Archive of SID

مجله علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۷، شماره ۲: از ۷۱ تا ۸۰
پاییز و زمستان ۱۳۸۳

جداسازی و تخلیص آلفا ۱– مهارکننده پروتئیناز از منبع انسانی و تعیین برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن

عباس صاحبقدم لطفی[1*]، بهزاد ادیبی مطلق[2]، کامران موسوی حسینی[3]، مهدی محمودی[4]

۱- دانشیار گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس ، تهران
۲- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، شرکت پالایش و پژوهش خون ، تهران
۳- عضو هیئت علمی سازمان انتقال خون ، تهران
٤- دانشیار گروه بیوشیمی، بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

چکیده

هدف: مطالعه حاضر روش تخلیص آلفا-۱- مهار کننده پروتئیناز[1] از منبع غنی شده خمیر IV-1 کوهن را با حذف مراحل پیچیده و مواد شیمیایی گران قیمت در شرایط ساده و مقرون به صرفه و سریع توضیح می دهد.

مواد و روشها: ابتدا A1PI با دو مرحله رسوبگیری به وسیله پلی اتیلن گلیکول از سایر پروتئینهای موجود درمنبع اولیه(خمیر IV-1 استخراج و سپس با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یون روی ژل DEAE-سفاروز CL6B پروتئین با درجه خلوص بالاتر جداسازی و تخلیص شد. ویروس زدایی محصول به روش پاستوریزاسیون (انکوباسیون ٦۰°C و ۱۰ ساعت) بدون تغییر فاحش در فعالیت بیولوژیکی پروتئین آن انجام شد. محصول نهایی به وسیله روش اولترافیلتراسیون تغلیظ و سپس به صورت لیوفیلیزه نگهداری شد. برای تعیین فعالیت پروتئین از ظرفیت مهاری تریپسین (TIC) استفاده شد. میزان A1PI محصول با روش ایمونودیفیوژن شعاعی (SRID) تعیین شد.

نتایج:در این فرایند راندمان ٦۰٪ و درجه خلوص A1PI ایزوله شده ۰/٦۲ و وزن ملکولی آن با استفاده از روش SDS-PAGE در حدود ٥٤۰۰۰D تخمین زده شد. همچنین برای مشاهده دقیقتر درجه خلوص و تایید خاصیت آنتی ژنیک (ایمونوراکتیویته) از روش ایمونوالکتروفورز درمقابل آنتی بادی تام انسانی و آنتی بادی اختصاصی برعلیه A1PI استفاده شد.

نتیجه گیری: نتایج فوق بیانگر تخلیصA1PI با درجه خلوص ٦۲٪ می باشد، همچنین بررسی A1PI و تریپسین حاکی از آن بود که µg ۲-۱/٥ از این پروتئین توانایی مهار µg ۱ تریپسین را داشت بنابراین هم درجه خلوص و هم خاصیت مهار کنندگی A1PI تخلیص شده با نوع تجاری قابل مقایسه است.

کلید واژگان: آلفا۱- مهار کننده پروتئیناز (آلفا۱- آنتی تریپسین)، پالایش پلاسما، خمیرIV-1 کوهن، تخلیص پروتئین.

نشانی مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۵-۱٤۱۱٥، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی بالینی E-mail: lotfi_ab@modares.ac.ir

1 . Alpa-1-Proteinase Inhibitor=A1PI

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

آلفا-۱- آنتی تریپسین[1] متعلق به ابر خانواده مهار کنندگان سرین پروتئازها[2] می باشد که قادر است طیف وسیعی از سرین پروتئازها را مهار کند. بنابراین نام عمومی تر آلفا -۱- مهار کننده پروتئیناز[3] را به جای A1AT برای این پروتئین مهاری در نظر گرفتند[۱]. سه وظیفه کلی A1PI عبارتند از: ۱) کنترل فعالیت آمفیزمهای پروتئولیتیک(به عنوان مهمترین وظیفه) ۲) کنترل غیر مستقیم فعالیت فاکتورهای انعقادی۳) تنظیم نوسازی بافتهای همبند[۳،۲]روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن A1PI ۳٤mg به وسیله کبد سنتز و فوراً به داخل گردش خون ترشح می شود، (جمعاً میزان آن در خون افراد مختلف بین mg /ml ۳/۵-۱/۵ متغیر است) که ٦۰ درصد از مقدار فوق به داخل دیگر بافتها و مایعات بدن انتشار می یابد [٤،۱]. کمبود A1PI به دو صورت مادرزادی و اکتسابی وجود دارد، که کمبود مادرزادی آن می تواند به آمفی زم ریوی و برخی بیماریهای دیگر منجر شود. فرم کمبود اکتسابی A1PI (آمفی زم ثانویه) در اثر عوامل محیطی از قبیل در معرض قرار گرفتن با مواد شیمیایی و گازهای جنگی ایجاد، و یا در افراد سیگاری مشاهده می شود، که هر دو فرم کمبود ارثی و اکتسابی از طریق تزریق A1PI قابل درمان است[۵]. مصرف A1PI به صورت استنشاقی برای بهبود بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس استفاده شده است[٦،٤]. ساختمان A1PI از یک زنجیره پلی پپتیدی شامل ۳۹٤ اسید آمینه و یک ریشه سیستئینی آزاد تشکیل شده است. وزن مولکولیA1PI ٥۲kD تا٥٤ و pH ایزوالکتریک (pI) آن بین ٤/٤ تا ٤/۷ متغییر است. ۱۲٪ وزن این گلیکوپروتئین پلاسمایی را کربوهیدرات تشکیل می دهد که به صورت سه کمپلکس اولیگوساکاریدی متفاوت بر روی ریشه های آسپاراژین ۸۳؛٤٦ و۲٤۷واقع شده اند. این بخش کربوهیدراتی ممکن است دو یا سه شاخه ای با مقدار مختلف اسید سیالیک باشد. تفاوتهای فوق باعث ایجاد هشت فرم متفاوت (میکروهتروژن) از نظر حرکت الکتروفورزی بر روی ژل ایزوالکتریک فوکوسینگ می شود.

