

УДК 57.083.3:571.27:54.058

DOI: 10.20535/1810-0546.2017.3.104595

О.В. Кравченко<sup>1</sup>, Н.Г. Ракша<sup>2</sup>, Л.К. Івашко<sup>2</sup>, М.О. Абрамова<sup>2</sup>, Л.Б. Орябінська<sup>1\*</sup><sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна<sup>2</sup>ННЦ “Інститут біології та медицини” КНУ ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ВИДІЛЕННЯ ПОЛІКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО КОЛАГЕНУ МЕТОДОМ ІОНООБМІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА КОЛОНЦІ З DEAE-СЕФАРОЗОЮ

**Background.** Development of new methods for isolation and purification of polyclonal antibodies.

**Objective.** Analysis of the efficiency of the ion exchange column with DEAE-Sepharose at isolation of polyclonal antibodies to collagen.

**Methods.** IgG were isolated from precipitated  $\gamma$ -globulin fraction of serum of immunized rabbit by ion exchange chromatography on column with DEAE-Sepharose.

**Results.** It was determined that the IgG output at volume ratio of 4:3 of starting material and the carrier applied to the column is 1.67 times higher than the ratio of 2:3. It is shown that IgG goes out of the column together with the protein that has a molecular weight of about 57–60 kDa. We found that 5.123 mg of IgG with minor impurities of serum proteins is obtained from 30 cm<sup>3</sup> of rabbit's serum.

**Conclusions.** The method of ion exchange chromatography on column with DEAE-Sepharose provides a high yield of IgG with few impurities and can be used as a way of pre-treatment of polyclonal antibodies.

**Keywords:** polyclonal antibodies; collagen; immunization; ion exchange chromatography; DEAE-Sepharose.

### Вступ

Технології, пов'язані з виробництвом і застосуванням антитіл (АТ), інтенсивно розвивалися протягом останніх кількох десятиліть. На сьогодні АТ мають широке як *in vivo*, так і *in vitro* застосування: в імунодіагностиці, для терапевтичних цілей, у фундаментальних наукових дослідженнях, при проведенні моніторингу стану довкілля, для виявлення шкідливих речовин у харчових продуктах тощо [1, 2].

Поліклональна антисироватка, отримана в результаті імунізації тварини, містить у собі антитіла неоднакової специфічності до різних ділянок молекули імуногена. Поліклональні антитіла (ПАТ) мають широке застосування завдяки низці переваг: низька вартість виробництва, відносно швидке отримання, можливість розпізнавання більш ніж одного епітопу полідетермінантних антигенів (АГ) [3, 4].

На сьогодні колаген можна розглядати як добре вивчений білковий АГ. Його аутоантигенну природу розпочали вивчати на фоні розвитку хронічних запальних процесів. Останнім часом імунологічні дослідження були засновані на потребі у специфічних АТ, які можна використовувати як інструменти для характеристики структурних і метаболічних властивостей колагенів [5]. ПАТ, специфічні до різних типів колагену, застосовують для вивчення закономірностей синтезу колагену в культурах клітин, дослідження функ-

ції фібробластів, моніторингу ходу захворювань сполучної тканини, таких як цироз печінки, атеросклероз тощо [6, 7].

У зв'язку з цим на сьогодні актуальним є пошук порівняно недорогих ефективних способів очищення ПАТ, у т.ч. специфічних до колагену. Витрати, пов'язані з процедурою виділення й очищення ПАТ, становлять близько 50–80 % від загальної суми витрат на виробництво. Така тенденція пов'язана насамперед із поширеним використанням дорогих афінних імуносорбентів [1, 8].

Серед сучасних розробок технології виділення і очистки ПАТ окреме місце посідає іонообмінна хроматографія. При використанні іонообмінників зв'язування АТ із носієм відбувається за рахунок електростатичних взаємодій і залежить від ізоелектричної точки молекул імуноглобулінів (Ig), а також від величини рН та іонної сили рухомої фази [9, 10].

Метод іонообмінної хроматографії зазвичай не використовують окремо: перед хроматографічним очищенням проводять осадження  $\gamma$ -глобулінів або по закінченні процесу доочищують ПАТ за допомогою гель-фільтрації чи афінної хроматографії [11, 12].

