

AGNIESZKA BARNYK
JERZY LEWOSZ
KRZYSZTOF TREDER
WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI
TOMASZ PILECKI

Institut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie, Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka, Bonin

Zastosowanie chromatografii tiofilnej do izolacji przeciwciał poliklonalnych z surowicy krwi królików

Application of thiophilic chromatography for purification of polyclonal antibodies from rabbit serum

Sposób izolacji przeciwciał z surowicy w znacznym stopniu wpływa na ich jakość, a tym samym może wpływać na jakość zestawów diagnostycznych. Istnieje wiele sposobów wyodrębniania przeciwciał z surowicy (chromatografia jonowymienna na DEAE celulozie, chromatografia powinowactwa z białkiem A, itd.). Różnią się one pomiędzy sobą m.in. efektywnością, czasem wykonania oraz kosztem. Niniejsza praca przedstawia chromatografię tiofilną jako tańszą i wydajniejszą alternatywę dla innych metod uzyskiwania przeciwciał z surowicy króliczej.

Słowa kluczowe: chromatografia tiofilna, izolacja przeciwciał, króliki, surowica krwi

A procedure used for purification of antibodies from serum has a significant effect upon their quality and therapy their suitability for diagnostic tests. The commonly used approaches include: (i) ion-exchange chromatography (both on anion and cation exchangers, depending on conditions applied) and (ii) affinity chromatography (on resins charged with the protein A or with the specific antigen). These methods differ in efficacy; amount of time needed and costs for antibodies purification. The study presented herein estimates the suitability of thiophilic chromatography as a cost and time-saving alternative approach for purification of antibodies from rabbit serum.

Key words: antibody purification, blood serum, rabbits, thiophilic chromatography

WSTĘP

Diagnostyka w uprawie roślin w znacznej mierze oparta jest na testach immunologicznych. Jednym z nich jest powszechnie stosowany płytkowy test immunoenzymatyczny ELISA. Charakteryzuje się on dużą czułością, stosunkowo krótkim czasem trwania procedury, nie wymaga stosowania drogich odczynników i aparatury. Zasadniczą

rolę w tego rodzaju testach odgrywają przeciwciała specyficzne dla odpowiedniego antygeny (np. cząsteczki wirusa lub komórki bakterii), a ich jakość jest elementem decydującym o efektywności zestawu testowego. Bardzo istotne jest, by oczyszczanie przebiegało w sposób szybki i efektywny, a warunki prowadzenia procesu sprzyjały utrzymaniu trwałości przeciwciał.

Zastosowanie chromatografii tiofilnej do oczyszczania przeciwciał zostało po raz pierwszy zaprezentowane w 1985 roku przez Porath i współautorów. Wykorzystali oni podłoże agarozowe, zmodyfikowane przez reakcje z di-winył-sulfonem i 2-merkaptoetanolom do frakcjonowania białek plazmy. W procesie separacji etap adsorpcji prowadzony był w warunkach wysokiego stężenia soli tworzących układy o znacznym stopniu uporządkowania (likotropowych), natomiast elucję związanych białek wykonywano w warunkach bezsolnych. Ten rodzaj chromatografii przypomina chromatografię hydrofobową, w której wiązanie białek z hydrofobowym ligandem zachodzi również przy dużym stężeniu soli. Jednak mechanizm adsorpcji jest inny w obu przypadkach, gdyż w chromatografii tiofilnej sole niemające własności likotropowych nie promują wiązania białek z ligandem. Ponadto ligand tiofilny ma charakter hydrofilowy. Kluczowe dla wiązania białek okazało się oddziaływanie reszty sulfonowej i tioeteru ligandu z atomami siarki obecnymi w białkach. Z tego powodu chromatografia tiofilna była często używana do oczyszczania przeciwciał (Hutchens, Porath, 1986; Belew i in., 1987).

Adsorpcja tiofilna znalazła zastosowanie w izolacji dużych ilości przeciwciał z różnych gatunków zwierząt oraz nadaje się do oczyszczania szczególnie trudnych w izolacji przeciwciał monoklonalnych, np. mysich z kultur komórkowych zanieczyszczonych surowicą wołową (Finger i in., 1996). Przeciwciała były izolowane tą metodą także z krwi siary, serwatki mleka (Hutchens i in., 1990; Konecny i in., 1994) oraz krwi ludzkiej (Bridonneau i in., 1993).

