

PERILAKU MIGRASI IMUNOGLOBULIN Y PADA ELEKTROFORESIS DALAM KEADAAN NATIVE

Umul Karimah

Program Studi Farmasi, Universitas Nahdlatul Ulama Kalimantan Timur
Email: ukarimah@gmail.com

ABSTRAK

Elektroforesis protein dalam keadaan *native* (*Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, *native PAGE*) jarang diterapkan pada penelitian. Namun, hasil *native PAGE* penting untuk mempelajari aktivitas dan interaksi protein. Penelitian ini mempelajari perilaku migrasi imunoglobulin Y (IgY) pada pemisahan menggunakan *native PAGE*. IgY digunakan karena protein telah dikarakterisasi dengan baik. IgY diisolasi dari kuning telur folikel dan diperiksa dengan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) PAGE reduktif, nonreduktif dan *clear native PAGE* (CN-PAGE). Elektroferogram SDS-PAGE reduktif menunjukkan pita berukuran ~68 dan 38 kDa yang berturut-turut merupakan rantai berat dan rantai ringan IgY. Elektroferogram SDS-PAGE nonreduktif juga menunjukkan pita IgY berukuran normal ~185 kDa dengan kemurnian yang tinggi. Sementara itu, elektroferogram CN-PAGE IgY membentuk pola goresan dengan rentang ukuran protein yang sangat besar yakni ~409 hingga 1048 kDa. Hasil ini memunculkan dugaan adanya agregasi atau oligomerisasi IgY. Dilusi dan disagregasi IgY dengan deterjen natrium dodesil sulfat (NDS), natrium deoksikolat (NDK), sarkosil, urea, dan gliserol tidak mengubah perilaku migrasi IgY pada CN-PAGE. Penelitian ini menyimpulkan IgY tidak membentuk agregat. Perilaku migrasi IgY yang sangat lambat, membentuk pola goresan dan tampak berukuran sangat besar diduga dipengaruhi pI dan konformasi planar dari IgY.

Kata Kunci: elektroforesis, imunoglobulin Y, *native PAGE*

ABSTRACT

Protein separation with electrophoresis in native state (native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, native PAGE) is rarely applied in laboratory. Nevertheless, native PAGE result can identify important protein-protein interaction. This study aimed to investigate immunoglobulin Y(IgY) behavior in separation using native PAGE. IgY protein is used since it is well-characterized. IgY was isolated from follicles yolk and examined using clear native PAGE (CN-PAGE) and Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) PAGE, both in reducing and nonreducing condition. CN-PAGE electropherogram of IgY showed streaked band from ~409-1048 kDa indicating IgY aggregation. Whereas SDS-PAGE in reducing condition showed normal result, ~68 kDa and ~18,7 kDa protein bands correlated with heavy and light chain of IgY respectively. Moreover SDS PAGE in nonreducing condition also resulted in normal IgY band sized ~185 kDa. Dilution and disaggregation using sodium dodecyl sulphate (SDS), sodium deoxycholate (SDC), sarcosyl, urea, and glycerol did not affect the migration behavior. We concluded that IgY is not in aggregate form. Migration behavior of IgY in CN-PAGE which was slow, produced streaked band, and appeared to have very high molecular weight is possibly due to pI and planar conformation of IgY.

Keywords: *electrophoresis, immunoglobulin Y, native PAGE*

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v2i1.104>

PENDAHULUAN

Elektroforesis adalah teknik laboratorium untuk memisahkan makromolekul berdasarkan muatan dan ukurannya dalam suatu medium yang dialiri listrik. *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah salah satu metode elektroforesis untuk memisahkan protein. Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE kehilangan konformasi aslinya dan bermuatan negatif sehingga akan bergerak menuju kutub positif dan terpisah berdasarkan ukurannya. Metode elektroforesis lainnya, *native polyacrylamide gel electrophoresis* (*Native PAGE*), mempertahankan protein dalam konformasi aslinya sehingga pemisahannya bergantung pada titik isolistrik (pI) dari protein[1], ukuran dan bentuknya[2].