### Постановка задачі

Мета роботи – проаналізувати доцільність використання іонообмінної хроматографії на DEAE-сефарозі у технології виробництва полі-

\* corresponding author: lbofbt@mail.ru

клональних антитіл, зокрема до колагену. Для досягнення мети було поставлено такі задачі: виділити колаген із вихідної сировини, провести імунізацію кроля згідно з вибраною схемою, отримати сироватку крові та виділити  $\gamma$ -глобулінову фракцію, дослідити ефективність вилучення IgG із фракції  $\gamma$ -глобулінів на колонці з DEAE-сефарозою.

### Матеріали і методи дослідження

*Отримання імуногена.* Колаген отримували кислотною екстракцією з луски риби [6] та ліофілізували. З метою перевірки чистоти препарату колагену проводили електрофорез за Лемлі [13] з використанням 10 %-ного поліакриламідного гелю (ПААГ) за наявності 0,1 % додецилсульфату натрію (ДСН). Для визначення концентрації колагену в отриманому препараті 50 мг ліофілізату розчиняли в 3 см<sup>3</sup> 0,01 н оцтової кислоти. Концентрацію білка визначали методами Лоурі [14], Бредфорда [15] та біуретовим методом [16].

*Імунізація кроля.* Для приготування імуногена 50 мг ліофілізованого колагену розчиняли в 3 см<sup>3</sup> 0,01 н оцтової кислоти та змішували з 2 см<sup>3</sup> повного ад'юванта Фрейнда. Отриманою емульсією імунізували дорослого кроля, що утримувався в умовах віварію ННЦ "Інститут біології та медицини". Під час первинної імунізації імуноген вводили підшкірно послідовними ін'єкціями по 600–800 мкл у 7 точок уздовж хребта на невеликій відстані одна від одної.

Повторну імунізацію проводили через 14 днів. Для цього 50 мг ліофілізованого колагену з луски риби розчиняли в 5 см<sup>3</sup> 0,05 н оцтової кислоти. Ад'ювант при повторній імунізації не використовували. Отриманий розчин вводили кролю внутрішньом'язово у задню лапку.

*Відбір крові й отримання сироватки.* На 14 та 25-й день після проведення первинної імунізації кров із вушної вени кроля відбирали у кількості, що не перевищувала 40 см<sup>3</sup>. Пробірки із зібраною кров'ю та скляною паличкою ставили у термостат при 37 °С на 30–40 хв до утворення згустку. За допомогою скляної палички обережно відділяли згусток від стінок пробірки та центрифугували при 2500–3000 об/хв протягом 30 хв. Супернатант відбирали та змішували з рівним об'ємом насиченого розчину сульфату амонію для осадження  $\gamma$ -глобулінової фракції при 4 °С.

*Знесолення сироватки.* Осаджену насиченим розчином сульфату амонію  $\gamma$ -глобулінову фракцію відділяли центрифугуванням при 5000 об/хв

протягом 15 хв. Супернатант зливали, а осад, що містить Ig, розчиняли у 25 см<sup>3</sup> буфера 0,05 М Tris-HCl, що містить 0,13 М NaCl, з рН 7,4. Цей буфер використовували і для елюції.

Залишки сульфату амонію із фракції Ig видаляли гель-фільтрацією на колонці із сефардексом G-25. Колонку об'ємом 30 см<sup>3</sup> врівноважували 10-кратним об'ємом буферного розчину 0,05 М Tris-HCl з 0,13 М NaCl, рН 7,4. Досліджуваний розчин у кількості, що не перевищувала 25–30 % об'єму колонки, наносили зі швидкістю 4,5 см<sup>3</sup>/хв. Після нанесення досліджуваного розчину через колонку пропускали елюент зі швидкістю 4,5 см<sup>3</sup>/хв. Початок і закінчення виходу імуноглобулінової фракції визначали спектрофотометрично за довжини хвилі  $\lambda = 280$  нм. Елюат збирали та зберігали в холодильнику. Після закінчення елюції колонку промивали 10-кратним об'ємом дистильованої води.

