

ПРОБЛЕМИ БІОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 577.27:57.083.33:543.54

О.Ю. Галкін

РОЗРОБЛЕННЯ УДОСКОНАЛЕНОЇ МЕТОДИКИ ОТРИМАННЯ Fc-ФРАГМЕНТІВ IgM ЛЮДИНИ

The aim of work was to develop the improved methods of obtaining and allocating Fc-fragments of human IgM. To achieve this goal IgG hydrolysis with subsequent purification (Fc)₂μ-fragments was optimized. The improved method for obtaining Fc-fragments of IgM provides papain hydrolysis of immunoglobulin in the nitrogen environment for 30 minutes allowing to achieve maximum output of Fc₂μ fragments without their further degradation: isolation and purification of Fc₂μ fragments by two-stage gel filtration on sephacryl S-300; control the purity of the target product in electrophoresis in polyacrylamide gel with SDS and immunodiffusion for Ouchterlony. By employing the proposed scheme, we can obtain Fc₂μ-fragments of high purity. Outcome of Fc₂μ fragments after all stages of purification was about 15 % of the initial IgM amount in the preparation. Molecular weight of Fc₂μ-fragments was approximately 95 kDa.

Вступ

До імуноглобулінів належать білки тваринного та людського походження, які мають активність антитіл, а також імуноглобулінові рецептори лімфоцитів та білки, подібні до антитіл за хімічною структурою і антигенною специфічністю – мієломні білки, білки Бенс-Джонса та субодиниці імуноглобулінів. Антитіла виконують багато біологічних функцій, спрямованих на елімінацію чужорідного агента з організму: розпізнають і зв'язують антиген, допомагають у його презентації макрофагам і лімфоцитам, зумовлюють ушкодження мастоцитів, лізують клітини, що містять специфічні антигенні субстанції, зумовлюють опсонізуючу дію, активують систему комплементу. Первинна функція антитіл – взаємодія із комплементарною структурою антигену – антигенною детермінантою, а вторинні (ефекторні) функції – фіксація комплементу, опсонізуючий вплив, цитотоксична, імунорегуляторна дії тощо [1–3]. Структурні ділянки молекул імуноглобулінів, відповідальні за ефекторну активність, просторово віддалені від антигензв'язуючих центрів і розміщені, головним чином, у Fc-області. Ізотипічна мінливість молекул імуноглобулінів також обумовлена антигенними детермінантами Fc-фрагментів [4]. Для розв'язання низки фундаментальних та прикладних задач в імунології, молекулярній і клітинній біології та біотехнології виникає потреба в одержанні Fc-фрагментів імуноглобулінів. Наприклад, Fc-фрагменти можна застосовувати для вивчення ефекторних функцій імуноглобулінів, які опосередковані даними областями. Часто їх використовують як імуноген для одержання антивидового кон'югату (в т.ч. на основі моноклональних антитіл) при розробленні

тестів для серологічної діагностики. Слід зазначити, що Fc-фрагмент як антиген дає змогу одержати більш специфічні та селективні антивидові імунні сироватки. Отримані при розщепленні імуноглобулінів Fc-фрагменти можна використовувати також для аналізу антивидових моноклональних антитіл та одержання імуноафінних сорбентів.

Аналіз літературних даних засвідчив наявність кількох підходів до розщеплення IgM людини ферментами з метою отримання Fc₂μ-фрагментів. Найчастіше вони базуються на використанні папаїну [5]; також застосовуються пепсин та трипсин [6]. Папаїнова фрагментація дає можливість отримати більш стабільні та відтворювані результати [7–10]. Незважаючи на велику кількість модифікацій методики, значна частина з них погано відтворюється, часто бракує достовірних способів контролю за ферментативним розщепленням. Данні різних авторів у багатьох випадках містять суттєві розбіжності.

Постановка задачі

Метою роботи є розроблення удосконаленої методики отримання та виділення Fc-фрагментів IgM людини.

