



УДК 577.152.344

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ ФАКТОРОВ В И \bar{D} АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА

Соляков Л. С., Козлов Л. В.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Разработан простой метод получения фактора В альтернативного пути активации комплемента из сыворотки крови человека с выходом $>40\%$ и чистотой по белку $>80\%$. Высокий выход достигается отказом от фракционирования сульфатом аммония и использованием только двух стадий хроматографического разделения: на СМ-сефадексе С-50 и DEAE-сефарозе СЛ-6В. Дополнительная хроматография на QAE-сефадексе А-50 позволяет получить фактор В 100%-ной чистоты, но с потерей части белка (выход $\sim 20\%$). Из одной из фракций первой стадии очистки фактора В, содержащей фактор D, после повторной хроматографии на СМ-сефадексе С-50 и гель-фильтрации через сефадекс G-75 получен фактор \bar{D} с выходом $>60\%$ и чистотой $\sim 100\%$.

Альтернативный путь активации системы комплемента — важная часть иммунного ответа, особенно на начальном этапе борьбы организма с инфекцией. Инициаторами активации могут быть некоторые бактерии, вирусы, инфицированные вирусом клетки, а также паразиты, т. е. активация может осуществляться при полном отсутствии специфических антител [1]. В активации альтернативного пути участвуют факторы В и D, проявляющие протеолитическую активность в активированной форме. Возможность участия зимогенных форм факторов В и D в активации альтернативного пути рассмотрена нами ранее [2]. Для изучения свойств этих факторов, их активации, проявления ферментативной активности, ингибирования необходимо было разработать эффективные методы получения их высокоочищенных препаратов.

Фактор В — гликопротеин, находящийся в крови в виде неактивного профермента с молекулярным весом 93 000. В ходе активации альтернативного пути пептидная связь Arg-Lys фактора В расщепляется фактором \bar{D} в присутствии C3b и Mg^{2+} [3, 4]. В результате расщепления образуется ферментативно активный фрагмент \bar{Vb} с молекулярным весом 60 000 и освобождается активационный N-концевой пептид Va с молекулярным весом 33 000 [3, 4]. Фактор В содержится в сыворотке в количествах от 200 мг/л [1] до 280 мг/л [5] или несколько выше. Если полагать, что 1 л сыворотки крови человека содержит в среднем 66 г белка, то максимально достижимая степень очистки может составлять 230—330.

В литературе описаны методы выделения фактора В, большинство из которых включает в себя осаждение сульфатом аммония [4—7] и три стадии хроматографического разделения (или хроматографии и гель-фильтрации) [4—9]. Следует отметить метод аффинной хроматографии на анти-В-антителах, связанных с сефарозой [10], содержащий всего две стадии очистки с выходом фактора В 25%. Другой метод, который можно условно отнести к аффинной хроматографии, — выделение фактора В на ДНК-целлюлозе. Метод позволяет получить белок с чистотой 95%, однако состоит из четырех стадий (выход не указан) [7]. Наиболее удачные методы выделения и очистки фактора В, описанные в работах Ниманн и др. [4] и Курмана и соотр. [5], а также Керра [9]. В этих случаях достигается, по видимому, 100%-ная очистка белка. Данных относительно удельной актив-

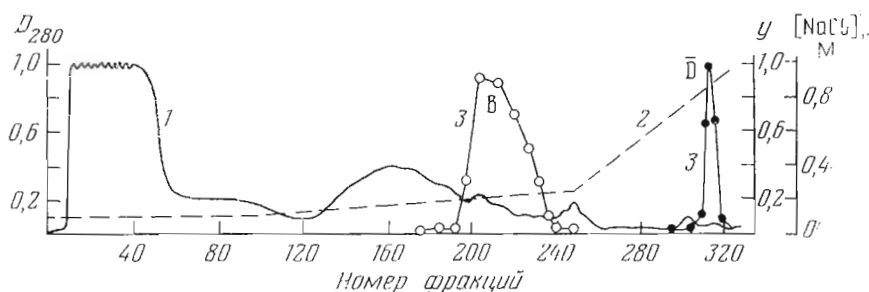


Рис. 1. Хроматография сыворотки на CM-сефадексе С-50: 1 — D_{280} , 2 — градиент концентрации NaCl, 3 — гемолитическая активность (степень лизиса эритроцитов кролика — y)

