

ISOLATION AND DETERMINATION OF LACTOFERRINE FROM HUMAN SALIVA USING PARAMAGNETIC PARTICLES

IZOLACE A STANOVENÍ LAKTOFERINU Z LIDSKÝCH SLIN POMOCÍ PARAMAGNETICKÝCH ČÁSTIC

Skaličková S.¹, Zítka O.¹, Křížková S.^{1,2}, Vlková M.³, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Clinical Immunology and Allergology, University Hospital, Pekařská 53, 656 91 Brno, Czech Republic

E-mail: sylvie.skalickova@gmail.com

ABSTRACT

Saliva is a watery substance produced in the mouths of human and most animals. The important compound of saliva is lactoferrin. It is involved in binding and transport of metal ions such as Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺. Because of these functions it has an antibacterial, anticarcinogenic and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to design a method based on isolation of lactoferrin from human saliva using paramagnetic particles to prepare bead-based complex with lactoferrin. This complex was subsequently determined by SFIA. Our results were correlated with ELISA using spectrophotometric detection. The limit of detection for lactoferrin was 0.4 µg.ml⁻¹. This method has the potential as a biosensor analysis.

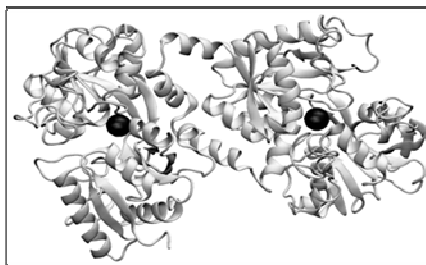
Key words: lactoferrin, ELISA, SFIA, biosensor

Acknowledgments: The work has been supported by CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 and IGA FA MENDELU TP 6/2012.

ÚVOD

Sliny jsou směsí biologicky významných glykoproteinů, proteinů, enzymů, hormonů, minerálů, elektrolytů rozpuštěných ve vodě. Obsah vody a v ní rozpuštěných látek kolísá v závislosti na momentálním fyziologickém stavu organismu, přičemž tyto procesy jsou řízené vegetativním nervovým systémem na základě podmíněných a nepodmíněných reflexů (Humphrey a Williamson, 2001). Sliny se podílejí na trávení potravy, přenosu chuti k chuťovým pohárkům, zvlhčují dutinu ústní, mají antimikrobní, desinfekční a ochranné účinky (Amerongen a Veerman, 2002). Jednou z významných složek slin je laktoferin. Tento glykosylovaný protein, o molekulové hmotnosti 80 kD je složený z 692 aminokyselin (Rey, a kol., 1990) a jeho isoelektrický bod (pI) byl stanoven na 8 – 8,5 (Levay a Viljoen, 1995)(Lonnerdal a Iyer, 1995). Struktura laktoferinu je uspořádána do jednoduchého polypeptidového řetězce strukturovaného do dvou domén (Obr. 1). Ty jsou pak schopny vázat ionty kovů, nejčastěji Fe^{2+} nebo Fe^{3+} , ale také i ionty Cu^{2+} , Zn^{2+} a Mn^{2+} (Levay a Viljoen, 1995),(Lonnerdal a Iyer, 1995). Výskyt tohoto proteinu byl zaznamenán u několika sekretů sliznic, (v mateřském mléce, slzách, krevní plazmě, slinách, potu spermatu či vaginálním výtoku) (Levay a Viljoen, 1995). V organismu plní důležitou funkci v nespecifickém imunitním systému díky jeho antimikrobní, antifungicidní a antivirulentní aktivitě, která je podmíněná schopností vázat kovové ionty, které většina bakterií vyžaduje pro svůj růst (Arslan, a kol., 2009). Zvýšení hladiny laktoferinu v krvi je často spojené se zánětlivými procesy probíhajícími v organismu (Sukharev, a kol., 2009).

Obr. 1: Struktura laktoferinu, která je uspořádána do jednoduchého polypeptidového řetězce strukturovaného do dvou domén.