*Виділення IgG на DEAE-сефарозі.* Для очистки фракції IgG від Ig інших класів і залишків супутніх білків сироватки готували та використовували іонообмінну колонку з DEAE-сефарозою ("GE Healthcare", США).

У колонку, закріплену вертикально у штативі, порціями вносили 40–50 см<sup>3</sup> аніонообмінника DEAE-сефарози, промивали 1 М NaCl і давали суспензії осісти, через декілька хвилин відкривали нижній кран і продовжували заповнення колонки, поступово додаючи аніонообмінник. Після цього промивали колонку робочим буфером – 10 мМ Tris + 50 мМ NaCl, рН 8. По закінченні заповнення колонки іоніт ущільнювали поршнем до отримання постійної висоти стовпа гелю. Після цього колонку врівноважували робочим буфером, пропускаючи близько 8 об'ємів колонки.

Знесолену фракцію імуноглобулінів наносили на колонку зі швидкістю 2 см<sup>3</sup>/хв. Промивання з метою отримання незв'язаної фракції проводили робочим буфером, який подавали зі швидкістю 2 см<sup>3</sup>/хв. Незв'язану фракцію, що містить IgG, нейтралізували 1 М розчином Tris-HCl (рН 7,0) з розрахунку 100 мкл розчину на 1 см<sup>3</sup> фракції до встановлення рН у межах 7–9 одиниць. Після виходу фракції IgG проводили елюцію зв'язаної фракції, подаючи елюент зі швидкістю 2 см<sup>3</sup>/хв. Вихід фракцій контролювали спектрофотометрично за довжини хвилі  $\lambda = 280$  нм і кондуктометрично. Після елюції колонку регенерували, пропускаючи 10 об'ємів робочого буфера.

*Електрофорез у ПААГ.* Електрофорез проводили за модифікованою класичною методикою [13] у вертикальній камері з використанням 10 %-ного ПААГ за наявності 0,1 % ДСН. Мо-

дифікація методу полягала в заміні електродного фосфатного буфера на Tris-гліцинову систему: 50 ммоль Tris-HCl (pH 8,6), 0,384 М гліцину, 0,1 % ДСН. Електрофоретичне розділення протеїнів проводили з метою оцінки чистоти отриманого препарату IgG. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували  $\beta$ -меркаптоетанол. Як маркери використовували набір білків ("Pharmacia", Швеція) з відомими молекулярними масами: 97, 66, 45, 31, 21 і 14 кДа. Для візуалізації ділянок, що містять пептиди, гелі забарвлювали у 0,01 %-ному розчині кумасі (KDC-G250).

**Визначення концентрації білка.** Концентрацію білка визначали у вихідній фракції Ig, у фракції IgG, виділеній у результаті проведення іонообмінної хроматографії, та у фракції баластних білків. Визначення концентрації проводили за Бредфордом [15].

### Результати і їх обговорення

Молекула колагену має складну структуру, великі розміри (близько 300 кДа) і декілька різних антигенних доменів, що, в разі використання колагену для імунізації, призводить до утворення АТ, специфічних до різних антигенних детермінант.

Для того щоб отримати препарат специфічних до колагену АТ, насамперед необхідно контролювати чистоту імуногена. Наявність домішок у препараті, яким імунізують тварину, спричинить утворення АТ не тільки до колагену, а й до супутніх домішок. З метою ідентифікації окремих поліпептидних ланцюгів у складі молекули колагену та перевірки чистоти препарату проводили електрофорез за Леммлі [13]. На рис. 1 зображена електрофореграма продуктів розпаду молекул колагену.

