

Жумашев Ж.Ж., Салханова С.Н., Камбаров А.А.

Казахский национальный аграрный университет, г. Алматы

ВЫДЕЛЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КОРОВ

Аннотация В работе предоставлены результаты исследования по выделению чистых иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови коров. Выделение предварительно очищенных белков, содержащие все классы иммуноглобулинов осуществлено каприловой кислотой. Высокоочищенные препараты иммуноглобулинов G1 и G2 получены колоночной хроматографией на ДЭАЭ - сефадексе А-50. Проверка чистоты выделенных белков и их идентификация выполнена электрофорезом в агаровом геле и иммуноэлектрофорезом.

Ключевые слова: Белки, сыворотка крови, белки сыворотка крови, иммуноглобулины, иммуноглобулин G, иммуноглобулины M, иммуноглобулин A, электрофорез.

Введение Иммуноглобулины класса G – главные носители специфических антител (1, 2,3,4). В этих фракциях находится основная масса антител против вирусов и различных бактерий. У человека IgG встречается в виде четырех подклассов: G1, G2, G3 и G4, различающихся строением постоянных участков тяжелых цепей, биологическими и антигенными свойствами. У овец (Жумашев и др. 1985) и крупного рогатого скота (Туганбекова, Жумашев, Сеитов, 1981; Жумашев и др. 1982) обнаружили и идентифицировали два подкласса иммуноглобулинов G, причем в сыворотке крови этих видов животных иммуноглобулин G1 преобладает над G2. Биологическое значение иммуноглобулинов G заключается в том, что они составляют основу иммунного статуса животных. Однако выделение и получение чистых препаратов иммуноглобулинов класса IgG в виде подклассов - IgG1 и IgG2 у животных представляют серьезные трудности из-за близости их физико-химических и антигенных свойств

Материалы и методы исследования Материалом для выделения иммуноглобулинов класса G служила сыворотка двух клинически здоровых коров алатауской породы. Выделение иммуноглобулинов класса G состояло из двух этапов:

а) получение предварительно очищенного белка каприловой кислотой,
б) получение высокоочищенных иммуноглобулинов G1 и G2 ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50.

Выделение иммуноглобулинов каприловой кислотой

Для выделения иммуноглобулинов класса G использовали надосадочную жидкость, получаемую каприловой кислотой (Жумашев. 1994). Нормальную сыворотку крови разбавляли 0.1 н раствором уксусной кислоты до содержания белка 50 г/л. доводя ее рН до 5.0. К разбавленной сыворотке крови коров медленно, по каплям добавляли каприловую кислоту, из расчета 6 мл на 100 мл разбавленной сыворотки.

После добавления каприловой кислоты смесь перемешивали в течение 30 минут магнитной мешалкой. Осадок удаляли центрифугированием, рН надосадочной жидкости, где содержались иммуноглобулины, доводили до 7.3 и использовали для колоночной хроматографии.

