استخلاص وتنقية السموم

الاستخلاص:

لكي يتم استخلاص السموم الداخلية يجب أولا تحطيم جدار الخلية الجرثومية وهذا يتم عن طريق بعض العمليات منها:

١- طريقة التجميد واعادة الاذابة: في هذه الحالة توضع الخلايا المجفدة بقليل من الماء المقطر وتوضع في المجمدة لفترة من الوقت ثم يتم اخراجها واذابتها بدرجة حرارة الغرفة ثم يعاد تجميدها وهكذا عدة مرات، خلال هذه العملية سوف يحدث خلل في الضغط الازموزي فيؤدي الى انفجار الجدار الجرثومي وخروج محتويات الخلية خارجا.

٢- التحطيم باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية ultra sound sonicator : ويعد الجهاز خطر لذا عند تشغيله يتم الخروج من الغرفة لحين انتهاء وقت التكسير وكذلك نتيجة لتلك الموجات الفوق صوتية سوف تتولد حرارة قد تفسد البروتينات لذا يتم وضع المستخلص الجرثومي في وعاء حاوي على الثلج للحفاظ على درجة حرارة المستخلص.

٣- استخدام عملية الاستخلاص البارد بواسطة جهاز الهزاز stirrer: اذ يتم وضع المزرعة أو المستحلب الجرثومي داخل دوارق حاوية على مذيبات عضوية أو ماء مقطر ومغلفة بشريط البارافين، عند تشغيل الجهاز تتحرك الصفيحة حيث بشكل دوران ومع دورانها يدور السائل في الدورق حسب سرعة دوران الصفيحة حيث يتم وضع قضيب مغناطيسي magnatic bar داخل الدورق وينجذب الى الصفيحة المعدنية فيدور بدورانها وبسرعة الدوران ووجود القضيب يحدث اصطدامات فتتفجر الخلايا.

أما السموم الخارجية فلا نحتاج الى تحطيم الخلايا لاستخلاصها فيتم أخذ المزرعة وترشيحها بواسطة أوراق ترشيح دقيقة ويؤخذ راشح المزرعة الخالي من البكتريا والحاوي على السم المفرز ويحضر للتنقية.

الفصل والتنقية:

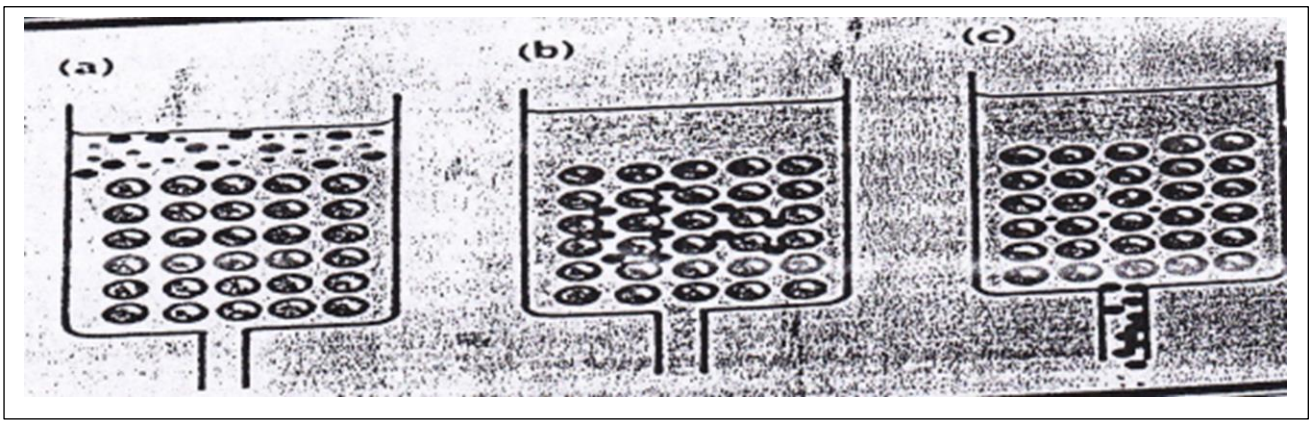
توجد عدة طرق لفصل السموم وأكثرها شيوعا تلك المعتمدة على الأوزان الجزيئية ومنها:-

