استخلاص و تنقية بروتين سي الفعال و دراسة تأثير المعادن و درجة الحرارة و الرقم الهيدروجيني على عملية ارتباطه باضداده المحمولة على حبيبات اللاتكس

حسن مجيد رشيد* ، أليس كريكور ملكونيان** و لينة عبد الكريم*
* قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.
** قسم التقنيات الاحيائية ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.
Hassan_bio79@yahoo.com

الخلاصة

جمعت ٢٥ عينة من سائل الجنب (Pleural effusion) من حالات سريرية مختلفة و بحجم كلي مقداره ٩ لتر، لغرض استخلاص بروتين سي الفعال. استخدمت طريقة للاستخلاص معتمدة على اللسيثين و الكلوروفورم التي أعطت منتوج بنقاوة عالية. تمت تنقية العينة المستخلصة باستعمال عمود المبادل الأيوني DEAE-Sephadex A-50 ومن ثم عمود الترشيح بهلام Sephacryl S-300، إذ كانت نسبة بروتين سي الفعال المسترجعة ٣٥% و بنقاوة عالية، حيث ظهر على شكل حزمه واحده واضحة عند ترحيله كهربائيا" على وسط PAGE. أظهر أيون المنغنيز تأثيرا" ايجابيا" في ارتباط بروتين سي الفعال مع الأضداد المرتبطة باللاتكس، أما الكوبلت فكان له تأثير سلبي، و لم يلاحظ للصوديوم أي تأثير في الفعالية ألارتباطيه لبروتين سي الفعال. تراوحت فعالية بروتين سي الفعال ضمن الأرقام الهيدروجينية ٤.٥-٨ وضمن مدى حراري تراوح من ٠ الى ٤٥°م.

الكلمات المفتاحية: بروتين سي الفعال، اللسيثين، الجنب، الكلوروفورم.

المقدمة

اكتشف بروتين سي الفعال سنة ١٩٣٠ من قبل العالمين Tillet و Francis، و هو يعد احد بروتينات استجابة الطور الحاد (استجابة غير متخصصة تنشأ نتيجة لتحطم خلوي، و جرح نسيجي، و التهابات) إذ يرتفع مستواه في مصل الدم إلى أكثر من ١٠٠٠ مره عن مستواه الطبيعي، و قد سجل وجود هذا البروتين في معظم الحيوانات الفقرية **[1]**. ينتمي بروتين سي الفعال إلى عائلة البروتينات الخماسية، إذ يتألف من خمس وحدات متماثلة تربط بينهم جسور ملحية و أواصر كبريتية و له وزن جزيئي يتراوح من١٠٥٠٠٠ – ١٣٠٠٠٠ دالتون و يظهر في منطقة الكاما عند ترحيله كهربائيا" خلال هلام Polyacrylamid Gel Electrophoresis (PAGE) وله نقطة تعادل كهربائي مساو" لـ ٦.٤ **[٢]**.

يمتلك بروتين سي الفعال صفات ارتباطية متخصصة بعضها يكون بهيئة معتمده على الكالسيوم (ارتباط بروتين سي الفعال بمادة Phosphocholine الموجود ضمن الجدار الخلوي للبكتريا الممرضة و لا سيما النوع ***Streptococcus pneumoniae*** وأخر بهيئة غير معتمدة على الكالسيوم مثل الارتباط بالمواد عديد الشحنة الموجبة **[٣،٤]**. يقوم بروتين سي الفعال بوظائف دفاعيه مهمة مثل تنشيط نظام المتمم التقليدي و الطهاية للبكتريا الممرضة و تقديم المستضد (Antigen presentation)، و تحفيز إنتاج الحركيات الخلوية الالتهابية **[5]**. يعد بروتين سي الفعال من العوامل المهمة للكشف عن الإصابة و الالتهابات و ازدادت الدراسات في نهاية العقد الماضي حول نسب تراكيز بروتين سي الفعال في مصل الدم، إذ لوحظ أن هناك علاقة وثيقة بين زيادة تركيز بروتين سي الفعال و التنبؤ ببعض الحالات المرضية و لا سيما الأمراض الوعائية القلبية، إذ اعتبرت بعض الدراسات إن مستوى بروتين سي الفعال عاملا" تنبؤيا" أكثر دقة من الكوليسترول فيما يخص الجلطات القلبية **[6]** كما ان بعض الدراسات أكدت على أهمية تحديد نسب بروتين سي الفعال بوصفه عامل تنبؤ لأمراض الاستسقاء البنكرياسي **[7]**.

المواد طرائق العمل

جمع العينات

تم جمع عينات السائل الجنبي (Pleural fluid) بواقع ٢٠٠-٦٠٠ مليلتر من مرضى راقدين في مستشفى الجراحات التخصصية، مستشفى ابن النفيس يعانون من تجمع السوائل في منطقة الصدر حول غشاء الجنب

تقدير المحتوى البروتيني للعينات

تم تقدير كمية البروتينات الكلية للعينات و لنواتج عمليات الاستخلاص و التنقية؛ و ذلك بالرجوع إلى المنحني القياسي للبروتينات، و باستعمال البومين المصل البقري، بطريقة فولن لوري **[٨]**.

استخلاص بروتين سي الفعال

أضيف ١٠ غرام من مادة اللسثين إلى ٢٠٠ مليلتر من العينة المركزة و مزجت جيداً إلى حين الحصول على خليط دهني، ثم أضيف للخليط ٣٠٠ مليلتر من محلول كلوريد الكالسيوم (٠.٠٠٢ مولاري، برقم هيدروجيني٥)، بعدها تمت ديلزة المزيج ضد محلول كلوريد الكالسيوم نفسه ولمدة ٢٤ ساعة. عرض الخليط للنبذ بوساطة المنبذة المبردة و بسرعة ٥٠٠٠ دورة/ دقيقة و لمدة ٢٠ دقيقة، تم اخذ الراسب وغسل بمحلول كلوريد الكالسيوم (٠.٠٠٢ مولاري و برقم هيدروجيني ٥) و عرض للنبذ المبرد بسرعة ٥٠٠٠ دورة/ دقيقة و لمده ٢٠ دقيقة.

