

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia instituut

Merit Nikopensius

***STREPTOCOCCUS UBERIS*'E VASTASTE
ANTIKEHADE PUHASTAMINE VERESEERUMIST**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Toonika Rincken, PhD

Kairi Kivirand, PhD

Tartu 2015

Sisukord

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Mikroorganismide leidumine piimas.....	5
1.1.1 <i>S. uberis</i> 'e iseloomustamine.....	5
1.1.2 <i>S. uberis</i> 'e määramine piimas.....	7
1.2 Antigeen.....	7
1.3 Antikehad.....	8
1.3.1 Antikehade puhastamine afiinsuskromatograafia abil.....	10
1.4 NHS-aktiveeritud Sepharose	11
1.5 Valgu kontsentratsiooni määramise meetodid.....	11
1.6 Meetodid antikehade määramiseks.....	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	14
2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid.....	14
2.2 Kasutatud seadmed	14
2.3 Metoodika.....	15
2.3.1 Lahuste valmistamine.....	15
2.3.2 Peptiidi sidumine HiTrap NHS-aktiveeritud Sepharose® HP kolonnile ...	16
2.3.3 <i>S. uberis</i> 'e vastaseid antikehasid sisaldavad küülikute vereseerumid.....	16
2.3.4 Antikehade puhastamine küüliku vereseerumist.....	17
2.3.5 Puhastatud antikehade iseloomustamine	18
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	19
3.1 Immuniseeritud küülikute vereseerumite iseloomustamine	19
3.2 Afiinsuskolonnide valmistamise optimeerimine	20
3.3 Valmistatud afiinsuskolonnide iseloomustamine	21
3.4 Antikehade puhastamine erinevatest vereseerumitest	22
3.5 Puhastatud antikehade iseloomustamine	25
KOKKUVÕTE.....	28
SUMMARY	29
4. KASUTATUD KIRJANDUS	30

TÖÖS KASUTATUD LÜHENDID

ALP – aluseline fosfataas (*alkaline phosphatase*)

BCA – *Bicinchonine acid test*

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumine*)

CFU – kolooniaid moodustav üksus

DMSO – dimetüülsulfoksiid

ELISA – ensüüm-immunosorptsioon analüüs (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

HRP – mädarõika peroksidaas (*horseradish peroxidase*)

Ig – immunoglobuliin

KLH – meriteo *Megathura crenulata* hemotsüaniin (*keyhole limpet hemocyanin*)

NHS – N-hüdrosüsuktsiinimiid

PBS – fosfaatpuhver soolaga

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

SUAM – *Streptococcus uberis* adhesion molecule

TMB – Tetrametüülbensidiin

Tris – tris(hüdrosümetüül)aminmetaan

SISSEJUHATUS

Streptococcus uberis (*S. uberis*) on üks peamisi mastiiti põhjustavaid patogeene. *S. uberis* levib peamiselt looma ümbritseva keskkonna kaudu. Koos *Staphylococcus aureus*'e ja *Escherichia coli*'ga on Eestis *S. uberis* udarapõletiku põhjustaja ligikaudu 50 % juhtudest.

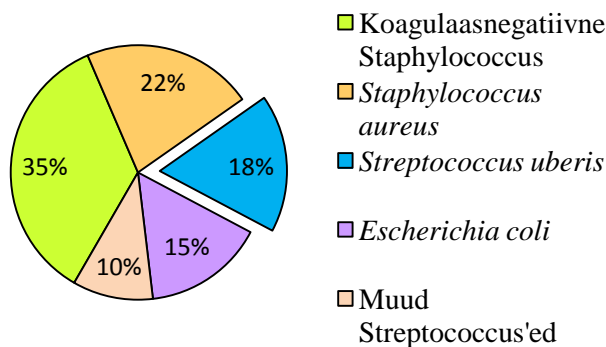
Tartu Ülikoolis uuritakse võimalusi nende patogeenide kiireks koosmääramiseks piimas immunobiosensorsüsteemiga, mis põhineb määratavate patogeenide esmasel sidumisel tahkele kandjale. Seondunud patogeenid määratakse detekteeriva antikehaga. Detekteerivad antikehad, mis tunnevad selektiivselt ära tuvastatava patogeeni, on märgistatud erinevate fluorestsentsmarkeritega.

Kuigi paljude patogeenide jaoks on detekteerivad antikehad kommertsiaalselt olemas, ei ole saadaval *S. uberis*'e vastaseid antikehasid. Sellest tulenevalt toodeti *S. uberis*'e vastased antikehad immunobiosensori äratundmissüsteemi jaoks kohapeal. Käesoleva töö eesmärgiks oli meetodi välja töötamine *S. uberis*'e vastaste antikehade puhastamiseks küülikute vereseerumitest afiinsuskromatograafia abil. Selektiivsete afiinsuskolonnide valmistamiseks seoti eeltäidetud HiTrap NHS-aktiveeritud Sepharose® HP kolonnile *S. uberis*'e adhesioonivalgu antigeensete piirkondade erinevad sünteetilised analoogid, mida oli kasutatud küülikute immuniseerimisel immuunvaste tekitamiseks. *S. uberis*'e vastaste antikehade efektiivsemaks eraldamiseks optimeeriti afiinsuskromatograafia läbiviimise tingimusi.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mikroorganismide leidumine piimas

Piima tootmises on üheks suuremaks probleemiks piimalehmade udarapõletik ehk mastiit, mida põhjustavad peamiselt patogeensed mikroorganismid. Kõige suuremal määral põhjustavad mastiiti stafülokokkuste perekonda kuuluvad patogeenid, mis levivad kontaktnakkuse teel. *Streptococcus uberis* põhjustab ~18 % levinumatest mastiidi juhtudest ning levib peamiselt allapanu kaudu (keskkondlik patogeen). *Escherichia coli* moodustab ~10 % levinumatest mastiidi juhtudest ning kandub edasi samuti looma ümbritseva keskkonna kaudu (Joonis 1). [4]



Joonis 1. Levinumad mastiiti põhjustavad patogeenid Eestis 2014. aasta seisuga [4].

Mikroobse infektsioonina levib mastiit karjas kiiresti ning piimatoodang väheneb hüppeliselt. Mastiidi tagajärjel toimuvad piima koostises mitmed muutused, näiteks toimub piimas kaseiini proteolüüs ja laktoosi hulga vähenemine [1]. Mastiiti haigestunud loomal vähenevad piima kogused, selle kvaliteet halveneb ning piima tootmiskulud suurenevad [2]. Juba korra haigestunud loomal võib mastiit muutuda krooniliseks. Selle vältimiseks on oluline võimalikult kiiresti tuvastada infektsiooni põhjustav patogeen ja määrata spetsiifiline ravi konkreetse patogeeni vastu. [3]

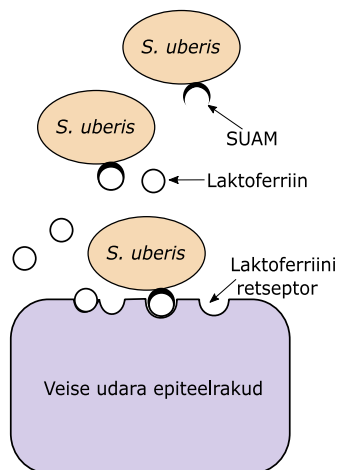
1.1.1 *S. uberis*'e iseloomustamine

S. uberis on grammpositiivne kerakujuline bakter ning kuulub streptokokkide perekonda. *S. uberis*'e peamiseks esinemiskohtadeks on looma nahk, mokad ja udara pind ning looma ümbritsev keskkond.

Organismis tekib *S. uberis*'e bakterite levikul immuunvastus (antikehad). Bakteri raku pinnal eksponeeritult oleva *S. uberis*'e adhesiooni molekuli (SUAM) järjestus on teada ning

SUAM'il on mitmeid immunogeenseid piirkondi (epitoope), kuhu antikehad saavad seonduda. Antikehad seonduvad bakterile bakteri pinnal asuvate immunogeensete piirkondade kaudu. SUAM järjestus on afiinne piima koostises oleva laktoferrini (glükoproteiini) suhtes. [5]

Piima koostises oleval laktoferrinil on oluline roll raua transportimisel organismis. Mastiitses piimas kasvab laktoferrini sisaldus. Laktoferrin seob organismis vaba rauda, mis on hädavajalik teatud bakterite kolooniate arenguks (näiteks *E. coli*). Sellest tulenevalt on laktoferrin antibakteriaalse toimega. *S. uberis* on laktoferrini antibakteriaalsele toimele resistentne, kuna vajab vähesel määral elutegevuseks rauda. Laktoferrin seondub SUAM'i pinnale ning *S. uberis* kasutab laktoferrini kui silda, et seonduda veise udara epiteelkoele (Joonis 2). Antikehad, mis on organismis tekitatud immuunvastuseks SUAM'il asuvate antigeensetele piirkondadele, inhibeerivad SUAM'i seondumist laktoferrinile ja selle edasist seondumist veise udara epiteelile. [6]



Joonis 2. *S. uberis*'e kinnitumine veise udara epiteelkoele laktoferrini abiga [7].

Bakteriaalset infektsiooni hoitakse tavaliselt kontrolli all ravi ja hügieeni nõuete täitmiseega. Sellised meetmed on olnud edukad näiteks *Staphylococcus aureus*'e korral, kuid on andnud halvemaid tulemusi *S. uberis*'e infektsiooniga loomadel, sest haigustekitaja kandub edasi ka loomade kontaktisel kokkupuutel. *S. uberis* püsib keskkonnas elusana kuni 4 nädalat ning bakterite kolooniad paljunevad sageli loomade väljaheidetes [5]. Patogeenide poolt põhjustatud mastiidi esmased haigustunnused ei ole tavaliselt silmaga nähtavad (subkliiniline mastiit), kuid organismi nõrgenedes ilmnevad silmaga nähtavad tunnused (kliiniline mastiit). Organismi nõrgestamine sõltub bakterite tüübist ja nende hulgast ning looma

vastupanuvõimest. Kliinilise mastiidi tunnused ilmnevad ~24 tunniga. Subkliinilist mastiiti on käesoleval ajal võimalik tuvastada vaid laboris [8].

