

TINH SẠCH IMMUNOGLOBULIN G (IgG) TỪ MÁU HEO (*Sus domesticus*)

Nguyễn Thị Bảo Trân^{1*}, Lê Như Quỳnh¹, Lê Minh Vương¹,
Nguyễn Thanh Tú¹, Tào Việt Hà², Cao Ngọc Diệp¹, Võ Văn Song Toàn¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu tinh sạch Immunoglobulin G (IgG) từ máu heo (*Sus domesticus*) được thực hiện trên ba dung môi kết tủa là ethanol, acetone và ammonium sulfate. Sau đó dung môi và tỷ lệ tủa tốt nhất sẽ được chọn để tiến hành sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100 và sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE CL-6B. Kết quả phân tích cho thấy khi tủa với ethanol, acetone và ammonium sulfate ở các nồng độ khác nhau thì kết tủa ammonium sulfate với nồng độ 30% - 40% là tối ưu và được chọn để tiến hành sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100. Kết quả thu được một đỉnh duy nhất là F (9 - 13) có hàm lượng protein là 1.261 mg với hiệu suất thu hồi đạt 27% và kết quả nhuộm huỳnh quang cho thấy hàm lượng IgG thu được là 216 mg. Phân đoạn F (9 - 13) của sắc ký lọc gel tiếp tục được sắc ký trao đổi ion âm trên gel DEAE Sepharose CL-6B, thu được hai đỉnh F1 và F2 với F1 loại bỏ được phần lớn albumin, F1 có hàm lượng protein là 985 mg với hiệu suất thu hồi đạt 6,11% và hàm lượng IgG thu được là 120 mg.

Từ khóa: *Immunoglobulin G, sắc ký, tinh sạch kháng thể.*

1. GIỚI THIỆU

IgG (Immuno Globulin G) là một loại globulin miễn dịch của cơ thể, chúng phổ biến nhất trong máu, sữa non và các dịch mô. IgG có nồng độ cao nhất trong huyết thanh, chiếm khoảng 80% tổng lượng globulin miễn dịch. Kháng thể G có nhiều chức năng sinh học như hoạt hóa bổ thể, thúc đẩy quá trình opsonine hóa, ngưng kết và trung hòa vi khuẩn, trung hòa ngoại độc tố [1].

Ở Việt Nam, thịt heo là một loại thực phẩm chính nên đòi hỏi nguồn cung ổn định và dịch bệnh trên heo là một trong những nguyên nhân làm ảnh hưởng đến nguồn cung cấp, gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi. Trong đó bệnh do vi khuẩn là một trong các loại bệnh thường gặp nhất nên việc dùng thuốc kháng sinh từ lâu được coi là biện pháp hữu hiệu để phòng và trị bệnh [2]. Tuy nhiên, tình trạng kháng kháng sinh làm giảm hiệu quả điều trị bệnh và dư lượng kháng sinh trong thịt lợn cũng có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Vì thế, việc đưa ra một quy trình tinh sạch IgG để thay thế các biện pháp truyền thống rất cần được quan tâm nghiên cứu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Máu heo được thu tại Xí nghiệp Chế biến thực phẩm Cần Thơ, địa chỉ: tổ 5 - khu vực II - phường An Khánh - quận Ninh Kiều - TP. Cần Thơ.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị nguyên liệu

Máu heo được thu trực tiếp từ cơ sở giết mổ và để đông tự nhiên, sau đó được ly tâm ở 4800 vòng/phút trong 20 phút và thu nhận huyết thanh, trữ ở -20°C đến khi sử dụng [3].

2.2.2. Phương pháp thí nghiệm

Quy trình tủa trong các thí nghiệm tủa phân đoạn: sử dụng 15 ml huyết thanh đối với tủa ethanol và acetone, 50 ml đối với tủa ammonium sulfate, trộn nhẹ trong 15 phút và để yên trong 1 giờ. Tiến hành ly tâm ở 4.800 vòng/phút, 20 phút, 4°C, thu phần kết tủa và hòa tan chúng trong dung dịch đệm sodium sulfate pH 7,5, 0,1M, trữ ở -20°C đến khi sử dụng.

2.2.2.1. Tinh sạch IgG bằng phương pháp tủa phân đoạn với ethanol

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại, với 4 nghiệm thức (tỷ lệ huyết thanh: ethanol lần lượt là 1:1, 1:2, 1:3, 1:4).

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học,
Trường Đại học Cần Thơ

² Trường Đại học Tây Đô

*E.mail: ntbtran@ctu.edu.vn

2.2.2.2. Tinh sạch IgG bằng phương pháp tủa phân đoạn với acetone

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại, với 4 nghiệm thức (tỷ lệ huyết thanh:acetone lần lượt là 1:1, 1:2, 1:3, 1:4).

2.2.2.3. Tinh sạch IgG bằng phương pháp tủa phân đoạn với amonium sulfate

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 9 nghiệm thức: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%.

- Chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm tủa phân đoạn với ethanol, acetone và amonium sulfate:

- + Xác định những nghiệm thức có kết tủa.
- + Định lượng hàm lượng protein [4].
- + Xác định khối lượng phân tử và độ tinh sạch qua kết quả điện di [5].

2.2.2.4. Tinh sạch IgG bằng phương pháp sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100

Kết quả sẽ được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV nhằm chọn ra nghiệm thức thích hợp để tiến hành sắc ký.

Huyết thanh sau khi được kết tủa với yếu tố gây tủa ở tỷ lệ thích hợp được hòa tan với dung dịch đệm sodium phosphate pH 7,5, 0,1M. Tinh sạch mẫu sau tủa bằng gel Sephadex G-100 với tốc độ 0,5 mL/phút, ghi nhận sắc ký đồ ở bước sóng 280 nm.

