

Effective purification of human chorionic gonadotropin and its subunits from pregnant women urine

Moradi A¹, Mirshahi M^{2*}

1- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I. R. Iran.

2- Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

Received August 18, 2012; Accepted December 5, 2012

Abstract:

Background: Human chorionic gonadotropin (hCG), containing 30% sugar by molecular weight, is an important glycoprotein in pregnancy to keep the fetus. Nowadays, hCG has been used as the basis for the contraceptive vaccines. This study aimed to increase the hormone purity and shorten its purification time.

Materials and Methods: For hCG purification, urine samples of 2-3 month pregnant women were collected and precipitated using sodium benzoate, acetic acid and acetone. The concentrated hCG was run on Concanavalin A column (Con-A) and eluted using D-Glucose and D-Mannose. To isolate the purified α and β subunits of hCG, the Con-A column was run on DEAE-Sepharose 4B column. The purity of hCG and its subunits was confirmed by SDS-PAGE and validated by ELISA and Immunoblotting.

Results: The concentrated urine sample and purified hCG sample were compared with the standard hCG control sample from Organon company, in terms of molecular weight and purity, using SDS-PAGE method and silver nitrate staining. Concentrated sample was identical to standard sample in number of additional bands, in which additional bands were removed after hCG purification. hCG hormone and its subunits were approved using the monoclonal antibodies against the α and β chains using ELISA and Western blot.

Conclusion: According to the results of this study, hCG can be isolated from other parts of hCG and other glycoproteins using D-Glucose before D-Mannose.

Keywords: Human chorionic gonadotropin, Purification, Chromatography

*** Corresponding Author.**

Email: Mirshahi@modares.ac.ir

Tel: 0098 912 327 4065

Fax: 0098 21 828 84717

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences March, 2013; Vol. 17, No 1, Pages 71-79

Please cite this article as: Moradi A, Mirshahi M. Effective purification of human chorionic gonadotropin and its subunits from pregnant women urine. *Feyz* 2013; 17(1): 71-9.

تخالص هورمون hCG از ادرار زنان باردار و جداسازی زیرواحدهای آن

*^۱ علی مرادی ، منوچهر میرشاھی

خلاصه:

سابقه و هدف: هورمون hCG از گلیکوپروتئین‌های مهم دوران بارداری جهت حفظ جنین است که تقریباً ۳۰ درصد وزن مولکولی این هورمون را قند تشکیل می‌دهد. امروزه از این هورمون در درمان و همچنین ساخت واکسن‌های ضد بارداری استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر سعی در افزایش میزان خلوص و کوتاه کردن مسیر تخلیص این هورمون است.

مواد و روش‌ها: جهت تخلیص هورمون hCG از نمونه ادرار زنان باردار دو تا سه ماهه استفاده شد. نمونه جمع‌آوری شده توسط بنزووات سدیم، اسید استیک و استون رسوب‌دهی و تغليظ گردید. با عبور نمونه تغليظ شده از ستون کانکاتاوالین A (Con-A) و جدا-کننده‌های دی‌گلوكز و دی‌مانوز، hCG تخلیص گردید. با عبور نمونه hCG تخلیص شده از ستون 4B DEAE-Sephadex ایمونوبلاتینگ بررسی شد.

نتایج: نمونه تغليظ شده به دست آمده از ادرار و نمونه hCG تخلیص شده از ستون کانکاتاوالین A، با استاندارد hCG از شرکت ارگانون از نظر وزن مولکولی و میزان خلوص با روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مقایسه شدند. نمونه تغليظ شده شبیه نمونه استاندارد و دارای تعدادی باند اضافی بود که باندهای اضافی بعد از تخلیص hCG حذف گردید. تایید هورمون hCG زیرواحدهای آن با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد زنجیره α و β به روش الیزا و وسترن بلات انجام گرفت.

نتیجه‌گیری: استفاده از قند دی‌گلوكز قبل از دی‌مانوز توانست باعث جداسازی hCG از سایر قطعات hCG و گلیکوپروتئین‌ها شود.

واژگان کلیدی: کوریونیک گنادوتروپین انسانی، خالص سازی، کروماتوگرافی

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۱، فروردین واردیهشت ۱۳۹۲، صفحات ۷۱-۷۹

هورمون hCG از دو زیرواحد آلفا و بتا تشکیل شده است که توسط باندهای غیر کوالان هیدروژنی و هیدروفوب بهم متصل‌اند. زیرواحد آلفا در تمام هورمون‌های گلیکوپروتئینی این خانواده مشابه است. این زیر واحد شامل ۹۲ اسید آمینه با وزن مولکولی ۱۴۷۰۰ دالتون، پنج پل دی‌سولفید و دو زنجیره جانبی اولیگوساکاریدی به صورت N-link در موقعیت آمینو اسیدی ۵۲ و ۷۸ می‌باشد. زیرواحد بتا در خانواده این هورمون‌های گلیکوپروتئینی با هم فرق می‌کند؛ بنابراین فعالیت بیولوژیکی هر هورمون توسط زیرواحد بتای آن مشخص می‌شود. این زیرواحد شامل ۱۴۶ اسید آمینه با وزن مولکولی ۲۳۰۰۰ دالتون، شش باند دی‌سولفید و شش زنجیره قندی، دو زنجیره به شکل N-link چهار زنجیره به شکل O-link می‌باشد. اتصالات قندی در ترشح، تجمع، پایداری و فعالیت بیولوژیک و تصفیه هورمون hCG نقش مهمی را بازی می‌کنند [۸-۱۴]. در داخل سرم و ادرار زنان باردار در طول دوران بارداری، علاوه بر هورمون hCG به شکل کامل (فائد شکستگی)، اشکالی از هورمون به صورت تجزیه شده (زیرواحدهای آلفا و بتای آزاد) و شکسته شده (Nicked-hCG) یافت می‌شود. شکستگی اکثر در ناحیه آمینواسیدی ۴۷ و ۴۸ از زیرواحد بتا و در اثر آنزیمی به نام الاستاز لوکوسیت انسانی که توسط نوتروفیل‌ها ترشح می‌شود، اتفاق می‌افتد [۹-۱۱]. این