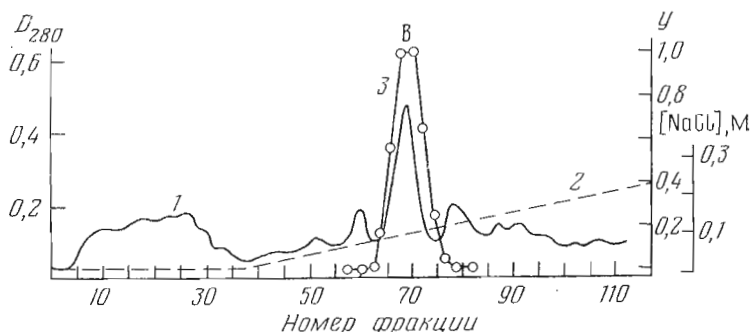


Рис. 2. Хроматография препарата фактора В на DEAE-сефарозе CL-6B (после хроматографии на CM-сефадексе С-50). Обозначения те же, что и на рис. 1

ности препарата нет. В работе Ниманн и др. [4] четыре стадии приводили к 183-кратной очистке белка с выходом 25%, в работе Курмана и др. [5] пять стадий очистки давали выход фактора В 14% со степенью очистки 226. Метод одновременного выделения факторов С2 и В, описанный в работе Керра [9], включает в себя две стадии ионообменной хроматографии и одну аффинной хроматографии на «состаренной» ВгCN-сефарозе (природа сорбента и механизм процесса разделения неясны). Выход фактора В > 20%.

Другой фермент альтернативного пути — фактор \bar{D} обнаружен в сыворотке крови в активированной форме. Зимогенная форма фермента в плазме [11] и в сыворотке крови [2] составляет очень небольшую часть от активного фактора \bar{D} . Поэтому при выделении обычно получают активную форму фактора. Фактор \bar{D} , белок с молекулярным весом 24 000, присутствует в сыворотке крови в концентрации ~ 1 –2 мг/л [12]. Следовательно, ожидаемая степень очистки для фактора \bar{D} может составлять 33 000–66 000.

Методы выделения и очистки фактора \bar{D} [3, 12, 13] основаны на использовании его некоторых физико-химических свойств, а именно низкого молекулярного веса и сравнительно высокой изоточки (pI 7,0 [13] или 7,4 [14]). Поэтому во всех методиках используется гель-фильтрация через сефадекс G-75 и ионообменная хроматография на катионитах (CM-сефадекс С-50 или биорексе 70). Трех-пятистадийные методики [3, 12, 13] позволяют получить фактор \bar{D} с выходом $\sim 20\%$ и активностью 100–200 ед./мкг.

Целью данной работы была разработка простого и эффективного метода выделения и очистки факторов альтернативного пути активации комплемента человека, обладающих ферментативной активностью, В и \bar{D} , со степенью чистоты, достаточной для дальнейших энзимологических исследований. Для лучшей утилизации исходного материала мы решили проводить одновременное выделение обоих факторов и сократить число стадий очистки с целью повышения выхода конечных продуктов. Кроме того, мы полностью исключили стадию фракционирования сыворотки кро-

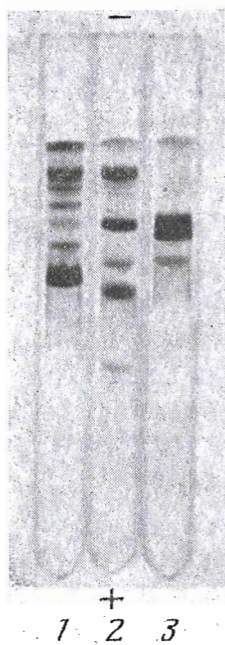


Рис. 3

Рис. 3. Гель-электрофорез с додецилсульфатом натрия исходной сыворотки (1) и препаратов фактора В после хроматографии на СМ-сефадексе С-50 (2) и DEAE-сефарозе CL-6B (3)

