طرق تنقية البروتينات 1

د. مجد الجمالي

تقانة حيوية | نظري

فريق الكريات الحمراء التطوعي
7
112
32
28/11/2018
RBC Pharmac

نقدِّم محاضرتنا الجميلة المليئة بفقرات من الأرشيف الرائع....طبعاً هذا لا يعني أنها سهلة

فهرس المحاضرة :

2 • تحدّيات إنتاج البروتين
4 • الملوِثات
13 • طرق تحطيم الخلايا
14 • التنبيذ التفاضلي
18 • الترسيب بالملح
27 • الترسيب بالمحل

Protein challenges
تحديات إنتاج البروتين

1. Large Molecules, very hard to be synthesized chemically

جزيئات ضخمة من الصعب اصطناعها كيميائياً

2. Complicated purification processes عملية تنقية البروتينات عملية صعبة:

More than one method is usually used to purify proteins.
Loss or denaturation of many proteins during the process.
غالباً ما نلجأ إلى استخدام أكثر من طريقة تنقية للحصول على المنتج النهائي، وأحياناً نخسر بعض البروتينات أو أنها قد تتمسّخ أثناء عملية التنقية.

نحن لا ننتج البروتينات في أنابيب اختبار بل ضمن جملة حية، وهذ الجملة الحية تتغيّر وحتى لو لم تتغير فهي بطبيعتها تنتج العديد من البروتينات وليس البروتين المطلوب لوحده، فهي بحاجة إلى هذه البروتينات للقيام بالعمليات الحيوية والبقاء حية.

ولكن منتجات الخليّة المتنوعة تشكّل عبئاً على عملية التنقية وتزيد من صعوبتها، فالمواد الكيميائية المنتَجة في أنابيب الاختبار تحتاج إلى تنقية ولكن تنقيتها أسهل فيما لو تمّ إنتاجها ضمن منظومة حيّة، عندها ستزداد التنقية صعوبة.

إذاً، عملية التنقية عملية صعبة وهناك العديد من المشاكل ليس لأن المطلوب تنقيته هو بروتين فقط، بل لأن هذا البروتين يتم إنتاجه ضمن *منظومة حية عالية التعقيد تلوِّث البروتين بمنتجاتها المختلفة.*

3. Complicated detection methods صعوبة التحري عن بنية البروتينات الصحيحة:

Should take care of **conformation** change during processing.

قد يحصل تمسُّخ للبروتينات أثناء عملية الإنتاج

أو قد ترتبط بروتينات أخرى بسبب وجود ألفة بين البروتين المطلوب وبروتين آخر ضمن منظومة التعبير الجيني المستخدمة

مما يؤدي إلى protein-protein interaction وارتباط البروتينات مع بعضها.

فنحن ننتج بروتين بشري باستخدام خلايا غير بشرية (مثلا Insect cells)، وهذه الخلايا تحوي عدد هائل من البروتينات ولا توجد معلومات كافية عنها، فنتفاجأ بأن البروتين المطلوب قد ارتبط ببروتين آخر من بروتينات الخلايا المستخدمة.

عملية فك البروتينات عن بعضها تكون صعبة ومكلفة ← نخسر الجدوى الاقتصادية، لذلك يتم تغيير المنظومة المستخدمة لإنتاج البروتين، من جهة أُخرى يجب التأكد أن هذا البروتين قد احتفظ بوظيفته (فعّال) ولم يفقدها.

4. Unstable البروتينات غير ثابتة:

Held by weak forces and easily destroyed in vitro and in vivo.

تتعرَّض البروتينات للتخرُّب بسهولة في الزجاج وفي الجملة الحيّة فهي ذات روابط ضعيفة ← يجب مراقبتها والتأكُّد من عدم حصول تسمُّخ وأن المنتج النهائي في حالة جيدة.

5. Difficult to formulate for large scale purposes:
Reproducibility is a challenge

صعوبة إنتاج البروتينات صناعياً بكميات كبيرة بالإضافة إلى صعوبة إعادة إنتاج هذه البروتينات بشكل مشابه تماماً في كل مرة.

6. Mostly delivered parenterally:

Contamination is a serious issue.
Difficult to protect from proteases when given orally.

- لا نستطيع حمايتها من أنزيمات البروتياز عند إعطائها فموياً لذلك فإنَّ ← الحقن هو الطريقة الأشيع لإتيانها.

- إنَّ إعطاءها حقناً يعني أن تكون بشكل محاليل وكما نعلم أن المحاليل بشكل عام منخفضة الثباتية ومعرَّضة للتلوُّث، وتلوُّث المحاليل الحقنيّة يُعَدُّ مصيبة.

طالما يتم العمل على منظومات حية ← هنالك العديد من الأمور التي يجب مراقبتها، ومهما تمَّ اتباع البروتوكول بدقة لابد من ظهور مفاجآت.

Contamination الملوثات

يمكن لمستحضرات البروتينات أن تحتوي على العديد من الملوِّثات والتي يمكن تقسيمها إلى:

ملوثات خاصة بالخلايا المضيفة host related

ملوثات خاصة بالمنتج product related

ملوثات متعلِّقة بعمليتي التحضير والتنقية process related.

Host Related	Product Related	Process Related
Viruses, Bacteria	acid substitution Amino or deletion	Growth medium components
Host-derived proteins and DNA	Denatured protein نتيجة طي غير صحيح للبروتين	Purification reagents
Glycosylation variants	Conformational isomer	Metals
N- and C-terminal variants اختلاف بأول وآخر حمض أميني	Dimers and aggregates	Column materials
Endotoxin	Disulfied pairing variants Protein fragments	

أولاً: Host Related

Viruses, Bacteria

عند استخدام خلايا الثدييات نخاف من التلوث بالفيروسات، بينما عند استخدام البكتريا نخاف من التلوُّث بالبكتريا نفسها أو حتى من الذيفانات التي تُفرزُها[1].

Host-derived or related proteins and DNA

ونحن هنا أمان مفهوم الأمان الحيوي Biosaftey

من الأرشيف:

بمعنى أننا نحضِّر البروتين المطلوب ولكن لا ننسى أن الخلية ستصنع العديد من البروتينات الأُخرى، وأيضاً هناك احتمال لتلوث البروتين بـ DNA الخلية سواء كانت بكتريا أو خطوط خلوية سرطانية، ففي البكتريا كما ذكرنا الخلايا غير قادرة على إفراز البروتين وبالتالي نلجأ لتحطيم الخلايا فتخرج كل مكوناتها ومنها الـDNA الذي يمكن أن يلوث المُنتج

- يتم الحصول على الخطوط الخلوية الخالدة immortal cell lines عن طريق تثبيط الجينات الكابحة للورم tumor suppressing genes كإحداث طفرة بالجينة المرمِّزة للبروتين P53 فتصبح الخليَّة سرطانيّة.

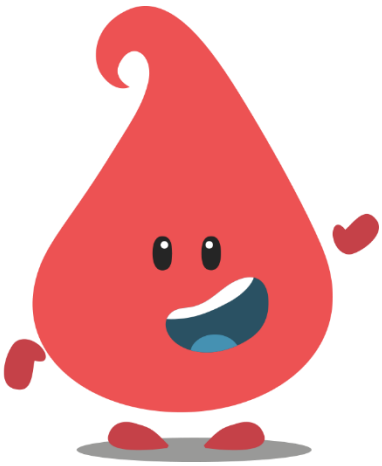
P53 من البروتينات الكابحة للأورام والمنظِّمة للدورة الخلويَّة Cell Cycle

← إن وُجِدَت طفرة به ستنقسم الخليَّة بشكل عشوائي وهذا ما أريده طبعاً عند تحضير الخطوط الخلويَّة السرطانيّة، فبانقسامها ستكون عمليَّة إنتاج البروتين مستمرَّة، إلا أننا الآن سنكون أمام مخاطر لم تكُن بالحُسبان !!!!

قد تموت بعض الخلايا وبالتالي يخرج الـ DNA منها، عندها من الممكن أن تبقى قطعة من الـ DNA في المحلول البروتيني الذي أُنتِجَهُ

وبفرض أن هذه القطعة هي ذاتها القطعة التي قمت بتطفيرها، إذاً هل من الممكن يا ترى عند حقن هذا المحلول البروتيني أن تدخل تلك القطعة على خلايا المريض وتتداخل في حمضه النووي intervation؟؟؟

[1] بحالة الجراثيم إيجابيّة الغرام.



هذه التساؤلات يجب أن تكون واردة بالرُّغم من أنَّ احتمال تحقُّقها جداً ضئيل..

Glycosylation variants

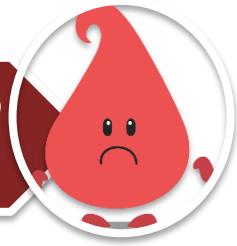
فكما رأينا أنه في حال تمَّ إنتاج البروتين في الخمائر Yeast ستكون عملية الغلكزة مختلفة عن الخلايا الثديية وبالتالي ***هل سيؤثّر ذلك على الفعاليّة أم لا*** ؟؟

من الأرشيف

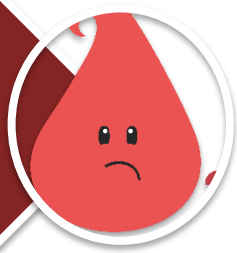
مثلاً في طبخة معينة لبروتين ما يحتوي على 5 مواقع غلكزة، سنجد أن 70٪ تمت عملية الغلكزة في الموقع الخامس، وفي طبخة أخرى 70٪ في الموقع الثالث، فإذا كانت الغلكزة هامة للتأثير الدوائي، فيجب أن يكون هناك طريقة لمعايرة البروتين الناتج لضبط الفعالية العلاجية.

