خون
فصلنامه پژوهشی
تابستان ۸۴ دوره ۲ شماره ۴

بهینه‌سازی خلوص فاکتور IX انعقادی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی هپارین و مقایسه آن با کروماتوگرافی تعویض یونی

سیدشهاب‌الدین موسوی مطلق[۱]، دکتر حوری رضوان[۲]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله[۳]، دکتر میرکامران موسوی حسینی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

بیماری هموفیلی B، به‌علت کاهش یا عدم وجود فاکتور IX انعقادی می‌باشد. روش درمان انتخابی برای این بیماران، استفاده از فاکتور IX است که تا حد امکان خالص شده باشد، لذا محققین درصدد تفکیک و خالص‌سازی پروتئین‌های پلاسمایی برآمده‌اند. از روش‌های رایج جهت تخلیص فاکتور IX می‌توان استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی را نام برد. ولی از دو دهه قبل به‌تدریج کروماتوگرافی تمایلی نیز به‌کار گرفته شده است.

هدف از این تحقیق در مرحله اول یافتن میزان خالص‌سازی فاکتور IX با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی هپارین (به‌عنوان روش تکمیلی) و سپس مقایسه آن با سیستم کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از DEAE بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعهٔ انجام شده از نوع تجربی بود. به‌منظور تهیه فاکتورIX انعقادی از ستون XK-16 و ژل‌های DEAE- سفاروز و هپارین- سفاروز استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فعالیت انعقادی، کیت پلاسمایی فاقد فاکتور IX و برای اندازه‌گیری میزان آنتی‌ژن، کیت الیزا مورد استفاده قرارگرفت.

یافته‌ها

فعالیت ویژه فاکتور IX و در نهایت میزان خالص‌سازی آن نسبت به پلاسما در کلیه مراحل کار مشخص گردید که با اضافه شدن یک مرحله کروماتوگرافی تمایلی (هپارین- سفاروز) به روش تهیه فاکتور IX، میزان فعالیت ویژه فاکتور IX از ۳/۱ IU/mg به ۲۹ IU/mg افزایش یافت و میزان خلوص آن در مقایسه با پلاسما حدود۱۴۵۰ برابر شد. درحالی‌که در استفاده تنها از کروماتوگرافی تعویض یونی (DEAE- سفاروز)، خلوص فاکتور IX حدود ۱۵۵ برابر پلاسما می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که اضافه نمودن یک مرحله کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از هپارین، در افزایش درجه خلوص و فعالیت ویژه این پروتئین پلاسمایی نقش چشمگیری داشته است.

کلمات کلیدی: **کروماتوگرافی تمایلی هپارین، فاکتور IX انعقادی، هموفیلی B، کروماتوگرافی تعویض یونی**

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش: ۸۴/ ۳/۱۱

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس هماتولولوژی- دانشگاه تربیت مدرس- صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۲- PhD بیوشیمی- دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- PhD ایمونولوژی- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- PhD شیمی دارویی- استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

فاکتور IX جزو فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K می‌باشد و در کبد سنتز می‌شود. همانند سایر پروتئین‌های ترشحی، ترجمه اولیه فاکتور IX، حاوی یک قسمت آمینی گسترش یافته است که در آن یک پلی‌پپتید که حاوی ۴۶ (یا ۴۱ یا ۳۹) اسید آمینه است وجود دارد. فاکتور IX انسانی از یک زنجیره پلی‌پپتیدی حاوی ۴۱۵ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی حدود ۵۷۰۰۰ دالتون دارد که ۲۰٪ از آن کربوهیدرات است (۱).

غلظت پلاسمایی آن در حدود ۵μg/ml-۴ است و نیمه عمری حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت و pI=۴/۱[1] دارد (۲).

کمبود فاکتور IX وابسته به کروموزوم X یا هموفیلی B، نسبت به هموفیلی A شیوع ۲۰٪ دارد که معادل حدود ۱۵ نفر در هر میلیون مرد است (۳).

