الکتروفورز

مولکولی که دارای بار خالص است، در میدان الکتریکی تحرک خواهد داشت. این پدیده که **الکتروفورز** نامیده می شود، روشی قدرتمند برای جداسازی پروتئین ها و سایر ماکرومولکول ها نظیر *DNA* و *RNA* می باشد. سرعت حرکت (V) یک پروتئین یا هر ماکرومولکول دیگر در یک میدان الکتریکی، به قدرت میدان *(E)*، بار خالص ماکرومولکول *(z)* و ضریب اصطکاک *(f)* وابسته است. ضریب اصطکاک به جرم، شکل مولکول و ویسکوزیته محیط وابسته است.

$$v = Ez/f$$

در این تکنیک ماکرومولکول ها بر اساس **نسبت بار به جرم** از یکدیگر تفکیک می شوند. بعنوان مثال، اگر دو پروتئین دارای وزن و شکل یکسانی باشند، پروتئینی که بار خالص بیشتری دارد حرکت سریع تری خواهد داشت. شکل پروتئین (کانفورماسیون) در جداسازی آن موثر است. پروتئین هایی رشته ای نسبت به پروتئین های کروی با وزن برابر آهسته تر حرکت می کنند.

مولفه های الکتریکی الکتروفورز

در الکتروفورز اختالف پتانسیل یا ولتاژ *(V)* نیروی اصلی حرکت دهنده مولکول های باردار است. رابطه ولتاژ و شدت جریان *(I)* و مقاومت الکتریکی *(R)* در قانون اهم آمده است:

$V=I.R$

مقاومت الکتریکی شامل مقاومت سیم ها، الکترودها، ژل و بافر است. به دلیل تغییر مقاومت الکتریکی (مولفه ولتاژ یا شدت جریان دچار تغییر می گردد، گرمایی که در اثر مقاومت الکتریکی در الکتروفورز تولید می شود، به گرمای ژول معروف است. این گرما با معادله توان قابل محاسبه است:

$P=V.I=I^2.R=V^2/R$

در الکتروفورز بهتر است جریان ثابت باشد یا ولتاژ؟

اگر جریان ثابت باشد، نمونه ها در یک میدان الکتریکی ثابت قرار می گیرند. بعبارتی در طول الکتروفورز سرعت ثابت خواهد بود. با ثابت نگه داشتن جریان، ولتاژ افزایش می یابد که با افزایش تولید گرما در انتهای الکتروفورز همراه می گردد. اختلاف دما بین کناره ها و مرکز ژل موجب حرکت غیر یکنواخت نمونه ها در ژل می شود *(smiling)*. برای حل این مساله می توان از سیستم بافری خنک استفاده کرد.

@drjafarnezhad

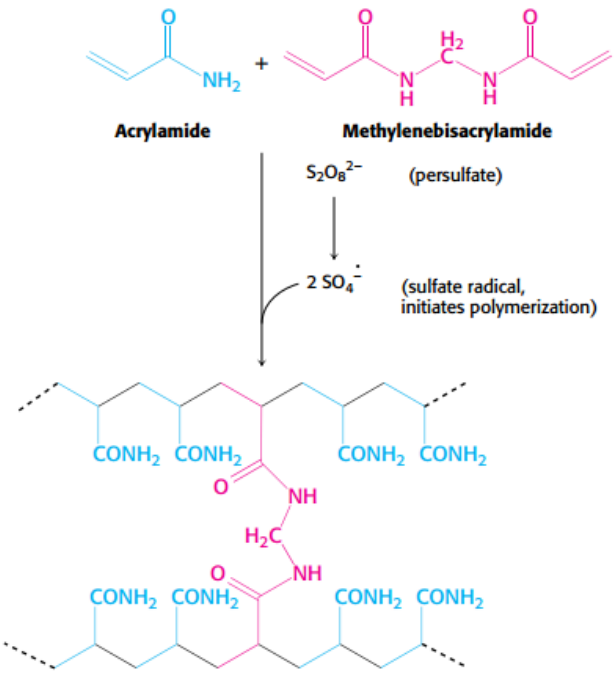
اگر ولتاژ ثابت باشد، میدان الکتریکی در طول الکتروفورز ثابت نخواهد بود. بعبارتی با گذشت زمان ضعیف تر می شود، در انتها سرعت جداسازی کاهش می یابد ولی گرما تولید نمی شود. کاهش سرعت، جداسازی پروتئین های بزرگ را در انتها مشکل می سازد.

محیط های نگه دارنده

الکتروفورز با استفاده از محیط های نگه دارنده را ***zone electrophoresis*** می نامند. این محیط ها زمینه ای برای جداسازی مولکول ها فراهم می کنند. انواع مختلف این محیط ها شامل محلول های بافری در الکتروفورز موئینه تا ژل های نامحلول نظیر نشاسته، آگاروز و پلی آکریل آمید یا صفحات استات سلولز مورد استفاده قرار می گیرد. به دلیل اندازه بزرگ منافذ ژل آگاروز، از آگاروز برای جداسازی ماکرومولکول ها نظیر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین های بزرگ و کمپلکس های پروتئینی استفاده می شود. در حالیکه اندازه منافذ ژل پلی آکریل آمید کوچک بوده از آن برای جداسازی اکثر پروتئین ها و الیگونوکلئوتیدهای کوچک استفاده می شود.

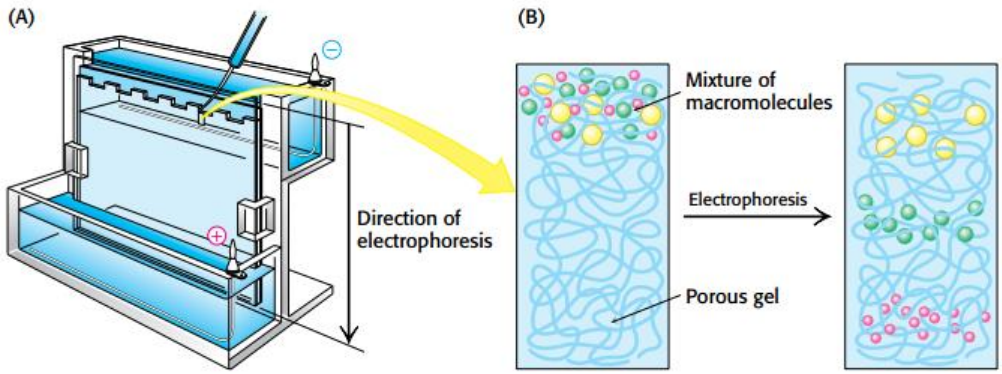
استفاده از ژل پلی آکریل آمید بعنوان محیط نگه دارنده در الکتروفورز

آکریل آمید (منومر) توسط بیس آکریل آمید (*cross-linker*) پلی مریزه شده و تشکیل یک شبکه سه بعدی را می دهند. پرسولفات آمونیوم تولید کننده رادیکال آزاد است که برای شروع پلی مریزاسیون لازم می باشد. از تترا متیل متیلن دی آمین *(TEMED)* بعنوان پایدار کننده رادیکال آزاد استفاده می شود.



farnezhad

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید *(PAGE)*



دو پارامتر T % (غلظت توتال آکریل آمید و بیس آکریل آمید g/100ml) و C % (درصد وزنی بیس آکریل آمید) در تنظیم اندازه منافذ ژل پلی آکریل آمید کاربرد دارند. هر چه درصد T بیشتر شود، اندازه منافذ هم کوچکتر خواهد شد و بلعکس. در غلظت 5 درصد C ژل اشباع می شود و کوچک ترین منافذ حاصل می شود.

$$\%T = \frac{\text{g acrylamide} + \text{g cross-linker}}{\text{Total volume, ml}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{g cross-linker}}{\text{g acrylamide} + \text{g cross-linker}} \times 100$$

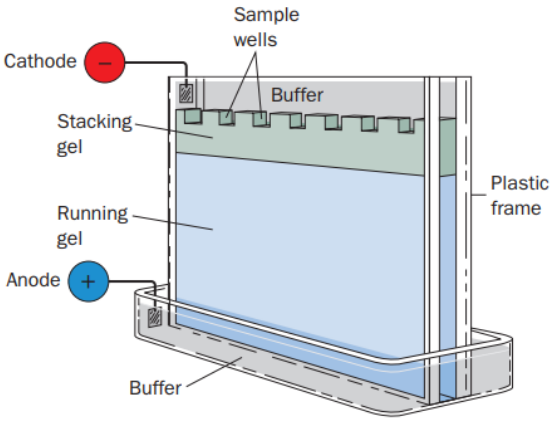
بافر (قدرت یونی و *pH*)

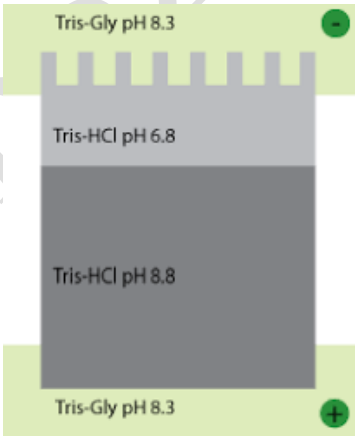
pH بافر تعیین کننده میزان یونیزاسیون ماکرومولکول و بار خالص آن است. بنابراین جهت حرکت مولکول را در میدان الکتریکی تعیین می کند. قدرت یونی بافر، ضخامت ابر یونی اطراف مولکول باردار، سرعت حرکت مولکول و جداسازی بهتر باندها *(sharpness)* را تعیین می کند. با افزایش غلظت یونی بافر، سهم جریان حمل شده توسط نمونه و سرعت حرکت آن کاهش می یابد. با افزایش قدرت یونی بافر، مقاومت کاهش می یابد که با افزایش جریان و تولید گرما همراه می شود. این بافرها باعث جداسازی بهتر باندهای پروتئینی می شوند ولی گرمای تولید شده موجب دناتوراسیون پروتئین ها خواهد شد. در الکتروفورز استفاده از بافر خنک ترجیح داده می شود زیرا باعث تفکیک بهتر شده و تبخیر از محیط الکتروفورزی را کاهش می دهد.

