تخلیص فریتین از کبد گوسفند و گزارش فعالیت پراکسیدازی مجموعه هیم-فریتین

سمیرا رنجبر[۱]، مرتضی جعفری[۱]، رضا خدارحمی[۱*]، زهرا زارعی[۱]، محمدرضا اشرفی[۱]، سیدشهرام میرآقائی[۱]

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۶ **تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۵**

چکیده

مقدمه: فریتین(یک پروتئین ۲۴ زیر واحدی با وزن مولکولی ۴۵۰ کیلودالتون) از زنجیره های سبک و سنگین تشکیل شده است و نقش مهم و اساسی در ذخیره آهن دارد به طوری که می تواند حداکثر ۴۵۰۰ یون فریک(Fe^{3+}) را در درون ساختار خود ذخیره کند. هدف از انجام این تحقیق، تخلیص فریتین از کبد(بافتی که حاوی مقدار زیادی فریتین می باشد) با بازده و خلوص بالا و بررسی فعالیت پراکسیدازی احتمالی آن بود.

مواد و روش ها: جهت جداسازی سازی موفق فریتین ویژگی بارز آن(مقاومت حرارتی بالا تا دمای حدود ۸۰°C) را برگزیدیم و خالص سازی را در دو مرحله تیمار حرارتی همراه با رسوب دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض آنیونی(DEAE- سلولز) تکمیل گردید.

یافته های پژوهش: فریتین به طور موفق و با خلوص تقریباً ۹۵ درصد خالص شد که الکتروفورز (SDS-PAGE) موفقیت این خالص سازی را تایید نمود. هم چنین در مطالعه حاضر فعالیت پراکسیدازی کمپلکس هیم-فریتین برای اولین بارگزارش شده است.

بحث و نتیجه گیری: از آن جایی که فریتین به طور وسیع در زمینه های تشخیصی و هم چنین تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد، خالص سازی آن اهمیت زیادی دارد. استرس اکسیداتیو، به عنوان مهم ترین دلیل بیماری های عصبی ممکن است با غلظت افزایش یافته فریتین در بیماری آلزایمر مرتبط باشد.

واژه های کلیدی: فریتین، تخلیص، کروماتوگرافی تعویض آنیونی، فعالیت پراکسیدازی

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

Email: rkhodarahmi@mbrc.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

فریتین، پروتئین داخل سلولی مهمی است که ذخیره و رها سازی آهن را به آن نسبت می دهند. این پروتئین می تواند به اندازه حدود ۲۰ درصد وزن خود، آهن جذب کند،(۱،۲). از آن جایی که آهن در فرایندهای حیاتی نظیر تنفس سلولی، توسعه نورون ها، میلین سازی، سنتز و کاتابولیسم نوروترانسمیترها، انتقال الکترون، تثبیت نیتروژن، سنتز DNA و هم چنین سنتز مراکز آهن-گوگرد و گروه هیم مورد نیاز می باشد، تعجب برانگیز نیست که فریتین در همه انواع سلول ها بیان شود.(۱،۳)

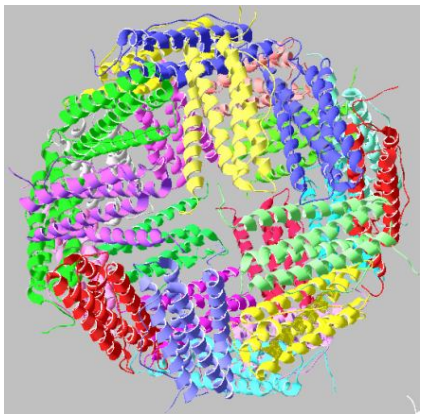
بدن انسان به طور طبیعی حاوی ۵-۲ گرم آهن است. حدود ۲/۳ گرم آن در هموگلوبین حضور دارد و۲۰-۱۵ درصد باقی مانده در فریتین یا هموسیدرین ذخیره می شود(فریتین پاسخگوی ذخیره میزان نرمال آهن است در صورتی که هموسیدرین محصول تخریب فریتین در شرایطی است که میزان آهن بدن زیاد باشد). مابقی آهن بدن اساسا در میوگلوبین ماهیچه ها و در آنزیم های حاوی آهن حضور دارد. با جمیع شرایط بالا، فقط حدود ۱ میلی گرم آهن به صورت روزانه جدب و دفع می گردد،(۴). فریتین مشابه با دیگر پروتئین ها که در هموستازی آهن در بدن شرکت می کنند(نظیر لاکتوفرین و ترانسفرین) می تواند هم به عنوان دهنده و هم به عنوان گیرنده آهن در نظر گرفته شود. اگرچه بر خلاف لاکتوفرین و ترانسفرین، فریتین توانایی بسیار بالاتری در گرفتن، ذخیره و رهاسازی آهن دارد،(۵). این توانایی های فریتین وابسته به ساختمان آن می باشد. هر مولکول فریتین ۲۴ زیرواحد دارد که با یکدیگر چیزی شبیه به یک ظرف تو خالی را ایجاد می کنند،(شکل شماره ۱). این حفره دارای قطری در حدود ۸۰Å می باشد،(۶،۷). در این حفره داخلی، فریتین ظرفیت پذیرش میزان متغیری از یون Fe^{+3} را دارد. زمانی که به طور کامل اشباع می شود تا ۴۵۰۰ یون Fe^{+3} را ذخیره می کند اما در شرایط معمولی این میزان به ۲۰۰۰ یون Fe^{+3} نزدیک است.(۶،۸)