با آنکه محققان از منابع مختلفی برای جداسازی A1PI انسانی استفاده کرده اند از جمله از اشرشیا کلی [۷] ، مخمر[۸] و گوسفند ترانس ژنیک[۹] اما کماکان صنعت پالایش پلاسما به روش اتانول – سرد[4] به عنوان یکی از رایج ترین روشها در اکثر مراکز انتقال خون کشورها برای تخلیص پروتئینهای پلاسمایی به ویژه در مورد پروتئینهای عمده پلاسما[5] از قبیل آلبومین و ایمونوگلوبولینها محسوب می شود[۱۰، ۱۱]؛ بدین لحاظ محققان دیگر از پلاسما [۱۲] و یا از فراکشنهای غنی شده پلاسما از قبیل مایع رویی II+III [۲] به عنوان منبع اولیه به کار بردند، اما نظر به اینکه فراکشن IV-1 منبع غنی از پروتئینهای باند α_1 به ویژه A1PI می باشد[۱۱،۱۰] ؛ لذا محققان دیگر از این فراکشن استفاده کرده اند[۱۵،۱٤،۱۳،۱]. با اینحال استفاده از پروسه کروماتوگرافی به دنبال مراحل رسوبگیری/ تغلیظ به منظور تهیه پروتئینهای شکننده[6] (از قبیل آنتی پروتئازها و فاکتورهای انعقادی) با درجه خلوص بالا به ویژه جهت مصارف درمانی ضروری به نظر می رسد[۱۰ ، ۱۱].

تشابه خصوصیات فیزیکوشیمیایی A1PI به آلبومین، جداسازی و تخلیص A1PI را از پلاسما مشکل می کند[۱٦،۱۵] در این مطالعه سعی شده است با انتخاب دقیق منبع اولیه مورد استفاده برای تخلیص A1PI همچنین روشهای مناسبی که بتوانیم علاوه بر دستیابی به درجه خلوص بالا (برای مصارف درمانی) وراندمان مناسب با جوانب اقتصادی نیز رعایت شود.

۲- مواد و روشها

۲-۱- روش کار

فراکشن Cohn IV-1 (که به روش پالایش پلاسما با اتانول- سرما در شرکت پالایش و پژوهش خون ایران تهیه گردید) به عنوان منبع اولیه تخلیص انتخاب شد. ابتدا پلاسمای تازه منجمد شده[7] را در دمای ٤°C ذوب، و پروتئینهایی که در سرما رسوب می کنند[8] به کمک سانتریفوژ جدا شدند و سپس فراکشن I از

1. Alpha-1-Antitrypsin=A1AT
2. Serine proteinase Inhibitor
3. Alpha-1-proteinase Inhibitor= AIPI
4. Cohn
5. Bulk proteins
6. Liable proteins
7. Fresh Frozen Plasma = F.F.P
8. Cryo precipitate = C.P

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمای فاقد پروتئینهای غیر مقاوم به سرما[1]، به وسیله اتانول ۸٪ رسوب داده شدند. با افزودن اتانول تا حد ۲۰٪ به محلول رویی[2] مذکور، ایمونوگلوبینها در فراکشن II+III رسوبگیری شدند. با کاهش pH تا حد ۵/۱ خمیر IV-1 از محلول رویی II+III رسوب داده و تهیه شد.