الاختلاف بأول وآخر حمض أميني N- and C-terminal variants

من الممكن حصول تفكيك لبعض الحموض الأمينية في كل من النهايتين.



ذلك يتمُّ بأن تقوم أنزيمات البروتياز proteases بتفكيك البروتين إما من C-terminal أو من N-terminal وفي كلتا الحالتين سينتُج ما يُسمَّى بـِ Truncated protein أي بروتين مبتور أو مقطوع وبالطبع فإنَّ ذلك قد يؤثّر على الوظيفة والفعاليّة.



Endotoxin

كما ذكرنا يتمُّ إنتاجها في البكتيريا وتعدُّ ملوِّث لمحاليل البروتينات.

ثانياً: Product Related

Amino acid substitution or deletion

هل حدث في Substitution أي استبدال خلال إنتاج البروتين؟؟

؟

بمعنى آخر هل أثَّرت تلك الخطوط الخلويَّة (سواء أكانت خلايا ثديية أم بكتيريا) على هذه المورّثة؟؟

طبعاً الاستبدال يكون على مورّثة البروتين بحدّ ذاتها فيجب أن آخذ بعين الاعتبار إمكانيَّة حدوث طفرة على هذه المورّثة...

يجب أن نأخذ هذا الأمر بعين الاعتبار دائماً وبشكلٍ خاص في حال كانت الخطوط الخلويَّة خلايا سرطانيَّة

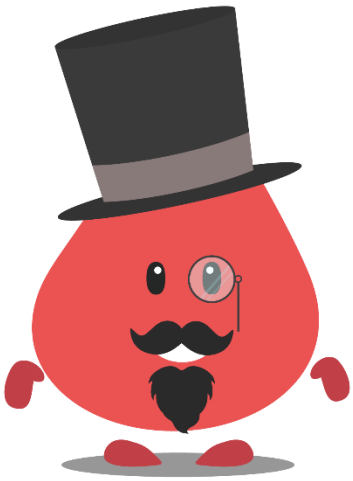
في حال كانت الخلايا طبيعيّة فإنها ستمرُّ أثناء درتها الخلويَّة بالطور G2 والذي تقوم به بمراقبة الانقسام والقيام بالتصحيحات في حال حدثت طفرة ثم تنتقل بعدها لطور الانقسام...

في حالة الخلايا السرطانية ستكون دورتها الخُلويَّة غير مضبوطة والطور G2 سيكون قصيراً، لأن هدفها الرئيسيّ هو الانقسام بغض النظر عن عدد الطفرات الموجودة...وبالتالي فإنّ احتمال أن تُحدِثَ طفرة بمورّثة البروتين الذي أُنتِجُهُ سيكون كبيراً.....هنا نحتاج لمراقبة دقيقة جداً.

Conformational isomer المحاكيات الفراغيّة

تعني وجود محاكيات للبروتين المطلوب ولكنها غير فعالة.

Dimers and aggregates (تعداد فقط)



Disulfide pairing variants

مثلاً بروتين يحوي على أكثر من ثمالة سيسيتئين في شروط معينة قد ترتبط هذه الثمالات مع بعضها بروابط ثنائيَّة الكبريت بشكل يعطل عمل البروتين.

من ناحيةٍ أخرى نحن نعلمُ أن خلايانا تقوم بإنتاج البروتينات وفق نظامٍ مضبوط، فعلى سبيل المثال تقوم الشابيرونات بإجبار البروتين على التشكُّل بشكلٍ فراغيٍّ معيَّن (ذلك يتضمَّن تشكُّل روابط ثنائيَّة الكبريت بمواضع معيَّنة أو عدم تشكُّلِها)...

حين أقوم بإنتاج هذا البروتين بمنظومةٍ مختلفة (سواء كانت خمائر أو بكتيريا أو حتى خلايا ثديية) فهل سيكون للبروتين الناتج نفس وظيفة البروتين المُنتَج في خلايانا؟؟؟؟ ليس من الضروريّ ذلك طبعاً.

ثالثاً: Process Related

Growth medium components

عند إنتاج البروتينات في منظومة معيَّنة فيجب أن أُضيف عوامل نمو Growth factors وبالنهاية فإنَّ عوامل النموّ هذه تُعتَبر من الشوائب مهما كان مصدرها...

إنَّ الشركات العالميَّة عند إنتاجها للبروتينات لا تضيف مصل كامل Serum للخطوط الخلويَّة المُنتِجَة بل إنَّها تعمدُ لإضافة عوامل النموّ فقط بالرُّغم من غلاء ثمنها، وإنَّ عوامل النموّ التي نضيفها هنا هي في الحقيقة بروتينات مأشوبة، إلّا أن تركيزها قليل لذلك لا تشكّل خطراً.

أما المصل فإننا نأخذه من جنين البقرة ونقوم بتنقيته وفلترته ثمَّ نضيفه وبالتالي فإنَّ عوامل النموّ الموجودة في هذا المصل تُعتَبرُ من الملوّثات وكذلك لا ننسى عدد البروتينات الموجودة في ذلك المصل.

Purification reagents الكواشف المُستخدَمة (تعداد فقط)

المعادن Metals

بالطبع تحتاج الخلايا وسطاً كاملاً حاوياً على جميع عوامل النموّ والمعادن لكي تنمو.

Column materials (تعداد فقط)

تنقية البروتينات Protein purification

من الأرشيف الظريف

يعد من أهم التحديات التي تواجهنا أثناء تصنيع الأدوية البيولوجية وقبل البدء بهذه العملية يجب أن يكون لدينا معلومات كاملة عن البروتين المرغوب بتنقيته بالإضافة لمعرفة ماهي البروتينات التي من الممكن أن تشوبه، ولذلك لفصله وتنقيته بشكل جيد مع الحفاظ على بنيته وفعاليته.

فمثلاً عند استخدام الاستشراب المبادل للشوارد IEC يجب أن نحسب شحنة البروتين الكلية (تتعلق بنوع الأحماض الأمينية المشكلة للبروتين، وهل هي على سطح البروتين أم معزولة ضمن بنية) بالإضافة إلى PH الوسط وذلك بمعرفة هل هذا البروتين أقرب للشحنة الموجبة أو السالبة وما هو العمود الذي نحتاج استخدامه.

أهم طرق تنقية البروتينات methods of protein purification:

1. طحن/سحق الخلايا Grinding of cells والتثبيت التفاضلي Differential Centrifugation.

سنضطرُّ لسحق الخلايا في حال كانت تلك الخلايا غير مُفرزَة للبروتين الذي ننتُجِهُ بها ← نطحن الخلايا لتخريب الغشاء الخلوي ← نطبّق طرق التنقية.

2. الترسيب بالملح Salting out والترسيب بالمحل Solvent precipitation:

3. الاستشراب على العمود Column Chromatography:

- الاستشراب بالاستبعاد الحجمي Size Exculusion Chromatography (Gel Chromatography) (SEC).
- الاستشراب المبادل للشوارد Ion Exchange Chromatography (IEC).

الاستشراب بالألفة Affinity Chromatography:

الارتباط بضد البروتين المدمج + الارتباط بالضد أو اللجين

4. طرق أُخرى:

Iso Electric Focusing (IEF)
التبئير متساوي الشحنة (البأر متساوي التكهرب)

+

الرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد 2D Gel Electrophoresis.

غالباً نحتاج أكثر من طريقة للحصول على البروتين موضع الاهتمام بشكل نقي، حيث لا يمكن أن نحصل على نقاوة عالية باستخدام طريقة واحدة.

لا يمكن الحصول على بروتين نقي 100% حتماً ستبقى بعض الشوائب (DNAأو RNA أو معادن) ولكن هناك حدود معينة maximum limit يجب ألا تتجاوزها.

تعتمد طرق تنقية البروتين السابقة على كون البروتين مُفرَزاً خارج الخلايا أو بروتين داخل الخلايا، حراً أو مرتبطاً بالأغشية الخلوية

1. إذا كان البروتين مفرزاً خارج الخلايا:

- وهي الحالة الأسهل، فيُمكن جمع السائل الطافي حول الخلايا والشروع بعمليات تنقية البروتين.
- تكون الخلايا مزروعة ضمن فلاسكات وملتصقة بقاعدتها ← نقوم بإمالة الفلاسك ونسحب السائل الطافي ← نعيد تجديد الوسط للخلايا لتُنتج بروتينات من جديد.

أرشيف

الوسط في هذه الحالة (صناعياً) لا يوجد فيه Fetal Bovine Serum (FBS) وذلك لأن ما يهمنا هو إنتاج الخلايا للبروتين المطلوب، أما في حال إضافة عوامل نمو تحرّض الانقسام فالخلايا ستنشغل بتضاعف الDNA وتحضير بروتينات الانقسام.

أرشيف

كما أن FBS تحوي على العديد من البروتينات التي قد تشوب البروتين الهدف وتصعب علمية التنقية.

هنا نتكلم عن فلاسكات صغيرة أو طبق بتري ولكن حقيقة تستخدم حاويات ضخمة قد تكون كمية السائل الطافي أكثر من 500 لتر ولكن المبدأ نفسه.

من الأرشيييييف:

يوجد خلايا ملتصقة وخلايا غير ملتصقة، نستخدم هذه الأخيرة غالباً في المُخمّرات فتكون عملية إنتاج البروتين صعبة.

