دراسة مقارنة لاستخلاص وتنقية البومين من مصل الدم البشري بطرق مختلفة

سوسن سلمان عطية ، هشام محمود عبد الكريم، سعدون سلمان احمد ، رحيم حسن رسن ، تماضر شاكر ناجي.

- دائرة بحوث الكيمياء والصناعات البتروكيمياوية .
- وزارة العلوم والتكنولوجيا .

Summary:

This study includes a comparison of the extraction and purification procedures for human serum albumin by different methods includes the updated precipitation method using polyethylene glycol and the comparison with the classical degradation method using ethanol then the purification by gel filtration and Ion exchange chromatography. It has been noticed that this update procedure is superior over the classical method. The final yield by the new method was 59.51% with purity of 83.74% compared with Cohns method which yield 53.28% with parity of 76.19% . The new method proves that it is suitable for the production of such material because it reduces time & work. and finally we received concentrated and purified solutions from human serum albumin by gel Filtration and Ion exchange chromatography.

-

الخلاصة:

تضمنت هذه الدراسة مقارنة الطرائق استخلاص وتنقية البومين مصل الدم البشري بطرق مختلفة تضمنت الطريقة الاولى المستحدثة الترسيب البارد باستخدام البولي اثلين كلايكول ومقارنتها بالطريقة الثانية التجزئة التقليدية بكحول الايثانول ومن ثم تنقية الالبومين باعمدة الترشيح الهلامي واعمدة التبادل الآيوني لوحظ بأن الطريقة الاولى تتفوق على الطريقة الثانية والتي بلغ الناتج النهائي بالطريقة الاولى المستحدثة حوالي ٥٩,٥١% عند مقارنتها بناتج طريقة الثانية التقليدية والتي كان الناتج النهائي فيها ٥٣,٢٨% ، بلغت درجة النقاوة للطريقة المستحدثة ٨٣,٧٤% ، والطريقة التقليدية حوالي ٧٦,١٩% ، تميزت الطريقة المستحدثة بأنها مناسبة وذلك لاختصارها الجهد والزمن وبالنتيجة النهائية تم الحصول منها على محاليل مركزة ونقية من البومين مصل الدم البشري .

المقدمة :

ان البومين مصل الدم البشري ذو أهمية طبية كبيرة اذ يستخدم في تحليل مستوى الدواء في الدم وفي تشخيص قرحة المعدة ويرتبط مع العناصر المشعة من اجل تصوير مقدار البلازما في المنطقة القلبية وفي حالات النزيف المعوي والمعدي وتشخيص امراض الغدة الدرقية وتستخدم محاليل الالبومين المركزة في معالجة الصدمة النزفية وعند الحروق الشديدة والكدمات . لذا ان الدم البشري كان منذ زمن بعيد محور البحث والدراسة الشاملة وكانت الطرق المستخدمة عامة

، من هذه الطرائق المستخدمة لاستخلاص البروتينات ومنها الالبومين هي طريقة التجزئة التقليدية للباحث (Cohn،١٩٤٦) ، اذ فصل مكونات البلازما الى اجزاء وبأكبر قدر ممكن من النقاوة لدراسة خواصها ، اذ استخدم الباحث تراكيز مختلفة من كحول الايثانول بدرجات حرارية واطئة لفصل اجزاء بروتينية مختلفة والتي تعتمد على اختزال قابلية ذوبانه الى مستوى ملائم بسائل عضوي ، اذ امكن المحافظة على تركيز الالكتروليت ضمن نطاق واطئ تعتمد فيه التفاعلات مع البروتين على القوى الآيونية وخواص البروتين الالكتروكيميائية الخاصة [١] . ظهرت بعده طرق اكثر اهمية لتجزئة الدم البشري هي استخدام تقنية الترسيب البارد بالبولي اثلين كلايكول (PEG) يتبعها الترشيح والتبادل الآيوني بالاعمدة ، ان هذه الطريقة تحافظ بدرجة كبيرة على الخصائص الصحية والديناميكية الحرارية (Thermodynamic) لمختلف المصول المعزولة من الاشخاص المرضى ، لكن في بعض الحالات قد تتغير هذه القيم عندما يرتبط الالبومين مع هرمون (Thyroxin)[٢] . يعتبر

البولي اثلين كلايكول بوليمر غير آيوني اوزانه الجزيئية بين ٤٠٠-٦٠٠٠ دالتون ، يكون تأثيره رقيق جدا على البروتينات بسبب ميله القليل لتحطيم البروتين ، وان تراكيزه المطلوبة لا تحتاج الى درجات حرارية واطئة[٣] ،كما يمكن ان يخزن الـ PEG مع البروتين مدة طويلة وبالامكان وقف عملية الترسيب في نهاية الاسبوع[٤،٥] ، اذ يمكن ان يزال خلال الترسيب الثاني بمادة الايثانول [٥،٦] ، ويعتقد بان له تأثير مثبت على تركيب الجزيئات الكبيرة [٦] . هناك فوائد لمادة PEG يتفوق بها على الترسيب بالاملاح وهي بانه لا يتدخل مع عمليات التبادل الآيوني التي تجري بعدها لتنقية البروتينات [٤]، لانه بسهولة ينزل اولاً قبل البروتين الذي يكون في نفس وزنه الجزيئي [٧] .كما يمكن ترسيب الالبومين بمادة PEG بأس هيدروجيني متعادل بوجود الايثانول من اجل عزله السريع للالبومين ، اذ انه يكون محاليل غير قابلة للامتزاج [٥،٦] .