مولکول فریتین که در آب و محلول های رقیق نمکی در محدوده وسیعی از pH محلول است، در مهره داران دارای دو نوع زیرواحد است،(۹). یکی زنجیره سنگین با وزن مولکولی ۲۱ کیلودالتون(دارای ۱۷۸ اسید آمینه) و دیگری زنجیره سبک با وزن مولکولی ۱۹ کیلو دالتون(دارای ۱۷۱ اسید آمینه)،(۶،۸). هر زنجیره استوانه ای شکل و دارای طول ۵/۵ نانومتر و عرض ۲/۷ نانومتر می باشد،(۱). در پستانداران زنجیره های سبک و سنگین حدود ۵۴ درصد تشابه دارند در حالی که زنجیره های سنگین ۹۰ درصد و زنجیره های سبک ۸۵ درصد با هم تشابه دارند،(۱۰). این دو نوع زنجیره عملکردهای مختلفی را بر عهده دارند. زنجیره سنگین دارای پتانسیل فعالیت فراکسیدازی است که اکسیداسیون آهن فروس(دو ظرفیتی) را کاتالیز می کند در حالی که زنجیره سبک نقش مهمی در تمرکز و ذخیره سازی آهن و نیز پایداری پروتئین بازی می کند. این خصوصیات باعث شده که برای فریتین نقش هایی نظیر سمیت زدایی نیز در نظر گرفته شود. مولکول های فریتین موجود در عضلات، تیموس و گلبول های قرمز بیشتر حاوی زنجیره های سنگین هستند در حالی که فریتین کبد و طحال بیشتر حاوی زنجیره های سبک می باشد و خصوصیت فریتین موجود در بافت های قلب، مغز و لنفوسیت ما بین این دو است. با ظهور روش های بسیار حساس و پیشرفته وجود این پروتئین در سرم و جریان خون(البته در غلظت بسیار پایین) به اثبات رسیده است. از آن جایی که فریتین با غلظت بالا در کبد و طحال وجود دارد، عمدتاً این دو بافت برای تخلیص فریتین مورد استفاده قرار می گیرند،(۱۳-۱۱). فریتین اولین بار به وسیله لافبرگر در سال ۱۹۳۷ از طحال اسب جداسازی و به کمک نمک کادمیوم کریستالیزه شد،(۹). ساختمان بسیار منظم فریتین و هم چنین وجود پیوندهای هیدروژنی و پل های نمکی متعدد در درون و بین زیر واحدها، پایداری حرارتی بالایی به آن بخشیده است طوری که فریتین تا دمای حدود ۸۰°C پایدار می باشد. از این ویژگی فریتین عموماً به عنوان گام نخست در تخلیص آن از بافت ها استفاده می شود،(۲،۱۱). تاکنون در بیشتر روش های تخلیص

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

فریتین، از کرماتوگرافی فیلتراسیون ژلی و در مواردی نیز از ترکیب کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی و تعویض یونی استفاده شده است.

با عنایت به اهمیت فریتین در بررسی و تشخیص بیماری های تخریب عصبی و سرطان های مختلف نظیر سرطان کبد، خون، پستان و نیز کاربرد آن به صورت گسترده در نانوبیوتکنولوژی به عنوان نانو ناقل دارو،(۱۶-۱۴)، تخلیص فریتین می تواند کمک به سزایی در پیشبرد این اهداف داشته باشد. با توجه به کاربرد وسیع این پروتئین در زمینه های تشخیصی و تحقیقاتی و نیز هزینه بالای محصول عرضه شده توسط شرکت های خارجی، این سوال مطرح می شود که آیا می توان فریتین را با هزینه پایین، بازده و خلوص بالا(و در زمان کمتر) خالص نمود. در این پژوهش، علاوه بر کوشش در تخلیص فریتین با درجه خلوص و راندمان قابل توجه، شواهدی از فعالیت پراکسیدازی این پروتئین در حضور گروه هیم نیز ارائه شده است.



شکل شماره ۱. پروتئین فریتین که به کمک نرم افزار spdbviewer **و با استفاده از فایل** PDB **با کد**3HX7 **رسم شده است**

