زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 3، شمارهٔ 2، پاییز و زمستان 1391

ارزیابی نقش کائوتروپ‌ها، شوینده‌های دو یونی خنثی، خنثی و بدون بار و باردار در انحلال‌پذیری پروتئوم اشک در فرآیند متمرکز کردن ایزوالکتریکی

ندا سرای‌گرد افشاری[1]، حسین نادری‌منش[2*]، مصطفی نادری[3]

1- دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- استاد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- دانشیار و فوق‌تخصص قرنیه، گروه چشم پزشکی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

***تهران، کدپستی 154-14115**
naderman@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/4/26، پذیرش: 91/6/20)

چکیده- در هر آزمون الکتروفورز دوبعدی، دست‌یابی به الگوی جداسازی مناسب و دلخواه تنها با حفظ حالت محلول پروتئین‌ها و جلوگیری از رسوب آن‌ها در مراحل مختلف امکان‌پذیر خواهد بود. متأسفانه به‌جهت لزوم حفظ بار طبیعی پروتئین در بعد اول جداسازی، استفاده از شوینده‌های قوی یونی در این مرحله ممکن نیست و این در حالی است که با افزایش برهم‌کنش‌های آب‌گریز، بین پروتئین‌های آلیفاتیک در نقطه ایزوالکتریک، احتمال رسوب پروتئین‌ها در ماتریکس ژل افزایش می‌یابد. با توجه به ناهمگون بودن محتوای پروتئینی اشک چشم، انتظار می‌رود که نحوه محلول‌سازی پروتئین‌های این سامانه اثرهای چشم‌گیری بر الگوی نهایی پروتئین‌های تفکیک‌شده ایجاد کند. بنابراین در این پژوهش، تأثیر کائوتروپ‌ها، شوینده‌های دویونی خنثی، خنثی و بدون‌بار و باردار در انحلال‌پذیری پروتئوم اشک، در فرایند متمرکز کردن ایزوالکتریکی بررسی شد. نتایج، نشان‌دهنده از دست رفتن پروتئین‌ها در مراحل مختلف، به‌دلیل رسوب در ماتریکس ژل و یا بازنگشتن به فاز محلول در زمان آماده‌سازی و انحلال رسوب است. این بررسی همچنین نشان می‌دهد که شوینده‌های بدون بار مانند TritonX-100 و Tween80 در رفع این مشکل ناموفق هستند. شوینده‌های دویونی خنثی همچون CHAPS و SB3-10 توانایی بیشتری برای حل محتوای هیدروفوب پروتئین‌های اشک داشته و الگوی مناسب‌تری را ارائه می‌دهند. در نهایت، بیشترین میزان انحلال‌پذیری و بهترین الگوی جداسازی می‌تواند با استفاده از مخلوط اوره و تیوره در بافر بارگزاری و اعمال شوینده آنیونی SDS در مرحله آماده‌سازی (با پروتکل ویژه‌ای که حذف کامل SDS و جایگزینی آن با CHAPS را تضمین کند) به‌دست آید.

کلیدواژگان: پروتئوم اشک، متمرکزسازی ایزوالکتریکی، الکتروفورز دوبعدی، محلول‌سازی، شوینده، کائوتروپ.

1- مقدمه

حفظ حالت محلول پروتئین در همه‌ی مراحل خالص‌سازی، جداسازی و ارزیابی و تحلیل از نکاتی است که باید همواره به آن توجه شود. محلول‌سازی فرایندی است که در آن همه‌ی برهم‌کنش‌های داخل و بین مولکولی، شکسته شده، ارتباط تک‌تک اجزا، با اجزاء مشابه یا مواد مداخله‌گر به کمترین مقدار ممکن رسیده و از شکل‌گیری تجمعات ثانویه جلوگیری می‌شود [1]. این فرایند یکی از نگرانی‌های مهم در زمینه‌ی الکتروفورز دوبعدی، به‌عنوان قدرتمندترین روش بررسی مقایسه‌ای محتوای پروتئوم، است.

الکتروفورز دوبعدی پروتئین‌ها در دو مرحله انجام می‌شود. در بعد اول، جداسازی پروتئین‌ها بر اساس نقطه ایزوالکتریک انجام می‌شود و در مرحله‌ی بعد پروتئین‌های تفکیک‌شده بر اساس وزن مولکولی از هم جدا می‌شوند. در هر آزمون الکتروفورز دوبعدی، آماده‌سازی نمونه و متمرکز کردن ایزوالکتریکی به عنوان گلوگاه روش درنظر گرفته می‌شود. در این گلوگاه، استخراج کامل پروتئین‌ها از نمونه‌های بیولوژیک، ورود کامل و مؤثر به بعد اول، حفظ انحلال‌پذیری در روند جداسازی ایزوالکتریکی و جلوگیری از رسوب پروتئین‌ها در ماتریکس ژل از مهم‌ترین عواملی است که مورد توجه قرار می‌گیرد [2]. در مطالعه حاضر انحلال‌پذیری پروتئوم اشک، طی فرایند آماده‌سازی و متمرکز کردن ایزوالکتریکی بررسی خواهد شد. این مبحث در بعد دوم اهمیت کمتری دارد؛ چرا که در بعد دوم، حضور یک شوینده آنیونی بسیار قوی و شناخته شده (SDS) که با نسبت وزنی ثابتی به پروتئین‌ها متصل می‌شود، سبب ایجاد دافعه الکترواستاتیک قوی بین مولکول‌ها شده، از تجمع و نهشت آن‌ها جلوگیری کرده و حرکت آن‌ها را در میدان الکتریکی آسان می‌کند. با توجه به بار منفی SDS و ضرورت حفظ بار طبیعی پروتئین‌ها در بعد اول، استفاده از این شوینده در این مرحله ممکن نبوده و همین عامل سبب می‌شود که از ترکیبات دیگری همچون کائوتروپ‌ها برای برهم زدن نیروهای بین مولکولی و وارد کردن آن‌ها به فاز محلول استفاده شود. باید بیان کرد که اگرچه کائوتروپ‌ها می‌توانند با تغییر خواص حلال و تضعیف بیشتر نیروهای بین مولکولی از جمله نیروهای آب‌گریز، به انحلال مؤثر مولکول‌ها کمک کنند؛ ولی تأثیر آن‌ها در برهم زدن میان‌کنش‌های آب‌گریز هرگز به اندازه شوینده‌ها نیست. به علاوه، به دنبال تضعیف نیروهای هیدروژنی، واندروالس و لاندن ساختار پروتئین، باز شده، بخش‌های آب‌گریز داخلی در دسترس حلال قرار می‌گیرند و احتمال شکل‌گیری تجمعات آب‌گریز افزایش می‌یابد. در خلال فرایند متمرکزسازی نیز، از دست رفتن بار سطحی پروتئین‌ها در نقطه ایزوالکتریک و تبدیل شدن آن‌ها به ترکیبات کاملاً آلیفاتیک، عاملی دیگر برای تقویت نیروهای آب‌گریز و ایجاد نهشت‌های مولکولی در ماتریکس ژل است. بنابراین استفاده از کائوتروپ‌ها به تنهایی نمی‌تواند نیاز به استفاده از شوینده‌ها را از بین ببرد [2]. تنها می‌توان از دو گروه از شوینده‌ها در فرایند متمرکز کردن ایزوالکتریکی استفاده کرد: شوینده‌های خنثی و بدون بار و شوینده‌های دوبونی خنثی. متاسفانه هر دو گروه گفته شده در مقایسه با شوینده‌های باردار بسیار ضعیف‌تر بوده و کارایی لازم را ندارند. از گروه اول می‌توان به خانوادهای Triton ، Tween و Nonidet P-40 و از گروه دوم می‌توان به انواع سولفوبتائین‌ها اشاره کرد [1, 3]. اثر بخشی هریک از این شوینده‌ها کاملاً به ماهیت پروتئوم بستگی داشته و انتخاب آن‌ها باید با در نظر گرفتن این مطلب انجام شود.

اشک چشم، یک نمونهٔ بسیار مهم و کلیدی در مطالعات چشم‌پزشکی و سیستمیک می‌باشد. تماس مستقیم نمونه با

سامانه گردش خون و بخش‌های مختلف چشمی که در بسیاری از موارد امکان تهیهٔ نمونهٔ نرمال از آن‌ها وجود ندارد به همراه سادگی و سهولت نمونه‌گیری، بر ارزش‌های این نمونه در مطالعات کلینیکی و بالینی افزوده است. متاسفانه می‌توان گفت که به لحاظ ساختار ویژه صفحهٔ اشکی، مطالعات پروتئومیک این نمونه با مشکلات فراوانی روبرو است. ناهمگون و نمکی بودن صفحه اشکی که از سه لایه چربی، آب و موسین تشکیل می‌شود [4-6] گویای وجود پروتئین‌های متفاوتی است که محیط‌های فیزیکی گوناگون را حس می‌کنند و برای انحلال به نمک نیاز دارند. از آن‌جا که برای جداسازی الکتروفورتیک لازم است نمک‌ها از سامانه حذف شده و پروتئین‌های خالص در محیطی همگون و سازگار با سامانه جداسازی به صورت محلول در آیند، انتظار می‌رود که آماده‌سازی نمونه اشک با از دست رفتن مقدار چشم‌گیری از پروتئین‌ها همراه باشد؛ همچنین با توجه به ماهیت آب‌گریز موسین‌های لایه موسینی و پروتئین‌های لایه چربی، می‌توان گفت که میزان زیادی از پروتئوم اشک را پروتئین‌های آب‌گریز تشکیل می‌دهند [6 - 7] و همین عامل، احتمال رسوب آن‌ها را در ماتریکس ژل، در بعد اول، افزایش می‌دهد. مرور مقالاتی که تا کنون در زمینه پروتئوم اشک چاپ شده است نیز می‌تواند این مطلب را تایید کند. با مرور این مقالات به راحتی می‌توان دریافت که این بررسی‌ها با دو مشکل عمده مواجه است. تکرارپذیر نبودن و تفاوت بسیار در تعداد پروتئین‌های شناسایی‌شده در ژل. تکرارپذیری، افزون بر مسئله محلول‌سازی می‌تواند تحت تأثیر قدرت احیایی بافرها نیز قرار گیرد که در این‌جا بررسی نمی‌شود. با توجه به تفاوت بسیار تعداد پروتئین‌های گزارش‌شده در الگوی ژل دوبعدی پروتئوم اشک (97 تا 250 پروتئین [8-11]) تصور می‌شود که افزون بر احیاء ناکارامد، این تفاوت تعداد، به از دست رفتن پروتئین‌ها، به خاطر حل‌نشدن درست برگردد. در این پژوهش فرضیه بالا، با بررسی تأثیر کائوتروپ‌ها و شوینده‌ها بر الگوی ژل دوبعدی پروتئوم اشک بررسی خواهد شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- نمونه‌گیری و استخراج پروتئین

پس از دادن آگاهی‌های لازم درباره‌ی ماهیت پژوهش، نمونه‌های اشک از ده داوطلب زن با میانگین سنی 3 ± 28 سال جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه، با استفاده از یک کاغذ استریل به نام شیرمر[1] که رطوبت را جذب می‌کند و برای ارزیابی خشکی چشم نیز به کار می‌رود، انجام شد. کاغذ، گوشه چشم و بالای پلک پایین قرار داده شد و نمونه‌گیری در مدت پانزده دقیقه با چشمان بسته انجام شد.

استخراج پروتئین از کاغذهای شیرمر بر اساس روش گفته‌شده در مرجع [8] و با کمی تغییر انجام شد. به طور خلاصه، هر کاغذ حدود سی دقیقه در 100µl محلول 100mM آمونیم بیکربنات که مقادیر کافی از آنزیم‌های مهارکننده پروتئازها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده اسیدهای نوکلئیک را دارا بود قرار داده شد. به این ترتیب با انحلال پروتئین‌ها در محلول رقیق نمکی، جداسازی آن‌ها از کاغذ، با یک سانتریفیوژ ساده، تضمین شده و انجام شد. پروتئین‌های استخراج‌شده به حجم‌های مناسب، تقسیم و تا زمان ارزیابی وتحلیل در $80^{o}C$- نگه‌داری شدند.

2-2- خالص‌سازی و انحلال دوباره‌ی پروتئین‌ها در بافرهای مناسب

برای حذف مواد مداخله‌گر و به دست آوردن پروتئین‌های خالص، رسوب‌گیری کلروفرم/ متانول انجام شد. در این روش به هر حجم از نمونه، چهار حجم متانول، یک حجم کلروفرم و

1. Schirmer strip

سه حجم آب به طور جداگانه، اضافه و به خوبی مخلوط شد. مخلوط به‌دست‌آمده پنج دقیقه در دمای 4ºC و شتاب 9000×g سانتریفیوژ شد. در این مرحله مخلوط اولیه به صورت دو فاز در میکروتیوب جداسازی شد و پروتئین‌ها در فاصله بین این دو فاز، رسوب کردند. مایع رویی با احتیاط از میکروتیوب خارج، سه حجم متانول به باقی‌مانده افزوده و به خوبی مخلوط شد. سرانجام برای جداسازی نهایی، رسوب‌گیری پروتئین‌ها با سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ده دقیقه، در دمای 4ºC و شتاب 12000×g کامل شد. مایع رویی دور ریخته ونمونه خالص پروتئین، جمع‌آوری شد؛ سپس هریک از نمونه‌های پروتئینی به‌دست‌آمده از مرحله خالص‌سازی، که از ابتدا در هفت قسمت مساوی تقسیم شده بوند، با ترکیباتی مطابق جدول (1)، در بافرهای انحلال حل شدند.

جدول 1 نوع و غلظت کائوتروپ‌ها و شوینده‌های مورد استفاده در ترکیب بافرهای انحلال و بارگزاری در هفت گروه آزمون

کد آزمون	غلظت کائوتروپ‌ها در بافر انحلال	غلظت شوینده‌ها در بافر انحلال	غلظت کائوتروپ‌ها در بافر خیساندنIPG	غلظت شوینده‌ها در بافر خیساندنIPG
1- الف	8M اوره	%2 CHAPS	8M اوره	%2 CHAPS
1- ب	5M اوره 2M تیوره	%2 CHAPS %2 SB	5M اوره 2M تیوره	%2 CHAPS %2 SB
1- ج	8M اوره	%2 CHAPS %2 Triton X-100	8M اوره	%2 CHAPS %2 Triton X-100
1- د	8M اوره	%2 CHAPS %2 Tween 80	8M اوره	%2 CHAPS %2 Tween 80
2- الف	7M اوره 2M تیوره	%4 CHAPS	7M اوره 2M تیوره	%4 CHAPS
2- ب	8M اوره	%4 CHAPS	8M اوره	%2 CHAPS
3	---	%1.5 SDS	7M اوره 2M تیوره	%4 CHAPS

2-3- سنجش غلظت پروتئین

به دلیل مداخله ترکیباتی چون SDS با معرف‌های رایج در سنجش پروتئین‌ها، تعیین غلظت، با خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج 280nm و با استفاده از کمینه مقدار ممکن نمونه، در دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, 2000c) انجام شد.

2-4- الکتروفورز دوبعدی

برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس نقطه ایزوالکتریک، از ژل‌های نواری مخصوص متمرکز نمودن ایزوالکتریکی که شیب pH تثبیت شده به صورت تجاری و آماده در آن‌ها برقرار شده است (IPG)، استفاده شد. IPG های هفت سانتی‌متری استفاده شده، از پخش لگاریتمی و غیرخطی pH در محدودهٔ 3 الی 10 برخوردار بودند. در هر گروه آزمون، 30µg پروتئین با بافر مخصوص خیساندن IPG، مخلوط و جذب نمونه به داخل ژل به صورت فعال با اعمال نیرو محرکه 50V، طی 16 ساعت انجام شد. نوع و مقدار کائوتروپ‌ها و شوینده‌های استفاده‌شده در بافر بازآبدهی یا خیساندن IPG برای هفت گروه طراحی‌شده بر اساس جدول 1 متفاوت بود؛ ولی مقدار ماده احیاءکننده (DTT 100mM) و آمفولیت (0/16 W/V درصد) استفاده شده در همه آن‌ها ثابت در نظر گرفته شد. سرانجام پس از احیا IPG و بارگذاری نمونه، جداسازی مولکول‌ها بر اساس pI، در دستگاه IEF Cell [تهیه‌شده از شرکت Bio-Rad آمریکا]، در سه مرحله اعمال ولتاژ انجام شد. در مرحله اول، دستگاه به گونه‌ای تنظیم شد که در 20 دقیقه، ولتاژ به صورت خطی به 250 ولت افزایش یابد. در مرحله دوم، افزایش ولتاژ خطی تا 6000 ولت انجام شد و سرانجام، جداسازی در 6000 ولت تا رسیدن به مقدار نهایی 14 کیلوولت ساعت، تکمیل شد.

پس از پایان مرحله متمرکزسازی ایزوالکتریکی پروتئین‌های تفکیک شده که بار خود را از دست داده و به همین دلیل توانایی حرکت در میدان الکتریکی را ندارند، در دو مرحله پانزده دقیقه‌ای، با استفاده از بافرهای

مخصوص متعادل‌سازی، با SDS به تعادل رسیده و بار لازم برای مهاجرت در بعد دوم را به‌دست آوردند. ترکیب پایه این بافرها در دو مرحله، یکسان بوده و از محلول 50 mM تریس- اسید هیدروکلریک با pH حدود 8/8، حاوی 6 مولار اوره، 2 درصد وزنی SDS و 30 درصد حجمی گلیسرول، تشکیل می‌شدند. در مرحله اول، بافر پایه افزون بر متعادل‌سازی به‌خاطر داشتن 1درصد وزنی DTT، عمل کاهش باندهای دی‌سولفید را نیز انجام می‌دهد. در مرحله دوم، DTT با آیدواستامید 4 درصد وزنی، جایگزین شد و با تثبیت گروه‌های احیایی، مهاجرت درست پروتئین‌ها در بعد دوم تضمین گشت.

پس از پایان مرحلهٔ متعادل‌سازی، ژل‌های IPG با استفاده از آگارز به ژل‌های پلی‌آکریل آمید با غلظت 12 درصد متصل و با اعمال نیرو محرکه 200V در سامانه Mini-Protean III از شرکت Bio-Rad آمریکا بر اساس وزن مولکولی، جداسازی شدند. در نهایت، آشکارسازی لکه‌های پروتئینی با استفاده از رنگ‌آمیزی نقره سازگار با سامانه طیف‌سنجی جرمی، مطابق روش گفته‌شده در مرجع شماره [12] انجام و تصویر به‌وسیله‌ی دانسیتومتر GS-800 از شرکت Bio-Rad گرفته شد. در آخرین مرحله، تعداد دقیق نقاط پروتئینی تفکیک‌شده، با استفاده از نرم‌افزار Progenesis SameSpots (v 3.3, Nonlinear Dynamics, UK) به‌دست آمده، ارزیابی و ثبت شد.

3- یافته‌ها و بحث

3-1- بررسی تاثیر شوینده‌های دویونی خنثی و خنثی و بدون بار بر الگوی پروتئوم اشک

انواع مختلفی از شوینده‌های خنثی و بدون بار و دویونی خنثی وجود دارند که اثربخشی و موارد استفاده آن‌ها متفاوت است. به طور کلی می‌توان اثربخشی شوینده‌های سازگار با فرآیند متمرکز نمودن ایزوالکتریکی را به دو عامل میزان قطبش‌پذیری بخش‌های آب‌دوست و شکل زنجیره‌های آب‌گریز موجود در ساختار شوینده‌ها نسبت داد. از دیدگاه شکل زنجیره آلیفاتیک، شوینده‌ها به دو گروه کلی تقسیم می‌شوند. دسته‌ای که زنجیره‌های آلیفاتیک خطی دارند (SB و octyl glucoside) و گروهی که زنجیره‌های آلیفاتیک غیر خطی و گاهی حلقوی دارند (Triton، Nonidet P40 و CHAPS). به عنوان یک قانون کلی، زنجیره‌های خطی و بلند، قدرت شویندگی بیشتری به ترکیب می‌دهند که برای محتویات آب‌گریز پروتئوم مناسب‌تر است؛ اما متأسفانه، حضور اجتناب‌ناپذیر اوره در ترکیب بافرهای مخصوص بعد اول، استفاده از این شوینده‌ها را محدود و گاهی غیرممکن می‌کند. در غلظت‌های بالا، تحرکات آزادانهٔ مولکول‌های اوره در آب، محدود شده و ساختارهای کانال‌مانند سازمان‌یافته‌ای را تشکیل می‌دهند. این ساختارها می‌توانند به آلکیل‌های خطی متصل شده و ترکیبات نامحلولی را با عنوان inclusion body ایجاد کنند. به همین‌دلیل در بعد اول می‌توان تنها از شوینده‌هایی که زنجیره آلیفاتیک غیرخطی و یا خطی و کوتاه دارند استفاده کرد [1, 2, 13].

در این بررسی، چهار شوینده مختلف که خواص فیزیکی و اثربخشی شیمیایی متفاوت دارند برای درج در بافرهای انحلال و بارگزاری انتخاب شدند: CHAPS به عنوان نماینده شوینده‌های دویونی خنثی و با زنجیره آلیفاتیک غیرخطی، SB 3-10، به عنوان نماینده شوینده‌های دویونی خنثی و با زنجیره آلیفاتیک خطی کوتاه، Triton X-100 و Tween 80 به عنوان نماینده شوینده‌های خنثی و بدون بار با زنجیره‌های آلیفاتیک غیرخطی با حجم فضایی متفاوت.

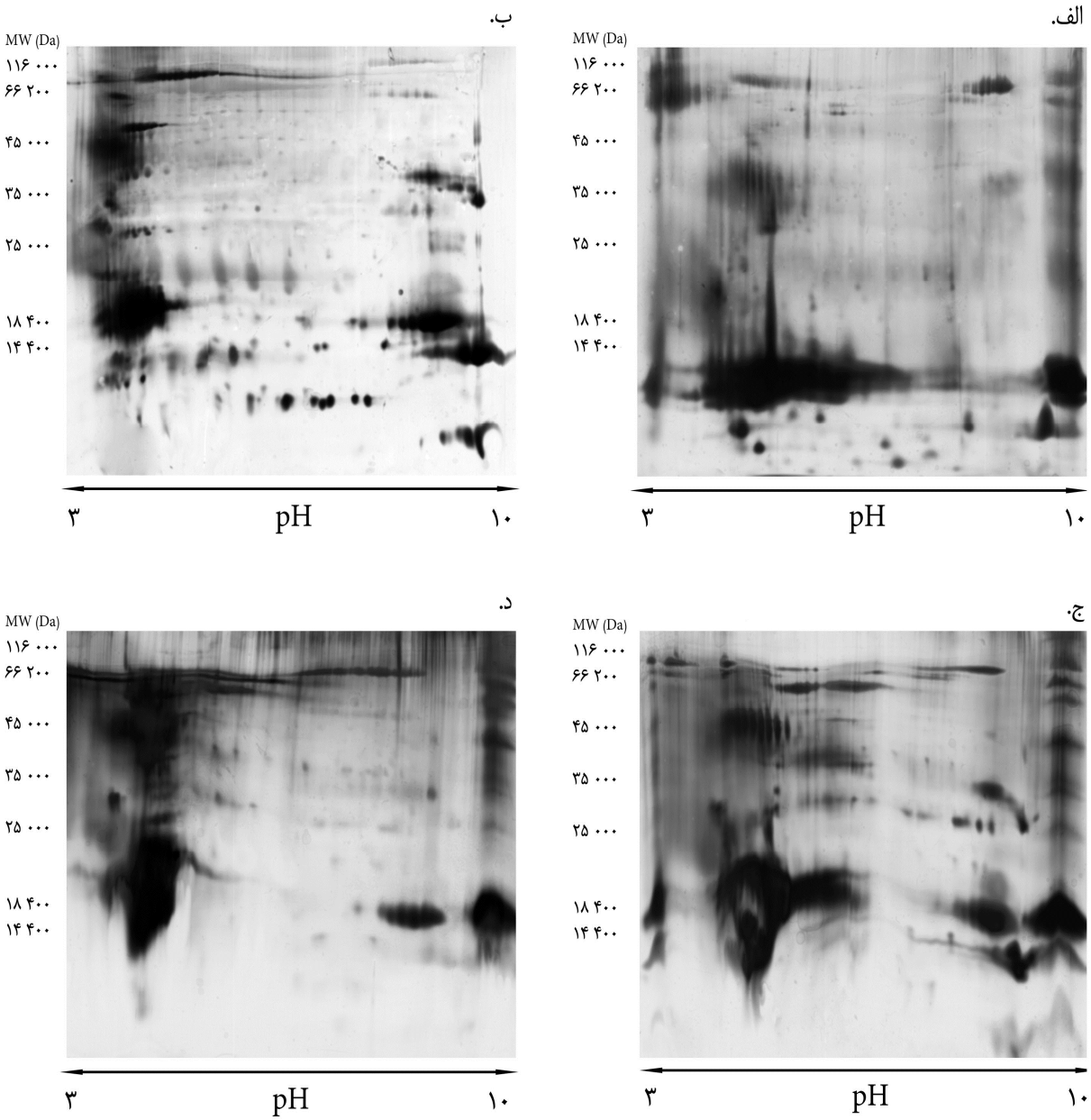
تأثیر متفاوت شوینده‌های منتخب بر الگوی دوبعدی پروتئوم اشک انسان در شکل 1 نشان داده شده است.

نتیجه این بررسی نشان می‌دهد که حضور شوینده‌هایی چون Triton و Tween (شکل 1- ج و 1- د) سبب تفکیک نادرست پروتئین‌های اشک در IPG می‌شوند. زمینه غیرشفاف و مات تصاویر، بروز رگه‌های عمودی و افقی، تعداد بسیار اندک پروتئین‌های تفکیک‌شده در نمایه دوبعدی (109 و 108 پروتئین به ترتیب در نمایه مربوط به Triton و Tween) همه و همه بیانگر این واقعیت هستند که این دو شوینده در محلول‌سازی پروتئین‌های اشک ناموفق بوده و حتی از طریق رقابت با CHAPS، قدرت شویندگی این ترکیب را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. با توجه به ساختار این دو شوینده می‌توان گفت که ناکارآمدی عملکرد آن‌ها به‌خاطر حضور چشم‌گیر پروتئین‌های آب‌گریز، در محتوای پروتئوم اشک است. انتظار می‌رود که شوینده‌هایی که در ساختار خود گروه‌های قابل یونیزه‌شدن دارند، در محلول‌سازی پروتئین‌های آب‌گریز مؤثرتر باشند. نتایج به‌دست‌آمده در این آزمون نیز بیانگر درستی این موضوع است. همچنین مقایسه بین الگوی به‌دست‌آمده از تیمار با Triton و Tween نشان می‌دهد که Triton اندکی مؤثرتر از Tween ظاهر می‌شود. ضعیف بودن قدرت شویندگی Tween در برخی منابع دیگر گزارش شده [1] و در این‌جا در مورد پروتئوم اشک نیز تأیید می‌شود.

گذشته از تفاوت موجود در تعداد نقاط پروتئینی تفکیک‌شده در نمایه مربوط به تیمار با CHAPS و SB 3-10 (به ترتیب 184 و 471 پروتئین) می‌توان بیان کرد که شوینده‌های دویونی خنثی، در مجموع مؤثرتر از انواع دویونی بدون بار ظاهر شده‌اند. مقایسه بین شکل 1- الف و 1- ب، گویای افزایش قدرت تفکیک به دنبال افزودن SB 3-10 به ترکیبات بافر انحلال است. SB 3-10 ترکیبی است که زنجیره کوتاه خطی دارد و در برخی منابع به عنوان یک شوینده مؤثر در محلول‌سازی پروتئین‌های غشایی و آب‌گریز معرفی می‌شود [14- 15]. تأثیر مثبت این شوینده بر محتوای آب‌گریز پروتئوم اشک نیز، مشهود است. نکته‌ای که در این آزمون باید به آن توجه شود حضور تیوره در بافر استفاده‌شده در آزمون SB است. متأسفانه این شوینده در غلظت بالای 5 مولار اوره محلول نیست ولی در ترکیب اوره و تیوره به راحتی حل می‌شود. حضور تیوره در این آزمون که بیشترین تعداد نقاط پروتئینی و تفکیک را دارد، ما را به سمت بررسی تأثیر کائوتروپ‌ها در آزمونی مستقل از شوینده‌های خانواده سولفوبتائین‌های خطی هدایت می‌کند. همچنین تفاوت مجموع غلظت شوینده‌ها در این دو آزمون می‌تواند عاملی برای تفاوت‌های مشاهده شده در الگوی نهایی باشد که باید بررسی شود.

2-3- تأثیر غلظت CHAPS بر الگوی پروتئوم اشک

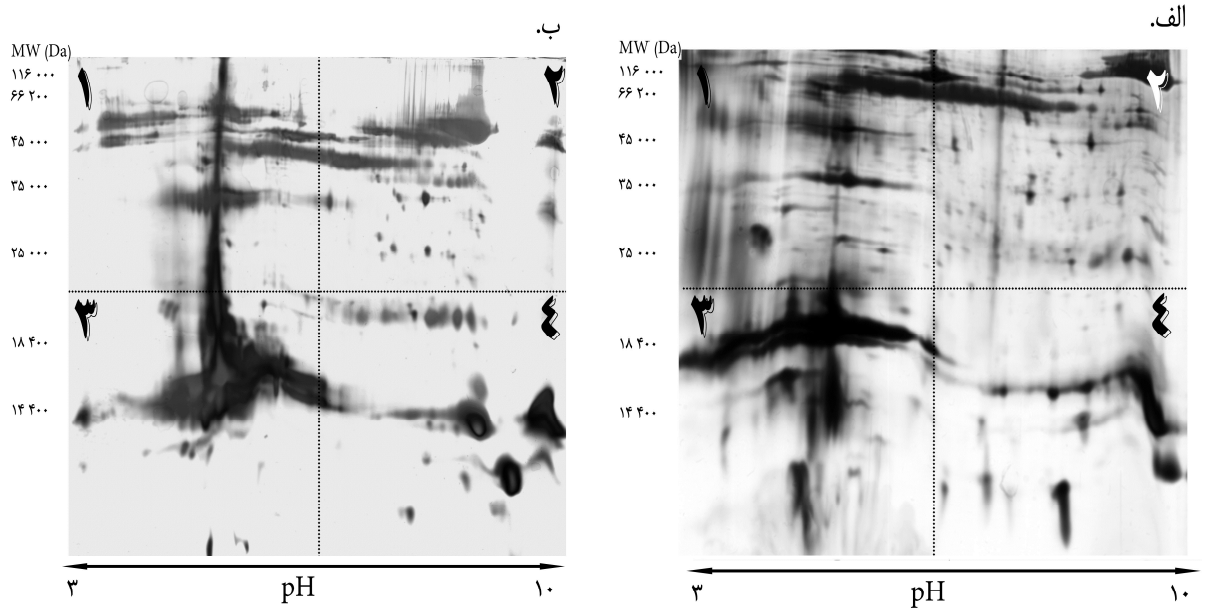
بررسی الگوی پروتئوم به‌دست‌آمده از تیمار نمونه با غلظت‌های 2 و 4 درصد CHAPS (شکل 1- الف و 2- ب) نشان می‌دهد که افزایش غلظت CHAPS می‌تواند سبب افزایش تعداد پروتئین‌های تفکیک‌شده شود (184 در برابر 221 پروتئین) و الگوی مناسب‌تری را ارائه دهد. بررسی شکل 2- ب نشان می‌دهد که اگرچه غلظت‌های بالاتر شوینده، الگوی بهتری را معرفی می‌کنند ولی مشکل انحلال‌پذیری پروتئین‌ها به طور کامل برطرف نشده و کشیدگی لیپوکالین آب‌گریز که گاهی تا 33 درصد محتوای پروتئوم اشک را به خود اختصاص داده و در سمت اسیدی و پایین ژل ظاهر می‌شود، می‌تواند دلیلی برای این موضوع باشد.



شکل 1 نمایه‌های دوبعدی پروتئوم اشک که تحت تأثیر شوینده‌های مختلف در محدوده pH 3 تا 10، بر بستر آکریل‌آمید 12 درصد، جداسازی و تفکیک شده‌اند. ترکیب بافرهای استفاده‌شده در شکل‌های الف تا د با بافرهای 1-الف تا 1–د در جدول 1 مطابقت دارد. به این ترتیب که در هر چهار مورد، ترکیب بافر انحلال و بازآب‌دهی یکسان بوده و در شکل الف، تأثیر وجود CHAPS، در شکل ب، تأثیر وجود SB 3-10، در شکل ج، تأثیر وجود Triton X-100 و در شکل د، تأثیر وجود Tween 80 بررسی و مقایسه شده است.

3-3- بررسی تأثیر نوع کائوتروپ‌ها بر الگوی پروتئوم اشک

اوره و تیوره، کائوتروپ‌های مرسوم در مطالعات پروتئومیک هستند. سایر کائوتروپ‌ها یا به اندازه این دو قدرت ندارند و یا در سامانه جداسازی مداخله می‌کنند. همچنین برخی از کائوتروپ‌ها را نمی‌توان با غلظت‌های بالا در آب حل کرد. برای نمونه قدرت واسرشته‌کنندگی محلول یک مولار تیوره بسیار بیشتر از محلول یک مولار اوره است ولی متأسفانه تیوره در آب به سختی حل می‌شود. تیوره را می‌توان در محلول‌های غلیظ اوره حل کرد [1- 2]. تأثیر تغییر نوع کائوتروپ‌ها بر بافر انحلال و بارگزاری در شکل 2 نشان داده شده است. مقایسه الگوی تفکیک شده پروتئوم اشک در دو آزمون انجام شده نشان‌دهنده اثر بخشی مثبت وجود تیوره بر تعداد پروتئین‌ها و الگوی تفکیکی است. تفاوت تعداد پروتئین‌ها در منطقه دو از شکل‌های 4- الف و 4- ب در مقایسه با سایر مناطق واضح‌تر است. در کل، افزودن تیوره سبب افزایش تعداد نقاط پروتئینی از 221 به 322 پروتئین شده است. تأثیر مثبت تیوره در بسیاری از مطالعات انجام‌شده درباره‌ی الگوی پروتئین‌های آب‌گریز، اثبات شده است و تایید این مطلب در مورد پروتئوم بررسی شده، بار دیگر، بازتاب کننده ماهیت آبگریز محتوای نمونه‌های اشک می‌باشد.



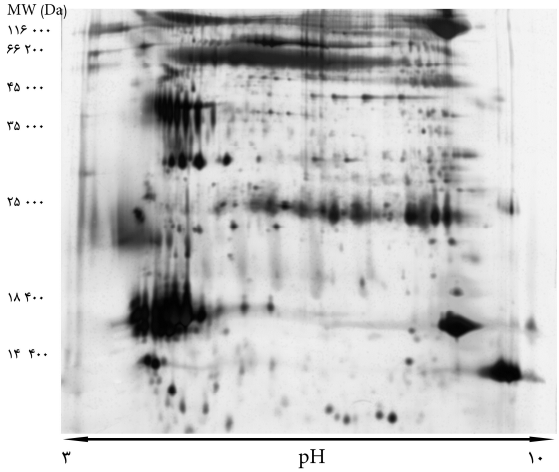
شکل 2 نمایه‌های دوبعدی پروتئوم اشک که تحت تأثیر دو ترکیب مختلف کائوتروپیک در محدودهٔ pH 3 تا 10، بر بستر آکریل‌آمید 12 درصد، جداسازی و تفکیک شده‌اند. ترکیب بافرهای استفاده‌شده در شکل‌های الف و ب با بافرهای 2- الف و 2–ب در جدول 1 مطابقت دارد. در شکل الف تأثیر مخلوط 7 مولار اوره و 2 مولار تیوره و در شکل ب، تأثیر محلول 8 مولار اوره بررسی و مقایسه شده است. در این‌جا نیز ترکیب بافر انحلال و بازآب‌دهی یکسان است.

3-4- بررسی تأثیر وجود SDS در بافر انحلال

اهمیت مسئله انحلال‌پذیری در بعد اول، در سه سطح مختلف نمایان می‌شود:

- در زمان محلول‌سازی نمونه‌ها، پس از رسوب‌گیری و قبل از مخلوط‌سازی با بافر بارگزاری یا بازآب‌دهی: پس از رسوب‌گیری، احتمال شکل‌گیری تجمعات مولکولی بزرگ، با تغلیظ نمونه، افزایش می‌یابد. در این حالت، برای بازگرداندن مولکول‌ها به حالت محلول، باید از ترکیبات قوی‌تر و مؤثرتر استفاده کرد. همواره بخشی از نمونه‌های پروتئینی در این مرحله از دست می‌روند.
- در زمان ورود نمونه‌های از پیش حل‌شده به ماتریکس IPG: ژل‌های IPG در زمان استفاده، خشک و بدون آب هستند. بافر استفاده‌شده در بعد اول، افزون بر این‌که IPGها را بازآب‌دهی و احیا می‌کند، شرایطی را فراهم می‌کند که نمونه نیز هم‌زمان به درون ماتریکس ژل نفوذ کند. در زمان ورود نمونه به ژل، تجمع موضعی مولکول‌های پروتئین به‌خاطر افزایش ضریب اصطکاک بین دو سطح رخ می‌دهد که می‌تواند سبب رسوب پروتئین‌ها در سطح ژل و بروز رگه‌های افقی در الگوی نهایی شود. به کار گرفتن شوینده‌های قوی می‌تواند احتمال ایجاد رسوب‌های پروتئینی در مرحله بازآبدهی را کاهش داده، حرکت و تفکیک اجزا آسان کند.
- پس از ورود به ژل، در ماتریکس IPG و در نقطه ایزوالکتریک: در این نقطه نیز بار سطحی پروتئین از بین رفته، برهم‌کنش‌های آب‌گریز افزایش یافته و احتمال رسوب پروتئین‌ها در ماتریکس ژل افزایش می‌یابد [2].

در آزمون‌هایی که تاکنون به آن‌ها اشاره شد، ترکیبات بافر انحلال و بافر بارگزاری، یکسان بودند. آنگونه که مشاهده شد تغییر در نوع کائوتروپ‌ها و شوینده‌ها در همه آزمون‌های انجام شده با تأثیر بر هر سه سطح گفته شده، تغییرات قابل توجهی را در الگوی تفکیکی پروتئین‌ها ایجاد کرد. با توجه به این‌که ممنوعیت استفاده از شوینده‌های یونی و باردار تنها در سطح سوم مطرح است و امکان‌پذیر نمی‌باشد گاهی می‌توان با حل‌کردن رسوب‌های پروتئینی در شوینده‌های قدرتمندی چون SDS، مشکل انحلال‌پذیری را در دو سطح اول از بین برد. استفاده از SDS در بافر انحلال با شرایط ویژه‌ای امکان‌پذیر است. در این حالت نمونه‌ها را در محلول 1/5 یا 2 درصد SDS می‌جوشانند. این محلول باید در کمترین حجم ممکن استفاده شود تا غلظت نهایی SDS پس از مخلوط کردن نمونه با بافر انحلال به کمترین مقدار ممکن کاهش یابد؛ هم‌زمان، غلظت شوینده استفاده‌شده در بافر بارگزاری نیز باید بالا باشد تا شرایطی فراهم شود که SDS در مراحل اولیه تحت تأثیر ولتاژ، از سامانه خارج شده و امکان جایگزین شدن آن با شوینده ثانویه فراهم شود [16- 17]، به همین دلیل غلظت CHAPS در بافر بارگزاری این آزمون، 4 درصد انتخاب شد. نتیجه این تیمار ویژه در شکل 3 دیده می‌شود. این تیمار بهترین نتیجه را از نظر تعداد پروتئین‌های واردشده در ژل (620 پروتئین)، حدود تفکیک و برطرف‌شدن رگه‌های افقی و عمودی ارائه می‌دهد.



شکل 3 نمایه دوبعدی پروتئوم اشک که تحت تأثیر شویندهٔ آنیونی SDS در بافر انحلال و مخلوط اوره و تیوره در بافر بارگزاری، در محدودهٔ pH 3 تا 10، بر بستر آکریل‌آمید 12 درصد، جداسازی و تفکیک شده است. ترکیب بافرهای استفاده‌شده در این الگو، با بافرهای کد 3 در جدول 1 مطابقت دارد. افزایش غلظت CHAPS تا سقف 4 درصد، استفاده از ترکیب اوره و تیوره در بافر بازآب‌دهی و به کار بردن محلول 1/5 درصد SDS در بافر انحلال از ویژگی‌های بارز این آزمون است.

4- نتیجه‌گیری

موفقیت هر آزمون الکتروفورز دوبعدی به‌طور مستقیم به حفظ حالت محلول پروتئین‌ها در همه‌ی مراحل خالص‌سازی و جداسازی بستگی دارد. در این بین، محلول‌سازی پروتئین‌ها در مرحله آماده‌سازی و متمرکزکردن ایزوالکتریکی، به‌خاطرممکن‌نبودن استفاده از شوینده‌های قدرتمند یونی و کسب حالت آلیفاتیک در نقطه ایزوالکتریک، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. میزان تأثیر نوع شوینده‌ها و کائوتروپ‌ها بر الگوی تفکیک‌شده پروتئین‌ها کاملاً به ماهیت پروتئوم بررسی‌شده برمی‌گردد. این پژوهش نشان داد که به‌خاطر پیچیدگی‌های ساختار صفحه اشکی و ناهمگون بودن محتویات این پروتئوم، به استفاده از قوی‌ترین نوع شوینده‌ها و کائوتروپ‌ها در هر دو بخش آماده‌سازی و جداسازی در بعد اول نیاز است. همچنین از آنجا که نمی‌توان از تغییراتی که به‌خاطر تغییر نوع و غلظت این ترکیبات در الگوی نهایی پروتئوم اشک ایجاد می‌شود، چشم‌پوشی کرد، شایسته است که نتایج این بررسی در مطالعات مقایسه‌ای نمونه‌های کلینیکی در نظر گرفته شوند.

5- سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از یک پروژه مقایسه‌ای- بالینی است که به‌وسیله‌ی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) حمایت شده است.

6- مراجع

[1] Rabilloud, T. (1996) Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*. 17(5), 813-829.

[2] Rabilloud, T. (1999) Solubilization of Proteins in 2D Electrophoresis: An Outline. *Methods Mol. Biol.* 112, 9-19.

[3] Gorg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4(12), 3665-85.

[4] Zhou, L., et al. (2012) In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics*. Doi: 10. 1016/j.jprot. 2012.04.053.

[5] Ananthi, S., et al. (2011) Comparative proteomics of human male and female tears by two- dimensional electrophoresis. *Exp Eye Res*. 92(6), 454-63.

[6] Green-Church, K.B., et al. (2011) The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in health and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(4), 1979-93.

[7] Davidson, H.J. and Kuonen, V.J. (2004) The tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol*.7(2), 71-7.

[8] Green-Church, K.B., et al. (2008) Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol. Vis*. 14, 456-70.

[9] Saijyothi, A.V., et al. (2010) Two dimensional electrophoretic analysis of human tears: Collection method in dry eye syndrome. *Electrophoresis*. 31, 3420-3427.

[10] de Souza, G.A., Godoy, L.M.F., and Mann, M. (2006) Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*. 7(8), R72.

[11] Herber, S., et al. (2001) Two-dimensional analysis of tear protein patterns of diabetic patients. *Electrophoresis*. 22(9), 1838-44.

[12] Mortz, E., et al. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*. 1(11*)*, 1359-63.

[13] Rabilloud, T. (2009) Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. Methods Mol. Biol. 528 259-67.

[14] Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Elecmrophoresis*. 21(6), 1054-70

[15] Molloy, M.P. (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem*. 280(1), 1-10.

[16] Harder, A., et al. (1999) Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 20, 826-9.

[17] Boucherie, H., et al. (1995) Two-dimensional protein map of Saccharomyces cerevisiae: construction of a gene-protein index. *Yeast*. 11(7), 601-13.