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

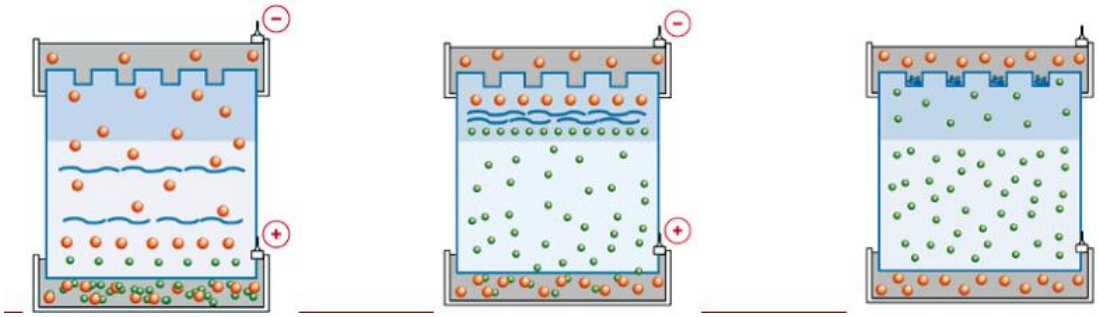
سیستم بافری پیوسته و ناپیوسته

در سیستم بافری پیوسته ترکیب یونی و *pH* بافر در سراسر مسیر الکتروفورز (نمونه، ژل و مخازن بافری) مشابه است. در حالیکه در سیستم بافری ناپیوسته ترکیب یونی و *pH* بافر در نمونه، ژل و مخازن بافری با یکدیگر تفاوت دارد. در سیستم ناپیوسته حتی ژل نیز غالبا شامل دو قسمت (ژل بالا و پایین) است. این دو ژل از نظر اندازه منافذ با یکدیگر متفاوت هستند. مزیت سیستم بافری ناپیوسته در این است که می توان حجم های بالایی از نمونه های رقیق پروتئین را بطور مطلوب تفکیک کرد. زیرا پروتئین ها طی حرکت در ژل بالا *(gel Stacking)* به صورت لایه های بسیار نازکی در می آیند و سپس در ژل پایین *(gel Resolving)* تفکیک می شوند .سیستم ناپیوسته لاملی *(Laemmli)* متداول ترین سیستم ناپیوسته در الکتروفورز است. در این سیستم نمونه پروتئین و ژل بالا حاوی بافر تریس- هیدروکلراید با *pH* برابر 8/6، ژل پایین حاوی بافر تریس- هیدروکلراید با *pH* برابر 8/8 و بافر مخازن شامل تریس- گالیسین با *pH* برابر 8/3 می باشد.





در *pH* برابر 8/6 تعداد کمی از مولکول های گلیسین (با *pI* برابر 6) یونیزه و باردار می شوند. با برقرار شدن جریان، یون های کلر به دلیل تحرک الکتروفورزی بالا شروع به حرکت کرده از یون های گلیسین فاصله می گیرند. لذا یک منطقه با هدایت الکتریکی ضعیف تر (شیب ولتاژ بالا) بوجود می آید. سپس هر دو یون کلر (یون جلو دار) و گلیسین (یون تعقیب کننده) با شتاب یکسان و فاصله مشخص به حرکت خود ادامه می دهند. پروتئین ها در این *pH* در حد فاصل دو یون قرار می گیرند.



رنگ آمیزی

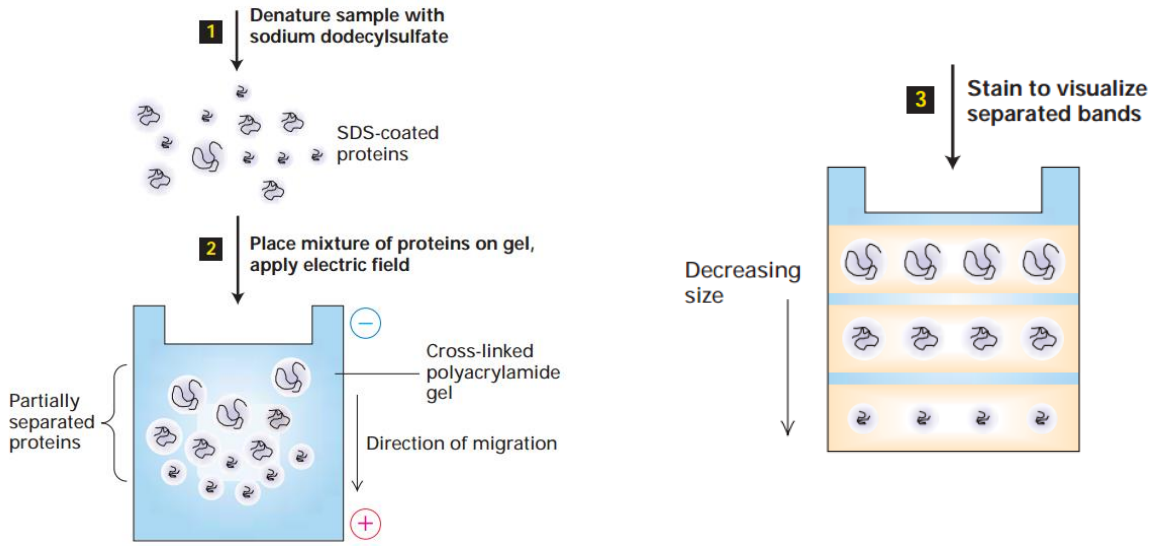
بعد از جداسازی، برای مشاهده ماکرومولکول ها در ژل باید رنگ آمیزی انجام گیرد. قبل از رنگ آمیزی، پروتئین های جدا شده توسط عوامل شیمیایی نظیر اسید استیک و متانول در ژل تثبیت می شوند. این عمل، از انتشار پروتئین ها به هنگام قرار گرفتن در محلول رنگ آمیزی جلوگیری می کند.

TABLE 5-1 Suggested Wavelengths for Quantitation of Protein Zones by Direct Densitometry

Separation Type	Stain	Nominal Wavelength (nm)
Serum proteins in general	Amido Black (Naphthol Blue Black)	640
	Coomassie BrilliantBlue G—250 (Brilliant Blue G)	595
	Coomassie BrilliantBlue R—250 (Brilliant Blue R)	560
	Ponceau S	520
Isoenzymes	Nitrotetrazolium Blue	570
Lipoprotein zones	Fat Red 7B (Sudan Red 7B)	540
	Oil Red O	520
	Sudan Black B	600
DNA fragments	Ethidium bromide (fluorescent)	254 (Ex) 590 (Em)
CSF proteins	Silver nitrate	—

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات *(SDS-PAGE)*

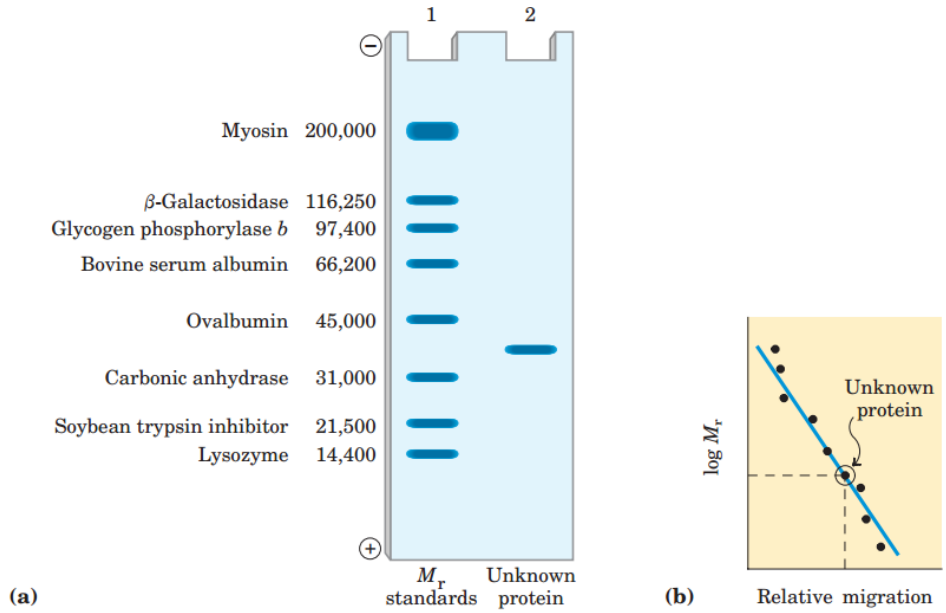
از این نوع الکتروفورز برای تعیین وزن مولکولی پروتئین ها و درجه خالص بودن نمونه پروتئینی استفاده می شود. در این روش پروتئین ها توسط دترجنت *SDS* و حرارت بالا دناتوره می شوند و پروتئین های چند زیرواحدی با شکستن اتصالات دی سولفیدی توسط **بتا مرکاپتو اتانول آمین** یا **دی تیو تریتول** به زیرواحدهای سازنده تفکیک می شوند. بواسطه پوشانده شدن پروتئین ها توسط *SDS*، بار پروتئین سهم ناچیزی در جداسازی پروتئین در میدان الکتریکی پیدا می کند و جداسازی بر اساس جرم پروتئین صورت می گیرد. در پایان، برای مشاهده پروتئین ها در ژل از رنگ های کوماسی بلو یا نیترات نقره استفاده می شود.



آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

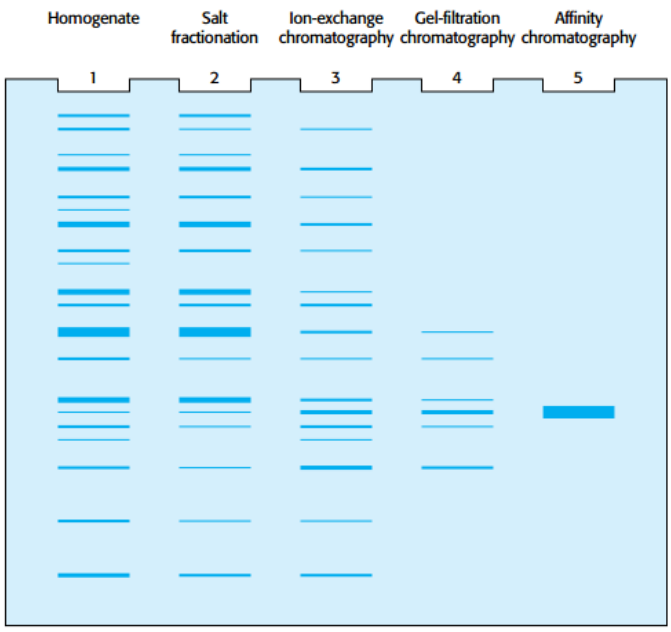
تعیین وزن مولکولی پروتئین توسط *SDS-PAGE*

حرکت الکتروفورزی یک پروتئین در ***SDS-PAGE*** به وزن مولکولی ***(Mr)*** وابسته است. وزن مولکولی پروتئین مجهول ***(unknown)*** توسط نمودار لگاریتم وزن مولکولی پروتئین های استاندارد در برابر حرکت نسبی بدست می آید.



استفاده از *SDS-PAGE* برای آنالیز تخلیص پروتئین

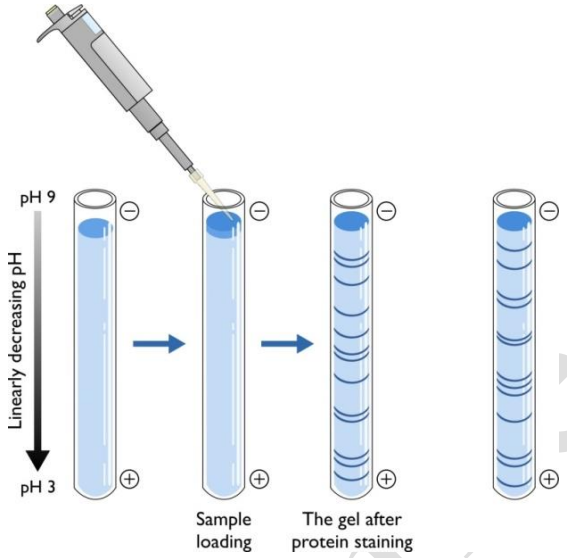
تصویر پایین مربوط به تخلیص یک آنزیم طی 5 مرحله است. در هر مرحله به کمک ***SDS-PAGE*** می توان درجه خالص بودن پروتئین را بررسی نمود.



آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

تمرکز ایزوالکتریک *(Isoelectric Focusing; IEF)*

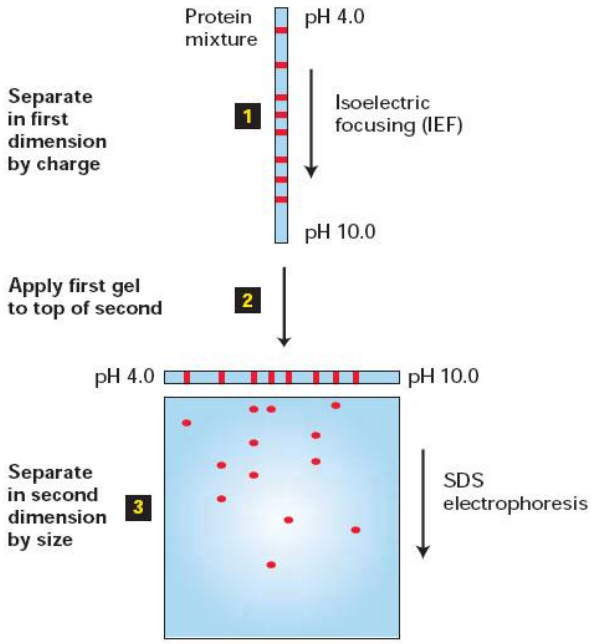
از این نوع الکتروفورز برای تعیین *pHi* (*pH* که در آن بار خالص پروتئین صفر است و در میدان الکتریکی فاقد تحرک می باشد) پروتئین ها استفاده می شود. در این روش پروتئین ها در شکل طبیعی *(native)* در گرادیان *pH* که توسط ترکیباتی بنام آمفولیت در داخل ژل ایجاد می شود، تفکیک می گردند. زمانی که *pHi* پروتئین با *pH* داخل ژل برابر شود، پروتئین متوقف می شود.



الکتروفورز دو بعدی

از این نوع الکتروفورز برای مطالعه الگوی بیان پروتئینی سلول ها (پروتئوم) استفاده می شود. از تکنیک های مورد استفاده در پروتئومیکس است. در بعد اول، پروتئین ها بر اساس *pHi* (تکنیک *IEF*) و در بعد دوم، پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی (تکنیک *SDS-PAGE*) تفکیک می شوند.

برای آنالیز بیشتر پروتئین های تفکیک شده در الکتروفورز 2 بعدی، می توان آنها را از ژل خارج و توسط اسپکترومتری جرمی، جرم و توالی آنها را تعیین کرد.



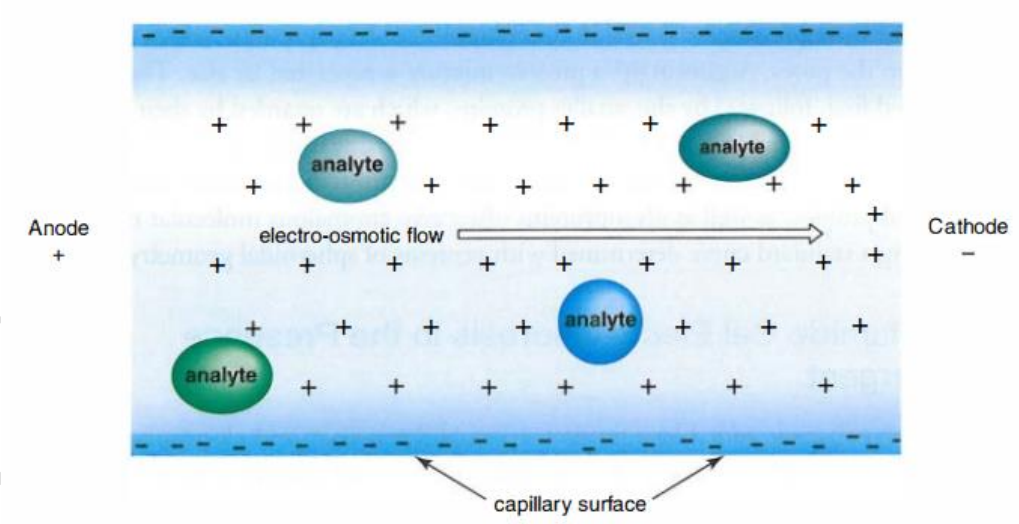
الکتروفورز موئینه *(CE) Capillary Electrophoresis*

در این روش حرکت یون ها در یک لوله مویین کوچک از جنس سیلیکا که با پلی آمید پوشش داده شده است و حاوی محلول بافر می باشد، انجام می گیرد. استفاده از لوله مویین دو مزیت دارد: 1- نسبت سطح به حجم بالا موجب پراکنده شدن سریع گرما می شود لذا می توان از ولتاژهای بسیار بالا استفاده کرد. ولتاژهای بالا راندمان جداسازی را افزایش داده و زمان آنالیز را کوتاه می کند. 2- پهن شدن باندها را به حداقل می رساند.

سطح داخلی لوله مویین با گروه های سیلانول $SiOH$ پوشیده شده است. در pH های بالاتر از 3 این گروه ها پروتون زدایی شده و به فرم آنیون SiO^- وجود دارند. وجود این بار منفی باعث می شود که کاتیون ها جذب سطح دیواره شوند و در نتیجه کاتیون ها به صورت دو لایه در می آیند. یک لایه سخت از کاتیون های جذب شده و یک لایه از کاتیون های پخش شده. وجود این دو لایه اختلاف پتانسیلی به نام **پتانسیل زتا** ایجاد می کند.

جریان الکترواسمزی

اعمال پتانسیل زتا در عرض یک لوله مویین حاوی بافر، جریانی به نام جریان الکترواسمزی ایجاد می کند. کاتیونها در بیرون لایه مضاعف جدا می شوند و چون آب پوشیده اند، توده حلال را هم با خود می کشند و می برند.

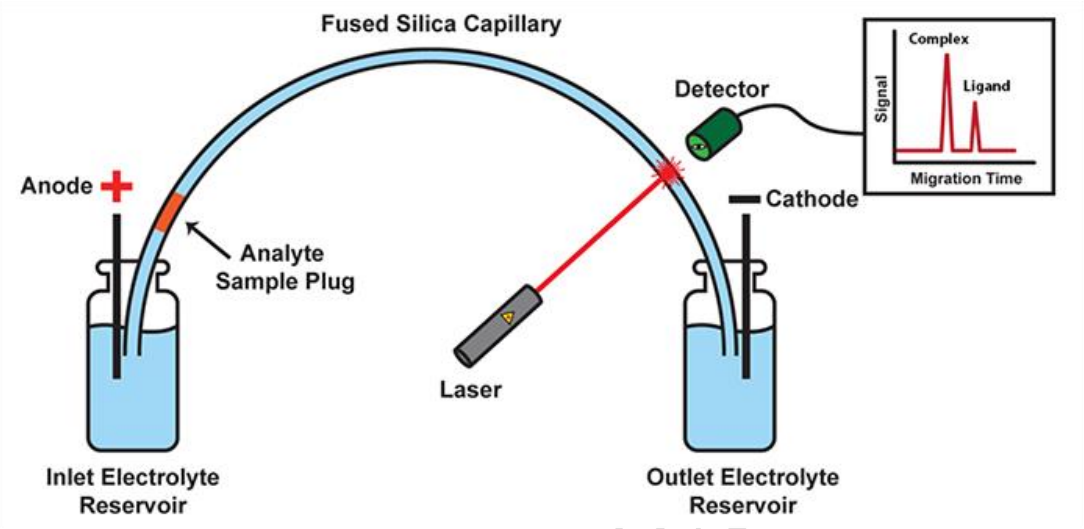


ترتیب شستشو:

بیشترین کاتیون، کمترین کاتیون، ترکیبات خنثی، کمترین آنیون و بیشترین آنیون.

