بهینه سازی ایزوالکتریک فوکوسینگ(بعد اول) عصاره پروتئینی مغز موش ماده

آنا میفور[1*]، نایبعلی احمدی[1]، فرج اله ملکی[2]

1) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

2) گروه بیوشیمی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/8//10 تاریخ پذیرش: 91/11/15

چکیده

مقدمه: مهم ترین فعالیـــت های بیولوژیکی در سلول بر عهده پروتئین هاست و امروزه شناسایی پروتئین های سلول های مغزی و عملکرد آن ها با توجه به اهمیت مغز و نقش آن در کنترل فعالیت های بیولوژیکی از مباحث مورد علاقه محققان نورولوژیست می باشد. یکی از روش های مورد استفاده برای بررسی پروتئین های سلول های مغز، جدا کردن پروتئین ها بر اساس pH ایزوالکتریک آن ها می باشد. این مطالعه به منظور بهینه سازی شرایط ایزوالکتریک فوکوسینگ و انتخاب نوار با شیب pH تثبیت شده(IPG) که دارای بیشترین قدرت تفکیک باشد، انجام گردید.

مواد و روش ها: بعد از استخراج پروتئین های مغز موش و تعیین غلظت پروتئین ها به روش Bradford، عمل ایزوالکتریک فوکوسینگ با استفاده از سه نوار IPG با سه شیب PH مختلف انجام شد.

یافته های پژوهش: نوار IPG با pH=3-10NL در مـقایسه با دو نـــوار IPG دیگر با pH=3-10 و pH=4-7 توانست پروتئین های بیشتری با قدرت نفکیک بالا جداسازی کند.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که نوارهای با pH=3-10NL در مقایسه با دیگر نوارهای به کار رفته در تکنیک ایزوالکتریک فوکوسینگ می توانند پروتئین های بیشتری را از یکدیگر جدا کنند و این نوارها دارای قدرت تفکیک بهتری نسبت به دیگر نوارهایIEF می باشند. با توجه به پیچیدگی مغز، عملکرد آن و گستردگی پروتئین هایش این نوارها برای جداسازی پروتئین ها مناسب ترند.

واژه های کلیدی: مغز، ایزوالکتریک فوکوسینگ، موش، پروتئین

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: meyfour_a@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-06-01]

مقدمه

کنترل همه فرایندهای بیولوژیکی در جانوران به ویژه پستانداران برعهده مغز(سیستم عصبی مرکزی) می باشد. از طرفی مهم ترین فعالیت های بیولوژیکی در سلول بر عهده پروتئین هاست، بنا بر این شناسایی پروتئین های سلول های مغزی و عملکرد آن ها امروزه از مباحث مورد علاقه محقـقان نورولـوژیـست می باشد،(۱،۲). یکی از روش های مورد استفاده برای بررسی پروتئین های سلول های مغز، جداسازی پروتئین ها بر اساس pH ایزوالکتریکشان (Isoelectric Focusing: IEF) می بـاشـد. IEF، روش الکتروفورزی است که در آن پروتئین ها در یک میدان الکتریکی بر اساس نقطه ایزوالکتریک خود و بر روی بستر ژل پلی اکریل آمید که دارای شیب pH و حاوی غلظت زیاد اوره است از یکدیگر جدا می شوند،(3). بنا بر این در این نوع از الکتـروفورز، پروتئین ها بر اساس بار الکتریکی، که یک خصوصیت ذاتی و وابسته به ساختار اسیدآمینه هایشان است از یکدیگر جدا می شوند و با این روش می تـوان پروتئین هایی که دارای نقطه ایزوالکتریک متفاوتی هستند را مورد جداسازی قرار داد. چرا که بسیاری از پروتئین ها دارای ایزوفرم هایی هستند که وزن مولکولی مشابه اما دارای نقطه ایزوالکتریک متفاوت هستند. این روش به ولتاژ بالا در حدود 10000 ولت، زمان طولانی در حدود 10 ساعت و یک شیب pH نیاز دارد.(۴،۵)