Jak podaje Bog-Hansen (1997), złoża tiofilne w obecności odpowiednich soli mogą być stosowane również do oczyszczania przeciwciał z płynów puchliny brzusznej, natomiast Hansen i wsp. w 1998 roku zastosowali tę metodę do izolacji IgY z żółtka jaja, uzyskując odzysk na poziomie 100%. Birkenmeier i Kopperschlager (1992) oczyszczali z użyciem złoża tiofilnego przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko peroksydazie chrzanowej uzyskując lepsze wyniki w porównaniu z innymi technikami chromatograficznymi, takimi jak chromatografia jonowymienna i hydrofobowa, czy też chromatografia z użyciem białka A.

Wszystkie te przykłady pokazują jak wiele potencjalnych zastosowań może mieć chromatografia tiofilna. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie próby zastosowania tej metody do oczyszczania przeciwciał z surowicy króliczej. Oznaczenie czystości wyizolowanych IgG oraz ich miana testem ELISA, pozwoliło określić potencjalne możliwości zastosowania otrzymanych przeciwciał do produkcji zestawów diagnostycznych.

MATERIAŁY I METODY

Wykonanie złoża tiofilnego

Materiałem wyjściowym do syntezy złoża biofilnego była 6B Sepharose (Pharmacia). Nośnik poddano aktywacji z użyciem di-winył-sulfonu (Sigma) stosując 1 ml na 10 ml żelu, w 0,5M węglanie sodu (pH = 11), przez trzy godziny w 25°C na wytrząsarce. Po aktywacji żel przemywano destylowaną wodą do momentu uzyskania neutralnego pH.

Do 100 ml zaktywowanego żelu dodano 100ml 0,1M NaHCO₃ (pH = 9) i 10 ml merkaptotetanolu. Zawiesinę mieszano delikatnie przez 20 godzin w temperaturze pokojowej, a po zakończonym procesie ponownie przemywano wodą destylowaną do uzyskania neutralnego pH.

Gotowy żel tiofilny inkubowano w temp. 25°C przez trzy godziny w 0,2M TriS/HCl, pH = 8,5.

Izolacja przeciwciał z surowicy króliczej

Badania były prowadzone dla surowicy anty-*Cms* (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* oraz anty-PVY (ang. Potato virus Y). Surowicę krwi pobrano z królików immunizowanych: a) preparatem wirusa PVY, b) zawiesiną termicznie inaktywowanych bakterii *Cms* (szczep BPR 527).

Kolumnę ze złożem tiofilnym (5 ml) równoważono przy użyciu buforu fosforanowego (1/2 PBS) pH = 7,4 zawierającego 0,6 M K₂SO₄. Następnie nakładano surowicę zawierającą również siarczan potasu w takim samym stężeniu. Po nałożeniu surowicy, kolumnę przemywano do całkowitego zaniku białek w wypływie z kolumny (tj. do zaniku absorbancji przy 280), stosując bufor 1/2 PBS (ten sam, jaki został użyty do równoważenia). Desorpcję przeciwciał prowadzono na drodze elucji buforem fosforanowym bez dodatku soli. Prędkość przepływu przez kolumnę wynosiła 2,5 ml/min.

Uzyskane w ten sposób przeciwciała dializowano względem buforu 1/2 PBS.

Określenie stężenia białka, jego czystości i miana wyizolowanych przeciwciał:

Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy 280 i 235 nm i wyliczano przyjmując za Whitakerem i Granumem (1980) zależność:

$$C_{mg/ml} = \frac{(A_{235nm}^{1cm} - A_{280nm}^{1cm})}{2,51} \quad (1)$$

gdzie:

C — stężenie białka [mg/ml]

A — absorbancja przy danej długości fali

2,51 — współczynnik, który jest różnicą pomiędzy średnimi wartościami absorbancji w 235 nm i w 280 nm dla 0,1% roztworów różnych białek.