SDS-PAGE lebih sering digunakan dalam analisis protein karena hasilnya yang lebih konsisten. Hal ini menyebabkan laporan ilmiah tentang analisis protein dengan *native PAGE* cukup terbatas. Namun demikian, karena protein dipertahankan dalam konformasi aslinya, elektroforesis *native PAGE* penting untuk mempelajari kompleks protein dan muatan protein pada pH tertentu[3]. Komplek protein dalam keadaan *native* sebagai hasil elektroforesis dapat dikeluarkan dari gel kemudian dianalisis untuk menguji aktivitas tertentu dari protein[4].

Imunoglobulin Y adalah protein target yang menarik untuk *native PAGE* karena perilaku migrasinya pada *native PAGE* belum diketahui namun karakterisasi IgY telah banyak dilakukan sehingga dapat menjadi pembanding untuk hasilnya di *native PAGE*. Imunoglobulin adalah protein yang dihasilkan oleh sel limfosit yang mampu mengenali antigen secara sangat

spesifik[5]. Unggas menghasilkan tiga isotipe imunoglobulin yakni imunoglobulin M, A dan Y (IgM, IgA, dan IgY)[6]. Selain terdapat pada serum, IgY secara eksklusif terdapat dalam kuning telur. Deposit IgY dalam kuning telur adalah bentuk transfer imun pasif dari induk kepada anakan[7]. Sekuens asam amino IgY memiliki homologi dengan IgE sehingga IgY secara struktur menyerupai IgE namun memiliki aktivitas seperti IgG[8].

Penelitian ini bertujuan mempelajari pola migrasi IgY pada *native PAGE*. Penelitian ini menemukan pola migrasi IgY yang unik sekaligus menunjukkan hasil *native PAGE* suatu protein harus dianalisis dengan bantuan berbagai data pendukung lainnya.

METODE PENELITIAN

Isolasi Imunoglobulin Y

Isolasi IgY dilakukan dengan *PierceTM Chicken IgY Purification Kit* (Thermoscientific) sesuai dengan petunjuk kit.

SDS-PAGE

Protein dipisahkan dengan elektroforesis sistem Laemmli[9] pada 10% gel poliakrilamida pemisah. Protein pada SDS-PAGE reduktif ditambah β -merkaptotanol dan dididihkan. SDS-PAGE nonreduktif tidak menggunakan β -merkaptotanol dan proses pendidihan. Pemisahan dilakukan dengan perangkat elektroforesis Bio-Rad pada 110 volt, buffer Tris-glisin pH 8,3, dengan protein penanda *SeeBlue Pre-stained Standard* (Novex Life Technologies). Pewarnaan dilakukan dengan *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBBG-250).

Clear Native-PAGE (CN-PAGE)

Isolat IgY dipisahkan dengan elektroforesis sistem Laemmli[9]. Semua larutan yang digunakan tidak mengandung denaturan dan agen pereduksi, dan sampel tidak dididihkan. Pemisahan dilakukan dengan perangkat elektroforesis Bio-Rad pada suhu rendah, tegangan 80 volt, buffer Tris-glisin pH 8,3 dan protein penanda *NativeMARK unstained protein standard* (Novex Life Technologies). Elektroferogram diwarnai dengan CBBG-250.

Pengenceran IgY

IgY diencerkan dengan PBS pH 7,2 dengan faktor dilusi 2, 5, 10, 25, dan 50 kali untuk mengetahui efek dilusi pada migrasi molekul IgY. IgY yang telah diencerkan dipisahkan dengan CN-PAGE.

