

تعیین مقدار پروتئین تام و بخش‌های مختلف پروتئین سرم خون به روش الکتروفورز استات سلولز در گوسفندان ایرانی

● پروانه خضایی‌نیا، ● علی مجابی، ● ملیحه عباسعلی پورکبیره، ● ایرج نوروزیان، اعضای هیأت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

چکیده

۶۴۸ رأس گوسفند ایرانی از سه نژاد شال ۲۱۰ رأس، سنگسری ۲۱۱ رأس و مهربان ۲۲۷ رأس در دو جنس نر و ماده و در چهار گروه سنی زیر ۶ ماه، ۷-۱۲ ماه، ۱۳-۲۴ ماه و بالاتر از ۲۴ ماه از نظر میزان پروتئین تام سرم خون و باندهای مختلف آن به روش الکتروفورز استات سلولز مورد بررسی قرار گرفتند. متوسط میزان تام پروتئین سرم خون گوسفندان ایرانی $7/10 \pm 0/01 \text{ g/dl}$ ، پروتئین تام سرم خون گوسفندان نژاد شال $6/98 \pm 0/05$ ، پروتئین تام سرم خون گوسفندان نژاد سنگسری $7/81 \pm 0/08$ و پروتئین تام سرم خون گوسفندان نژاد مهربان $6/53 \pm 0/05$ به دست آمد. در غلظت پروتئین تام سرم خون بین ۳ نژاد شال، سنگسری و مهربان اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت ($P < 0/05$)، کمترین میزان پروتئین تام سرم خون در نژاد مهربان و بیشترین میزان آن در نژاد سنگسری بود. با افزایش سن میزان پروتئین تام سرم افزایش نشان داد و مقایسه این پارامتر در دو جنس نشان داد که میزان پروتئین تام سرم در جنس ماده بیشتر از جنس نر است ($P < 0/05$)، تعداد باندهایی که در الکتروفورز استات سلولز در گوسفندان ایرانی به دست آمد ۶ تا بود که به ترتیب آلبومین، آلفا، بتایک، بتادو، گاما یک و گاما دو بودند. متوسط نسبت آلبومین به گلوبولین ($\frac{A}{G}$) $1/15 \pm 0/006$ برآورد گردید.

مواد و روش کار

در این بررسی در مجموع از تعداد ۶۴۸ رأس گوسفند از سه نژاد شال ۲۱۰ رأس، سنگسری ۲۱۱ رأس و مهربان ۲۲۷ رأس که در معاینه بالینی سالم بودند، خونگیری از ورید وداج به عمل آمد. سرم خون بعد از تشکیل لخته، جدا گردید و غلظت پروتئین تام سرم به روش بیوره با دستگاه Epos analyzer 5060 ساخت شرکت ایندرف آلمان تعیین گردید (۱۹). جهت تفکیک باندهای مختلف پروتئین سرم و مقادیر هر یک از آنها همچنین نسبت آلبومین به گلوبولین از روش الکتروفورز استات سلولز استفاده گردید. در این روش از بافر تریس با $\text{pH} = 8/6$ استفاده

پلاسما باید از میزان و وضعیت طبیعی آنها اطلاعات کافی داشت.

میزان طبیعی پروتئین‌های سرم گوسفند و باندهای مختلف آن توسط تعدادی از محققین خارجی گزارش شده است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۳، ۱۷ و ۱۸) ولی با توجه به متفاوت بودن شرایط آب و هوایی، تغذیه و نژاد مشخص نبود که آیا این مقادیر هم می‌توانند برای گوسفندان بومی ایرانی به عنوان مرجع مطرح باشند؟ لذا در این مطالعه مقدار پروتئین تام، تعداد باندها و مقادیر هر یک از باندهای جدا شده در سرم خون گوسفندان ایرانی سالم از سه نژاد بومی شال، سنگسری و مهربان مورد بررسی قرار گرفت. تا به عنوان مرجعی جهت مقایسه موارد پاتولوژیک از موارد طبیعی قرار گیرد.