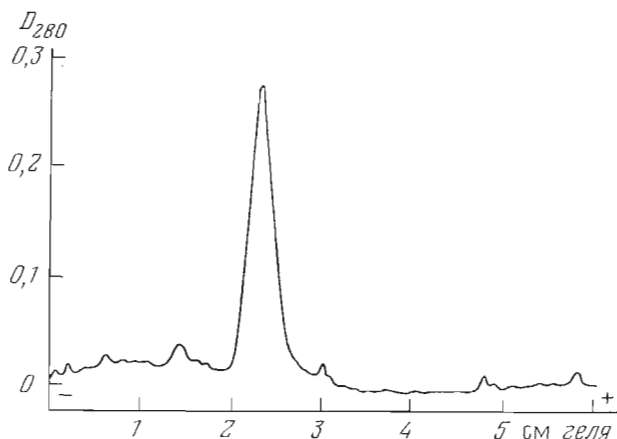


Рис. 4

Рис. 4. Сканирование при 280 нм гель-электрофореграммы после разделения при рН 8,3 препарата фактора В (после хроматографии на DEAE-сефарозе CL-6B)

ви осаждением сульфатом аммония, используемую в большинстве известных методик, поскольку именно на этой стадии происходит основная потеря активности фактора В при выделении.

Первой стадией является хроматографическое разделение сыворотки на СМ-сефадексе С-50 при рН 6,5. Для большей избирательности хроматография проводится вблизи изоэлектрической точки фактора В (рI 6,6 [14]). На рис. 1 видно, что большая часть белков сыворотки выходит, не задерживаясь на колонке. При небольшом повышении ионной силы элюирующего буфера, достигаемом с помощью линейного градиента концентрации NaCl, удается элюировать фактор В с выходом по гемолитической активности ~80%. Дальнейшее увеличение ионной силы раствора при создании более крутого градиента концентрации NaCl позволяет элюировать белок, обладающий активностью фактора D (рис. 1).

Вторая стадия — хроматография на DEAE-сефарозе CL-6B. Перед хроматографией элюат после 1-й стадии, содержащий фактор В, диализовали для снижения ионной силы раствора и создания необходимого рН. При этом происходит дополнительная очистка за счет выпадения в осадок эуглобулинов, которые удаляли центрифугированием. Хроматографическое разделение на DEAE-сефарозе CL-6B проводится также вблизи изоэлектрической точки белка — при рН 6,8 (рис. 2). Гемолитически активная фракция после элюирования с колонки с DEAE-сефарозой CL-6B представляет собой практически чистый фактор В. Выход по активности составил 43% исходной. Содержание белка 30,8 мг (из 200 мл исходной сыворотки) было определено по D_{280} на основании $E_{280}^{1\%}$ 12,7 [5].

На рис. 3 показана очистка фактора В наглядно при сравнении электрофореграмм в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия исходной сыворотки и фракций фактора В после каждой стадии.

Очищенный фактор В был также подвергнут длительному электрофорезу при рН 8,3 в полиакриламидном геле (рис. 4). Электрофореграмма имела одну главную полосу и ряд минорных компонент, которые, по-ви-

Рис. 5. Хроматография на QAE-сефадексе А-50 препарата фактора В (после хроматографии на DEAE-сефарозе CL-6B). Обозначения те же, что и на рис. 1

Рис. 6. Гель-электрофорез с додецилсульфатом натрия препарата фактора В после хроматографии на QAE-сефадексе А-50: 1 — начало пика фактора В, 2 — середина пика, 3 — конец пика

