



УДК 577.27:57.083.33:543.54

Удосконалення методики отримання Fc-фрагментів IgA людини

О.Ю. Галкін¹, Ю.В. Горшунів², В.Ф. Соловйова³

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна

³Український науково-дослідний інститут харчування, біотехнології та фармації, Київ, Україна

Мета статті – висвітлити удосконалення методики отримання та виділення Fc-фрагментів IgA людини. Для цього оптимізовано умови гідролізу імуноглобулінів із подальшим виділенням і очищенням Fc-фрагментів. Розроблено удосконалену методику одержання Fc-фрагментів IgA людини, яка передбачає папаїновий гідроліз імуноглобулінів у середовищі азоту упродовж 4 год, що дозволяє досягти максимального виходу Fc-фрагментів без їх подальшої деградації, виділення та очищення Fc-фрагментів IgA шляхом одноетапної гель-фільтрації на сефадексі G-100, контроль чистоти цільового продукту в електрофорезі у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та імунодифузії за Оухтерлоні. Застосування запропонованої схеми дозволяє одержувати Fc-фрагменти IgA людини високого ступеня чистоти. Вихід Fc-фрагментів після всіх етапів очищення склав близько 18% початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc-фрагментів IgA людини склала близько 70 кДа.

Ключові слова: IgA людини; Fc-фрагменти; фрагментація; папаїн; гель-фільтрація; електрофорез

Improvement of the method of obtaining human IgA Fc-fragments

O.Y. Galkin¹, Y.V. Gorshunov², V.F. Solovjova³

¹National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

²Research and Design Institute of Urban Planning, Kyiv, Ukraine

³Ukrainian Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Pharmacy, Kyiv, Ukraine

To address a number of fundamental and applied problems in immunology, molecular and cellular biology and biotechnology it is necessary to obtain Fc-fragments of immunoglobulins. Fc-fragments may be used for studying of the effector functions of antibodies which are mediated by these areas. They are often used as an immunogen to produce anti-specie (based on so-called secondary antibody) conjugate in the development of serological tests for diagnostics (predominantly such conjugate based on monoclonal antibodies). The work is aimed to develop improved methods of obtaining and allocation of Fc-fragments of human IgA. To achieve this objective, optimization of hydrolysis of IgA with subsequent purification of Fc-fragments have been carried out. Improved method of obtaining Fc-fragments of IgA provides: papain hydrolysis of immunoglobulin in the environment of nitrogen for 4 h, allowing to achieve maximum output of Fc-fragments without their further degradation: isolation and purification of Fc-fragments of human IgA by one-stage gel filtration on sephadex G-100; control of purity of the target product by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate and Ouchterlony immunodiffusion. Enzymatic hydrolysis was carried out at the optimal temperature of papain (37 °C). As the oxygen in the air may have inhibitory effect on enzymatic hydrolysis reaction, the reaction mixture was incubated in the nitrogen atmosphere to prevent inactivation of papain. To reduce the incident degradation of immunoglobulin molecules, papain hydrolysis was carried out without using an enzyme activator (cysteine). Usage

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», пр. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Peremohy Ave., 37, Kyiv, 03056, Ukraine
Tel.: +380-67-234-86-42. E-mail: alexfbt@mail.ua

Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, вул. Урицького, 35, Київ, 03035, Україна
Research and Technology Institute of Urban Development, Urytskogo Str., 35, Kyiv, 03035, Ukraine
Tel.: +380-44-502-79-00. E-mail: alexfax@mail.ru

Український науково-дослідний інститут харчування, біотехнології та фармації, вул. Чигоріна, 18, Київ, 01042, Україна
Ukrainian Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Pharmacy, Chygorina Str., 18, Kyiv, 01042, Ukraine
Tel.: +380-44-284-53-65. E-mail: soloviova_yvv@mail.ru

of the proposed scheme allows obtaining Fc-fragments of human IgA of high purity. Outcome of Fc-fragments after all stages of purification was about 18% of the initial amount of IgA in the preparation. Molecular weight from Fc-fragments of human IgA was equal to approximately 70 kDa.