1.1.2 *S. uberis*'e määramine piimas

Patogeene määratakse piimas aeganõudvate mikrobioloogiliste testidega (36–48 h). Sageli võivad analüüsi segada antibiootikumide jäägid proovis, mis takistavad bakterite kolooniate kasvu söötmel.

Teiseks meetodiks mikrobioloogiliste testide kõrval on *S. uberis*'e määramine polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR), mille läbiviimine kestab kuni 6 tundi. Meetodi eeliseks on tundlikkus – patogeene on võimalik tuvastada madalatel kontsentratsioonidel ($3,12 \cdot 10^2$ CFU/ml), kuid PCR ei tee vahet elusal ja surnud mikroorganismil [9]. Suuremate karjade puhul on PCR aga liiga kulukas ning tootjad ei saa seda endale lubada. [3]

Kolmandaks meetodiks on piimas leiduvate patogeeni määramine immunobiosensoritega. Immunobiosensorid on detekteerimissüsteemid, milles kasutatakse äratundmiselemendina antikehasid, mis on immobiliseeritud silikoonist, klaasist või polümeerist valmistatud kandjale [10]. Immunobiosensori viimisel lahusesse toimub antigeeni-antikeha seondumine. Enimkasutatud patogeeni tuvastamismeetodid on elektrokeemilised ja optilised. Immunobiosensoreid on võimalik kasutada kohapeal, reaalajas ja automaatselt. Kui näiteks *S. aureus*'e ja *E. coli* määramiseks on immunobiosensorsüsteemid juba arendamisel, siis *S. uberis*'e määramiseks piimas pole hetkel veel immunobiosensorsüsteemi välja töötatud, sest *S. uberis*'e vastaseid detekteerivaid antikehasid ei ole kommertsiaalselt saadaval. [11]

1.2 Antigeen

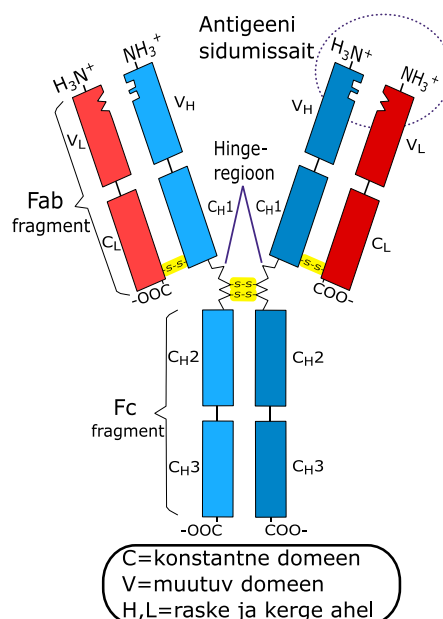
Antigeen on kehavõõras molekul, mis tekitab organismis immuunvastuse (immunogeenid). Kõige sagedamini on antigeenideks valgud ning polüsahhariidid, kuid antigeenideks võivad olla ka lipiidid. Antigeeni ja immunogeeni termineid kasutatakse samas tähenduses. Väiksed molekulid, haptendid, ei tekita sageli organismis immuunvastust, kuid suuremate struktuuridega molekulidele tekib organismis immuunvastus. Antigeeni tunneb ära B-lümfotsüüdi retseptor – immunoglobuliin. Antigeeni immunogeensust mõjutavad mitmed erinevad tegurid. [12]

Väga immunogeensed on molekulid, mille molekulmass on suurem kui 100 kDa, samas alla 5 kDa jäävad molekulid ei ole immunogeensed. Antigeeniks saab olla vaid molekul, mis on organismile võõras. Epitoobiks ehk determinandiks nimetatakse antigeeni piirkonda, mis seob organismis vasteks genereeritud antikeha. Sünteetiliste antigeenide molekulmass on tavaliselt alla 5 kDa ning sellepärast konjugeeritakse sünteetilised epitoobid näiteks veise seerumi albumiiniga (BSA) või meriteo *megathura crenulata* hemotsüaniiniga (KLH) suuremaks kompleksiks. Vastasel korral ei tekiks organismis immuunvastust. [13]

1.3 Antikehad

Antikehad ehk immunoglobuliinid (Ig) on immuunsüsteemiga seotud valgud, mida leidub kõigi selgroogsete veres. Antikehasid toodavad immuunsüsteemi B-lümfotsüüdid ning organism kasutab neid kehavõõraste molekulide ja mikroorganismide vastaseks kaitseks.

Antikeha on Y-kujuline molekul, mis koosneb kahest polüpeptiidipaarist: kaks identset rasket ahelat (H) ja kaks identset kerget ahelat (L). Ahelad on ühendatud disulfiidsildadega. Sarnase struktuuriga antikehade ahelate osasid nimetatakse Ig domeenideks. Ig domeenid koosnevad umbes 110 aminohapest. Raskel ja kergel ahelal on mõlemal üks varieeruv domeen (V_H ja V_L). Kergel ahelal esineb üks konstantne domeen (C_L) ja raskel ahelal kolm (IgG) või neli (IgM) konstantset domeeni (C_H). Raske ahela konstantsete domeenide arv oleneb Ig klassist (Joonis 3). [14]



Joonis 3. IgG tüüpi antikeha struktuur [15].

Antikehadel on kaks seondumise piirkonda (paratoopi), mis tunnevad ära antigeeni vastava antigeense ala. Paratoobid asuvad antigeeni siduvatel Fab fragmentidel (ingl. k. *fragment antigen binding*) (Joonis 3). Seandumine, mille käigus moodustub antigeen-antikeha immunokompleks, leiab aset tänu ioonsetele, hüdrofoobsetele ja Van der Waalsi jõududele. Antikehade seandumist antigeeniga iseloomustatakse afiinsuskonstandi ja aviidsusega. Afiinsus iseloomustab antikeha ja antigeeni seandumise tugevust. Aviidsus (funktsionaalne afiinsus) sõltub antikeha valentsusest ning antikeha võimest seonduda mitme epitoobiga samal antigeenil. Mida rohkem epitoope antikehaga seondub, seda kõrgem on aviidsus. [16]

Antikehade spetsiifiline seandumine tuleneb nende varieeruva osa aminohappelisest järjestusest ning toimub luku-võtme süsteemi alusel. Antigeen-antikeha seandumised on pöörduvad. [17]

Antikeha fragmenti, mille abil toimub antikeha seandumine Fc retseptoriga immuunrakkudel, kutsutakse baasfragmentiks Fc (ingl. k. *fragment crystallizable*) (Joonis 3). Fc fragment täidab olulist rolli immunokeemilistes protsessides [18]. Antikeha paindlikkus on tingitud CH₁ ja CH₂ domeenide vahelisest alast, mida kutsutakse hinge regiooniks. Paindlikkus tagab antikeha sidumiskohtade iseseisva liikumise – antikeha võib moodustada ka T kujulise struktuuri. [12]

Lähtudes antikeha päritolust eristatakse mono- ja polükloonaalseid antikehasid. Enamikel antigeenidel on mitu epitoopi, mida tunnevad ära erinevad B-lümfotsüüdid. Vasteks tekivad polükloonaalsed antikehad, mis saavad seonduda erinevate või mitme epitoobiga. Monokloonaalsed antikehad on tekitatud vaid ühe B-lümfotsüüdi järglaskonnast ning antikeha seondub ühe epitoopse piirkonnaga antigeeni molekulil. Monokloonaalsed antikehad on omavahel identsed ja kindla seandumisspetsiifikaga. [19]

Antikehad jaotatakse klassidesse, mis on määratud raske ahelaga. Rasked ahelad erinevad üksteisest struktuuri ja antigeensuse poolest. Imetajatel on esindatud viis erinevat antikehade klassi: IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE, (Tabel 1). IgG, IgD ja IgE esinevad monomeeridena, IgA dimeerina ning IgM pentameerina. Tähtsaim immunoglobuliinide klass on IgG, mis moodustab ligikaudu 80 % vereseerumi immunoglobuliinide koguhulgast. IgA 10-13 %, IgM 5-8 % ja IgD ning IgE sisaldus immunoglobuliinide koguhulgast jääb alla 1 %. Antikehade afiinsuskonstant K_a jääb vahemikku 10^7 - 10^{11} . [15]

Tabel 1. Antikehade klassid [13].

Klass	Raske ahel	Alamklass	Molekulmass (kDa)
IgG	gamma (γ)	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	152
IgA	alfa (α)	α_1, α_2	160
IgM	müü (μ)	-	970
IgD	delta (δ)	-	184
IgE	epsilon (ϵ)	-	188

1.3.1 Antikehade puhastamine afiinsuskromatograafia abil

Antikehade puhastamiseks kasutatakse afiinsuskromatograafiat, mis põhineb immunospetsiifilisel seandumisel. Afiinsuskromatograafia on vedelikkromatograafia alaliik, mille korral eraldatavad antikehad seotakse selektiivselt ligandidele, mis on kovalentselt seotud kolonni statsionaarsele faasile. Puhastada on võimalik kõiki antikehasid, mis seonduvad antigeeni epitoopidega, olenemata antikeha klassist. [20]

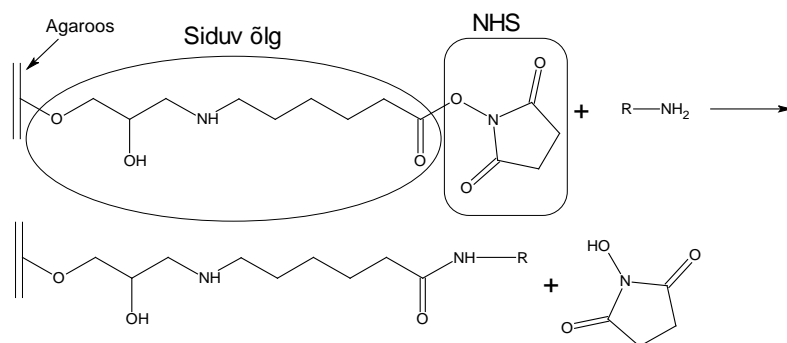
Afiinsuskromatograafias kasutatakse statsionaarse faasina hüdrofiilset polüsahhariididest geeli näiteks ristseotud agarosi või dekstraani. Geeli juures on oluline keemiline ja mehaaniline stabiilsus (peab vastu puhastustingimustele ja kõrgematele voolukiirustele). Geel peab olema vähese mittespetsiifilise seandumisvõimega, et ei toimuks biomolekulide mittespetsiifilist seandumist. Ligandi saab siduda otse polüsahhariidi pinnale hüdroksüülrühmade kaudu, kuid geelile saab kinnitada ka siduvad õlad. Siduvate õlgade lisamisel suureneb spetsiifiliste ligandide (näiteks antigeenide epitoopide) kovalentne sidumine. Ligandi immobiliseerimisel moodustuv kovalentne side peab olema stabiilne nii analüüsi ajal kui ka kolonni puhastamise käigus. [21]