۳۰g خمیرIV-1 در بافر تریس ۵ میلی مولار به کمک حرارت ۴۵°C به مدت ۹۰ دقیقه حل شد و هدایت سنجی سوسپانسیون IV-1 به کمک سالین در حدود ۵ میلی زیمنس تنظیم گردید. سپس سوسپانسیون مذکور تا دمای ۵°C سرد و به آن PEG ۴۰۰۰[3] (۱۱/۵٪ W/V) افزوده و pH محلول به کمک اسید استیک ۱ نرمال بین ۵/۲-۵ تنظیم گردید. رسوب حاصله دور ریخته شد و pH محلول رویی باقی مانده به وسیله سدیم هیدروکسید ۱ مولار دقیقاً بر روی pH=۶/۵ تنظیم و با افزودن (۲۵٪ W/V) PEG 3350 رسوب حاصله تحت عنوان خمیر حد واسط[4] برای ادامه پروسه تخلیص در دمای ۳۰°C- نگهداری شد. به منظور انجام کروماتوگرافی ابتدا بایستی از خمیر I.P سوسپانسیون تهیه می شد، لذا خمیر مذکور در بافر سدیم فسفات ۲۵٪ مولار با pH=۶/۵ (که همان بافر متعادل کننده و شستشو دهنده ستون بود) حل شد. نمونه با سرعت (جریان عبور)[5] ml ۱ بر دقیقه از ستون K×۲۶ (فارماسیا) که حاوی ژل DEAE – سفاروز – CL6B بود عبور داده شد.پس از شستشوی کامل ژل با بافر شستشو، پروتئینهای متصل شده به گروههای DEAE ژل، به وسیله بافر جدا کننده (بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار + کلرید سدیم ۰/۳ مولار با pH = ۶/۵) که به صورت گرادیان اضافه شده بوده، از ستون جدا شد و در فراکشن های با حجم هر کدام ۵cc در انتهای ستون جمع آوری شدند. به منظور غیر فعال ساختن عوامل عفونت زا و ویروس زدای محصول از روش پاستوریزاسیون (در دمای ۶۰°C به مدت ۱۰ ساعت)، در حضور پایدار کننده های سدیم سیترات ۰/۳۸ مولار و ساکروز W/V ۳۷٪ استفاده گردید. به کمک اولترافیلتراسیون نمونه به وسیله فیلتر با منافذ ۱۰۰۰۰ تغلیظ شد، که غلظت پروتئین در محصول نهایی mg/m1 ۲۸ بود. به منظور نگهداری نمونه برای مدت طولانی به وسیله فریزدرایر محصول لیوفیلیزه شد.

۲-۲- سنجش فعالیت مهار کنندگی و فعالیت ویژه A1PI

روش محاسبه ظرفیت مهاری تریپسین

A1PI سرم از هیدرولیز سوبسترای کروموژنیک BAPNA[6] (تهیه شده از سیگما) به وسیله تریپسین (سیگما) محلول در بافرتریس جلوگیری می کند. واکنش به وسیله افزودن اسید استیک ۱نرمال متوقف می شد و جذب حاصله پس از مدت ده دقیقه در طول موج ۴۰۵ nm در دمای ۳۷°C خوانده می شد. در این طول موج PNA [7] دارای جذب مولی ۱۰/۵ است. ضمناً در این آزمایش از آلبومین به عنوان شاهد استفاده شد و غلظت A1PI با شدت رنگ تولید شده رابطه عکس دارد. روش مذکور به ظرفیت مهاری تریپسین[8] معروف است که واحد آن بر حسب فعالیت آنزیمی μ mol/min /ml بیان می شود[۱۷].

۲-۳- تعیین میزان A1PI بوسیلهٔ ایمونودیفیوژن شعاعی[9]

اساس کار در این روش واکنش آنتی بادی- آنتی ژن است، که درون پلیت مدوری که قبلاً از ژل آگاروز ۲٪ + غلظت مشخصی از آنتی بادی بر علیه A1PI[10] پر شده می باشد. اندازه گیری نقطه تعادل، به وسیله خط کشی مخصوص SRID انجام شد. قطر حلقه رسوبی بستگی به غلظت A1PI نمونه بستگی دارد (تمام مراحل کار در دمای ۳۷°C انجام شد) پس از۲۴ ساعت مجذور قطر دایره مربوط به هر یک از نمونه ها اندازه گیری و با مقایسه آن با منحنی استاندارد، میزان کمی A1PI بر حسب واحد mg/d1 مشخص می شود.

1. Cryo Poor Plasma = C.P.P
2. Supernatant
3. Polyethylene glycol = PEG
4. Intermediate Paste = I.P
5. Flow rate
6. Benzoyle Arginine Para – Nitro Anilide = BAPNA
7. Para – Nitro Anilide= PNA
8. Trypsin Inhibitor capacity = TIC
9. Single Redial ImmunoDiffusion = SRID
10. Rabbit – anti – Hu AIPI

www.SID.ir

Archive of SID

۲-٤- اندازه گیری پروتئین تام

به کمک متد بیوره در زول موج ٥٤٦ nm و یا به روش جذب ماوراء بنفش در طول موج ۲۸۰ nm غلظت پروتئین تام اندازه گیری شد.

۲-٥- الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات[1]

روش SDS-PAGE براساس روش lammli و بااستفاده از ژل متراکم کننده با غلظت ٤٪ و ژل جداکننده با غلظت ۷/٥٪ انجام شد. ژل با کوماسی بریلیانت بلو R250 رنگ آمیزی گردید. لازم به توضیح است پروتئینهای استاندارد ملکولی نیز درکنار نمونه ها قرار داده شد.

۲-٦ مطالعات ایمونوالکتروفورز

ژل آگاروز ۱/۲٪ مذاب را روی اسلاید ریخته و پس از برقراری جریان الکتریکی، نمونه های حاوی پروتئین از قطب منفی به سمت مثبت حرکت می کنند. سپس درون شیارهای طولی از قبل تعبیه شده در ژل، به صورت یک در میان از آنتی سرم تام انسانی[2] و آنتی بادی بر علیه A1PI پر شد. اسلاید مذکور را به مدت ۲٤ ساعت در اطاقک مرطوب قرار داده و پس از رنگ آمیزی به وسیله کوماسی بلو، و رنگ زدایی اسید استیک ٥٪، اسلاید خشک شد.