تحقیقات گذشته بر روی جداسازی پروتئین ها و انجام مرحله IEF نشان می دهند که علاوه بر مشکلاتی که همیشه در محلول سازی پروتئین ها وجود دارد. بهینه سازیIEF هم یکی از مراحل بسیار سخت است. در این مرحله باید ولتاژ مناسب داده شود تا پروتئن های با وزن مولکولی بالا هم فوکوس شوند. از طرفی زمان فوکوسینگ هم باید کافی باشد تا همه پروتئین ها به نقطه ایزوالکتریک خود برسند و فوکوس شوند،(6-3). بنا بر این تهیه یک روش استاندارد بهینه برای استخراج پروتئین و انجام IEF مـغز مـوش می تواند در بسیاری از تحقیقات دیگر و بررسـی های پروتئین های مغز راه گشا باشد. در مطالعه ای که در سال 1979 توسط Amnéus H انتشار یافت،(7)، نشان داده شد که پروتئین ها مولکول هایی آمفوتر هستند، یعنی بسته به pH محیطی که در آن قـرار می گیرند دارای بار الکتریکی خالص مثبت، منفی و یا خنثی می شوند و بار خالص هر پروتئین در واقع جمع جبری همه بارهای مثبت و منفی آن می باشد. اگر تعداد گروه های اسـیدی بیشـتر از گـروه هـای بازی باشد، pH ایزوالکتریک پروتئین پایین خواهد بود و پروتئین جز پروتئین های اسیدی طبقه بندی خواهد شد. اگر تعداد گـروه هـای بازی در یک پـروتئین بیشتر از گروه های اسیدی باشد pH ایزوالکتریک پروتئین بالا خواهد بود و پروتئین جز پروتئین های بازی طبقه بندی خواهد شد. پروتئین ها تفاوت قابل ملاحظه ای در نقطه ایزوالکتریک با یکدیگر دارند و pI آن ها معمولاً در محدوده 12-3 و اکثراً در محدوده 7-4 می باشند. در حضور یک گرادیان pH و تحت تاثیر یک میدان الکتریکی، پروتئین به سمت نقطه ای در شیب حرکت می کند که بارالکتریکی خالصش صفر شود. پروتئینی با بار الکتریکی خالص منفی به سمت آند مهاجرت خواهد کرد، تا جایی که بار الکتریکی منفی اش کم شود و به صفر برسد. در صورتی که این پروتئین از محدوده pI خود خارج شود، فوراً باردار می شود و به pI خـود باز می گردد. در واقع این پدیده فوکوسینگ یا متمرکز شدن پروتئین در یک نقطه است که در «IEF» صورت می پذیرد و باعث تجمع و تمرکز یک پروتئین در نقطه ایزو الکتریک خود شده و ابزاری قدرتمند در جداسازی پروتئین ها بر اساس اختلاف هر چند ناچیز در بار الکتریکی شان می باشد.(8)

در تحقیق حاضر، از حیوان موش به خاطر شباهت فیزیولوژی به انسان و کاربرد آن به عنوان مدل در بسیاری از تحقیقات بیوتکنولوژی و بالینی استفاده شد. هدف از انجام این تحقیق، IEF پروتئین های مغز موش(جداسازی پروتئین های مغز موش بر اساس نقطه ایزوالکتریکشان)، بهینه سازی IEF یعنی انتخاب شیب pH مناسب برای جداسازی پروتئین های مغز، به دست آوردن زمان فوکوسینگ مناسب و بهینه سازی ولتاژ به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-06-01]

منظور به دست آوردن بهترین قدرت تفکیک می باشد تا بتوان از نتایج حاصله در تحقیقات آتی برای بررسی پروتئوم مغز موش بهره برد.

مواد و روش ها

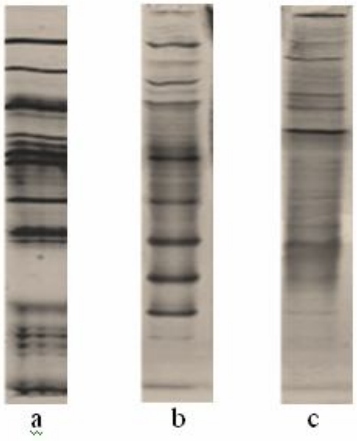
پس از بیهوش و خارج کردن مغز موش ماده، مغز با استفاده از هموژنایزر در کوکتل پروتئاز اینهیبیتور هموژنایز شده، در نیتروژن مایع فریز شد و به مدت 24 ساعت به منظور پودر کردن نمونه در فریزدرایر قرار داد شد. به نمونه فریزدرای شده، بافر لیز کننده اضافه شد و یک ساعت در دمای محیط ماند. بافر لیزکننده شامل، 2M Thiourea، 40mM Tris و 0.2% Biolyte بود. نمونه سانتریفیوژ شده و در نهایت تعیین غلظت پروتئین توسط روش Bradford انجام شد،(12-9). لازم به ذکر است جهت تکرار کار و بالا رفتن اطمینان، تعیین غلظت پروتئین توسط روش Bradford دو بار انجام شد.

