

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ ARTENJAK

**OPTIMIZACIJA IZOLACIJE IMUNOGLOBULINOV RAZREDA M IZ
HUMANEGA SERUMA ZA ŠTUDIJSKIH MOLEKULSKIH SPREMENB PO
ELEKTRO-OKSIDACIJI**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ ARTENJAK

**OPTIMIZACIJA IZOLACIJE IMUNOGLOBULINOV RAZREDA M IZ
HUMANEGA SERUMA ZA ŠTUDIJSKIH MOLEKULSKIH SPREMEMB PO
ELEKTRO-OKSIDACIJI**

**OPTIMIZATION OF ISOLATION OF IMMUNOGLOBULINS CLASS M FROM
HUMAN SERUM FOR STUDIES OF MOLECULAR CHANGES AFTER
ELECTRO-OXIDATION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljal v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za reumatologijo, SPS interna klinika, KC Ljubljana pod mentorstvomizr. prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem. Nefelometrične meritve je opravila dr. Ivica Avberšek-Lužnik, mag. farm., spec. med. biokem. na oddelku Laboratorijska diagnostika, Splošna bolnišnica Jesenice. Določanje sprememb specifičnosti z ELISA metodo je bilo izvedeno v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za reumatologijo, SPS interna klinika, KC Ljubljana v okviru rutinskih preiskav.

Hvala mentorjuizr. prof. dr. Borutu Božiču, da mi je omogočil izvedbo diplomske naloge na področju imunologije in za vse strokovne nasvete, napotke in usmerjanja pri izvedbi kot tudi pri pisanju diplomske naloge. Hvala tudi celotnemu osebju Laboratorija za imunologijo revmatizma za uvajanje in vso tehnično pomoč pri izvedbi diplomske naloge.

Prav tako se iskreno zahvaljujem mojim staršem in najbližjim, ki so mi omogočili študij ter me ves čas podpirali. Zahvaljujem se tudi vsem mojim prijateljem, ki so mi med celotnim študijem stali ob strani, me v težkih trenutkih bodrili in mi tako in drugače polepšali študentska leta.

Iskrena hvala vsem!

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.

VSEBINA

POVZETEK.....	1
ABSTRACT	2
OKRAJŠAVE	3
1. UVOD.....	4
1.1. PROTEINI	4
1.1.1. SERUMSKI PROTEINI.....	5
1.2. PROTITELESA.....	6
1.2.1. SPECIFIČNOST VEZAVE ANTIGEN/PROTITELO.....	7
1.2.2. AVTOIMUNOST, AVTOPROTITELESA.....	7
1.2.3. PROTITELESA RAZREDA M.....	8
1.3. IZOLACIJA PROTITELES.....	8
1.3.1. SPECIFIČNE METODE	9
1.3.1.1. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA.....	9
1.3.2. NESPECIFIČNE METODE	9
1.3.2.1. METODE OBARJANJA PROTEINOV.....	10
1.3.2.1.1. OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM	10
1.3.2.2. DIALIZA	11
1.3.2.3. ULTRAFILTRACIJA	11
1.3.2.4. GELSKA FILTRACIJA.....	12
1.4. METODE DETEKCIJE IMUNOGLOBULINOV	14
1.4.1. SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE PROTEINOV.....	14
1.4.1.1. Direktno	14
1.4.1.2. Bradfordova metoda.....	14
1.4.2. SDS-PAGE	14
1.4.3. NEFELOMETRIJA	15
1.4.4. ELISA	15
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI in METODE	17
3.1. MATERIALI.....	17
3.1.1. BIOLOŠKI MATERIAL	17
3.1.2. APARATURE IN OSTALI MATERIAL.....	17
3.1.3. KEMIKALIJE.....	18
3.1.4. PUFRI IN DRUGE RAZTOPINE	20
3.2. METODE	24
3.2.1. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA	24
3.2.2. OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM.....	24
3.2.3. DIALIZA	24
3.2.4. ULTRAFILTRACIJA.....	24
3.2.5. GELSKA FILTRACIJA	25
3.2.6. BRADFORDOVA METODA.....	25
3.2.7. SDS - PAGE	25
3.2.8. NEFELOMETRIJA	25
3.2.9. ELISA (aCL, anti- β_2 GPI).....	25

4. EKSPERIMENTALNI DEL	26
4.1. IZOLACIJA IgM Z AFINITETNO KROMATOGRFIJO.....	27
4.1.1. Korak 1 – PRIPRAVA VZORCA	27
4.1.2. Korak 2 – IZOLACIJA IgM	27
4.2. OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM	28
4.3. DIALIZA	29
4.4. ULTRAFILTRACIJA.....	30
4.5. GELSKA FILTRACIJA	33
4.6. BRADFORDOVA METODA.....	35
4.7. SDS - PAGE	36
4.8. ELISA (aCL in anti β_2-GPI).....	39
5. REZULTATI in RAZPRAVA.....	40
5.1. SPECIFIČNE METODE	40
5.1.1. IZOLACIJA IgM Z AFINITETNO KROMATOGRFIJO.....	40
5.1.1.1. Korak 1 – PRIPRAVA VZORCA.....	40
5.1.1.2. Korak 2 – IZOLACIJA IgM	40
5.2. NESPECIFIČNE METODE.....	42
5.2.1. Ponovitev A	42
5.2.1.1. Korak 1 – OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM	42
5.2.1.2. Korak 2 – DIALIZA	42
5.2.1.3. Korak 3 – ULTRAFILTRACIJA	45
5.2.1.4. Korak 4 – GELSKA FILTRACIJA.....	48
5.2.1.4.1 Kolona 10/20.....	48
5.2.1.4.2. Kolona XK 16/100	50
5.2.1.5. Korak 5 – KONCENTRIRANJE VZORCEV.....	54
5.2.2. Ponovitev B	55
5.2.2.1. Korak 1 – OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM.....	56
5.2.2.2. Korak 2 – ULTRAFILTRACIJA	56
5.2.2.3. Korak 3 – DIALIZA.....	58
5.2.2.4. Korak 4 – GELSKA FILTRACIJA.....	61
5.2.2.4.1 Kolona XK 16/100	61
5.2.2.5. Korak 5 – KONCENTRIRANJE VZORCEV.....	64
5.2.3. ELISA REZULTATI	66
5.2.4. IZKORISTEK IZOLACIJE	66
5.3. OPTIMALEN NAČIN IZOLACIJE.....	68
6. SKLEPI.....	70
7. LITERATURA	71

POVZETEK

Proteini imajo v telesu različne funkcije, ena izmed njih je tudi obramba organizma pred tujki. Med proteine s takšno vlogo sodijo tudi protitelesa. Protitelesa so glikoproteini, katerih osnovna monomerna enota je zgrajena iz dveh identičnih lahkih in dveh identičnih težkih verig, ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi. Med njimi so IgM največji, saj so zgrajeni iz 5 osnovnih monomernih enot. Predel, s katerim se protitelesa vežejo na antigen, imenujemo hipervariabilno mesto, saj je tukaj aminokislinsko zaporedje najbolj spremenljivo. Protitelesa so kot proteini podvrženi različnim kemijskim spremembam. Spremembe aminokislin hipervariabilne regije lahko vplivajo na njihovo imunoreaktivnost v smislu, da postanejo protitelesa avtoreaktivna. Spremembe imunoreaktivnosti in pojav avtoimunosti raziskujemo tudi s študijami elektro-oksidacije protiteles.

Cilj našega dela je bil za študije elektro-oksidacije imunoglobulinov razreda M iz združenih serumov zdravih ljudi pridobiti čim bolj čiste ter strukturno nespremenjene proteine z ohranjeno aktivnostjo in hkrati postaviti optimalno pot izolacije. S tem namenom smo izolacijo izvedli na dva načina. Po eni strani smo za izolacijo uporabili specifično metodo – afinitetna kromatografija z manan vezavnim proteinom. Po drugi pa smo izolirali IgM s kombinacijo nespecifičnih metod v 5 korakih in dveh različicah. Nespecifične metode, s katerimi smo čistili IgM, so: obarjanje z amonijevim sulfatom, dializa, ultrafiltracija in gelska filtracija. Med izolacijo smo nekatere metode optimizirali z namenom povišanja izkoristka in / ali poenostavitve izvedbe metode. Koncentracijo IgM, IgG in IgA smo določali nefelometrično, celokupnih proteinov pa z Bradfordovo metodo. Čistost izoliranih frakcij smo določali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Spremembo imunoreaktivnosti izoliranih protiteles IgM smo preverili z indirektno encimsko imunsko metodo in pri tem kot antigena uporabili kardiolipin in β_2 -glikoprotein I.

Ugotovili smo, da izolacija IgM z manan vezavnim proteinom zaradi nizkega izkoristka in majhne kapacitete kolone ni primerna metoda za pridobitev materiala za študije elektro-oksidacije. Po drugi strani pa smo s kombinacijo nespecifičnih metod uspešno izolirali IgM, saj sta bila koncentracija IgM in volumen izoliranega materiala dovolj velika, da lahko izvedemo študije elektro-oksidacije. Rezultati encimsko imunske metode so dokazali, da se imunoreaktivnost protiteles med izolacijo v merjenih parametrih ni spremenila.

ABSTRACT

Proteins in human body have different functions. One of them is the protection of organism against foreign objects. Proteins with that kind of role are called antibodies. Antibodies are glycoproteins, whose basic monomer unit is built from two identical light chains and two identical heavy chains, which are connected with disulphide bonds. Among them the IgM is the biggest, because it is built from 5 basic monomer units. The region with which the antibodies interact with the antigen is called hypervariable region, because the amino acid sequence is most variable at this part. Antibodies are due to their protein nature subjected to different chemical alterations. Alterations of amino acids in hypervariable region can affect their immunoreactivity in the way that the antibodies become autoantibodies. We study changes of immunoreactivity and appearance of autoimmunity with on electro-oxidized antibodies.

The aim of our work was to optimize the isolation and to purify IgM from pooled serum of healthy human donors. The isolation was carried out in two different ways. One way that we used for our isolation was the specific method - affinity chromatography with mannan binding protein. The other way was that we isolated IgM with combination of nonspecific methods in 5 steps and in two variations. Nonspecific methods, used for IgM purification, were: precipitation with ammonium sulphate, dialysis, ultrafiltration and gel filtration. During the isolation we optimized some steps with the purpose of raising the efficiency and / or simplifying procedures. We determined the concentration of IgM, IgG in IgA nephelometrically, the concentration of total proteins was determined by Bradford method. We determined the purity of isolated fractions by SDS-PAGE. Alterations in immunoreactivity of isolated antibodies IgM were verified by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay, whereby we used cardiolipin and β_2 -glycoprotein I as antigens.

We found out that the isolation of IgM with mannan binding protein is inappropriate for acquiring the material for studies of electro-oxidation, because of the low efficiency and small capacity of the column. On the other hand, with the combination of nonspecific methods we successfully isolated IgM: the amount of IgM was big enough to carry out the studies of electro-oxidation. Results of indirect enzyme-linked immunosorbent assay were in all cases negative which proved that the immunoreactivity of antibodies after the isolation was not modified.

OKRAJŠAVE

MM	-	molekularna masa
vol.	-	volumska enota
ut.	-	utežna enota
IgM	-	protitelesa razreda M
IgG	-	protitelesa razreda G
IgA	-	protitelesa razreda A
NERED.	-	nereducirajoči pogoji
RED.	-	reducirajoči pogoji
CBB	-	Commassijevo briljantno modrilo (Commassie brilliant blue)
PBS	-	s fosfatnim pufrom pufrana slanica (pH 7,4)
BSA	-	goveji serumski albumin
HSA	-	humani serumski albumin
SDS-PAGE	-	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
ELISA	-	Indirektni encimsko imunska metoda

1. UVOD

1.1. PROTEINI

Proteini so molekule zgrajene iz aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidnimi vezmi. Peptidna vez je kovalentna vez, ki povezuje α -amino skupino ene aminokislone z α -karboksilno skupino druge aminokislone. Peptidi so usmerjene molekule, zato imajo dva različna konca, ki sta označena kot N-terminalni in C-terminalni konec, glede na to ali je prosta amino ali karboksilna skupina. Polipeptide, ki so zgrajeni iz 40 ali več aminokislin (MM \sim 5000) pojmujeemo kot proteine [1,2]. Nekateri proteini vsebujejo tudi neproteinske komponente imenovane prostetične skupine. Glede na naravo prostetične skupine poznamo metaloproteine, glikoproteine, mukoproteine, fosfoproteine, itd. [1]. Pri opredeljevanju zgradbe proteinov govorimo o štirih nivojih strukture [1,2,3]:

1. Primarna struktura – nam pove aminokislinsko zaporedje v polipeptidni verigi.
2. Sekundarna struktura – nam pove, kako so organizirani deli polipeptidnih verig. Elementa sekundarne strukture sta α -vijačnica, β -ploskev in β -zavoj. β -ploskev je sestavljena iz polipeptidnih verig, ki so si vzporedne, glede na njihovo orientacijo ločimo paralelne in antiparalelne plasti.
3. Terciarna struktura – opisuje intramolekularno zvitje polipeptidne verige v trodimenzionalno strukturo specifične oblike, ki jo stabilizirajo elektrostatske (ionske, van der Waalove) vezi, vodikove vezi, disulfidni mostovi (S-S) ter hidrofobne interakcije.
4. Kvartarna struktura – gre za več struktur (podenot) združenih v trodimenzionalno strukturo.

Funkcije proteinov so vzdrževanje onkotskega pritiska, viskoznosti, kislinsko-bazičnega ravnovesja v krvi (zaradi največje zastopanosti v krvi ima največji prispevek albumin), transport ionov in nevodotopnih snovi po krvi ter skladiščenje snovi, sodelovanje v imunskem odzivu (protitelesa, komponente komplemента, interferoni), strjevanje krvi (faktorji strjevanja), kataliziranje kemijskih reakcij (encimi), hormonska funkcija. Proteini imajo tudi regulatorno in receptorsko vlogo, strukturno vlogo, prav tako pa so udeleženi pri gibanju (omogočajo krčenje mišic) [2,4,5].

Lastnosti proteinov [1,3]:

- MM – proteini imajo veliko molekularno maso, ki pa se od proteina do proteina zelo razlikuje

- Absorpcijska maksimuma sta pri dveh valovnih dolžinah, vendar je pomembnejši tisti pri valovni dolžini 278-280 nm.
- Izoelektrična točka (I_p) – pH, pri katerem je celoten naboj proteina enak nič (enako število pozitivno in negativno nabitih skupin v proteinu). Pri $pH < I_p$ je protein pozitivno nabit, pri $pH > I_p$ pa negativno nabit. Pri fiziološkem pH (7,4) je večina proteinov negativno nabitih.
- Topnost – odvisna je od pH, ionske moči, temperature, dielektrične konstante topila. Topnost proteinov je najnižja, ko je I_p enak pH.

1.1.1. SERUMSKI PROTEINI

Serum je rumeno obarvan del frakcije krvi po odstranitvi krvnih celic in fibrina (po strjevanju krvi). Vsi serumski proteini se sintetizirajo v jetrih (albumin, α_1 , α_2 , β -globulini), z izjemo γ -globulinov, ki nastajajo v B limfocitih (kostni mozeg, vranica in bezgavke) in hormonov proteinskega izvora [1,6]. Referenčna vrednost za celokupne proteine v plazmi je 70 – 80 g/L, v serumu je zaradi odstranjenega fibrina referenčna vrednost nižja za približno 3 g/L [5,7]. Nekateri pomembnejši serumski (plazemski) proteini so zbrani in opisani v preglednici I.

Preglednica I: Koncentracije, molekulske mase (MM) in vloga nekaterih plazemskih proteinov [8].

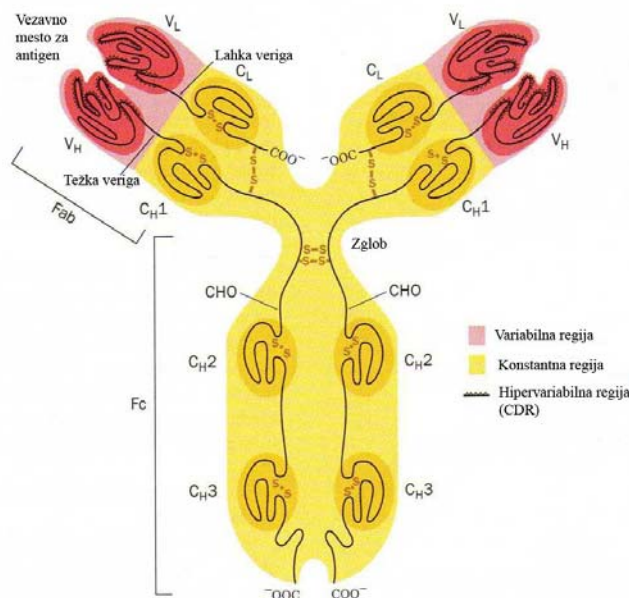
Protein	Plazemska koncentracija (g/L)	MM	Vloga
Albumin	39 – 51	66 000	Onkotski pritisk, rezervoar aminokislin, prenos majhnih molekul
α_1 -antitripsin	2,0 – 4,0	54 000	Inhibitor proteaz
Haptoglobin	0,4 – 2,9	100 000 (tip 1-1)	Veže hemoglobin
α_2 -makroglobulin	1,5 – 3,5	725 000	Inhibitor proteaz
β -lipoprotein	2,7 – 7,4	380 000	Prenos lipidov
Transferin	2,0 – 4,0	80 000	Prenos železa
C3	0,6 – 1,4	185 000	Protein komplementnega sistema
Fibrinogen	1,0 – 4,0	340 000	Strjevanje krvi
Imunoglobulin A	0,4 – 3,5	160 000	Površinska imunost
Imunoglobulin D	0,1 – 0,4	180 000	/
Imunoglobulin E	50 – 600 (μ g/L)	180 000	Vezava na tkivne bazofilce (mastocite), alergijske in vnetne reakcije
Imunoglobulin G	7 – 15	150 000	Humoralna imunost
Imunoglobulin M	0,25 – 2,0	850 000	Humoralna imunost, primarni imunski odziv

1.2. PROTITELESA

Imunoglobulini so glikoproteini, ki ščitijo organizem pred tujki. Prisotni so na površini limfocitov B, kjer so receptorji za specifične antigene in kot prosta protitelesa v krvi ter limfni tekočini. So bifunkcionalne molekule. En predel molekule se veže z antigenom (F_{ab} predel), drugi pa ima efektorsko funkcijo (F_c regija). Učinkujejo lahko na več načinov: nevtralizirajo bakterijske toksine, preprečujejo prehajanje virusov v celice, aktivirajo komplement, vežejo se na različne celice imunskega sistema in fagocite (makrofage).

Zgrajena so iz dveh identičnih lahkih in dveh identičnih težkih verig. Verige so med seboj povezane s kovalentnimi disulfidnimi ter ne-kovalentnimi vezmi (slika 1). Molekulska masa lahke verige je približno 25 000, težke pa med 50 000 – 77 000. Poznamo 2 tipa lahkih (lambda – λ , kappa – κ) in 5 tipov težkih (alfa – α , delta – δ , epsilon – ϵ , gamma – γ in mi – μ). Tip težke verige določa razred (podrazred) imunoglobulinov. Oba tipa lahkih se lahko kombinirata s vsemi tipi težkih verig. Poznamo protitelesa razreda α – Imunoglobulini A (α_1, α_2 – IgA₁, IgA₂), δ – Imunoglobulini D, ϵ – Imunoglobulini E, μ – Imunoglobulini M in razreda γ – Imunoglobulini G (γ_1 – γ_4 – IgG₁–IgG₄). Razlikujejo se po velikosti, naboju, aminokislinskem zaporedju, vsebnosti ogljikovih hidratov. Vsebnost ogljikovih hidratov niha od 2 – 3% pri IgG do 12 – 14% pri IgM, IgD in IgE [9].

Lahke in težke verige imajo več segmentov (domen) oziroma ponavljajočih homolognih predelov, ki so stabilizirani z disulfidnimi vezmi. Segmente, ki predstavljajo vezišče za antigene označujemo z V_L (variabilni del lahke verige) in V_H (variabilni del težke verige). Konstantne segmente imunoglobulinov istega razreda označujemo s C (C_L , C_H). Lahki verigi imata po en konstantni (C_L), težke verige pa po 3 (α , δ , γ) oziroma 4 (ϵ , μ) konstantne segmente [6,9]. Variabilni segmenti lahkih in težkih



Slika 1: Zgradba IgG [10]

verig imajo tri predele, katerih aminokislinsko zaporedje je zelo spremenljivo. Predele imenujemo hipervariabilne regije (CDR; CDR1-CDR3). Zvitje V_L in V_H poteka tako, da se CDR deli izpostavi in zblížajo ter predstavljajo vezišče za antigene [9].

1.2.1. SPECIFIČNOST VEZAVE ANTIGEN/PROTITELO

Protitelesa se z antigeni vežejo preko ne-kovalentnih vezi (vodikove, elektrostatske, Van der Waalove in hidrofobne interakcije). Moč povezave je odvisna od razdalje med skupinami, ki interagirajo. Jakost vezi med veziščem antigena (epitopa) in protitelesa (paratopa) imenujemo afiniteta protiteles. Osnovna monomerna enota protiteles (4 verige – 2 lahki in 2 težki verigi) ima dve enaki vezišči (paratopa), zato se lahko protitelo hkrati veže na dve antigenski determinanti (epitopa). Jakost vseh vezi med protitelesom in antigenom opredeljuje pojem avidnost. Paratopi prepoznavajo celotno trodimenzionalno strukturo epitopov in razlikujejo že v majhnih spremembah aminokislinskega zaporedja antigenov (proteinskega izvora), naboja, optične konfiguracije in sterične konformacije. Zaradi tega se protitelesa vežejo le na tiste antigene, s katerimi se najbolj skladajo, kar je bistven razlog za visoko specifičnost protiteles [9].

1.2.2. AVTOIMUNOST, AVTOPROTITELESA

Avtoimunost je posledica porušanja mehanizmov, ki vzdržujejo neodzivnost do lastnega telesa. Do sprememb, ki odločilno vplivajo na razvoj bolezni lahko pride na nivoju tkiva, imunskega odziva (limfocitov) ali/in zaradi vpliva genetičnih dejavnikov. Dejstvo je, da reakcije proti lastnemu telesu (avtoimunske reakcije) potekajo vsakodnevno, ni pa nujno da privedejo do bolezni. Do avtoimunske bolezni pride, ko pride do patoloških poškodb tkiva. Poznamo protitelesa razreda M, ki spadajo med naravna protitelesa in se vežejo na lastne molekule. Vendar so šibko afinitetna in ne povzročajo poškodb tkiv. Do patoloških poškodb pa pride, če nastane velika količina močno afinitetnih avtoprotiteles [6].

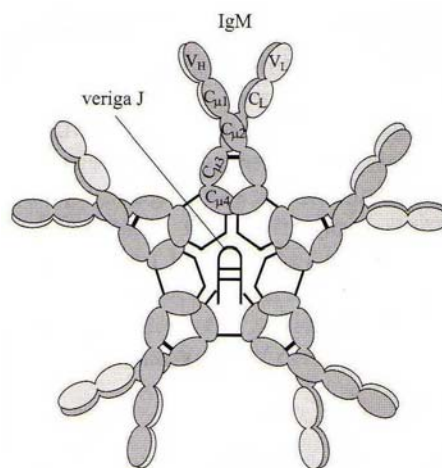
Po drugi strani pa se v zadnjem času pojavljajo študije, ki navajajo, da so lahko za nastanek klinično pomembnih avtoimunskih reakcij odgovorne posttranslacijske spremembe protiteles v telesu, predvsem hipervariabilne regije (CDR) zaradi oksidativne transformacije v telesu. Spremembe v hipervariabilnih regijah (CDR) zaradi oksidativne transformacije naj bi povzročile preobrazbo sicer nereaktivnih protiteles v močno afinitetna avtoprotitelesa, kar je lahko eden izmed vzrokov za nastanek avtoimunskih bolezni [11].

1.2.3. PROTITELESA RAZREDA M

IgM proteini imajo glavno vlogo pri primarnem imunskem odzivu (ob prvem stiku posameznika z eksogenim antigenom). Imunoglobulini razreda M aktivirajo sistem komplementa. Spadajo med naravna protitelesa, saj jih najdemo v serumu normalnih ljudi, še preden je prišlo do imunizacije (stika z antigeni) [6].

Molekula je zgrajena iz 5 osnovnih monomernih enot protiteles (2 lahki in 2 težki μ verigi) in dodatne J (joining) verige, kar prikazuje slika 2.

Verige so med seboj povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi. Molekulska masa lahki verig je 25 000, težkih pa približno 65 000 [9]. V literaturi navajajo različno molekularsko maso celotnega glikoproteina med 850 000 – 970 000 [8,9]. Ker je IgM pentamer, ima 10 vezišč za antigene. Molekula je torej 10 valentna, vendar pa pri antigenih velike MM pride do prostorskega oviranja in zato zasledimo nekoliko nižjo valenco [6,9].



