

Isolatie van Gc-globuline uit serum

Naomi Bongaerts

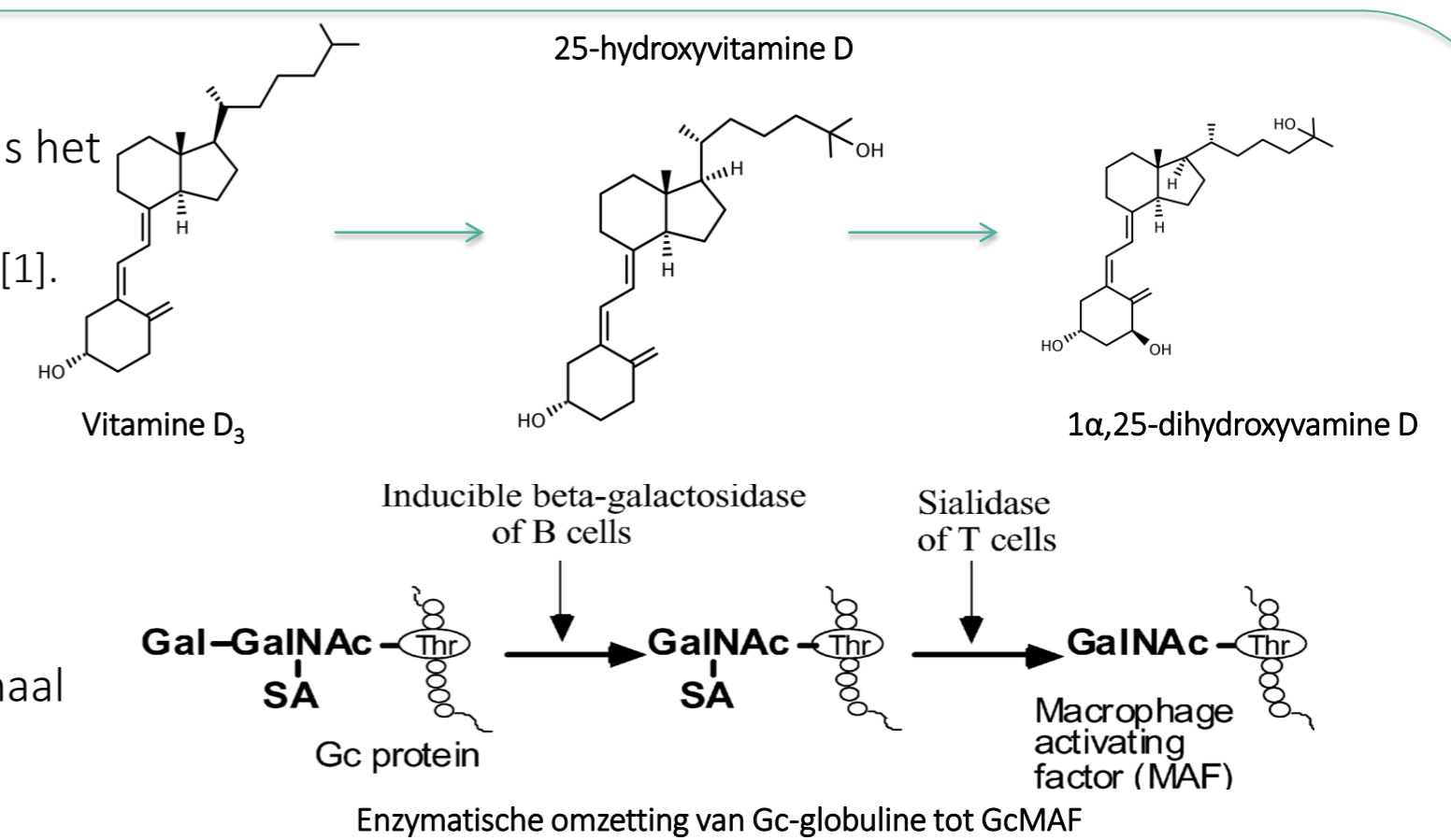
Master IW biochemie

Achtergrond

Gc-globuline of het vitamine D-bindend proteïne (VBP) is een eiwit dat in de bloedcirculatie voorkomt. Haar belangrijkste taak is het transport van vitamine D₃ en vitamine D₃ metabolieten, namelijk 25-hydroxyvitamine D en 1 α ,25-dihydroxyvitamine D. Deze stoffen zijn belangrijk bij het in evenwicht houden van de calcium- en fosforhuishouding en dus voor ook het botmetabolisme [1].