أعيدت عملية الغسل مرتين، بعدها أخذ الراسب و أذيب بـ ١٠٠ مليلتر من داريء فوسفات الصوديوم ٠.٠٠٥ مولاري، وبرقم هيدروجيني ٧.٤ إذابة كاملة، وأضيف له ٢٠٠ مليلتر من الكلوروفورم، وتم خلطه بوساطة المحرك االمغناطيسي لمدة ساعة واحدة. بعد انتهاء المدة عرض المزيج للنبذ المبرد وبسرعة ٥٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة. جمعت الطبقة العليا بوساطة ماصة باستور و وضعت في قنينة معقمة، وأهملت الطبقات المتكونه الأخرى (٩).

تنقية بروتين سي الفعال

تم استخدام مرحلتين لتنقية بروتين سي الفعال المستخلص من سائل الجنب باستخدام اللسثين و الكلوروفورم هما:

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

اجري على وفق طريقة Ikuta وجماعته [9] لتنقية بروتين سي الفعال باستخدام DEAE-Sephadex A-50 بابعاد (١.٦×٣٤) سنتمتر. بدلا من المبادل الأيوني الموجب DEAE-Cellulose مرحلة الغسل (Wash) تمت بأستخدام ٠.٠٠٥ مولر من داريء الفوسفات برقم هيدروجيني ٧ على عمود المبادل ألايوني بمعدل جريان ٠.٤ مليلتر/ دقيقه و بواقع ٢.٥ مليلتر/ جزء. مرحله الاسترجاع (Elution) تمت باستخدام ٠.٠٠٥ مولر من داريء الفوسفات و برقم هيدروجيني ٧ و تدرج خطي لكلوريد الصوديوم (٠.١ –١) مولرعلى عمود المبادل الايوني و بمعدل جريان ٠.٤ مليلتر/ دقيقة و بواقع ٢.٥ مليلتر/ جزء.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

استعمل لهذا الغرض هلام السيفاكريل اس ٣٠٠ (Sephacryl S-300).بابعاد (١.٦×٤٧) سنتمتر باستخدام ٠.٠٠٥ مولر داريء الفوسفات و برقم هيدروجيني ٧ و ٠.١ مولر كلوريد الصوديوم و بمعدل جريان ٠.٤ مليلتر/ دقيقة بواقع ٢.٥ مليلتر/ جزء. على وفق طريقة [٩].

دراسة تأثير بعض المعادن في بروتين سي الفعال المنقى.

تمت دراسة تأثير كلوريدات اربعة معادن و بواقع ثلاث تراكيز لكل معدن هي ١، ٥، ١٠ ملي مولار **[10]**. ودرس تأثيرها في بروتين سي الفعال بتركيز ٠.١ ملغرام/ مليلتر و كلوريدات المعادن هي:

(١) كلوريد الصوديوم NaCl

تم تحضير محلول خزين من كلوريد الصوديوم بتركيز ٥٠ ملي مولر وبحجم ١٠ مليلترات. وذلك بإذابة ٠.٠٢٩٢ غرام من الملح في ٥ مليلترات ماء مقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠ مليلترات.

(٢) كلوريد المنغنيزالمائي $MnCl_2 .4H_2O$

تم تحضير محلول خزين من كلوريد المنغنيز بتركيز ٥٠ ملي مولر و بحجم ١٠ مليلترات و ذلك بإذابة ٠.٠٩٨٩ غرام من الملح في ٥ مليلترات ماء مقطر، و من ثم أكمل الحجم إلى ١٠ مليلترات.

(٣) كلوريد الكوبلت المائي $CoCl_2.6H_2O$

تم تحضير محلول خزين من كلوريد الكوبلت بتركيز ٥٠ ملي مولر و بحجم ١٠ مليلتر، و ذلك باذابة ٠.١١٨٩ غرام من الملح في ٥ مليلترات ماء مقطر، و أكمل الحجم إلى ١٠ مليلترات حضنت الأنابيب الحاوية على البروتين والمعادن لمدة ساعتين بدرجة ٢٥ْم و من ثم ملاحظة تأثير المعادن في فعالية بروتين سي الفعال من خلال تحضير تخافيف نصفية لكل معدن ولكل تركيز وملاحظة قابليه البروتين على التلازن مع أضداده المرتبطة بحبيبات اللاتكس.

دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في بروتين سي الفعال

تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني بقيم ٤ ، ٤.٥، ٥، ٥.٥، ٦، ٦.٥، ٧، ٧.٥، ٨، ٨.٥، ٩، ٩.٥ في بروتين سي الفعال **[11]** إذ تم أضافه حامض الهيدروكلوريك (HCl) بتركيز ٠.١ مولاري إلى ٢ ملليلترات من بروتين سي الفعال بتركيز ٠.١ ملغرام/ ملليلتر للوصول إلى درجات الرقم الهيدروجيني المختلفة و باستعمال جهاز قياس الرقم الهيدروجيني كما تم استعمال هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) بتركيز ٠.١ مولاري، لغرض الوصول إلى درجات الرقم الهيدروجيني المختلفة.

تم حضن هذه الأنابيب بدرجة ٣٧ْم و قيست فعالية بروتين سي الفعال بعد مرور ساعتين عن طريق عمل التخافيف النصفية لكل قيمه رقم هيدروجيني و ملاحظة قوة التلازن مع أضداد بروتين سي الفعال المرتبطة باللاتكس.

