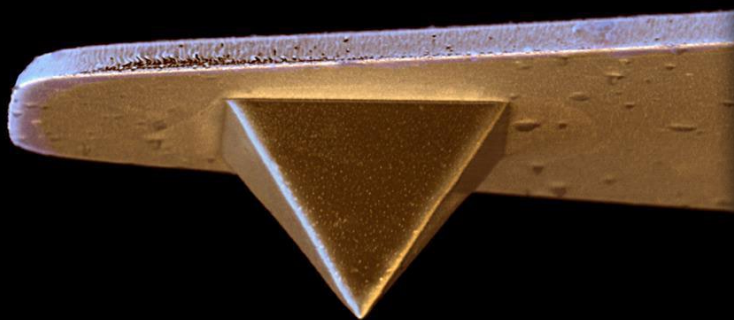
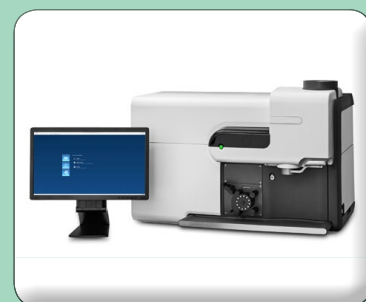




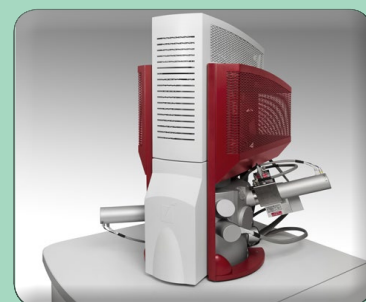
حالت‌های کاری میکروسکوپ
نیروی اتمی در زیست‌شناسی
و استخراج اطلاعات کمی



پلاسمای ماکروویو - طیف‌سنجی
نشر اتمی



مروری بر کروماتوگرافی مایع سریع
پروتئین



معرفی آشکارساز الکترون‌های ثانویه
در خلاء پایین در میکروسکوپ‌های
الکترونی روبشی

پنجمین گردهم‌آیی مدیران مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی به میزبانی پژوهشگاه صنعت نفت

از برترین آزمایشگاه‌های عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی تقدیر شد

نویسندگان

مehشید رحیمی فرد^{۱*}
 مریم یوسفی^۲، محمود نادری^۳
 *m_rahimifard@yahoo.com

مروری بر کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین

چکیده

کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین^۵، نوعی از کروماتوگرافی مایع با فشار متوسط است که برای خالص سازی پروتئین ها با تفکیک پذیری و تکرار پذیری بالا ایجاد شده است. ویژگی متمایز این روش، فاز ساکن آن است که از دانه های با قطر کم (رزین هایی که با آگارز، کراس لینک شده اند) تشکیل شده و درون یک ستون استوانه ای شیشه ای یا پلاستیکی با حجم بالا قرار گرفته است. در دستگاه FPLC طیف گسترده ای از بافرهای آبی (فاز متحرک) و فازهای ساکن بکار گرفته می شوند تا انواع روش های معمول کروماتوگرافی (تبادل یونی، اندازه طردی، جذبی و برهم کنش آگریزی) اجرا شوند. با این حال، تبادل آنیونی و اندازه طردی، روش هایی هستند که بیشترین استفاده را دارند.

واژه های کلیدی

کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین، تبادل یونی، اندازه طردی، برهم کنش آگریزی، جذبی.

مقدمه

تجزیه، تخلیص و شناسایی پروتئین ها، که هر کدام از آن ها وظیفه خاصی در بدن موجودات زنده بر عهده دارند، در پیشرفت علوم زیستی، فناوری زیستی، پزشکی و صنعت دارو اهمیت خیلی زیادی پیدا کرده است. برای تخلیص پروتئین ها ابتدا باید غشای سلول را تخریب و سپس محتویات داخل سلول را استخراج نمود. برای جداسازی پروتئین های موجود در محتویات داخل سلول از دیگر اجزا، معمولاً از روش رسوب دهی با نمک آمونیوم سولفات، فیلتراسیون و سانتریفیوژ استفاده می شود. برای خالص سازی پروتئین مورد نظر و جداسازی آن از مخلوط پروتئینی به دست آمده می توان روش های متعددی از جمله الکتروفورز دو بعدی و یا انواع روش های کروماتوگرافی (مانند کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی اندازه طردی، کروماتوگرافی جذبی و کروماتوگرافی برهم کنش آگریزی) را استفاده نمود. کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین، نوعی از کروماتوگرافی مایع است که بیشتر برای آنالیز و یا خالص سازی مخلوط پروتئین ها استفاده می شود. همانند دیگر اشکال کروماتوگرافی، این جداسازی نیز براساس برهم کنش متفاوت اجزای مخلوط با دو فاز ساکن و متحرک صورت می گیرد. در FPLC فاز متحرک یک محلول آبی یا «بافر» است. شدت جریان بافر با استفاده از یک پمپ کنترل به طور معمول ثابت نگه داشته می شود، در حالی که ترکیب بافر می تواند با ترکیب مایعات در نسبت های مختلف از دو یا چند مخزن خارجی متفاوت باشد. روش FPLC، جداسازی پروتئین را در زمان بسیار کوتاه تر نسبت به دیگر روش ها امکان پذیر می سازد و با توجه به این که در صنعت، برای تخلیص پروتئین در مقیاس انبوه، عامل زمان بسیار اهمیت دارد، اخیراً این روش به شکل خیلی گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. این روش قادر است نمونه هایی با ابعاد چند میلی گرم (با ستون هایی با حجم ۵ میلی لیتر یا کمتر) تا نمونه های صنعتی با ابعاد کیلوگرمی (با ستون هایی با حجم چندین لیتر) را به راحتی آنالیز کند. روش FPLC علاوه بر پروتئین ها برای تخلیص دیگر مولکول های زیستی مانند لیپوپروتئین ها [۱]، RNA [۲] و DNA نیز کاربرد دارد.