Slika 2: Zgradba IgM [6]

1.3. IZOLACIJA PROTITELES

Izolacijo IgM lahko izvajamo s specifičnimi ali nespecifičnimi metodami. Prednost specifičnih metod je, da ciljano izoliramo želene proteine v malo korakih ali celo le enem koraku. Izolaciji z nespecifičnimi metodami pa je večstopenjski proces, saj z enim samim nespecifičnim korakom izolacije z zadovoljivo čistoto ni moč doseči. Potrebno je izbrati optimalno kombinacijo metod, ki temeljijo na različnih princip ločevanja proteinov. Ker je protiteles M v serumu relativno malo, je pri izolaciji potreben kompromis med izkoristkom celotne izolacije in tudi posameznih stopenj izbranih metod ter čistoto izoliranega vzorca. Ob enem pa je potrebno opozoriti tudi, da so protitelesa kot proteini podvrženi kemijskim spremembam, do katerih lahko pride med potekom same izolacije oziroma čiščenja protiteles. Pri imunoglobulinih lahko do majhnih kemijskih sprememb (predvsem v hipervariabilni regiji) pride tudi v serumu (krvi), vendar pa zaradi velike količine in heterogenosti serumskih proteinov te spremembe pogosto niso opažene. Za študije elektro-oksidacije humanih protiteles IgM pa je potrebno, da so izolirani proteini strukturno

nespremenjeni, saj so lahko takšne spremembe ključnega pomena, zato izbiramo pri izolaciji prednostno predvsem nedestruktivne metode.

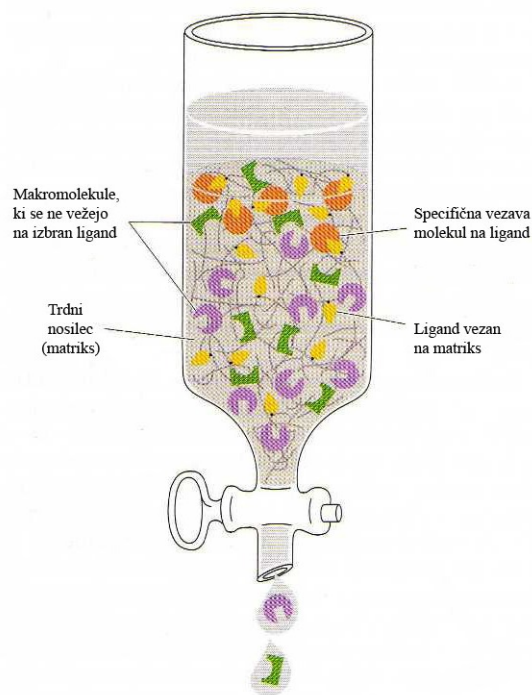
1.3.1. SPECIFIČNE METODE

Princip specifičnih metod je, da se le določeni proteini v heterogenem vzorcu vežejo na izbrani ligand. Interakcije, s katerimi se proteini vežejo z ligandom so tako specifične, da lahko ciljano izoliramo proteine, ki jih kasneje ob spremenjenih pogojih izperemo s kolone (slika 3) [10].

1.3.1.1. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Uvrščamo jo med kolonski tip kromatografije. Princip ločevanja temelji na močni specifični vezavi molekul (proteinov) z ne-kovalentnimi vezmi na ligand, ki je kovalentno pritrjen na nosilec. Po vezavi izbranega proteina na ligand, ostale speremo iz kolone. Nato s spremembo mobilne faze oslabimo interakcije med ligandom in izbranim proteinom ter ga speremo iz kolone. Za čiščenje protiteles lahko uporabimo različne ligande, ki so vezani na trdni nosilec [2,3,10,12,13,14]:

- Protein A – veže IgG1, IgG2 in IgG4, ne pa IgG3 in IgM
- Protein G – veže vse IgG, ne pa IgM
- Protein L – veže vse imunoglobuline, ki imajo kappa – κ lahke verige
- Komplementni protein C1q – veže IgM (ima $18\times$ večjo afiniteto za IgM kot za IgG)
- Protamin sulfat – veže IgM
- Manan vezavni protein (MBP) – veže IgM



Slika 3: Princip afinitetne kromatografije [10]

1.3.2. NESPECIFIČNE METODE

Metode, pri katerih ločevanje ni ciljano na točno določeno molekulo, opredeljujemo kot nespecifične. Interakcije, ki so vzrok ločitve molekul (proteinov), so značilne za večjo množico molekul (proteinov). Kljub temu se ločitev do določene mere lahko doseže z izbiro »specifičnih« pogojev pri sami izvedbi metode.

1.3.2.1. METODE OBARJANJA PROTEINOV

Topnost proteinov je odvisna od različnih lastnosti topila (pH, ionska moč, temperatura, dielektrična konstanta), zato lahko s spreminjanjem le-teh dosežemo oboritev proteinov. Lastnosti topila spreminjamo z dodajanjem visokih koncentracij soli ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , Na_2SO_4 , NaCl), organskih molekul (aceton, etanol, kaprilna kislina – oktanojska kislina, polietilenglikol – PEG), kovinskih kationov (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ba^{2+}) ali večjih anionov (pikrat, molibdat, trikloroacetat, sulfosalicilat).

Eden izmed načinov obarjanja proteinov je s spreminjanjem ionske moči. Večina proteinov je pri zelo nizki ionski moči slabo topnih (npr. v vodi). Te proteine imenujemo evglobulini. Z večanjem ionske moči (dodajanjem soli, npr. amonijevega sulfata) njihova topnost narašča, kar imenujemo vsoljevanje. Obratno, pa pojem izsoljevanje opisuje proces, pri katerem zaradi nadaljnega večanja ionske moči topnost proteinov začne padati. Pojavi se težnja k združevanju molekul in oboritvi. Oborjene proteine lahko ponovno resuspendiramo v raztopini s primerno ionsko močjo in pH [2,3,12,15].

1.3.2.1.1. OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM

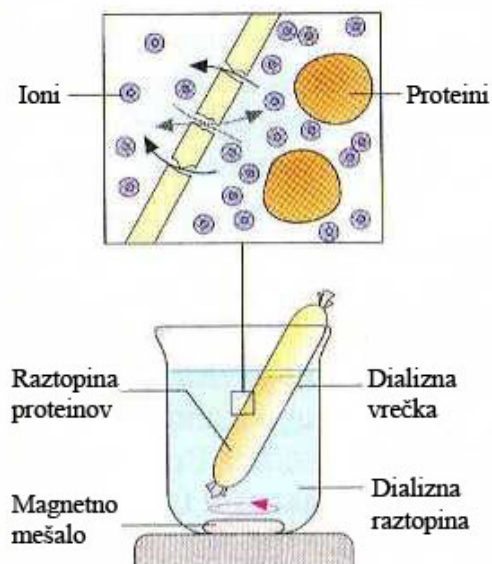
Princip obarjanja z amonijevim sulfatom temelji na izsoljevanju. Z višanjem koncentracije soli v raztopini odtegujemo vodo, ki tvori hidratacijski ovoj, s površine proteinov, kar vodi do združevanja molekul med sabo. Za tvorbo agregatov so najpomembnejše interakcije med hidrofobnimi deli površine. Proteini z večjimi deležem hidrofobne površine agregirajo ter se oborijo prej, kot ostali z več hidrofilne površine. Heterogenost proteinov (hidrofilna/hidrofobna površina) lahko s pridom izkoristimo za frakcionirano obarjanje. S postopnim dodajanje soli lahko sprva oborimo proteine z več hidrofobne površine, nato pa tiste z vedno manj. Po vsakem dodatku amonijevega sulfata pa oborjene proteine odcentrifugiramo. Po obarjanju amonijev sulfat odstranimo z gelsko filtracijo, dializo ali večkratno ultrafiltracijo [3].

Največkrat se za ta namen uporablja amonijev sulfat iz več razlogov [15]:

- Obarja večino proteinov
- Ščiti proteine pred denaturacijo (proteine lahko tudi shranjujemo v koncentriranih raztopinah amonijevega sulfata)
- Ob dodajanju se raztopina ne segreva, kar bi lahko vodilo do denaturacije proteinov
- Visoka koncentracija soli preprečuje oziroma ovira rast in razmnoževanje bakterij
- Po oboritvi ne interferira pri procesu sedimentacije proteinov med centrifugiranjem

1.3.2.2. DIALIZA

Dializa je metoda, s katero lahko pod milimi pogoji vzorec razsolimo in / ali zamenjamo pufrski sistem. Pri dializi uporabljamo tanko semipermeabilno membrano v obliki črevesa z različno velikimi porami (1 – 50 kDa), dimenzijami in iz različnih materialov (npr. celofan – celulozni acetat, nitroceluloza, koloidon). Metoda temelji na principu pasivne difuzije. Semipermeabilno membrano prehajajo (prehajanje je lahko v obe smeri) le molekule, ki so manjše od velikosti por membrane. Torej lahko potujejo le molekule vode (lahko pride do povečanja volumna vzorca) in topljencev z MM manjšo od velikosti por, molekule večje od por pa zaostanejo v dializnem črevesu (slika 4). Gonilna sila je koncentracijska razlika določene molekule oziroma topljenca med dializnim pufrom in črevesom. Topljenec bo prehajal iz področja višje koncentracije (dializno črevo) v področje nižje koncentracije (dializni pufer) dokler se koncentraciji ne izenačita in je



Slika 4: Princip ločevanja z dializo [2]

1.3.2.3. ULTRAFILTRACIJA

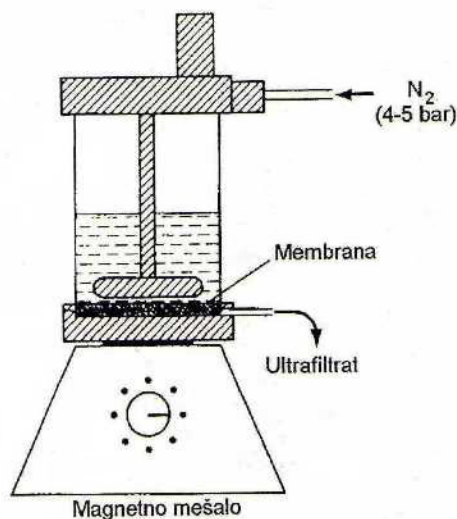
Metodo ultrafiltracije uporabljamo predvsem za koncentriranje vzorcev. Če skoncentriran vzorec ponovno razredčimo in postopek koncentriranja/redčenja večkrat ponovimo lahko dosežemo menjavo pufrskega sistema ali odstranitev topljencev (tudi proteinov), katerih MM je manjša od velikost por izbrane membrane [3,15]. Tako kot pri dializi tudi pri ultrafiltraciji uporabljamo semipermeabilno membrano. Pretok skozi membrano dosežemo z nadtlakom (uporabo inertnih plinov shranjenih pod visokim pritiskom, npr. N₂),

prehajanje v obe smeri enako. Z večkratno menjavo dializnega pufra ohranjamo koncentracijsko razliko, s čimer odstranimo še več neželenega topljenca. Za boljšo razsolitev je pomembnejša večkratna menjava dializnega pufra kot pa enkratna dializa v večjem volumnu. Čeprav višja temperatura poveča hitrost difuzije, pa dializo zaradi stabilnosti proteinov običajno izvajamo pri nižjih temperaturah (4 – 8°C), najpogosteje pa v hladni sobi (4°C) in ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu. Pomanjkljivosti dialize sta predvsem počasnost in poraba velikih volumnov pufra [3,10,15].

vakuomom ali gravitacijsko (centrifugalno) silo. Membrane so iz različnih materialov, ki imajo različne prednosti (slika 5 in 6). Polisulfonske membrane omogočajo dobre pretoke, membrane iz regenerirane celuloze pa najmanj adsorbirajo proteine na svojo površino. Velikosti por segajo od 3 do 300 kDa (ang. molecular weight cut off MWCO) [3,15,16].

Za odstranjevanje proteinov manjših od velikosti por membrane velja [16]:

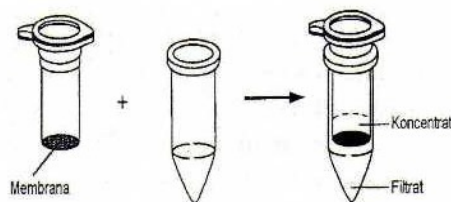
- MM proteinov se mora razlikovati vsaj za $10\times$
- MM zadržanih proteinov naj bi bila vsaj $3\times$ večja od velikosti por membrane
- MM proteinov, ki se jih želimo znebiti naj bi bila vsaj $3\times$ manjša od velikosti por membrane
- Koncentracija vzorca naj bi bila največ 5 g/L
- Najvišja sila pri centrifugiranju naj bi bila $500 - 1000 \times g$



Slika 5: Ultrafiltracija na principu nadtlaka [3]

1.3.2.4. GELSKA FILTRACIJA

Tako kot afinitetna kromatografija spada gelska filtracija tudi med kolonski tip kromatografije. Ločevanje pri gelski filtraciji temelji na razlikah v velikosti posameznih molekul (velikost je posledično povezana z MM). Molekule se ob

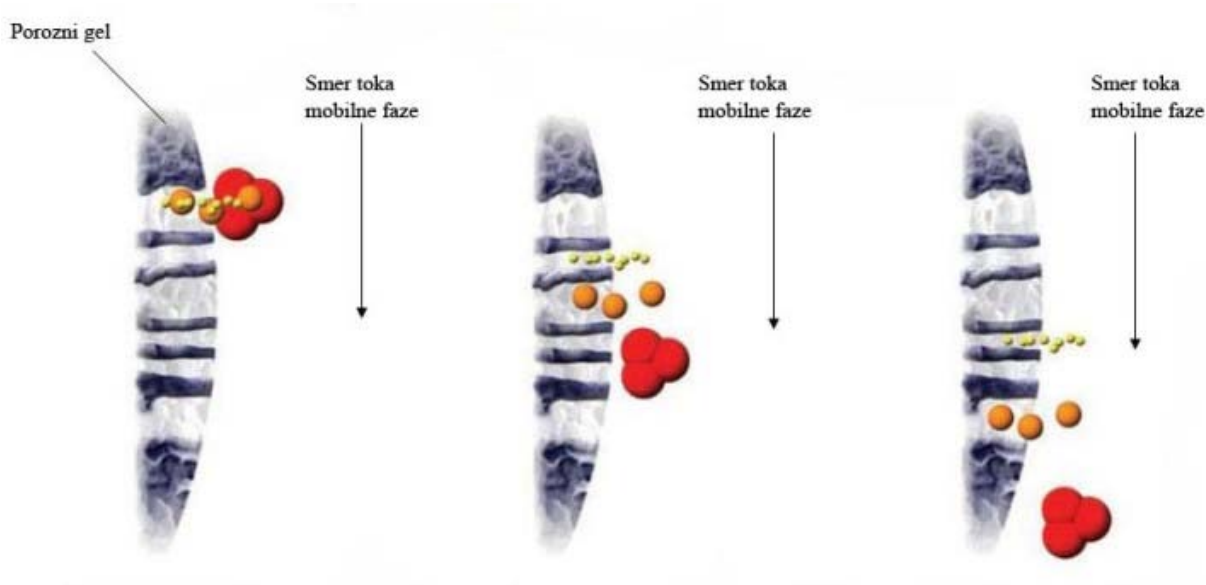


Slika 6: Ultrafiltracija na principu centrifugalne sile [3]

potovanju čez kolono porazdeljujejo med stacionarno in mobilno fazo, glede na njihovo velikost. Stacionarno fazo predstavlja tekočina v porah gela, gel pa je nosilec oziroma matriks. Manjši proteini skozi kolono potujejo dlje časa, saj se med potovanjem difundirajo globlje v pore in iz njih, s čimer se potovanje upočasnjuje. Obratno pa večje molekule zaradi velikosti ne morejo zaiti tako globoko v pore, kar vodi do tega, da je čas potovanja krajši (slika 7).

Z izbiro gelov s porami različnih velikosti reguliramo velikostni interval molekul, ki jih lahko ločujemo. Z gelsko filtracijo lahko ločujemo molekule v velikostnem razredu najmanj od 2 do 30 kDa in največ od 55 do 9000 kDa. Največkrat so geli iz dekstrana,

agaroze in poliakrilamida. Gelsko filtracijo lahko uporabljamo za ločevanje proteinov po velikosti, razsoljevanje vzorca (če predhodno napolnimo kolono z želenim pufrom ali za določevanje relativne MM neznanega proteina (obstaja linearna poveza med logaritmom MM in eluiranem volumnom).



Slika 7: Princip ločevanja molekul pri gelski filtraciji [17]

Opišemo jo tudi kvantitativno. Opredelimo lahko več volumnov, iz katerih lahko izračunamo porazdelitveni koeficient (K_{av}), ki predstavlja volumski delež stacionarne faze, s katero se molekule (proteini) porazdeljujejo.

- V_t – celokupni volumen kolone
- V_o – prosti volumen (ang. void volume); predstavlja volumen, ki ga zavzema tekočina izven gela
- V_x – volumen, ki ga zavzema gel
- V_{el} – volumen raztopine, ki preteče skozi kolono po nanosu vzorca, da se vzorec pojavi na izhodu

$$K_{av} = \frac{V_{el} - V_o}{V_t - V_o}$$

Porazdelitveni koeficient je za majhne molekule blizu 1, saj se veliko časa zadržijo v porah gela, za velike molekule pa blizu 0, saj se v porah zadržijo le kratek čas ali pa sploh ne [3,10,14,18].

1.4. METODE DETEKCIJE IMUNOGLOBULINOV

1.4.1. SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE PROTEINOV

1.4.1.1. Direktno

Direktno spektrofotometrično merjenje absorbance proteinov izvajamo pri valovni dolžini (λ) 280 nm. Pri tej valovni dolžini imajo proteini absorpcijski maksimum (λ_{MAX}), najbolj pa absorbirata svetlobo aminokislini triptofan in tirozin, v manjši meri še fenilalanin. Povezavo med absorbanco (A) in koncentracijo vzorca (npr. proteinov) opredeljuje Beer-Lambertov zakon. V primeru, da poznamo molarni absorpcijski koeficient (ϵ) lahko iz izmerjene absorbance izračunamo koncentracijo celokupnih proteinov v vzorcu. Metoda je absolutna, zato ne potrebujemo umeritvene krivulje, in nedestruktivna [3].

1.4.1.2. Bradfordova metoda

Metoda temelji na merjenju kompleksa anionske oblike Coomassijevega briljantnega modrila (CBB) s proteinskimi aminokislinami pri absorpcijskem maksimumu λ_{MAX} 595 nm. Kompleks je modre barve. Prosta oblika CBB je rdeče barve in ima λ_{MAX} pri 465 nm. CBB se v največji meri veže na aminokislino arginin, v manjši pa na triptofan, tirozin, histidin in fenilalanin. Z Bradford metodo lahko določujemo koncentracije proteinov v vzorcih, vendar je metoda relativna, zato potrebujemo umeritveno krivuljo [3,19].

1.4.2. SDS-PAGE

Elektroforeza je ločitvena metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Z elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS) ločujemo proteine le po njihovih razlikah v MM. Pri tej metodi proteine popolnoma denaturiramo, kar dosežemo z dodatkom 2-merkaptetanola in segretje na visoko temperaturo (95°C). Cepijo se tudi disulfidne vezi, tako da pride do ločitve kvartarne strukture (npr. osnovna strukturna enota protitelesa razpade na 2 lahki in 2 težki verigi).

SDS je anionski detergent, ki se nespecifično veže, v povprečju, na 2 aminokislini proteina, tako da naboj kompleksa preseže naboj čistega proteina. Posledica je, da imajo vsi proteini enak negativen naboj in se pri potovanju proti anodi ločujejo le po velikosti. Proti anodi potujejo hitreje proteini z manjšo MM. Na hitrost potovanja lahko vplivamo tudi s stopnjo zamreženosti poliakrilamidnega gela. Različne stopnje zamreženosti dosežemo s spremembo razmerij med reagenti potrebnimi za pripravo (polimerizacijo) gela. Gel za elektroforezo je sestavljen iz dveh različno zamreženih gelov. Zgornji (zbiralni ali koncentracijski) je manj zamrežen in ne ovira potovanja proteinov, omogoča pa, da vsi

proteini potovanje v spodnji gel začnejo iz enake bazne linije. Spodnji (ločitveni ali separacijski) je bolj zamrežen, zato se molekule pri potovanju ločujejo na podlagi velikosti. Proteine po potovanju na elektroforezi detektiramo na več načinov. Najbolj uporabljana je tehnika barvanja s CBB ali s srebrovim nitratom (AgNO_3). S srebrovim nitratom zaznamo 100-krat manjše koncentracije proteinov kot s CBB. Proteine, ki so radioaktivno označeni detektiramo z avtoradiografijo. Po drugi strani pa lahko ločene proteine prenesemo na nitrocelulozno ali najlonsko membrano s pivnanjem (ang. Western blotting), kjer jih lahko dokazujemo z imunokemičnimi postopki [3,6,15].

1.4.3. NEFELOMETRIJA

Značilnost reakcij med antigeni in protitelesi je ta, da v ekvivalentnem razmerju ali blizu tega razmerja tvorijo oborino. To lastnost izkoriščamo za nefelometrično določanje koncentracije proteinov.

Nefelometrija je postopek, pri katerem na podlagi merjenja jakosti sipane svetlobe pod kotom 70° določamo koncentracijo antigenov. S protitelesi proti točno določenim antigenom povzročimo tvorbo oborine. Posledica je sipanje svetlobe vpadnega žarka, kar merimo. Vlogo antigena lahko imajo različne molekule, če želimo meriti koncentracijo protiteles razreda M, imajo vlogo antigena le-ti proteini. Z metodo lahko kvantitativno in specifično določamo številne antigene v bioloških tekočinah [6].

1.4.4. ELISA

Indirektna encimsko imunska metoda - ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay) sodi med encimsko imunske metode. Princip metode je, da encim, konjugiran s protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Intenziteto obarvanega produkta lahko merimo. Metodo odlikujeta hitrost izvedbe in visoka občutljivost (celo pod 1 ng proteinov).

Protitelesa in antigene lahko s to metodo določimo kvalitativno in kvantitativno. Za kvantitativno določitev potrebujemo umeritveno krivuljo znanih koncentracij protiteles oziroma antigenov. Protitelesa v serumu ali kakem drugem vzorcu določamo z indirektnim ELISA testom. Na trdnem nosilcu je vezan antigen, na katerega se specifično veže primarno protitelo. Sekundarno protitelo, na katerega je pripet encim, se veže na primarno. Po dodatku raztopine substrata se pojavi obarvanje, ki ga merimo [3,6,10].

2. NAMEN DELA

Protitelesa razreda M sodijo po svoji zgradbi med glikoproteine. So ena izmed večjih serumskih proteinov, ki pa so v serumu zastopana v relativno majhnem deležu.

Za študije molekularskih sprememb IgM po elektro-oksidaciji je potrebno pridobiti strukturno nespremenjene proteine z ohranjeno aktivnostjo.

Namen dela je optimizirati postopek izolacije IgM iz seruma na tak način, da se specifičnost izoliranih IgM ne razlikuje od specifičnosti izhodiščnega materiala. To bomo dosegli z ustreznim izborom specifičnih in nespecifičnih metod ali kombinacijo le-teh, pri čemer bomo dajali prednost neagresivnim pristopom. Hkrati nameravamo posamezne korake optimizirati za doseganje boljšega izkoristka izolacije v krajšem času.

3. MATERIALI in METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. BIOLOŠKI MATERIAL

- Zbirek serumov: izhajali smo iz skupno 10 ml zbirka humanih serumov treh klinično zdravih oseb. Humani serumi teh oseb (moški in dve ženski; med 25 in 30 leti) so bili pridobljeni iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo SPS interne klinike KC Ljubljana. Vse tri osebe so bile seznanjene in so soglašale z namenom uporabe njihovih serumov.
- Označevalec za elektroforezo: SeeBlue® Plus-2 Pre-Stained Standard (1×), kat. št. LC5925 Invitrogen™, Carlsbad, CA 92008, ZDA
- Albumin, from bovine serum, Essentially fatty acid free BSA, Lot 048K7400, Sigma®, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, ZDA
- Komplet kalibracijskih proteinov: Gel Filtration Calibration Kit LMW, Lot 365097, Pack W367798, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, VB
- Komplet kalibracijskih proteinov: Gel Filtration Calibration Kit HMW, Lot 366403, Pack W367158, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, VB
- IgM standard: IgM Sapporo Standard, EY2C9, IgM aCL anti-β₂ GPI antibody, ELISA Control and/or Standard Curve, Inova Diagnostics, Inc., San Diego, ZDA

3.1.2. APARATURE IN OSTALI MATERIAL

- M501 Single Beam Scanning UV/Visible Spectrophotometer, Camspec Ltd., Cambridge, VB
- Spektrofotometer za mikrotitrne plošče Sunrise Tecan, Tecan Tradin AG, Švica
- Generator napetosti toka Bio-Rad, model 1000/500
- Peristaltična črpalka: Pharmacia peristaltic pump P-1, kat. št. 18-1110-91 GE Healthcare UK, Buckinghamshire, VB
- Zbiralnik frakcij: Pharmacia RediFrac, Serial No. AO 00141B, Pharmacia LKB, Švedska
- Tehnica Mettler Toledo, type PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica
- pH meter Mettler Toledo SevenEasy, Columbus, Ohio, ZDA

- Kolona za gelsko filtracijo: Econo-Column® Chromatography Columns, 1,0 × 20 cm, kataloška št. 737-4021, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, ZDA
- Kolona za gelsko filtracijo: Pharmacia XK 16/100 Column, Chromatography column, kat. št. 18-8776-01, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, VB
- Ultrafiltracijska celica: Ultrafiltration cell Amicon, model 8010, Amicon Division, W.R. Grace & Co.-Conn., Beverly, MA, ZDA
- Komplet za izolacijo: IgM ImmunoPure® Purification Kit, Pierce, Rockford, ZDA
- Razsoljevalna kolona: D-Salt™ Excellulose™ Plastic Desalting Columns, Pierce Biotechnology, Rockford, ZDA
- Mikrotitrna plošča Costar® 3591, 96 Well EIA/RIA plate, flat bottom without lid, medium binding, polystyrene, non-sterile, Corning, NY, ZDA
- Celulozna membrana, Dialysis tubing, (MWCO = 12 kDa) Sigma®, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, ZDA
- Filter membrana: Minisart®, single use syringe filter, sterile –EO, non-pyrogenic, hydrophilic, velikost por 0,45 µm, Sartorius, Goettingen, Nemčija
- Polietersulfonska membrana za ultrafiltracijo: Millipore Biomax ultrafiltration disc, 300 kDa, premer 25 mm, Millipore Corporation, Billerica, MA, ZDA
- Polietersulfonska membrana za ultrafiltracijo: 10 kDa YM5 25 mm, Diaflo® ultrafiltration membrans, Amicon Corporation, Scientific systems division Danvers, MA., Irska
- Koncentrirna epruveta: Amicon Ultra – 4 ml, Ultracel – 30k, Regenerated Cellulose, 30,000 MWCO, Millipore, Co. Cork, Irska
- Filtrirna epruveta: Amicon® Ultra-15 (10 kDa), Millipore Co., Billerica, MA, ZDA
- Hamiltonove brizge: Hamilton syringe, model 1701 N in model 1705 N, Sigma®, Sigma Chemical company, St. Loius, MO, ZDA
- Drobn laboratorijski material (epruvete, pipete, steklovina, filtrirni papir...)

