Eine schnelle, einfache Methode zur Reinigung von γ -Globulinen aus menschlichen Seren durch thiophile Adsorptionschromatographie

Rapid and Reliable One-Step Purification of γ -Globulines by Thiophilic Adsorption Chromatography

F. Boege, Christa Kraus, Michaela Müller, R. Jahns

Hauptlabor der Medizinischen Poliklinik, Universität Würzburg

Zusammenfassung:

Wir haben eine technisch einfache Methode zur Herstellung von γ -Globulinfractionen für den Einsatz im klinischen Routinelabor adaptiert. Mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ haben wir die Adsorption sämtlicher Klassen von Immunglobulinen an thiophile Agarose induziert. Die Elution erfolgt durch 0,5 M NaCl. Innerhalb einer Stunde können so aus einer Serumprobe mehr als 90 % IgG und IgA, sowie mehr als 60 % IgM in ca. 80 % reiner Form erlöst werden. α_2 -Makroglobulin ist mit einem Gesamtproteinanteil von 5 % die Hauptverunreinigung. Kontaminationen mit Albumin sind geringer als 1 %. Bei geringem apparativem Aufwand können bis zu 50 Seren pro Stunde verarbeitet werden.

Schlüsselwörter:

Thiophile agarose – γ -Globuline – Reinigung

Summary:

A simple one-step procedure for the purification of γ -globulines from human serum was evaluated for its use in routine clinical analysis. It includes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ promoted adsorption of immunoglobulines to thiophilic agarose followed by batchwise elution. Within 1 h more than 90 % of IgG and IgA and more than 60 % of IgM can be obtained in a purified form (≈ 80 % of the total protein concentration). α_2 -Macroglobulin copurifies and constitutes the major non- γ -globulin protein in the eluted fraction (≈ 5 % of the total protein concentration). The contamination with albumin is less than 1 %. Without mechanization ≈ 50 serum samples can be processed simultaneously in 1h.

Keywords:

Thiophilic agarose – γ -globulines – purification

Einleitung

Die Analyse von Antikörpern gegen virale und bakterielle Proteine sowie gegen Blutgruppensubstanzen und menschliche Autoantigene nimmt in der medizinischen Diagnostik an Bedeutung zu. Meist werden Serumproben für diese Analysen verwendet, aber viele Komponenten des Serums, wie z. B. Medikamente und Metaboliten, Albumin und andere Proteine, können mit der Antigen-Antikörperreaktion interferieren. Diese potentiellen Störquellen spielen vor allem eine Rolle, wenn nieder-affine oder -titrige Antikörper untersucht werden sollen, wenn die Spezifität des Meßsignals zweifelhaft erscheint oder wenn eine intrinsische biologische Aktivität der Antikörper, z. B. Stimulation oder Hemmung einer Enzymaktivität, im Vordergrund des diagnostischen Bemühens stehen. In solchen Fällen kann es von großem Nutzen sein, die zu analysierenden Antikörper aufzureinigen.

Die thiophile Adsorptionschromatographie zur Reinigung von Immunglobulinen wurde erstmals von Porath et al. vorgeschlagen (1). Diese Methode nutzt die für alle Klassen von Immunglobulinen und für α_2 -Makroglobulin typische, bislang jedoch unbekannte Eigenschaft, bei neutra-

lem pH und hohen Salzkonzentrationen spezifisch an Sulfon-Thioether-Liganden zu binden (2). Im Gegensatz zu anderen Einschnittsverfahren zur Immunglobulinreinigung können bei der thiophilen Adsorptionschromatographie pH-Extreme und andere potentiell denaturierende Bedingungen vermieden werden (3). Außerdem zeigt der thiophile Ligand eine sehr breite Spezifität für alle Klassen von Immunglobulinen (4) und ist daher anderen Verfahren überlegen, wenn es gilt, möglichst die Gesamtheit der vorhandenen γ -Globuline funktionell intakt zu erfassen. Die Methode wurde vielfach erfolgreich von Biologen, Lebensmittelchemikern und Veterinären aufgegriffen (4–7), hat jedoch unseres Wissens bisher keinen Eingang in die medizinische Diagnostik gefunden.

Wir berichten hier über unsere Bemühung, das Reinigungsprinzip in eine Anwendungsform zu überführen, die den Anforderungen des klinischen Routinelabors gerecht wird. Wir schildern eine vom zeitlichen und technischen Aufwand her vertretbare, ausschließlich auf kommerziell erhältlichen Materialien beruhende Methode, die geeignet ist, γ -Globuline aus Patientenserumproben wiederholt schnell und mit standardisierter Ausbeute zu reinigen.

