

عزل وتنقية هرمون الكوبيبتين من مصلى دم اشخاص مصابين بأمراض القلب

ذكري علي علوش ، نوري محمد عزيز

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

شملت هذه الدراسة عزل وتنقية هرمون الكوبيبتين من مصلى دم اشخاص مصابين بامراض القلب باستخدام تقنيات حيوية مختلفة فقد فصلت حزمتين بروتينية بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (سيفادكس G-50) من الراسب الناتج بواسطة الترسيب بالاسيتون البارد ولقد وجد ان اعلى تركيز لهرمون الكوبيبتين كان في القمة الثانية (الحزمة B) .

فضلا عن ذلك تم الكشف عن نقاوة هرمون الكوبيبتين المعزول والحزمة (B) بواسطة تقنيات (كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء -الطور المعكوس و الهجرة الكهربائية) , ولقد بينت النتائج التي تم الحصول عليها بتقنية RP-HPLC تطابقا فيها جيدا في زمن الاحتباس بين المحلول القياسي للكوبيبتين ومحلول النموذج الذي تم الحصول عليه في تقنية الترشيح الهلامي (الحزمة B) .

كما تم ايجاد الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون الكوبيبتين المنقى جزئيا الحزمة (B) باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي سيفادكس (G-50) والهجرة الكهربائية باستخدام الصوديوم دوديسيل سلفيت كان (4654±400 دالتون , 4513±400 دالتون) على التوالي , وتم دراسة التركيب الثانوي (الفا-الجلون) لهرمون الكوبيبتين بواسطة تقنية (Circular Dichroism) ووجد ان النسبة المئوية (الفا-الجلون) بين المحلول القياسي للكوبيبتين ومحلول النموذج الذي تم الحصول عليه بتقنية الترشيح الهلامي (الحزمة B) كانت متطابقة بدرجة عالية.

الكلمات الدالة: هرمون الكوبيبتين , كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء الطور المعكوس, الازدواجية اللونية , الهجرة الكهربائية.

المقدمة

واحد للارجنين فاسوبرسين اضافة الى النهاية الكاربوكسيلية للكلايكوبروتين للبروفاسوبرسين ثم تحشر في حويصلة الغدد الصم العصبية لتنتقل من SON و PVN الى الفص الخلفي للغدة النخامية posterior pituitary والذي يفرز منه الكوبيبتين (6) . ان الالية المهمة لافراز الكوبيبتين والفاسوبرسين هو ان الخلايا العصبية الكبيرة تعمل على نقل الاكسونات من تحت المهاد hypothalamus ليسمح لها بالدخول الى الفص الخلفي للغدة النخامية posterior pituitary وهذا مايسمى بالمسالك العصبية (5) ان الكوبيبتين يفرز بنفس الكيفية مع الارجنين فاسوبرسين (8) ان الفسيولوجيا المرضية لإفراز الكوبيبتين تعتمد على نخر خلايا القلب ويستخدم استجابة لكرب الغدد الصماء ولذلك سطر الضوء على الكوبيبتين في امراض القلب (9).

الهدف من الدراسة: عزل وتنقية الكوبيبتين من مصلى دم الانسان ودراسة خواصه .

طرائق العمل

عزل وتنقية هرمون الكوبيبتين من مصلى الدم

العينات:

تم الحصول على مصلى الدم من اشخاص مصابين بامراض القلب وبأعمار مختلفة من مستشفى كركوك العام/ كركوك ومستشفى ابن سينا التعليمي / الموصل للفترة من بداية تموز 2013 الى نهاية كانون الاول 2013 , وذلك بسبب ارتفاع تركيز هرمون الكوبيبتين في مصلى دم مرضى القلب (9), وقدر تركيز البروتين بطريقة لاوري المحورة (10) وكذلك قدر تركيز هرمون الكوبيبتين (14)

1- الترسيب بالمذيب العضوي

ان أول من وصف الكوبيبتين، المعروف أيضاً باسم الببتيد السكري المرتبط بالفاسوبرسين AVP-associated glycopeptide كان Holwerda عام 1972 (1) ولم تكتشف وظيفة هرمون الكوبيبتين الا في العقد المنصرم (2006) و يدعى الكوبيبتين بالببتيد السكري للنهاية الكاربوكسيلية لطليعة الفاسوبرسين (C-terminal portion of arginine vasopressin (CP-proAVP)(3و2) تتوضح اهمية الكوبيبتين في مميزات قياسه ايضا والذي يكون ثابت جدا ويتطلب كميات اقل في مقارنة مع الفاسوبرسين اثناء القياس ولا يحتاج الى استخلاص او اضافة مواد مثل مثبطات البروتيز protease inhibitors اضافة الى الوقت القصير الذي يحتاجه في الحصول على النتائج (4).

يعد الكوبيبتين من الببتيدات السكرية ويتكون من 39 حامض اميني (5) يصنع الكوبيبتين من نفس الجين الذي يصنع منه الفاسوبرسين في الكرموسوم العشرين في الموقع P13 ويترتيب عكسي مع جين الاوكسيتوسين ويشق من الاكسون الثالث من اكسونات التشفير الثلاثة في mRNA مع اخر 17 حامض اميني للنهاية الكاربوكسيلية (لنيوروفاليسين-2) (NP-2) , اما الاكسونات الاخرى فانها تترجم الى اشارات ببتيديية (AVP) و (NP-2) (6) ان عملية تجزئة البروفاسوبرسين الى اشارات اخرى تتم عن طريق اربعة من انزيمات التحلل وهي الاندوبيتايديز , الاكسوبيتايديز , المونواوكسجينز و اللايز خلال نقل الاكسونات من (SON) Supraoptic nucleus و (PVN) Paraventricular nucleus للتحل المهاد hypothalamus (7) , ان البروفاسوبرسين يحشر في الشبكة الاندوبلازمية وتشكل من 8 جسور كبريتية 7 منها لل (NP-2) و

من شركة (Mybiosource \ USA). وتم اجرائها في جامعة بلكننت في تركيا/المركز القومي لبحوث النانوتكنولوجيا

5- ازدواجية اللون الدوارة Circular dichroism

تم تطبيق (0.2 مل) بتركيز (2.2 بيكو مول) من النموذج المحضر بتقنية الترشيح الهلامي في جهاز ازدواجية اللون الدوار Circular dichroism (CD) (Jasco, J815) وطبق النموذج القياسي المجهر من شركة (Mybiosource \ USA) بحجم (0.2 مل) و بتركيز (2.5) بيكو مول. وتم اجرائها في جامعة بلكننت في تركيا/المركز القومي لبحوث النانوتكنولوجيا

تقدير الكويبيتين.