١- الديلزة dialysis : والتي تعتمد على البدء على ترسيب البروتين ومن ثم تعبئة محلول البروتين في أكياس الديلزة dialysis sacs التي تتمتع أغشيتها بخاصية نفاذية بالاعتماد على الوزن الجزيئي للبروتين المراد فصله اذ يتم اختيار حجم ثقوب الكيس بحيث لايتمكن البروتين المراد فصله من الخروج الى خارج الكيس بعد وضعه في محلول دارئ والسماح لمحتوياته بالتنافذ مع الاخير.

٢- كروماتوغرافيا الترشيح بالهلام gel filtration chromatography: تعتمد الطريقة على استخدام مواد هلامية جزيئاتها ذات أقطار مختلفة بحيث يفصل كل نوع من هذه المواد وزن جزيئي معين، وهذه المواد الهلامية خاملة لاتتفاعل مع خليط البروتينات ولاتسبب تثبيطها اذ غالبا ماتكون خالية من المجاميع المشحونة ولاتمتلك القدرة على الفة المواد المراد فصلها ومن أهم المواد المستخدمة في هذا المجال هي مادة السيفادكس ويحضر من تفاعل الدكستران القاعدي مع الابيكلوروهايدرين له القدرة على الانتفاخ في المحاليل المنظمة والماء كما توجد مواد أخرى مثل السيفاروز والسيليكا والاكريل أمايد والبايوجيل والاكاروز وغيرها، اذ تمتلك القدرة على الانتفاخ عند وضعها في المحاليل المنظمة أو الماء وعند صب خليط البروتينات في عمود الفصل تتحرك الجزيئات حسب الوزن الجزيئي العالي الذي يفوق حدود الاقصاء بصورة أسرع من الجزيئات التي هي ضمن المدى والتي تنزل بصورة أبطأ من الأولى.

مدى الاقصاء exclusion limits: هي قدرة كل نوع من المادة على فصل مدى محدد من الأوزان الجزيئية مثلا سيفادكس G15 له مدى اقصاء 500-1500 والـ G100 يفصل جزيئات يصل حجمها الى 100000.

عند صب خليط البروتينات المراد فصلها في عمود الفصل تتحرك الجزيئات ذات الوزن الجزيئي العالي الذي يفوق حدود الاقصاء بصورة أسرع من الجزيئات التي هي ضمن المدى والتي تعبر من خلال جزيئات الهلام لذا فانها تتحرك باتجاه الاسفل بصورة أبطأ من الاولى والشكل التالي يوضح العملية:



صورة توضيحية آلية نزول الجزيئات المفصولة على اساس وزنها الجزيئي

الملاحظات الواجب مراعاتها قبل البدء بالعمل

اختيار الهلام الملائم حسب الوزن الجزيئي المراد فصله اذ يجب ان تكون لجزيئات السموم المراد فصلها القدرة على اختراق جزيئات الهلام وهذا مايسمى بالنخل او الغربلة sieving وهنا يجب ذكر انه توجد انواع من هلامات السيفادكس أو السيفاروس أو الاكريلمايد كل نوع منها له القدرة على فصل مدى محدد من الأوزان الجزيئية تسمى بحدود الأقصاء للهلام Exclusion limits فمثلا الجدول التالي يوضح الأنواع المختلفة للسيفادكس والمديات التي تتمكن من اقصاءها:

Sephadex	مدى الاقصاء (Exclusion range)
G-15	500-1500
G-25	500-9000
G-50	800-75000
G-100	يفصل جزيئات يصل حجمها الى 100000

طريقة العمل:

١- في حالة كون السم داخليا يجب ترسيب خلايا البكتريا في أنبوبة اختبار بواسطة الترشيح أو الطرد المركزي ويؤخذ الراسب ويخفف بقليل من المحلول الدارئ ويوضع مع قليل من الثلج داخل جهاز الموجات فوق الصوتية بقوة 20-9 KH_Z لمدة ربع ساعة، ثم يستخرج الخليط ويفصل للحصول على الراشح فقط الحاوي على دقائق السم، أما في حالة السموم الخارجية فترشح المزرعة بأوراق ترشيح دقيقة ويؤخذ الراشح فقط ويجهز لعملية التنقية.