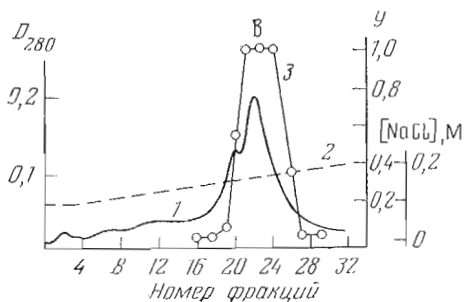


Рис. 5

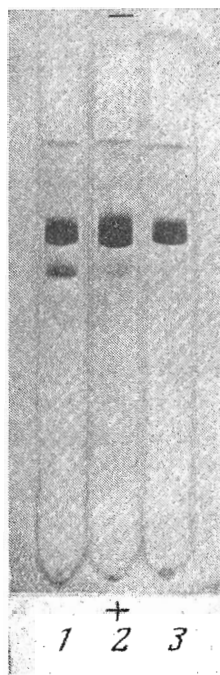


Рис. 6

димому, представляют множественные формы фактора В. Полиморфизм фактора В хорошо известен [5, 15, 16]. Основная полоса (рис. 4) содержит 82% всего количества белка (по поглощению при 280 нм). Фактор В на данной стадии очистки обладал удельной активностью 1217 ед/мг.

100%-ная очистка может быть достигнута ценой потери около половины количества выделенного белка при хроматографии на QAE-сефадексе А-50 (рис. 5). Определение чистоты фактора В во фракциях, соответствующих началу, середине и концу пика, при разделении на QAE-сефадексе А-50 показано на рис. 6. На электрофореграммах в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия видно постепенное уменьшение минорной полосы. В табл. 1 представлена характеристика препарата фактора В на разных стадиях очистки.

Для получения очищенного фактора \bar{D} использовали фракцию, содержащую этот фактор, после 1-й стадии очистки фактора В на CM-сефадексе С-50 (рис. 1), а также фракцию, полученную при хроматографии сывортки на том же ионообменнике с целью получения реагента RD [2] (рис. 7). Объединенные фракции фактора \bar{D} после хроматографии на CM-сефадексе С-50 подвергали повторной хроматографической очистке на том же ионообменнике, но уже в 0,02 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl (т. е. вблизи изоэлектрической точки фактора \bar{D}). Как показано на рис. 8, линейным градиентом концентрации NaCl удается элюировать белок, содержащий активность фактора \bar{D} . После концентрирования ультрафильтрацией фракций, содержащих фактор \bar{D} , была проведена последняя стадия очистки гель-фильтрацией через сефадек G-75 (рис. 9). Полученный препарат фактора \bar{D} , судя по удельной активности — 364 ед/мг белка (количество белка определяли, используя $E_{280}^{1\%}$ 20 [12]), имел чистоту ~100%. Общий выход составил ~65%, а степень очистки ~40 000 (см. табл. 1). Сравнение различных методов очистки факторов В и \bar{D} дано в табл. 2.

Определение гемолитической активности факторов В и \bar{D} проводилось методами, описанными ранее [2], с небольшой модификацией, состоящей в том, что количества реагентов RB и RD в пробах были уменьшены до 0,08 мл. Это позволило повысить чувствительность метода определения фактора В в 1,6–1,7 раза, а фактора \bar{D} — в 1,5 раза. Было обнаружено,

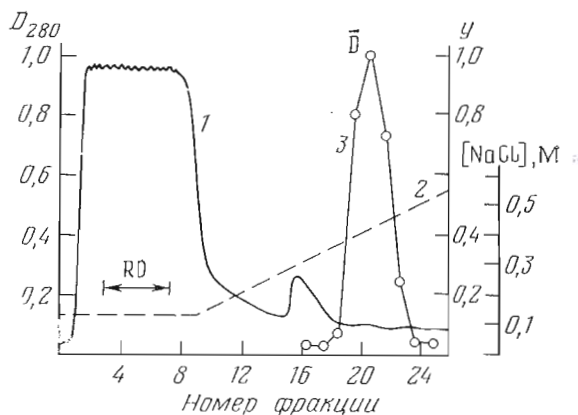


Рис. 7. Получение реагента RD и препарата фактора \bar{D} хроматографией сыворотки на CM-сефадексе С-50. Обозначения те же, что и на рис. 1