3.1.3. KEMIKALIJE

- Glicin, H₂NCH₂COOH analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- TRIS, 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propanodiol, C₄H₁₁NO₃, analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Amonijev sulfat, (NH₄)₂SO₄, analitsko čist, Kemika Zagreb, Hrvaška
- Natrijev klorid, NaCl, analitsko čist, Riedel-de-Haën, Nemčija,

- Kalijev klorid, KCl, analitsko čist, Kemika Zagreb, Hrvaška,
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, analitsko čist, Kemika Zagreb, Hrvaška
- Kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 , analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Barijev klorid dihidrat, $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, analitsko čist, Sigma®, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, ZDA
- Tekoči dušik (N_2): Dušik 5,0, 200 bar, Linde Gas
- Natrijev dodecil sulfat (SDS), reagent za elektroforezo, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, ZDA
- barvilo Bio-Rad Protein assay dye reagent concentrate, reagent za kvantitativno določitev proteinov, kat. št. 500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH, Muenchen, Nemčija
- Glicerol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, redestiliran, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- 2-merkaptotanol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, analitsko čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Bromfenolmodro, indikator, Riedel de Haen, Seelze, Nemčija
- Akrilamid/bis-akrilamid, 30% raztopina, elektroforezni reagent, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, ZDA
- Amonijev persulfat (APS), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq 98\%$, reagent za elektroforezo, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, ZDA
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, Biochemica Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
- Commassie Brilliant Blue R, barvilo, Sigma®, St. Louis, ZDA
- Etanol, 96%, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, po Ph. Eur 6th, LEX, Portorož, Slovenija
- Klorovodikova kislina, HCl, 37%, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hidroksid, NaOH, analitsko čist, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Ledocetna kislina, CH_3COOH , 100%, brezvodna, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Natrijev hipoklorit, NaOCl, 13% raztopina, čisti ekstrakt, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Natrijev azid, NaN_3 , ekstra čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Krom-žveplova kislina, za spiranje laboratorijskega materiala, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Gel za gelsko filtracijo: Sephacryl™ S-300 High Resolution, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska

3.1.4. PUFRI IN DRUGE RAZTOPINE

- **Pufri in raztopine pri izloaciji IgM s kolono MBP**

Pufer za menjavo pufrskega sistema oziroma odstranitev fosfata iz vzorca:

NaCl	1,25 M	3,653 g
TRIS	20 mM	0,121 g
dH ₂ O		do 50 ml

Po potrebi uravnamo pH z 0,5 M natrijevim hidroksidom ali 0,5 M klorovodikovo kislino.

0,02 ut/ut % raztopina natrijevega azida za konzerviranje kolone:

Zatehtamo 5 mg natrijevega azida in ga raztopimo v 24,995 g destilirane vode.

- **Pufri in raztopine za obarjanje z amonijevim sulfatom in dializo**

Nasičena raztopina amonijevega sulfata pri 4°C:

(NH ₄) ₂ SO ₄	14,33 g
dH ₂ O	do 20 ml

S fosfatnim pufrom pufrana slanica (PBS), pH 7,4:

NaCl	137 mmol	8,006 g
KCl	2,7 mmol	0,201 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	6,5 mmol	1,157 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol	0,204 g
dH ₂ O		do 1000 ml

Po potrebi uravnamo pH z 2 M natrijevim hidroksidom ali 2 M klorovodikovo kislino.

- **Pufri in raztopine za ultrafiltracijo**

Raztopina za regeneracijo membrane:

NaOCl	100 ppm	77 µl 13 % NaOCl
NaOH	0,1M	0,4 g NaOH
dH ₂ O		do 100 ml

10 vol/vol% etanolna raztopina za konzerviranje kolone (100 g):

96% etanol	8,54 g
dH ₂ O	91,46 g

- **Pufri in raztopine za gelsko filtracijo**

Raztopina Blue Dextran 2000 (C = 1 g/L):

Zatehtamo 6 mg Blue Dextrana 2000 in ga raztopimo v 6 ml predhodno segretega PBS na 40°C.

Raztopina kalibracijskih proteinov 1 (4 proteini):

Kalibracijski komplet	Protein	MM	Vsebnost (%)	C (g/L)	Zatehta (mg)	V (ml)
LMW	Ribonukleaza A	13 700	100,0	10,0	10	
LMW	BSA	67 000	100,0	10,0	10	
HMW	Aldolaza*	158 000	22,7	6,0	25	1
HMW	Feritin**	440 000	19,3	1,0	5	

* natehta 25 mg vzorca, saj je vsebnost aldolaze 22,7 % (ut./ut.)...torej 6 mg aldolaze

** natehta 5 mg vzorca, saj je vsebnost feritina 19,3 % (ut./ut.)...torej 1 mg feritina

Raztopina kalibracijskih proteinov 2 (4 proteini):

Kalibracijski komplet	Protein	MM	Vsebnost (%)	C (g/L)	Zatehta (mg)	V (ml)
LMW	Ribonukleaza A	13 700	100,0	10,0	20	
LMW	Ovalbumin	43 000	100,0	10,0	20	
HMW	Aldolaza*	158 000	22,7	5,2	46	2
HMW	Feritin**	440 000	19,3	1,1	11	

* natehta 46 mg vzorca, saj je vsebnost aldolaze 22,7 % (ut./ut.)...torej 10,4 mg aldolaze

** natehta 11 mg vzorca, saj je vsebnost feritina 19,3 % (ut./ut.)...torej 2,1 mg feritina

Raztopina kalibracijskih proteinov 3 (4 proteini):

Kalibracijski komplet	Protein	MM	Vsebnost (%)**	C (g/L)	Zatehta (mg)	V (ml)
LMW	Ribonukleaza A	13 700	95,2	5	10,5	
HMW	Ovalbumin	43 000	100,0	5	10,0	
HMW	Aldolaza*	158 000	100,0*	5	* 1 ml	2
					C ₀	
HMW	Tiroglobulin	669 000	98,8	5	10,1	

* po navodilih proizvajalca [18] smo celotno vsebino viala (50 mg aldolaze) raztopili v 5 ml PBS (C₀=10g/L)

** vsebnost smo izračunali na podlagi priloženih analiznih informacij proteinov proizvajalca

20 vol/vol% etanolna raztopina za konzerviranje kolone (1000 g):

96% etanol	172,74 g
dH ₂ O	827,26 g

- **Bradfordova metoda**

Raztopina BSA za umeritveno krivuljo (C = 1 g/L)

BSA	25 mg
PBS	25 ml

- **Pufri in raztopine za SDS PAGE**

➤ Pufri za pripravo gelov:

1,5 M Tris-Cl, pH 8,8:

TRIS	18,2 g
dH ₂ O	100 ml

umerimo s HCl do pH 8,8

0,5 M Tris-Cl, pH 6,8:

TRIS	6,1 g
dH ₂ O	100 ml

umerimo s HCl do pH 6,8

➤ Pufri za vzorce:

Reducirajoči (4×) pufer:

1 M Tris-Cl, pH 6,8	5 ml
SDS	1,6 g
Glicerol	8 ml
2-merkaptoetanol	4 ml
Bromfenolmodro	4 mg
dH ₂ O	do 20 ml

Nereducirajoči (4×) pufer (brez HOCH₂CH₂SH):

1 M Tris-Cl, pH 6,8	6,1 g
SDS	1,6 g
Glicerol	8 ml
Bromfenolmodro	4 mg
dH ₂ O	do 20 ml

➤ Pufri za elektroforezo:

10 ut/vol % SDS:

SDS	10 g
dH ₂ O	do 100 ml

10% amonijev persulfat (APS):

APS	10 g
dH ₂ O	do 100 ml

Spodnji pufer:

Tris (0,025 M)	6 g
Glicin (0,192 M)	29 g
dH ₂ O	do 2000 ml

Zgornji pufer:

Spodnji pufer	495 ml
10% SDS	5 ml

Mešanica za 10% ločitveni gel (velikosti 8 × 7 cm):

Akrilamid / BisAkrilamid (30% T)	1,67 ml
1,5 M Tris-Cl, pH 8,8	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
dH ₂ O	2,00 ml

Zgornji mešanici tik pred uporabo dodamo:

TEMED	2,5 µl
10% APS	50,0 µl

Mešanica za 4% koncentracijski gel (velikosti 8 × 7 cm):

Akrilamid / BisAkrilamid (30% T)	0,40 ml
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	0,75 ml
10% SDS	0,03 ml
dH ₂ O	1,73 ml

Zgornji mešanici tik pred uporabo dodamo:

TEMED	3,0 µl
10% APS	25,0 µl

Barvilo za obarvanje proteinov po elektroforezi:

CBB	1,0 g
Ledocetna kislina	100 ml
Etanol (96%)	450 ml
dH ₂ O	do 1000 ml

Raztopina za razbarvanje (bledilec):

Ledocetna kislina	100 ml
Etanol (96%)	250 ml

dH₂O

do 1000 ml

3.2. METODE

3.2.1. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Izolacijo IgM smo izvedli s kolono MBP (IgM ImmunoPure® Purification komplet). Pri izolaciji smo se držali postopka predpisanega s strani proizvajalca [20]. Proizvajalec izolacijskega kompleta opozarja, da je ob prisotnosti fosfatnih ionov izkoristek čiščenja nizek, zato smo pred nanosom vzorca na kolono MBP izvedli menjavo pufrskega sistema. Menjavo pufra smo izvedli z razsoljevalno kolono D-Salt™ Excellulose™ Plastic Desalting Columns in pufrom 20 mM TRIS, 1,25 M NaCl, pH 7,4 po predpisanem protokolu za razsoljevalno kolono [21].

3.2.2. OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM

Proteine smo oborili z amonijevim sulfatom. Z večanjem koncentracije soli smo dosegli selektivno oboritev proteinov, saj so se proteini z več hidrofobne površine oborili prej, kot tisti z več hidrofilne. Zaradi narave proteinov in njihove stabilnosti smo izvedli obarjanje v hladni sobi pri 4°C in fiziološkem pH 7,4. Po vsakem dodatku amonijevega sulfata smo vzorcem preverili ustreznost pH, ki je bil v vseh primerih je v območju okrog 7. V primeru, da bi prišlo do večjega odstopanja, pa bi lahko pH korigirali z dodatkom amonijevega hidroksida ali žveplove kisline. Za doseg želene stopnje nasičenosti smo upoštevati, da je topnost odvisna od temperature, in da po dodatku trdnega amonijevega sulfata pride do povečanja volumna [15,22,23]. Potrebne volumne in zatehte za različno nasičene raztopine amonijevega sulfata smo izračunali s pomočjo spletnega vira [22].

3.2.3. DIALIZA

Metodo dialize smo uporabili za odstranitev amonijevega sulfata iz vzorcev. V ta namen smo uporabili celulozno membrano s porami 12 kDa, s čimer smo preprečili prehajanje proteinov iz dializnega črevesa in s tem ohranili nespremenjeno proteinsko sestavo. Dializo vseh vzorcev smo izvedli pri 4°C.

3.2.4. ULTRAFILTRACIJA

Pri izolaciji IgM smo v različnih stopnjah z različnimi nameni uporabili metodo ultrafiltracije. Ultrafiltracijo smo v vseh primerih izvedli pri 4°C, pretok pa smo dosegli z nadtlakom ali s centrifugalno silo. Ultrafiltracijo z nadtlakom (N₂) smo izvedli po protokolu: Koncentriranje proteinov v mikrocentrifugirni celici Amicon, ki se rutinsko

izvaja v Laboratoriju za imunologijo revmatizma v koncentrirni celici Amicon 10 ml. V primerih, ko smo ultrafiltracijo uporabili za koncentriranje le enega vzorca med izvajanjem katere druge metode, je ultrafiltracija tistega vzorca vključno s pogoji opisana v poglavju dotične metode.

3.2.5. GELSKA FILTRACIJA

Ločevanje proteinov smo izvedli z gelsko izključitveno kromatografijo. Uporabili smo dve koloni različnih dimenzij; dimenzije 10 mm × 20 cm (10/20) in 16 mm × 100 cm (XK 16/100). Kot nosilec smo uporabili Sephacryl S 300 HR, ki omogoča ločevanje proteinov v razponu 10 – 1500 kDa. Mobilno fazo oziroma izpiralni pufer je predstavljal PBS. Ob shranitvi kolone za dlje časa, smo jo konzervirali s spiranjem z 2-kratnim volumnom kolone 20% raztopine etanola. Kolono smo sestavili in pakirali po navodilih proizvajalca gelov. Za kolono manjše 10/20 v navodilih posamezni koraki pakiranja niso opredeljeni, zato smo korake glede na velikost in premer kolone poskušali ustrezno prilagoditi [24].

3.2.6. BRADFORDOVA METODA

Koncentracijo proteinov med posameznimi koraki izolacije smo določali po Bradfordovi metodi po protokolu, ki se rutinsko izvaja v laboratoriju za imunologijo revmatizma [19].

3.2.7. SDS - PAGE

Z elektroforezo smo preverjali stopnjo čistosti in uspešnosti ločitve po posameznih korakih izolacije IgM. Elektroforezo smo izvajali po Laemmli protokolu hkrati pod reducirajočimi in nereducirajočimi pogoji na gelu(ih) dimenzij 8 × 7 cm [15].

3.2.8. NEFELOMETRIJA

Nefelometrične meritve vsebnosti IgM, IgG ter IgA proteinov so bile v celoti izvedene v Splošnem laboratoriju Jesenice z aparatom BN ProSpec® System, Dade Behring Marburg, GmbH, Marburg, Nemčija. Za merjenje je naprava potrebovala 300 µl vzorca. V ta namen smo v 1,5 ml epruvete napipetirali po 300 µl predhodno premešanih vzorcev, epruvete označili ter jih zapakirali v stiroporno škatlo s hladilnim vložkom. Tako pripravljene vzorce smo nato poslali na Jesenice.

3.2.9. ELISA (aCL, anti-β₂ GPI)

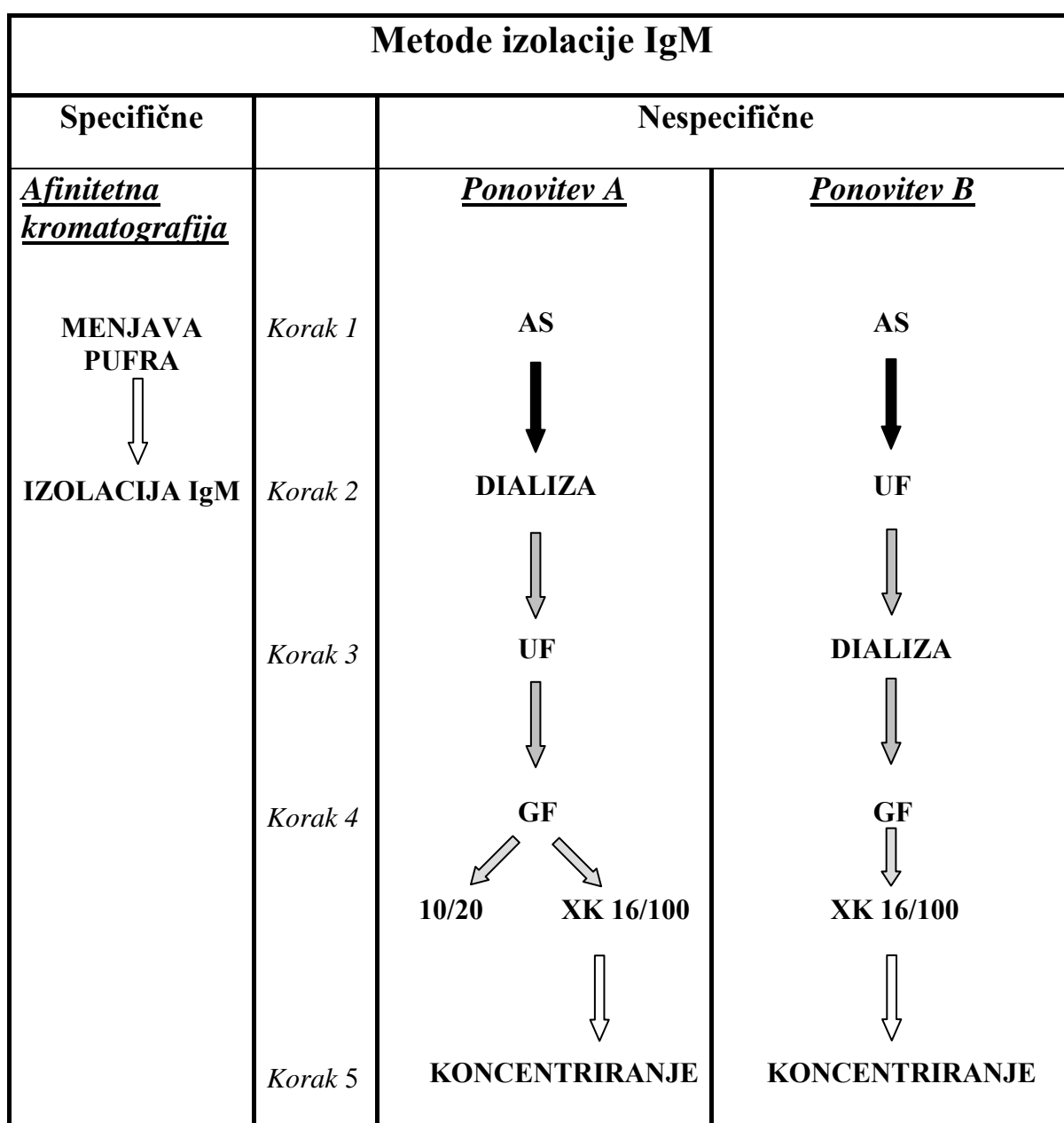
Imunokemični metodi sta bili izvedeni po protokolih za določanje antikardiolipinskih protiteles (aCL) [25] in protiteles β₂-glikoproteinu I (anti-β₂ GPI) [26] v okviru rutinskih preiskav v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Pri obeh analizah smo ugotavljali ali

je prišlo tekom korakov izolacije do sprememb aktivnosti protiteles razreda M v smislu tega, da so postala avtoreaktivna.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

Izolacije IgM smo se lotili na dva načina. Na eni strani s specifično metodo, na drugi pa s kombinacijo nespecifičnih neagresivnih metod (shema 1). Tekom obeh izolacij smo vse vzorce shranjevali pri -40°C .

Shema 1: Metodološki pristop izolacije protiteles razreda M. Nekateri pogoji posameznih korakov ponovitve A in B se razlikujejo, saj smo tekom izolacije težili tudi k optimizaciji posameznih metod.



--	--	--	--

AS – obarjanje z amonijevim sulfatom; UF – ultrafiltracija; GF – gelska filtracija, 10/20 označuje kolono s premerom 10 mm in dolžino 20 cm; XK 16/100 označuje kolono s premerom 16 mm in dolžino 100 cm

4.1. IZOLACIJA IgM Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO

4.1.1. Korak 1 – PRIPRAVA VZORCA

- **Menjava pufrskega sistema**

Razsoljevalno kolono smo najprej odprli na zgornji strani in odlili konzervirni pufer (raztopina z azidom), nato smo na kolono nalili pufer TRIS, NaCl in jo odprli kolono še na spodnji strani. Kolono smo sprali s 5×2 ml puфра TRIS, NaCl. Na kolono smo nanegli 500 μ l predhodno prefiltriranega zbirka serumov skozi membrano Sartorius s porami 0,45 μ m. Zbirali smo ~ 1 ml frakcije in jim merili absorbanco pri 280 nm. Frakcije z visoko absorbanco smo združili. Njihov skupni volumen je bil več kot 6 ml, zato smo združene frakcije za nadaljnjo uporabo skoncentrirali. Kolono smo regenerirali s spiranjem z 20 ml destilirane vode, nato pa konzervirali z 0,02% raztopino azida v destilirani vodi. Pri nanosu azida smo najprej počakali, da je nekaj mililitrov steklo skozi kolono, nato pa jo zaprli z zgornje strani in počakali, da je nehala kapljati, za tem pa jo zaprli še spodaj.

- **Koncentriranje združenih frakcij z metodo ultrafiltracije**

Združene frakcije smo odpipetirali v filtrirno epruveto AMICON[®] Ultra-15 (10 kDa) in $5\times$ centrifugirali (5 min / 23°C / 2450 g). Zadnji dve centrifugiranji smo izvedli le 2 min pri enakih pogojih. Končni volumen je bil 660 μ l.

4.1.2. Korak 2 – IZOLACIJA IgM

- **Priprava kolone**

Koloni MBP smo najprej odstranili zgornji, nato še spodnji pokrovček in pustili, da konzervirni pufer steče iz kolone. Za tem smo kolono sprali s 5 ml ImmunoPure MBP Column preparativnega puфра. Pripravo kolone smo izvedli pri sobni temperaturi.

- **Vezava IgM iz vzorca na kolono**

Vezavo smo izvedli pri 4°C z ImmunoPure IgM vezavnim pufrom. Kolono smo sprva sprali z 20 ml vezavnega puфра, nato pa nanegli vzorec in pustili da v celoti vstopi v gel. Po predpisu je priporočen volumen nanesenega vzorca 500 μ l, ki ga pred nanosom redčimo z vezavnim pufrom v razmerju 1 : 1. Izhajali smo iz 500 μ l zbirka serumov, katerega smo po

menjavi pufrov skoncentrirali na 660 μ l. Ker gre pri redčitvi za enak puferski sistem, smo dodali le 340 μ l vezavnega pufru, da je bil volumen nanešenega vzorca 1000 μ l. Po nanosu vzorca smo počakali, da se je le-ta vpil v gel, nato smo na kolono dodali še 500 μ l vezavnega pufru in jo zaprli na spodnji strani ter inkubirali 30 min. Po inkubaciji smo kolono ponovno odprli in sprali s 26 ml vezavnega pufru, da so se odstranili nevezani proteini. Zbirali smo ~3 ml frakcije in jim merili absorbanco pri 280 nm proti vezavnemu pufru. Ko je absorbanca frakcij dosegla absorbanco vezavnega pufru, smo spiranje zaključili in zamašili spodnji del kolone.

- **Izpiranje IgM iz kolone**

Izpiranje kolone smo izvedli pri sobni temperaturi. Najprej smo ogreli kolono MBP in ImmunoPure IgM izpiralni pufer na sobno temperaturo, odprli spodnjo stran in nanесли 3 ml izpiralnega pufru in hkrati zbirali izpirek. Prvemu izpirku (~2,8 ml) po dodatku 3 ml izpiralnega pufru smo izmerili absorbanco proti izpiralnemu pufru in ga uvrstili med frakcije, ki vsebujejo čiste IgM proteine. Počakali smo, da se je v celoti vpil v gel, nato smo na vrh kolone dodali še nekaj izpiralnega pufru, da se gel ni izsušil in zaprli spodnji del kolone. Inkubirali smo čez noč, zato smo na kolono na rahlo namestili še zgornji pokrov. Po inkubiranju smo na kolono nanесли 15 ml izpiralnega pufru in začeli zbirati ~1 ml frakcije, katerim smo merili absorbanco proti izpiralnemu pufru. Ko je absorbanca frakcij dosegla absorbanco izpiralnega pufru, smo izpiranje zaključili. Kolono smo regenerirali s spiranjem z 10 ml dH₂O, nato pa še z 10 ml ImmunoPure IgM vezavnega pufru. Za tem smo zamašili spodnji del kolone, dodali 1,5 ml vezavnega pufru in kolono zaprli od zgoraj.

4.2. OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM

- **Ponovitev A**

1. Alikvot 1 (5 ml) zbirka serumov smo centrifugirali (15 min/1500 g/4 °C). Po centrifugiranju ni bilo usedline, tako da smo celoten vzorec prenesli v 50 ml čašo.
2. Alikvotu 1 zbirka serumov smo nato ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu po kapljicah dodali 100% nasičeno raztopino amonijevega sulfata. Za pripravo 35% nasičenega vzorca smo potrebovali 2,69 ml 100% nasičene raztopine amonijevega sulfata. Vzorec smo mešali 4 h.

- Po 4 h mešanja smo vzorec ponovno centrifugirali (30 min/2450 g/4 °C). Po centrifugiranju smo dobili usedlino. Supernatantu smo izmerili volumen (6,8 ml) (~200 µl motnega supernatanta neposredno nad usedlino smo za doseg večje čistote zavrgli) ter ga ločili od usedline. Za povišanje nasičenosti iz 35% na 50% pri 4°C smo potrebovali 0,61 g trdnega amonijevega sulfata. Amonijev sulfat smo dodajali počasi, ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom. Vzorec smo mešali pri 4°C, čez noč. Dobljeno usedlino pri 35% nasičenju (označeno kot frakcija "35%") pa smo resuspendirali v 2 ml PBS.
- Po 19,5 h mešanja, smo vzorec s 50% nasičenostjo z amonijevim sulfatom centrifugirali (30 min/2450 g/ 4°C). Supernatantu (označen kot frakcija ">50%") smo določili volumen (~6,5 ml) in ga ločili od usedline. Oborjene proteine med 35 % in 50% nasičenostjo (označene kot frakcija "50%") smo resuspendirali v 2 ml PBS.

- **Ponovitev B**

- Alikvot 2 (3,78 ml; predhodno prefiltriran čez filter Sartorius s porami 0,45) zbirka serumov smo centrifugirali (15 min/1500 g/4 °C). Po centrifugiranju ni bilo peleta oziroma usedline, tako da smo celoten vzorec prenesli v 50 ml čašo.
- Alikvotu 2 zbirka serumov smo nato po kapljicah počasi dodajali 100% nasičeno raztopino amonijevega sulfata ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu. Za pripravo 50% nasičenega vzorca smo potrebovali 3,78 ml 100% nasičene raztopine amonijevega sulfata. Vzorec smo mešali na magnetnem mešalu čez noč pri 4°C.
- Po 18,5 h mešanja smo vzorec ponovno centrifugirali (30 min/2450 g/4 °C). S centrifugiranjem smo ločili oborino od supernatanta. Supernatant (označen kot frakcija ">50%") smo ločili od oborine in določili volumen (~6,1 ml). Dobljeno usedlino pri 50% nasičenju (označeno kot frakcija "50%") smo resuspendirali v 4 ml PBS.

4.3. DIALIZA

Pri ponovitvi izolacije z nespecifičnimi metodami A in B smo izvedli odstranitev amonijevega sulfata po enakem protokolu. Pri ponovitvi A smo izvedli dializo frakcij "35%", "50%" in ">50%" po obarjanju z amonijevim sulfatom, pri ponovitvi B pa dializo frakcij "50%" po ultrafiltraciji in ">50%" po obarjanju z amonijevim sulfatom. Pri vseh frakcijah je prišlo do povečanja volumna, do največjega pa je prišlo pri frakciji ">50%" po obarjanju z amonijevim sulfatom pri ponovitvi B. Zato smo se odločili, da ta vzorec

skoncentriramo na približen volumen izhodnega poola serumov. V ta namen smo izbrano frakcijo centrifugirali (5+10+4 min/ 2450 g/ 4°C) s koncentrirno epruveto Amicon Ultra Centrifugal Unit 4 ml z membrano s porami 30 kDa.

- **Priprava dializne vrečke**

Na embalaži proizvajalec opozarja, da je potrebno dializni vrečki pred uporabo odstraniti glicerol in žveplo, ki ga je lahko več, kot le v sledovih. Glicerol smo odstranili s spiranjem dializnih vrečk v erlenmajerici, 3 h, pod hladno tekočo vodo. Potrebno je opozoriti, da žvepla nismo odstranjevali, kar bi teoretično bilo potrebno upoštevati pred postopkom elektro-oksidacije. Ioni žvepla bi potencialno lahko bili udeleženi v redoks reakcijah. Vendar je potrebno omeniti, da pri obeh ponovitvah dializa ni bila zadnji korak čiščenja IgM proteinov. Za dializo smo v obeh primerih izvedli še gelsko filtracijo, pri kateri se vzorec po eni strani zelo razredči, po drugi strani pa lahko z gelsko filtracijo zamenjamo tudi puferski sistem. Na podlagi tega lahko pridemo do zaključka, da je teoretično pri končnem produktu koncentracija žvepla tako nizka, da žveplo na postopek elektro-oksidacije ne more vplivati.

- **Dializa**

Dializo smo izvedli v časi s 500 ml PBS, ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom in pri 4°C. Dializni pufer smo zamenjali 4-krat (3-krat v razmaku 2 h in enkrat v razmaku 17 h).

- **Testiranje prisotnosti amonijevega sulfata z barijevim kloridom**

Amonijev sulfat reagira z barijevim kloridom (BaCl_2), tako da nastane bela oborina (BaSO_4). Uspešnost dialize smo preverjali s primerjavo intenzitete motnosti PBS in alikvotov odpadnega dializnega pufera po dodatku barijevega klorida.

4.4. ULTRAFILTRACIJA

- **Ponovitev A – Odstranitev proteinov, katerih MM je manjša od velikosti por membrane z uporabo natlaka**

V ta namen smo uporabili membrano polietersulfonsko membrano Millipore Biomax, s porami 300 kDa. Ultrafiltracijo smo izvedli pri najvišjem dovoljenem nadtaku za uporabljeno membrano, 0,7 atm. Odstranitev proteinov smo izvedli tako, da smo izhodni

vzorec (združeni frakciji "35%" in "50%" po DIALIZI) najprej razredčili iz ~4 ml na ~10 ml, nato pa ga ponovno skoncentrirali na ~4 ml. Postopek smo ponovili 6-krat.

- **Ponovitev B – Sočasna odstranitev amonijevega sulfata in proteinov, katerih MM je manjša od velikosti por membrane, iz vzorca z uporabo nadtlaka**

Postopek je bil izveden pod enakimi pogoji kot v zgornjem primeru, le da smo, zaradi drugega predhodnega koraka, odstranjevali še amonijev sulfat (topljenec nizke MM). V tem primeru je bil vzorec frakcija "50%" po obarjanju z amonijevim sulfatom.

- **Ponovitev A, B – Koncentriranje vzorcev po gelski filtraciji z uporabo nadtlaka in centrifugalne sile (korak 5)**

Koncentriranje pri obeh ponovitvah se je razlikovalo (preglednica II). Pri ponovitvi B smo spremenili pogoje koncentriranje vseh vzorcev. Pri vzorcih, ki so vsebovali IgM pa smo na mesto centrifugalne sile koncentriranje izvedli z uporabo nadtlaka, saj je pri ponovitvi A zaradi preostrih pogojev prišlo pri le-teh frakcijah do agregiranja IgM in usedline. Za koncentriranje s centrifugalno silo smo uporabili koncentrirne epruvete Amicon Ultra Centrifugal Unit 4 ml z membrano s porami 30 kDa.

Preglednica II: Pogoji koncentriranja vzorcev pri ponovitvi A in B

Ponovitev A	Ponovitev B
<u>Frakcije z IgM:</u> - koncentriranje s centrifugalno silo - 10 min/2450 g/4 °C	<u>Frakcije z IgM:</u> - koncentriranje z nadtlakom - membrana 10 kDa YM5 DIAFLO® - nadtlak 4 atm/4 °C - 40 + 60 min
<u>Ostale frakcije:</u> - koncentriranje s centrifugalno silo - 10 min/2450 g/4 °C	<u>Ostale frakcije:</u> - koncentriranje s centrifugalno silo - 10 min/1500 g/4 °C

4.4.1. UTRAFILTRACIJA NA PRINCIPU NADTLAKA (N₂)

Glede na namen ultrafiltracije smo izbrali ustrezno membrano premera 25 mm (polietersulfonsko membrano Millipore Biomax s porami 300 kDa ali polietersulfonsko membrano YM5 Diaflo® s porami 10 kDa) in izvedli ultrafiltracijo po sledečem postopku v 10 ml koncentrirni celici Amicon.

- **Priprava membrane**

Membrane so pred izsušitvijo zaščitene z glicerolom, nekatere so tudi prevlečene z NaN₃. Obe spojini je pred uporabo potrebno odstraniti. Zaščitno plast (glicerol, NaN₃) smo

odstranili v skladu z navodili proizvajca membrane Amicon z namakanjem 1 h v destilirani vodi (3× menjava vode), pri čemer je bila svetleča stran membrane obrnjena navzdol [27].

- **Sestava celice**

Po namakanju smo sestavili 10 ml koncentrirni celici Amicon. Membrano smo namestili na spodnji nastavek s svetlečo stranjo obrnjeno navzgor, nato smo membrano zatesnili z elastičnim obročem in privili na spodnji nastavek valj celice. Na zgornji strani valja smo dodali še magnetno mešali. V celico smo sedaj lahko nalili vzorec.

- **Ultrafiltracija**

Po nalitju vzorca smo zaprli celico s zgornjim nastavkom, ki je vezan na jeklenko z N₂, in celico vstavili v kovinsko ogrodje. Pri tem se je moral spodnji nastavek zataktniti v okrogli odprtini kovinskega ohišja. S tako pripravljeno celico smo izvedli ultrafiltracijo. Na dovodu plina smo nastavili želen tlak, odprli ventil na celici, ventil za plin na jeklenki (N₂) in vklopili mešalo. Odpad (ultrafiltrat) smo lovili v 50 ml stekleno čašo. Glede na uporabljeno membrano smo nastavili primeren tlak – pri delu z membrano ≥ 10 kDa je priporočen optimalen tlak 3,7 atm, maksimalen pa 4,7 atm; pri delu z membrano ≥ 100 kDa je maksimalen tlak 0.7 atm [27]. Ko je volumen vzorca v celici padel ~4 ml smo ustavili mešanje, zaprli dotok plina v ventilom in šele nato odprli ventil na celici. Celico smo izmaknili iz kovinskega ogrodja in odstanili zgornji nastavek. Skoncentriran vzorec smo lahko odpipetirali. V primeru odstranjevanja proteinov, katerih MM je manjša od velikosti por membrane in / ali amonijevega sulfata, smo v tej točki vzorcu dodali PBS do 10 ml in ponovili ultrafiltracijo. Zmeraj pa smo pred prvo ultrafiltracijo vzorca preverili tesnjenje celice s filtriranjem dH₂O pri enakih pogojih.

- **Čiščenje in shranjevanje membrane**

V primeru, da smo membrano uporabili večkrat, smo jo očistili z namakanjem v 0,1 M NaOH, ki je vsebovala 100 ppm NaOCl, 30 min. Membrano smo nato shranili v 10% raztopini etanola v hladni sobi [27].

4.5. GELSKA FILTRACIJA

- **Priprava kolone**

Kolono in adapterje smo sprali z detergentom, 70% etanolom in destilirano vodo. Nato smo kolono sestavili in omočili notranjost s elucijskim pufrom, s čemer smo preprečili lepljenje gela na steklo ob vlitju.

- **Priprava gela**

Za pakiranje kolone smo pripravili V_{gela} , ki je odgovaljal $1,5 \times V_{\text{kolone}}$ in nato dodati še izpiralni pufer do $2 \times V_{\text{kolone}}$. Sephacryl S-300 HR smo ogreli na sobno temperaturo, dobro pretresli in nato odmerili z merilnim valjem. Tudi po dodatku elucijskega puffra smo gel dobro premešali, da je nastala homogena suspenzija.

- **Pakiranje**

Pripravljeno suspenzijo smo dobro premešali in jo s pomočjo steklene palčke vlili v kolono. Volumen suspenzije je večji od volumna kolone, zato smo na vrh kolone vstavili dva plastična lija (enega na drugega in ju med seboj ovili s parafilmom, v katera smo nalili suspenzijo. Po navodilih za pakiranje kolone bi morali naliti vso suspenzijo v za to namenjen rezervoar na vrhu kolone, vendar le-tega nismo imeli. Pakiranje bi morali izvesti tako, da bi vrh rezervoarja zatesnili s pokrovom, ki bi bil preko cevke povezan s črpalko. Preko črpalke bi nastavili pretok in začeli pakirati. V našem primeru nismo imeli rezervoarja, kot zbiralnik za večji volumen suspenzije sta nam služila prej omenjena lija. Da bi dosegli posedanje gela, smo namestili črpalko na odtočno cevko ("spodnja stran kolone") in na podlagi izsesavanja tekočine oziroma vakuuma dosegli posedanje. Tako smo izvedli le korak 1. Po koraku 1 se je gel toliko posedel, da smo lahko namestili na vrh kolone adapter in tako povezali kolono s črpalko preko zgornje strani. Korak 2 v fazi pakiranja smo izvedli po navodilih proizvajalca gela (preglednica III) [24].

Preglednica III: Pogoji pakiranja kolon 10/20 in XK 16/100

	Korak 1 (2 h)*	Korak 2 (1 h)
Kolona 10/ 20	20 ml/h	40 ml/h
Kolona XK 16/100	60 ml/h	120 ml/h

*črpalka priključena na spodnjo stran oziroma odtočno cevko

- **Gelska filtracija vzorcev**

Prosti volumen (V_0) kolon smo določili z gelsko filtracijo Blue Dextrana 2000, uspešnost ločevanja proteinov pa preverili z gelsko filtracijo različnih mešanic kalibracijskih proteinov različnih MM. Raztopine Blue Dextrana 2000 in mešanice kalibracijskih proteinov smo pripravili po navodilih proizvajalca [18], tako da je bila koncentracija vsakega posameznega proteina med 3 in 5 g/L, le koncentraciji Blue Dextrana 2000 in feritina sta bili 1 g/L. Po določitvi prostega volumna in ločitvi mešanice kalibracijskih proteinov smo izvedli gelsko filtracijo vzorcev. V vseh primerih so bili volumni vzorcev nanešeni na kolono v intervalu 1–2% celokupnega volumna kolone (V_t), kar je bilo v predpisanem intervalu (0,1–2%) s strani proizvajalca kalibracijskih proteinov, za doseg visoke ločljivosti nanešenega vzorca [18]. Pri manjši koloni smo zbirali frakcije po ~1 ml v 1,5 ml epruvete ročno. Pri večji koloni pa smo zbirati frakcije z Pharmacia RediFrac zbiralnikom po ~3 ml. Ker smo pretok večkrat spremenili, smo prav tako spremenili minutni interval, v katerem je zbiralnik lovil eno frakcijo. V vseh primerih pa smo poskušali loviti 3 ml frakcije.

Tekom izvajanja ponovitev gelske filtracije smo pogoje na podlagi rezultatov spreminjali, s čimer smo želeli doseči boljšo ločitev proteinov (preglednica IV).

Preglednica IV: Pogoji, pri katerih smo izvedli posamezne gelske filtracije

Ponovitev A		Ponovitev B
Kolona 10/20	Kolona XK 16/100	Kolona XK 16/100
<u>Blue dextran 2000</u> - $V_{\text{nanosa}} = 200 \mu\text{l}$ - sobna T - pretok 20 ml/h - frakcije / 3 min (~1 ml)	<u>Blue dextran 2000</u> - $V_{\text{nanosa}} = 3 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 30 ml/h - frakcije / 6 min (~3 ml)	<u>Blue dextran 2000</u> - $V_{\text{nanosa}} = 3 \text{ ml}$ - sobna T - pretok 10 ml/h - frakcije / 23 min (~2,8 ml)
<u>Kalibracijska raztopina 1</u> - $V_{\text{nanosa}} = 200 \mu\text{l}$ - sobna T - pretok 20 ml/h - frakcije / 2,5 min (~0,8 ml)	<u>Kalibracijska raztopina 2</u> - $V_{\text{nanosa}} = 2 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 30 ml/h - frakcije / 6 min (~3 ml)	<u>Kalibracijska raztopina 3</u> - $V_{\text{nanosa}} = 2 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 10 ml/h - frakcije / 23 min (~2,8 ml)
<u>Vzorec po UF (35 + 50)</u> - $V_{\text{nanosa}} = 300 \mu\text{l}$ - sobna T - pretok 20 ml/h	<u>Alikvot 1 po UF (35+50)</u> - $V_{\text{nanosa}} = 2 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 20 ml/h	<u>Alikvot 1 po DIALIZI</u> - $V_{\text{nanosa}} = 2 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 10 ml/h

- frakcije / 2,5 min (~0,8 ml)	- frakcije / 9 min (~3,2 ml) <u>Alikvot 2 po UF (35+50)</u> - $V_{\text{nanosa}} = 1,38 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 10 ml/h - frakcije / 23 min (~2,8 ml)	- frakcije / 23 min (~2,8 ml) <u>Alikvot 2 po DIALIZI</u> - $V_{\text{nanosa}} = 2,1 \text{ ml}$ - hlajenje plašča kolone* - pretok 10 ml/h - frakcije / 23 min (~2,8 ml)
--------------------------------	--	---

* hlajenje plašča kolone z vodo iz pipe

4.6. BRADFORDOVA METODA

- **Umeritvena krivulja**

Pripravili smo raztopino govejega serumskega albumina (BSA) koncentracije 1 g/L. Iz tako pripravljene raztopine BSA smo pripravili umeritveno krivuljo, tako da smo v 1,5 ml epruvete najprej odpipetirali ustrezeni volumen fosfatnega pufra in nato dodali ustrezeni volumen BSA koncentracije 1 g/L. Epruvete smo nato premešali na vrtničniku in v vsako dodali 200 μL barvila Bio Rad (predhodno premešanega in segretega na sobno temperaturo). Po dodatku barvila smo pripravljene vzorce za umeritveno krivuljo inkubirali najmanj 5 min. Analitsko ozadje smo izmerili v vzorcu, sestavljenem iz 800 μL PBS + 200 μL barvila (preglednica V).

Preglednica V: Priprava umeritvene krivulje

V [μL] BSA (C = 1 g/L)	V [μL] PBS	V [μL] barvila	$C_{\text{končna v epici}}$ [mg/L]
0 (slepa)	800	200	0
1	799	200	1
3	797	200	3
5	795	200	5
8	792	200	8
10	790	200	10
20	780	200	20
25	775	200	25

- **Priprava vzorca**

Pripravili smo dve raztopini (paralelki) za vsak posamezni vzorec. V 1,5 ml epruveto smo najprej odpipetirali ustrezeni volumen PBS in še ustrezeni volumen vzorca. Nato smo raztopino premešali na vrtničniku in dodali 200 μL barvila Bio Rad (predhodno segretega

na sobno temperaturo in premešanega). Enako kot pri vzorcih za umeritveno krivuljo smo po dodatku barvila vzorce inkubirali najmanj 5 min (preglednica VI).

Preglednica VI: Priprava vzorca

V [μ L] PBS	V [μ L] vzorca*	V [μ L] barvila
795	5	200
797	3	200

* Vzorce, pri katerih smo sklepali, da bodo zaradi visoke koncentracije proteinov izven umeritvene krivulje, smo prehodno redčili. Redčitve so se razlikovale od vzorca do vzorca (4 \times , 6 \times).

- **Merjenje absorbance (TECAN spektrofotometer)**

Na mikrotitrsko ploščo Costar-Medium Binding smo napipetirali po 100 μ l raztopin za umeritveno krivuljo oziroma vzorce, in sicer v duplikatih. V programu X-Fluor smo naložili predlogo »proteini BioRad« in izmerili absorbance merimo pri 595 nm. Zaradi obstojnosti reakcije (1 h v temi) smo meritev morali izvesti v 1 h od priprave raztopin.

- **Obdelava rezultatov**

Iz dobljenih absorbanc pri 595 nm smo narisali umeritveno krivuljo za BSA ($A_{595} = f(C_{BSA})$). Iz enačbe umeritvene krivulje smo nato izračunali koncentracijo proteinov v vzorcu za vsako paralelko posebej z upoštevanjem morebitnih redčitev. Končna koncentracija proteina je bila povprečje koncentracij obeh paralelek.

Končne koncentracije smo morali korigirati s korekcijskim faktorjem. Korekcijski faktor za protitelesa je (21,1/8,0), povprečni pa (21,1/10,9). Za izračun koncentracije vseh naših vzorcev smo uporabili povprečni korekcijski faktor.

4.7. SDS - PAGE

- **Priprava gela**

Predhodno smo pripravili vse potrebne pufre in raztopine, ki smo jih potrebovali elektroforezo. Stekla za elektroforezo smo prav tako predhodno dobro očistili z detergentom in jih razmastili z 98% etanolom. Nato smo sestavili celico za vertikalno gelsko elektroforezo in pri tem uporabili distančne letvice 0,75 mm in pripravili 5 ml (10 ml v primeru elektroforeze dveh gelov) mešanice za 10% ločitveni gel, kateri smo tik pred uporabo dodali APS in TEMED. Pripravljeno raztopino smo napipetirali med steklenima ploščama do 3 cm od vrhnjega roba steklene plošče. Po 1 min smo z injekcijsko brizgo

nalili čez gel destilirano vodo in počakali 30 min, da je gel polimeriziral. V primeru, da smo elektroforezo nadaljevali naslednji dan, smo celico ovili s parafilmom, da se ni izsušila in jo shranili v hladni sobi (4°C). V nadaljevanju smo popivnali vodo s površine ločitvenega gela s pivnik papirjem in pripravili smo 3 ml (oziroma 6 ml za dva gela) mešanice za 4% koncentracijski gel, kateri smo tik pred uporabo dodali APS in TEMED. Raztopino smo pipetirali med plošči skoraj do vrha gela ob tem pa pustili toliko prostora, da se ni polilo, ko smo vstavili glavnik z 10 zobci in počakali 30 min, da je gel polimeriziral. Nato smo pripravili elektroforezno celico, vanjo nalili spodnji pufer in vstavili sendvič z zgornjim pufrom. Zatem smo izvlekli glavnik in vsako luknjo sprali z zgornjim pufrom s pomočjo Hamiltonove brizge.

• Priprava vzorcev

V elektroforezni žepki smo lahko nanesti največ 30 µl pripravljene vzorčne mešanice. Mešanica vzorca sestoji iz:

- Vzorca (po potrebi predhodno razredčenega)
- 7,5 µl 4× vzorčnega pufera (reducirajočega ali nereducirajočega)
- Destilirane vode (po potrebi smo dopolnili do 30 µl)

V posamezni elektroforezni žepki smo poskušali nanesti 10 µg proteinov. V ta namen smo vzorce z visoko koncentracijo (predhodno določeno z Bradford metodo) redčili v takšnem razmerju, da so bili volumni vzorca za 10 µg proteinov v področju 2,5 – 22,5 µl. V primeru, da je bila koncentracija proteinov tako nizka, da bi morali odmeriti več kot 22,5 µl, smo v vzorčno mešanico odpipetirali 22,5 µl vzorca. 4× vzorčni pufer smo pri pripravi mešanice vzorca redčili z vzorcem in/ali destilirano vodo do končne 1× koncentracije. dH₂O smo dodali le v primeru, ko je bil volumen odpipetiranega vzorca in 4× vzorčnega pufera manjši od 30 µl in smo z destilirano vodo dopolnili do le-tega volumna. Lahko smo uporabili reducirajoči in nereducirajoči (ni vseboval 2-mekaptoetanol) vzorčni pufer. Razlika pri pripravi mešanice z enim oziroma drugim pufrom je bila v tem, da smo vzorce s 4× reducirajočim pufrom pred nanosom v elektroforezne žepke segrevali 5 min pri 98°C.

• Označevalec molekulskih mas

V elektroforezni žepki smo pri prvi elektroforezi nanesti 5,0 µl, ker pa je ena lisa po barvanju in razbarvanju gela zginila smo v vseh nadaljnjih elektroforezah nanesti po 7,5 µl označevalca SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard. Kljub večjemu nanosu pa lise nismo

opazili. Glede na razporeditev lis smo prišli do zaključka, da je v vseh primerih zginila lisa mioglobina (22 kDa), ki je po barvanju s CBB zbledela. V enem primeru pa je izginila še lisa aprotinina (6 kDa), ki jo je najverjetneje zakrila močna lisa lizocima (16 kDa).

- **Elektroforeza**

Nanesli smo vzorce in označevalec na gel, za tem pa nalili zgornji pufer do vrha. Na generatorju napetosti smo nastavili pogoje za elektroforezo v koncentracijskem gelu (za en gel: napetost 125 V, tok 12,5 mA; za dva gela: napetost 250 V, tok 25 mA) ter si med elektroforezo zapisovali dejanske pogoje. Potovanje skozi koncentracijski gel je trajalo približno 30 min. Ko so vzorci pripotovali v ločitveni gel, smo nastavili nove pogoje (za en gel: napetost 125 V, tok 25 mA; za dva gela: napetost 250 V, tok 50 mA) ter si med elektroforezo zapisovali dejanske pogoje. Ko je bila sprednja linija 1 cm pred koncem gela, smo izključili elektriko in začeli z nadaljnjo obdelavo. Potovanje proteinov v ločitvenem gelu je trajalo prav tako približno 30 min.

- **Obdelava gela po elektroforezi**

- Barvanje gela s CBB in razbarvanje

Gel smo prenesli v plastično kadičko z barvilom za obarvanje. Ob rahlem stresanju smo barvali od 15 do 35 min. Po barvanju smo odlili barvilo v posebno odpadno posodo, nato pa na gel nalili raztopino za razbarvanje (bledilec oziroma ang. destain) in postavili na stresalnik. Tekočino za razbarvanje smo vmes vsaj enkrat zamenjali. Razbarvanje je trajalo od 30 do 45 min. Preden smo gel posušili, smo ga slikali v G:BOXu. Za slikanje smo gel iz raztopine za razbarvanje nanesli na stekelce omočeno z nekaj kapljicami te raztopine, položili nanj gel in slikali v komori pod vidno svetlobo.