لأنه لا بد من تثفيل الخلايا أولاً، ثم نقوم بأخذ السائل الطافي والتثفيل المتكرر قد يؤذي الخلايا.

إلا أن استخدام هذه الخلايا في المُخمّر مهم بسبب المدة الطويلة لعملية التخمير وبالتالي يجب أن تكون الخلايا متحركة بشكل مستمر بحيث يتم تجديد الأوكسجين والمواد المغذية لها.

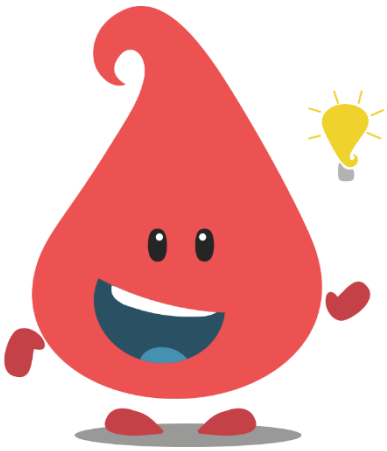
لا يمكن استخدام الخلايا الملتصقة أبداً في المُخمرات لأننا نريد إنتاج كبير، بينما الخلايا الملتصقة ستلتصق بالأسفل وهي فقط التي ستقوم بالإنتاج.

-يمكن تحويل الخلايا الملتصقة إلى خلايا غير ملتصقة من خلال منعها من الالتصاق (استخدام مواد بلاستيكية مُعالجة بشكل يمنع التصاق الخلايا عليها وهي غالية الثمن) وتُنتج البروتين بشكل طبيعي مع تطبيق بعض الشروط الخاصة.

-نستخدم على النطاق البحثي الخلايا الملتصقة كون التعامل معها أسهل ولا تكون الغاية إنتاج كميات كبيرة من البروتين.

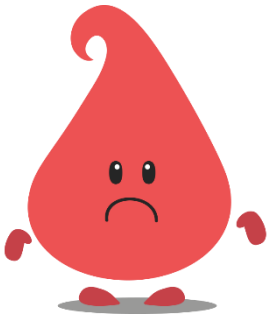
-معظم الخلايا السرطانية المعزولة تعيش ملتصقة في المخبر على الرغم من أن طبيعتها هي كتلة ورمية ثلاثية الأبعاد ويمكن السماح لها بتشكيل هذه البنية باستخدام المواد البلاستيكية التي تحدثنا عنها.

2. إذا كان البروتين داخل الخلايا:



معظم البروتينات المنتجة بالبكتريا تبقى داخل الخلايا، لذلك تكون هناك حاجة لتحطيم جدار الخلية (مما يؤدي إلى خروج كل محتوى الخلية وبالتالي ستكون التنقية أصعب)، والقيام على الأغلب بعملية التنبيذ التفاضلي لفصل مكونات الخلايا والحصول على السيتوبلازما الخلوية الحاوية على البروتين الحر (المنحل في السيتوبلازما).

3. أما إذا كان البروتين غشائياً:



أي داخل الخلايا ومرتبط بالغشاء (وهي الحالة الأصعب).

لكن يمكن تحريره:

- باستعمال عوامل التوتر السطحي
- أو إنزيمات وتراكيز ملحية مختلفة

غالباً هذه البروتينات الغشائية تكون مواضيع بحثية؛ ولا يوجد إلى الآن دواء بروتيني أصله بروتين غشائي، فالبروتينات الغشائية بالنسبة لنا هي مستقبلات الأدوية وليست أدوية بحد ذاتها وهذا من حسن حظنا!!!!!

لأن تنقية البروتين الغشائي وسحبه من الغشاء أمر صعب جداً.

أيضاً من الصعب الحفاظ على فعاليته بعد التنقية، فالبروتين الغشائي يكون مندمجاً ضمن الغشاء ويملك طرفين:

- طرف محب للدسم (ضمن الغشاء)
- وطرف محب للماء (يمتد إلى خارج الخلية)
- وإذا كان البروتين عابر للغشاء سيمتلك طرف ثالث محب للماء ضمن الخلية

عندما ننزع هذا البروتين؛ سنريد تحويله في النهاية إلى محلول، وبالتالي سنغير بيئته ***وسيتغير تطوّي البروتين مما يؤدي إلى تخرُّبه وتمسخه***.

يمكن *تحطيم* الخلايا بأحد الطرق التالية

أولاً: تحطيم الجدار الخلوية بطرق فيزيائية (إذا كانت منظومة التعبير الجيني خلايا نباتية حيث يكون لها جدار خلوي قاسٍ) مثل:

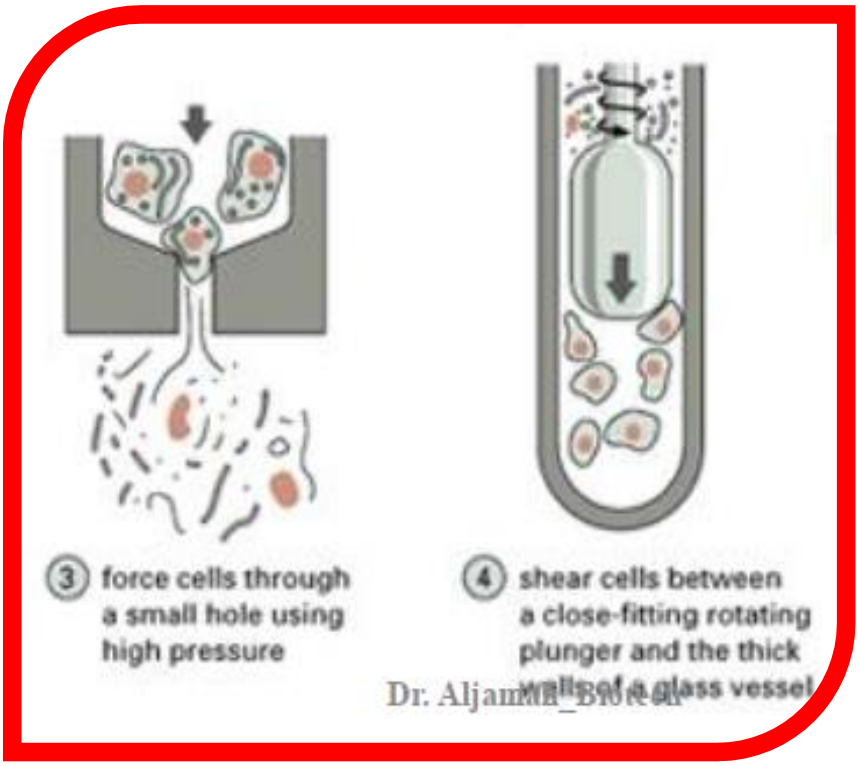
أولاً: الطحن Grinding:

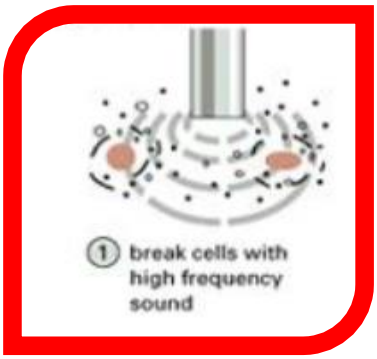
كالطحن في جهاز له مكبس.

ثانياً: عبر تمرير الخلايا عبر مسامات دقيقة بوجود ضغط.

كسيرنغات ذات رؤوس مختلفة الأحجام.

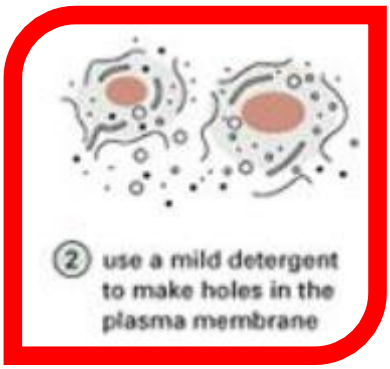
تنويه: هنا نتكلم عن نطاق **ضيق** وتكون الأدوات المستخدمة عند الإنتاج على نطاق واسع مشابهة ولكن بأحجام أكبر.





ثانياً: استخدام تواترات لأمواج فوق صوتية Ultrasound frequencies (ultrasonication)

لا يؤثر استخدامها على البروتينات (لا يخرِّبها).



ثالثاً: استخدام عوامل فعالة على السطح

تقوم هذه العوامل بتفكيك طبقة الغشاء البلازمي.

يجب الحذر من تخريب العوامل السطحية للبروتينات أيضاً وغالباً تستخدم لخلايا الثدييات التي تكون هشة فهي لا تملك جدار خلوي بل غشاء خلوي فقط.

رابعاً: دورات من التجميد والإذابة Freeze-thaw cycles

بشكلٍ عام سنحصل بالنهاية على السيتوبلازما وكل ما فيها من عضيَّات خلوية ومواد ولكن ما يهمنا هو القسم المنحل، وهنا نلجأ إلى طرق التنقية للحصول على البروتين الهدف.