2.2.2.5. Tinh sạch IgG bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE Sepharose CL - 6B

Phân đoạn thu protein thu được sau quá trình sắc ký lọc gel được tinh sạch trên cột gel DEAE Sepharose CL - 6B với tốc độ 1 mL/phút. Các protein mục tiêu được rửa giải bằng dung dịch NaCl (0-1M), dựa trên sắc ký đồ để xác định và thu các phân đoạn protein.

- Chỉ tiêu theo dõi của sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100 và sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE Sepharose CL - 6B:

- + Xác định hàm lượng protein [4].
- + Kiểm tra độ tinh sạch và khối lượng phân tử của kháng thể bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE [5].
- + Xác định hàm lượng IgG bằng nhuộm huỳnh quang FITC [6].

Nồng độ IgG được tính dựa theo công thức: $IgG-FITC = (OD_{280} - 0,35 \cdot OD_{493}) / 1,4$ (mg/mL)

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được lưu trữ, xử lý và vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2013. Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, sai số chuẩn được tính toán bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV. Trung bình số liệu của các nghiệm thức thí nghiệm được so sánh bằng phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (One Way Anova) và kiểm định LSD với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Tinh sạch IgG bằng phương pháp tủa với ethanol

Bảng 1. Hàm lượng protein của huyết thanh được tủa bằng ethanol

Tỷ lệ HT:ethanol	Khối lượng kết tủa (g)	Thể tích (mL)	Protein tổng (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
Huyết thanh	0	15	776	100
1:1	4,01 ^d ±0,045	12,9±0,233	153 ^d ±5,08	20±0,66
1:2	5,85 ^c ±0,047	15,3±0,13	183 ^c ±8,65	23,9±1,13
1:3	6,73 ^b ±0,192	20,2±0,649	299 ^b ±10,5	39,0±1,36
1:4	10 ^a ±0,087	36,6±0,545	377 ^a ±9,00	49,2±1,17

* Số liệu trong bảng là giá trị của 3 lần lặp lại. Các chữ cái trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử LSD. CV = 0,18%

Ở các tỷ lệ huyết thanh: ethanol đều xuất hiện kết tủa ở các mức độ khác nhau. Hàm lượng protein tăng dần từ tỷ lệ 1:1 đến 1:4, hàm lượng protein cao nhất thu được ở tỷ lệ 1:4 với hàm lượng protein là 377 mg.

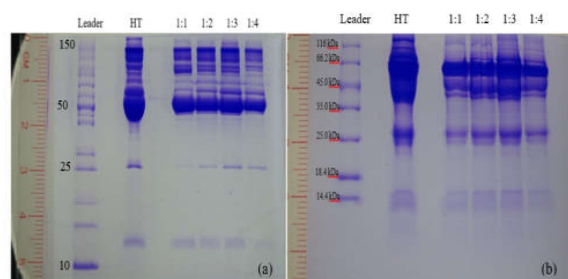
Hàm lượng protein thu được tăng dần qua các tỷ lệ chứng tỏ hằng số điện môi trong môi trường phối trộn huyết thanh và ethanol giảm mạnh. Hằng số

điện môi giảm dẫn tới khả năng liên kết, tương tác, hòa tan của các protein tan trong huyết thanh với môi trường xung quanh giảm và liên kết, tương tác giữa các protein được tăng lên. Trong môi trường có hằng số điện môi thấp, các phân tử protein sẽ liên kết với nhau và hình thành kết tủa [7]. Hằng số điện môi càng thấp thì tác động càng nhiều tới protein và đồng thời cũng cho ra nhiều kết tủa.

Qua hiệu suất thu hồi cho thấy, lượng protein tăng đều qua các tỷ lệ nhưng vẫn còn thấp. Chỉ thu được gần 50% lượng protein có trong huyết thanh đối với tỷ lệ cao nhất. Có 2 nguyên nhân có thể xảy ra:

Thứ nhất là do lượng kết tủa protein thu được đã bị biến tính do mất cấu trúc trong môi trường điện môi thấp. Nên khi hòa tan kết tủa trở lại với dung dịch đệm thì đã xuất hiện những protein không tan trong đệm, đã làm giảm đáng kể lượng protein thu được. Kết quả này giống với mô tả của Herskovits *et al.* (1970) [8] về sự biến tính protein với tác nhân là ethanol.

Nguyên nhân thứ hai là do lượng protein vẫn còn nằm trong huyết thanh sau tỷ lệ tủa 1:4. Đó là những protein được kết tủa trong môi trường có hằng số điện môi thấp hơn nữa. Nên tỷ lệ 1:4 chưa phải là tỷ lệ tốt nhất để có thể thu được hết lượng protein có trong huyết thanh.



Hình 1. (a) Phổ điện di protein được tủa bằng ethanol không bổ sung β -mercaptoethanol (b) Phổ điện di protein được tủa bằng ethanol có bổ sung β -mercaptoethanol

Kết quả điện di cho thấy phân tử IgG có mặt ở cả 4 tỷ lệ (Hình 1a). Giữa các tỷ lệ có sự giảm đáng kể về băng protein so với huyết thanh. Giữa các tỷ lệ với nhau không có sự khác biệt nhiều về số băng. Các protein trong huyết thanh đa phần có khối lượng phân tử lớn hơn 40 kDa. Nhiều nhất trong huyết thanh chính là protein albumin có khối lượng phân tử khoảng 60 kDa; albumin chiếm đến 50% lượng protein trong huyết thanh [9]. Qua các tỷ lệ kết tủa cho thấy các băng protein mờ và hẹp hơn so với các băng trong huyết thanh.