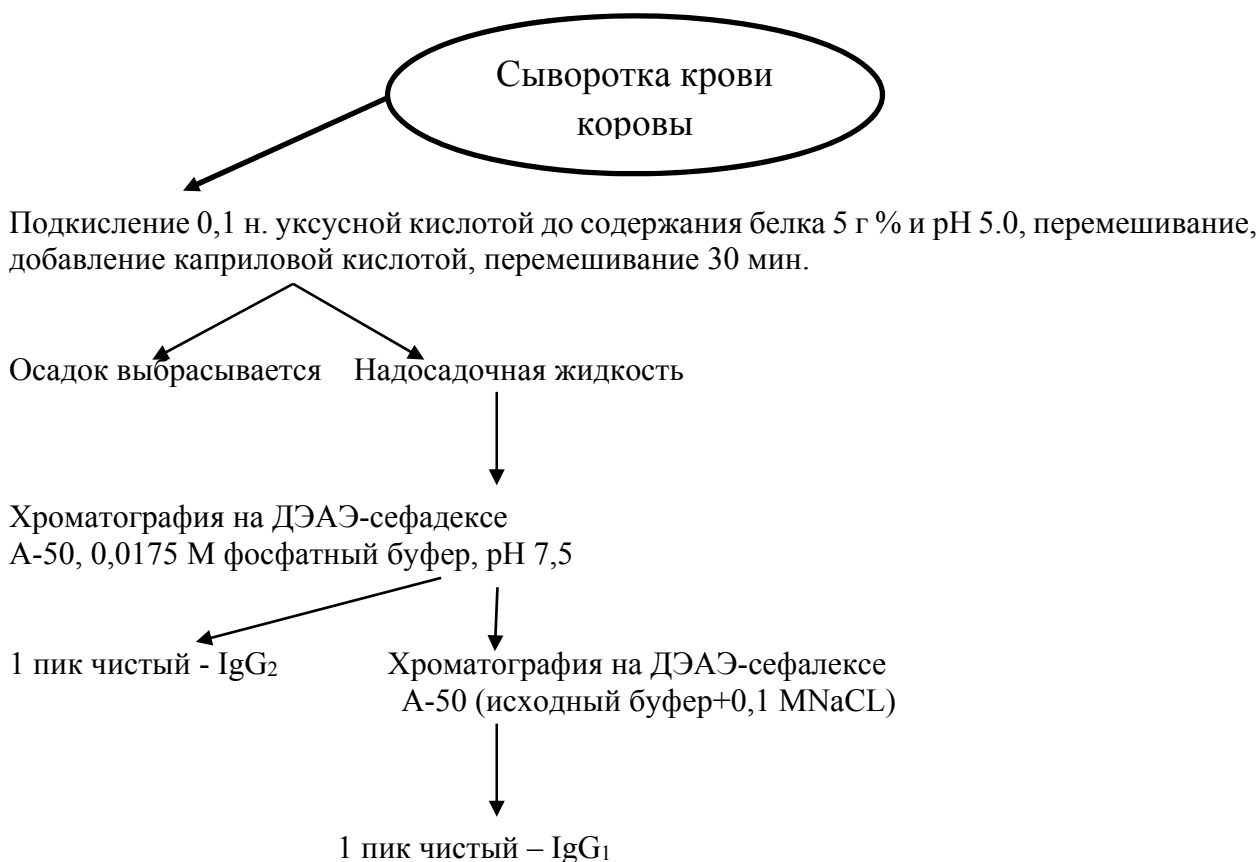
Колоночная хроматография на ДЭАЭ – Сефадексе А-50

Процесс выделение IgG1 и IgG2 можно представить в виде схемы.

Выделение IgG2. Иммуноглобулин G2, получали хроматографией на ДЭАЭ – сефадексе А-50, пропуская через колонку 0,0175 М фосфатный буфер, рН 7,5.

Выделение IgG₁. После полного выхода IgG₂ из колонки через нее пропускали 0,0175 М калий – фосфатный буфер, рН 7,5, содержащий 0,1 М NaCl. При этом в виде самостоятельного пика выходил иммуноглобулин G₁.

Схема выделения IgG₂ и IgG₁



Сыворотка крови коровы, белки, полученные каприловой кислотой и препараты IgG₂ и IgG₁ выделенные колоночной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50 были исследованы электрофорезом в агаровом геле и иммуноэлектрофорезом. Электрофорез в агаровом геле проводили в боратно-ацетатном буфере, рН 8,6, в электрофоретической камере, сделанной из плексигласа. Состав буфера: 43,55 г ацетата натрия, 52,58 г борной кислоты и 76,28 г буры растворяли в 10 л дистиллированной воды. рН буфера - 8,6. Очистка и приготовление 2% раствора агара. 43 г агара вносили в колбу вместимостью 2 л, заливали дистиллированной водой, перемешивали оставляли на сутки. Сменяли воду еще 2 раза. После осветления промывной жидкости воду сливали через марлевые фильтры, заливали агар свежей порцией дистиллированной воды до отметки 2 л и расплавляли его на водяной бане. Расплавленный до однородного состояния горячий раствор агара фильтровали на воронке Бюхнера через ватномарлевые фильтры. Фильтрат охлаждали при комнатной температуре до 70°C, затем снова нагревали в кипящей водяной бане и повторно отфильтровывали. Горячий раствор агара разливали в колбы вместимостью 0,5 л, консервировали мертиолатом и хранили в холодильнике при 4°C.