دراسة تأثير درجات الحراره في بروتين سي الفعال

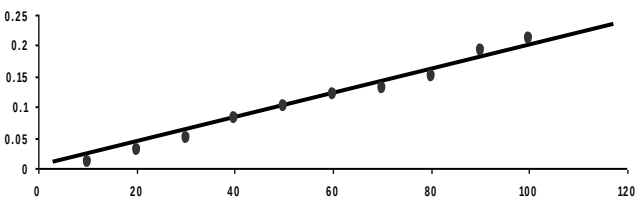
تم دراسة تأثير درجات الحرارة في فعالية بروتين سي الفعال؛ و ذلك بحضن البروتين بدرجات حرارة مختلفة (٠ ، ٤، ١٠، ٢٥، ٣٠، ٣٥، ٣٧، ٤٥، ٦٠)مْ و بعد مدة حضن استمرت ساعتين **[١١]**.

تم ملاحظة تأثير درجات الحرارة المختلفة في بروتين سي الفعال، و ذلك بعمل تخافيف نصفية لكل درجة حرارية، و ملاحظة ارتباط بروتين سي الفعال مع أضداده المرتبطه باللاتكس.

النتائج و المناقشة

جمع العينات

قدر المحتوى البروتيني اعتمادا على المنحني القياسي باستعمال البومين المصل البقري – شكل -١- عدد العينات المستعملة ٢٥ و بحجم كلي يقارب ٩ لتر.



البومين مصل البقر مايكروغرام/ مليلتر

الشكل (١) المنحني القياسي لتقدير محتوى البروتينات باستخدام البومين المصل البقري باستخدام طول موجي ٦٠٠ نانوميتر.

استخلاص بروتين سي الفعال باستخدام اللسثين والكلوروفورم

أضيفت 10 غرامات من مادة اللسثين (مادة دهنية مفسفرة Phospholipid) و ٣٠٠ مليلتر من كلوريد الكالسيوم الى 200 مليلتر من عينة سائل الجنب المركزة لأمتزاز بروتين سي الفعال إذ من المعلوم أن لبروتين سي الفعال مواقع ارتباط متخصصة لمجاميع الفوسفات (Phosphate groups) معتمدة على الكالسيوم (ايونين من الكالسيوم يعملان على ربط مجموعة الفوسفات لكل موقع ارتباط) [١٢]. لوحظ تكون راسب ملبد أبيض (flocculant)، يحتوي على بروتين سي الفعال (أذيب قسم من الراسب في دارئ الفوسفات واختبر بطريقة التلازن) وكانت نسبة الاسترجاع لبروتين سي الفعال 47.5% (جدول رقم -١-).

الجدول (١)

مراحل استخلاص بروتين سي الفعال وكميات البروتين المسترجعة.

حجم العينة ونوع المعاملة	البروتين الكلي (ملغرام)	بروتين سي الفعال المتمثل بعيارية التلازن	الاسترجاع لبروتين سي الفعال %
200 مليلترمن العينة غير المعاملة	124.63	16/1	١٠٠
٩٥ مليلتر بعد المعاملة باللسثين والكلوروفورم	39	16/1	٤٧.٥

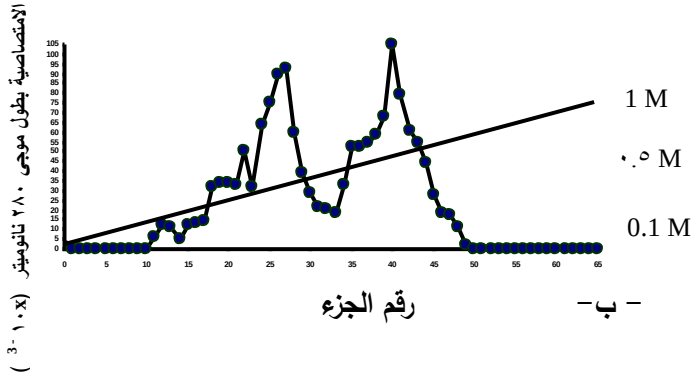
التنقية

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

أستعملت العينات المستخلصه بوساطة اللسثين والكلوروفورم وأجريت عملية التبادل الأيوني باستخدام عمود المبادل الأيوني DEAE-Sephadex A-50 بأبعاد

(1.6×34) سنتمتر، وقد تم استحصال بروتين سي الفعال من دارئ الفوسفات الحاوي على بروتين سي الفعال وبرقم هيدروجيني 7 والذي هو أعلى من نقطة تساوي الشحنة (Isoelectric Point) (pI) لبروتين سي الفعال التي هي حوالي 6.4 وبهذا تكتسب جزيئات بروتين سي الفعال شحنة سالبة تربطها بجزيئات المبادل الأيوني، بخلاف معظم البروتينات الأخرى الموجودة في المستخلص البروتيني (الشكل ٢- أ). تم شطف بروتين سي الفعال المرتبط بالمبادل باستخدام 0.05 مولر دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني 7 وبتدرج ملحي خطي باستخدام كلوريد الصوديوم بمدى (0.1-١) مولر إذ كان تركيز كلوريد الصوديوم اللازم لشطف بروتين سي الفعال مساويا إلى (0.433 - 0.537) مولر وذلك مقارب للتركيز الذي استعمل من قبل Ikuta وجماعته [٩] والذي كان (٠.٤٧ – ٠.٥٦) مولر و الشكل(-٢- ب) يوضح القمم المنفصلة على وفق هذه الطريقة، وقد شخص وجود بروتين سي الفعال في القمة الثانية في الأجزاء (24-31) و التي كانت موجبة لتفاعل التلازن مع أضداد بروتين سي الفعال المرتبطة باللاتكس، اما القمة الأولى والثانية فلم تعط أية نتيجة موجبة (لم تعط تفاعل تلازن)، مما يدل على وجود بروتينات أخرى مع بروتين سي الفعال.