Materialien und Methoden

Thiophile Agarose (Affi-T) wurde bei Kem-En-Tec, Kopenhagen, Dänemark, gekauft. PD10 Polypropylen-Chromatographiesäulen (Pharmacia, Freiburg) wurden mit 1 ml Gel gefüllt. Wenn entsprechend der Herstellerempfehlungen gelagert, konnten die Säulen mehr als zehnmal wiederverwendet werden. Thiophile Affinitätschromatographie von menschlichen Serumproben wurde bei Raumtemperatur ausgeführt. Zu 1 ml-Portionen des Serums wurde langsam und unter ständigem Mischen 2 ml 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 zugemischt. Hierbei ausgefällte Proteine (üblicherweise weniger als 5 % IgG und weniger als 2 % IgA/IgM) wurden sedimentiert ($13000 \times g$ für 5 min). Der Überstand wurde an 1 ml thiophile Agarose adsorbiert und das Gel nachfolgend mit 5 Säulenvolumen 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 Säulenvolumen 0,5 M NaCl.

Die Konzentrationen von Albumin, Transferrin, α_2 -Makroglobulin und Immunglobulinen wurden in Seren und chromatographischen Fraktionen durch Immunnephelometrie (Behring-Nephelometer-Analyzer und Antiseren: Behringwerke AG, Marburg), die Gesamtproteinkonzentrationen nach Biuret bestimmt. Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit Hilfe des PhastSystems (Pharmacia, Freiburg) unter nicht-reduzierenden Bedingungen in 4–15 % Gradientengelen durchgeführt. Die getrennten Proteine wurden im Gel durch Silberfärbung sichtbar gemacht (8). Die Nachweisgrenze der Färbung betrug ≈ 2 ng/Spur für Rinderserumalbumin. Für die gelchromatographische Analyse von Serum und gereinigten γ -Globulinen wurde eine Su-

perdex 200 Säule (1,6 x 70 cm, Pharmacia, Freiburg) benutzt. Die Säule wurde in einer FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg) mit 0,2 mol/l NaCl, 10 mmol/l Tris HCL, pH 7,4, Flußrate 0,5 ml/min equilibriert und entwickelt. Üblicherweise wurden Probenvolumen von 200 μl injiziert. Die in dieser Studie verarbeiteten 50 Serumproben stammten von gesunden Blutspendern.

Ergebnisse

Die Adsorption von Immunglobulinen an die thiophile Matrix hängt vorwiegend von der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration ab (Abb. 1). Eine komplette Bindung von IgG und IgA wurde bei 1 M Konzentrationen erreicht, während für die komplette Adsorption von IgM höhere Konzentrationen nötig waren, bei denen auch Albumin vermehrt an die Matrix adsorbierte. Als Kompromiß zwischen möglichst immunglobulinspezifischer und möglichst vollständiger Bindung wurde die Adsorption unter Standardbedingungen mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durchgeführt. Unter diesen Bedingungen bindet Albumin nur sehr schwach an den Liganden und wurde üblicherweise zu mehr als 95 % in der Durchlauf- und den Waschfraktionen gefunden (Abb. 2). Mehr als 90 % des IgG/IgA und mehr als 60 % des IgM banden fest an die Säule und konnten vollständig mit 0,5 M NaCl eluiert werden. Die optimalen Volumina für Waschen (5 ml) und Elution (4 ml) einer 1 ml Säule wurden aus den in Abbildung 2 exemplarisch dargestellten Versuchen abgeleitet. Für die Bestimmung der mittleren Ausbeute sowie der Reproduzierbarkeit der Methode wurden γ -Globuline aus 1 ml Portionen von 50 Seren gesunder Blutspender unter optimierten Standardbedingungen gewonnen. Die mittleren Ausbeuten für IgG, IgA, IGM sind in Tabelle 1 dargestellt.

Abb. 1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abhängige Adsorption von Albumin und γ -Globulinen an thiophile Agarose: 1 ml Portionen humanen Serums wurden auf die angegebenen Salzkonzentrationen eingestellt und jeweils an 1 ml thiophile Agarose adsorbiert. Die Säulen wurden dann mit 10 ml der gleichen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration, pH 7,4 gewaschen. Durchlauf- und Waschfraktionen wurden jeweils vereinigt. Die Konzentrationen von Albumin, IgG, IgA und IgM wurden im eingesetzten Serum und in den Durchlauf-/Waschfraktionen immunnephelometrisch gemessen und hieraus die adsorbierten Anteile berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei Versuchsreihen, die Standardabweichung beträgt für jeden Punkt weniger als 15 %.