برای کروماتوگرافی تهیه‌ای^{۱۲} مناسب است.

■ **دریچه تزریق:** دریچه تزریق در واقع نقش تزریق کننده نمونه مورد آنالیز به داخل حلال عبوری را در دستگاه کروماتوگراف مایع بازی می‌کند. این بخش سیستمی است متشکل از چند مسیر که می‌تواند بین پمپ و ستون قرار گرفته و در حین عبور حلال یا فاز حامل با فشار زیاد، مقدار معینی از نمونه را به داخل آن هدایت کند. مقدار ثابت نمونه در داخل لوله‌ای با حجم مشخص بنام لوپ در کمین نشسته تا در لحظه فرمان کاربر سوار موج حلال شده و به سمت ستون کروماتوگرافی حرکت کند. حجم این لوپ از چندین میکرولیتر تا ۵۰ میلی‌لیتر یا بیشتر، قابل تغییر است.

■ **ستون:** ستون‌هایی که در FPLC استفاده می‌شوند، لوله‌های بزرگ با قطر داخلی میلی‌متری هستند که داخل آن با ذرات کوچک یا دانه‌های ژل در ابعاد میکرومتری پر شده‌است. این دانه‌ها از رزین‌هایی تشکیل شده‌اند که با آگارز، کراس لینک شده‌اند و درون یک ستون استوانه‌ای شیشه‌ای یا پلاستیکی قرار گرفته‌اند. رزین‌های FPLC بسته به نوع کاربردها در طیف گسترده‌ای از اندازه دانه و لیگاندهای متصل به سطح، در دسترس هستند.

■ **سل‌های جریان:** خروجی ستون از درون یک یا چند سل جریان عبور می‌کند تا غلظت پروتئین در خروجی ستون (با جذب نور UV در ۲۸۰ نانومتر) اندازه‌گیری شود. سل دیگری (سل رسانایی) هدایت بافر را برحسب میلی‌زیمنس بر ثانیه اندازه‌گیری می‌کند که نشان دهنده غلظت نمک در بافر است. در برخی دستگاه‌ها یک سل جریان برای اندازه‌گیری pH بافر نیز در مسیر تعبیه می‌شود. معمولاً هر سل جریان به یک مازول الکترونیک جداگانه وصل می‌شود که سیگنال را تقویت می‌کند و شدت را اندازه می‌گیرد.

■ **صفحه نمایش / ثبات:** سل‌های جریان به یک صفحه نمایش / ثبات متصل می‌شوند. در دستگاه‌های قدیمی این یک ضبط کننده ساده بود، در دستگاه‌های مدرن، کامپیوتر با رابط سخت افزاری و صفحه نمایش استفاده می‌شود.

■ **جمع کننده اجزا:** جمع کننده اجزا به‌طور معمول یک قفسه دوار است که می‌تواند با لوله‌های آزمایش یا ظروف مشابه پر شده

تاریخچه

FPLC اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط شرکت فارماسیا^۸ در سوئد تولید و عرضه شد و در ابتدا به دلیل شباهت با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۷، کروماتوگرافی مایع با عملکرد سریع^۸ نام گرفت [۳]. از آنجایی که این روش تنها برای پروتئین‌ها بکار گرفته شد بعدها به نام کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین تغییر نام داد. با وجودی که این روش فقط برای پروتئین‌ها استفاده می‌شود، با این حال، به دلیل انتخاب گسترده‌ای از رزین‌ها و بافرها، کاربردهای فراوانی دارد.

اجزای دستگاه FPLC

یک FPLC آزمایشگاهی معمولی مشابه با یک HPLC، شامل یک یا دو پمپ با دقت بالا، یک دریچه تزریق، یک ستون، یک آشکارساز، یک ثبات و یک جمع کننده اجزا^۹ است (شکل ۱).

■ **پمپ:** به منظور انتقال حلال و همچنین نمونه در فضای نسبتاً طویل ستون، نیاز به ایجاد فشاری در دستگاه است که برای ایجاد آن حداقل از یک پمپ یا موتور استفاده می‌شود. بیشتر دستگاه‌ها از دو پیستون دو سیلندر استفاده می‌کنند، یعنی برای هر یک از بافرها یک پمپ جداگانه استفاده و در نهایت هر دو بافر در مخزن ترکیب^{۱۰} با یکدیگر مخلوط می‌شوند. بعضی از دستگاه‌های ساده‌تر، از یک پمپ مجزا استفاده می‌کنند که هر دو بافر را از مخازن جداگانه (توسط سوییچ کردن) دریافت و در مخزن ترکیب مخلوط می‌کنند. در هر صورت، پمپ قادر است با توجه به برنامه زمانی، کسرهای متنوعی از بافرها را وارد ستون کند. در مقایسه با HPLC، در این روش فشار بافر نسبتاً کم است (معمولاً کمتر از ۵ بار)، اما شدت جریان نسبتاً بالا است (معمولاً ۱ تا ۵ میلی‌لیتر در دقیقه است). سرعت جریان می‌تواند از چند میلی‌لیتر در دقیقه در دستگاه‌های رومیزی، تا چند لیتر در دقیقه برای مقیاس صنعتی استفاده شود. این دامنه وسیع سرعت جریان هم برای کروماتوگرافی تجزیه‌ای^{۱۱} و هم



■ شکل ۱: نمای دستگاه FPLC آزمایشگاهی [۴].