Матеріали і методи

Препарат IgM людини. Препарат імуноглобулінів людини класу М було попередньо отримано згідно з методикою [11]. Чистота цього препарату була перевірена за допомогою імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН). Імуноглобуліни переводили в реакційний буферний розчин гель-фільтра-

цією на колонці $1,5 \times 20$ см з сефадексом G-50. Колонку зрівноважували 0,1 М фосфатним буфером з рН 7,0, який містив 0,001 М цистеїну та 0,001 М ЕДТА. [7]. Концентрацію одержаних після гель-фільтрації IgM вимірювали на спектрофотометрі при 280 нм [5]. Вміст імуноглобулінів доводили реакційним буфером до 12 мг/мл.

Папаїновий гідроліз IgM людини. Для проведення ферментативного розщеплення використовували папаїн ("Sigma", США) у вигляді кристалічної суспензії в 0,05 М ацетатному буфері з рН 4,5 з додаванням 0,01 % тимолу. Реакцію розщеплення проводили у 0,01 М фосфатному буфері, рН 6,5, який містив 0,002 М $\text{Na}_2\text{-EDTA}$. В реакційну суміш компоненти вносили в таких співвідношеннях: на 100 мг глобулінової фракції – 1 мг папаїну [12]. Реакційну суміш інкубували при 37 °С в атмосфері азоту для запобігання інактивації папаїну киснем повітря [13]. З метою віднаходження оптимального часу інкубування з реакційної суміші відбирали проби через 10, 20, 40, 60 і 120 хв від початку постановки реакції. Ферментативний гідроліз у пробах зупиняли їх заморожуванням.

Гель-фільтрація. Використовували колонку із сефакрилом S-300, "Pharmacia Biotech" (розмір $2,5 \times 100$ см), яку переводили у 0,05 М фосфатний буфер з 0,15 М NaCl з рН 7,2. Елюцію проводили зі швидкістю 2 мл/хв, збираючи колектором фракції об'ємом 4 мл. Об'єднували ті з них, які відповідали виходу піків. Концентрацію білка вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda = 280$ нм [5].

Електрофорез. Електрофорез проводили за [14] у вертикальній камері в 15 % ПААГ за наявності ДСН. Як маркери молекулярної маси використовували овотрансферін ($M_r = 78000$), альбумін ($M_r = 66250$), овальбумін ($M_r = 42700$), карбоангідразу ($M_r = 30000$), міоглобін ($M_r = 16900$), цитохром С ($M_r 12300$) ("Sigma", США). Білки в гелі фарбували Coomassie Blue R-250.

Імунодифузія за Оухтерлоні. Імунодифузію проводили у 1,25 %-ному агарозному гелі, приготованому на боратному буфері з рН 8,6 [15]. Використовували моноспецифічні сироватки проти імуноглобуліну людини, λ_L - та κ_L -ланцюгів імуноглобулінів ("Предприятие по производству бактериальных препаратов Центрального НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова", Росія). У центральні лунки вносили імунні сироватки, а в периферійні – розчин антигену в серійних розведеннях. Для фарбування та фіксації гелю використовували розчин фарбника

амідочорного [15]. Відмивку проводили 2 %-ним розчином оцтової кислоти.