مقدمه

هورمون کوریونیک گنادوتروپین انسانی یا hCG (Human chorionic gonadotropin)، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۶۷۰۰ دالتون بوده که ۳۰ درصد وزن مولکولی این هورمون را قندها تشکیل می‌دهند. هورمون hCG متعلق به خانواده هورمون‌های گلیکوپروتئینی FSH و LH می‌باشد، اما برخلاف این سه هورمون که توسط هیپوفیز ترشح می‌شوند hCG در طول دوران بارداری توسط سلول‌های سنتیتوتروفوبلاست جفت ترشح می‌شود. میزان این هورمون با تشکیل سلول‌های سنتیتوتروفوبلاست افزایش پیدا می‌کند؛ به طوری که در هفته دهم بارداری به حداقل میزان خود رسیده و بعد از آن میزان این هورمون کاهش می‌باید تا اینکه در هفته بیست و یکم به یک پانزدهم حداقل میزان خود می‌رسد و تا پایان دوران بارداری با نوسانات خیلی کم در همین سطح باقی می‌ماند [۱-۳].

^۱ استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
^۲ دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

*لشانی نویسنده مسئول؛

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی
تلفن: ۰۹۱۲۳۲۷۴۰۶۵ - ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۱۷ - دورنیش:

پست الکترونیک: Mirshahi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۸ تاریخ پذیرش (های): ۹۱/۹/۱۵

جلوگیری از رشد باکتری و یک میلی گرم بر لیتر سوی بین تریپسین به عنوان مهارکننده سرین پروتازها جمع آوری شد [۲۵].

تغليظ نمونه

برای تخلیط نمونه های ادرار جمع آوری شده، ابتدا مواد نامحلول نمونه به وسیله سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه حذف گردید. بعد از حذف املاح نامحلول، ۲۵ گرم نمک بنزووات سدیم به ازای هر لیتر به نمونه اضافه گردید. pH نمونه با اسید استیک به ۴ رسانده شد. رسوب شیری رنگ تشکیل شده با دور ۱۴۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه جمع آوری گردید. رسوب حاصل در ۵۰ میلی لیتر استون به ازای هر لیتر نمونه حل شده و سپس سانتریفیوژ گردید و پس از حذف محیط روثی، رسوب به دست آمده جهت انجام مراحل بعدی نگهداری شد. از آنجایی که هورمون hCG در آب به راحتی حل می شود، رسوبات به دست آمده در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر به ازای هر لیتر نمونه به مدت ۸ ساعت حل گردیدند. سپس با دور ۱۸۰۰۰ g hCG دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی که حاوی هورمون hCG است جمع آوری گردید. برای خلوص بیشتر می توان رسوب دهی را با استون یا اتانول ادامه داد. در این تحقیق از استون استفاده شد؛ بدین صورت که به میزان دو برابر حجم نمونه، به نمونه استون اضافه گردید رسوب سفید رنگ تشکیل شده با سانتریفیوژ با دور ۱۸۰۰۰ g، به مدت ۳۰ دقیقه جدا گردید، سپس در داخل آب مقطر حل گردید (کلیه مراحل فوق در ۴ درجه سانتی گراد انجام شد) [۲۶].

تخلیص هورمون hCG

تخلیص هورمون hCG با عبور نمونه تغليظ شده به روش رسوب دهی از ستون کروماتوگرافی کانکاناوالین A (Con-A) با اندازه ۱×۵cm انجام گردید. ستون Con-A با ۲۰ میلی مولار، حجم از بافر تعادل حاوی تریس کلرید هیدروژن ۲۵ میلی مولار، کلرید منزیم ۱۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۱۰ میلی مولار و کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار با pH ۷/۴ به تعادل رسید. نمونه تغليظ شده به روش رسوب دهی عليه بافر تعادل به مدت یک شباهه روز در دمای ۴°C دیالیز گردید و با سرعت ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. سپس ستون به ترتیب با قندهای گالاكتوز، فروکتوز و دی گلوکز نیم مولار و محلول جداسازی دی مانوز نیم مولار با سرعت ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه جداسازی شد. نمونه ها در هر مرحله به حجم یک میلی لیتر جمع آوری شده و جذب آنها

شکستگی باعث ناپایداری مولکول hCG و در نتیجه تجزیه سریع-تر آن می شود. در اثر این شکستگی زیر واحد بتای آزاد شکسته و زیر واحد آلفای آزاد به دست می آید. زیر واحد بتای آزاد شکسته در β -Core (fragment) تبدیل می شود که در ادرار به مقدار زیادی یافت می شود [۱۳، ۱۲]. اندازه گیری هورمون hCG و قطعات آن امروزه در امر تایید بارداری [۱۴]، تشخیص اختلالات بارداری از قبیل سندروم داون [۱۵]، سقط خود به خودی و بارداری های خارج رحمی [۱] و تشخیص سرطان های تروفوبلاستیک (سرطان کوریون، و مول مهاجم) و غیر تروفوبلاستیک (سرطان ریه، مثانه، پانکراس، سینه) استفاده می شود [۱۷، ۱۶، ۲]. هم چنین، از کاربردهای دیگر این هورمون می توان در درمان افرادی که مشکل تخمک گذاری دارند، ساخت واکسن های ضد بارداری برای کنترل جمعیت [۱۸-۲۲] و درمان کاپوسی سارکوما (ks) را نام برد [۲۴، ۲۳]. با توجه به کاربرد فراوان هورمون hCG در امراض تشخیص و درمان، تخلیص این هورمون و قطعات آن با روش های کم هزینه و با بازدهی بالا، ضروری به نظر می رسد. تا به امروز تکنیک های مختلفی برای جداسازی هورمون hCG، زیر واحدها و قطعات آن صورت گرفته است، اما در تمام این تحقیقات بالاترین خلوص به دست آمده در حد استاندارد ارگانون است و از روش های طولانی و زمان بر استفاده شده است [۲۵-۲۸]. در این تحقیق سعی شده است تا با افزایش درجه خلوص و کوتاه کردن مسیر در رفع این مهم، قدیمی برداشته شود.