علاوه بر این، مواد ستون FPLC و HPLC کاملاً متفاوت هستند. برای HPLC، دانه‌های سیلیکا با اندازه‌های بسیار کوچک و مقاوم در برابر فشار بالا بکار می‌رود، در حالی که در بیشتر فرآیندهای FPLC برای پر کردن ستون به آگارز یا پلیمر با اندازه ذرات بزرگتر نیاز است. رزین‌های مورد استفاده برای FPLC به اندازه دانه‌های سیلیکا در برابر فشار حساس نیستند ولی نسبت به حباب‌های هوا بسیار حساسند. علاوه بر این، نه تنها محتوای ستون بلکه ساختار ستون نیز متفاوت است. در HPLC کلاسیک، ستون‌های فولادی ضد زنگ مقاوم در برابر فشار استفاده می‌شود، ولی همان‌طور که قبلاً ذکر شد، پایداری فشار برای FPLC مهم نیست؛ بنابراین می‌توان با ستون‌های شیشه‌ای شفاف و زیست سازگار کار کرد. این مزیتی بزرگ است؛ زیرا کاربر می‌تواند به راحتی وجود یا عدم وجود حباب‌های هوا در ستون را بررسی کند و یا وضعیت مواد را در طول یک شویش، نظارت کند.

تفاوت در پرکننده‌های ستون منجر به تفاوت در روش‌های جداسازی می‌شود. در آنالیز HPLC، کروماتوگرافی فاز معکوس با فازهای ساکن آبگریز و فازهای متحرک قطبی، روشی پرکاربرد و عمومی است، در حالی که در FPLC از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود (شکل ۲). یکی از روش‌های FPLC، کروماتوگرافی اندازه طردی است که مولکول‌ها براساس اندازه آنها جدا می‌شوند. مولکول‌های کوچکتر می‌توانند در منافذ دانه‌ها نفوذ کنند، در حالی که مولکول‌های بزرگتر از ستون عبور می‌کنند. روش دیگر، جداسازی کروماتوگرافی تبادل یونی است. زیست مولکول‌ها با توجه به میزان بار مخصوص خود که به pH بافر بستگی دارد، به فاز ساکن متصل می‌شوند. هر چه بار پروتئین بیشتر باشد بهتر به رزین با بار مخالف متصل می‌شود. برای خارج کردن پروتئین از ستون، غلظت یون‌های نمکی در طول دوره افزایش می‌یابد. یون‌های نمکی با پروتئین برای اتصال به رزین رقابت می‌کنند، لذا پروتئین‌ها به ترتیب از فاز ساکن جدا شده و از ستون خارج می‌شوند. یکی دیگر از روش‌های مهم FPLC، کروماتوگرافی جذبی است که مولکول هدف می‌تواند به‌طور خاص به ستون متصل شود در حالی که مولکول‌های دیگر متصل نمی‌شوند، بنابراین توسط فاز متحرک شسته می‌شوند. برای این منظور، ستون‌هایی با محیط‌های خاص که زیست مولکول مورد نظر را تشخیص می‌دهند استفاده می‌شود. یک فرم مخصوص کروماتوگرافی جذبی، جذب یون فلز تثبیت شده^{۱۶} است. پروتئین هدف را بصورت ژنتیکی با اضافه کردن برچسب^{۱۷} به پروتئین، که به‌طور معمول شامل ۶ هیستیدین است، تغییر می‌دهند. رزین IMAC به‌طور خاص این «برچسب هیستیدین» را تشخیص می‌دهد. با افزایش غلظت ایمیدازول که با پروتئین‌های حاوی برچسب هیستیدین رقابت می‌کند، رها شدن اتفاق می‌افتد [۸]. علاوه بر روش‌های فوق، پروتئین‌ها همچنین می‌توانند با استفاده از تفاوت در آبگریزی خود، با استفاده از روش جداسازی برهم‌کنش آبگریزی تفکیک شوند. رزین به‌گونه‌ای ساخته شده‌است که پروتئین‌هایی با بیشترین آبگریزی به ستون متصل می‌شوند و با کاهش گرادیان نمک، از ستون جدا می‌شوند.

باشد. این بخش از دستگاه این امکان را فراهم می‌کند که خروجی ستون در حجم‌های ثابتی جمع شود و یا می‌تواند بخش‌هایی از نمونه را که با استفاده از حسگر به‌عنوان قله‌های غلظت پروتئین تشخیص داده شده‌اند، به ظروف جداگانه منتقل کند.

برخی از دستگاه‌ها علاوه بر قسمت‌های ذکر شده، دارای اجزای اختیاری مختلف دیگری نیز هستند. به‌عنوان مثال، استفاده از یک فیلتر بین مخلوط کننده و ستون برای کاهش مسدود شدن دستگاه یک فرآیند اختیاری و کاربردی است. در ستون‌های FPLC بزرگ، نمونه می‌تواند به‌طور مستقیم با استفاده از یک پمپ مجزای کوچک به جای یک حلقه تزریق^{۱۳} به ستون تزریق شود. در برخی دستگاه‌ها از فلکه‌های تعویض ستون^{۱۴} استفاده می‌شود تا این امکان را به کاربر بدهد که بتواند در هنگام آنالیز، ستون را تغییر دهد [۵].

ستون‌های FPLC

ستون‌هایی که برای FPLC مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند ماکرومولکول‌ها را براساس اندازه، توزیع بار (تبادل یون)، آبگریزی، فاز معکوس یا تشخیص زیستی^{۱۵} [۶] جدا کنند. برای استفاده آسان، طیف گسترده‌ای از ستون‌های پرشده تجاری با تنوع بالایی از اندازه دانه و لیگاند‌های متصل به سطح، برای روش‌هایی مانند تبادل یونی، ژل تراوا (اندازه طردی)، برهم‌کنش آبگریزی و کروماتوگرافی جذبی موجود است [۷]. ستون‌های بکار رفته در FPLC از HPLC متفاوت است، زیرا ستون‌هایی که برای FPLC استفاده می‌شود تنها می‌توانند تا حداکثر فشار ۳-۴ میلی‌پاسکال (۴۳۵-۵۸۰ psi) استفاده شوند. بنابراین، اگر بتوان فشار دستگاه HPLC را تعدیل کرد، هر ستون FPLC نیز می‌تواند در دستگاه HPLC استفاده شود.