مواد و روش ها

در مرحله نخست بافت کبد گوسفند نر بالغ به صورت تازه تهیه شده و با استفاده از محلول نرمال سالین(۰/۹ درصد NaCl) شستشو داده و قطعه قطعه شد. سپس عروق و کپسول های آن جدا گردید و در دستگاه هموژنایزر مدل Mikro-Dismembrator به مدت ۲۵ دقیقه هموژنیزه گردید. در مرحله بعد به هر حجم کبد هموژنیزه شده، ۴ حجم سالین بافری شده با فسفات(PBS) افزوده شد. محلول فوق را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم دمای ۷۵°C حرارت داده و سپس تا دمای ۲۰°C سرد گردید تا آنزیم ها و پروتئین های دناتوره شده رسوب کنند. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰×g سانتریفیوژ شد. محلول رویی پس از سانتریفیوژ به کمک کاغذ واتمن شماره ۳ فیلتر گردید. در مرحله بعد برای رسوب دادن فریتین از روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات کمک گرفته شد،(۱۷). عصاره فیلتر شده مرحله قبل بر روی استیرر قرار داده شد و به آرامی به آن آمونیوم سولفات خشک اضافه گردید تا به غلظت نهایی ۵۰ درصد رسید. در این غلظت از سولفات آمونیوم، فریتین به همراه برخی پروتئین های دیگر رسوب می کند. پس از حل شدن کامل سولفات آمونیوم، عصاره به مدت یک شب در دمای ۴°C قرار داده شد و پس از آن ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰×g در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید. رسوب به دست آمده که حاوی فریتین ناخالص بود در ۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار با pH: ۷/۲ حل شد. نمونه داخل کیسه دیالیز(دارای شعاع برش حدود ۱۰ کیلودالتون) ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار با pH: ۷/۲ دیالیز شد. لازم به ذکر می باشد که در طول این مدت و به هدف خارج شدن همه سولفات آمونیوم از محلول

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

داخل کیسه دیالیز، بافر فسفات سدیم سه بار تعویض گردید،(۱۰). بعد از انجام دیالیز محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. در هر مرحله برای بررسی مراحل تخلیص از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید در حضور SDS و برای رنگ آمیزی ژل از رنگ کماسی بلو R-۲۵۰ استفاده شد،(۱۸). جهت تعیین غلظت فریتین هم از روش برادفورد بهره گرفته شد،(۱۹). آنالیز الکتروفورتیک در این مرحله حاکی از این بود که فریتین خالص نیست و هنوز هم مقدار بسیار زیادی از پروتئین های کبدی در عصاره وجود دارد. بنا بر این عصاره مرحله قبل مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۸۰°C حرارت داده شد و سپس در ۱۰۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. در این مرحه مقدار بسیار زیادی از پروتئین ها و آنزیم های کبدی حذف شده بودند. برای تخلیص نهایی فریتین از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی(DEAE-سلولز) استفاده گردید.(۲۰)

در این مرحله، ابتدا ستون حاوی DEAE-سلولز (۳cm ×۵۰cm) توسط بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار با pH: ۶ به تعادل رسید. عصاره ناخالصی که در مرحله قبل با همین بافر به تعادل رسیده بود، از درون ستون عبور داده شد. سپس ستون با همان بافری که نمونه با آن به تعادل رسیده بود، شستشو داده شد تا پروتئین‌های با اتصال سست، از ستون جدا شوند. شستشو تا زمانی که جذب نمونه های خارج شده از ستون در طول موج ۲۸۰ نانومتر به صفر نزدیک شود(سرعت جریان ۴ میلی لیتر در دقیقه) ادامه پیدا کرد. پس از خارج شدن پروتئین هایی که به صورت سست به ستون متصل شده بودند، به کمک نمک کلرید سدیم ۱ مولار در بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار با pH: ۶(به عنوان بافر شستشو)، فریتین از ستون شستشو داده شد. این بافر به علت افزایش مرحله ای قدرت یونی می تواند فریتین با(pI: ۴/۸) را که به واسطه نیروی جاذبه الکتروستاتیک به رزین چسبیده است، جدا و از ستون خارج کند. در این مرحله، خروجی ستون در فرکشن های جداگانه و با حجم ۳ میلی لیتر جمع آوری شد و جذب نمونه ها در ۲۸۰nm قرائت گردید.

مطابق با گزارش های موجود در منابع متعدد، گروه هیم می تواند به پروتئین فریتین متصل شود،(۲۱،۲۲). برخی گزارش ها وجود هیم متصل به فریتین در شرایط طبیعی بدن را تائید کرده اند،(۲۱). هم چنین مشخص شده است که ۱۷-۱۵ گروه هیم می توانند به یک پروتئین فریتین متصل شوند،(۲۱). برای آزمودن این احتمال و بررسی عمیق تر فعالیت آنزیمی این دو سیستم، فعالیت پراکسیدازی فریتین در غیاب و حضور هیم مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور از TMB(یک سوبسترای کلاسیک برای آنزیم های پراکسیداز) و پراکسید هیدروژن(H_2O_2)(به عنوان اکسیدکننده) استفاده شد. TMB بعد از اکسید شدن از محلول بیرنگ به یک محلول آبی متمایل به سبز، که در ۶۵۲ nm دارای حداکثر جذب است، تبدیل می شود. سنجش فعالیت پراکسیدازی هیم به تنهایی، فریتین به تنهایی و مجموعه هیم-فریتین در بافر فسفات پتاسیم ۲۰ میلی مولار با pH: ۷ و در دمای اتاق انجام شد.