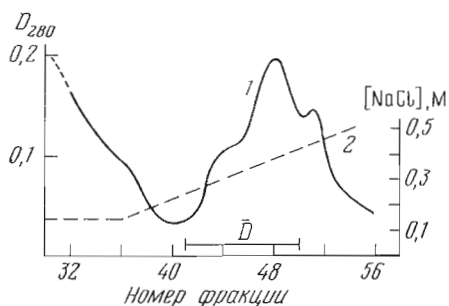


Рис. 8

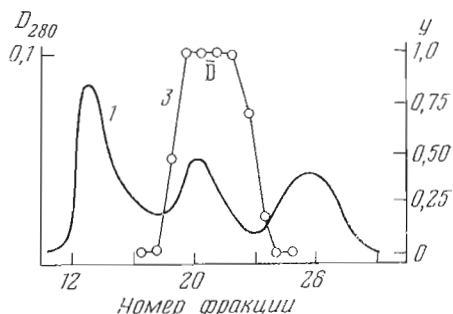


Рис. 9

Рис. 8. Рехроматография на CM-сефадексе С-50 объединенных фракций фактора \bar{D} . Обозначения те же, что и на рис. 1

Рис. 9. Гель-фильтрация через сефадекс G-75 препарата фактора \bar{D} после рехроматографии на CM-сефадексе С-50. Обозначения те же, что и на рис. 1

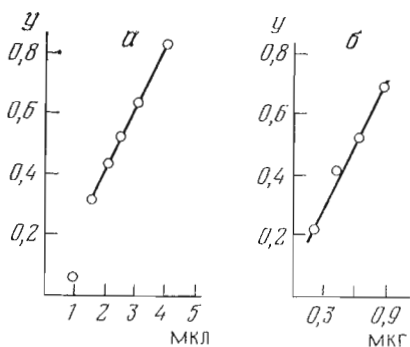


Рис. 10

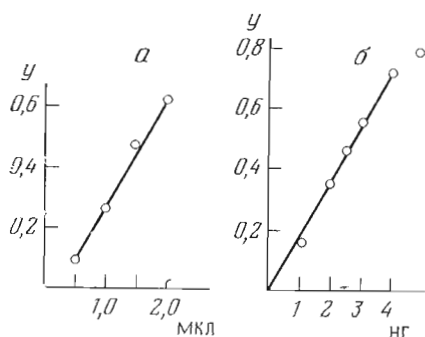


Рис. 11

Рис. 10. Зависимость степени лизиса эритроцитов кролика (y) от количества фактора В: а – сыворотка, б – препарат очищенного фактора В

Рис. 11. Зависимость степени лизиса эритроцитов кролика (y) от количества фактора \bar{D} : а – сыворотка, б – препарат очищенного фактора \bar{D}

что в реагентах содержатся, по-видимому, антитела к эритроцитам кролика, что приводит к их склеиванию и агрегации и тем самым затрудняет реакцию гемоллиза. Поэтому необходим оптимальный подбор количества реагентов. Таким оптимальным количеством оказалось 0,08 мл. На рис. 10 и 11 показаны зависимости степени лизиса (y) от количества факторов В и \bar{D} в сыворотке и очищенных препаратах. Видно, что степень гемоллиза до 80% пропорциональна количеству факторов в пробах.