Заливка агарового геля. Камеру устанавливали на строго горизонтальной поверхности и заливали 1% - раствором агара в боратно-ацетатном буфере, охлажденном до 43-45°C. После застывания геля в кюветах заливали всю верхнюю часть подноса раствором агара до образования слоя толщиной 4-5 мм. Затем в середине пластинки устанавливали трафарет для образования лунок.

Нанесение исследуемых образцов.

После формирования геля трафарет вынимали и в образовавшиеся лунки наносили исследуемые пробы. 0,25 мл сыворотки крови коровы разбавляли 0,75 мл изотонического раствора хлорида натрия и к подгретому до 38-40° С образцу добавляли 1 мл 2% агара. После тщательного перемешивания образцы наносили в лунки. Поверхность лунок заглавливали 2% раствором агара и через 10 мин аппарат подключали к электрической сети. Проведение электрофореза: боратно-ацетатный буфер, рН 8,6, сила тока 100 мА, напряжение 220 В, источник питания УИП-1, электроды-платиновые, продолжительность электрофореза 7 ч.

Фиксация белков, после окончания электрофореза пластинку с гелем вынимали из подноса и погружали в фиксирующий раствор N 1 (200 мл уксусной кислоты доводили до 2 л водой). Через 15 мин гель переносили с пластинки на стекло такого же размера и оставляли в растворе на 3 ч., затем переносили в раствор № 2 (140 мл глицерина и 100 мл уксусной кислоты), которую доводили до 2 л водой и оставляли на 1 ч.

Сушка геля. После фиксации белков поверхность геля покрывали фильтровальной бумагой, пропитанной 5% раствором уксусной кислоты, следя за тем, чтобы не оставались пузырьков воздуха между гелем и бумагой. Электрофореграмму высушивали при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

Окрашивание и отмывание электрофореграмм. 2 г краски амидо-черного 10Б небольшими порциями растворяли в 2 л 10% раствора уксусной кислоты и после полного растворения краски раствор отфильтровали через складчатые бумажные фильтры. Высушенную гелевую пластинку вместе с бумагой погружали в раствор краски и через 10 мин удаляли бумагу, легко отстающую от геля. Окрашивание проводили 2 ч, затем краску сливали и гелевую пластинку отмывали от избытка краски фиксирующими растворами №1 и №2. Отмытую от краски агаровую электрофореграмму высушивали при комнатной температуре.

Иммуоэлектрофорез проводился также в агаровом геле с использованием боратно-ацетатного буфера, рН 8.6 и антисывороток против белков быка.

Результаты исследования и их обсуждение. Электрофоретическое и иммуоэлектро-форетическое изучение надсаложенной жидкости показало, что при добавлении каприловой кислоты в сыворотку, при рН 5,0 осаждаются все белки, кроме IgG₁ и IgG₂, а также IgM. Однако иммуоэлектрофорезом обычно обнаруживаются следы IgA, β-и редко α-глобулинов. По нашим данным, с помощью каприловой кислоты относительно легко можно выделить достаточно чистые препараты иммуноглобулинов G₁ и G₂ из сыворотки крови крупного рогатого скота. Электрофоретическое изучение белкового состава сыворотки крови коровы и препаратов полученных каприловой кислотой показана на рис.1 и 2.



1 2
Корова №1 Корова №2

Рисунок 1. Электрофореграмма препарата белка, полученного каприловой кислотой из сыворотки крови двух коров, состоящий из IgG₂ и IgG₁ с примесью IgM и IgA.