Abb. 2: 1 ml Humaneserum wurde auf 1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und an 1 ml thiophile Agarose adsorbiert. Die Säule wurde 9mal mit 1 ml, 1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 gewaschen und 5mal mit 1 ml, 0,5 mol/l NaCl eluiert. Die Konzentrationen von IgG, IgA, IgM und Albumin wurden im Ausgangsmaterial und den chromatographischen Fraktionen immunnephelometrisch gemessen und die prozentuale Ausbeute berechnet.

Die Reinheit der eluierten γ -Globuline wurde mit drei Verfahren überprüft: 1. Durch SDS-PAGE. In Abbildung 3 ist ein Beispiel gegeben. 2. Durch Gelchromatographie. Abbildung 4 gibt ein Beispiel. 3. Durch quantitative Analyse und Bilanzierung des Immunglobulin-, Albumin- und Gesamtproteingehaltes in den eluierten Fraktionen (Tabelle 1). Aus allen drei Methoden geht klar hervor, daß Immunglobuline in ca. 80 % reiner Form gewonnen wurden. Die Hauptkontaminante stellt mit 5 % Gesamtproteinanteil α_2 -Makroglobulin dar. Albumin wird zu weniger als 1 % der Gesamtproteinkonzentration reduziert. Weitere geringfügige Proteinkontaminationen konnten sichtbar gemacht werden, indem Polyacrylamidgele mit dem Equivalent von 2 μ g IgG überladen wurden (Abb. 3). Unter diesen Umständen stellten sich schwache Proteinbanden (2–4 ng/Bande) im Molekulargewichtsbereich 60 000–100 000 Dalton dar, deren Gesamtproteinanteil unter 1 % liegt.

Die Methode zeigte eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit hinsichtlich Reinheitsgrad und Ausbeute sowohl innerhalb einer Serie (Variationskoeffizient VK < 10 %, n

Tab. 1: Immunnephelometrische Analyse der wichtigsten Serumproteine vor und nach thiophiler Adsorptionschromatographie von 1 ml Serum

	Serum (mg/1 ml)	Eluat (mg/4 ml)	Ausbeute* (%)
Albumin	47,21 $\pm$ 7,81	0,33 $\pm$ 0,07	0,7
Transferrin	3,21 $\pm$ 0,62	0,09 $\pm$ 0,01	2,8
α_2 -Macroglobulin	1,93 $\pm$ 0,45	0,83 $\pm$ 0,29	43,0
IgG	12,7 $\pm$ 5,5	11,8 $\pm$ 4,7	92,9
IGA	2,48 $\pm$ 0,42	2,08 $\pm$ 0,48	83,8
IgM	1,21 $\pm$ 0,33	0,77 $\pm$ 0,31	63,6
Gesamtprotein	76,1 $\pm$ 14,7	18,7 $\pm$ 3,9	24,9

Der Mittelwert Standardabweichung von 50 Präparationen unterschiedlicher Sera ist gezeigt.

*1) bezogen auf die Ausgangsmenge

= 10) als auch von Tag zu Tag (VK < 15 %, n = 5). Einbußen der Ausbeute waren lediglich dann zu beobachten, wenn die Säulen häufiger als 10mal wiederverwendet wurden.

Abb. 3: Gelchromatographische Reinheitsanalyse: 1 ml Humanserum wurde auf 1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und an 1 ml thiophile Agarose adsorbiert. Die Säule wurde mit 9 ml, 1 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 gewaschen und mit 4 ml, 0,5 mol/l NaCl eluiert. Durchlauf- und Waschfraktionen wurden vereinigt. 200 μ l Proben des Serums, der Durchlauf-/Waschfraktion und des Eluates wurden auf einer Superdex 200 Säule (1,6 x 70 cm) der Gelchromatographie unterworfen. Die UV-Absorption (280 nm) wurde kontinuierlich aufgenommen. Die markierten Proteinpeaks wurden gesammelt und durch Immunnephelometrie identifiziert:

- Peak 1: α_2 -Makroglobulin
- Peak 2: IgM
- Peak 3: IgA
- Peak 4: IgG
- Peak 5: Transferrin, Albumin
- Peak 6: Bilirubin

Abb. 4: Reinheitsanalyse der γ -Globuline durch SDS-Gelelektrophorese: 1 ml Portionen von Seren wurden der thiophilen Affinitätschromatographie (Standardbedingungen) unterworfen. Die IgG-Konzentrationen in den Elutionsfraktionen wurden gemessen und Portionen equivalent zu 50 ng (Spur 1,2) oder 2 μ g (Spur 3,4) IgG wurden in die Gelelektrophorese eingesetzt. Die angezeigten relativen Molekulargewichte entsprechen der Migrationsdistanz folgender Eichproteine: Myosin, α_2 -Makroglobulin, β -Galactosidase, Phosphorylase b Untereinheiten, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Sojabohnen, Trypsininhibitor. Die Proteinfärbung mit Silber erfolgte entsprechend (9).