Результати і їх обговорення

Оскільки, за даними різних авторів [7–10], більш відтворювані результати одержуються при папаїновому гідролізі імуноглобулінів, то нами вибрано саме такий варіант ферментативного розщеплення IgM людини. На першому етапі визначали оптимум часу інкубування фракції імуноглобулінів з папаїном. Температурний оптимум для папаїну становить близько 37 °С [6], тому інкубацію IgM людини та ферменту проводили саме за цієї температури. Кисень повітря може чинити інгібуючий вплив на реакцію ферментативного гідролізу [13], тому реакційну суміш інкубували в атмосфері азоту для запобігання інактивації папаїну. За даними різних авторів [13, 16], задля зменшення неконтрольованої деградації молекули IgM папаїновий гідроліз краще проводити без використання активатора ферменту – цистеїну. В такому випадку є можливість отримання $(\text{Fc})_5\mu$ -фрагментів, що краще з огляду на подальшу процедуру їх виділення та очистки з реакційної суміші. Дані літератури [9] свідчать про те, що папаїновий гідроліз IgM відбувається значно швидше, ніж, наприклад, IgG. Проте дані різних авторів щодо оптимального часу такого протеолізу істотно різняться. Відтак з метою віднаходження оптимального часу інкубування з реакційної суміші відбирали проби через 10, 20, 40, 60 і 120 хв від початку постановки реакції. Ферментативний гідроліз у пробах зупиняли їх заморожуванням. Процес ферментативного гідролізу контролювали за допомогою вертикального електрофорезу в ПААГ з ДСН (рис. 1). В редуруючих умовах імуноглобуліни розпадалися на важкі (H) та легкі (L) ланцюги, формуючи дві чіткі смуги на рівні 70 і 23 кДа. На електрофореграмі проб з реакційної суміші з'являлася третя смуга (≈ 35 кДа), яка, певно, відповідає за $\text{Fc}\mu$ -фрагменти важких ланцюгів імуноглобулінів. При збільшенні часу інкубації з папаїном до 120 хв поступово зникала смуга, що зумовлена наявністю важких ланцюгів. Це було підтвердженням протікання фрагментації імуноглобулінів. Разом із тим починаючи із 40 хв гідролізу було зафіксовано утворення низькомолекулярних фрагментів (≈ 13 кДа), що свідчить про небажану деградацію IgM. Тому було ухвалено рішення проводити розщеплення IgM протягом 30 хв, що давало можливість одержати

ти максимальний вихід F_c μ -фрагментів без їх подальшої деградації.

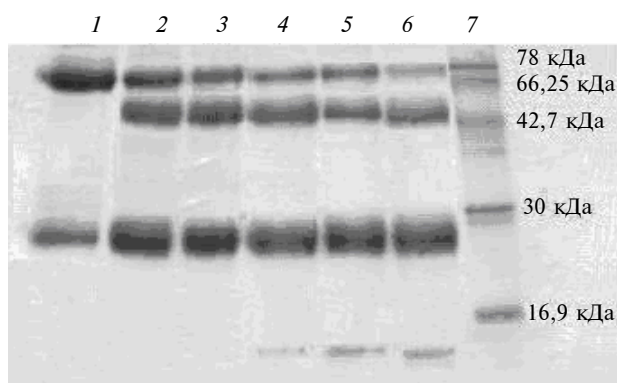


Рис. 1. Електрофореграма проб з реакційної суміші та нативного IgM людини: 1 – препарат IgM; 2, 3, 4, 5, 6 – проби, які відбиралися з реакційної суміші відповідно через 10, 20, 40, 60 і 120 хв після початку розщеплення; 7 – маркери молекулярної маси

Після фрагментації IgM проводили виділення та очистку (F_c)₅ μ -фрагментів за допомогою послідовного вилучення Fab μ -фрагментів, мономерних F_c μ -фрагментів.

Поставлене завдання можна було вирішувати різними способами. За даними [17], найкращі результати одержують при використанні іонообмінної хроматографії, зокрема на КМ-целюлозі та ДЕАЕ-целюлозі. Проте за більш новими даними [13], в такому випадку ефективніше використовувати гель-фільтрацію на сефакрилі.

З метою розділення компонентів реакційної суміші після 30 хв інкубування її пропускали через колонку із сефакрилом S-300 (рис. 2). Як видно з хроматограми, реакційна суміш розділилася на чотири фракції. Першими з колонки мали сходити нефрагментовані IgM, які мають найбільшу молекулярну масу, другий пік, певно, утворювали (F_c)₅ μ -фрагменти, третій – Fab μ -фрагменти та мономерні F_c μ -фрагменти, а четвертий – низькомолекулярні фрагменти, продукти небажаної фрагментації імуноглобулінів.