تركيز PEG ذو وزن جزيئي ٤٠٠٠ يؤدي الى ترسيب الالبومين بحد ادنى قريباً من نقطة التعادل الكهربائي للبروتين وبدرجات حرارة بين (٤-٢٠)مْ [٦] اذ يبقى الالبومين في حالة مركب كيمياوي مستقل الى ما بعد مرحلة الترسيب الاولي [٦] . ان تأثير بوليمرات PEG على ثابت العزل (K) للالبومين مع حبيبات الجل في الاعمدة يؤدي الى زيادة محاليل الاسترداد (elution) لكن في نفس الوقت يقلل ذوبان البروتينات ذات الاوزان الجزيئية العالية [٨،٩] . ان اضافة الماء الى PEG يؤدي الى تغير صفاتها الاذابية وجعله اقل قطبية فتكون هناك منافسة بين البروتين و PEG على الماء [٧] وان ارتباط الماء مع PEG يعمل كصدفة (shell) تغطي المحددات الانتيجية للالبومين مما يجعله خامل عند دخوله الجسم ، هذه تفيد في العلاج الانزيمي لانها تؤدي الى استبعاد عمليات التحسس تجاه البروتينات داخل الجسم [١٠] ، ولوحظ كلما زاد حجم PEG يزداد تأثيره كمرسب وتزداد الاذابة للاحماض الامينية ويكون اكثر فعالية بعشرة مرات من اصغر نوع لـ PEG ذو وزن جزيئي (٤٠٠) [٧] . ومن اجل تحديد طرائق الترسيب المثلى . تم حساب تركيز الالبومين في مصل الدم البشري لتحديد النقاوة للمواد المستخلصة من هذه الطرق. فهناك عدة طرائق لحساب كمية الالبومين تتضمن الترحيل الكهربائي في الهلام ، الترسيب ، استخدام الصباغ وهي على انواع المثيل البرتقالي ، بروموكريسول كرين BGC ، وتحليل 1- hydro azobenzene benzoic (HABA) وتحليل naphthalene sulfanic acid (NSA) 8- anilino acid 4- 2 وهناك طرائق اخرى مستخدمة لحساب تركيز الالبومين وهي (RID) Radial immunodiffusion & (SLFIA) وهي مختصر كلمة Substrate labeled fluorescent immuno assay ، اعتمد في هذا البحث طريقة التحليل Bromocresol green (BCG) والتي تكون قيمتها متوافقة ومقاربة الى قيم طريقة (SLFIA) المناعية بصورة جيدة وبشكل معقول [١١،١٢،١٣] .

ان الهدف من هذا البحث ايجاد طريقة مستحدثة واقل صعوبة من الطرق الاخرى التقليدية لاستخلاص الالبومين بأقصر وقت واقل جهد وبناتج نهائي عالي لانتاج محاليل طبية معقمة بنطاق واسع .

المواد وطرائق العمل

١- المواد : جمع البلازما :

تم الحصول على اكياس بلازما مفصولة من مصرف الدم في بغداد وتخزن بدرجات حرارة منخفضة تؤخذ الاكياس وتقسم البلازما الى قسمين ، الأول من اجل طريقة (Cohn) وجماعته ١٩٤٦ ، الثاني من اجل طريقة الترسيب بـ PEG والتي بحسب طريقة الباحث (Yao) عام ١٩٧٩ [١٤] .

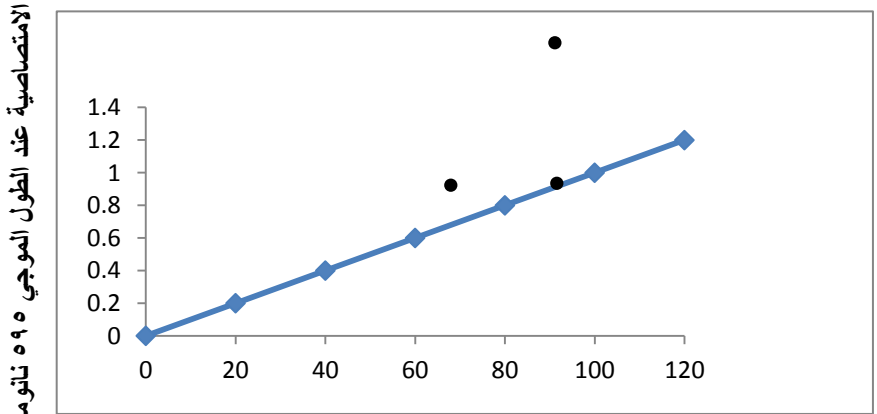
٢- طرائق العمل:

في البداية نعمل طريقة التجزئة التقليدية للباحث (Cohn) تتلخص هذه الطريقة لفصل اولي لمكونات البروتينية للبلازما الى كميات صغيرة من الاجزاء وتستمر التجزئة الى ان تكون اكثر تركيزاً واكثر نقاوة تم استخدام تراكيز مختلفة من كحول الايثانول بدرجات حرارية واطئة لفصل الاجزاء البروتينية اذ يكون الجزء الخامس الالبومين هو الجزء المتغلب فيه ، درجة الحرارة المستخدمة تتراوح بين (صفر - 10 مْ) ، تركيز البروتين بين 0.2 – 66 غرام / لتر تركيز الايثانول بين (0 – 40 %) الأس الهيدروجيني بين (4-7) مع اضافة بفرات الكاربونيت والفوسفيت للمحافظة على الاس الهيدروجيني مع القوى الآيونية للمحلول . اما طريقة الترسيب بمادة البولي اثلين كلايكول فتبدأ بوزن الـ PEG ذو وزن جزيئي ٤٠٠٠ اذ حضر محلول ذو تركيز ١٣ % تم

مزج المحلول مع القسم الثاني من البلازما لمدة ساعة، ثم اضافة محلول من كلوريد الصوديوم ذو مولارية (٠,١٥) مساوٍ الى مرتين من حجم البلازما الاصلية ، بعدها عدل قيمة الاس الهيدروجيني للمحلول الى (٥,٧٥) بدرجة حرارة -٥ مْ بعدها اضيف كحول الايثانول بتركيز ٤١ % بحجم ٤٦٢ مليلتر / ١لتر من البلازما لمدة من الزمن . تأتي بعدها مرحلة التخلص من الراسب المتكون عن طريق جهاز الطرد المركزي بسرعة ٤٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة بعدها يأخذ الراشح ويعدل الأس الهيدروجيني له الى ٤,٨ ، ثم يترك للحصول على راسب الالبومين . يعاد حل الراسب بمحلول ملحي ذوعيارية (٠,١٥) والذي يكون مساوٍ الى مرتين من حجم البلازما الاصلية ، واضافة كحول الايثانول بتركيز ٤١% بدرجة (-٥ مْ) وبنفس حجم الكحول السابق اذ يتكون راسب يتم فصله بجهاز الطرد المركزي ، يعاد حل الراسب المراد هذه المرة بالماء المقطر ، ويعدل اسه الهيدروجيني الى (٥,٢) بمادة بيكاربونات الصوديوم ويعمل له ترشيح بوحدة الترشيح (0.2Mm) ليكون جاهزاً لمرحلة (التبادل الآيوني بالاعمدة) ومرحلة المبخر الدوار والترشيح الفائق للتخلص من الكحول ومادة PEG أذ يتم امرار المحلول الرائق الناتج من المرحلة السابقة اعلاه في عمودي الفصل (النوع الاول DEAE-Sephadex) ذو قياس (١٥×٣) سم مع دارئ الفصل Tris HCL Buffer ذو قوى آيونية (0.05M) و أس هيدروجيني (٨,٦) مع محلول ملحي ذو مولارية (٠,١٥) ، ونوع العمود الثاني (CM-Cepharose SL-6B) ذو قياس (١٥×٣)سم بدارئ الفصل sod-Acetate ذو قوى آيونية (٠,٠٧) واس هيدروجيني (٤,٨) مع محلول الغسل قوة آيونية (٠,١) واس هيدروجيني (٥,٥) حسب الترتيب المذكور ، تم العمل بدرجة حرارة (٢٢مْ) مع معدل جريان جهاز جامع الاجزاء هوائي ١٢ مل / ساعة اما الاجزاء الناتجة والتي تعطي قيمة واضحة اثناء قياسها بجهاز المطياف بطول موجي ٢٨٠nm يتم ترشيحها خلال وحدة الترشيح (0.2 Mm) وذلك بين مرحلتين الفصل بالاعمدة والاحتفاظ باجزاء تلك القمة لاجراء تحليل تركيز البروتين والالبومين عليها بعدها تأتي مرحلة (المبخر الدوار والترشيح الفائق) اذ يعدل الاس الهيدروجيني للراشح الناتج من المرحلة السابقة الى (٧,٠) ثم يوضع في المبخر الدوار ومن ثم جهاز الترشيح الفائق من اجل تركيز المحلول والتخلص من الماء ، اجريت العملية تحت ضغط غاز النيتروجين حوالي (110 Psi) يعني 6.7 atm وتحت درجات حرارة منخفضة ، اذ استخدم خلالها اوراق الترشيح الخاصة والتي تكون فتحات الاوراق محددة حسب الاوزان الجزئية للبروتينات المفصولة تدعى هذه الاوراق DIAFLO membrane ، اذ تعامل الاوراق هذه بالماء المقطر لمدة ساعة واحدة ولعدة تغيرات لهذا الماء وذلك لازالة مادة الكليسيرين ويمكن ان نعقم الورقة في حالة الاستخدام الثاني وذلك بمادة الفورمالين ٥% مع الايثانول ٢٥% . في نهاية العملية تحفظ الورقة باضافة مزيج من الايثانول والماء ١٠% . في نهاية العملية تحفظ في الثلاجة هذا الحفظ الرطب اما الحفظ الجاف فيتم باضافة مزيج من كلسيرين وماء ٥٠% لمدة يوم واحد ثم تجفف وتحفظ جافة . تأتي المرحلة النهائية وهي (الترشيح الهلامي) في الاعمدة اذ تم امرار المحلول الناتج على عمود هلام (sphacryl S -200) منتج من قبل شركة (pharmacia fine chemicals) وزن الهلام في العمود ١٠,٥ غم وقياس العمود (٣٠×٢,٥)سم ، مع دارئ الفصل محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.05M بدرجة حرارة (٤ مْ) مع معدل جريان ١٢ مل / ساعة وذلك للتخلص من الاملاح ثم تؤخذ الاجزاء الناتجة بعد قياس تركيزها بجهاز المطياف على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر وتوضع مرة ثانية في جهاز الترشيح الفائق للتخلص من الماء وتركيز الناتج النهائي .

