جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

3-1. مقدمه:

در اوایل سرمهای درمانی که توسط پادزهر اسب تهیه می شد به صورت خام به مصرف می رسید. بدین ترتیب که پس از تزریق دزهای معینی از زهر به بدن حیوان و اندازه گیری میزان پادزهر تولید شده، عمل خون گیری از اسب انجام می گرفت.

سپس خونهای گرفته شده در استوانه های شیشه ای که داخل سرپوش فلزی آنها وزنه سربی آویزان شده بود، قرار می‌گرفت.

چند ساعت پس از خونگیری وزنه سربی به آرامی رها می گردید و خونابه به تدریج در مدت یک تا دو روز جدا می شد و این وزنه با فشار روی لخته مقدار بیشتری سرم را جدا می کرد، سپس سرم شفاف و عاری از گویچه ها را به کمک سیفون خارج کرده و با افزودن مقداری فنل محلول در اتر، سرم را برای چند ماه تا یک سال در سردخانه رها می کردند. در این مدت مقدار زیادی آلبومین و پروتئین های غیر اختصاصی رسوب می‌کرد و پس از حذف رسوبات، سرم شفاف را پس از تعیین عیار به حجم های حدودی 500 تا 1000 واحد بین المللی تقسیم نموده و پس از تأیید با آزمایش های لازم سترونی و بی ضرری و حسن اثر، محصول نهایی آماده عرضه و مصرف پزشکی می‌گردید.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

چنین سرمی طبعاً دارای آلبومین ها و پروتئین های غیر اختصاصی سرم اسب بود و ناگزیر بدن بیمار پس از تزریق نسبت به تمامی پروتئین های موجود در سرم اسب حساس می شد و استفاده از سرم اسبی برای بار دوم معمولا با عوارض و آلرژی توأم بود. از این رو در دهه های قبل از جنگ جهانی دوم مسئله تصفیه سرم و تخلیص آن بسیار مورد توجه بود. روش های متعددی برای تصفیه سرم به کار گرفته شده بود که در زیر به پاره ای از آن ها به طور اختصار اشاره می شود.

در سال 1903 در انگلستان ایمری[1] مسئله تصفیه سرم با آنزیم ها را مطرح کرد ولی از کار او استقبال زیادی نشد. چرا که به ازای از بین رفتن پروتئین های غیر اختصاصی پاره‌ای از پروتئین های اختصاصی هم از بین میرفت. در سال های 1936-1939 پارفنچف[2] دانشمند لهستانی بررسی های جالبی در ضمیمه تصفیه سرم به کمک پپسین و سولفاتها در آمریکا به ثبت رساند.

در سال 1954 در انگلستان ککویک[3] و همکاران آنها از اتر به عنوان رسوب دهنده پروتئین ها استفاده نمودند.

بنزهاف[1] نیز روشی را ارائه کرد که با دناتوراسیون حرارتی و Salting out کار تصفیه صورت می گرفت.

1- Imray
2- Parfentjev
3- Kekwik

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سیستم سولفات سدیم هاوو[۲] که با افزایش تدریجی غلظت سولفات سدیم در پلاسما بود نیز یکی از روش های تصفیه بود.

سیستم سولفات آمونیوم وودورث[۳] هم تا قبل از سیستم تصفیه با اتانل سرد یکی از کارآمدترین روش های تصفیه سرم درمانی بود.

بعدها کوهن روش اتانل سرد را ابداع کرد که جامع ترین روش در آمریکا بود، در این روش با تغییر غلظت الکل اتیلیک در سرما پروتئین های پلاسما به پنج جزء اصلی تقسیم می شدند. مزیت استفاده از این روش این بود که به آسانی می توانستند موقع (خشک کردن گلوبولینها با تبخیر آزاد کرده و برطرف شوند) و عیب این روش هم این بود که تمامی این مراحل باید در سرما انجام شود. و عده ای از پروتئین های پلاسما پس از تماس دائم با الکل خاصیت ابتدایی خود را از دست می دهند و بی ثمر می‌شوند.

www.kandoocn.com

---

[1]- Ban zhaf

[2]- Howe

[3]- wadawotrh

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

3-2. تصفیه و تخلیص سرمهای درمانی:

از میان تکنیک های متعدد تصفیه و تخلیص پروتئین ها، روش های رسوبی متداولترین و با سابقه ترین روش‌های جداسازی پروتئین های پلاسما محسوب می شوند که در مقیاس وسیع جهت تولید فرآورده های بیولوژیک مانند سرم های درمانی کاربرد داشته اند.

