الکتروفورز هموگلوبین

الکتروفورز استات سلولز – سیترات آگار

اصول- روش کار- خطاها

ترجمه : دکتر کتایون خداوردیان

آزمایشگاه مرجع سلامت

الکتـــروفـــورز

الکتروفورز عبارت است از حرکت یک جسم باردار در یک میدان الکتریکی در PH معین.

پروتئین ها درPH ایزو الکتریک خود دارای بارهای منفی ومثبت برابرند، بنابر این در PH قلیائی دارای بار منفی شده وبطرف قطب مثبت حرکت می کنند. در طی این حرکت جدا سازی صورت میگیرد. هموگلوبین نرمال در افراد بالغ (HbA) ، در بافر قلیایی دارای شارژ منفی است و به طرف آند حرکت می کند .

جداسازی بیشتر انواع هموگلوبین های غیرطبیعی ازهموگلوبین A بدلیل ساختمان غیر طبیعی آنها که معمولا" یک آمینواسید جایگزین آمینو اسید دیگرشده است ، بر اساس تغییر در شارژ الکتریکی شان صورت می گیرد.

جدا سازی الکتروفورتیک روشی ساده برای شناسائی مقدماتی بسیاری از هموگلوبین ها می باشد.

الکتروفورز استات سلولز جهت بررسی هموگلوبینوپاتی‌ها :

انواع مختلف حامل (Supporting media) وجود دارد که حامل های سلولزی از متداول ترین آنها می باشد.

مزایا: سهولت استفاده ،جدا سازی سریع هموگلوبین های A، S، F وC (با جذب کم)،حمل آسان ونگهداری طولانی مدت با قرار دادن در کیسه پلاستیکی

معایب: عدم شناسائی اجزائی از هموگلوبین با غلظت کم،عدم جدا سازی همه انواع هموگلوبین بخصوص هموگلوبین های ناپایدار.هم چنین هموگلوبین های F وA در کنار هم جدا می شوند که ممکن است مقادیر کم هر یک در برابر مقدار بالای دیگری قابل جدا سازی نباشند.

• آماده سازی نمونه

– نمونه مورد استفاده در الکتروفورز ، همولیزات است که ترجیحا" از گلبولهای قرمز شسته شده تهیه می شود. یک جداسازی خوب الکتروفورتیک ، عموما" از همولیزاتی با غلظت هموگلوبین در محدوده ۳–۲ گرم در دسی لیتربدست می آید.

– ضد انعقاد مصرفی EDTA , ACD , CPD یا Heparin می باشد وخون دردمای ۴درجه به مدت۱۰ روزقابل نگهداری است. (خون های هپارینه در طول نگهداری ممکن است تشکیل لخته های بسیار کوچک بدهند .)

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

– در صورتیکه بیمار مشکوک به یک هموگلوبینوپاتی 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 : دارای مخازن نگهداری بافروپل هایی است که استات سلولز روی آن قرار می گیرند.

۲- منبع تغذیه : باید دستگاه یک ولتاژ ثابت جریان مستقیم داشته باشد و دارای اتصال زمین باشد تا مانع شوک به کاربر شود. مجهز به تایمر۶۰-۰ دقیقه ، قادر به تأمین ولتاژ ۴۵۰ و کلید قطع و وصل اتوماتیک 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 پارگی محیط (Medium) به آن دست بزنیم. معمولا" استات سلولز به یک ورقه پلاستیک متصل می شود.

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

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

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

- پودر تریس هیدروکسی متیل آمینومتان ۱۰/۲گرم
- EDTA ۰/۶گرم
- اسید بوریک 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 الکتروفورز استات سلولزمی توان از هر نوع رنگ آمیزی مناسب پروتئین ها استفاده نمود. به طـور اعـم با رنگ Panceau S (W/V) ۰/۵-۰/۳ درصد کـه دارای۵ درصد (W/V) تری کلرواستیک اسید می باشد نتایج خوبی مشاهده می می گردد.