IgG có cấu tạo bao gồm 2 chuỗi nặng có khối lượng khoảng 50 kDa và 2 chuỗi nhẹ có khối lượng khoảng 25 kDa [10]. Khi sử dụng β -mercaptoethanol, các liên kết S - S trong phân tử IgG sẽ bị cắt đứt tạo thành 4 phân mảnh làm cho các phân tử có khối lượng 150 kDa bị phân cắt tạo thành các băng có khối lượng 25 kDa và 50 kDa trong các tỷ lệ (Hình 1b). Kết quả này giống với nghiên cứu của Indyk *et al.* (2008) [11] khi phân cắt IgG thành hai chuỗi. Các protein khác cũng bị phân cắt không còn thấy so với gel không có bổ sung β -mercaptoethanol.

Như vậy IgG đều xuất hiện ở các tỷ lệ. Dựa vào độ đậm nhạt và số lượng của các băng protein tập khác có trong các tỷ lệ và hiệu quả kinh tế khi sử dụng lượng ethanol thấp nhất thì tỷ lệ 1:1 được xem là ít tạp và hiệu quả hơn so với 3 tỷ lệ còn lại.

3.2. Tinh sạch IgG bằng phương pháp tủa với acetone

Bảng 2. Hàm lượng protein của huyết thanh được tủa bằng acetone

Tỷ lệ HT:acetone	Khối lượng kết tủa (g)	Thể tích (mL)	Protein tổng (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
Huyết thanh	0	15	776,2	100
1:1	6,11 ^c ±0,018	19,7±0,128	581 ^b ±51,4	75,8±4,42
1:2	7,15 ^b ±0,077	21,6±0,181	649 ^a ±23,0	84,7±3,54
1:3	7,29 ^b ±0,055	21,3±0,536	445 ^c ±16,7	58,1±3,76
1:4	7,72 ^a ±0,142	22,1±0,253	440 ^c ±26,5	57,5±6,02

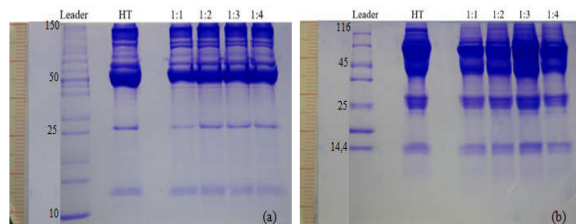
* Số liệu trong bảng là giá trị của 3 lần lặp lại. Các chữ cái trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$ theo phép thử LSD. CV= 1,04%

Hàm lượng protein thu được cao nhất ở tỷ lệ 1:1 (581 mg) và thấp nhất ở tỷ lệ 1:4 (440 mg). Hàm lượng protein giữa tỷ lệ 1:3 và 1:4 khác biệt không có ý nghĩa thống kê và khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh với tỷ lệ 1:1 và 1:2 ở mức ý nghĩa 5%. Kết quả này giống với Crowell *et al.* (2013) [12] khi khảo sát nồng độ acetone tối đa để thu hồi protein trong

dung dịch. Nồng độ tối đa từ 50% đến 80% tương đương tỷ lệ 1:1 (50%) và 1:2 (66,7%). So với ethanol, acetone cho kết quả cao hơn từ 3 tới 4 lần. Nguyên nhân là do ở tỷ lệ acetone cao đồng nghĩa với việc hằng số điện môi giảm mạnh và tương tác giữa các protein tăng cao làm protein bị biến tính, không tan trở lại dung dịch đệm. Điều này được chứng minh

qua khối lượng kết tủa thu được; ở tỷ lệ 1:4 có khối lượng kết tủa cao nhưng hàm lượng protein tổng lại là nhỏ nhất. Hàm lượng protein tổng thu được ở tỷ lệ 1:2 là cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại nhưng khối lượng kết tủa thu được khác biệt không có ý nghĩa so với tỷ lệ 1:3.

Hiệu suất thu hồi protein của acetone là rất cao. Đối với tỷ lệ 1:1 và 1:2 hiệu suất thu hồi đạt hơn 75% và là 2 tỷ lệ có hiệu suất thu hồi cao nhất trong khi đó 2 tỷ lệ 1:3 và 1:4 thì có hiệu suất thu hồi thấp hơn nhưng vẫn cao hơn rất nhiều so với thí nghiệm tủa với ethanol.



Hình 2. (a) Phổ điện di protein được tủa bằng acetone không bổ sung β -mercaptoethanol; (b) Phổ điện di protein được tủa bằng acetone có bổ sung β -mercaptoethanol

Kết quả ở hình 2 (a) cho thấy protein trong huyết thanh với các tỷ lệ phối trộn gần như giống nhau và đều xuất hiện băng protein IgG với khối lượng 150 kDa. Điều này chứng tỏ rằng acetone đã làm kết tủa và thu hồi hầu hết các protein có trong huyết thanh. Giữa các tỷ lệ cho thấy, không có sự khác biệt nhiều về số băng protein. Kết quả điện di (Hình 2b) cho thấy các phân tử có khối lượng 150 kDa không còn, thay vào đó là sự xuất hiện các băng có khối lượng phân tử tương đương 25 kDa và 50 kDa. Điều này chứng tỏ IgG đã được phân cắt thành 2 chuỗi. Các protein khác cũng bị phân cắt không còn thấy so với gel không có bổ sung β -mercaptoethanol. Các băng protein đậm hơn cũng thể hiện được hiệu quả của acetone trong việc kết tủa các protein trong huyết thanh.