برای بررسی فعالیت پراکسیدازی ابتدا فعالیت پراکسیدازی هیم تنها، مقدار ۱ میکرومولار هیم به همراه ۶۰۰ میکرومولار TMB و ۳ میلی مولار H_2O_2 به همراه بافر فسفات ۲۰ میلی مولار درون کووت کوارتز ریخته شد. سپس در خلال ۲ دقیقه اول که تغییرات جذب در مقابل زمان خطی است، جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر اندازه گیری شد. در ادامه به همین ترتیب فعالیت پراکسیدازی فریتین تنها با غلظت ۰/۰۴۵ mg/ml مجموعه هیم(۰/۱ میکرومولار)- فریتین و مجموعه هیم(۱ میکرومولار)- فریتین انجام شد. تمام آزمایش های مربوط سه بار تکرار شدند.

یافته های پژوهش

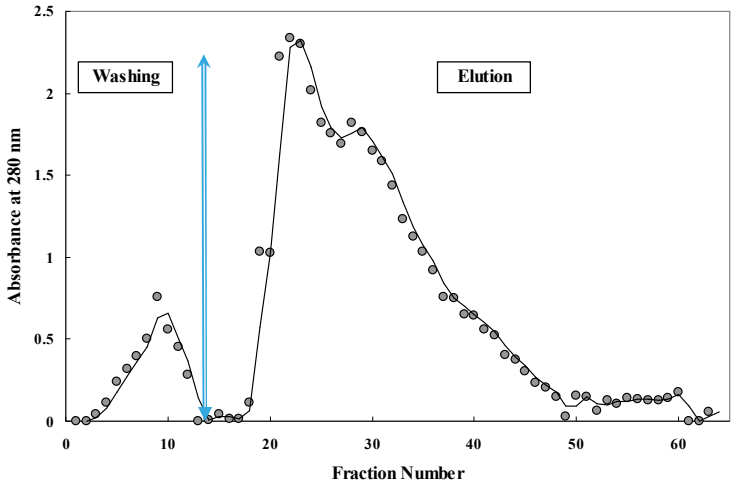
پس از بررسی روش های قبلی تخلیص فریتین به این نکته پی بردیم که تاکنون در بیشتر روش های تخلیص از کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی استفاده شده است و استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی دارای بازده پایینی بوده است،(۱۷)، و بازدهی بالای آن زمانی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

بود که با کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی همراه می شد. بنا بر این با عنایت به پیچیدگی و زمان بر بودن استفاده از روش فیلتراسیون ژلی بر آن شدیم تا صرفاً با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی فریتین را با بازدهی و خلوص بالا تخلیص کنیم. از آن جایی که تهیه فریتین از شرکت های خارجی بسیار هزینه بر می باشد، تخلیص فریتین با هزینه پایین و بازده و خلوص بالا دارای ارزش فراوانی است که ما در این تحقیق به آن دست یافتیم.

به طور کلی جداسازی فریتین از بافت نیازمند روش چند مرحله ای است که شامل حرارت دادن، استفاده از سولفات آمونیوم، سانتریفیوژ و استفاده از کروماتوگرافی می باشد. البته هر کدام از مراحل دارای محدودیت های مخصوص به خود می باشد. به عنوان مثال تغییرات pH باعث کاهش میزان خلوص در هر کدام از مراحل می شد و ما شرایط بهینه را پس از چندین بار آزمون و خطا در شرایط مختلف به دست آوردیم. همان طور که در روش تخلیص توضیح داده شد ما از ویژگی بارز فریتین که مقاومت حرارتی بالای آن می باشد به عنوان یک فاکتور کلیدی(در دو مرحله) برای حذف بسیاری از پروتئین های کبد استفاده کردیم.

همان طور که در نمودار کروماتوگرافی(شکل شماره ۲) مشاهده می شود در مرحله شستشوی اول که از بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار pH: ۶ استفاده شده پروتئین هایی که در این pH دارای بار منفی نیستند توانایی چسبیدن به ستون تعویض آنیونی را نداشته، بنا بر این از ستون خارج شده اند. ولی فریتین که دارای pI: ۴/۸ می باشد در pH: ۶ دارای بار منفی است و به واسطه نیروی جاذبه الکتروستاتیک به رزین اتصال می یابد. ولی در مرحله بعد با افزودن قدرت یونی بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار به کمک شیب کلرید سدیم ۱ مولار، فریتین از ستون جدا و در فرکشن های مختلف با درصد خلوص متفاوت جمع آوری گردید.

