

УДК 577.27:57.083.33:543.54

О.Ю. Галкін

РОЗРОБКА УДОСКОНАЛЕНОЇ МЕТОДИКИ ВИЛУЧЕННЯ Й ОЧИСТКИ IgE ЛЮДИНИ

We aim at creating and evaluating the acceptability of improved methods of isolation of high purity human IgE suitable for use in highly sensitive immuno-analytical methods. To this end, we generalize physicochemical and biological properties of immunoglobulins of different classes and analyze key methodological techniques used for isolation and purification of human IgE (ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, gel filtration on Sephadex G-200 and S-300 Sephacryl different options immunoaffinity chromatography). In addition, we justify circuit isolation and purification of human IgE based on own research data, as well as on other authors' data. The technique is based on combination of the following methodological techniques: sequential removal of serum human IgG (by affinity chromatography on protein G), human IgA and IgM removal (using immunoaffinity chromatography based on sorbents with anti-IgA and anti-IgM monoclonal antibodies), allocation of human IgE by dual-gel filtration on Superdex 200. In addition, we perform the quality control of IgE by immunodiffusion for Ouchterlony and electrophoresis in polyacrylamide gel in reducing conditions. Using the proposed scheme, we obtain human IgE high purity. The human IgE output after all treatment phases is about 42 % of the initial amount of immunoglobulin E in the serum.

Вступ

У 1921 р. експерименти двох німецьких лікарів К. Праусніца і Х. Кюстнера показали, що прояви алергії корелюють із сироватковим фактором, який у 1925 р. Р. Кох визначив як "реагіни" [1]. Тільки в 1966–1967 рр. у США К. Ішизака, Т. Ішизака, М. Хорнбрук [2] та в Швеції Х. Бенніч і С. Йохансон [3] ідентифікували новий клас імуноглобулінів, який у 1968 р. експертами Всесвітньої організації охорони здоров'я визначений як імуноглобулін Е (IgE) [4, 5]. IgE є класом антитіл, який наявний тільки у ссавців і являє собою мономерний глікопротеїн із молекулярною масою (ММ) 190 кДа. Fc-фрагмент IgE має вдвічі більшу ММ порівняно із Fc-фрагментом IgG (100 кДа), що зумовлено додатковими 100 амінокислотними залишками (містить додатковий четвертий C_H-домен). Імуноглобулін Е синтезується переважно в лімфоїдній тканині шкіри, дихальних шляхів, кишок і в лімфатичних вузлах, які їх дренують [1]. Основна функція IgE пов'язана із захистом організму від гельмінтів і найпростіших паразитів [6, 7]. IgE відіграє також важливу роль у гіперчутливості типу I, яка проявляється різними алергічними захворюваннями, такими як алергічна астма, алергічний риніт, харчова алергія, atopічний дерматит, анафілаксія тощо.

Для вирішенні багатьох завдань в імунології та молекулярній медицині виникає потреба в очищених препаратах імуноглобулінів. IgE використовуються як імуногени для імунізації,

а також для створення імуносорбентів, призначених для видалення перехресно реагуючих антитіл й афінної очистки поліклональних антиімуноглобулінових сироваток. Очищені IgE можуть виступати як стандартні антигени при їх кількісному визначенні. Також вони необхідні для перевірки відповідних імунних сироваток [8]. Для вилучення й очистки імуноглобулінів послуговуються широким арсеналом методів молекулярної імунології та біохімії. При цьому всі підходи базуються на застосуванні фізико-хімічних і біологічних властивостей даної групи молекул. Найчастіше використовують такі відмінності антитіл різних класів від інших молекул, що наявні у сироватці: ММ, спорідненість до низки протеїнів (білки А і G), ізоелектричну точку (pI), розчинність за різних умов. На використанні зазначених відмінностей біомолекул базуються методи гел'фільтрації, афінної та іонообмінної хроматографії, діалізу, осадження солями й органічними розчинниками. Більшість підходів, що трапляються в літературі [9–11], передбачають поєднання кількох методів. Цікавим є і той факт, що дані різних авторів [9–13] істотно різняться щодо значень деяких фізико-хімічних властивостей імуноглобулінів, наприклад pI для різних ізотипів. Відповідно, виникають проблеми при формуванні методологічних схем вилучення імуноглобулінів.

