

Анализ кривых титрования проводился с помощью стандартной модели нековалентной некооперативной 1:1 гетероассоциации, в рамках которой предполагается существование в растворе мономеров и их гетеродимера. Закон сохранения массы записывается в виде:

$$\begin{cases} x_0 = x_1 + K_h x_1 y_1 \\ y_0 = y_1 + K_h x_1 y_1 \end{cases}, \quad (1)$$

где x_1 , x_0 и y_1 , y_0 – мономерные и общие концентрации метиленового голубого и кофеина/флавиномононуклеотида, соответственно; K_h – равновесная константа гетероассоциации метиленового голубого и кофеина/флавиномононуклеотида. Выражение для наблюдаемой оптической плотности A (фактически, функция, описывающая кривую титрования) выглядит следующим образом.

$$A = (\varepsilon_m - \varepsilon_h) x_1 + \varepsilon_h x_0, \quad (2)$$

где ε_m , ε_h – молярные коэффициенты поглощения (экстинкции) красителя, находящегося в мономерном состоянии и в составе гетерокомплекса с кофеином/флавиномононуклеотидом, соответственно.

Аппроксимация экспериментальных кривых титрования (точки на рис. 3) производилась численно в пакете MATLAB путем подгонки значений K_h и ε_h . Значения подгоночных параметров приведены в таблице 1. Близкие к единице значения коэффициентов детерминации указывают на хорошее качество аппроксимации.

Таблица 1 – Значения параметров гетероассоциации и коэффициентов детерминации

Смесь	Равновесная константа гетероассоциации, K_h , л/моль	Коэффициент экстинкции молекулы МВ в составе гетеродимера, ε_h , л/(моль·см)	Коэффициент детерминации, R^2
MB-CAF	110,5	59456,5	0,9878
MB-FMN	3760,5	32597,6	0,9906

Полученные значения параметров гетероассоциации в целом соответствуют основным предположениям относительно гетероассоциации ароматических БАВ друг с другом. Обращает на себя внимание большое значение константы гетероассоциации MB-FMN, на порядок превосходящее таковое для MB-CAF. Очевидно, это связано с большей площадью перекрытия хромофоров молекул в случае с FMN по сравнению с CAF, поскольку основным стабилизирующим комплекс фактором является так называемый π -стэкинг.

Результаты данного исследования далее будут применены для изучения гетероассоциации NOR-CAF и NOR-FMN.

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ № НШ-5889.2018.3.

1. Traganos F. *et al.* // Cancer Res., 1991, V. 51, p. 3682-3689.
2. Traganos F. *et al.* // Cell Prolif., 1991, V. 24, p. 305-319.
3. Evstigneev M.P. *et al.* // Prog. Biophys. Mol. Biol., 2019 [accepted].

Выбор оптимальной схемы выделения иммуноглобулинов из желтка яиц сельскохозяйственной птицы



Юдина А.Н., Красноштанова А.А.

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
кафедра биотехнологии, Москва
E-mail: aak28@yandex.ru*

Современные технологии по внедрению новых способов получения поликлональных антител вносят существенный вклад в развитие иммунологии. Особенно важным аспектом данного направления остается разработка неинвазивных вариантов получения антител, выступающих альтернативой традиционным методам на основе выделения иммуноглобулинов из сывороток крови, причиняющих вред животным. Именно поэтому извлечение антител из желтков куриных яиц (IgY) является наиболее перспективным [1].

Большая часть иммуноглобулинов, содержащихся в желтке (около 100 мг/г массы желтка), отнесена к классу, называемому IgY [2]. Иммуноглобулины (IgY) – это гликопротеины, которые представляют собой антитела, вырабатываемые плазмой клеток в ответ на воздействие антигена. В последнее время в литературе приводится значительное количество публикаций,

касающихся исследований свойств желточных антител в отношении возбудителей инфекционных заболеваний в связи с их эффективным применением в диагностических, терапевтических и профилактических целях.