- Sušenje gela

Vključili smo sušilec in ga priključili na vakuumsko črpalko. Gel smo položili na folijo, ga prekrili z drugo plastjo folije, tako da smo zajeli čim manj zračnih mehurčkov. Nato smo ga položili na sušilec gel, in sicer med dva filter papirja ter vse skupaj prekrili s folijo na sušilcu. Počakali smo, da se je vzpostavil vakuum in nato zaprli pokrov sušilca. Sušili smo 20 min pri 80°C. Po 20 min smo odklopili vakuum iz sušilca, zaprli črpalo, ugasnili sušilec in pustili, da se je gel v njem ohladil (da ni prišlo do zvijanja gela). Posušeni gel smo lahko trajno shranili.

4.8. ELISA (aCL in anti β_2 -GPI)

Po zaključku ponovitev A in B izolacije smo preverili morebitne spremembne imunoreaktivnosti protiteles tekom izolacije z indirektnim encimsko imunskim testom z uporabo dveh različnih antigenov (aCL in β_2 -glikoproteinu I). Vzorce smo pred nanosom na mikrotitrne plošče posebej pripravili (ustrezno zmešali), kar prikazujeta preglednici VII in VIII. Razlog je v tem, da so rutinske analize na avtoreaktivnost protiteles nastavljene na serumske koncentracije (serumski vzorci).

Preglednica VII: Priprava vzorcev za aCL ELISA

	Vzorec	C_{IgM} [g/L]	Mešanje
	Zbirek serumov	1,90	6 μ l vzorca + 594 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. A	"35%" po DIALIZI	1,32	6 μ l vzorca + 594 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. A	"50%" po DIALIZI	1,63	6 μ l vzorca + 594 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. A	Fr. po GF (IgM)	0,23	30 μ l vzorca + 270 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. B	"50%" po DIALIZI	1,51	6 μ l vzorca + 594 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. B	Fr. po GF (IgM)	0,55	30 μ l vzorca + 270 μ l PBS-0,05% Tween 20

Preglednica VIII: Priprava vzorcev za anti β_2 -GPI ELISA

	Vzorec	C_{IgM} [g/L]	Mešanje
	Zbirek serumov	1,90	4 μ l vzorca + 396 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. A	"35%" po DIALIZI	1,32	4 μ l vzorca + 396 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. A	"50%" po DIALIZI	1,63	4 μ l vzorca + 396 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. A	Fr. po GF (IgM)	0,23	20 μ l vzorca + 180 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. B	"50%" po DIALIZI	1,51	4 μ l vzorca + 396 μ l PBS-0,05% Tween 20
Pon. B	Fr. po GF (IgM)	0,55	20 μ l vzorca + 180 μ l PBS-0,05% Tween 20

5. REZULTATI in RAZPRAVA

Rezultati posameznih korakov s pripravajočo razpravo so predstavljeni kronološko.

5.1. SPECIFIČNE METODE

5.1.1. IZOLACIJA IgM Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO

5.1.1.1. Korak 1 – PRIPRAVA VZORCA

Na razsoljevalno kolono smo nanesti 500 μ l zbirka serumov. Zbirali smo frakcije po \sim 1 ml. Rezultati so prikazani v preglednici IX. Frakcije z visokimi absorbancami smo združili (frakcije 2 – 7) in skoncentrirali na 660 μ l.

Preglednica IX: Absorbance in volumni frakcij po nanosu vzorca na razsoljevalno kolono

Frakcija	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A _{280nm}	-0,032	\sim 2,830	0,903	0,200	0,268	0,794	0,145	0,008	-0,005
V [μ l]	/	1280	930	935	1064	1020	985	/	/

5.1.1.2. Korak 2 – IZOLACIJA IgM

- **Vezava IgM na kolono in odstranitev ostalih proteinov s kolone**

Po vezavi IgM proteinov na kolono smo nevezane proteine sprali s kolone z vezavnim pufrom. Izpranim frakcijam smo izmerili absorbance proti vezavnemu pufu preglednica X.

Preglednica X: Absorbance frakcij po spiranju kolone z vezavnim pufrom

Frakcija	1	2	3	4	5	6	7
A _{280nm}	0,448	\sim 2,900	0,459	0,056	0,002	-0,032	-0,043

- **Izpiranje IgM proteinov s kolone**

Rezultati izpiranja IgM proteinov so prikazani v preglednici XI. V navodilih proizvajalca izolacijskega kita [20] navajajo, da je pri uporabi kivete dolžine 1 cm vrednost absorbance 1,18 enaka koncentraciji IgM 1 g/L (vrednost molarne absorpcijskega koeficienta $\epsilon = 1,18 \text{ L/mol cm}$). Prav tako proizvajalec IgM Purification Kita priporoča, da se združijo vse frakcije z absorbanco $\geq 0,020$. Na podlagi tega smo izračunali koncentracije in posledično mase IgM v frakcijah (preglednica XI). Nefelometrično izmerjena koncentracija IgM izhodnega materiala (zbirka serumov) je bila 1,9 g/L, iz česar sledi, da smo na kolono nanesli 0,95 mg IgM proteinov. Ob upoštevanju frakcij, katerih absorbanca $\geq 0,020$, in predpostavki, da pri menjavi pufra nismo izgubili IgM, je izkoristek izolacije $\sim 55\%$.

Preglednica XI: Absorbance in volumni frakcij ter teoretična koncentracija, izolirana masa IgM proteinov ter izkoristek izolacije

Frakcija	Po dodatku 3 ml elucijskega pufra	1	2	3	4	5	6	7
A _{280nm}	0,120	0,095	0,076	0,047	0,049	0,035	0,001	-0,010
V [ml]	2,800	0,935	1,010	0,860	0,855	0,905	/	/
C _{IgM} [g/L]	0,1017	0,0805	0,0644	0,0398	0,0415	0,0297		
m _{IgM} [mg]	0,2847	0,0753	0,0651	0,0343	0,0355	0,0268	$\Sigma = 0,5217$	
$\eta_T = 0,5217 / 0,95 \times 100\%$								
$\eta_T = 54,9\%$								

Izkoristek je sicer večji od 50%, vendar temelji na teoretični predpostavki, da vse frakcije po nanosu izpiralnega pufra vsebujejo le IgM proteine. Koncentracije v posameznih izpranih frakcijah so bile tako nizke, da bi pri nefelometričnem merjenju z aparatom BN ProSpec® System bile vse koncentracije pod mejo detekcije ($C \geq 0,176 \text{ g/L}$). Vzorce z absorbanco $\geq 0,020$, bi sicer lahko združili in skoncentrirali na volumen izhodnega seruma (500 μl) s čimer bi prišli v merljivo območje nefelometra. V tem primeru bi bila koncentracija IgM v izoliranem materialu v grobem primerljiva s serumskimi koncentracijami IgM, vendar pa bi bil volumen premajhen za študije posttranslacijskih sprememb z elektro-oksidacijo, saj je le za eno izvedbo potrebnih 200 – 300 μl vzorca s koncentracijo protiteles podobno serumski za eno meritev [28]. Lahko bi sicer z več ponovitvami pridobili večji volumen vzorca, vendar se tukaj postavi vprašanje med samim izkoristkom in ceno uporabljenega materiala.

Do teoretičnega izkoristka smo zelo kritični, saj smo na podlagi vzporednih rezultatov izolacije IgM z istim kitom izven diplomskega dela (osebna komunikacija Omersel J) prišli

do sklepa, da je v teh frakcijah koncentracija IgM bistveno nižja. Vzoredne analize so namreč pokazale, da je tudi po koncentriranju frakcij, ki bi naj po navodilih proizvajalca kita [20] vsebovale čiste IgM, nefelometrično določena koncentracija IgM še vedno pod mejo detekcije ($C < 0,176$ g/L). Do podobnih rezultatov – nizkega izkoristka (<5%) so prišli tudi Arnold in kolegi, ki so izolirali IgM z enako kolono [29].

5.2. NESPECIFIČNE METODE

Namen našega diplomskega dela je bil ob pridobitvi vzorca za študije elektro-oksidacije tudi optimizacija metod izolacije v smislu zvišanja izkoristka in hitrosti pridobitve materiala. S tem namenom smo pogoje posameznih metod glede na rezultate spreminjali.

5.2.1. Ponovitev A

Pri obarjanju smo izhajali iz 5 ml zbirka serumov zdravih oseb. Nefelometrično določena koncentracija IgM proteinov v serumu je bila 1,9 g/L.

5.2.1.1. Korak 1 – OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM

Sprva smo obarjanje proteinov izvedli pri 35% nasičenosti z amonijevim sulfatom, nato pa smo nasičenost povečali do 50%, s čimer smo želeli ločiti IgG proteine od IgM. Stopenjsko oboritev proteinov so podobno izvedli Korngold in kolegi, ki so sprva odstranili IgG proteine pri nasičenosti 33,3%, nato pa z dodatkom trdnega amonijevega sulfata povečali nasičenost na 50% in oborili IgM [30]. Drugi avtorji člankov in literature navajajo, da lahko IgM proteine obarjamo v eni stopnji pri različnih nasičenostih z amonijevim sulfatom, ki pa segajo do 50% nasičenosti [12,23,31]. Kot naslednji korak smo izvedli dializo, s čimer smo odstranili amonijev sulfat iz vzorcev. V člankih in literaturi, kjer so za oboritev proteinov uporabili amonijev sulfat, prav tako navajajo kot takojšen naslednji korak dializo za odstranitev amonijevega sulfata [23,31,32].

5.2.1.2. Korak 2 – DIALIZA

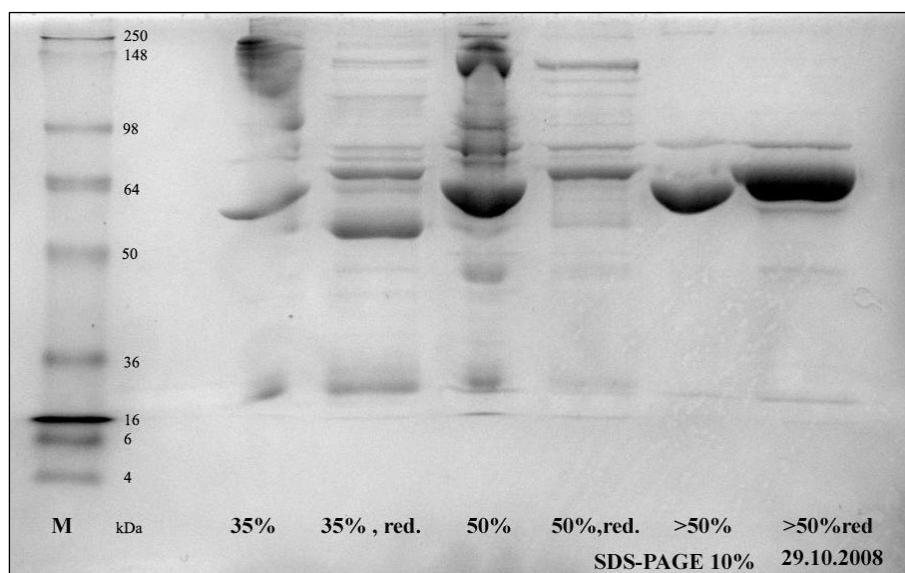
Izvedli smo dializo raztopine proteinov oborjenih pri 35% (označene kot frakcija "35%") nasičenosti, raztopine proteinov oborjenih med 35% in 50% nasičenostjo (označene kot frakcija "50%") in raztopine proteinov, ki se niso oborili do 50% nasičenosti (označene kot ">50%"). Uspešnost dialize smo preverjali z dodatkom barijevega klorida v alikvot odpadnega dializnega pufra (npr. pri menjavi po 2 h urah dialize). Po 4-kratnem dializiranju v 500 ml PBS je bila motnost dializnega PBS enaka motnosti PBS. S tem smo dokazali, da je koncentracija amonijevega sulfata v vzorcih padla na raven koncentracije

amonijevega sulfata prisotnega v PBS. Po dializiranju je v vseh vzorcih prišlo do povečanja volumna. Po dializi smo od vseh vzorcev odpipetirali 300 μ l za nefelometrično določitev IgM v posameznih vzorcih, tako da smo pri nadaljnjih analizah izhajali iz volumnov manjših za 300 μ l (2,29 ml, 2,29 ml in 9,2 ml). Koncentracije IgM v posameznih vzorcih so prikazane v preglednici XII.

Preglednica XII: Koncentracije in maso IgM ter volumni v frakcijah po obarjanju z amonijevim sulfatom in dializi

	"35%",	"50%"	">50%"
$V_{po\ AS}$ [ml]	Usedlina + 2 ml PBS	Usedlina + 2 ml PBS	~ 6,5
	↓	↓	↓
$V_{po\ DIALIZI\ (\uparrow V)}$ [ml]	2,59	2,59	9,5
$C_{IgM\ po\ DIALIZI}$ [g/L]	1,32	1,63	<0,176

Po dializi smo z Bradford metodo določili skupno koncentracijo proteinov v posameznih dializiranih vzorcih. Predhodno smo vse vzorce 4-krat redčili. Po določitvi koncentracij smo izvedli elektroforezo vzorcev v nereducirani in reducirani obliki. Rezultat elektroforeze vzorcev je predstavljen na sliki 9.



Slika 9: Elektroforezni gel vzorcev po obarjanju z amonijevim sulfatom in dializi (NERED. in RED.)

V liniji posameznih frakcij na gelu je vidnih veliko lis, še največ v "50%" frakciji, kar pomeni, da so frakcije heterogene in vsebujejo veliko proteinov različnih molskih mas

oziroma velikosti. Najintenzivnejše lise, glede na MM, pripadajo humanemu serumskemu albuminu (HSA), z molekularsko maso 66 000. Najmočnejša lisa je vidna v frakciji ">50%". Tudi v frakciji "35%" je pri tej MM lisa, ki je sicer poševna in šibkejša v primerjavi ostalima dvema frakcijama. Sklepamo da se je veliko HSA oborilo že pri 50% nasičenju z amonijevim sulfatom, največ HSA pa se nahaja v frakciji ">50%". To pomeni, da se večina HSA z amonijevim sulfatom obarja šele, ko je koncentracija slednjega višja od 50%.

Iz primerjave nereducirane in reducirane oblike vzorcev lahko sklepamo, da so predvsem v prvih dveh frakcijah prisotni imunoglobulini. Pri reducirani obliki "35%" frakcije se pojavijo lise pri ~25 kDa, ~50 kDa in nad 64 kDa, ki ustrezajo razcepljenim lahkim in težkim verigam IgG in IgM.

Izrazite lise na vrhu gela (med 150 in 250 kDa) pri nereduciranih vzorcih "35%" in "50%" nakazuje na to, da v vzorcih imamo proteine, ki zaradi velikosti ostanejo na vrhu gela. Glede na zastopanost posameznih proteinov v serumu (preglednica I) lise ustrezajo IgM, IgG in α_2 -makroglobulin. Slednji je glikozilirani serumski protein z MM 725 000 in je sestavljen iz 4 podenot. Podenote pa imajo MM nekje okoli 180 kDa [8,33]. Glikozilirani proteini v elektroforezi ne potujejo enako kot neglikozilirani, saj sladkorne verige vlečejo molekule v gel, kar je razlog, da so se lise pojavile pod 148 kDa. Teh lis pa ni pri vzorcu nereduciranem vzorcu frakcije ">50%", kar pomeni, da so se ti proteini oborili v veliki večini do 50% nasičenosti z amonijevim sulfatom. Pri reduciranem vzorcu ">50%" se sicer pojavijo komajda opazne lise pri ~25 kDa, ~50 kDa in nad 64 kDa, ki sicer ustrezajo lahkim in težkim verigam IgM in IgG. Na podlagi tega sklepamo, da so sicer protitelesa prisotna tudi v frakciji ">50%", vendar v zanemarljivo majhni koncentraciji.

Rezultati (elektroforezna slika in koncentracije IgM v frakcijah določene nefelometrično) so v nasprotju z našimi pričakovanji, ki so bila, da pri 35% nasičenosti selektivno oborimo le IG, nato pa z povečanjem nasičenosti do 50% le IgM proteine. Predpostavimo sicer lahko, da smo večino IgG oborili pri 35% nasičenosti, vendar smo hkrati oborili skoraj ½ IgM iz izhodnega poola serumov (preglednica XIII). Obenem smo prišli do zaključka, da je obarjanje z amonijevim sulfatom boljše izvesti direktno pri 50% nasičenosti, ker se večina IgM obori do te stopnje nasičenosti. Tak zaključek podpira tudi meritev IgM v frakciji ">50%", pri kateri je bila koncentracija IgM pod mejo detekcije ($C < 0,176$ g/L).

Preglednica XIII: Koncentracije IgM in celokupnih proteinov ter volumni posameznih in kasneje združenih frakcij

	V [ml]	C _{celokupna} [g/L]	C _{IgM} [g/L]
Frakcija "35%"	2,29	38	1,32
Frakcija "50%"	2,29	31	1,63
Frakcija ">50%"	9,20	/	<0,176
F. "35%"+"50%"	4,28 + 300 µl	47	1,475

Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da pred naslednjim korakom frakciji "35%" in "50%" zaradi večjega izkoristka združimo. Pri naslednjem koraku smo torej izhajali iz 4,58 ml vzorca združenih frakcij "35%"+"50%", kateremu pa smo odaliktvirali 300 µl (kontrolni material).

5.2.1.3. Korak 3 – ULTRAFILTRACIJA

Namen ultrafiltracije je bil odstraniti proteine manjše od 300 kDa, torej se znebiti večine proteinov v vzorcu, pri čemer smo izhajali iz 4,28 ml vzorca združenih frakcij. Po vsaki ciklu ultrafiltracije smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 280 nm »odpada« (ultrafiltrat; ~6 ml) proti PBS pri sobni temperaturi. Absorbance odpadov po vsakem ciklu so padale, le zadnja je ponovno višja, predvidevamo da zaradi čiščenja membrane pred zadnjim ultrafiltriranjem. Časi posameznih ciklov se niso podaljševali, iz česar lahko sklepamo, se tekom ponavljanja ciklov pore membrane niso zamašile in je bil prehod molekul vseeno omogočen, čeprav najverjetneje nekoliko otežen. Absorbance odpadov 2, 3, 4 in 5 nakazujejo, da je, kljub večkratni uporabi membrane, bilo izločanje proteinov enakomerno, čeprav nižje kot po 1. ciklu (preglednica XIV).

Preglednica XIV: Čas posameznih ciklov, absorbance odpadov in koncentracije celokupnih proteinov v odpadih po posameznem ultrafiltracijskem ciklu

Ultrafiltracija	1	2	3	4	5	6*
t [min]	90	90	87	87	85	77
A _{280nm} odpad (~6ml)	1,106	0,367	0,326	0,326	0,293	0,726
C _{celokupna} [g/L]**	1,96	0,50	0,73	1,03	0,65	0,44

*pred zadnjo ponovitvijo smo membrano očistili po navodilih proizvajalca [27]

** celokupno koncentracijo proteinov smo določili z Bradfordovo metodo (beri dalje)

Po ultrafiltraciji smo z Bradfordovo metodo določili skupno koncentracijo proteinov v vzorcu pred ultrafiltracijo (označenega kot pred UF "35%" + "50%") in po (označenega kot po UF "35%" + "50%") njej ter v posameznih odpadnih frakcijah po vsakem

ultrafiltracijskem ciklu. Ključni rezultati so predstavljeni v preglednici XV. Koncentracija združene frakcije po ultrafiltraciji je nižja za približno 16 g/L (iz 48 g/L na 32 g/L), koncentracije posameznih odpadov (ultrafiltratov) pa so bistveno nižje od frakcij »pred UF« in »po UF«.

Primerjava razmerij absorbanc med odpadki in razmerij koncentracij odpadov določenih z Bradfordovo metodo daje navskrižne rezultate (preglednica XIV). Primerjavo smo izvedli na predpostavki, da so razmerja med absorbancami odpadov določena direktno spektrofotometrično sorazmerna razmerjem med koncentracijami proteinov v odpadkih. Ugotovili smo, da je do razlik med razmerji koncentracij proteinov v odpadkih določenih z Bradfordovo metodo in absorbancami določenimi direktno spektrofotometrično prišlo, ker metodi temeljita na različnih principih. Pri Bradfordovi metodi merimo absorbanco kompleksa anionske oblike CBB (modra barva, $\lambda = 595$ nm) in aminokislin. CBB se v največji meri veže z Arg, v manjši se veže še na Trp, Tyr, His in PheAla. Prosta oblika CBB je rdeče barve pri 470 nm. Pri direktnem spektrofotometričnem merjenju absorbance pri 280 nm pa merimo absorpcijo svetlobe Trp, Tyr in v majhni meri še PheAla.

Preglednica XV: Koncentracije IgM in celokupnih proteinov ter volumen združenih frakcij pred in po ultrafiltraciji

	V [ml]	C _{celokupna} [g/L]	C _{IgM} [g/L]
Pred UF ("35%"+"50%")	4,28	48	1,475
Po UF ("35%"+"50%")	~4,20	32	1,503*

* predpostavljamo, da IgM med ultrafiltracijo nismo izgubili in se količina IgM ni spremenila, zaradi zmanjšanja volumna pa se je nekoliko dvignila koncentracija

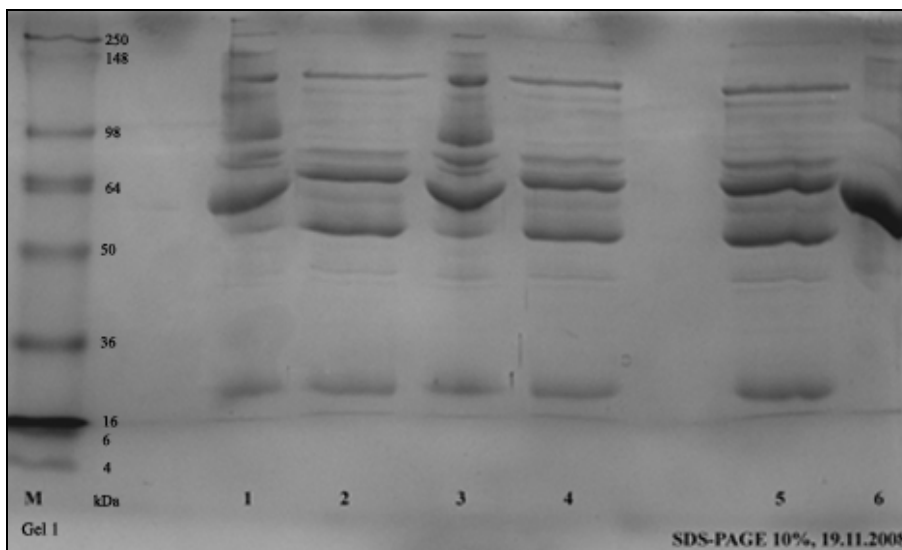
Po določitvi koncentracij smo izvedli elektroforezo vzorcev v nereducirani in reducirani obliki (preglednica XVI, slika 10 in 11).

Preglednica XVI: Nanos vzorcev na gel 1 in 2 po ultrafiltraciji

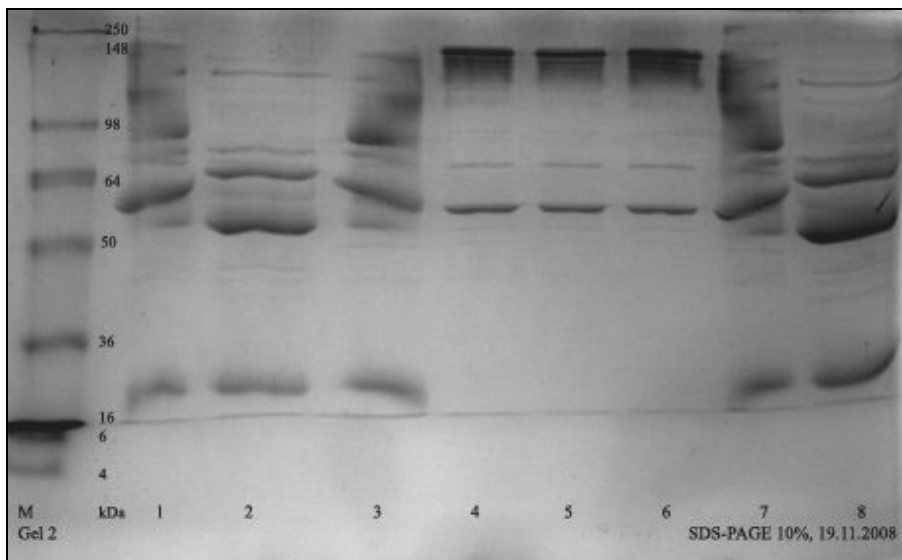
Gel 1	1	2	3	4	5	6		
Vzorec	predUF	predUF/red	poUF	poUF/red	poUF/red ↑C	HSA		
Gel 2	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	O1	O1/red.	O2	O3	O4	O5	O6	O6/red

Iz obeh gelov (slika 10 in 11) je prav tako razvidno, da so lise nereduciranih vzorcev neposredno ob reduciranih vzorcih poševne. Ta pojav smo opazili že pri prvi elektroforezi. Sklepamo smo, da pufer reduciranega vzorca vpliva na nereduciranega neposredno ob njem. Pri nadaljnjih elektroforezah smo zato razporediti vzorce po žepkih tako, da so bili skupaj vsi nereducirani in vsi reducirani, med njimi pa je moral biti en žepki prazen.

