Дослідження сорбційної ємності барвник-афінних сорбентів у процесі очищення фактора VIII зсідання крові

Шурко Н.О., Даниш Т.В.

ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», м. Львів, Україна

Обґрунтування. Хроматографічні методи, зокрема афінна хроматографія, є найефективнішими при одержанні високоочищених білків плазми крові. Особливу групу лігандів для афінної хроматографії становлять активні тріазинові та вініл-сульфонові барвники. На попередніх етапах дослідження нами встановлено, що барвник-афінні сорбенти зв'язують нецільові до фактора VIII (FVIII) білки. Ємність афінного сорбенту визначається як максимальна кількість зразка (білка), що може зв'язатися на колонці за певних умов. Визначення межі адсорбції чи граничної ємності сорбенту дає можливість виявити доцільність його використання для вилучення певного типу білка.

Мета. Дослідження сорбційної ємності барвник-лігандних афінних сорбентів у процесі очищення FVIII.

Матеріали та методи. У роботі використовували такі сорбенти: Diasorb-Procion Blue HB, Diasorb-Procion Gelb M4R і Diasorb-Procion Blue MXR. Як вихідний розчин – кріопреципітат. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда, активність FVIII – уніфікованим одностадійним методом кількісного визначення фактора.

Результати та їх обговорення. Після приготування низки розведень вихідного розчину кріопреципітату дослідили сорбцію нецільових білків та активність FVIII. Наносили різні концентрації білка з розрахунку на 1 см³ сорбенту, щоби підібрати оптимальну концентрацію та не перенаситити колонку: I – 19,74±0,20 мг білка/мл; II – 7,94±0,05 мг білка/мл; III – 3,97±0,05 мг білка/мл; IV – 1,96±0,04 мг білка/мл. Максимальна ємність серед досліджуваних сорбентів становила 14,62±0,04 мг білка / 1 см³ сорбенту для Diasorb-Procion Blue HB. Встановлено, що для досягнення максимального очищення FVIII (найвищої питомої активності) оптимальна кількість білка, що наноситься на 1 мл сорбенту, має бути в межах 4-8 мг білка / 1 см³ сорбенту. Найвищий ступінь очищення становив 19,65 у разі вихідної концентрації білка порядку 4 мг білка/мл для цього самого сорбенту (p≤0,01).

Висновки. Проведено розрахунок сорбційної ємності сорбентів. Продемонстровано, що максимальна ємність досліджуваних сорбентів становить приблизно 15 (14,62±0,04) мг білка / 1 см³ сорбенту.

Ключові слова: барвники-ліганди, сорбційна ємність, фактор VIII зсідання крові.

Investigation of sorption capacity of dye-affinity sorbents in the process of purification of factor VIII coagulation

Shurko N.O., Danysh T.V.

State Institution "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Lviv, Ukraine

Background. Chromatographic methods, in particular affinity chromatography, are the most effective in obtaining highly purified preparations of plasma proteins. The active triazine and vinyl sulfone dyes are the special group of ligands for affinity chromatograph. We found that the dye-affinity sorbents bind non-target to factor VIII (FVIII) proteins in the previous stages of the study. The sorption capacity of the affinity sorbent is defined as the maximum amount of sample (protein) that can bind to the column under certain conditions. Determining the adsorption limit or limiting capacity of the sorbent makes it possible to identify the feasibility of its use to extract a certain type of protein.

Objective. To study the sorption capacity of various dye-ligand affinity sorbents in the process of purification of FVIII.

Materials and methods. We used next sorbents: Diasorb-Procion Blue HB, Diasorb-Procion Gelb M4R and Diasorb-Procion Blue MXR. The cryoprecipitate was initial material. The total protein concentration was determined by the Bradford method, the activity of factors VIII – one-stage clotting method.

Results and discussion. Sorption of non-target proteins and FVIII activity were investigated after preparation of a number of dilutions of the initial solution of cryoprecipitate. Different concentrations of protein were applied per 1 cm³ of sorbent to select the optimal concentration and do not to oversaturate the column: I – 19.74±0.20 mg of protein/ml; II – 7.94±0.05 mg of protein/ml; III – 3.97±0.05 mg of protein/ml; IV – 1.96±0.04 mg of protein/ml. The maximum sorption capacity among the studied sorbents was 14.62±0.04 mg of protein / 1 cm³ for of sorbent Diasorb-Procion Blue HB. It was

found that to achieve maximum purification of FVIII (highest specific activity), the optimal concentration of protein to 1 ml of sorbent should be in the range of 4-8 mg of protein / 1 cm³ of sorbent. The highest degree of purification for these sorbents was 19.65 times at an initial protein concentration of about 4 mg protein/ml ($p \leq 0.01$).

Conclusions. The sorption capacity of sorbents was calculated. It was demonstrated that the maximum sorption capacity is approximately 15 (14.62 ± 0.04) mg of protein / 1 cm³ of sorbent.

Key words: ligand dyes, sorption capacity, factor VIII coagulation.