شكلت الأجزاء الموجبة لتفاعل التلازن مع أضداد بروتين سي الفعال حوالي 21% من حجم المستخلص الكلي وبتركيز بروتين كلي 0.85 ملغرام/ مليلتر، اي كانت كمية البروتين الكلية 17.0، ملغرام ونسبة بروتين سي الفعال المسترجعة هي 40%.



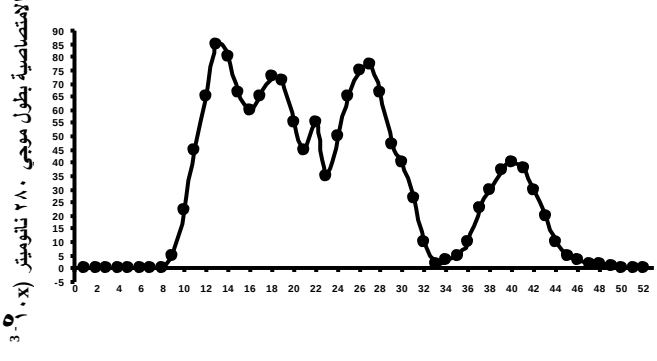
الشكل (٢) تنقية بروتين سي الفعال باستخدام عمود المبادل الايوني DEAE-Sephadex A-50.

-أ-مرحلة الغسل (Wash) بأستخدام ٠.٠٥ مولر من داريء الفوسفات برقم هيدروجيني ٧ على عمود المبادل ألايوني DEAE-Sephadex A-50 بابعاد (١.٦×٣٤) سنتمتر و بمعدل جريان ٠.٤ مليلتر/ دقيقة و بواقع ٢.٥ مليلتر/ جزء.

-ب-مرحلة الاسترجاع (Elution) باستخدام ٠.٠٥ مولر من داريء الفوسفات و برقم هيدروجيني ٧ و تدرج خطي لكلوريد الصوديوم (٠.١ -١) مولرعلى عمود المبادل الايوني DEAE-Sephadex A- 50 بأبعاد (١.٦ ×٣٤) سنتمتر و بمعدل جريان ٠.٤ مليلتر/ دقيقة وبواقع ٢.٥ مليلتر/ جزء.

2- كروماتوغرافيا الترشيح

استخدم عمود الترشيح الهلامي Sephacryl S-300 بأبعاد (1.6×47) سنتمتر بوصفها مرحلة ثانية لتنقية بروتين سي الفعال المستخلص بوساطة اللسثين والكلوروفورم و المنقى جزئياً باستخدام المبادل الأيوني DEAE-Sephadex A-50، إذ تم استرداد بروتين سي الفعال من المرشح الهلامي باستخدام 0.05 مولر دارئ الفوسفات 0.1 مولر كلوريد الصوديوم وبرقم هيدروجيني 7و تم الحصول على قمتين (الشكل ٣).

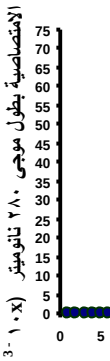


من كمية البروتين المنقى باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بتركيز بروتين كلي 0.65 ملغرام/ مليلتر أي كانت كمية البروتين الكلية تساوي ١١.٣٧ ملغرام، وكانت نسبة استرجاع بروتين سي الفعال ٣٥ % (الجدول ٢).

رقم الجزء

الشكل (٣) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي للعينه المنقاة جزئيا على عمود Sephacryl S-300 بابعاد (١.٦×٤٧) سنتمتر باستخدام ٠.٠٥ مولر داريء الفوسفات و برقم هيدروجيني ٧ و ٠.١ مولر كلوريد الصوديوم و بمعدل جريان ٠.٤ مليلتر/ دقيقة بواقع ٢.٥ مليلتر/ جزء.

إن نتائج أختبار التلازن لأجزاء القمتين كانت موجبة للأجزاء (36-42)، إذ شكلت هذه الأجزاء حوالي 87.5 %



الجدول (٢)

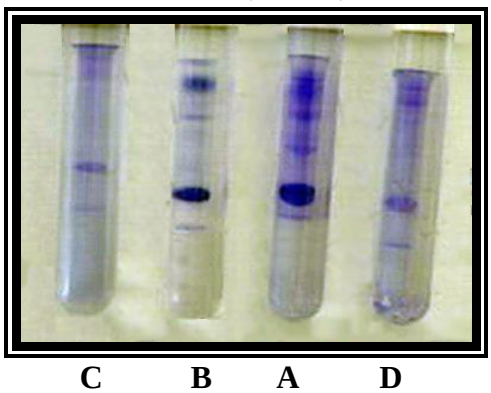
مراحل استخلاص و تنقية بروتين سي الفعال (تم حساب نسب الاسترجاع وذلك بالاعتماد على عيارية التلازن والتي تمثل تركيز بروتين سي الفعال مضروبا بالحجم وبذلك نحصل على كمية البروتين عند كل خطوة وبقسمة الناتج على كمية بروتين سي الفعال بالعينة الغير معاملة (١/١٦X٢٠٠) تم الحصول على نسب الاسترجاع لكل خطوة).

حجم العينة ونوع المعاملة	تركيز البروتين (ملغرام/مليلتر)	البروتين الكلي (ملغرام)	نسبة بروتين سي الفعال متمثه بعيارية التلازن	نسبة الاسترجاع لبروتين سي الفعال (%)
200 مليلتر من العينة غير المعاملة	٦	$10^3 \times 1.21$	16/1	١٠٠
٩٥ مليلتر بعد المعاملة باللسثين والكلوروفورم	0.39	٣٧	16/1	47.5
20مليلتر ناتج من عمود المبادل الايوني Sephadex A-50− DEAE	0.85	17	١/٦٤	40
17.5 مليلتر ناتج من الترشيح بهلام Sephacryl S-300	0.65	١١.٣٧	١/٦٤	35

ومن الجدير بالذكر بأن الاختلاف في طريقة التنقية المستعملة لبروتين سي الفعال عن طريقة Ikuta *et al.*, (1983) هو استخدام المبادل DEAE-Sephadex A-50 بدلا من DEAE-Cellulose، أما عمود الترشيح الهلامي فكان نفسه Sephacryl-300 مع اختلاف في طوله.