کنسانتره‌های کمپلکس پروترومبین[2]، به‌صورت گسترده برای درمان خونریزی افراد هموفیلی B به‌کار می‌روند. این محصولات حاوی مخلوطی از فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K هستند که به‌صورت نسبی تخلیص شده‌اند. کنسانتره‌های بسیار خالص فاکتور IX حاوی مقادیر کمی از فاکتورهای آلوده کننده هستند. بازیافت و بهبود ابتدایی فاکتور IX نوترکیب در درون بدن (در مقایسه با فاکتور IX مشتق از پلاسما) تا حدود ۲۸٪ کاهش می‌یابد.

چندین روش برای جداسازی پروتئین‌های وابسته به ویتامین K از پلاسما شرح داده شده است که براساس استفاده از بار الکتریکی یا حالت کربوکسیلاسیون آن‌ها می‌باشد (۴).

استفاده از نمک‌های باریم که به‌طور انتخابی پروتئین‌های حاوی گاماگلوتامیک اسید را جذب می‌کنند، ممنوع شده است و علت آن خطر سمیت باریم است (۵).

تعویض‌کننده‌های آنیونی همانند گروه‌های DEAE[3] به ماتریکس‌های پایداری (همانند آگاروز، دکستران و سلولز) متصل شده و قادر به گسترش روش‌های جدید برای تهیه پروتئین‌های وابسته به ویتامین K از پلاسما (براساس شارژ پروتئین) می‌باشند. این روش‌ها هنوز مهم‌ترین ابزار در تولید کنسانتره‌ها هستند. ماده اولیه برای شروع کار معمولاً مایع رویی رسوب کرایو[4] است که حاوی قسمت عمده این پروتئین‌ها می‌باشد. با استفاده از این روش می‌توان فاکتورVIII و هم‌چنین مقداری از فیبرینوژن (که ممکن است با کروماتوگرافی تداخل کند) را در ابتدا در رسوب کرایوبرداشت کرد. پروتئین‌های وابسته به ویتامین K را می‌توان با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی از یکدیگر جدا نمود و این روش‌ها شامل استفاده از موادی هم‌چون هپارین، آنتی‌بادی، دکستران و شلات‌کننده‌های فلزی می‌باشند که می‌توان آن‌ها را برای مقیاس‌های زیاد، آماده نمود (۵).

معمولاً از پلی‌مرهای دارای بار منفی استفاده می‌گردد که عمده‌ترین آن‌ها هپارین و سولفات دکستران هستند (۶).

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه تجربی آزمایشگاهی بود و در مراحل زیر به انجام رسید.

جداسازی فاکتور IX

جذب به DEAE : ۸۰۰ میلی‌لیتر از پلاسمای تازه منجمد شده در یخچال ۶-۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۱۸ ساعت با سانتریفوژ یخچال‌دار ژولابو (آلمان) در دور ۴۰۰۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر از مایع رویی آن برداشته شده و در دمای۴-۱ درجه سانتی‌گراد با سرعت۱۸۰ میلی‌لیتر در ساعت بر روی ستون XK-16 که حاوی ۷ میلی‌لیتر DEAE- سفاروز CL-6B (ساخت شرکت فارماسیا سوئد) موازنه شده با بافر (pH=۶ ، فسفات ۵mM و سیترات ۵mM) بود، تزریق گردید. سپس ستون با همان بافر که حاوی غلظت‌های مختلف نمک، به‌ترتیب۰/۰، ۰/۱، ۰/۱۴، ۰/۱۸، ۰/۲۳، ۰/۲۸ و ۰/۳۶ مولار NaCl بود، با سرعت ۱۲۰ میلی‌لیتر در ساعت شستشو داده شد. فاکتور IX در فراکشن‌های ۰/۲۸، ۰/۳۶ مولار NaCl جدا شد. ستون با ۲ مولار نمک طعام و ۰/۵ مول NaOH احیا گردید.

1- Isoelecteric Point
2- Prothrombin Complex Concentrate
3- Di Ethyl Amino Ethyl
4- Cryo Precipitate Supernatant

Archive of SID
www.SID.ir

جذب به هپارین: ۵ میلی‌لیتر از ژل هپارین- سفاروز CL-6B (ساخت شرکت فارماسیا) در ستون XK-16 با بافر سیترات (۲۰mM, pH=۶) در دمای۴-۱ درجه سانتی‌گراد موازنه شد. فاکتور IX استخراج شده از مرحله DEAE، با یک حجم از بافر فوق رقیق شد و با سرعت ۱۸۰ میلی‌لیتر درساعت به ستون تزریق گردید. بعد ستون با بافر مشابه که حاوی غلظت‌های مختلف نمک، به‌ترتیب۰/۰ ، ۰/۰۸، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ مول NaCl بود باسرعت ۳۴ میلی‌لیتر در ساعت شسته شد. فاکتور IX در فراکشن (۰/۶M) NaCl جدا گردید. ستون با بافر مشابه که حاوی ۲ مولار نمک طعام بود و در مرحله بعد با (۰/۵M) NaOH احیا شد.

اندازه‌گیری فعالیت انعقادی فاکتور IX

تعیین فعالیت انعقادی فاکتور IX با استفاده از روش یک مرحله‌ای با دستگاه STA Compact فرانسه انجام شد که برای این منظور کیت فاقد فاکتور IX (ساخت شرکت دیاگنوستیکا فرانسه) تهیه گردید.

اندازه‌گیری آنتی‌ژن فاکتور IX

میزان آنتی‌ژن فاکتور IX با استفاده از روش الیزا و دستگاه دایینکس انگلیس و توسط کیت $AsserachromFIX_{Ag}$ (ساخت شرکت دیاگنوستیکا فرانسه) تعیین شد.

اندازه‌گیری پروتئین

برای اندازه‌گیری مقادیر بالای پروتئین از روش بیوره و برای اندازه‌گیری مقادیر پایین از روش برادفورد استفاده شد که میزان پروتئین با دستگاه PU8750 فیلیپس (ساخت انگلستان) خوانده شد.

SDS-PAGE[1]

برای این کار از SDS (۷/۵٪) و بافر تریس با pH=۸/۸ برای مدت سه ساعت و ۴۰ میلی‌آمپر استفاده شد. استاندارد با وزن مولکولی بالای سیگما، فاکتور IX خالص شده (ساخت دیاگنوستیکا فرانسه) و آلبومین سازمان انتقال خون نیز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

کروماتوگرافی با DEAE - سفاروز

میزان آنتی‌ژن و فعالیت انعقادی فاکتور IX در فراکشن‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. با توجه به میزان پروتئین در هر یک از فراکشن‌ها، فعالیت ویژه فاکتورIX و در نهایت میزان خالص‌سازی آن نسبت به پلاسما مشخص می‌گردد که با توجه به جدول مربوطه، بهترین خلوص فاکتور IX از فراکشن‌های حاوی (۰/۲۸، ۰/۳۶ مولار) NaCl به‌دست می‌آید.

کروماتوگرافی با هپارین- سفاروز

میزان خالص‌سازی فاکتور IX در فراکشن‌های مختلف در جدول ۲ آمده است، همان‌طور که مشخص شده بهترین خلوص در فراکشن حاوی ۰/۶ مولار نمک طعام می‌باشد.