مواد و روش ها

مواد و دستگاه های مورد استفاده در این مطالعه از منابع زیر می باشند: استاندارد hCG (Organon, Netherland)، آنتی بادی ثانویه ضد موشی نشاندار شده با (HRP)، (Immunotech, Frances)، بازدارنده سوی بین تریپسین، دی گلوکز، دی مانوز، DAB و O-Phenylenediamine OPD، Sigma، (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride Merck, Germany)، سانتریفیوژ Watson (Beckman J2-MI, USA)، پمپ پریستاتیک (Anthos 2020)، الایزا ریدر (marlow 505S, Germany)، (Germany).

جمع آوری نمونه

نمونه های ادرار صبح پنج فرد باردار دو تا سه ماهه حاملگی در داخل ظروف حاوی ۰/۰۵ درصد سدیم آزید جهت

تائید نمونه‌های hCG، زیر واحد آلفا و بتا از طریق الایزا و وسترن بلات الایزا: در این روش، از هر یک از نمونه‌های خالص شده hCG، زیر واحد آلفا و بتا در بافر PBS با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک‌های پلاک الایزا اضافه شد. به یکی از چاهک‌ها بعنوان کنترل منفی نمونه آلومنین اضافه گردید، بقیه مراحل طبق پروتکل انجام شد [۳۶-۳۴]. آنتی‌بادی‌های اولیه علیه زیر واحد آلفا (Anti α -hCG) و علیه زیر واحد بتا (Anti β -hCG) با غلظت‌های ۱،۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ نانوگرم در میلی لیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شدند. جهت خواندن از سوبستراتی OPD و طول موج ۴۹۲ نانومتر استفاده شد و نمودارهای مربوطه رسم گردید [۳۶] (تمام مراحل فوق در دمای اتاق، ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید). در روش وسترن زیر واحد آلفا، بتا و نمونه hCG به طور همزمان تحت شرایط SDS-PAGE، ژل ۱۲/۵ درصد، ولتاژ ۱۲۰، به مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز شدند. بقیه مراحل طبق پروتکل انجام شد [۳۶-۳۴]. بعد از انتقال باند، غشای نیتروسولولز به صورت نوارهایی بریده و هر نوار به طور جداگانه در داخل لوله‌های درب‌دار قرار گرفت. هر لوله به طور جداگانه با هر یک از آنتی‌بادی‌های اولیه آلفا، بتا و مخلوطی از هر دو آنتی‌بادی به میزان سه میلی لیتر با غلظت دو میکروگرم در میلی لیتر مجاور شد. بعد از یک ساعت مجاورت با آنتی‌بادی‌های اولیه، نوارهای بلات شده با محلول شستشو، سه مرتبه شستشو شده و سپس آنتی‌بادی ثانویه به میزان سه میلی لیتر با رقت ۱/۲۰۰۰ به هر لوله اضافه گردید. رنگ-آمیزی با استفاده از محلول دی‌آمینوبنزیدین (DAB) انجام شد [۳۶].

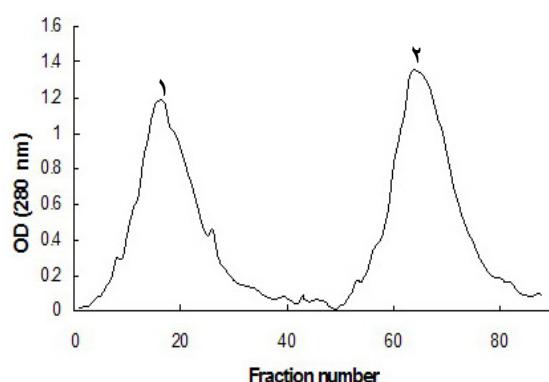
نتایج تخلیص هورمون hCG

با عبور نمونه تغليظ شده ادرار از ستون Con-A در نمودار شماره ۱، هورمون hCG و سایر گلیکوپروتئین‌های موجود در نمونه به ستون متصل شده، در حالی که پروتئین‌های غیر گلیکوزیله همراه با عبور نمونه و بافر تعادل بعنوان flow through از ستون خارج شدند؛ پیک ۱ در ادامه با شستشوی ستون با محلول قند دی‌گلوکز؛ پیک ۲ و با قند دی‌مانوز؛ پیک ۳ جدا گردید. رسم جذب نمونه‌های به دست آمده علیه تعداد نمونه‌ها نشان داده شده است. نمونه‌های به دست آمده از ستون Con-A همراه با استاندارد hCG تحت شرایط ژل ۱۲/۵، SDS-PAGE درصد و غیراچیایی به مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز گردیدند و سپس ژل مربوطه به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (شکل ۱). شماره ۱.

