

**CNEN/SP**

---

***ipen*** **Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares**

**PREPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DE RADIOINSULINAS**

**Isacelis Torres da Toledo e Souza Daniel Guarnella Neto e Bernardo Léo Wajchenberg**

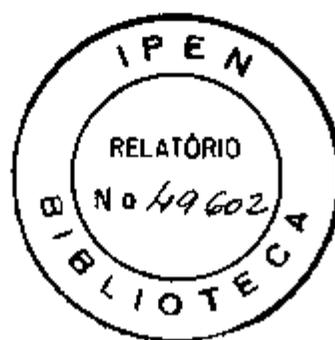
**PUBLICAÇÃO IPEN 160**

**JULHO/1988**

**PREPARAÇÃO PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DE RADIOINSULINAS**

Iracema Torres de Toledo e Souza Daniel Giannella Neto e Bernardo Léo Wajchenberg

**DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



CNEN/SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
SÃO PAULO - BRASIL

**I.P.E.N.**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C 45 00

CHLORAMINES  
COMPARATIVE EVALUATIONS  
INSULIN  
IODINATION  
ORGANIC IODINE COMPOUNDS  
RADIOIMMUNOASSAY

## PREPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DE RADIOINSULINAS

Iracelia Torres de Toledo e Souza Daniel Giannella Neto & Bernardo Léo Wajchenberg

### RESUMO

Desenvolvemos a técnica de radiiodação controlada de insulina de porco pelo método de Hunter e Greenwood com as modificações sugeridas por Roth. Este método foi comparado com a radiiodação usando Iodogen. O Iodogen reage em fase sólida com a mistura aquosa de  $I^-$  e proteínas. Obtivemos, nos 2 métodos, insulina de porco marcada com atividade específica satisfatória e estudamos as características do radioimunoensaio.

### PREPARATION, PURIFICATION AND STORAGE OF RADIOINSULIN

#### ABSTRACT

Stoichiometric iodination of porcine insulin was performed to the general method of Hunter and Greenwood with modifications recommended by Roth. These method was compared with radioiodination using Iodogen. Films of Iodogen react rapidly in the solid phase with aqueous mixtures of  $I^-$  and proteins. For two methods satisfactory activity of the labeled porcine insulin was obtained and the characteristics of the radioimmunoassay were studied.

#### INTRODUÇÃO

O método clássico da cloramina T para a marcação de polipeptídeos quando se deseja alcançar alta atividade específica ( $A_e$ ) pode conduzir a preparações marcadas com imunorreatividade

e estabilidade diminuídas, presumivelmente em virtude da exposição da proteína ao excesso deletério dos agentes oxidantes (Cloramina T) e redutores (metabissulfito de sódio). Para obviar estes inconvenientes padronizamos e comparamos 2 métodos de preparação de radioinsulinas. Ambos procedimentos são realizados em condições moderadas, evitando-se o excessivo contato com os reagentes e consequentemente, menor agressão à molécula proteica. Objetivou-se a obtenção de radioinsulinas com alta atividade específica da molécula no sentido de manter a estabilidade e imunoreatividade expressas pelas ligações inespecíficas e máxima com o anticorpo específico na ausência de antígeno.

#### IODAÇÃO CONTROLADA DA CLORAMINA T

Utilizamos o método clássico de Hunter e Greenwood (4) com as modificações sugeridas por Roth (3) que preconiza lenta e progressiva adição de quantidades controladas de cloramina T, nas exatas proporções das massas envolvidas e não em excesso como convencionalmente. A fim de não ultrapassar a quantidade estequiométrica de cloramina T avaliamos a cinética da reação a cada nova adição de agente oxidante. A adição de pequena quantidade de um redutor (metabissulfito de sódio) evitará o prosseguimento ulterior da reação.

#### IODOGEN

Foi descrito primeiramente por Fraker e Speck (2) como um reagente para iodação de proteínas e membranas celulares. O Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3a-6a-difenilpicloril) intervem na iodação rápida em fase sólida (potencialmente menos destrutiva) em solução aquosa de proteína. Pelo fato de ser pouco solúvel em água é preparado em solvente orgânico, distribuído em tubos que serão usados para a reação de iodação e secos à temperatura ambiente. Forma-se um fino filme na base. Pode-se preparar previamente os tubos de reação para uma estocagem de até 6 meses. O Iodogen permanece na fase sólida durante a reação de iodação e o hormônio é difundido na área em que está contido o reagente. A reação é interrompida pela simples remoção do produto marcado do tubo de reação.

## PURIFICAÇÃO DO PRODUTO MARCADO

Sendo a insulina um hormônio peptídico de caráter básico a baixo peso molecular pode ser adsorvida à celulose através de grupos funcionais do adsorvente(1) e ser eluída por eluente adequado. As radioinsulinas obtidas pelos 2 métodos de marcação, foram purificadas por este sistema.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nos 2 métodos de marcação utilizamos a mesma quantidade de insulina de porco (4µg) e ImCi de 125-I.

