

УДК 591.111.8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ПАПАИНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ IgG ЧЕЛОВЕКА

Ширяев Н.В., Ширяев В.В., Ефименко А.М., Лузин А.В.

Современная история изучения структуры и функции иммуноглобулинов наполнена многочисленными важными открытиями. Большую гордость для нас представляет вклад крымской биохимической школы в исследование иммуноглобулинов. Так, Г.В. Троицкий впервые сделал вывод о широкой распространённости β -складчатых структур в составе глобулярных белков, в том числе и иммуноглобулинов [1].

Наши исследования касались взаимодействия иммуноглобулинов с амфифильными лигандами. Однако для их проведения необходимо было получить высокочистые препараты папаиновых фрагментов иммуноглобулинов человека, свободные не только от примесей друг друга, но и от примесей цельных иммуноглобулинов. В связи с этим целью работы было создание методики разделения папаиновых фрагментов поликлональных иммуноглобулинов G человека с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-трисакрилом М.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поликлональные IgG сыворотки крови человека выделялись из смеси сывороток крови от 50 здоровых доноров. Смесь сывороток осаждали 17,5%-ным сернокислым аммонием и центрифугировали при 6000 g в течение 30 минут. Осадок растворяли в дистиллированной воде и диализовали против 0,025 М трис-HCl буферного раствора, pH=8,8, содержащего 0,035 М NaCl.

Выделение иммуноглобулинов осуществлялось методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-трисакриле М (ЛКВ, Швеция). Раствор белка, осажденного не более, чем из 6 мл исходной сыворотки, вносился на колонку объёмом 50 мл. Элюат собирался порциями по 3,5 мл. Концентрацию белка в элюате определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре СФ-26. Чистоту полученных поликлональных IgG определяли с помощью диск-электрофореза в 7,5% -ном полиакриламидном геле.

Поликлональные IgG человека использовались для получения F_{ab}- и F_c-фрагментов. Для этого проводился папаиновый гидролиз [2] с использованием папаина фирмы "Sigma", США, в соотношении папаин: IgG = 1:20. К 80 мг поликлонального IgG человека, растворённым в 6 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH=7,0, содержащего 0,002 М Na₂-ЭДТА, добавлялось 11 мг цистеин-HCl и 4 мг

меркурипапаина. Инкубация проводилась в течение одного часа при +37°C. Реакция останавливалась добавлением 720 мкл 0,1 М раствора иодацетамида, после чего раствор центрифугировали 15 минут при 6000 g.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное выделение папаиновых фрагментов IgG человека проводилось по оригинальной, разработанной нами методике.

Отделение F_{ab}- и F_c-фрагментов от нерасщепленных IgG достигалось с помощью гель-фильтрации путём пропускания смеси IgG и их фрагментов в забуференном физрастворе (0,005 М фосфатный буфер, pH=7,4, содержащий 0,15 М NaCl) через колонку с ультрагелем AcA44 (LKB, Швеция) для разделения молекул с M = 10000 – 130000. Нерасщепленные IgG человека сходили с колонки первым пиком, тогда как смесь F_{ab}- и F_c-фрагментов образовывала второй пик, подвергавшийся концентрированию и дальнейшей ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-трисакрилом М. Скорость папаинового гидролиза и результаты гель-фильтрации контролировали методами электрофореза (при необходимости – в градиенте полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия).

Чистоту полученных препаратов F_{ab}- и F_c-фрагментов определяли по методике твердофазного иммуноферментного анализа: для детекции F_{ab}-фрагментов использовали разработанные ранее мышиные моноклональные антитела IgG1 3H2, специфичные к α-цепям иммуноглобулинов человека, а для детекции F_c-фрагментов – мышиные моноклональные антитела HP 6069 к F_c-фрагментам IgG1 человека (Calbiochem, Канада).

Изолированную смесь F_{ab}- и F_c-фрагментов диализовали против 0,025 М трис-HCl буферного раствора без NaCl, pH=8,8, а затем вносили на колонку с ДЭАЭ-трисакрилом М. Элюцию проводили равными объемами того же буферного раствора с возрастающим содержанием NaCl: первый объем без NaCl, последующие с 0,035 М, 0,057 М и 1,000 М NaCl (рис. 1).