Z biologického vzorku lze laktoferin izolovat díky podstatně odlišnému pI od pI proteinů ostatní matrice vzorku pomocí iontově výměnná chromatografie (Recio a Visser, 1999), (Uchida, a kol., 2003). Další využívané metody pro izolaci a purifikaci laktoferinu jsou enzymově značená imuno-analýza (Hutchens, a kol., 1989), afinitní membránová chromatografie (Wolman, a kol., 2007) či nověji pseudoafinitní chromatografie (Ng a Yoshitake, 2010). Kvantitativní stanovení se

nejčastěji provádí imunoseparačními metodami jako je ELISA (enzymově značená sorbent analýza), (Sato, a kol., 2000),(Shinmoto, a kol., 1997),(Yoshise, a kol., 2007), RIA (radioimunoanalýza), (Sykes, a kol., 1982)(Boxer, a kol., 1982) či LSA (luminiscenčně založená imunoanalýza) (Maacks, a kol., 1989). Pro tyto metody se limity detekce pohybují v rozmezí 10 ng.ml^{-1} – $0,2 \text{ mg.ml}^{-1}$. Literatura se však také zmiňuje o stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí s limitem detekce $4,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Drackova, a kol., 2009), elektrochemicky s amperometrickou detekcí s limitem detekce 35 nM (Campanella, a kol., 2009), pomocí čipové elektroforézy nebo elektrochemie s modifikovanou skleněnou uhlíkovou elektrodou ($L_D = 1,3 \text{ nM}$) (Campanella, a kol., 2009).

Biomolekuly, jako je laktoferin lze izolovat pomocí paramagnetických částic, které v současné době nachází stále více využití v imunoanalytických metodách. Jejich výhodou oproti jiným značkám používaných v immunoassays je jejich velikost, která předurčuje stabilitu, nerozpadají se, nedegradují a jsou odolné vůči denaturaci a neutralizaci [17].

V této práci byla vyvinuta metoda pro izolaci proteinu laktoferinu z biologického vzorku za využití protilátkou modifikovaných paramagnetických částic. Účinnost jednotlivých izolačních kroků byla sledována s využitím spektrofotometrických a elektrochemických technik. Po provedení izolace byla konečná koncentrace izolovaného laktoferinu stanovena mikrofluidním elektrochemickým zařízením SFIA [18] jehož parametry byly také optimalizovány.

MATERIÁL A METODIKA

TMB, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , lidský IgG, NaCl, Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 a ostatní chemikálie v ACS kvalitě byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA), pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky laktoferinu (1 mg.ml^{-1}) byly připraveny v ACS vodě a uchovány ve tmě při -20°C . Polyklonální koží protilátka, monoklonální myší protilátka a kuřecí – HPR konjugát byl zakoupen z firmy SantaCruz Biotechnology (USA). Polyklonální králičí a myší konjugát s alkalickou fosfatázou byl zakoupen od firmy Dako (Německo). Magnetické mikročástice Dynabeads Protein G byly zakoupeny od Invitrogen (Norsko).

Příprava protilátek a jejich imobilizace na paramagnetické částice byla provedena dle manuálu výrobce (Invitrogen, Norsko). Magnetické částice s proteinem G (DB-G) ($25 \text{ } \mu\text{l}$) byly 2x promyty $100 \text{ } \mu\text{l}$ PBS puřem. Koží protilátka proti laktoferinu ($10 \text{ } \mu\text{g}$ in $100 \text{ } \mu\text{L}$ of PBS) byla inkubována s magnetickými částicemi 30 minut při laboratorní teplotě na multi-spin centrifuze MSC-3000 (Biosan, Litva). Poté za pomoci magnetu, který zadržel paramagnetické částice s navázaným komplexem, byl odstraněn supernatant. Částice byly opět promyty $100 \text{ } \mu\text{l}$ of PBS a zablokovány $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ nespecifickým lidským IgG 30 min na centrifuze. Po promytí paramagnetických částic byly resuspendovány ve $100 \text{ } \mu\text{l}$ PBS s $0,01 \text{ } \%$ Tween-20 a uchovány pro pozdější použití při 4°C .