Iz slike 11 elektroforeze odpadov (gel 2) linija 1 in 2 je razvidno, da so proteini po velikosti zastopani enakomerno in podobno kot pri vzorcih pred UF in po UF. Pri odpadih 3, 4, 5 so lise praktično enake. V teh frakcijah so se najverjetneje izločili IgG, IgA in tudi del HSA. Pri teh frakcijah ni prisotna lisa pod 36 kDa, ki je prisotna v odpadu 1 in 2. Po 5 ciklih ultrafiltraciji smo membrano očistili in izvedli še eno ultrafiltracijo. Pri odpadu 6 se ponovno pojavi lisa pod 36 kDa.



Slika 10: Elektroforezni gel vzorcev po ultrafiltraciji (NERED. in RED.)



Slika 11: Elektroforezni gel vzorcev po ultrafiltraciji (NERED. in RED.)

Predpostavili smo, da bodo proteini manjši od velikosti por membrane (300 kDa) prehajali skozi membrano in bodo v frakciji po UF ("35%" + "50%") ostali le proteini večji od 300 kDa. Iz primerjave vzorcev pred UF ("35%" + "50%") in po UF ("35%" + "50%") pa je razvidno, da smo se znebili vseh proteinov manjših od 300 kDa v približno enakem razmerju, skupno pa smo odstranili približno 1/3 proteinov. Sprva je bil naš namen z ultrafiltracijo v celoti odstraniti proteine manjše od 300 kDa in pridobiti že relativno čisto frakcijo IgM proteinov, vendar zelenega efekta nismo dosegli. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili za gelsko filtracijo kot naslednji korak. Gelsko filtracijo so kot eno izmed metod pri čiščenju IgM uporabili tudi drugi raziskovalci [13,30,34,35].

5.2.1.4. Korak 4 – GELSKA FILTRACIJA

Gelsko filtracijo smo najprej izvedli na kolono dimenzij 10/20. Po pakiranju kolone je potrebno izvesti kalibracijo kolone, in sicer z raztopino Blue Dextrana 2000 in mešanico kalibracijskih proteinov. Volumen uporabljenega vzorca po UF ("35%" + "50%") je bil 4,2 ml, od tega smo 300 μ l uporabili za kolono 10/20, preostanek pa smo uporabili za gelsko filtracijo skozi kolono XK 16/100.

5.2.1.4.1. Kolona 10/20

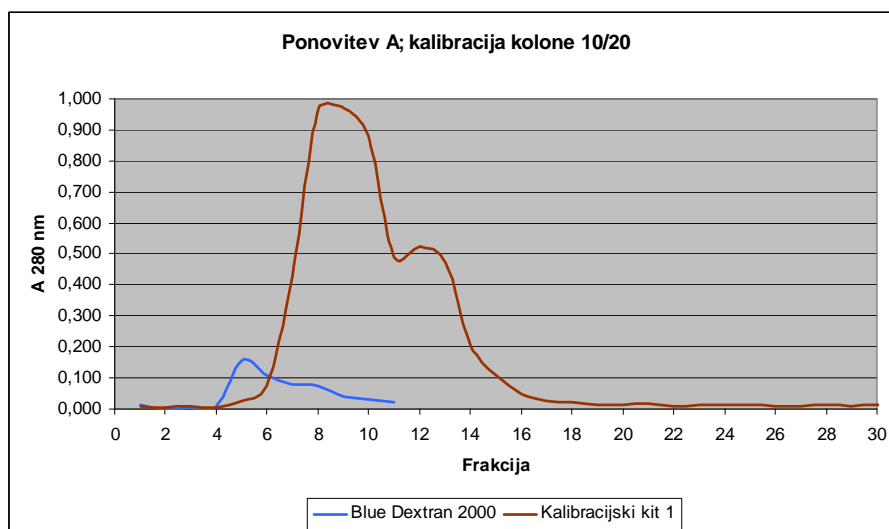
- Kalibracija kolone

Prosti volumen kolone smo določili z gelsko filtracijo Blue Dextrana 2000, ki je pripotoval skozi kolono zelo hitro – v frakciji 5 je bila absorbanca najvišja. Vrh ni simetričen in pojavil se je tudi izrazit rep. V tem primeru to ni imelo velikega pomena, saj je bila prisotna le ena spojina. Ugotovili smo, da je prosti volumen kolone (V_0) približno 5 ml

(graf 1, Blue Dextran 2000). Zmožnost ločevanja proteinov smo določili z gelsko filtracijo raztopine kalibracijskih proteinov 1 (graf 1, kalibracijski kit 1). V raztopini proteinov nanešenih na kolono so bili 4 proteini s sorazmerno zelo različnimi velikostmi, razlika med posameznimi proteini v MM je bila najmanj 2-kratna. Predpostavili smo, da se bodo proteini zaradi teh razlik med potovanjem skozi gel ločili in bomo dobili najmanj 3 oziroma 4 vrhove; 3 zato, ker smo na podlagi grafov v navodilih proizvajalca pričakovali, da bosta vrhova aldolaze in govejega serumskega albumina zelo skupaj in bi se lahko zaradi pojava repa prekrivala.

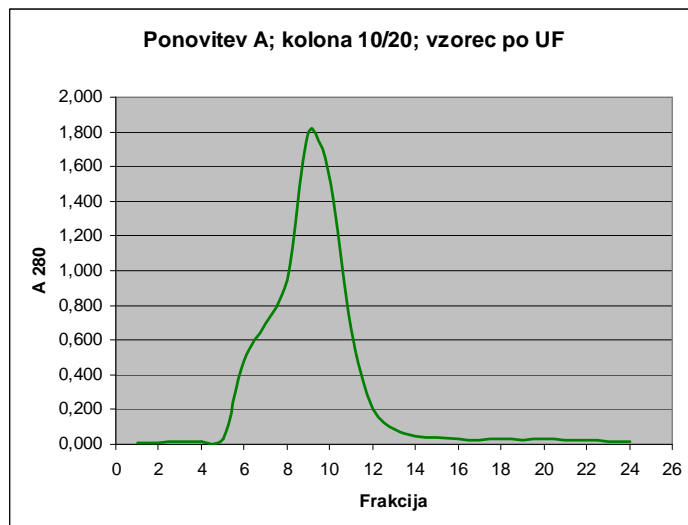
Rezultati so bili v nasprotju s pričakovanji saj je očitno le en visok vrh pri frakciji št. 9 in še en nižji pri frakciji št. 12. Vrhova se zelo prekrivata. Razvidno je, da se proteini pri potovanju skozi kolono niso ločili. Sklepamo, da je po eni strani bila pot potovanja proteinov prekratka po drugi pa nastavljen pretok previsok, tako da manjši proteini že zaradi hitrosti pretoka niso uspeli zaiti v pore gela. Kljub neuspešno izvedeni kalibraciji kolone smo se odločili izvesti še gelsko filtracijo vzorca po UF.

Graf 1: Kalibracija kolone 10/20 pri ponovitvi A



- **Ločitev proteinov vzorca**

Kot že pri raztopini kalibracijskih proteinov 1, se tudi pri vzorcu pojavil le en izrazit vrh. Viden je en izrazit vrh pri frakcijah 10, 11. Pred vrhom je vidna nekoliko izrazitejša fronta (graf 2). Sklepamo, da je fronta pripadala proteinom z večjo MM (IgM in α_2 -makroglobulinu).

Graf 2: Ločitev proteinov vzorca po UF (35 + 50) pri ponovitvi A

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da v nobenem primeru gelske filtracije s kolono 10/20 ločitev proteinov ni uspela. Možna razloga sta relativno previsok pretok glede na velikost kolone in / ali prekratka kolona. Najverjetnejši je predvsem previsok pretok, saj gel, s katerim smo pripravili kolono, omogoča ločevanje molekul v razponu od 10 do 1500 kDa. Po drugi strani pa se pri ločevanju proteinov s tako malo kolono pojavlja problem zaradi majhnega volumna vzorca nanešenega na kolono (1 do 2 % volumna celokupne volumna kolone). Četudi bi nam uspelo ločili IgM od ostalih proteinov ob nižjem pretoku, bi za študije elektro-oksidacije morali izvesti gelsko filtracijo v veliko ponovitvah, da bi zbrali zadovoljivo količino IgM. Zato smo se odločili, da bomo v nadaljevanju uporabili za ločitev proteinov večjo kolono. S tem bomo podaljšali potovanje proteinov, kar lahko posledično vpliva na boljšo ločitev proteinov po MM. Po drugi strani pa bo volumen nanešenega vzorca bistveno večji, s čimer se bomo izognili veliko ponovitvam, ki nižajo izkoristek izolacije.

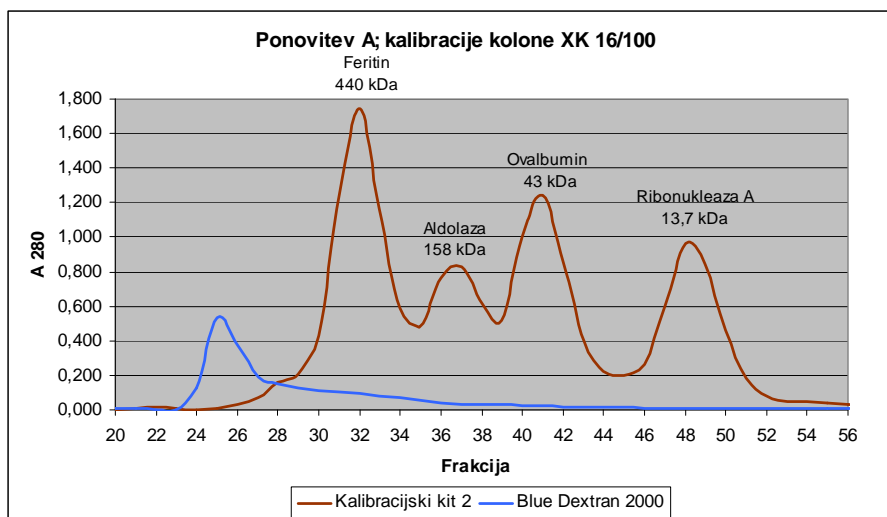
5.2.1.4.2. Kolona XK 16/100

Pred gelsko filtracijo smo vzorec prefiltrirali skozi membranski filter s porami 0,45 μ l, pri čemer je prišlo do izgube vzorca (0,5 ml), tako da smo pred gelsko filtracijo imeli približno 3,4 ml izhodnega materiala. Namen filtriranja čez membranski filter je bil odstranitev morebitnih večjih delcev, ki bi lahko vplivali na potovanje proteinov skozi kolono.

- **Kalibracija kolone**

Najvišjo absorbanco Blue Dextrana 2000 smo imeli pri frakciji 25 (graf 3, Blue Dextran 2000). Na podlagi tega smo določili prosti volumen (V_0) kolone, ki je približno 75 ml. Vrh je bil zelo oster in visok, prisoten pa je bil tudi rep. Pojav repa nima bistvenega pomena, saj je iz elucijskega profila kalibracijskih proteinov 2 razvidno, da do pojava repa ni prišlo.

Graf 3: Kalibracija kolone XK 16/100 pri ponovitvi A



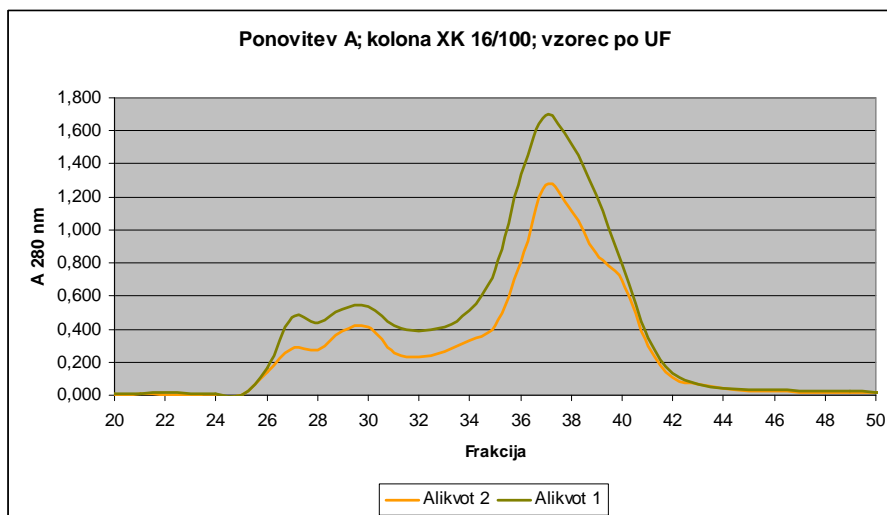
S kolono XK 16/100 smo dosegli ločitev proteinov mešanice kalibracijskih proteinov 2 (graf 3, kalibracijski kit 2), saj so vidni 4 vrhovi, ki ustrezajo feritinu, aldolazi, ovalbuminu in ribonuklezi A. Vrhovi so visoki simetrični, ki pa med sabo niso dobro ločeni, le zadnja dva vrhova sta nekoliko boljše ločena. V primerjavi s kolono 10/20, smo pri tej kolono uspešno ločili mešanico kalibracijskih proteinov, vendar so se vrhovi še vedno prekrivali. Sklepali smo, da sta razloga za prekrivanje vrhov lahko visoka koncentracija posameznih proteinov v mešanici in / ali previsok pretok skozi kolono. Zaradi tega smo se odločili, da izvedemo naslednjo gelsko filtracijo pri nižjem pretoku (20 ml/h), s čimer smo želeli doseči boljšo ločitev proteinov vzorca.

- **Ločitev proteinov vzorca**

Gelsko filtracijo vzorca po UF ("35%" + "50%") ponovitve A smo izvedli v dveh alikvotih ($V_{\text{aliquot 1}} = 2,00$ ml, $V_{\text{aliquot 2}} = 1,38$ ml) in pri dveh različnih pretokih. Pri alikvotu 1 je bil pretok 20 ml/h, pri alikvotu 2 pa 10 ml/h. Pretok alikvota 2 je nižji, ker smo po gelski filtraciji alikvota 1 menili, da se proteini niso med samo zadovoljivo ločili. Primerjava elucijski profilov obeh alikvotov pa kaže, da pretok v tem primeru ni vplival na ločljivost. Kljub temu smo se odločili, da ponovitev B v celoti izvedemo pri nižjem pretoku (10

ml/h). Enak pretok skozi enako kolono za čiščene IgM protiteles navajajo tudi drugi avtorji [35]. Rezultati obeh gelskih filtracij so prikazani na grafu 4. V obeh primerih elucijskih profilov so vidni 3 vrhovi. Profila sta zelo podobna in primerljiva, razlika je le v tem, da je pri alikvotu 2 graf nižji, kar pa je posledica manjšega volumna nanešenega na kolono.

Graf 4: Ločitev proteinov obeh alikvotov* vzorca po UF (35 + 50) pri ponovitvi A



* Elucijski profil alikvota 1 smo predstavili za dve frakciji v desno, s čimer smo dosegli pokrivanje vrhov Izbranim frakcijah po gelski filtraciji alikvota 1 smo določili koncentracijo proteinov z Bradfordovo metodo. Razmerja med koncentracijami proteinov v frakcijah so bile v grobem skladne z razmerji med absorbancami le-teh frakcij, določenih direktno spektrofotometrično takoj po gelski filtraciji (preglednica XVII).

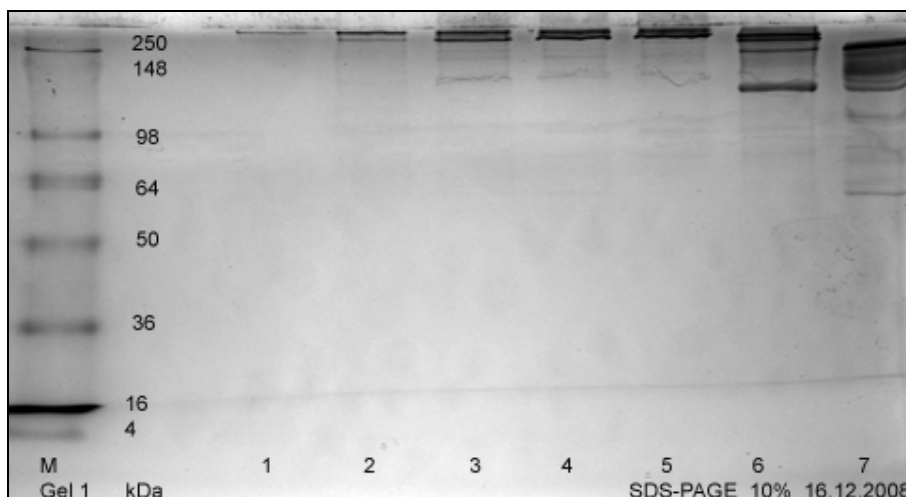
Preglednica XVII: Absorbance in koncentracije frakcij po GF alikvota 1

Frakcija	24	25	26	27	28	30	35
A _{280nm}	0,163	0,472	0,435	0,521	0,539	0,385	1,690
C _{celokupna} [g/L]	0,31	0,54	0,41	0,82	1,01	0,50	2,20

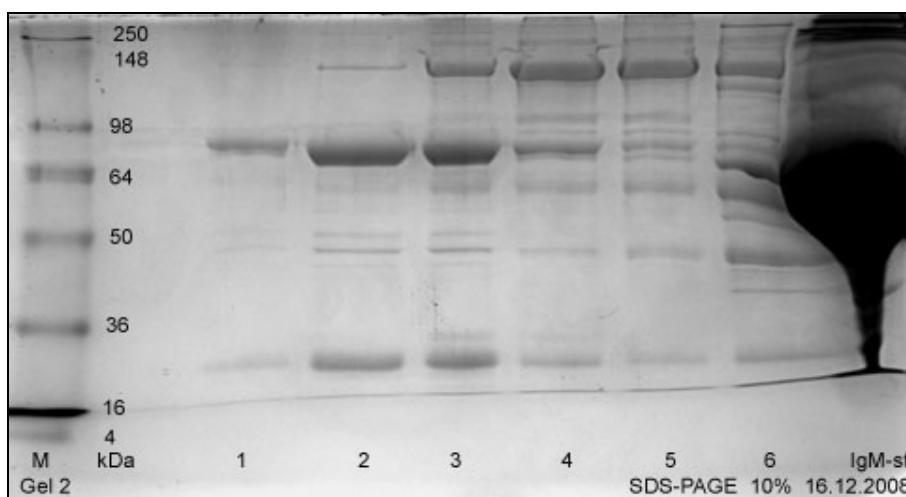
Po določitvi koncentracij smo izvedli elektroforezo izbranih frakcij gelske filtracije alikvota 1. Izbrali smo začetne frakcije posameznih vrhov in ob tem še frakcijo, ki je imela po spektrofotometrični meritvi najvišjo absorbanco. Razporeditev pripravljenih vzorcev na obeh gelih je prikazana v preglednici XVIII, rezultati elektroforeze pa na slikah 12 in 13. Na gel 2 smo nanegli tudi IgM standard (slika 13).

Preglednica XVIII: Nanos frakcij alikvota 1 na gel 1 in 2

Gel 1	1	2	3	4	5	6	7
Frakcija	24	25	26	27	28	30	35
Gel 2 (red.)	1	2	3	4	5	6	7
Frakcija	24	25	26	27	28	30	IgM-st.



Slika 12: Elektroforezni gel vzorcev po gelski filtraciji alikvota 1 (NERED.)



Slika 13: Elektroforezni gel vzorcev po gelski filtraciji alikvota 1 (RED.)

Na gelu 1 (slika 12) je razvidno, da so skoraj vsi nanešeni vzorci zaostali na vrhu ločitvenega gela, le pri frakcijah 30 in 35 so lise vidne tudi malo pod 150 kDa. Pri frakciji 24 je vidna ena šibkejša lisa na vrhu ločitvenega gela. Pri frakcijah 25 – 28 so lise zelo podobne. Vidnih je več lis. Dve slabo ločeni ostri lisi na vrhu ločitvenega gela (proteini so bili tako veliki, da niso potovali po ločitvenem gelu) in ena slabše vidna lisa pod 148 kDa. Lise pri frakcijah 30 in 35 so zelo visoko (148 kDa) in so razvlečene, pripadajo pa

relativno čisti heterogeni IgG frakciji. Hkrati je pri frakciji 35 je vidna še šibkejša lisa nad 64 kDa, ki sklepamo, da pripada HSA.

Na gelu 2 (slika 13) je razvidno, da je redukcija vzorcev uspešno potekla, saj je vidnih več lis, ki pripadajo posameznim podenotam proteinov po razpadu disulfidnih vezi. Ker smo nanegli preveliko količino IgM-standarda, je le-ta motil potovanje vzorca 6 (frakcija 30). Pri frakcijah 24 – 27 so lepo vidne lise pri nad 64 kDa, ki so najintenzivnejše v frakcijah 25 ter 26. Te lise pripadajo težkim verigam IgM proteinov. Prav tako so pri teh vzorcih prisotne lise okoli 25 kDa, ki pripadajo lahkim verigam IgM in J verigi. Prisotne so tudi lise okoli 50 kDa, ki so bistveno šibkejše od lis nad 64 kDa in pripadajo težkim verigam IgG protiteles. Intenziteta lis nad 64 kDa postane šibkejša pri frakciji 27, hkrati pa se je povečala intenziteta lise pri 148 kDa. Iz tega sledi, da se je v frakcijah 26 in vključno z njo izpral IgM v relativno čisti obliki. V frakcijah 26 – 30 so vidne lise pod 148 kDa. Pri nereduciranem vzorcu se pri istih frakcijah sicer vidijo lise pod 148 kDa, vendar so dosti manj intenzivne kot po redukciji. Lise pripadajo podenotam α_2 -makroglobulina, ki je v krvi prisoten v nekoliko višji koncentraciji kot imunoglobulini razreda M (preglednica I).

Na podlagi elucijskih profilov obeh alikvotov (graf 4) in elektroforeznih slik (slika 12, 13) smo ugotovili, da prvi (najnižji) vrh pripada IgM proteinom, naslednji (nekoliko višji) α_2 -makroglobulinu, zadnji pa IgG proteinom. Hkrati smo prišli do sklepa, da s to metodo IgM od ostalih proteinov lahko ločimo le do določene mere. Predvsem predstavlja problem α_2 -makroglobulin, ki potuje skozi kolono skoraj tako hitro kot IgM. Seveda so prisotni še drugi proteini, ki so bili zastopani v serumu, vendar jih zaradi nizkih koncentracij in nepomembnosti za našo izolacijo niti ne omenjamo. Npr. IgA je lahko prav tako prisoten v frakcijah z IgG, saj sta MM zelo podobni, vendar smo zaradi preglednosti obravnavali le IgG proteine.

5.2.1.5. Korak 5 – KONCENTRIRANJE VZORCEV

Po gelski filtraciji obeh alikvotov smo paralelno združili frakcije prvih dveh vrhov z enako sestavo (frakcije, ki so na grafu 4 imele na enake položaj). Združene frakcije smo poskušali skoncentrirati do volumna podobnega volumnu uporabljenega vzorca za gelsko filtracijo (~3,4 ml). Vzorci so se nekoliko različno koncentrirali, verjetno zaradi vsebnosti proteinov različnih molekulskih mas v posameznih frakcijah (preglednica XIX). Po koncentriranju smo v koncentriranih epruветah vzorcev, ki so vsebovali IgM, zasledili oborino, ki smo jo ob rahlem mešanju resuspendirali. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da naslednje

koncentriranje izvedemo pri milejših pogojih, pri frakcijah, ki vsebujejo IgM pa na mesto centrifugalne sile uporabimo koncentriranje z nadtlakom.

Po koncentriranju smo izbranim vzorcem (skoncentrirane frakcije po gelski filtraciji ponovitve A in frakciji alikvota 1 z najvišjo absorbanco) preverili vsebnost IgM in IgG proteinov z nefelometrično metodo (preglednica XIX).

Preglednica XIX: Volumni po koncentriranju izbranih frakcij ter koncentracije IgM in IgG

Vzorec	V _{po konc} [ml]	C _{IgM} [g/L]	C _{IgG} [g/L]
Alikvot 1 (24,25) + alikvot 2 (26,27)	5,20	0,229	<0,073
Alikvot 1 (26) + alikvot 2 (28)	3,36	0,227	<0,073
Alikvot 1 (27) + alikvot 2 (29)	3,46	<0,176	<0,073
Alikvot 1 (28) + alikvot 2 (30)	3,07	<0,176	<0,073
Alikvot 1 (29) + alikvot 2 (31)	3,51	<0,176	<0,073
Alikvot 1 (30) + alikvot 2 (32)	3,16	<0,176	<0,073
Alikvot 1 (31) + alikvot 2 (33)	3,20	<0,176	<0,073
Alikvot 1 (35)	3,20	<0,176	1,01

Nefelometrične meritve so potrdile, da se je IgM izpral s kolone v začelih frakcijah (aliquot 1, frakcije 24, 25, 26; alikvot 2, frakcije 26, 27, 28), ko se je absorbanca dvignila, in da prvi vrh odgovarja IgM proteinom. V naslednjih frakcijah pa koncentracija IgM pade pod mejo detekcije proteinov. Z nefelometrično določitvijo IgG smo tudi dokazali, da izolirani IgM ne vsebujejo IgG proteinov. IgG proteinom pripada tretji vrh in že ena sama frakcija z najvišjo absorbanco alikvota 1 ima koncentracijo IgG 1,01 g/L, kar pomeni, da je sledečim načinom izolacije kot stranski produkt moč izolirati tudi IgG proteine. Vendar pa je potrebno omeniti, da potrebno preveriti čistost izoliranega IgG, saj so IgA proteini prav tako enakem velikostnem razredu kot IgG in bi se lahko izprali s kolone skupaj z IgG protitelesi.