Natomiast stężenie przeciwciał w wyizolowanej frakcji określono stosując zależność:

$$C_{IgG} = \frac{A_{280nm}}{1,4} \quad (2)$$

gdzie:

C_{IgG} — stężenie IgG

A_{280} — absorbanca przy 280 nm.

1,4 jest wartością absorbancji A_{280} , charakterystyczną dla stężenia IgG = 1 mg/ml.

Czystość otrzymanych przeciwciał określano spektrofotometrycznie wykorzystując fakt, że stosunek absorbancji 280/250 nm dla wysoko oczyszczonych immunoglobulin króliczych wynosi 2,5–2,7 (Goszczyński, 1991) oraz za pomocą rozdziału elektroforetycznego prowadzonego w warunkach denaturujących (Laemmli, 1970).

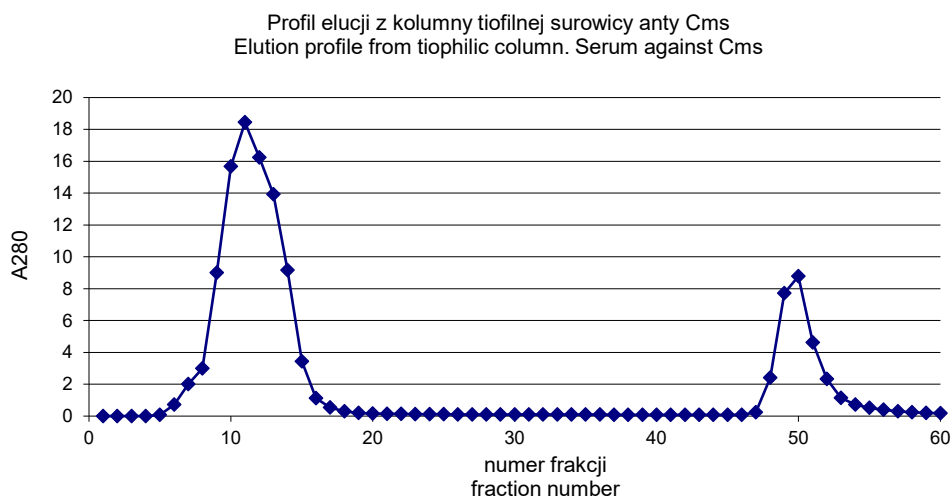
Miano przeciwciał wyznaczono testem DAS-ELISA. Mikroplótkę powlekano przez 2 godziny w 37°C preparatami IgG anty-PVY lub anty-*Cms* rozcieńczonymi od 1000 do 8000 razy buforem powlekającym (50 mM bufor węglanowy, pH 9,6). Każde rozcieńczenie surowicy nakładano do ośmiu studzienek. Następnie płukano 4-krotnie buforem do płukania (PBS + 0.05% Tween-20). Połowę studzienek mikroplótki napełniano sokiem ze zdrowych roślin, który był 20-krotnie rozcieńczony buforem do prób (1×PBS + 0,05% Tween 20 + 2% PVP), a drugą połowę napełniano tak samo rozcieńczonym sokiem z roślin porażonych PVY lub sokiem ze zdrowych roślin zawierającym zawiesinę bakterii *Cms* (BPR 527) o koncentracji 5000 komórek bakteryjnych/ml. Soki: kontrolny (z roślin zdrowych) i testowy (zawierający badany patogen) nakładano do studzienek w taki sposób, że oba rodzaje soku dla każdego rozcieńczenia surowicy powtórzone były trzykrotnie. Płótkę inkubowano 24 h w 4°C, płukano i napełniano roztworem koniugatu (IgG anty-PVY lub IgG anty-*Cms* sprzęgnięte z alkaliczną fosfatazą) w buforze koniugatowym (PBS + 0,05% Tween 20 + 2% PVP + 0,2% albumina wołowa). Po 3-godzinnej inkubacji w 37°C płótkę przemywano i napełniano 0,1% roztworem fosforanu p-nitrofenolu (pNPP) w buforze substratowym (1M di-etanoloamina + 0,05% NaN_3). Płótki inkubowano 2 h w temperaturze pokojowej w ciemności i mierzono wartość absorbancji przy $\lambda_{405 \text{ nm}}$ stosując czytnik Dynatech. MR7000. Za reakcję pozytywną uznawano wynik 2-krotnie większy od wartości średniej uzyskanej z 4 powtórzeń kontroli negatywnej dla danego rozcieńczenia. Najniższe rozcieńczenie przeciwciał, dla którego w opisanych wyżej warunkach stwierdzano reakcję pozytywną, uznawano za ich miano. Obliczenia średniej i odchylenia standardowego dokonano dla trzech powtórzeń.