تفاوت‌های HPLC و FPLC

تفاوت در نام‌های کروماتوگرافی مایع پروتئین سریع (FPLC) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، اشاره به تفاوت بین این روش‌های کروماتوگرافی دارد. در حالی که HPLC با فشار بالا برای آنالیز مواد شیمیایی کوچک بکار می‌رود، FPLC مولکول‌های زیستی بزرگ مانند پروتئین یا DNA را خالص می‌کند. کروماتوگرافی مولکول‌های زیستی، بسیار حساس است، زیرا آنها نمی‌توانند دمای بالا، فشار بالا و یا حلال‌های معمولی که در HPLC استفاده می‌شود را تحمل کنند. به همین علت جداسازی زیست مولکول‌ها نیاز به یک روش جایگزین برای HPLC دارد.

زیست مولکول‌ها از عصاره‌های سلولی خالص‌سازی می‌شوند، که به معنی حجم بسیار بزرگتری از نمونه نسبت به نمونه‌های مورد آنالیز در HPLC است. بنابراین، برای تزریق نمونه، حلقه تزریق بزرگتر و یا حتی پمپ با سرعت جریان بالا استفاده می‌شود.

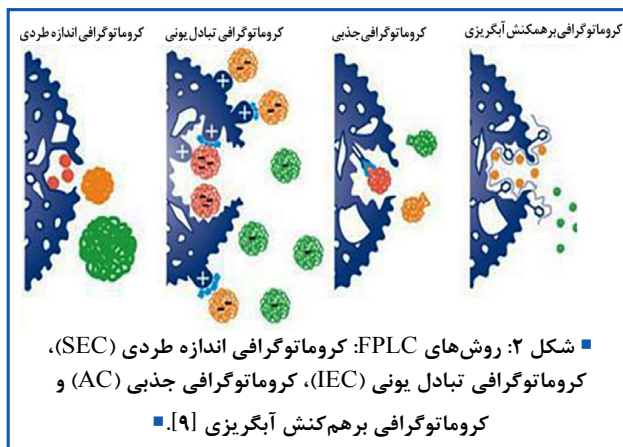
رطوبت نیز کاهش می‌یابد. بنابر این، تمامی اجزای یک دستگاه FPLC باید مخصوص چنین شرایطی طراحی شوند.

علاوه بر این، اجزای دستگاه FPLC با یک چالش اضافی دیگر به نام محلول‌های بافر نمکی مواجه می‌شوند که به‌عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار می‌گیرند. در FPLC، به‌طور معمول pH ایزواسمتیک و غلظت نمک شبیه به محیط سلولی انتخاب می‌شوند. دستگاه‌های کروماتوگرافی عموماً از فولاد ضد زنگ ساخته می‌شوند. از یک طرف، نمک موجود در بافرها می‌تواند منجر به خوردگی فلز شود و از سوی دیگر، یون‌های فلزی موجود در فولاد ضد زنگ می‌توانند با پروتئین تداخل داشته و ساختار آن را مختل سازند. بنابراین، در دستگاه‌های FPLC مهم است که بجای استفاده از فولاد ضد زنگ، از مواد زیست سازگار مانند پلی‌اتر اتر کتون، سرامیک و یا تیتانیوم استفاده شود.

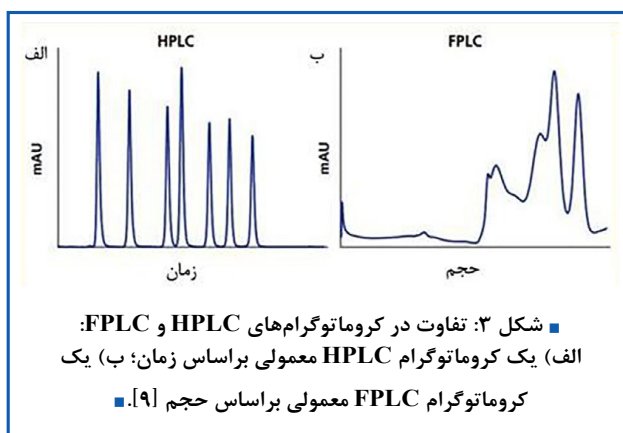
بدین ترتیب واضح است که تفاوت‌های عمده‌ای بین این دو کروماتوگرافی وجود دارد (جدول ۱). روش‌ها، سخت‌افزارها و نرم‌افزارها با توجه به اینکه مولکول آنالیز خواهد شد یا تخلیص، متفاوت است. برای کاربردهای FPLC، ماهیت حساس نمونه‌ها و تلاش برای حفظ آن‌ها به‌صورت فعال، به چالش منجر می‌شود.

جدول (۱): محدوده غلظت خطی دستگاه پلاسمای ماکروویو - طیف‌سنج نشر اتمی و محدوده غلظت پهنه دستگاه جذب اتمی برای نمونه‌های آب میوه

عنوان	FPLC	HPLC
هدف	خالص‌سازی	آنالیز
فشار	حداکثر ۴۰ بار (۴ مگا پاسکال)	۱۵۰۰ بار (۱۵۰ مگا پاسکال)
وزن مولکولی نمونه	چندین کیلو دالتون	از چندین اتم تا ۳۰۰۰ دالتون
حجم نمونه	از ۱۰۰ میکرولیتر تا چندین لیتر	کمتر از ۱۰۰ میکرولیتر
فاز متحرک	بافر	حلال‌ها
جنس سخت‌افزار	زیست سازگار	فولاد
ویژگی فاز ساکن	آگارز/پلیمر، فقط فشارهای پایین، اندازه ذرات بزرگ، سرعت جریان‌های بالا	دانه‌های سیلیکا، مقاوم به فشار، اندازه ذرات کوچک، سرعت جریان‌های کم
روش‌ها	اندازه طردی، تبادل یونی، جذبی و برهم‌کنش آگبریزی	فاز معکوس
نرم‌افزار	نتایج براساس حجم گزارش می‌شوند، بصری، قابلیت کنترل مستقیم	نتایج براساس زمان گزارش می‌شوند، نرم‌افزارهای تحلیلی