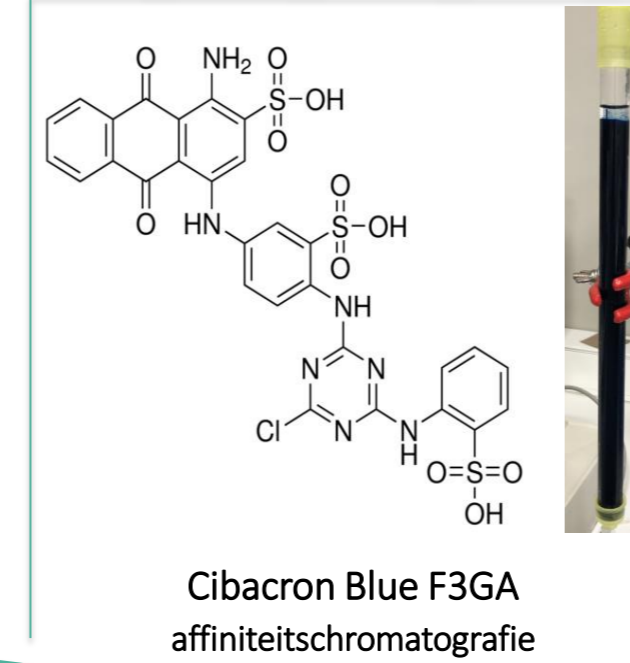
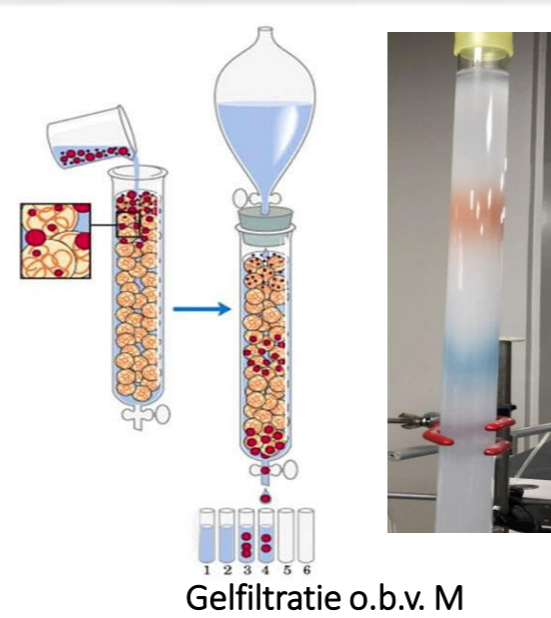
Daarnaast maakt Gc-globuline ook deel uit van het Extracellulair Actine Scavenger System, waar het verantwoordelijk is voor het afvoeren van globulair actine naar de lever voor afbraak. Zo worden microtromboses in bloedvaten voorkomen [1], [3].

Als laatste kan Gc-globuline bij virale of bacteriële infecties of bij weefselschade en met behulp van de B- en T-lymfocyten, enzymatisch in 2 stappen omgevoerd worden naar een macrofaag activerende factor, GcMAF. GcMAF activeert het immuunsysteem via herkenning van C-type lectines op het celmembraan van de macrofagen. Een intracellulair transductie signaal pathway wordt geactiveerd, waarna macrofagen Fc-receptoren op hun celmembraan tot expressie brengen en zo antigenen kunnen herkennen en fagocyteren.