Для вилучення IgE людини як вихідний матеріал зазвичай використовують сироватку хворих на алергічні захворювання або IgE-продукувальну мієлому (проте останній варіант

надзвичайно рідко внаслідок низької розповсюженості цього онкозахворювання). Серед основних методологічних прийомів, що застосовуються для вилучення й очистки IgE, слід назвати іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі, гель-фільтрацію на сефадексі G-200 чи сефакрилі S-300 [9, 14] або різні варіанти імуноадсорбції [15]. Незважаючи на велику кількість модифікацій методики, значна частина з них погано відтворюється, часто бракує достовірних способів контролю чистоти отриманого імуноглобулінового препарату. Дані різних авторів містять певні методологічні розбіжності, а інколи й суперечності. Отримання високоочищеного препарату IgE є вкрай актуальною задачею, особливо у випадках, коли навіть слідові кількості імуноглобулінів інших класів, що “забруднюють” препарат IgE, можуть критично вплинути на процес або експеримент. З подібними труднощами дослідники стикаються, наприклад, при тестуванні гібридом-продуцентів моноклональних антитіл до IgE людини.

Постановка задачі

Метою роботи є розроблення удосконаленої методики вилучення й очистки IgE людини, придатного для використання у високочувливих методах імуноаналізу.

Матеріали й методи дослідження

Вихідний матеріал (сироватка). Джерелом для отримання IgE людини була сироватка крові людей із підвищеним умістом цього імуноглобуліну. Для роботи використовували сироватку, яка не містила HBs-антигену й антитіл до вірусів імунодефіциту людини і гепатиту С (за результатами попереднього тестування). Сироватку фільтрували через пори 0,8/0,22 мкм і додавали 0,1 % азиду натрію.

Електрофорез. Електрофорез проводили за У. Леммлі [16] у вертикальній камері у 15 %-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності додецилсульфату натрію (ДСН). Як маркери молекулярної маси використовували овотрансферин (ММ 78000), альбумін (ММ 66250), овальбумін (ММ 42700), карбоангідразу (ММ 30000), міоглобін (ММ 16900), цитохром С (ММ 12300) (“Sigma”, США). Білки в гелі фарбували Coomassie Blue R-250.

Афінна хроматографія. Для доочистки IgE людини (вилучення домішок IgG людини) використовували афінну колонку з протеїном G

“HiTrap Protein G” (Pharmacia Biotech) об’ємом 1 мл. Імуноглобуліновий препарат розводили в 2 рази 0,02 М фосфатним буфером з рН 7,0. Одержану суміш пропускали через колонку зі швидкістю 1 мл/хв, збираючи фракцію, що не зв’язалася. Елюцію зв’язаної фракції здійснювали розчином 0,1 М гліцин-НСІ з рН 2,7. Таким чином із препарату видаляли всі імуноглобуліни класу G. Фракцію, що не зв’язувалася із колонкою, переосажували сульфатом амонію, осад розчиняли в мінімальній кількості деіонізованої води [8].

Гель-фільтрація. Цей варіант хроматографії використовувався для переведення імуноглобулінів у інший буфер та як один із методів очистки. Зміну буфера проводили на колонці 1,5×20 см із сефадексом G-200 (Pharmacia Biotech). Елюцію препарату проводили зі швидкістю 2 мл/хв. Вихід білкового піка реєстрували спектрофотометрично при $\lambda = 280$ нм, вихід буфера – кондуктометричним методом.