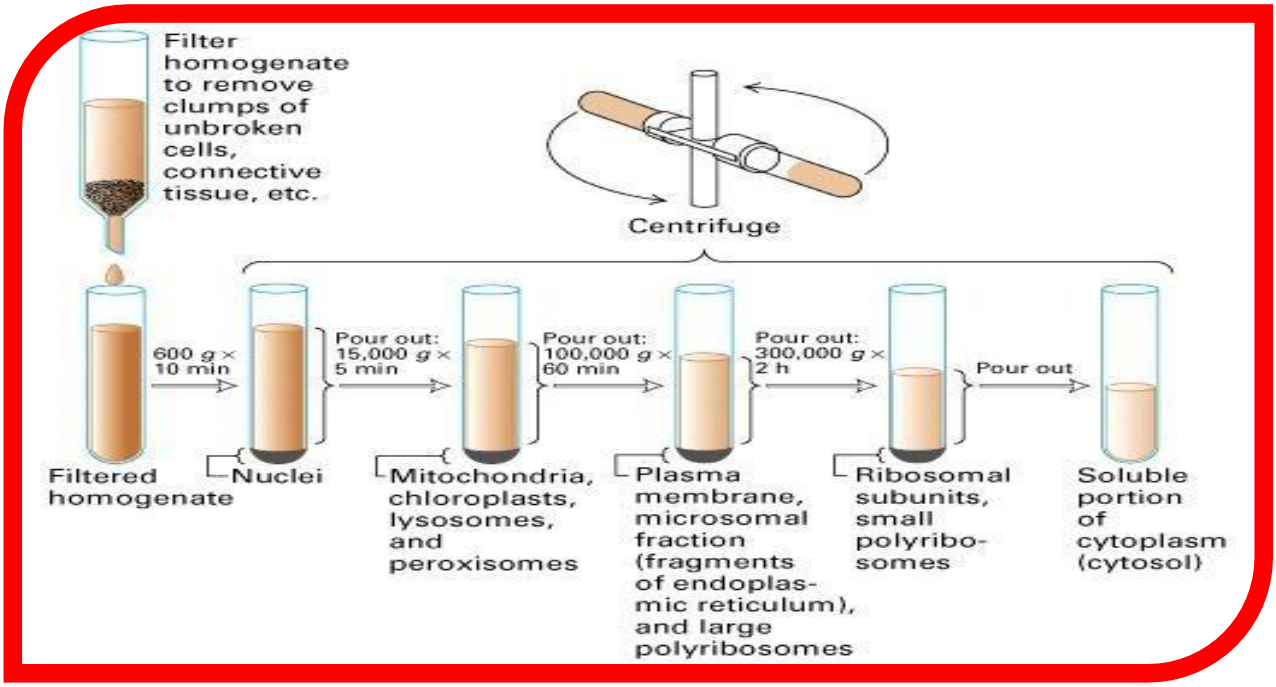
طرق تنقية البروتينات

أولاً: التنبيذ التفاضلي Differential Centrifugation

بعد تحطيم (**طحن**) الخلايا يتمّ فصل مكونات الخلية بواسطة التنبيذ التفاضلي الذي يفصل مكونات الخلية (جهاز غولجي، النواة...إلخ والتي تكون غير منحلة) حسب اختلاف سرعة ترسبها تبعا لِحجمها وكتلتها وكثافتها، وذلك بهدف الحصول على الهيولى الحاوية على البروتين المنحل فقط.

يتم التثفيل باستخدام سرعات متزايدة، ونلجأ للتخلص من العضيّات الخلوية خاصةً إذا كنا ننقي بروتين ناتج عن خلايا حقيقية النوى التي تحوي الكثير من المتعضيات (ميتوكوندريا، شبكة إندوبلازمية...) بينما البكتريا لا تملك كل هذه المتعضيات فيكون تنقيتها وتثفيلها أسهل، ونحصل بالنهاية على البروتينات منحلة دون وجود شوائب

ملاحظة: لا يوجد خطوة واحدة تعزل البروتين عن كل مكونات الخلية، بل هنالك العديد من الخطوات التي يجب القيام بها تدريجياً حتى نصل للبورتين الهدف.



تابعوا معنا في الصورة:

- نقوم أولاً بترشيح المعلق الذي يحتوي الخلايا المطحونة، وذلك لإزالة الأجزاء الصلبة والخلايا غير المتكسرة والأنسجة الضامة ← نحصل على رشاحة متجانسة filtered homogenate.

طبعاً لا تزال هذه الرشاحة تحوي الكثير من المتعضيات الخلوية التي تكون أحجامها صغيرة بحدود الميكرون وبالتالي لا تنفصل بالترشيح.

- نبدأ التثفيل بسرعة منخفضة نسبياً حوالي g600 (ثُقالة)[2] لمدة 10 دقائق ← تترسَّب نوى Nuclei الخلايا (لأنها كبيرة الحجم وذات كثافة عالية).
- نأخذ السائل الطافي ونثفل بسرعة g 15000 لمدة 5 دقائق ← ترسُّب مايلي:

[2] تُقاس سرعة التثفيل بواحدتين: دورة بالثانية Round Per Minute (RPM) أو ثُقالة Relative Centrifugal Force (RCF or g)، ويمكن التحويل بين الواحدتين باستخدام قوانين خاصة، وتكون الRCF هي الواحدة المتعارف عليها في الأبحاث وكل ما يتم نشره، بسبب اختلاف المثفلات في أقطارها وبالتالي 1000 دورة بالدقيقة في مثفلة ستختلف عن 1000 دورة في مثفلة أخرى، أما الRCF ثابتة.

الميتوكوندريا + وصانعات اليخضور chloroplasts (بالخلايا النباتية) + والليزوزومات + والبيروكسيزومات

هذه المتعضيات أقل كثافة من النواة

- نأخذ السائل الطافي ونثفل بسرعة 100,000 g لمدة ساعة (هنا نكون قد بدأنا بالتثفيل الفائق ultracentrifugation ويجب الانتباه الى موازنة الأنابيب بشكل دقيق جداً) ← ترسب مايلي (تابعوا بالمستطيل عاليسار):

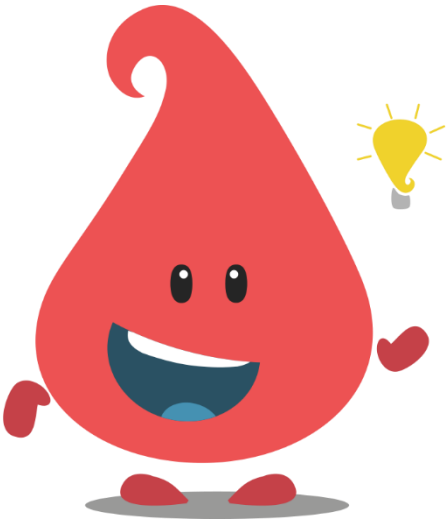
- الأغشية السيتوبلازمية.
- الأجزاء الصغرويّة microsomal fractions مثل الغشاء الإندوبلازمي.
- الأجزاء الكبيرة من الريبوزومات وجهاز غولجي.

- نأخذ السائل الطافي ونثفل بسرعة 300,000 g لمدة ساعتين، مما يؤدي على ترسب الوحيدات الريبوزومية الصغيرة Ribosomal Subunites (وهي أصغر ما في الخلية والأقل كثافة).

هنا نكون قد رسّبنا كل المتعضيات الخلوية.

- يُفصَل السائل الطافي بعد هذه المرحلة ويكون حاوي على ←←←

ملاحظة: في بعض البروتوكولات يُكتفى بالتثفيل بسرعة 100,000 g.



وهناك سؤال يطرح نفسه: لماذا لا نبدأ التثفيل على سرعة 300,000 g عوضاً عن اللجوء إلى المراحل السابقة كلها؟

الأمر متعلق بتقنيّة التثفيل الفائق بحدِّ ذاتها، فهي حساسة جداً لأي تغيّر في توزع الجزيئات ضمن المحلول، وبالتالي في حال وجود أجزاء كبيرة من النواة وعضيات الخلية فإن هذه المثفلات لن تعمل أساساً، حيث أن سرعة 300.000 g تُعتَبَر من السرعات الفائقة، وعند التثفيل بهذه السرعة مباشرة فإن الجزيئات الكبيرة في الخلية ((مثل النواة)) سيحصل لها عملية تسريع، أي ستتحرك بسرعة كبيرة جداً مثل الطلقة بدلاً من أن تترسب، ومن جهة أُخرى فإن المثفلات لا تعمل بسرعات عالية مباشرةً بل تنتقل تدريجياً بين السرعات.

- في مخبرنا عندما كنا نعمل على المثفلات العادية كنا نضطر إلى موازنة الأنابيب بحيث نضعها بشكل متقابل وبأوزان متساوية تقريباً حتى لا تتأثر عملية التثفيل (بعض المثفلات عند عدم موازنتها يضطرب أداؤها وهذا قد يؤدي إلى حوادث مؤلمة عند السرعات العالية)، وبالنسبة للمثفّلات الفائقة يجب الموازنة حتى 0.000001 من الغرام فهي حساسة جداً.

- عدم التوازن قد يسبب العديد من الكوارث، فالدوران بسرعة 100.000 و في حال عدم التوازن قد يسبب تفكك أجزاء المثفلة، وبسرعة 300.000 و قد يحصل انفجار أما حالياً المثفّلات الحديثة لا تعمل أبداً في حال عدم التوازن وتعطي Error.

نلاحظ أنّ التنبيذ التفاضليّ يحتاج لعمليّتيّ التنبيذ الفائق والتنبيذ العادي.

ثانياً: التنبيذ المناطقي Zonal Centrifugation: (هذه الفقرة من الأرشيف ولم يذكرها الدكتور ♥_♥) يعني ***أرشيف***

يُدعى أيضاً التنبيذ بالكثافة Density Centrifugation.