۳- نتایج

فعالیت ویژه A1PI تخلیص شده ۰/۶۲ و راندمان تخلیص ۶۰٪ بود.

۳-۱- بررسی شرایط تهیه سوسپانسیون از فراکشن IV-1

جدول شماره ۱ نتایج حاصل از تأثیر تغییر عواملی چون pH و مولاریته بافر، حرارت و مدت زمان انکوباسیون هنگام تهیه سوسپانسیون از خمیر IV-1 را نشان می دهد. با توجه به اینکه فاکتور تخلیص در روش دوم بالاتر است، بنابراین مشخص شد عوامل موجود در روش دوم شرایط مناسب تری برای تهیه سوسپانسیون IV-1 محسوب می شوند.[جدول ۱]

۳-۲- نتایج حاصل از استخراج A1PI از سوسپانسیون IV-1 به وسیله دو مرحله رسوب گیری با PEG و تغییر pH محیط

به منظور بررسی اینکه در هر یک از دو مرحله رسوب گیری A1PI در محلول رویی باقی مانده و یا اینکه در رسوب تشکیل شده فعالیت A1PI نسبت به پروتئین تام سنجش شد که نتایج حاصل مشخص کرد که در مرحله اول رسوب گیری A1PI در محلول رویی و در مرحلهٔ دوم در رسوب جمع آوری گردید، ولی بر عکس بخشی از آلبومین در مرحله اول در رسوب تشکیل شده وجود داشت و در مرحله دوم به همراه سایر پروتئینهای با وزن ملکولی بالا در محلول رویی باقی مانده است. مقایسه فعالیت ویژه سوسپانسیون حاصل از حل کردن خمیر I.P نسبت به سوسپانسیون IV-1 نشان داد که فعالیت ویژه A1PI، پنج برابر افزایش یافته است.[جدول ۳]

۳-۳- نتایج حاصل از کروماتوگرافی DEAE – سفاروز- CL6B

ژل مذکور علاوه بر اینکه یک تعویض کننده آنیونی عمل می کند، دارای خاصیت جذب اختصاصی است، لذا انتخاب دقیق شرایط کروماتوگرافی یعنی جریان عبور، حجم قرار داده شده بر روی ستون[3] و همچنین طرز افزودن بافر جدا کننده در جدا سازی سازی بهتر A1PI از نمونه به ویژه آلبومین حائز اهمیت است. لذا در این مطالعه تحت تأثیر تغییر سه فاکتور مذکور عمل کروماتوگرافی انجام شد که نتایج آن در جدول شماره ۲ آمده است.

بررسی فعالیت ویژه A1PI بر روی قسمت های جمع آوری شده حاکی از آن بود که مناسبترین شرایط مربوط به روش سوم

1. SDS-PAGE
2. Whole anti human serum
3. CV Loading = Column Volume Loading

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ نتایج حاصل از تغییر چندین فاکتور برای دستیابی به‌مناسب‌ترین شرایط تهیه سوسپانسیون از فراکشن IV-1 :

ردیف	وزن خمیر (گرم)	حجم بافر مصرفی (ml)	مولاریته و بافر (مولار)	PHبافر	حرارت و مدت انکوباسیون	فعالیت A1PI (mg/ml)	پروتئین تام (mg/ml)	فعالیت ویژه	فاکتور تخلیص نسبت به پلاسما
۱	۳۷/۵	۳۰۰	۰/۱	۸/۲	۴۰°C-۶۰min	۱/۵	۲۸/۵	٪۵۲	۲
۲	۳۰	۳۰۰	۰/۰۰۵	۹	۴۵°C-۹۰min	۱/۲۵	۲۱	٪۶۰	۲/۴

جدول ۲ نتایج حاصل از بررسی تاثیر سه فاکتور Flow rate ، CV-loading و طرز افزودن بافر جداکننده برروی کروماتوگرافی A1PI

ردیف	Flow rate (ml/min)	CV-loading (ml)	حجم بافر شستشو (ml)	حجم بافرelution (ml)	طرز افزودن بافرelution	فعالیت (mg/ml)	پروتئین تام (mg/ml)	فعالیت ویژه
۱	۲	۲۵۰	۴۲۰	۳۵۰	یک‌مرحله‌ای	۸/۲	۱۶	۰/۵۱
۲	۴	۷۵	۲۴۰	۱۸۰	یک‌مرحله‌ای	۷/۶	۱۴	۰/۵۴
۳	۱	۱۸۰	۱۲۰۰	۶۰۰	گرادیان+قدرت نمکی	۹/۳۵	۱۴/۵	۰/۶۴

بررسی فعالیت ویژه A1PI بر روی فراکنش‌های جمع‌آوری شده حاکی از آن بود که مناسب‌ترین شرایط مربوط به روش سوم است (که نشان از شستشوی دقیق ژل به منظور حذف نمودن پروتئین‌های جذب نشده) و جداسازی بهتر A1PI از ستون کروماتوگرافی داشت.