در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و منحنی جذب علیه تعداد نمونه‌ها رسم گردید [۲۶-۲۹].

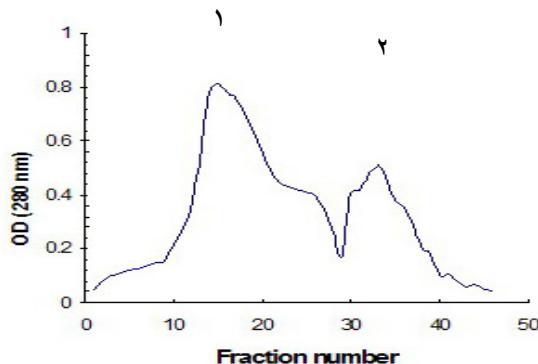
جداسازی زیر واحد آلفا و بتای هورمون hCG جهت جداسازی زیر واحد آلفا و بتا، نمونه‌ای DEAE-Sepharose خالص شده از ستون Con-A از ستون ۴B با اندازه 1×5 cm عبور داده شد. ستون مورد نظر با ۲۰ حجم از بافر تعادل حاوی گلایسین ۴/۰ مولار و اوره ۸ مولار با pH ۷/۵ به تعادل رسید. پس از به تعادل رسانیدن نمونه با بافر فوق، pH نمونه با اسید کلریدریک ۲ نرمال به ۴/۵ رسانده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای جدابی کامل زیر واحدهای آلفا و بتا انکویه گردید. سپس pH نمونه با سود ۰/۵ نرمال به ۷/۵ pH اصلاح گردید و با سرعت ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه ۰/۵ میلی لیتر از ستون عبور داده شد و ستون با بافر تعادل تا رسیدن جذب به صفر شستشو گردید. جداسازی با استفاده از محلول گلایسین ۰/۲ مولار، اوره ۸ مولار و کلرید سدیم ۰/۵ مولار با pH ۷/۵ و سرعت ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه انجام شد [۳۰-۳۲]. نمونه‌ها با حجم یک میلی لیتر جمع‌آوری گردید و جذب نمونه‌ها در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و نمودار مربوطه (جذب علیه تعداد نمونه‌ها) رسم گردید.

جداسازی و تخلیص باند حد واسط زیر واحد آلفا و بتا نمونه hCG به دست آمده از ستون Con-A علاوه بر باندهای زیر واحد آلفا و بتا دارای یک باند اضافی گلیکوپروتئینی در ناحیه حد واسط بین زیر واحدهای آلفا و بتا است که در SDS-PAGE به طور واضح دیده می‌شود (شکل شماره ۲) [۳۳]. جهت جداسازی این باند به روش زیر اقدام شد: برای جداسازی از ستون ۴B DEAE-Sepharose با اندازه 1×5 cm استفاده گردید. نمونه مورد نظر برای عبور از ستون علیه بافر تعادل (۰.۰۵ M Tris/HCl، pH ۸.۴) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ یک شبانه روز دیالیز گردید. پس از به تعادل رسیدن ستون با ۰/۵ میلی لیتر از ستون با سرعت ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه عبور داده شد. جدا سازی باند حد واسط با اعمال گردادیان نمکی بین صفر تا یک مولار NaCl با سرعت ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه انجام گردید. نمونه‌ها با حجم یک میلی لیتر جمع‌آوری شده و جذب آنها در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و نمودار مربوطه رسم گردید.



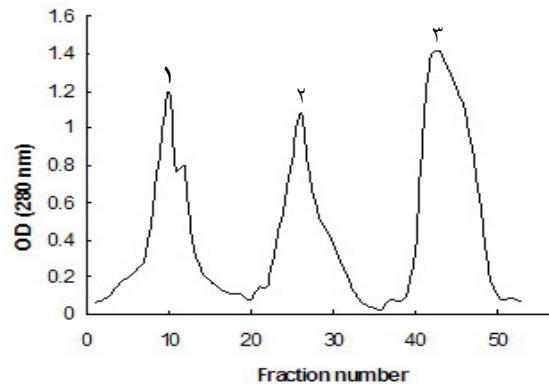
نمودار شماره ۲- جداسازی زیر واحد آلفا (پیک ۱) و زیر واحد بتا (پیک ۲) با استفاده از ستون DEAE-Sephadex تحت شرایط گرادیان نمکی از صفر تا یک مولار.

جداسازی باند حد واسط زیر واحد آلفا و بتای هورمون hCG از آنجایی که ماهیت این باند برای ما مشخص نبود، از ستون DEAE-Sephadex 4B و گرادیان نمکی برای جداسازی آن استفاده گردید. نمودار بدست آمده از این ستون به صورت دو پیک مشاهده شد (نمودار شماره ۳): پیک ۱ که با غلظت نمکی ۰/۳ مولار شروع به جدا شدن کرد که حاوی نمونه های گلیکوپروتئینی به غیر از باند حد واسط بود، در حالی که پیک دوم با غلظت نمکی ۰/۶ مولار شروع به جدا شدن کرد که حاوی نمونه باند حد واسط بود.

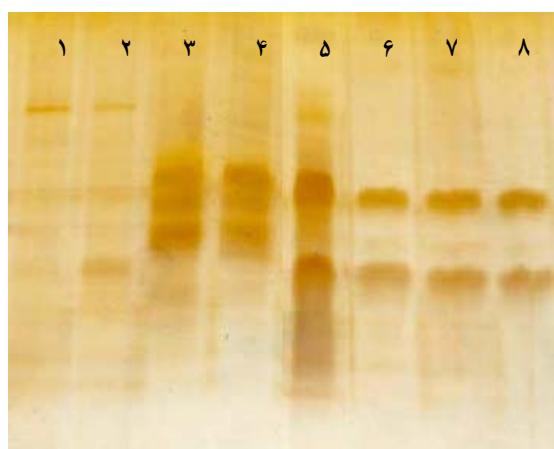


نمودار شماره ۳- جداسازی باند حد واسط زیر واحد آلفا و بتا با استفاده از ستون DEAE-Sephadex با اعمال شرایط گرادیان نمکی از صفر تا یک مولار.