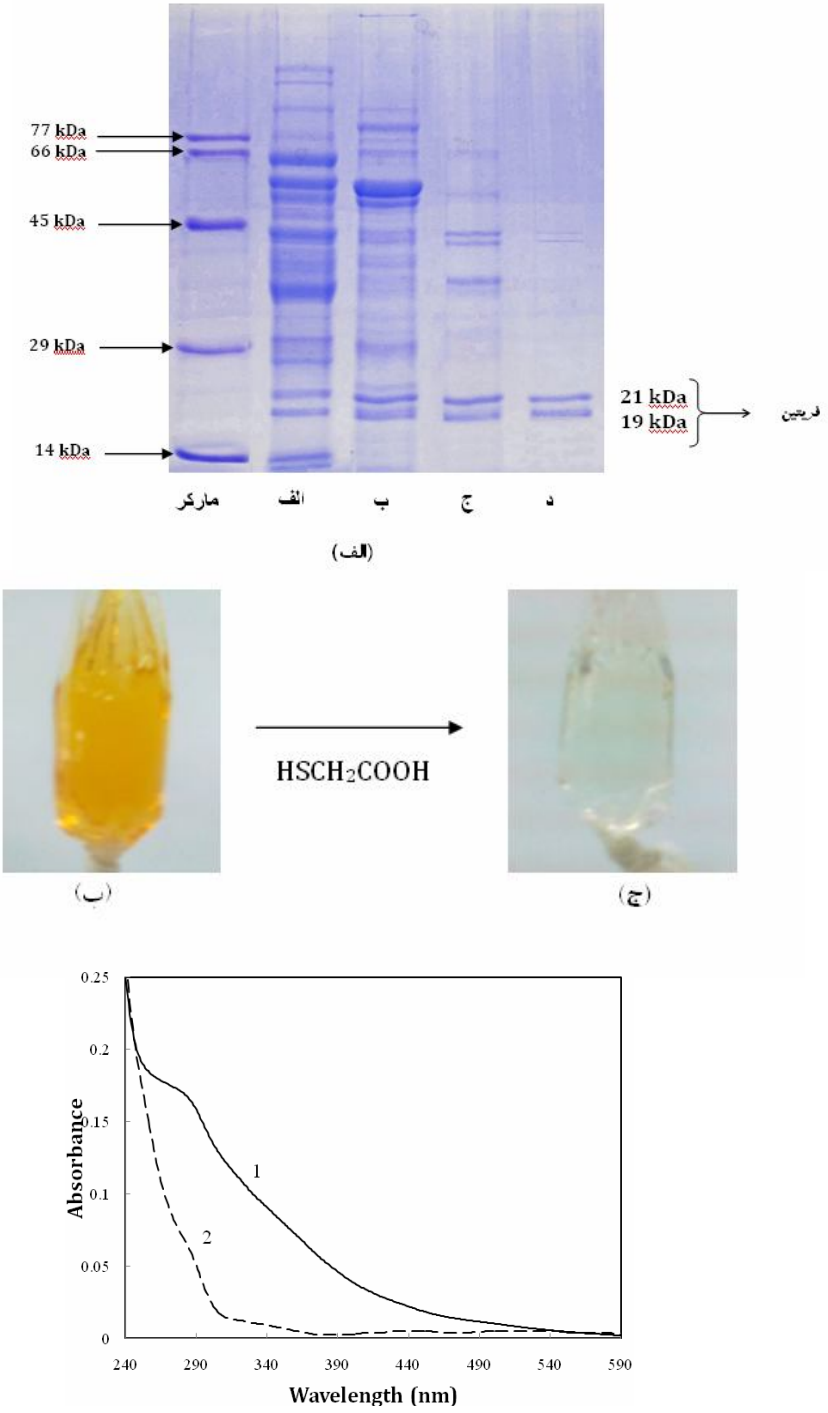


شکل شماره ۲. کروماتوگرام تخلیص فریتین. جذب نمونه ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر را در مراحل مختلف کروماتوگرافی نمایش داده شده است

برای بررسی میزان خلوص فریتین در تمام مراحل تخلیص از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید در حضور SDS استفاده شد. شکل شماره ۳- الف ژل الکتروفورز مربوط به مراحل مختلف تخلیص را نشان می دهد. خط الف، ب، ج و د به ترتیب مربوط به عصاره بافت کبد قبل از رسوب با سولفات آمونیوم، قبل از تیمار حرارتی ۸۰°C، بعد از تیمار حرارتی ۸۰°C و فرکشن نهم شستشوی فریتین از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی(DEAE-سلولز) می باشند. همان طور که در شکل مشاهده می گردد در این روش فریتین با درجه خلوص بالایی خالص گردیده است. ژل الکترفورز پس از رنگ آمیزی به دستگاه دانسیتومتر منتقل شد و سپس توسط دستگاه جذب هر بند پروتئینی در طول موج ۵۹۰ نانومتر(طول موج مکمل رنگ آبی) قرائت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

گردید. در ادامه دستگاه با تقسیم جذب هر بند بر جذب کل بندهای ژل، معیاری تقریبی از غلظت نمونه مورد نظر به دست می‌آورد. این روش مقدار جزیی خطا دارد که ناشی از پراکنش نور توسط مولکول های آب موجود در ژل می باشد ولی در کل معیار مناسبی برای تخمین میزان درجه خلوص می باشد. در این روش درجه خلوص فریتین بیش از ۹۵ درصد تخمین زده شد.

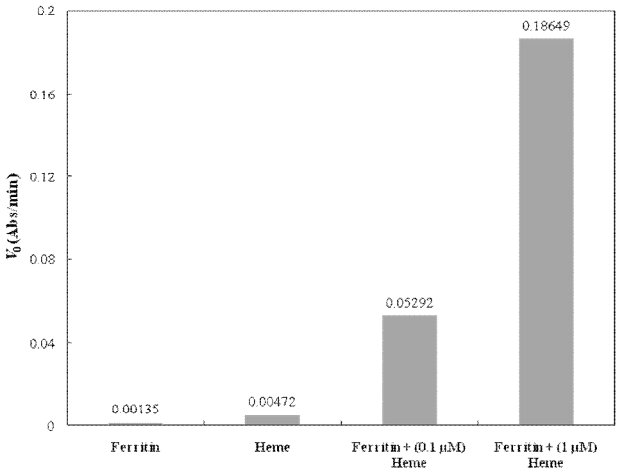


شکل شماره ۳. (الف) ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید در حضور SDS. الف، ب، ج و د به ترتیب نشان دهنده عصاره بافت کبد قبل از رسوب با سولفات آمونیوم، نمونه قبل از تیمار حرارتی ۸۰°C، بعد از تیمار حرارتی ۸۰°C و فرکشن نهم شستشوی فریتین از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی(DEAE-سلولز) می باشند. (ب) تغییر رنگ پروتئین فریتین در حین شکل گرفتن آپوفریتین به دلیل تبدیل آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی و آزاد شدن آن. (ج) طیف جذبی UV-Vis فریتین(۱) وآپوفریتین(۲) در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار pH ۷/۰. غلظت هر دو پروتئین ۱۰۰ نانومولار است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

نمونه فریتین خالص شده با استفاده از کیت Immunoradiometric Assay (IRMA) شرکت RADIM SPA کشور ایتالیا مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود که آیا کیت های تجاری قادر به شناسایی فریتین گوسفندی هستند یا خیر؟ نتیجه نشان داد که کیت مذکور قادر به شناسائی فریتین تخلیص شده گوسفندی می باشد. هم چنین تیمار نمونه فریتین با تیوگلیکولیک اسید(HSCH2COOH) منجر به تغییر رنگ محلول حاوی پروتئین گردید. یون های Fe^{3+} موجود در فریتین به واسطه حضور تیوگلیکولیک اسید به تدریج ضمن تبدیل به Fe^{2+} (و تولید آپوفریتین) از پروتئین جدا می گردند. در این حین رنگ محلول فریتین از خرمائی–قرمز به زرد کمرنگ تا بیرنگ تغییر می یابد(شکل شماره ۳–ب). مضافاً طیف جذبی فریتین در حدود طول موج ۴۰۰ نانومتر دارای یک حداکثر جذبی است که در صورت خروج آهن از ساختار آن، این ناحیه جذبی در طیف آپوفریتین ناپدید می گردد(شکل شماره ۳–ج). جمیع شواهد بالا نشان می دهد که باندهای پروتئینی خالص شده در شکل شماره ۳–الف مربوط به فریتین می باشند.

گزارش هایی مبنی بر قابلیت اتصال فریتین به گروه هیم وجود دارد،(۲۱،۲۲). بر این اساس احتمال آن می رود که مجموعه مذکور به نوعی جایگاه فعال پراکسیداز را بازسازی و دارای خاصیت پراکسیدازی می باشد. برای آزمایش چنین فرضیه ای، فعالیت پراکسیدازی فریتین در حضور و عدم حضور هیم بررسی شد. همان طور که در شکل شماره ۴ قابل مشاهده است، فعالیت پراکسیدازی مجموعه هیم–فریتین بسیار بالاتر از هیم به تنهایی است که میزان این فعالیت به غلظت هیم وابسته می باشد. ضمناً فریتین به تنهایی نیز فاقد هرگونه فعالیت پراکسیدازی می باشد.



شکل شماره ٤. سرعت اکسیداسیون TMB توسط فریتین به تنهایی، هیم به تنهایی و نیز فریتین در حضور غلظت های ۰/۱ و ۱ میکرو مولار هیم.

بحث و نتیجه گیری

فریتین یک پروتئین عمومی برای تمام سلول ها و ارگانیسم ها است و بیش از ۷۰ سال است که تحقیقات به آن معطوف شده است. اما هنوز به عنوان یک مولکول جالب ویژگی های جدید و غیرقابل پیش بینی را بروز می دهد. در طی این تاریخچه طولانی مشخص شده که این پروتئین با نیازهای ویژه ای سازش یافته است. به عنوان مثال توانایی حرکت فریتین به سوی هسته برای محافظت از DNA در باکتری ها. البته هنوز مکانیسم بسیاری از عملکردهای فریتین به طور کامل روشن نشده است. علاوه بر این، مطالعه ناهنجاری های وابسته به نقص فریتین دریچه های جدیدی در مورد عملکردهای مختلف فریتین به ما می دهد. به عنوان مثال بررسی فریتین میتوکندریایی می تواند یک موضوع مورد تحقیق باشد که پاسخگوی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

ناهنجاری های میتوکندریایی، پیری و حتی تخریب نورونی است.