در این تحقیق نوارهای مخصوص IEF (Immobilized pH Gradient strip: IPG strip) با سه شیب pH=4-7 و pH=3-10NL و pH=3-10 مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به سایز نوار، مقدار کافی نمونه برای هر نوار IPG (Bio Rad, USA) در نظر گرفته شد. حجم هر نمونه به همراه بافر آب دهی (Rehydration Buffer) به 300 میکرولیتر رسانده شد. نمونه به سینی های 17 سانتی متری انتقال داده شده و نوار IPG داخل آن قرار گرفت. پس از یک ساعت، روی نوار در حال آب گیری روغن معدنی اضافه شد تا از خشک شدن آن جلوگیری شود. بعد از گذشت 15 ساعت، نوار IPG از داخل Trayها خارج شده و روغن آن ها گرفته شد. سپس جهت انجام IEF به سینی مخصوص IEF منتقل شده و دوباره برای جلوگیری از سوخته شدن روی آن روغن معدنی ریخته شد. سپس سینی IEF داخل دستگاه Protean IEF Cell ,(Bio Rad), USA قرار گرفت و به دستگاه، ولتاژ مناسب داده شد که شامل 3 مرحله: 250 ولت مرحله اول، 10000 ولت مرحله دوم و در نهایت 50000 ولت-ساعت در مرحله سوم می باشد و تقریباً زمانی نزدیک به 10 ساعت را در بر می گیرد.(5)

یافته های پژوهش

پس از در آوردن مغز موش، لایز آن و انجام مرحله استخراج پروتئین، نمونه تعیین غلظت شد. غلظت پروتئینی حاصله برابر 8/5 میلی گرم در هر میلی لیتر نمونه بود. سپس مقدار کافی پروتئین(1200 میکروگرم) به سه نوار IPG با pH 4-7 ,3-10 ,3-10NL به همراه بافر آب دهی اضافه شد. پس از انجام مرحله خیساندن نوارها برای انجام IEF به دستگاه منتقل شدند. به منظور مشاهده الگوی به دست آمده و مقایسه نحوه فوکوسینگ پروتئین ها در سه شیب pH مختلف(7-4، 10-3، 3-10NL)، نوارها با رنگ IEF staining solution, Bio-Rad رنگ آمیزی شدند. همان طور که در شکل شماره 1 ملاحظه می گردد در نوار با pH=3-10NL تعداد بسیار زیادی از پروتئین های مغز موش با قدرت تفکیک نسبتاً بالا به صورت باند از یکدیگر جدا شدند(شکل a). در نوار IPG با pH=4-7 همان طور که در شکل(b) ملاحظه می گردد اگر چه قدرت تفکیک در ناحیه 4-7 بالا رفته است اما در مقایسه با شکل(a)، یک سری پروتئین ها که pH ایزوالکتریکشان در ناحیه pH=3-4 و pH=7-10 می باشد از دست می روند. در نهایت در شکل(c) که دارای شیب pH=3-10 به صورت خطی است، مشاهده می گردد که باندهای پروتئین ها در ناحیهpH=4-7 بسیار متراکم هستند و با استفاده از این نوار با این شیب pH، قدرت تفکیک بالایی حاصل نمی گردد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-06-01]



شکل شماره 1. نوارهایIPG **سه** pH **مختلف**(3-10NL (fig a), 4-7 (fig b), 3-10 (fig c
رنگ آمیزی شده با IEF staining solution