Dựa vào kết quả điện di, hiệu suất thu hồi và hiệu quả kinh tế trong việc giảm bớt thể tích acetone thì tỷ lệ 1:1 được xem là hiệu quả nhất so với 3 tỷ lệ còn lại.

3.3. Tinh sạch IgG bằng phương pháp tủa với amonium sulfate

Bảng 3. Hàm lượng protein của huyết thanh được tủa bằng amonium sulfate (AS)

Nồng độ AS (%)	Khối lượng kết tủa (g)	Thể tích (mL)	Protein tổng (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
HT	0	50	2.554	100
10	0	-	-	0
20	0	-	-	0
30	4,14 ^c ±0,235	21,5±0,89	361 ^b ±15,0	14,1 ^b ±0,586
40	5,85 ^b ±0,047	30,1±0,952	412 ^b ±32,0	16,1 ^b ±1,25
50	6,73 ^b ±0,192	35,6±1,51	390 ^b ±13,5	15,3 ^b ±0,528
60	10 ^a ±0,087	56,3±0,632	799 ^a ±30,0	31,3 ^a ±1,17
70	4,42 ^c ±1,18	27,8±1,49	197 ^c ±41,1	7,7 ^c ±1,61
80	0	-	-	0
90	0	-	-	0

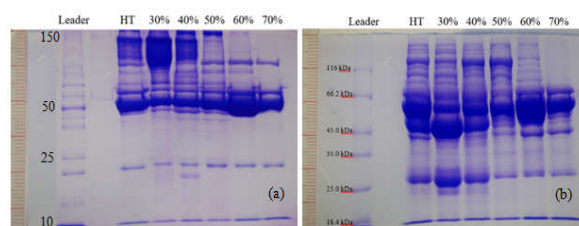
* Số liệu trong bảng là giá trị của 3 lần lặp lại. Các chữ cái trong cùng một cột khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P<0,05$ theo phép thử LSD. CV= 4,83%.

Không thấy sự kết tủa của huyết thanh với amonium sulfate ở nồng độ từ 10% - 20%, kết tủa protein chỉ xuất hiện ở nồng độ muối 30% - 70%. Kết quả phân tích thống kê hàm lượng protein thu được ở nồng độ muối 30% - 70% cho thấy, ở nồng độ muối 60% cho lượng protein cao nhất, 70% là thấp nhất. Độ

tan của protein trong huyết thanh phụ thuộc vào nhiều yếu tố, hơn cả là nồng độ muối trong dung dịch. Khi nồng độ muối cao dần, muối sẽ cạnh tranh lớp vỏ ưa nước làm tương tác giữa các protein với nước giảm xuống và xảy ra sự kết tủa. Mỗi loại protein có tính tan khác nhau sẽ tủa ở những phân đoạn khác nhau [13]. Một số protein trong huyết

thanh đã được kết tủa ở nồng độ thấp từ 30% tăng lên 40% rồi giảm xuống 50% nhưng vẫn có một số loại protein đến nồng độ muối 60%, 70% mới có thể kết tủa được.

Hiệu suất thu hồi của tổng các phân đoạn là 85,5% cao hơn so với các thí nghiệm tủa với acetone và ethanol. Nguyên nhân do ammonium sulfate chỉ tháo bỏ các phân tử nước trên bề mặt mà không làm biến tính protein nên không có hiện tượng protein sau khi kết tủa bị biến tính và không hòa tan lại với dung dịch đệm.



Hình 3. (a) Phổ điện di protein được tủa bằng ammonium sulfate không bổ sung β -mercaptoethanol; (b) Phổ điện di protein được tủa bằng ammonium sulfate không bổ sung β -mercaptoethanol

Kết quả điện di ở hình 3a cho thấy, băng IgG xuất hiện rất rõ ở nồng độ muối 30%, 40% và có sự khác biệt rất rõ rệt giữa các băng protein ở các phân đoạn khác nhau. Ở phân đoạn 50%, 60%, 70% không có sự xuất hiện của băng IgG mục tiêu và có khá nhiều protein tạp có kích thước nhỏ hơn 100 kDa. Tổng lượng protein trong 3 phân đoạn này đạt 54,3% điều này đồng nghĩa với việc đã loại bỏ được 54,3% protein tạp không chứa IgG. Kết quả này tương tự với Mariam *et al.* (2015) [14] khi kết tủa IgG bằng ammonium sulfate ở nồng độ 40%.

Kết quả điện di ở hình 3b cho thấy khi sử dụng β -mercaptoethanol để phân cắt các protein có cầu nối S - S trong phân tử, ở tỷ lệ 30% và 40% có các băng protein với khối lượng phân tử lần lượt là 50 kDa và 25 kDa với vết đậm hơn các phân đoạn còn lại.

Tóm lại, khi tủa phân đoạn với ammonium sulfate ở nồng độ 30% - 40% có sự tập trung IgG và ít tạp so với các nồng độ muối khác.

So sánh 3 phương pháp tủa tinh sạch IgG

Huyết thanh tủa với ethanol, acetone và ammonium sulfate được quy đổi về 50 mL để so sánh hiệu quả giữa 3 phương pháp tủa và tìm ra phương

pháp hiệu quả nhất, kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. So sánh 3 phương pháp tủa

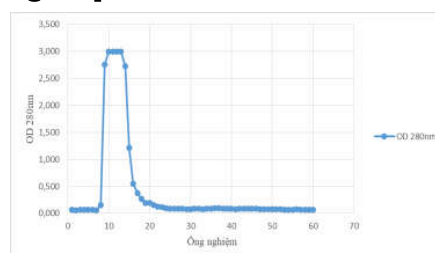
Mẫu	Thể tích (mL)	Khối lượng kết tủa (g)	Protein tổng (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
Huyết thanh	50	0	2.554	100
Ethanol tỷ lệ 1:1	43	13,4	510	20
Acetone tỷ lệ 1:1	65,7	20,4	1937	75,8
AS 30% - 40%	9,99	51,6	773	30,2