تم قياس هرمون الكويبيتين بواسطة تقنية التقدير بالانزيم المرتبط مناعيا (ELISA) (14) من شركة Mybiosource \ USA. التحليل تم في مختبر العوز المناعي في مستشفى كركوك العام/كركوك. نوع الجهاز ELX 800 قارئ الصفيحة المايكروسكوبية لجهاز الاليزا، TEK-BIO، INC، الأمريكية

تقدير تركيز البروتين:

لتقدير الكميات الدقيقة من البروتين استخدمت طريقة لوري (15) والمحوارة من قبل العالمين (10)، إذ استعمل البومين مصلى البقر (BSA) كمحلل قياسي والذي له معامل إطفاء (Extinction Coefficient=0.67) وتتضمن هذه الطريقة تفاعل البروتين مع كاشف فولن ليعطي معقدا أزرق اللون تقراً الامتصاص له عند (650 نانومتر) إذ تتناسب شدة الامتصاص مع تركيز البروتين (16).

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي

تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للنموذج المحضر الذي يمثل هرمون الكويبيتين بواسطة تقنيتي كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال السيفادكس (G-50) وتقنية الهجرة الكهربائية بالمقارنة مع مواد بروتينية معلومة الوزن الجزيئي (11). علما ان تقنية الهجرة الكهربائية تم اجرائها في جامعة بلكننت في تركيا/المركز القومي لبحوث تقنية النانوتكنولوجيا.

النتائج والمناقشة

عزل وتنقية الكويبيتين

يستعمل الاسيتون البارد كعامل مرسل جيد للبروتينات بسبب سهولة التخلص منه و تطايره للحصول على الراسب البروتيني. ويظهر من الجدول (1) ان تركيز الكويبيتين في محلول الراسب البروتيني الذي حصل عليه من مصلى الدم بواسطة الترسيب بالاسيتون البارد اعلى من تركيزه في مصلى الدم، وقد تم اهمال الراشح لخلوه من الكويبيتين. وعادة يستخدم كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لفصل المركبات الحيوية بالاعتماد على حجم جزيئاتها واشكالها حيث يحتوي عمود الفصل على هلام السيفادكس (G-50) وتم تطبيق تقنية الترشيح الهلامي لفصل المواد البروتينية التي حصل عليها بواسطة الترسيب بالاسيتون البارد من مصلى الدم. بينت النتائج الموضحة بالشكل (1) وجود حزميتين بروتينيتين (A و B) للمركبات البروتينية المفصولة من الراسب

فصلت المواد البروتينية من مصلى الدم بواسطة الترسيب بالاسيتون البارد (11) بنسبة (60:40 v/v) الى المصل مع التحريك المستمر البطيء عند 4 م⁰ لمدة 60 دقيقة ويترك الى اليوم الثاني في الثلجة، ويتم فصل الراسب البروتيني بواسطة الطرد المركزي المبرد بسرعة (12000xg) لمدة 30 دقيقة ثم يذاب الراسب البروتيني بأقل كمية من الماء المقطر، ثم بعدها يقدر حجم محلول الراسب البروتيني وتركيز البروتين وتركيز الهرمون فيه ثم يحفظ بالتجميد لاستكمال الخطوات اللاحقة.

2- كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

استخدم عمود الفصل ذي الأبعاد (105 x 1.5 سم) والذي يحتوي على مادة الهلام من نوع (Sephadex G-50) التي تفصل المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزيئية بحدود (30000 دالتون) (11) وتم وضع مادة الهلام على ارتفاع (97 سم) بسكب مادة الهلام على جدران عمود الفصل بهدوء وبشكل مائل بواسطة العصي الزجاجية لمنع تكون الفقاعات حتى يستقر وتزال الكمية الزائدة من الماء المقطر (12).

تم امرار المحلول البروتيني الناتج من الترسيب بالاسيتون بمقدار (2 مل) على عمود الفصل الحاوي على هلام السيفادكس (G-50) وتبع ذلك (2 مل) من الماء المقطر للغسل. وبعد ذلك تم استرداد المواد البروتينية بمعدل جريان (60 مل/ساعة) بمعدل (3 مل/3دقيقة) لكل جزء من جامع الاجزاء الذي يعمل بنظام الدقائق، اذ تمت متابعة المواد البروتينية لكل الاجزاء من خلال قراءة شدة الامتصاص عند طول موجي 280 نانومتر باستعمل جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية. فضلا عن ذلك تم تقدير تركيز هرمون الكويبيتين في الاجزاء المفصولة بقسمت الى جزئين احدهما حفظ بالتجميد للاستخدام اللاحق والآخر تم تجفيف الحزم البروتينية الناتجة من عملية الترشيح الهلامي باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) لغرض الحصول على هذه الحزم بشكل مسحوق جاف وبعد الحصول على المسحوق البروتيني تم وضعه في انبوب محكم الاغلاق ويحفظ بالتجميد لحين استخدامه في التجارب اللاحقة.