5.2.2. Ponovitev B

Z izbrano kombinacijo nespecifičnih metod smo pri ponovitvi A uspešno izolirali protitelesa razreda M. Ena izmed zastavljenih nalog diplomskega dela je bila tudi optimizacija izolacije, zato smo poskušali posamezne korake pri ponovitvi B spremeniti v takšni meri, da bi hkrati pridobili IgM v čim večji količini in čim krajšem času.

Pri obarjanju smo izhajali iz 3,78 ml predhodno prefiltriranega zbirka serumov zdravih oseb. Nefelometrično določena koncentracija IgM proteinov v serumu je bila 1,9 g/L.

Izhodni pool serumov zdravih oseb smo predhodno prefiltrirali skozi filter membrano Minisart® z velikostjo por 0,45 µm.

5.2.2.1. Korak 1 – OBARJANJE Z AMONIJEVIM SULFATOM

Korak 1 pri ponovitvi B se je razlikoval od ponovitve A v tej meri, da smo obarjanje izvedli le pri 50% nasičenosti z amonijevim sulfatom in ne sprva pri 35%, nato pa pri 50% nasičenosti. Za tak postopek smo se odločili, ker sta koncentraciji IgM v frakcijah "35%" in "50%" pri ponovitvi A bili v enakem velikostnem razredu. Iz tega sledi, da smo približno polovico IgM iz izhodnega materiala oborili pri 35% nasičenosti, drugo polovico pa pri 50% nasičenosti. Sklepali smo, da bomo z obarjanjem le pri 50% nasičenosti (označeno kot frakcija "50%") zajeli celotno količino IgM proteinov le v eni stopnji. Frakcijo s proteini, ki se niso oborili do 50% nasičenosti smo označili kot frakcijo ">50%".

5.2.2.2. Korak 2 – ULTRAFILTRACIJA

Tokrat smo pri ponovitvi B izpustili korak dialize, s katero smo pri ponovitvi A v večji meri odstranili amonijev sulfat in izvedli takoj po obarjanju ultrafiltracijo frakcije proteinov oborjene do 50% nasičenosti z amonijevim sulfatom (frakcija "50%"). Ultrafiltracije frakcije ">50%" nismo izvedli, saj smo na podlagi rezultatov ponovitve A predpostavili, da ne vsebuje IgM proteinov. Frakcija nam je služila le kot kontrolni material. Predpostavili smo, da se bomo s to metodo hkrati uspešno znebili amonijevega sulfata in tudi odstranili določen delež proteinov manjših od navidezne MM 300 kDa.

Tokratne absorbance odpadov (razen odpada po 6 ultrafiltraciji) so bistveno višje od absorbanc odpadov pri ultrafiltraciji ponovitve A (preglednici XIV in XX). Razlog za tako visoke absorbance je lahko po eni strani velika količina odstranjenih proteinov, po drugi pa vpliv amonijevega sulfata na prepustnost svetlobe čez kiveto. Preverili smo tudi absorbance nasičene (3,93 M, pri 4°C) raztopine amonijevega sulfata, ki je bila proti fosfatnemu pufri, enaka 0. Iz tega sledi, da amonijev sulfat lahko na absorpcijo svetlobe vpliva le posredno, preko interakcij s proteini. Čas ultrafiltracij je bil v primerjavi z ultrafiltracijami ponovitve A bistveno daljši. Med posameznimi cikli pa se ni podaljševal, iz česar sklepamo, da se tudi pri ponovitvi B niso pore zamašile mere, da bi bil prehod molekul onemogočen oziroma bistveno počasnejši.

Preglednica XX: Čas posameznih ciklov, absorbance odpadov in koncentracije celokupnih proteinov v odpadih po posameznem ultrafiltracijskem ciklu

Ultrafiltracija	1	2	3	4	5	6*
-----------------	---	---	---	---	---	----

t [min]	145	110	108	110	107	115
A_{280nm} odpad (~6ml)	1,197	0,856	0,680	0,700	1,075	0,146
C_{celokupna} [g/L]**	1,47	0,36	0,70	0,30	0,01	0,03

*pred zadnjo ponovitvijo smo membrano očistili po navodilih proizvajalca [27]

** celokupno koncentracijo proteinov smo določili z Bradfordovo metodo (beri dalje)

Po ultrafiltraciji smo z Bradfordovo metodo določili koncentracije proteinov v odpadih. Rezultati so prikazani v preglednici XX. Do dobljenih koncentracij odpadov po 6 ciklih ultrafiltracije smo kritični, ker so vsebovali povečano količino amonijevega sulfata, čeprav se je s vsakim ciklom zniževala. Teoretično je bila sicer koncentracije amonijevega sulfata že v prvem odpadu 0,786 M. V navodilih za določanje proteinov po Bradfordovi metodi pa navajajo [19], da lahko amonijev sulfat vpliva na določitev koncentracije proteinov, če je molarnost višja od 1 M, kar po teoretičnem izračunu v nobenem od odpadov ni bila. Razmerja določenih koncentracij frakcij odpadov po ultrafiltraciji se ne skladajo z razmerji med absorbancami le-teh frakcij, določenih direktno spektrofotometrično, takoj po ultrafiltraciji. Možen vzrok je lahko vsebnost amonijevega sulfata, ki je motila direktno spektrofotometrično meritev ali / in Bradfordovo metodo, čeprav smo enako neskladje zasledili tudi pri ultrafiltraciji ponovitve A.

Prisotnost amonijevega sulfata smo, kot že pri ponovitvi A po dializi, preverili z barijevim kloridom. Intenziteto motnosti smo izmerili odpadom po posamezni ultrafiltraciji proti intenziteti motnosti fosfatnega pufra po dodatku barijevega klorida. Motnost v vseh odpadih je bila višja od motnosti fosfatnega pufra. Potrebno je omeniti, da intenzitete odpadov ne moremo direktno primerjati z intenziteto motnosti fosfatnega pufra, saj je potrebno upoštevati prisotnost proteinov v odpadih in dejstvo, da barijevi ioni spadajo med katione, ki ireverzibilno obarjajo proteine. Teoretično smo se sicer znebili amonijevega sulfata v veliki meri, vendar pa tega z gotovostjo ne moremo trditi (preglednica XXI). Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da kot naslednji korak vseeno izvedemo dializo.

Preglednica XXI: Teoretičen izračun koncentracij amonijevega sulfata v odpadih po vsakem ciklu ultrafiltracije

3,93 M (100% nasičenost) → 1,965 M (50% nasičenost – smo jo dosegli z zmešanjem izhodnega poola serumov z amonijevim sulfatom v razmerju 1:1)						
Ultrafiltracija	1	2	3	4	5	6
C_{AS vzorec (skoncentriran) (4 ml) (M)}	1,965	0,786	0,314	0,126	0,050	0,020

$C_{AS \text{ razred. vzorec (10 ml) (M)}$	0,786	0,314	0,126	0,050	0,020	0,008
$C_{AS \text{ odpad (6 ml) (M)}$	0,786	0,314	0,126	0,050	0,020	0,008

Opomba: $1,965 \text{ M} \times 4 \text{ ml} = X_1 \times 10 \text{ ml} \rightarrow X_1 = 0,786 \text{ M}$

$0,786 \text{ M} \times 4 \text{ ml} = X_2 \times 10 \text{ ml} \rightarrow X_2 = 0,3144 \text{ M}$

...

5.2.2.3. Korak 3 – DIALIZA

Na podlagi rezultatov po ultrafiltraciji smo se odločili, da korak dialize vseeno izvedemo. Dializirali smo frakcijo "50%" po 6 ciklih ultrafiltracije in frakcijo "<50%" po obarjanju z amonijevim sulfatom. Po 4-kratni dializi je bilo iz primerjave intenzivnosti odpadnega dializnega pufru obeh frakcij ("50%" in ">50%") in fosfatnega pufru razvidno, da smo se pri obeh frakcijah uspešno znebili amonijevega sulfata oziroma je koncentracija amonijevega sulfata pri obeh vzorcih padla na raven koncentracije prisotne v fosfatnem pufru. V obeh vzorcih je po dializi prišlo do povečanja volumna. Vzorcju ">50%" se je volumen zelo povečal, zato smo ga skoncentrirali, s čimer smo prišli v približno volumsko območje izhodnega poola serumov uporabljenega za izolacijo IgM pri postopku B. Po dializi smo od obeh vzorcev odpipetirali 300 μl za nefelometrično določitev IgM, tako da smo pri nadaljnjih analizah izhajali iz volumnov manjših za 300 μl (4,2 ml in 4,24 ml). Rezultati po obarjanju, ultrafiltraciji in dializi so zbrani v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Koncentracije IgM in IgG in maso IgM v frakcijah po obarjanju z amonijevim sulfatom in dializi in volumni obeh frakcij

	"50%"	">50%"
$V_{po \text{ AS}} \text{ [ml]}$	Usedlina + 4 ml PBS	~ 6,1
	↓	↓
$V_{po \text{ UF}} \text{ [ml]}$	~ 3,90	↓
	↓	↓
$V_{po \text{ DIALIZI (↑V)}} \text{ [ml]}$	4,50	4,54*
$C_{IgM \text{ po DIALIZI}} \text{ [g/L]}$	1,51	<0,176
$C_{IgG \text{ po DIALIZI}} \text{ [g/L]}$	6,74	0,097

* takoj po dializiranju smo vzorec skoncentrirali s koncentrirno epruveto Amicon Ultra – 4 ml, Ultracel – 30k iz 11,45 ml na 4,54 ml, da smo prišli v volumsko območje izhodnega poola serumov (3,78 ml)

Po dializi in koncentriranju frakcije ">50%" smo določili koncentracije proteinov v posameznih frakcijah in tudi odpadih po ultrafiltraciji frakcije "50%". Koncentracije proteinov v odpadih so prikazane v preglednici XX s pripadajočo razpravo (glej korak 2,

ponovitev B). Povprečni koncentraciji proteinov v frakcijah "50%" po DIALIZI in ">50%" DIALIZI sta bili 28 g/L in 59 g/L.

Koncentracija proteinov v frakciji po ultrafiltraciji pri postopku A (frakcija "35%" + "50%") ter frakciji po ultrafiltraciji in sledeči dializi pri postopku B (frakcija "50%") se bistveno ne razlikujeta (preglednica XXIII). Koncentracije proteinov pred ultrafiltracijo postopka B nimamo, saj smo se na podlagi navodil za Bradfordovo metodo [19] odločili, da zaradi visoke vsebnosti amonijevega sulfata v frakciji "50%" takoj po obarjanju meritve ne izvedemo. Iz primerjave rezultatov obeh ponovitev smo ugotovili, da smo kljub spremembi zaporedja korakov ultrafiltracijo drugič izvedli ponovljivo in primerljivo.

Preglednica XXIII: Primerjava znižanja koncentracije celokupnih proteinov po ultrafiltraciji

	Postopek A	Postopek B
Vzorec	"35% + 50%"	"50%"
C_{celokupna} pred UF [g/L]	48	/*
C_{celokupna} po UF [g/L]	32	28**

* meritve nismo izvedli

** koncentracija po ultrafiltraciji in sledeči dializi

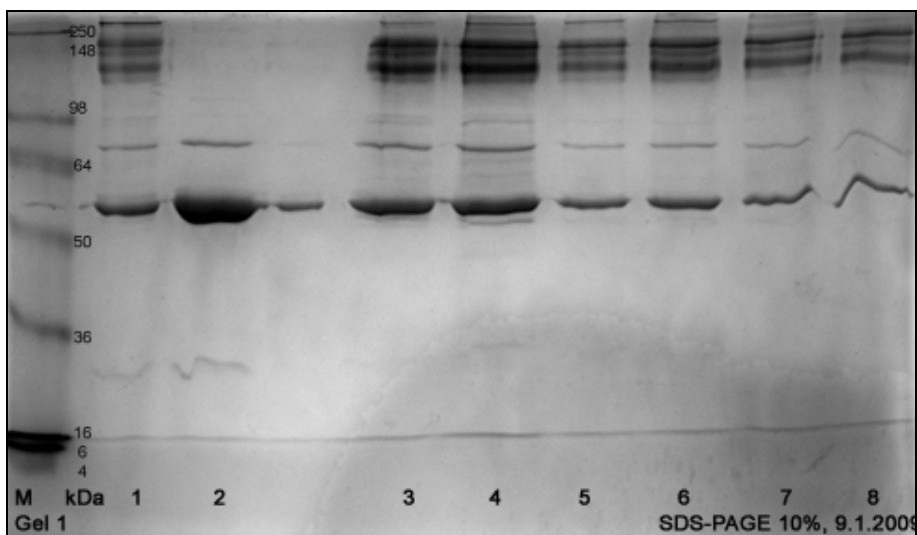
Izračunane koncentracije smo uporabili za preračun volumnov potrebnih za nanos izbranih vzorcev na elektroforezo. Pri nanosu pripravljenih vzorcev na elektroforezni gel smo zaradi višje vsebnosti amonijevega sulfata v odpadnih po ultrafiltraciji frakcije "50%", ki bi lahko vplivala na potovanje proteinov, med ostalima vzorcema in vzorci odpadov izpustili en žepček. Razporeditev vzorcev na gelih 1 in 2 je prikazana v preglednici XXIV, rezultati elektroforeze pa na slikah 15 in 16.

Preglednica XXIV: Razporeditev vzorcev na gelu 1 in 2 po dializi in / ali ultrafiltraciji

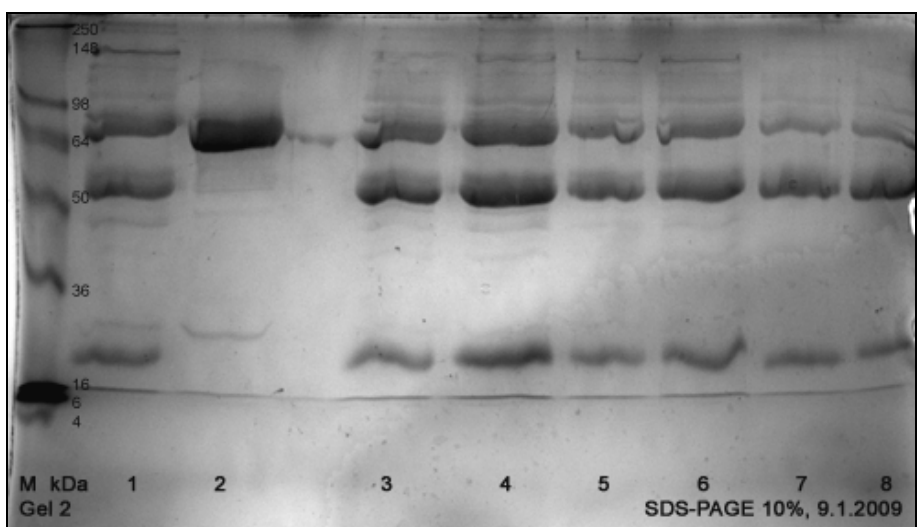
Gel 1	1	2	3	4	5	6	7	8
Gel 2 (red.)	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	50% po DIA	>50% po DIA	O1	O2	O3	O4	O5	O6

Iz primerjave linije 1 in 2 pod nereducirajočimi in reducirajočimi smo ugotovili, da smo pri 50% nasičenosti z amonijevim sulfatom oborili dejansko vse imunoglobuline (IgM, IgG, IgA) in da je v frakciji ">50%" po DIALIZI ostal večinoma le humani serumski albumin (HSA), z molekularsko maso 66 000. Lisa HSA je na gelu 2 potovala nekoliko dlje oziroma nižje kot pri gelu 1. Možen vzrok je vpliv vzorčnega pufra, ki v prvem primeru ne vsebuje

2-merkaptotetanolu, v drugem pa. Drug vzrok je lahko, da sta bila ločitvena gela različno visoka in je bilo potovanje proteinov posledično različno oziroma v tem primeru relativno hitreje pri gelu 2. Iz obeh gelov (slika 15 in 16) je razvidno, da je HSA prisoten tudi pri vzorcu "50%", vendar v bistveno manjši koncentraciji kot pri frakciji ">50%".



Slika 15: Elektroforezni gel vzorec po dializi in / ali ultrafiltraciji (NERED.)



Slika 16: Elektroforezni gel vzorev po dializi in / ali ultrafiltraciji (RED.)

Lise odpadov 1 – 6 po ultrafiltraciji kažejo na to, da smo se po vsakem ciklu skozi membrano s porami 300 kDa znebili nekaj proteinov različnih MM, vendar manjših od 300 kDa navidezne MM. Iz primerjave nereducirajočih in reducirajočih vzorcev sklepamo, da gre za protitelesa razreda G. (lise 25 in 50 kDa vidne na gelu 2 pripadajo lahkim oziroma težkim verigam IgG ter IgA). Iz primerjave odpadov ter frakcije 50% po DIALIZI

(predhodno po 6 ciklih UF) lahko ugotovimo, da smo se z ultrafiltracijo znebili IgG proteinov, vendar ne v celoti.

Na podlagi rezultatov korakov 2 in 3 ponovitve B lahko trdimo, da smo izolacijo do tega koraka izvedli zelo primerljivo kot pri ponovitvi A. Pri ponovitvi A smo predpostavili, da je bila količina IgM pred in po ultrafiltraciji (preglednica XV, korak 3, ponovitev A) nespremenjena, torej da nismo med ultrafiltracijo izgubili IgM. Pri ponovitvi B smo nefelometrično določili koncentracijo IgM po ultrafiltraciji in sledeči dializi ($C_{\text{IgM}} = 1,51$ g/L), koncentracija pa je bila primerljiva s koncentracijo IgM le po dializi ponovitve A ($C_{\text{IgM}} = 1,48$ g/L) (preglednica XXII). Na podlagi teh rezultatov smo prišli do zaključka, da med ultrafiltracijo ponovitve A nismo izgubili veliko IgM proteinov. Ultrafiltracijo lahko uspešno uporabimo za odstranitev približno 1/3 balastnih proteinov, ki bi lahko otežili nadaljnje korake izolacije, hkrati pa ne izgubimo veliko IgM.

5.2.2.4. Korak 4 – GELSKA FILTRACIJA

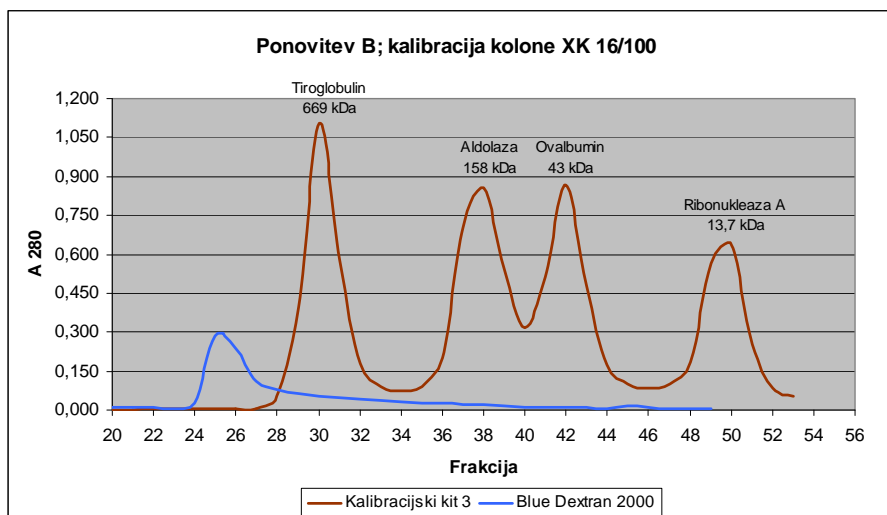
5.2.2.4.1. Kolona XK 16/100

Pred gelsko filtracijo ponovitve B smo kolono ponovno zapakirali, zato je bilo potrebno ponovno izvesti kalibracijo kolone. Pretoki v vseh primerih gelskih filtracij, tako kalibracije kot tudi ločitve proteinov v vzorcih so bili 10 ml/h.

- **Kalibracija kolone**

Elucijski profil Blue Dextrana 2000 je v primerjavi z elucijskim profilom na isti koloni pri ponovitvi A zelo podoben. Najvišjo absorbanco smo prav tako dobili v frakciji 25, prosti volumen kolone (V_0) pa je bil približno 70 ml, kar je nekoliko manj kot pri ponovitvi A, vendar je potrebno opozoriti, da smo zmanjšali pretok iz 30 ml/h na 10 ml/h (preglednica IV). Tudi pri gelski filtraciji ponovitve B smo dosegli uspešno ločitev mešanice kalibracijskih proteinov (graf 5, kalibracijski kit 3), saj so vidni 4 visoki in simetrični ter relativno dobro ločeni vrhovi. Prav tako lahko iz primerjave elucijskih profilov mešanice kalibracijskih proteinov pri ponovitvah A in B ugotovimo, da so se proteini kalibracijske raztopine 3 ločili zelo primerljivo kot proteini kalibracijske raztopine 2. Edina razlika je, da smo pri kalibracijskem kit 3 uporabili na mesto feritina (440 000) tiroglobulin (669 000), zato je prvi vrh boljše ločen od drugega, ki pripada v obeh primerih aldolazi (158 000).

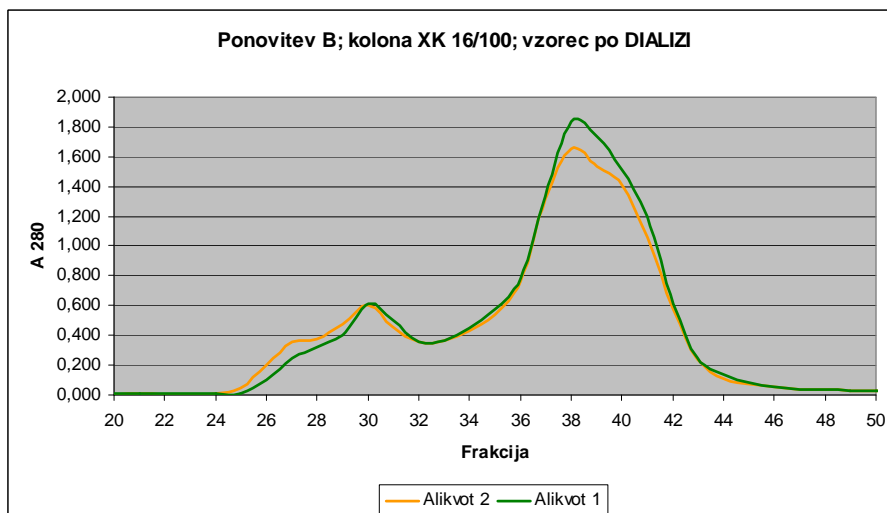
Graf 5: Kalibracija kolone XK 16/100 pri ponovitvi B



- **Ločitev proteinov vzorca**

Rezultati obeh gelskih filtracij so prikazani na grafu 6. V obeh primerih elucijskih profilov sta vidna 2 vrhova. Profila sta zelo podobna in primerljiva. Pred prvim vrhom se v obeh primerih nakazuje še en vrh, vidna pa je le poševna stopnička. Elucijska profila obeh alikvotov sta zelo podobna elucijskima profiloma po gelski filtraciji vzorca pri ponovitvi A, le da se na mesto prvega vrha pojavita poševni stopnički. Poševni stopnički pripadata IgM proteinom, naslednji vrh α_2 -makroglobulinu, najvišji pa najverjetneje IgG.

Graf 6: Ločitev proteinov obeh alikvotov* vzorca po DIALIZI pri ponovitvi B



* Elucijski profil alikvota 1 smo prestavili za eno frakcijo v desno, s čimer smo dosegli pokrivanje vrhov

Izbranim frakcijah po gelski filtraciji obeh alikvotov smo določili koncentracijo proteinov z Bradfordovov metodo. Določene koncentracije proteinov v frakcijah so bile skladne z razmerji med absorbcami le-teh frakcij, določenih direktno spektrofotometrično takoj po

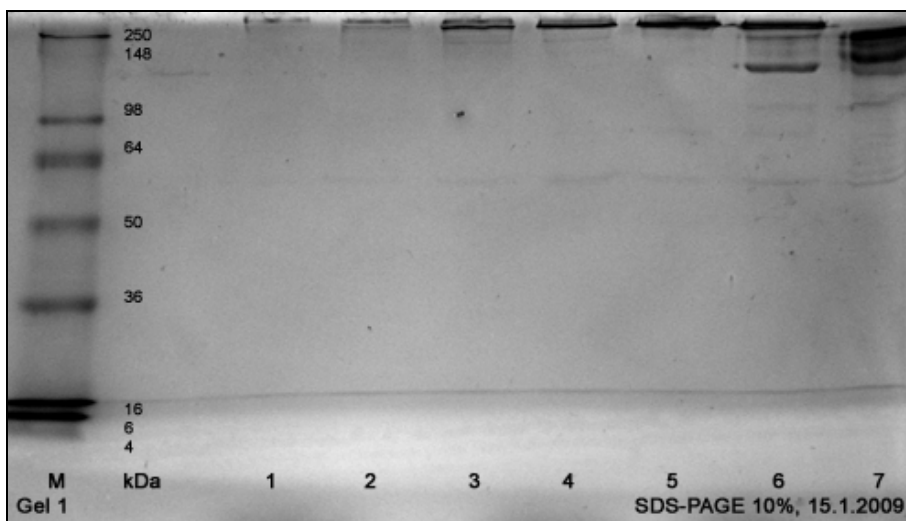
gelski filtraciji. Prav tako so bila tudi razmerja med koncentracijami obeh alikvotov enaka razmerjem absorbanc skladnih frakcij. Po določitvi koncentracij smo izvedli elektroforezo izbranih frakcij gelske filtracije alikvota 2. Izbrali smo začetne frakcije posameznih vrhov in ob tem še frakcijo, ki je imela po spektrofotometrični meritvi najvišjo absorbanco. Razporeditev vzorcev na gelih 1 in 2 je prikazana v preglednici XXV, rezultati elektroforeze pa na slikah 17 in 18.