*Chú thích: ammonium sulfate (AS)

Hàm lượng protein thu được sau khi huyết thanh được tủa với acetone là cao nhất và thấp nhất là ở thí nghiệm với ethanol. Kết quả điện di huyết thanh với các dung môi kết tủa cho thấy, các băng IgG đều xuất hiện ở các tỷ lệ nhưng đối với thí nghiệm kết tủa với ammonium sulfate ở nồng độ 30% - 40% có sự tập trung IgG và loại bỏ được đến 54,3% protein tạp ở các nồng độ muối khác. Do đó, kết tủa với ammonium sulfate hiệu quả hơn cả trong ba tác nhân kết tủa của huyết thanh.

Như vậy, huyết thanh kết tủa với ammonium sulfate ở phân đoạn 30% và 40% được chọn để tiến hành sắc ký trên gel Sephadex G-100.

3.4. Tinh sạch IgG bằng phương pháp sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100



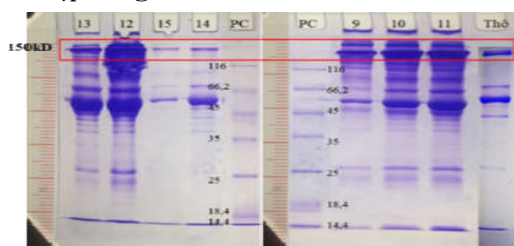
Hình 4. Sắc ký đồ gel Sephadex G-100

Qua sắc ký lọc gel chỉ thu được một phân đoạn duy nhất (ống 9 - 13). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shapiro và Martinfz (1969) [15] khi thực hiện sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100 chỉ thu được một phân đoạn duy nhất khi phân tách huyết thanh của người. Ngoài ra, sắc ký lọc gel cũng được nghiên cứu bởi Pattison và Jennifer (1975) [16] và Yoshihiro *et al.* (1982) [17] trong việc tách IgA, IgM, IgG từ huyết thanh và tinh sạch IgA từ sữa non của bò.

Bảng 5. Hàm lượng protein qua các giai đoạn

Phân đoạn	Thể tích (mL)	Protein tổng (mg)
Thô	50,0	3.649±0,006
F (9 - 13)	25,0	1.261±0,015

Hàm lượng protein tổng của phân đoạn F (9 - 13) của sắc ký lọc gel là 1.261 mg, so với hàm lượng protein tổng của mẫu thô là 3.649 mg đã giảm xuống khoảng 2,89 lần. Sau sắc ký đã loại được khá nhiều protein tạp trong mẫu thô.



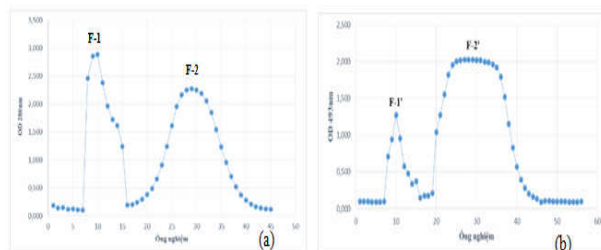
Hình 5. Phổ điện di protein của phân đoạn sắc ký lọc gel Sephadex G-100

* *Chú thích: Thô: pha loãng 100 lần, 9 - 14: pha loãng 10 lần, 15: pha loãng 5 lần, PC: Protein chuẩn.*

Kết quả điện di cho thấy, băng có khối lượng phân tử 150 kDa rất đậm từ ống 9 đến 11, chứng tỏ ở các ống này chứa nhiều IgG. Các ống 12 và 13 thì băng không đậm bằng các ống trước, ống 14 và 15 băng 150 kDa mờ dần và lượng protein tạp xuất hiện càng nhiều. *Nhuộm kháng thể IgG*

Dựa vào kết quả của sắc ký đồ (Hình 6a), cho thấy có sự tách thành 2 đỉnh rõ rệt là F-1 từ ống 8 - 15

và F-2 từ ống 22 - 37. Trong đó, các protein có khối lượng phân tử lớn sẽ nằm ở phân đoạn F-1 và các protein có khối lượng phân tử nhỏ ở phân đoạn F-2.



Hình 6. (a) Sắc ký đồ gel G25 mẫu nhuộm FITC OD 280nm; (b) Sắc ký đồ gel G25 mẫu nhuộm FITC OD 493nm

Khi đo độ hấp phụ của huỳnh quang fluorescein isothiocyanate (FITC) tại bước sóng 493nm, FITC gắn nhãn được với kháng thể thông qua nhóm isothiocyanate liên kết với các nhóm amin [18]. Trong cấu trúc của IgG có nhóm amin nằm ở chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Dựa vào nguyên lý đó mà FITC gắn nhãn được IgG. Đồng thời, IgG có khối lượng phân tử lớn (150 kDa) nên khi cho hỗn hợp qua sắc ký lọc gel thì IgG sẽ được đệm đẩy ra khỏi cột trước ở phân đoạn F-1' từ ống 8 đến ống 15. Độ hấp phụ của huỳnh quang giảm dần đến ống 20 thì bắt đầu tăng lên cho đến ống 39 cho ra phân đoạn F-2'. Tuy nhiên, ở phân đoạn này độ hấp phụ của huỳnh quang còn cao và nhiều do lượng huỳnh quang còn dư trong quá trình kết hợp với IgG hoặc các protein có khối lượng nhỏ có chứa nhóm $-NH_2$ tự do đã liên kết được với FITC.