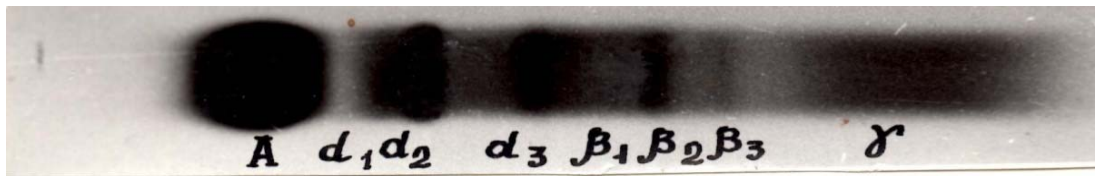


Рисунок 2. Электрофореграмма сыворотки крови коровы в агаровом геле



Рисунок 3. Иммуноэлектрофоретическое изучение препарата полученного каприловой кислотой.

1. Антисыворотка против белков сыворотки крови быка.
2. Препарат, полученный каприловой кислотой

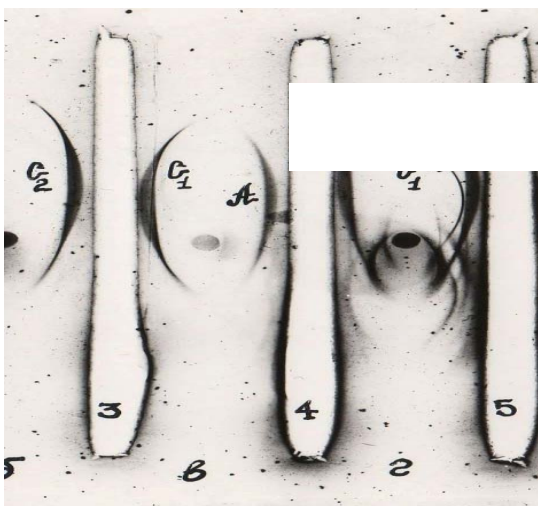


Рисунок 4. Иммуноэлектрофоретическое изучение препарата полученного каприловой кислотой и чистых иммуноглобулинов IgG2. 2. Смесь IgG2 + IgA

3. Препарат, полученный каприловой кислотой. В лунках антисыворотка против белков сыворотки крови быка.



1 2 3
Рисунок 5. Электрофоретическое изучение белков, выделенных колоночной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50 и

сыворотка крови коровы.

1. Сыворотка крови коровы.

2. IgG2.

3. IgG1.

Выводы Из сыворотки крови коровы каприловой кислотой, получена фракция белка, состоящая из иммуноглобулинов G1 и G2 с примесью иммуноглобулинов М и А. Важным результатом проведенной работы заключается в том, что методом колоночной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50 получены наиболее важные иммуноглобулины – носители специфических антител- IgG1 и IgG1. Иммуноглобулиновый состав препарата, полученного каприловой кислотой и чистота полученных хроматографией иммуноглобулинов доказана электрофорезом в агаровом геле и иммуноэлектрофорезом. Полученные препараты общих иммуноглобулинов и иммуноглобулинов G1 и G2 могут быть использованы как важный фактор повышения иммунного статуса новорожденных телят.

Литература

1. Жумашев Ж.Ж., Алимжанова Ш.С. Выделение и характеристика иммуноглобулинов овец // Вестн. с-х. науки Казахстана. – 1981. - N 9. – С. 61-66.
2. Жумашев Ж.Ж., Туганбекова М.А., Сеитов З.С. Количественное определение иммуноглобулинов и белков сыворотки крови коров алатауской породы // Изв. АН КазССР. Сер.биол. – 1982. - N 2. – С. 75-79.
3. Жумашев Ж.Ж., Алимжанова Ш.С., Туганбекова М.А., Сеитов З.С., Турсынбаев К.Ш. Выделение, идентификация и количественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови овец и крупного рогатого скота. / Методические рекомендации. – Алма-Ата, 1985. – 50 с.
4. Жумашев Ж.Ж., Мартинес М.Р., Туганбекова М.А., Сеитов З.С. Выделение и иммунохимическая характеристика иммуноглобулинов крупного рогатого скота // Вестн. АН. КазССР – 1981 – N8. – С.60-67.
5. Жумашев Ж.Ж., Алимжанова Ш.С., Горяев М.И., Сеитов З.С. Электрофоретическое изучение белкового состава сыворотки овец // Изв. АН. КазССР. Сер.биол. – 1973. - N 5. – С. 66-71.
6. Жумашев Ж.Ж., Сеитов З.С., Туганбекова М.А., Фогель Н.А. Алимжанова Ш.С. Иммуноэлектрофоретический спектр иммуноглобулинов овцы, коровы и лошади // XI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. / Биохимия. – М.: Наука, 1975 – С. 57.