مقدمه

پروتئین‌های بی‌شماری در بدن انسان و سایر پستانداران وجود دارد که تعدادی از این پروتئین‌ها به صورت محلول در مایعات داخل و یا خارج سلولی و تعدادی نیز در ساختمان غشاء سلول قرار دارند. میزان زیادی از انواع مختلف پروتئین در پلاسما شناخته شده است که از نظر غلظت و وزن مولکولی با هم تفاوت دارند، این پروتئین‌ها بین پلاسما و مایع خارج سلولی دائماً در تبادل هستند.

در بسیاری از بیماری‌ها در میزان یک یا چند نوع از پروتئین‌های خون تغییراتی پدید می‌آید که بررسی این تغییرات در تشخیص بیماری می‌تواند مفید واقع شود. ولی قبل از بررسی پاتولوژیک پروتئین‌های سرم یا

گوسفند نژاد سنگسری



قوچ نژاد شال



تغییرات سن و درصد آلبومین ارتباط معنی‌داری ندارند $r = -0.715$ با افزایش سن میزان گلوبولین تام سرم خون گوسفندان ایرانی افزایش می‌یابد $r = 0.5653$ ولی درصد آن با سن ارتباط معنی‌داری ندارد $r = 0.859$ افزایش سن و نسبت $\frac{A}{G}$ ارتباط معنی‌داری ندارد.

Tollersrud و همکاران (۱۹۷۱) اظهار داشتند که پروتئین تام سرم در بره‌ها کمتر از میش‌های بالغ است (۲۰). Keay & Doxey (۱۹۸۴) نشان دادند که با افزایش سن آلبومین سرم نیز افزایش می‌یابد (۱۲).

Kaneko (۱۹۸۹) اظهار داشت که در تمام حیوانات با افزایش سن، پروتئین تام و گلوبولین‌های سرم خون افزایش و آلبومین سرم خون کاهش می‌یابد (۱۰).

Otesile (۱۹۹۲) در بررسی اثرات سن و جنس بر روی غلظت توتال پروتئین و گاما گلوبولین‌ها گزارش کرد که در گوسفندان ۱-۲ ماهه میزان توتال پروتئین و ایمونوگلوبولین نسبت به سنین بالاتر کمتر است (۱۵).

Pieragostini (۱۹۹۳) گزارش کرد که سن از عوامل مؤثر بر روی توتال پروتئین و فراکسیون‌های آن در سرم خون گوسفندان می‌باشد (۱۶).

Audige (۱۹۹۳) در تحقیق بر روی پروتئین‌های سرم خون آهو گزارش کرد که متوسط توتال پروتئین، آلبومین و گاما گلوبولین با افزایش سن افزایش می‌یابد (۱).

نتایج حاصل از آنالیز آماری در این مطالعه نشان می‌دهد که در غلظت پروتئین تام و غلظت و درصد هر یک از فراکسیون‌های پروتئین سرم خون در سه نژاد شال، سنگسری و مهربان اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$). کمترین میزان پروتئین تام سرم خون در نژاد مهربان و بیشترین میزان در نژاد سنگسری وجود دارد (نمودار شماره ۴).

Falk و Healy (۱۹۷۴) پروتئین تام آلبومین و گلوبولین تام سرم گوسفندان نژادهای مریوس و دورست هورن را در سنین مختلف مطالعه نمودند و هیچ‌گونه اختلافی از نظر نژادی مشاهده نکردند (۸).

نتایج

میانگین غلظت پروتئین تام و میانگین غلظت و درصد هر یک از باندهای پروتئینی سرم خون همچنین نسبت آلبومین به گلوبولین ($\frac{A}{G}$) در گوسفندان ایرانی، در سه نژاد شال، سنگسری و مهربان در چهار گروه سنی و در دو گروه جنسی به ترتیب در جداول شماره ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. وجود یاعدم وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین مقادیر پارامترها در گروه‌های مختلف نژادی، سنی و جنسی نیز مشخص گردیده است. میانگین غلظت پروتئین تام سرم گوسفندان ایرانی $(M \pm SE)$ 7.10 ± 0.1 g/dl، پروتئین تام سرم خون گوسفندان نژاد شال 6.98 ± 0.5 g/dl، پروتئین تام سرم خون گوسفندان نژاد سنگسری 7.81 ± 0.8 g/dl و پروتئین تام سرم خون گوسفندان نژاد مهربان 6.98 ± 0.5 g/dl به دست آمد.

