**Journal of Ardabil University of Medical Sciences**

**Vol. 20, No. 2, Summer 2020, Pages 151-175**

**Review Article**

# Proteins Separation and Purification Methods with Focus on Chromatography: a Review Study

Babaie M*

Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
**** Corresponding author.*** Tel: +982634570038, Fax: +982634552194, E-mail: m.babaie47@yahoo.com

Received: Aug 9, 2020 Accepted: Nov 12, 2020

## ABSTRACT

Before describing the structure and mechanism of action of a protein, it must first be subject to purification procedure. Protein purification is a set of processes in which one or a small number of proteins are purified from a complex compound that may be a complete cell, tissue, or organism. Understanding the functions, structural properties, and interactions of the protein are directly related to the degree of purity of the protein of interest. In the purification process, the protein and non-protein parts are separated. The biggest challenge is when the protein must be separated from other proteins. The purification procedure of an unknown protein is usually depends on the size, physicochemical properties, binding affinity, and biological activity. The end product of the purification process is called protein isolate. The protein purification process usually involves filtration and one or more chromatographic steps. Chromatography is a useful method for acquiring very pure protein for using in very accurate experiments. Therefore, by purifying the desired molecule, it can be used in various industries, such as medicine.

***Keywords:*** Protein; Purification; Filtration; Chromatography

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**مقاله مروری**

# روش‌های جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها با تمرکز بر کروماتوگرافی: یک مطالعه مروری

***مهدی بابائی****

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸ فاکس: ۰۲۶۳۴۵۵۲۱۹۴ پست الکترونیک: m.babaie47@yahoo.com

**چکیده**

قبل از توصیف ساختار و مکانیسم عملکرد یک پروتئین، ابتدا باید آن را خالص کرد و سپس مورد بررسی قرار داد. خالص‌سازی پروتئین به مجموعه‌ای از فرآیندها گفته می‌شود که در آن یک یا تعداد اندکی از پروتئین‌ها از یک ترکیب پیچیده که ممکن است سلول، بافت یا موجود زنده کامل باشد، خالص می‌گردد. برای این که بتوانیم عملکردها، ویژگی‌های ساختاری و برهم‌کنش‌های پروتئین مورد نظرمان را دریابیم ابتدا لازم است تا آن را خالص کنیم. در فرایند خالص‌سازی، قسمت پروتئینی و غیرپروتئینی از یکدیگر جدا می‌شوند. بیشترین چالش مربوط به زمانی است که پروتئین مورد نظر باید از سایر پروتئین‌ها جدا گردد. مراحل خالص‌سازی معمولاً به اندازه پروتئین، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت زیستی پروتئین مورد نظر بستگی دارد. محصول نهایی فرایند تخلیص، پروتئین جداسازی شده نام دارد. معمولاً فرایند تخلیص پروتئین، شامل فیلتراسیون و یک یا چند مرحله کروماتوگرافی است. با استفاده از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی و بهینه سازی آن، مولکول‌های خالص‌تری بدست می‌آید و تحقیقات دقیق‌تری انجام می‌گیرد. در نتیجه، با تخلیص مولکول مورد نظر، می‌توان از آن در صنایع مختلف از جمله پزشکی استفاده کرد.

**واژه های کلیدی:** پروتئین، تخلیص، فیلتراسیون، کروماتوگرافی

**دریافت:** ۱۳۹۹/۵/۱۹ **پذیرش:** ۱۳۹۹/۸/۲۲

## مقدمه

با پیشرفت روزافزون جهان، تحقیق و بررسی در مورد موجودات زنده و مکانیسم‌های دخیل در بدن آنها اهمیت بسزایی پیدا می‌کند. وقتی صحبت از موجود زنده است، واکنش‌های بیوشیمیایی مطرح می‌شوند، که به واسطه مولکول‌ها و ماکرومولکول‌ها، اتفاق می‌افتد. از این رو اولین قدم در مطالعه موجودات زنده مختلف، در همه علوم زیستی، آشنایی با مولکول‌ها و ماکرومولکول‌های حیاتی آنها است [۱].

با خالص‌سازی این مولکول‌های زیستی، می‌توان اثرات مفید و یا مضر آنها را بر روی ارگانیسم‌های زنده یا سایر مولکول‌ها مورد بررسی قرار داد [۷-۲]. توجه به اصول اساسی بیوشیمی و درک مسائل مربوطه، می‌تواند نقش مهمی را در فراگیری علوم پایه داشته باشد. برای این منظور استفاده از روش‌های مناسب و نوین می‌تواند بسیار مفید باشد. مطالعه حاضر به بررسی چند روش از معتبرترین روش‌های آزمایشگاهی خالص‌سازی مولکول‌های زیستی می‌پردازد.

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**روش کار**

مقاله حاضر، یک مطالعه مروری می‌باشد که پس از جستجو در بانک‌های ISI، Scopus، Pubmed، Google scholar و Medline تهیه شده و سعی شد که در آن از اطلاعات به روز استفاده گردد. از پایگاه اطلاع رسانی جهاد دانشگاهی (SID) و MAGIRAN نیز استفاده گردید. جستجوی کتابخانه‌ای برای جمع‌آوری اطلاعات از کتاب‌های در دسترس و الکترونیکی نیز انجام گرفت. در حد امکان، تمامی مقالات و خلاصه مقالات معتبر خارجی و داخلی مرتبط، مرور گردید. در جستجو از کلمات کلیدی مانند پروتئین، تخلیص، فیلتراسیون، کروماتوگرافی استفاده شده است.

**یافته‌ها**

**انتخاب و ترکیب روش‌های خالص‌سازی**

جداسازی پروتئین‌ها با استفاده از روش‌های خالص سازی انجام می‌شود. روش‌های خالص‌سازی با توجه به تفاوت در ویژگی‌های خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند و هر روش به تعادل بین تفکیک پذیری، سرعت، ظرفیت و بازیابی اشاره دارد [۸].

**ظرفیت**، به مقداری از پروتئین هدف که در طول خالص‌سازی استفاده می‌شود، اشاره دارد. در برخی موارد مقدار نمونه‌ای که می‌توان استفاده کرد به وسیله حجم (مثلاً در ژل فیلتراسیون) یا با مقدار زیادی از مواد زائد که همراه با پروتئین هدف هستند، محدود می‌شود.

**تفکیک پذیری**، به وسیله روش‌های انتخابی و ماده زمینه‌ای کروماتوگرافی در ایجاد پیک‌های باریک به دست می‌آید. به طور کلی، تفکیک پذیری زمانی دشوارتر می‌شود که پروتئین‌های موجود در نمونه دارای خواص بسیار مشابه به هم باشند.

**سرعت**، در ابتدای خالص‌سازی بسیار مهم است، که این امر با حذف مواد زائد، به بیشترین حد خود می‌رسد.

**بازیابی**، به طور فزاینده‌ای به عنوان نتیجه حاصل از خالص سازی به دلیل افزایش ارزش محصول خالص شده مهم است. بازیابی، توسط فرآیندهای مخرب در نمونه و شرایط نامطلوب در ستون تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

**انواع روش‌های مطالعه و تخلیص پروتئین‌ها**

یک روش منفرد و ساده برای تخلیص تمام پروتئین‌ها وجود ندارد و هدف نهایی در تکنیک خالص‌سازی باید مورد توجه قرار گیرد و ابزار تخلیص بسته به نوع پروتئین مورد نظر انتخاب گردد، چرا که فرایند و شرایط مورد استفاده در عمل خالص سازی یک پروتئین ممکن است منجر به غیر فعال شدن پروتئین دیگر گردد. برای مثال، به منظور استفاده از یک آنزیم که در پودر شستشو کاربرد دارد، یک نمونه (آنزیم) نسبتاً ناخالص کافی است و فراهم آوری آن نیازمند هیچ نوع مهار فعالیتی نیست. اما اگر پروتئین برای اهداف درمانی مورد نیاز باشد، تخلیص باید با دقت بسیار بالایی انجام شود [۹].

**اولترافیلتراسیون**

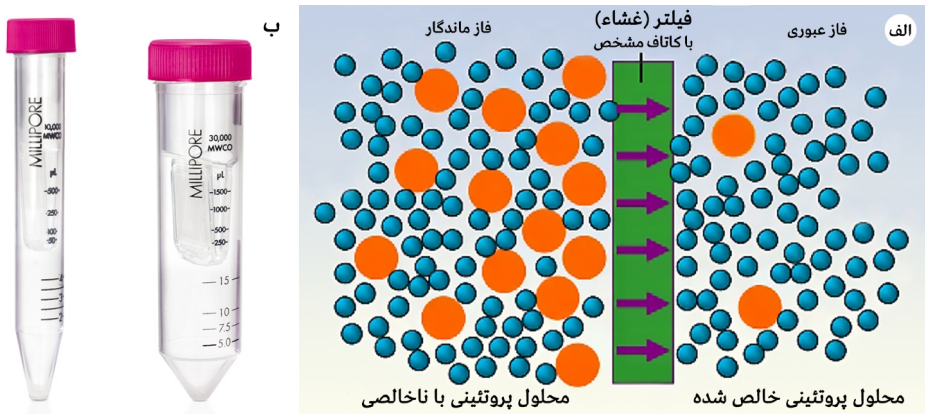
تراوش از فیلتری که قادر است ذرات بسیار ریز (اولترامیکروسکوپیک) را از خود عبور دهد فراپالایش یا اولترافیلتراسیون[1] می‌نامند. فراپالایش با بهره‌گیری از غشاها انجام می‌گیرد و از این نوع غشا برای جداسازی ماکرومولکول‌هایی با اندازه ۲۰ تا ۱۰۰۰ آنگستروم استفاده می‌شود. در این روش، کلوئیدها، پروتئین‌ها، مواد میکروبی بیماری‌زا و مولکول‌های آلی بزرگ که وزن مولکولی آن بین $10^3$ تا $10^6$ دالتون است، جداسازی می‌شوند. در بیشتر آزمایشات خالص‌سازی پروتیئن، از لوله فالکون‌ها یا میکروتیوب‌هایی با ضریب عبور مختلف استفاده می‌گردد. به طوری که محلول پروتئینی درون میکروتیوب ریخته می‌شود و با استفاده از سانتریفیوژ اجزاء محلول داخل تیوب جدا سازی می‌گردند. به بیان دیگر، اولترافیلتراسیون فناوری جداسازی ذرات

[1] Ultra-Filtration

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

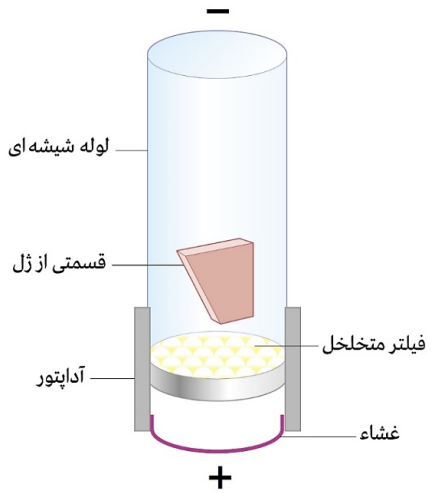
معلق نامحلول توسط غشا است که بر مبنای غشاء نیمه تراوا عملیات جداسازی را تا کمتر از یک دهم میکرون انجام می‌دهد. اختلاف فشار، نیروی محرک جریان جهت عبور از غشا یا فیلتر می‌باشد. ساختار نامتقارن غشاهای اولترافیلتراسیون باعث جدا شدن ذرات بزرگتر از اندازه مولکولی غشا و باقی ماندن آن‌ها در سطح غشا می‌شود، در حالی که ذرات کوچکتر (بسته به اندازه فیلتر) از میان منافذ غشا عبور می‌کنند. به طور کلی محلول‌هایی که در پشت غشاها جریان می‌یابند (شکل ۱)، مواد برگشتی یا فاز ماندگار نامیده می شوند. آنچه از غشا عبور می‌کند، تراویده یا فاز عبوری به‌شمار می‌آید. فیلتراسیون، پالایش، جداسازی و تغلیظ محلول، زمانی که غلظت مواد باقیمانده بر سطح غشا افزایش پیدا می‌کند به پایان می‌رسد. همچنین از فرآیند اولترا-فیلتراسیون، در عملیات تصفیه، تغلیظ و تفکیک نیز می‌توان استفاده کرد [۱۰].




**شکل ۱. الف: اولترافیلتراسیون و نحوه عمل آن، ب: لوله فالکون‌های اولترافیلتراسیون**

## الکترو الوشن

در مقالات گوناگون، انواع مختلفی از تعداد روش‌های الکتروالوشن و دستگاه‌های موثر بر بازیافت پروتئین از ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید شرح داده شده است. اکثر این روش‌ها یک اصل مشترک دارند که بر مبنای انتقال ماکرومولکول‌های پروتئینی متشکل از تکه‌های ژل پلی‌آکریل‌آمید از طریق یک فیلتر متخلخل بر روی تله غشایی در میدان الکتریکی است. در حالت کلی، الکتروالوشن پروتئین از ژل، روشی است که برای بازیابی پروتئین‌های الکتروفورز شده در ژل پلی‌آکریل-آمید با انتقال مولکول‌های پروتئینی از ژل با استفاده از یک میدان الکتریکی است. روش الکتروالوشن باعث می‌شود که پروتئین‌ها از ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید برای تجزیه و تحلیل و کاربردهای بعدی بازیافت شوند. اساس الکتروالوشن پروتئین از ژل در شکل ۲ نشان داده شده است. نکته حائز اهمیت در روش الکترو-الوشن، این است که پروتئین استفاده شده در این روش پس از چند مرحله خالص سازی (مثلاً به وسیله کروماتوگرافی) در الکتروالوشن به کار گرفته می‌شود [۱۱].




**شکل ۲. نمای شماتیک الکتروالوشن پروتئین**

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**کروماتوگرافی**

تکنیک عمده‌ای که برای استخراج و تخلیص ماکرو-مولکول‌های حیاتی کاربرد زیادی دارد، کروماتوگرافی است. کروماتوگرافی[1]، در زبان یونانی chroma یعنی رنگ و grophein یعنی نوشتن است. اساس عمل کروماتوگرافی بر اصل کلی پخش فاز بنیان نهاده شده است و امکان می‌دهد تا اجزای سازنده نزدیک به هم مخلوط‌های کمپلکس را جدا و شناسایی کند. بسیاری از این جداسازی‌ها به روش‌های دیگر ناممکن است [۸].

کروماتوگرافی متکی بر حرکت نسبی دو فاز است که یکی از فازها بدون حرکت است و فاز ساکن نامیده می‌شود و دیگری را فاز متحرک می‌نامند. اجزای یک مخلوط به وسیله جریانی از یک فاز متحرک از داخل فاز ساکن عبور داده می‌شود. جداسازی‌ها بر اساس اختلاف در سرعت مهاجرت اجزاءِ مختلف نمونه استوار است. در واقع مولکول‌هایی که تمایل بالایی به فاز ثابت دارند، نسبت به آنهایی که به فاز متحرک تمایل نشان می‌دهند، با سرعت کمتری حرکت می‌کنند. فاز ثابت بستر خلل و فرج داری است که فاز متحرک (حلال) را جذب کرده است. بستر فاز ثابت باید حاوی گروه‌هایی باشد که با ثابت‌های پیوندی متفاوت به مولکول‌های پروتئینی پیوند شود و همچنین از نظر فیزیکی و شیمیایی نیز پایدار باشد. فاز ثابت در کروماتوگرافی درون ستون قرار می‌گیرد و فاز متحرک، محلول شستشو است که به درون آن پمپ می‌گردد [۸].

هنگامی که نمونه وارد ستون کروماتوگرافی می‌شود و به دنبال آن عمل شستشو برای خروج آن انجام می‌گیرد حجم محلولی که از ابتدای ورود نمونه تا خروج جزءِ مورد نظر از ستون در لوله آزمایش جمع می‌شود را حجم بقاءِ گویند و با $V_R$ نمایش می‌دهند. به جای حجم بقاءِ اغلب از زمان بقاءِ [$t_R$] استفاده می‌شود که اندازه‌گیری آن ساده‌تر است [۱۲]. رابطه میان حجم و زمان بقاءِ به‌صورت زیر است:

$$V_R=F_C t_R$$

که $F_C$ سرعت جریان حجم است. مقدار عددی حجم بقا تا حد زیادی به نوع ستون به‌کار رفته بستگی دارد. برای به دست آوردن کمیت طبیعی بقا، عامل بقا (K) معمولاً استفاده می‌شود. عامل بقاءِ از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$K= [V_R/V_0 - 1]$$

که $V_0$ حجم خالی (تهی) از نمونه است. شکل ۳، ارتباط میان پارامترهای مختلف بقا را نشان می‌دهد. پارامتر بقاءِ طبیعی دیگری به‌نام عامل تأخیر وجود دارد. عامل تأخیر را با $R_F$ و به صورت زیر نمایش می‌دهند:

$$R_F=V_0/V_R=1/1+K$$

این عامل اغلب برای کروماتوگرافی غیرستونی به‌کار می‌رود. $R_F$ نسبت فاصله جسم از نقطه حرکت به فاصله حلال از نقطه حرکت است [۱۳].

روش‌های کروماتوگرافی را می‌توان ابتدا بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس بر حسب ماهیت فاز ساکن طبقه‌بندی کرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد.

مزیت دیگر روش‌های کروماتوگرافی در این است که تنها مقدار بسیار کمی از مخلوط برای تجزیه لازم است. روش‌های کروماتوگرافی ساده سریع و وسایل مورد لزوم آنها ارزان هستند. مخلوط‌های پیچیده را می‌توان نسبتاً به آسانی با این روش‌ها به دست آورد.

**انواع کروماتوگرافی**

روش‌های کروماتوگرافی انواع مختلفی دارند که برخی از آنها عبارتند از کروماتوگرافی کاغذی، کروماتوگرافی لایه‌نازک، کروماتوگرافی گاز- جامد، گاز- مایع، مایع-مایع، کروماتوگرافی ژل، کروماتوگرافی تعویض (تبادل) یونی، کروماتوگرافی تمایلی (گرایشی)، کروماتوگرافی تمرکزی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) کروماتوگرافی برهم‌کنش آبگریز و غیره. با توجه به اهمیت و کاربرد انواع کروماتوگرافی، در ادامه چند نوع مهم کروماتوگرافی که بر اصول توصیف شده بالا متکی هستند، توضیح داده می‌شود.

[1] Chromatography

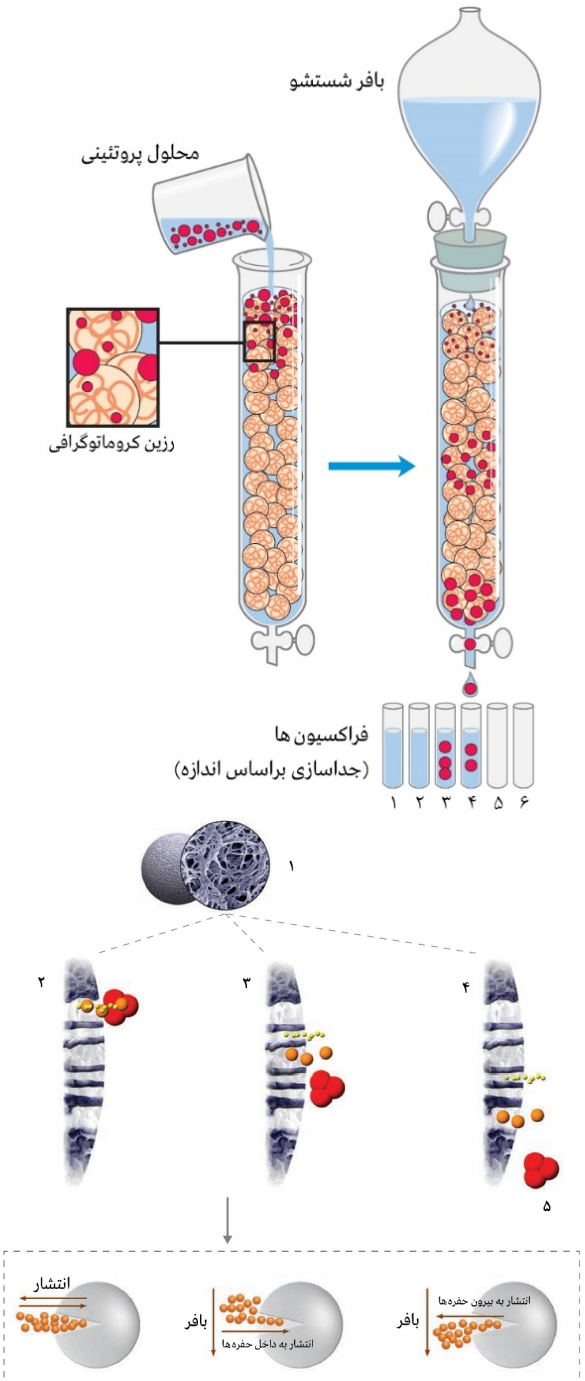
[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون**[1]

در این روش، تخلیص مبتنی بر جدا سازی مولکولی بر روی اجسام بی بار در جریان مهاجرت الکتروواسمزی از داخل ژل‌ها انجام می‌شود. بدین ترتیب که جداسازی بر مبنای اندازه‌های نسبی مولکول‌ها انجام می‌گیرد و از اصطلاح صاف کردن به وسیله ژل استفاده می‌گردد. تفاوت در وزن مولکولی (اندازه) پروتئین‌ها عاملی است که باعث جدایی آنها در این نوع کروماتوگرافی می‌شود. مهمترین مزیت تکنیک این است که می‌توان شرایط ستون کروماتوگرافی را با شرایط فیزیولوژی سازگار کرد. روش جداسازی ژل فیلتراسیون، کمترین تفکیک پذیری را با پائین‌ترین ظرفیت و بیشترین رقت نمونه در مقایسه با سایر تکنیک‌های کروماتوگرافی دارد و اغلب به خاطر اجرای آسان و برخی خصوصیات دیگر که در سایر تکنیک‌ها وجود ندارد، کاربرد دارد. مزیت اصلی این روش داشتن تداخل ملایم با پروتئین می‌باشد که منجر به حفظ فعالیت زیستی پروتئین می‌شود. همچنین از آنجا که جداسازی به هیچ خاصیت جذبی از مولکول وابسته نیست، ژل فیلتراسیون امکان جداسازی پلیمرهایی را که به راحتی توسط روش‌های دیگر کروماتوگرافی قابل تفکیک نمی‌باشند، فراهم می‌کند [۱۴،۱۲].

این سیستم شامل ستونی است که توسط بستر جامد پر شده است و حلالی که درون ستون جریان دارد. بستر فاز جامد شامل دانه‌های خلل و فرج داری (با اندازه ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرومتر) است که داخل ستون قرار می‌گیرد و همراه با مایعی است که درون ستون جریان دارد. محلول پروتئینی از بالای ستون به درون آن تزریق می‌شود و پس از انجام شستشوی ستون، محلول‌هایی که از ستون خارج می‌شوند در لوله‌هایی جمع‌آوری می‌گردند. در هنگام استفاده از فاز متحرک مولکول‌های بزرگ در فضای خارج دانه‌ها قرار می‌گیرند، زیرا قادر نیستند که داخل حفره‌ها وارد شوند. از این رو با محلول شستشوی کمتر و سرعت بیشتر (نسبت به مولکول‌های کوچکتر که داخل حفره‌ها قرار دارند) از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند و مولکول‌های کوچک در فضای حفره‌ها قرار می‌گیرند و دیرتر خارج می‌شوند (شکل ۳) [۱۴،۱۲].




**شکل ۳. نمای شماتیک ژل کروماتوگرافی و مراحل آن [۱۶]**

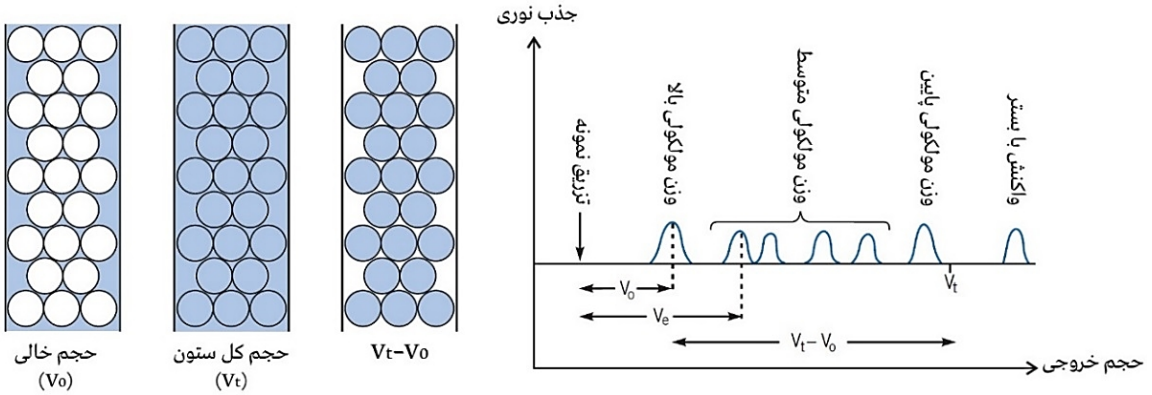
[1] Gel Filtration Chromatography

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

در شکل ۳:

۱: ذرات کروی بستر ژل فیلتراسیون درون ستون بسته‌بندی (پک) می‌شوند. ۲: نمونه به ستون اضافه می‌گردد. ۳: بافر شستشو (فاز متحرک) به ستون وارد می‌شود و همراه نمونه در طول ستون حرکت می‌کند. مولکول‌ها در منافذ داخلی و خارجی بستر (ماتریکس) انتشار پیدا می‌کنند (در این حالت، نمونه‌ها در میان فاز متحرک و فاز ثابت تقسیم می‌شوند). مولکول‌های کوچکتر در طول ژل حرکت بیشتری دارند و در نتیجه به مدت طولانی‌تری در ستون می‌مانند. ٤: بافر به طور مداوم از ستون عبور می‌کند، مولکول‌های بزرگ قادر به انتشار به داخل خلل و فرج (حفره‌ها) بستر نیستند و از ستون عبور می‌کنند. مولکول‌های کوچکتر در داخل خلل و فرج پراکنده شده و با تأخیر از پائین ستون عبور می کنند. ۵: مولکول‌های بزرگ بر اساس اندازه نسبت به مولکول‌های کوچکتر، ستون را زودتر ترک می‌کنند. کل فرآیند جداسازی به عنوان حجم بافر عبور داده شده [معادل حجم بستر بسته بندی شده] از بستر ستون ژل فیلتراسیون طول می‌کشد.