مانند دستگاه HPLC، دستگاه‌های FPLC نیز با استفاده از نرم‌افزار کنترل می‌شوند. اختلاف قابل توجهی بین نرم‌افزار FPLC و HPLC وجود دارد. HPLC به‌طور عمده برای آنالیز نمونه‌ها بکار می‌رود، بنابراین نرم‌افزار آن شامل ابزارهای تحلیلی است. در حالی که در FPLC، ابزارهای تحلیلی زیادی مورد نیاز نیست و معمولاً نتایج براساس حجم و یا حتی حجم ستون استوار است (شکل ۳). نرم‌افزار FPLC به‌صورت عمده بسیار بصری و کاربر پسند است و به دلیل قابلیت کنترل مستقیم، این امکان را به کاربر می‌دهد تا در طی اجرا، عوامل را تنظیم نماید. به این ترتیب، کاربر می‌تواند به موقعیت‌های مختلف به‌طور لحظه‌ای واکنش نشان می‌دهد.



الزامات FPLC

زنجیره پروتئین‌ها از واحدهای اسیدهای آمینه تشکیل شده‌است. این زنجیره به‌صورت یک ساختار سه بعدی پیچ خورده بوده که کلید عملکرد و فعالیت هر پروتئین است. بنابراین، حفظ این ساختار پروتئین در طول فرآیند خالص‌سازی بسیار مهم است. عوامل خارجی مانند دما، فشار، بالا، pH شدید یا حلال‌ها می‌توانند ساختار پروتئین را مختل کنند، لذا در FPLC باید از این عوامل اجتناب شود.

دمای کار برای پروتئین‌ها معمولاً ۴ درجه سانتیگراد است. به همین دلیل است که دستگاه FPLC بیشتر در داخل یک اتاق سرد قرار می‌گیرد که نه تنها دمای پایین تامین می‌شود بلکه

ترکیب پیچیده (که ممکن است سلول، بافت یا موجود زنده کامل باشد) خالص می‌شود. در فرآیند خالص‌سازی قسمت پروتئینی و غیرپروتئینی از یکدیگر جدا می‌شوند. بیشترین چالش مربوط به زمانی است که هدف، جداسازی پروتئین مورد نظر از دیگر پروتئین‌ها باشد. مراحل خالص‌سازی معمولاً به اندازه، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت زیستی پروتئین مورد نظر بستگی دارد.

ترکیبی از چندین روش کروماتوگرافی می‌تواند برای خالص‌سازی یک مولکول هدف مورد استفاده قرار گیرد. هدف از خالص‌سازی پروتئین‌ها با FPLC، تهیه مقادیری از مولکول هدف با خلوص کافی و در حالت فعال زیست شناختی به منظور استفاده بیشتر از آن است. کیفیت محصول نهایی بسته به نوع و مقدار مواد اولیه، کارایی جداسازی و گزینش‌پذیری رزین مورد استفاده، متفاوت است. هیچ روش کروماتوگرافی ماده فعال ۱۰۰ درصد را تولید نمی‌کند و تولید کلی به تعداد مراحل خالص‌سازی بستگی دارد که با بهینه‌سازی هر مرحله برای هدف مورد نظر و کاهش تعداد مراحل، به بیشترین بازده خواهد رسید.

یک فرآیند خالص‌سازی چند مرحله‌ای با یک مرحله خالص‌سازی اولیه آغاز می‌شود که رایج‌ترین مرحله، کروماتوگرافی تبادل یونی است. در این روش، رزینی که به عنوان فاز ساکن انتخاب می‌شود باید این ویژگی را داشته باشد که در بافر A (بافر در حال اجرا) با پروتئین هدف برهم‌کنش الکتروستاتیکی داشته باشد، اما زمانی که بافر شستشو به B (بافر شستشو) تغییر کند پروتئین را رها کرده تا همراه با بافر B حرکت نماید. مخلوطی که حاوی یک یا چند پروتئین هدف است، در ۱۰۰ درصد بافر A حل شده و به ستون تزریق می‌شود. پروتئین‌های مورد نظر به رزین متصل می‌شوند در حالی که اجزای دیگر در بافر باقی می‌مانند. در FPLC شدت جریان بافر ثابت نگه داشته می‌شود در حالی که نسبت بافر B به تدریج از ۰ درصد به ۱۰۰ درصد (براساس گرادیان تعریف شده) افزایش می‌یابد. در طی این فرآیند، با افزایش غلظت یون‌های نمکی، هر یک از پروتئین‌های متصل شده، به ترتیب از فاز ساکن جدا شده و همراه با فاز متحرک حرکت می‌کنند. خروجی ستون از دو آشکارساز عبور می‌کند که غلظت نمک (هدایت الکتریکی) و غلظت پروتئین (با جذب نور ماوراء بنفش در طول موج ۲۸۰ نانومتر) را اندازه‌گیری می‌کنند.