Liczbę komórek *Cms* określano na podstawie pomiaru rozproszenia światła przy 600nm przyjmując, że wartość absorbancji 0,1 odpowiada 5×10^6 komórek bakteryjnych/ml. Zależność tę otrzymano po wykonaniu serii rozcieńczeń zawiesiny bakteryjnej. Dla każdego mierzono rozproszenie światła przy 600 nm i wykonywano posiewy na płytkach z pożywką YGM. Liczbę bakterii obecną w danym rozcieńczeniu określano zliczając uzyskane kolonie *Cms*.

WYNIKI I DYSKUSJA

W chromatografii tiofilnej wykorzystuje się złoże z ligandem o tioetylosulfonowej strukturze, który wykazuje powinowactwo do grup sulfhydrylowych występujących w białkach. W praktyce efektywne wiązanie białka do złoża następuje tylko przy wysokim stężeniu soli likotropowych, a przy ich braku białko wypływa z kolumny. Chromatografia

tego typu nadaje się szczególnie do oczyszczania białek bogatych w grupy siarkowe. W surowicy zwierzęcej główną frakcją takich białek stanowią immunoglobuliny. Aby sprawdzić przydatność chromatografii tiofilnej do oczyszczania przeciwciał, surowice królicze zawierające przeciwciała skierowane na bakterie *Cms* lub PVY oraz odpowiednie stężenie soli likotropowej nakładano na kolumnę ze złożem tiofilnym zrównoważoną buforem z tą samą solą. W takich warunkach (przy obecności soli) frakcja zawierająca około 70% białka surowicy nie związała się ze złożem (rys. 1, frakcja I). Aby wyeluować niespecyficznie związane białka, kolumnę przemywano buforem z solą (10–12 objętości kolumny). Następnie frakcję białka związanego ze złożem eluowano buforem bez soli. Wypłynęła ona jako relatywnie symetryczny pik zawierający około 30% wyjściowej ilości białka surowicy (rys. 1, frakcja II).



Rys. 1. Rozdział chromatograficzny białek surowicy króliczej zawierającej przeciwciała anty-*Cms* na kolumnie ze złożem tiofilnym

Fig. 1. Chromatographic profile of proteins from rabbit serum containing *Cms*-specific immunoglobulins resolved on thiophilic column

W uzyskanych frakcjach pochodzących z surowic przeciwko bakteriom *Cms* lub PVY, stężenie białka odpowiadało stężeniu przeciwciał (tab. 1).

Tabela 1

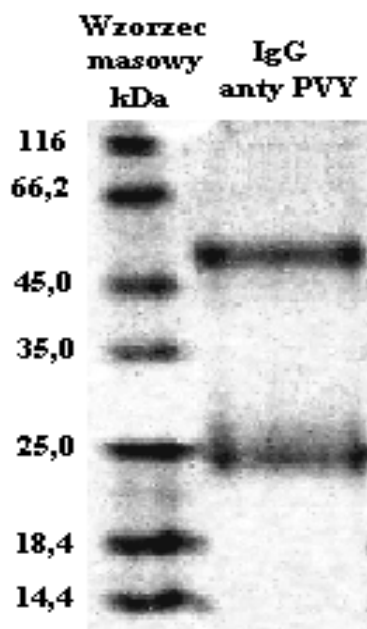
Obliczenia stężenia białka i ilości IgG w eluacie
Determination of protein concentration and IgG amount in elution

IgG	A _{235nm}	A _{250nm}	A _{280nm}	Czystość Purity A ₂₈₀ /A _{250nm}	Objętość eluatu Elution volume [ml]	Białko*	IgG**
						Protein [mg/ml]	[mg/ml]
Anti- <i>Cms</i> IgG	11,26	1,57	4,08	2,6	16,5	2,9	2,9
Anti-PVY IgG	6,7	0,93	2,4	2,6	92,5	1,7	1,7