در جداسازی پروتئین های پلاسما با تکنیک های رسوبی میزان حلالیت دارای اهمیت می باشد که به خصوصیات حلال و سایر اجزا مخلوط پلاسما مربوط است.

مهمترین عوامل موثر بر حلالیت پروتئین ها عبارتند از: PH ، قدرت یونی، دما و ثابت دی الکتریک

3-2-1. رسوب دادن با تغییر PH:

یکی از ساده ترین روش های جداسازی پروتئین ها به طریقه تنظیم PH محلول در نقطه ایزوالکتریک[1] پروتئین مورد نظر برای ایجاد رسوب می باشد.

---

[1]- نقطه ایزوالکتریک (IP) ، PHمعینی است که در آن پروتئین یا اسید آمینه داراي بار مثبت و منفي برابر مي‌باشد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ولی از این روش برای خارج کردن پروتئین های نامطلوب از مخلوط استفاده می شود. و برای رسوب دادن پروتئین های مورد نیاز به دلیل احتمال دناتوره شدن آنها کاربرد ندارد.

3-2-2. رسوب دادن توسط کاهش قدرت یونی:

برخی از پروتئین ها را می توان با کاهش قدرت یونی رسوب داد ولی از آنجا که برای این کار باید به محلول پروتئین ها آب اضافه شود، لذا با کاهش غلظت پروتئین های محلول، افزایش حلالیت آنها دور از انتظار نیست. از این رو این روش اغلب در مراحل پایانی خالص سازی، که غلظت پروتئین ها در محلول به قدر کافی افزایش یافته، استفاده می شود.

3-2-3. رسوب دادن با افزایش قدرت یونی:

پدیده Salting out شالوده تعدادی از تکنیک های مهم جداسازی و تخلیص پروتئین هاست که با ایجاد غلظت بالایی از نمک خنثی در محلول پروتئینی و رسوب دادن بخشی از پروتئین ها موجب تفکیک و خالص سازی و تغلیظ آنها می گردد و از رایج ترین روش های جداسازی به طریقه رسوبگیری به شمار می رود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مطالعه پدیده Salting out پروتئین های سرم به کمک آنالیز و سانتریفوژ نشاندهنده تاثیر پیچیده نمک روی پروتئین ها است.

مشخص شده است که بین حلالیت نمک و تاثیر آن در رسوب پروتئین ها رابطه مستقیم وجود دارد. این ایده مبنای نظریه دبای[1] در توجیه پدیده مذکور می باشد که به بیان ساده می گوید:

یون های نمک اکثر ملکول های قطبی محیط (حلال) را به طرف خود جذب کرده و اطراف مولکول های پروتئین از آنها خالی می گردد و متعاقباً بدنبال برخورد های تصادفی مولکول های پروتئین با یکدیگر تجمع مولکولی ایجاد و رسوب تشکیل می‌شود.

هرگاه نمک به محیط اضافه شود مولکول های حلال قطبی از اطراف پروتئین به طرف یون های نمک جذب می شود و مولکول های پروتئین به طور تصادفی در مجاورت یکدیگر قرار می گیرند، در حالی که لایه آب به شکل موثر وجود ندارد تا مانع جذب آنها به یکدیگر شود، در نتیجه تجمع یافته و تشکیل رسوب می دهند.

---

[1]- Debye

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

پروتئین های بزرگتر که سطح بیشتری دارند (مولکول هایی با گروههای غیر قطبی) با مقادیر نمک کمتری رسوب می کنند و مولکول های کوچکتر که گروههای غیر قطبی کمتری دارند در غلظت های زیادتر نمک رسوب می نمایند.

به دنبال بررسی های کمی پدیده Salting out رابطه ای خطی بین لگاریتم حلالیت یک پروتئین معین و قدرت یونی محلول در قالب معادله خط بیان می گردد:

$$\log S = \beta' - K_s(\mu)$$

در رابطه فوق:

S= حلالیت پروتئین β' = عرض از مبداء

μ = قدرت یونی محلول K_s' = شیب خط یا Salting out constant

K_s' برای یک پروتئین و نمک معین، مستقل از دما و PH است ولی β' به طور مشخص، تحت تاثیر هر دو عامل یاد شده قرار دارد.