3- الهجرة الكهربائية

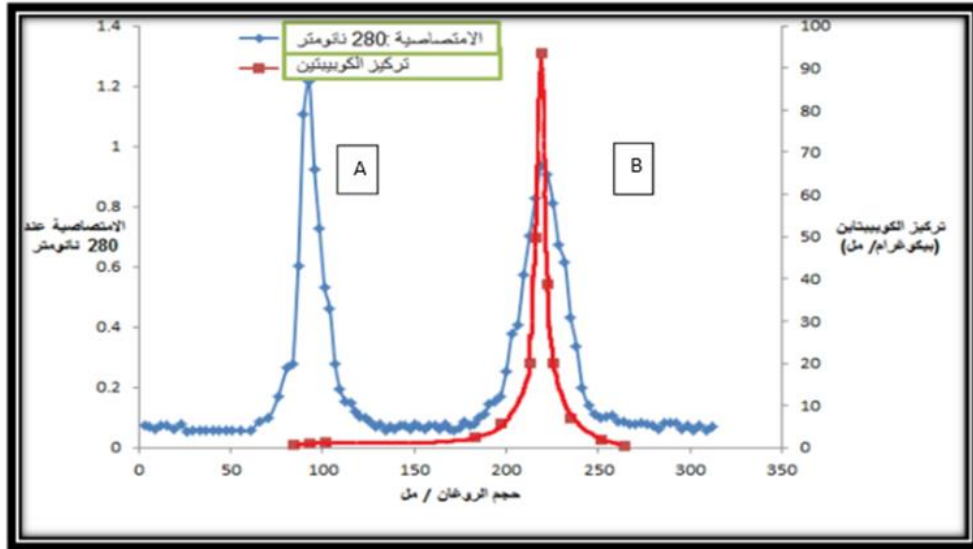
ان القمة المفصولة من كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي طبقت على (SDS-PAGE) نوع (من Mediphor هايدلبرغ المانيا) حسب طريقة (13) باستعمال التطهير العمودي على اللوح الهلامية. وتم اجرائها في جامعة بلكننت في تركيا/المركز القومي لبحوث النانوتكنولوجيا

4- كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء الطور المعكوس.

استخدم في الحقن (2 مل) من المحلول المائي للنموذج الهرموني والذي تم الحصول عليه من كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي في الفقرة السابقة طبق في كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء-الطور المعاكس نوع (HPLC, Agilent 1200 Series, 6890N/ 7683 B) باستعمال عمود فولاذ مقاوم للصدأ (C₁₈). النموذج القياسي الذي طبق

البروتينية الفعالة والممثلة للكوبيبتين وتم اهمال الحزمة A لعدم وجود تركيز للكوبيبتين فيها. وخالصة نتائج مراحل تنقية الكوبيبتين من محلول راسب الاسيتون البارد مدرجة في الجدول (1)

البروتيني للاسيتون . وكان حجم الروغان للحزمة الاولى (92.7 مل) بينما حجم الروغان للحزمة الثانية (219.8 مل) ولقد تبين ان الحزمة البروتينية (B) اعطت اعلى تركيز للكوبيبتين وعدت بذلك الحزمة



الشكل (1) المظهر الجانبي للروغان محلول الراسب البروتيني بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام العمود ذي الابعاد (105*1.5 سم) والحاوي على مادة الهلام سيفادكس (جي-50)

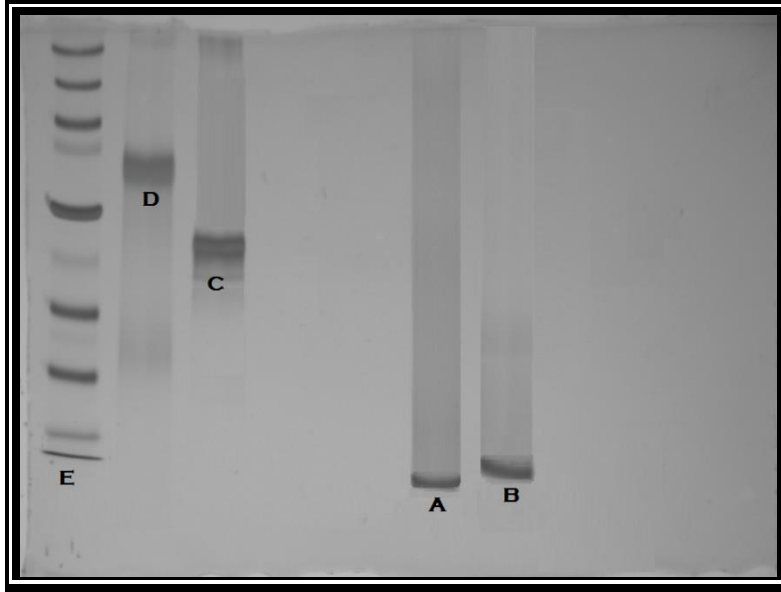
جدول (1) خلاصة نتائج مراحل تنقية الكوبيبتين من مصد الدم

الاستعادة %	عدد مرات التنقية	الفعالية الكلية للكوبيبتين Pg/Mg	التركيز الكلي للكوبيبتين Pg	تركيز البروتين الكلي Mg	تركيز البروتين Mg/mL	تركيز الكوبيبتين Pg/mL	الحجم الكلي mL	مراحل التنقية
100	1	1.31	3410.8	2584	76	100.32	34	مصل الدم
91	1.74	2.28	3113	1364	62	141.5	22	محلول الراسب البروتيني
76	34.79	45.5	2598	57	5.7	259.8	10	الحزمة B الترشيح الهلامي

1-الهجرة الكهربائية

اظهرت الحزمة الثانية (B) والممثلة لهرمون الكوبيبتين المنقى من مصد الدم بتقنية الترشيح الهلامي حزمة فردية من خلال تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام SDS-PAGE وكما موضح بالشكل (2) وهذا يتفق مع (17) على ان الكوبيبتين هو ببتيد احادي ويحتوي على 39 حامض اميني.