جدول ۳ نتایج حاصل از تخلیص A1PI از ۳۰ گرم از خمیر IV-1

نمونه	فعالیت (a) (mg)	پروتئین تام (b) (mg)	فعالیت ویژه	ضریب تخلیص	راندمان
سوسپانسیون IV-1	۴۳۳/۷۵	۷۴۵۵	۰/۰۶	۱	۱۰۰
مایع رویی مرحلهٔ اول رسوبگیری	۴۱۳/۲۵	۴۱۳۲/۵	۰/۱	۱/۶۶	۹۳
سوسپانسیون I.P	۳۴۸	۹۹۰	۰/۳۵	۵/۸۳	۸۴
فراکشن‌های جمع‌آوری شده	۲۸۰	۴۳۵(c)	۰/۶۴	۱۰/۶۶	۶۳
محصول نهایی	۲۶۸	۴۳۵	۰/۶۲	۱۰/۵	۶۰

۱- فعالیت مهار کنندگی A1AT به روش TIC اندازه‌گیری شده است.

۲- میزان پروتئین تام به روش بیوره اندازه‌گیری شد.

۳- میزان تعیین پروتئین تام به روش جذب ماوراء بنفش در طول موج ۲۸۰nm مشخص شد

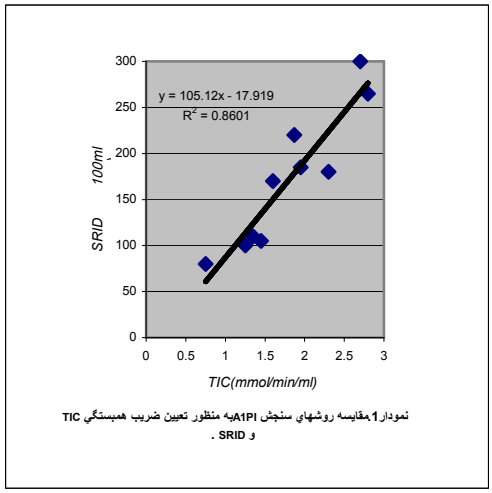
www.SID.ir

Archive of SID

است، که نشان از جداسازی بهتر A1PI توسط کروماتوگرافی داشت[جدول ۲].

۳-٤- نتایج حاصل از مقایسه روش های سنجش A1PI به منظور تعیین ضریب همبستگی بین دو روش TIC و SRID

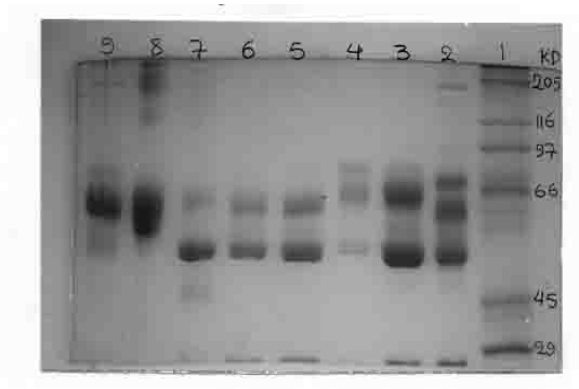
به منظور مقایسه روشهای آنزیماتیک؛ ایمونودیفیوژن و آزمایش همبستگی بین آنها انجام وضریب رگرسیون محاسبه گردید. ضریب رگرسیون ۸٦٪ نشان از وجود همبستگی بالای بین این دو روش داشت. بنابراین می توان فعالیت A1PI به دست آمده به روش TIC را بر حسب واحد mg/ml بیان نمود. [نمودار ۱]



نمودار1.مقایسه روشهای سنجش A1PIبه منظور تعیین ضریب همبستگی TIC و SRID .

۳-٥- نتایج حاصل از SDS-PAGE به منظور تعیین وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده

اسکن باندهای مربوط به محصول نهایی حاکی از وجود دو پیک داشت که تعیین دانسیته این دو پیک به کمک دانستیومتر درمقایسه با باندهای مربوط به آلبومین و A1PI تجاری نشان داد که باند اصلی مربوط به A1PI است که٦٥-٦٠٪ از پروتئینهای محصول نهایی را تشکیل داده و بقیه مربوط به پیک آلبومین است. در صورتی که نمونه A1PI تجاری علاوه بر دو پیک مذکور حاوی پیکهای است که نشان از وجود پروتئین با وزن ملکولی بالا و پایین در آن داشت. ضمناً مقایسه باند اصلی مربوط به محصول نهایی با پروتئینهای با وزن ملکولی معین حاکی از آن است که وزن ملکولی پروتئین تخلیص شده بین دو وزن ملکولی kD ٤٥و٦٦ در محدوده ٥٤- ٥٥ قرار دارد.