تایید خلوص نمونه های hCG، زیر واحد آلفا و بتا و باند حد واسط به وسیله الکتروفورز زیر واحد آلفا و بتای خالص شده از ستون DEAE-hCG Sephadex hCG همراه با استاندارد hCG خالص شده از



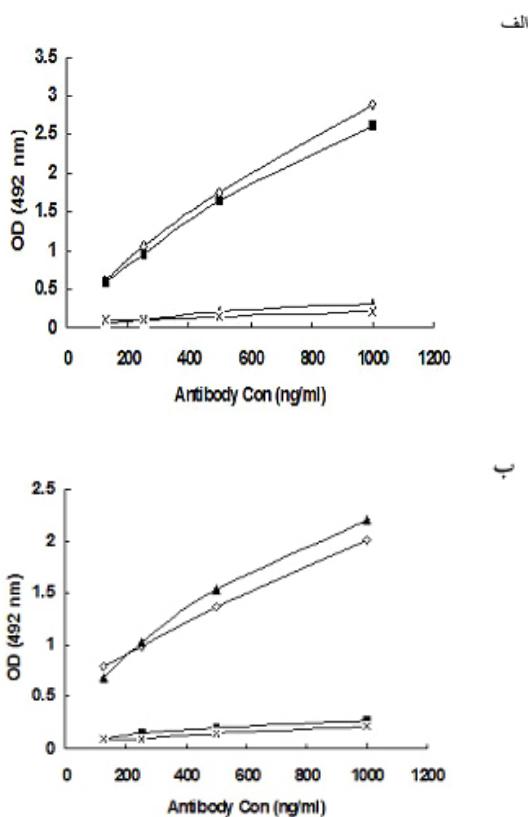
نمودار شماره ۱- خالص سازی هورمون hCG با استفاده از ستون Con-A. پیک ۱: Flow through (بروتئین هایی که با عبور نمونه به ستون متصل نشده اند)، پیک ۲: جداسازی با دی گلوکز یک مولار، پیک ۳: جداسازی با دی مانوز یک مولار



شکل شماره ۱- ژل SDS-PAGE (۱۲ درصد، غیر احیایی با رنگ آمیزی نیترات نقره) مربوط به خالص سازی هورمون hCG با استفاده از ستون های ۱ و ۲ در ژل مربوط به پیک ۱ از نمودار ۱ می باشد (بروتئین های غیر گلیکوزیله)، ستون های ۳ و ۴ در ژل مربوط به پیک ۲ از نمودار ۱ می باشد که توسط قند دی گلوکز جدا گردید، ستون ۵ مربوط به استاندارد (Organon) hCG است، ستون های ۶، ۷ و ۸ در ژل مربوط به پیک ۳ از نمودار ۱ می باشد که توسط قند دی گلیکوز جدا گردید (مربوط به hCG).

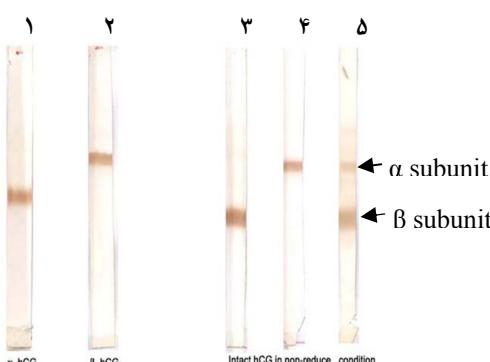
جداسازی زیر واحد آلفا و بتای هورمون hCG

جهت جداسازی و تخلیص زیر واحد آلفا و بتای هورمون hCG از شرایط اوره، حرارت و pH ۷/۵ استفاده گردید. با توجه به pH ایزو الکتریک زیر واحد آلفا، این زیر واحد تحت این شرایط دارای بار خشی بوده، به طوری که همراه با عبور نمونه از ستون خارج می شود؛ در حالی که زیر واحد بتا به علت بار مثبت به ستون محکم متصل شده و تحت شرایط نیم مولار نمکی جدا گردید (نمودار شماره ۲).



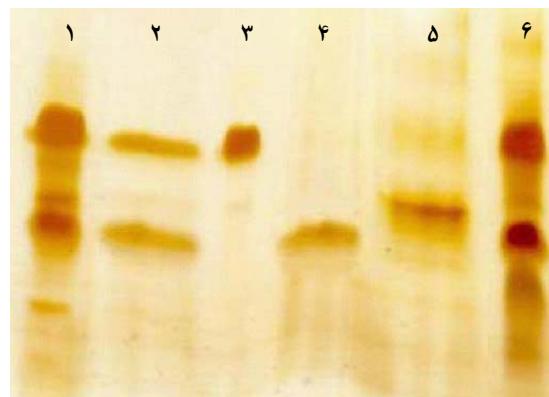
نمودار شماره ۴- مطالعه شناسایی زیر واحدهای آلفا، ■؛ بتا، ▲؛ و β ، در مقایسه با کنترل منفی: BSA، \times توسط آنتی کورهای مونوکلونال آلفا (ضد آلفا و بتا) ضد بتا با روش الایزا استاندارد

تایید صحت نمونه های hCG، زیر واحد آلفا و بتا توسط ایمونوبلات بعد از ایمونوبلات همزمان نمونه های hCG، زیر واحد آلفا و بتا، کاغذ نیترولوژی مربوط به هر کدام به صورت نوارهایی بریده شده و هر نوار علیه یکی از آنتی بادی های مونوکلونال ضد آلفا، بتا و مخلوطی از هر دو مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۳). نتایج در مورد باند حد واسط نشان داده نشده است.