Keywords: human IgA; Fc-fragments; fragmentation; papain; gel filtration; electrophoresis

Вступ

До імуноглобулінів належать білки тварин і людини, які мають активність антитіл, а також імуноглобулінові рецептори лімфоцитів та білки, подібні до антитіл за хімічною структурою та антигенною специфічністю – мієломні білки, білки Бенс-Джонса та субодиниці імуноглобулінів. Первинна функція антитіл – взаємодія з комплементарною структурою антигену – антигенною детермінантою, а вторинні (ефекторні) – фіксація комплексу, опсонізувальний вплив, цитотоксична, імунорегуляторна дії тощо (Delves et al., 2011). Структурні ділянки молекул імуноглобулінів, відповідальні за ефекторну активність, просторово віддалені від антигензв'язувальних центрів і містяться, головним чином, у Fc-області. Ізотипова мінливість молекул імуноглобулінів також зумовлена антигенними детермінантами Fc-фрагментів (Yakobysyak, 2004).

Для виконання низки фундаментальних та прикладних завдань імунології, молекулярної та клітинної біології та біотехнології виникає потреба в одержанні Fc-фрагментів імуноглобулінів. Наприклад, Fc-фрагменти можливо застосовувати для вивчення ефекторних функцій імуноглобулінів, які опосередковані даними областями. Часто їх використовують як імуноген для одержання антивидового кон'югату (у тому числі на основі моноклональних антитіл) під час розроблення тестів для серологічної діагностики. Отримані при розщепленні імуноглобулінів Fc-фрагменти можливо використовувати також для аналізу антивидових моноклональних антитіл, одержання імуоафінних сорбентів. Аналіз літературних даних свідчив про наявність декількох підходів до розщеплення IgA людини ферментами з метою отримання відповідних Fc-фрагментів. Найчастіше вони базуються на використанні папаїну (Paster et al., 1989), також застосовується пепсин та трипсин (Ketti, 1991). Папаїнова фрагментація дозволяє отримати стабільніші результати (Wilson, 1971; Beale, 1985; Josi and Lim, 2001). Незважаючи на велику кількість модифікацій методики, значна частина з них погано відтворюється, часто бракує достовірних способів контролю за ферментативним розщепленням. Дані різних авторів у багатьох випадках містять суттєві розбіжності.

Мета цієї статті – висвітлити удосконалення методики отримання та виділення Fc-фрагментів IgA людини.

Матеріал і методи досліджень

Препарат IgA людини отримано згідно з методикою (Nikolaenko et al., 2005). Чистота препарату перевірена за допомогою імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН). IgA переводили у реакційний буферний розчин гель-фільтрацією на колонці 1,5 × 20 см із сефадексом G-25. Колонку зрівноважували 0,1 М фосфатним буфером з рН 7,0, який містив 0,001 М

цистеїну та 0,001 М ЕДТА (Svehag et al., 1969). Концентрацію одержаних після гель-фільтрації IgA вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 280 нм (Paster et al., 1989). Уміст імуноглобулінів додали реакційним буфером до 10 мг/мл.

Папаїновий гідроліз IgA людини. Для проведення ферментативного розщеплення використано папаїн (Sigma, США) у вигляді кристалічної суспензії в 0,05 М ацетатному буфері з рН 4,5 із додаванням 0,01% тимоли. Реакцію розщеплення проводили у 0,01 М фосфатному буфері, рН 6,5, який містив 0,002 М Na₂-ЕДТА. У реакційну суміш на 100 мг IgA вносили 1 мг папаїну та інкубували за 37 °С в атмосфері азоту для запобігання інактивації папаїну киснем повітря. З метою віднаходження оптимального часу інкубування з реакційної суміші відбирали проби через 30 хв, 1, 2, 4 та 6 год. від початку реакції. Ферментативний гідроліз у пробах зупиняли шляхом їх заморожування.

Гель-фільтрація. Використовували колонку із сефадексом G-100, розмірами 1,0 × 100 см, яку переводили у 0,05 М фосфатний буфер із 0,15 М NaCl із 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 за довжини хвилі 280 нм (Paster et al., 1989).

Електрофорез проводили у вертикальній камері у 15% ПААГ за присутності ДСН (Laemmli, 1970). Як маркери молекулярної маси (ММ) застосовували овотрансферин (78,0 кДа), альбумін (66,3 кДа), овальбумін (42,7 кДа), карбоангідразу (30,0 кДа), міоглобін (16,9 кДа) (Sigma, США). Білки у гелі фарбували Coomassie Blue R-250.