خصوصیات فاکتورهای IX تهیه شده

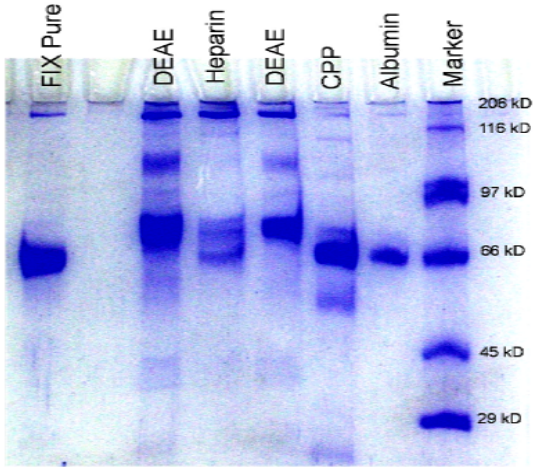
جدول ۳ خصوصیات فراکشن‌های اصلی حاوی فاکتورIX را در مراحل مختلف کار نشان می‌دهد. این جدول ثابت می‌کند در صورتی‌که مرحله کروماتوگرافی تمایلی هپارین به‌عنوان روش تکمیلی استفاده گردد، تا چه حد بر خلوص فاکتور IX می‌افزاید (از ۱۵۵ برابر خلوص در مرحله DEAE به ۱۴۵۰ برابر خلوص در مرحله هپارین می‌رسد). هم‌چنین نشان می‌دهد که مقدار آنتی‌ژن فاکتور IX در مرحله هپارین به ۲۱٪ کل پروتئین می‌رسد در حالی‌که در پلاسما فقط ۰/۰۰۶٪ از کل پروتئین را فاکتورIX تشکیل می‌دهد و این میزان در مرحله جذب به DEAE در حدود ۲٪ می‌باشد. ضمن این که در مراحل تخلیص، میزان فاکتورهای IX که فعالیت انعقادی خون را حفظ کرده‌است به‌تدریج کاهش می‌یابد و در مرحله جذب به DEAE به ۶۲٪ رسیده و این مقدار در پایان مرحله هپارین معادل ۵۵٪ می‌باشد.

شکل ۱ افزایش نسبت فاکتور IX به سایر پروتئین‌ها را در روند کار مشخص می‌نماید. همان‌طور که انتظار می‌رود اکثر CPP[2] را آلبومین تشکیل می‌دهد که در مراحل بعدی

1- Sodium Dodecyl Sulfate
2- Cryo poor plasma

Archive of SID
www.SID.ir

یعنی DEAE و هپارین دیده نمی‌شود ولی در عوض در DEAE یک باند که کمی سنگین‌تر از آلبومین است وجود دارد که با وزن مولکولی پروترومبین(۷۲kD) مطابقت دارد. این باند در مرحله استخراجی از هپارین به‌شدت کاهش می‌یابد و در عوض به میزان یک باند دیگر که کمی سبک‌تر از آلبومین است اضافه می‌گردد که در واقع با فاکتور IX (در مقایسه با فاکتور IX خالص که در ستون آخر آمده است) مطابقت دارد زیرا فاکتور IX وزنی معادل ۵۷-۶۰kD دارد.



شکل ۱ : نتایج الکتروفورز SDS-PAGE مراحل مختلف کار: DEAE دوبار گذاشته شده است که در دومی حجم بیشتر از معمول نمونه برای نشان دادن پروتئین‌هایی بامیزان کم استفاده گردیده است (CPP=Cryo Poor Plasma, F IX=Factor IX)

جدول ۱ : نتایج کروماتوگرافی بر روی DEAE- سفاروز با استفاده از بافر (pH=۶) ، ۵mM فسفات و ۵mM سیترات با غلظت‌های مختلف نمک و شستشو با سرعت ۱۲۰ml/h (n=۳)