Pemberian Deterjen, Agen Chaotropik, dan Kosolven untuk Disagregasi IgY

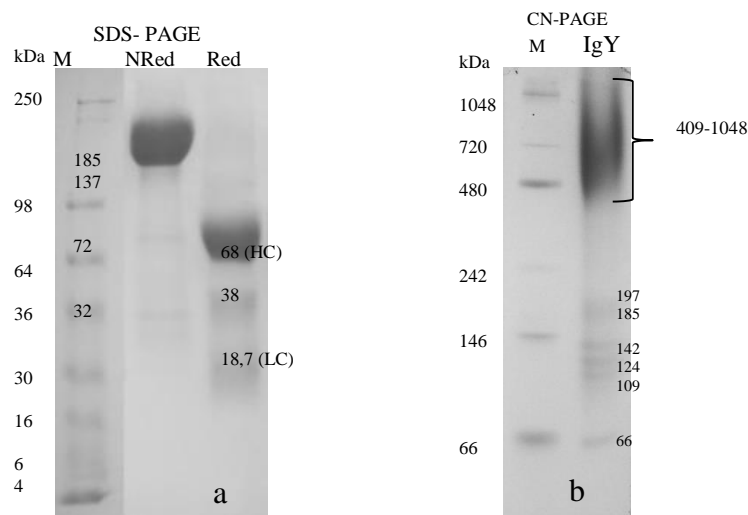
Isolat IgY ditambah dengan natrium dodesil sulfat (NDS), natrium deoksikolat (NDK), dan sarkosil konsentrasi akhir 1% dan 2% b/v. IgY juga diberi perlakuan urea sebagai agen chaotropik pada konsentrasi akhir 0,25 M

dan 0,5 M, dan gliserol sebagai kosolven pada konsentrasi akhir 5% dan 10% v/v. Tiap isolat IgY kemudian dipisahkan dengan CN-PAGE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Elektroferogram Immunoglobulin Y

Isolat IgY yang diperoleh memiliki konsentrasi 6,23 mg/mL (perhitungan data tidak ditunjukkan). Pemeriksaan isolat IgY dilakukan dengan SDS-PAGE pada kondisi reduktif dan nonreduktif. Elektroferogram SDS-PAGE pada kondisi reduktif menghasilkan pita rantai ringan (~18,7 kDa) dan rantai berat (~68 kDa) (Gambar 1.a). Elektroferogram SDS-PAGE nonreduktif menunjukkan pita IgY berukuran ~185 kDa dengan intensitas yang tinggi tanpa adanya pita lain yang signifikan (Gambar 1.a). Hasil ini sedikit berbeda dengan laporan Leslie dan Clem[6] bahwa IgY memiliki bobot molekul ~179 kDa, dengan rantai berat berukuran 67,5 kDa dan rantai ringan berukuran 22 kDa. Namun kedua elektroferogram mengindikasikan IgY sudah berada dalam keadaan murni.



Gambar 1 Pemisahan IgY dengan SDS-PAGE pada kondisi nonreduktif (NRRed) dan reduktif (Red) (a) dan CN-PAGE (b), perkiraan bobot molekul ditunjukkan pada angka di kiri atau kanan. SDS-PAGE nonreduktif menunjukkan pita IgY berukuran ~185 kDa, dan reduktif menunjukkan rantai berat (HC) dan rantai ringan (LC) IgY. IgY pada CN-PAGE menghasilkan pita goresan pada bobot molekul yang tinggi ~409-1048. HC: rantai berat, LC: rantai ringan, M: protein standar bobot molekul.

Isolat IgY kemudian diperiksa dengan CN-PAGE. Hasil dari elektroforesis IgY dengan CN-PAGE cukup menarik karena protein IgY bergerak lambat membentuk pita goresan berukuran sekitar 409 kDa hingga 1048 kDa (Gambar 1.b), dan beberapa protein lain dengan ukuran lebih kecil. Ukuran ~409 kDa hingga 1048 kDa ini jauh lebih besar dibanding ukuran teoritis IgY sekitar 179 kDa.

Pemisahan protein dengan CN-PAGE bergantung pada muatan intrinsik protein (perbandingan pI protein dan pH elektroforesis) dan ukuran pori gel gradien sehingga CN-PAGE tidak dapat sepenuhnya digunakan untuk menentukan bobot molekul dan oligomerisasi protein walaupun elektroforesis telah menggunakan *marker protein* sebagai standar[10]. Hasil elektroferogram IgY dengan CN-PAGE yang diperoleh belum dapat digunakan untuk menyimpulkan IgY berada dalam keadaan agregat atau oligomer dan perlu diperiksa lebih lanjut.