Імунодифузія за Оухтерлоні. Імунодифузію проводили в 1,25% агарозному гелі, приготованому на боратному буфері (рН 8,6). Використано моноспецифічні сироватки проти імуноглобуліну людини, λ_1 - та κ_1 -ланцюгів імуноглобулінів (Предприятие по производству бактериальных препаратов Центрального НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Росія). У центральні лунки вносили імунні сироватки, у периферійні – розчин антигену у серійних розведеннях. Для фарбування та фіксації гелю брали розчин амідочорного. Відмивання проводили 2% розчином оцтової кислоти (Mihaylov and Simirskiy, 1991).

Результати та їх обговорення

Оскільки, за даними різних авторів (Wilson, 1971; Beale, 1985; Josi and Lim, 2001), більш відтворювані результати одержують при папаїновому гідролізі імуноглобулінів, ми обрали саме даний варіант ферментативного розщеплення IgA людини. На першому етапі визначали оптимум часу інкубування IgA з папаїном. Температурний оптимум гідролітичної активності папаїну складає близько 37 °С (Ketti, 1991), тому інкубацію IgA людини та ферменту проводили саме за цієї температури.

ри. Оскільки кисень повітря може чинити інгібувальний вплив на реакцію ферментативного гідролізу (Galkin, 2012), реакційну суміш інкубували в атмосфері азоту для запобігання інактивації папаїну. За даними різних авторів (Harlow and Lane, 1988; Goding, 1996), задля зменшення неконтрольованої деградації молекул імуноглобулінів їх папаїновий гідроліз краще проводити без використання активатора ферменту – цистеїну. Дані різних авторів щодо оптимального часу такого протеолізу відчутно різняться (Wilson, 1971; Beale, 1985; Harlow and Lane, 1988; Goding, 1996; Josi and Lim, 2001). Відтак із метою віднаходження оптимального часу інкубування з реакційної суміші відбирали проби через 30 хв, 1, 2, 4 та 6 год. від початку постановки реакції. Ферментативний гідроліз у пробах зупиняли шляхом їх заморожування. Процес ферментативного гідролізу контролювали за допомогою вертикального електрофорезу у ПААГ з ДСН (рис. 1).

У редуруючих умовах імуноглобуліни розпадалися на важкі (H) та легкі (L) ланцюги, формуючи дві чіткі смуги на рівні 55 і 25 кДа. На електрофореграмі проб із реакційної суміші з'являлися ще дві смуги – на рівні 35 кДа (відповідає Fc-фрагментам важких ланцюгів IgA₁) та 20 кДа (відповідає фрагменту важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH). Коли збільшували час інкубації з папаїном до 6 год., поступово зникала смуга, зумовлена присутністю важких ланцюгів. Це підтверджувало перебіг фрагментації імуноглобулінів. Зважаючи на ту обставину, що збільшення часу гідролізу понад 4 год. не викликає значного збільшення виходу Fc-фрагментів і зростає ймовірність утворення низькомолекулярних фрагментів унаслідок подальшого гідролізу отриманих фрагментів імуноглобуліну (Galkin, 2012), прийнято рішення проводити розщеплення IgA протягом 4 год.

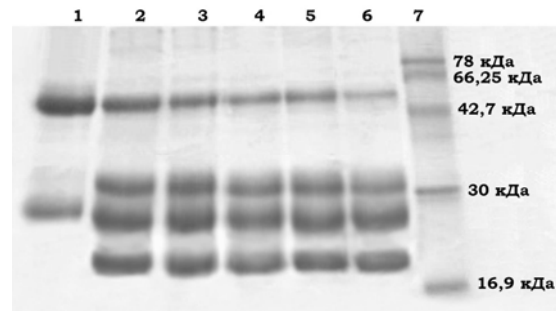


Рис. 1. Електрофореграма проб із реакційної суміші та нативного IgA людини:
1 – препарат IgA; 2, 3, 4, 5, 6 – проби, відібрані з реакційної суміші відповідно через 30 хв, 1, 2, 4 та 6 год. після початку розщеплення; 7 – маркери ММ

