

De opzuivering van Gc-globuline uit humaan plasma/serum met behulp van de Cohn-fractionering en affiniteitschromatografie

Bjorn Smeets

Master IW Biochemie

Achtergrond

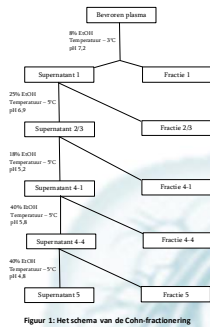
Gc-globuline is een serumproteïne dat bestaat voor het transport van vitamine D metabolieten. Daarnaast heeft het nog enkele immunologische toepassingen zoals vetzuurtransport, chemotaxis, actine-scavenger en de vorming van GC-MAF. Deze laatste is een macrofaagactiverende factor die als therapeutisch middel kan dienen [1].

Het doel van dit onderzoek is de opzuivering van Gc-globuline uit humaan plasma. Het menselijk plasma bevat tussen 63 en 83 gram eiwit per liter waarvan albumine de meest voorkomende is. Er dient een methode opgesteld te worden voor het scheiden van deze vele eiwitten.

Methode

Cohn fractionering

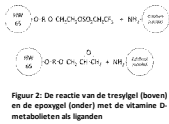
De scheiding van albumine uit het plasma wordt gedaan aan de hand van de Cohn-fractionering. Dit proces berust op het neerslaan van eiwitten bij hun isoelektrisch punt bij verschillende ethanolconcentraties, pH-waarden en temperaturen. De eiwitten worden gecentrifugeerd en worden afgezonderd als fractie. In fractie 4-1 bevindt zich Gc-globuline [2].



Figuur 1: Het schema van de Cohn-fractionering

Affiniteitschromatografie

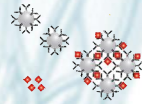
Vitamine D-metabolieten werden gecoat op toypearl epoxy- en tresylgels. Op deze manier werd een kolom met affiniteit voor Gc-globuline gecreëerd. De moleculen gebonden aan de kolom werden gedesorbeerd via een uitzouting met NaCl.



Figuur 2: De reactie van de tresylgel (boven) en de spongel (onder) met de vitamine D-metabolieten als liganden

Antiserum albumine turbidimetrie

Wanneer albumine bindt met zijn antiserum vindt coagulatie plaats, dat verstrooiing van licht veroorzaakt. Dit kan turbidimetrisch bepaald worden. Op deze manier wordt de albumineconcentratie gemeten.



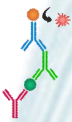
Figuur 3: Albumine-antibodies coaguleren met meerdere albumine-moleculen

Spectrofotometrie

De eiwitconcentratie wordt bepaald aan de hand van spectrofotometrie bij een golflengte van 280nm. Bij deze golflengte absorberen de aromatische zijgroepen van tyrosine en tryptofaan licht.

Sandwich ELISA

De Gc-globulineconcentratie wordt achterhaald met een sandwich ELISA. Er wordt hierbij gebruik gemaakt van anti-Gc-globuline antilichamen. Het secundaire antilichamen is gecoat met het enzym HRP en zet de reactie van TMB met H₂O₂ in werking.

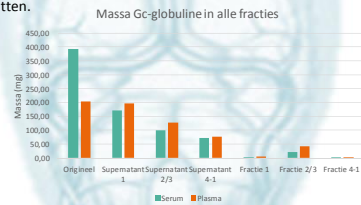


Figuur 4: Binding van primair antilichamen, secundair antilichamen en de omzetting van het substraat bij de sandwich-ELISA

Resultaten

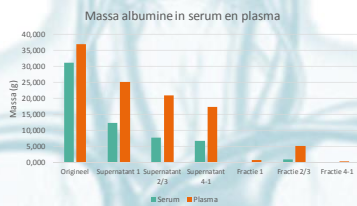
Cohn Fractionering

De grootste massa Gc-globuline is neergeslagen in fractie 2/3. Theoretisch gezien zou dit in fractie 4-1 moeten zijn. Dit is mogelijk te wijten aan interacties tussen Gc-globuline en andere eiwitten.



Figuur 5: De massa Gc-globuline in elke fractie van de Cohn-fractionering van serum en plasma

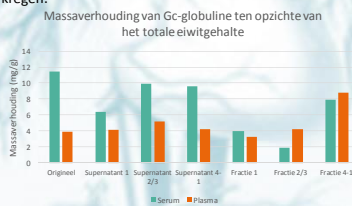
De grootste massa albumine bevindt zich in de supernatanten zoals verwacht was uit de theorie van de Cohn-fractionering. Fractie 1 en fractie 4-1 bevatten weinig tot geen albumine.



Figuur 6: De massa albumine in elke fractie van de Cohn-fractionering van serum en plasma

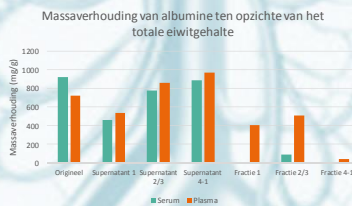
Zuiverheid

Fractie 4-1 bevat de hoogste zuiverheid van alle fracties samen met een lage massa albumine. Via de Cohn-fractionering werd een zuiverheid van 7,94mg/g in serum en 8,85mg/g in plasma verkregen.