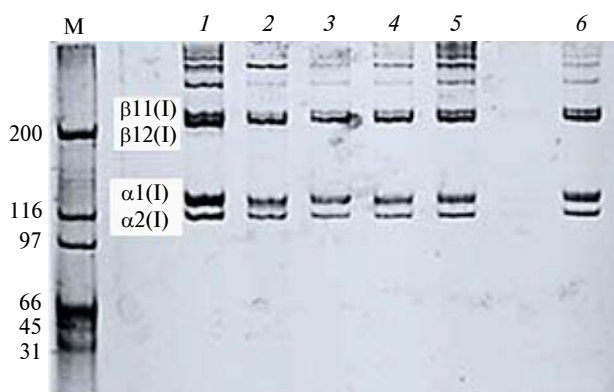


Рис. 1. Електрофореграма зразків колагену, отриманих унаслідок кислотної екстракції з луски риби: М – набір білків-маркерів молекулярної маси; 1–6 – зразки отриманого колагену

Результати проведення електрофорезу виділеного колагену за наявності білків-маркерів молекулярної маси показали, що головними продуктами денатурації є поліпептиди з молекулярними масами 115 та 130 кДа, які відповідають ланцюгам  $\alpha 2(I)$  та  $\alpha 1(I)$ . Присутні поліпептиди з молекулярними масами 215 та 235 кДа відповідають димерам  $\beta 12(I)$  та  $\beta 11(I)$ , які складаються з двох ланцюгів:  $\alpha 1(I)$  та  $\alpha 2(I)$  або  $[\alpha 1(I)]_2$ . У незначній кількості присутні тримери та високомолекулярні поперечно зшиті компоненти, характерні для колагенових фібрил [6].

Як видно з рис. 1, кількість поліпептидів  $\alpha 1(I)$  приблизно вдвічі більша за кількість  $\alpha 2(I)$ . Звідси виходить, що нативна молекула колагену з луски риби складається з двох ланцюгів  $\alpha 1(I)$  та одного ланцюга  $\alpha 2(I)$  і має загальну формулу –  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ . Така структура характерна для колагену I типу у ссавців [6].

Концентрацію колагену в отриманому препараті визначали різними методами: Лоурі, Бредфорда та біуретовим методом. У результаті обчислень прийняли робочу концентрацію розчину колагену, що дорівнює 0,3 мг/см<sup>3</sup>. Достовірність отриманих даних було статистично підтверджено ( $P < 0,05$ ).

Очищений колаген застосовували в процедурах імунізації. Повний ад'ювант Фрейнда використовували лише під час першої імунізації для підвищення імунної відповіді організму тварини. На 11-й день після повторної імунізації відбирали до 40 см<sup>3</sup> крові кроля й отримували сироватку.

До сироватки додавали рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію з метою осадження  $\gamma$ -глобулінової фракції без втрат її імунологічної активності. Молекули IgG, що мають низький ступінь гідратації порівняно з іншими білками сироватки крові, при взаємодії з насиченим розчином солі втрачають гідратну оболонку і випадають в осад. Унаслідок висолювання в осад випадає також значна кількість IgM та IgA. Таким чином, було проведено попередню стадію очистки  $\gamma$ -глобулінової фракції від значної кількості  $\beta$ - і  $\alpha$ -глобулінів, альбумінів та інших компонентів сироватки крові.

Висока концентрація іонів амонію негативно впливає на етапи виділення IgG, тому знесолення розчину  $\gamma$ -глобулінів є важливим етапом у виробництві ПАТ. Сульфат амонію з розчину вилучали за допомогою гелі-хроматографії на колонці із сефадексом G-25, який має великі та жорсткі гранули з дрібними порами. Сефадекс G-25 характеризується діапазоном фракціонування для глобулярних білків у межах 1–5 кДа. Задля отримання

мання найкращого варіанта розділення піків елюцію проводили з високою швидкістю подачі елюенту – 4,5 см<sup>3</sup>/хв. При максимальному використанні об'єму колонки нам вдалося запобігти значному розведенню вихідного розчину – не більш ніж на 15 %.

Вилучення IgG з імуноглобулінової фракції проводили на колонці з DEAE-сефарозою. Молекули IgG характеризуються ізоелектричною точкою в діапазоні рН 6,6–7,6, що дає змогу використовувати як сильні, так і слабкі іонообмінники для виділення Ig цього класу. DEAE-сефароза є слабким аніонообмінником, який повністю заряджений у діапазоні рН 2,0–9,0. Порівняно із сильними аніонітами DEAE-сефароза забезпечує додаткову вибірковість при очищенні розчинів. Для того щоб виділити IgG на DEAE-сефарозі, було підбрано умови, за яких білки, що містяться у вихідному розчині, сходять із колонки поступово при зміні іонної сили буферного розчину.