Після фрагментації IgA проводили виділення та очищення Fc-фрагментів IgA. Це завдання виконували послідовним вилученням Fab-фрагментів, мономерних Fc-фрагментів IgA людини. За даними літератури та власним досвідом (Goding, 1996), у цьому випадку ефективніше застосовувати гель-фільтрацію. Отже, після 4 год. ферментативного гідролізу реакційну суміш пропускали через колонку із сефадексом G-100 (рис. 2). Як видно із хроматограми, реакційна суміш розділилася на шість фракцій. Першими з колонки мали виходити нефрагментовані IgA, які мають найбільшу ММ – 160 кДа, другий пік, імовірно, утворювали Fc-фрагменти IgA із ММ близько 70 кДа, третій – два легкі ланцюги IgA₂ ММ 50 кДа, четвертий – Fab-фрагменти IgA₁ та IgA₂ ММ близько 45 кДа, п'ятий – частина важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH ММ близько 20 кДа. Шостий пік формували, імовірно, низькомолекулярні фрагменти, що є продуктами небажаної фрагментації імуноглобулінів.

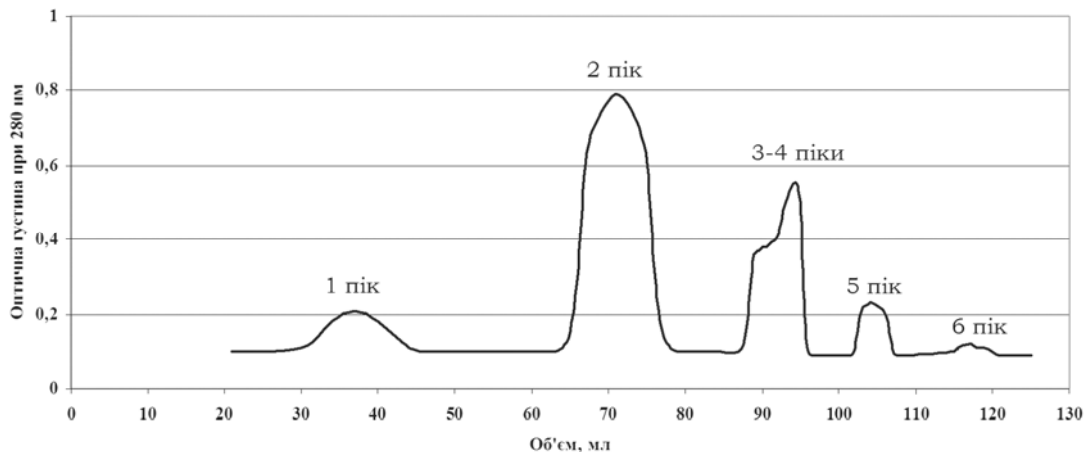


Рис. 2. Гель-фільтрація реакційної суміші на сефадексі G-100

Для аналізу перших трьох фракцій застосовано вертикальний електрофорез у ПААГ із ДСН (рис. 3). Як видно з електрофореграми, фракції першого піка відповідають дві смуги на рівні 55 та 25 кДа, які утворені, відповідно, важкими (H) та легкими (L) ланцюгами IgA. Фракції другого піка утворювали одну смугу на рівні 35 кДа, що відповідає молекулярній масі Fc-фрагментів IgA. Об'єднана фракція третього та четвертого піків утворювала дві близькі за молекулярною масою смуги на рівні

20–25 кДа, що співвідноситься з припущенням щодо їх вмісту (легкі ланцюги IgA₂ та Fab-фрагменти IgA). Фракція п'ятого піку формувала одну смугу на рівні 20 кДа, що підтверджувало наше припущення щодо вмісту даної фракції (частина важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH).

Вміст фракцій, отриманих після гель-фільтрації, досліджували також за допомогою імунодифузії. Фракція першого піка утворювала лінії преципітації з

імуниними сироватками до цільних молекул IgA, λ_1 - та κ_1 -ланцюгів, що додатково підтверджує припущення щодо її вмісту (нефрагментовані IgA). У той же час фракція другого піку утворювала лінії преципітації лише із сироваткою до цільної молекули IgA. Це підтверджує наявність Fc-фрагментів IgA у фракції другого піка. Фракція третього та четвертого піків давала позитивні реакції аналогічно до фракції першого піка, що підтверджувало припущення щодо вмісту у ній легких ланцюгів IgA₂ та Fab-фрагментів IgA. Фракція п'ятого піка проявляла імунологічну активність, аналогічну фракції другого піка, проте інтенсивність лінії преципітації була помітно меншою, що підтверджувало присутність у даній фракції антигенних детермінант важкого ланцюга та свідчило про коректність висловлених нами припущень щодо вмісту у даній фракції частини важкого ланцюга IgA₂, що містить домени CH₁-VH.