- پانسو S ، ۳۰۰-۵۰۰ میلیگرم

تری کلرو استیک اسید ، ۵ میلیگرم

آب مقطر تا ۱۰۰ میلی لیتر

- Counter staining: جهت افتراق پروتئین های هم از غیر هم(Hem)، نوار را می توان با یک رنگ ویژه هم(Hem) ،Counter stain کرد . برای این منظور از بنزیدین استفاده می شود که بدلیل کارسینوژنیک بودن آن سایر رنگهای ویژه هم (Hem) مانند :

O - tolidine dihydrochloride

O – dianisidine (3 , 3´ dimethoxybenzidine)

نیزتوصیه می شود.

- **محلول های رنگ بر ، آب گیر ، شفاف کننده**

۱) اسید استیک (V/V) ۳–۵ درصد (رنگ بر)

۲) متانول۹۵ –۱۰۰ درصد (آب گیر)

۳) اسید استیک در متانول (V/V)۲۰درصد (شفاف کننده)

با چند بار تعویض در اسید استیک ۳–۵ درصد ، زمینه را بی رنگ کنید.

- **روش کار**

روش کار بر اساس دستور العمل هر تولیدکننده صورت می گیرد. مراحل زیر بطور معمول در اکثر روش ها اجرا می شود:

۱) نوار استات سلولز را به آرامی در بافر فرو ببرید تا از ایجاد حباب هوا جلوگیری کند.(اشباع کردن در بافر)

۲) دو مخزن تانک را به طور مساوی با بافر پر کنید.

۳) نوار اشباع شده را از بافر خارج نموده و به سرعت بین دو ورقه کاغذ جاذب الرطوبت قرار داده ورطوبت اضافی را به طور یکنواخت بگیرید.

۴) نمونه های همولیزات را بر روی استات سلولز ، در طول یک خط و در فاصله یک سوم طول ورقه از لبه کاغذ قرار دهید. نتایج خوب عموما" با مقادیر ۰/۵–۱میکرو لیتراز همولیزات مشاهده می شود.

۵) نوار استات سلولز را طوری بر روی پل مخزن قرار دهید که محل نمونه گذاری به کاتد نزدیکتر باشد.

۶) مطمئن شوید سمت استات سلولزنوار به طرف بافر (پائین) است.

۷) ولتاژ ۲۵۰-۴۰۰ ولت (عموما" ۳۵۰) را در زمان مورد نظر برقرار کنید .(بسته به نوع و اندازه نوار استات سلولز و کارخانه تولیدکننده متغیر است.)

۸) پس از زمان مورد نظر ، نوار را از مخزن بیرون آورده ، بر اساس دستور العمل درون کیت رنگ آمیزی ، شفاف و خشک کنید.

- **ملزومات حرکت**

* کنترل

در هر بار الکتروفورز استات سلولز بایداز یک نمونه کنترل حاوی هموگلوبین های A , F , S , C در کنار نمونه های بیماران استفاده نمود..

- نوسانات کم جریان برق ، شماره سریالهای مختلف بافر ونوار استات سلولز ، ممکن است سبب تغییرات کم در سرعت حرکت در الکتروفورز شود.

- الگوی حرکت نمونه های مجهول را باید با همولیزات نمونه کنترل درهمان نوار مقایسه نمود.

* جدا سازی

با هر شماره سریال جدید استات سلولز ، نمونه هایی که حاوی ترکیبی از هموگلوبین های F , A و F , S هستند باید نمونه گذاری شوند و جداسازی مناسب هموگلوبین ها بر روی نوار استات سلولز آزمایش شود. تفکیک واضح این هموگلوبین ها باید با یک ناحیه شفاف کوچک بین آنها مشخص شود. ممکن است لازم باشد غلظت هموگلوبین ها را در نمونه کاهش داده یا زمان و ولتاژ را جهت مشاهده تفکیک دقیق باندها تنظیم شود.

- **فتوتیپ**

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

- در گزارش هموگلوبینوپاتی ها ، هموگلوبینی که غلظت آن بیشتر است ، ابتدا نوشته می شود . وقتی غلظت HbA بیشتر است ، الگوی فرم هتروزیگوت آن مثلا" در سیکل سل هتروزیگوت یا HbC هتروزیگوت به صورت HbAC یا HbAS نوشته میشود.

