

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G DE COBAIA PARA A PRODUÇÃO DE SEGUNDO ANTICORPO PARA RADIOIMUNOENSAIO

S.R. SILVA, V.C. BORGHI, M.H. BELLINI e B.L. WAJCHENBERG*

COORDENADORIA DE BIOENGENHARIA DO INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES / CNEN - SP e LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA 25 DA FMUSP*

RESUMO

A IgG de cobaia foi isolada e purificada pela precipitação com ácido caprílico seguida de adsorção em "batch" com DEAE-celulose. A eficiência do procedimento foi verificada pela determinação das proteínas totais durante as etapas de purificação. Comprovou-se a pureza do produto final por meio de imunoeletroforese frente a soro de coelho anti-soro total de cobaia. Foram obtidos 240 mg de IgG pura a serem empregados na produção do segundo anticorpo específico para radioimunoensaio.

INTRODUÇÃO

O preparo de reagentes para radioimunoensaio tem sido tema das pesquisas em desenvolvimento no IPEN, visando a substituição de produtos importados [1, 4, 6 e 9].

O presente trabalho descreve o isolamento e a purificação da IgG de cobaia a ser utilizada na produção de um segundo anticorpo para radioimunoensaios, nos quais o primeiro anticorpo é gerado em cobaias.

Esse duplo anticorpo será utilizado principalmente na separação do ensaio de pró-insulina humana, desenvolvido em nossos laboratórios, em substituição ao soro de cabra anti-IgG de cobaia, importado da Pel-Freez, EUA [2].

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se soro normal de cobaias Inglesas, obtido por sangria via punção cardíaca de 18 animais provenientes do Instituto Butantan. A normalidade dos soros foi confirmada pela determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Gornall e cols. [5].

A IgG foi isolada e purificada a partir de uma mistura de 100 ml desses soros, segundo a técnica descrita por Steinbuch e Audran [10]. Inicialmente, adicionaram-se ao soro aproximadamente 200 ml de tampão acetato de sódio 0,06 M pH 4,0, sob agitação constante, até a solução atingir um pH final de 4,8. Em seguida, acrescentaram-se

7,5 ml de ácido caprílico gota a gota, sendo a solução submetida a agitação vigorosa por 30 minutos.

O material foi então centrifugado a 3500 RPM durante 20 minutos, sendo o sobrenadante reservado e o precipitado lavado três vezes com tampão acetato de sódio 0,015 M pH 4,8. O precipitado foi desprezado e os sobrenadantes obtidos durante essas lavagens foram reunidos com aquele reservado anteriormente.

O pH da solução resultante foi elevado para 5,7, ela foi dialisada contra tampão acetato de sódio 0,015 M pH 5,7 e concentrada por meio de membrana Diaflo PM 30, em sistema de ultrafiltração Amicon.

A IgG dessa solução foi purificada pela adição de 6 g de DEAE-celulose, seguida de agitação lenta por 30 minutos. O material foi centrifugado a 3500 RPM por 30 minutos. A IgG presente no sobrenadante foi dialisada contra solução fisiológica e concentrada em saco de diálise envolvido por Sephadex G-50 seco.

Com exceção da ultrafiltração e da diálise, que foram realizadas a 4°C, os demais procedimentos foram efetuados a temperatura ambiente. Durante as diferentes etapas de purificação, a concentração protéica foi avaliada pelo método do Biuret.

A pureza da IgG obtida foi verificada por imunoeletroforese frente a soro de coelho anti-soro total de cobaia (Sigma Immunochemicals). Ela foi então esterilizada em membrana Millipore e armazenada em alíquotas de 1 ml a -80°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média das proteínas totais determinada no soro das cobaias foi de $5,41 \pm 0,41$ g/100 ml, cujos valores individuais estão apresentados na tabela 1. Esses valores são compatíveis com o intervalo de normalidade para cobaias descrito na literatura, que vai de 4,6 a 6,2 g/100 ml [7].

A tabela 2 exhibe os níveis das proteínas totais e os respectivos rendimentos percentuais, obtidos nas várias etapas de purificação da IgG. Observa-se que os 100 ml de soro normal das cobaias, que conti-

nham 5,41 g de proteínas totais, forneceram 0,24 g, correspondendo a um rendimento final de 4,46%.

Tabela 1 - Concentração de proteínas totais do soro das diferentes cobaias.

Animal (nº)	Proteínas Totais (g/100 ml)
1	4,6
2	5,4
3	5,6
4	5,9
5	5,8
6	6,0
7	5,8
8	6,0
9	5,9
10	5,5
11	5,0
12	5,4
13	4,8
14	4,7
15	5,6
16	5,5
17	5,0
18	4,9
Média =	5,41
Desvio = ±	0,41
Padrão	

Tabela 2 - Purificação da IgG de cobaia. Valores de proteínas totais e respectivos rendimentos percentuais.

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	PROTEÍNAS TOTAIS (g)	RENDIMENTO (%)
Soro total	5,41	100
Precipitação com ácido caprílico	0,53	9,90
Adsorção em "batch" com DEAE-celulose	0,27	5,02
Concentração final	0,24	4,46

Esse rendimento foi superior aquele obtido anteriormente em nossos laboratórios, quando se isolou a IgG de coelho pela precipitação com sulfato de sódio e cromatografia em DEAE-celulose [8]. Isso deve ser devido ao menor manuseio do material pela precipitação com o ácido caprílico e adsorção em "batch" com DEAE-celulose.

Entretanto, outros autores empregando esse mesmo procedimento na purificação da IgG humana, obtiveram rendimentos ainda maiores, da ordem de 10 a 12% [10].

A figura 1 apresenta o resultado da imunoeletroforese da IgG purificada, revelando, frente ao soro de coelho anti-soro total de cobaia, uma linha única de precipitação com mobilidade eletroforética de IgG.

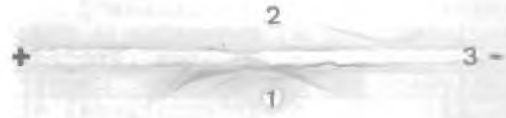


Figura 1 - Padrão imunoeletroforético da IgG purificada: (1) soro total de cobaia; (2) IgG purificada; (3) soro de coelho anti-soro total de cobaia.

Portanto, além da purificação da IgG pela ajuda do ácido caprílico ser um procedimento bastante prático, por envolver uma única precipitação, ela forneceu um produto final de pureza elevada.

Os 240 mg de IgG obtidos foram distribuídos em frascos estéreis, contendo 10,98 mg cada e mantidos a -80°C.

Considerando que na obtenção dos anticorpos empregam-se quantidades pequenas do imunógeno, da ordem de 100 a 500 µg por injeção [3 e 9], a quantidade de IgG isolada neste trabalho permitirá a imunização de muitos animais para a produção do duplo anticorpo de radioimunoensaio.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a técnica empregada para o isolamento da IgG do soro de cobaias foi eficiente e que a IgG obtida apresentou pureza elevada, sendo muito adequada para a produção de anticorpos específicos. Além disso, a quantidade de imunógeno isolada permite a obtenção desse segundo anticorpo para radioimunoensaio em muitos animais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Sr. C.E. Lopes do Instituto Butantan a doação das cobaias. Agradecem também ao CNPq (processo nº 50.0289/90-5) e a FAPESP (processo nº 91/2610-0) os auxílios recebidos para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BORGHI, V.C. "Preparation and quality control of radioiodinated hormones for radioimmunoassay", In: Memorias de la III Escuela para los Problemas Actuales de las Ciencias Nucleares, La Havana, Cuba, 17-22 de octubre 1990, volumen 3, no prelo.
2. BORGHI, V.C.; NASCIMENTO, M. & WAJCHENBERG, B.L., "Specific and direct proinsulin radioimmunoassay for the evaluation of insulinomas", In: International Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures: Perspectives in Developing Countries. Vienna, 1991. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1992. p. 366-79. IAEA-SM-324/30.
3. CHAPMAN, R.S.; MUNRO, A.C.; TEMPLETON, J.G. & FATORI, P., "Production of second antibody for radioimmunoassay", In: HUNTER, W.M.; CORRIE, J.E.T., eds., Immunoassay for clinical chemistry, London, Churchill Livingstone, 1983, p. 456-68.
4. GIMBO, E.R.; RIBELA, M.T.C.P.; BORGHI, V.C.; SCHWARZ, I.; DIAS, L.E.M.; ARAUJO, E.A. & BARTOLINI, P., "Small-scale extraction and radioiodination of human hormones for the substitution of imported radioimmunoassay reagents", São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1988 (Publicação IPEN 181).
5. GORNALL, A.C.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M.; "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction", Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 177: 751-66, 1949.
6. LIN, H.L.; ARENSTEIN, I.R. & BORGHI, V.C., "Hormônio tireotrófico humano hipofisário: isolamento e aplicação no radioimunoensaio", In: Anais do 3º Congresso Geral de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 1990, Associação Brasileira de Energia Nuclear, caderno 12, p.57-66.
7. MANNING, P.J.; WAGNER, J.E. & HARKNESS, J.E., "Biology and diseases of guinea pigs", In: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEM, F.M. eds., Laboratory animal medicine, New York, Academic Press, 1984, p.149-81.
8. SILVA, S.A. & BORGHI, V.C., "Isolamento e purificação da imunoglobulina (IgG) de coelho para a produção de segundo anticorpo para radioimunoensaio", São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1990 (Publicação IPEN 294).
9. SILVA, S.R.; BORGHI, V.C. & WAJCHENBERG, B.L., "Estudo comparativo do segundo anticorpo para radioimunoensaio produzido integralmente no país com similar importado (soro de carneiro anti-IgG de coelho)", In: Anais do 4º Congresso Geral de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 1992, Associação Brasileira de Energia Nuclear, 2º volume, p.659-64.
10. STEINBUCH, M. & AUDRAN, R., "The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid", Archives of biochemistry and biophysics, New York, 134:279-84, 1969.

ENDEREÇO PARA CONTACTO

Dra. Vânia Caira Borghi
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
Caixa Postal 1149
CEP 05499 - Pinheiros, SP - Brasil
Fone: (011) 2116011 ramal 1522
FAX: (011) 2123546