Bảng 6. Hàm lượng IgG trong phân đoạn F1 sắc ký lọc gel G25

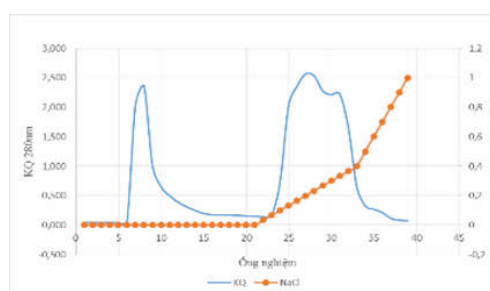
STT ống	OD 280nm	OD 493nm	FITC-IgG (mg/mL)	Thể tích (mL)	Hàm lượng IgG (mg)
8	2,461	0,713	1,33	2	3,16
9	2,856	0,944	1,53	2	3,61
10	2,886	1,277	1,49	2	3,48
11	2,379	0,957	1,31	2	2,92
12	1,961	0,577	1,256	2	2,51
13	1,726	0,477	1,06	2	2,23
14	1,615	0,339	1,069	2	2,14
15	1,244	0,372	0,796	2	1,59

Sau khi nhuộm với huỳnh quang, trong suốt quá trình thu được 216 mg IgG có trong phân đoạn F (9 - 13).

Dựa vào kết quả SDS - PAGE cho thấy, phân đoạn protein từ ống nghiệm số 9 - 13 có sự xuất hiện của IgG với băng protein có khối lượng phân tử 150 kDa và có ít protein tạp hơn so với protein trong các ống nghiệm còn lại của quá trình sắc ký lọc gel Sephadex G-100, mẫu trong các ống nghiệm này được thu và sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

3.5. Tinh sạch IgG bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên gel DEAE Sepharose CL - 6B

IgG có điểm đẳng điện dao động từ 5,8 đến 7,3 nên khi sử dụng dung dịch đệm phosphate 0,1 M pH 7,5 sẽ làm cho IgG sẽ tích điện âm [19]. Tại pH 7,5 các protein có pI lớn hơn 7,5 sẽ tích điện dương và được rửa ra khỏi cột bằng dung dịch đệm, còn các protein có pI nhỏ hơn 7,5 sẽ được các hạt gel giữ lại trong cột và được rửa ra khỏi cột bằng gradient nồng độ muối NaCl 0 - 1 M.



Hình 7. Sắc ký đồ gel DEAE Sepharose CL-6B

Kết quả sắc ký đồ (Hình 7) cho thấy protein của F (9-13) sau quá trình sắc ký trao đổi ion âm trên gel DEAE Sepharose CL-6B tách thành 3 phân đoạn gồm: 1 phân đoạn không bám (UB) và 2 phân đoạn F1, F2. Kết quả này phù hợp với Sedigheh *et al.* (2014) [20] khi sắc ký trên cột DEAE Sepharose CL-6B thu được 2 đỉnh protein đều chứa IgG.

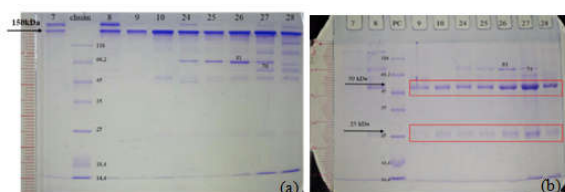
Bảng 7. Sắc ký trên gel DEAE

Phân đoạn	Thể tích (mL)	Protein tổng (mg)	Nồng độ NaCl (M)
UB	20,0	31,5	0,000
F1	25,0	71,2	0,500
F2	20,0	65,9	0,750

Số liệu cho thấy phân đoạn F1 có hàm lượng protein cao hơn phân đoạn UB và F2, cụ thể là hàm lượng protein ở F1 là 71,2 mg trong khi đó UB và F2 lần lượt là 31,5 mg và 65,9 mg. Kết quả này cũng cho

thấy tùy vào lực liên kết của các protein với gel mạnh hay yếu mà chúng được rửa ra khỏi cột ở các nồng độ muối khác nhau [21]. Phân đoạn F1 được rửa giải ra khỏi cột ở nồng độ muối là 0,5 M thấp hơn so với phân đoạn F2 là 0,75 M, chứng tỏ các protein có trong phân đoạn F1 có lực liên kết với gel yếu hơn các protein có trong phân đoạn F2.

IgG được kỳ vọng xuất hiện ở phân đoạn F1 (24 - 28), tuy nhiên kết quả điện di (Hình 8a) cho thấy có sự xuất hiện IgG ở phân đoạn UB (7 - 10). Việc IgG nằm ở phân đoạn không mong muốn có thể do trong quá trình sắc ký đã bơm quá lượng protein mà các hạt gel có thể giữ lại trong cột; vì vậy IgG không được gel giữ lại bị đệm rửa ra ở phân đoạn UB. Ở phân đoạn F1 ngoài băng có khối lượng phân tử là 150 kDa còn có các băng protein tạp có khối lượng phân tử khoảng 70 và 81 kDa.

