

ESTUDOS DAS MELHORES CONDIÇÕES DE ENSAIO NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS DE E. COLI EM PRODUTOS OBTIDOS MEDIANTE TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

Carlos Roberto Jorge Soares e Paolo Bartolini  
Divisão de Medicina (TBM) - IPEN-CNEN/São Paulo.

A padronização de uma técnica ultra-sensível de determinação de proteínas de E. coli (ECP) tornou-se indispensável no controle de qualidade dos extratos de hormônio de crescimento recombinante (rec-hGH) produzidos em nosso laboratório e também é necessária em todo tipo de produção de proteínas injetáveis obtidas em bactérias transformadas.

O limite máximo de aceitabilidade deste tipo de contaminantes foi estabelecido em 10 ppm (partes por milhão) pelas organizações internacionais de controle. Tendo que analisar frascos com conteúdo de aproximadamente 2 mg de rec-hGH/ml, a sensibilidade necessária deverá ser, portanto, de pelo menos 5 ng ECP/ml. De fato os trabalhos existentes na literatura sobre este assunto relatam sensibilidades de até 2 ng/ml (Anicetti e cols. J. Immunol. Methods, 1986; 91:213-224).

Com esta finalidade, objetivando especialmente sensibilidade e precisão, foi montado um sistema de ensaio imunoradiométrico (IRMA) a partir de proteínas da cepa RRI de E. coli, a mais utilizada em nossas transformações, submetidas parcialmente ao mesmo processo de purificação utilizado para o rec-hGH. Esta fração proteica foi usada para imunizar quatro coelhos (New Zealand White), testando os títulos dos antisoros obtidos mediante um simples radioensaio montado especificamente para esta finalidade, empregando ECP marcadas com  $^{125}\text{I}$ . O antisoro que apresentou o título maior foi purificado por precipitação com ácido caprílico seguida de cromatografia por afinidade em colunas preparadas acoplando as mesmas ECP à gel de Sepharose 4B ativado com CNBr.

As gama-globulinas anti-ECP assim purificadas foram usadas para marcação com  $^{125}\text{I}$  e preparação de um sistema "sandwich-IRMA" com fase sólida em placas (Dynatech, Alexandria, VA, EUA).

Um estudo foi realizado com relação às melhores condições de ensaio, utilizando diferentes concentrações de IgG (1,25; 2,50 e 5,0 mg/ml) na preparação da fase sólida e diferentes quantidades de  $^{125}\text{I}$ -IgG (10.000; 100.000 e 250.000 cpm/poço). A sensibilidade da técnica nas várias condições foi calculada utilizando a formulação de Rodbard (Anal. Biochem. 1978; 90:1-2). Também foi analisada a precisão ao longo da curva, a razão ligação máxima/ligação mínima e a inclinação da curva dose resposta. A curva obtida com 250.000 cpm de traçador e 1,25 mg/ml de IgG apresentou aparentemente os melhores parâmetros, com uma sensibilidade da ordem de 0,04 ng/ml, um CV = 2-10% (n = 4 replicatas) e uma inclinação de -2000 cpm/ng ECP.

Estes dados relativos à precisão serão discutidos juntamente com os conceitos de exatidão, lembrando que este tipo de ensaio sempre deverá ser específico para a cepa bacteriana e o procedimento de purificação utilizados em cada caso.