يُمكن استعمال مدروج من تراكيز مادة ما (سكروز أو فيكول) لزيادة نقاوة مكونات الخلية، بحيث يساعد وجود التراكيز المختلفة لتلك المادة على فصل أفضل لتلك المكونات الخلوية اعتماداً على كثافتها، ويُدعى ذلك بالتنبيذ التفاضلي أو التنبيذ بالكثافة.

فهنا نقوم بصب المحلول بتراكيز مختلفة وبالتالي كثافات مختلفة، فنقوم أولاً بصب طبقة ذات كثافة 1.25 غ/ل، ثم نصب طبقة أُخرى ذات كثافة 1.22 غ/ل وهكذا..، وهذا الطبقات لا تختلط مع بعضها إذا لم تترك لفترة طويلة بسبب الاختلاف بالكثافة (بينما إذا تركت لفترة طويلة ستختلط بسبب ظاهرة الانتشار diffusion وتتطلب دقة ومهارة عالية أثناء الصب)، وأخيراً نقوم بصب الرشاحة العضويّة، ونثقّل فتنفصل مكونات الرشاحة حسب كثافتها، فمثلاً كثافة الميتوكوندريا 1.18 غ/ل وبالتالي ستتوضع بين الطبقتين اللتين تملكان الكثافتين 1.19 و1.15، وبالمثل بالنسبة لباقي المكونات.

وبالتالي يتم التخلص من الكثير من العضيات الملوثة للبروتين بهذه الطريقة، وتستخدم هذه الطريقة لأغراض بحثية فقط ولا تستعمل لإنتاج البروتينات على المستوى الصناعي.

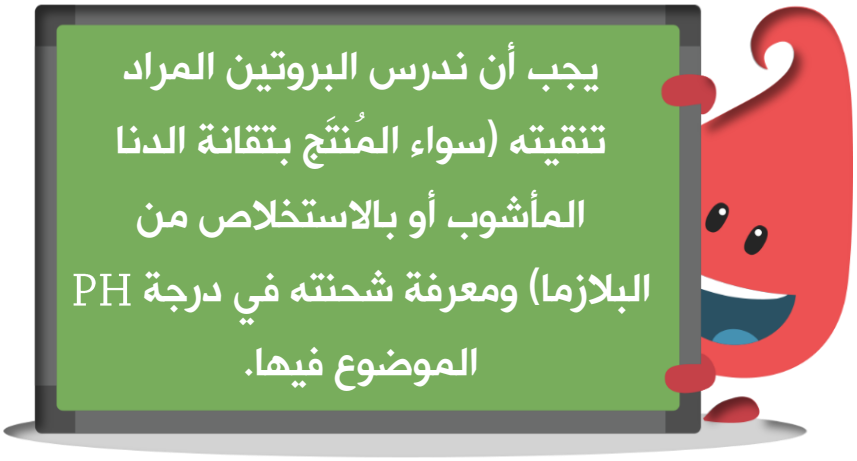
خلصت فقرة الأرشيف 💔 💔 💔 💔 😐

ثالثاً: الترسيب بالملح Salting out:

السائل الطافي الذي حصلنا عليه بعد الانتهاء من عملية التثفيل يحوي العديد من المواد المنحلة وليس البروتين الهدف فقط، وبالإضافة إلى أن حجمه كبير (عدة

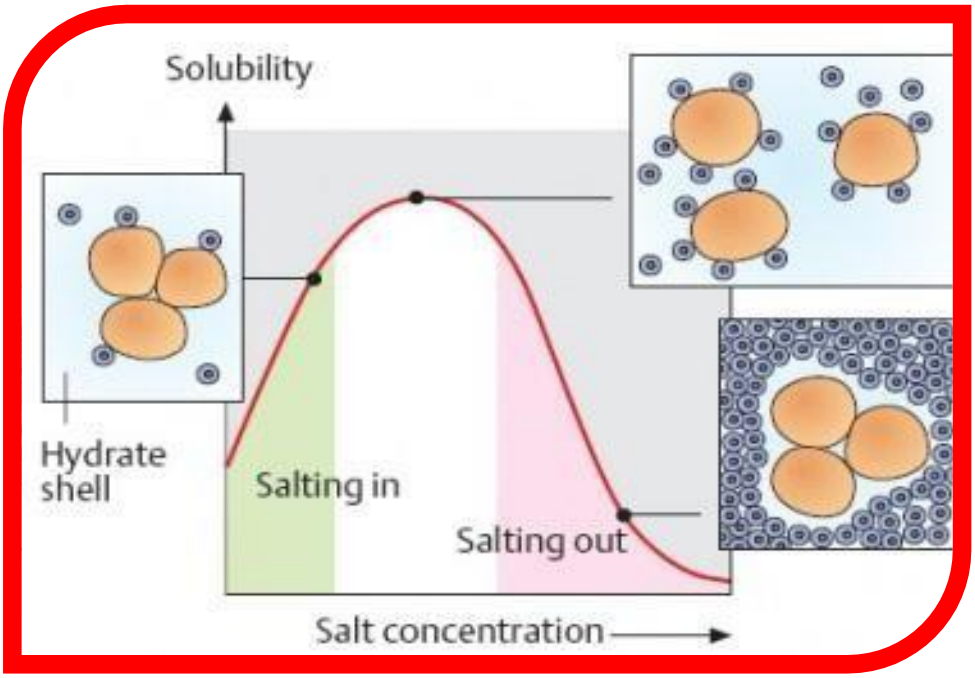
ليترات)، فلترسيب البروتين وفصله عن باقي مكونات السائل نلجأ لطريقة الترسيب بالملح.

مبدأ هذه الطريقة يعتمد على ***إضافة تركيز عالٍ جداً من الشوارد بحيث يتحوَّل البروتين من الشكل المنحلّ إلى الشكل المترسِّب (غير المنحلّ)*** مع مراعاة ألا تسبَّب هذه التراكيز المُرتَفعَة بتمسُّخ البروتين، وهو ما يُسمَّى بالترسيب بالملح Salting out.



الترسيب بسلفات الأمونيوم Ammonium Sulfate Precipitation

بدايةً: إنّ البروتينات في السائل الطافي قد تكون منجذبة لبعضها بسبب اختلاف شحناتها فيمكن أن يترسَّب بعضها، خاصةً إذا كانت التراكيز عالية ولكن معظم البروتينات تكون منحلة.



عند بدء إضافة الملح: ستبعثِر شوارد الملح البروتينات وستعمل كوسيط يساعد على انحلال البروتينات، فهي تحيط بجزيئات البروتين وترتبط به من جهة وبالماء من جهة أُخرى.

وتدعى مرحلة زيادة انحلال البروتين بـ **Salting in**.

وبازدياد تراكيز الملح: سترتبط شوارد الملح مع بعضها ← تحصر جزيئات البروتين ← تترسَّب البروتينات عند تركيز ملحي معيَّن.

وهي مرحلة **Salting out**.

ولكن كيف نفصل البروتينات الهدف عن باقي البروتينات المنحلة؟

✓ إن تركيز الملح اللازم للترسيب والانحلال كله يتعلَّق بنوع البروتين وشحنته.

✓ نحن نعلم بأن البروتينات تختلف بشحنتها فهناك ←

بروتينات تغلب عليها الشحنة الموجبة بسبب غناها بالأرجنين والليزين	
	وبروتينات تغلب عليها الشحنة السالبة بسبب غناها بالغلوتامات والأسبارتات
وبروتينات معتدلة الشحنة neutral.	

وبالتالي في حال اختلاف شحنة البروتين الهدف عن باقي البروتينات من الممكن فصله عنها أي ترسُّب البروتين الهدف مباشرة

تعدُّ طريقة الترسيب بالملح من أكثر وأرخص الطرق استخداماً في تنقية البروتين وتجرى عادة مع التبريد لمنع تمسّخ البروتينات.

عبر تعديل تركيز الملح المستخدم في المحلول الحاوي على خليط من البروتينات إلى النقطة التي *تسبق* تماماً *التركيز الذي يترسب عنده البروتين* المرغوب تنقيته ← يمكننا بذلك التخلُّص من العديد من البروتينات التي تُشوب محلول البروتين.

تكون هذه البروتينات مدروسة ومعروفة مسبقاً مع شحنتها، (فمثلاً البروتينات الملوثة في حال البكتريا مختلفة عنها في حال الخمائر).

أي نرسّب البروتينات الملوثة وتزيلها ثم نرسّب الهدف.

يُمكن بعدها جمع وإزالة الراسب (الحاوي على البروتينات الأُخرى) عبر الترشيح Filtration أو التنبيذ، وعندها يمكن زيادة تركيز الملح لترسيب البروتين المرغوب نفسه وطبعاً بحيث لا يتخرب هذا البروتين، وبعدها نحل البروتين الهدف في محل مناسب فنحصل على محلول نقي ومركز ولكن النقاوة ليست 100%.

يعد ملح سلفات الأمونيوم من أكثر الأملاح شيوعاً حيث يملك خاصتين رئيستين هما:

1) انحلالية عالية تصل حتى 3.9 مول/ل في الماء بالدرجة 0 مئوية، نلاحظ أن التركيز المستخدم عالي ولكن بسبب الانحلالية العالية له لا يترسب.

2) قوة شاردية عالية في المحلول (ضرورية لمرحلتي Salting in وSalting out) تصل إلى 23.5 في الماء بالدرجة 0 مئوية، بمعنى أنه قادر على إعطاء الكثير من الشوارد التي ترتبط مع بعضها وترسّب البروتين.