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

اجزاء اصلی دستگاه الکتروفورز موئینه



کاربردها:

1- الکتروفورز پروتئین های سرم در تشخیص میلوما، بیماری های کبد و کلیوی

2- الکتروفورز پروتئین های ادرار در تشخیص اختلالات گلومرولی و توبولی کلیوی و شناسایی پروتئین بنس-جونز

3- الکتروفورز پروتئین های مایع ***CSF*** در تشخیص مالتیپل اسکلروزیس

4- الکتروفورز مایعات گوش و بینی جهت بررسی نشت مایع ***CSF*** و آسیب مغزی

5- ایمونوتایپینگ و شناسایی نوع منوکلونال آنتی بادی در درمان مالتیپل میلوما

6- الکتروفورز هموگلوبین در تشخیص تالاسمی ها و انواع هموگلوبینوپاتی ها

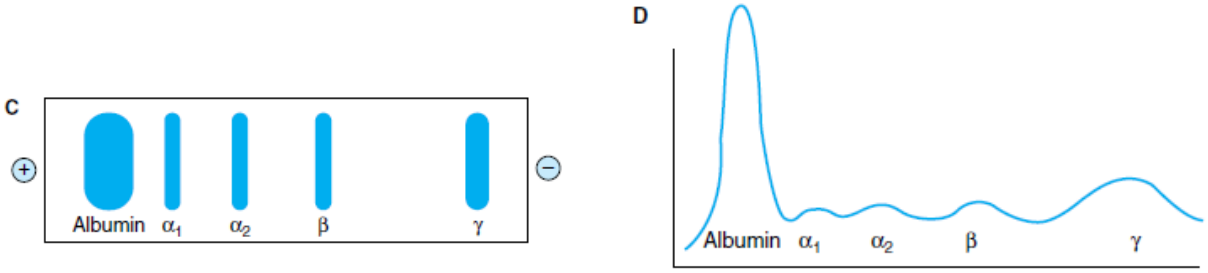
7- الکتروفورز هموگلوبین و تعیین ***HbA1c*** در تشخیص و مدیریت بیماران دیابتی

@drjafarmehrabi

جداسازی پروتئین های سرم

الکتروفورز کاغذ استات سلولز در pH قلیائی 8/6 یک روش رایج برای جداسازی پروتئین های سرم در آزمایشگاه تشخیص طبی است. همانطور که در شکل نمایش می دهد، نتیجه الکتروفورز پروتئین های سرم انسان روی نوار **استات سلولز** به صورت باندهای پروتئینی مجزا، بعد از رنگ آمیزی آشکار می شوند. اگر چه حرکت پروتئین ها عمدتا به بار الکتریکی نسبی آن ها وابسته است ولی اندازه پروتئین ها نیز نقش مهمی در این تفکیک بر عهده دارد که موقعیت باند گاما گلوبولین ها دلیلی بر آن است.

با وجود این که، پروتئین های سرم به صورت باندهای مجزا (آلبومین، آلفا یک، آلفا دو، بتا و گاما گلوبولین ها) ظاهر می شوند، ولی باید به خاطر داشت که هر باندی متشکل از پروتئین های متفاوتی است.



مشخصات پروتئین های اصلی سرم

TABLE 20.2
Characteristics of Major Plasma Proteins

Protein	Concentration Range (g/L)	Molecular Weight	Actions
Prealbumin	0.15–0.36	62,000	Binds thyroxine; transports vitamin A
Albumin	39–51	66,000	Oncotic pressure; amino acid reservoir; carries small molecules
α_1-Antitrypsin	2.0–4.0	54,000	Protease inhibitor
α_2-Macroglobulin	1.5–3.5	725,000	Protease inhibitor
Haptoglobulin	0.4–2.9	100,000 (Type 1-1)	Binds hemoglobin
β-Lipoprotein	2.7–7.4	380,000	Lipid transport
Transferrin	2.0–4.0	80,000	Transports iron
C3	0.6–1.4	185,000	Component of complement system
Fibrinogen	1.0–4.0	340,000	Clot formation
Immunoglobulin A	0.4–3.5	160,000	Surface immunity
Immunoglobulin D	0.1–0.4	180,000	
Immunoglobulin E	50–600 (μg/L)	180,000	Binds to mast cells; hypersensitivity reactions
Immunoglobulin G	7–15	150,000	Humoral immunity
Immunoglobulin M	0.25–2.0	850,000	Humoral immunity primary response

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

الگوی الکتروفورزی پروتئین های پلاسما در ژل آگاروز در pH قلیایی 8/6

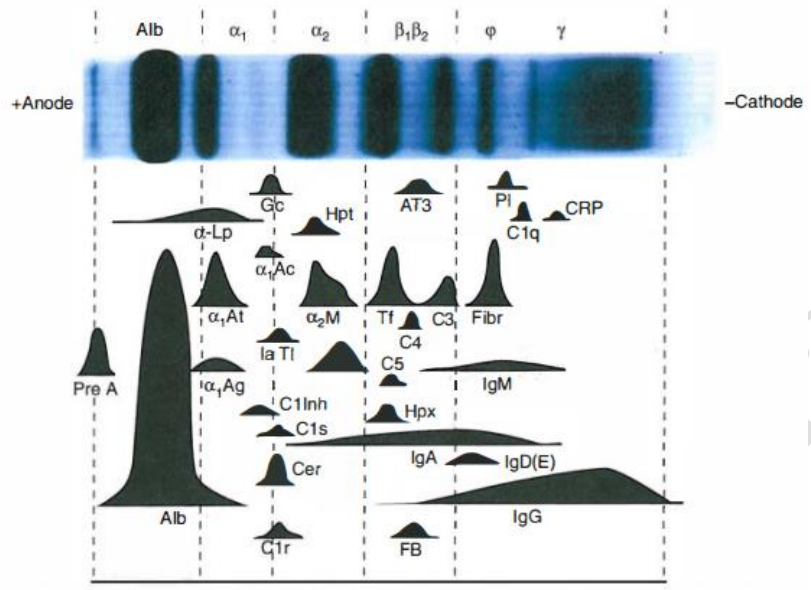


Figure 20.2 Plasma protein electrophoresis pattern in agarose gel is composed of five fractions, each composed of many individual species. Some of the major proteins are shown here in an artist's rendition for clarity. *α_1Ac,* α_1-Antichymotrypsin; *α_1Ag,* α_1-acid glycoprotein; *α_1At,* α_1-antitrypsin; *α_2-M,* α_2-macroglobulin; *α-Lp,* α-lipoprotein; *Alb,* albumin; *AT3,* antithrombin III; *β-Lp,* β-lipoprotein; complement components *C1q, C1r, C1s, C3, C4, C5,* as designated; *C1Inh,* C1 esterase inhibitor; *Cer,* ceruloplasmin; *CRP,* C-reactive protein; *FB,* factor B; *Fibr,* fibrinogen; *Gc,* Gc-globulin (vitamin D–binding protein); *Hpt,* haptoglobin; *Hpx,* hemopexin; immunoglobulins *IgA, IgD, IgE, IgG, IgM,* as designated; *IαTI,* inter-α-trypsin inhibitor; *PI,* plasminogen; *Pre A,* prealbumin; *Tf,* transferrin. *(Modified from Laurell CB: Electrophoresis, specific protein assays, or both in measurement of plasma proteins?* Clin Chem *19:99, 1973, with permission.)*

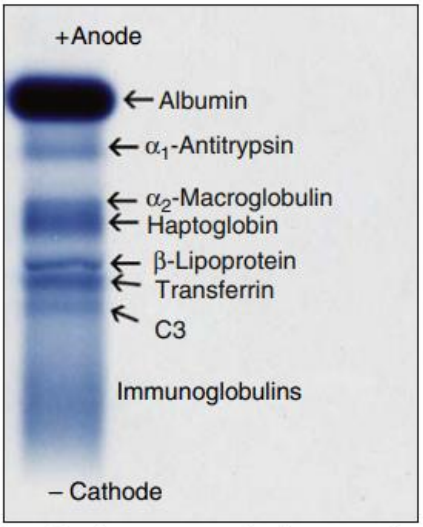
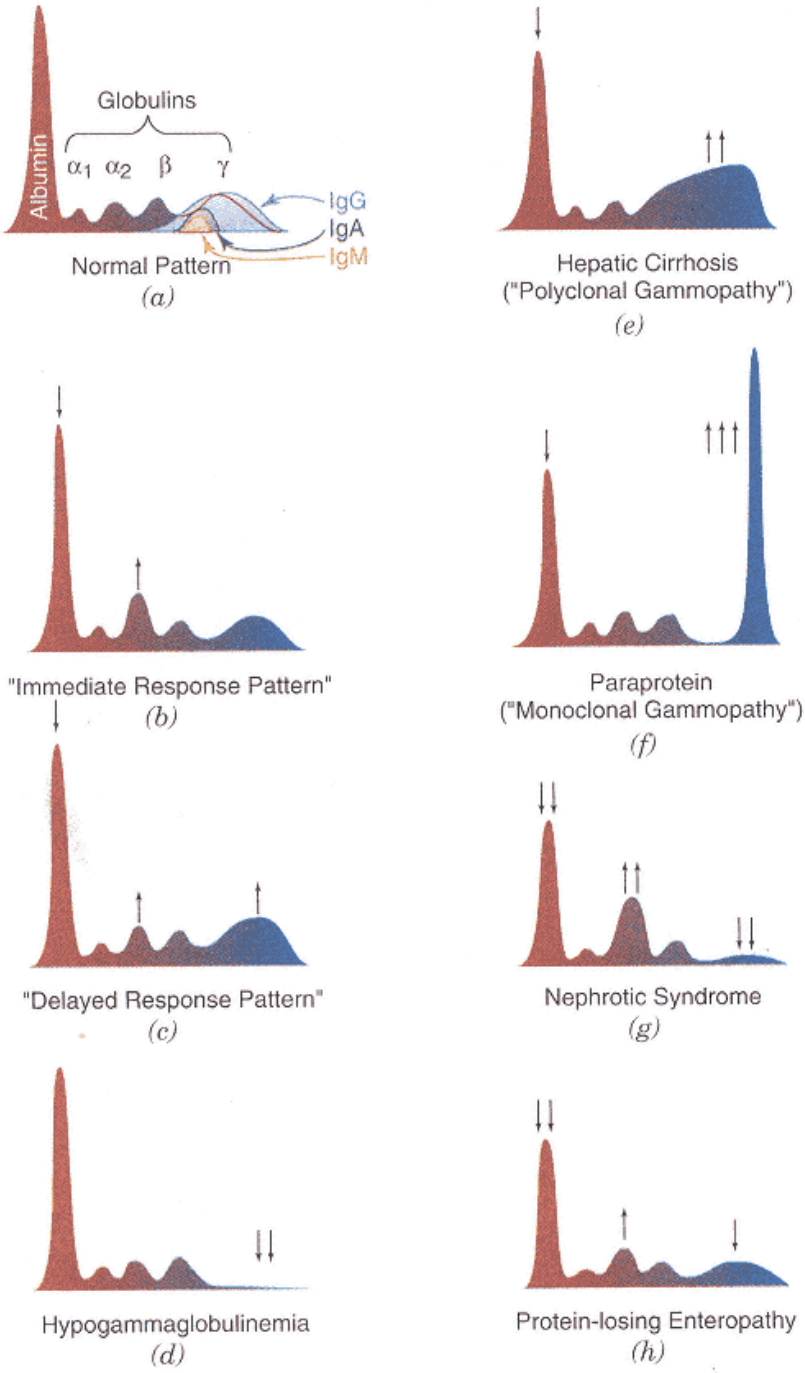