SDS-PAGE byla provedena na Mini Protean Tetra elektroforetické vaně (Bio-Rad, USA). Gely byly připraveny z 30 % (*m/V*) akrylamidového zásobního roztoku s 1 % (*m/V*) bisakrylamidu. Před analýzou byly vzorky smíchány s neredukčním pufrům v poměru 2:1 a inkubovány při 93°C 3 min. Takto připravené vzorky byly nadávkovány přímo do gelu. K detekci molekulové hmotnosti vzorků byl použit proteinový ladder “Precision plus protein standards” (Biorad, USA). Elektroforéza probíhala při 150 V 1 h při laboratorní teplotě 23 °C (Power Basic, Biorad USA) v tris-glycinovém puru (0,025 M Trizma-base, 0,19 M glycin and 3,5 mM SDS, pH = 8,3). Následně byly gely obarveny stříbrem dle Krizkova et al. (Krizkova, a kol., 2009).

Pro elektrochemickou detekci HPR bylo použito miniaturizované mikrofluidní zařízení SFIA (Zitka, a kol., 2011). Systém byl složen z programovatelné nástřikové pumpy (Model eVol, SGE Analytical Science Pty Ltd, Austrálie), 3 cestného 2-pozičního ventilu (vytvořený z 6-cestného ventilu) (Valco, Instruments Co. Inc, USA), který pomocí dávkovací kapiláry dopravoval vzorek do elektrochemické průtokové cely, které byla složena z pracovní skelno uhlíkové elektrody, platinové pomocné elektrody a Ag/AgCl 3M KCl referenční elektrody (CH Instruments, Inc., USA) a z prototypu miniaturizovanéo mikropotenciostatu (910 PSTAT mini (Metrohm, Švýcarsko).

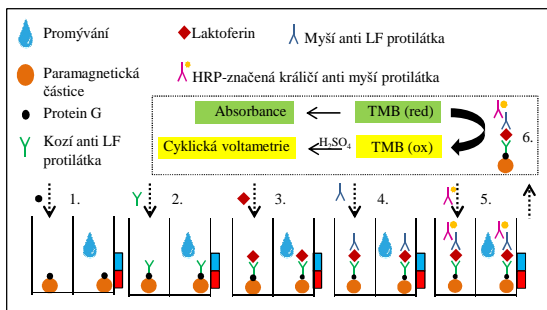
Vzorek o objemu 10 µl byl do systému injektován automatickou pipetou (SGE Analytical Science, Austrálie). Mezi jednotlivými analýzami byla elektrochemická cela promyta 200 µl vodným roztokem etanolu (75% *v/v*), a následně 200 µl 100% metanolu a stabilizována 200 µl elektrolytem (0,05 M uhličitánový pufr pH = 9,6). K analýze byla využita cyklická voltmetrie: cyklický sken od 0 mV do +1000 mV a zpět do 0 mV, rychlost skenu 20 mV/s.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Příprava komplexu protilátek s paramagnetickými částicemi

Základní experimentální schéma imunoseparace laktoferinu využívalo magnetickou separaci, kde byly magnetické částice modifikovány pomocí sandwich ELISA. Schéma komplexu protilátek s paramagnetickými částicemi pro izolaci laktoferinu je ukázáno na obrázku (Obr. 2). Na paramagnetické částice byl navázán protein G, na který byla poté navázána kozí protilátka. Následně byl do mikrotitrační destičky přidán laktoferin, který je afinitní ke kozí protilátce. V dalším kroku byla navázána myší protilátka. Ke vzniklému komplexu byla nakonec navázána křenová peroxidáza, která redukuje TMB. Výsledný produkt této reakce byl následně spektrofotometricky analyzován. Mezi jednotlivými kroky byl vznikající komplex promýván PBS aby byly odstraněny veškeré nenavázané molekuly.

Obr. 2: Schéma komplexu paramagnetické částice-laktoferin-protilátky. Na povrch paramagnetických částic pokrytých proteinem G byly imobilizovány polyklonální koží protilátky proti laktoferinu. Po vazbě laktoferinu byla pro jeho detekci použita monoklonální myší protilátka proti laktoferinu ve spojení s králičím konjugátem s HRP.