٢- يسخن السيفادكس المذاب في محلول دارئ أو ماء مقطر في حمام مائي لمدة 5 ساعات هذه المدة تكون كافية لانتفاخ حبيبات السيفادكس والانتفاخ باستخدام الحمام المائي يكون اسرع من ترك السيفادكس بدرجة حرارة الغرفة اضافة الى ان التسخين يساعد على سحب الفقاعات من الهلام.

٣- يبرد السيفادكس لدرجة حرارة الغرفة ثم يسحب الهواد من الهلام باستخدام vacum اذ تقوم فقاعات الهواء بحرف جزيئات البروتين النازلة عن مسارها.

٤- يصب الهلام في عمود الفصل على طول قضيب زجاجي رفيع لتجنب تكون فقاعات الهواء ويراعى صب الهلام كله في نفس الوقت للسماح لجزيئات الهلام بالترص في وقت واحد ويترك عادة لمدة 18 ساعة على الأقل ليأخذ الهلام وضع التراص والاستقرار.

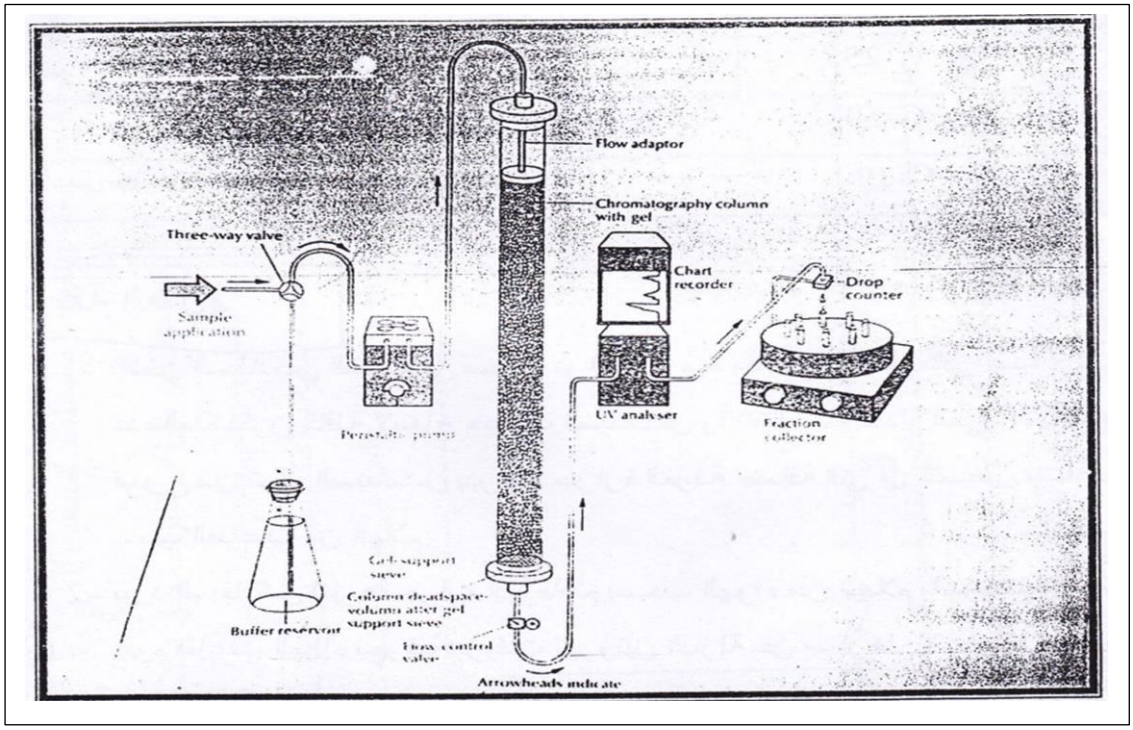
٥- يغسل الهلام بماء مقطر أو محلول دارئ بحجم مضاعف لحجمه الأصلي لتفعيل جزيئات الهلام ولازالة الشوائب العالقة في الهلام.
٦- اضافة العينة الحاوية على السموم برقة على جدران العمود لتلافي تحريك واثارة الهلام المتراص اذ ان التحريك يسبب انحراف في مسار البروتينات.