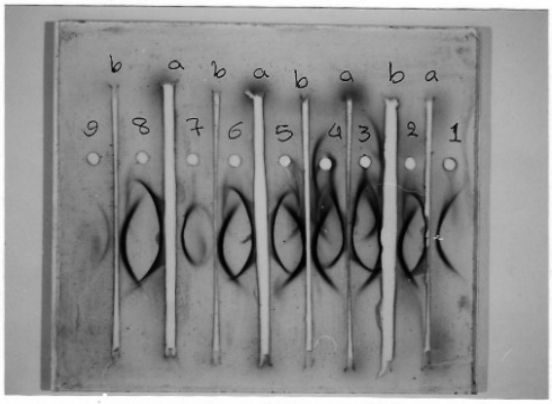
شکل ۱ SDS-PAGE رنگ آمیزی شده به وسیله کوماسی بلو مربوط به مراحل مختلف تخلیص در مقایسه با A1PI و آلبومین تجاری، سایز مارکر و پلاسمای نرمال را نشان می دهد. ردیف ۱(٥µg/L سایز مارکر)؛ ردیف ۲(٥µg/L سوسپانسیون IV-1)؛ ردیف ۳ (٢٥ µg/L محلول رویی مرحله اول رسوب گیری به وسیله PEG)؛ ردیف ٤ (١µg/L سوسپانسیون I.P)؛ ردیف ٥ و ٦(١٠ µg/Lو ٥ محصول نهایی)؛ ردیف ۷(٥ µg/L A1PI تجاری)؛ ردیف ۸(١٠ µg/L آلبومین تجاری)؛ ردیف۹(١ µg/L پلاسمای نرمال)

۳-٦- نتایج حاصل از بررسی نمونه های مربوط به مراحل مختلف تخلیص به کمک روش ایمونوالکتروفورز

شکل ۲ نمونه های مربوط به مراحل مختلف تخلیص را نشان می دهد، در نمونه مربوط به پلاسمای نرمال در مقابل آنتی سرم تام انسانی خطهای رسوبی متعددی وجود دارد ولی در مقابل آنتی A1PI فقط یک خط رسوبی آن مربوط به مبانکنش A1PI-antiA1PI می باشد. اما این امر در مراحل مختلف تخلیص کمتر شده به طوری که در نمونه مربوط به محصول نهایی چه در مقابل آنتی سرم تام انسانی و چه در مقابل آنتی A1PI فقط یک خط رسوبی وجود داشت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲ ایمونوالکتروفورز مراحل مختلف تخلیص و مقایسه آنها با A1PI تجاری و پلاسمای نرمال در مقابل آنتی سرم تام انسانی و آنتی A1PI.(a) آنتی A1PI (b) آنتی سرم تام انسانی؛ آنتی ژن (۱- پلاسمای نرمال؛ ۲و٦و۸ محصول نهایی؛ ۳-سوسپانسیون خمیرIV-1؛ ٤- مایع رویی مرحله اول رسوب گیری به وسیله PEG؛ ٥- سوسپانسیون خمیرI.P ؛ ۷ و۹- A1PI تجاری).

۳- ۷- نتایج کلی مربوط به مراحل مختلف تخلیص

در جدول ۳ آورده شده است.

٤- بحث

صنعت پالایش پلاسما به روش اتانول - سرد به عنوان یکی از رایج ترین روشها در اکثر مراکز انتقال خون کشورها برای تخلیص پروتئینهای پلاسمایی به ویژه در مورد پروتئینهای عمده پلاسما از قبیل آلبومین و ایمونوگلوبولینها محسوب می شود؛ اما استفاده از پروسه کروماتوگرافی به دنبال مراحل رسوب گیری- تغلیظ به منظور تهیه پروتئینهای شکننده (از قبیل آنتی پروتئازها و فاکتورهای انعقادی) با درجه خلوص بالا به ویژه جهت مصارف درمانی ضروری به نظر می رسد[۱۰ ، ۱۱].

مزایای استفاده از فراکشن IV-1 بعنوان منبع اولیه برای جداسازی A1PI عبارتند از:

۱- خمیر IV-1 به عنوان فراکشنی در فرایند پالایش پلاسما محسوب می شود که حداقل فشردگی را بر روی محتویات پروتئین دارد [۱۸].

۲- فراکشن مذکور منبع غنی از پروتئینهای باند ۱ α به ویژه A1PI می باشد [۱۱،۱۰]. و به علاوه خمیر IV-1 را می توان برای مدت طولانی در حرارت زیر صفر نگهداری نمود[۱۵،۱]

در این بررسی غلظت A1PI درمنبع اولیه پلاسمایی (F.F.P) در۳ mg/ml و بازیافت آن در فراکشن I نسبت به منبع اولیه ۹۵٪ و در فراکشن II+III نیز در ۹۰٪ تعیین شده است. با آنکه بازیافت A1PI در خمیر IV-1 نسبت به پلاسما فقط ۲۵٪ اما به علت اینکه قسمت مذکور منبع غنی از پروتئینهای باند α1 است و از طرفی پروتئینهای مزاحم[1] در بخشهای قبلی جدا شده اند؛ بنابراین درجه خلوص آن در خمیر IV-1 نسبت به فراکشنهای قبلی بیشتر است، که این امر در تأیید مطالعات محققان قبلی بود [۱۵،۱]. کاهش شدید بازیافت A1PI درخمیر IV-1 مربوط به شرایط تهیه آن (رسوب گیری به وسیله اتانول ۲۰٪) است که این امر سبب دناتوره شدن A1PI می شود.