بین مقادیر به دست آمده در گروه‌های مختلف سنی اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت و با افزایش سن میزان پروتئین تام سرم افزایش نشان می‌داد. در مقایسه بین سه نژاد میزان پروتئین تام در نژاد سنگسری بیشتر و در نژاد مهربان کمتر بود ($P < 0.05$) در مقایسه بین دو جنس میزان پروتئین تام در سرم گوسفندان ماده‌بیش‌از‌سرم‌گوسفندان‌نر بود ($P < 0.05$). در جداسازی باندهای پروتئین سرم به روش الکتروفورز استات سلولز از سرم خون تمام گوسفندان مورد مطالعه ۶ باند جدا گردید، که به ترتیب آلبومین، آلفا، بتایک، بتادو، گاما یک و گاما دو می‌باشند (شکل شماره ۱).

بحث

میانگین غلظت پروتئین تام سرم خون گوسفندان ایرانی 7.10 ± 0.1 g/dl به دست آمد. نتایج گزارش شده توسط محققین دیگر با مطالعه اخیر همخوانی دارد (۵، ۱۷، ۶، ۴، ۹، ۳، ۱۰، ۱۸، ۱۳).

نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون پروتئین‌های سرم خون گوسفندان ایرانی و سن نشان می‌دهد که با افزایش سن میزان پروتئین تام سرم افزایش می‌یابد (نمودار شماره ۱). با افزایش سن میزان آلبومین سرم خون گوسفندان ایرانی افزایش می‌یابد $r = 0.5792$.

شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها بر روی کاغذ استات سلولز توسط اپلیکاتور مخصوص و قرار دادن آن در تانک مخصوص الکتروفورز که حاوی بافر بود جریانی برابر با 22° ولت و 13 میلی آمپر در تانک برقرار گردید و بدین ترتیب پروتئین نمونه‌های سرم که همه دارای شارژ منفی شده بودند به طرف قطب مثبت حرکت کردند. فراکسیون‌هایی که دارای الکترون‌گاتیویته بیشتر بودند مانند آلبومین زودتر از بقیه باندها به طرف قطب منفی حرکت کردند و گاما گلوبولین‌ها از سایر باندها کندتر بودند.

نکته قابل توجه اینکه جهت جدا شدن باندهای پروتئین سرم گوسفندان بر روی کاغذ استات سلولز زمان‌های 20° ، 30° ، 40° و 50° دقیقه آزمایش شدند برای تفکیک پروتئین‌های سرم خون گوسفند مناسب‌ترین زمان 40° دقیقه بود.

بعد از اتمام این مرحله کاغذهای استات سلولز مدت 10° دقیقه در رنگ بنسواس قرار گرفتند و به این ترتیب باندهای پروتئینی، رنگ قرمز به خود گرفتند. برای اینکه رنگ‌های اضافی زوده شوند کاغذها در محلول‌های رنگ‌زدا حاوی اسید استیک قرار گرفتند به طوری که باندهای پروتئین به رنگ قرمز در روی زمینه سفید نوارها مشاهده شدند.

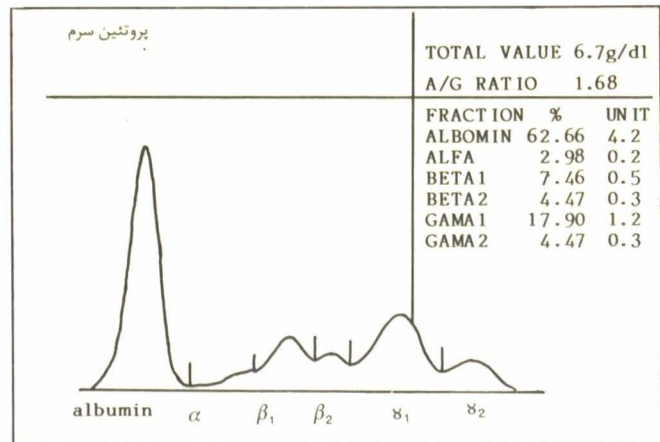
سیس نوارها در محلول شفاف کننده قرار گرفته و روی لام‌های شیشه‌ای گذاشته شدند قسمت اضافی نوار جدا شده و اسلایدها در آون 100° درجه به مدت 15 دقیقه قرار گرفتند تا خشک و کاملاً شفاف شدند. اسلایدهای آماده توسط دانسیتومتر ساخت شرکت LRE MEDIZINT آلمان مور بررسی قرار گرفتند (۱۹).