–اگر دو نوع هموگلوبین تقریبا" در مقادیر مساوی حضور داشته باشند. آن یکی که از نظر بالینی اهمیت بیشتری دارد اول نوشته می شود. مثلا" (HbSC)

–هموگلوبینوپاتی هایی نظیر HbS هموزیگوت یا HbS / β - thal اغلب با یک افزایش در HbF همراه شده اند. این مسئله قسمتی از ژنوتیپ نیست (بلکه مسئله ای جبرانی است .) البته به جز در HPFH* .

– در برخی موارد تشخیص انواع هموگلوبینوپاتی ها از یکدیگر مشکل است مثلا" در شکل

(β° - thal) ، HbA کاملا" غایب است والگو HbS / β°thal از نوع هموزیگوت HbS غیر قابل تشخیص است .

- **ژنوتیپ**

ترکیب اختصاصی آللیک ژن یا مجموعه ژنها در سطح DNA می باشد.

شرح بیان ژنتیکی کامل انواع هموگلوبین ها ، نیاز به روش های آزمایشگاهی تائیدی ، مطالعات خانواده گی (شجره نامه) و مطالعات بالینی دارد.

- **منابع خطا**

تشخیص قطعی هموگلوبینوپاتی بر اساس الکتروفورز در PH واحد امکان پذیرنمی باشد در عین حال این روش با وجود مشخص نمودن هموگلوبینهای مختلف، مقدار کمی وصحیح هر هموگلوبین را نیز نشان نمی دهد. اما تفاوت های آشکار را میتوان تخمین زد.

۱) کدورت و آلوده گی بافر ، بافر با PH یا قدرت یونی نامناسب .

۲) آلوده گی چاهکهای نمونه گذاری ، اپلیکاتور، blotter ها (کاغذهای جاذب الرطوبت) ، یا آلوده گی پلیت استات سلولز با گرد و خاک ، خون یا سایر پروتئین ها .

۳) کدورت یا مستهلک شدن (تغییر رنگ) همولیزات :

– همولیزات کهنه ، حاوی استرومای گلبول قرمز، یا آلود گی باکتریال ممکن است جداسازی شان خیلی ضعیف باشد ، آرتفکت بدهند و یا باندهای هموگلوبین به صورت Smear دیده شوند. (تفکیک نشوند)

– تشکیل همولیـــزات قهـــوه ای رنگ ممکن است مربوط به ایجاد مت هموگلوبین در نمونه های کهنه و یا نمونه هایی که بطور مناسب نگهداری نشده اند باشد. در صورت وجود مت هموگلوبین در نمونه خون، باندهای کوچکی در سمت کاتدیک باندهای هموگلوبین اصلی دیده می شود

باافزودن یک قطره سیانید پتاسیم (KCN)۵ درصد به همولیزات، مت هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین تبدیل می شود ، در نتیجه اگر مت هموگلوبین به عنوان آرتفکت در نمونه وجـــود داشته باشد (در نمونـــــه ای که به خـــوبی نگهداری نشده) باند ضعیف مت هموگلوبین دیگر دیده نمی شود. با این روش می توان جوابهای مبهم و گیج کننده را از بین برد و یک جواب واضح بدست آورد.

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

۵) blotting نامناسب نوارهای استات سلولز ، سبب خشک شدن استات سلولز یا باقی ماندن رطوبت روی آن می شود.

۶) تأخیر در : الف) نمونه گذاری روی نوارهای blot شده ، ب) در برقراری جریان الکتریسته ، ج) در بیرون آوردن نوارها از مخزن ، د) در رنگ آمیزی نوارها بعد از الکتروفورز ← سبب ایجاد خطا می شود.

۷) مقدار نمونه گذاری نامناسب باشد . (خیلی زیاد یا کم)

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

۹) بخار شدن زیاد رطوبت نوارها در مدت الکتروفورز (مثلا"بدنبال حرارت بالا ، جریان خیلی بالا و غلظت های بالای بافر) که در این حالت اگر دمای اتاق بالا تراز ۲۵ درجه باشد، خنک کردن دستگاه توسط کیسه یخ(Icebag) ضرورت پیدا می کند.

۱۰) عدم برداشت لکوسیت ها در بیماران مبتلا به لکوسیتوز ، ممکن است یک باند غیرطبیعی از پروتئین هم (Hem)ایجاد کند.این باند حرکت آندیک سریعتر از هر هموگلوبینی دارد (حتی سریعتر از HbH) و ممکن است ناشی از میلو پراکسیداز لکوسیتی باشد.