شکل شماره ۳- ایمونوبلات hCG و زیر واحدهای آن. نوار ۱ ایمونوبلات زیر واحد آلفای خالص شده علیه مخلوطی از آنتی کور ضد آلفا و آنتی کور ضد بتا، نوار ۲ ایمونوبلات زیر واحد بتای خالص

ستون Con-A و hCG ای تغلیظ شده به روش رسوب دهی تحت شرایط ژل ۱۲/۵ درصد و غیر احیایی به مدت یک ساعت و نیم الکتروفورز گردیدند و بهروشن نیترات نقره رنگ- آمیزی شدند (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- ژل ۱۲ درصد، غیر احیایی با رنگ آمیزی نیترات نقره (جهت مقایسه نمونه های به دست آمده به روش تغلیظ سازی و کروماتوگرافی. ستون ۱ نمونه تغلیظ شده از ادرار، ستون ۲ هورمون hCG به دست آمده از ستون ۳ زیر واحد بتا از ستون آلفا؛ ستون ۴ زیر واحد DEAE-Sephadex 4B، ستون ۵ باند حد واسط آلفا از ستون DEAE-Sephadex 4B، ستون ۶ زیر واحد آلفا و بتا از ستون DEAE-Sephadex 4B استاندارد hCG

تایید صحت نمونه های hCG، زیر واحد آلفا و بتا توسط الایزا در این آزمایش برای بررسی نمونه های به دست آمده به رده های اول و دوم پلاک الایزا زیر واحد آلفا، به ردیف سوم و چهارم زیر واحد بتا و به ردیف پنجم و ششم هورمون hCG اضافه گردید. به ردیف هفتم به عنوان کنترل منفی نمونه آلبومین اضافه گردید. در مرحله بعد به ردیف های اول، سوم و پنجم آنتی بادی اولیه مونوکلونال ضد آلفا و به ردیف های دوم، چهارم و ششم آنتی بادی مونوکلونال ضد بتا اضافه گردید. به ردیف هفتم به عنوان شاهد، به سه خانه اول آنتی بادی مونوکلونال ضد آلفا و به سه خانه بعدی آنتی بادی مونوکلونال ضد بتا اضافه گردید. در پایان با اضافه کردن آنتی بادی ثانویه و سوبسٹرای مربوطه به تمام ردیف ها، جذب های بدست آمده توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شده و نتیجه مورد باند حد واسط نشان داده نشده است.

C8 و سفادکس G100 زیرواحدهای هورمون hCG جدا گردید. در این تحقیق از رزین‌های C4 و C18 نیز برای جداساز استفاده گردید که دیده شد کارآیی بالایی ندارند. نمونه‌های به دست آمده از رزین C8 و سفادکس G100 در مقایسه با نمونه استاندارد و نمونه ادرار SDS-PAGE شدند که در صد خلوص نسبتاً خوبی را نشان می‌دهند [۲۵]. در مورد کارهای انجام شده با ستون‌های تبادل یونی و تمایلی جواب‌های بدست آمده در حد استاندارد hCG از شرکت ارگانون است؛ به طوری که بر روی ژل علاوه بر زیرواحد آلفا و بتا، باند حد واسطه بین دو زیر واحد و تعدادی باند اضافی در پائین زیرواحد آلفا دیده می‌شود (شکل شماره ۲) [۳۱، ۲۵، ۳۰]. این باندهای اضافی می‌توانند باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی در بدن شوند؛ بنابراین حذف این باندهای اضافی می‌تواند در بهبود استفاده از این هورمون در امر درمان مهم باشد [۲۵]. در کارهای انجام شده با استفاده از ستون میل ترکیبی Con-A فقط از ترکیب قندی دی‌مانوز استفاده شده است، در حالی که ما در انجام این تحقیق از سایر قندها مانند گالاكتوز، فروکتوز و گلوکز قبل از استفاده از دی‌مانوز استفاده کردیم که دلیل آن نیز به علت وجود متفاوت بودن ترکیب قندی در گلیکوپروتئین‌ها و قطعات مختلف hCG مانند زیرواحد بتا و هسته بتا است [۴۳، ۲۶، ۱۷، ۶]. در این تحقیق انتظار می‌رفت که استفاده از این قندها باعث حذف باندهای اضافی شود. مشاهده شد که در بین این قندها تنها قند دی-گلوکز قادر به جداسازی باندهای اضافی مانند باند حد وسط و سایر گلیکوپروتئین‌ها است. لازم به ذکر است از آنجایی که امکانات لازم جهت اندازه‌گیری فعالیت بیولوژیک این هورمون موجود نبود، بنابراین امکان اندازه‌گیری فعالیت مخصوص در حین کار وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

استفاده از ستون Con-A و جداکننده دی‌گلوکز قبل از دی‌مانوز توانست به افزایش خلوص و کوتاه شدن مسیر خالص-سازی هورمون hCG کمک کند. باند حد واسطه بین زیرواحدهای آلفا و بتا نیز طی یک مرحله توسط ستون DEAE-Sepharose و گرادیان نمکی حذف شد و بنابراین باعث خلوص تقریباً صد درصدی هورمون hCG گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه اجراشده در دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. از سرکار خانم زرندی کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی که در تهیه مواد و امکانات آزمایشگاهی همکاری کردن، قدردانی می‌شود.

