن الجزيئي والمسافة المقطوعة للمواد لمستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية SDS-PAGE .

اسم المادة		الوزن الجزيئي دالتون	المسافة المقطوعة سم
البومين مصل البقر	BSA	67000	7.5
انزيم الفا – اميليز	α-Amylase Enzyme	58000	8.3
البومين البيض	Eggs Albumin	45000	7.9
انزيم التربسين	Trypsin Enzyme	23000	8
سايتوكروم C	Cytocrom (C)	12.500	9.5

وتبين من خلال المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي SDS-PAGE في الشكل (٥) ان الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الخامسة يساوي 16000 دالتون ويتضح من خلال نتائج فصل الهرمون وتقدير وزنه الجزيئي بتقنيتي الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية ان الحزمة البروتينية الخامسة المفصولة من بلازما الدم هي للمركب البروتيني نفسه الذي حدد وزنه الجزيئي التقريبي بـ 16000 دالتون وهذا يتفق مع (١ ، ٧).



الشكل ٥ : المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية SDS-PAGE .

يستنتج من البحث ان البلازما تحتوي على خمس حزم بروتينية عند فصلها بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G - 75 وان الحزمة البروتينية الخامسة فقط أعطت فعالية لهرمون اللبتين وتبين ان الوزن الجزيئي التقريبي للهرمون المعزول هي بحدود ١٥٧٥٠ و١٦٠٠٠ دالتون باستخدام تقنيتي الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية بوجود SDS على التوالي ويعتقد من خلال النتائج ان الهرمون المعزول هو من النوع الحر غير المرتبط.

المصادر

1. Horn, R. R.; Geldszus, R.; Potter, E.; Muhlen, V. Z.; and Brabant, G. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 104: 454-458. 1996.

2. Linco Research, Inc. info (a) lincoresearch. Com. www.Linco research. com. U.S.A..

3. Snehalatha, C.; Ramachandran, A.; Satyavani, K.; Sivasankair, S., and Vijag, V. 47 (12): 1164-1167. 1999.

4. Miyanaga, F.; Ogawa, Y.; Ebihara. K.; Hidaka, S.; Tanaka, T.;Hayashi., S.; Masuzaki, H.; and Nakao, K. Diabetologia. 46: 1329-1337. 2003.

5. Licinio, J., Caglayan, S., Ozata, M.; Yildiz, B. O.; Miranda, P. B.; Okirwan, F.; whitby, R.; Liang, L.; cohen, P.; Bhasin, S.; Krauss, R. M.; Veldhuis, J. D.; Wagner, A. J.; Depaoli, A. M.; Mcconn, S. M. and Wong, M. L. PNAS. 101 (13): 4531-4536. 2004.

6. Laml, T.; Hartmann, B. W.; Ruecklinger, E.; Preyer, O.; Soeregi, G.; and Wagenbichler, p. J. Soc. Gynecol. Investig. 8(1): 43-47. 2001.

7. Lewandowski, K.; Horn, R.; Ocallaghan, C. J.; Dunlop, D.; Medlley, G. F.; Ohare, P.; and Brabant, G. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84: 300-306. 1999.

8. Andrews, P. J. Biol. Chem. 96: 595. 1965.

9. Bryan, L. W. and Wilson, K. "Abiologists Guide to principles and Techniques of practical Biochemistry" 2nd ed., Butter and Tanner Ltd., London. 212. 1981.