Pengaruh Dilusi dan Penambahan Agen Disagregasi pada Migrasi IgY pada *Native* PAGE

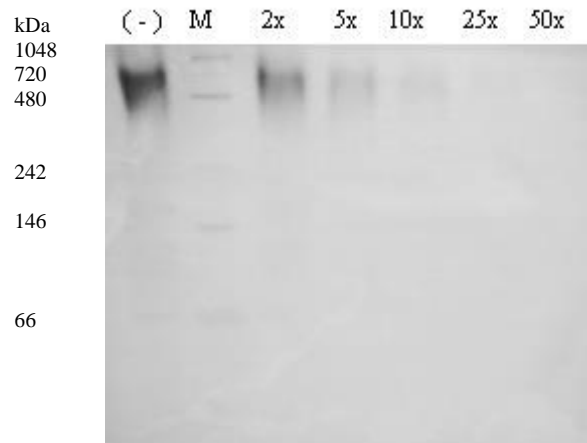
Kecepatan migrasi IgY pada CN-PAGE sangat lambat dan menyerupai protein yang membentuk agregat atau oligomerisasi. Agregasi dapat terjadi pada protein dengan daerah hidrofobik terutama pada buffer dengan kekuatan ionik tinggi. Schade dkk.[11] menyebutkan bagian paling hidrofobik dari IgY adalah bagian terkristal (*fragment crystallizable region*, Fc). Penentuan urutan 504 residu asam amino Fc IgY oleh Parvari dkk.[12] menunjukkan 281 residu asam amino nonpolar. Agregasi dapat terjadi dengan terbentuknya ikatan kovalen, seperti jembatan disulfida, maupun nonkovalen seperti gaya van der Waals, interaksi hidrofobik dan sebagainya. Berdasarkan

hasil CN-PAGE IgY, agregasi IgY, jika ada, kemungkinan bersifat nonkovalen, dapat balik, dan melibatkan interaksi hidrofobik antar Fc.

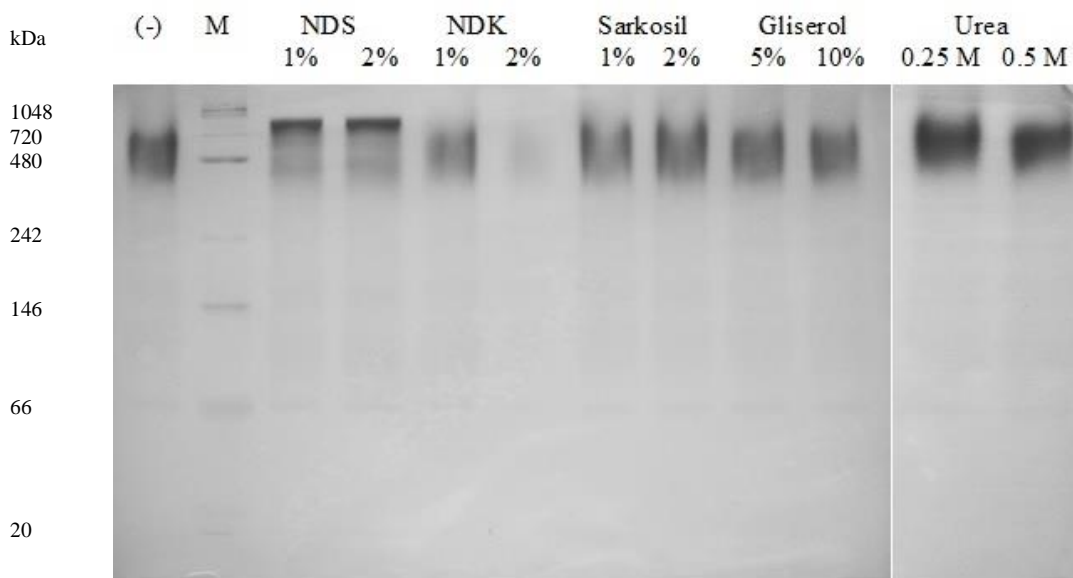
Usaha untuk menghilangkan agregasi IgY yang pertama adalah dilusi karena agregasi dapat disebabkan konsentrasi protein yang terlalu tinggi. Pengenceran IgY dengan faktor 2-50 kali dilanjutkan CN-PAGE ternyata tetap menunjukkan pita IgY dengan bobot molekul yang sama (Gambar 2) sehingga perilaku migrasi IgY pada *native* PAGE tersebut tidak dipengaruhi oleh konsentrasi protein.