کروماتوگرافی برهم‌کنش آبریزی می‌تواند هم برای مرحله اول خالص‌سازی و هم برای مراحل میانی استفاده شود. گزینش‌پذیری در این روش مستقل از pH عمل می‌کند و از گرادیان‌های نمکی نزولی استفاده می‌شود. برای این منظور سولفات آمونیوم به نمونه اضافه می‌شود تا غلظت آن با غلظت بافر A مطابقت کند. اگر این نوع کروماتوگرافی قبل از کروماتوگرافی تبادل یونی استفاده شود، قدرت یونی باید با استفاده از رقیق کردن، دیالیز یا تعویض بافر کاهش یابد. به

کاربردهای FPLC

همان گونه که تاکنون هم اشاره شد، پرکاربردترین استفاده FPLC در اندازه‌گیری و خالص‌سازی پروتئین‌هاست. به عنوان مثال، کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین که در آن از رزین‌های آنیونی استفاده شده‌است، تجزیه سریع و تکرارپذیری از پروتئین‌های پلاسما در مایع ادرار و مایع نخاعی مغزی را فراهم می‌کند. این جداسازی برای نمونه‌های ادرار ۱ ساعت و برای مایع نخاعی مغزی ۴۵ دقیقه طول می‌کشد. به این ترتیب ۲۱ پروتئین پلاسما شناسایی و اندازه‌گیری شده‌اند [۱۰].

یکی دیگر از کاربردهای FPLC، اندازه‌گیری لیپوپروتئین‌هاست. گونه‌های گلیسروفسفولیپید و اسفنگولیپید و متابولیت‌های فعال زیستی آن، تنظیم کننده‌های مهمی از لیپوپروتئین‌ها و عملکرد سلولی هستند. در مثال دیگری لیپوپروتئین‌های خون انسان، VLDL، LDL و HDL با تزریق ۵۰ میکرولیتر سرم از ۲۱ اهداکننده سالم ناشتا به دستگاه کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین‌ها، جدا شدند. سپس پروتئین‌های فسفاتیدیل کولین، لیزوفسفاتیدیل کولین^{۲۰}، اسپینگومیلین^{۲۱}، سرامید^{۲۲}، فسفاتیدیل اتانول‌آمین^{۲۴}، کلسترول و کلسترول استر با استفاده از طیف‌سنج جرمی مجهز به یونیزاسیون الکترواسپری آنالیز شدند. این روش به محقق این امکان را می‌دهد که با یک آزمایش خون ساده تغییرات پروفایل لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها در بیمار را ردیابی کند [۱].

از دیگر کاربردهای FPLC می‌توان به جداسازی پورفوبیلی‌نوژن دامیناز^{۲۵} اشاره کرد. این ترکیب در سنتز زیستی هم، نقش کاتالیزگر را در مرحله تشکیل تتراپیرول حلقوی پورفیرین از ۴ مولکول پورفوبیلی‌نوژن، ایفا می‌کند. فعالیت پورفوبیلی‌نوژن دامیناز در اریتروسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، هپاتوسیت‌ها، آمینوسیت‌ها و لنفوبلاست‌های بیماران مبتلا به پورفیری متناوب حاد (یک بیماری مادرزادی) کاهش می‌یابد. خالص‌سازی این آنزیم از منابع انسانی قدمی ضروری در بررسی ساختار و عملکرد آن در شرایط سلامتی و بیماری است [۱۱]. FPLC با روش اندازه‌طردی، جایگزین مناسبی برای جداسازی سریع RNA بجای روش معمول الکتروفورز روی ژل آکرل آمید^{۲۶} است. از آنجایی که در ستون‌های اندازه‌طردی، الیگونوکلوئیدهای RNA، متفاوت از پروتئین‌های کروی عمل می‌کنند، این امکان فراهم می‌شود تا با استفاده از ۲ ستون مختلف (ستون سوپردکس ۷۵^{۲۷} و ستون سوپردکس ۲۰۰) الیگونوکلوئیدهای RNA با طول‌های متفاوتی را اندازه‌گیری و جداسازی کرد. چنین روشی قادر است RNAهای منومر را نیز از مولتی‌مر آن جدا کند [۲].

خالص‌سازی پروتئین با FPLC

خالص‌سازی پروتئین به مجموعه‌ای از فرآیندها گفته می‌شود که در آن یک یا تعداد اندکی از پروتئین‌ها از یک

پی‌نوشت

۱. دکتری شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۲. دکتری شیمی آلی، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا
۳. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۴. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی

5. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)
6. Pharmacia
7. High-performance liquid chromatography (HPLC)
8. Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)
9. Fraction collector
10. Mixing chamber
11. Analytical chromatography
12. Preparative chromatography
13. Injection loop
14. Column switching valves
15. Biorecognition
16. Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC)
17. Tag
18. Isosmotic
19. Polyether Ether Ketone (PEEK)
20. Phosphatidylcholine (PC)
21. Lysophosphatidylcholine
22. Sphingomyelin (SM)
23. Ceramide (CER)
24. Phosphatidylethanolamine (PE)
25. Porphobilinogen deaminase
26. Polyacrylamide gel electrophoresis
27. Superdex 75

همین دلیل است که کروماتوگرافی تبادل یونی به‌طور معمول قبل از کروماتوگرافی برهم‌کنش آبگریزی انجام می‌شود چون غلظت بالای نمک بدست آمده در انتهای کروماتوگرافی تبادل یونی برای اتصال به رزین‌های کروماتوگرافی برهم‌کنش آبگریزی ایده‌آل است.

مرحله نهایی خالص‌سازی، عبور از ستون فیلترینگ ژل (کروماتوگرافی اندازه طردی) است. در این مرحله پروتئین‌ها براساس اندازه (در برخی موارد براساس وزن مولکولی) از یکدیگر جدا می‌شوند. اگر نیاز به خالص‌سازی بیشتری باشد یک مرحله کروماتوگرافی تبادل یونی با شرایط کاملاً متفاوت با قبلی به این مراحل اضافه می‌شود.

اگر چه روش ذکر شده نمونه‌ای از یک دستورالعمل خالص‌سازی معمول برای پروتئین‌ها است ولی انواع متفاوتی از بافرها، سرعت جریان‌ها و رزین‌ها را می‌توان بکار برد تا طیف وسیعی از پروتئین‌های هدف را با این روش خالص کرد. این انعطاف‌پذیری برای یک سیستم خالص‌سازی ضروری است، زیرا پروتئین‌ها رفتارهای متفاوتی دارند و در بیشتر موارد از پیش‌بینی‌ها منحرف می‌شوند [۱۲].