Diskussion

Wir stellen hier ein Protokoll vor, mit dem sich γ -Globuline aus Serumproben rasch, kostensparend und ohne großen apparativen Aufwand reinigen lassen. Es besteht kein Zweifel, daß sich Ausbeute und Reinheitsgrad durch Gradientenelution und Hochdruckchromatographie steigern ließen (4, 5). In der hier vorgestellten Form reicht die Methode jedoch aus, die Serummatrix soweit zu reduzieren, daß wesentliche Störeffekte auf die Antigen-Antikörper-Reaktion ausgeschlossen werden können. Das Reinigungsprinzip ist nicht neu, hat jedoch bisher keinen Eingang in die medizinische Laborroutine gefunden. Wesentliche Vorteile dieser Methode gegenüber anderen Verfahren sind die vergleichsweise schonende Behandlung der Proteine während der chromatographischen Trennung sowie die breite Spezifität des Liganden für die meisten Immunglobulinklassen.

Mit dem weiterhin zunehmenden Einsatz von Immunglobulinen in der medizinischen Laborroutine als Analyten wie auch als Reagenzien wird eine derartige Probenvorbereitung langfristig eine methodische Bereicherung darstellen, selbst wenn derzeit in der Regel noch auf die γ -Globulinpräparation unter Routinebedingungen verzichtet werden kann.

Literatur:

1. Porath, J., Maisano, F. & Belew, M. (1985) Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation, *FEBS Lett.* 185, 306–310.
2. Hutchens, W. T. & Porath, J. (1986) Thiophilic adsorption of immunoglobulins – analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification, *Anal. Biochem.* 159, 217–226.
3. Hutchens, W. T. & Magnuson, J. S. (1990) Secretory IgA, IgG and IgM immunoglobulins isolated simultaneously from colostrum whey by selective thiophilic adsorption, *J. Immunol. Methods* 128, 89–99.
4. Nopper, B., Kohen, F. & Wichek, M. (1989) A thiophilic adsorbent for one-step high-performance liquid chromatography purification of monoclonal antibodies, *Anal. Biochem.* 180, 66–71.
5. Juronen, E., Parik, J. & Toomik, P. (1991), FPLC purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid using blue DEAE and thiophilic sorbents, *J. Immunol. Methods* 136, 103–109.
6. Hutchens, W. T., Magnuson, J. S. & Yip, T. T. (1989) Selective removal, recovery and characterization of immunoglobulins from human colostrum, *Pediatr. Res.* 26, 623–628.
7. Lihm, A. & Heegaard, W. P. M. (1991) Thiophilic adsorption chromatography: the separation of serum proteins, *Anal. Biochem.* 192, 64–69.
8. Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining, *Electrophoresis* 6, 103–112.

Anschrift für Korrespondenz:

Dr. med. Fritz Boege
Hauptlabor der Medizinischen Poliklinik
der Universität Würzburg
Klinikstraße 6–8
8700 Würzburg

□

Thromborel® S...

...falls Chargenkonstanz für Sie nicht Luft ist.

Die über 400 von
Behring produzierten
Chargen dokumentieren
die hohe Qualität des
Thromboplastins

Thromborel® S.

Der Variationskoeffizient
bezogen auf den Empfind-
lichkeitsfaktor ISI
liegt von Charge zu
Charge bei 3,9%.

Behringwerke AG
Postfach 1140, 3550 Marburg/Lahn

Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 1212
6237 Liederbach 1

GENERATIONSWECHSEL

NOVA ELEKTROLYT- SYSTEME

1959 war vielen der Rock'n'Roll zu modern.

1978 war vielen unsere neu eingeführte flammenlose ISE zu modern.

Und **1992** wird vielen die neueste Generation unserer Elektrolytsysteme zu modern sein.

Warten Sie nicht bis zur **MEDICA**. Wir informieren Sie gern auch schon vorher ausführlich.

biomedical

NOVA BIOMEDICAL GMBH

Adam-Opel-Straße 19a

6074 Rödermark

Telefon 0 60 74/5 00 21

Telefax 0 60 74/60 70