توضیحات	Protein (mg/ml)	FIX Activity (IU/ml)	FIX: Ag (U/ml)	Specific activity (IU/mg)	Purity	FIXc: Ag	Volume (ml)
CPP	۵۲ ± ۱	۰/۹۳ ± ۰/۰۲	۱/۰۰	۰/۰۱۷	–	۰/۹۳	۲۰۰
Filtrate	۴۹ ± ۱	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۰۰۶	–	۱	۲۰۰
۰ NaCl	۱۰ ± ۱	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۰۲	۰/۱	۰/۴۰	۴۳
۰/۱ NaCl	۱/۵ ± ۰/۲	۰	۰	۰	۰	–	۳۵
۰/۱۴ NaCl	۰/۲۶۰ ± ۰/۰۲۰	۰	۰	۰	۰	–	۴۵
۰/۱۸ NaCl	۰/۳۴۰ ± ۰/۰۲۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۲	۱	۱	۵۰
۰/۲۳ NaCl	۰/۴۴۰ ± ۰/۰۳۰	۰/۲۰ ± ۰/۰۱	۰/۲۲	۰/۴۵	۲۲	۰/۹۰	۱۰۵
۰/۲۸ NaCl	۰/۳۴۰ ± ۰/۰۲۰	۱/۰۲ ± ۰/۰۳	۱/۹۰	۳	۱۵۰	۰/۵۳	۵۸
۰/۳۶ NaCl	۰/۴۶۰ ± ۰/۰۲۵	۱/۵۲ ± ۰/۰۵	۱/۹۲	۳/۳	۱۶۵	۰/۷۹	۲۹
۲ NaCl	۰/۱۵۰ ± ۰/۰۱۵	۰/۰۱	۰/۰۹	۰/۰۰۶	۰/۳	۰/۱۱	۲۹
NaOH	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۱۰	۰	۰	۰	۰	–	۲۵

Archive
www.SID.ir

جدول ۲ : نتایج کروماتوگرافی بر روی هپارین- سفاروز با استفاده از pH=۶ ، سیترات ۲۰mM و شستشو با سرعت ۳۴ml/h (n=۳)

توضیحات	Protein (mg/ml)	FIX Activity (IU/ml)	FIX: Ag (U/ml)	Specific activity (IU/mg)	Purity	FIXc: Ag	Volume (ml)
DEAE elute	۰/۳۸۰ ± ۰/۰۲۵	۱/۱۸ ± ۰/۰۳	۱/۹	۳/۱	۱۵۵	۰/۶۲	۳۷/۵
Dilute ۱/۵	۰/۰۷۵ ± ۰/۰۰۵	۰/۲۳ ± ۰/۰۱	۰/۳۸	۳/۱	۱۵۵	۰/۶۲	۱۸۷
Filtrate	۰/۰۳۵ ± ۰/۰۰۲	۰	۰/۰۳	۰	۰	۰	۱۸۷
۰/۰۸ NaCl	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۰۲	۰	۰/۰۳	۰	۰	۰	۴۴
۰/۲ NaCl	۰/۰۴۲ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۱ ± ۰/۰۱	۰/۱۰	۰	۰/۲	۰/۱	۴۵
۰/۴ NaCl	۰/۰۷۰ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۰/۶۰	۱	۵۰	۰/۱۱	۳۱
۰/۶ NaCl	۰/۰۳۵ ± ۰/۰۰۱	۰/۵۸ ± ۰/۰۰۲	۱/۰۵	۲۹	۱۴۵۰	۰/۵۵	۳۴
۰/۸ NaCl	۰/۰۱۰	۰	۰/۰۸	۰	۰	۰	۲۱
۲ NaCl	۰/۰۰۸	۰	۰/۰۴	۰	۰	۰	۱۴
۰/۵ NaOH	۰/۰۱۵	۰	۰/۰۱	۰	۰	۰	۱۱

جدول ۳ : مراحل مختلف تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی

توضیحات	Protein (mg/ml)	FIX Activity (IU/ml)	FIX: Ag (U/ml)	Specific activity (IU/mg)	Purity	FIX_{Ag} Protein (%)	FIXc/Ag	Load Volume (ml)	Product Volume (ml)
آزمایشگاهی CPP	۵۲ ± ۱	۰/۹۳ ± ۰/۰۲	۱	۰/۰۱۷۹	<۱	۰/۰۰۶	۰/۹۳	-	-
DEAE elute	۰/۳۸۰ ± ۰/۰۲۵	۱/۱۸ ± ۰/۰۳	۱/۹	۳/۱	۱۵۵	۲	۰/۶۲	۲۰۰	۸۷
Heparin elute	۰/۰۲۰ ± ۰/۰۰۱	۰/۵۸ ±۰/۰۰۲	۱/۰۵	۲۹	۱۴۵۰	۲۱	۰/۵۵	۳۷/۵	۲۱