*Obliczono ze wzoru (1) — Calculated to formula (1)

**Obliczono ze wzoru (2) — Calculated to formula (2)

Można więc przypuszczać, że głównym składnikiem zebranych frakcji były czyste przeciwciała. Ponadto stosunek absorbancji w 280 nm do absorbancji w 250 nm dla obu frakcji wynosił 2,6 (tab. 1). Taką charakterystykę spektrofotometryczną posiadają preparaty wysoko oczyszczonych IgG. Czystość uzyskanych preparatów IgG analizowano również za pomocą elektroforezy w warunkach redukujących (rys. 2).



Rys. 2. Obraz elektroforetyczny immunoglobulin anti-PVY oczyszczonych za pomocą chromatografii tiofilnej

Fig. 2. Electrophoretic profile of PVY-specific IgG purified by thiophilic chromatography

W uzyskanym obrazie elektroforetycznym nie stwierdzono obecności żadnych innych białek poza charakterystycznymi dla immunoglobulin podjednostkami H (50 kDa) i L (25 kDa) (rys. 2). Otrzymane preparaty IgG można więc uznać za elektroforetycznie czyste. Wyniki te świadczą o tym, że wytworzone złożo tiofilne posiada zdolność selektywnego wiązania przeciwciał z surowicy króliczej. Dzięki temu otrzymane przeciwciała nie wymagają dalszego frakcjonowania, co znacznie usprawnia proces ich pozyskiwania. Aby otrzymać podobnej czystości przeciwciała za pomocą chromatografii jonowymiennej należy je wstępnie oddzielić od innych białek surowicy poprzez frakcjonowanie za pomocą siarczanu amonu. Ponadto przed nałożeniem frakcji zawierającej IgG na kolumnę jonowymienną należy najpierw oddializować sól. W efekcie taka procedura oczyszczania jest wieloetapowa i długotrwała. Hansen i wsp. (1998) za pomocą chromatografii tiofilnej uzyskali z żółtka jaja przeciwciała IgY o podobnym

stopniu czystości do otrzymanego w prezentowanej pracy. Birkenmeier i Kopperschlager (1992) oczyszczali z użyciem złoża tiofilnego przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko peroksydazie chrzanowej uzyskując lepsze wyniki w porównaniu z chromatografią jonowymienną, powinowactwa do białka A czy hydrofobową. Chromatografia powinowactwa do białka A lub do specyficznego antygeny również pozwala na jednoetapowe uzyskanie wysoko oczyszczonych przeciwciał, jednak elucja w tym przypadku wymaga stosowania niskiego lub wysokiego pH buforu elucyjnego. Może to doprowadzić do denaturacji i utraty aktywności biologicznej izolowanych przeciwciał. Zaletą przedstawionej metody jest to, że IgG eluowane są buforem o niskiej sile jonowej i neutralnym pH. Dzięki temu długie dializowanie w celu usunięcia nadmiaru soli lub korygowania pH nie jest konieczne. Stąd chromatografia tiofilna znajduje zastosowanie w przypadkach, gdy izolowane przeciwciała są wrażliwe na zmiany warunków otoczenia (np. wahania pH, stężenie soli), które mogą doprowadzić do nieodwracalnej utraty ich aktywności biologicznej. Metoda ta nadaje się doskonale do izolacji przeciwciał monoklonalnych (Finger i in., 1996). Dodatkowym atutem chromatografii tiofilnej są znacznie niższe koszty w porównaniu z chromatografią powinowactwa do białka A (Porach, Belew, 1987; Skoble, Scopes, 1997).