الترحيل الكهربائي بهلام عديد الاكريل امايد

تعد طريقه الترحيل الكهربائي على هلام عديد الاكريل امايد من الطرائق الشائعة في تقييم قدرة عمليات الاستخلاص والتنقية للبروتينات المختلفة إذ يمكن من خلالها تقدير نقاوة المنتوج النهائي، و كذلك ملاحظة قدرة كل خطوة من خطوات الاستخلاص والتنقية والتعرف على تواجد الملوثات (بروتينات غير مرغوبة) التي تتمثل في عدد الحزم الملاحظة عند ترحيل العينة و مقارنتها مع عدد الحزم الظاهرة في العينة غير المعاملة اذ ان A تمثل عينة سائل الجنب غير المعاملة والتي ظهرت بها ٦ حزم، و B تمثل مرحلة الاستخلاص بوساطة اللسثين و الكلوروفورم وظهرت بها ٤ حزم محددة و مركزة، و C تمثل العينة المستخلصة باللسثين و الكلوروفورم و المنقاة باستخدام المبادل الأيوني والترشيح الهلامي وظهرت بها حزمة واحدة محددة و مركزة مع اثار طفيفة جدا لحزمة اخرى، أما D فتمثل مرحلة الاستخلاص بأستخدام أملاح كبريتات الأمونيوم وظهرت بها ٤ حزم واضحة و حزمة خامسة اقل وضوحا (الشكل ٤).



C B A D

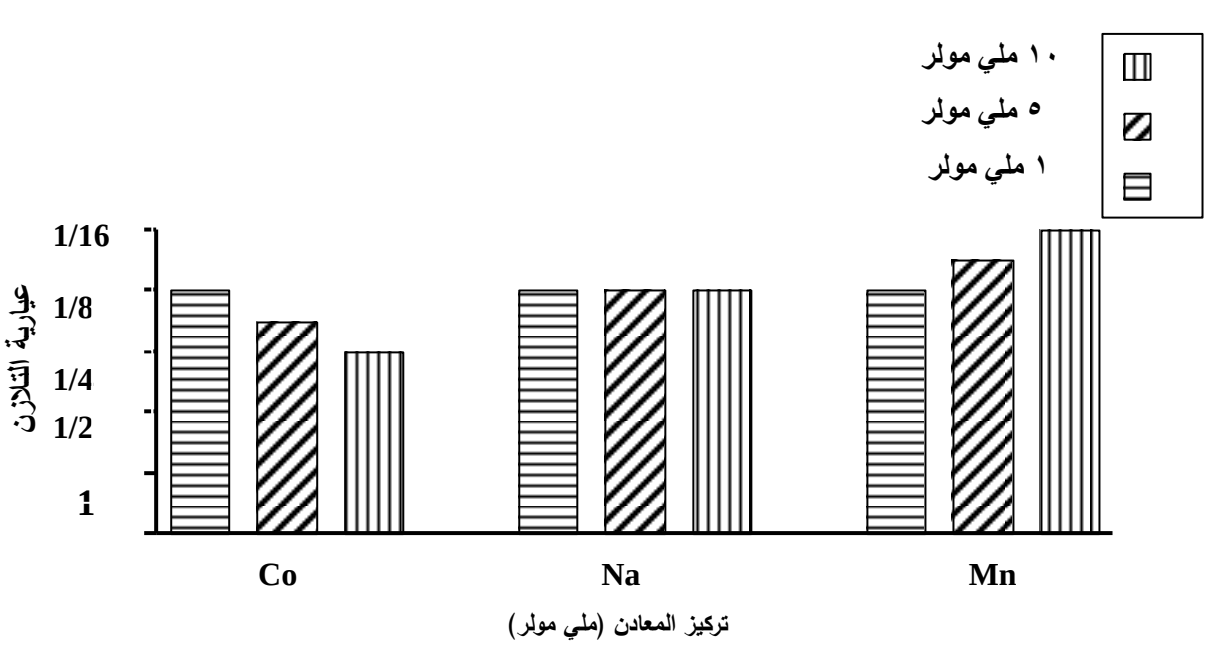
الشكل (٤) الترحيل الكهربائي على هلام عديد الاكريل أمايد لعينات تمثل مراحل استخلاص و تنقية بروتين سي الفعال إذ إن A تمثل عينة سائل الجنب غير المعاملة، وB تمثل مرحلة الاستخلاص بوساطة اللسثين و الكلوروفورم، و C تمثل العينة المستخلصة باللسثين والكلوروفورم والمنقاة باستخدام المبادل الأيوني والترشيح الهلامي، أما D فتمثل مرحلة الاستخلاص بأستخدام أملاح كبريتات الأمونيوم.