پروتئین‌هایی که وزن مولکولی بالایی دارند، نمی‌توانند داخل حفره‌ها شوند و در نتیجه در میان فضای خارجی حفره‌های دانه‌های ژل قرار می‌گیرند. این پروتئین‌ها توسط $V_0$ مشخص می‌شوند. مولکول‌های کوچک که در حفره‌های دانه‌ای ژل وارد می‌شوند مدت بیشتری در ستون باقی می‌مانند. این مولکول‌ها توسط حجم کل $V_t$ مشخص می‌گردند. حجم شستشو برای پروتئین‌هایی که بین $V_0$ و $V_t$ قرار دارند، $V_e$ است. اگر $V_e < V_0$ باشد (پروتئین قبل از حجم $V_0$ از ستون خارج می‌شود) عمل پر کردن ستون توسط ژل به‌طور مناسب صورت نگرفته است، به عبارتی فاصله میان دانه‌های ژل بسیار زیاد است. در صورتی‌که $V_e > V_t$ باشد [یعنی پروتئین پس از شستشو و حجم کل $V_t$ از ستون خارج شود]، به طور یقین برهم‌کنش‌های متعددی میان بستر جامد و پروتئین وجود دارد که با محلول شستشوی بیش از $V_t$ از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شود (شکل ٤). این نوع کروماتوگرافی برای جدا کردن پروتئین‌های تجمع‌یافته از یکدیگر و ایجاد مولکول‌های پروتئینی منفرد، بسیار کاربرد دارد. طی انجام مراحل تخلیص، اغلب تجمع پروتئینی روی می‌دهد که به کمک کروماتوگرافی می‌توان این مشکل را رفع کرد. پارامترهای متعدد مانند انتخاب ژل‌هایی با قطر حفره‌های مشخص، بسیار مهم است [۱۵،۱٤].

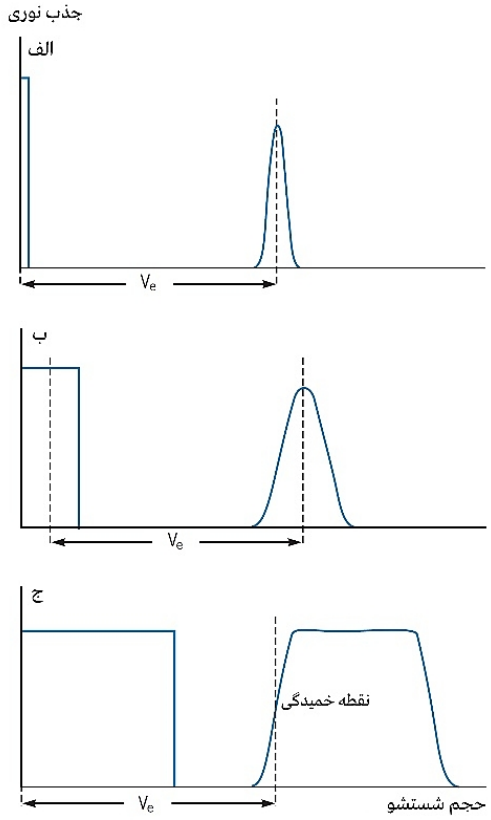



**شکل ٤. نمودار هندسی $V_t$ و $V_0$. عبارت $V_t - V_0$ شامل حجم مواد جامدی است که ماتریکس را تشکیل می‌دهد [۱۶]**

رفتار هر جزء را می‌توان از نظر حجم شستشو آن جزء بیان کرد، $V_e$، توسط اندازه‌گیری مستقیم از کروماتوگرام تعیین می‌شود. در شکل ۵، سه روش مختلف اندازه‌گیری $V_e$، وابسته به حجم نمونه اعمال شده به ستون نشان داده شده است [۱۶،۱۷].

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]




**شکل ۵. اندازه‌گیری حجم شستشو، $V_e$ [۱۶]**

الف: هنگامی که نمونه‌های بسیار کوچک استفاده می‌شود (به اندازه کافی کوچک است که در مقایسه با حجم شستشو نادیده گرفته می‌شود) موقعیت پیک حداکثری در نمودار شستشو به برحسب $V_e$ را معیار قرار می‌دهند. ب: اگر حجم نمونه در مقایسه با حجم شستشو قابل اغماض نباشد، حجم شستشو بر اساس نیمی از حجم نمونه تا موقعیت پیک حداکثری اندازه‌گیری می‌شود. ج: هنگامی که حجم نمونه بسیار بزرگ استفاده شود (ایجاد منطقه گسترده در منحنی شستشو) حجم شستشو از شروع برنامه شستشو نمونه تا نقطه عطف بلندترین قسمت پیک شستشو برحسب $V_e$ اندازه‌گیری می‌شود.

از مهمترین نکاتی که در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون باید مورد توجه قرار گیرد، انتخاب محیط ژل است. انتخاب حلال با pH مناسب می‌تواند در تفکیک صحیح نمونه‌ها بسیار مؤثر باشد. در مورد پروتئین‌ها باید حلالی استفاده شود که پروتئین در آن محلول باشد و از طرفی pH حلال نباید باعث غیرطبیعی‌شدن پروتئین گردد [۱۸]. عامل عمده‌ای که در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون مطرح می‌باشد، ایجاد جریانی یکنواخت با سرعت مناسب در ستون است. برای ایجاد جریان حلال یکنواخت در ستون از پمپ پریستالتیک استفاده می‌شود. طول ستون انتخابی در این نوع کروماتوگرافی در درجه تفکیک مهم است. دستگاه جمع‌آوری‌کننده در فواصل زمانی مشخص محلول خارج شده از ستون را در لوله‌هایی جمع‌آوری می‌کند. جذب نمونه‌های خروجی بلافاصله توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده می‌شود و سپس منحنی جذب بر حسب مقدار حجم بافر خروجی یا تعداد لوله‌ها رسم می‌گردد (شکل ٤) [۱۶].

بافرهای مورد استفاده در این نوع کروماتوگرافی باید از فیلترهایی با روزنه‌هایی به قطر ۰/۲ نانومتر صاف شده باشند و نیز به کمک سیستم ایجاد خلاء هوای موجود در آنها خارج گردد، زیرا در غیر این صورت هنگام ورود به ستون کروماتوگرافی حباب‌هایی را ایجاد خواهد کرد. ژل استفاده شده در این روش باید بی اثر و پایدار باشد و قدرت یونی بافر باید حدود ۰/۱۵ تا ۲ مولار ثابت نگه داشته شود تا از برهم کنش‌های الکترواستاتیک و واندروالس جلوگیری شود. گرانروی نمونه نیز اهمیت زیادی دارد و نباید از دو برابر گرانروی شوینده بیشتر باشد. از دیگر عوامل مهم حجم نمونه است، بدین ترتیب که هر چه حجم نمونه کمتر باشد، غلظت هر جزء در محلول خارج شده نیز کمتر خواهد بود و پیک‌های رسم شده در نمودار بلندتر خواهند شد. طول ستون به علت تأثیر در تفکیک پذیری و زمان آزمایش، اهمیت دارد. پس از شستشو، ژل در بافرهایی با فعالیت ضد میکروبی نظیر اتانول ۲۰ درصد (V/V) یا سدیم آزاید ۰/۵-۰/۲ درصد (W/V) نگهداری می‌شود [۱۶].

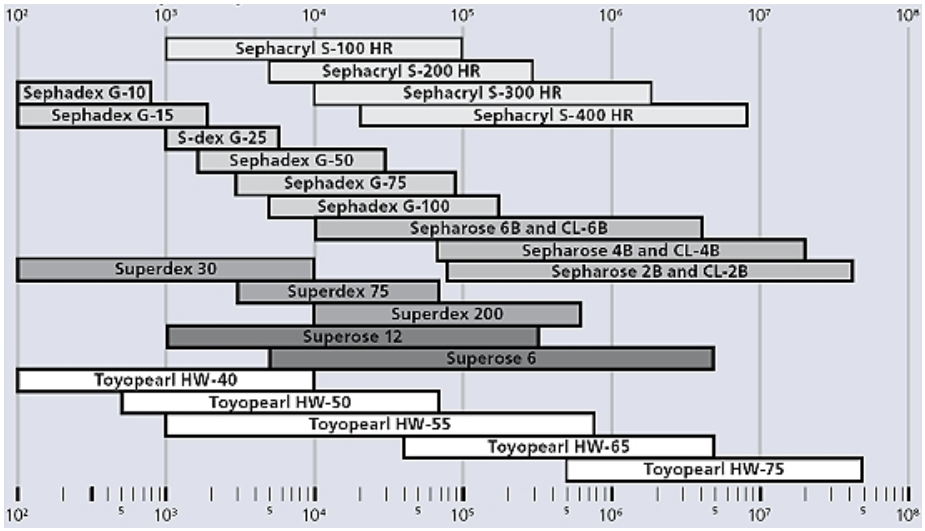
کروماتوگرافی ژل ابتدا برای جداسازی مولکول‌های بزرگی که منشاء زیستی دارند، مانند پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها به کار

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

می‌رود و هنوز هم بیشترین کاربرد این روش، در همین زمینه‌ها است [۴،۶،۷،۱۸].

**انواع بسترهای ژل کروماتوگرافی**

بستر ژل فیلتراسیون اغلب از پلیمرهای طبیعی نظیر آگاروز و دکستران و به ندرت از پلیمرهای سنتتیک نظیر پلی اکریل‌آمید، تشکیل شده است. یک فضای سه‌بعدی در اثر اتصالات عرضی[1] در این پلیمرها ایجاد می‌شود. به منظور یک جداسازی بهینه و تکرارپذیر، منافذ ژل باید محدوده کنترل شده دقیقی از اندازه را داشته باشند. انتخاب یک ژل با محدوده جداسازی مناسب اهمیت بسیاری دارد. به طوری که منافذ کوچکتر عموماً برای نمک‌زدائی سریع یا تخلیص پپتیدها و انواع بزرگتر برای پروتئین‌های مختلف و ترکیبات زیستی به کار می‌رود. در شکل ۶، تعدادی از بسترهای جداسازی در ژل فیلتراسیون همراه با محدوده وزن مولکولی مؤثر نمایش داده شده است [۱۹،۲۰].




**شکل ۶. انواع بسترهای ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون [۱۶]**

**اثر فاکتورهای مختلف بر جداسازی و وضوح ستون ژل فیلتراسیون**

**حجم نمونه:** حجم نمونه به عنوان یک درصد از حجم کل ستون (بستر بسته بندی شده) بیان می‌شود. برای جداسازی گروهی حجم نمونه تا ۳۰٪ از کل حجم ستون می‌تواند استفاده شود. حجم نمونه کمتر کمک می‌کند تا در صورت وجود پیک‌های نزدیک به هم از هم‌پوشانی آنها جلوگیری گردد. هر چه نمونه تزریق شده به ستون بیشتر شود، هم‌پوشانی پیک‌ها نیز بیشتر خواهد شد. بدین ترتیب با تزریق نمونه‌هایی که با حجم ستون مناسب است می‌توان بهترین تفکیک و مشخص ترین پیک را بدست آورد [۱۵،۱۶،۲۱].

**سرعت فاز متحرک:** نمونه‌ها از ستون ژل فیلتراسیون، با استفاده از یک سیستم تک بافره شسته می‌شود. پس از شروع کار، نمونه کل با توجه به حجم بافر عبوری از ستون (معادل حجم بستر بسته بندی شده) جدا می‌شود. استفاده از سرعت جریان، به مولکول‌ها اجازه می‌دهد که در داخل و خارج از بستر (تقسیم بندی بین فاز متحرک و فاز ثابت) به منظور دستیابی به تفکیک بهینه پراکنده شوند. هدف هر جدایی یا تفکیک رسیدن به بالاترین وضوح ممکن در کوتاه ترین زمان ممکن است. وضوح با افزایش سرعت جریان کاهش می یابد و برای رسیدن به تفکیک مناسب باید تعادلی بین این دو پارامتر ایجاد شود. به عبارت ساده، وضوح حداکثری با یک ستون بلند و سرعت جریان کم به

[1] Cross-Link

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

دست می‌آید و در مقابل سریع‌ترین اجرا با یک ستون کوتاه و سرعت جریان بالا به دست می‌آید. سرعت جریان مناسب برای جداسازی با وضوح بالا و یا جداسازی گروهی معمولاً با هر محصول عرضه می شود [۱۵،۱۶،۲۱].

**گرانروی[1] نمونه:** حلالیت یا گرانروی (ویسکوزیته) ممکن است غلظت نمونه مورد استفاده در ژل فیلتراسیون را محدود کند. گرانروی بالای نمونه باعث بی‌ثباتی جداسازی و الگوی جریان نامنظم می‌شود که منجر به ایجاد پیک بسیار گسترده و نامتقارن و افزایش فشار پشت بستر می‌گردد [۱۵،۱۶،۲۱].