Puhastatav antikeha peab seonduma kolonnile spetsiifiliselt, kuid pöörduvalt. Kui seondumine on liiga tugev, muutuvad elueerimistingimused mittesobivaks (pH liiga madal) ning antikeha bioaktiivsus väheneb või kaob üldse. [21]

Ligandi sidumiseks kolonni kasutatakse mitmeid meetodeid. Näiteks tsüanogeen bromiidiga (CNBr) aktiveeritud afiinsuskoloni, mille korral ei ole võimalik kasutada väga madalat pH'd või N-hüdroksüsuksüinimiidiga (NHS) aktiveeritud Sepharose koloni, kui on vaja kasutada madalama pH-ga elueerimistingimusi. [22]

1.4 NHS-aktiveeritud Sepharose

Väiksema molekulmassiga ligandide immobiliseerimiseks kasutatakse tavaliselt N-hüdrosüsuktsiinimiidiga (NHS) aktiveeritud Sepharose HP kolonni. Ligandi seondumine toimub aminorühma kaudu (Joonis 4). Sepharose maatriks koosneb ristseotud agarooosi kerakujulistest graanulitest, mis tagavad geeli tugevuse. Agarooosi pinnal on 10-aatomilised siduvad õlad, mis seotakse maatriksiga epiklorohüdrini abil ja karboksüülrühm aktiveeritakse seejärel NHS-iga. [22]



Joonis 4. Peptiidi sidumine NHS-aktiveeritud agarosile [22].

Nukleofiilse rünnaku tagajärjel seondub ligandi (peptiidi) aminorühm estersidemele ning moodustub stabiilne peptiidside (Joonis 4). Peptiidside on stabiilne kuni pH väärtuseni 13, seega saab NHS-aktiveeritud agarooosi kasutada ka kõrgematel pH väärtustel. [22]

1.5 Valgu kontsentratsiooni määramise meetodid

Valgu kontsentratsiooni on võimalik määrata mitmete erinevate meetoditega, millest kõige tuntumad on kiirguse neeldumise mõõtmine UV alas ning Lowry, Bradfordi ja BCA (ingl. k. *bicinchonine acid test*) meetodid.

Kiirguse neeldumist on võimalik mõõta UV alas spektrofotomeetriliselt. Suureks eeliseks on meetodi lihtsus ning lisareagentidevaba keskkond. Kiirguse neeldumist mõõdetakse optimaalse neeldumismaksimumi juures lainepikkusel 280 nm. Neeldumine lainepikkusel 280 nm on põhjustatud valgus olevate türosiini ja trüptofaani aromaatsetest rühmadest ja vähesel määral fenüülalaniini aromaatsetest rühmadest ning tsüsteiini jääkide disulfiidsidemetest. Määramispiirkond on vahemikus 0,1–3 mg/ml kohta. [23]

Lowry meetod põhineb kahel reaktsioonil. Biureedi reaktsioon viiakse läbi biureedi reagentiga. Aluselises keskkonnas reageerivad valkude peptiidsidemed Cu²⁺ ning tekib Cu⁺.

Cu^+ reageerib Folini reagentiga. Folin-Ciocalteu reaktsiooni käigus toimub valgu aminohappe jääkides olevate aromaatsete tuumade oksüdatsioon ning lahus, sõltuvalt valkude kontsentratsioonist, omandab sinise värvuse. Valguse neeldumist mõõdetakse lainepikkusel 750 nm. Meetod on aeganõudev ning mõõtmist võivad segada mõningad puhverlahused näiteks tris(hüdroksümetüül)aminometaan (Tris). Määramispiirkond on vahemikus 0,2–1,5 mg/ml kohta. [23,24]

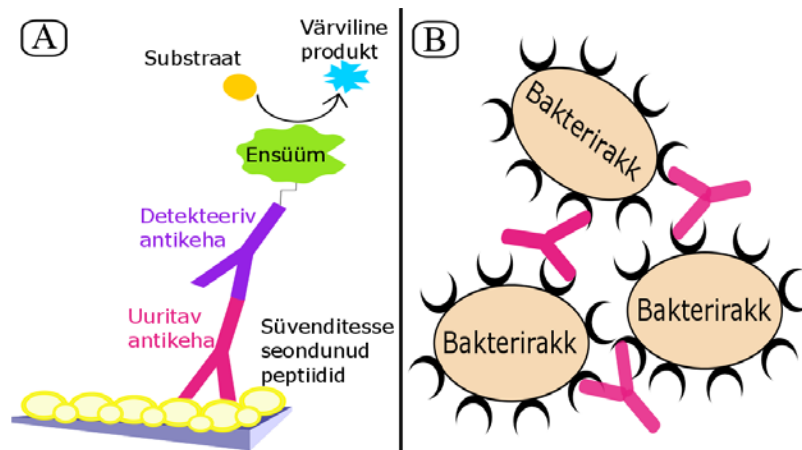
Bradfordi meetod põhineb Coomassie briljantsinise G250 värvaine kasutamisel, mis seondub arginiini, trüptofaani, türosiini, histidiini ja fenüülalaniini jääkide külge. Värvaine seondumine valgule põhjustab valguse neeldumismaksimumi nihkumist lainepikkuselt 470 nm lainepikkusele 595 nm. Meetodi eeliseks on kiirus. Tavaliselt valitakse standardaineiks BSA, millega koostatakse kalibreerimisgraafik. Meetodi üheks oluliseks puuduseks on vaba ja seotud värvaine valguse neeldumismaksimumide osaline kattumine, mille tagajärjel ei pruugi valgu kontsentratsiooni ja valguse neelduvuse vaheline sõltuvus olla lineaarne. Teiseks seondub värvaine eelkõige arginiinile, millest tingitult sõltub tulemus arginiini jääkide sisaldusest valgus. Sellise valgu määramise meetodi puuduseks on ka värvaine adsorbeerumine kvartsist küveti pinnale, mistõttu ei ole võimalik analüüse läbi viia kvartsküvetidega. Määramispiirkond on vahemikus 0,2–1,4 mg/ml kohta. [23,24]

BCA meetod sarnaneb eelpool kirjeldatud Lowry meetodiga. BCA meetodi korral on tekkinud Cu^{2+} hulk proportsionaalses vahekorras lahuses oleva valguga. Valgulise koostisega lahus värvub lillakaks ning proovide valguse neelduvust mõõdetakse lainepikkusel 562 nm. Temperatuuriks valitakse 60 °C, sest sellel temperatuuril tõuseb valgu kontsentratsiooni määramise tundlikkus ja väheneb sõltuvus valgu koostisest. BCA meetodil on vähem segavaid faktoreid kui Lowry'l. Määramispiirkond on vahemikus 0,2–1,0 mg/ml kohta. [23,24]

1.6 Meetodid antikehade määramiseks

Antikehasid on võimalik määrata ELISA (ingl. k. *enzyme-linked immunosorbent assay*) testiga, mis põhineb antigeen-antikeha seandumisel. Antigeeni sünteetilised epitoobid kantakse hüdrofoobse polüstüreenist valmistatud plaadi süvenditesse. Seejärel blokeeritakse peptiidi poolt katmata jäänud alad mittespetsiifilise valguga (näiteks BSA). Uuritav antikeha lisatakse süvenditesse, et toimuks seondumine spetsiifilise antigeeni sünteetilise epitoobiga. Pärast antikeha seandumist antigeeniga pestakse plaate mitteseondunud antikehade eemaldamiseks. Seejärel märgistatakse antikehad detekteeriva antikehaga, millele on

eelnevalt seotud ensüümmärgis. Ensüümidest kasutatakse tavaliselt mädarõika peroksüdaasi HRP (ingl. k. *horseradish peroxidase*) või aluselist fosfataasi ALP (ingl. k. *alkaline phosphatase*). Analüüsi käigus reageerib ensüüm substraadiga (näiteks tetrametüülbensidiin TMB) ja lahus värvub siniseks. Sinine värvus muutub kollaseks pärast stopp-lahuse lisamist (lisatakse näiteks H_2SO_4). Stopp-lahus lisatakse selleks, et peatada ensüümi reaktsioon ja stabiliseerimaks lahuse värvuse muutumist. Värvuse intensiivsust mõõdetakse spektrofotomeetriliselt ning intensiivsus on võrdeline proovis sisalduva uuritava antikehaga (Joonis 5A). Kui proov ei sisalda uuritavat antikeha, siis jääb lahus värvituks. [25]



Joonis 5. A: ELISA illustreeriv skeem, B: aglutinatsiooni testi illustreeriv skeem

Aglutinatsioon on antigeen-antikeha reaktsioon, mille käigus antikeha seondub talle omase eptioobiga bakteri raku pinnal. Seondumine leiab aset elektrolüüdi juuresolekul, kindlal temperatuuril ja pH-l – toimub ristseondumine ning tekivad nähtavad osakeste klombid (Joonis 5B). Aglutinatsioon on nähtav, kui antigeene ei ole võrreldes antikehadega suures ülehulgas. Aglutinatsiooni reaktsioon on sarnane sadenemisele. Erinevus seisneb selles, et antigeeni eptioobid peavad olema antikehadele kättesaadaval. Aglutinatsiooni test viiakse läbi erinevate lahjendusseriatega, kus antigeeni kontsentratsioon jääb samaks või vastupidi. Antigeen-antikeha omavahelist seondumist detekteeritakse mikroskoobiga. [26]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud reaktiivid ja materjalid