يجب الانتباه إلى أنه يمكن لشوارد أُخرى مثل Ca_2, Mg_2^+, Li^+, I^- Ba^+ أن تزيد من انحلال البروتينات بدلاً من أن تُنقِصه، في النهاية سنصل لمرحلة يترسب عندها البروتين ولكن غالباً تؤدي إلى تمسخ البروتينات، وبالتالي لا يمكن استخدام جميع الأملاح للترسيب.

أمثلة:

1. مثال أول:

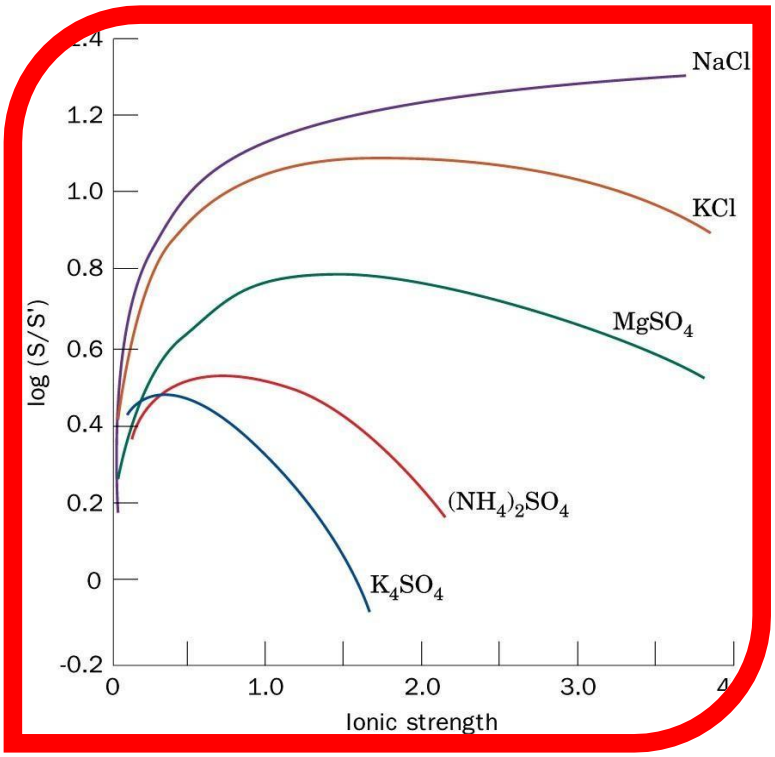
لاحظ الشكل في الصفحة التالية:

تم إجراء هذه التجربة بهدف معرفة أي الأملاح هي الأكثر ملائمة للكربوكسي هيموغولبين والذي يُخلصنا من أغلب الشوارد والبروتينات.

Log(s/s'): هي لوغاريتم الجزء المنحل من البروتين على كامل كمية البروتين.

وكلما زاد ← زادت الانحلالية.

نلاحظ عند:



استخدام كلوريد الصوديوم أن انحلال البروتين يستمر بالزيادة لأن ملح كلور الصوديوم يمتلك قوة شاردية كبيرة جداً) وبالتالي لا فائدة من استخدامه لترسيب الكربوكسي هيموغلوبين لأننا سنبقى ضمن مرحلة Salting in.

كلوريد البوتاسيوم أو كبريتات المغنزيوم لن ترسب بالشكل المطلوب وسيبقى قسم كبير من البروتين بشكل منحل بسبب القوة الشاردية العالية جداً.

نلاحظ أن كبريتات الأمونيوم أكثر ملائمة للترسيب، حيث أنه يصل بسرعة لمرحلة Salting out وهناك مدى جيد لترسب البروتينات الأُخرى وفصلها قبل ترسب البروتين الهدف.

أما كبريتات البوتاسيوم فترسب أكثر من اللازم وبالتالي قد تترسب كثير من البروتينات الأخُرى مع الكربوكسي هيموغلوبين ولن نحصل على تنقية جيدة.

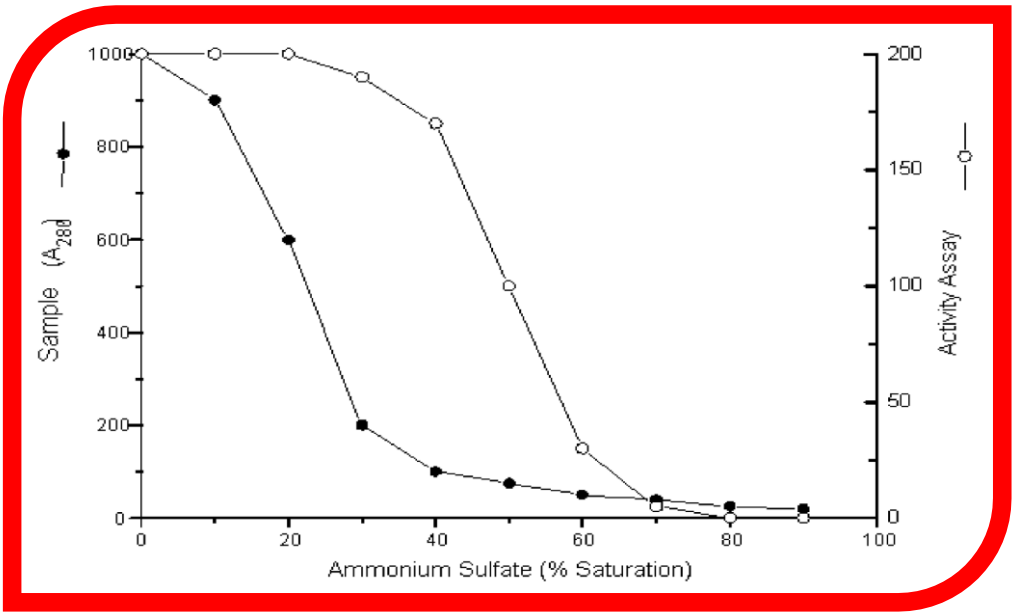
2. مثال ثاني:

يبين الشكل في الصفحة التالية قدرة فصل البروتين المرغوب تنقيته عن باقي البروتينات المنحلة عند *زيادة* تركيز سلفات الأمونيوم.

يُقاس تركيز البروتين الكلي بقياس الامتصاص عند طول موجة 280 نم "A280".

تقاس فعالية الإنزيم (البروتين) الذي نريد تنقيته بأحد طرق المعايرة.
وذلك في عينة تؤخذ عند كل تركيز من تراكيز ملح سلفات الأمونيوم المستخدم.
ويبيِّن الشكل إمكانيَّة ترسيب (والتخلُّص من) العديد من البروتينات في التراكيز 10-30٪ من الإشباع بالملح مع بقاء البروتين (الإنزيم) المرغوب منحلاً.

Ammonium Sulfate (% saturated) تركيز الملح	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Sample A_{280} امتصاص البروتينات	1000	900	600	300	100	75	50	40	25	20
Activity assay الفعالية(units) الإنزيمية	200	200	200	190	170	100	30	5	0	0



تم رسم النقاط المبينة بالجدول فحصلنا على الشكل البياني التالي:

خلونا نفكلكن طلاسم هالشكل ونشرحلكن شوي عنو

المحور الأيسر يدل على الامتصاص عند طول موجة 280 نانومتر وبالتالي يدل على تركيز البروتين الكلي.

المحور الأيمن يدل على تركيز البروتين الهدف ضمن المحلول، وبما أن هذا البروتين إنزيم فقد قمنا بمعرفة التركيز من خلال قياس الفعالية الإنزيمية بطريقة مناسبة.

نبدأ بالترسيب بتراكيز متزايدة من سلفات الأمونيوم ونأخذ عينات عند كل زيادة تركيز للملح ونقيس فيها مَعلمين هما:

- ✓ **تركيز البروتين الكلي** (قياس الامتصاص عند طول موجة 280 نانومتر) وهو الخط الحاوي على نقط **غامقة**.
- ✓ فعالية الإنزيم (أو تركيز البروتين) المرغوب وهو الخط الحاوي على نقط مفرغة.

نلاحظ عند تركيز 10% من سلفات الأمونيوم كانت الفعالية الإنزيمية 100%، بينما انخفضت تراكيز البروتينات إلى 90%، وبالتالي تخلصنا من 10% من البروتينات التي تشوب الإنزيم (البروتين) المرغوب دون أن نؤثر على فعاليته.

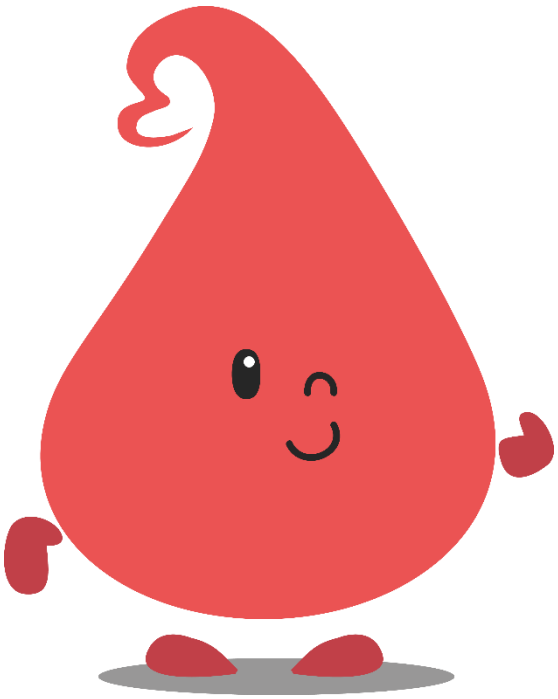
عند تركيز 20% من سلفات الأمونيوم كانت الفعالية الإنزيمية قريبة من 100%، بينما انخفضت تراكيز البروتينات الأخرى إلى 60%، وبالتالي تخلصنا من 40% من البروتينات التي تشوب الإنزيم المرغوب أيضاً دون أن نؤثر على فعاليته (وكميته أيضاً).