بينت النتائج في الجدول (1) ان الكوبيبتين قد ازداد بعد عملية الترسيب وهذا قد يكون بسبب زيادة نقاوة الكوبيبتين . وكذلك نلاحظ زيادة في التركيز بعد عملية الترشيح الهلامي لتصبح عدد مرات التنقية (34.79) كذلك بلغت النسبة المئوية للاستعادة (76) وللتأكد من نقاوة الكوبيبتين المعزول (الحزمة B) من مصد الدم تم اجراء تقنية الهجرة الكهربائية SDS-PAGE وتنقية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء RP-HPLC

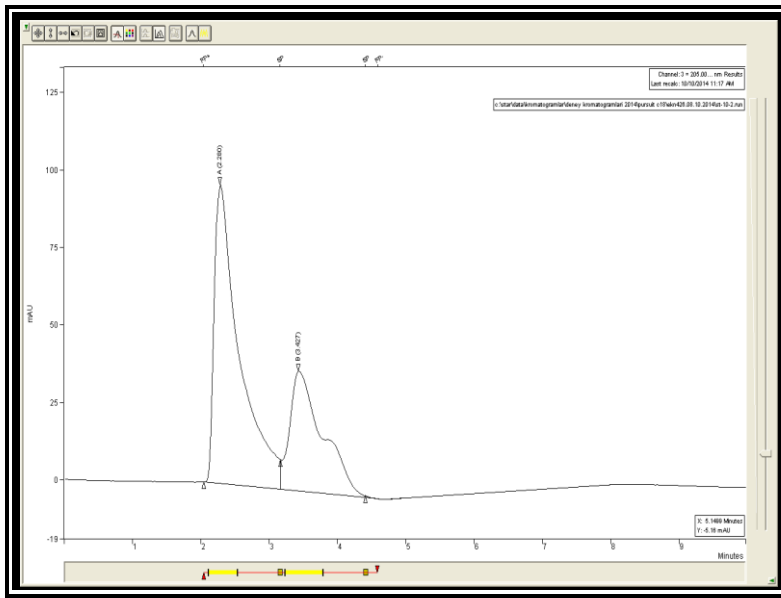


الشكل (2) الهجرة الكهربائية SDS-PAGE للكويبيتين المنقى جزئياً من مصل الدم مع المواد البروتينية القياسية
 الحزمة (A) تمثل الكويبيتين المنقى جزئياً الحزمه (B) من الترشيح الهلامي , الحزمة (B) تمثل الانسولين, الحزمة (C) البومين البيض , الحزمة (D) تمثل الفا-اميليز , الحزم (E) تمثل مجموعة بروتينات كعلامة معلومة الوزن الجزيئي

دقيقة) (درجة الحرارة , درجة حرارة المحيط) (الطول الموجي , 205.8 نانومتر)(الضغط : 12 Mpa) واطهرت النتائج في الشكل (3) والجدول (2) وجود حزمتين الحزمة الاولى (الاساسية) والحزمة الثانية والتي ظهرت عند زمن احتباس (2.280) و(3.427) دقيقة على التوالي بالنسبة للمحلول القياسي.

2- كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء الطور المعكوس.

تم تقدير نقاوة الكويبيتين المنقى جزئياً الحزمة (B) التي تم الحصول عليها من الترشيح الهلامي من خلال نظام كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء (الطور المعكوس) واستخدم المحلول القياسي للكويبيتين لمعرفة زمن الاستجابة تحت الشروط التالية : (سرعة الانسياب: 0.5 مل /



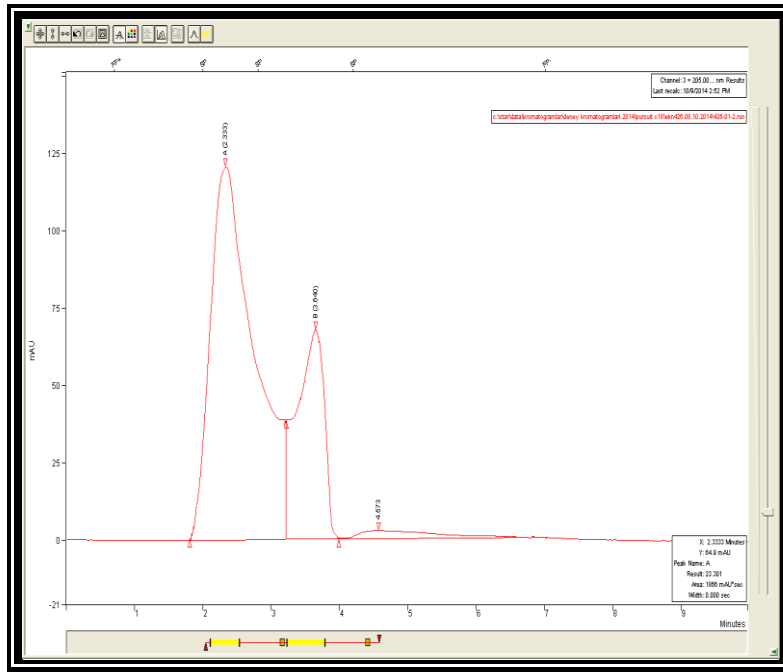
الشكل (3) كروماتوغرام المحلول القياسي للكويبيتين

جدول (2) البيانات من RP-HPLC للمحلل القياسي والنموذج (الحزمة B) من الترشيح الهلامي.

اسم المحلول	الحزمة	زمن الاحتباس / دقيقة	ارتفاع الحزمة
المحلل القياسي للكوبيبتين	A	2.280	95.004
	B	3.427	35.130
محلل النموذج الحزمة (B)	A	2.333	120.589
	B	3.640	68.174
	C	4.537	3.186

الحزمة الاولى (الاساسية) وقد ظهرت الحزم الثلاث عند زمن احتباس (2.333) , (3.640) و (4.537) على التوالي.