بحث و نتیجه گیری

همان طور که در بالا به آن اشاره شد هدف از انجام این مطالعه، بهینه سازی روش IEF پروتئین های مغز موش می باشد. در انجام این مرحله فاکتورهای زیادی از جمله شیب pH، زمان انجام IEF، نوع نمونه، دمای انجام آزمایش، مقدار پروتئین load شده و طول ژل نوار IPG بستگی دارد. در این تحقیق از 3 شیب مختلف pH استفاده شد تا مشخص شود که کدام شیب برای جداسازی پروتئین های مغز موش مناسب تر می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده (شکل شماره 1) به نظر می رسد که نوارهایی با شیب pH=3-10NL برای جداسازی پروتئین های مغز موش مناسب تر از دو شیب pH=4-7 و pH=3-10 می باشد. تحقیقات دیگر نشان می دهند که زمانی برای انجامIEF از یک شیب pH خطی در محدوده 3-10 استفاده می شود که هدف بررسی کلی پروتئین های نمونه می باشد. استفاده از این روش، انتخاب مناسبی برای مطالعه اولیه یک نمونه پروتئینی جدید و نا آشنا، چگونگی توزیع پروتئینی آن و چک کردن نحوه استخراج پروتئین ها می باشد و برای بررسی دقیق پروفایل پروتئینی نمونه مورد نظر شیب مناسبی نمی باشد، زیرا اکثر پروتئین ها دارای pH ایزوالکتریک در محدوده 7-4 هستند و از طرفی pH در نوارهایی با pH=3-10 به صورت خطی(یک واحد یک واحد) تغییر می کند و ممکن است که بسیاری از پروتئین ها با pH ایزوالکتریک نزدیک به هم روی هم متمرکز شوند. پس این نوارها قدرت تفکیک بالایی در pH=4-7 ندارند،(15-13)، و نتایج این مطالعه هم تاییدکننده همین مطالب می باشد.

همان طور که گفته شد pH ایزوالکتریک بیشتر پروتئین ها عددی بین 4 تا 7 می باشد پس نوارهایی با شیب pH=4-7 دارای قدرت تفکیک بالایی در این محدوده pH هستند. این نوارها برای مطالعه دقیق نمونه های پروتئینی مثل پروتئین های اسپرم که اکثر پروتئین هایش در محدوده pH=4-7 می باشد مناسب هستند،(۱۶،۱۷). اما مطالعات گذشته نشان داده اند که پروتئین های مغز دارای طیف گسترده ای از pH می باشند و اگر از نوارهایی با pH=4-7 برای جداسازی آن ها استفاده شود بسیاری از پروتئین ها در نوار فوکوس نخواهند شد و از دست می روند،(20-18). از مقایسه شکل 1b با دو شکل دیگر مشخص می شود که اگرچه میزان تفکیک پروتئین ها بسیار بالا رفته است اما پروتئین های ناحیه اسیدی و بازی روی ژل متمرکز نشده اند. یکی از راه حل ها برای رفع دو مشکل فوق یعنی رسیدن به قدرت تفکیک مناسب و در عین حال داشتن یک طیف گسترده pH، استفاده از نوارهایی با pH غیر خطی بین 3-10 است. این نوارها در محدوده pH=4-7 دارای قدرت تفکیک بالایی هستند. در واقع در این نوارها تغییر pH از ناحیه اسیدی به سمت بازی به صورت خطی نمی باشد و ناحیه pH=4-7 وسعت بیشتری دارد، در نتیجه پروتئین ها در

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-06-01]

این ناحیه بهتر از یکدیگر جدا می شوند،(۱۳،۲۱). الگوی به دست آمده از پروتئین های مغز موش هم در شکل 1a نشان دهنده همین مطالب می باشد. در نهایت می توان نتیـــجه گـــــیری کرد در مغز طیف گسترده ای از پروتئین ها با pH ایزوالکتریک اسیدی یا بازی وجود دارد و با توجه به پیچیدگی مغز و عملکرد آن و گستردگی پروتئـــین های مغز، نوارهای با pH=3-10NL می توانند پروتئین های بیشتری را از یکدیگر جدا کند این نوارها دارای قدرت تفکیک بهتری نسبت به دیگر نوارهای IEF می باشند.

References

1-Dhingra V, Li X, Liu Y, Fu ZF. Proteomic profiling reveals that rabies virus infection results in differential expression of host proteins involved in ion homeostasis and synaptic physiology in the central nervous system. J Neurovirol 2007;13:107-17.