در روش های مبتنی بر Salting out معمولا جداسازی یک پروتئین معین به صورت رسوب در PH نزدیک نقطه ایزوالکتریک آن پروتئین بیشترین بازده را دارد. همچنین ممکن است در غلظت بالای نمک پروتئین ها در بیش از یک PH

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

حداقل حلالیت را نشان دهند که می تواند به دلیل تشکیل نمک های نامحلول پروتئین در آن PH خاص باشد.

میزان تاثیر نمک در پدیده مورد بحث به طبیعت آنیون و کاتیون ، حاصل از تفکیک یونی نمک خصوصاً به آنیون آن مربوط می شود. موثرترین آنیون ها، آنیون های چند ظرفیتی و موثرترین کاتیونها، انواع یک ظرفیتی آنها می باشند. میزان کارآیی آنیون ها و کاتیون ها به صورت زیر است:

آنیون ها : $PO_4^{2-} > SO_4^{2-} > CH_3COO^- > Cl^-$

کاتیون ها : $NH_4^+ > K^+ > Na^+$

نمک های خنثی که در این تکنیک ها مصرف می شود باید حتی المقدور خالص بوده و از حلالیت بالایی برخوردار باشند، به هنگام حل شدن تغییر قابل ملاحظه ای در PH و دمای محلول ایجاد نکنند و ارزان باشند. نکته آخر اینکه چگالی محلول پس از افزودن نمک به نحوی تغییر نیابد که سانتریفیوژ را با مشکل مواجه نماید. از میان انواع نمک هایی که مصرف آنها متداول است سولفات آمونیوم ($(NH_4)_2SO_4$) به دلیل ارزانی و حلالیت مناسب بیش از سایر نمک ها به کار گرفته شده است.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

چگالی محلول اشباع آن در حدود 1/23 است که ممکن است در عمل پس از اضافه کردن به محلول پروتئینی چگالی آن را افزایش دهد و سانتریفیوژ را با مشکل مواجه نماید و همچنین اندکی محلول را اسیدی می‌کند که در صورت لزوم می توان از بافر مناسب استفاده کرد.

غلظت سولفات آمونیوم معمولا به صورت درصد اشباع (درصد $\frac{V}{V}$ محلول اشباع سولفات آمونیوم) بیان می شود. مقدار نمک سولفات آمونیوم لازم برای دست یابی به دذئ اشباع مطلوب در یک لیتر محلول و در دمای $20^{\circ c}$ به صورت معادله زیر محاسبه می شود.

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0/3(S_2)}$$

در معادله فوق:

g : مقدار نمک خشک سولفات آمونیوم برحسب گرم

S_1 : غلظت اولیه سولفات آمونیوم (غلظت فعلی)

S_2 : غلظت ثانویه سولفات آمونیوم (غلظت مطلوبی که باید ایجاد شود) می باشد.

لازم به ذکر است که هر دو غلظت S_1 , S_2 درصد حجمی- حجمی سولفات آمونیوم اشباع هستند. تکنیک های Salting out در مقایسه با سایر روش های جداسازی رسوبی پروتئین ها فاقد حساسیت دست و پا گیر بوده و از مزیت

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سادگی نسبی برخوردار است، به علاوه پروتئین های به دست آمده با این روش ها معمولا دناتوره نمی شوند و فعالیت بیولوژیک خود را حفظ می کنند و بدلیل حضور نمک نسبت به پروتئولیز و آلودگی باکتریایی مقاوم بوده و پایداری مناسبی دارند.

به منظور نمک زدایی رسوبات پروتئینی حاصل می توان آنها را در آب حل کرد. سپس اولترا فیلتراسیون نموده و یا به کمک دیالیز در آب، نمک رسوبات را حذف کرد که به صورت مفصل این روش توضیح داده می شود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

3-3. خواص سولفات آمونیوم:

انحلال پذیری سولفات آمونیوم از $^{c.}0$–$^{c.}30$ تغییر پذیر است.

سولفات آمونیوم [$(NH_4)_2SO_4$] به صورت طبیعی در دهانه آتشفشان های فعال یافت می شود.

در آب به صورت محلول است و در الکل واستون غیر قابل حل می باشد.

نقطه ذوب آن $^{c.}230$ می باشد و در اثر گرما در سیستم باز، ترکیبات آن شروع به متلاشی شدن در دمای $^{c.}100$ می نمایند.

آمونیوم بی سولفات هم به فرمول (NH_4HSO_4) وجود دارد که نقطه ذوب $^{c.}146.9$ را داراست.