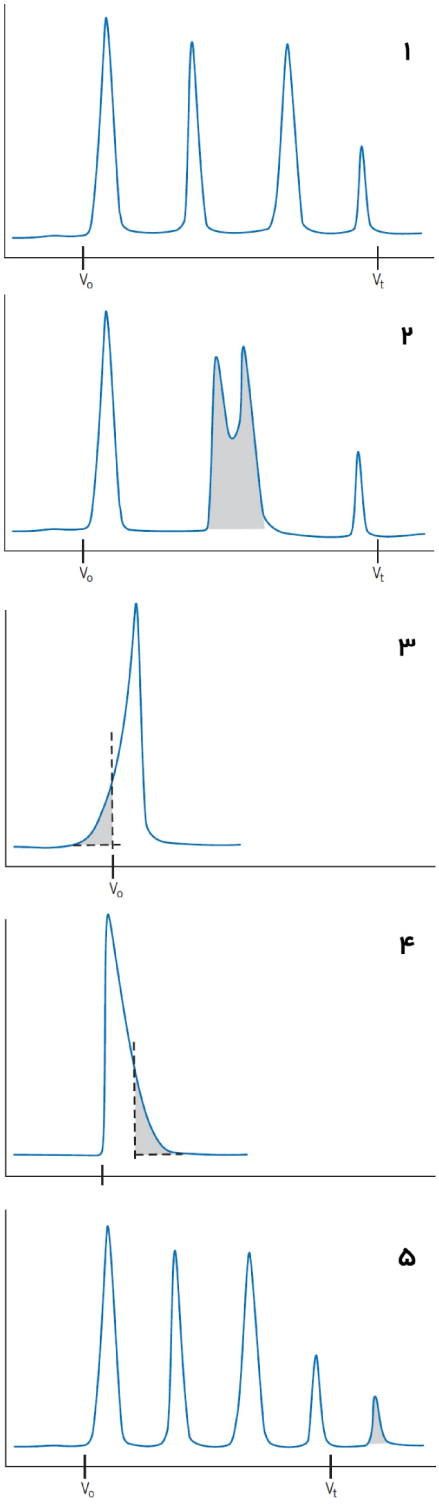
**عیب یابی و تجزیه و تحلیل نتایج در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون**

با اتمام ژل فیلتراسیون و جداسازی نمونه پروتئینی، مرحله بعدی به‌دست آوردن نمودارهای حاصل از تفکیک است. با رسم این نمودارها می‌توان به تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از کار پرداخت. نتایجی از قبیل درستی شستشو، مناسب بودن بستر ژل، حجم نمونه، سرعت جریان و ... را می‌توان از روی نمودارهای حاصل از ژل فیلتراسیون به‌دست آورد. در حالت کلی با استفاده از شکل پیک‌های حاصل از کروماتوگرافی در کروماتوگرام، می‌توان کیفیت عملکرد ستون را ارزیابی کرد. یک پیک واقعی، تیز و سه‌گوش می‌باشد که در ناحیه رأس دارای محور تقارن است [۱۶].

اگر قسمت پایه پیک به‌طور قابل توجهی باریک باشد، ممکن است نتیجه غلظت بالای نمونه و عدم تعادل میان فاز متحرک و فاز ثابت باشد. اگر قسمت پایه پیک متقارن باشد اما ابتدای پیک باریک باشد و تقارن خود را از دست بدهد، می‌تواند ناشی از حلالیت پائین نمونه و برهم‌کنش بالای آن با بستر جامد باشد. باریک بودن نوک پیک عدم حلالیت نمونه را آشکار می‌کند.

[1] Viscosity

اگر میان دو پیک فاصله دره‌مانند وجود داشته باشد، می‌تواند ناشی از درجه تفکیک پائین و یا تزریق ناقص نمونه به درون ستون کروماتوگرافی باشد (شکل ۷) [۱۶].




**شکل ۷. انواع نمودارهای حاصل از ژل فیلتراسیون [۱۶]**

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

۱: تفکیک رضایت بخش: بدون نقص، پیک‌های متقارن. ۲: تفکیک ناچیز: می‌تواند ناشی از درجه تفکیک پائین و یا تزریق ناقص نمونه به درون ستون کروماتوگرافی باشد. فاکتورهای مؤثر در تفکیک، شامل نوع ژل انتخاب شده، اندازه ذرات، حجم نمونه تزریقی، حجم ستون، شدت جریان را باید بررسی کرد. ۳: ستون بدون شستشو: بعد از عبور بافر به اندازه Vt، هنوز پیک دیده می‌شود. همیشه بین دو تزریق نمونه در ستون باید یک مرحله شستشو قرار گیرد. ممکن است مولکول‌ها با ژل اتصال غیرویژه داشته باشند. اگر اثرات متقابل، ماهیت یونی داشته باشد، برای شستشو غلظت نمک زیادتر گردد (تا ۱۵۰ میلی مولار). این کار ممکن است به شستشو کمک کند. اگر اثرات متقابل، ماهیت هیدروفوبیک داشته باشد، غلظت نمک پائین و pH بالا برده شود یا از یک دترجنت یا حلال آلی استفاده گردد. ٤: پیک پیشتاز (پیک نامتقارن): نمونه شسته شده به وسیله گزینش کردن یک راه ویژه در ستون قبل از حجم تهی دیده می‌شود. این عمل در اثر زیاد پک شدن به وسیله فشار یا سرعت زیاد رخ می‌دهد. پک کردن دوباره ستون نتیجه را اصلاح می‌کند. ۵: پیک دنباله دار (پیک نامتقارن): نمونه به صورت ناهموار و ناجور اعمال شده است. در صورت امکان بالای ستون چک گردد. از پک شدن ستون به صورت هموار و یکنواخت و استعمال نمونه بدون ناخالصی در ستون اطمینان حاصل گردد. پیک‌های دنباله دار در اثر پک شدن به وسیله فشار کم یا سرعت کم ایجاد می‌شود.

**کروماتوگرافی تعویض یونی**[1]

کروماتوگرافی تعویض یونی یکی از قدرتمندترین تکنیک‌های موجود جهت تخلیص پروتئین‌ها است و احتمالاً بیشترین کاربرد را برای جداسازی پروتئین‌ها، پپتیدها، اسیدهای نوکلئیک، پلی نوکلئوتیدها و سایر مولکول‌های باردار دارد. برهم کنش‌های یونی، اساس جداسازی و تخلیص پروتئین‌ها به روش کروماتوگرافی تعویض یونی است. در واقع، رقابت میان یون‌ها برای اتصال به گروه‌های باردار شده (با بار مخالف) بر روی یک تعویض‌کننده یونی است. در این روش بین فاز متحرک (محلول) و فاز ساکن (جامد) به صورت برگشت پذیر یون مبادله می‌شود [۲۲].

برهم‌کنش میان پروتئین و یک تعویض کننده یونی، نه تنها به بار خالص و قدرت یونی بستگی دارد بلکه به توزیع بار سطحی پروتئین، pH، طبیعت یون‌های ویژه در حلال، افزودنی‌هایی نظیر حلال‌های آلی و خواص تعویض کننده یونی نیز وابسته است. هرچه بار پروتئین بیشتر باشد به گروه‌های باردار شده (با بار مخالف) در تعویض کننده یونی محکم‌تر اتصال می‌یابد. به‌طور مشابه تعویض‌کننده‌های یونی که بار بیشتری دارند، پیوند مؤثرتری با پروتئین برقرار می‌کنند. شرایط مختلف، فرایند تعویض یونی را متأثر می‌کند. برای مثال تغییر pH که بار پروتئین و تعویض کننده یونی را تغییر می‌دهد، می‌تواند برهم‌کنش این دو را با یکدیگر تحت تأثیر قرار دهد [۲٤،۲۳].

pH یکی از مهمترین پارامترها در تعیین پیوند پروتئین است، همان‌طور که بار سطح پروتئین و تعویض‌کننده یونی را تعیین می‌کند. اگر چه پروتئین‌ها در pHهای مختلف بار خالص متفاوتی دارند، اما پیوند پروتئین به تعویض‌کننده یونی زمانی روی می‌دهد که بار خالص سطح پروتئین مخالف بار گروه‌های موجود در تعویض کننده یونی باشد. هرچه pH محلول نسبت به pH ایزوالکتریک (pI) پروتئین، فاصله بیشتری داشته باشد، پروتئین به بستر (تعویض‌کننده یونی) محکم‌تر متصل می‌شود. در pHهای نزدیک pH ایزوالکتریک، به دلیل بار خالص کم بر روی سطح پروتئین، پیوند پروتئین با بستر پیوند محکمی نیست.

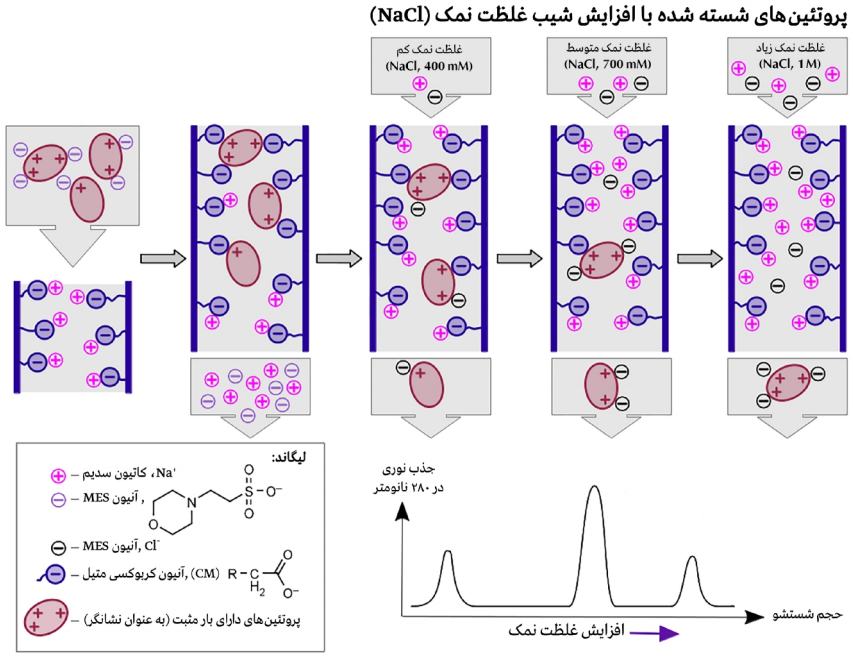
در کروماتوگرافی تعویض یونی، پروتئین‌ها با سایر یون‌های موجود در حلال برای پیوند به گروه‌های باردارشده (سطح تعویض‌کننده یونی) رقابت می‌کنند. هنگامی که غلظت یون‌های رقابت‌کننده پائین باشد، پروتئین در رقابت با یون‌های حلال پیروز می‌شود و

[1] Ion Exchange Chromatography

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

به تعویض‌کننده یونی اتصال می‌یابند. با افزایش غلظت یون‌های رقابت‌کننده (بالا بردن قدرت یونی حلال)، پروتئین‌ها جای خود را به یون‌ها می‌دهند و به تدریج از ستون خارج می‌شوند (شکل ۸)، بنابراین هنگام عمل شستشو در کروماتوگرافی تعویض یونی، از حلالی استفاده می‌شود که قدرت یونی بالایی داشته باشد. قدرت یونی بالا سبب جدا کردن مولکول‌های پروتئینی از بستر می‌شود و آن‌ها را به خارج ستون هدایت می‌کند [۲۵-۲۳].




**شکل ۸. کروماتوگرافی تعویض یونی (کروماتوگرافی تعویض کاتیونی)**

پروتئین‌ها دارای اسیدهای آمینه آبدوست و آبگریز هستند. معمولاً اسیدهای آمینه آبدوست در سطح پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه آبگریز در داخل پروتئین‌ها قرار دارند. pH ایزوالکتریک بسیاری از پروتئین‌ها پائین‌تر از pH هفت قرار دارد، از این رو این پروتئین‌ها دارای گروه‌های اسیدی فراوانی هستند، بنابراین در کروماتوگرافی تعویض یونی، بهتر است که در شرایط قلیایی (حدود pH=۸) کار شود و از تعویض‌کننده‌های آنیونی استفاده گردد. pH ایزوالکتریک بعضی از پروتئین‌ها در شرایط قلیایی است، بنابراین در کروماتوگرافی تعویض یونی، باید در شرایط اسیدی از تعویض‌کننده‌های کاتیونی استفاده کرد [۲۵،۱۶].

به بیان ساده‌تر کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی کروماتوگرافی است که بار مثبت یون‌ها در آن با بار منفی رزین متصل می‌شود و کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونی کروماتوگرافی است که بار منفی یون‌ها با بارهای مثبت رزین اتصال می‌یابد. رزین‌های معمول برای کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی S-resin و CM-resin هستند. همچنین برای کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونی از رزین‌های Q-resin و DEAE resin استفاده می‌کنند [۲۵].

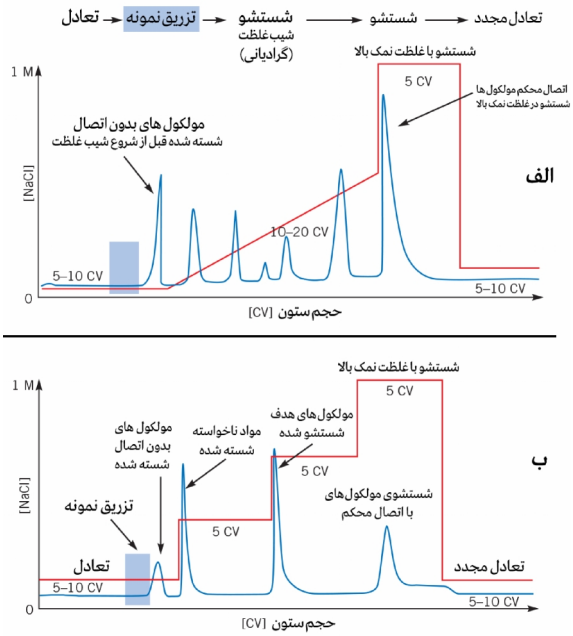
**مراحل کار با کروماتوگرافی تعویض یونی**

کار با ستون‌های کروماتوگرافی تعویض یونی بدین صورت است که ستون یک مرتبه توسط محلول معین (بافر آغازین)، شسته می‌شود تا به تعادل برسد. بافر آغازین باید قدرت یونی کمی داشته باشد. در مرحله بعد نمونه به ستون تزریق می‌گردد، سپس با استفاده از بافر دومی که دارای شیب غلظت است و به طور پیوسته قدرت یونی آن بالا می‌رود، مولکول‌های معین

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

شسته می‌شوند. pH بافر شوینده، به طور مداوم اصلاح می‌گردد و پروتئینی که بار آن با بستر اثر متقابل ندارد، شسته می‌شود و از ستون خارج می‌گردد. در این مرحله ستون با بافرهای دارای pH مختلف چندین بار شستشو می‌شود. در ادامه به ستون محلولی با غلظت بالای نمک در حدود یک مولار اعمال می‌گردد تا کل پروتئین ستون شسته شده و از ستون خارج گردد. در نهایت ستون دوباره به تعادل می‌رسد.