تأثير بعض المعادن على بروتين سي الفعال

تمت دراسة تأثير كل من الكالسيوم و المنغنيز و الكوبلت والصوديوم في فعالية بروتين سي الفعال بتراكيز ١، ٥، ١٠ ملي مولر. إذ كانت النتائج تدل على أهمية وجود ايون الكالسيوم ضمن مكونات مستحضر بروتين سي الفعال لما له تأثير كبير ليس فقط في فعالية البروتين و ارتباطاته و إنما في تركيب جزيئة بروتين سي الفعال الخماسي، إذ يلعب دوراً مهماً في الربط بين وحداته الخمسة محافظاً بذلك على مواقع الارتباط من التغير جراء الانفصال إلى الوحدات الأساسية، لقد درس تأثير ايون الكالسيوم في بروتين سي الفعال من قبل العديد من الباحثين و منهم العالم Potempa وجماعته **[٢]**، الذين أوضحوا ان غياب الكالسيوم وتواجد تراكيز عالية من اليوريا مع بروتين سي الفعال سوف يؤدي إلى تحور في مواقع الارتباط و في سلوكه في أثناء الترحيل الكهربائي إذ تؤدي إلى تغير في قيمة نقطة التعادل الكهربائي (Isoelectric focusing) لبروتين سي الفعال من ٦.٤ الى ٥.٤ كما انه يصبح أكثر سرعة أثناء الترحيل أي يظهر في منطقة ألفا (α) بدلاً من منطقة الكاما (γ)، بينما جزيئة بروتين سي الفعال المحوره سوف تحتفظ بالقليل من صفاتها المستضدية التي كانت موجودة في الجزيئة الأصل الخماسية. كما أظهر الباحث إن تأثير الحرارة (حرارة ٦٣ مْ لمده ٥ دقائق) يكون مؤثراً في جزيئه بروتين سي الفعال بغياب الكالسيوم كما استنتج ان هذه التأثيرات الناجمة عن اليوريا و الحرارة يمكن أن يقلل من تأثيرها أو تثبط بوساطة إضافة ٠.٧ ملي مولر أو أكثر من الكالسيوم و أضاف أيضا إن بروتين سي الفعال المحور يفقد قابليته في الارتباط المعتمد على الكالسيوم بعديد السكريد سي (C-Polysaccharide) على الرغم من احتفاظها بقابليتها بالارتباط بالمواد عديدة الشحنة الموجبة. وجد العالم Myles وجماعته **[١٣]** أن بروتين سي الفعال المنقى حديثاً يعاني من تحللات ذاتية (Spontaneous dissociation) في حاله عدم إضافة كلوريد الكالسيوم إليه و إن هذا التحلل يزداد بازدياد مدة الخزن. اما تأثير المعادن الأخرى الصوديوم، الكوبلت، المنغنيز بوجود الكالسيوم في ارتباط بروتين سي الفعال بالأضداد المرتبطة باللاتكس كان متبايناً (الشكل ٥). إن إضافة أي معدن من المعادن المذكورة دون الكالسيوم سوف يؤدي إلى عملية التحلل الذاتي (Autolysis) الطبيعية لبروتين سي الفعال (وهي عملية تحول جزيئه بروتين سي الفعال الخماسية إلى جزيئه أحاديه بسبب غياب

ايونات الكالسيوم (++Ca) التي تعمل على ربط الوحدات التركيبية بعضها مع بعض) [١٠]. سبب أيون المنغنيز (Mn) تنشيطا طفيفاً لقوة تفاعل بروتين سي الفعال مع أضداده المرتبطه باللاتكس، أما الكوبلت (Co) فقد اظهر تنشيطاً في شده التفاعل و ازداد هذا التنشيط بزيادة تركيزه. ايون الصوديوم (Na) لم يظهر أي تأثير لتفاعل بروتين سي الفعال إلا انه يوصى به من قبل الشركات المتخصصة بتحضير العدة التجارية (Atlas) وذلك بإضافة كلوريد الصوديوم ١ ملي مولر إلى مستحضر بروتين سي الفعال أو إلى أضداد بروتين سي الفعال لغرض الحفاظ عليه بالتعاون مع ايونات الكالسيوم. إذ أن بعض العدد التجارية التي تنتج للتحري عن بروتين سي الفعال تحوي ضمن مكونات الكاشف على كلوريد الصوديوم (NaCl) بتركيز ١ ملي مولر.

النتائج اعلاه كانت مطابقة لما جاء به العالم Potempa وجماعته [١٤] مع الاختلاف في طريقة قياس الفعالية حيث اعتمد الباحث على فعالية ارتباط بروتين سي الفعال بمادة Phosphorylcholine بدلا من ارتباط البروتين بالأضداد المرتبطة باللاتكس.



الشكل (٥) تأثير بعض المعادن في تفاعل بروتين سي الفعال المقدرة بارتباطه بالأضداد المرتبطة باللاتكس بوجود ايون الكالسيوم (تفاعل التلازن).

تأثير الرقم الهيدروجيني في بروتين سي الفعال

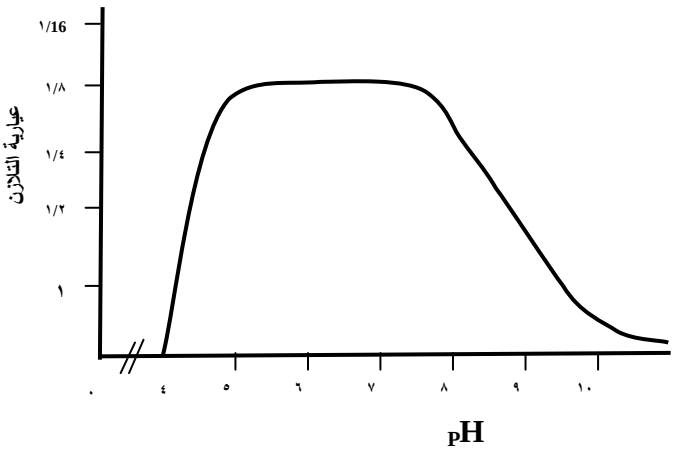
تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في صفات بروتين سي الفعال الارتباطية وتضمنت الأرقام الهيدروجينية المحصورة ضمن مدى من 4-9.5 وبزيادة 0.5 رقم هيدروجيني (12 رقم هيدروجيني)، وتم قياس هذا التأثير بقابلية بروتين سي الفعال بالارتباط بأضداده المرتبطة باللاتكس (تفاعل تلازن).