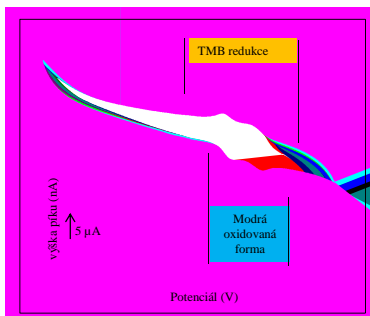


Pomocí SDS-PAGE byla ověřena použitelnost protilátek pro imunoextrakci standardů laktoferinu. V případě imunoextrakce analytu je nezbytné nejen to, aby se protilátka vážala na antigen, ale také, aby se na něj vážala dostatečně silně.

SFIA analýza TMB

Pro elektrochemickou analýzu TMB byla použita SFIA v uspořádání jak popisuje Zitka et al (Zitka, a kol., 2011) Charakterizace konverze 0,92 mM TMB v čase od 5 po 60 minutách byla provedena cyklickou voltametrií. Při proložení získaných votamogramů (Obr. 3) jsou vidět redukční píky v 0,250 V a 0,70 V. Jejich výška se postupně snižuje, k poklesu dochází již od 5 minuty reakce. Výška oxidačních píků v potenciálech 0,260 V a 0,280 V se mírně zvyšuje s delším časem reakce a to až do 20 min, kdy dochází k mírnému poklesu signálu. Je tedy zřejmé, že reakce je reverzibilní a s delší dobrou reakce dochází k poklesu signálu u oxidačních i redukčních píků. Pro analýzu 0,92 μM TMB byla provedena optimalizace akumulace pomocí DPV voltametrie. Z výsledků je patrné, že po 30 sekundách doby akumulace dochází k výraznému navýšení elektrochemického signálu. S delším časem akumulace (60 a 90 s) se již signál výrazně nemění, v 60 s mírně klesá a v 90 s je pozorováno opět navýšení. Naše snaha byla vyvinout senzitivní elektrochemickou detekci TMB, která bude zároveň časově méně náročná, proto byla vybrána doba akumulace 30 s. Následně byla sestrojena kalibrace redukčního signálu TMB v rozmezí 0,195 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, která vykazovala polynomický trend $y = -0,1368x^2 + 45,825x + 101,33$, $R^2 = 0,9951$ a RSD = 6,7 % (n = 5). Limit detekce byl stanoven (3 S/N) 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro nástřik 5 μl .

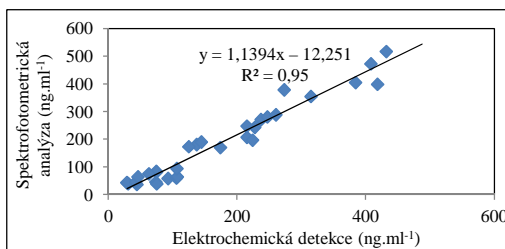
Obr. 3: Časová závislost konverze TMB ($0,16 \mu\text{M}$) v přítomnosti 30 % H_2O_2 , která je katalyzována HRP na TMB.



Korelace elektrochemické a spektrofotometrické detekce TMB

Korelace mezi koncentracemi laktoferinu ve standardech laktoferinu a lidských slinách zjištěnými pomocí spektrofotometrické a elektrochemické detekce standardu 1 a 3 byla určena metodou nejmenších čtverců s korelačním koeficientem $R^2 = 0,94$, což ukazuje na velmi dobrou shodu získaných výsledků. Srovnání spektrofotometrické a elektrochemické detekce je vyjádřeno následující rovnicí: spektrofotometrická detekce = $1,1394x$ elektrochemická detekce – 12,251. Z těchto výsledků vyplývá dobrá korelace mezi oběma metodami detekce na základě hodnoty $R^2 = 0,95$ (Obr. 4)

Obr. 4: Korelace mezi koncentracemi laktoferinu analyzovaných pomocí spektrofotometrie a SFIA



ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo vyvinout immunosensor pro detekci laktoferinu pomocí mikrofluidního zařízení SFIA s amperometrickou detekcí pro laktoferrin, který byl testován na třech různých standardech (Sigma, Biopole a námi izolovaný laktoferin z lidských slin). Tato metoda vykazuje dobrou korelaci s dosud nejvyužívanější metodou pro stanovení laktoferinu v nízkých koncentracích – ELISOU.

