

## Tiofilna sefaroza 6B

### Opis:

Tiofilna sefaroza 6B jest produktem przeznaczonym do chromatografii tiofilnej w której wykorzystuje się powinowactwo ligandu o strukturze tioetylosulfonowej do grup sulfhydrylowych występujących w białkach. W praktyce efektywne wiązanie białka do złoża następuje tylko przy wysokim stężeniu soli likotropowych, a przy ich braku białko wypływa z kolumny.

Chromatografia tego typu nadaje się szczególnie do oczyszczania białek bogatych w grupy siarkowe. W surowicy zwierzęcej główną frakcją takich białek stanowią immunoglobuliny. Adsorpcja tiofilna znalazła zastosowanie w izolacji dużych ilości przeciwciał z różnych gatunków zwierząt oraz nadaje się do oczyszczania szczególnie trudnych w izolacji przeciwciał monoklonalnych, np. z mysich kultur komórkowych zanieczyszczonych surowicą wołową (*Finger i in., 1996*). Złóża tiofilne mogą być z powodzeniem stosowane do oczyszczania IgY z żółtka jaja.

Złóża tiofilne pozwalają efektywnie izolować przeciwciała monoklonalne dając znacznie lepsze wyniki w porównaniu z innymi technikami chromatograficznymi, takimi jak chromatografia jonowymienna i hydrofobowa, czy też chromatografia z użyciem białka A (*A. Birkenmeier i Kopperschlager (1992)*).

Pojemność wiązania złoża: 8 mg IgG/ml żelu\*.

Warunki przechowywania: +4<sup>0</sup> C

*\*pomiaru dokonano względem IgG króliczych. W przypadku oczyszczania immunoglobulin z innego źródła pojemność wiązania złoża może nieznacznie różnić się od w/w wartości.*

**UWAGA!** Pewne składniki buforów mogą działać silnie drażniąco. Podczas pracy ze wszystkimi związkami chemicznymi należy przestrzegać ogólnie obowiązujących przepisów BHP. Ten produkt został zaprojektowany i wykonany wyłącznie do celów badawczych. Nie został przetestowany w kierunku zastosowania do celów diagnostycznych i do bezpośredniej produkcji leków oraz do celów związanych z produkcją leków.

**Procedura:****Bufor A :** 0.5x PBS pH 7.4 + 0,6 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**Bufor B:** 0.5x PBS pH 7.4

PBS - standardowy 1x, po 2-krotnym rozcieńczeniu - 0.5x. Zamiast PBS można użyć 10-25 mM buforu Tris, HEPES lub innego buforującego w zakresie neutralnym. Bufor powinien być odpowiedni do zachowania stabilności oczyszczanych immunoglobulin (IgG).

**A. Przygotowanie surowicy do oczyszczania immunoglobulin:**

Surowica należy odwirować, następnie rozpuścić K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tak aby końcowe stężenie soli wynosiło 0,6M. Po rozpuszczeniu soli surowicę klarować przez 5 min przy 1000 x g.

**B. Oczyszczanie przeciwciał**

1. Odmierzyć potrzebną objętość Tiofilnej sefarozy 6B w cylindrze (należy odczekać aż żel opadnie i wtedy ewentualnie dodać kolejną porcję aby zminimalizować możliwość błędu), przygotować bufor A.
2. Odpowietrzyć pod próżnią (pompka wodna, pompa próżniowa membranowa) żel oraz bufor.
3. Przygotować 50% zawiesinę tiofilnej sefarozy w falkonie lub butelce (np.: 5 ml żelu + 5 ml buforu). Mieszać delikatnie obracając.
4. Kolumnkę wypełnić wodą lub buforem, następnie otworzyć wylot kolumny. Ponownie zamknąć wylot, gdy ciecz osiągnie poziom o wysokości ok. 1 cm.
5. Zawiesinę 50% złoża wlać delikatnie po bagietce lub po ściance do kolumny o odpowiedniej objętości (jeżeli możliwe, stosować kolumny szerokie i krótkie).
6. Po wstępnym uformowaniu złoża otworzyć wylot kolumny i uzupełnić kolumnę buforem A aż zostanie przemyta objętością buforu równą 10 objętością złoża (w przypadku 5 ml żelu będzie to 50 ml buforu). Można podłączyć wlot kolumny wężykiem z butlą zawierającą bufor A i przemywać grawitacyjnie (butla położona jest wyżej niż kolumna) lub za pomocą pompy perystaltycznej (przepływ wymuszony).
7. **Nakładanie Próby:** Po zrównoważeniu kolumny buforem A (pkt. 6) należy kolumnę odłączyć od butli zasilającej i pozwolić by poziom buforu A w kolumnie opadł do poziomu upakowanego złoża. Zamknąć wylot kolumny i delikatnie wlać do niej surowicę. Otworzyć wylot kolumny. W razie potrzeby dolewać kolejne porcje surowicy (lub podłączyć do kolumny wężykiem butelkę z surowicą, w tym przypadku wyregulować przepływ tak by nie przekraczał 0.5 ml/min).
8. **Odmywanie białek niezwiązanych ze złożem:** Po nałożeniu całej objętości surowicy pozwolić by jej poziom osiągnął poziom złoża i zamknąć wylot kolumny. Dodać 1-2 ml buforu A i otworzyć wylot, pozwolić by bufor osiągnął poziom złoża i operację powtórzyć dwukrotnie. Następnie wypełniać kolumnę buforem (lub wlać bufor tak by przykrywał złoże na 2-5 cm i podłączyć do wylotu wężykiem butlę z buforem A) i przemywać do wymycia niezwiązanych ze złożem białek (ok 10 objętości kolumny, należy jednak pamiętać o ciągłym monitorowaniu

poziomu białek wypływających z kolumny. Przerwać przemywanie dopiero gdy już wszystkie białka niezwiązane ze złożem zostaną usunięte z kolumny).

9. **Elucja przeciwciał:** Pozwolić by bufor A osiągnął poziom złoża, zamknąć wylot kolumny i wlać do niej 1-2 ml buforu B. Otworzyć wylot kolumny, pozwolić by bufor B osiągnął poziom złoża i zamknąć ponownie. Następnie wlać bufor B do kolumny, otworzyć wylot kolumny i zbierać do probówek 1-2 ml frakcje. Elucję prowadzić do przemycia kolumny buforem B o objętości równej 10 X objętości kolumny (dla 5 ml złoża będzie to 50 ml buforu B). Przeciwciała najczęściej eluuje się w obrębie pierwszych trzech objętości kolumny (dla 5 ml żelu = 15 ml).
10. **Oznaczanie stężenia frakcji immunoglobulin:** Oznaczyć stężenie białka w eluowanych frakcjach, obecność i czystość IgG we frakcjach zawierających białko można dodatkowo ocenić za pomocą SDS-PAGE (czyste IgG królicze w warunkach denaturujących występują w postaci dwóch widocznych prążków - 25 i 50 kDa), zebrać frakcje zawierające IgG, a następnie dializować wobec 3 zmian buforu B lub buforu określonego do dalszych eksperymentów.
11. **Regeneracja złoża:** złożę przemyć kolejnymi 10 objętościami buforu B, następnie 10 objętościami wody, następnie zrównoważyć w 5 mM buforze boranowym lub 100 mM Tris, pH 8.0, zawierającym 1M NaCl, oraz 0,05% azydek sodu. Przechowywać w 4stC.