В результате было получено шесть белковых пиков, из которых с учетом данных электрофореза три были проанализированы на наличие F_{ab}- и F_c-фрагментов с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты иммуноферментного анализа приведены на рис. 2. В качестве положительного контроля использовался исходный поликлональный IgG. Показано, что пик I содержал исключительно F_{ab}-фрагменты, пик IV содержал F_c-фрагменты с небольшими примесями целых IgG и F_{ab}-фрагментов (с учетом данных электрофореза в градиенте полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия), а пик V содержал чистые F_c-фрагменты. Совокупность данных электрофореза и твердофазного иммуноферментного анализа позволяет заключить, что в пике IV преобладают F_c-фрагменты IgG1, тогда как в пике V преобладают F_c-фрагменты других подклассов IgG. В "остаточном" пике VI электрофорез не обнаруживал IgG или их фрагментов, что позволяет предположить элюирование папаина в данном белковом пике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ПАПАИНОВЫХ ФРАГМЕНТОВ IGG ЧЕЛОВЕКА

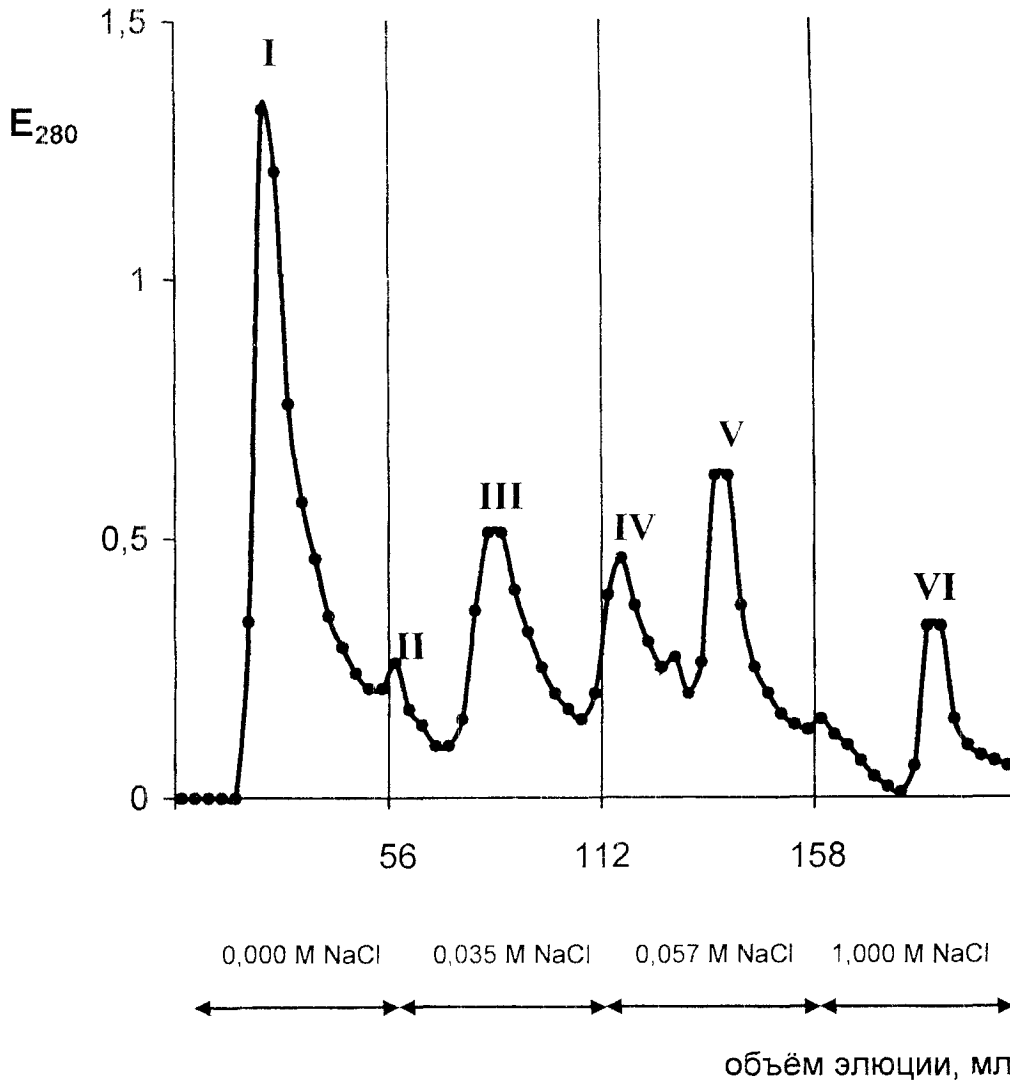


Рис. 1. Профиль элюции белка ступенчатым градиентом концентрации NaCl (в 0,025 М трис-НСl буферном растворе, рН=8,8) смеси F_{ab} - и F_c -фрагментов поликлональных IgG человека. E_{280} – экстинкция при длине волны 280 нм.