Для аналізу перших трьох фракцій використовували вертикальний електрофорез у ПААГ з ДСН (рис. 3). Як видно з електрофореграми, фракція 1-го піку утворює дві смуги на рівнях 70 і 23 кДа, які відповідають за Н- і L-ланцюги IgM відповідно. Фракція 2-го піку утворює три смуги: невеликі смуги на рівнях 70 і 23 кДа, які можуть бути зумовлені наявністю негідролізованих IgM (Н- і L-ланцюги), та інтенсивну

смугу на рівні 50 кДа (відповідає (F_c)₅ μ -фрагментам). Фракція 3-го піку утворювала дві виражені смуги на рівнях 50 кДа (мономерний F_c μ -фрагмент) і 23 кДа (Fab μ -фрагменти). Середній вміст білка у фракції з F_c μ -фрагментами становив 0,32 мг/мл.

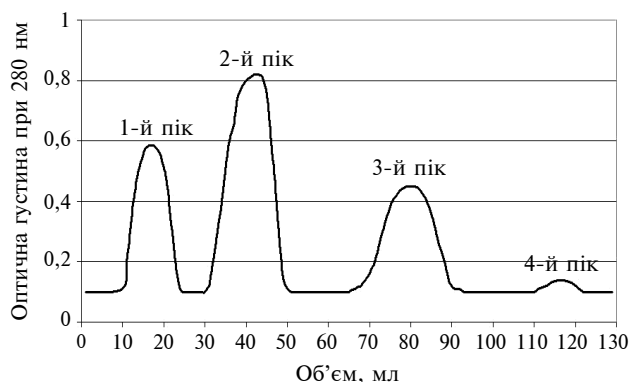


Рис. 2. Гель-фільтрація реакційної суміші на сефакрилі S-300

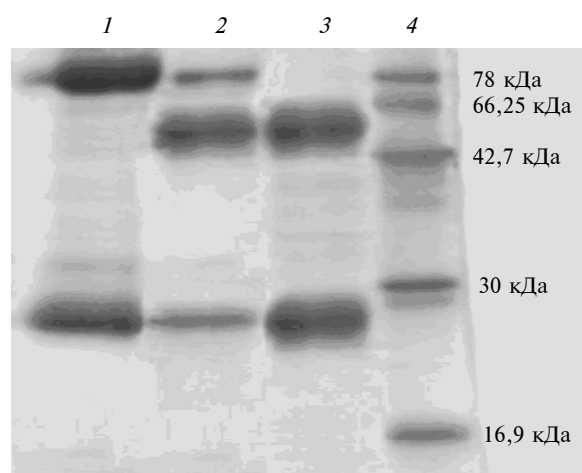


Рис. 3. Електрофореграма фракцій після гель-фільтрації на сефакрилі S-300: 1 – фракція 1-го піку; 2 – фракція 2-го піку; 3 – фракція 3-го піку; 4 – маркери молекулярної маси

Вміст фракцій, отриманих після гель-фільтрації на сефакрилі S-300, досліджували в імунодифузії за Оухтерлоні (рис. 4). Видно, що фракція 1-го піку утворювала лінії преципітації з імунними сироватками до цільних молекул IgM, κ_L - та λ_L -ланцюгів, що підтверджує припущення щодо її вмісту. У той же час фракція 2-го піку утворювала лінії преципітації з сироватками до IgM. Це підтверджує наявність F_c μ -фрагментів у фракції 2-го піку. Слабка лінія преципітації з сироваткою до κ_L -ланцюгів свідчила про недостатню чистоту отриманих F_c μ -фрагментів, пов'язану з наявністю домі-

шок молекул IgM. Фракція 3-го піку давала позитивні реакції аналогічно до фракції першого піку, що підтверджувало припущення щодо вмісту в ній Fc μ - і Fab μ -фрагментів.