بحث

در تحقیق حاضر مشخص شد که در مقیاس آزمایشگاهی در تهیه فاکتور IX در صورتی که علاوه بر کروماتوگرافی تعویض یونی (با استفاده از DEAE- سفاروز) از کروماتوگرافی تمایلی هپارین (که نقش تعویض‌کننده کاتیونی هم دارد) استفاده گردد، فعالیت ویژه فاکتور IX افزایش یافته و از فعالیت ویژه ۳/۱IU/mg در مرحلهٔ DEAE- سفاروز به ۲۹IU/mg در مرحله هپارین- سفاروز می‌رسد که خلوص آن در مقایسه با پلاسما حدود ۱۴۵۰ برابر شده است. در حالی‌که در استفاده تنها از کروماتوگرافی تعویض یونی، خلوص فاکتورIX حدود ۱۵۵ برابر پلاسما بود. ضمن این که فعالیت ویژه فاکتور IX در پلاسما کمتر از ۰/۰۲ بود.

اندرسون و همکارانش به‌منظور مشخص کردن خصوصیات فاکتور IX، از چند مرحله استفاده نمودند. در ابتدا از DEAE- سفادکس استفاده کردند، این در حالی بود که فعالیت ویژه فاکتور IX در این مرحله فقط به ۰/۸U/mg می‌رسید (۴۰ برابر خالص‌سازی) (۷).

مناچ وهمکارانش از روش دو مرحله‌ای استفاده کردند. آن‌ها در ابتدا از DEAE- سفادکس استفاده نمودند (که همراه آن دیافیلتر هم بود) و فعالیت ویژه فاکتور IX را به ۲/۱U/mg رساندند (یعنی ۱۰۵ برابر خالص‌سازی نسبت

Archive of SID
www.SID.ir

به پلاسما) (۸). میچالسکی و برنف، روش یک مرحله‌ای تهیه کمپلکس پروترومبین (روش اصلی تهیه کنسانتره فاکتور IX تا سال‌های گذشته) را با روش دو مرحله‌ای تهیه کنسانتره فاکتور IX مقایسه کردند. در روش یک مرحله‌ای، از DEAE- سفادکس (اصلی‌ترین ژل تهیه کنسانتره فاکتور IX و در واقع تهیه کمپلکس پروترومبین) استفاده کردند. فعالیت ویژه فاکتور IX در این مرحله فقط ۱/۱U/mg بود (یعنی ۵۵ برابر خالص‌سازی). آن‌ها سپس از روش دو مرحله‌ای استفاده کردند که در آن ابتدا از DEAE- سفاروز استفاده می‌شد و فعالیت ویژه فاکتور IX را به ۲/۹U/mg می‌رساند (تقریباً ۱۴۵ برابر خالص‌تر از پلاسما) (۹). هوفر و همکاران از روش سه مرحله‌ای استفاده کردند. آن‌ها ابتدا از DEAE- سفادکس و سپس از DEAE- سفاروز استفاده نمودند که خلوص آن در این مراحل به‌ترتیب ۵۰ و ۲۰۰ برابر پلاسما بود (یعنی به‌ترتیب فعالیت ویژه‌ای معادل ۱U/mg و ۴U/mg را به‌وجود آوردند) (۱۰). در تحقیق حاضر نیز از روش دو مرحله‌ای استفاده گردیده است. ابتدا از DEAE- سفاروز استفاده شده که طی آن فعالیت ویژه فاکتور IX به ۳/۱U/mg رسیده است و اگر این فعالیت ویژه با فعالیت‌های ویژه‌ای که شرح داده شد مقایسه شود، مشخص می‌گردد که نسبت به‌روش‌های یک مرحله‌ای تعویض یونی، خلوص بهتری به‌دست آمده و خلوصی نزدیک به‌روش‌های دو مرحله‌ای تعویض یونی فراهم شده است.