Figure 20.1 Positions of major serum proteins in a normal person using electrophoresis in agarose. Individual proteins separate according to their electrical charge between the anode (positive pole) and the cathode (negative pole).

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

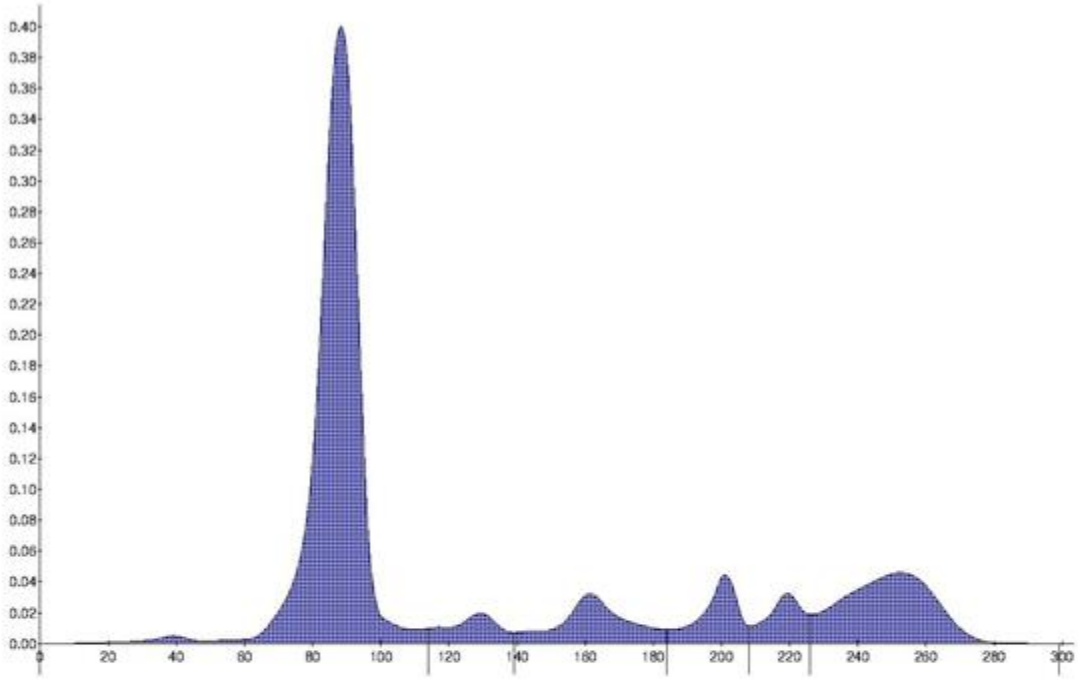
اهمیت تشخیصی الگوی الکتروفورزی پروتئین های سرم در شرایط پاتولوژیک

از الگوی الکتروفورزی پروتئین های سرم در تشخیص بیماری ها استفاده می شود. در شکل زیر به تغییرات باندهای پروتئینی در بیماری های مختلف توجه نمائید.



آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

Capillary serum protein electrophoresis

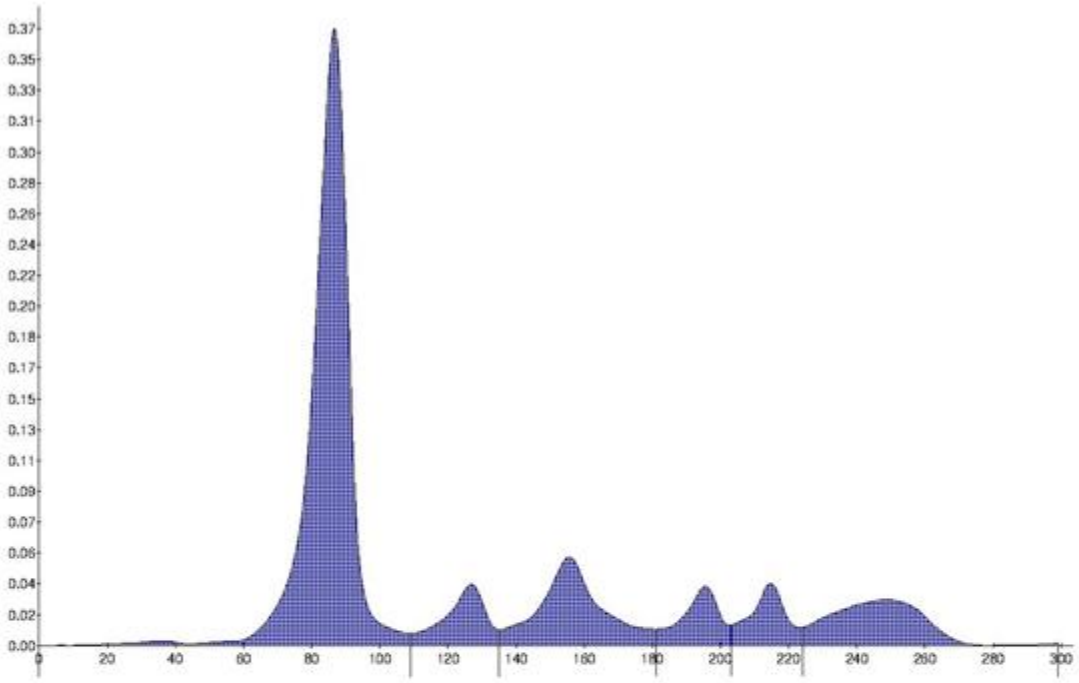


Fractions	%	Ref. %	g/dl	Ref. g/dl
Albumin	**61.7**	55.8 - 66.1	4.4	4.0 - 4.8
Alpha 1	**3.6**	2.9 - 4.9	0.3	0.2 - 0.4
Alpha 2	**7.8**	7.1 - 11.8	0.6	0.5 - 0.9
Beta 1	**5.9**	4.7 - 7.2	0.4	0.3 - 0.5
Beta 2	**4.4**	3.2 - 6.5	0.3	0.2 - 0.5
Gamma	**16.6**	11.1 - 18.8	1.2	0.8 - 1.4

A/G Ratio : **1.61** Total Protein : **7.2**g/dl

Comment: normal

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

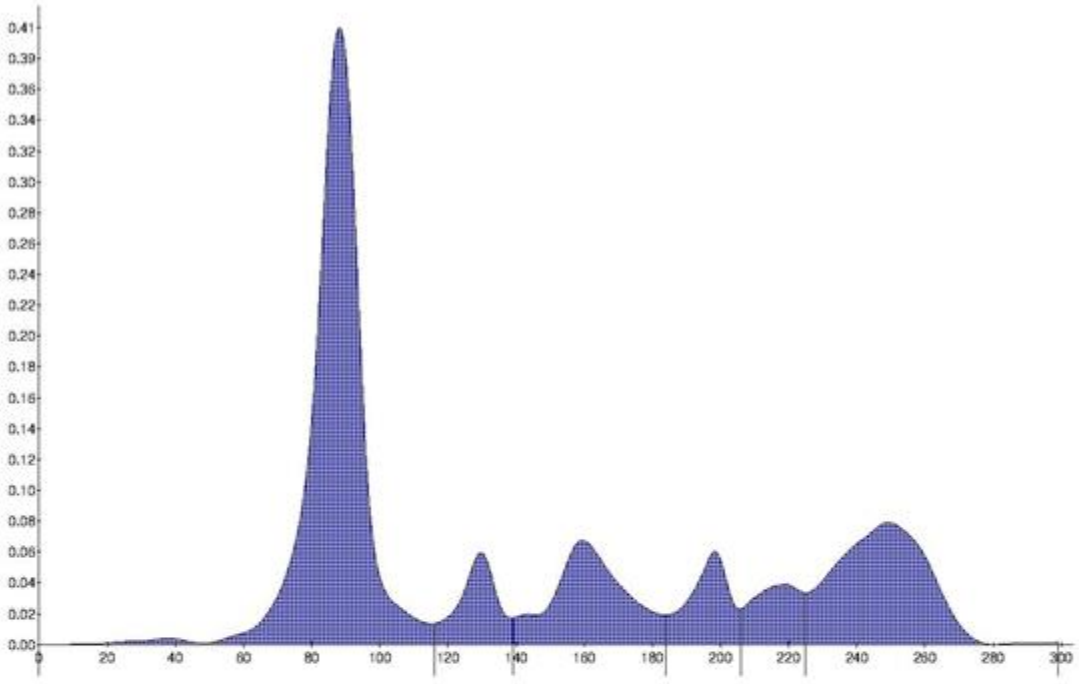


Fractions	%	Ref. %	g/dl	Ref. g/dl	
Albumin	**57.6**	55.8 - 66.1	4.1	4.0 - 4.8	
Alpha 1	**6.3**	2.9 - 4.9	0.4	0.2 - 0.4	H
Alpha 2	**13.6**	7.1 - 11.8	1.0	0.5 - 0.9	H
Beta 1	**5.6**	4.7 - 7.2	0.4	0.3 - 0.5	
Beta 2	**5.6**	3.2 - 6.5	0.4	0.2 - 0.5	
Gamma	**11.3**	11.1 - 18.8	0.8	0.8 - 1.4	