٣- قياس تركيز البروتين :

عمل بحسب طريقة المنحنى المعياري القياسي الخاصة بطريقة براد فورد تؤخذ الاجزاء المحفوظة من المراحل السابقة ويعمل لها القياس توزيع البروتين بجهاز DB-G spectrophotometer Beckman instrument مقاسة على طول موجي (595 nm) وكثافة ضوئية في محلول ملحي بتركيز ١% كما في الشكل (١) .



تركيز البروتين الألبومين الدم البقري

شكل (١) المنحني القياسي للبروتين

بعدها تم حساب الناتج النهائي (Yield) لكل مرحلة لكلا الطريقتين التقليدية وطريقة الترسيب بمادة PEG [١٥] .

٤ـ قياس تركيز الالبومين :

تؤخذ الأجزاء المحفوظة يعمل لها تحليل (Bromo cresol green) [٩،٧] لتحديد تركيز الالبومين لكل مرحلة .

٥ـ المعاملة الحرارية :

تمت عمليات البسترة بتعريض المحاليل الناتجة الى درجة حرارة حوالي ٦٠مْ لمدة ١٠ ساعة بوجود المواد المثبتة التالية sod. acetyl tryptophan (0.02 M) و caprylic acid (0.02 M)التي تمت أضافتها قبل عملية البسترة .

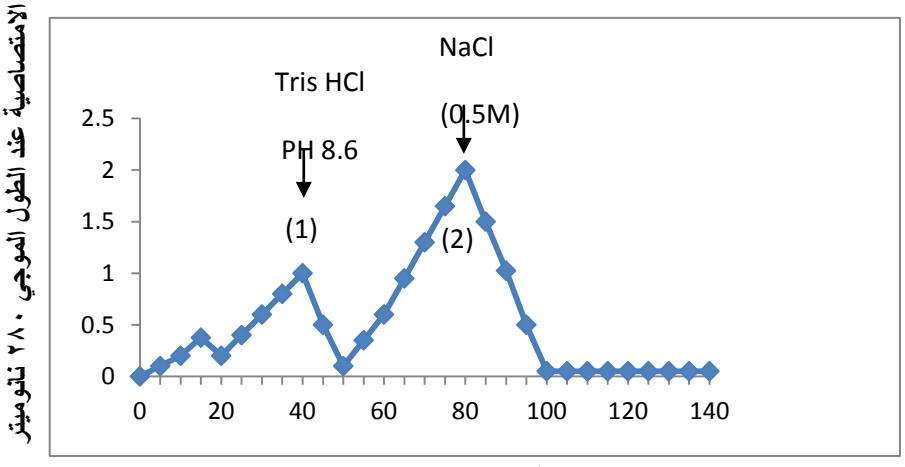
النتائج والمناقشة:

ان استخدام تقنية الاستخلاص بالترسيب البارد بمادة PEG لتجزئة الدم البشري أدت الى الحصول على راسب من مادة الالبومين المذاب في الماء المقطر خلال مدة تكاد تكون قصيرة عكس الطريقة التقليدية بحيث يكون هذا البروتين المعزول بروتيناً متجانساً في محلول المرسب به وهذا يتفق مع ما توصل اليه الباحث [١٦] .

وان هذه المادة تكون تركيبية متشابهة لتلك الخارجة من طريقة الترسيب البارد بالكحول للباحث (Cohn) وان هذه الملاحظات جاءت متوافقة مع ما ذكره الباحث Hao [١٩،١٧] .

يذكر ان الالبومين يكون مع PEG طوران مائيان غير ممتزجان وتعتبر هذه حالة خاصة والذي يكون فيها احد الاطوار صلبا [٢٢،٢١،٢٠،١٨] بحيث يحتل البروتين دومينات البوليمر غير الآيوني ثم يأتي بعدها المذيب العضوي ويطرده مما يؤدي الى زيادة تركيزه الى ان تزداد ذوبانيته [٢٥،٢٤،٢٣،٢] .