٧- تنزل العينة في أنابيب الاختبار الموضوعة أسفل العمود وحسب معدل الجريان الذي يتم ضبطه بمساعدة الصنبور الموجود في نهاية عمود الفصل حيث تؤخذ العينات المفصولة ويتم تشخيصها باستخدام أجهزة متنوعة للتحليل مثل جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 280 نانومتر وجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC وتقنية الترحيل الكهربائي.

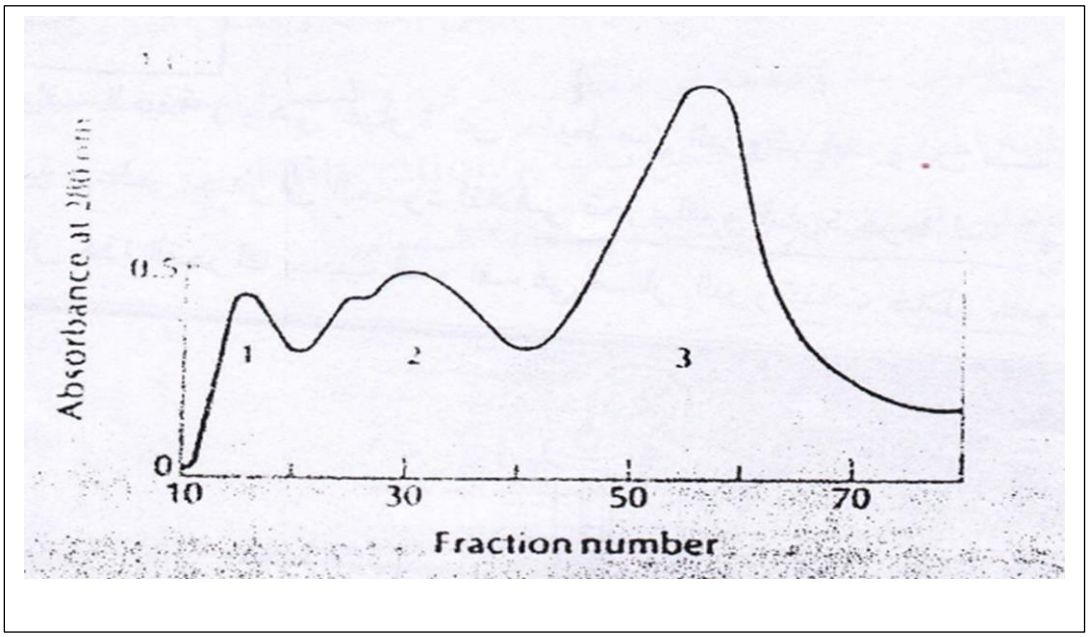
ملاحظات هامة:

١- عند ترك الهلام لفترة طويلة دون غسل أو تنقية يجب اضافة المادة thiomersal بتركيز 0.005% لمنع نمو البكتريا وعند استخدامه يجب التخلص من بقايا هذه المادة باستخدام مادة كيمياوية لها القدرة على امتصاص الجزيئات أعلاه لانه هذه المادة تعطي قراءة خلال استخدام UV-Spectrophotometer ويستخدم لهذا الغرض عادة مادة Sodium azide بتركيز 0.01 مولاري اذ يغسل بها عمود الفصل كما انها تعطي امتصاصية ضعيفة في الجهاز.

٢- يجب مراعاة عدم جفاف المحلول الدارئ لتجنب تشقق الهلام واذا حدث ذلك يجب أن يعاد تنشيط الاكار وصبه من جديد في عمود الفصل.



صورة توضح وحدة الفصل المتكاملة Fractionation unite



صورة توضح قمم البروتينات المفصولة بعد اخذ القراءات لها باستخدام جهاز Spectrophotometer