LITERATURA

- Amerongen A. V. N., Veerman E. C. I. (2002): Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1): 12-22.
- Arslan S. Y., Leung K. P., Wu C. D. (2009): The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5): 411-416.
- Boxer L. A., Coates T. D., Haak R. A., Wolach J. B., Hoffstein S., Baehner R. L. (1982): Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function. *New England Journal of Medicine*, 307(7): 404-410.
- Campanella L., Martini E., Pintore M., Tomassetti M. (2009): Determination of Lactoferrin and Immunoglobulin G in Animal Milks by New Immunosensors. *Sensors*, 9(3): 2202-2221.
- Drackova M., Borkovcova I., Janstova B., Naiserova M., Pridalova H., Navratilova P., Vorlova L. (2009): Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(S102-S104).
- Humphrey S. P., Williamson R. T. (2001): A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2): 162-169.
- Hutchens T. W., Henry J. F., Yip T. T. (1989): Purification and characterization of intact lactoferrin found in the urine of human milk-fed preterm infants. *Clinical Chemistry*, 35(9): 1928-1933.
- Krizkova S., Adam V., Eckschlager T., Kizek R. (2009): Using of chicken antibodies for metallothionein detection in human blood serum and cadmium-treated tumour cell lines after dot- and electroblotting. *Electrophoresis*, 30(21): 3726-3735.
- Levay P. F., Viljoen M. (1995): Lactoferrin - a general-review. *Haematologica*, 80(3): 252-267.
- Lonnerdal B., Iyer S. (1995): Lactoferrin - molecular-structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, 15(93-110).
- Maacks S., Yuan H. Z., Wood W. G. (1989): Development and evaluation of luminescence-based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial-infections in pediatric medicine. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 3(4): 221-226.
- Ng P. K., Yoshitake T. (2010): Purification of lactoferrin using hydroxyapatite. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(13-14): 976-980.

- Recio I., Visser S. (1999): Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin - In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831(2): 191-201.
- Rey M. W., Woloshuk S. L., Deboer H. A., Pieper F. R. (1990): Complete nucleotide-sequence of human mammary-gland lactoferrin. *Nucleic Acids Research*, 18(17): 5288-5288.
- Sato R., Ohki K., Syuto B., Sato J., Naito Y. Plasma lactoferrin concentration measured by ELISA in healthy and diseased cows. *International Congress Series; Lactoferrin: Structure, function and applications*, 2000 (vol 1195).
- Shimoto H., Kobori M., Tsushida T., Shinohara K. (1997): Competitive ELISA of bovine lactoferrin with bispecific monoclonal antibodies. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61(6): 1044-1046.
- Sukharev A. Y., Yermolayeva T. N., Beda N. A., Krylov G. F. (2009): Immunochemical studies of salivary lactoferrin. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 4): 38-39.
- Sykes J. a. C., Thomas M. J., Goldie D. J., Turner G. M. (1982): Plasma lactoferrin levels in pregnancy and cystic-fibrosis. *Clinica Chimica Acta*, 122(3): 385-393.
- Uchida T., Dosako S., Sato K., Kawakami H. (2003): Sequential separation of lactoferrin, lactoperoxidase, and secretory component by sulfate-linked ion-exchange chromatography. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 58(9-10): 482-486.
- Wolman F. J., Gonzalez Maglio D., Grasselli A., Cascone O. (2007): One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, 288(1-2): 132-138.
- Yoshise R. E., Matsumoto M., Chiji H., Kuwata H., Shin K., Yamauchi K., Tamura Y., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K. (2007): Profiles of bovine lactoferrin in the gastrointestinal tracts of rats as observed by ELISA, Western blotting and SELDI-affinity MS. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 62(4): 446-450.
- Zitka O., Krizkova S., Krejcova L., Hynek D., Gumulec J., Masarik M., Sochor J., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kizek R. (2011): Microfluidic tool based on the antibody-modified paramagnetic particles for detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine of prostate cancer patients. *Electrophoresis*, 32(22): 3207-3220.