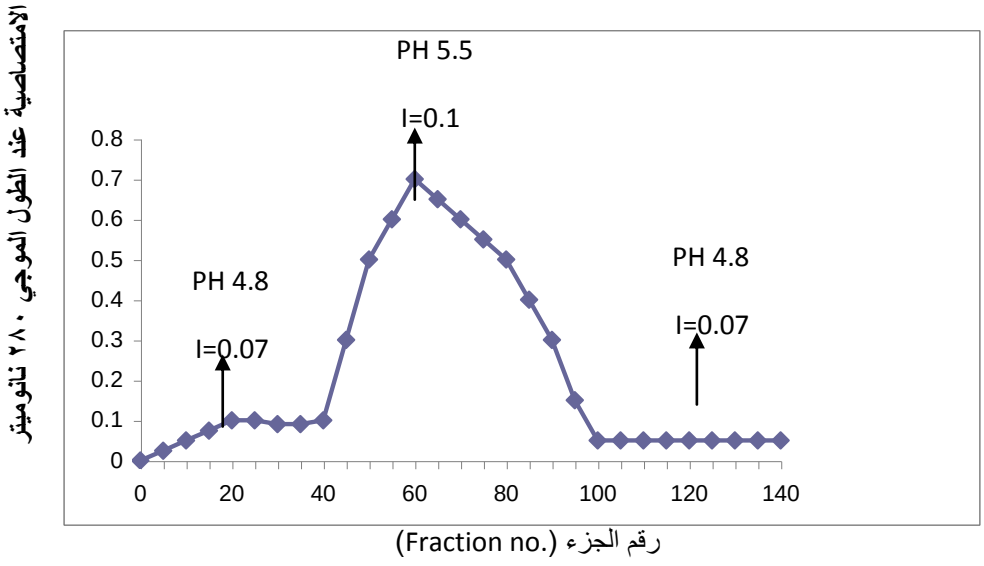
ان من فوائد هذه الطريقة المذكورة في البحث امكانية العمل بها بدرجات حرارة الغرفة مما يسمح لنا بتوسيع الطريقة على نطاق واسع وعدم الحاجة الى سيطرة صارمة على درجات الحرارة ، وان مادة PEG بتركيز ٢٠ % تعمل على ازالة واستبعاد اي ميكروبات مجهرية منها الفيروسات من محاليل الالبومين وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث Hao وجماعته[٢٥،١٨] . وان هذه الاجزاء المستحصلة بطريقة الترسيب بمادة PEG تعتبر مصدر كـ Labile protein من الصعوبة الحصول عليها من خلال الطريقة التقليدية بالترسيب البارد بمادة كحول الايثانول[٢٧،٢٦،٢٥،١٨] . اظهرت نتائج مرحلة التبادل الآيوني على عمود DEAE ظهور قمتين من الاجزاء البروتينية المقاسة على طول موجي 280 nm والتي يوضحها الشكل (٢).



شكل (٢) طريقة كروموتوغرافيا التبادل الايوني

المرحلة الاولى للتنقية بعد الترسيب PEG بعمود DEAE sephadex

اذ تمثل القمة الاولى الصغيرة الكلوبيولينات المناعية اما القمة الثانية فتمثل مادة الالبومين بعد التأكد منها بالطرق التحليلية . اما المرحلة الثانية التبادل الآيوني على عمود CM-sepharose بينت النتائج ظهور قمة واضحة مقاسة على طول موجي (280 nm) كما وضحها الشكل (٣) .



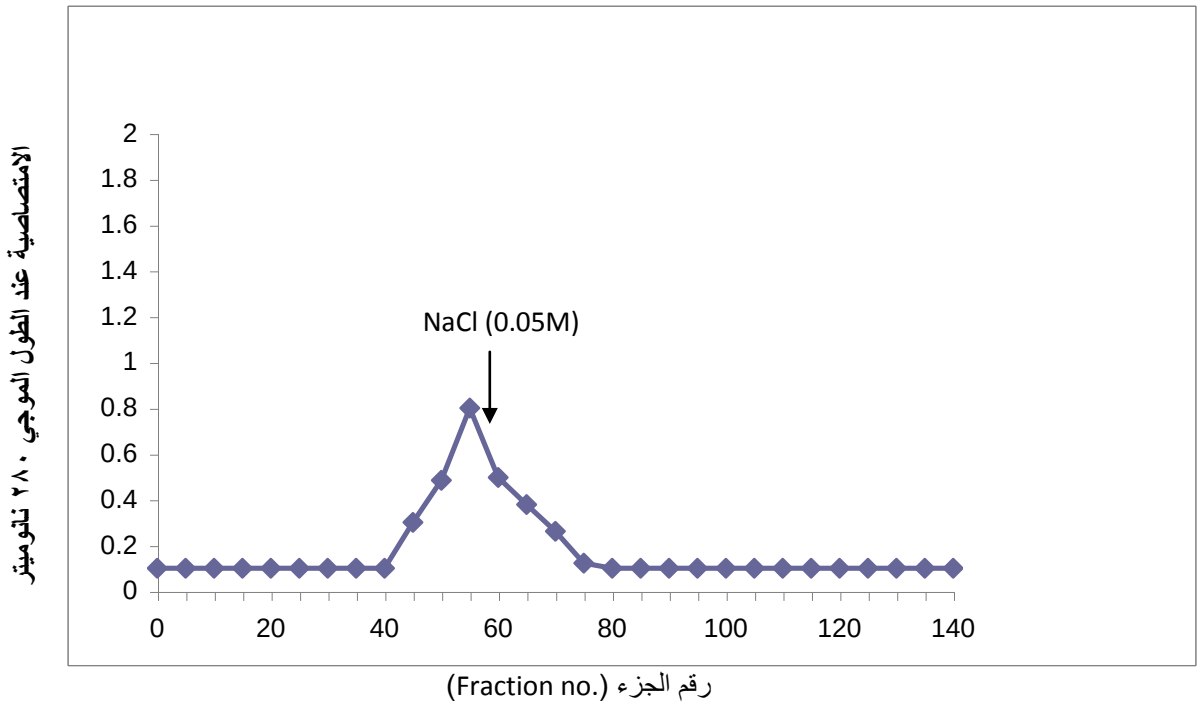
شكل (٣) طريقة كروموتوغرافيا التبادل الايوني