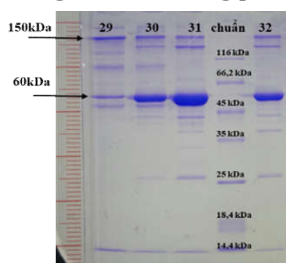


Hình 8. (a) Phổ điện di protein phân đoạn UB (7 - 10) và F1 (24 - 28) gel DEAE Sepharose CL-6B không bổ sung β -mercaptoethanol; (b) Phổ điện di protein phân đoạn UB (7 - 10) và F1 (24 - 28) gel DEAE Sepharose CL-6B không bổ sung β -mercaptoethanol

Kết quả điện di (Hình 8b) cho thấy, cầu nối S-S của IgG trong phân đoạn UB và F1 đã bị β -mercaptoethanol cắt đứt thành các chuỗi 50 kDa và 25 kDa. Kết quả này phù hợp với Phan và Paraf (1987) [22] khi nghiên cứu trên IgG heo và Jun *et al.* (2014) [23] khi nghiên cứu trên huyết thanh người. Ngoài ra, kết quả còn cho thấy có xuất hiện các băng có khối lượng phân tử khoảng 74 và 81 kDa, trùng khớp với khối lượng phân tử của các băng ở hình 8a khi không được bổ sung β -mercaptoethanol.

Kết quả điện di phân đoạn F2 (29 - 32) cho thấy có sự xuất hiện của IgG nhưng băng không đậm màu như phân đoạn UB (7 - 10) và F1 (24 - 28), kéo theo đó là sự xuất hiện của nhiều protein tạp với băng rất đậm và rõ nét ở vị trí có khối lượng phân tử khoảng 60 kDa. Protein này là albumin, chúng có lực liên kết mạnh hơn các protein ở phân đoạn F1 do chúng được rửa giải ở nồng độ muối cao hơn. Theo Wongchuphan *et al.* (2014) [24] trong nghiên cứu loại bỏ albumin sử dụng dung dịch đệm pH 8, lượng

albumin được loại bỏ là 90% và ít nhất 20% IgG nằm trong phân đoạn không bám. Khi khảo sát ở pH 7,5 kết quả điện di cho thấy không loại bỏ được protein này dẫn đến chúng còn nằm trong phân đoạn F2.



Hình 9. Phổ điện di protein phân đoạn F2 (29 - 32) của sắc ký trao đổi ion

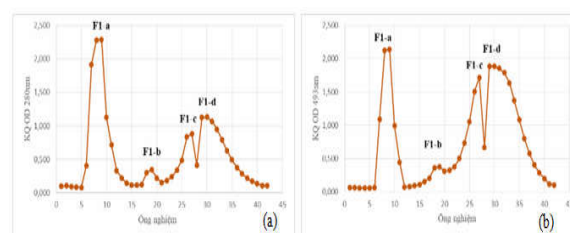
Kết quả của hai hình điện di đều trùng khớp với nghiên cứu của The và Feltkamp (1970) [25] khi sắc ký trên cột gel DEAE thu được 2 phân đoạn đều chứa IgG.

Nhuộm kháng thể IgG

Sau khi mẫu được nhuộm với huỳnh quang và cho qua sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-25, kết quả cho thấy có sự tách thành 4 đỉnh rõ rệt: F1-a, F1-b, F1-c và F1-d (Hình 10a).

Sắc ký đồ hình 10b cho thấy huỳnh quang đã được kết hợp với IgG, do IgG có khối lượng phân tử 150 kDa vì vậy khi huỳnh quang được gắn kết cùng IgG sẽ được đệm rửa ra ở phân đoạn F1-a từ ống 7 - 11, độ hấp phụ huỳnh quang giảm dần đến ống 8 thì

bắt đầu tăng lên cho đến ống 20 cho ra phân đoạn F1-b, độ hấp thụ của huỳnh quang tiếp tục tăng lên tạo ra 2 đỉnh gồm F1-c từ ống 24 - 28 và F1-d từ ống 29 - 36. Ở phân đoạn này độ hấp phụ của huỳnh quang tương đối cao và nhiều do lượng huỳnh quang còn dư trong quá trình kết hợp với IgG hoặc các protein có khối lượng nhỏ có chứa nhóm $-NH_2$ tự do đã liên kết được với FITC.



Hình 10. Sắc ký đồ gel G25 mẫu nhuộm FITC OD 280nm

Sau khi nhuộm với huỳnh quang, cả quá trình thu được 120 mg IgG trong phân đoạn F1.

Tóm lại, sau quá trình sắc ký, thu được 2 phân đoạn F1 và F2 với phân đoạn F2 có hàm lượng protein tổng thấp hơn phân đoạn F1. Kết quả điện di cho thấy ở phân đoạn F1 bằng IgG rất đậm và chứa ít băng protein tạp hơn so với F2, điều này chứng tỏ phân đoạn F1 tinh sạch hơn. Kết quả nhuộm huỳnh quang cho thấy có 120 mg IgG trong phân đoạn F1.

Bảng 8. Hàm lượng IgG trong phân đoạn F1 sắc ký lọc gel G25

STT ống	OD 280nm	OD 493nm	FITC-IgG (mg/mL)	Thể tích (mL)	Hàm lượng IgG (mg)
7	1,917	1,093	1,096	2	2,19
8	2,281	2,127	1,098	2	2,20
9	2,290	2,139	1,101	2	2,20
10	1,124	0,995	0,554	2	1,11

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng khi tiến hành kết tủa với ammonium sulfate ở nồng độ 30% - 40% cho hiệu quả tốt nhất để tiến hành sắc ký. Sau khi sắc ký lọc gel trên gel Sephadex G-100 và sắc ký trao đổi ion âm trên gel DEAE Sepharose CL-6B với hiệu suất thu hồi 6,11%, hàm lượng protein đạt được là 985 mg trong đó hàm lượng IgG được phát hiện bằng phương pháp nhuộm huỳnh quang là 120 mg.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. [4]
- Bertchinger, H. U., and J. M. Fairbrother, 1999. Escherichia coli infections. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (ed.),