دستگاه جمع‌آوری کننده در این روش در فواصل زمانی مشخص محلول خارج شده از ستون را در لوله‌های مختلف جمع‌آوری می‌کند. جذب نمونه‌های خروجی، توسط اسپکتروفتومتر و در طول موج ۲۸۰ نانومتر ثبت می‌گردد و پس از آن منحنی جذب بر حسب حجم بافر خروجی یا تعداد لوله‌ها رسم می‌گردد (شکل ۹) [۲۶،٤].




**شکل ۹. کروماتوگرافی تعویض یونی [۱۶]**

الف: شستشوی گرادیانی: اغلب هنگامی که کروماتوگرافی با نمونه ناشناخته شروع شود و یا برای جدایی با وضوح بالا از این شستشو استفاده می‌شود. ب: شستشوی مرحله‌ای: این شستشو در موقعیت‌های مختلفی استفاده می‌شود. هنگامی که جدا سازی با کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از شستشو گرادیانی بهینه باشد، تغییر شستشو گرادیانی به شستشوی مرحله‌ای، سرعت زمان جدایی و مصرف بافر را کاهش می‌دهد، در حالی که سطح خلوص مورد نیاز حفظ شده است.

اگر pH مورد نیاز برای راه اندازی نمونه مشخص باشد، می‌توان نوع کروماتوگرافی تعویض یونی لازم برای منحنی توالی پروتئین را تعیین کنید. اگر در pH مورد نظر بار پروتئین منفی است از تعویض کننده بار منفی (آنیونی) و اگر مثبت است از تعویض کننده مثبت (کاتیونی) استفاده می‌شود. در نهایت به دو طریق می‌توان پروتئین هدف را از ستون جدا کرد، با تغییر pH بافر شستشو یا با افزایش قدرت یونی، که کاربرد روش دوم بیشتر است و با افزایش غلظت نمک (NaCl) انجام می‌گیرد. این یون‌ها برای اتصال به رزین، با پروتئین‌ها رقابت می‌کنند و بنابراین پروتئین‌ها از ستون خارج می‌شوند در این روش مقدار حجم نمونه بسیار کمتر از حجم کل رزین است و می‌توان با افزایش مجذور طول ستون، تفکیک را افزایش داد. شیب غلظت شستشو معمولاً منجر به افزایش تفکیک می‌شود چرا که در حین شستشو نواحی (قله‌های) تیز در منحنی ایجاد می‌گردد (شکل ۸).

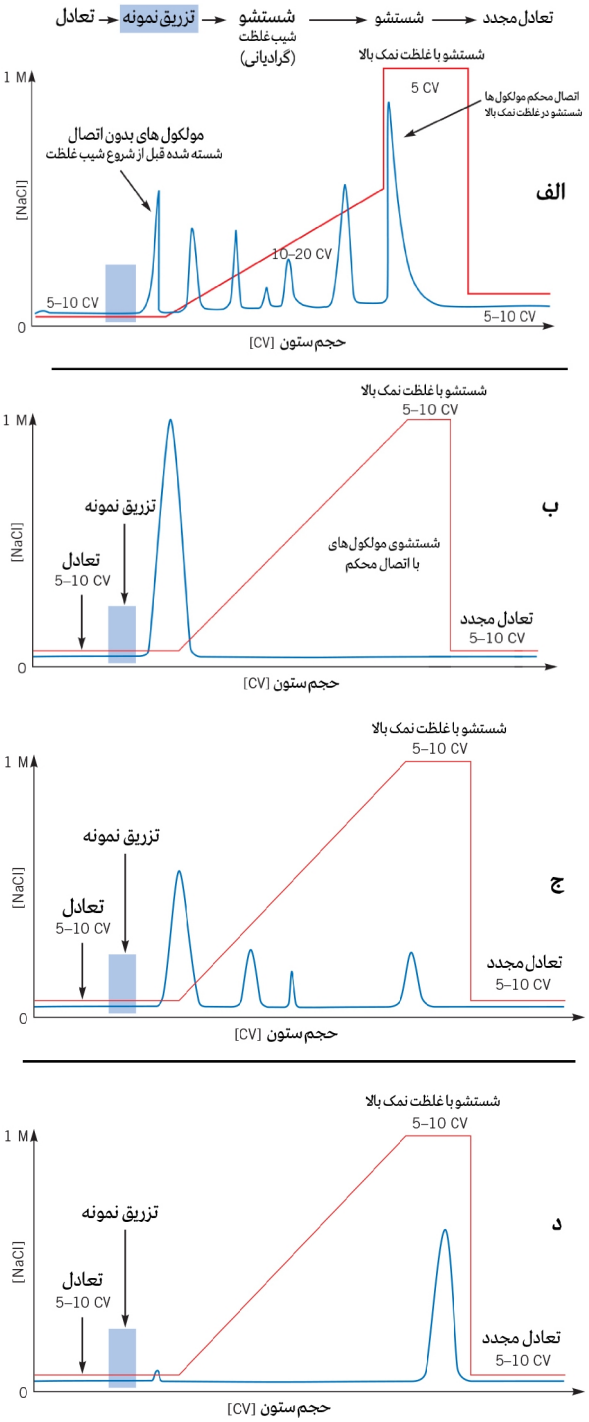
از مزایای این تکنیک این است که شستشو به صورت طبیعی در شرایط ملایم صورت می‌گیرد و پروتئین می‌تواند ساختار طبیعی خود را حفظ کند. این نوع کروماتوگرافی همچنین دارای ظرفیت اتصال بالا به پروتئین است و در حذف ناخالصی‌هایی نظیر اشکال دِآمیده، اندوتوکسین‌ها و گلیکوفرم‌های ناخواسته مؤثر است [۲۷،۲۸].

**عیب یابی و تجزیه و تحلیل نتایج در کروماتوگرافی تعویض یونی**

در شکل ۱۰، انواع نمودارهای حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی نشان داده شده است. در واقع این نمودارها (به جز نمودار الف) کروماتوگرام‌های

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

کروماتوگرافی تعویض یونی که از وضعیت ایده‌آل در طول خالص‌سازی منحرف می‌شوند را نمایش می‌دهند [۱۶].




**شکل ۱۰. انواع نمودارهای حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی [۱۶]**

الف: جدا سازی ایده‌آل: پروتئین‌های هدف به خوبی توسط شیب غلظت شستشو تفکیک شده‌اند. همان طور که مشخص است پیک‌ها بعد از اعمال گرادیان محلول شستشو (مثلاً نمک) به وجود آمده‌اند و از ستون خارج شده‌اند. ب: نمونه شستشو شده قبل از اعمال گرادیان نمک از ستون خارج شده است. باید اطمینان حاصل شود که بافرها در ظروف صحیح می باشند. برای اصلاح خطا، قدرت یونی نمونه‌ها به وسیله نمک زدایی کاهش یابد و یا با بافر شروع رقیق گردد. برای تبادل آنیونی، افزایش pH بافر و برای تبادل کاتیونی، کاهش pH بافر اعمال گردد. اگر پروتئین‌ها هنوز هم در هر pH ای متصل نشده‌اند، این امکان وجود دارد که ستون توسط مواد شوینده آلوده شده باشد. ج: بعضی از نمونه‌های شسته شده هنوز قبل از اعمال گرادیان نمک خارج می‌شوند. برای جلوگیری از تداخل پروتئین‌هایی که به ستون متصل نشده‌اند با روند جدا سازی حجم بافر شروع (مرحله به تعادل رساندن) قبل از شروع شستشوی گرادیانی افزایش یابد. د: نمونه در طول شستشو ستون با غلظت نمک بالا دیده می‌شود. پروتئین‌ها به بستر به شدت اتصال یافته‌اند. باید اطمینان حاصل گردد که بافرها در ظروف صحیح می‌باشند. اگر از تبادل آنیونی استفاده شده است، pH بافر کاهش یابد، اگر از تبادل کاتیونی استفاده شده است، pH بافر افزایش یابد.

### کروماتوگرافی تمرکزی[1]

اساس این روش مشابه کروماتوگرافی تعویض یونی است با این تفاوت که در فاز ثابت گرادیانی از pH وجود دارد. جداسازی پروتئین‌ها در این روش بر اساس pH ایزوالکتریک آنها صورت می‌گیرد. در بافرهایی با pH بالاتر از pH ایزوالکتریک پروتئین، بار سطحی پروتئین منفی می‌شود، در نتیجه به گروه‌های بار دار شده مثبت بستر (نواحی از بستر که pH آن اسیدی است) اتصال می‌یابند و بالعکس در بافر با pH

[1] Focusing Chromatography

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

پائین‌تر از pH ایزوالکتریک پروتئین، بار سطحی پروتئین مثبت است و بنابراین به گروه‌های بار دار شده منفی بستر (نواحی از بستر که pH آن قلیایی است) متصل می‌شود [۲۹].

پروتئین‌هایی که در بافرهایی با pH بالاتر از pH ایزوالکتریک پروتئین قرار دارند، از ناحیه‌ای از بستر که pH قلیایی دارند به سرعت عبور می‌کنند (به دلیل دافعه‌های بار منفی) و بالعکس هنگامی که به ناحیه‌ای از بستر که pH اسیدی دارد، می‌رسند (به دلیل دافعه بارهای مثبت و منفی) جذب بستر می‌شوند. به همین ترتیب پروتئین‌هایی که در بافرهایی با pH پائین‌تر از pH ایزوالکتریک پروتئین قرار دارند، در ناحیه‌ای از بستر با pH اسیدی، سریع عبور می‌کنند (به دلیل دافعه بارهای مثبت) و هنگامی که به ناحیه‌ای از بستر با pH قلیایی می‌رسند (به دلیل دافعه بارهای مثبت و منفی) جذب بستر می‌شوند. برای جدا کردن این پروتئین‌ها از بستر می‌توان از بافرهایی با قدرت یونی بالا و pH مختلف استفاده کرد. بنابراین با انجام کروماتوگرافی تمرکزی می‌توان پروتئین‌های با pH ایزوالکتریک مختلف را از یکدیگر مجزا کرد [۳۰].

حلالیت پروتئین‌ها تا حدودی تابع بار سطحی آن‌ها است، بنابراین با تغییر pH، حلالیت آن‌ها تغییر می‌کند. بسیاری از پروتئین‌ها در pH ایزوالکتریک به علت کمی دافعه الکترواستاتیک حلالیت پائینی دارند، بنابراین قدرت یونی پائین نیز حلالیت را در pH ایزوالکتریک تحت تأثیر قرار می‌دهد. قدرت یونی بافر مورد استفاده در کروماتوگرافی تمرکزی پائین خواهد بود که مطلوب برهم‌کنش پروتئین با بستر جامد است. بسیاری از پروتئین‌ها در pH ایزو الکتریک خود رسوب می‌کنند و یا مجتمع می‌شوند که این موضوع یک مشکل اساسی در کروماتوگرافی تمرکزی است و استفاده از آن را در بسیاری از موارد محدود می‌کند. اگر ستون کروماتوگرافی تمرکزی با بافری که pH آن در محدوده pH ایزوالکتریک پروتئین است، شستشو داده نشود و عمل شستشو با بافری انجام شود که pH آن با pH ایزوالکتریک پروتئین اختلاف داشته باشد، مشکل رسوب پروتئین‌ها برطرف خواهد شد [۲۹،۳۰].

**کروماتوگرافی تمایلی**[1]

کروماتوگرافی تمایلی یک روش بسیار توانمند در خالص‌سازی محسوب می‌شود. هنگامی‌که مخلوطی از مواد مختلف وجود دارد که تنها یک جزء آن پروتئین است، برای تخلیص آن، این روش کروماتوگرافی بیشتر خود را نمایان می‌کند. کروماتوگرافی تمایلی بر پایه اثرات متقابل منحصر به فرد موجود بین یک مولکول و یک لیگاند متصل به یک بستر است. در کروماتوگرافی تمایلی، درباره انواع مختلف تمایلات زیستی برای اتصال مولکول به یک بستر جامد صحبت می‌شود. تمایل دو مولکول مختلف به یکدیگر، اساس کروماتوگرافی تمایلی است. یکی از این مولکول‌ها لیگاند است که بر روی فاز جامد تثبیت می‌شود و مولکول دیگر اغلب مولکولی با وزن مولکولی بیشتر (نسبت به لیگاند) است که هنگام عبور از ستون، جذب لیگاند (پروتئین) می‌شود [۳۱].

موضوعی که در کروماتوگرافی تمایلی مهم است و باید بسیار مورد توجه قرار گیرد، قدرت پیوند میان لیگاند و پروتئین است. اگر قدرت پیوند ضعیف باشد، جذبی میان لیگاند و پروتئین صورت نمی‌گیرد و در صورتی که پیوند میان لیگاند و پروتئین با قدرت بالایی انجام شود، در جداکردن پروتئین هنگام شستشو مشکل ایجاد می‌گردد. همواره باید توجه شود که شرایطی (مانند pH مناسب، غلظت نمک، استفاده از پاک‌کننده‌ها و ...) فراهم آید که هنگام شستشو بتوان پروتئین را بدون تغییر ساختمانش از بستر جدا کرد. در کروماتوگرافی تمایلی، لیگاندها معمولاً به دو گروه تقسیم می‌شوند [۳۲،۳۱]:

الف- لیگاندهایی که هدف آن‌ها یک مولکول ویژه و یا تعداد بسیار محدودی مولکول است.