المرحلة الثانية للتنقية بعمود CM- sepharose CL-6B

اذ تمثل اجزاء رقم (٢) الالبومين، محلول الاسترداد داريء خلات الصوديوم

اما مرحلة الترشيح الفائق اظهرت محلولاً مركزاً ، اذ اختزلت كميات من المذيب العضوي مع مادة PEG الى مستويات لا اهمية لها وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث [١٨،٢٧،٢٨،٢٩] .

بينت نتائج الترشيح الهلامي على عمود SephacryLS-200 وجود قمة واحدة عند قياسها على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر وذلك دلالة على مقدار النقاوة عالي جداً وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره الباحث [١٨،٢٨،٢٩] كما هو واضح في الشكل (٤).



شكل (4) الترشيح الهلامي

المرحلة النهائية لتنقية الالبومين باستخدام عمود هلام Sephacryl S-200

في النهاية المحاليل المستحصلة بهذه الطريقة لن تتطور لديها اية عكورة تذكر او ضبابية عند تعريضها الى الحرارة بدرجة ٦٠ مْ لمدة ١٠ ساعات مع وجود المثبتات المذكورة سابقاً ، وكذلك عند الخزن لمدة طويلة .

اثبتت تقنية الترسيب البارد الـ PEG جدارتها وتفوقها على طريقة الترسيب البارد بكحول الايثانول وذلك بحصولنا على نتائج جديدة بالنسبة لقياسات الناتج النهائي ومقدار النقاوة لمحاليل الالبومين لجميع مراحل الاستخلاص والتنقية لكلا الطريقتين المعتمدتين في البحث كما يوضحها الجدول (١).

خطوات الاستخلاص او الفصل	تركيز البروتين الكلي mg/ml	تركيز البومين mg/ml	نسبة الناتج % للالبومين	نسبة النقاوة الالبومين %
* البلازما الاولية(النسبة المئوية)	٨٦,١٨	٣٤,٨٣		
*الطريقة الاولى (جزء ١)	١٢٥,٢٧	٢٣,٨٥	٧٢,٦٧	٦٨,٤٧
الطريقة الاولى جزء (lll&ll)	١٢٤,٣٩	٢٤,٧٨	٧٢,١٦	٧١,١٤
الطريقة الاولى جزء (lv-1)	١٠٩,٠٨	٢٣,٥٩	٦٣,٢٨	٦٧,٧٢
الطريقة الاولى جزء (lv-4)	١١٥,٢٠	٢٤,٥٩	٦٦,٨٣	٧٠,٦٠
الطريقة الاولى (V)	٩١,٨٥	٢٦,٥٤	٥٣,٢٨	٧٦,١٩
*الطريقة الثانية الترسيب بمادة PEG (١٣%)	١٠٥,٢٠	٢٦,٨٨	٦٠,٠٣	٧٧,١٧
الطريقة الثانية الترسيبب بـPEG (٢٢%)	١٠٤,٦٠	٢٦,٨٢	٦٠,٦٨	٧٧,٠٠
الطريقة الثانية بعد مرحلة عمود DEAE	١٠٤,٣٢	٢٧,٢٤	٦٠,٥٢	٧٨,٢٠

الطريقة الثانية مرحلة عمود – CM	١٠٣,٢٠	٢٧,٨٧	٥٩,٨٧	٨٠,٠١
الطريقة الثانية مرحلة عمود LS Sephacryl 200	١٠٢,٥٨	٢٩,١٧	٥٩,٥١	٨٣,٧٤

*الطريقة الاولى : طريقة الترسيب بكحول الايثانول البارد (الطريقة التقليدية).

* الطريقة الثانية : طريقة الفصل بالاعمدة (الطريقة المستحدثة).

* ٥٩,٥١ : قيمة الناتج اكبر من الاولى .

* ٨٣,٧٤ : قيمة النقاوة اكبر من الاولى .