A/G Ratio : **1.36** Total Protein : **7.1**g/dl

Comment: acute inflammation

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

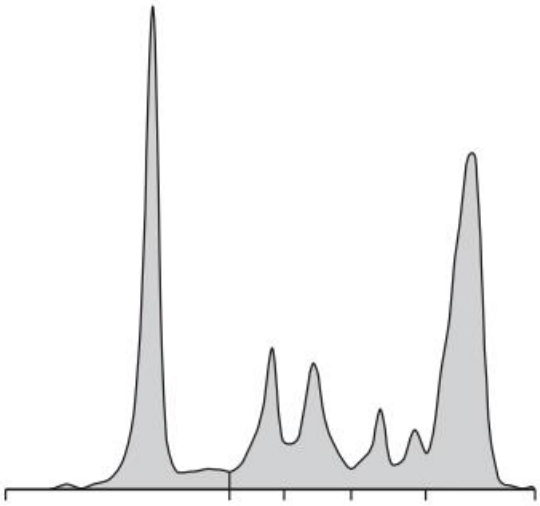


Fractions	%	Ref. %	g/dl	Ref. g/dl	
Albumin	**49.6**	55.8 - 66.1	3.3	4.0 - 4.8	L
Alpha 1	**5.9**	2.9 - 4.9	0.4	0.2 - 0.4	H
Alpha 2	**12.9**	7.1 - 11.8	0.9	0.5 - 0.9	H
Beta 1	**6.3**	4.7 - 7.2	0.4	0.3 - 0.5	
Beta 2	**5.2**	3.2 - 6.5	0.3	0.2 - 0.5	
Gamma	**20.1**	11.1 - 18.8	1.3	0.8 - 1.4	H

A/G Ratio : **0.98** Total Protein : **6.6**g/dl

Comment: chronic inflammation- polyclonal gammopathy

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138



Fractions	%		Ref. %	Conc.	Ref. Conc.
Albumin	**35.8**	<	45.3 – 67.7	**2.4**	3.4 – 5.2
Alpha 1	**5.7**		2.9 – 6.8	**0.4**	0.2 – 0.4
Alpha 2	**12.6**		6.2 – 14.9	**0.8**	0.5 – 1.0
Beta	**9.0**		8.1 – 18.0	**0.6**	0.6 – 1.1
Gamma	**36.9**	>	8.8 – 24.5	**2.5**	0.6 – 1.6

Comment: monoclonal gammopathy

الگوی الکتروفورزی سرم و ادرار در multiple myeloma

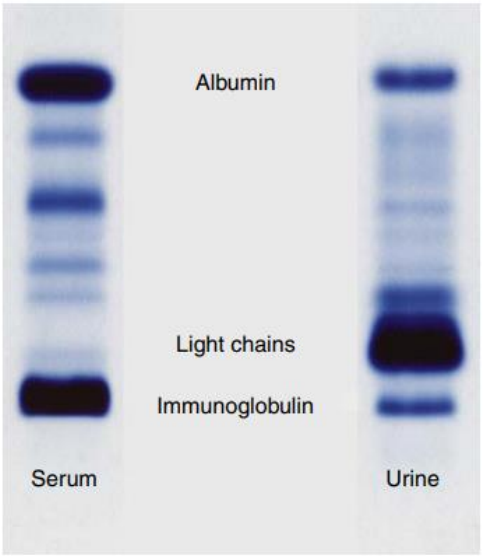


Figure 20.11 Serum and urine protein electrophoretic patterns in a patient with multiple myeloma. Serum demonstrates a predominance of the larger complete immunoglobulin; the urine has a large amount of the smaller-sized light chains, with only a small amount of the whole immunoglobulin.

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

مواردی که در تشخیص منوکلونال آنتی بادی باید مورد توجه قرار گیرد:

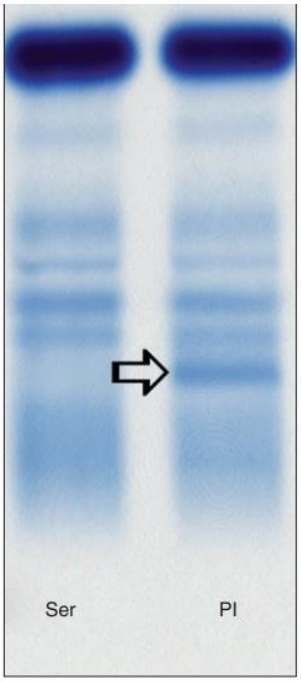
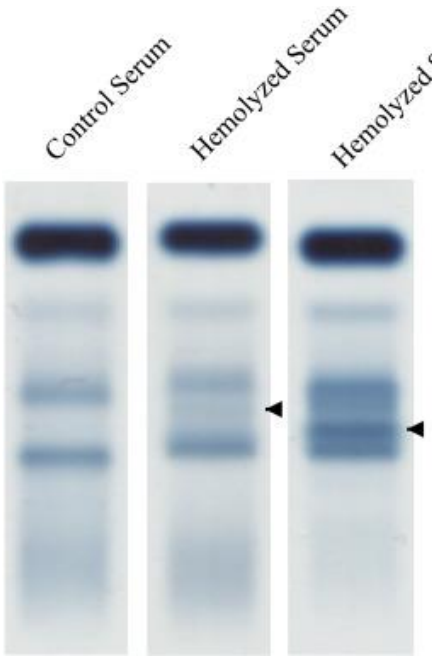


Figure 19-7 Comparison of serum (Ser) and citrated plasma (Pl) from the same individual demonstrates the position of fibrinogen *(arrow)* in plasma that should not be confused with a monoclonal immunoglobulin.

- ♣ موقعیت فیبرینوژن در پلاسما می تواند با منوکلونال آنتی بادی اشتباه گرفته شود. بنابراین باید دقت شود، پلاسما بجای سرم استفاده نشده باشد.

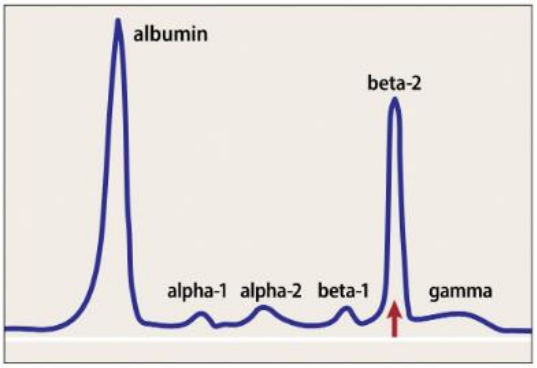


- ♣ استفاده از نمونه های همولیز شده می تواند موجب اشتباه گرفتن هموگلوبین با آنتی بادی منوکلونال شود.

afarnezhad

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

♣ گاهی اوقات آنتی بادی منوکلونال در ناحیه بتا قرار می گیرد.



Abnormal result with myeloma cells producing the M-protein, creating an M-spike in the beta-2 region

ایمونوتایپینگ

ظهور یک پروتئین منوکلونال در الکتروفورز سرم یا ادرار ممکن است واقعی یا کاذب باشد. بنابراین برای تشخیص قطعی وجود و نوع پروتئین های مونوکلونال لازم است از آزمایش ایمونوتایپینگ یا ایمونوساب تراکشن استفاده شود. در این روش، نمونه ها ابتدا با آنتی ایمونوگلبولین آنتی بادی ها ***(anti-IgG, IgA, and IgM, IgD, IgE and antifree light chains, kappa and lambda)*** انکوبه می شوند و سپس با الکتروفورز موئینه به روش معمول آنالیز می شوند. حضور باند منوکلونال بصورت ناپدید شدن پیک (ساب تراکشن) موجود در نمونه انکوبه نشده ظاهر می شود.

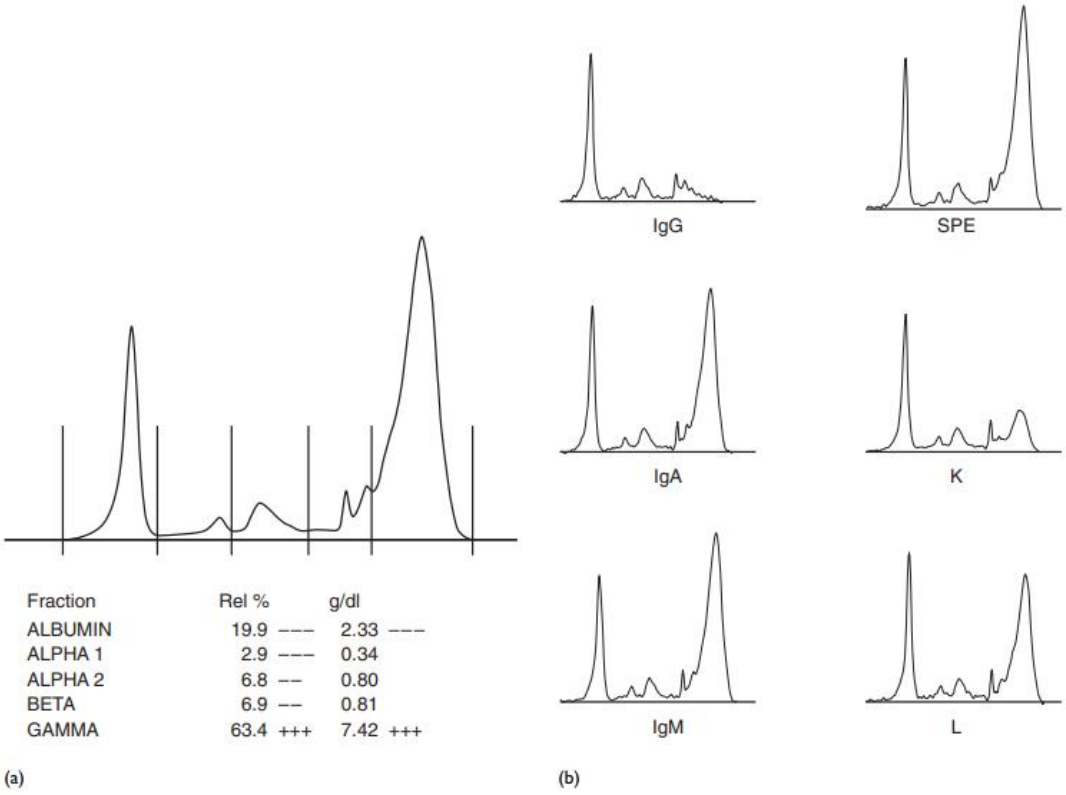


Figure 10.1 (a) Capillary zone electropherogram performed on serum from a 42-year-old man. (b) Immunosubtraction of the serum from (a). (Paragon CZE 2000.)

mezhad

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138

الگوی الکتروفورز پروتئین های سرم در سیروز کبد (شکل چپ) و سندروم نفروتیک (شکل راست)

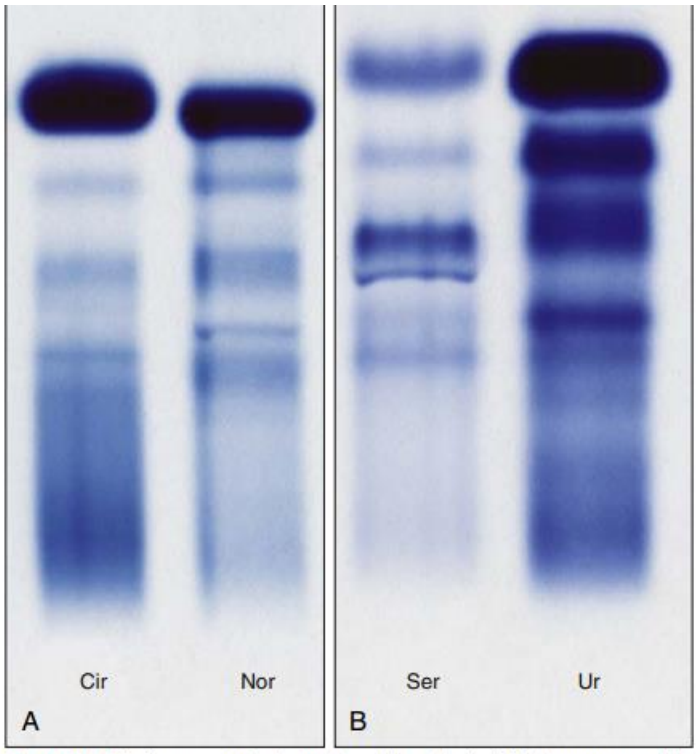


Figure 20.4 A, Serum protein electrophoresis in cirrhosis (Cir) shows more rapidly migrating albumin compared with normal serum (Nor) because of the additional negative charge from covalently linked conjugated bilirubin (i.e., δ-bilirubin). The γ-globulins are broadly increased in the polyclonal elevation characteristic of cirrhosis of the liver. B, Protein electrophoretic patterns of serum (Ser) and concentrated urine (Ur) in a patient with nephrotic syndrome. Smaller molecular-sized proteins such as albumin are preferentially lost from blood into urine. Larger proteins such as α_2-macroglobulin and β-lipoprotein are retained in the blood and constitute major bands in the serum pattern.

- ♣ افزایش حرکت آلبومین در سیروز (Cir) نسبت به نرمال (Nor) ناشی از اتصال بیلی روبین به آلبومین (بیلی روبین دلتا) است که آلبومین را منفی تر می سازد.
- ♣ افزایش پلی کلونال ایمونوگلبولین ها از مشخصات سیروز کبد است.
- ♣ در سندروم نفروتیک پروتئین ها با اندازه کوچک نظیر آلبومین در ادرار دفع می شوند و پروتئین ها با اندازه بزرگ نظیر آلفا دو ماکروگلبولین و بتا لیپوپروتئین در سرم تجمع می یابند.

@drjavad

الگوهای الکتروفورز پروتئین های ادرار در اختلالات مختلف

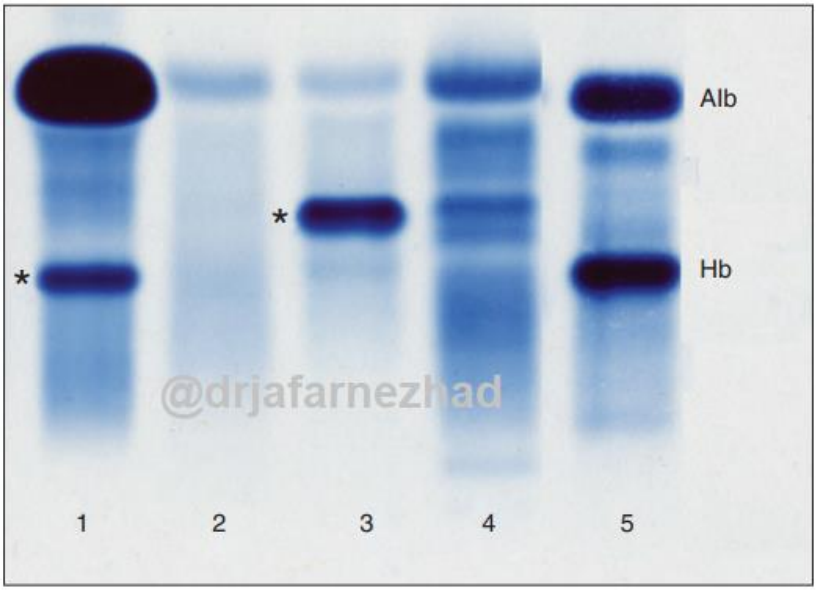


Figure 19-10 **Patterns of urine protein electrophoresis in different disorders.** (1) Severe glomerular proteinuria with a major band of albumin plus a secondary one of transferrin (*). (2) Trace proteinuria with a faint band of albumin and other diffuse proteins. (3) Immunoglobulin light chains in a case of multiple myeloma (*). (4) Tubular proteinuria with multiple bands that do not correspond to major serum proteins. (5) Hematuria with a major band of hemoglobin (not to be confused with monoclonal gammopathy), in addition to albumin.

(1) پروتئین یوریا گلومرولی: آلبومین باند اصلی است.

(2) پروتئین یوریا ملایم: دفع مختصر آلبومین و سایر پروتئین های سرم وجود دارد.

(3) مالتیپل میلوما: دفع زنجیر سبک ایمونوگلبولین ها در برخی از موارد مالتیپل میلوما مشاهده می شود.

(4) پروتئین یوریا توبولی: دفع انواع پروتئین های سرم در ادرار مشاهده می شود.

(5) هماچوری: باند مربوط به هموگلوبین نباید با منوکلونال آنتی بادی اشتباه گرفته شود.

@drjafarnezhad

الگوی الکتروفورزی پروتئین های سرم در التهاب مزمن *(1)* التهاب حاد *(2)* و آسیب نخاعی *(3)*

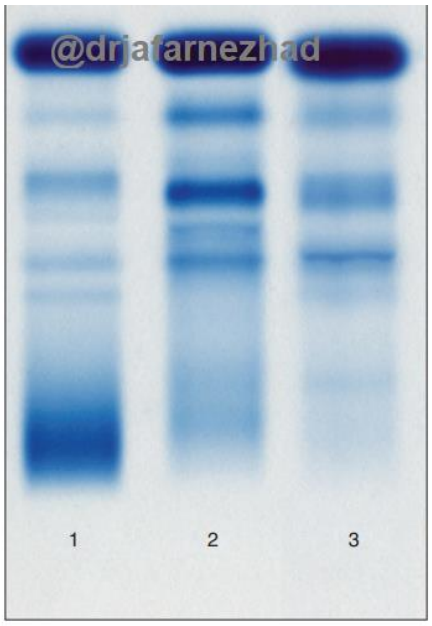


Figure 19-9 Serum protein patterns in (1) chronic inflammation with decreased albumin and increased γ-globulins; (2) acute inflammation with increased α_2-fraction (haptoglobin) and decreased C3 due to activation and consumption of complement; and (3) inanition post–spinal cord injury with hypoproteinemia of several fractions.

Bisalbuminemia حالتی نادر که در سرم افراد دو نوع آلبومین وجود دارد.

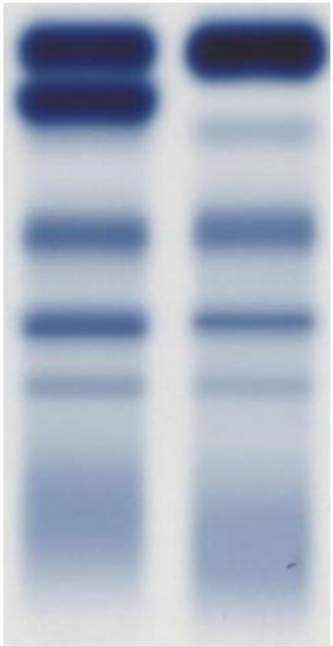


Figure 20.3 Bisalbuminemia. Serum protein electrophoresis with normal pattern in right lane and bisalbuminemia consisting of two equal intensity bands of albumin in left lane. The additional band of albumin in this patient migrated more slowly than normal albumin into the α_1-region.

jafarnezhad

آزمایش آلودگی مایعات بدن با CSF

برای این منظور از آزمایش ایمونوفیکساسیون با آنتی بادی ترانسفرین استفاده می شود. ترانسفرین موجود در مایع CSF برخلاف ترانسفرین سرم فاقد قند اسیدسیالیک (asialotransferrin) است، بنابراین در الکتروفورز در جایگاه باند بتا دو قرار می گیرد.