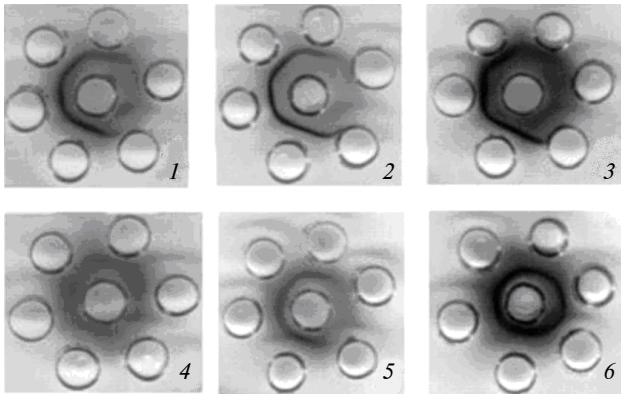


Рис. 4. Імунодифузія за Оухтерлоні фракцій після першого циклу гель-фільтрації; 1-й пік з сироваткою: 1 – до λ_L -ланцюга, 2 – до κ_L -ланцюга, 3 – до IgM; 2-й пік з сироваткою: 4 – до λ_L -ланцюга, 5 – до κ_L -ланцюга, 6 – до IgM

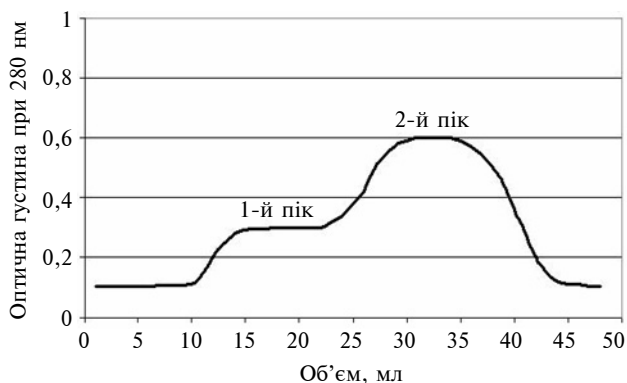


Рис. 5. Гель-фільтрація фракції 2-го піку на сефакрилі S-300: 1-й пік – залишки нефрагментованих IgM; 2-й пік – Fc μ -фрагменти

Отримані експериментальні дані спонукали нас до проведення ще одного циклу гель-фільтрації на сефакрилі S-300 із фракцією 2-го піку (рис. 5). Залишки нефрагментованих імуноглобулінів сходили першими з колонки, утворюючи перший пік. Другий пік формували Fc μ -фрагменти.

Кінцеву перевірку Fc μ -фракції на чистоту проводили, використовуючи імунодифузії за Оухтерлоні. Результати імунодифузії свідчать про те, що отримана фракція Fc μ -фрагментів є достатньо чистою, оскільки не утворює ліній преципітації з сироватками до κ_L - і λ_L -ланцюгів. Чистота отриманих Fc μ -фрагментів була підтверджена також в електрофорезі (рис. 6). У

пробі 1 проявлялася лише індивідуальна смуга, відповідальна за Fc μ -фрагменти. Вихід останніх, після всіх етапів очистки, становив ~15% від початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc μ -фрагментів становила ~95 кДа.

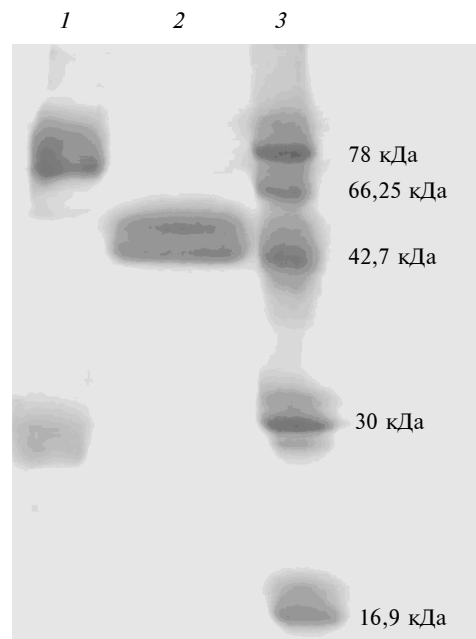


Рис. 6. Електрофореграма фракцій Fc μ -фрагментів та препарату IgM: 1 – препарат IgM; 2 – Fc μ -фрагменти; 3 – маркери молекулярної маси