Колонку з DEAE-сефарозою врівноважували буферним розчином 50 мМ Tris–NaCl з низькою іонною силою та рН 8,0. За таких умов молекули IgG не зв'язуються з аніонообмінником, у той час як Ig інших класів і домішки баластних білків сироватки фіксуються на колонці.

Розчин фракції Ig об'ємом 11 см<sup>3</sup> наносили на колонку, при цьому співвідношення об'єму нанесеного вихідного матеріалу та об'єму носія становило 2:3. Після нанесення колонку відмивали до повного видалення незв'язаних IgG із колонки. Виходу фракції IgG відповідає пік 1 на хроматограмі, зображений на рис. 2.

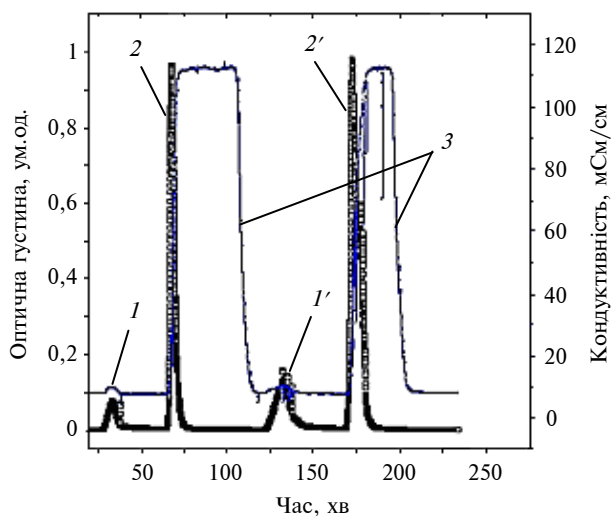


Рис. 2. Хроматограма виділення IgG на колонці з DEAE-сефарозою з використанням градієнта NaCl зі знесолених фракцій Ig: 1 і 1' – фракція, яка, імовірно, містить IgG; 2 і 2' – фракція баластних білків; 3 – зміна кондуктивності, пропорційна зміні іонної сили

Для того щоб зібрати з колонки весь зв'язаний матеріал, що містить баластні білки, елюцію проводили буфером з високою іонною силою – 1 М NaCl. Іони Cl<sup>-</sup> виступають як протиіони, які витісняють зв'язаний білок, взаємодіючи із зарядженою стаціонарною фазою. Як можна побачити з рис. 2, стрімкий ріст іонної сили розчину на виході з колонки, яку контролювали кондуктометрично, збігається з виходом усієї фракції баластних білків (пік 2).

Зіставлення площі хроматографічних піків між собою дає змогу оцінити кількісний склад розділених компонентів. Фракція IgG, за даними розрахунків, становила близько 8,5 % від загальної кількості білка, нанесеного на колонку з DEAE-сефарозою.

Удруге виділення IgG проводили із розчину Ig об'ємом 22 см<sup>3</sup>. Співвідношення об'єму нанесеного вихідного матеріалу та об'єму носія становило 4:3. У результаті проведення іонообмінної хроматографії на DEAE-сефарозі зібрали фракції, яким відповідають пік 1' та пік 2' на рис. 2. Фракція IgG становила близько 14,2 % від загальної кількості білка, нанесеного на колонку. Вихід IgG під час проведення другого експерименту збільшився у 1,67 разу, що свідчить про раціональність використання можливостей колонки при співвідношенні об'ємів нанесеного матеріалу і носія більше 1,0 см<sup>3</sup>/см<sup>3</sup>.

Чистоту отриманих фракцій IgG перевіряли проведенням електрофорезу в 10 %-ному ПААГ за наявності 0,1 % ДСН. Отримана електрофореграма зображена на рис. 3.