В отличие от иммуноглобулинов млекопитающих (IgG), IgY не взаимодействуют с ревматоидным фактором (RF), не способствуют активации системы комплимента, не связываются с Fc рецептором (FcR), а также имеют слабую перекрестную реактивность, что подтверждает возможность их широко использования в медицинской и пищевой промышленности [3]. В соответствии с имеющимися биохимическими особенностями IgY были разработаны несколько технологий по выделению иммуноглобулинов из желтка. В данной работе исследована эффективность двухстадийной обработки, отвечающая специфическим свойствам IgY. Согласно данному способу первая стадия включает удаление липидов и липопротеидов из водорастворимой фракции посредством замораживания-оттаивания разбавленного раствора желтка, при pH 5,0; а вторая – непосредственное извлечение из водорастворимой протеиновой фракции IgY под воздействием раствора солей хлорида натрия определенной концентрации. Полученную белковую суспензию подвергают дополнительной очистке и концентрированию.

Поскольку желток яйца содержит другие ценные белки, а его липиды имеют самостоятельное практическое значение, то представляется целесообразным подобрать режимы выделения иммуноглобулинов из яичного желтка при их комплексной переработке. Таким образом, целью данной работы является подбор условий выделения иммуноглобулинов из желтка куриного яйца с одновременным выделением липидной фракции желтка, которая может служить ценным компонентом для кормопроизводства и функционального питания.

В качестве объекта исследования в работе был использован желток яйца сельскохозяйственной птицы производства птицефабрики ОАО «Снежка» с влажностью - 74%, содержанием жира в желтке - 32,6г/100г, сырого протеина в белке - 10,6%, в желтке - 16,6%, фосфолипидов в желтке – 29,6%. Содержание сырого протеина определяли микрометодом Къельдаля, белка в растворах – биуретовым методом, содержания общих жиров – методом Сокслета, влажности [4]. Ультрафильтрацию белковых растворов проводили на плоских мембранах УАМ-100

На предварительном этапе работы были проведены исследования по выделению иммуноглобулина Y из яичного желтка путем обработки растворами хлорида натрия предварительно обезжиренного желтка, использования для осаждения липидов растворов декстрана. Однако эти методы не позволили получить конечный продукт с содержанием белка более 54%. Поэтому на следующем этапе работы согласно ранее разработанным способам выделения иммуноглобулинов [1], после разделения яиц на белок и желток, яичный желток переносили на фильтровальную бумагу для более тщательного удаления остатков яичного белка. После чего внешнюю оболочку желтка декантировали, а желточную массу собрали в отдельную ёмкость. В оболочке желтка измерили содержание сырого протеина методом Къельдаля. Было установлено, что содержание сырого протеина составляет 54,3% и 38% общего жира, поэтому данная фракция представляет интерес для последующего извлечения липидов и белков. Далее желточную массу смешали с эквивалентным объемом натрий-фосфатного буферного солевого раствора (ФСБ) со значением pH 7,4. Из полученной суспензии отбирали аликвоты для последующих разведений в водопроводной воде (предварительно подкисленной до pH 5,0 с помощью 0,2 н HCl) в 6 и 8 раз. Полученные смеси заморозили при температуре -20°C и поместили в воронки (с заранее заготовленным бумажным фильтром) и подвергли самопроизвольному размораживанию при комнатной температуре. Из проведенного эксперимента было выявлено, что использование данного метода позволяет эффективно задерживать липиды. После фильтрации был получен прозрачный раствор, содержащий преимущественно белковую фракцию. Концентрации белка в полученных фильтрах в зависимости от исходного разбавления желточной массы, определенные биуретовым методом, представлены в таблице 1:

Таблица 1 – Влияние кратности разведения на концентрацию белка в фильтрате желточной массы