Figuur 7: De massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van de totale eiwitmassa in alle fracties van de Cohn-fractionering van serum en plasma

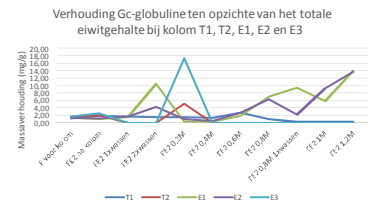
De massaverhouding van albumine ten opzichte van de totale eiwitmassa heeft een stijgende trend in de supernatanten. Ook dit werd verwacht volgens de theorie van de Cohn-fractionering. Fractie 4-1 heeft ook een lage massaverhouding voor albumine wat deze fractie interessant maakt voor verdere opzuivering.



Figuur 8: De massaverhouding van albumine ten opzichte van de totale eiwitmassa in alle fracties van de Cohn-fractionering van serum en plasma

Affiniteitschromatografie

Fractie 2/3 uit plasma werd verkozen als staal voor de affiniteitschromatografie. Hiermee werd een zuiverheid van 17,3mg/g behaald, met kolom E3, caldidiol als ligand en een concentratie van 0,2M voor uitzouting.

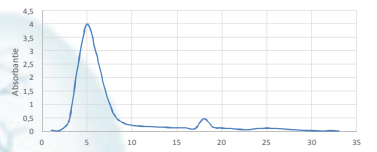


Figuur 8: De massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van de totale eiwitmassa bij elke stap van de affiniteitschromatografie

Gelchromatografie

Fractie 4-1 van serum werd onderworpen aan een gefiltratie met een ACA 44 uitrolog. Er bleek een verhoging in absorptantie te zijn in de fractie waar Gc-globuline werd verwacht. Deze fractie moet verder onderzocht worden.

Absorptantie in functie van fractienummer na gefiltratie



Figuur 8: Absorptantie bij alle fracties na gefiltratie

Toekomstig werk

Cohn fractie 4-1 bevat nog andere interessante eiwitten buiten Gc-globuline zoals transferrine, proteïne C, α2-macroglobuline, α1-antitrypsine en IGF1 [3] [4] [5] [6] [7]. Er is verder onderzoek nodig naar de opzuivering van deze eiwitten.

Conclusie

Via de Cohn-fractionering werd een zuiverheid van 7,95mg/g in serum en 8,85mg/g in plasma in fractie 4-1. In deze fractie zat ook zo goed als geen albumine wat als storende factor werkte.

Na affiniteitschromatografie werd een zuiverheid van 17,3mg/g behaald. De zuiverheid van Gc-globuline is hierdoor met factor 4,4 gestegen in plasma en factor 1,5 in serum. Gelchromatografie biedt een interessante mogelijkheid voor verdere scheiding.

Het onderzoek kan verder gezet worden naar andere therapeutische eiwitten in Cohn-fractie 4-1.

Bibliografie

[1] K. Shigeru, Y. Mochizuki, Y. Arita, H. Kanetsake en N. Yamamoto, "Effects of Vitamin D3-Binding Protein-Derived Macrophage Activating Factor (GM-CSF) on Angiogenesis," *Journal of the National Cancer Institute*, pp. 1213-1218, 2002.
 [2] K. Mousa, M. Hossain en M. Ghannam, "Implementation of Plasma Fractionation in Biological Medicines Production," *Iranian Journal of Biotechnology*, pp. 215-220, 2015.
 [3] E. Aronow, J. Muscatello, V. Melella, V. Romano, P. Giacchetti, I. Nardini en C. Ferrara, "A simple method for large scale purification of plasma derived apo-transferrin," *Biochemistry and Applied Biochemistry*, pp. 87-95, 2011.
 [4] S. Barakat, D. G. Ahn en K. A. Kang, "Separation of protein C from Cohn fraction IV by immuno-antibody," *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 325-331, 2007.
 [5] C. Huangfu, Y. Mo, M. Lu, J. Ba, X. Zhao en J. Zhang, "Purification of alpha 2 macroglobulin from Cohn fraction IV by immobilized affinity chromatography: a promising method for the better use of plasma," *Journal of chromatography*, pp. 68-75, 2005.
 [6] C. Huangfu, J. Zhang, Y. Mo, J. Ba, M. Lu, X. Zhao en J. Zhang, "New process for purifying high purity alpha 2 antitrypsine from Cohn fraction IV by chromatography: A promising method for the better utilisation of plasma," *Journal of chromatography B*, pp. 156-164, 2007.
 [7] J. Steczek, M. Hulin, A. Chelna en A. Labenies, "Purification and characterization of three molecular forms of insulin-like growth factor I from human Cohn-fraction IV," *Journal of chromatography*, pp. 237-243, 1990.

Promotoren / Copromotoren: Ing. Bart Thewissen, dhr. Eugene Bosmans en ing. Liesbet Pauls