Обсуждая достоинства предложенного нами метода, важно подчеркнуть, что часть F_{ab} -фрагментов не задерживается на колонке при внесении образца в исходном буферном растворе, не содержащем NaCl, тогда как нерасщепленные IgG человека полностью фиксируются на носителе при данных условиях. Вместе с тем, после длительной элюции трис-НСl буферным раствором, содержащим 0,035 М NaCl, нерасщепленные поликлональные IgG человека практически полностью удаляются с колонки.

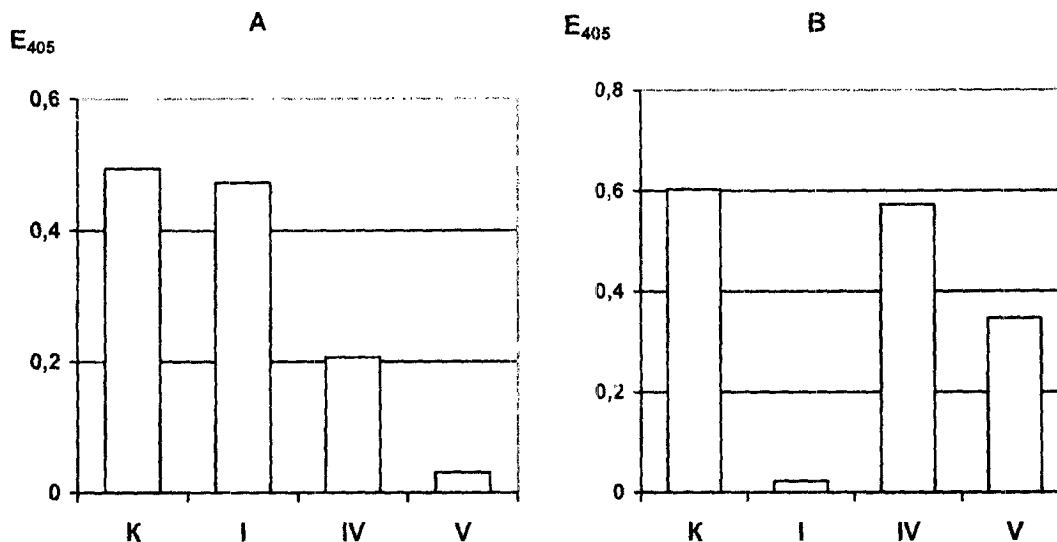


Рис. 2. Определение присутствия F_{ab} - и F_c -фрагментов поликлональных IgG человека в белковых пиках, элюированных с колонки при ионообменной хроматографии (см. рис.1), с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (К – образец исходного нерасщепленного папаинового поликлонального IgG в качестве положительного контроля твердофазного иммуноферментного анализа; I, IV, V – пики, полученные при элюции смеси F_{ab} - и F_c -фрагментов (см. рис. 1)): А – взаимодействие с мышиными моноклональными антителами к α -лёгким цепям иммуноглобулинов человека; В – взаимодействие с мышиными моноклональными антителами к F_c -фрагментам IgG человека.

ВЫВОДЫ

1. Создана новая модификация методики разделения папаиновых фрагментов поликлональных иммуноглобулинов G человека с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-трисакрилом М.
2. Получены чистые препараты иммуноглобулинов и папаиновых фрагментов иммуноглобулинов.

Список литературы

1. Троицкий Г. В. Применение “расширенного” уравнения Моффита для оценки конформации белков. Доказательства в пользу широкой распространенности среди белков β -структур // Биофизика. – 1965. – Т. 10, вып. 5. – С. 895-901.
2. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

Поступила в редакцию 28.11.2005 г.