- 1) Etanoolamiin (C_2H_7NO), 99,5 % AppliChem
- 2) Dinaatriumvesinikfosfaat (Na_2HPO_4), 99 % Sigma Aldrich
- 3) Naatriumkarbonaat-dekahüdraat ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$), 99 % AppliChem
- 4) Naatriumkloriid ($NaCl$), 99,9 % AppliChem
- 5) Kaaliumkloriid (KCl), 99,5 % Reachim
- 6) Dikaaliumvesinikfosfaat (K_2HPO_4), 99,5 % AppliChem
- 7) Vesinikkloriidhape (HCl), 35-38 % Reachim
- 8) Glütsiin ($C_2H_5NO_2$), 99,5 % AppliChem
- 9) Tris(hüdrosümetüül)aminmetaan ($C_4H_{11}NO_3$), 99,2 % Scharlau
- 10) Etaanhape (CH_3COOH), 90 % Reachim
- 11) Naatriumasiid (NaN_3), 90 % MERCK
- 12) Veise seerumi albumiin (BSA), A8022, Lot nr Slep 4122v, Sigma Aldrich
- 13) Dimetüülsulfoksiid (DMSO) (C_2H_6OS), 98 % AppliChem
- 14) Tetrametüülbensidiin (TMB) ($C_{16}H_{20}N_2$), 98 % Sigma Aldrich
- 15) Vesinikperoksiid (H_2O_2), 30 % AppliChem
- 16) Tween® 20 ($C_{26}H_{50}O_{10}$), BioTop
- 17) Sidrunhape ($C_6H_8O_7$), 99,5 %, Sigma Aldrich
- 18) HRP-anti-rabbit immunoglobulins, P0488, LOT nr 20003813, 0,3 g/l, Dako
- 19) Väävelhape (H_2SO_4), 98 %, Reachim
- 20) HiTrap NHS-aktiveeritud Sepharose® HP kolonn, GE Healthcare
- 21) Nunc-Immuno Plate MaxiSorp, Sigma Aldrich

2.2 Kasutatud seadmed

- 1) ÄKTApurifier UPC 10, UV monitor UPC-900 (GE Healthcare)
- 2) UV 1800 UV-Vis Spektrofotomeeter (Shimadzu corporation)
- 3) pH-meeter (Mettler Toledo)
- 4) Vortex segaja (Heidolph)
- 5) Analüütiline kaal XS105 Dual Range (Mettler Toledo)
- 6) Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
- 7) The Brightfield green LED illumination through 0,55 NA condenser 40x NA 0,95 (Olympus)
- 8) Multiskan MCC/340 (Labsystems)

2.3 Metoodika

2.3.1 Lahuste valmistamine

Kõikide lahuste valmistamisel kasutati ülipuhast Milli-Q vett (eritakistus 18,2 MΩ·cm). Puhverlahuste pH määrati pH-meetriga, täpsusega ±0,02 ühikut. Puhverlahuseid säilitati temperatuuril +4 °C. Reagendid kaaluti analüütilise kaaluga, täpsusega ±0,01 mg.

NHS-aktiveeritud Sepharose[®] HP kolonni ettevalmistamisel ja antikehade puhastamisel vereseerumist kasutati järgmiseid lahuseid:

- 1) seondumispuhver: 0,2 M Na₂CO₃·10H₂O 0,5 M NaCl pH 8,3;
- 2) A₁ lahus: 0,5 M etanoolamiin 0,5 M NaCl pH 8,3;
- 3) B₁ puhver: 0,1 M CH₃COOH 0,5 M NaCl pH 4,0;
- 4) kolonni neutraliseerimispuhver: 50 mM Na₂HPO₄ pH 7,0;
- 5) hoiustamispuhver: 50 mM Na₂HPO₄ pH 7,0 (0,1 % asiidiga);
- 6) A₂ puhver: 20 mM Na₂HPO₄ 0,15 M NaCl pH 7,4;
- 7) B₂ puhver: 100 mM glütsiin pH 2,5;
- 8) antikehadega fraktsiooni neutraliseerimispuhver: 1 M Tris pH 9,0.

ELISA testis kasutati järgmiseid lahuseid:

- 1) karbonaatpuhver: 0,05 M Na₂CO₃·10H₂O pH 9,6;
- 2) PBS (fosfaatpuhver soolaga): 10 mM Na₂PO₄; 2 mM K₂HPO₄; 140 mM NaCl; 3 mM KCl pH 7,4;
- 3) 0,1 M atsetaat-tsitraat puhver (pH 6).

2.3.2 Peptiidi sidumine HiTrap NHS-aktiveeritud Sepharose® HP kolonnile

Peptiidi sidumiseks kasutati 1 ml HiTrap NHS-aktiveeritud Sepharose® HP kolonni (GE Healthcare). Peptiidi sidumine afiinsuskolonnile viidi läbi toatemperatuuril. Peptiidi kaaluti 7,5 või 15 mg ja lahustati seondumispuhvril (0,2 M karbonaatpuhver 0,5 M NaCl pH 8,3). Afiinsuskolonna hoiustamiseks kasutatava 100 % isopropanooli eraldamiseks pesti afiinsuskolonna esmalt kuue kolonni ruumala jääkülma 1 mM HCl voolukiirusega 0,25 ml/min. Peptiid sisestati kolonni voolukiirusega 0,1 ml/min ja inkubeeriti 30 min. Seejärel alustati kolonni voolutamist (voolukiirusel 0,3 ml/min) mitteseondunud peptiidi eraldamiseks ja vabade aktiivsete sidumiskohtade inaktiveerimiseks A₁ lahuse (0,5 M etanoolamiin 0,5 M NaCl pH 8,3) ja B₁ puhvriga (0,1 M CH₃COOH 0,5 M NaCl pH 4,0) järgneva protokollil alusel:

- 1) 6 kolonni ruumala A₁ lahust
- 2) 6 kolonni ruumala B₁ puhvrit
- 3) 6 kolonni ruumala A₁ lahust
- 4) inkubeeriti 30 minutit
- 5) 6 kolonni ruumala B₁ puhvrit
- 6) 6 kolonni ruumala A₁ lahust

Afiinsuskolonne säilitati temperatuuril +4 °C 50 mM Na₂HPO₄ puhvril (pH 7), millele oli bakteri kasvu pidurdamiseks lisatud 0,1 % asiidi.

2.3.3 *S. uberis*'e vastaseid antikehasid sisaldavad küülikute vereseerumid

Küülikute immuniseerimine ja vereseerumite valmistamine viidi läbi firmas LabAs Ltd. Küülikute immuniseerimiseks kasutati Kaisa Mikhlepa poolt sünteesitud kolme peptiidi, mille aminohapete jääkide järjestus oli järgmine: CSAPVYLGVSTE (I peptiid), CDQGVVAKVADN (II peptiid) ja CPPFNYNQPGKNGHIG (III peptiid). Peptiidideks valiti *S. uberis*'e membraanil asuva SUAM valgu antigeensed järjestused, millel olid võimalikult kõrged antigeensuse skoorid [31]. Kuna peptiidide molekulmass oli immuniseerimiseks liiga väike, siis konjugeeriti peptiidid KLH-ga. Immuniseerimine viidi läbi kolme küülikuga ning igale küülikule süstiti ühte peptiidi kolm korda kolme nädalase vahega. Küülikutel, kellel esines immuunvastus, eraldati veri ja valmistati vereseerum.

2.3.4 Antikehade puhastamine küüliku vereseerumist

Antikehade puhastamiseks kasutati peptiididega ettevalmistatud afiinsuskolonne, mis olid ühendatud ÄKTApurifier UPC 10 süsteemiga. Vereseerum (25 ml) jaotati väiksemateks osadeks (1, 2, 3 ml) ning hoiti puhastamiseni temperatuuril $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enne puhastamist sulatati vereseerum $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Küüliku vereseerumit tsentrifugeeriti võimalike valguagregaatide eraldamiseks 10 min ($10\,000\text{ g}$) ning seejärel lahjendati A_2 puhverlahusega ($20\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $0,15\text{ M NaCl}$ pH 7,4). Vereproovide lahjendused olid järgnevad: 25, 33, 40, 50, 100 %. Antikehade puhastamiseks kasutati A_2 ja B_2 (100 mM glütsiin pH 2,5) puhvreid ning kasutati järgnevat protokollit:

- 1) afiinsuskolonn tasakaalustati A_2 puhvriga;
- 2) 2 ml vereseerumit sisaldavat proovi sisestati afiinsuskoloni;
- 3) afiinsuskolonnist pesti A_2 puhvriga välja mittespetsiifiliselt seondunud fraktsioon;
- 4) seondunud antikeha elueeriti kolonnist B_2 puhvriga;
- 5) afiinsuskolonn pesti ja tasakaalustati uuesti A_2 puhvriga.

Fraktsioonid koguti 0,3 ml kaupa 1,5 ml plastiktuubidesse ning neutraliseeriti 1 M Tris puhvriga (pH 9,0). Afiinsuskoloni väljavoolu monitooriti lainepikkusel 280 nm ning fraktsioonide kogumist alustati, kui neelduvuse intensiivsus ületas 5 mAU, ning lõpetati, kui neelduvuse intensiivsus langes alla 20 mAU.

Puhastatud antikehade kontsentratsiooni hinnati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 280 nm. Kontsentratsiooni määramisel arvestati, et IgG optiline tihedus 1 mg/ml kohta ($b = 1\text{ cm}$) lainepikkusel 280 nm on 1,37 [28]. Kontsentratsiooni määramisel UV spektrofotomeetriga võeti null-lahuseks B_2 puhver ning kontsentratsioon määrati enne antikehade lahuste neutraliseerimist 1 M Tris puhvriga (pH 9,0).

2.3.5 Puhastatud antikehade iseloomustamine

ELISA meetodit kasutades määrati antikehade spetsiifilisus sünteesitud peptiidide suhtes. ELISA plaadi (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp) süvendid täideti sünteesitud peptiidide lahustega (10 µg/ml) 0,05 M karbonaatpuhvrts (pH 9,6) ja inkubeeriti üleöö temperatuuril +4 °C. Karbonaatpuhver eemaldati süvenditest ning sünteesitud peptiidide poolt katmata jäänud alad blokeeriti 3 %-lise BSA-ga, mis lahustati PBS puhvrts (10 mM Na₂PO₄; 2 mM K₂HPO₄; 140 mM NaCl; 3 mM KCl pH 7,4). ELISA plaati inkubeeriti 30 minutit. Seejärel pesti süvendeid 3 korda PBS puhvrtsiga, mis sisaldas 0,1 % Tween® 20. Süvenditesse lisati 100 µl puhastatud antikehade lahust (100 mM glütsiinpuhvrts (pH 2,5) ja neutraliseerimiseks lisatud 1 M Tris puhvrts (pH 9,0)) ning inkubeeriti 1 tund.