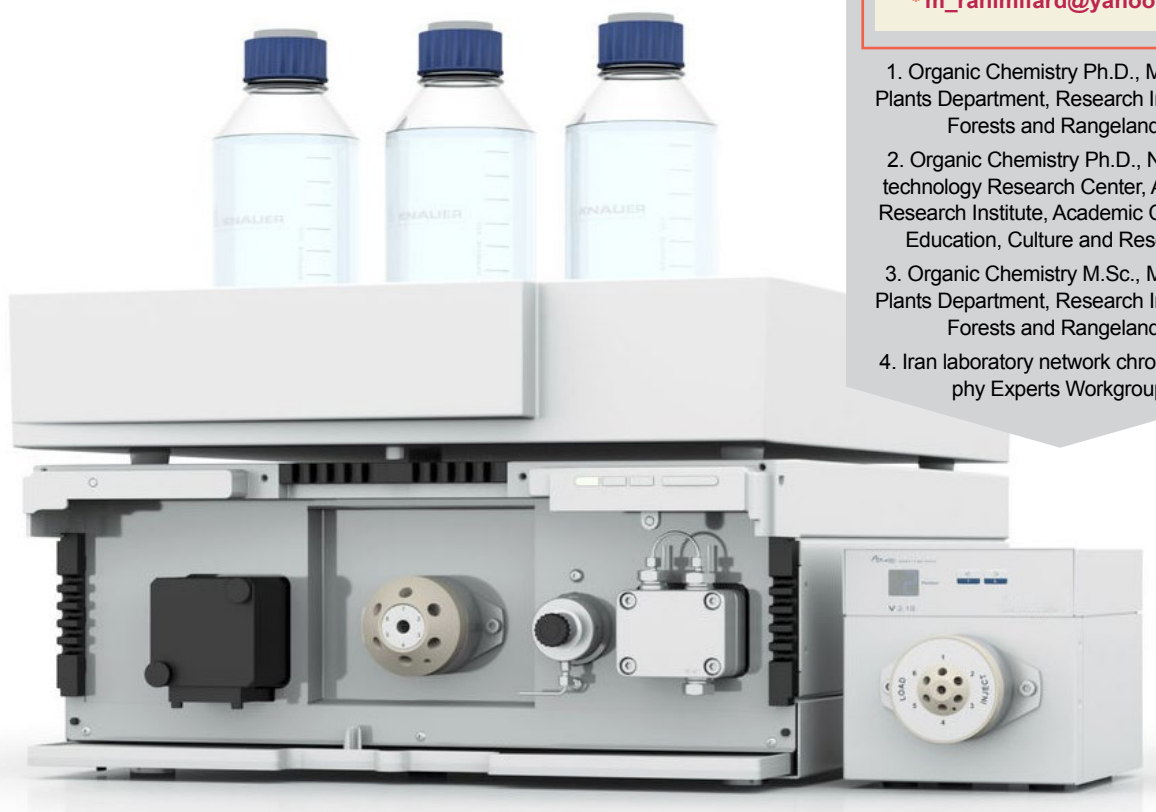
پس از خالص‌سازی، تعیین درصد خلوص، غلظت و عملکرد یا فعالیت آنزیم با استفاده از HPLC، الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید، آزمایش فعالیت آنزیم یا طیف‌سنجی جرمی، مورد بررسی قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین (FPLC)، نوعی از کروماتوگرافی مایع است که بیشتر برای آنالیز و یا خالص‌سازی مخلوط پروتئین‌ها، لیپوپروتئین‌ها، RNA و DNA استفاده می‌شود. در این روش شدت جریان فاز متحرک همواره ثابت نگه داشته می‌شود، در حالی که ترکیب آن در طول شویش تغییر می‌کند. اجزای یک FPLC آزمایشگاهی معمولی مشابه با یک HPLC است با این تفاوت که نوع ستون‌های بکار رفته و فشار دستگاه در FPLC از HPLC متفاوت است. از آنجایی که عوامل خارجی مانند دما، فشار بالا، pH شدید یا حلال‌ها می‌توانند ساختار مولکول‌های زیستی که هدف این دستگاه هستند را مختل کنند، لذا در FPLC باید از این عوامل اجتناب شود.

مراجع

- [1] Wiesner P., Leidl K., Boettcher A., Schmitz G., Liebisch G., Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Lipid Research*, 50(3): 574-585 (2009).
- [2] Kim I., McKenna S.A., Puglisi E.V., Puglisi J.D., Rapid purification of RNAs using fast performance liquid chromatography (FPLC), *Rna*, 13(2): 289-294 (2007).
- [3] Richey J., FPLC-A COMPREHENSIVE SEPARATION TECHNIQUE FOR BIO-POLYMERS, *American Laboratory*, 14(10): 104-& (1982).
- [4] <http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?ID=MWHBF4CZF>.
- [5] Sheehan D., O'Sullivan S., Fast Protein Liquid Chromatography, in *Protein Purification Protocols*, Cutler, P., Editor. 2004, Humana Press: Totowa, NJ. p. 253-258.
- [6] Verbeke K., Verbruggen A., Usefulness of fast protein liquid chromatography as an alternative to high performance liquid chromatography of 99mTc-labelled human serum albumin preparations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14 (8): 1209-1213 (1996).
- [7] Göke B., Keim V., HPLC and FPLC, *International Journal of Pancreatology*, 11(2): 109-116 (1992).
- [8] Bornhorst J.A., Falke J.J., Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags, *Methods in enzymology*, 326: 245-254 (2000).
- [9] Runde S., FPLC versus Analytical HPLC: Two Methods, One Origin, Many Differences, *The Column*, 12(15): 12-16 (2016).
- [10] Cooper E.H., Turner R., Johns E.A., Lindblom H., Britton V.J., Applications of fast protein liquid chromatography TM in the separation of plasma proteins in urine and cerebrospinal fluid, *Clinical Chemistry*, 29(9): 1635-1640 (1983).
- [11] de Rooij F.W.M., Hamer C.M., Wilson J.H.P., Purification of porphobilinogen deaminase from human erythrocytes by fast protein liquid chromatography, *Clinica Chimica Acta*, 162(1): 61-68 (1987).
- [12] Healthcare G., *Strategies for Protein Purification: Handbook*, Uppsala GE Healthcare, (2010).