اندرسن و همکارانش در مرحله دوم کار خود از هپارین- سفاروز استفاده کردند و فعالیت ویژه فاکتورIX را از ۰/۸U/mg به ۶/۹U/mg رساندند (۳۴۵ برابرخالص‌سازی نسبت به پلاسما و ۸/۵ برابر خلوص نسبت به مرحله قبل) و بعد از آن در مرحله سوم مجدداً از همین ستون هپارین- سفاروز استفاده کردند و فعالیت ویژه فاکتور IX به ۲۳/۵U/mg رسید (یعنی ۱۱۷۵ برابر خالص‌سازی نسبت به پلاسما و ۳/۴ برابر خلوص نسبت به مرحله قبل). مناچ و همکارانش در مرحله دوم از دکستران استفاده کردند که در نهایت فعالیت ویژه از ۲/۱U/mg به ۱۷/۴U/mg رسید (که معادل ۸۷۰ برابر خالص‌سازی نسبت به پلاسما و ۸/۳ برابر نسبت به مرحله قبل بود). میچالسکی و برنف در ادامه مقایسه خود (در مقیاس تولیدی) درمرحله دوم از هپارین- سفاروز استفاده کردند که فعالیت ویژه فاکتورIX را از ۲/۹U/mg به ۱۰/۹U/mg می‌رساند (تقریباً ۵۵۰ برابر خالص‌تر از پلاسما و ۳/۷۵ برابرخالص‌تر از مرحله قبل). هوفر و همکاران در ادامه روش سه مرحله‌ای از هپارین- سفاروز استفاده کردند که خلوص فاکتورIX در این مرحله ۲۵۰۰ برابر پلاسما (و ۱۲/۵ برابر مرحله قبل) بود (یعنی فعالیت ویژه از ۴U/mg به ۵۰U/mg رسید). در تحقیق حاضر نیز در مرحله دوم از هپارین- سفاروز استفاده شده است که در طی آن فعالیت ویژه فاکتورIX از ۳/۱U/mg به ۲۹U/mg رسیده است (یعنی ۱۴۵۰ برابر خالص‌تر از پلاسما و ۹/۳ برابر خالص‌تر از مرحله قبل). با مقایسه‌ای بین تحقیق موجود و آن چه که در سطور بالا گذشت، مشخص می‌شود که با تغییر شرایط می‌توان فعالیت ویژه فاکتورIX را در مرحله استفاده از هپارین- سفاروز به نسبت‌های متفاوت افزایش داد.

برانویچ و همکارانش نیز از روش دو مرحله‌ای استفاده کردند. ابتدا از DEAE- سفاروز و در نهایت از ستون‌های منولیتیک استفاده شد و فعالیت ویژه فاکتورIX به ۲۸U/mg رسید (تقریباً ۱۴۰۰ برابر خالص‌تر از پلاسما). آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که هنگامی‌که از دو ستون HAP[1] وسپس ازHIC[2] استفاده گردد، میزان فعالیت ویژه فاکتورIX به ۱۵U/mg می‌رسد (۷۵۰ برابرخالص‌تر از پلاسما).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اضافه نمودن یک مرحله کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از هپارین در تهیه فاکتور IX انعقادی از پلاسمای انسانی، موجب افزایش درجه خلوص و فعالیت ویژه آن گردید. میزان فعالیت ویژه فاکتور IX از ۳/۱IU/mg به ۲۹IU/mg و خلوص آن در مقایسه با میزان آن در پلاسما از ۱۵۵ برابر (با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی) به ۱۴۵۰ برابر افزایش یافت.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم بدینوسیله از پرسنل محترم بخش تحقیقات

1- Hydroxyl Amino Propyl
2- Hydrophobic Interaction Chromatography

Archive of SID
www.SID.ir

آقای بهزاد ادیبی و خانم‌ها صدیقه چابک‌پی و صدیقه نوروزنیا همچنین آقای دکتر کرباسی‌زاده از بخش انعقاد سازمان که در این پروژه ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی نماییم.