Очистку імуноглобулінів проводили на хроматографічній колонці з сефакрилом S-300 або супердексом 200 (Pharmacia Biotech) розмірами 2,5×100 см, яку переводили в 0,05 М фосфатний буфер з 0,14 М NaCl, рН 7,2. Елюцію проводили зі швидкістю 2 мл/хв (для першого циклу) та 1 мл/хв (для другого циклу), 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 [8, 10].

Імуноафінна хроматографія. На першому етапі 25 мл підготовленої сироватки пропускали через передколонку із мишачими МКАТ нейтральної специфічності (для нівелювання неспецифічної взаємодії компонентів сироватки з імуноафінним сорбентом) об’ємом 10 мл зі швидкістю 2 мл/хв. Елюат збирали й на другому етапі використали для вилучення IgM та IgA людини. Цю сироватку зі швидкістю 1 мл/хв пропускали через дві послідовно з’єднанні імуноафінні колонки об’ємом 10 мл з іммобілізованими анти-IgM і анти-IgA МКАТ відповідно. Колонки ретельно відмивали 0,02 М фосфатним буфером з 0,15 М NaCl (рН 7,2–7,4) зі швидкістю 2 мл/хв. Елюцію IgM та IgA проводили з тією ж швидкістю слабоекислим 1,75 М $MgCl_2 \times 6H_2O$ і реєстрували вихід імуноглобуліну при 280 нм.

Імунодифузія за Оухтерлоні. Імунодифузію проводили у 1,25 %-ному агаровому гелі, приготовленому на боратному буфері з рН 8,6 [9]. Використовували моноспецифічні сироватки

проти імуноглобуліну людини класів G, M і A (підприємство з виготовлення бактерійних препаратів "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 [9]. Відмивку проводили 2 %-ним розчином оцтової кислоти.

Результати і їх обговорення

Обґрунтування схеми вилучення й очистки IgE людини. Під час попередніх досліджень нами було накопичено певний досвід щодо вилучення й очистки імуноглобулінів інших класів, зокрема IgG (включаючи розділення на підкласи), IgA та IgM [8, 17]. У цих дослідженнях найкраще зарекомендувала себе схема з поєднанням афінної хроматографії на білках A та G і гель-фільтрації на сефакрилі S-300. Використання специфічного методу вилучення IgE людини (імуноафінна хроматографія з використанням анти-IgE антитіл) у цьому дослідженні

було неможливим внаслідок відсутності відповідних імунохімічних реагентів. Слід зазначити, що не було можливості оцінити доцільність і потенційну ефективність використання іонообмінної хроматографії для розділення імуноглобулінів різних класів через невизначеність щодо їх pI. Водночас, зважаючи на дані різних авторів щодо близькості ізоелектричних точок різних ізотипів імуноглобулінів, а також вкрай низький вміст IgE у сироватці людини та його біохімічні й фізико-хімічні властивості (таблиця), ми вважали не доцільним включення в розроблюваному схему цього методу іонообмінної хроматографії через можливість великих втрат цільового імуноглобуліну. З іншої сторони, на нашу думку, доцільним є вилучення IgG, IgA та IgM людини із сироватки безпосередньо перед вилученням IgE. Вилучення імуноглобуліну E доцільно проводити гель-фільтрацією із високою роздільною здатністю. У цьому випадку перспективним сорбентом є сефакрил S-300 (використовувався у власних попередніх дослідженнях з іншими класами імуноглобулінів [8, 17]) та супердекс 200, який, за даними [18], характеризується високою роздільною здат-

Таблиця. Основні властивості й характеристики імуноглобулінів людини [1, 8]