Pemeriksaan lebih lanjut terhadap dugaan agregasi IgY adalah pemberian deterjen ionik natrium dodesil sulfat (NDS), deterjen natrium deoksikolat (NDK), deterjen sarkosil, agen chaotropik (urea), dan kosolven (gliserol). Secara teoritis, NDS mampu menghilangkan ikatan non-kovalen antar protein, NDK menghilangkan interaksi antar protein, sementara sarkosil dapat melarutkan badan inklusi. Agen chaotropik dapat menghilangkan interaksi nonkovalen antarprotein seperti ikatan hidrogen, interaksi dipol-dipol dan interaksi hidrofobik [13]. Gliserol mencegah agregasi protein dan berperan sebagai ampifatik yang memperantarai bagian hidrofobik protein dengan pelarut polar [14].

Hasil elektroforesis CN-PAGE menunjukkan pemberian kelima agen disagregasi tidak mengubah pola elektroferogram meskipun IgY dengan perlakuan NDS menunjukkan pita yang lebih tegas (Gambar 3). Berdasarkan elektroferogram yang diperoleh, diduga perilaku migrasi IgY pada CN-PAGE yang sangat lambat dan membentuk pita goresan dengan ukuran jauh lebih besar dari nilai teoritisnya bukan disebabkan adanya agregasi IgY tetapi karena muatan dan konformasinya.



Gambar 2 Dilusi pada IgY tidak mempengaruhi elektroferogram CN-PAGE karena tetap terlihat memiliki bobot molekul yang besar yakni lebih dari ~408 kDa. Faktor dilusi ditunjukkan pada angka di bagian atas. (-) : IgY tanpa pengenceran, M: protein standar bobot molekul.



Gambar 3 Pemberian deterjen ionik (NDS, NDK, dan sarkosil), agen chaotropik (urea), dan kosolven (gliserol) tidak mempengaruhi perilaku migrasi CN-PAGE IgY kecuali pita yang lebih tegas pada NDS. (-): kontrol, M: protein standar bobot molekul.

Pengaruh muatan IgY pada migrasinya di CN-PAGE dapat dijelaskan melalui titik isolistrik (pI) IgY. Titik isolistrik (pI) IgY berkisar antara $6,6 \pm 0,9$ [15]. CN-PAGE sistem Laemmli menggunakan larutan penyangga dengan pH netral cenderung basa yakni Tris-Glisin pH 8,3. IgY pada lingkungan di atas pI bermuatan total negatif sehingga dapat

bergerak menuju kutub positif. Namun demikian, pH sistem CN-PAGE tidak cukup jauh dari pI IgY sehingga muatan negatif yang dihasilkan tidak cukup tinggi. Elektronegativitas yang rendah tersebut menyebabkan IgY bermigrasi sangat lambat pada gel CN-PAGE. Wittig *et al.* [16] menyebutkan protein dengan pI

mendekati netral bergerak terlalu lambat menuju anoda pada CN-PAGE.

Pola goresan pada pita IgY di CN-PAGE terkait dengan subpopulasi pada IgY. Semua subpopulasi IgY dari induk akan ditransfer ke kuning telur [17]. IgY dari berbagai subpopulasi memiliki urutan asam amino yang tidak sama pada domain variabelnya. Perbedaan satu asam amino dapat menyebabkan perbedaan migrasi pada *native* PAGE [18]. Perbedaan asam amino tiap subpopulasi IgY mempengaruhi nilai pI-nya dan berefek pada perbedaan elektronegativitas saat CN-PAGE. Perbedaan elektronegativitas subpopulasi IgY menyebabkan IgY tidak bergerak serentak dengan kecepatan yang sama dan menghasilkan pola goresan. Bentuk protein mempengaruhi migrasinya pada *native* PAGE [2]. Konformasi planar dari molekul IgY diduga juga menyebabkan IgY bersifat kurang hidrodinamis dan pergerakannya lambat.

