استخلاص وتنقية الالبومين من بلازما الدم البشري

سوسن سلمان عطية* سعود رشيد العالي* حسنة وضاح معيبد*
صبا عبد الآله عباس* سعاد عبد علي عطية* لمى منعم كريم*

استلام البحث 9، حزيران، 2010
قبول النشر 26، تشرين الاول، 2010

الخلاصة :

تستخدم محاليل البومين المصل البشري منذ سنوات كسوائل بديلة لبلازما الدم ، تم الحصول في هذه الدراسة على محاليل البومين جديدة من خلال فصلها بطريقة التبادل الايوني بالاعمدة حيث تضمنت هذه الدراسة وصفاً لطريقة تنقية البومين مصل الدم البشري بتقنية جديدة ، اذ تم تحوير طريقة التنقية باستخدام اعمدة كروماتوغرافيا التبادل الايوني ومقارنتها مع الطريقة التقليدية المتمثلة بطريقة ترسيب الالبومين بكحول الايثانول البادر .

قورنت الطريقة التقليدية باستخدام كحول الايثانول مع الطريقة المحورة باستخدام التبادل الآيوني بالاعمدة ، اذ اثبتت طريقة الاعمدة تفوقها على طريقة التقليدية من حيث الكمية والنقاوة ، اذ بلغ الناتج النهائي لطريقة الاعمدة حوالي (69.32 %) وبدرجة نقاوة حوالي (83.45 %) اما الطريقة التقليدية فكانت (60.30 %) و (80.71 %) على التوالي .

تتميز محاليل الالبومين خلال المعاملة بهذه الطريقة المحورة بعدم وجود اية مرسبات فيها ، واستنتج من هذه الطريقة بأن الناتج النهائي لمحاليل الالبومين عالي النقاوة مقارنة بطريقة الترسيب البارد بكحول الا يثانول التقليدية .

الكلمات المفتاحية: الالبومين ، بلازما الدم البشري

المقدمة :

يعتبر دم الانسان نسيج ذو تعقيد كبير (عناصر , كريات حمر ،كريات دم بيض ن بروتينات ... الخ) اذ يكون الالبومين حوالي نصف بوتينات البلازما , يبلغ وزنه الجزئي حوالي 69.000 دالتون ويمتلك نقطة تعادل كهربائي واطئة حوالي (4.7) ، محتوى الجسم منه حوالي (4-5) غم / كغم [1] ، ثلث منه يوجد في الدوران وثلثين خارج الاوعية قريبة من الجلد لهذا نجد الاحمرار بعد حدوث الحروق [2] .

هناك اهمية طبية لمحاليل الالبومين كبيرة من اجملها نم البحث والتقصي عن طرق استخلاصها بتراكيز مختلفة منها 5 % ، 25 % والتي تعالج الحالات المرضية التالية وهي : (hypvolemia ، cardio pulmonary ، surgary ، hypoalbnminemia واخيراً امراض الدم التحليلية لحديثي الولادة Haemolytic Disease of Bar[3]) . كما يستخدم الالبومين كمادة مجففة مثالاً كجسم متضرر ، او كجسم رابط Ligand ، جسم سيطرة ، جسم قياسي ، او كجسم اتحادي Conjucation في معظم العمليات المناعية التي تتطلب بروتين عالي النقاوة [4,5] .

ان فصل مكونات البلازما الى الى اجزاء تم بحسب الطريقة التقليدية للباحث (cohn,1950) باكبر قدر ممكن من النقاوة لدراسة خواصها والاستفادة منها ، هناك اربع متغيرات في هذا النظام تحدد قابلية الذوبان هي الاس الهيدروجيني ، تركيز الملح ، درجة الحرارة والبروتين في البلازما [6,7] .
اذ استخدم الباحث تراكيز مختلفة من كحول الايثانول بدرجة حرارية واطئة المستوى الملائم بسائل عضوي اذ امكن المحافظة على تركيز الالكتروليت ضمن نطاق واطئ تعتمد فيه التفاعلات مع البروتين على القوى الآيونية وخواص البروتين الالكتروكيميائية الخاصة .
ان طريقة التنقية تعتمد اساساً على طريقتين هما الترسيب البارد بكحول الايثانول باستخدام مواد كيميائية هي ميثانول ، كبريتات الامونيوم ، بولي اثلين كلايكول المنظفات السالبة ، اما الطريقة الثانية هي الترشيح والذي يتم الفصل فيها بالمواد الصلبة [8] .
هناك نوعان من اعمدة التبادل الايوني العمود الاول مبادل سالب ضعيف يتراوح عمل الاس الهيدروجيني بين (6-13) , اما الثاني مبادل موجب

*وزارة العلوم والتكنولوجيا .

ضعيف والذي يعمل بين (2-9) من الاس الهيدروجيني , ويعتبر عمود الفصل (– DEAE Sepharose - CM) , (Sepharose) افضل من (DEAE- Sepharose) مع (– SP sephadex C-So) في فصل الجزيئات وتنقيتها [9].

المواد وطرائق العمل :

جمع البلازما : تم الحصول على اكياس البلازما من مصرف الدم في بغداد ، والقيام بترشيحها من خلال شاش طبي وذلك للتخلص من الدهون مع الياف الفايبرين والمواد المانعة للتخثر ثم طردت بعدها مركزياً بسرعة (10000) دورة / الدقيقة وبدرجة حرارة 4 ْم لمدة خمس دقائق للتخلص من المواد غير الذائبة في البلازما ، ثم قسمت البلازما الى جزئين متساويين اوخذ الجزء الاول بطريقة الترسيب البارد بمادة الكحول الاثيلي الموسومة من قبل (cohn) [10] . والتي تتكون من مراحل اربعة حيث يضاف اليها دارئ مع الكحول الاثيلي بتراكيز مختلفة باستخدام درجات حرارة منخفضة واوخذ الجزء الثاني من الكروموتوغرافيا لأعمدة الفصل ولكن هناك خطوات قبل البدء بعملية التبادل الآيوني بالاعمدة والتي تذكر مفصلا ادناه :

الترشيح الهلامي : في الاعمدة امرر المحلول الناتج على عمود ذي ابعاد (30□15) سم هلام السيفادكس sephadex G-2S وزن 5.3 غـــم ينتج من قبل شركة (phermacia fine chemicals Uppsala-Sweden) مع محلول الغسل sodium –acetatphuhher بتركيز (0.025) مولاري بدرجة 4 ْم ، معدل جريان 21 قطرة / الدقيقة .

النبذ المركزي : عدل الاس الهيدروجيني الى (5.2) بمادة الخلات المخفضة وتترك الى ان تم ترسيب الكلوبيولينات الحقيقية ، وتم التخلص منها بجهاز النبذ المركزي بسرعة (10.000دورة / الدقيقة) بدرجة حرارة 4 ْم لمدة عشرة دقائق وادخال الراشح خلال وحدة الترشيح المعقم (0.20) ملي مايكون وكان المحلول النهائب الناتج محلول معقم ورائق .

كروموتوغرافيا التبادل الآيوني : امرر المحلول الرائق على عمود الفصل النوع الاول DEAE (–sepharose sl-6B) ذو ابعاد (15□3) سم والنوع الثاني (CM-sepharose sL-6B) ذو ابعاد (15□3) سم واستخدم دارئ الفصل (Sod. acetate) ذو اس هيدروجيني مختلف وهو كالآتي : دارئ الفصل للعمود الاول رقم الدرائ (5.3)PH ورقم الدارئ الثاني(4.5)PH ، (4)PH محلول الغسل ، اما (5.2)PH هو محلول الموازنة اما ارقام دارئ الفصل للعمود الثاني وهو الرقم الاول وهي كالآتي : pH (4.8) ورقم الثاني pH(5.5) ، pH(8.1) محلول الغسل (4.8)PH محلول الموازنة تم العمل بدرجة حرارة 4 ْم ومعدل جهاز جامع الاجزاء حوالي 28 مل / ساعة في بداية الامر يتم تنشيط العمود الاول بمادة هيدروكسيد الصوديوم (NaoH) تركيزها 0.5 مولاري والعمود الثاني بحامض الهايدروكلوريك اسيد (Hcl). لمدة يوم ، يتم غسل الاعمدة بماء متعادل خلال الليل حسب تعليمات تنشيط اعمدة التبادل الآيوني قبل استخدامها في فصل الجزيئات حيث يتم اضافة 3 مل من الدارئ المذكور سابقاً الى العمود مع اضافة المحلول الرائق ومساعدتها على النزول وذلك بمزج اعلى العمود اذا كانت لزجة اما محاليل الاجزاء الناتجة من جهاز جامع الاجزاء التي تعطي قمة واضحة من عملية الفصل الاخيرة في العمود الثاني يتم ترشيحها من خلال وحدة الترشيح المعقم بحجم (0.20) ملي مايكرو وهذه العملية تتم بين مرحلتي الفصل بالاعمدة والاحتفاظ بجزء صغير من راشح كل مرحلة فصل بالاعمدة لقياس تركيز البروتين والالبومين فيها فيما بعد ، ثم نجمع المحاليل الناتجة من مرحلة الفصل الاخيرة للمرحلة التالية وهي الترشيح الفائق لزيادة تركيز الالبومين .

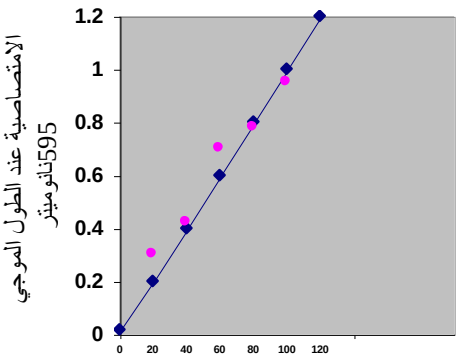
الترشيح الفائق : عدُل الاس الهيدروجيني للمحلول الرائق المنتج من المرحلة السابقة لبى pH (7) لكي يتم وضعه في جهاز التؤشيح الفائق Ultra Filration تحت ضغط غاز النتروجين حوالي psi 110 (6.7 atm) وبدرجات حرارة منخفضة جداً باستخدام عمود (2.5 × 50) سم فيه هلام 10.5 غم من (Sephacry L – S-200) من دارئ الفصل محلول كلوريد الصوديوم ذو عيارية 0.05 بدرجة حرارة 4ْ م معدل جريان 12 مل / ساعة .

ثم تجمع محاليل الاجزاء الناتجة وتوضع مرة ثانية في جهاز الترشيح الفائق للتخلص من الماء وتركيز ناتج المحلول النهائي .

قياس تركيز البروتين :

رسم المنحني القياسي للبروتين حسب طؤيقة برادفورد (14) وفق العلاقة بين تراكيز البروتين المقدرة بمايكروغرام / مل والامتصاصية عند الطول الموجي 595 نانوميتر واستخرجت معادلة الخط المستقيم .

ويتم الحصول الناتج الطاقي المحتوي على الالبومين ويقاس نسبة تركيز البروتين والالبومين . وبعدها تم اخذ الناتج واجزاء عملية الترسيح الهلامي له .



تركيز بروتين البومين الدم البقري ملغم /مل

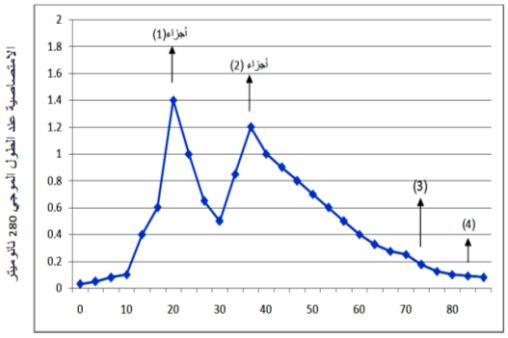
شكل (1) المنحنى القياسي للبروتين

قياس تركيز الالبومين: تؤخذ الاجزاء النافذة من كل مرحلة من مراحل الاستخلاص والتنقية لكلا الطريقتين المعتمدتين بالبحث حسب الطريقة اللونية (كوستاف سون) [11] ويعمل لها تحليل (**Bromocresol green**)لتحديد تركيز الالبومين لكل مرحلة من مراحل الاستخلاص والتنقية .

-المعاملة الحرارية :يتم تعريض الناتج النهائي للمحاليل الالبومين الخارجة من جهاز الترشيح الفائق لدرجة حرارة حوالي 60 مْ لمدة 10 ساعة بوجود المواد المثبتة التالية بتركيز (0.02) مولار sod- tryptophan & caprylic acid acetyl.

النتائج والمناقشة:

بعد استخلاص الالبومين تم التخلص مبكرا من المواد المضاده للتخثر والتي تتكون من Citric acid, tri-Sod.Citrate ,NaH_2Po_4 المضافة الى البلازما اثناء عملية سحب الدم اذ اظهرت نتائج الترشيح الهلامي الاول للـ Sephadex G-25 وجود قمتين من المواد البروتينية الشكل (2)

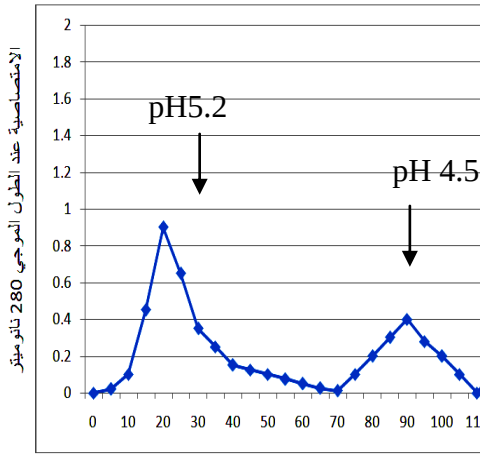


رقم الجزء (fraction no.)

شكل (2) الترشيح الهلامي المرحلة الأولية للتنقية البلازما خلال عمود Sephadex G-25 قياس (30×1.5) معدل جريان 12مل /ساعة بحجم ml 4 للجزء غسل بداري خلات الصوديوم(0.025M) بدرجة حرارة 22 مْ .

اذ تمثل اجزاء رقم (1) الاجسام المضادة نوع IgG تم تحديدها من خلال الترحيل الهلامي للبروتينات . اما الاجزاء رقم (2) فتمثل الالبومين بعد انتهاء عملية الترشيح الهلامي جمعت الاجزاء النافذة من العمود والغنية بالمواد البروتينية اذ اظهرت هذه العملية حصول على محاليل رائقة من البلازما .

بينما اظهرت المرحلة الأولى للاستخلاص والفصل على عمود التبادل الآيوني الاول (DEAE-Sephrose CL-6B) ظهور قمتين للاجزاء البروتينية كما يوضحها الشكل (3) .



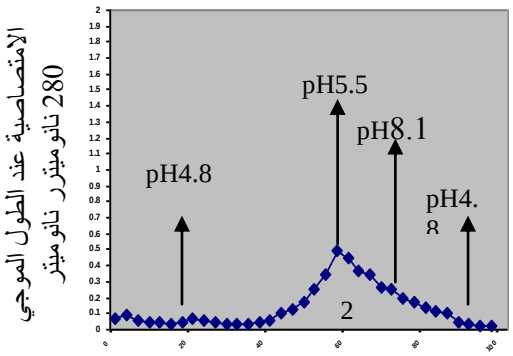
رقم الجزء (fraction no.)

شكل (3) طريقة كروموتوغرافيا اعمدة الفصل

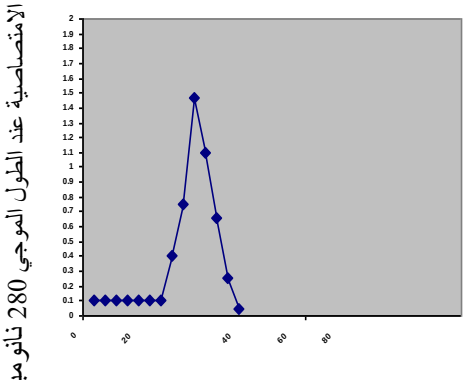
المرحلة الأولى للفصل على عمود التبادل الايوني DEAE- SEPHAROSE CL-6B الاجزاء رقم (1) IgG ، أما ألاجزاء رقم (2) فتمثل الألبومين .

اذ تمثل القمة الاولى الكلوبيولينات والتي تكون عادة نوعها IgG اما القمة الثانية فتمثل الالبومين وذلك بعد قياسه طبعا ، وبالتالي انتج محاليل رائقة ومعقمة [12,15]

اما المرحلة الثانية من الفصل تمت على عمود التبادل الآيوني الثاني (CM-Sepharose CL-6B) اظهرت النتائج ظهور قمة واحدة مقاسة على طول موجي 280 nm اذ تعتبر هذه المرحلة بالنسبة للالبومين تنقية اضافية له اذ لوحظ عند استخدام دارئ الخلات ذو أس هيدروجيني (4.8) وجود قراءات واطئة الامتصاصية على نفس الطول الموجي ، لكنها عند استخدام دارئ الخلات ذوالأس هيدروجيني (5.5) بدأت القراءات بالارتفاع كما وضحها الشكل (4) .



شكل (4)طريقة كروموتوغرافيا اعمدة الفصل المرحلة الثانية من الفصل على عمود CM-SEPHAROSE CL-6B ا



شكل (5) الترشيح الهلامي المرحلة النهائية لتنقية الالبومين باستخدام عمود هلام Sephacryl S-200 (50 × 1.5) سم .

بينما اظهرت نتائج الترشيح الهلامي على عمود (Sephacryl S-200) وجود قمة واحدة عند قياسها على طول موجي280 nm كما هو واضح في الشكل (5) .

ان في هذه المرحلة من الترشيح الهلامي يتم استبعاد العكورة التي تظهر اثناء الخزن عكس ما اظهرته طريقة الباحث (Cohn,1950)(10) وهو وجود عكورة أو ضبابية اثناء البسترة او الخزن مع وجود المواد المثبتة . ان طريقة الفصل بالاعمدة تعطي محاليل سهلة التعقيم والتي عرضت الى حرارة حوالي 60 0م لمدة 10 ساعات مع وجود المثبتات وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث (Curling,1980) [12]. بينت نتائج حساب قيمة الناتج ومقدار النقاوة لمحاليل الالبومين لجميع مراحل الاستخلاص والتنقية لكلا الطريقتين المعتمدتين في البحث كما هو واضح في جدول (1) .

جدول (1) يبين خطوات تنقية الألبومين لكلا الطريقتين مع نسبة تركيز البروتين الكلي مع نسبة تركيز الالبومين مع نسب قيم الناتج والنقاوة لكل مرحلة من مراحل الاستخلاص والفصل.

جدول (1) يبين خطوات تنقية الألبومين لكلا الطريقتين مع نسبة تركيز البروتين الكلي مع نسبة تركيز الالبومين مع نسب قيم الناتج والنقاوة لكل مرحلة من مراحل الاستخلاص والفصل.

اسم مرحلة الاستخلاص او الفصل	تركيز البروتين الكلي mg/ml	تركيز الالبومين mg/ml	نسبة ناتج الالبومين المئوية %	نسبة نقاوة الالبومين المئوية %
*المرحلة الاولية (البلازما الاولية) /لتر	60.92	32.38		
*طريقة (1) (الجزء II&I)	125.27	23.85	82.55	72.53
*طريقة (2) مرحلة الترشيح Sephadex G-25	115.27	24.89	75.69	76.68
طريقة (1) (الجزء IV-1 +III)	109.08	23.59	71.62	71.74
طريقة (2) مرحلة عمود DEAE	115.39	23.11	75.76	71.39
طريقة (1) (الجزء IV-4)	115.20	24.59	75.64	74.78
طريقة (2) مرحلة عمود CM-	110.20	26.17	72.35	80.82
طريقة (1) (الجزء V)	91.85	26.54	60.30	80.71
طريقة (2) مرحلة الترشيح بـ Sephacryl S-200	105.58	27.02	69.32*	83.45*

طريقة(1) الترسيب بكحول الايثانول البارد (Cohn)
طريقة (2) : طريقة الفصل بالاعمدة .
* 69.32: قيمة الناتج عالية بالنسبة لطريقة (2)
*83.45 : قيمة النقاوة اعلى بالنسبة لطريقة (2)

ارتفاع في قيم الناتج والنقاوة للالبومين المستحصلة بطريقة الفصل بالاعمدة ، اذ قدرت حوالي 69.32 % و 83.45% حسب الترتيب المذكور ، بينما كانت قيمة الناتج والنقاوة لطريقة Cohn حوالي 60.30% و 80.71% حسب الترتيب المذكور .

*نستنتج بان طرق كروموتوغرافيا التبادل الآيوني اكفأ من طريقة الترسيب البارد بكحول الايثانول التقليديةللباحث (Cohn, 1950)[10] لانها تسمح بتحضير كمية ناتج جيدة من محاليل الالبومين افضل من الطريقة التقليدية اذ تتميز طريقة كروموتوغرافيا التبادل الآيوني ببساطتها وسرعة انجازها ، واقتصاديا غير مكلفة وان استخدام هذه الطريقة لعمود الفصل DEAE- الذي يعتبر فعال ويسمح بمعدل جريان عالي وسعة عمود جيدة

واستعادة ناتج بصورة جيدة اذ يمكن اكمال عمليات الفصل خلال مدة اسبوع ، اما فقدان الالبومين خلال عمليات الفصل فيكون اقل من الطريقة التقليدية ، اذ تبلغ النسبة حوالي 1% خلال مراحلها الاولية،اما 5% خلال مرحلتي الفصل بإعمدة التبادل الآيوني (CM & DEAE) عكس الطريقة التقليدية الذي يكون الفقدان والخسارة للالبومين خلال المرحلة (4) ، اما طريقة الفصل بالاعمدة يكون استحصال للـ(elution) احسن وامثل بحيث يعطينا ناتج احسن لأنه يتميز بانه عديم اللون ، خالي من الفيروسات ، ثابت ، عالي النقاوة وبالنتيجة نضمن امان لمحاليل الالبومين الصيدلانية المعدة للحقن في المرضى مع معدل اعراض جانبية اقل وهذا يتفق ما ذكره الباحث Wolf [13] .

المصادر:

1- Zhang Y, Yang G, Zhang X, Zhao J , Cail , Chen Y . 2005." Separation and Purification of Proteins on monolithic anion – exchange columns ". Sepu 23. P : 219 -22 Chinese .

2-. Xu Y , Ding Z. 2004 . " Anovel method for simultaneous Purification of albumin and immuno globulin G . " Prep . Biochem . Biotechnol . 34 (4) , p: 377- 85 .

3- Asakawa-S,.Fujiwara–H,Naito-S,Homma-R,Ishido-S,chino-F, Tsuchiya – M, Mutsurra-S, Tanaka-S, ohki-M. 1994. Application of the limulus test for practical quality control on endo toxin content in commercial human serum albumin products. In comparison with the rabbit pyrogen test. Yakugaku – Zaschi. NO. $114^{(11)}$ P: 888-93.

4- Johnston A , Uren E , Johnston D , WuJ . 2003. "LowpH , Caprylate incubation as a second viral inactivation step in the manufacture of albumin Parametrc and validation studies . Biologicals (3) , P : 212 – 21 .

5-Oliva, A., Santovena, A., etal 1999. Stabilit Study of human Serum albumin pharmaceutical preparationss. J. pharm. pharmacol., 51(4), P:385-42 .

6-Adock, W.L., MacGregor, A., etal .1998. Chromatographic removal and heat inactivation of hepatitis A virus during manufacture of human albumin. Biotechnol. Appl. Biochem. Vol-28(pt.1), P:85-94.

7- Pabst TM, Antos D, Carta G, Ramasubroman yan N, Hunter AK . 2008. "Protein separations with induced pH gradients using cation–exchange chromatogrghic columans containing weak acid groups " J . Chromatogr . A. 15;11 81(1-2) P: 83-94

8-. Annex 14- 2001. Manufacture of products derived. Annex 14-(2001). Manufacture of products derived from Human Blood or Human plasma. Website// Annex-14 (Denmark). P:131-135.

9- Yan Q. Zhe D. 2001, chromatography on DEAE ion – exchange and protein G affinity columns intandem for the sepation and purification of proteins , Journal of Biochemical and Biophysical methods Vol. 49 , Issnes 1-3, 263 – 273 .

10- 10.Cohn, E.J., Gurd, F.R.N., Surgenor, D.M.,Barner, B.A., Brown, R.K., Derounans,G , Gillespie , J.M.K, Kahnt, F.W. ,lever, W.F., liu, C.H., Mittelman, D., Mouton, R.F., schmid , K.& Uroma , E. 1950 . Asystem For the separation of the components of Human Blood: Quantitative procedures For the s- eparation of the protein components of Human plasma . J. Am Chem. Soc, 72, P:465-474.

11- Gustafsson, J.E.C. 1976. Improved specificity of serum albumin Determination and estimation of acute phase reactants by use of the Bromo cresol green Reaction Clin. Chem.22,:616-622

by ion exchange chromatography. Vox sang. 70(4), P:198-202.
14- .BradFord, M.M. 1976. Arapid and sensitive method For the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding.Anal.Biochem.72, P:248-254.
15 -Anderson , L.O.: serum albumin , In " Plasma Proeins" 2 nd. ed. Edited by, Blombăek, B., Han son , L. A., Awiley- Interscience Publication, 1979, P:43-71.
12-Curling, J.M.: Section (2). Albumin purification by Ion Exchange chromatography. In((Methplasma protein Fractionation,)) 1st ed,. Edited by Curling, J.M. Academic press, Asubsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, publishers, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. 1980. P: 77-90.
13- WOLF – YI Kronenberg H., Dodds A., Miach P., Isbister J., Levidiotis M., Deark. 1996. A safety study of Albumex 5 , a humen albumin solution Produced

Extraction and Purification of albumin from Hunan plasma

S.S. Atia* S.R.Alani* H.W. Muaibed* S.A.A.Abaas* S.A.Atia L.M.Kareem*

* Ministry of Sciences and Technology .

Abstract:

This study includes adescription of Human serum Albumin by amodified using ion-exchange chromatography with manipulated comparison with cold ethanol precipitation method , It has been nticed that this procedure is superior orer the classical method . The Final yield by the new method 69.32% with purity of 83.42% compared with cohn which yield 60.30 % with purity of 80.7 % .

The new method prored that it suitable for the pusi Fication of such material because it yield no precipitation material and it increases the Final yield of albumin solutions .

- Human serum Albumin .
- Albumin purification .
- Ion – exchange chromatography .
- Human plasma .
- Albumin extraction .