Очистка факторов В и \bar{D} по стадиям

Фракция	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Активность, ед.	Уд. активность, ед./мг	Выход, %	Чистота, %	Степень очистки
Ф а к т о р В							
Сыворотка	200	13 200	87 000	6,6	100	0,04	1
СМ-сефадекс С-50	295	164	68 600	418,3	79	28	63
DEAE-сефароза CL-6B	45	30,8	37 475	1216,7	43	82	184
QAE-сефадекс А-50 (рис. 6, 3)	Не определялось			1484	20	100	225
Ф а к т о р \bar{D}							
Сыворотка	372	24 550	225 455	9,2	100	0,0025	1
СМ-сефадекс С-50 1-я хроматография	110	Не определялось					
2-я хроматография	30	»					
Сефадекс G-75	8	0,4	145 450	363 600	65	100	40 000

Таблица 2

Сравнение методов очистки факторов В и \bar{D}

Метод	Число стадий	Степень очистки	Уд. активность, ед./мг	Выход, %
Ф а к т о р В				
Курман и др. [5]	5	226	Нет данных	14
Пимати и др. [4]	4	183	То же	25
Данная работа	2	184	1217	43
»	3	225	1484	20
Ф а к т о р \bar{D}				
Лезавр и др. [3]	3	74 000	185 000	19
Дэвис и др. [13]	4	Нет данных		20
Джонсон и др. [12]	5	60 000	102 600	20
Данная работа	3	40 000	363 600	65

Экспериментальная часть

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту и ее натриевую соль (Serva, ФРГ), этиленгликоль-бис(β -аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) фирмы «Sigma» (США), сефадекс G-75, СМ-сефадекс С-50, QAE-сефадекс А-50, DEAE-сефарозу CL-6B (Pharmacia, Швеция), кумасси R-250, акриламид, метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), трис (Merck, ФРГ), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин и $(NH_4)_2S_2O_8$ (Reanal, Венгрия), альбумин бычий сывороточный лиофилизированный марки Б Олайнского завода химреактивов, ϵ -аминокапроновую кислоту того же завода, остальные реактивы (квалификации не ниже ч.д.а.) отечественного производства.

Приготовление изотонического вероналового буфера (VBS), получение сыворотки крови человека описано в работе [17].

Приготовление буфера VBS-Mg-EGTA, эритроцитов кролика, RB описано в работе [2].

Приготовление RD. На колонку (8×1,5 см) с СМ-сефадексом С-50, уравновешенным VBS, рН 7,4, нанесли 22 мл сыворотки, содержащей 10 мМ EGTA, со скоростью 8 мл/ч. Собирали фракции по 4 мл. В не сорбиравшейся на колонке сыворотке определяли гемолитическую активность по альтернативному пути [2]. Фракции с отсутствием активности, но восстанавливающие ее при добавлении раствора фактора \bar{D} использовали в качестве реагента (RD) для определения гемолитической активности фактора \bar{D} . Фактор \bar{D} элюировали с колонки линейным градиентом concentra-

ции NaCl, создаваемым 35 мл VBS, pH 7,4, и 35 мл того же буфера, содержащего 0,55 М NaCl.

Определение гемолитической активности факторов В и \bar{D} [2]. К 0,08 мл реагента (RD или RB) добавляли 0,22 мл тестируемой пробы и 0,2 мл стандартной суспензии эритроцитов кролика в VBS-Mg-EGTA, смесь инкубировали, периодически встряхивая, 60 мин при 37° С, добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали на холоду при 1000—1500 g и измеряли D_{412} против контроля, в который вместо тестируемой пробы вносили 0,22 мл VBS-Mg-EGTA. Стандартная суспензия эритроцитов при полном лизисе в условиях опыта давала D_{412} 1 (0,2 мл суспензии с 2,8 мл воды).

Гель-электрофорез при pH 8,3. Электрофорез по методу Дэвиса [18] проводили в 7% полиакриламидном геле при силе тока 2 мА на трубочку геля в течение 7 ч. Для одного разделения использовали 60—100 мкг белка. После разделения гели фиксировали водным раствором изопронапола (25%) с метапалом (5%) и скапировали при 280 нм на спектрофотометре Gilford 2400-2 (США).