من المعروف من بين العوامل الاكثر شيوعاً لتجزأة البلازما هي المذيبات العضوية وهي الطريقة المشروحة من قبل الباحث Cohn [١] . اذ انها تتجنب تحطيم البروتين من خلال المحافظة على درجة الحرارة قريبة من الصفر المئوي ، لكن هناك طرائق اخرى اكثر مرونة ولا تتطلب السيطرة على درجات الحرارة المنخفظة وتم استخدامها من قبل الباحث (Polson) وجماعته لعزل كاما كلوبيولين الفايبرينوجين [٥] وهي طريقة الترسيب بـPEG ومن اجل تنقية البروتين يتم ترسيب الـ PEG ثم الالبومين وذلك باستخدام الايثانول الذي وجد بانه الانسب بين المذيبات العضوية ، وتتم الاضافة بحمام ثلجي لكي لا تسبب تحطيم البروتين وايضاً تساعد على تركيزه ، وان مادة الـ PEG لا تؤثر على نقاوة البروتين [٥،٢٦،٢٧] . يستنتج من ذلك بان طريقة التنقية بالـ(بولي اثلين كلايكول) تسمح بتحضير ناتج عالي حوالي ٥٩,٥١ % ونقاوة كبيرة حوالي ٨٣,٧٤ % مقارنة بالناتج المستحصل عليه من طريقة Cohn والتي بلغت حوالي ٥٣,٢٨ % ونقاوة ٧٦,١٩ % على التوالي .

يمكن التوصية باستعمالها بدلاً من الطريقة التقليدية للباحث وكذلك ان استخدام اعمدة التبادل الآيوني والتي تسمح بمعدل جريان عالي مع سعة جيدة واستعادة ناتج جيد يضيف ميزة اخرى لهذه الطريقة المستحدثة بالنتيجة نضمن الامان Safty لمحاليل الالبومين الصيدلانية المعدة للحقن في المرضى مع معدل اعراض جانبية اقل ، بذلك نستنتج ان الطريقة المستحدثة لا تسبب اجهاد مثل الطريقة التقليدية للباحث (Cohn) ولا تستهلك مواد مرسبة ولا تحتاج التعامل معها بحذر تختصر الزمن ولا تتطلب درجات حرارة منخفضة على طول مراحل الاستخلاص والتنقية لالبومين مصل الدم البشري .

References:

1- Cohn,E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., JR., Mule ford,D. J., Ashworth, J.N., Melin, M. & Taylor, H.L. (1946).Preparation and Properties of serum and Plasma Proteins. Iv. A system for the separation into Fractions of the protein and protein components of Biological Tissues and Fluids J Am . Chem. Soc., vol. 68, P: 459-475 .

2- Ivanov , A.I., sarmatskaia, V.V., Korolenko, EA, Korolik, EvMeleshchenko, LA, Zhbonkov, RG, (1996) . Modification of the ligand load and Structure of Human serum with different methods of isolation. Biokhimiia, May , 61 (5) , P : 903-1 .

3- Miekka , Shirley .I .& Kenneth C. lngham . (1978) . Influence of self-association of proteins on their Precipitation by poly ethylene glycol. Archives of Biochemistry & Biophysics., vol. 191, No .2 , December , P : 525-536 .

4- Topic 19 . (2002) . Cell Growth and Protein purification . Web site // Topic 19 , P : 1-11 .
5- Jimenez, M.I,B. carballo , M.S. Ayuso- parrilla & R. parrilla. (1974) .A procedure For the rapid isolation of serum albumin using a combination of polyethylene glycol and ethanol . Biochemical. Et Biophysical Acta,vol. 372 , P : 436 .
6- Ingham, K . C. (1977) . Poly ethylene glycol in aqueous solution : Solvent Perturbation and gel filration Studies Archives of Biochemistry & Biophsics , vol.184, P : 59-68 .
7- Ingham, C. Kenneth.(1978) . Precipitation of proteins with poly ethylene glycol : characterization of albumin . Archives of Biochemistry and Biophysics , vol .186, No.1, February , P:106-113 .
8- Falken Hagen D., Strobl, W., etal.(1999) .Fractionated Plasma separation and adsorption system: anovel system for blood purification to remove albumin bound substances .Artif. Organs .,vol. 23(1) .P:81-6 .
9- Krister Hellsing. (1968) . Gel chromatography in eluents containing polymers. J. chromatog ., vol. 36, P:170-1 .
10- A.Braham A.buchowski, T. heo .van Es, N.icholus C. Palcznk and F .rank F. Davis. (1977) . Alternation of immunological Properties of Bovine Serum albumin by covalent attachment of poly ethylene Glycol .The Journal of Biological chemistry , vol.252 , No.11 Issue of June 10, P:3578-3581 .
11- Lurdh B. (1965) . Serum albumin as determined by the methyl orange method and electrophoresis . Scand.J. Clin. Lab . Invest. Vol.(5),P:503.
12- Iolekho PH ,charoenpolw. (1974) .Improved automat ,for detemining serum albumin with Bromocresol green . Cline. Chem .May ,vol. 20(5).
13- Patinkin , J., Dan lnbar , chana Ben- Gigi, Sara Derfl yakir Klaus ner & Bertold Fridlender ,Ames-Yissum ltd.(1983) . Homogenous Substrate – labeled Fluorescent immune assay for Human serum alumin. Journal of immunoassay . Vol.4(2) ,P:159-174 .
14- Hao, Y.L. (1979) .Asimple method for the preparation ,human albumin .Vox. Sang ., vol. 36(5) P: 313-20 .
15- Bradford ,M.M. (1976) .A rapid and sensitive method for the quantitation of miorogram quantities of protein utilizing the Principle of protein – dye binding .Anal .Biochem. 72, P : 248-254 .
16- Hong, W. & Maria –Reginakula . (1976) . Selectivity of Protein Precipitation with poly ethylene glycol Fractions of various Molecular weights. Analytica Biochemistry , vol. 72,P: 502-522 .
17- HAO, Y.L.(1985) Pilot – Pliant Scale Preparation of Human Serum albumin .Vox Sang , vol. 49(1),P: 1-8 .
18- HAO,Y.L., Ingham, K.C.& wicker hawser , M. : Section (1), Fractional Precipitation of Proteins with pony ethylene glycol, In " Methodods of Plasma Proteins Fractionation " , 1st ed ,Edited by Curling , J.M. Academic Press,