همان طور که قبلا نیز ذکر شد نقش فریتین به عنوان یک پروتئین اصلی، در هموستازی آهن شناخته شده است اما بسیاری از جنبه های حیاتی مربوط به عملکردهای این پروتئین عظیم تاکنون ناشناخته باقی مانده است که ممکن است شگفتی های فراوانی را در آینده باعث شود. بنا بر این برای بررسی بیشتر خواص فریتین به روش هایی احتیاج است که این پروتئین با درصد خلوص بالا، هزینه پایین و در مدت زمانی کوتاهی خالص گردد. البته بدیهی است به دلیل سهولت استحصال انواع فریتین گاوی، گوسفندی و غیره تحقیقات عمدتاً برروی این پروتئین ها صورت می گیرد. لکن به علت تشابه بالای توالی و ساختار سوم و چهارم فریتین انسانی و گوسفندی(مستند به نتایج Alignment) نتایج به نوع انسانی نیز قابل تعمیم خواهد بود.

همان طور که در بخش مواد و روش ها هم ذکر شد، مراحل ابتدایی تخلیص مشابه روش به کار برده شده توسط بهجتی و همکاران(۱۳۸۳) می باشد. ولی ما با اندکی تغییرات و افزایش یک مرحله تیمار حرارتی مقدار بسیار زیادی از پروتئین های کبدی را حذف نمودیم. به عبارتی با این کار(یعنی افزایش یک مرحله تیمار حرارتی) توانستیم راندمان تخلیص فریتین را به میزان زیادی بهبود ببخشیم(قسمت ج در شکل شماره ۳). همان طور که در شکل نیز مشاهده می شود افزودن این مرحله تاثیری آن چنانی بر روی مقدار فریتین نداشته و فقط پروتئین های مزاحم را حذف کرده است. در مرحله آخر نیز برخلاف روش به کار برده شده در رفرنس شماره ۱۰(کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی چرخشی یا تکرار شونده) از کروماتوگرافی تعویض آنیونی(DEAE-سلولز) استفاده کردیم که موجب گردید فریتین با درصد خلوص بالا و در زمان بسیار کوتاه تری نسبت به کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی خالص گردد. در کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی به علت لزوم اعمال جریان بافر(Flow rate) کمتر(حدوداً ۱۰ درصد سرعت جریان اعمال شده در روش کروماتوگرافی تعویض یونی) زمان زیادی(حدود ۱۰ برابر) صرف می گردد. تکرار فرایند به صورت چرخشی (نظیر آن چه در رفرنس شماره ۱۰ مورد استفاده قرار گرفته است) علاوه بر این که سبب رقیق سازی نمونه می گردد، وقت زیادی را طلب می نماید. در مقابل کروماتوگرافی تعویض یونی علاوه بر تغلیظ نمونه و در مقایسه با کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی در مدت زمان کوتاه تری قابل انجام است. لازم به ذکر است که بازده روش به کار برده شده در این تحقیق ۲۰۰ میکروگرم فریتین به ازای هر گرم بافت تازه کبد می باشد که در مقایسه با رفرنس شماره ۱۰ و منابع ذکره شده در آن قابل توجه می باشد.