SIMPULAN

IgY telah dianalisis menggunakan CN-PAGE dan menunjukkan perilaku migrasi yang unik yakni pita goresan berukuran ~409-1048 kDa yang jauh lebih besar dari ukurannya di SDS-PAGE sebesar 185 kDa. Disagregasi dengan dilusi maupun pemberian NDS, NDK, sarkosil, urea, dan gliserol tidak mengubah hasil elektroferogram. IgY bergerak lambat karena elektronegativitas IgY yang rendah di CN-PAGE (pI IgY 6.6 ± 0.9 , pH buffer *native* PAGE 8.3) dan bentuk tiga dimensi IgY yang planar. Berbagai subpopulasi IgY memiliki pI berbeda yang menyebabkan perbedaan elektronegativitas sehingga IgY bergerak pada kecepatan yang berbeda-beda dan membentuk pola goresan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arndt C, Koristka S, Bartsch H, Bachmann M (2012). "Native polyacrylamide gels". *Methods Mol Biol.* **869**: 49-53.
2. Garcia-Descalzo L, Garcia-Lopez E, Alcazar A, Baquero F, Cid C (2012). Gel electrophoresis of proteins [Internet]. [19 Desember 2018]. Tersedia di: http://cdn.intechopen.com/pdfs/35091/InTech-Gel_electrophoresis_of_proteins.pdf. DOI: 10.5772/37514.
3. Kim R (2011). "Native agarose gel electrophoresis". *Cold Spring Harb Protoc*: 884-887. DOI: 10.1101/pdb.prot4558.
4. Wittig I, Braun HP, Schagger H (2006). "Blue native PAGE". *Nature Protocols.* **1**: 418-428.
5. Murphy K (2012). *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science. 127, 159-193, 418-419 p.
6. Leslie GA, Clem LW (1969). "Phylogeny of immunoglobulin structure and function". *J Exp Med.* **130**: 1337-1351.
7. Szabo C (2012). "Transport of IgY from egg yolk to embryo". *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* **2**: 612-620.
8. Warr GW, Magor KE, Higgins DA (1995). "IgY: clues to the origins of modern antibodies". *Immunology Today.* **16**: 392-398.
9. Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* **227**: 680-685.
10. Wittig I, Schagger H (2005). "Advantages and limitations of clear-native PAGE". *Proteomics.* **5**: 4338-4346.
11. Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR (2005). "Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress and production in research and human and veterinary medicine". *Altern Lab Anim.* **33**: 129-154. [Abstrak].

12. Parvari R, Avivi A, Lentner F, Ziv E, Tel-Or S, Bursten Y, Schechter I (1988). "Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains, limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evaluation of the heavy chain locus". *EMBO*. **7**: 739-744.
13. Johnson M (2013). "Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More" [Internet]. *Matter and Methods*. **3**: 163. [18 Juni 2014]. Tersedia di: <http://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>.
14. Vagenende V, Yap MG, Trout BL (2009). "Mechanism of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol". *Biochemistry*. **48**: 11084-11096.
15. Davalos-Pantoja L, Ortega-Vineusa JL, Bastos-Gonzalez D, Hidalgo-Alvarez R (2000). "A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particle". *J Biomater Sci*. **11**: 657-663.
16. Wittig I, Beckhaus T, Wumaier Z, Karas M, Schagger H (2010). "Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis, principles and practical hints". *Molecular & Cellular Proteomics*. **9**: 2149-2161.
17. Loeken MR, Roth TF (1983). "Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into chicken oocyte". *Immunology*. **49**: 21-28.
18. Thammasirirak S, Preecharam S, Ponkham P, Daduang S, Araki T, Svasti J (2007). "New variant of quail egg white lysozyme identified by peptide mapping". *Comparative Biochemistry and Physiology*. **147**: 314-324.