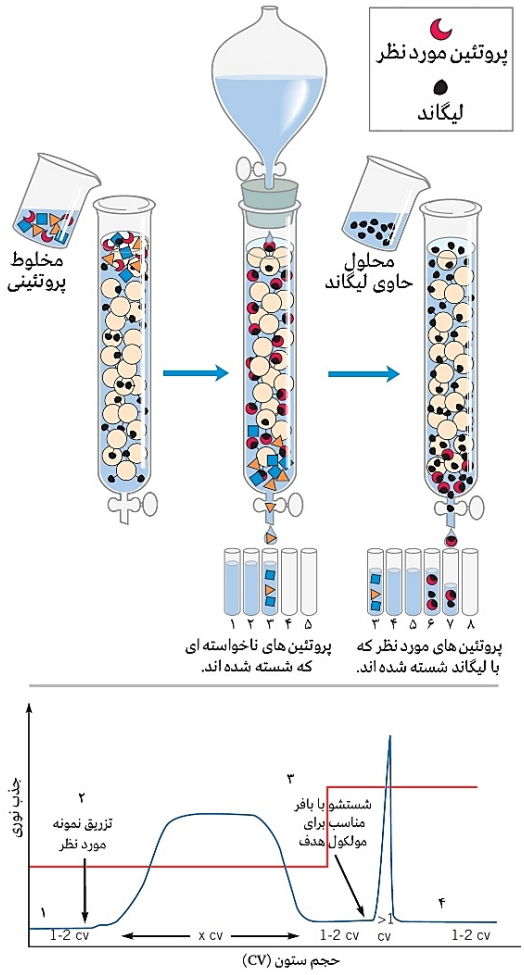
ب- لیگاندهایی که می‌توانند به مولکول‌های متعددی پیوند شوند.

[1] Affinity Chromatography

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**گروه اول**، شامل هورمون‌های استروئیدی، ویتامین‌ها و مهارکننده‌های آنزیمی ویژه‌ای هستند که به یک مولکول منفرد ویژه و یا به تعداد بسیار اندکی از پروتئین‌ها اتصال می‌یابند. برای مثال، لیزین تنها به پلاسمینوژن پلاسمای خون و ویتامین $B_{12}$ تنها به پروتئین‌های انتقالی‌اش پیوند می‌شود. این لیگاندها معمولاً بسیار محکم به مولکول‌های هدف خود متصل می‌شوند. **گروه دوم**، طیف وسیعی از عامل‌های آنزیمی هستند که می‌توانند به اهداف مختلفی اتصال یابند. بسیاری از بسترهای مورد استفاده در کروماتوگرافی تمایلی، حاوی این گروه از لیگاندها هستند [۳۳،۳۲]. شکل ۱۱ شمایی از تخلیص، توسط کروماتوگرافی تمایلی را نشان می‌دهد.




**شکل ۱۱. تصویر شماتیک از کروماتوگرافی تمایلی و نمودار حاصل از آن [۱۶]**

**مراحل کار با کروماتوگرافی تمایلی**

مراحل کار با کروماتوگرافی تمایلی (شکل ۱۱) به چهار مرحله اصلی تقسیم می‌شود [۳۵-۳۲]:

**۱. به تعادل رساندن**[1]: اولین قدم در کروماتوگرافی تمایلی آماده سازی فاز ساکن است. فاز ساکن معمولاً ترکیبی حل نشدنی از یک پلیمر آبگریز (هیدروفوبی) مانند آگاروز است. باید این فاز را با بافرهای لازم به تعادل رساند و شرایط را برای چسبیدن پروتئین هدف آماده کرد.

**۲. تزریق نمونه**[2]: در یک نمونه که حاوی انواع مختلف پروتئین است، پروتئین هدف جذب فاز ساکن می‌شود، به آن متصل می‌گردد و سایر پروتئین‌ها به‌راحتی از میان فاز ساکن عبور می‌کنند و شسته می‌شوند. موفقیت این بخش، به مقدار توانایی مولکول هدف برای متصل شدن به لیگاند بستگی دارد. ثابت تفکیک (KD) وابسته به مقدار نیروی موجود بین مولکول هدف و لیگاند است. هر گاه ثابت تفکیک کمتر باشد یعنی پیوند قویتر است. مقدار ثابت تفکیک ایده‌آل برای متصل شدن پروتئین هدف و فاز ساکن بین $10^{-4}$ و $10^{-6}$ است. اگر ثابت تفکیک بسیار بزرگ باشد، پروتئین هدف به ستون نمی‌چسبد و اگر خیلی کوچک باشد، پروتئین هدف به سختی به لیگاندها متصل می‌شود و به صورت برگشت ناپذیر جذب آن می‌گردد. در طی شستشو، به استثناءِ پروتئین‌هایی که محکم به فاز ساکن چسبیده‌اند، اغلب مولکول‌هایی که دارای اثرات متقابل ضعیف هستند، توسط یک محلول حاوی غلظت بالای نمک شسته می‌شوند.

**۳. شستشو:** به دنبال شستشو در مرحله آزاد سازی، پروتئین‌ها به صورت یک باند از فاز ساکن جدا می‌شوند. پس از اینکه نمونه هدف به فاز ساکن اتصال یافت، بافر با شیب غلظت لازم است. در کروماتوگرافی تمایلی باید شرایط چسبیدن و شرایط رها شدن به سهولت فراهم شود.

[1] Equilibration
[2] Application of Sample

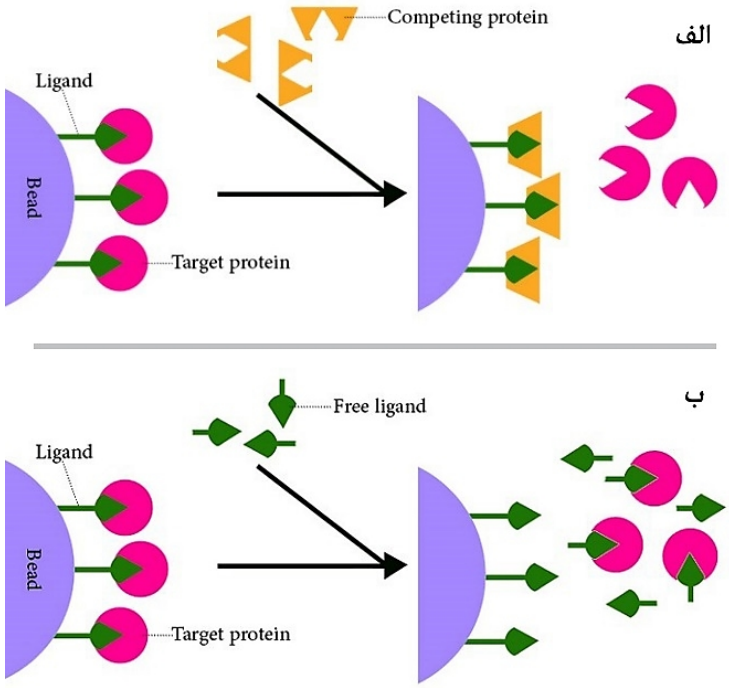
[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**٤. تعادل مجدد**[1]: پس از اتمام کروماتوگرافی تمایلی، آماده سازی مجدد فاز ساکن امری ضروری است. این فاز با بافرهای مناسب به تعادل می‌رسد. تعادل مجدد به این دلیل است که شرایط بستر برای چسبیدن مجدد پروتئین هدف آماده گردد.

دو راه برای شستشوی مولکول هدف از فاز ساکن وجود دارد:

۱. تغییر مقدار ثابت تفکیک از کم به زیاد. مقدار ثابت تفکیک ایده‌آل برای شستشو معمولاً بین $10^{-1}$ و $10^{-2}$ می‌باشد. همچنین مقدار ثابت تفکیک می تواند با تغییر شرایط عوض شود، شرایطی مانند غلظت نمک، pH و دما.

۲. اضافه کردن ماده‌ای که به عنوان رقیب به لیگاند متصل شود و باعث آزادی پروتئین هدف گردد (شکل ۱۲، الف) یا ماده‌ای که به عنوان رقیب به پروتئین هدف اتصال یابد و همراه آن، به وسیله بافر از ستون و فاز ساکن شسته شود (شکل ۱۲، ب).




**شکل ۱۲. آزادسازی پروتئین‌های هدف به وسیله پروتئین‌های رقیب (الف) و لیگاندهای رقیب (ب)**

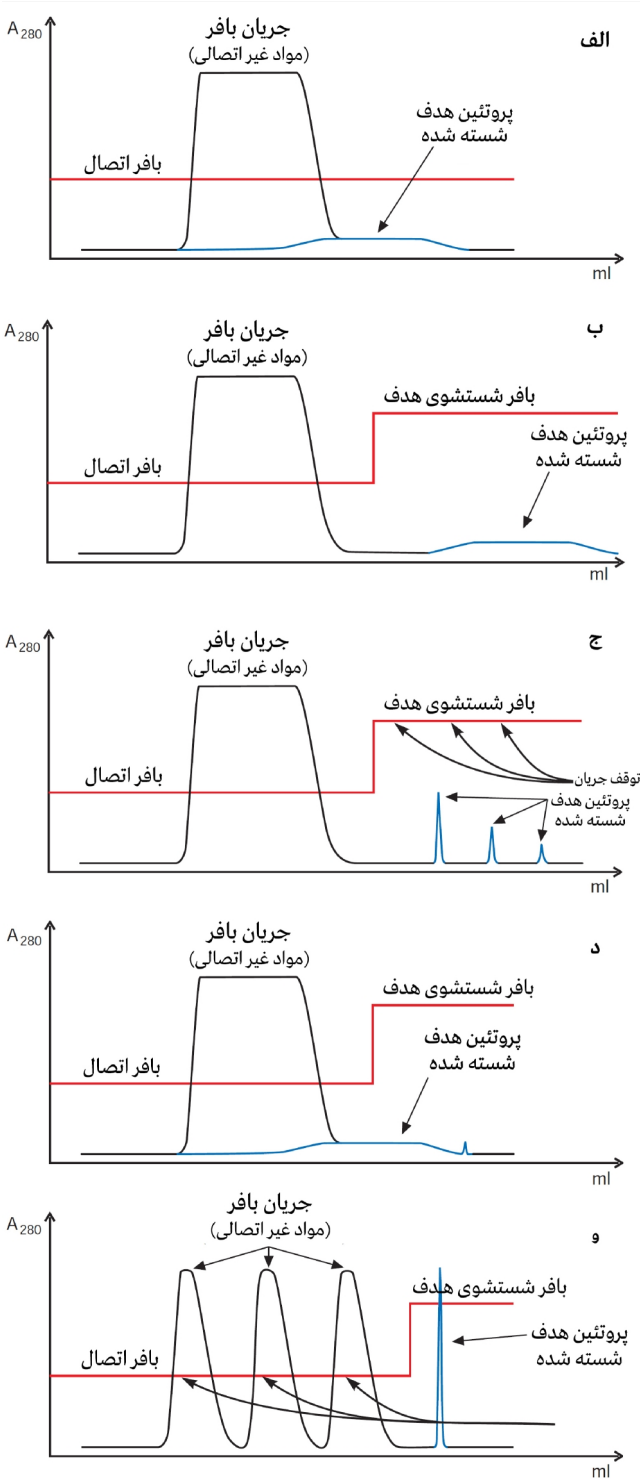
**عیب یابی و تجزیه و تحلیل نتایج در کروماتوگرافی تمایلی**

شکل ۱۱، یک کروماتوگرام با پیک درست و نتیجه رضایت بخش را نشان می‌دهد. شکل ۱۳، نشان می‌دهد که چگونه یک کروماتوگرام ممکن است از حالت ایده‌آل در طول خالص‌سازی تمایلی منحرف شود و در نهایت چه اقداماتی را برای بهبود نتایج می‌توان انجام داد [۱۶].

[1] Re-equilibration

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]




**شکل ۱۳. کروماتوگرام‌های تمایلی که از وضعیت ایده‌آل در طول خالص‌سازی منحرف شده‌اند [۱۶]**

الف: پیک‌های هدف در حالی که بافر اتصال تزریق شده است، کم ارتفاع و دارای گستردگی زیاد هستند: شرایط اتصال بهتری جستجو گردد. ب، ج: پیک‌های هدف زمانی که بافر شستشو تزریق شده است، کم ارتفاع و دارای گستردگی زیاد هستند: شرایط شستشو متفاوتی جستجو شود. اگر از شستشو رقابتی استفاده شده است، غلظت رقیب در بافر شستشو افزایش یابد. جریان متناوب در طول شستشو متوقف گردد،

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

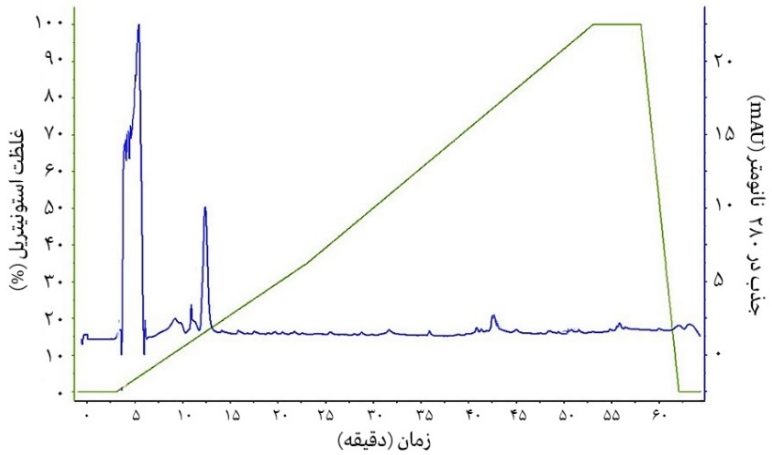
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

تا زمان برای مولکول هدف برای شستن و جمع‌آوری پروتئین هدف ایجاد گردد. توجه: این نتیجه نیز ممکن است در صورتی که پروتئین هدف دِناتوره و در ستون جمع شود و یا اتصال غیر اختصاصی داشته باشند مشاهده گردد. د، و: بعضی از مولکول‌های هدف شسته شده، در حالی که تحت شرایط اتصال هستند، پیک کم ارتفاع با گستردگی دارند. به نمونه برای اتصال زمان داده شود و یا نمونه در مقادیر یکسان اعمال گردد. توقف جریان برای چند دقیقه بین هر نمونه انجام گیرد.

**کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا**[1]

این روش نسبتاً جدید است و تحقیقات مربوط به آن مربوط به سال‌های ۱۹۷۰ بر می‌گردد. اساس این روش پمپ کردن مواد آبی و محلول‌های آلی به داخل ستون با فشاری بین ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ پوند بر اینچ مکعب می‌باشد. روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) زمان جدا سازی را به طور قابل توجهی کوتاه می‌کند.

HPLC با استفاده از پمپ‌های فشار بالا انجام می‌شود که سرعت حرکت مولکول‌های پروتئین را به طرف پائین در ستون افزایش می‌دهد و همچنین مواد به‌کار رفته در کروماتوگرافی نیز دارای کیفیت بالایی است که می‌توانند در برابر نیروی فشارنده جریان مقاومت نمایند. با کاهش زمان عبور از ستون، HPLC می‌تواند از طریق محدود نمودن توزیع انتشار باندهای پروتئینی، قدرت تفکیک را به میزان زیادی افزایش دهد. در HPLC، معمولاً از بافر استونیتریل حاوی مقداری تری فلوروواستیک اسید[2] (TFA)، استفاده می شود. TFA یک اسید قوی است و به منظور پروتونه کردن آمین ها و اسیدهای کربوکسیلیک باقی مانده در ستون به کار می‌رود. در مدت زمان معین غلظت استو- نیتریل به ۱۰۰٪ و در نهایت به صفر می‌رسد [۳۶،۳۷]. نمونه‌ها توسط دستگاه جمع کننده اتوماتیک جمع‌آوری می‌گردد و جذب نمونه‌های خروجی با دستگاه HPLC در ۲۸۰ نانومتر قرائت می‌شود، پس از آن منحنی جذب بر حسب زمان رسم می‌گردد (شکل ١٤).




**شکل ١٤. نمودار کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا**

ویژگی HPLC جداسازی سریع آن است، به طوری که مخلوطی که باید جداسازی شود توسط محلول یا مخلوطی از حلال‌ها به ستون منتقل می‌شود و اجزائی که باید جداسازی شوند با سرعت‌های متفاوت از فاز ساکن عبور کرده و ستون را در زمان‌های مختلف ترک می‌کنند. مواد (پروتئین‌های) خروجی از ستون به کمک یک آشکار ساز مشخص می‌گردد. اطلاعات به واحد ارزیابی داده منتقل می‌شود و پیک‌ها رسم

[1] High Performance Liquid Chromatography; HPLC

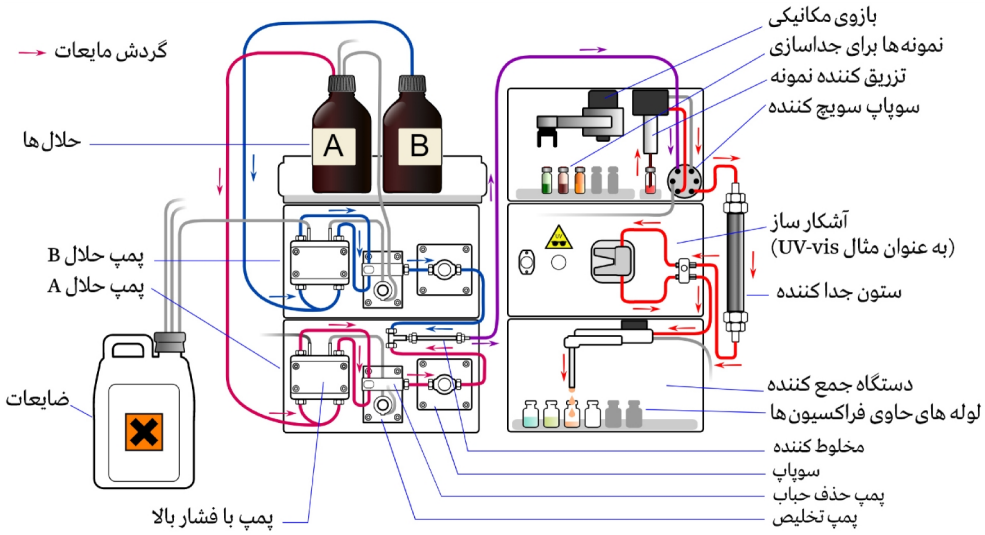
[2] Trifluoroacetic Acid; TFA

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

می‌شود. تعداد پیک‌ها معادل تعداد اجزاءِ جداسازی شده در نمونه و سطح زیر پیک‌ها معادل مقدار آن اجزاءِ است. هر دستگاه دارای حداقل یک انتقال دهنده حلال (پمپ)، محل تزریق، ستون، آشکار ساز و دستگاه ارزیابی داده‌ها است (شکل ۱۵). در HPLC، اگر یک لوله ورودی محلول شوینده وجود داشت، دستگاه را ایزوکراتیک[1] می‌نامند و اگر دو یا چند ورودی محلول شوینده وجود داشت، دستگاه گرادیان است. معمول ترین فاز ساکن در این روش، سلیکاژل اصلاح شده یا C18 می‌باشد. آشکار سازها معمولاً از نوع UV هستند [۳۸،۳۶،۱۸]. مهمترین بخش این سیستم، ستون آن است، زیرا جدا سازی اجزاءِ نمونه عملاً در طول ستون انجام می‌گیرد. دستیابی به پیک‌هایی با شکل و اندازه مناسب و نیز تکرار پذیری نتایج حاصل از آنالیز، تنها زمانی ممکن است که ستون از کارایی و بازدهی کافی برخوردار باشد. HPLC به دو دسته HPLC معمول (نرمال) و HPLC فاز معکوس[2] تقسیم می‌شود. در HPLC نرمال، فاز متحرک غیر قطبی و فاز ساکن قطبی است، در این روش، ستون با ذرات قطبی معدنی پر می‌شود و از یک فاز متحرک غیر قطبی برای عبور از میان فاز قطبی استفاده می‌کنند. از HPLC نرمال به طور عمده برای خالص‌سازی نمونه‌های خام، جداسازی نمونه‌های به شدت قطبی یا جداسازی تحلیلی با کروماتوگرافی لایه نازک بهره می‌گیرند. یکی از مشکلات استفاده از HPLC نرمال این است که آب، حلالی قوی برای این نوع کروماتوگرافی به شمار می‌آید و وجود آب در فاز متحرک به طور محسوسی بر بازداری نمونه تاثیر گذار است. در HPLC فاز معکوس، فاز متحرک قطبی و فاز ساکن غیر قطبی است. نوع برهم‌کنش‌ها را در HPLC فاز معکوس به صورت نیروهای آب‌گریز در نظر می‌گیرند. این نیروها نتیجه انرژی حاصل از تغییر در ساختارهای دوقطبی حلال است. جدا سازی مواد به طور عمده ناشی از تقسیم شدن آنالیت بین فاز ساکن و متحرک است. مولکول‌های حل‌شونده در تعادل بین فاز ساکن آب‌گریز و فاز متحرک با قطبیت جزئی هستند. هر قدر مولکول آب‌گریز (غیر قطبی) باشد، زمان بازداری طولانی‌تری خواهد داشت، درحالی که ترکیبات معدنی یونیزه شده، یون‌های معدنی و مولکول‌های فلزی قطبی، زمان بازداری کمی دارند [۴۰،۳۹].

[1] Isocratic
[2] Reversed-Phase HPLC




**شکل ۱۵. شمایی از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا**

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

**بحث**

با توجه به اهمیت پروتئین‌ها و تاثیر اساسی آنها در بدن موجودات زنده مطالعات زیادی در این زمینه انجام گرفته است. با مطالعات انجام شده بر روی تعداد زیادی از پروتئین‌ها، شناخت ما از ساختمان و عمل بسیاری از پروتئین‌ها تا حال حاضر صورت گرفته است. برای مطالعه جزئیات هر پروتئین، ابتدا لازم است آن را از پروتئین‌های دیگر جدا نمود و همچنین لازم است برای تعیین ویژگی‌های آنها فناوری‌هایی در دسترس باشد. روش‌های مورد نیاز از شیمی پروتئین مشتق شده که خود قدمتی به اندازه عمر بیوشیمی دارند و نقش مهمی را در تحقیقات بیوشیمیایی ایفا می‌نماید.

توانایی تفکیک یک پروتئین از مخلوط پروتئینی و بررسی آن به طور مجزا در سیستم آزمایشگاهی این امکان را می‌دهد که خواص زیستی نظیر آنزیم شناسی و سیگنال دهی آن را به صورت منفرد یا در ترکیب با سایر عناصر در شرایط مختلف محیطی (مانند دما، pH، نمک و...) مطالعه کرد [۴۱،۴۲].

برای توانایی جداسازی یک پروتئین از یک مخلوط پروتئینی، باید خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن پروتئین منفرد تعیین شود. بنابراین برای تخلیص یک پروتئین، اولاً، باید فعالیت پروتئین مورد نظر کاملاً ارزیابی شود. ثانیاً، باید منابع قابل قبولی برای نگهداری و سنجش این فعالیت وجود داشته باشد.

برای تخلیص مولکول‌های مهم مانند پروتئین از روش‌های متعددی استفاده می‌گردد. در بیشتر موارد برای تخلیص کامل یک پروتئین، لازم است روش‌های مختلف متعددی به‌طور متوالی مورد استفاده قرار گیرند [۴۳، ۷-۴].

انتخاب روش تا حدودی تجربی می‌باشد و قبل از یافتن بهترین روش ممکن است روش‌های زیادی مورد بررسی قرار گیرد. با استفاده از روش‌های متکی بر فناوری‌های موجود برای جداسازی پروتئین‌های مشابه، اغلب می‌توان خطا را به حداقل رساند. در حالت کلی بهتر است روش‌های ارزان در ابتدا انجام شود که حجم نمونه زیادتر است و تعداد مواد مداخله کننده بیشترین میزان می‌باشد. انتخاب روش‌های کروماتوگرافی اغلب در مرحله اول غیر عملی هستند، زیرا با افزایش اندازه نمونه، نیاز به محیط کروماتوگرافی بیشتر می‌گردد. به طور کلی، با تکمیل هر مرحله خالص‌سازی، مقدار نمونه کمتر می‌شود و استفاده از روش‌های کامل‌تر (و گران) در مراحل بعدی را عملی می‌نماید.

اولین قدم در دستیابی به یک محصول خالص طراحی و توصیف فرایند اصلی تخلیص می‌باشد. برای تخلیص یک پروتئین لازم است که روشی برای جستجو و تعیین مقدار پروتئین مورد نظر در حضور تعداد زیادی پروتئین دیگر در هر مرحله از روش داشت. بعد از هر مرحله تخلیص، فعالیت فرآورده (برحسب واحد) و میزان تام پروتئین به‌طور مستقل تعیین می‌شود و نسبت این دو، فعالیت ویژه را تعیین می‌کند. به طور کلی، فعالیت و پروتئین تام در هر مرحله کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت به این دلیل است که همیشه مقداری از فعالیت به خاطر غیرفعال شدن با واکنش‌های متقابل ناخواسته با ستون کروماتوگرافی یا سایر مولکول‌های موجود در محلول، از دست می‌رود. علت کاهش پروتئین تام، برداشت بیشتر پروتئین‌های ناخواسته و غیراختصاصی می‌باشد. در یک مرحله موفقیت‌آمیز، ازدست‌رفتن پروتئین غیراختصاصی بسیار بیشتر از میزان از دست رفتن فعالیت می‌باشد، از این رو، حتی با کاهش فعالیت کلی، فعالیت ویژه افزایش می‌یابد [۴۳،۱۸].

در مطالعه‌ای برای تخلیص یک پروتئین خاص (پروترومبین)، از سه روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، تعویض یونی و HPLC استفاده شد که در هر مرحله، محصول خالص شده دیالیز گردید و مقدار پروتئین آن محاسبه شد. نتایج نشان داد که با هر مرحله خالص‌سازی، مقدار پروتئین کمتر شد، اما

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

اثر پروتئین در هر مرحله به مراتب افزایش یافت. با بررسی یافته‌های این مطالعه، می‌توان اظهار داشت که اگر روش‌های متعدد کروماتوگرافی به‌طور متوالی مورد استفاده قرار گیرد، می‌تواند در بهبود خالص‌سازی و تاثیر نمونه خالص شده موثر باشد [۱۸].

اغلب روش‌های خالص‌سازی بیش از یک مرحله اجرایی برای دستیابی به محصول مورد نظر دارند، بدین ترتیب محصول اجرای هر مرحله به عنوان سوبسترای مرحله بعدی است و در هر مرحله مقداری از محصول از دست می‌رود (اصطلاحاً پرت می‌شود). برای مثال از ۸۰٪ نمونه اولیه در مرحله اول، فقط ۲۰٪ آن در مرحله پایانی (بعد از حدود ۸ مرحله خالص‌سازی) باقی خواهد ماند. بنابراین برای دستیابی به یک ماده خالص بیشتر، سعی بر این است که با کمترین تعداد مراحل و آسان‌ترین تکنیک‌ها، بهترین کارایی را داشته باشیم و هدف اصلی در هر مرحله شامل شناسائی و حذف فاکتورهای آلوده کننده، آلودگی‌ها با حفظ فعالیت زیستی پروتئین می‌باشد [۱۶]. در مطالعه‌ای موسوی مطلق و همکاران، برای خالص‌سازی فاکتور IX از دو روش کروماتوگرافی تمایلی و تعویض یونی استفاده نمودند. در مرحله اول از کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد و تخلیص مناسب صورت گرفت. در ادامه با اضافه کردن کروماتوگرافی تمایلی نشان داده شد که انجام دو گروماتوگرافی برای تخلیص فاکتور IX از پلاسمای انسانی، موجب افزایش درجه خلوص و فعالیت ویژه آن گردید. به طوری که خلوص فاکتور IX با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و تمایلی ۱۰ برابر بیشتر از زمانی بود که از یک نوع کروماتوگرافی استفاده شد [٤٤].