Property	Ammonium Sulfate
Colour	Colourless
Physical state ($25^{c.}$, 1atm)	Rhombic Crystals
Formula	$(NH_4)_2\ SO_4$
Relative molecular Mass	132.14
Melting point ($^{c.}$)	230
Density	1.769 ($50^{c.}$)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

Solubility in water (gr/Lit)	754 (20^{c})

www.kandoocn.com
www.kandoocn.com
www.kandoocn.com
www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

روش تصفیه و تخلیص سرم های درمانی در موسسه رازی مبتنی بر هضم نسبی آنزیماتیک و دناتوراسیون حرارتی پروتئین های پلاسما و Salting out با سولفات آمونیوم می باشد.

این فرایند در هفت مرحله به شکل زیر انجام می شود که تا مرحله ششم عمل تصفیه یکسان می باشد و فقط در مرحله آخر است که دستگاه دیالیز ساخته شده را می توان جایگزین روش سنتی دیالیز کرد و در وقت و آب صرفه جویی چشمگیری کرد.

1- هضم پپتیکی:

در این مرحله ابتدا پلاسمای آنتی توکسین (ضد سم) سه مرتبه با سرم فیزیولوژی (محلول 8/5 گرم کلرورسدیم در یک لیتر آب) رقیق می شود. دمای محلول در $30^{\circ C}$ و PH آن با اسید کلریدریک نرمال در حدود 3/2 تنظیم می گردد و آنزیم پپسین به $(\frac{W}{V})$ 0/5٪ (نسبت به حجم پلاسما) اضافه می شود. هضم نسبی آنزیماتیک در شرایط فوق به مدت 30 دقیقه صورت می گیرد.

2- دناتوراسیون حرارتی و رسوب پروتئین های نامطلوب:

بلافاصله پس از خاتمه مدت هضم با سود نرمال PH مخلوط در 4/2 تنظیم می گردد و سولفات آمونیوم به نسبت $\frac{W}{V}$ 14٪ اضافه می گردد و در ضمن هم زدن

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

حرارت داده می شود. به طوری که ظرف مدت 10 دقیقه دمای مخلوط $^{\circ}C$ 55-56 گردد. سپس مقدار 1 میلی لیتر تولوئن[1] به ازای هر لیتر حجم مخلوط اضافه می شود. هم زدن مخلوط به آرامی در دمای $^{\circ}C$ 55-56 به مدت 60 دقیقه ادامه می یابد. پس از این مدت مخلوط به کمک صافی پارچه ای تصفیه می گردد.

3- اولین رسوب پروتئین های ضد سم:

PH محلول به دست آمده از مرحله دوم با سود نرمال در 7/2 تنظیم می شود و به نسبت $\frac{W}{V}$ 18٪ سولفات آمونیوم افزوده می شود و به مدت 15 دقیقه به هم زده شده و سپس افزوده می شود و به مدت 15 دقیقه به هم زده شده و سپس رسوبات تشکیل شده با صافی پارچه ای جدا می شود.

4- دیالیز اول:

رسوبات مرحله سوم در کیسه های سلفون به مدت 48 ساعت در دمای $^{\circ}C$ 4 در برابر آب جاری دیالیز می شود

5- رنگ گیری:

به ازای هر 1000 میلی لیتر محلول دیالیز، 5 گرم فنل و 400 میلی لیتر ژل هیدروکسید آلومینیوم مخلوط می شود و به محلول حاصل دیالیز اضافه می شود.

[1] افزودن تولوئن براي حذف ذرات چربي هنگام جدا كردن رسوبات انجام مي شود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مخلوط حاصل ضمن هم زدن به مدت 60 دقیقه و در دمای $50^{\circ C}$ حرارت داده می شود. پس از این مدت مخلوط با صافی پارچه ای تصفیه و محلول صاف شده نگهداری می شود.