در ادامه کار به منظور استخراج A1PI از دیگر پروتئینهای موجود در سوسپانسیون IV-1 از PEG به همراه تغییرpH محیط برای رسوب گیری استفاده شد؛ لازم به ذکر است هنگامی که از ابتدای کار، یعنی بر روی پلاسمای طبیعی، از PEG به عنوان راسب استفاده شد با آنکه بازیافت A1PI در محصول نسبت به منبع اولیه (پلاسما) ۸۰٪ بود، اما فقط به درجه خلوص پنج درصدی دست یافتیم، که علت این امر مربوط به مشابهت خواص فیزیکو شیمیایی A1PI با آلبومین می باشد. به همین جهت Curling برای رسوب گیری و استخراج آلبومین از پلاسما از(۲۵ w/v٪) PEG ٤۰۰۰ ، در محیط pH=٤/٦ استفاده نمود [۱۹،۱۲]. با توجه به بررسی جمیع جهات فوق، در این مطالعه پس از تهیه سوسپانسیون IV-1pH=٥/۱ انتخاب شد تا بالاتر از ٤/۷-٤/٤ یعنی pI مربوط به آلفا-۱- آنتی تریپسین و از طرفی نزدیک به ٤/۸ یعنی pI آلبومین باشد که در حضور PEG٤۰۰۰ عمل رسوب گیری انجام شود، این امر به جدا شدن و رسوب آلبومین کمک کرد، ولی A1PI در محلول رویی باقی

1 . Bulk proteins

www.SID.ir

Archive of SID

ماند. و در مرحله دوم به منظور استخراج A1PI از محلول رویی رسوبگیری با pH=٦/٥ انجام شد که در این شرایط نیاز به PEG بیشتری(٢٥٪ w/v) برای رسوب گیری بود، اما با این حال از PEG با وزن ملکولی پایین تر(٣٣٥٠ PEG) استفاده شد تا آلبومین کمتری رسوب نماید. مهمترین مرحله تخلیص، کروماتوگرافی تعویض یونی نمونه هاست. چون ژل DEAE – سفاروز-CL6B علاوه بر اینکه خاصیت تعویض یونی دارد، دارای جذب اختصاصی است، بنابراین از خودA1PI به عنوان عامل جدا کننده استفاده شد. به عبارت دیگر چون A1PI کمی بهتر از آلبومین به ستونDEAE وصل می شود (با انتخاب٦/٥ =pH و Flow Rate=1 m1/min)؛ لذا آلبومین در مرحله شستشو از ستون جدا می شود. وجود تنها یک پیک پس از به کارگیری بافر جدا کننده به صورت گرادیان که قسمتهای مربوط به نقطه اوج آن دارای بیشترین فعالیت مهار کنندگی A1PI بود نشان از موفقیت انجام مراحل کروماتوگرافی را داشت؛ بنابراین بهترین شرایط برای دستیابی به محصولی که درجه خلوص و راندمان آن مناسب باشد، انتخاب منبع غنی از A1PI است که به روش اتانول – سرد تهیه شده باشد (فراکشن IV-1) سپس به منظور استخراج A1PI از فراکشن مذکور، از PEG با تغییر pH محیط استفاده می شود و در آخر به منظور افزایش درجه خلوص این پروتئین مراحل کروماتوگرافی انجام شود.چنانچه برای تخلیص A1PI، مستقیماً سوسپانسیونIV-1 بر روی ستون کروماتوگرافی قرار داده شود، تنها به درجه خلوص ١٩٪ می توان دست یافت[٢٠]، زیرا آلبومین همراه A1PI در انتهای ستون چدا می شود. Chen با کروماتوگرافی سوسپانسیون IV-1 با DEAE – سفاروز – Fast Flow و عمل تخلیص را انجام داد[١]، اما احتمالاً روش فوق از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد؛ زیرا درجه خلوص بالای ٥٠٪ A1PI برای مصارف درمانی به صورت تزریقی کافی است، مگر برای تهیهٔ A1PI در حد بسیار خالص، از جمله تهیه تحصولی به منظور مصارف استنشاقی که نیاز به درجه خلوص بالاتری است؛ لذا کاری که در این پروژه انجام شد هم از نظر درجه خلوص مناسب بود و هم جنبه های اقتصادی در نظر گرفته شد. در حال حاضر روش پاستوریزاسیون (با توجه به مقاومت حرارتی نسبتاً بالای A1PI) روش مناسبی برای ویروس زدایی این محصول است [٢١،١٠] و فعالیت A1PI بعد از پاستوریزاسیون حداکثر پنج درصدکاهش یافت. همچنین وجود رطوبت کمتر از ٢ درصد در محصول لیوفیلیزه شده و از طرفی حفظ خاصیت مهار کنندگی A1PI درمقایسه با نمونه های محلول، نشان از موفقیت عمل مراحل تخلیص و لیوفیلیزاسیون داشت. برای.بررسی استویکیومتری بین A1PI- تریپسین نشان داد که ١/٥-٢μg از این پروتئین توانایی مهار ١μg از تریپسین را داراست که خاصیت مهارکنندگی A1PI تخلیص شده با نوع تجاری قابل مقایسه است.