Властивості й характеристики	Ізотип імуноглобулінів									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	sIgA	IgD	IgE
Важкий ланцюг	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	α_1/α_2	δ	ϵ
Легкий ланцюг	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ	к, λ
Інші ланцюги	–	–	–	–	J-ланцюг	J-ланцюг, S-компонент			–	–
Кількість основних чотирьох ланцюгових одиниць	1	1	1	1	5	1, 2, 3	1, 2, 3	2	1	1
Коефіцієнт седиментації	7S	7S	7S	7S	19S	7S, 9S, 14S	7S, 9S, 14S	11S	7S	8S
Молекулярна маса, кДа	146	146	170	146	970	160	160	385	184	188
Середня концентрація в сироватці, мг/мл	9,0	3,0	1,0	0,5	1,5	3,0	0,5	0,05	0,03	0,00005
Час напівжиття, діб	21	20	7	21	10	6	6	6	3	2
Частка від імуноглобулінів сироватки, %	50	17	5	3	10	16	2	Сліди	< 1	Сліди
Внутрішньосудинний пул, %	45	45	45	45	80	42	42	Сліди	75	50
Вміст вуглеводів, %	2–3	2–3	2–3	2–3	12	7–11	7–11	7–11	9–14	12
Коефіцієнт екстинкції E_{280} (1 % 1 см)	13,6	13,6	13,6	13,6	11,8	13,2	13,2	12,6	17,0	15,3
Активация комплементу за альтернативним шляхом	–	–	–	+	–	+	+	–	–	+
Зв'язування з білком А	+++	+++	–	+++	–	–	–	–	–	–
Зв'язування з білком G	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	–
Зв'язування з білком L	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–	–	–

ністю в діапазоні молекулярних мас 10^4 – $6 \cdot 10^5$. Таким чином, з урахуванням наявних літературних джерел [9–11] та власного досвіду нами була теоретично синтезована така схема вилучення й очистки IgE людини: 1) вилучення із сироватки IgG людини за допомогою афінної хроматографії на протеїні G; 2) вилучення із сироватки IgA та IgM людини за допомогою імуноафінних сорбентів на основі анти-IgA й анти-IgM моноклональних антитіл, що були в нашому розпорядженні [17, 19]; 3) вилучення IgE людини у порівняльних експериментах із використанням сефакрила S-300 та супердекса 200; 4) контроль якості отриманого імуноглобуліну в імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезі в ПААГ у редуруючих умовах [8].

Отримання вихідного матеріалу (сироватки). Як відомо, концентрація IgE у сироватці крові здорових людей становить у середньому 50 нг/мл (2,4 нг/мл відповідають 1 МО/мл). Очевидно, що такий низький рівень цільового імуноглобуліну не дає змоги використовувати таку сироватку як вихідний матеріал для вилучення IgE. З літературних даних [20–22] відомо, що при низьці захворювань спостерігається істотне підвищення імуноглобуліну E у сироватці, наприклад: при алергічному риніті – до 1000 МО/мл, при atopічній бронхіальній астмі – до 1200 МО/мл, при гельмінтозах і паразитарних інвазіях – до 2000 МО/мл, при алергічному бронхопальмонарному аспергільозі (фаза загострення) – до 8000 МО/мл, при atopічному і дифузному дерматитах – до 14000 МО/мл. Тому доцільним було використання як вихідного матеріалу сироватки пацієнтів із рівнем IgE не менше 2000 МО/мл. Таким чином, ще до початку цієї роботи методом імуноферментного аналізу (набір “IgE–ИФА–БЕСТ” виробництва Вектор-Бест, Росія) було досліджено 17 зразків сироваток пацієнтів, які мають в анамнезі відповідні захворювання. За результатами такого скринінгу було відібрано 3 зразки сироватки, які й слугували вихідним матеріалом для вилучення IgE.