№	Кратность разведения	Концентрация белка в фильтрате, г/л
1	6	7,2
2	8	6,1

Поскольку для обоих разведений наблюдались близкие значения концентраций белка, то по полученным результатам не удалось сделать однозначного вывода об оптимальной кратности разведения. Поэтому на следующем этапе работы проводили фракционирование белков, содержащихся в водорастворимой фракции, посредством специфической преципитации солями хлорида натрия, добавляемыми к растворам фильтратов в концентрациях равных 5 и 10%. Приготовленные фракции выдерживали при 4°C в течение суток, после чего осадок соли и балластных белков отделяли фильтрованием, а в фильтрах определяли содержание белка биуретовым методом. Полученные результаты представлены в таблице 2:

Таблица 2 – Влияние степени разведения желточной массы и концентрации хлорида натрия на выход белка

№	Кратность разведения	концентрации добавляемой соли (<i>NaCl</i>), %	Концентрация белка, г/л
1	6	5%	8,1
		10%	9,7
2	8	5%	10,3
		10%	10,1

На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что наибольшая концентрация белка в фильтрате наблюдается при кратности разведения 8 и концентрации хлорида натрия 5%.

Рассчитанные значения интегральной селективности по белку, а также концентрации содержащегося протеина в растворах после ультрафильтрации приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние кратности разбавления желточной массы и концентрации хлорида натрия на эффективность ультрафильтрации

№	Кратность	Концентрации добавляемой соли NaCl, %	Концентрация белка после концентрирования, г/л	Интегральная селективность ϕ , %
1	6	5%	3,58	56
		10%	3,26	66
2	8	5%	4,49	56
		10%	3,8	62

Полученные значения селективности белка указывают на эффективность его очистки от балластных белковых примесей.

Из представленных данных следует, что оптимальное разведение составляет 6, а концентрация NaCl 10% от массы раствора, так как при восьмикратном разведении наблюдается сильно опалесцирующий эффект в объеме водорастворимой фракции, что не допустимо для последующей очистки IgY.

Поскольку в полученных фракциях иммуноглобулина содержится значительное количество хлорида натрия, в качестве метода выделения и очистки была изучена возможность их концентрирования на мембране УАМ-10 с последующей отмывкой от соли в режиме диафильтрации (кратность отмывки была равна 4). Полученные результаты приведены в табл.4.

Таблица 4 – Влияние кратности диафильтрации на физико-химические показатели диафильтратов и концентрата белка

Кратность диафильтрации	Остаточная концентрация хлорида натрия, г/л	Интегральная селективность ϕ , %	СВ диафильтрата, %	Содержание белка в концентрате, %
1	5,0	99,8	5,6	70,4
2	2,5	98,8	2,4	82,5
3	1,3	95,3	1,6	89,9
4	0,6	95,8	0,8	95,0

По окончании проведения промывки был получен раствор белка с концентрацией 12,18 г/л. Следовательно, посредством ультрафильтрации удалось увеличить общее содержание белка в исходном растворе в 4,5 раза. Из полученных данных следует, что концентрация хлорида натрия после 3-ей промывки не превышает 1,3%, что соответствует требованиям к качеству раствора целевого белка, поэтому целесообразно выбрать кратность диафильтрации равную 3.

По приведенным значениям интегральной селективности можно сделать вывод о том, что в ходе диафильтрации потери целевого белка минимальны, тогда как концентрация соли в концентрате иммуноглобулина снижается в 16 раз, что позволяет рекомендовать метод ультраконцентрирования и последующей диафильтрации для получения очищенного иммуноглобулина Y. В расчёте на сухое вещество полученный препарат иммуноглобулина содержал не менее 95% основного вещества.

1. Petr Hodek, Pavel Trefil, Jiri Simunek, Jiri Hudecek, Marie Stiborova, J. Electrochem. Sci., 8 (2013) 113 – 124.
2. Каплин В.С., Каплина О.Н. IgY -технологии. Желточные антитела птиц - Биотехнология, 2017, Т.33, №2, С.29
3. Wala Ahmad Amro, Wael Al-Qaisi, Fawzi Al-Razem, J. of Genetic Engineering and Biotechnology, 16 (2018) 99.
4. Кусакина М.Г., Суворов В.И., Чудинова Л.А. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. Пособие – Перм. гос. нац. исслед. ун-т.-Пермь, 2012, с. 5-11