7. Жумашев Ж.Ж., Алимжанова Ш.С., Горяев М.И., Сеитов З.С. Электрофоретическое изучение белкового состава сыворотки овец // Изв. АН. КазССР. Сер.биол. – 1973. - N 5. – С. 66-71.

Камбаров А.А., Жумашев Ж.Ж., Салханова С.Н.

СИБИРДЫҢ ҚАН САРЫСУЫНАН ИММУНОГЛОБУЛИНДЕРДІ БӨЛУ

Мақалада сиыр қаны сарысуынан G-иммуноглобулинді бөліп алу әдісі баяндалған. Құрамында барлық иммуноглобулиндер бар препарат каприл қышқылы арқылы бөлініп алынды. Таза G1 және G2- иммуноглобулиндер хроматография әдісімен ДЭАЭ-сефадекс-А-50 арқылы алынған. Белоктар тазалығы электрофорез және иммуноэлектрофорез арқылы тексерілген.

Кілт сөздер: Белоктар, қан сарысуы, қан сарысуы белоктары, иммуноглобулиндер, иммуноглобулин G, иммуноглобулин M, иммуноглобулин A, электрофорез.

Zhumashev Zh.Zh., Salhanova S.N., Kambarov A.A.

SEPARATION OF IMMUNOGLOBULINS G FROM COW BLOOD SERUM

In the paper are given the results of investigation on separation of immunoglobulins G from cow blood serum. Separation of the protein containing all classes of immunoglobulins was realized by caprylic acid. The obtaining of high purification immunoglobulins G1 and G2 are realized by column chromatography on DEAE-sephadex A-50. The checking of purity of separating immunoglobulins and their identification were carried out by methods of electrophoresis and immunoelectrophoresis.

Key words: Proteins, serum of blood, immunoglobulins of blood serum, immunoglobulins, immunoglobulin G, immunoglobulin M, immunoglobulin A, electrophoresis.

ӘОЖ: 637.12.61:645.26

Қазықанұлы О., Әділқанқызы А., Бодайқызы Б., Шәріпұлы М.

*Шыхызы университеті жануарлар ғылымы институты,
Шин Жяң Шиху ауданы мал дәрігерлік пункті*

ШИН ЖЯҢНЫҢ ЖЫЛҚЫ ШАРУАШЫЛЫҒЫНЫҢ ДАМУ ЖАҒДАЙЫ

Аңдатпа Мақалада шінжяң жылқы шаруашылығының жалпы жағдайы сөзге тиек етіліп, жылқының өңірлік орналасуы және жылқы тұқымын сапаландырумен түрлі жылқы өнімдерін құнттап мәнерлеу жағындағы түрлі ғылыми жетістіктер баяндалған.

Кілт сөздер: тұқым жетілдіру; өңірлік орналасу.

Кіріспе Жылқы шаруашылығы мал шаруашылығының маңызды құрамдас бөлегі болып қана қалмастан, заманауи ауыл шаруашылығымен жаңаша ауыл-аймақ құрудың маңызды мазмұны, халықтық экономика мен қоғамды дамытудағы орны кем болса болмайтын негізгі шаруашылықтардың бірі [1]. Шин Жяң еліміздегі жылқы байлығы ең мол әрі жайы орналасқан, кәсіптену өресі біршама жоғары автономиялы аудан болып, жылқы шаруашылығын өркендетудің тамаша абзалдылығына ие.