Вилучення IgG, IgM і IgA із сироватки. Для вилучення імуноглобуліну G із сироватки останню поступово наносили на афінну колонку із протеїном G, кожного разу збираючи фракцію, що не зв’язалася з колонкою; зв’язану фракцію (IgG) елюювали з колонки гліциновим буфером. Цикли вилучення проводили до

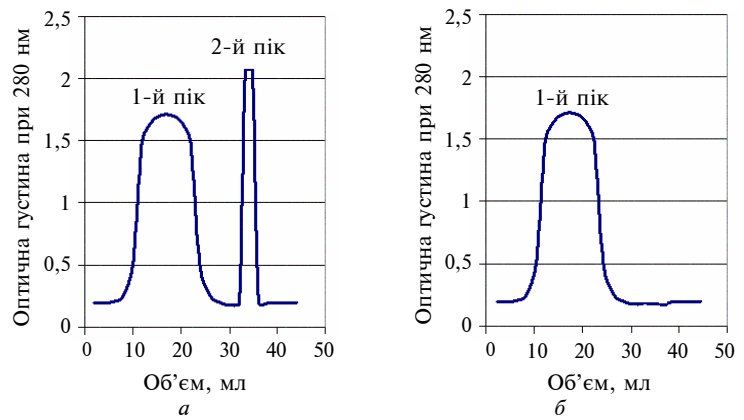


Рис. 1. Вилучення IgG із сироватки людини афінною хроматографією на протеїні G: *а* – перший цикл хроматографії, *б* – останній цикл хроматографії; 1-й пік – фракція, що не зв’язалася з колонкою; 2-й пік – елюція IgG, що зв’язався з колонкою

повного зникнення піків після елюювання, що вказувало на повне видалення імуноглобулінів G із сироватки. На рис. 1, *а* зображена хроматограма першого циклу хроматографії, а на рис. 1, *б* – останнього циклу. Для вилучення із сироватки IgM та IgA використовували імуноафінні сорбенти за описаною вище методикою.

Вилучення IgE людини і контроль його чистоти. Очистку IgE проводили на хроматографічній колонці з сефакрилом S-300 або супердексом 200 розмірами $2,5 \times 100$ см, що забезпечують максимальне розділення молекул у діапазоні молекулярних мас 140–190 кДа (молекули IgG, IgA, IgD, IgE). Хроматограми, отримані з використанням зазначених носіїв наведено на рис. 2. Профілі елюції були принципово схожими, але використання супердекса 200 забезпечувало дещо краще розділення молекул. Пік 1 мав містити IgE людини, пік 2 – IgD людини, а пік 3 – баластні білки із меншою молекулярною масою. Припущення щодо вмісту фракцій 1-го піку було підтверджено за результатами імуноферментного аналізу (набір “IgE–ИФА–БЕСТ” виробництва Вектор-Бест, Росія). Білки фракції 1-го піка переосажували сульфатом амонію, осад розчиняли в мінімальній кількості деіонізованої води, переводили у фосфатний буфер і піддавали повторній хроматографічній очистці на супердексі 200 (рис. 3). На цьому етапі вдалося розділити різні класи імуноглобулінів. Для аналізу фракцій 1-го піка, отриманого після другого циклу хроматографічної очистки, використовували вертикальний електрофорез у ПААГ з ДСН, результати якого наведено на рис. 4. Як видно з електрофоре-