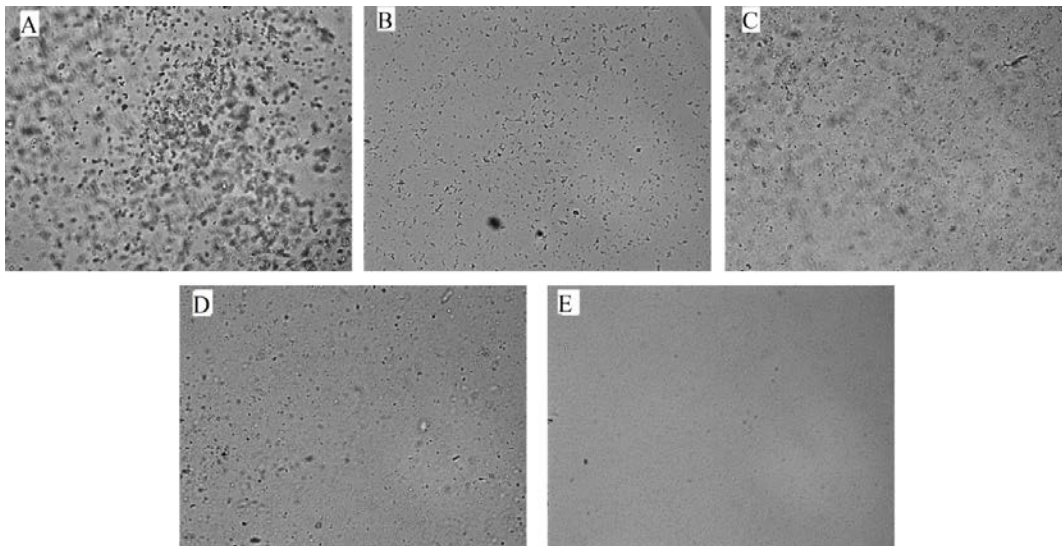
Pärast seda pesti süvendeid viis korda PBS-Tween® 20 puhvrtsiga, lisati 100 µl detekteerivat antikeha (HRP-anti-rabbit immunoglobulins; 2000-kordne lahjendus PBS-Tween® 20 puhvrts) ja inkubeeriti 30 minutit. Seejärel pesti süvendeid viis korda PBS-Tween® 20 puhvrtsiga. Substraat tetrametüülbensidiin (TMB) (10 mg/ml) lahustati dimetüülsulfoksiidis (DMSO) ning 20 µl substraadi lahusele lisati 2 ml 0,1 M atsetaat-tsitraat puhvrts (pH 6) ja 2 µl 30 % H₂O₂. Saadud lahus pipeteeriti mikrotiiterplaadi süvenditesse (100 µl) ja plaati hoiti 10 minutit pimedas. Reaktsioon peatati 50 µl 1 M H₂SO₄ lisamisega. Lahuste optiline tihedus mõõdeti spektrofotomeetriga (Multiskan MCC/340) lainepikkustel 450 nm ja 620 nm.

Antikehade selektiivsust *S. uberis*'e bakteri kultuuri (ATCC BAA-854/0140J, USA) suhtes määrati aglutinatsiooni testiga. *S. uberis*'e suspensioon valmistati Kaisa Mihklepa poolt. *S. uberis*'e bakteritest (kasvatatud lamba vere söötmel) tehti lahjendusseeria PBS puhvrts, kusjuures *S. uberis*'e algne kontsentratsioon oli 6·10⁷ CFU/ml. Süvenditesse lisati puhastatud antikehad. Iga süvendi lahuse kogu ruumala oli 50 µl. Baktereid inkubeeriti puhastatud antikehadega kaks tundi toatemperatuuril. Seejärel pipeteeriti suspensioonid alusklaasile (5 µl igat suspensiooni) ning aglutinatsiooni teket hinnati 40x suurendusega mikroskoobi abil (The Brightfield green LED illumination).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Immuniseeritud küülikute vereseerumite iseloomustamine

Enne selektiivsete afiinsuskolonnide ettevalmistamist kontrolliti aglutinatsiooni testiga antikehade sisaldust immuniseeritud küülikute vereseerumis. Aglutinatsiooni testide alusel leiti, et kõige suurem *S. uberis*'e vastaste antikehade sisaldus oli I peptiidiga (CSAPVYLGVSTE) immuniseeritud küüliku vereseerumis. II peptiidiga (CDQGVVAKVADN) immuniseeritud küüliku vereseerumis oli antikehade sisaldus kõige madalam ning III peptiidiga (CPFFNYNQPGKNGHIG) oli küüliku vereseerumis olevate antikehade sisaldus võrreldes eelmiste peptiididega keskmine (Joonis 6).



Joonis 6. Aglutinatsiooni test *S. uberis*'e bakteritega (10^9 CFU/ml): A – I peptiidi vasteks tekkinud antikehadega vereseerum, B – II peptiidi vasteks tekkinud antikehadega vereseerum, C – III peptiidi vasteks tekkinud antikehadega vereseerum. D – mitteimmuniseeritud küüliku vereseerum ja E – vesi.

Lähtudes esmastest aglutinatsiooni testidest võib öelda, et II peptiidiga immuniseeritud küülikute vereseerumis ei tekkinud kõrge antikehade sisaldusega immuunvastust. Immuunvastuse tekkimine sõltub küülikust (igal organismil erinev immuunvastus). Aglutinatsiooni piltide erinevus immuniseeritud küüliku ja mitteimmuniseeritud küüliku vereseerumite vahel puudub (Joonis 6 B ja D). III peptiidiga immuniseeritud küüliku vereseerumis oli märgata osalist *S. uberis*'e ja spetsiifiliste antikehade vahelist seondumist (Joonis 6 C). Edasise afiinsuskolonnide valmistamise optimeerimisel lähtuti saadud tulemustest.

3.2 Afiinsuskolonnide valmistamise optimeerimine

Afiinsuskolonnide valmistamiseks seoti peptiidid NHS aktiveeritud agarosile peptiididel olevate aminorühmade abil, mis asuvad peptiidide N-terminaalses otsas või peptiidis olevate aminohappejääkide kõrvalahelal (näiteks lüsiin).

Afiinsuskolonnide valmistamisel lähtuti 1 ml NHS-aktiveeritud Sepharose[®] HP kolonnile soovitud nõuetest ning tingimusi optimeeriti töö käigus [22]. Afiinsuskolonnini kasutamiseks lubatud maksimaalne voolukiirus oli 1 ml/min ja lubatud maksimaalne rõhk oli 0,3 MPa. Peptiidi sidumine afiinsuskolonnile viidi läbi toatemperatuuril, et oleks võimalik kasutada kõrgemaid voolukiiruseid. Töö käigus jagati meetod kaheks etapiks, kus esimene koosnes 1 mM HCl pesust ning teine vabade NHS-rühmade deaktiveerimisest.

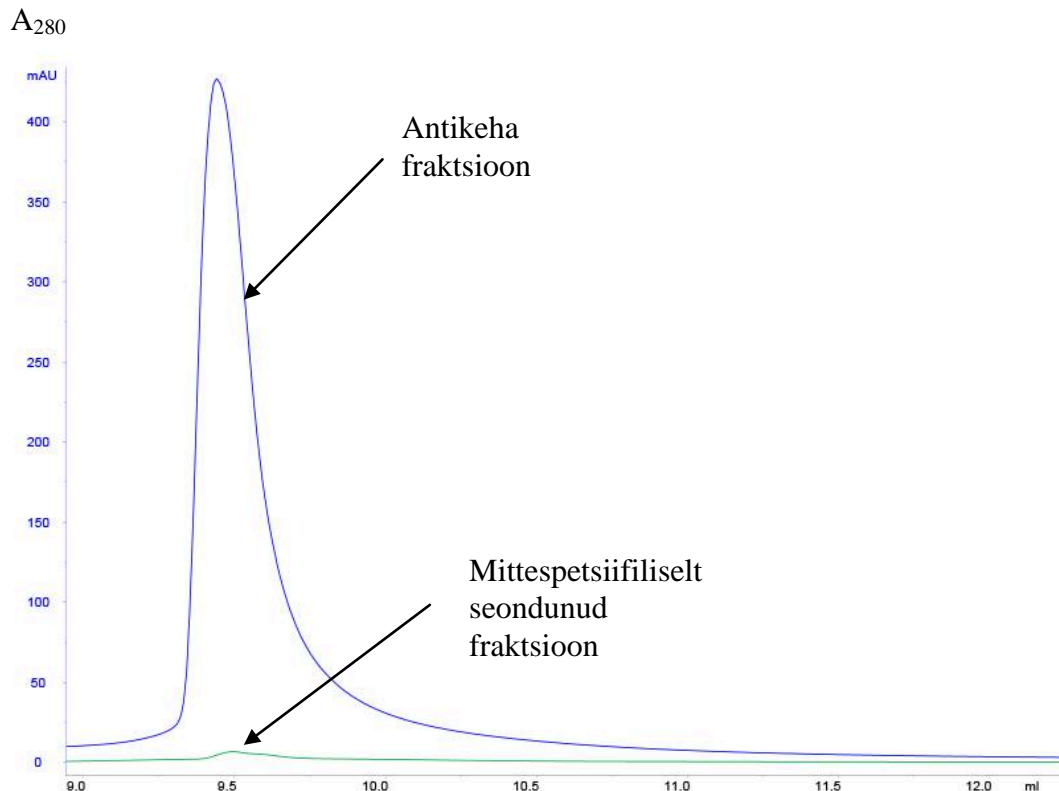
1 mM HCl voolutamisel kasutati voolukiirust 0,25 ml/min, kuna kõrgemal voolukiirustel kahjustab 1 mM HCl pesu afiinsuskolonnini maatriksit. Peptiidi lahuse sisestamisel afiinsuskolonnini kasutati voolukiirust 0,1 ml/min, et peptiidi seondumine afiinsuskolonnile oleks efektiivsem. Vabade reageerimata jäänud NHS-rühmade deaktiveerimiseks etanoolamiiniga kasutati voolukiirust 0,3 ml/min.