استرس اکسیداتیو عمدتاً ناشی از عدم تعادل در وضعیت آنتی اکسیدان هاست بوده و در اغلب موارد منجر به آسیب بافتی می گردد. چنان چه استرس اکسیداتیو ملایم باشد بافت با افزایش تولید آنتی اکسیدان ها به آن پاسخ می دهد و در صورتی که استرس اکسیداتیو شدید باشد منجر به مرگ سلولی می گردد. بدن انسان با استفاده از آنتی اکسیدان های آنزیمی(آنزیم هایی نظیر کاتالاز و پراکسیداز) و یا مکانیسم های غیر آنزیمی(نظیر تولید گلوتاتیون) به مقابله با استرس اکسیداتیو می پردازد. لازم به ذکر است واکنش های پراکسیدازی از نظر ترمودینامیک مطلوب هستند و تقویت آن ها باعث بهبود عملکرد اعصاب محیطی، عملکرد اندوتلیال و مهار تخریب نرونی می گردد که این فرایند می تواند در درمان بیماری هایی چون دیابت اثرگذار باشد،(۲۳،۲۴). در این مطالعه نشان داده شد که فریتین به تنهایی فاقد فعالیت پراکسیدازی و هیم به تنهایی دارای فعالیت پراکسیدازی بسیار پایینی است ولی بعد از اتصال به یکدیگر و ایجاد کمپلکس هیم-فریتین فعالیت پراکسیدازی قابل توجهی را بروز می دهند. فعالیت یاد شده می تواند در حالت نرمال محافظت کننده از استرس اکسیداتیو باشد. لیکن در شرایط حاکم در بیماری های تخریب نورونی، امکان تخریب مولکول‌های حیاتی به دلیل حضور مقادیر بالای پراکسید افزایش می‌یابد. این موضوع در آزمایشگاه بیولوژی ساختاری مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه در حال پیگیری است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی(دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه) به خاطر حمایت مالی و از همکاری پرسنل محترم آن تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1-Worwood M. Ferritin. Blood Rev. 1990; 4:259-69.
2-Cham BE, Roeser HP, Nikles A, Ridgway K. A procedure for the purification of ferritin from human liver by heating a methanol-treated homogenate. Anal. Biochem. 1985;151:561-5.
3-Baraibar MA, Barbeito AG, Muhoberac BB, Vidal R. Iron-mediated aggregation and a localized structural change characterize ferritin from a mutant light chain polypeptide that causes neurodegeneration. J. Biological Chem. 2008;283:31679-89.
4-Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. Sem Hematol 1998;35(1):35-54.
5-Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. Haematologica. 1995;80(3): 252-67.
6-Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta 1996;1275:161-203.
7-Theil E. The ferritin family of iron storage proteins. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1990;63:421-49.
8-Ford GC, Harrison PM, Rice DW, Smith JM, Treffry A, White JL, Yariv J. Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule. Phil Trans R Soc Lond 1984; 304:551-65.
9-Drysdale JW, Ramsay WN. The separation of ferritin and haemosiderin for studies in the metabolism of iron. Biochem. J. 1965;95:282-8.
10-Behjati AR, Sadeghi M, Ghods R, Ali Ahmad A, JadiTehrani M. Extraction and purification of ferritin from liver. J Babol Uni Med Sci 2003;14:1-21.
11-Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. Biochemica et Biophysica Acta. 2009;1790:589-99.
12-Parker P. Ferritin, First Edi., ICON Group International, Inc. San Diego, 2004.
13-Cetinkaya N, Lengman F, Kogan P. Isolation, purification and characterization of bovine apeleen ferritin, comp. Biochem. Physiol. 1985;80B:773-8.
14-Wu H, Engelhard MH, Wang J, Fisher DR, Lin Y, Mater J. Synthesis of Lutetium Phosphate/ Apoferritin Core-Shell Nanoparticles for Potential Applications in Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy of Cancers, J. Chem 2008;18:1779-83.
15-Liu G, Wang J, Wu H, Lin Y. Versatile Apoferritin Nanoparticle Labels for Assay of Protein. Analytical Chemistry, Anal. Chem. 2006;78:7417-23.
16-Liu G, Wu H, Dohnalkova A, Lin Y. Apoferritin templated synthesis of encoded metallic-phosphate nanoparticle tags, Anal. Chem. 2007;79:5614-19.
17-Drysadale JW, Munro HN. Small-scale isolation of ferritin for assay of the incorporation of 14C-labelled amino acids, Biochem. J. 1965;95:851-8.
18-Mostafaei A. Practical and theoretical manual of protein gel electrophoresis. 2rd ed. Yadavaran Publications; 2002.
19-Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. Methods Mol. Biol. 1994;32:9-15.
20-Huang HQ, Lin QM, Wang TL. Kinetics of iron release from pig spleen ferritin with bare platinum electrode reduction. Biophysical Chemistry 2002;97:17-27.
21-Fahmi H, Kadir A, Geoffrey R. Moore Haem binding to horse spleen ferritin, FEBS, 1990;276:81-4.
22-Usami A, Tanaka M, Yoshikawa Y, Watanabe K, Ohtsuka H , Orino K. Heme-mediated binding of a -casein to ferritin: evidence for preferential a-casein binding to ferrous iron, Biometals, 2011;24:1217–24.
23-Khodarahmi R, Naderi F, Mostafaie A, Mansouri K. Heme, as a chaperone, binds to amyloid fibrils and forms peroxidasein vitro: Possible evidence on critical role of non-specific peroxidase activity in neurodegenerative disease nset/progression using the a-crystallin-based experimental system, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010;494:205-15.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

24-Venkateswaran S, Pari L. Antioxidant effect of Phaseolus vulgaris in streptozotocin-induced diabetic rats, Asia Pacific J. Clin. Nutr. 2002;11:206-9.

Purification of Ferritin From Sheep Liver and The Report of Peroxidase Activity of Heme-Ferritin Complex

Ranjbar S[1], Jaafari M[1], Khodarahmi R[1], Zarei Z[1], Ashrafi M.R[1], Miraghaei S.Sh[1]*

(Received: 24 Feb. 2012 Accepted: 5 Nov. 2012)

Abstract

Introduction: Ferritin (with molecular weight: 450 kDa, 24 subunits) is composed of light and heavy chains and has a major role in circulating iron storage, so that up to 4500 ferric iron ions (Fe^{3+}) can be stored within its structure. The aim of this study was purification of ferritin from liver (the tissue that contains large amounts of ferritin) with high yield/purity, and evaluation of its possible peroxidase activity.

Materials & Methods: For successful purification of ferritin, we employed the obvious characteristic of ferritin (high thermal resistance against temperatures over 80°C) in two steps accompanying with ammonium sulfate precipitation and anionic exchange chromatography (DEAE-cellulose).

Findings: Ferritin was successfully purified and its purity (~ 95%) was confirmed using SDS-PAGE. Also at the present study, the peroxidase activity of heme-ferritin complex for the first time is documented.

Discussion & Conclusion: Since ferritin is widely used in diagnosis as well as research fields, its purification is inevitable prerequisite. Oxidative stress, as the main cause of neurodegenerative diseases, may also correlate with increased concentrations of ferritin in AD brain.

Keywords: ferritin, purification, anion exchange chromatography, peroxidase actity

1. Biomedical Research Center of Kermanshah, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]