جهت آنالیز آماری نتایج از برنامه کامپیوتری SPSS استفاده گردید. برای پی‌بردن به وجود اختلاف آماری بین گروه‌های سنی مختلف و همچنین بین سه نژاد مورد مطالعه شال، سنگسری و مهربان از تست آماری آنالیز واریانس استفاده شد و برای پی‌بردن به وجود اختلاف آماری بین دو جنس نر و ماده از تست T استفاده گردید، همچنین با استفاده از نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون ارتباط غلظت پروتئین تام سرم و سن در گوسفندان ایرانی مشخص گردید (۱۴).

فوج نژاد مهربان



شکل شماره ۱- منحنی الکتروفورز استات سلولز سرم خون گوسفند ایرانی (نژاد مهربان)



pattern of serum proteins in some ruminants. Indian Veterinary Journal. 69: 265-266.

12- Keay G., Doxey D.L., 1982. A comparison of the serum protein electrophoretic patterns of young and adult animals. Vet. Res. Com. 5: 271-276.

13- Meyer D.J., Coles E.H., Rich L.J., 1992. Veterinary laboratory medicine, Interpretation and diagnosis. 1st ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. PP: 315-331.

14- Nie N.H., Hadialhull, C., Jenkins, J.G., Steinbrenner, D., 1975. SPSS: Statistical package for the social sciences. 2nd ed. New York, Hill Book Co.

15- Otesile E.B., Kasall O.B., 1993. Effect of age and sex on serum proteins, urea nitrogen and transaminase concentration in Ethiopian Highland sheep. Vet Bull, Abst, No: 6253.

16- Pier Agostini E., Petazzi F., Dario C., Satriani A., 1991. Total protein content and protein fractions of blood serum in Leccese sheep. Vet. Bull. Abs. No: 4221.

17- Schmid M., Forstner V., 1986. Laboratory testing in veterinary medicine diagnosis and clinical monitoring, 1st ed. Boehringer Manbeim GmbH, Mannheim. PP: 77-78.

18- Smith B P., 1990. Large animal internal medicine. 1st ed. The C.V., Mosby Co. Philadelphia. PP: 489-491.

19- Tiets N.W., 1994. Text book of clinical Chemistry 2nd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. PP: 692-697.

20- Tollersrud S., Baustas B., Flat Landmo K., 1971. Effects of physical stress on serum enzyme and other blood constituents in sheep. Acta. Vet. Scand 12: 220-229.

منابع مورد استفاده

1- Audige, L., 1998. Serum biochemical values of Rusa deer (*Cervustimorensis russa*) in New Caledonia. Vet. Bull. Abs. No: 3541.

2- Benamine M. M., 1989. Outline of veterinary clinical pathology. 3rd ed. The Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA, PP: 108-115.

3- Blood D.C., Radostits O.M., Arundel J.H., Gay C.C., 1994. Veterinary medicine. 8th ed. Balliere Tindall, London. PP: 1726-1727.

4- Coles E.H., 1986. Vet. clinical pathology, 4th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. PP:136-144.

5- Doxey D.L., 1983. Clinical pathology and diagnostic procedures. 2nd ed. Bailliere Tindall, London.

6- Duncan J.R., Prasse K.W., 1986. Veterinary laboratory medicine. Clinical pathogy. 2nd ed Iowa State University Press Ames, Iowa, USA PP: 105-109.

7- Eyal E., Bogin E., Avidar Y., Shimshony A., Isreali B., 1982. Enzyme, motabolite and electrolyte levels in the blood and tissues of Assaf and Assaf-Chios, lambs. Refuah. Veterinarith. 39: 160-165.

8- Healy P.J., Falk R.H., 1974. Value of some biochemical constituents in the serum of clinically normal sheep. Australian veterinary journal 50: 302-305.

9- Howard J.L., 1986. Current veterinary therapy. Food animal practice. 2. 1st ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. P: 920.