Висновки

Розроблено удосконалену методику одержання Fc μ -фрагментів IgM людини, яка передбачає:

- папаїновий гідроліз імуноглобулінів у середовищі азоту впродовж 30 хв, що дає можливість досягти максимального виходу Fc μ -фрагментів без їх подальшої деградації;
- виділення та очистки Fc μ -фрагментів двохетапною гель-фільтрацією на сефакрилі S-300;
- контроль чистоти цільового продукту в електрофорезі в ПААГ з ДСН та імунодифузії за Оухтерлоні.

Використання запропонованої схеми дає змогу одержувати Fc μ -фрагменти високого ступеня чистоти. Вихід Fc μ -фрагментів після всіх етапів очистки становив ~15% від початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc μ -фрагментів становила ~95 кДа.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на оптимізацію та удосконалення мето-

дик отримання фрагментів інших класів імуноглобулінів.

1. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. – М.: Мир, 2002. – 592 с.
2. *W. Vains*, Biotechnology from A to Z. Oxford, GB: IRL Press, 1998, 422 pp.
3. *Имунологія: Підручник / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін.; передм. С. Комісаренка; за заг. ред. Є.У. Пастер.* – К.: Вища шк., 2005. – 598 с.
4. *Якобияк М.* Имунологія / Пер. з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.
5. *Иммунология: Практикум / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть.* – К.: Вища шк., 1989. – 304 с.
6. *Антитела. Методы: Кн. 1 / Пер. с англ.; под ред. Д. Кэтти.* – М.: Мир, 1991. – 287 с.
7. *S.-E. Svehag et al.*, “Ultrastructure of papain and pepsin digestion fragments of human IgM globulins”, *J. Exp. Med.*, vol. 130, pp. 691–705, 1969.
8. *G.M. Butchko and F.P. Inman*, “Mercaptan-induced fragmentation of a subunit-like proteolytic fragment of Immunoglobulin M”, *Biochem. J. (Great Britain)*, vol. 127, pp. 801–807, 1972.
9. *K. Onoue et al.*, “Structure of human immunoglobulin M. II. Isolation of a high molecular weight Fc fragment of IgM composed of several Fc subunits”, *J. Immunol.*, vol. 100, pp. 238–244, 1968.
10. *I.D. Wilson*, “Studies on the products of peptic digestion of IgA”, *Immunol.*, vol. 20, pp. 327–339, 1971.
11. *I.V. Nikolayenko et al.*, “Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis”, *Ukrainica Bioorganica Acta*, vol. 2, no. 2, pp. 3–11, 2005.
12. *Hsiao Shu-his and F.W. Putman*, “The cleavage of human g-globulin by papain”, *J. Biol. Chem.*, vol. 236, no 1, pp. 122–135, 1961.
13. *J. Goding*, Monoclonal antibodies. Principles and practice. San Diego: Academic press, 1996, 492 pp.
14. *U.R. Laemmli*, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the of bacteriophage T4”, *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
15. *Михайлов А.Т., Смирский В.Н.* Методы иммунохимического анализа в биологии развития (практическое руководство). – М.: Наука, 1991. – 288 с.
16. *E. Harlow and D. Lane*, Antibodies. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1988, 726 pp.
17. *Иммунологические методы / Под ред. Х. Фримеля.* – М.: Мир, 1979. – 520 с.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
14 липня 2011 року