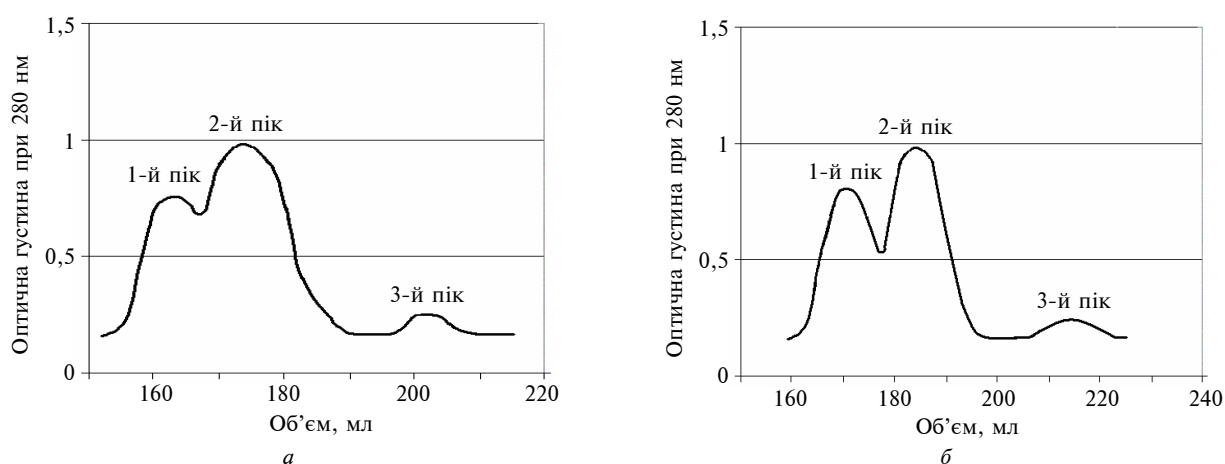


Рис. 2. Вилучення IgE людини методом гель-фільтрації на сефакрилі S-300 (а) та супердексі 200 (б)

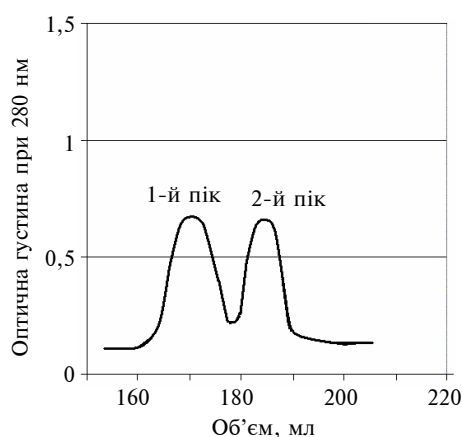


Рис. 3. Повторний цикл очистки IgE людини методом гель-фільтрації на супердексі 200

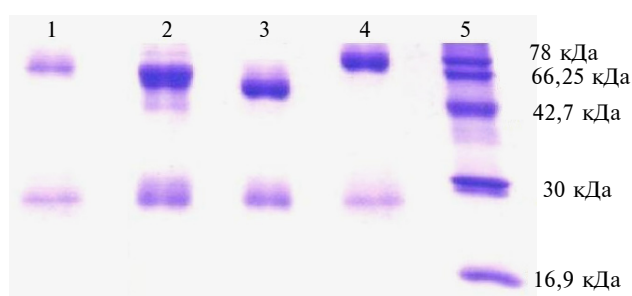


Рис. 4. Електрофореграма імуноглобулінових препаратів: 1 – фракція 1-го піка (IgE людини); 2 – IgA людини; 3 – IgG людини; 4 – IgM людини; 5 – маркери молекулярної маси

грами, фракції 1-го піка (трек 1) співвідносні дві смуги на рівні 80 кДа і 23 кДа, які відповідають за важкі (H) і легкі (L) ланцюги IgE відповідно. При проведенні імунодифузії за Оух

терлоні (дані не наведено) фракція 1-го піка не давала ліній преципітації із моноспецифічними сироватками проти імуноглобуліну людини класів G, M і A. Для очистки IgE за розробленою схемою було використано 25 мл сироватки із вмістом IgE близько 9,6 мкг/мл; кількість отриманого IgE людини становила 101 мкг. Отже, ефективність розробленої схеми (вихід IgE від початкової кількості у сироватці) становила 42 %.

Висновки

Розроблено вдосконалену методику одержання IgE людини, яка передбачає: вилучення із сироватки IgG людини за допомогою афінної хроматографії на протеїні G; вилучення із сироватки IgA та IgM людини за допомогою імуноафінних сорбентів на основі анти-IgA й анти-IgM моноклональних антитіл; вилучення IgE людини двохетапною гель-фільтрацією на супердексі 200; контроль якості отриманого імуноглобуліну в імунодифузії за Оухтерлоні та електрофорезі в ПААГ у редуруючих умовах. Використання запропонованої схеми дає можливість одержувати IgE людини високого ступеня чистоти, що зумовлює його використання для імунізації та високочутливих методів аналізу. Вихід IgE людини після всіх етапів очистки становив близько 42 % від початкової кількості імуноглобуліну E в сироватці.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на розроблення специфічного методу вилучення й очистки IgE людини із використанням анти-IgE моноклональних антитіл.