۱۱) در بیماران دیابتی که تحت کنترل پزشک نیستند ، باندی که نسبت به HbA کمی آندیک تر است ، به دلیل حضور هموگلوبین گلیکوزیلیت مشاهده می شود.

الکتروفورز سیترات آگار

درالکتروفورز سیترات آگار جدا سازی هموگلوبین ها بر اساس واکنش متقابل بین هموگلوبین ، آگار و یونهای بافر سیترات صورت می گیرد.

• نمونـــــه گذاری :

- نمونه های همولیزات را به آرامی به سطح آگار منتقل کنید.
- نمونه گذاری باید به فاصله ۳سانتی متر ازانتهای آندیک و یا در مرکزنوار صورت گیرد.
- در هنگام نمونه گذاری از آسیب رساندن به سطح آگار اجتناب کنید.
- HbS و HbC به طرف آند حرکت کرده ، در حالیکه HbA و HbF به طرف کاتد حرکت می کنند.
- در هربار الکتروفورز سیترات آگار باید ازنمونه خون کنترل حاوی هموگلوبین های C,S,F,A استفاده کرد وباندهای جدا شده را در مقایسه با نمونه کنترل تفسیر نمود.
- در صورتیکه به هموگلوبین Hb Oarab مشکوک هستید ، باید از نمونه کنترل حاوی این هموگلوبین استفاده کنید.
- در بعضی انواع تجارتی پلیت های آماده سیترات آگار ، HbO با HbS حرکت می کند.

• مزایای روش سیترات آگار

۱- الکتروفورز سیترات آگار همزمان وجود هموگلوبین ها یC,S,F,A و انواع نادر دیگر را تأئید می کند. این روش بین هموگلوبین های O,E,C افتراق می گذارد و HbS را از انواع نادر دیگر که مشابه HbS در الکتروفورز قلیایی حرکت می کند تشخیص می دهد.

۲- این روش تشخیص انواع هموگلوبینوپاتی ها را از طریق نشان دادن مقادیر کم HbF و HbA در حضور مقادیر زیاد دیگر هموگلوبین ها آسان می کند.

۳- الکتروفورز سیترات آگار به عنوان روش ثانویه برای غربالگری خون بند ناف مفید است . زیرا HbF را به آسانی از HbA و HbS جدا می کند و مقادیر کم هموگلوبین بالغین را که در زمان تولد وجود دارد آشکار می سازد.

• محدودیت هـــا

۱) الکتروفورز سیترات آگار نمی تواند به عنوان یک روش غربالگری اولیه برای شناسائی هموگلوبین های غیرطبیعی کمک کننده باشد. چون بسیاری از انها علی الرغم شارژالکتریکی شان نظیرHbA یا HbF(در موارد مشکوک به واریانت های هموگلوبین فتال) حرکت میکنند.

۲)در صورت تهیه پلیت های آگار درآزمایشگاه نمی توان آن را به مدت طولانی نگهداری کرد ، چون خراب شده (گاهی اوقات حتی بعد از یکماه) و ضریب اطمینان آنها باید به طور متناوب با نمونه های کنترل چک شوند.

۳) حرکت هموگلوبین ها می تواند به عوامل مختلف وگسترده ای (در مقایسه با سایرروشها) نظیر غلظت ونوع هموگلوبین، تغییردر خصوصیات بافرو جریان الکتریکی وابسته باشد. لذا استفاده هم زمان از نمونه کنترل بسیار مهم است.

۴) رنگ آمیزی های ساده پروتئین نظیر پانسو S ، به دلیل آنکه جذب آگار می شوند قابل استفاده نمی باشند.

- **منابع خطـــا**

منابع خطا همانند روش استات سلولز می باشد.

منابع:

- Detection Of Abnormal Hemoglobin Using Cellulose Acetate Electrophoresis NCCLS Vol.14 No.10 2005

-Hematology A combined Theoretical And Technical Approch 1997

-Citrate Agar Electerophoresis For Confirming The Identification Of Variant Hemoglobins NCCLS Vol.8 No.6 2003

*Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin