

الکتروفورز هموگلوبین

الکتروفورز استات سلولز · سیترات آگار

اصول - روش کار - خطاها

آزمایشگاه مرجع سلامت

الکتروفورز

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

پروتئین ها در PH ایزو الکتریک خود دارای بارهای منفی و مثبت برابرند، بنابراین در PH قلیائی دارای بار منفی شده و بطرف 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 از هموگلوبین A بدلیل ساختمان غیر طبیعی آنها که معمولاً یک آمینواسید جایگزین آمینو اسید دیگر شده است، بر اساس تغییر در شارژ الکتریکی شان صورت می گیرد. جدا سازی الکتروفوریک روشی ساده برای شناسائی مقدماتی بسیاری از هموگلوبین ها می باشد.

الکتروفورز استات سلولز جهت بررسی هموگلوبینوپاتی ها :

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، F، S، C (با جذب کم)، حمل آسان و نگهداری

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 و A 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 2-3 گرم در دسی لیتر بدست می آید.

- ضد انعقاد مصرفی EDTA , ACD , CPD یا Heparin می باشد و خون دردمای 4درجه به مدت 10 روز قابل نگهداری است. (خون های هیپارینه 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 و تغییر ماهیت این هموگلوبین ها میشود.

• تجهیزات

۱- مخزن الکتروفورز : دارای مخازن نگهداری بافرپل 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 تایمر 0-60 دقیقه ، قادر به تأمین ولتاژ 450 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 1 ± 0.5 از نمونه را در

سطح محیط قرار دهد انجام گیرد . مقادیر نمونه گذاری شده باید یکسان باشد.

۵- بافر TEB · این بافرعموما" در محدوده $PH = 9/2-8/4$ استفاده میشود بافر مرسوم

دارای $PH=8/4$ است.

• طرز تهیه بافر (TEB) Boric Acid · EDTA · Tris :

- پودر تریس هیدروکسی متیل آمینومتان 10/2 گرم

- EDTA 0/6 گرم

- اسید بوریک 3/2 گرم

- آب مقطر تا حجم 1000 میلی لیتر

بافر فوق تا قبل از کدورت و تغییر رنگ در دمای 4 درجه قابل مصرف است.

• رنگ

در الکتروفورز استات سلولز می توان از هر نوع رنگ آمیزی مناسب پروتئین ها استفاده نمود. به طور اعم

با رنگ (W/V) Panceau S 0/5-0/3 درصد که دارای 5 درصد (W/V) تری کلرواستیک اسید

می باشد نتایج خوبی مشاهده می می گردد.

- پانسو S ، 300-500 میلیگرم

تری کلرو استیک اسید ، 5 میلیگرم

آب مقطر تا 100 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)

نیز توصیه می شود.

• محلول های رنگ بر ، آب گیر ، شفاف کننده

(۱) اسید استیک (V/V) 3-5 درصد (رنگ بر)

(۲) متانول 95-100 درصد (آب گیر)

(۳) اسید استیک در متانول (V/V) 20درصد (شفاف کننده)

با چند بار تعویض در اسید استیک 3-5 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 و رطوبت 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 عموماً با مقادیر 1-0/5 میکرو 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 سلولز نوار به طرف بافر (پائین) است.

۷) ولتاژ 250-400 ولت (عموماً 350) 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 باید از 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 در همان نوار مقایسه نمود.

□ جدا سازی

با هر شماره سریال جدید استات سلولز ، نمونه هایی که حاوی ترکیبی از هموگلوبین های A , F و 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

منظور از فنوتیپ، هموگلوبین های عمده ای است که به فرم باند مجزا در الکتروفوراستات 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 thal - / HbS 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 (thal - °) ، HbA کاملا" غایب است والگو thal / HbS 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 پذیر نمی باشد در عین حال این روش با وجود مشخص نمودن هموگلوبینهای مختلف، مقدار کمی و صحیح 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 همولیزات قهوه 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

بافزودن یک قطره سیانید پتاسیم (KCN) 5 درصد به همولیزات، مت هموگلوبین به سیان مت هموگلوبین تبدیل می شود ، در نتیجه اگر مت هموگلوبین به عنوان آرتفکت در نمونه وجود داشته باشد (در نمونه ای که به خوبی 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 (مثلاً "بدنبال حرارت بالا ، جریان خیلی بالا و غلظت های بالای بافر) که در این حالت اگر دمای اتاق بالا تر از 25 درجه باشد، خنک کردن دستگاه توسط کیسه یخ (Icebag) ضرورت پیدا می کند.
- 10) 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.
- 11) 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

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

• نمونه گذاری :

- نمونه های همولیزات را به آرامی به سطح آگار منتقل کنید.
- نمونه گذاری باید به فاصله 3 سانتی متر از انتهای آندیک و یا در مرکز نواری 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 هر بار الکتروفورز سیترات آگار باید از نمونه خون کنترل حاوی هموگلوبین های C,S,F,A استفاده کرد و باندهای 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 تجارتي پلیت های آماده سیترات آگار ، HbO با HbS حرکت می کند.

• مزایای روش سیترات آگار

- 1- الکتروفورز سیترات آگار همزمان وجود هموگلوبین های C,S,F,A و انواع نادر دیگر را تأیید 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.
- 2- این روش تشخیص انواع هموگلوبینوپاتی ها را از طریق نشان دادن مقادیر کم HbA و HbF در حضور مقادیر زیاد دیگر هموگلوبین ها آسان می کند.

3- 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 ها

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

2) در صورت تهیه پلیت های آگار در آزمایشگاه 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.

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

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

• منابع خطا

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 Approach 1997

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

*Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin