

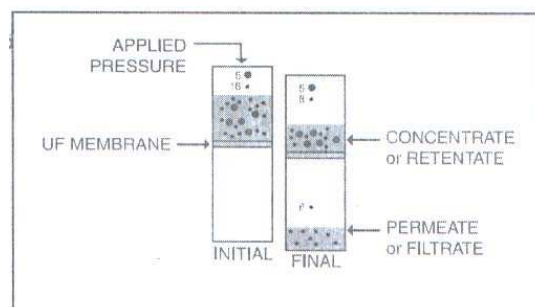
1-2. تصفیه (دیافیلتریشن):

روشی موثر و سریع برای نمک زدایی یا تغییر بافر نمونه های بیولوژیکی دیافیلتریشن روشی است که غشاهای فراپالایش (پالایش از لا به لای صافی ای که قادر به گذراندن ذرات بسیار و ریز میکروسکوپی باشد) را برای تغییر، جابجایی یا کم کردن غلظت نمک یا مواد حل شده در محلول که شامل پروتئین ها، پپتیدها، نوکلئیک اسید و مولکولهای دیگر می باشد، مورد استفاده قرار می دهد. که در این حال با انتخاب صافی های غشاء نفوذپذیر (تراوا) برای جداسازی اجزا محلول بسته به اندازه مولکول به کار می رود. یک غشا فراپالایش مولکول هایی را که بزرگتر از منافذ غشا هستند را در خود نگه می دارد، در حالی که مولکولهای کوچکتر مثل نمک و مواد محلول در آب که قابلیت نفوذپذیری 100% دارند، به راحتی از غشا عبور می دهد. در اینجا ما مفاهیم مربوط به غلظت پروتئینی و دیافیلتریشن را شرح داده و روش های مختلف اجرای دیافیلتریشن و تاثیر آنها روی مراحل زمان، حجم، ثبات و بازیافت را مقایسه می کنیم.

غلظت:

مواد محلول از طریق غشایی که به عنوان تغلیظ یا ابقا (حفظ کردن) شناخته شده در محلول حفظ می شود. مواد محلول از درون غشایی می گذرند که صافی

یا تراوش نامیده می شود. یک غشاء، براساس خصوصیت دفعش برای نمونه ای که غلیظ می شود، انتخاب می شود. طبق یک قاعده کلی، وزن مولکول برای غشاء (MWCO) باید $1/3rd$ تا $1/6th$ وزن، مولکولی باشد که از غشا عبور نمی کند. این یک ابقا کامل است. هر چند MWCO به آن نمونه (محلول) نزدیک تر باشد، تشکیل ضایعات کوچک هم در طول مراحل غلظت بیشتر می شود. میزان جریان غشا (میزان جریان صافی در هر واحد غشا) به اندازه منفذ ارتباط دارد. هر چه اندازه منفذها کوچکتر باشد، میزان سرعت جریان غشاء برای همان فشار به کار رفته، کمتر می شود. بنابراین وقتی غشایی برای غلظت / تصفیه انتخاب می شود باید به عامل زمان در مقابل بازیافت توجه داشت. در بسیاری از کاربردهای



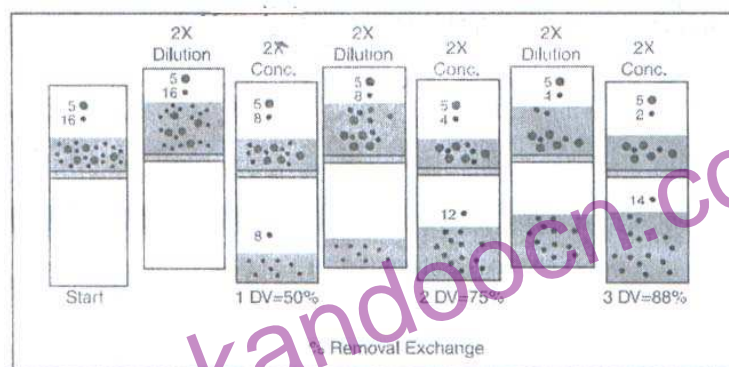
بیولوژیکی، عامل بازیابی مهمتر از عامل زمان است. مرحله زمان همیشه می تواند با افزایش میزان سطح غشا به کار برده، کاهش یابد. شکل 1 نمونه یک محلول غلیظ را نشان می دهد.

غلظت نمونه با تصفیه (دیفیلتریشن)

در این نمونه غشا تصفیه‌ای مناسبی قرار داده شده که مولکول‌های بزرگ را در خودنگه می‌دارد. فشار تا زمانی وارد می‌شود که نصف حجم محلول از غشا عبور کند. مولکول‌های بزرگ در نصف حجم اصلی (محلول غلیظ) باقی می‌مانند که در این بخش نصف مولکول‌های نمک هم قرار دارند. تصفیه، نصف دیگر مولکول‌های نمک را در بر می‌گیرد و شامل هیچکدام از مولکول‌های بزرگ نمی‌شود. بنابراین، مولکول‌های بزرگ به عنوان مایع غلیظ می‌شوند و نمک خارج می‌شود. مولکول‌های نمک به تناسب حجم در غلظت، ثابت می‌مانند پس قدرت یونی محلول غلیظ شده نسبتاً ثابت باقی می‌ماند. قدرت یونی محلول غلیظ می‌تواند با «شستن» نمک باقیمانده کاهش یابد. این مرحله تصفیه نامیده می‌شود. مرحله رقیق‌سازی هم بسیار مهم است که بعد از مرحله غلظت، انجام می‌شود. در حالی که صافی خارج می‌شود، آب هم اضافه می‌شود اگر محلول شستشو، به جای آب، بافر دیگری باشد، نمک بافر جدید در نمک اولیه موجود در نمونه، جایجا خواهد شد.

1-1-2. تصفیه ناپیوسته - رقیق‌سازی مداوم (پی در پی):

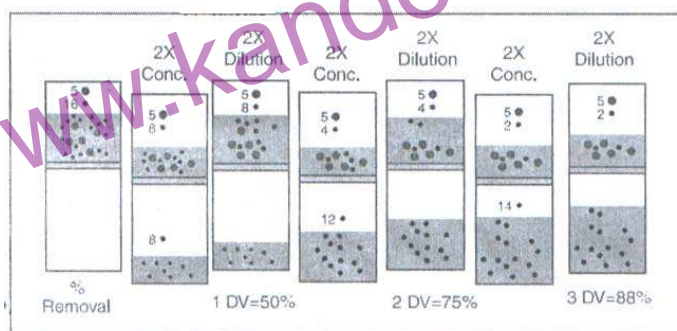
در این روش ابتدا نمونه را با آب یا بافر دیگر، به حجم از پیش تعیین شده، رقیق می کنند. سپس نمونه رقیق شده با فرایالایش، غلیظ شده و به حجم اصلی اش بر می گردد. این مرحله آن قدر تکرار می شود تا زمانی که نمک، مواد حلال در محلول یا مولکول های کوچکتر خارج شوند. با هر مرحله رقیق سازی مداوم، مولکول های کوچک بیشتری خارج می شوند. همان طور که در شکل 2 نشان داده شده این نمونه معمولاً با یک حجم مشخصی از بافر رقیق می شود (1DV). در صورتی که مخزن به اندازه کل حجم جا داشته باشد متناوباً چندین حجم می تواند به یکباره اضافه شود، رقیق سازی کم کم چسبندگی را کم می کند که این عامل ممکن است میزان جریان صافی را افزایش دهد.



تصفیه ناپیوسته - رقیق سازی مداوم

2-1-2. تصفیه ناپیوسته - کاهش حجم:

در این روش ابتدا نمونه با یک حجم از پیش تعیین شده غلیظ می شود و سپس محلول رقیق شده با آب یا بافر دیگری به حجم اصلی اش بر می گردد. این عمل آنقدر تکرار می شود تا نمک، مواد حلال در محلول و مولکول های ریز خارج شوند. با هر مرحله غلیظ سازی و رقیق سازی مولکول های ریز بیشتری خارج می شوند.



رقیق سازی ناپیوسته (منقطع) با کاهش حجم

بعد از اینکه آخرین محلول بافر برای تکمیل مرحله رقیق سازی اضافه شد، نمونه ممکن است قبل از تجزیه یا مرحله بعدی تصفیه غلیظ شود. آخرین محلول به دست آمده بعد از تصفیه با هر روشی (کاهش حجم ناپیوسته 2X یا رقیق سازی مداوم) به اندازه همان حجم و غلظت شروع رقیق سازی است. غلظت نمک به

طور مساوی در هر دو نمونه کاهش می یابد. هرچند حجم تصفیه بافر که با روش کاهش حجم به کار می رود نصف آن حجمی است که در رقیق سازی مداوم به کار می رود. این به خاطر، غلظت اولیه‌ای است که حجم را تا نصف کاهش می دهد. حجم تصفیه برابر با حجمی است که رقیق سازی انجام می گیرد بنابراین، نصف حجم نیاز می باشد. با این مورد به نظر می رسد که غلیظ سازی قبل از رقیق سازی با هر دو روش (تصفیه ناپیوسته یا تصفیه با حجم ثابت) باید حجم تصفیه بافر مورد نیاز را کاهش داده و زمان را هم حفظ کند. (هدر ندهد) در بیشتر موارد این حالت اتفاق می افتد. عاملی که ما آن را محاسبه نکردیم، سرعت جریان صافی است، که برابر با مرحله زمان است. همان طور که محلول تولید شده غلیظ میشود چسبندگی افزایش یافته و سرعت جریان صافی هم کاهش می یابد. سرعت جریان صافی عکس سرعت غلظت است.

$$J = K \ln(C_G / C_B) \quad \text{که در اینجا:}$$

$J =$ میزان سرعت جریان صافی

$C_G =$ غلظت لایه زله ای

$K =$ مقدار ثابت

$C_B =$ غلظت بقاء (جریان)

(حجم)

همان طور که غلظت محلول تولید شده (C_B) چند درصد افزایش می باید. و وابسته به خصوصیات مولکول های خاصی است که نمونه را می سازند، کل معادله هم تغییر می کند. بنابراین با وجودی که ممکن است برای رقیق سازی یک نمونه غلیظ، حجم کمتری در مقایسه با نمونه کم غلظت به کار می رود. ولی از لحاظ زمانی زمان بیشتری طول می کشد. برای سادگی کار نمونه های بالا، شیوه جریان صافی مثل غلیظ کننده سانتریفوژ به کار می رود.

تصفیه:

روش های مرسوم که برای خارج کردن نمک یا تغییر بافر به کار می آیند، مثل دیالیز غشاء و کروماتوگرافی ژل تراوا می تواند موثر باشد. ولی محدودیت هایی دارد. روش های دیالیز تا چندین روز طول می کشد، حجم زیادی آب را برای تعادل نیاز دارد و به خاطر تهیه مخزن های دیالیز با دست، کاری ریسکی است. کروماتوگرافی ژل تراوا که ناشی از رقیق سازی نمونه است، اغلب برای برگشت غلظت به حالت قبلی نیاز به یک مرحله تصفیه اضافی دارد. که اضافه کردن این مرحله به مراحل دیگر هم ریسک است، چون ممکن است در نمونه ضایعات یا آلودگی ایجاد کند. با عمل رقیق سازی می توان خارج کردن نمک یا مواد محلول دیگر را همچون تغییر بافر، سریع و آسان انجام داد مزیت مهم دیگر رقیق سازی

این است که نمونه روی همان سیستم غلیظ می شود، و ریسک ضایعات و آلودگی نمونه را کم می کند.

چندین روش برای انجام رقیق سازی وجود دارند، در حالی که نتیجه کار ممکن است یکی باشد ولی زمان و حجم مورد نیاز برای تکمیل مرحله ممکن است به طور قابل توجهی تغییر کند. تشخیص تفاوت روش های به کار رفته زمانی که یکی بعد از دیگری به کار می روند، حائز اهمیت است.

2-1-3. تصفیه پیوسته:

روش تصفیه (که به تصفیه حجم ثابت هم معروف است) شامل شستشوی نمک های بافر اصلی (یا انواع مولکول های کم وزن تر) در نمونه ابقا که با اضافه کردن آب یا بافر جدید به محلول ابقاء که با همان میزان صافی تولید شده است می باشد. در نتیجه، حجم محلول ابقاء و غلظت تولید شده در طول مراحل تصفیه تغییر نمی کند. اگر آب برای تصفیه به کار رود، نمک ها شسته شده و قدرت رسانایی کاهش می یابد. اگر یک محلول بافر برای رقیق سازی به کار رود، غلظت نمک محلول بافر جدید به طور معکوس در تناسب افزایش می یابد. میزان نمک خارج شده، متناسب با حجم محلول ابقاء به حجم تصفیه تولید شده مربوط می شود. حجم تصفیه تولید شده معمولاً به حجم تصفیه معروف است. حجم تصفیه

(DV)، همان حجم محلول ابقاء در زمان شروع تصفیه است. برای تصفیه پیوسته، مایع به همان میزانی که محلول تصفیه تولید شده، اضافه می شود. وقتی حجم محلول تصفیه شده به اندازه حجم محلول ابقاء باشد، مرحله 1DV به دست می آید. با استفاده از روش تصفیه پیوسته، بیش از 99/5٪ از 100٪ محلول نفوذ پذیر می تواند با شستشو از بین 6 حجم محلول ابقاء خارج شود.

| Diafiltration Volumes | Permeability 100% Rejection Coefficient= 0 | Permeability 75% Rejection Coefficient= 0.25 |
|-----------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1 | 63% | 53% |
| 2 | 86% | 77% |
| 3 | 95% | 89% |
| 4 | 98.2% | 95% |
| 5 | 99.3% | 97.6% |
| 6 | 99.7% | 98.9% |
| 7 | 99.8% | 99.4% |
| 8 | | 99.7% |
| 9 | | 99.9% |

جدول 1: تصفیه پیوسته (حجم ثابت)

مولکولهایی که بزرگتر از نمک ها و مواد حلال در محلول هستند ولی هنوز از منافذ غشاء کوچکتر هستند هم می توانند شسته شده و خارج شوند. قابلیت نفوذ پذیری این مولکول ها ممکن است کمتر از 100% باشد. در چنین مواردی مایع بیشتر یعنی DV بیشتری برای شستشوی کامل مولکول های قابل نفوذ از غشاء به کار می رود. معمولاً هر چه مولکول بزرگتر باشد، قابلیت نفوذپذیری کمتر و حجم شستشوی مورد نیاز بیشتر می شود. قابلیت نفوذپذیری یک مولکول از طریق یک غشاء خاص می تواند با سنجش غلظت مولکول در تصفیه در مقایسه با غلظت آن در محلول ابقاء تحت موقعیت های خاص، مشخص می شود.

$$100 * \frac{\text{غلظت محلول تصفیه}}{\text{غلظت محلول ابقاء}} = \text{نفوذپذیری } \%$$

نفوذپذیری اغلب به عنوان «ضریب دفع» غشاء هم تعریف می شود. که همان

توانایی غشاء برای برگرداندن یا دفع یک مولکول می باشد.

$$\text{ضریب دفع} = 1 - \frac{\text{Conc (تصفیه) / ابقاء}}{\text{Conc (غشاء) / غلظت}}$$

ضریب دفع 1: برابر 0% نفوذپذیری است.

ضریب دفع 0: برابر 100% نفوذپذیری است.

نفوذپذیری با عواملی مثل فشار تراغشایی (TPM) میزان جریان عرضی، غلظت محلول ابقاء، PH، قدرت یونی و تشکیل لایه ژله ای (غلظت پلاریزاسیون (قطبش)) تاثیر می پذیرد. بنابراین، قابلیت نفوذ پذیری ممکن است در طول مرحله تغییر کند. جدول 1 روابط بین نفوذپذیری را از طریق یک غشا و تعداد حجم های مورد نیاز تصفیه برای خارج کردن ذره های نفوذپذیر نشان می دهد. همان طور که قبلاً ذکر شد، حجم بیشتری از محلول بافر برای خارج کردن مولکولی که نسبتاً حفظ می شود نیاز می باشد. برای خارج کردن 99/9٪ یک مولکول وقتی نفوذپذیری 75٪ است به غشائی که 9DV می باشد. نیاز داریم، در حالی که وقتی 100٪ نفوذپذیری ذره ها (اجزا) را داریم فقط VDV نیاز می باشد.

2-2. تصفیه پیوسته یا ناپیوسته کدام روش باید به کار رود؟

وقتی تصمیم می گیرید که کدام روش باید به کار رود و در کدام بخش از مرحله عمل تصفیه باید اجرا شود، باید این عوامل را در نظر بگیرید:

(1) حجم اولیه نمونه، غلظت و چسبندگی

(2) غلظت مورد نیاز آخرین نمونه

(3) پایداری نمونه در غلظت های مختلف

(4) حجم بافر مورد نیاز برای تصفیه

(5) کل زمان مرحله

(6) اندازه مخزن موجود

(7) مسائل اقتصادی

انتخاب روش براساس چندین معیار به کار می رود. مقیاس بسیار مهم است. کاری که ما در مقیاس آزمایشگاهی انجام می دهیم ممکن است در مقیاس مراحل خیلی فرق داشته باشد. بخصوص اگر مرحله به طور خودکار، عمل کند. در مقیاس آزمایشگاهی تصفیه ناپیوسته اغلب برای سادگی به کار می رود. تصفیه پیوسته نیاز به فشار یا وسیله ای برای اضافه کردن محلول تصفیه به میزان ثابت دارد. اگر ما این وسیله را حذف کنیم و فقط به مراحل توجه کنیم، می توانیم تفاوتها را مقایسه

کنیم. قدرت یونی، ترکیب بافر و غلظت متعادل کننده می تواند بر پایداری نمونه تاثیر بگذارد. تصفیه ممکن است نمک یا مولکول های متعادل شده را خارج کند که ناشی از تراکم و تقلیب پروتئین باشد. مرحله غلیظ کردن و رقیق سازی محلول پروتئین هم می تواند روی برهم کنش مولکول ها تاثیر بگذارد که آن هم ناشی از تراکم و تقلیب و ته نشینی متوالی و تولید ضایعات است. لازم است که تاثیر غلظت را روی محلول تولید شده ارزیابی کنیم و این کار برای این است که تصمیم به نسبت تاثیرات غلظت، عمل تصفیه کجا انجام می گیرد. روش تصفیه پیوسته مزیتی نسبت به تصفیه ناپیوسته دارد، به این دلیل که غلظت محلول ابقاء ثابت می ماند. اغلب دیده می شود که هرچه مرحله آرامتر انجام شود ثابت بودن (پایداری) محلول تولید شده هم بیشتر می شود.

| Diafiltration Volumes | 2x Volume Reduction | | Continuos Diafiltration (Constant Volum) | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|------------------------|
| | 100% Permeable 0% Retention | 75% Permeable 0% Retention | 100% Permeable 0% Retention | 75% Permeable 25% R |
| 1 | 50% | 41% | 63% | 53% |
| 2 | 75% | 65% | 96% | 77% |
| 3 | 88% | 79% | 95% | 89% |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| 4 | 94% | 88% | 98.2% | 95% |
| 5 | 96.9% | 93% | 99.3% | 97.6% |
| 6 | 98.4% | 95.6% | 99.7% | 98.9% |
| 7 | 99.2% | 97.4% | 99.9% | 99.4% |
| 8 | 99.6% | 99.0% | | 99.7% |
| 9 | 99.8% | 99.4% | | 99.9% |
| 10 | 99.9% | | | |

کاهش نمک از نمونه با استفاده از دو روش کاهش حجم و تصفیه حجم ثابت

3-2. چه موقع عمل تصفیه را انجام دهیم - قبل یا بعد از غلیظ کردن:

اخیراً مشاهده شده که غلیظ کردن یک نمونه ابتدا می تواند به طور قابل توجهی حجم محلول تصفیه مورد نیاز را کاهش دهد. همچنین مشاهده شده که روش تصفیه پیوسته با رقیق سازی ممتد (مداوم) حجم کمتری نسبت به روش تصفیه ناپیوسته می گیرد. بنابراین، اگر ابتدا نمونه در حد آخرین غلظت مورد نیاز غلیظ شود و سپس روش تصفیه پیوسته انجام شود، نتایج قابل قبول تری به دست می آید. هرچند، علاوه بر یک غلظت خاص میزان سرعت جریان تصفیه هم ممکن است، کاهش یابد. ممکن است، رقیق سازی نمونه غلیظ شده در صورتی که نمونه ابتدا برای کاهش غلظت رقیق شود، بیشتر طول بکشد. در این حالت حتی تصفیه

پیوسته نمونه رقیق شده نیاز به حجم تصفیه بیشتری دارد و کل زمان مرحله با توجه به میزان جریان صافی سریعتر، کمتر می شود.

حجم * میزان جریان تصفیه = مرحله زمان

به طور کلی، مناسب ترین غلظت محلول ابقاء برای تصفیه پیوسته به صورت

معادله زیر است:

$$\ln(C_G / C_R) = 1 \text{ یا } C_R = \text{مناسبت ترین} = C_G / e = 0.37 C_G$$

در این معادله:

C_G = غلظت لایه ژل

C_R = غلظت محلول ابقاء

بالاترین غلظت محلول ابقاء جایی که تصفیه باید انجام شود = (مناسبتترین)

C_R

میزان C_G برای یک نمونه می تواند با استفاده از غلظت یک نمونه روی غشا و

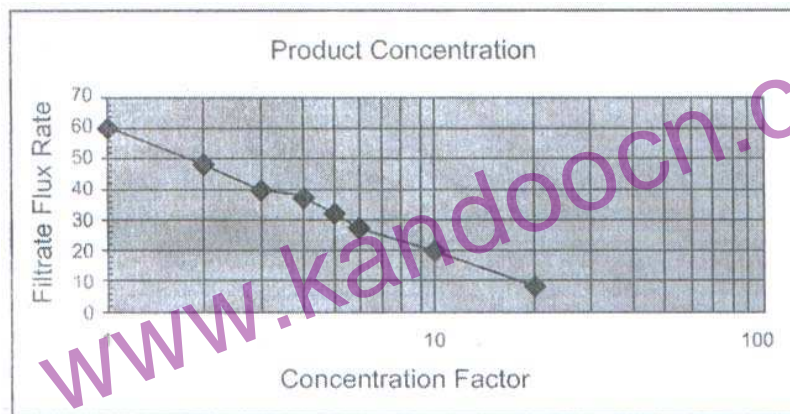
ثبت اطلاعات نمودار برای میزان جریان صافی در برابر غلظت (یا عامل غلظت) از

آزمایشات تشخیص داده شود بعد منحنی برای میزان جریان صافی = "0" می

تواند پیش بینی شود. مقدار C_G برای این محلول تولید شده بدون توجه به شروع

میزان جریان صافی یا غلظت، یکسان است.

در این نمونه (شکل 4) مقدار C_G عامل غلظت است. که حدوداً $33x$ است. بنابراین بهترین غلظت برای انجام عمل تصفیه $0/37C_G = 12/2x$ می باشد. اگر شروع غلظت محلول تولید شده 5mg/ml است، پس تصفیه باید زمانی انجام گیرد که غلظت به 61mg/ml برسد، عمل تصفیه باید بعد از غلظت انجام شود. مگر اینکه لازم شود یک مولکول خاص را قبل از غلیظ کردن، خارج کنیم.



تشخیص مقدار C_G برای محلول تولید شده

محلول حاصل تصفیه شده ممکن است تصفیه پیوسته یا ناپیوسته را مشخص کند. سلول های متحرک و شیوه های سانتریفوژ به خاطر طرز عملشان، بهترین و مناسب ترین عوامل روش تصفیه ناپیوسته به شمار می رود. شیوه های جریان

مماس برای هر دو روش مفید و مناسب هستند و برای آنها مزیتی محسوب می شوند.

2-4. خلاصه

روش تصفیه، روشی سریع و موثر برای نمک زدایی یا تغییرات بافر محلول است. این روش به دو صورت پیوسته و ناپیوسته می تواند انجام شود. معمولاً روش تصفیه پیوسته برای رسیدن به همان درجه کاهش نمک، نسبت به روش تصفیه ناپیوسته با رقیق سازی مداوم، حجم کمتری می گیرد و انجام آن آسانتر است. روش تصفیه پیوسته به عنوان روشی ملایم و آرام روی مولکول های شیمیایی فعال است. غلیظ کردن نمونه قبل از تصفیه معمولاً حجم تصفیه مورد نیاز را کاهش می دهد و زمان را حفظ می کند. هرچند اگر چسبندگی نمونه خیلی زیاد باشد، میزان جریان تصفیه کاهش یابد و زمان می تواند به طور قابل توجهی افزایش یابد. تشخیص C_G برای نمونه می تواند جوابگوی این سوال باشد که در چه غلظتی

تصفیه باید انجام شود؟

حجم اولیه از چند میلی لیتر تا هزاران لیتر می تواند با استفاده از روش تصفیه جریان مماس پال (TFF) تولید شود. سیستم های جریان مماس پال به راحتی اجازه اضافه شدن غشا را می دهند. ضمن اینکه قابلیت انعطافی خاصی ایجاد

می کند و زمان را هم کاهش می دهد. این نوع سیستم ها و روش ها همچون قابلیت انعطاف، قابلیت مقیاسی را هم برای کار با هر حجم نمونه ای ایجاد می کنند. غشاهای انتخابی پلی اتر سولفن (PES) OMEGA پال با منافذ بسیار نزدیک و سرعت جریان بالا در سریعترین زمان و موثرترین تجزیه، کار تصفیه را انجام می دهند.

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

فصل دوم

مروری بر تحقیقات گذشته

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com