- Diseases of swine, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, pp.431-468. [2]
3. Crowell, A. M., M. J. Wall and A. A. Doucette, 2013. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. *Analytica chimica acta*, 79(6): 48-54. [12]
4. Herskovits, T. T., B. Gadegbeku and H. Jailliet, 1970. On the structural stability and solvent denaturation of proteins I. Denaturation by the alcohols and glycols. *Journal of Biological Chemistry*, 245(10): 2588-2598. [8]
5. Hames, B. D., 1998. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach, 3rd edition, New York: Oxford University Press, pp.13-34. [5]
6. Indyk, H. E., J.W. Williams and H. A. Patel, 2008. Analysis of denaturation of bovine IgG by heat and high pressure using an optical biosensor. *International dairy journal*, 18(4): 359-366. [1]
7. Janson, J. C. and L. Rydén, 1997. Protein purification: Principle, High-Resolution method, and Application, 2nd edition, Canada: A John Wiley & Sons, 79-143. [21]
8. Jansson, E. and P. Tengvall, 2004. Adsorption of albumin and IgG to porous and smooth titanium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35: 45-51. [19]
9. Janeway Jr, C. A., P. Travers, M. Walport and M. J. Shlomchik, 2001. The structure of a typical antibody molecule. *In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Garland Science. [10]
10. Jiang, L., L. He and M. Fountoulakis, 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1023(2): 317-320. [9]
11. Jun R., Y. Peng, C. Jingjing and J. Lingyun, 2014. Salt-independent hydrophobic displacement chromatography for antibody purification using cyclodextrin as supermolecular displacer. *Journal of Chromatography A*, 1369: 98-104. [23]
12. Mariam, S. H. S., C. W. Ooi, W. S. Tan, O. A. Janna, A. Arbakariya and B. T. Tey, 2015. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and Purification Technology*, 14(4): 133-138. [14]
13. Mao, 2010. Conjugation of fluorochromes to antibodies. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 72(5): 35-38. [6]
14. Mullins M. J., 2010. Overview of Fluorochromes. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 72(5): 97-105. [18]
15. Nguyễn Đức Lượng, 2004. Công nghệ Enzyme. Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, trang 85-95. [7]
16. Page, M., M. G. Baines and R. Thorpe, 1994. Preparation of purified immunoglobulin G (IgG). *Basic Protein and Peptide Protocols*, 13(2): 407-432. [3]
17. Pattison J. R. and E.M. Jennifer, 1975. Elution patterns of rubella IgM, IgA, and IgG antibodies from a dextran and an agarose gel. *Journal of Clinical Pathology*, 1975(28): 670-673. [16]
18. Phan, T. L. and A. Paraf, 1987. Purification of three porcine immunoglobulin classes from the same biological source. *Annales de Recherches Vétérinaires*, INRA Editions, 18(3): 261-267. [22]
19. Rousseaus, J., G. Biserte and H. Bazin, 1980. The differential enzyme sensitivity of rat immunoglobulin G subclasses to papain and pepsin. *Molecular immunology*, 17(4): 469-482. [11]
20. Scherer, P. and S. F. Fischer, 2010. Debye-Hückel Theory. *In Theoretical Molecular Biophysics*, 21(2): 45-59. [13]
21. Sedigheh, K., H. Zolfagharian, N. M. Dounighi, M. Tebianian and R. Madani, 2014. Study on camel IgG purification: A new approach to prepare Naja Naja Oxiana antivenom as passive immunization for therapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(6):1633-1638. [20]
22. Shapiro, S. S. and J. Martinfz J., 1969. Human prothrombin metabolism in normal man and in hypocoagulable subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 48(7):1292-1298. [15]
23. The, T.H. and T.E.W. Feltkamp, 1970. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies: I. Experiments on the conditions of conjugation. *Immunology*, 18(6): 865-866. [25]
24. Wongchuphan, R., B. T. Tey, W. S. Tan, S. K. Subramanian, F. S. Taip and T. C. Ling, 2011. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. *Process Biochemistry*, 46(1): 101-107. [24]
25. Yoshihiro K., K. Yasuo and T. Tamotsu, 1982. Purification of Secretory IgA from Bovine Colostrum. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(6): 1531-1537. [17]

PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN G (IgG) FROM PIG BLOOD (*Sus domesticus*)

**Nguyen Thi Bao Tran, Le Nhu Quynh, Le Minh Vuong,
Nguyen Thanh Tu, Tao Viet Ha, Cao Ngoc Diep, Vo Van Song Toan**

Summary

The study of Immunoglobulin G (IgG) purification from pig blood (*Sus domesticus*) was performed on three protein precipitation solvents, ethanol, acetone and ammonium sulfate. Then the best solvent and precipitation rate will be selected for gel filtration chromatography on Sephadex G-100 gel and ion exchange chromatography on DEAE CL-6B gel. The analytical results showed that when precipitated with ethanol, acetone and ammonium sulfate at different concentrations, the ammonium sulfate precipitate with a concentration of 30% - 40% was optimal and was chosen to perform gel filtration chromatography on Sephadex gel. G-100. The results obtained a single peak of F (9-13) with a protein content of 1,261 mg with a recovery efficiency of 27% and fluorescence results showed that the obtained IgG content was 216 mg. Fraction F (9-13) of gel filtration chromatography continued to be negative ion exchange chromatography on DEAE Sepharose CL-6B gel, obtained two peaks F1 and F2 with F1 eliminated most albumin, F1 had protein is 985 mg with recovery efficiency of 6.11% and obtained IgG content is 120 mg.

Keywords: *Purification of Immunoglobulin g (IgG) from pig blood (Sus domesticus).*

Người phản biện: PGS.TS. Cù Hữu Phú

Ngày nhận bài: 30/11/2020

Ngày thông qua phản biện: 31/12/2020

Ngày duyệt đăng: 7/01/2021