Tabela 2

Oznaczanie miana przeciwciał anty PVY metodą DAS ELISA
Determination of titer of anti-PVY antibodies by DAS ELISA

PVY	Rozcieńczenie przeciwciał — IgG dilution									
	1000x		2000x		4000x		6000x		8000x	
	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD
Próba pozytywna — positive	1,518	0,016	1,384	0,009	1,177	0,011	1,030	0,051	0,963	0,013
Próba negatywna — negative	0,063	0,007	0,062	0,005	0,055	0,004	0,078	0,019	0,071	0,004

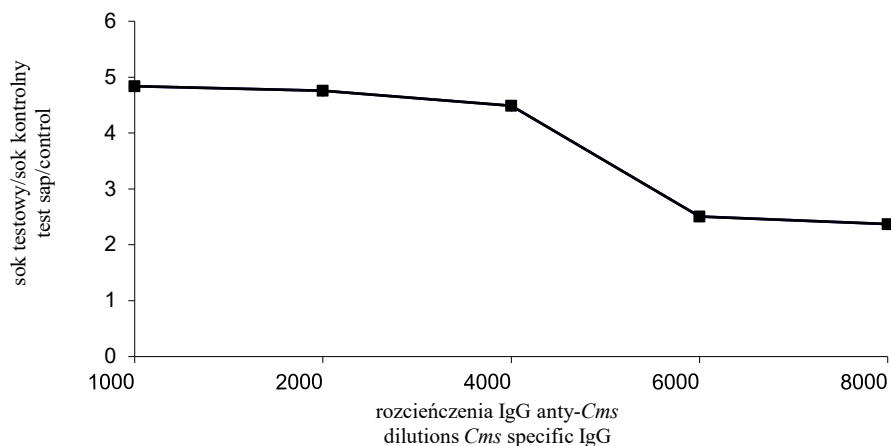
Tabela 3

Oznaczanie miana przeciwciał anty Cms metodą DAS ELISA
Determination of titer of anti-Cms antibodies by DAS ELISA

Cms	Rozcieńczenie przeciwciał — IgG dilution									
	1000x		2000x		4000x		6000x		8000x	
	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD	A _{405nm}	SD
Próba pozytywna — positive	0,387	0,010	0,333	0,008	0,305	0,026	0,178	0,011	0,147	0,011
Próba negatywna — negative	0,080	0,010	0,070	0,008	0,064	0,004	0,071	0,005	0,062	0,004

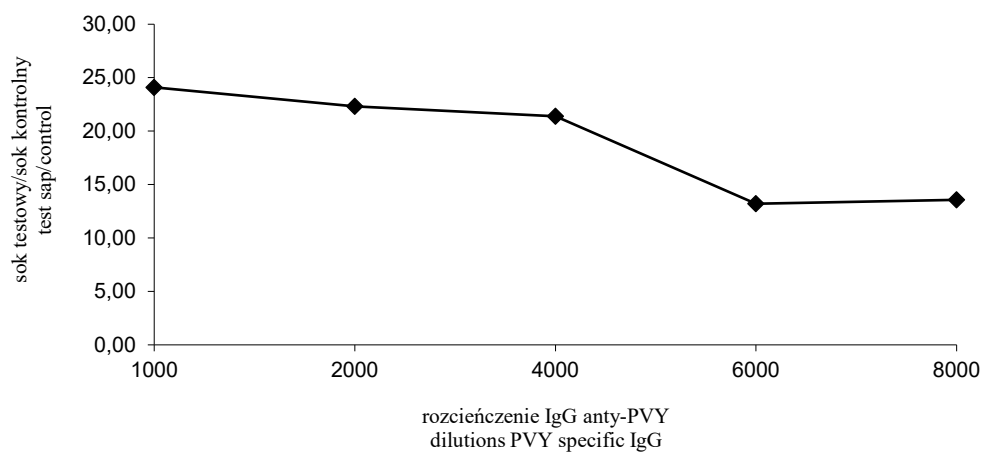
Przydatność uzyskanych za pomocą chromatografii tiofilnej immunoglobulin do wykrywania PVY lub Cms sprawdzano metodą DAS ELISA. Studzienki mikropłytek powlecano rozcieńczonymi (od 1000 do 8000) preparatami IgG anty-PVY (lub anty-Cms). Dla każdego z rozcieńczeń IgG oceniano poziom reakcji niespecyficzyh inkubując w studzienkach sok ze zdrowych roślin (sok kontrolny) oraz zdolność do wiązania specyficznego antygeny stosując

taki sam sok z roślin zainfekowanych PVY (sok testowy) lub sok zawierający martwe bakterie *Cms* (5000 komórek/ml). Dla obu preparatów poziomy reakcji z sokiem kontrolnym był niski i nie zmieniał się wraz z rozcieńczeniem IgG (tab. 2 i 3).