2-Wang H, Qian WJ, Chin MH, Petyuk VA, Barry RC, Liu T, et al. Characterization of the mouse brain proteome using global proteomic analysis complemented with cysteinyl-peptide enrichment. J Proteome Res 2006;5:361-9.

3-Choe LH, Lee KH. Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis. Electrophoresis 2003;24:3500-7.

4-O'Neill RA, Bhamidipati A, Bi X, Deb-Basu D, Cahill L, Ferrante J, et al. Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:16153-8.

5-Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R ,et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods 1982;6:317-39.

6-Stoyanov AV, Righetti PG. Dynamics of protein isoelectric focusing in immobilized pH gradient gels .Electrophoresis 1996;17: 1313-8.

7-Amneus H, Naslund L, Gabel D, Kasche V. Biospecific sample preparation and its application in isoelectric focusing. Biochem Biophys Res Commun 1979;90:1313-20.

8-Langen H, Roder D, Juranville JF, Fountoulakis M. Effect of protein application mode and acrylamide concentration on the resolution of protein spots separated by two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis 1997;18:2085-90.

9-Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy biochem 1976;72:248-54.

10-Tan AA, Azman SN, Abdul Rani NR, Kua BC, Sasidharan S, Kiew LV, et al. Optimal protein extraction methods from diverse sample types for protein profiling by using Two-Dimensional Electrophoresis (2DE). Trop Biomed 2008;28:620-9.

11-Aresta A, Calvano CD, Palmisano F, Zambonin CG, Monaco A, Tommasi S, et al. Impact of sample preparation in peptide/ protein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 2008;46:157-64.

12-Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. J Chromatogr A .2004;1023:317-20.

13-Gorg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E, Righetti PG. Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultra-thin polyacrylamide layers. J Biochem Biophys Methods 1980;3:273-84.

14-Gorg A, Postel W, Baumer M, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley seed proteins: discrimination of cultivars with different malting grades. Electrophoresis 1992;13:192-203.

15-Righetti PG, Bossi A. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: an update. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997;699:77-89.

16-Chao HC, Chung CL, Pan HA, Liao PC, Kuo PL, Hsu CC. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14 is a novel sperm-motility biomarker. J Assist Reprod Genet 2011;28:851-61.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-06-01]

17-Secciani F, Bianchi L, Ermini L, Cianti R, Armini A, La Sala GB, et al. Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm. J Proteome Res 2009;8:3377-89.
18-Friedman DB, Hoving S, Westermeier R. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. Methods Enzymol 2009;463:515-40.
19-Westermeier R, Postel W, Weser J, Gorg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. J Biochem Biophys Methods 1983;8:321-30.
20-Gauss C, Kalkum M, Lowe M, Lehrach H, Klose J. Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identifycation by mass spectrometry and genetic variation. Electrophoresis 1999;20:575-600.
21-Bae SH, Harris AG, Hains PG, Chen H, Garfin DE, Hazell SL, et al. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. Proteomics 2003;3:569-79.

Isoelectric Focusing Optimization of Female Mouse Brain Protein Extract

Meyfour A[1], Ahmadi N[1], Maleki F[2]*

(Received: 31 Oct. 2012 Accepted: 3 Feb. 2013)

Abstract

Introduction: Brain (central nervous system) is responsible to manage all biological process in living organisms, particularly mammalian. Since proteins play major roles in the biological cell activities, nowadays identification of brain proteins and determination of their function is interesting subject for neurologists. Isoelectric Focusing (IEF) technique is one of the proteomic technologies to study brain proteins. This study was carried out to select the IPG strips with maximum resolution and to optimize IEF condition for the separation of mouse brain proteins.

Materials & Methods: After extraction of mouse brain proteins and determination of protein concentration by Bradford assay, Isoelectric Focusing was performed using IPG strips with three different pH gradients.

Findings: IPG strip with pH=3-10NL was able to separate more proteins with relatively high resolution in comparison with IPG strips with pH=3-10 and pH=4-7.

Discussion & Conclusion: Results were shown that more proteins can be separated using IPG strip with pH=3-10 NL and this strip has a high resolution rather than the other strips. Due to the complexity of brain, its function, and the extent of brain proteins, it is appropriate to resolve proteins by the method.

Keywords: Mouse, Protein, Isoelectric focusing, Brain

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-06-01]