Гель-электрофорез с додецилсульфатом натрия. Электрофорез с додецилсульфатом натрия проводили по методу Вебера и Осборна [19] в 7% полиакриламидном геле при силе тока 8 мА на трубочку геля в течение 4—5 ч. Образцы белка инкубировали в 1% додецилсульфате натрия в течение 1 ч при 37° С без восстанавливающих реагентов. Для одного разделения использовали 100 мкг белка. После проведения электрофореза гели окрашивали кумасси R-250.

Очистка фактора В. 200 мл сыворотки диализовали в течение 24 ч против трех смен (по 1 л) раствора, содержащего 0,02 М фосфатный буфер (pH 6,5), 0,1 М NaCl и 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту. Диализованный раствор центрифугировали при 25 000g в течение 30 мин. Супернатант наносили со скоростью 40 мл/ч на колонку (27×3,8 см) с CM-сефадексом С-50, уравновешенным раствором, против которого проводился диализ. Не связавшиеся на колонке белки отмывали тем же раствором (двумя объемами колонки). Фактор В элюировали линейным градиентом концентрации NaCl: 600 мл того же раствора и 600 мл аналогичного раствора, но содержащего 0,25 М NaCl. Фактор \bar{D} элюировали линейным градиентом концентрации NaCl, создаваемым 300 мл последнего раствора и 300 мл аналогичного раствора, но содержащего 1,0 М NaCl. Скорость элюирования 30 мл/ч. Фракции собирали по 15 мин в течение всей хроматографии. Для определения гемолитической активности факторов В и \bar{D} из каждой фракции отбирали по 10 мкл пробы. Элюат, содержащий активность фактора В (около 300 мл), диализовали в течение 20 ч против двух смен раствора (по 2,5 л), содержащего 0,02 М фосфатный буфер, pH 6,8, и 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту. Осадок эуглобулинов отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 25 000g.

Супернатант наносили со скоростью 55 мл/ч на колонку (35×1,6 см) с DEAE-сефарозой CL-6B (~70 мл), уравновешенной тем же раствором, против которого проводился диализ, и промывали тем же раствором до отсутствия в элюате поглощения при 280 нм. Элюирование фактора В проводили линейным градиентом концентрации NaCl: 175 мл того же раствора и 175 мл такого же раствора, но содержащего 0,2 М NaCl. Скорость элюирования 25 мл/ч. Фракции собирали по 12 мин в течение всей хроматографии. Фактор В элюируется в объеме ~45 мл. Фракцию, содержащую В, диализовали 16 ч против двух смен (по 1 л) раствора, содержащего 0,02 М трис-HCl-буфер, pH 8, 0,1 М NaCl.

Для дополнительной очистки проводили хроматографию на QAE-сефадексе А-50. Раствор фактора В после 2-й стадии очистки (15 мл) наносили со скоростью 10 мл/ч на колонку (30×0,9 см) с QAE-сефадексом А-50, уравновешенным тем же раствором, против которого проводили последний диализ. Фактор В элюировали со скоростью 6 мл/ч линейным градиентом концентрации NaCl: 50 мл исходного раствора и 50 мл того же раствора, но содержащего 0,2 М NaCl. Фракции собирали по 30 мин.

Фактор В сохраняли в последнем буферном растворе при -40° С.

Очистка фактора \bar{D} . Объединенные фракции после первой стадии очистки фактора В и получения RD, содержащие активность фактора \bar{D} , диализовали 20 ч против нескольких смен раствора, содержащего 0,02 М фосфатный буфер (рН 7,4), 0,15 М NaCl и наносили со скоростью 8 мл/ч на колонку (30×0,85 см) с CM-сефадексом С-50, уравновешенным тем же раствором. Фактор \bar{D} элюировали со скоростью 3,3 мл/ч линейным градиентом концентрации NaCl: 30 мл исходного раствора и 30 мл такого же раствора, содержащего 0,5 М NaCl. Фракции собирали по 30 мин в течение всей хроматографии. Фактор \bar{D} элюировался в объеме ~30 мл. Ультрафильтрацией раствор белка концентрировали до 1,5 мл и подвергали гель-фильтрации на колонке (70×0,9 см) с сефадексом G-75, промытым 0,02 М фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, со скоростью 6,4 мл/ч. Собирали фракции по 15 мин. Фактор \bar{D} выходил в объеме ~8,0 мл (D_{280} 0,1).