Afiinsuskolonnide valmistamisel varieeriti immobiliseeritava peptiidi koguseid vahemikus 5–15 mg. Peptiid lahustati sidumispuhvris ning sidumispuhvri ruumala varieeriti vahemikus 0,5–1 ml. Väiksemate sisestusruumalade juures oli probleemiks see, et kogu afiinsuskolonn ei täitunud peptiidi lahusega ning peptiid ei seondunud kogu kolonnini ulatuses ühtlaselt. Mitteühtlase seondumise tulemusel vähenes afiinsuskolonnini efektiivsus, sest proovi sisestamisel ei saanud peptiidiga aktiveerimata jäänud afiinsuskolonnini osas antikehade seondumist toimuda. Kõige optimaalsem peptiidi lahuse kontsentratsioon oli 15 mg/ml. Antud kogus on suurem tootja poolt antud soovitudest (kuni 10 mg/ml), kuid on vastavuses tootja poolt antud NHS-rühmade kontsentratsiooniga afiinsuskolonnini (10 µmol/ml). Väiksemate peptiidi koguste korral jääb afiinsuskolonnini liiga palju vabu reageerimata jäänud NHS-rühmasid, mis hiljem deaktiveeritakse.

Afiinsuskolonnini inkubeeriti tootja poolt ettekirjutatud nõuete alusel 30 minutit, et peptiidi seondumine afiinsuskolonnini oleks maksimaalne. Etanoolamiiniga deaktiveeriti reageerimata jäänud NHS-rühmad. I peptiidiga valmistati optimeeritud tingimustega afiinsuskolonn. Afiinsuskolonnide iseloomustamine ja antikehade puhastamine viidi läbi kolme afiinsuskolonniga, mis olid valmistatud erinevate peptiididega. Edasistes analüüsid kasutati afiinsuskolonnide voolukiirusel 0,25 ml/min.

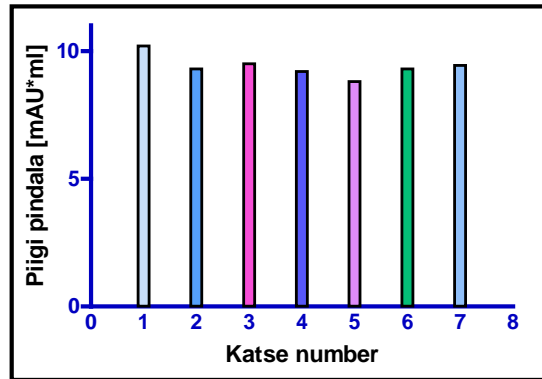
3.3 Valmistatud afiinsuskolonnide iseloomustamine

Esmalt hinnati afiinsuskolonna selektiivsust immuniseeritud küüliku vereseerumis olevate antikehade suhtes. Selektiivsustesti läbiviimiseks sisestati afiinsuskolonna mitteimmuniseeritud küüliku vereseerumit ning järgmine katse viidi läbi immuniseeritud küüliku vereseerumiga (Joonis 7). Selgus, et valmistatud afiinsuskolonnidega ei toimu mittespetsiifilist seondumist.



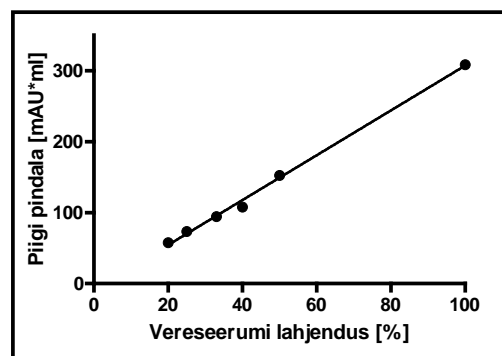
Joonis 7. III Peptiidiga valmistatud afiinsuskolonna selektiivsuse hindamine antikeha fraktsiooni põhjal.

Afiinsuskromatograafias kasutatavate kolonnide üks olulisemaid omadusi lisaks selektiivsusele on afiinsuskolonnide regenereerimine. Regenereerimine näitab afiinsuskolonna efektiivsust ja taaskasutamiskordade arvu. Valmistatud afiinsuskolonnide regenereerimise iseloomustamiseks süstiti sisestuskapillaari korduvalt uuritavat vereseerumit viiekordse lahjendusega A₂ puhvril. Selgus, et afiinsuskolonna on võimalik regenereerida väga efektiivselt ning eraldatud proovi fraktsiooni pindalade erinevus jäi korduskatsete korral ühe pindala ühiku raamesse (mAU·ml). Näitena on joonisel 8 toodud II peptiidiga valmistatud afiinsuskolonna regenereerimise hindamine, kusjuures joonisel toodud antikehasid sisaldavate piikide pindalad leiti kromatogrammidele vastavate piikide kõrguse ja laiuse korrutisena.



Joonis 8. II peptiidiga valmistatud afiinsuskolonna regenerereerimise hindamine seitsme järjestikuse antikehade puhastamise tulemuste põhjal.

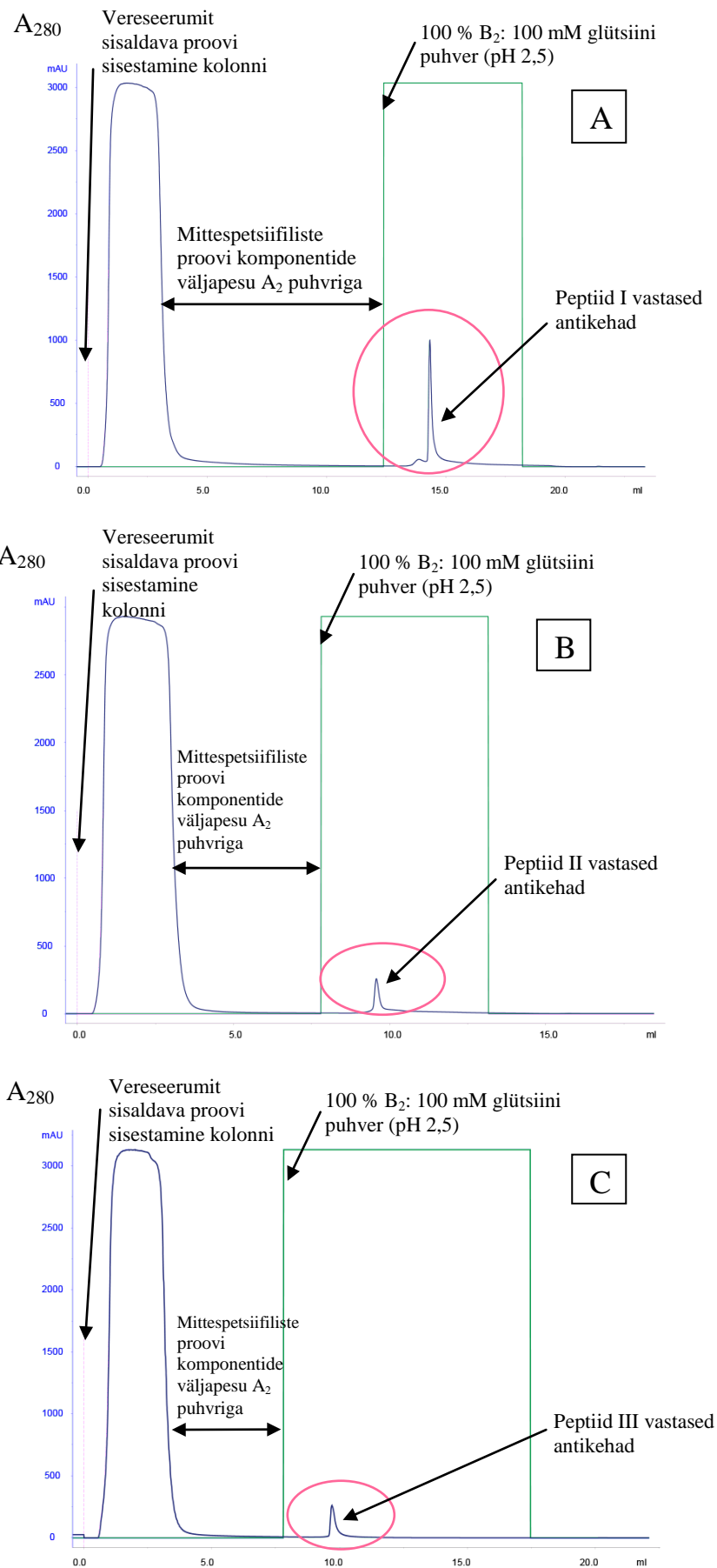
Afiinsuskolonnide mahtuvust analüüsiti erinevatel vereseerumi lahjendustel, sest afiinsuskolonna puhul on oluline selle maksimaalne sidumisvõime, mis määrab sisestatava proovi maksimaalse suuruse. Mahtuvuse määramisel kasutati 2 ml sisestuskapillaari ning selgus, et valmistatud afiinsuskolonna oli võimalik sisestada vähemalt 2 ml lahjendamata vereseerumit, ilma et oleks täheldatud seondunud antikehade koguse oodatavast väiksemat sidumist kolonnile. Piigi pindala sõltuvuse hindamisel vereseerumi lahjendusest leiti, et eraldatud antikehade kontsentratsioon sõltus sisestatud vereseerumi lahjendusest lineaarselt ning saadud sõltuvuse standardhälve ei ületanud 5 % (Joonis 9). Sellest tulenevalt võib eeldada, et afiinsuskolonna on võimalik sisestada veelgi suuremaid vereseerumi koguseid sisestada.



Joonis 9. Antikehasid sisaldava piigi pindala sõltuvus sisestatava proovi lahjendusest.