كذلك كما يلاحظ في الشكل (4) والجدول (2) وجود ثلاث حزم للنموذج المفصول (الحزمة B) من الترشيح الهلامي. في نظام RP-HPLC تحت نفس الشروط التي طبقت مع المحلول القياسي وتعد

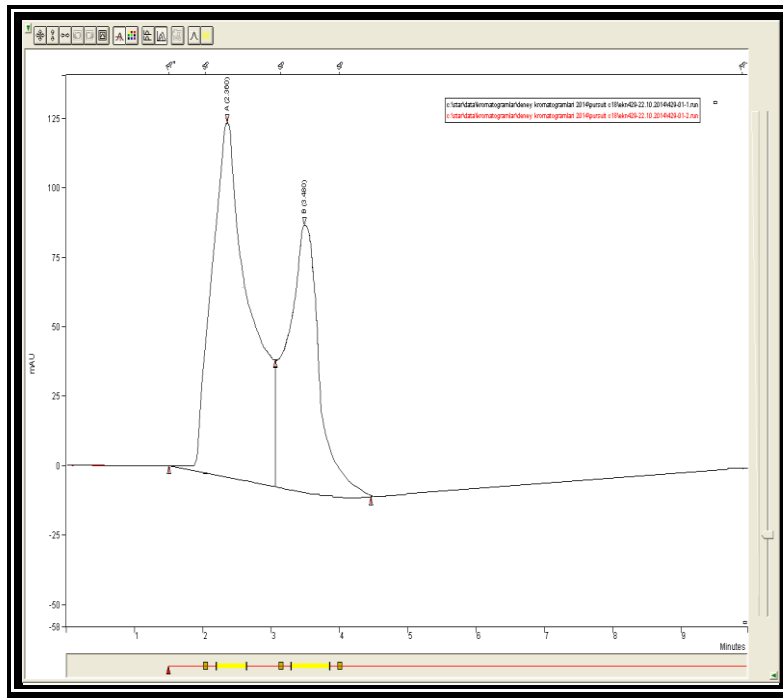


الشكل(4): كروماتوغرام محلل النموذج (الحزمة B) من الترشيح الهلامي سفادكس (G-50)

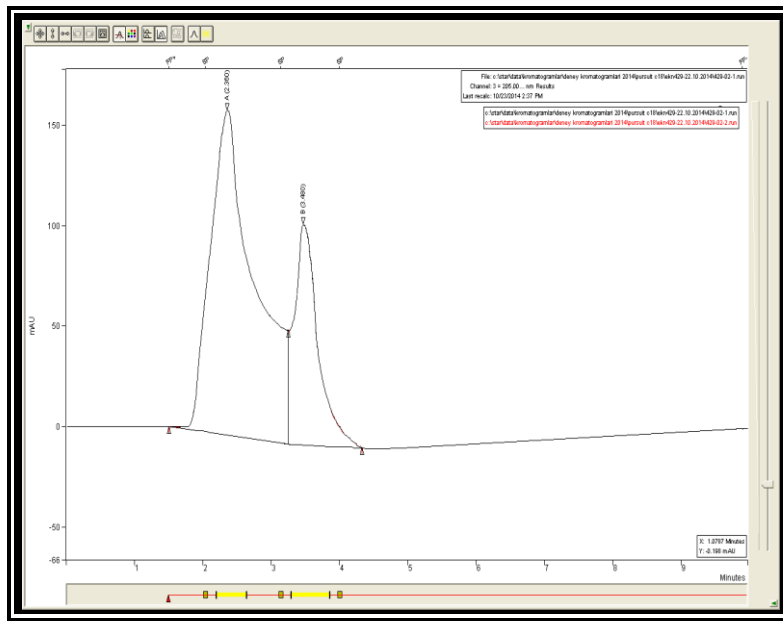
الترشيح الهلامي على التوالي ثم مرر على RP-HPLC تحت نفس الظروف السابقة.

وبينت النتائج في الشكل (5) , (6) والجدول (3) تبين ارتفاع الحزمتين قد ازداد مع زيادة تركيز المحلول القياسي المضاف الى النموذج , اضافة الى ثبات زمن الاحتباس. بعد مقارنة الكروماتوغرام في الشكل (4) , (5) و (6) تبين وجود تشابه او تطابق بين الحزمة (B) للنموذج والمحلل القياسي للكوبيبتين . كذلك يشير الى ان النموذج المعزول من الترشيح الهلامي بواسطة سيفادكس (G-50) له نفس خواص الكوبيبتين القياسي.

بعد مقارنة كروماتوغرام المحلول القياسي للكوبيبتين مع النموذج (الحزمة B) وجد ان هناك تطابق جيد في زمن الاحتباس بين النموذج (الحزمة B) والمحلل القياسي وكما موضح في الشكل (3) و(4) والجدول (2) تبين وجود تطابق في زمن الاحتباس بالنسبة للنموذج (الحزمة B) الممتلئ لهورمون الكوبيبتين المنقى جزئيا من تقنية الترشيح الهلامي وهورمون الكوبيبتين القياسي. من اجل التأكد ان الكوبيبتين المنقى جزئيا يشابه المحلول القياسي للكوبيبتين. تم اضافة 10 , 20 مايكرو لتر من المحلول القياسي الى النموذج المحضر من



الشكل (5) كروماتوغرام محلول النموذج الحزمة (B) بعد اضافة (10 مايكرو لتر) من محلول الكويبيتين القياسي



الشكل (6) كروماتوغرام محلول النموذج الحزمة (B) بعد اضافة (20 مايكرو لتر) من محلول الكويبيتين القياسي

جدول (3) البيانات من RP-HPLC للنموذج الحزمة (B) بعد اضافة 10 , 20 مايكرو لتر من محلول الكويبيتين القياسي

ارتفاع الحزمة	زمن الاحتباس/ دقيقة	الحزمة	اسم المحلول
123.850	2.360	A	محلول النموذج بعد اضافة 10 مايكرو لتر من المحلول القياسي للكويبيتين
86.647	3.480	B	
157.291	2.360	A	محلول النموذج بعد اضافة 20 مايكرو لتر من المحلول القياسي للكويبيتين
100.80	3.480	B	

50) على ارتفاع (97 سم) وتم امرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي التي تتراوح اوزانها (204-2000000 دالتون) لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (Vi) لكل مادة وكذلك الحجم الخالي من الحبيبات (Vo) ويبين الجدول (4) المواد التي مررت على عمود الفصل المستخدم واوزانها الجزيئية وحجم روغانها.