Rys. 3. Stosunek odpowiedzi specyficznej do niespecyficznej w teście DAS ELISA dla przeciwciał anti-PVY

Fig. 3. Ratio of positive to false positive signals for PVY specific IgG in DAS ELISA assay. Test sap-sap from PVY infected plants, control-sap from uninfected plants



Rys. 4. Stosunek odpowiedzi specyficznej do niespecyficznej w teście DAS ELISA dla przeciwciał anti-Cms

Fig. 4. Ratio of positive to false positive signals for Cms specific IgG in DAS ELISA assay. Test sap-sap from PVY infected plants, control-sap from uninfected plants

W przypadku IgG anty-PVY wysoką, ponad dziesięciokrotną odpowiedź na antygen obecny w soku testowym uzyskano dla wszystkich badanych rozcieńczeń preparatu przeciwciał (tab. 2, rys. 3). Dla IgG anty-Cms rozcieńczonych od 1000 do 4000-razy poziom reakcji z sokiem testowym był około pięciokrotnie wyższy od poziomu reakcji niespecyficznych (tab. 3, rys. 4). Dalsze rozcieńczanie przeciwciał powodowało spadek poziomu reakcji specyficznej i dla IgG rozcieńczonych 6000-8000 razy był on już tylko około 2,5-krotnie wyższy od poziomu reakcji z sokiem kontrolnym (tab. 3, rys. 4).

Wyniki testu DAS ELISA świadczą o tym, że przeciwciała izolowane metodą chromatografii tiofilnej zachowują swoje właściwości i mogą być użyte jako składnik testów immunologicznych.

LITERATURA

- Belew M., Juntti N., Larsson A., Porath J. 1987. A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a 'thiophilic' adsorbent. *J. Immunol. Methods* 102: 173 — 82.
- Birkenmeier S. B., Kopperschlager G. 1992. Application of phase partitioning and thiophilic adsorption chromatography to the purification of monoclonal antibodies from cell culture fluid. *J. Immunol. Methods* 149: 161 — 165.
- Bog-Hansen T. C. 1997. Separation of monoclonal antibodies from cell culture supernatants and ascites fluid using thiophilic agarose. *Mol. Biotechnol.* 8: 279 — 281.
- Bridonneau P., Lederer F. 1993. Behaviour of immunoglobulin G subclasses on thiophilic gels: comparison with hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.* 616: 197 — 204.
- Finger U. B., Brummer W., Knieps E., Thommes J., Kula M. R. 1996. Investigations on the specificity of thiophilic interaction for monoclonal antibodies of different subclasses. *J. Chromatogr.* 675: 197 — 204.
- Goszczyński D. 1991. Otrzymywanie poliklonalnych przeciwciał króliczych i kurzych z żółtek jaj oraz monoklonalnych przeciwciał mysich i ich zastosowanie w technice ELISA do wykrywania wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV). Rozprawa doktorska.
- Hansen P., Scoble J. A., Hanson B., Hoogenraad N. J. 1998. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J. Immunol. Methods* 215: 1 — 7.
- Hutchens T. W., Porath J. 1986. Thiophilic adsorption of immunoglobulin — analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Anal. Biochem.* 159: 217 — 226.
- Hutchens T. W., Magnuson J. S., Yip T. T. 1990. Secretory IgA, IgG and IgM immunoglobulin isolated simultaneously from colostrum whey by selective thiophilic adsorption. *J. Immunol. Methods* 128: 89 — 99.
- Konecny P., Brown R. J., Scouten W. H. 1994. Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *J. Chromatogr.* 673: 45 — 53.
- Porath J., Belew M. 1987. 'Thiophilic' interaction and the selective adsorption of proteins. *Trends Biotechnol.* 5: 225 — 229.
- Porath J., Maisano F., Belew M. 1985. Thiophilic adsorption — a new method for protein fractionation. *FEBS* 2631, Volume 185, No 2: 306 — 310.
- Scoble, J. A., Scopes, R. K. 1997. Ligand structure of the divinylsulfone-based T-gel. *J. Chromatogr.* 787: 47 — 54.
- Whitaker J. R., Granum P. E. 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* 109: 156 — 159.