عند تركيز 30% من سلفات الأمونيوم بدأنا نفقد القليل من الفعالية الإنزيمية (حوالي 5%)، ولكن انخفضت تراكيز البروتينات إلى 20%، وبالتالي تخلصنا من 80% من البروتينات التي تشوب الإنزيم ولكن فقدنا 5% من البروتين الهدف.

عند تركيز 40% من سلفات الأمونيوم انخفضت تراكيز البروتينات إلى 10%، وبالتالي تخلصنا من 90% من البروتينات التي تشوب الإنزيم.

بعد هذه المرحلة نلاحظ فقدان كبير للفعالية الإنزيمية، بمعنى أن الإنزيم يترسب أو يتخرب بشكل كبير حيث فقدنا تقريباً 15% من البروتين الهدف في هذه المرحلة.

عند تركيز 50٪ من سلفات الأمونيوم يبقى أقل من 10٪ من البروتينات الكلية، وبذلك نكون قد رسبنا حوالي 50٪ من البروتين الهدف، لكن الناحية الإيجابية أننا فقدنا كمية كبيرة (90٪) من الشوائب.



وبالتالي نعتمد إما تركيز 30٪ أو 40٪ من الملح اعتماداً على درجة النقاوة المطلوبة للإنزيم، وفي كلا الحالتين يُعد الترسيب خطوة أولى لتنقية البروتينات الدوائية، فلا يمكن استخدام الترسيب بالملح فقط لإنتاج دواء بروتيني يُعطى حقناً، فهذه الشوائب البروتينية ربما تجد ما ترتبط به ضمن الجسم وتعطي تأثيرات غير مرغوبة، ومع أنها خطوة أولى إلا أنها طريقة سهلة وقويّة تحقِّق درجة جيدة من النقاوة، فعلى الرغم من بساطتها استطاعت تخليصنا من 90٪ من الشوائب البروتينية.

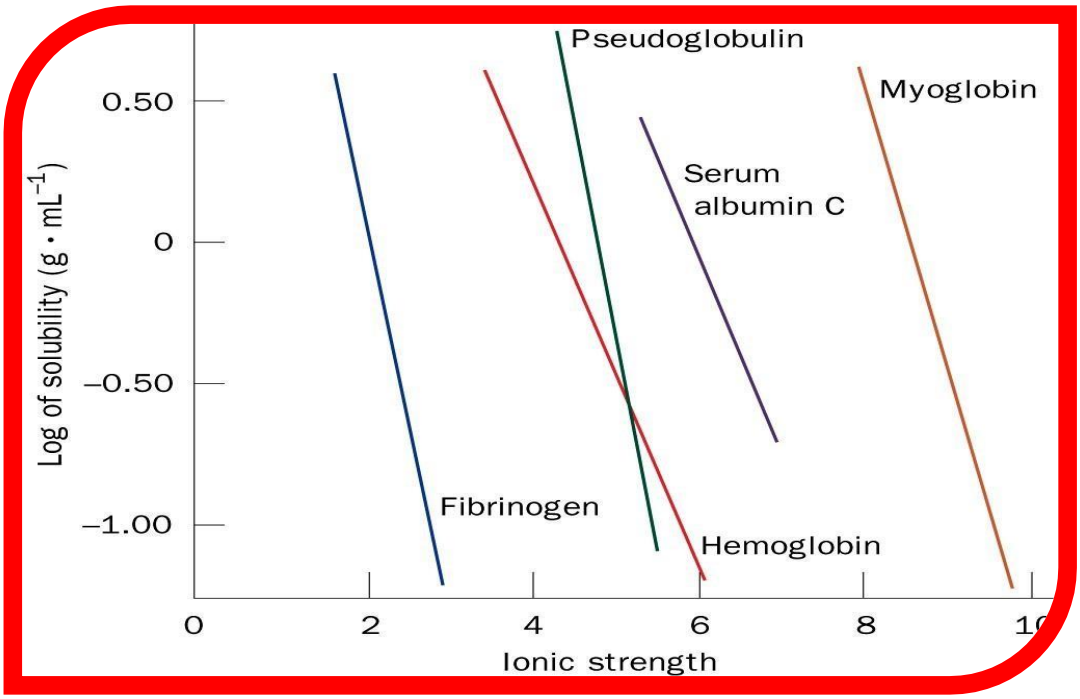
يُفضل تركيز 30% فعند هذا التركيز نكون تخلَّصنا من 80% من الشوائب وخسرنا فقط 5% من البروتين الهدف.

ملاحظة:

هذه العملية لا تُجرى على كامل السائل الطافي بل على عينة منه، وبعد تحديد الملح المناسب والتركيز المناسب نطبق البروتوكول الذي توصلنا إليه على باقي السائل.

3. مثال ثالث: انحلالية العديد من البروتينات في محاليل سلفات الأمونيوم:

يبين الشكل التالي اختلاف تراكيز ملح سلفات الأمونيوم التي تُستخدم لترسيب عدد من البروتينات المختلفة، وذلك تبعاً لشحنة البروتينات وخصائصها الأخرى.



فإذا أردنا تنقية الهيموغلوبين نلاحظ أنه يتطلب قوة شاردية كبيرة حتى يترسب وبالتالي نبدأ بتركيز مرتفع من سلفات الأمونيوم

بينما الفيبرينوجين يترسب بقوة شاردية منخفضة نسبياً فيجب أن نكون حذرين عند تنقيته بالترسيب بسلفات الأمونيوم إذا كانت شوائب البروتينات تُرّسب بقوة شاردية تساوي أو أقل من الفيبرينوجين، أما إذا كانت الشوائب لا تترسب فنستخدم التركيز الملحي الذي يوافق القوة الشاردية لترسيب الفيبرينوجين ونتخلص من السائل الطافي (أي رسبنا فيبرينوجين وتركنا الباقي دون ترسيب).

فلو كان لدينا محلول يحوي البروتينات الخمسة نبدأ بإضافة السلفات تدريجياً حتى نفصل كل بروتين لوحده ويجب الحذر عند فصل الألبومين والسودوغلوبولين، فالتراكيز التي ترسب كل منهما متقاربة لذلك يجب الإضافة بالتدريج.

رابعاً: الترسيب بالمحل (أو بالطور العضوي) Solvent Precipitation:

- يمكن للمحلات العضوية المختلطة بالماء (كالأسيتون والإيتانول) أيضاً أن ترسب البروتين.

وهي الطريقة التي اتبعها *كون* في استخلاص البروتينات من البلازما.

- تعتمد هذه الطريقة على امتلاك هذه المحلات ***ثابتات ثنائية التكهرب*** [3] ***منخفضة*** *low dielectric constants* فهي تخفض القوة الانحلالية لمحاليلها المائية الحاوية على الشوارد المنحلة ← ينخفض بذلك انحلال هذه الشوارد.

كلما كانت قوة المحل على عزل الشوارد عن بعضها كبيرة؛ كانت الثابتة ثنائية التكهرب أعلى.

من الأرشيف ولكن مهم قراءته

عند امتزاج هذه المحلات بالماء فإنها تخفض الثابتة ثنائية التكهرب الخاصة بالماء، فتنخفض قدرة الماء على حل الشوارد وحل البروتينات فتترسب.

الماء له ثابتة تكهرب كبيرة وبالتالي عند وضع ملح في الماء يكون قادراً على فصل شوارد Na^+ عن Cl^- أي يؤدي إلى انحلالها.

أما عند وضع الملح في البنزن أو الإيتانول فنلاحظ أنه يترسب بسبب امتلاك هذه المحلات لثابتة عزل منخفضة غير قادرة على عزل شاردة الصوديوم عن شاردة الكلور في الملح وهي الخاصّة التي اعتمد عليها "كون" في الإيتانول، أي ترتفع الثابتة عند المحلات التي تفصل الشوارد وتنخفض عند المحلات التي لا تفصل الشوارد.

تلعب درجة الـPH دوراً هاماً بالترسيب بالملح والترسيب بالمحل، بسبب اعتماد هذه الطرق على شحنة البروتينات وهذه الشحنة متعلقة بالـPH.

- تستخدم هذه الطريقة أيضاً عند درجات حرارة منخفضة (غالباً 0 درجة مئوية) بسبب:

تبخر المحل عند درجات عالية	وبسبب كونها مُحلات عضوية فهي لا تتجمد عند الدرجة 0 مئوية

[3] ثابتة عزل تمثل قدرة المحل على فصل الشوارد عن بعضها.

- يمكن لهذه الطريقة أن تزيد من الفائدة من طرق الترسيب بالملح (أي نستخدم الطريقتين معاً).

ملاحظة: بعض المحلات العضوية المختلطة بالماء مثل (DMF[4] و DMSO[5]) تكون جيدة في تعظيم *انحلالية* البروتينات (بسبب امتلاكها ثابتات ثنائية التكهرب عالية)، وهذه المحلات قد تستخدم في الأمبولات لزيادة انحلال المادة الدوائية ولكن بتراكيز ضئيلة جداً.

- تملك معظم البروتينات مجموعات متشردة عديدة لها درجات تشرّد حمض/أساس مختلفة PKs.