تقدير الوزن الجزيئي للكوبيبتين:

تقدير الوزن الجزيئي بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

تم استخدام تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للكوبيبتين (الحزمة البروتينية B) الحاوية على اعلى تركيز من الكوبيبتين. وقد استخدم لهذا الغرض عمود الفصل ذو الابعاد (105X 1.5 سم) الحاوي على مادة هلام السيفادكس (G-

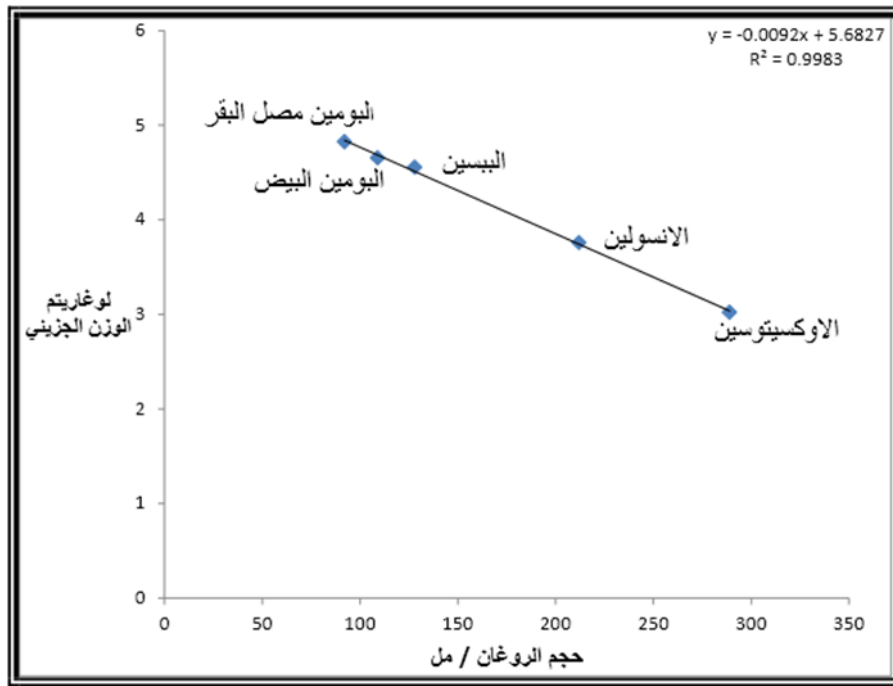
الجدول (4) العلاقة بين الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد المستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي

بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

المواد	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان / مل
الدكستران الازرق	2000000	60
البومين مصل البقر	67000	92
البومين البيض	45000	109
ببسين	36000	128
انسولين	5743	212
اوكتوسين	1051	289
الترتوفان	204	312
النموذج	5446	219

التقريبي للكوبيبتين النقي جزئيا من مصل الدم (الحزمة B) اذ ان حجم الروغان (للحزمة B) كان (219 مل)

يوضح الشكل (7) يبين حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي , اذ تبين ظهور خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي



الشكل (7) المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي

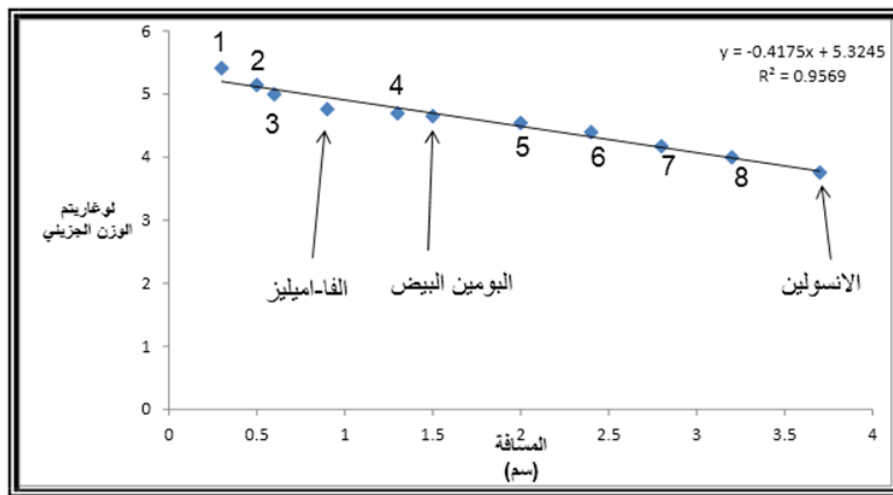
3- تقدير الوزن الجزيئي بواسطة الهجرة الكهربائية SDS-PAGE كما قدر الوزن الجزيئي التقريبي للكوبيبتين المنقى جزئيا الحزمة (B) من كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام مركبات معلومة الوزن الجزيئي بتقنية (SDS-PAGE) كما موضح بالشكل (2) وعند

تشير نتائج المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي على ان الوزن الجزيئي التقريبي للكوبيبتين (الحزمة B) (400±4645 دالتون) وهذا يتفق مع النتائج التي ذكرها (18) على ان الوزن الجزيئي للكوبيبتين يساوي (~5000 دالتون).

رسم المسافة التي يقطعها المواد البروتينية واورانها الجزئية الموضحة في الجدول (5) تبين وجود خط مستقيم حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة (B) المفصول من تقنية الترشيح الهلامي وكما مبين في الشكل (8) وجد ان الوزن الجزيئي التقريبي (4513 ± 400 دالتون) وهذا يتفق مع مذكره (18).