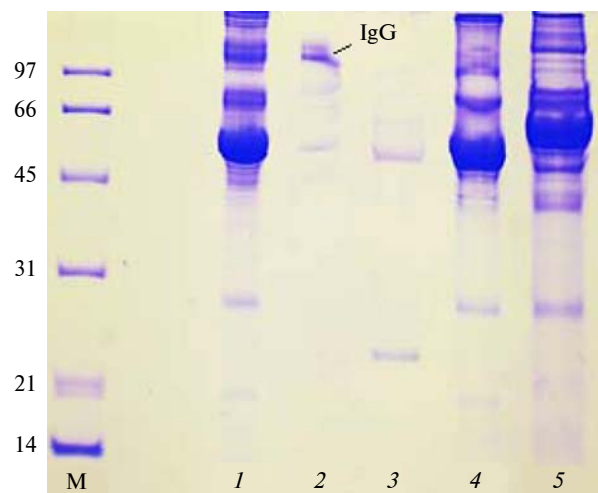


Рис. 3. Електрофореграма протеїнів вихідного матеріалу (1), фракції IgG – невідновленої (2), відновленої (3), фракції баластних білків – невідновленої (4), відновленої (5), очищених на DEAE-сефарозі; М – набір білків-маркерів молекулярної маси

**Таблиця.** Результати визначення кількості білка у фракціях, отриманих під час проведення іонообмінної хроматографії

№ досліду	1			2		
	Вихідна фракція Ig	Фракція баластних білків	Фракція IgG	Вихідна фракція Ig	Фракція баластних білків	Фракція IgG
Об'єм, см <sup>3</sup>	11	13	7,5	22	22	20
OD	0,105	0,084	0,01	0,1	0,078	0,027
Концентрація, мг/см <sup>3</sup>	0,875	0,7	0,083	0,833	0,65	0,225
Кількість білка, мг	9,625	9,1	0,623	18,33	14,3	4,5

Як видно з рис. 3, електрофоретичний профіль фракції баластних білків (треки 4 і 5) порівняно з вихідним матеріалом (трек 1) майже повністю позбавлені смуг на рівні 150 кДа, що відповідають молекулам IgG. Це свідчить про високий ступінь виснаження фракції  $\gamma$ -глобулінів від молекул IgG.

Фракції IgG у невідновлених умовах (трек 2) співвідносні смуги на рівні 150 кДа. Проте, як видно з рис. 3, фракція містить домішки білків з молекулярною масою близько 57–60 кДа. Відновлений зразок (трек 3) має смуги на рівні 55 і 25 кДа, що відповідають важким і легким ланцюгам IgG.

З метою розрахунку кількості виділеного IgG визначали концентрацію білка методом Бредфорда у зразках, відібраних під час проведення іонообмінної хроматографії на DEAE-сефарозі. Результати розрахунків зведені в таблицю.

При проведенні вилучення IgG з  $\gamma$ -глобулінової фракції методом іонообмінної хроматографії на DEAE-сефарозі при співвідношенні об'єму нанесеного на колонку вихідного матеріалу та об'єму носія 4:3 спостерігався високий вихід цільового продукту – 4,5 мг білка. Натомість при менш ефективному використанні колонки, що

мало місце під час проведення першого досліду, було отримано 0,623 мг білка.

Одержаний нами препарат IgG можна доочистити за допомогою гель-фільтрації на сефардексі G-75 або афінної хроматографії з використанням специфічних лігандів.

### Висновки

Визначено, що ефективним об'ємним співвідношенням нанесеного на колонку вихідного матеріалу і носія є 4:3, яке забезпечує у 1,67 разу вищий вихід цільового продукту, ніж співвідношення 2:3.

За допомогою колонки з DEAE-сефарозою з 30 см<sup>3</sup> вихідної сироватки імунізованого кроля отримано 5,123 мг IgG з домішками білків, що мають молекулярну масу близько 57–60 кДа.

Доведено, що метод іонообмінної хроматографії на DEAE-сефарозі дає змогу при невеликих затратах ефективно виснажити  $\gamma$ -глобулінову фракцію і отримати високий вихід IgG з невеликим вмістом домішок. Таким чином, цей метод може бути використаний як спосіб попередньої очистки ПАТ.