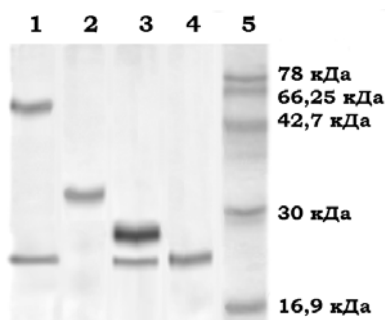


Рис. 3. Електрофореграма фракцій після гель-фільтрації реакційної суміші на сефадексі G-100:
1 – фракція першого піка; 2 – фракція другого піка; 3 – фракція третього та четвертого піків; 4 – фракція п'ятого піка; 5 – маркери ММ

Чистота отриманих Fc-фрагментів IgA була задовільною вже після першого етапу очищення, а вихід останніх після всіх етапів очищення склав близько 18% початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc-фрагментів IgA склала близько 70 кДа.

Висновки

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

- папаїновий гідроліз імуноглобулінів у середовищі азоту упродовж 4 год., що дозволяє досягти максимального виходу Fc-фрагментів без їх подальшої деградації;
- виділення та очищення Fc-фрагментів IgA шляхом одноетапної гель-фільтрації на сефадексі G-100;

– контроль чистоти цільового продукту в електрофорезі в ПААГ з ДСН та імунодифузії за Оухтерлоні.

Застосування запропонованої схеми дозволяє одержувати Fc-фрагменти IgA людини високого ступеня чистоти. Вихід Fc-фрагментів після всіх етапів очищення склав близько 18% початкової кількості імуноглобулінів у препараті. Молекулярна маса одержаних Fc-фрагментів IgA людини склала близько 70 кДа.

Бібліографічні посилання

- Beale, D., 1985. Differences in fragmentation between bound and unbound bovine secretory component suggest a model for its interaction with polymeric immunoglobulin. *Biochem J.* 229(3), 759–763.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M., 2011. *Essential Immunology*, 12th Edition. Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Galkin, O.Y., 2012. Rozroblennya udoskonalenoyi metodyky otrymannya Fc-frahmentiv IgM lyudyny [Developing of improved method of obtaining of human IgM Fc-fragments]. *Research Bulletin of National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"* 3, 7–11 (in Ukrainian).
- Goding, J., 1996. *Monoclonal antibodies. Principles and practice.* Acedemic press, San Diego.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.
- Josi, D., Lim, Y.P., 2001. Analytical and preparative methods for purification of antibodies. *Food Technol. Biotechnol.* 39(3), 215–226.
- Ketti, D., 1991. *Antitela. Metodyi: Kniga 1* [Antibodies. Methods: Book 1]. Mir, Moscow (in Russian).
- Laemmli, U.R., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- Mihaylov, A.T., Simirskiy, V.N., 1991. *Metodyi immunohimicheskogo analiza v biologii razvitiya* [Immunoassay methods in developmental biology]. Nauka, Moscow (in Russian).
- Nikolayenko, I.V., Galkin, O.Y., Grabchenko, N.I., Spivak, M.Y., 2005. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta* 2(2), 3–11.
- Paster, E.U., Ovod, V.V., Pozur, V.K., Vykhod', N.E., 1989. *Immunologiya: Praktikum* [Immunology: Workshop]. Vyisshaya Shkola, Kiev (in Russian).
- Svehag, S.E., Bloth, B., Seligmann, M., 1969. Ultrastructure of papain and pepsin digestion fragments of human IgM globulins. *J. Exp. Med.* 130(4), 691–705.
- Wilson, I.D., 1971. Studies on the products of peptic digestion of IgA. *Immunol.* 20, 327–339.
- Yakobysyak, M., 2004. *Imunolohiya* [Immunology]. Nova Knyha, Vinnytsya (in Ukrainian).

Надійшла до редколегії 21.02.2015