جدول (5) العلاقة بين الوزن الجزيئي والمسافة المقطوعة بتقنية SDS-PAGE

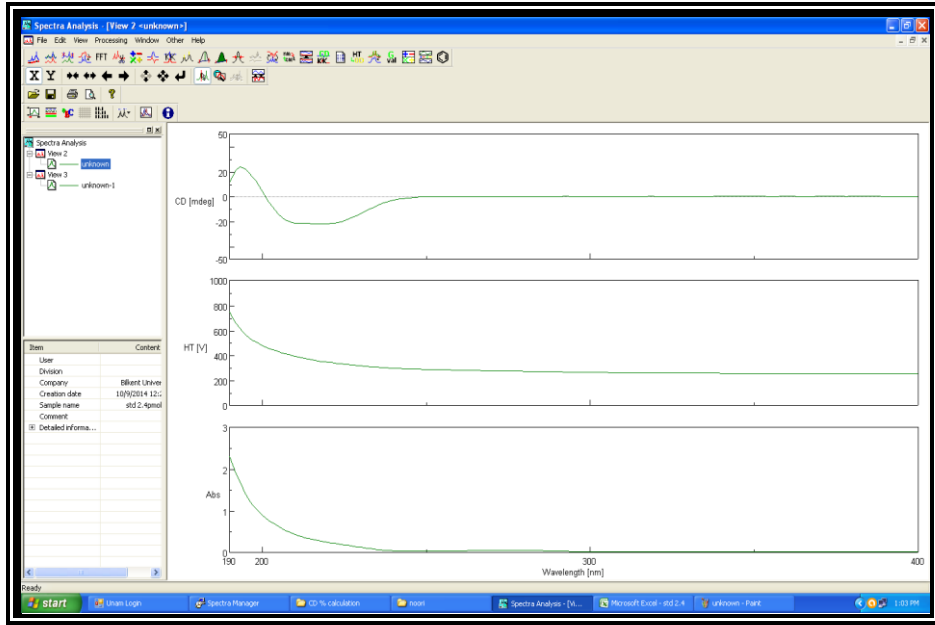
المواد	الوزن الجزيئي (دالتون)	المسافة (سم)
1	260000	0.3
2	140000	0.5
3	100000	0.6
الفا-اميليز	58000	0.9
4	50000	1.3
البومين البيض	45000	1.5
5	35000	2
6	25000	2.4
7	15000	2.8
8	10000	3.2
الانسولين	5743	3.7
النموذج	4513	4.0



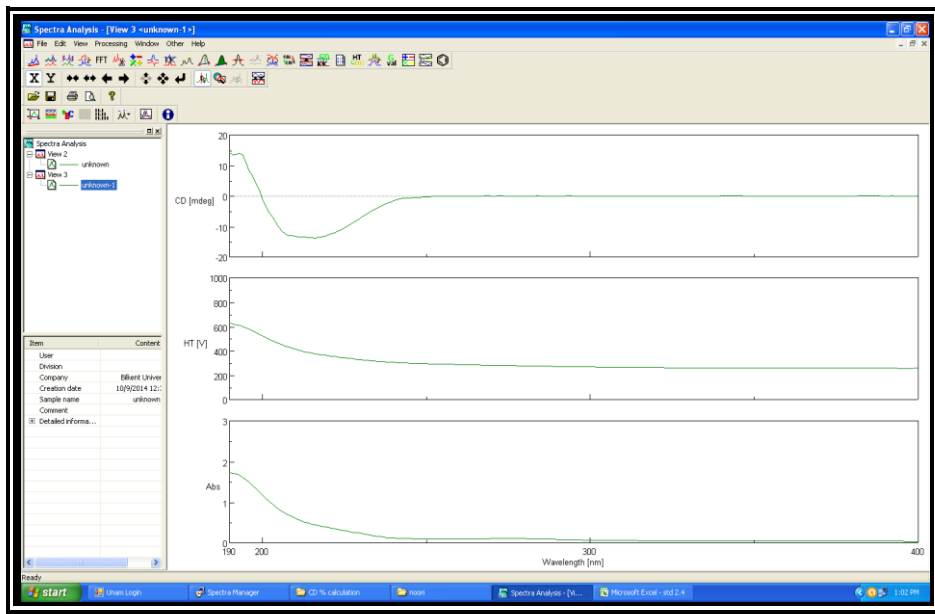
الشكل (8) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي بواسطة SDS-PAGE باستخدام بروتينات معلومة الوزن الجزيئي

ابعاد (0.2 سم) وقد تم الحصول على نسبة مئوية لالفا-الكلزوني (1.32%) ، (1.34%) لكل من المحلول القياسي بتركيز (2.5 بيكومول/ لتر) ومحلول النموذج المستخدم (1.4 بيكومول/ لتر) على التوالي .وهذا يدل على التطابق القريب جدا بين المحلول القياسي ومحلول النموذج. كما هو موضح بالشكل (1-9) للمحلول القياسي . والشكل (10-1) لمحلول النموذج الحزمة (B).

4- تقدير التركيب الثانوي للكوبيبتين (الفا-الكلزوني) باستخدام تقنية ازدواجية اللون
تم تقدير التركيب الثانوي للكوبيبتين بواسطة تقنية (CD) لكل من المحلول القياسي للكوبيبتين وكذلك محلول النموذج الحزمة (B) المنقى جزئيا بتقنية الترشيح الهلامي . وقد استخدم مدى من اطول موجية (190-400 نانومتر) وبدرجة حرارة الغرفة باستخدام خلية كوارتز ذات



الشكل (9) تقنية (CD) للمحلول القياس للكوبيبتين



الشكل (10) تقنية (CD) لمحلول النموذج الحزمة (B) .