شده علیه مخلوطی از آنتی کور ضد آلفا و آنتی کور ضد بتا، نوار ۳ ایمونوبلات hCG کاملاً علیه آنتی کور ضد آلفا، نوار ۴ ایمونوبلات hCG کاملاً علیه آنتی کور ضد بتا، نوار ۵ ایمونوبلات hCG کاملاً علیه مخلوطی از آنتی کور ضد آلفا و آنتی کور ضد بتا

بحث

امروزه از اندازه‌گیری hCG و اشکال آن در تست بارداری، تشخیص اختلالات بارداری و سرطان‌های تروفیوبلاستیک و غیر تروفیوبلاستیک استفاده می‌شود. علی‌رغم استفاده از روش ایمونوآسی به طور وسیع در آزمایشگاه‌ها، کیفیت این سنجش دارای مشکل است که دلیل آن می‌تواند استفاده از کالیبراتورهای سنجش ناخالص باشد [۳۷-۳۹]. آنالیز تعدادی از فرآوردهای تجاری hCG نشان می‌دهد که اکثر آنها حاوی اشکال تجزیه شده، زیرواحدها و قطعات شکسته شده hCG هستند که استفاده از این نمونه‌های hCG باعث تولید آنتی‌بادی‌های ناخواسته شده، که بالطبع با پایین آمدن کیفیت سنجش همراه است [۳۹، ۳۸]. اولین مرحله در خالص‌سازی هورمون hCG از ادرار حذف لیپیدها، نمک‌ها و پیتیدهای کوچک است که در این تحقیق با استفاده از بنزووات‌سدیم، اسید استیک و استون انجام شد. تا این مرحله در hCG اکثر مقالات ذکر شده است [۴۰]. اما از آنجایی که هورمون hCG دارای درصد بالایی از قند است، حلالیت این هورمون در داخل آب بالاست که از این خاصیت استفاده شده و رسوب‌های بدست آمده در آب حل گردیدند. سپس، جهت حذف ترکیبات نامحلول سانتریفیوژ انجام شد. نمونه بدست آمده از این طریق دارای درصد بالایی از hCG بود که در شکل شماره ۱ این نمونه با نمونه شرکت ارگانون مطابقت می‌کند. جهت خالص‌سازی بیشتر از تکنیک کروماتوگرافی استفاده گردید. از سال ۱۹۶۲ تا به امروز کارهای زیادی با استفاده از تکنیک‌های متفاوت کروماتوگرافی در رابطه با تخلیص هورمون hCG، زیرواحدهای آن و قطعات شکسته شده آن (زنگیره بتای شکسته در ناحیه ۴۶-۴۷ و یا قطعه مرکزی بتا) صورت گرفته است [۴۱، ۳۳، ۳۱، ۳۰، ۲۶، ۲۵]. در مورد کارهای انجام شده، بیشتر از تکنیک‌های تغليظ سازی و کروماتوگرافی مانند HPLC (Reverse phase)، تبادل یونی (HPLC)، و ستون تمایلی نسبت به قندها استفاده شده است. کارهای انجام شده با HPLC بیشتر جنبه آنالیتیک و تشخیص کلینیکی داشته و کمتر در مقیاس‌های صنعتی مورد توجه بوده است. از تکنیک HPLC اکثرا برای جداسازی زیرواحد آلفا، بتا و قطعات شکسته شده آن با استفاده از خاصیت هیدروفیوپسیتی آنها استفاده گردیده است [۴۲]. در سال ۱۹۹۰ با استفاده از رزین

References:

- [1] Buster JE, Simon JA. Placental hormones, hormonal preparation for control of parturition, and hormonal diagnosis of pregnancy, In *Endocrinology*. 2th ed. Edited by Degroot LJ. WB Saunders Company, USA; 1989. p. 2043-73.
- [2] Strauss JF, Gafvels M, King BF. In *Endocrinology*. 3th ed. Degroot LJ. Published by: WB Saunders Company, USA; 1995. p. 2171-207.
- [3] Cole LA. Hyperglycosylated hCG. *Placenta* 2007; 28(10): 977-86.
- [4] Kobata A, Takeuchi M. Structure, pathology and function of the N-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophysica Acta* 1990; 1455 (2-3): 315-21.
- [5] Korhonen J, Alftan H, Ylöstalo P, Veldhuis J, Stenman UH. Disappearance of human chorionic gonadotropin and its α- and β-subunits after term pregnancy. *Clin Chem* 1997; 43(11): 2155-63.
- [6] Cole LA. Hyperglycosylated hCG. *Placenta* 2010; 31(8): 653-64.
- [7] Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369(6480): 455-61.
- [8] Manjunath P, Sairam MR. Enhanced thermal stability of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. *J Biol Chem* 1983; 258(6): 3554-8.
- [9] Kardana A, Cole LA. Human chorionic gonadotropin β-subunit nicking enzymes in pregnancy and cancer patient serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(3): 761-7.
- [10] Stenman UH, Tiiainen A, Alftan H, Valmu L. The classification, functions and clinical use of different isoforms of hCG. *Hum Reprod Update* 2006; 12(6): 769-84.
- [11] Birken S, Kovalevskaya G, O'Connor J. Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125(1-2): 121-31.
- [12] Okamoto T, Niu R, Matsuo K, Furuhashi M, Ohsawa M, Mizutani S, et al. Human chorionic gonadotropin β-core fragment is directly produced by cancer cells. *Life Sci* 2001; 68(8): 861-72.
- [13] Cole LA, Kardana A, Park SY, Braunstein GD. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Met* 1993; 76(3): 704-10.
- [14] O'Connor JF, Birken S, Lustbader JW, Krichevsky A, Chen Y, Canfield RE. Recent advances in the chemistry and Immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocr Rev* 1994; 15(5): 650-82.
- [15] Wenstrom KD, Owen J, Chu DC, Boots L. Free β- hCG subunit versus intact hCG in down syndrome screening. *Obstet Gynecol* 1995; 90(3): 370-4.
- [16] Michel RM, Aguilar JL, Arrieta O. Human chorionic gonadotropin as an angiogenic factor in breast cancer during pregnancy. *Med Hypotheses* 2007; 68(5): 1035-40.
- [17] Nishimura R, Koizumi T, Yokotani T, Taniguchi R, Morisue K, Yoshimura M, et al. Molecular heterogeneity of hCG β-related glycoproteins and the clinical relevance in trophoblastic and non-trophoblastic tumors. *Int J Gynecol Obstet* 1998; 60 Suppl 1: 529-32.
- [18] Gupta A, Pal R, Ahlawat S, Bhatia P, Singh O. Enhanced immunogenicity of a contraceptive vaccine using divers synthetic carriers with permissible adjuvant. *Vaccine* 2001; 19(25-26): 3384-9.
- [19] Delves PJ, Iles RK, Roitt IM, Lunda T. Designing a new generation of anti-hCG vaccines for cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 260-262: 276-81.
- [20] Griffin PD, Jones WR, Stevens VC. Anti-fertility vaccines: currentt status and implications for family planning programmes. *Reprod Health Matters* 1994; 3:75.
- [21] Naz RK, Gupta SK, Gupta JC, Vyas HK, Talwar AG. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Hum Reprod* 2005; 20(12): 3271-83.
- [22] Pal R, and Singh O. Absence of corpus luteum rescus by chorionic gonadotropin in women immunized with a contraceptive vaccine. *Fertil Steril* 2001; 76(2): 332-6.
- [23] Tavio M, Nasti G, Simonelli C, Vaccher E, Paoli PD, Giacco M, et al. Human chorionic gonadotropin in the treatment of HIV-related kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 1998; 34(10): 1634-7.
- [24] Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Huang PL, Kung HF, Blithe DL, et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV component in β-core preparation of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6): 2678-81.
- [25] Sakakibara R, Miyazaki S, Shigemura T, Tominaga N, Sakai A, Ishiguro M. Effective purification of human chorionic conadotropin and its subunits from pregnant women's urinary peptides adsorbed on Reverse-phase resin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1990; 38(5): 1414-6.
- [26] Xu B, Zhu Z, Tang Y, Huang O, Wang X. Purification of human chorionic gonadotropin from urine by membrane filtration affinity chromatography with a positively charged membrane. *Protein Expr Purif* 1999; 16(2): 221-3.
- [27] Birken S, Maydelman Y, Aawinowicz MA. Preparation and analysis of the common urinary from of human's chorionic gonadotropin. *Methods* 2000; 21(1): 3-14.
- [28] Manjunath P, Sairam MR. Biochemical, biological, and immunological properties of

- chemically deglycosylated human choriogonadotropin. *J Biol Chem* 1982; 257(12): 7109-15.
- [29] Dufau ML, Tsuruhara T, Catt KJ. Interaction of glycoprotein hormones with agarose concavalin A. *Biochem Biophys Acta* 1972; 278(2): 281-92.
- [30] Birken S, Chen Y, Gawinowicz MA, Lustbader JW, Pollak S, Agosto G, et al. Separation of nicked human chorionic gonadotropin, intact hCG, and β hCG fragment from standard reference preparations and raw urine samples. *Endocrinology* 1993; 133(3):1390-7.
- [31] Khademi F, Hamzehee K, Mostafaie A, Hajihossaini R. Purification of three major forms of β -hCG from urine and production of polyclonal antibodies against them. *Clin Biochem* 2009; 42 (13-14): 1476-82.
- [32] Morgan FJ, Canfield RE, Vitocaitis JL, Ross GT. Properties of the subunit of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1974; 94(6): 1601-4.
- [33] Gam LH, Latiff A. SDS-PAGE Electrophoretic Property of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and its β -subunit. *Int J Biol Sci* 2005; 1(3): 103-9.
- [34] Mostafaei A. Protein gel electrophoresis a guide to theory and practice. Kermanshah: Yadavar; 2005. p. 1- 127. [in Persian]
- [35] Laemmili UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
- [36] Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9): 4350-4.
- [37] Bock JL. HCG assays. A plea for uniformity. *Am J Clin Pathol* 1990; 93(3): 432-3.
- [38] Cole LA, Kardana A. Discordant results in human chorionic gonadotropin assays. *Clin Chem* 1992; 38(2): 263-70.
- [39] Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between method variation in human chorionic gonadotropin test results. *Clin Chem* 2004; 50(5): 874-82.
- [40] Bambra CS. Purification and properties of baboon chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fertil* 1987; 79(2): 421-30.
- [41] Blith DL, Akar AH, Wehmann RE, Nisula BC. Purification of β -core fragment from pregnancy urine and demonstration that it's carbohydrate moieties differ from those of native human chorionic gonadotropin- β . *Endocrinology* 1988; 122(1): 173-80.
- [42] Susan P, Susana H, Brian BT, Steven B. High Resolution High Performance Liquid Chromatography Fingerprinting of Purified Human Chorionic Gonadotropin Demonstrates that Oxidation Is a Cause of Hormone Heterogeneity. *Endocrinology* 1990; 126(1): 199-208.
- [43] Shimojo M, Sakakibara R, Ishiguro M. Purification and characterization of high molecular weight hCG from human first trimester placenta. *Biol Pharm Bull* 1995; 18(12): 1637-42.