Subsidiary of Harcourt brace Jovanovich , Publishers , London , New York, Toronto. Sydney ,San Franciso. 1980, P:57-70.
19- Adock,W.L., Mac gregor , A., etal. (1998) . Chromatoraqhic removal and heat in activation of hepatitis A virus during manufacture of Human albumin . Biotechnol. Apple .Biochem ., vol. 28(Pt 1) , P: 85-94 .
20- Andersson, L.O . Serum albumin , in "Plasma Proteins" .2nd ed Editied by, Blom back, B., Hanson, L.A.,A Wiley – Interscience Publication, (1979) . P: 43-71 .
21- Annex 14 ,(2001) . Manufacture of Products Derived from Human Blood or Human Plasma. Website // Annex 14 .(Denmark) , P : 131-135.
22- Asakawa , S., Fujwara , H., Naito, S., Homma , R., Ishida, S chion,F ., Tsuchiya , M., Matsuura ,S., Tanaka , S., Ohki-M . (1994) . Application of the limulus test for Practial quality control on endo toxincontenu in commercial human serum albumin (HAS) Products. In comparison with the rabbit pyogen test . Yakugaku-Zasshi: No. 14(11), P:888-43.
23- Cohn , E., Gurd, F, R , N . Surgenor, D. M., Bornes, B.A ., Brown, R.R., Derouaux G., Gilles pie J.M ., Kahnt , F . W ., Lever , W.F., Liu, C.H , Nittelman, D., Neuton, R.F. Schmidt , K.& Uroma E.(1950) .A system for the Separation of the protein componets of H"uman Plasma .J.Am. Chem. Soc., 27, P: 465-474 .
24- Domingues Pereira, Andr., Quilherme Pandol Fujitec & Leonardo dos Santos Revuella. (1998) . Study of similarities in albumin . Web sit//Study of similarities in albumin's htm ., P:1-5 .
25- Elizabeth Edmond & A.C . Oyston .(1970) . Phase Seporation in an Aqueous Quatermay system. Biochem.J., vol . 117. P: 85-8 .
26- Gustafsson, J . E. C. (1976) . Improved specificity of albumin deter maintion and estimation of acute phase reactants by use of the Bromo cresol green reaction . Clin . Chem., vol.22, P:616-622 .
27- Oliva , A., Santovena , A., etal. (1999) . Stability study Human Serum albumin pharmaceutical preprations. J.pham. Pharmacol., 51(4), P: 485-9 .
28- Peterson, E.A . Sober . (1956) . Chromatography of proteins on ion-exchange absorbence . Amer. Chem. Soc., vol . 87, P: 751-755.
29- Pool. E J , Johaar ,G., James , S., Peterson , I, Bouin , P. (1999) . Differemtiation between endo toxin and non – endo toxin Pyrogems in Human albumin Solution using an exvivo whole blood culture assay . J . Immunoassay , Feb- may , vol.20 (1-2) , P : 79-89 .
30- Wolf – Yikronenberg H., Dodds A., Miach P , Isbister J ., Levidiotis M ., Deark. (1996) . Asafety study of albumex 5 , a humen albumin solution produced by Ion exchange chromatography . Vox sang . 70 (4) , P : 189-202.
31- Ziad J. Sahab , Yewseoksuh , and Qing – Xiang Amy sang , Isoelectric point – Based Prefractionation of Proteins from crude Biological samples prior to Two- Dimensional Gel Electrophoresis , Journal of Proteome Research , American chemical society , 2005 ,4, pp. 2266- 2272.
32- Lian Shan and David J. Anderson , Gradient chromatofocusing . Versatile pH Gradient separation of proteins in Ion –Exchange HPLC: characterization

studies , Analytical chemistry American chemical society, Vol.74 , No. 21 , Nov.1, 2002, pp. 5641- 5649.
33- Ziad J. Sahab, and Qing – Xiang Amy sang , Albumin elimination from Human plasma , Abstract , Division of Analytical chemistry , Aug. 28-Sep.1 , 2005, Anyl.150 , Washington ,DC.
34- Chuman J. , Zuns Zain P. A. , Petitpas I. , Bhattachrya A.A. , Otagiri M., Curry S. Structural basis of the durg – binding specificity of human serum albumin . J. Mol. Biol. Vol. 353 , No. 1 , 2005 , 38-52 .