أظهرت الأرقام الهيدروجينية المنخفضة (اقل من 5) تأثيراً شديدا" في فعالية بروتين سي الفعال وصلت إلى تثبيط كامل لتفاعل التلازن مع أضداده المرتبطة باللاتكس أما عند الرقم الهيدروجيني 5 فقد وجد ان هناك تثبيط جزئي يتلاشى مع ازدياد قيمة الرقم الهيدروجيني وتصل الفعالية الارتباطية لبروتين سي الفعال ذروتها عند الرقم الهيدروجيني المحصور بين 7-7.5 ويبدأ بعدها التثبيط للفعالية الارتباطية مع زيادة قيمة الرقم الهيدروجيني إلى قيم أعلى من 8 لحين الوصول إلى الرقم الهيدروجيني 9.5 والذي يعطي تثبيطاً جزئياً غير كامل وكما هو موضح بالشكل (٦).

وقد أوضح العالم [١٥] ان بروتين سي الفعال يعاني من تغيرات تركيبية (Conformational changes) معتمدة على الرقم الهيدروجيني ودعم هذا التوضيح بوساطة السلوك التالقي لمعقد بروتين سي الفعال مع الصبغة التألقية (ANS) -S-anilino naphthalenesulfonate و لا سيما عند غياب ايون الكالسيوم، وأيضا بنقاط التعادل الكهربائي إذ كانت ٦.٤ عند البدء برقم هيدروجيني 7 وكانت 5.3 و ٦.٤ عندما كان البدء برقم هيدروجيني

5.5. أوضح الباحث Lee وجماعته [16] ان الفعالية الارتباطية لبروتين سي الفعال ببعض المواد تكون ثابته بوضوح عندما تكون قيمة الرقم الهيدروجيني محصورة بين 4.5-8 بوجود كلوريد الكالسيوم وانه يظهر نقصاناً قليلاً في معدلات الارتباط عند الرقم الهيدروجيني 9، أما على الجانب الحامضي فانه يظهر هبوطا حادا في فعاليته الارتباطية تحت الرقم الهيدروجيني 4.5 تصل إلى انعدام الفعالية تماما عند الرقم الهيدروجيني ٤. هذا الانخفاض في الجانب الحامضي قد يعود الى فقدان بروتين سي الفعال لتركيبه الخماسي الحلقي وتجزءه إلى وحداته و من ثم فقدان بعض مواقعه الارتباطية المهمة التي تؤدي إلى فقدان فعاليته بالارتباط مع أضداده ومع بعض المواد الأخرى ذات الألفة.

أوضح العالم Yatvin و جماعته [17] ان مناطق الالتهاب و الاخماج تعاني افرازاتها هبوطاً في رقمها الهيدروجيني يصل إلى ٥.٥ بعد ٦٠ ساعة من بدء الالتهاب و هذا يفسر لنا كون فعالية بروتين سي الفعال تكون عالية في بداية الالتهاب (عندما يكون الرقم الهيدروجيني مرتفعاً) و إنها تنخفض بعد ٤٨ ساعة و تتلاشى بعد ٧٢ ساعة.

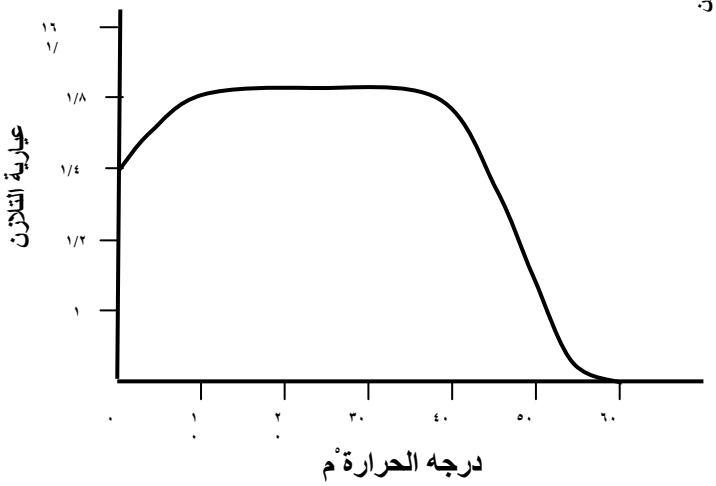


الشكل (٦) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية بروتين سي الفعال المقدرة بارتباطه بالأضداد المرتبطة باللاتكس (تفاعل التلازن).

تأثير درجة الحرارة في بروتين سي الفعال

تمت دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة (٠، ٤، ١٠، ٢٥، ٣٥، ٣٧، ٤٥، ٦٠)ْم في بروتين سي الفعال المنقى و لمدة ٣٠ دقيقة. لوحظ ان الدرجات الحرارية الأقل من ٤٥ْم لم يكن لها تأثير في بروتين سي الفعال، إذ يبقى البروتين محافظاً على شكله الخماسي و لم تقل شدة ارتباطه مع أضداده المرتبطة باللاتكس، أما عند معامله البروتين بالدرجات الحرارية المرتفعة ٤٥ – ٦٠ْم فقد لوحظ ان بروتين سي الفعال يفقد فعاليته تدريجياً إلى أن يصل إلى مرحلة عدم قدرته على الارتباط مع أضداده المرتبطة باللاتكس. ويعود هذا التغير إلى تمسخ بعض جزيئات البروتين أولاً و إلى تركيبة بروتين سي الفعال و هو يعد من عائلة البروتينات الخماسية (بروتينات تتألف جزيئاتها من خمس وحدات متماثلة مرتبطة مع بعضها بأواصر كبريتية ثنائيه و بجسور ملحية) إذ تعمل الحرارة على تكسير تلك الجسور و الأواصر مؤديه إلى تحول البروتين من شكله الأصلي (Native) إلى الشكل المحور (Modified) ذي الوحدة الواحدة و الذي يحوي على مواقع ارتباط مغايرة لتلك الموجودة في النوع الأصل، وهذا مشابه لتأثير الأرقام الهيدروجينية المنخفضة على تركيب بروتين سي الفعال. و قد حصل العالم Wang و جماعته [11] على هذه النتيجة أيضاً إذ حصلوا على بروتين سي الفعال المحور من تعريض البروتين الأصل إلى درجة حرارة ٦٣ْم و لمدة دقيقتين، كما إنهم حصلوا على تدرج في فقدان البروتين لشكله الخماسي عند تعرضه لدرجات حرارية بين ٤٥ – ٦٠ْم و متناسبة طردياً مع طول فتره التعرض.