1. Size Exclusion Chromatografie

Gc-globuline heeft een molmassa van 52 kDa. Het meest voorkomende proteïne in het serum is albumine met een molmassa van \pm 69 kDa. Dit storend eiwit moet zo veel mogelijk afgescheiden worden. Om de resolutie van de scheiding zo hoog mogelijk te maken wordt een Econo-column van 1 m gebruikt gevuld met Sephadex G-75. Het serum wordt gefractioneerd opgevangen door elutie met een fosfaatgebufferde zoutoplossing. Het elutiepatroon (absorbantie bij 280 nm i.f.v. elutievolume) wordt uitgezet en zowel piek- als schouderfracties worden gecontroleerd met de dot blot en sandwich-ELISA. Fracties met de hoogste Gc-globuline-concentraties worden verder onderworpen aan affiniteitschromatografie.



4. Affiniteitschromatografie

Cibacron blue F3GA is een kleurstof die via ionische en hydrofobe bindingen in bepaalde omstandigheden proteïnen bindt. Voor de affiniteitschromatografie werd een Econo-column van 30 cm gebruikt gevuld met een bed van 25 cm Affi-gel Blue. De affi-gel Blue is een agarosegel waaraan cibacron blue F3GA covalent gebonden is. Het experiment is gebaseerd op de methode van Gianazza & Arnaud [5]. Met behulp van een fosfaatbuffer en zoutgradiënt werden fracties met hoog VBP-gehalte geëluëerd. Deze fracties werden vervolgens met de dot blot en ELISA geanalyseerd. Als laatste werd getracht een dot blot voor albumine op te starten om te controleren of albumine werd afgescheiden van VBP. Wegens tijdsgebrek is dit niet gelukt.

Absorbantie	Concentratie VBP (mg/ml)	Fractie	Dot blot
0,252901	=0	5	Kleurloos
0,271985	0,304066=0	10	Kleurloos
1,1101	49,1301	15	Blauw
0,604035	16,5628	18	Blauw
0,410438	6,24055	20	Blauw
0,320478	2,12642	28	Licht blauw
0,304668	1,48414	30	Licht blauw
0,239514	=0	33	Zeer licht blauw
0,234999	=0	35	Zeer licht blauw
0,252574	=0	44	Licht blauw

Resultaten van de dot blot en ELISA van de affiniteitschromatografie.

Isolatie

Gc-globuline uit serum

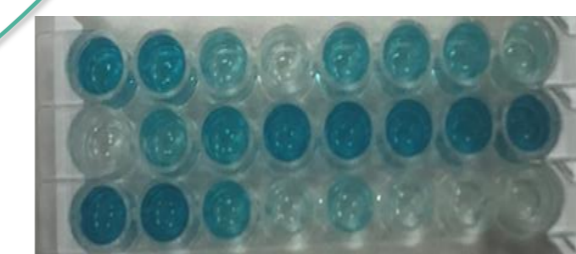
GcMAF is een veelbelovende parameter in verschillende kankerbehandelingen [4]. De in vitro productie van GcMAF start vanaf Gc-globuline. Deze laatste is zeer duur in aankoop. En vermits humaan serum, gecollecteerd van bloedafval, een grote hoeveelheid Gc-globuline bevat werd een methode ontwikkeld om Gc-globuline hieruit te isoleren. Epsilon biotech tracht zo de kosten te drukken.

Experimenten: SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAFIE OF GELFILTRATIE: gefractioneerde scheiding van proteïnen in het serum op basis van molecuulgrootte om Gc-globuline te isoleren[2].

CONTROLES MET DOT BLOT: kwalitatieve detectie van Gc-globuline met behulp van polyklonale Anti-Gc-globuline gekoppeld aan het HRP enzym en met TMB als substraat.

KWANTIFICATIE MET SANDWICH-ELISA: Gc-globuline concentraties bepalen in de geselecteerde fracties met behulp van primaire en secundaire polyklonale Anti-Gc-globuline.