### Список літератури

1. Low D., O'Leary R., Pujar N.S. Future of antibody purification // J. Chromatography B. – 2007. – **848**, № 1. – P. 48–63.
2. Newcombe C., Newcombe A.R. Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics // J. Chromatogr. B. – 2007. – **848**, № 1. – P. 2–7.
3. Production of polyclonal antibody against grapevine fanleaf virus movement protein expressed in *Escherichia coli* / D. Koolivand, N.S. Bashir, S.A. Behjatnia, R.J. Joozani // Plant Pathol. J. – 2016. – **32**, № 5. – P. 452–459.
4. Purification and characterization of anti-pneumococcal capsular polysaccharide IgG immunoglobulins / A.R. Parker, E. Lock, A. Iftikhar et al. // Clin. Biochem. – 2017. – **50**, № 1-2. – P. 80–83.
5. Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2004. – **71**, № 2. – P. 343–354.
6. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollack (*Theragra chalcogramma*) / M. Yan, B. Li, X. Zhao et al. // Food Chem. – 2008. – **107**, № 4. – P. 1581–1586.
7. Wangerin K., Wottge H.-U. Immunological reactions against collagen // Eur. J. Plast. Surg. – 1994. – **17**. – P. 287–291.

8. Bak H., Thomas O.R.T. Evaluation of commercial chromatographic adsorbents for the direct capture of polyclonal rabbit antibodies from clarified antiserum // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – **848**, № 1. – P. 116–130.
9. Grodzki A.C., Berenstein E. Antibody purification: Ion-exchange chromatography // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – **588**. – P. 27–32.
10. Ion exchange chromatography of antibody fragments / A. Ljunglof, K.M. Lacki, J. Mueller et al. // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – **96**, № 3. – P. 515–525.
11. Ko K.Y., Ahn K.Y. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography // *Poultry Sci.* – 2007. – **86**, № 2. – P. 400–407.
12. Qin Z., Chen T., Li R. Purification of immunoglobulin and serum albumin from serum via strong anion exchange chromatography coupled with molecular exclusion chromatography // *Se Pu.* – 2012. – **30**, № 8. – P. 851–855.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
14. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1952. – **193**. – P. 265–275.
15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**, № 1-2. – P. 248–254.
16. Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // *J. Biol. Chem.* – 1949. – **177**. – P. 751–756.

## References

- [1] D. Low *et al.*, “Future of antibody purification”, *J. Chromatogr. B*, vol. 848, no. 1, pp. 48–63, 2007. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.10.033
- [2] C. Newcombe and A.R. Newcombe, “Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics”, *J. Chromatogr. B*, vol. 848, no. 1, pp. 2–7, 2007. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.004
- [3] D. Koolivand *et al.*, “Production of polyclonal antibody against grapevine fanleaf virus movement protein expressed in *Escherichia coli*”, *Plant Pathol. J.*, vol. 32, no. 5, pp. 452–459, 2016. doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2016.0031
- [4] A.R. Parker *et al.*, “Purification and characterization of anti-pneumococcal capsular polysaccharide IgG immunoglobulins”, *Clin. Biochem.*, vol. 50, no. 1-2, pp. 80–83, 2017. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.08.009
- [5] A.K. Lynn *et al.*, “Antigenicity and immunogenicity of collagen”, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 71, no. 2, pp. 343–354, 2004. doi: 10.1002/jbm.b.30096
- [6] M. Yan *et al.*, “Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollack (*Theragra chalcogramma*)”, *Food Chem.*, vol. 107, no. 4, pp. 1581–1586, 2008. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.10.027
- [7] K. Wangerin and H.-U. Wottge, “Immunological reactions against collagen”, *Eur. J. Plast. Surg.*, vol. 17, pp. 287–291, 1994. doi: 10.1007/BF00181093
- [8] H. Bak and O.R.T. Thomas, “Evaluation of commercial chromatographic adsorbents for the direct capture of polyclonal rabbit antibodies from clarified antiserum”, *J. Chromatogr. B*, vol. 848, no. 1, pp. 116–130, 2007. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.003
- [9] A.C. Grodzki and E. Berenstein, “Antibody purification: Ion-exchange chromatography”, *Methods Mol. Biol.*, vol. 588, pp. 27–32, 2010. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0\_4
- [10] A. Ljunglof, “Ion exchange chromatography of antibody fragments”, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 96, no. 3, pp. 515–525, 2007. doi: 10.1002/bit.21124
- [11] K.Y. Ko and K.Y. Ahn, “Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography”, *Poultry Sci.*, vol. 86, no. 2, pp. 400–407, 2007. doi: 10.1093/ps/86.2.400
- [12] Z. Qin *et al.*, “Purification of immunoglobulin and serum albumin from serum via strong anion exchange chromatography coupled with molecular exclusion chromatography”, *Se Pu*, vol. 30, no. 8, pp. 851–855, 2012. doi: 10.3724/SP.J.1123.2012.04002
- [13] U.K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970. doi: 10.1038/227680a0
- [14] O.H. Lowry *et al.*, “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *J. Biol. Chem.*, vol. 193, pp. 265–275, 1952.
- [15] M.M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [16] A.G. Gornall *et al.*, “Determination of serum proteins by means of the biuret reaction”, *J. Biol. Chem.*, vol. 177, pp. 751–756, 1949.