3.4 Antikehade puhastamine erinevatest vereseerumitest

Kolme erineva peptiidiga valmistatud afiinsuskolonne kasutati küüliku immuniseerimisel vasteks tekkinud antikehade puhastamiseks vereseerumist. Erinevatest immuniseeritud küülikute vereseerumitest puhastatud antikehade kromatogramme on näha joonisel 10.



Joonis 10. Afinsusprotsessi kromatogrammid. A: I peptiidi vastased antikehad, B: II peptiidi vastased antikehad, C: III peptiidi vastased antikehad.

Kromatogrammidel on näha kogutud antikehade fraktsioone (Joonis 10). Antikehade väljumise ruumalad on toodud tabelis 2. Tabelist 2 on näha, et I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnist elueerus IgG fraktsioon B₂ puhvriga voolutades kõige hiljem. Sellest võib järeldada, et I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnist teine fraktsioon on kõige tugevamini kolonni seondunud ning kõige kõrgema afiinsusega. II peptiidi vastased antikehad on seevastu oletatavasti madalama afiinsusega ning tulevad välja varem. III peptiidi vastased antikehad väljuvad kolonnist 1,70 ml juures ning on seega oletatavasti võrreldes I ja II peptiidi vastaste antikehadega keskmise afiinsusega.

Tabel 2. Spetsiifiliste antikehade fraktsioonide väljumise ruumala B₂ puhvriga afiinsuskolonnist.

I peptiidiga kolonn	II peptiidiga kolonn	III peptiidiga kolonn
1,22 ml; 1,84 ml	1,58 ml	1,70 ml

Saadud kromatogrammidel on antikehade piigid ebasümmeetrilised, mis võib olla tingitud kõrgema afiinsusega antikehade tugevamast seondumisest afiinsuskolonnile (Joonis 10). Selle uurimiseks voolutati afiinsuskolonne täiendavalt B₂ puhvriga ning leiti, et afiinsuskolonnist jääb väike kogus kõrge afiinsusega antikehasid. Kõrge afiinsusega antikehade osakaal kogu sisestatud vereseerumi proovi hulgast oli hinnanguliselt 0,02 %. Nii kõrge afiinsusega antikehasid ei ole võimalik kasutada immunobiosensorite valmistamisel, sest madal pH väärtus võib antikehasid pöördumatult inaktiveerida.

II ja III peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnidel eraldusid vereseerumite puhastamisel antikehad ühe fraktsioonina ning fraktsioon moodustas vereseerumis olevatest antikehade fraktsioonist hinnanguliselt 1 %. I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonniga õnnestus saada 2 erinevat fraktsiooni (Joonis 10).

I peptiidiga afiinsuskolonnist valmistamisel kasutati eelnevalt optimeeritud tingimusi. I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnist kromatogrammi väiksem piik vastab madalama afiinsusega antikehadele, mis eeldatavalt on IgM klassi antikehad. IgM antikehad tekivad organismis primaarse immuunvastuse käigus ja IgM antikehade osakaal täiendavatel immuniseerimistel väheneb [26]. Hinnanguliselt on IgM fraktsiooni osakaal 0,2 % ning IgG fraktsiooni osakaal 2 % vereseerumis olevate antikehade koguhulgast (Joonis 10).

I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnist korraldada tuli pikendada mittespetsiifiliste proovikomponentide väljapesu afiinsuskolonnist A₂ puhvriga kümnele kolonni ruumalale, sest afiinsuskolonnist väljavoolust detekteeriti valgu jääke. B₂ puhvriga elueerimist lühendati kuuele

kolonni ruumalale, sest afiinsuskolonne väljavoolus rohkem valgulisi komponente ei detekteeritud.

Võrreldes erinevates vereseerumites esinevate spetsiifiliste antikehade koguseid ühesugusel vereseerumi lahjendusel selgus, et kõige suurema piigi pindalaga on I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonniga puhastatud antikehade fraktsioon. I Piigi pindala oli umbes kolm korda suurem võrreldes II või III peptiidiga valmistatud afiinsuskolonniga puhastatud antikehade piigi pindalaga. II ja III peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnide korral voolutati kolonnist mittespetsiifilised proovi komponendid välja 5 kolonni ruumalaga A₂ puhvriga ning uuritavad antikehad elueeriti kolonnist välja 10 kolonni ruumalaga B₂ puhvriga.

3.5 Puhastatud antikehade iseloomustamine

Puhastatud antikehade fraktsioonides mõõdeti IgG klassi antikehade sisaldus neeldumise alusel lainepikkusel 280 nm. Kontsentratsiooni määramisel arvestati, et IgG klassi antikehade optiline tihedus 1 mg/ml kohta (b = 1 cm) lainepikkusel 280 nm on 1,37. Antud optilise tiheduse väärtust kasutati eeldusel, et antikehade fraktsiooni koguhulgas on kõige rohkem IgG klassi antikehasid. Saadud tulemused erinevate vereseerumite kohta on toodud tabelis 3.

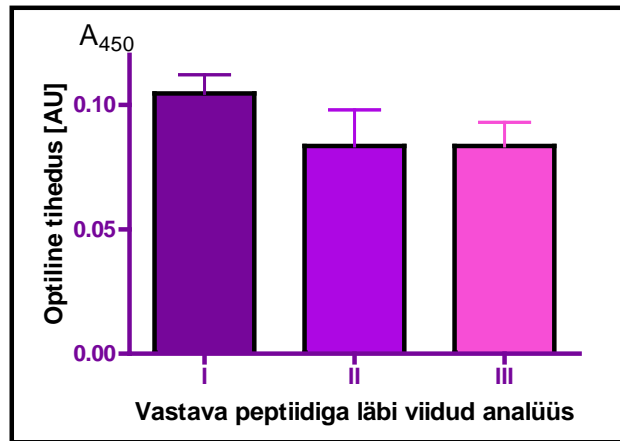
Tabel 3. Puhastatud antikehasid sisaldavate lahuste kontsentratsioonid.

Afiinsuskolonnidega puhastatud antikehade kontsentratsioonid		
I peptiidiga	II peptiidiga	III peptiidiga
1,14 ± 0,04 mg/ml	0,36 ± 0,04 mg/ml	0,45 ± 0,04 mg/ml

Kõige suurem puhastatud antikehade kontsentratsioon oli I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonniga puhastatud antikehadega lahuses, mis erines teistest peaaegu kolm korda. Kuna afiinsuskolonne süstiti I peptiidi lahust NHS rühmadega väikses ühehulgas, siis võib eeldada, et I peptiidiga valmistatud afiinsuskolonnist oli aktiivseid spetsiifilisi ligande rohkem kui teistes valmistatud afiinsuskolonnides. Antikehad elueeritakse kolonnist glütsiinpuhvriga madalal pH-l ning sellest tulenevalt uuriti ka kogutud fraktsioonis olevate antikehade aktiivsust ELISA ja aglutinatsiooni testide abil.

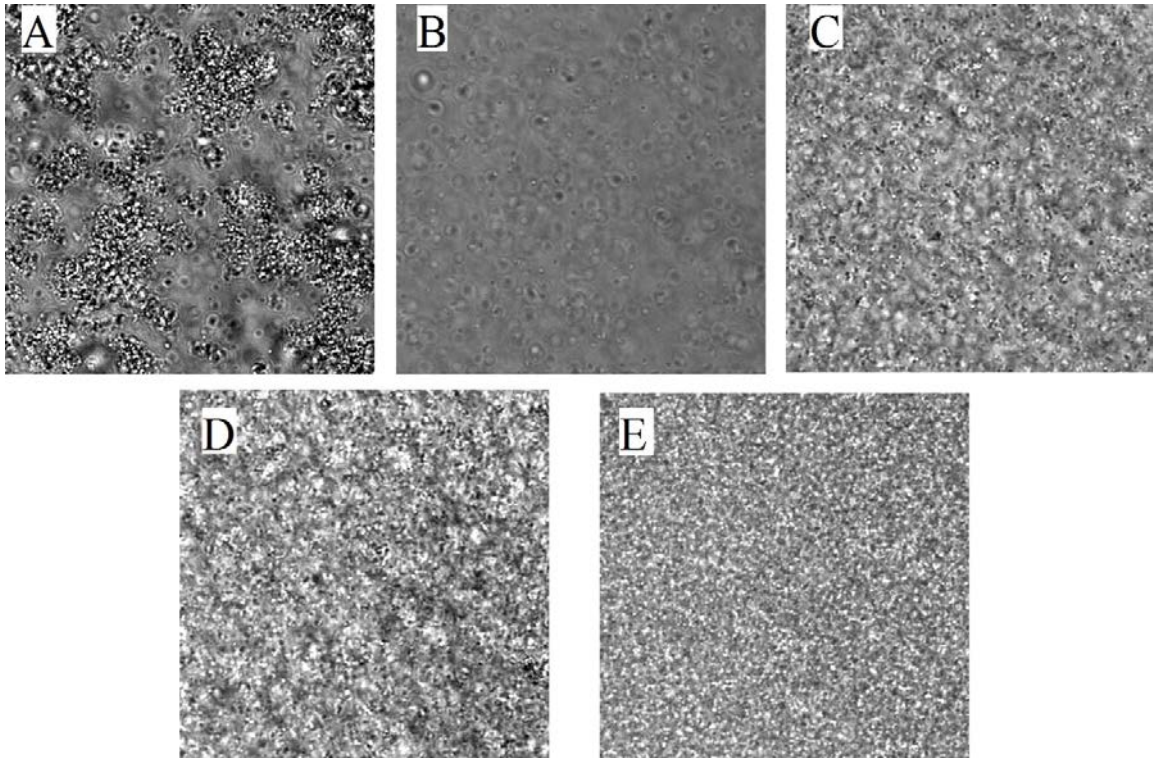
ELISA test viidi läbi immuniseerimiseks kasutatud peptiididega ning puhastatud antikehadega saadi neile omase peptiidiga positiivsed vastused (Joonis 11). Kõige intensiivsem oli antikehade seondumine I peptiidile ning selgus, et puhastatud *S. uberis*'e

vastased IgG klassi antikehad ei kaotanud oma aktiivsust madala pH-ga elueerimisel. Elueerimisel ei olnud võimalik kõrgema pH väärtusega puhvreid kasutada, sest kõrgema pH juures ei eraldunud spetsiifiliselt seondunud antikehad afiinsuskolonnist.