أما عند الدرجات الحرارية المنخفضة، فلم يلاحظ أي تأثير في بروتين سي الفعال حتى عند خزنه بدرجه صفر مئوي و لمده تجاوزت ٦ أشهر كما أنّ عمليه الإذابة (Thawing) المتكررة لعينات بروتين سي الفعال لم تؤثر فيه إلا تاثيراً بسيطاً من ناحية التلازن مع الأضداد المرتبطة باللاتكس (الشكل٧).



شكل (٧) تأثير درجات الحرارة في فعالية بروتين سي الفعال المقدرة بارتباطه بالأضداد المرتبطة باللاتكس (تفاعل التلازن).

References

[1] Steel, D. M. and whitehead, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive

protein, Serum amyloid p component and serum amyloid a protein. Immunol Today 15:81-88. (1994).

[2] Potempa, L. A.; Maldonado, B. A.; Laurent, P.; Zemel, E. S. and Gewurz, H. Antigenic, electrophoretic and binding alternation of human C-reactive protein and modified selectively in the absence of calcium Mol. Immunol. 20:1165-1175. (1983).

[3] Potempa, L. A.; Siegel, J. N. and Gewurz, H. Binding reactiving and phosphocholine. J. Immunol. 127:1509-1514. (1981).

[4] Hoff, H. F.; Lie, j. T.; Titus, J. l.; Bayardo, R. J.; Jackson, R. L.; DeBakey, M. E. and Gotto, A. M. Lipoprotein in atherosclerotic lesions-localized by immunoflurescence of apo-low density lipoproteins in human atherosclerotic arteries from normals and hyperlipoproteinaemics. Arch. Pathol. 99:253 (1975).

[5] Duclos, T. W. Function of c-reactive protein. Ann Med. 32:274-278. (2000).

[6] Ridker, P. M.; Rifai, N.; Rose, L. Comparasion of C- reactive protein and low- density lipo protein cholesterol levels in the predication of first cardiovascular events. N. Eng. J. Med. 547: 1557- 1565. (2002).

[7] Barauskas, G.; Svagzdys, S. and Maleckas, A. C-reactive protein in early prediction of pancreatic necrosis. MEDICINA. 40 (2): 135- 140. (2004).

[8] Lowry, O. H.; Rosebrouch, N. J.; Earr, A. L. and Randall, R. J. protein measurement with the folin phenol reagent. J. Boil. Chem. 193: 265- 275. (1951).

[9] Ikuta, T.; Okubo, H.; Yukimura, H. Ishibashi, H.. Purification of C-reactive protein. Biochem. Int. 6 (2): 275-282. (1983).

[10] Dong, A.; Caughey, W. S. and Duclos,T. W.. Effect of Calcium, Magnesium, and Phosphorylcholine on secondary structures of human C-reactive protein and serum Amyloid P-component observed by infrared spectroscopy. J. Biol. Chem. 269. 9: 6424-6430. (1994).

[11] Wang, H-W.; Wu, Y.; Chen, Y. and Sui, S-F. Polymorphism of structural forms of C-reactive protein. Int. J. Mol. Med. 9:665-671. (2002).

[12] Szalai, A. J.; Agrawal, A. Greenhough, T. J. and Volonakis, J. E. C-reactive protein: Structural biology and host defence function. Clin. Chem. Lab. Med. 37 (3):265-270. (1999).

[13] Myles, D. A. A.; Rule, S. A.; Delucas, L. J.; Babu, Y. S.; Xu, Y. Volanakis, J. E.; Bugg, C. E.; Bailey, S. and Greenhough, T. J. Regulation function studies of Human C-reactive protein. J. Mol. Biol. 216:461-496 (1990).

[14] Potempa, L. A.; Kubak, B. M. and Gewurz, H. Effect of divalent metal iones and pH upon the binding reactivity of human serum amyloid P-component, a C-reactive protein homologue, for Zymosan, preferential reactivity in the presence of Copper and Acidic pH. J. Biol. Chem. 260. 22:12142-12147. (1985).

[15] Tsujimoto, M.; Inoue, k. and Nojima, S.. Purification and charachterization of Human Serum C- reactive protein. J. Biochem. 94: 1367- 1373. (1983).

[16] Lee, R. T.; Takagahara, I. and Lee, Y. C.. Mapping the Binding areas of human C-reactive protein for phosphorylcholine andpolycationic compounds. J. Biol. Chem. 277 (1): 225- 232. (2001).

[17] Yatvin, M. B.; Kreutz, W.; Horwitz, B. A. and Shinitzky, M. pH sensitive liposomes: Possible clinical Implications. Science. 210: 1253-1255. (1980).

Abstract

Nine liters of pleural fluid or Pleural effusion samples were collected from patients suffer from different clinical cases. C-reactive protein was extractcted from the pleural fluid using lecithin and chloroform gave high purity product.

The purification of C-reactive protein was carried out by using ion exchange chromatography (DEAE – Sephadex A – 50) and gel filtration (Sephacryl S – 300). The percentage of the recovered C-reactive protein was 35% of the total amount of C-reactive protein characterized with high purity. The purity was confirmed by polyacryl amide gel electrophoresis (PAGE) which revealed one band.

The effect of the ions (Mn, Co, Na) used on C-reactive protein showed that the

manganese ion activate the reaction between the C-reactive protein and the antibodies bounded on latex. At the contrary, the cobalt ion produced a negative results on the same reaction, whereas the sodium ion showed no effect.

The activity of C-reactive protein was within a pH range of 4.5-8 and a temperature ranged of 0-45 ºc.