Фактор \bar{D} хранили без потери гемолитической активности в течение полугода при 4°С в растворе, содержащем 0,02 М фосфатный буфер (рН 7,4), 0,15 М NaCl, 0,02% NaN₃.

ЛИТЕРАТУРА

1. Müller-Eberhard H. J. In: Progress in Immunology IV. Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 1002-1024.
2. Козлов Л. В., Соляков И. С. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 3, с. 342-348.
3. Lesavre P. H., Hugli T. E., Esser A. F., Müller-Eberhard H. J. J. Immunol., 1979, v. 123, № 2, p. 529-534.
4. Niemann M. A., Volanakis J. E., Mole J. E. Biochemistry, 1980, v. 19, № 8, p. 1576-1583.
5. Curman B., Sandberg-Trägårdh L., Peterson P. A. Biochemistry, 1977, v. 16, № 24, p. 5368-5375.
6. Boenisch T., Alper C. A. Biochem. et biophys. acta, 1970, v. 221, № 3, p. 529-535.
7. Gardner W. D., Haselby J. A., Hoch S. O. J. Immunol., 1980, v. 124, № 6, p. 2800-2806.
8. Götzle O., Müller-Eberhard H. J. J. Exp. Med., 1971, v. 134, № 3, pt. 2, p. 90S-108S.
9. Kerr M. A. Biochem. J., 1979, v. 183, № 3, p. 615-622.
10. Andersset M. J., Lambert P. H., Miescher P. A. Immunochemistry, 1974, v. 11, № 1, p. 1-5.
11. Fearon D. T., Austen K. F., Ruddy S. J. Exp. Med., 1974, v. 139, № 2, p. 355-366.
12. Johnson D. M. A., Gagnon J., Reid K. B. M. Biochem. J., 1980, v. 187, № 3, p. 863-874.
13. Davis A. E., Zalut C., Rosen F. S., Alper C. A. Biochemistry, 1979, v. 18, № 23, p. 5082-5087.
14. Fearon D. T., Austen K. F. J. Immunol., 1975, v. 115, № 5, p. 1357-1361.
15. Alper C. A., Boenisch T., Watson L. J. Exp. Med., 1972, v. 135, № 1, p. 68-80.
16. Raum D., Donaldson V. H., Alper C. A., Rosen F. S. In: Progress in Immunology IV. Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 1245-1262.
17. Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Чух В. П., Молчанова Н. Н. Биоорг. химия. 1982, т. 8, № 5, с. 652-659.
18. Davis J. B. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404-427.
19. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 16, p. 4406-4412.

Поступила в редакцию
25.X.1982

EFFICIENT METHOD FOR SIMULTANEOUS ISOLATING HIGHLY PURIFIED FACTORS B AND \bar{D} OF ALTERNATIVE PATHWAY OF COMPLEMENT ACTIVATION FROM HUMAN SERUM

SOLYAKOV L. S., KOZLOV L. V.

M. M. Shemyak'n Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A simple method for isolation from human serum of the complement alternative pathway factor B, in a yield over 40% and purity over 80% with respect to protein, has been developed. Such a high yield was reached due to rejection of ammonium sulphate fractionation and employment of only two chromatographic stages: on CM-Sephadex C-50 and on DEAE-Sephadex CL-6B. An additional chromatography on QAE-Sephadex A-50 provides factor B of 100% purity but with a loss of some amount of protein (yield ~20%). One of the fractions, obtained at the first stage of factor B purification, contained also factor \bar{D} . After rechromatography on CM-Sephadex C-50 and gel filtration on Sephadex G-75 it afforded factor \bar{D} in yield more than 60% and purity about 100%.