Preglednica XXV: Nanos frakcij alikvota 2 po gelski filtraciji na gel 1 in 2

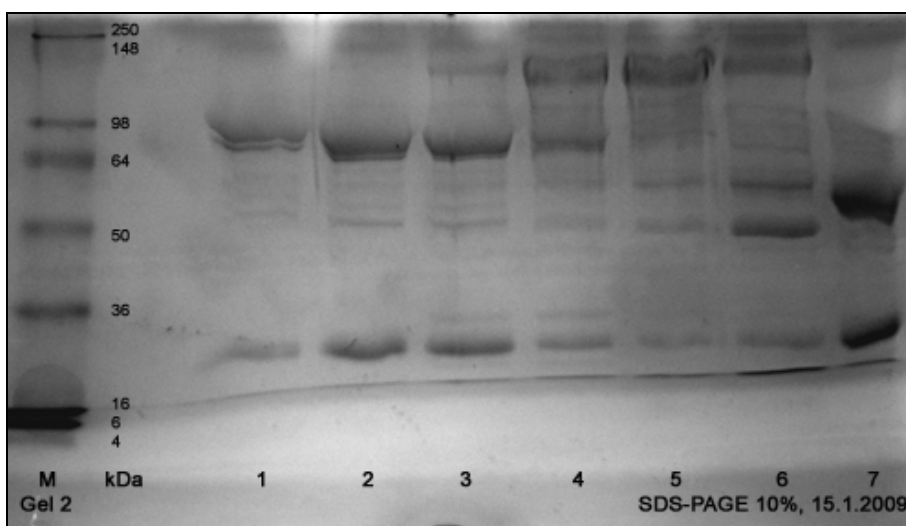
Gel 1	1	2	3	4	5	6	7
Gel 2 (red.)	1	2	3	4	5	6	7
Vzorec:	26	27	28	29	30	32	38

Na gelu 1 (slika 17) je razvidno, da so skoraj vsi nanešeni vzorci zaostali na vrhu ločitvenega gela, le pri frakcijah 32 in 38 so lise vidne tudi malo pod 148 kDa. Pri frakcijah 29, 30, 32 in 38 so vidne zelo šibke lise pri 64 kDa, ki najverjetneje pripadajo HSA. Vrh z najvišjo absorbanco določeno direktno spektrofotometrično (frakcija 38) pripada IgG. Prav tako je v tej frakciji še zelo majhen delež humanega serumskega albumina, ki ga s selektivnim obarjanjem z amonijem sulfatom pri nasičenosti 50% nismo v celoti odstranili.

Na gelu 2 (slika 18) je vidnih veliko več lis, kot na gelu 1, kar pomeni, da je redukcija vzorcev uspešno potekla. Pri frakcijah 26 – 29 so lepo vidne lise med 64 in 98 kDa, ki so najintenzivnejše v frakcijah 27 ter 28, ki pripadajo težkim verigam IgM. Prav tako so pri teh vzorcih prisotne lise okoli 25 kDa, ki pripadajo lahkim verigam IgM in J-verigi, seveda pa tudi lahkim verigam IgG. Prisotne so tudi lise okoli 50 kDa, ki so bistveno šibkejše od lis pri med 64 in 98 kDa. Sklepamo, da lahko pripadajo težkim verigam IgG protiteles, ki pa so v teh frakcijah v zanemarljivo majhni količini. V frakcijah 28 – 30 so vidne tudi lise pod 148 kDa, ki pripadajo podenotam α_2 -makroglobulina.



Slika 17: Elektroforezni gel vzorcev alikvota 2 po gelski filtraciji (NERED.)



Slika 18: Elektroforezni gel vzorcev alikvota 2 po gelski filtraciji (RED.)

Iz primerjave koraka 4 obeh ponovitev gelskih filtracij (A in B) na koloni XK 16/100 smo ugotovili, da smo tudi pri ponovitvi B izvedli zelo primerljivo in ponovljivo, na kar nakazujejo vsi rezultati. Iz tega sledi, da smo IgM uspešno ločili od večine ostalih serumskih proteinov, le α_2 -makroglobulin je v obeh primerih delno prisoten. Gelsko filtracijo ponovitve B smo, kljub nižjemu pretoku skozi kolono, izvedli ponovljivo in primerljivo z gelsko filtracijo ponovitve A.

5.2.2.5. Korak 5 – KONCENTRIRANJE VZORCEV

Naslednji korak je bil, kot že pri ponovitvi A, združitev paralelnih frakcij (frakcije s skladnimi absorbancami na elucijskem grafu – graf 6) in koncentriranje le-teh frakcij na volumen, ki je primerljiv z volumnom izhodnega poola serumov uporabljenega pri ponovitvi B (3,78 ml). v primerljavi s korakom 5 ponovitve A, smo tokrat izvedli

koncentriranje pri milejših pogojih, s čimer smo preprečili tvorbo oborine pri vzorcih, ki so vsebovali IgM. Kot že pri ponovitvi A, so se vzorci nekoliko različno koncentrirali, verjetno zaradi vsebnosti proteinov različnih molekularskih mas v posameznih frakcijah. Pri koncentriranju z milejšimi pogoji (koncentriranje na principu nadtlaka, na mesto centrifugalne sile) pri vzorcih z IgM ni prišlo do tvorbe oborine.

Po koncentriranju smo izbranim vzorcem (skoncentrirane frakcije po gelski filtraciji ponovitve B in frakcije alikvota 1 in 2 z najvišjima absorbanca) preverili vsebnost IgM, IgG ter tudi IgA proteinov z nefelometrično metodo (preglednica XXVI).

Preglednica XXVI: Volumni po koncentriranju izbranih frakcij ter koncentracije IgM, IgG in IgA

Vzorec	V _{po konc} [ml]	C _{IgM} [g/L]	C _{IgG} [g/L]	C _{IgA} [g/L]
Alikvot 1 (25,26,27) + alikvot 2 (26,27,28)	4,6	0,552	<0,073	/
Alikvot 1 (28) + alikvot 2 (29)	3,88	<0,176	<0,073	/
Alikvot 1 (29) + alikvot 2 (30)	3,73	<0,176	<0,073	/
Alikvot 1 (30) + alikvot 2 (31)	3,41	<0,176	<0,073	/
Alikvot 1 (31) + alikvot 2 (32)	3,21	<0,176	<0,073	/
Alikvot 1 (32) + alikvot 2 (33)	3,38	<0,176	<0,073	/
Alikvot 1 (33) + alikvot 2 (34)	3,04	<0,176	<0,073	/
Alikvot 1 (37)	2,83	<0,176	1,16	<0,248
Alikvot 2 (38)	2,75	<0,176	0,924	<0,248

Nefelometrične meritve so potrdile, da se je IgM izpral s kolone v začetnih frakcijah (aliquot 1, frakcije 25, 26, 27; alikvot 2, frakcije 26, 27, 28), ko se je absorbanca dvignila, in da stopnička pred prvim vrhom pripada IgM proteinom. Takoj v naslednjih frakcijah pa koncentracija IgM pade pod mejo detekcije proteinov. Z nefelometrično določitvijo IgG smo tudi dokazali, da izolirani IgM ne vsebujejo IgG proteinov. IgG proteinom pripada drugi vrh in že ena sama frakcija z najvišjo absorbanco alikvota 1 in 2 ima koncentracijo IgG približno 1 g/L. Tokrat smo izbranim frakcijam izmerili tudi vsebnost IgA, ki pa je bila v tistih frakcija, ki smo IgA pričakovali (frakcije z najvišjo absorbanco) pod mejo detekcije (<0,248). Iz tega sledi, da smo tudi pri ponovitvi B uspešno izolirali IgM. Obenem pa smo ugotovili, da je s sledečim načinom izolacije kot stranski produkt moč izolirati tudi IgG proteine, vendar bi odsotnost IgA morali preveriti še s kako drugo detekcijsko metodo.

5.2.3. ELISA REZULTATI

Po zaključku izolacije IgM z nespecifičnimi metodami smo izbrane vzorce posameznih korakov in končna produkta obeh ponovitev testirali na spremembo imunoreaktivnosti, pri čemer smo kot antigen uporabili kardiolipin in β_2 -glikoprotein I (preglednici XXVII in XXVIII).

Preglednica XXVII: Rezultati vzorcev po aCL ELISA

	Vzorec	C_{IgM} [g/L]	Rezultat
	Zbirek serumov	1,90	neg.
Pon. A	"35%" po DIALIZI	1,32	neg.
Pon. A	"50%" po DIALIZI	1,63	neg.
Pon. A	Fr. po GF (IgM)	0,23	neg.
Pon. B	"50%" po DIALIZI	1,51	neg.
Pon. B	Fr. po GF (IgM)	0,55	neg.

Preglednica XXVIII: Rezultati vzorcev po anti β_2 -GPI ELISA

	Vzorec	C_{IgM} [g/L]	Rezultat
	Zbirek serumov	1,90	neg.
Pon. A	"35%" po DIALIZI	1,32	neg.
Pon. A	"50%" po DIALIZI	1,63	neg.
Pon. A	Fr. po GF (IgM)	0,23	neg.
Pon. B	"50%" po DIALIZI	1,51	neg.
Pon. B	Fr. po GF (IgM)	0,55	neg.

Rezultati vseh vzorcev aCL in anti β_2 -GPI ELISA so bili negativni. S tem smo dokazali, da smo tekom izolacije z uporabo ustreznih nedestruktivnih in neagresivnih metod uspeli izolirati v merjenih parametrih nespremenjena protitelesa razreda M.

5.2.4. IZKORISTEK IZOLACIJE


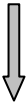
Po izolaciji IgM smo izračunali tudi izkoristek obeh ponovitev. Opredelili smo dva tipa izkoristkov. Realen izkoristek predstavlja tisto količino IgM proteinov, s katero lahko dejansko od zadnjega koraka dalje operiramo. Zajema vse tipe izgub med celotnim postopkom izolacije. Med izgube smo šteli neuspele poskuse izolacije (gelska filtracija na koloni 10/20) in izgube na račun kontrole vzorcev med posameznimi koraki (največje izgube smo imeli pri nefelometričnem merjenju – 300 μ l za vsak vzorec). Teoretičen izkoristek pa predstavlja tisto količino IgM, ki bi jo lahko izolirali, če ne bi med

posameznimi koraki vzorcev kontrolirali in ne bi izvedli neuspešnih poskusov. Izkoristka sta predstavljena v preglednici XXVII.

Pri ponovitvi A je realen izkoristek nižji od teoretičnega za več kot 10%, ker smo pri ponovitvi A še iskali optimalen način izolacije, zato smo posamezne vzorce večkrat preverjali, po drugi strani pa smo izgubili 300 μl vzorca z gelsko filtracijo na koloni 10/20. Iz teh razlogov se izkoristka tako razlikujeta. Pri ponovitvi B smo izolacijo na pri nekaterih korakih racionalizirali, kar je vidno tudi pri razliki med realnim in teoretičnim izkoristkom ($\eta_T = 37,8\%$ in $\eta_R = 33,1\%$), saj je le ta za več kot polovico manjša, kot pri ponovitvi A ($\eta_T = 31,0\%$ in $\eta_R = 19,1\%$). Teoretična izkoristka (η_T) sta v obeh primerih nad 30%, pri drugi ponovitvi je celo blizu 40%. Realen izkoristek izolacije je pri drugi ponovitvi bistveno višji od prvega in celo višji od teoretičnega izkoristka prve ponovitve, kar pomeni, da smo uspešno postavili pogoje izolacije z nespecifičnimi metodami. Ugotovili smo, da pri izolaciji v obeh primerih izgubimo največ IgM pri stopnji ločevanja proteinov z gelsko filtracijo in koncentriranju frakcij po gelski filtraciji, saj je v obeh primerih η_T tega koraka $\sim 40\%$. Izgubo pri teh dveh korakih pripisujemo predvsem gelski filtraciji in manj kasnejšemu koncentriranju frakcij z IgM. Izkoristek do koraka 4 je bil v obeh primerih relativno visok, pri drugi ponovitvi je bil celo blizu 95%.

Pridemo smo do zaključka, da s kombinacijo nespecifičnih metod lahko uspešno izoliramo IgM proteine z realnim izkoristom izolacije nad 30%. Ob tem je potrebno omeniti, da pri kombinaciji nespecifičnih metod lahko izhajamo iz relativno velikega volumna vzorca in tudi s 30% izkoristkom lahko pridobimo dovolj veliko količino IgM za izvedbo študij molekularskih sprememb po elektro-oksidacije protiteles razreda M.

Preglednica XXVII: Izračun realnega in teoretičnega izkoristka izolacije ponovitve A in B

<u>Ponovitev A</u>		<u>Ponovitev B</u>
$m_Z = 9,5$ (1,9 \times 5) $\eta_T = 0,804$ $m_K = 7,641$ (1,32 \times 2,59 + 1,63 \times 2,59)	Korak 1  Korak 2 	$m_Z = 7,182$ (1,9 \times 3,78) $\eta_T = 0,946$
$m_Z = 6,313$ (1,475 \times 4,28)		

$\eta_T = 1$	Korak 3	
$m_K = 6,313$ (1,503 × 4,2)	↓	$m_K = 6,795$ (1,51 × 4,5)
$m_Z = 5,080$ (1,503 × 3,38)	Korak 4	$m_Z = 6,342$ (1,51 × 4,2)
$\eta_T = 0,385$	↓	$\eta_T = 0,400$
$m_K = 1,954$ (0,229 × 5,2 + 0,227 × 3,36)	Korak 5	$m_K = 2,539$ (0,552 × 4,6)
$m_{K-realna} = 1,817$ (0,229 × 4,9) + (0,227 × 3,06)		$m_{K-realna} = 2,374$ (0,552 × 4,3)
$\eta_T = 0,804 \times 1 \times 0,385 \times 100\%$ $\eta_T = 31,0\%$		$\eta_T = 0,946 \times 0,400 \times 100\%$ $\eta_T = 37,8\%$
$\eta_R = 1,817 / 9,5 \times 100\%$ $\eta_R = 19,1\%$		$\eta_R = 2,374 / 7,182 \times 100\%$ $\eta_R = 33,1\%$

m – predstavljam maso IgM v mg; v oklepaju je prvo število koncentracija IgM v mg/ml = g/L, drugo pa volumen vzorca v ml; teoretičen izkoristek je prikazan z modro barvo, realen pa z rdečo

5.3. OPTIMALEN NAČIN IZOLACIJE

K optimizaciji izolacije IgM smo pristopili na dva načina. Najprej smo poskušali izolirati IgM s specifično metodo, toda afinitetna kromatografija z manan vezavnim proteinom se ni izkazala za ustrezno. Izoliranega materiala je bilo namreč premalo za študije elektro-oksidacije. Z več ponovitvami in večjo porabo izhodnega materiala bi sicer lahko pridobili večje količine IgM, pri čemer pa bi bila cena potrebnega materiala, glede na izkoristek same izolacije, previsoka.

Po drugi strani pa smo s kombinacijo neagresivnih nespecifičnih metod uspeli izolirati zadostno količino IgM, katerih specifičnost v merjenih parametrih se ni razlikovala od specifičnosti izhodiščnega materiala. Prav tako smo uspeli na podlagi dveh ponovitev najti optimalno kombinacijo nespecifičnih metod in optimizirati izvedbe posameznih metod. Optimalen način izolacije z nespecifičnimi metodami zavzema 5 korakov. Vzorec v prvem koraku oborimo z amonijevim sulfatom pri 50% nasičenosti. Takoj za tem resuspendirano

oborjeno frakcijo 4-krat dializiramo proti 500 ml PBS. Po dializi odstranimo določen delež (~1/3) balastnih proteinov z metodo ultrafiltracije. Kot zadnjo ločitveno metodo pa izvedemo gelsko filtracijo s kolono XK 16/100. V zadnjem koraku vzorce z IgM po gelski filtraciji združimo in skocentriramo z metodo ultrafiltracije na principu nadtlaka (N₂). Potek izolacije za 4 – 5 ml izhodiščnega materiala prikazuje shema 2. V primeru, je izhodiščnega materiala več se lahko izolacija izvede v več alikvotih, saj smo pri nekaterih metoda volumsko omejeni (ultrafiltracija, gelska filtracija).




Kot stranski produkt izolacije z nespecifičnimi metodami smo pridobili IgG proteine, saj so bili v končnih vzorcih v relativno visoki količini. Potrebno je opozoriti na prisotnost IgA v vzorcih, katerim smo dokazali visoko vsebnost IgG. Sicer smo odsotnost IgA nefelometrično potrdili, vendar bi morali to preveriti še, s katero drugo detekcijsko metodo.

V nadaljnjih izolacijah IgM bi lahko izvedbo še bolj skrajšali. Preveriti bi bilo potrebno ločitev vzorcev z gelsko filtracijo, če bi predhodno izpustili korak ultrafiltracije, s čimer smo pri zdajšnji izolaciji razbremenili kolono. Po drugi strani bi lahko preverili ločitev proteinov na gelski filtraciji pri višjem pretoku (20 ali 30 ml/h), s čimer bi občutno skrajšali trajanje gelske filtracije. V primeru, da bi kombinacijo nespecifičnih metod uporabili za sočasno izolacijo IgM in IgG, bi bilo smiselno modificirati metodo ultrafiltracije. Z uporabo membrane s porami 100 kDa na mesto 300 kDa bi znižali izgubo IgG med ultrafiltracijo, hkrati pa bi še vedno odstranili proteine manjše od 100 kDa navidezne MM.

Namen naloge, to je izolacija nespremenjenih IgM za študij molekulskih sprememb po elektro-oksidacije protiteles M, smo z ustreznim preverjanjem in optimizacijo postopka čiščenja dosegli.

Shema 2: Optimalen način izolacije; metode in pogoji izvedbe za 4–5 ml izhodiščnega materiala

	<u>Kombinacija metod:</u>	<u>Pogoji izvedbe:</u>
<i>Korak 1</i>	AS ↓	- oboritev IgM pri 50% nasičenosti z amonijevim sulfatom in raztopitev v 4 ml fosfatnega pufra
<i>Korak 2</i>	DIALIZA ↓	- 4× dializa proti PBS (en cikel najmanj 2 h)

Korak 3	UF 	<ul style="list-style-type: none"> - 6 ciklov z membrano s porami 300 kDa
Korak 4	GF  XK 16/100 	<ul style="list-style-type: none"> - gel Sephacryl S 300 HR - kolona XK 16/100 - nanos vzorca na kolono v dveh alikvotih - pretok 10 ml/h - zbiranje frakcij po ~3 ml
Korak 5	KONCENTRIRANJE	<ul style="list-style-type: none"> - IgM frakcije z uporabo Amicon ultrafiltracijske celice 10 ml z nadtlakom (N₂) do 5 atm in membrano s porami 10 kDa - ostale frakcije po potrebi z uporabo koncentriranih epruvt Amicon Ultra Centrifugal Unit 4 ml, 30 kDa

AS – obarjanje z amonijevim sulfatom; UF – ultrafiltracija; GF – gelska filtracija; XK 16/100 označuje kolono s premerom 16 mm in dolžino 100 cm

6. SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih sklepov:

- Izolacija IgM s specifično metodo (afinitetna kromatografija z manan vezavnim proteinom) se ni izkazala za najprimernejšo. Izoliranega materiala je bilo namreč premalo za študije elektro-oksidacije.
- Z več ponovitvami izolacije na afinitetni koloni z manan vezavnim proteinom bi sicer lahko pridobili večje količine IgM, pri čemer pa bi bila cena potrebnega materiala, glede na izkoristek same izolacije, previsoka.
- Optimizirali smo kombinacijo nespecifičnih metod (obarjanje z amonijevim sulfatom, dializa, ultrafiltracija in gelska filtracija), ki je dala zadovoljiv izkoristek izolacije iz biološkega materiala za študij molekulskih sprememb po elektro-oksidaciji IgM.

- S kombinacijo neagresivnih nespecifičnih metod smo uspeli izolirati zadostno količino IgM, katerih specifičnost se v merjenih parametrih ni razlikovala od specifičnosti izhodiščnega materiala.

7. LITERATURA

1. Burtis A C, Ashwood R E, Burns E D. Clinical chemistry and molecular diagnostics. Tietz, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA 2006: 541-543
2. Koolman J, Roehm K H. Color Atlas of Biochemistry. Thieme Stuttgart, New York 2005, second edition, revised and enlarged: 64-69, 78-79
3. Kuhelj R. Biokemija v praksi: načela in tehnike. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2003, 3. izdaja: 26-43, 67-71, 75-77
4. Boyer R F. Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana 2005: 79-82
5. Kuželički Karas N. Proteini - Vaje iz klinične kemije: gradivo za interno uporabo Univerzitetni program Farmacija 2007
6. Vozelj M. Temelji imunologije. Državna založba Slovenije, Ljubljana 2000, prva izdaja: 37-41, 50, 58, 100-102, 107, 112-113, 283, 293-294
7. Schmidt F R, Thews G. Human Physiology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1983: 331-333, 337

8. McPherson A R, Pincus R M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed., Saunders Elsevier 2007, Philadelphia, USA: 235, 237
9. Roitt, Brostoff, Male. Immunology, 5th ed., Mosby 1998, London UK: 71-81, 107-112
10. Voet D, Voet J G. Biochemistry. Second edition, John Wiley & sons, Inc. 1995, USA: 74, 78, 82-86, 1211
11. Omersel J, Jurgec I, Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Sodin-Šemrl S, Božič B. Autoimmune and proinflammatory activity of oxidized immunoglobulins. Autoimmunity reviews 2008; 7: 523-529
12. Pound D J. Immunochemical protocols. Methods in Molecular Biology, Volume 80, Second Edition, Humana press 1998: 98-99, 113-118
13. Nikolayenko I V, Galkin O Y, Grabchenko I N, Spivak Y M. Preparation of highly purified human IgG, IgM and IgA for immunization and immunoanalysis. Ukrainica Bioorganica Acta 2005; 2: 3-11
14. Gel Filtration, Principles and Methods, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden, 2006: 7, 11-16
15. Deutscher P M. Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology, Volume 182, Academic press 1990: 67-76, 285, 288-291, 301-305, 425-439
16. http://www.pall.com/34696_35497.asp, obiskano 5.3.2009
17. Antibody purification. Handbook, Amesham Biosciences, Edition AC 18-1037-46
18. Gel Filtration Calibration Kits, Product booklet. Codes: 28-4038-41, 28-4038-42, GE Healthcare UK, 2007
19. Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Bio-Rad, ZDA
20. IgM purification kit instructions. Pierce, Rockford, IL, ZDA
21. ImmunoPure® (G) IgG purification kit instructions. Pierce Biotechnology, Rockford, IL, ZDA
22. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>, obiskano 5.3.2009
23. Liddell J E. Antibody Purification by Ammonium Sulfate Precipitation. University of Cardiff, UK, encyclopedia of life sciences © 2003, John Wiley & Sons
24. Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400, S-500, high resolution instructions. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
25. Božič B, Kveder T, Stegnar M, e tal. Influence of degraded phosphatidylserine on binding of antiphospholipid antibodies. Int Arch Allergy Immunol 1997; 112(1): 19-26
26. Čučnik S, Kveder T, Križaj I, Rozman B, Božič B. High avidity anti-β₂-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. Ann Rheum Dis 2004; 63(11): 1478-1482

27. Ultrafiltration membranes, operating instructions. Millipore Corporation, Billerica, MA, ZDA
28. Purnat M. Vpliv seruma na elektrooksidacijo imunoglobulinov razreda G. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007
29. Arnold N J, Wormald R M, Suter M D, Radcliffe M C, Harvey J D, Dwek A R, Rudd M P, Sim B R. Human Serum IgM Glycosylation. Identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin. *The journal of biological chemistry* 2005; vol. 280, no. 32: 29080-29087
30. Korngold L. A human monoclonal IgM with binding activity for C-reactive protein (CRP). *Clinical immunology and immunopathology* 1974; 3: 236-242
31. Knutson P V, Buck A R, Moreno M R. Purification of a murine monoclonal antibody of the IgM class. *Journal of immunological methods* 1991; 136: 151-157
32. Pucci B, Rosaria Coscia M, Oreste U. Characterization of serum immunoglobulin M of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2003; 135: 349-357
33. Feldman R S, Gonias L S, Pizzo V S. Model of α_2 -macroglobulin structure and function. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 5700-5704
34. Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. *Journal of Immunological Methods* 1990; 128: 9-16
35. Bouvet J-P, Pires R. One-step purification of murine monoclonal antibodies of the IgM class. *Journal of immunological methods* 1991; 145: 263-266