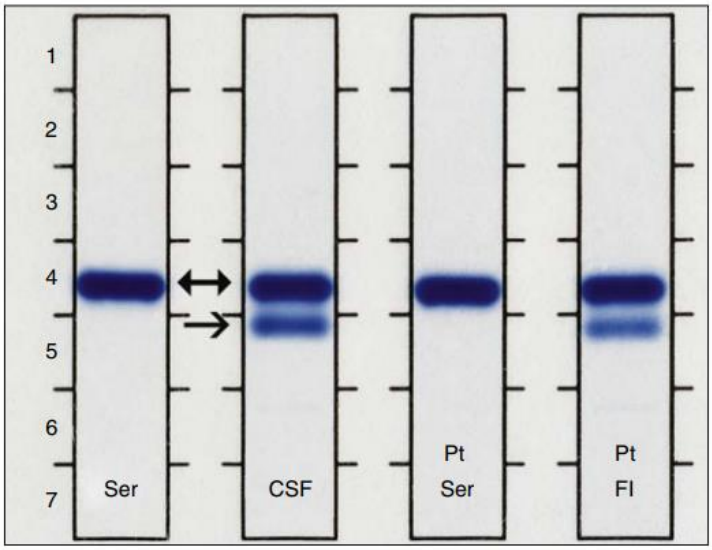
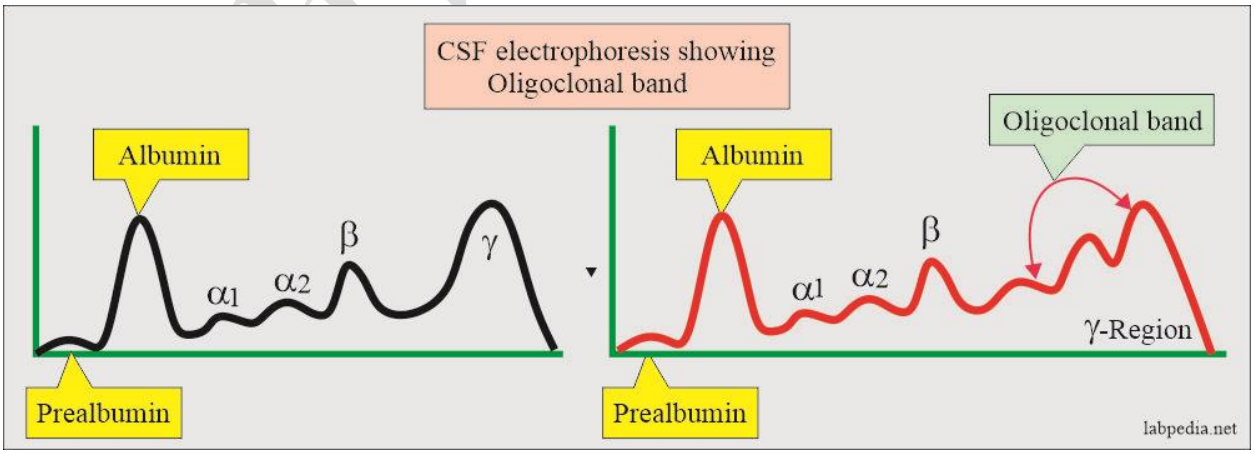
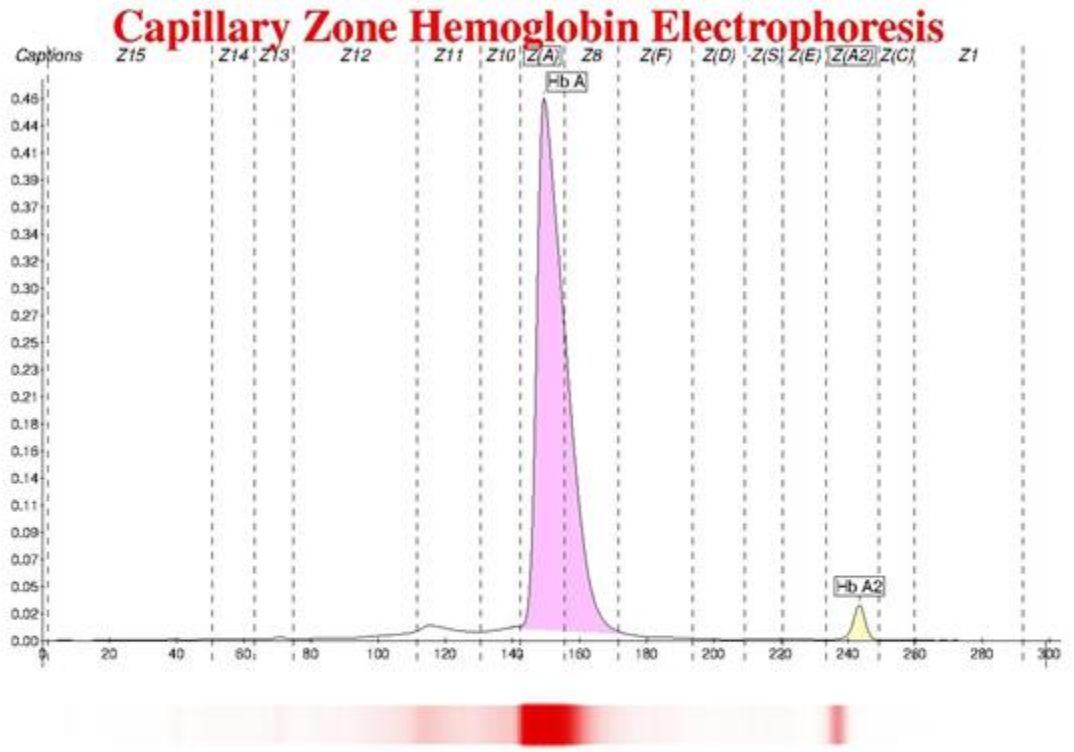


Figure 20.6 Immunofixation with transferrin antibody to test for presence of cerebrospinal fluid (CSF). *Ser,* Normal serum showing position of transferrin (Tf; *double-headed arrow*); *CSF,* normal position of Tf and asialotransferrin (aTf, *single-headed arrow*); *Pt Ser,* patient serum included to rule out electrophoretic variant of Tf; *Pt Fl,* unknown fluid from patient demonstrating bands of both Tf and aTf that confirm the presence of CSF in that fluid.

الکتروفورز پروتئین های CSF معمولا برای تشخیص باند الیگوکلونال ایمونوگلبولین ها در بیماران Multiple sclerosis انجام می گیرد. این الگو در سرم این بیماران دیده نمی شود.





Name	%
Hb A	97.4
Hb A2	2.6

- HbA2 در افراد بالغ 1/5 الی 3/5 درصد هموگلوبین توتال را تشکیل می دهد. در بتا تالاسمی مینور افزایش A2 مشاهده می شود. سطح A2 بندرت به 6 درصد می رسد و هرگز بیشتر از 12 درصد نمی شود.
- گاهی اوقات پرکاری تیروئید و کم خونی مگالوبلاستیک موجب افزایش A2 می شوند.
- در کم خونی فقر آهن و آلفا تالاسمی سطح A2 کاهش می یابد.
- اگر بیماری با بتا تالاسمی دارای کم خونی شدید فقر آهن باشد، افزایش A2 مخفی شده و سطح آن نرمال به نظر می رسد. در این شرایط، بعد از درمان کم خونی آزمایش تشخیص تالاسمی باید تکرار شود.
- در کم خونی سلول داسی شکل (هموزیگوت و هتروزیگوت) سطح A2 افزایش می یابد. افزایش آن ملایم است و زیر 4 درصد می باشد.

♣ سطح HbF (جنینی) در بالغین کمتر از 0/8 درصد است. با این وجود، حالت خوش خیمی وجود دارد که در آن تولید HbF بعد از تولد متوقف نمی شود که **Hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH)** نامیده می شود.

ویژگی های تشخیصی انواع تالاسمی

Table 4.8 Hematological Features of α- and β-Thalassemia

Disease	CBC	Hemoglobin Electrophoresis
α-Thalassemia[a]		
Silent carrier	Hb, normal; MCH, <27 pg	Normal
Trait	Hb, normal; MCH, <26 pg; MCV, <75 fL	Normal
Hb H disease	Hb, 8–10 g/dL; MCH, <22 pg; MCV, low	Hb H, 10–20% Hb Bart's, 80–90% Hb H, <1%
Hydrops fetalis	Hb, <6 g/dL; MCH, <20 pg	
β-Thalassemia		
Minor	Hb, normal or low; MCV, 55–75 fL[b]; MCH, 19–25 pg	Hb A_2, >3.5%
Intermedia	Hb, 6–10 g/dL; MCV, 55–70 fL MCH, 15–23 pg	Hb A_2, variable Hb F, up to 100%
Major	Hb, <7 g/dL; MCV, 50–60 fL; MCH, 14–20 pg	Hb A_2, variable Hb F, high

[a]*Mentzer index for children is <13 for both α- and β-thalassemia.*
[b]*MCV: Abnormal: adult, <80 fL; children (7–12 years), <76 fL; children (6 months–6 years), <70 fL.*

Mentzer index = MCV/RBC count

@drja

ویژگی های تشخیصی هموگلوبین S (کم خونی داسی شکل)

Table 4.3 Major Features of HbS Hemoglobinopathies

Disease	Hemoglobin Variants	Clinical Features
Sickle cell trait (heterozygous)	Hb AS	Hb S, 35–40%; Hb A_2, ≥3.5% Normal hemoglobin No apparent illness
Sickle cell disease	Hb SS	Hb S, >90%; Hb A_2, <3.5%; Hb F, <10%; no Hb A Hemoglobin, 6–8 g/dL Severe disease with chronic hemolytic anemia
Sickle cell β^0-thalassemia	Hb Sβ^0	Hb S, >80%; Hb A_2, >3.5%; Hb F, <20%; no Hb A Hemoglobin, 7–9 g/dL Severe sickle cell disease
Sickle cell β^+-thalassemia	Hb Sβ^+	Hb S, >60%; Hb A_2, >3.5%; Hb F, >20%; Hb A, 5–30% Hemoglobin, 9–12 g/dL Variable mild to moderate sickle cell disease
Hemoglobin SC disease	Hb SC	Hb S, 50%; Hb C, 50%; Hb F, >5% Hemoglobin, 10–12 g/dL Moderate sickling disease but chronic hemolytic anemia may be present
Hemoglobin S/HPFH		Hb S, 60%; Hb A_2, <3.5%; Hb F, 30–40% Hemoglobin, 11–14 g/dL; no Hb A Mild sickling disease

@drjafa

آزمایشگاه پاتوبیولوژی میلاد اصفهان 031-37138