Joonis 11. ELISA test. IgG klassi antikehade intensiivsus uuritavates proovides. I – I peptiidi vastased puhastatud antikehad, II – II peptiidi vastased puhastatud antikehad, III – III peptiidi vastased puhastatud antikehad.

Puhastatud antikehade aktiivsust *S. uberis*'e bakteritega seondumisel kontrolliti aglutinatsiooni testidega. $6 \cdot 10^7$ CFU/ml *S. uberis*'e rakkudest tehti viie- ja kümnekordne lahjendus. Saadud tulemused olid positiivsed I peptiidiga immuniseeritud küüliku vereseerumist puhastatud antikehadega (Joonis 12A). Teiste peptiididega valmistatud afiinsuskolonnidega puhastatud antikehade fraktsioonidega ei saadud aglutinatsiooni testil positiivseid tulemusi. Negatiivsete tulemuste põhjuseks võib olla ka see, et teiste peptiididega valmistatud afiinsuskolonnidega puhastatud antikehade kontsentratsioonid võisid jääda liiga madalaks võrreldes *S. uberis*'e bakterite rakkudega ning seetõttu ei olnud võimalik näha aglutinatsiooni teket (Joonis 12).



Joonis 12. Aglutinatsiooni test *S. uberis*'e bakteritega (10^8 CFU/ml): A – I peptiidi vasteks tekkinud puhastatud antikehad, B – II peptiidi vasteks tekkinud puhastatud antikehad, C – III peptiidi vasteks tekkinud puhastatud antikehad. D – mitteimmuniseeritud küüliku vereseerum ja E – vesi.

KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli välja töötada meetod polükloonaalsete antikehadega küüliku vereseerumist *Streptococcus uberis*'e vastaste monospetsiifiliste antikehade eraldamiseks ning eraldatud antikehade aktiivsuse kontrollimine küülikute immuniseerimiseks kasutatud sünteetilised peptiidide ja *S. uberis*'e bakteritega.

Töö käigus optimeeriti meetodikat sünteetilised peptiidide sidumiseks afiinsuskolonnile ja antikehade puhastamiseks. Leiti sobilikud voolukiirused ja sisestatavate proovide kogused. Antud töös kirjeldatud afiinsuskolonnide kasutamise meetodiga on võimalik puhastada immuniseeritud küüliku vereseerumist uuritavaid antikehasid ning eraldada ka IgM ja IgG klassi immunoglobuliinid.

Selgus, et *S. uberis*'e pinnal eksponeeritud antigeensetele piirkondadele tekkisid küülikute immuniseerimisel antikehadest vasted ning antikehade puhastamise käigus kogutud fraktsioonid olid aktiivsed – sidusid lisaks peptiididele ka bakteri rakku. Elueerimine kõrgel pH-l ei mõjutanud antikehade aktiivsust ning afiinsuskolonn oli hästi regenereeritav. Kõikide peptiididega valmistatud afiinsuskolonnide jaoks optimeeriti katse läbi viimise tingimusi ning leiti igale afiinsuskolonnile sobivad.

Töö edasiseks arenguks tuleks iseloomustada ka IgM ja IgA antikeha klasside esinemist kogutud fraktsioonides. Kui meetodit edasi arendada, siis on võimalik eraldada kõik vereseerumis esinevad IgG klassi antikehad ning puhastada välja peptiididele spetsiifilised IgG antikehad. IgG antikehasid on võimalik kasutada immunobiosensorsüsteemi valmistamisel *S. uberis*'e määramiseks.

SUMMARY

Purification of antibodies from blood serum against *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis is one of the most common pathogens causing environmental mastitis. Mastitis in dairy cattle can lead to a significant loss in milk production. Therefore it is important to identify infections early in order to control the spread of mastitis in the dairy cattle.

In the University of Tartu rapid and sensitive immunobiosensors for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* have been developed but at the present there are no commercial antibodies available to detect *Streptococcus uberis*. For this reason three rabbits were immunized with different synthetic antigenic regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule to get specific immune response.

The aim of the present work was to develop a method for antibody purification from blood serum and to determine the activity of purified antibodies against the synthesized peptides and *Streptococcus uberis* bacteria.

The synthetic peptides were immobilized to 1 ml HiTrap NHS-activated Sepharose® HP column and antibodies were purified from blood serum with specific synthetic peptide. It was possible to separate IgM and IgG fractions from blood serum containing antibodies against peptide I. The method was validated to characterize the specific binding, regeneration and capacity of the columns.

Validation process revealed that specific affinity columns did not bind unspecific sample components, could be regenerated and that the affinity columns capacity was more than 2 ml of undiluted blood serum. The concentration of purified antibodies was determined with UV-spectrophotometer. The activity of purified antibodies was tested with ELISA and agglutination tests. The test results showed presence of active antibodies towards synthetic peptides and *Streptococcus uberis* bacteria.

To improve the process IgG antibodies can be initially separated from blood serum. The gained IgG fraction can be further purified to separate specific IgG antibodies with affinity column. IgG antibodies have higher affinity than IgM antibodies and can be used for the development of immunobiosensing system for the detection of *Streptococcus uberis*.

4. KASUTATUD KIRJANDUS

1. Jones, G.; Bailey, T. Understanding the Basics of Mastitis. *Virginia Cooperative Extension*. **2009**, 404, 233, 1-5.
2. Ogola, H.; Shitandi, A.; Nanua, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci*. **2007**, 8, 3, 237-242.
3. Prabhu, K. N.; Isloor, S.; Hegde, R.; Rathnamma, D.; Veeregowda, B. M.; Murthy, H. N. N.; Shome, R.; Suryanarayana, V. V. S. Development of polymerase chain reaction of detection of predominant streptococcal isolates causing subclinical bovine mastitis. *IJBT*. **2013**, 12, 4, 208-212.
4. Veterinaar- ja toidulaboratoorium; <http://www.vetlab.ee/> viimati alla laetud 05.04.2015.
5. Ward, P. N.; Holden, M. TG.; Leigh, J. A. Lennard, N.; Bignell, A.; Barron, A.; Clark, L. Quail, M. A.; Woodward, J.; Barrel, B. G.; Egan, S. A.; Field, T. R.; Maskell, D.; Kehoe, M.; Dowson, C. G.; Chanter, N.; Whatmore, A. M.; Bentley, S. D.; Parkhill, J. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics*. **2009**, 10, 54.
6. Patel, D.; Almeida, R. A.; Dunlap, J. R.; Oliver, S. P. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. *J. Vet. Micro*. **2009**, 137, 3-4, 297-301.
7. Oliver, S. P.; Almeida, R. A.; Luther, D. A.; Park, HM. *Streptococcus uberis* adhesion molecule. US 7812147 B2, 2010.
8. Di Domenico, E. G.; Toma, L.; Prignano, G.; Pelagalli, L.; Police A.; Cavallotti, C.; Torelli, R.; Sanguinetti, M.; Ensoli, F. Misidentification of *Streptococcus uberis* as a Human Pathogen: A Case Report and Literature Review. *ISID*. **2015**, 33, 4, 79-81.
9. Riffon, E.; Sayasith, K.; Khalil, H.; Dubreuil, P.; Drolet, M.; Lagace, J. Development of Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *JCM*. **2001**, 39, 7, 2584-2589.
10. Rabbany, S. Y.; Donner, B. L.; Ligler, F. S. Optical immunosensors. *Crit. Rev. Biomed. Eng*. **1994**, 22, 5-6, 307-346.
11. Ramírez, N. B.; Salgado, A. M.; Valdman, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. *Braz. J. Chem. Eng*. **2009**, 26, 2, 227-249.
12. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier: Canada, 2015; pp 87-95.

13. Male, D. Brostoff, J.; Roth, D. B.; Roitt, I. *Immunology*. Mosby Elsevier: Canada, 2006; pp 59-72.
14. Dominguez, R.; Holmes, K. Antibody structure and function. *Focus*. **2011**, 40, 1, 58-78.
15. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of biochemistry*. W. H. Freeman and Company: New York, 2008; Vol. 6, pp 170-174.
16. Introduction to antibodies;
https://biochem.wisc.edu/sites/default/files/labs/weibel/methods/Introduction_to_Antibodies.pdf viimati alla laetud 26.04.2015.
17. Braden, B. C.; Dall'Acqua, W.; Eisenstein, E.; Fields, B. A.; Goldbaum, F. A.; Malchiodi, E. L.; Mariuzza, R. A.; Schwarz, F. P.; Ysern, X.; Poljak, R. J. Protein motion and lock and key complementarity in antigen-antibody reactions. *Pharm. Acta Helv.* **1995**, 69, 4, 225-230.
18. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of The Cell*. Garland Science: New York, 2008; Vol. 5, pp 156-157.
19. Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J.; Weis-Garcia, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR*. **2005**, 46, 3, 258-268.
20. Deutscher, M. P. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. San Diego: Academic Press Inc, 1990; Vol. 182, pp 9-15.
21. Phenomenex. *Introduction to peptide and protein HPLC*. Phenomenex, 1998; Vol. 1, pp 44-51.
22. Pharmacia Biotech. Affinity Chromatography. Principles and Methods. 18-1022-29
23. Spectrophotometric Protein Assays;
http://www.jenway.com/adminimages/a09_002a_protein_assays_on_the_genova.pdf viimati alla laetud 05.04.2015.
24. Walker, J. M. *The Protein protocols Handbook*. Humana Press. Totowa: New Jersey, 2002; Vol. 2, pp 3-15.
25. Walker, J. M.; Rapley R. *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press. Totowa: New Jersey, 2008; Vol. 2, pp 657-682.
26. Subhash C. P. *Textbook of Microbiology & Immunology*. Reed Elsevier India Private Limited: India, 2012; pp 107-108.
27. Mihklepp K. Bioäratundmissüsteem *Streptococcus uberis*'e määramiseks. Magistritöö, Tartu Ülikool, 2015.
28. Thermo Scientific. Protein measurement. US. 302-479-7707.

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merit Nikopensius,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose *Streptococcus uberis*'e vastaste antikehade puhastamine vereseerumist,

mille juhendajad on Toonika Rincken ja Kairi Kivirand,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **04.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2015**