6- دومین رسوب پروتئین های ضد سم:

به محلول صاف شده مرحله قبل به نسبت $\frac{V}{V}$ 55٪ محلول سولفات آمونیوم اشباع اضافه میشود و به مدت 15 دقیقه همزده و سپس با کاغذ صافی واتمن شماره 50 تصفیه می شود. رسوبات حاصل پس از پرس شدن جمع آوری می گردد. حجم لازم برای ایجاد غلظت $\frac{V}{V}$ 55٪ از محلول سولفات آمونیوم اشباع به کمک رابطه زیر:

$$X = \frac{V \times 55}{100 - 55}$$

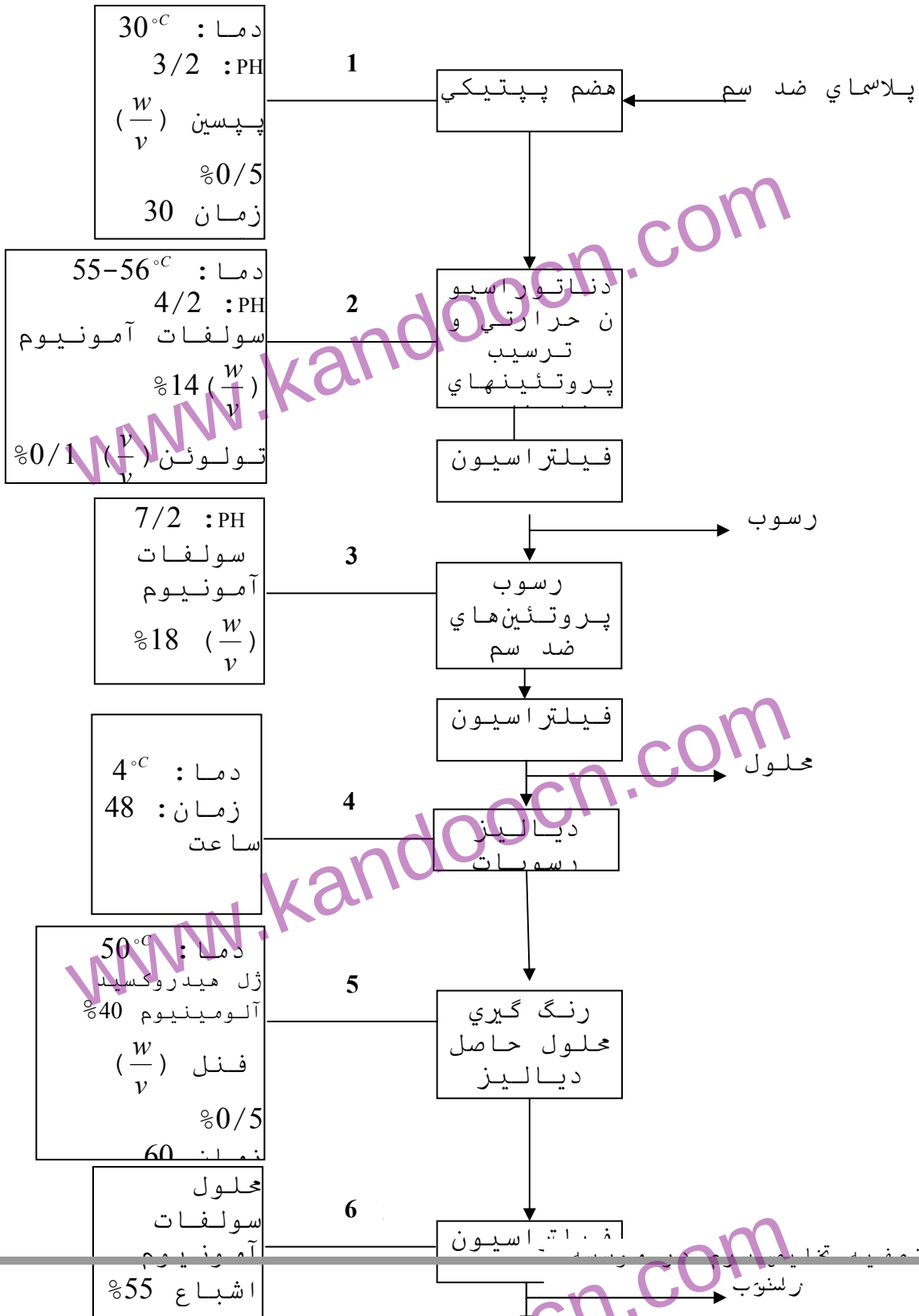
که در آن X حجم مورد نظر از محلول سولفات آمونیوم اشباع و V حجم محلول های حاصل از مرحله قبل است.

7- دیالیز نهایی:

رسوبات مرحله ششم در کیسه سلوفان در دمای $4^{\circ C}$ در برابر آب جاری به مدت حداقل 72 ساعت دیالیز می شود و در پایان این مرحله ۰/۱۵٪ فنل به عنوان محافظ میکروبی به محلول اضافه می گردد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید



جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com