من الأرشيف:
يملك الحمض الأميني الليزين PKa حوالي 11، الأرجينين أكبر قليلاً من 11، الغلوتامات 4.3، والأسبارتات أعلى قليلاً من الغلوتامات، وذلك ضمن PH الجسم الطبيعية ولكن تختلف هذه القيم في حال كونها ضمن بنية البروتين من الداخل.

تُدعَى النقطة التي تتساوى عندها جميع الشحنات الموجبة والسالبة للجزيء في درجة Ph محددة بنقطة تساوي الشحنة Isoelectrical Point (PI)، ولا يملك عندها البروتين أي شحنة ويكون غير قابل للحركة نحو أي من القطبين السالب أو الموجب إذا ما تعرّض محلول البروتين إلى حقل كهربائي.

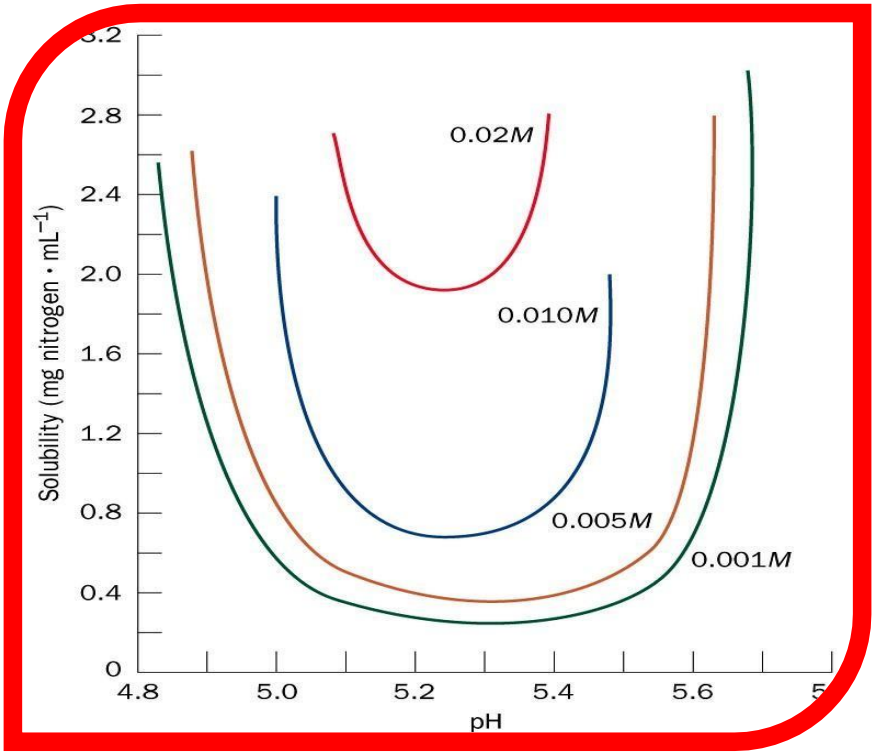
- يتمُّ قياس الشحنة الكُليَّة للبروتين بناءً على محتواه من الحموض الأمينيَّة المشحونة كالليزين والغلوتامات.
- البنية الفراغيَّة للبروتين تؤثِّر على شحنته، فمثلاً لو كان البروتين مؤلَّف من جزء كاره للماء ((داخلي)) وجزء خارجي محب للماء فمن الممكن أن نجد الليزين والغلوتامات متواجدين بالجزء الداخلي للبروتين ((الكاره))، وعندها فإنَّ الجسر

[4] Dimethyl formamide
[5] Dimethyl sulfoxide

الملحي الذي يتشكَّل عادةً بسهولة بين الليزين والغلوتامات (بسبب شحنتيهما المتغايرتين) في الطور المائي لن يتشكَّل في هذه الحالة لأنَّ البيئة الداخليَّة للبروتين كارهة للماء Hydrophobic.

فمثلاً عند وضع NaCl في البنزن فإنَّه سيترسَّب حتماً ولن ينحلّ

وهذا يؤكّد دور البنية الفراغيَّة للبروتين في ظهور الشحنة وليس فقط البنية الأوليَّة (هناك بعض البرامج التي تتنبَّأ بشحنة البروتين بناء على بنيته الفراغية)



وهكذا فإن انحلالية البروتين تتأثر بتغيرات الـPH كما يبدو في الشكل التالي الذي يمثل انحلالية بيتا لاكتوغلوبين -β lactoglobin بفعل درجة الحموضة PH عند تراكيز مختلفة ومنخفضة من ملح كلور الصوديوم NaCl.

✓ المحور Y يمثل *انحلالية* البروتين السابق ذكره، والمحور X يمثل *درجة الـPh*.

نلاحظ أنه عند درجة Ph منخفضة تطغى الشحنات الموجبة على البروتين ويبقى منحلاً Salting in.

مع ارتفاع الـ ph تبدأ الـانحلاليّة solubility بالانخفاض إلى أن نصل لنقطة تساوي الشحنة التي يترسَّبُ عندها البروتين.

مع الاستمرار برفع درجة الـ Ph ستطغى الشحنة السالبة على البروتين وسينحل مرة أخرى.

تتغيّر الانحلالية تبعاً لتغيُّر درجة الـ Ph وتركيز الملح المستَخدَم (كلما اقتربت الـPH من PI يقل الانحلال وكلما ابتعدت عنها يزيد الانحلال)

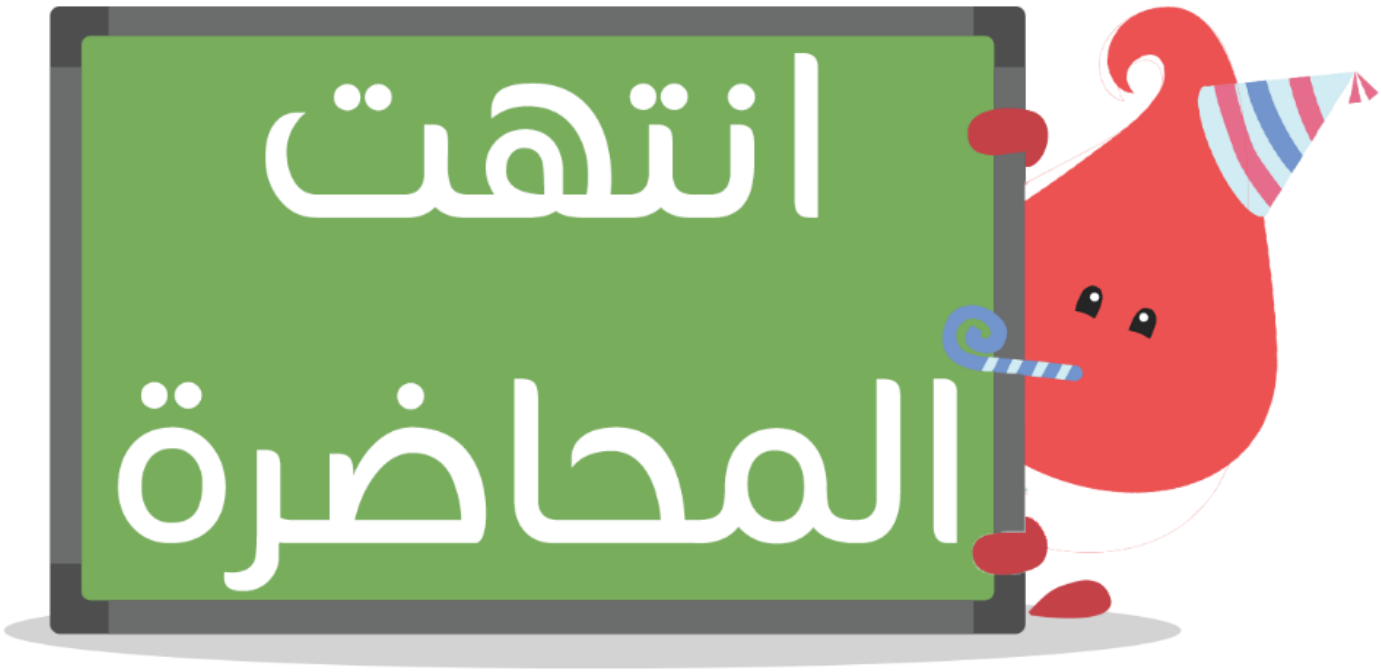
لكن الترسيب يكون عند تساوي الشحنة PI وعندها تكون الـ Ph معيَّنة بصرف النظر عن تركيز الملح المستخدم.

يمكن أن نقوم بعمليَّة التنقية بإحدى الطرق:

- ✓ نرسب البروتين الهدف وباقي البروتينات تكون منحلة.
- ✓ أو نرسب جميع البروتينات ونُبقِي البروتين الهدف منحلّ.

برضو أرشيف

نلاحظ أولاً أن الانحلالية عند استخدام تركيز 0.02M من الملح أعلى من انحلاليته عن استخدام 0.001M لأننا ما زلنا ضمن مرحلة slating in ونلاحظ اختلاف نقطة تساوي الشحنة PI باختلاف التركيز المستخدم من NaCl، حيث تكون عند PH=5.4 عندما نستخدم التركيز الملحي 0.001M، بينما تكون الـPH أقل عند تركيز 0.02M من الملح.



أضف ملاحظاتك :

لإرسال ملاحظاتكم:
goo.gl/forms/Hl8slZEmLSZvySq92

لتحميل محاضراتنا:
www.Rbcsteam.org/lectures

للاستفسار عن هذه المحاضرة على غروب الفريق على الفيس بوك:
RBCs Pharmacy 2019 www.facebook.com/groups/rbcs2019