1. *Имунологія: Підручник* / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін.; передм. С. Комісаренка; за заг. ред. Є.У. Пастер. – К.: Вища школа, 2005. – 599 с.
2. K. *Ishizaka et al.*, “Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity”, *J. Immunol.*, vol. 97, no. 1, pp. 75 – 85, 1966.
3. D.R. *Stanworth et al.*, “Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein”, *Lancet*, vol. 290 (7511), pp. 330–332, 1967.
4. A.J. *Bonnin et al.*, “Association of cigarette smoking with elevated serum IgE levels in Hispanic Puerto Rican men”, *Ann. Allergy*, vol. 67, pp. 609–611, 1991.
5. A. *Miadonna and C. Zanussi*, “IgE synthesis in aging. Enhancement of IgE production in subjects with autoantibodies”, *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, vol. 58, pp. 75–80, 1979.
6. K.J. *Erb*, “Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand?”, *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 5, pp. 1170–1173, 2007.
7. J. *Duarte et al.*, “Total and functional parasite specific IgE responses in Plasmodium falciparum-infected patients exhibiting different clinical status”, *Malar. J.*, vol. 6, pp. 1–13, 2007.
8. 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.
9. *Иммунологические методы* / Пер. с нем., под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
10. E. *Harlow and D. Lane*, *Antibodies. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1988, 726 p.
11. *Иммунология: Практикум* / Е.У. Пастер, В.В. Овод, В.К. Позур, Н.Е. Вихоть. – К.: Вища школа, 1989. – 304 с.
12. *Шугалей И.В., Гарабаджиу А.В., Целинский И.В.* Химия белка: Учебн. пособие. – СПб.: Проспект Науки, 2010. – 200 с.
13. R.G. *Hamilton*, *The human IgG subclasses*, C. Mohan, Ed. Baltimore: Johns Hopkins University School of Medicine, 2001, 64 p.
14. J. *Hakimi et al.*, “The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding”, *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 36, pp. 22079–22081, 1991.
15. J. *Kleine-Tebbe et al.*, “Purification of immunoglobulin E (IgE) antibodies from sera with high IgE titers”, *J. Immunol. Methods*, vol. 179, no. 2, pp. 153–164, 1995.
16. U.R. *Laemmli*, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the of bacteriophage T4”, *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
17. *Галкін О.Ю.* Одержання імуноафінного сорбенту та розробка методики специфічного виділення IgM людини // Наукові вісті НТУУ “КПІ”. – 2009. – № 2. – С. 98–102.
18. L. *Kegedal et al.*, “Chemical, physical and chromatographic properties of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media”, *J. Chromatogr.*, vol. 537, pp. 17–32, 1991.
19. *Галкін О.Ю., Дуган О.М.* Порівняння схем імунізації мишей лінії Balb/c для одержання моноклональних антитіл до IgA людини // Науковий вісник Нац. ун-ту біоресурсів та природокористування України. – 2009. – Вип. 134, ч. 1. – С. 88–97.
20. V.S. *Chowdary et al.*, “A study on serum IgE and eosinophils in respiratory allergy patients”, *Indian J. Allergy Asthma Immunol.*, vol. 17, no. 1, pp. 21–24, 2003.
21. T.A.E. *Platts-Mills*, “The role of immunoglobulin E in allergy and asthma”, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, vol. 164, pp. S1–S5, 2001.
22. N. *Novak and T. Bieber*, “Allergic and non-allergic forms of atopic disease”, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, vol. 112, pp. 252–262, 2003.