AFFINITEITSCHROMATOGRAFIE: gefractioneerde isolatie van Gc-globuline met behulp van cibacron blue die onder bepaalde omstandigheden al dan niet specifiek bindt met verschillende serumproteïnen op basis van affiniteit[5].

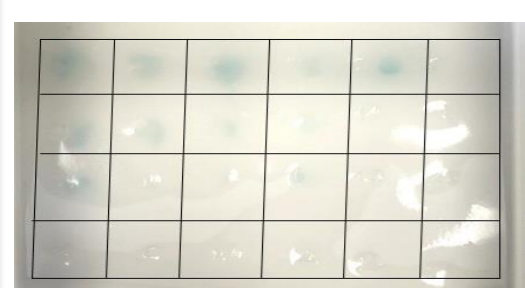


Overzicht van een ELISA-test afkomstig van enkele positieve dot blot fracties met berekening van de VBP-concentratie in mg/ml.

Absorbantie	Concentratie VBP (mg/ml)
0,54	< 56,25
1,45	84,31
1,37	76,79
1,44	83,53
0,25	< 56,25
0,99	< 56,25
2,70	241,71
0,19	< 56,25
1,76	107,83

2. Dot Blot

Om de aanwezigheid van Gc-globuline aan te tonen in de opgevangen fracties, wordt een kleine hoeveelheid gespot op een PVDF-membraan. Hier wordt dan polykloonaal anti-Gc-globuline aan toegevoegd dat gekoppeld is aan het HRP-enzym. Wanneer Gc-globuline in de spots aanwezig is, binden de antilichamen op het eiwit. Na toevoeging van het TMB-substraat op de spots ontstaat een redoxreactie gekatalyseerd door het HRP-enzym t.v.v. een blauw product. De intensiteit van de blauwe kleur weerspiegelt het gehalte aan Gc-globuline in de fracties. Fracties met een intens blauwe kleur worden verder geanalyseerd in de sandwich-ELISA.



V.l.n.r.: standaardraster voor het bepalen van As-concentratie om te gebruiken bij de dot blot; Resultaat van de dot blot afkomstig van schouder- en piekfracties van de gelfiltraties met Sephadex G-75.

Besluit

De isolatie van Gc-globuline met behulp van size exclusion chromatografie en affiniteitschromatografie is grotendeels gelukt. De resolutiefactor van de karakterisatiescheiding bedraagt immers 4,5, dus ruim boven de vereiste van 1,5. Hoe hoger de waarde hoe beter de scheiding. Ook hebben de experimenten van de affiniteitschromatografie de resultaten van Gianazza & Arnaud, 1982 bevestigd. Er kan dus vermoed worden dat ook in dit experiment albumine succesvol werd afgescheiden. Om dit met zekerheid te kunnen bevestigen moet de dot blot voor albuminedetectie op punt gesteld worden.

Referenties

[1] H. Nagasawa *et al.*, "Gc protein (Vitamin D-binding Protein): Gc Genotyping and GcMAF Precursor Activity," *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6A, pp. 3689–3696, 2005 [2] W. O. Smith and S. M. Daniels, "Purification of Phytochrome by Affinity Chromatography on Agarose-Immobilized Cibacron Blue 3GA," *Plant Physiol.*, vol. 68, pp. 443–446, 1981 [3] A. Hossein-Nezhad and M. F. Holick, "Vitamin D for Health: A Global Perspective," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 88, no. 7, pp. 720–755, 2013 [4] N. Yamamoto, M. Ueda, and K. Hashinaka, "Immunotherapy of breast cancer with Gc protein-derived macrophage activating factor, GcMAF," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 8 Supplement, pp. 5532–5532, Apr. 2011 [5] E. Gianazza and P. Arnaud, "Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction," *Biochem. J.*, vol. 203, no. 3, pp. 637–41, Jun. 1982

Promotoren / Copromotoren: Dhr. Eugene Bosmans, ing. Bart Thewissen, ing. Liesbet Pauls