О.В. Кравченко, Н.Г. Ракша, Л.К. Івашко, М.О. Абрамова, Л.Б. Орябінська

ВИДІЛЕННЯ ПОЛІКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО КОЛАГЕНУ МЕТОДОМ ІОНООБМІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА КОЛОНЦІ З DEAE-СЕФАРОЗОЮ

**Проблематика.** Розробка нових методів виділення та очистки поліклональних антитіл.

**Мета дослідження.** Аналіз ефективності використання іонообмінної колонки з DEAE-сефарозою при виділенні поліклональних антитіл до колагену.

**Методика реалізації.** З осажденої  $\gamma$ -глобулінової фракції сироватки крові імунізованого кроля виділяли IgG методом іонообмінної хроматографії на колонці з DEAE-сефарозою.

**Результати дослідження.** Визначено, що вихід IgG за об'ємного співвідношення нанесеного на колонку вихідного матеріалу і носія 4:3 у 1,67 разу вищий, ніж за співвідношення 2:3. Показано, що одночасно з IgG за вибраних умов проведення експерименту з колонки виходить білок, що має молекулярну масу близько 57–60 кДа. Встановлено, що з 30 см<sup>3</sup> сироватки кроля отримано 5,123 мг IgG з незначними домішками білків сироватки.

**Висновки.** Метод іонообмінної хроматографії на колонці з DEAE-сефарозою дає змогу отримати високий вихід IgG із незначною кількістю домішок і може бути використаний як спосіб попередньої очистки поліклональних антитіл.

**Ключові слова:** поліклональні антитіла; колаген; імунізація; іонообмінна хроматографія; DEAE-сефароза.

Е.В. Кравченко, Н.Г. Ракша, Л.К. Івашко, М.А. Абрамова, Л.Б. Орябинская

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К КОЛЛАГЕНУ МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА КОЛОНКЕ С DEAE-СЕФАРОЗОЙ

**Проблематика.** Разработка новых методов выделения и очистки поликлональных антител.

**Цель исследования.** Анализ эффективности использования ионообменной колонки с DEAE-сефарозой при выделении поликлональных антител к коллагену.

**Методика реализации.** Из осажденной  $\gamma$ -глобулиновой фракции сыворотки крови иммунизированного кролика выделяли IgG методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой.

**Результаты исследования.** Определено, что выход IgG при объемном соотношении нанесенного на колонку исходного материала и носителя 4:3 в 1,67 раза выше, чем при соотношении 2:3. Показано, что одновременно с IgG при выбранных условиях проведения эксперимента с колонки выходит белок, имеющий молекулярную массу около 57–60 кДа. Установлено, что с 30 см<sup>3</sup> сыворотки кролика получено 5,123 мг IgG с незначительными примесями белков сыворотки.

**Выводы.** Метод ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой позволяет получить высокий выход IgG с незначительным количеством примесей и может быть использован как способ предварительной очистки поликлональных антител.

**Ключевые слова:** поликлональные антитела; коллаген; иммунизация; ионообменная хроматография; DEAE-сефароза.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Надійшла до редакції  
08 квітня 2017 року