محدودیت‌های خالص‌سازی پروتئین با تاکید بر کروماتوگرافی می‌تواند در چند مورد قابل ذکر باشد. در مرحله اول تخلیص، خالص‌سازی را با نداشتن اطلاعاتی در مورد اندازه و خصوصیات فیزیکی پروتئین یا کسری از جرم پروتئین تام موجود باید شروع کرد. کمبود اطلاعات (بخصوص در مورد پروتئین‌های جدید) می‌تواند مشکل ساز باشد که البته با انجام چند بار کروماتوگرافی و تجزیه و تحلیل نتایج می‌توان این محدودیت را برطرف کرد. انتخاب بهترین روش کروماتوگرافی، جهت انجام خالص‌سازی در مواردی مشکل است. از بین رفتن مقداری از پروتئین در هنگام کروماتوگرافی و کم شدن پروتئین تخلیص شده نیز باید مدنظر قرار گیرد و در هنگام کروماتوگرافی باید از حجم مناسب پروتئین استفاده کرد تا در صورت کم شدن آن حین تخلیص مشکلی برای ادامه کار پیش نیاید و یا سعی شود که با کمترین تعداد مراحل و آسان‌ترین تکنیک‌ها، بهترین کارایی و بیشترین مقدار پروتئین بدست آید. در مواردی گران بودن برخی از مواد یا وسایل (مانند دستگاه HPLC یا دستگاه جمع‌کننده خودکار نمونه‌ها و ..) و یا عدم دسترسی به آنها به دلیل تحریم، می‌تواند در انجام فرایند خالص‌سازی محدودیت‌هایی ایجاد نماید.

انتخاب بهترین روش کروماتوگرافی و مقایسه نتایج آن‌ها با یکدیگر، به مقدار پروتئین، نوع آن و امکانات در دسترس بستگی دارد. اما با مطالعه انواع مختلف کروماتوگرافی که در این مطالعه آمده است می‌توان گفت که کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون آسان‌ترین نوع کروماتوگرافی است، اما خالص‌سازی با ژل فیلتراسیون، فرایندی کند است و مقادیر نسبتاً زیادی از جاذب و نمونه را لازم دارد. این در حالی است که در کروماتوگرافی‌هایی مانند تعویض یونی، تمایلی و HPLC تنها مقادیر کمی از جاذب و نمونه لازم است.

در نهایت، با داشتن اطلاعات زمینه‌ای کافی، روش‌های مناسب، نمونه آماده شده و فرایند استخراج، می‌توان سه فاز استراتژی تخلیص شامل دام اندازی[1]، خالص‌سازی حدواسط[2] و صیقل دادن[3] (تخلیص نهایی)

[1] Capture
[2] Intermediate Purification
[3] Polishing

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]
[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

را اجرا کرد. این استراتژی سه مرحله‌ای پیشرفت سریع‌تر کار در زمان کمتر جهت دستیابی به محصول خالص با کمترین هزینه را تضمین می‌کند. در مرحله دام اندازی، هدف جداسازی، تغلیظ و مقاوم سازی نمونه، در مرحله حدواسط، پاک‌سازی اغلب آلودکی‌ها و ناخالصی‌ها و در مرحله صیقل دادن، حذف آلودگی‌های باقی مانده احتمالی و اثرات آنها از پروتئین هدف و دستیابی به یک محصول کاملاً خالص مدنظر است [۱۶].

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه چند روش کروماتوگرافی مهم توضیح داده شد. در کارهای تحقیقاتی می‌توان هر یک از این روش‌های تخلیص را جداگانه به کار برد، اما نکته مهم این است که برای رسیدن به نتایج قابل قبول و خالص‌سازی دقیق لازم است چند نوع از این روش‌ها با هم انجام گیرد، تا مولکول یا پروتئین مورد نظر خالص شود. انتخاب نوع روش کروماتوگرافی به جز در موارد واضح (مانند کروماتوگرافی گازی در جداسازی مواد گازها) عموماً تجربی است. زیرا هنوز هیچ راهی جهت پیش‌بینی بهترین روش جداسازی مواد مگر در چند مورد ساده وجود ندارد. در ابتدا روش‌های ساده‌تر مانند کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و لایه نازک امتحان می‌شوند. زیرا این روش‌ها در صورتی که مستقیماً قادر به جداسازی مواد نباشند، نوع سیستم کروماتوگرافی را که جداسازی مواد به وسیله آن باید صورت بگیرد، مشخص می‌کنند، آن گاه در صورت لزوم از روش‌های پیچیده‌تر استفاده می‌شود. در نهایت، در به کار گیری روش‌های خالص‌سازی مانند کروماتوگرافی، زمانی که یک پروتئین خاص مد نظر است باید از چند روش کروماتوگرافی چند مرحله‌ای به صورت متوالی استفاده کرد تا به نتیجه مطلوب دست یافت.

## *References*


1- Cavaliere C, Capriotti AL, Labarbera G, Montone CM, Piovesana S, Laganà A. Liquid chromatographic strategies for separation of bioactive compounds in food matrices. Molecules. 2018 Dec; 23(12):1-18.

2- Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time. J Pharmacopuncture. 2015 Dec; 18(4):7-11.

3- Salmanizadeh H, Babaie M, Zolfagharian H. In vivo evaluation of homeostatic effects of *Echis carinatus* snake venom in Iran. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2013 Feb; 19(1):1-8.

4- Babaie M, Zolfagharian H, Salmanizadeh H, Mirakabadi AZ, Alizadeh H. Isolation and partial purification of anticoagulant fractions from the venom of the Iranian snake *Echis carinatus*. Acta Biochim Pol. 2013 Nov; 60(1):17-20.

5- Zolfagharian H, Mohajeri M, Babaie M. Bee venom (*Apis Mellifera*) an effective potential alternative to gentamicin for specific bacteria strains. J Pharmacopuncture. 2016 Sep; 19(3):225-30.

6- Babaie M, Zolfagharian H, Zolfaghari M, Jamili S. Biochemical, hematological effects and complications of *Pseudosynanceia melanostigma* envenoming. J pharmacopuncture. 2019 Sep; 22(3):140-6.

7- Babaie M, Ghaempanah A. Evaluation of hemolytic activity and biochemical properties of *Apis mellifera* bee venom on NIH laboratory mice. J Neyshabur Univ Med Sci. 2020 Jul; 8(3):23-34. [Full text in Persian]

8- Coskun O. Separation techniques: chromatography. North Clin Istanb. 2016 Nov; 3(2):156-60.

9- Babaie M, Ghaempanah A, Mehrabi Z, Mollaei A. Partial purification and characterization of antimicrobial effects from snake (*Echis carinatus*), scorpion (*Mesosobuthus epues*) and bee (*Apis mellifera*) venoms. Iran J Med Microbiol. 2020 Oct; 14(5):460-77.

10- Zumstein L. Dialysis and ultrafiltration. Curr Protoc Mol Biol. 2001 May; 3:1-8.


[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

11- Vázquez-Iglesias L, Estefanell-Ucha B, Barcia-Castro L, Delacadena MP, Álvarez-Chaver P, Ayude-Vázquez D, et al. A simple electroelution method for rapid protein purification: isolation and antibody production of alpha toxin from *Clostridium septicum*. Peer J. 2017 Jun; 22(5):1-16**.**
12- Wang M, Mallette J, Parcher JF. Comparison of void volume, mobile phase volume and accessible volume determined from retention data for oligomers in reversed-phase liquid chromatographic systems. J Chromatogr A. 2011 May; 1218(20):2995-3001.
13- Ó'Fágáin C, Cummins PM, O'Connor BF. Gel-filtration chromatography. Methods Mol Biol. 2017 Oct; 1485: 15-25.
14- Hagel L. Gel filtration: size exclusion chromatography. Methods Biochem Anal. 2011 Mar; 54:51-91.
15- O'Fágáin C, Cummins PM, O'Connor BF. Gel-filtration chromatography. Methods Mol Biol. 2011 Oct; 681:25-33.
16- GE Healthcare. Gel filtration: Principles and methods. 2010. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-gel-filtration.pdf
17- Engelke J, Brandt J, Barner-Kowollik C, Lederer A. Strengths and limitations of size exclusion chromatography for investigating single chain folding-current status and future perspectives. Polym Chem. 2019 May; 10:3410-25.
18- Babaie M, Salmanizadeh H, Zolfagharian H. Blood coagulation induced by Iranian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom: identification, purification and characterization of a prothrombin activator. Iran J Basic Med Sci. 2013 Nov; 16(11):1145-50.
19- Davies LC. Gel matrices for scanning gel chromatography. Biophys Chem. 1979 Jul; 10(1):55-65.
20- Nath S, Brahma A, Bhattacharyya D. Extended application of gel-permeation chromatography by spin column. Anal Biochem. 2003 Sep; 320(2):199-206.
21- Kong DY, Gerontas S, McCluckie RA, Mewies M, Gruber D, Titchener-Hooker NJ. Effects of bed compression on protein separation on gel filtration chromatography at bench and pilot scale. J Chem Technol Biotechnol. 2018 Aug; 93(7):1959-65.
22- Jungbauer A, Hahn R. Ion-exchange chromatography. Methods Enzymol. 2009 Nov; 463:349-71.
23- Williams A, Frasca V. Ion-exchange chromatography. Curr Protoc Protein Sci. 2001 May;8:1-21.
24- Cummins PM, Rochfort KD, O'Connor BF. Ion-exchange chromatography: basic principles and application. Methods Mol Biol. 2017 Oct; 1485:209-23.
25- Creasy A, Barker G, Carta G. Systematic interpolation method predicts protein chromatographic elution with salt gradients, pH gradients and combined salt/pH gradients. Biotechnol J. 2017 Mar; 12(3):1-11.
26- Tsumoto K, Ejima D, Senczuk AM, Kita Y, Arakawa T. Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. J Pharm Sci. 2007 Jul; 96(7):1677-90.
27- Ahamed T, Nfor BK, Verhaert PD, van Dedem GW, van der Wielen LA, Eppink MH, et al. pH-gradient ion-exchange chromatography: an analytical tool for design and optimization of protein separations. J Chromatogr A. 2007 Sep; 1164(1-2):181-8.
28- Tsonev LI, Hirsh AG. Theory and applications of a novel ion exchange chromatographic technology using controlled pH gradients for separating proteins on anionic and cationic stationary phases. J Chromatogr A. 2008 Jul; 1200(2):166-82.
29- Pergande MR, Cologna SM. Isoelectric point separations of peptides and proteins. Proteomes. 2017 Mar; 5(1):1-14.
30- Choy DY, Creagh AL, Haynes C. Improved isoelectric focusing chromatography on strong anion exchange media via a new model that custom designs mobile phases using simple buffers. Biotechnol Bioeng. 2014 Mar; 111(3):552-64.
31- Urh M, Simpson D, Zhao K. Affinity chromatography: general methods. Methods Enzymol. 2009 Nov; 463:417-38.
32- Wilchek M. Affinity chromatography; a tool in protein chemistry. Biochem J. 1972 Apr; 127(2):7-9.

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]

33- Hage DS. Affinity chromatography: A review of clinical applications. Clin Chem. 1999 May; 45(5):593-615.
34- Arora S, Ayyar BV, O'Kennedy R. Affinity chromatography for antibody purification. Methods Mol Biol. 2014 Feb; 1129:497-516.
35- Arora S, Saxena V, Ayyar BV. Affinity chromatography: a versatile technique for antibody purification. Methods. 2017 Mar; 116:84-94.
36- Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. BMJ. 1989 Sep; 299(6702):783-7.
37- Petrova OE, Sauer K. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. Methods Mol Biol. 2017 Sep; 1657:33-43.
38- Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, Ruane PH, Goodrich RP. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. Photochem Photobiol. 2004 Nov; 80(3):609-15.
39- Brokl M, Hernández-Hernández O, Soria AC, Sanz ML. Evaluation of different operation modes of high-performance liquid chromatography for the analysis of complex mixtures of neutral oligosaccharides. J Chromatogr A. 2011 Oct; 1218(42):7697-703.
40- Chen H, Horváth C. High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. J Chromatogr A. 1995 Jun; 705(1):3-20.
41- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. The purification of proteins is an essential first step in understanding their function. 5th ed. New York: WH Freeman; 2002. Section 4.1.
42- Labrou NE. Protein purification: an overview. Methods Mol Biol. 2014 Feb; 1129:3-10.
43- Alizadeh H, Madani R, Babaie M, Kavid N, Golchinfar F, Emami T. Preparation and purification of polyclonal antibodies against *Mycobacterium avium paratuberculosis* antigens in rabbit. J Fasa Univ Med Sci. 2012 Jan; 2(3):168-73. [Full text in Persian]
44- Musavi Motlagh S, Rezvan H, Pourfathollah A, Mousavi Hosseini M. Improving purification of coagulation F IX using heparin affinity chromatography and its comparison with ion exchange chromatography. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2005 Jun; 2(4):91-8. [Full text in Persian]

[ Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09 ]

[ DOI: 10.52547/jarums.20.2.151 ]