منابع

1- Ernest B, Marshall A, Barry S, Thomas J, Uri Seligwohn U. Hematology. Sixth edition. Mc Graw-Hill, 2001: 1409.
2- Myles L, Geun G, Armando C. Purification of recombinant DNA derived factor IX produced in transgenic pig milg and fractionation of active and inactive subpopulations. Chromatography. 2004; 1026: 149-157.
3- Stamatoyannopoulos N, Magerus V. The molecular basis of blood diseases. Third edition, W Saunders Company 2001: 694.
4- Harris. Blood separation and plasma fractionation. John wiley public 1991: 348.
5- Tingyue G, Kuang H. Scale up of affinity chromatography for purification of enzymes and other proteins. Enzyme and microbial technology 2003; 33: 430-437.
6- Thierry B, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins. Biochem Biophys Methods 2001; 49: 575-586.
7- Andersson L, Borg H, Miller M. Purification and characterization of human factor IX. *Thromb Res* 1975; 7: 451-459.
8- Menache D, Behre H, Orthner CL. Coagulation factor IX concentrate: Method of preparation and assessment of potential in vivo thrombogenicity in animal models. Blood 1984; 64: 1220-1227.
9- Michalski C, Burnouf T, Bal F. Large scale production and properties of a solvent detergent treated factor IX concentrate from human plasma. Vox Sang 1988; 55: 202-10.
10- Hoffer L, Schuinn H, Josic D. Production of highly purified clotting factor IX by a combination of different chromatographic Methods. J Chromatogrphy A 1999; 844(1-2): 119-128.
11- Branovic K, Buchacher A. Application of semi industrial monolithic columns for downstream processing of clottin factor IX. Chromatography B 2003; 790: 175-182.

Archive of SID

www.SID.ir

Improving purification of coagulation F IX using heparin affinity chromatography and its comparison with ion exchange chromatography

Musavi Motlagh S.Sh.[1](MS), Rezvan H.[2](PhD), Pourfathollah A.A.[1,2](PhD), Mousavi Hosseini M.K.[2](PhD)

[1]*Tarbiat Modarres University*
[2] *Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives
Hemophilia B is a genetic disorder due to deficiency or complete absence of factor IX coagulation factor. Treatment of choice for these patients is use of factor IX concentrates. Therefore, purification of plasma proteins and seperation of factor IX have been major objectives for scientists involved in this field. In this respect, purification procedure using ion exchange chromatography is widely used, but in the past decade affinity chromatography was also introduced. The objective of the present study has been to apply both techniques for the purification of factor IX and compare the quality and yield of the product.

Materials and Methods
For the purification procedure, chromatography columns (XK-16), containing DEAE sepharose and Heparin sepharose were used. Factor IX coagulation activity was measured using a one-stage coagulation assay and factor IX antigen was quantified using ELISA technique.

Results
The specific activity and relative increase in purity of factor IX was calculated and it was demonstrated that specific activity improved from 3.1 IU/mg using DEAE ion exchange to 29 IU/mg when affinity chromatography was added and purity was increased from 155 to 1450 respectively.

Conclusions
The present study demonstrates that addition of an affinity chromatography step using heparin sepharose is a major improvement in the purification of factor IX, where both specific activity and purity are increased considerably.

Key words: Heparin affinity chromatography, Factor IX, Hemophilia B, Ion exchange chromatography
SJIBTO 2005; 2(4): 91-98

Received: 5 Jan 2005
Accepted: 1 Jun 2005

Correspondence: Musavi Motlagh S.Sh. , MS of Hematology, Tarbiat Modarres University
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+98251) 7744121; Fax : (+98251) 7748774
E-mail: *Shahabi088@yahoo.com*

www.SID.ir