وزن ملکولی این پروتئین با استفاده از روش SDS-PAEG D ٥٤٠٠٠ و محل قرار گرفتن آن درست در زیر باند آلبومین واقع شده که تأییدی دیگر بر صحت تخلیص این پروتئین به صورت طبیعی است و برای حذف امکان مداخله سایر پروتئینهای هم وزن در باند حاصله از الکتروفورزو، همچنین تعیین خاصیت ایمونوراکتیویته A1PI تخلیص شده، روش ایمونوالکتروفورز به کار گرفته شد، ضمناً این امر به وسیله SRID نیز تأیید شده بود. علاوه بر موارد مذکور بر اساس تحقیقات Hubbard مشخص شده است که مصرف درمانی (به صورت استنشاق)A1PI تهیه شده از منبع پلاسمایی (p A1PI) و نوترکیب (r A1PI) دارای نتایج مشابهی است، اما جالب اینکه وزن ملکوبی p A1PI به وسیله SDS-PAGE ٥٤kDتخمین زده شد ولی r A1PI در حدود باندkD ٤٥ حرکت می کند[٤] که علت این کاهش وزن به علت عدم تشکیل شاخه های جانبی کربوهیدرات بر روی ریشه های آسپارژین r A1PI می دانند که این امر نشان از این دارد که p A1PI نسبت r A1PI به فرم طبیعی نزدیک تر است.

٥- سپاسگزاری

از مسوولین و کارمندان محترم بخش تحقیقات و تولید شرکت پالایش و پژوهش خون که با در اختیار گذاشتن خمیر IV-I و نیز امکانات آزمایشگاهی در انجام این پروژه ما را یاری کردند، صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

٦- منابع

[1]Chen SX, Hammond DJ, Lang JM, Leging WR. Purification of α_1-proteinase inhibitor from human plasma fraction IV-1 by ion exchange chromatography. Vox Sang 1998; 74: 241-48.

[2]Burnouf T, Constans J, Clere A, Descamps J. Biochemical and biological properties of α_1-antitrypsin concentrate. Vox Sang 1987; 52: 291-97.

[3]Patston PA, Gettins PG, Schapira M. Serpins are suicide substrates: implications for the regulation of proteolytic pathways. Semin Thromb Hemost 1994; 20 (4): 410-6.

[4]Hubbard RC, Crystal RG. Strategies for aerosol therapy of α_1- antitrypsin deficiency by the aerosol route. Lung 1990; 168(suppl.): 565-78.

[5]Werwers MD, Casolaro MA, Sellers SE, Swyze SC. Replacement therapy for Alaph-1-Antitrypsin deficiency associated with emphysema. N Engl J Med 1987; 316: 1055-62.

[6]Allen ED. Opportunities for the use of aerosoli zedα_1-antitrypsin for the treatment of cystic fibrosis. Chest 1996; 110 (6 suppl.): 256s-260s.

[7]Bischoff R, Speck D. Purification and biochemical characterization of recombinant α_1-Antitrypsin variants expressed in escherichia coli. Biochemistry 1991; 30: 3464-72.

[8]Kwon KS, Song M, Yu MH. Purification and characterization of alaph-1-antitrypsin secreted by recombinant yeast saccharomyces diastaticus. J Biotechnol 1995; 42: 191-95.

[9]Harris DP, Andrews AT. The application of aqueous tow-phase systems to the purification of pharmaceutical proteins from transgenic sheep milk. Bioseparation 1997; 7: 31-37.

[10]Ala F, Burnouf T, El-Nageh MM. Plasma fractionation programs for developing countries. WHO Regional Publication 1999; 22: 17-62.

[11]Burnouf T. Plasma protein purification technologies what's Next Trans fus. Today 2000; 42: 11-13.

[12]Grybel J, Wilusz T. The use of immobilized methyl chymotrypsin for the purification of human and sheep alpha 1proteinase inhibitor(α_1-PI). Cell Mol Biol Lett 2003; 8: 363-74.

[13]Galaser CB, Fallat R.Isolation and characterization of $Alpha_1$ antitrypsin from the Cohn fraction IV-1 of human plasma. Prep Biochem 1975; 5: 333-348.

[14]Mattes E, Matthiessen HP. Preparation and properties of $alpha_1$ protease inhibitor concentrate whit high specific activity. Vox Sang 2001; 81: 29-36.

[15]Coan MH, Brockway WJ, Eguizabal H, Kreg T. Preparation and properties of $Alpha_1$–proteinase inhibitor concentrate from human plasma. Vox Sang 1985; 48: 333-42.

[16]Finotti P,Pagetta A. Albumin contamination of a purified human α_1- antitrypsin does no affect either structural conformation or the electrophoretic mobility of the inhibitor. Clin Chim Acta 1997; 164:133- 48.

[17]Dietz AA, Rubinstein HM, Hodegs L. Measurement of $alpha_1$ antitrypsin in serum by immunodiffusion and by enzymatic assay. Clin Chem 1974;20: 396-399.

[18]Hoffman DL. Purification and large scale preparation of antithrombin III. Am J Med 1989; 87: 235-65.

[19]Curling JM, Berglof J, Lindquist LO, Eriksson JA. chromatographic procedure-

www.SID.ir

Archive of SID

for the purification of human plasma albumin. Vox Sang 1977; 33: 97-107

[20]Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: Specific preventative Strategies. Blood Rev 2000;14: 96 –110.

www.SID.ir