10- Kaneko J.J., 1989. Clinical biochemistry of domestic animals, 4th ed. Academic press, INC. New York. PP: 151-156.

11- Kataria N., Sareen M., Kataria A.K., Bhatia J.S., 1992. A qualitative study of electrophoretic

گامایک بولین و گامادو گلوبولین بودند (تصویر ۱).

میانگین نسبت آلبومین به گلوبولین در سرم خون گوسفندان ایرانی $6 \pm 1/15$ به دست آمد.

تعداد باندهایی که در سرم خون گوسفند به روش الکتروفورز اسنات سلولز توسط Howard (۱۹۸۶)، Kaneko (۱۹۸۹)، Benamine (۱۹۸۹)، Smith (۱۹۹۰) و Kataria (۱۹۹۲) گزارش شد. مشابه

تحقیق حاضر است اما همه این محققین نسبت $\frac{A}{G}$ را کمتر از یک و کمتر از مطالعه اخیر گزارش کرده‌اند که این موضوع قابل بررسی می‌باشد (۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲).

Doxey (۱۹۸۳) در سرم خون گوسفند به روش الکتروفورز اسنات سلولز ۴ باند آلبومین، آلفا، بتایک، بتادو و گاما گلوبولین را جدا کرد (۵). گزارش Coles (۱۹۸۶) مشابه Doxey می‌باشد (۴).

Blood (۱۹۸۹)، Duncan و Prasse (۱۹۸۶)، ۵

باند پروتئین به ترتیب آلبومین، آلفا، بتایک، بتادو و گاما گلوبومین در سرم خون گوسفند گزارش کردند (۳ و ۶). به جز Coles (۱۹۸۶) این محققین نیز نسبت $\frac{A}{G}$ را کمتر از ۱ گزارش نمودند. Meyer (۱۹۹۲) نسبت $\frac{A}{G}$ را بیش از ۱ گزارش کرد (۱۳). اختلاف عمده‌ای که

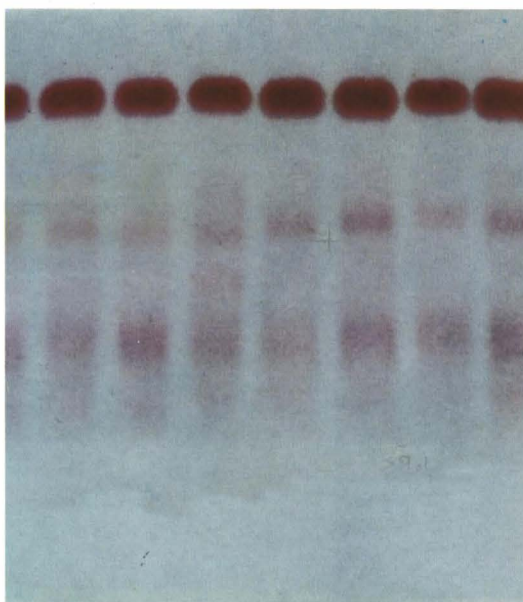
بین تحقیق حاضر با گزارش سایرین مورد توجه قرار می‌گیرد نسبت $\frac{A}{G}$ می‌باشد که در گوسفندان ایرانی در هر سه نژاد این نسبت از ۱ بزرگتر به دست آمد و تعداد

باندهای گزارش شده هم در بعضی موارد با تحقیق اخیر همخوانی ندارد به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که مقادیر گزارش شده توسط محققین خارجی نمی‌تواند به عنوان یک مرجع برای گوسفندان بومی ایرانی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین بر خود واجب می‌دانند که از زحمات جناب آقای دکتر محمد جواد ضمیری، دکتر رامین بهجانی، دکتر محمدعلی مظاهری جهت همکاری برای تهیه سرم خون گوسفند و همچنین سرکارخانم بنیثا طباطبایی رضوی جهت زحماتی که برای تایپ مقاله متحمل شدند سپاسگزار می‌نمایند.

باندهای پروتئینی سرم خون گوسفندان ایرانی در الکتروفورز اسنات سلولز (نژاد مهربان)



باندهای پروتئینی سرم خون گوسفندان ایرانی در الکتروفورز اسنات سلولز (نژاد شال)