المصادر

- Holwerda, D.A.(1972) "A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries characterization". Eur J Biochem.;28: 334–339..
- Brunton, L.; Chabner, B. and Knollman, B. (2011)" editors. Goodman and Gilamn's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. China: McGraw-Hill companies.
- Hammarsten, O. and Goetze, P.J.(2012)" Copeptin: A new peptide in clinical measurement". Kilnisk Niokemi I Norden. 1:22-29.
- Morgenthaler, N.G.; Struck, J.; Alonso, C. and Bergmann, A.(2006)" Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin". Clin. Chem. 52(1):112-119.
- Morgenthaler ,N.G.(2010)" Copeptin: A biomarker of cardiovascular and renal function". Congest Heart Fail.16(4)(suppl 1):S37-S44.
- Hanoune, J.(2010)" The neurohypophyseal system: synthesis and metabolism of vasopressin". In: Laycock, J. F. "Perspectives on vasopressin". London: Imperical college press.
- Morgenthaler, N.G.; Muller, B.; Struck, J.; Bergmann , A.; Redl , H. and ChristCrain, M.(2007)" Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock". Shock. 28(2):219–26.
- Yalta , K.; Yalta, T.; Sirvi, N. and Yetkin, E. (2013)" Copeptin and cardiovascular disease: A

- review of a novel neurohormone". *Inter. J. Cardiol.* 167(5):1750-1759.
9. Keller, T.; Tzikas, S.; Zeller, T.; Czyz, E.; Lillpopp, L.; Ojeda, FM.; Roth, A.; Bickel, C.; Baldus, S.; Sinning, CR.; Wild, PS.; Lubos, E.; Peetz, D.; Kunde, J.; Hartmann, O.; Bergmann, A.; Post, F.; Lackner, KJ.; Genth-Zotz, S.; Nicaud, V.; Tired, L.; Münzel, TF. and Blankenberg, S. (2010) "Copeptin Improves Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction" *J Am Coll Cardiol.* 55 (19):2096–2106
10. Schacterle, G.R. and Pollack, R. L. (1973). "A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein biological material". *Anal. Biochem.* 51(2): 654-655.
11. Robyt, F.J. and White, J.B.(1987) "Biochemical techniques: theory and practice" Book Cole publishing Co.,USA.,141,235-236,246,263,269
12. Plummer, T.D.(1978) "An introduction of partial biochemistry" 2nd ed., McGraw-Hill Book; Co. V.K., 48, 52, 174, 270, 274.
13. Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* 227(5259):680-685.
14. Uysal, M.A. ; Bekar, N.; Demirer, E.; Sancak, M. and Yilmaz, V. (2013) "Serum Copeptin Levels and its Relation with Other Inflammatory Markers in Acute Exacerbation of COPD" *J Ann Eu Med* ;1(3): 56-61
15. Lowery, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with folin-phenol agent". *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.
16. Holme, D.J. and Peck, H. (1988). "Analytical Biochemistry". John Wiley and Sons. Inc., New York, 86.
17. Maisel, A.; Mueller, C.; Neath, SX.; Christenson, RH.; Morgenthaler, NG.; McCord, J.; Nowak, RM.; Vilke, G.; Daniels, LB.; Hollander, JE.; Apple, FS.; Cannon, C.; Nagurney, JT.; Schreiber, D.; deFilippi, C.; Hogan, C.; Diercks, DB.; Stein, JC.; Headden, G.; Limkakeng, AT.; Jr, Anand, I.; Wu AH, Papassotiriou, J.; Hartmann, O.; Ebmeyer, S.; Clopton, P.; Jaffe, AS. and Peacock, WF.(2013) "Copeptin Helps in the Early Detection of Patients With Acute Myocardial Infarction" *JACC.* 62 (2):151-160
18. Mastropietro, W.C.; Mahan, M.; Valentine, M.K.; Clark, A.J.; Hines, C.P. ;Walters, L.H.; Delius, RE.; Sarnaik, AP. and Rossi, NF.(2012) "Copeptin as a marker of relative arginine vasopressin deficiency after pediatric cardiac surgery". *Intensive Care Med.*38(12):2047-2054.
19. Okubo, T.; Suzuki, T.; Yokoyama, Y.; Kano, K. and Kano, I. (2003). "Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diesters and monoesters by MCF-7 cell proliferation assay in vitro". *Biol. Pharm. Bull.*, 26(8): 1219-1224.
20. Ferguson, K.K.; Cantonwine, D.E.; Rivera-González, L.O.; Loch-Carusio, R.; Mukherjee, B.; Anzalota Del Toro, L.V.; Jiménez-Vélez, B.; Calafat, A.M.; Ye, X.; Alshawabkeh, A.N.; Cordero, J.F.; Meeker, J.D.(2014) "Urinary phthalate metabolite associations with biomarkers of inflammation and oxidative stress across pregnancy in Puerto Rico". *Environ. Sci. Technol.*48(12):7018-7025
21. Kutzman, RS.; Meyer, G-J. and Wolf, AP. (1980) "Biodistribution and excretion of [¹¹C]benzaldehyde by the rat after two-minute inhalation exposures". *Xenobiotica.*, 10(4): 281–288
22. Fiedler, N.; Laumbach, R.; Kelly-McNeil, K.; Liroy, P.; Fan, Z-H.; Zhang, J.; Ottenweller, J.; Ohman-Strickland, P. and Kipen, H.(2005) "Health Effects of a Mixture of Indoor Air Volatile Organics, Their Ozone Oxidation Products, and Stress" *Environmental Health Perspectives* ,113(11):1542-1548

Isolation and purification of copeptin hormone from serum of patients with heart disease

Thikra Ali Allwsh, Noori Mohammed Aziz

Department of Chemistry, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

This study included isolation and purification of copeptin hormone from heart disease patients serum using different biochemical techniques. The study showed two proteinous peak has been isolated by gel filtration (Sephadex G-50) from the precipitation by cold acetone, the results predicted that (peak B) has a high concentration of copeptin. Furthermore, the purity of the isolated copeptin (peak B) had been identified by SDS-poly acryl amide gel electrophoresis and the reverse phase high performance liquid chromatography in which results showed a good identity in retention time between the standard and the isolated copeptin (peak B).

The approximate molecular weight of partially purified copeptin peak (B) was (4654±400 Dalton, 4513±400 Dalton) using gel filtration chromatography (Sephadex G-50) and (SDS-poly acryl amide gel electrophoresis) technique respectively.

The study of secondary structure (α -helix) to copeptin hormone by the (Circular Dichroism) showed the percentage of the (α -helix) between the standard solution of copeptin and sample solution (peak B) was good match.