Author

Mahshid Rahimifard^{1,4*}Maryam Yousefi^{2,4}Mahmoud Naderi^{3,4}

* m_rahimifard@yahoo.com

1. Organic Chemistry Ph.D., Medicinal Plants Department, Research Institute of Forests and Rangelands

2. Organic Chemistry Ph.D., Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research.

3. Organic Chemistry M.Sc., Medicinal Plants Department, Research Institute of Forests and Rangelands

4. Iran laboratory network chromatography Experts Workgroup

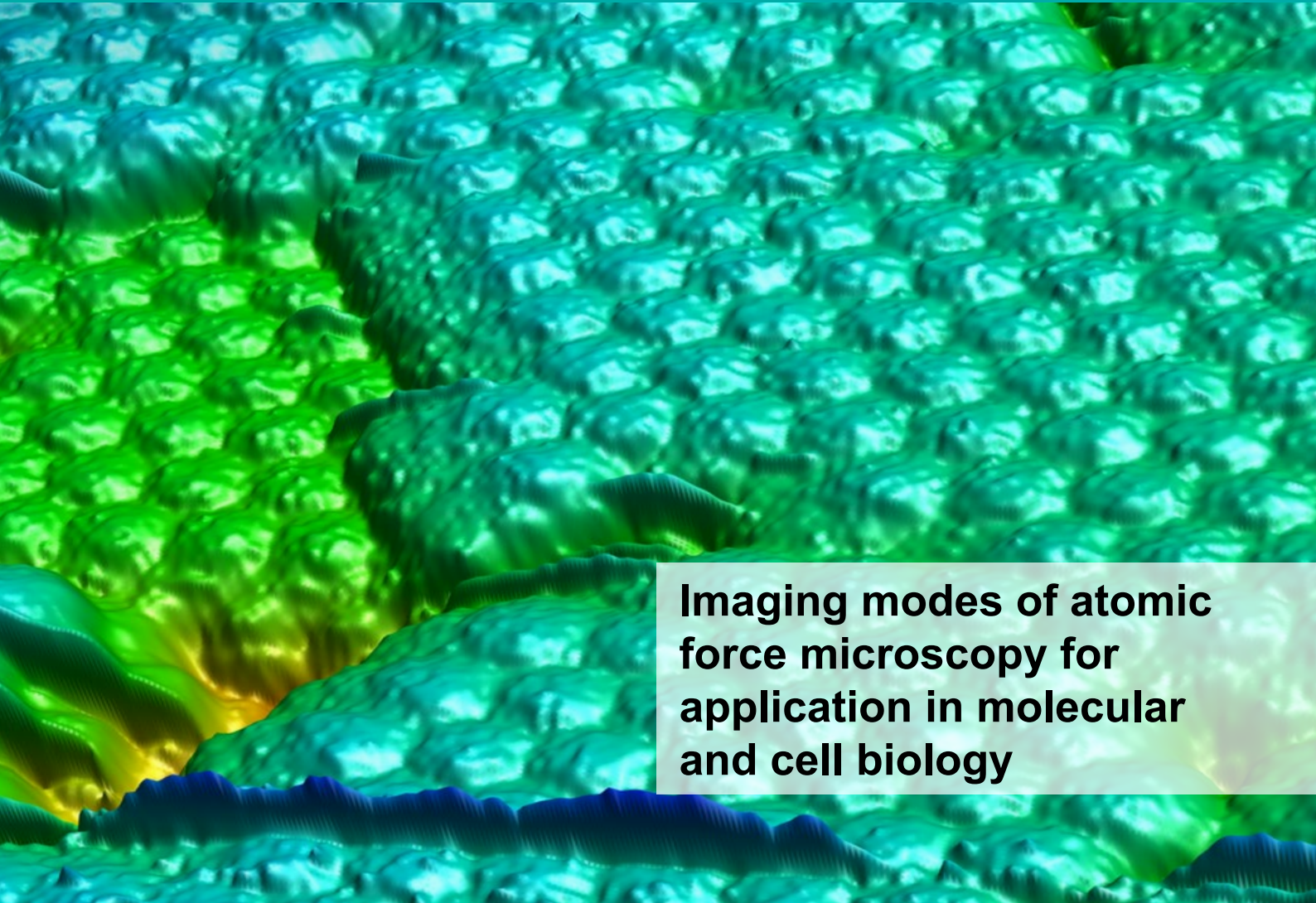
Fast protein liquid chromatography

Abstract

Fast protein liquid chromatography (FPLC) is a form of medium pressure chromatography originally developed for purifying proteins with high resolution and reproducibility. Its distinguishing feature is that the stationary phase is composed of small-diameter beads (generally cross-linked agarose) that are packed in glass or plastic columns and have high loading capacity. The FPLC system allows the use of a wide range of aqueous buffers (the mobile phase) and different stationary phases to perform the main chromatography modes (ion exchange, gel filtration, affinity and hydrophobic interaction, reverse phase). However, anion exchange and gel filtration chromatography are the modes most commonly used.

Keywords

fast protein liquid chromatography, ion exchange, gel filtration, affinity, hydrophobic interaction



Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology



**Microwave Plasma Atomic
emission Spectroscopy
(MP-AES)**



**Fast protein liquid
chromatography**



**Introduction of Secondary
low vacuum detector in the
Scanning Electron Microscope**