## RADIOAÇÃO CONTROLADA DA CLORAMINA T

No tubo de iodação adicionamos 35 µl de Tampão Fosfato 0,3 M pH 7,5; ImCi de 125-I; 4µl de insulina de porco (4µg em q s p ácido clorídrico 0,01N) e 15µl de cloramina T (0,6µg em q s p Tampão Fosfato 0,3M pH 7,5). Determinamos o percentual de radioatividade pela precipitação com ácido tricloroacético TCA 10%. Em geral foram necessárias 2 adições de cloramina T para se obter o rendimento adequado da reação. No total adicionamos apenas 1µg de cloramina T. Após a adição de 5µl de metabissulfeto de sódio (1µg em q s p Tampão Fosfato 0,3M pH 7,5) adicionamos 100µl de BSA 25% (bovina serum albumin em Tampão Fosfato).

## IODOGEN

No tubo de iodação (2µg de iodo gen preparado previamente com diclorometano como solvente) adicionamos 10µl de 125-I (ImCi de 125-I em q s p Tampão Fosfato 0,5M pH 7,5) e 10µl de insulina de porco (4µg em q s p Tampão Borato 0,05M pH 8,5). O rendimento de marcação foi obtido pela determinação do percentual de radioatividade pela precipitação com TCA 10%.

## PURIFICAÇÃO

A purificação da insulina de porco marcada pelos 2 métodos foi realizada através de adsorção à celulose (coluna de pó de celulose Whatmann CF 11) acondicionada até a altura de 4 cm em pipeta Pasteur com cerca de 0,7cm de diâmetro.

Aplicamos o material marcado no topo da coluna aguardando a sua total incorporação. Lavamos 10 vezes a coluna com 0,05ml de água destilada exercendo certa pressão de ar (pequena bexiga) no topo da coluna para escotar o volume correspondente a cada uma das eluições (todo livre e fração danificada). A insulina de marca 125-I adsorvida à celulose, foi eluída através de uma solução álcool-ácido (álcool etílico ácido clorídrico concentrado: água destilada-7,50 0,15 2,35ml) coletando-se cada fração em tubo separado e identificado. Controlamos a pureza de cada fração pelo percentual de radioatividade precipitado pelo TCA 10%.

#### ESTABILIDADE E IMUNORREATIVIDADE

O conteúdo dos 4 eluetos da coluna de celulose foram testados para observar a percentagem de ligações inespecíficas e propriedade de se ligar adequadamente ao anticorpo específico. Para as ligações inespecíficas os tubos testes foram preparados com 0,1ml do traçador ( $\approx 20\ 000$  cpm) e 0,2ml de tampão Fosfato 0,04M pH 7,5 contendo 5 $\mu$ g/ml de albumina humana. Para a imunorreatividade 0,1ml de traçador ( $\approx 20\ 000$  cpm) 0,1ml de anticorpo específico (diluição 1 20 000) e 0,1ml de tampão Fosfato 0,04M pH 7,5 contendo 5 $\mu$ g/ml de albumina humana. Após a incubação de 24 horas a 4° separamos a insulina livre e ligada ao anticorpo pela precipitação da forma ligada com 0,3ml de polietilenoglicol (PEG) 25%. A única variável foi a radioinsulina marcada com cloramina T e Iodogen.

#### ESTOCAGEM

Preparamos em tampão Fosfato 0,04M pH 7,5 volumes suficientes de anticorpo específico (diluição 1 20 000) e traçador (2° eluato da coluna de celulose) de cada radioinsulina ( $\approx 20\ 000$  cpm por tubo) para testar as ligações inespecíficas e imunorreatividade das radioinsulinas marcadas pelos 2 métodos para uma estocagem de até 60 dias.

#### RESULTADOS E CONCLUSÕES

Eficiência da Marcação Expressa como percentagem do total de radioatividade incorporada a fração proteica. As medianas

dos rendimentos de reação (78 e 78%) e das atividades específicas (195 e 197  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) não foram estatisticamente diferentes entre os 2 métodos (Tabela 1)

**Purificação** As 4 frações eluídas da coluna de celulose apresentaram (Tabela 2) percentuais de pureza que variaram de 90 a 98% sendo que o eluato 2 apresentou mediana dos percentuais de pureza maior para a Cloramina T

**Estabilidade e Imunorreatividade** Testes realizados nos 4 eluatos obtidos após purificação em coluna de celulose, mostram ligações inespecíficas próximas (em torno de 5%) A ligação máxima foi maior para o método da Cloramina T (tabela 3)

**Estocagem** As radioinsulina preparadas pelos 2 métodos (3 marcações para cada método) submetidas a testes de estabilidade (ligações inespecíficas) e imunorreatividade (reação antígeno-anticorpo) utilizando o eluato 2 como traçador (tabela 4 e figura 1) resultaram em ligações inespecíficas inalteradas e diminuição da imunorreatividade (queda do percentual de ligação B0/T) durante a estocagem de 60 dias. A percentagem de queda de ligação máxima em relação à ligação inicial foi maior para o método da cloramina T no 1º e 30º dia após a marcação. A percentagem de queda de ligação máxima em relação à inicial foi maior para o método da cloramina T 30 dias após a marcação, porém não houve diferenças entre os 2 métodos 60 dias após a marcação

Ambos os métodos mostraram-se adequados para a obtenção de radioinsulina com alta atividade específica. Foi possível a utilização dos preparados até 2 meses após a marcação com manutenção das ligações não específicas baixa e máxima de no mínimo 30% sem necessidade de repurificação

O método do Iodato de sódio é mais simples na sua consecução que o método estequiométrico da cloramina T e adequado na obtenção de radioinsulina com alta atividade específica permitindo utilização prolongada em radioimunoensaios do preparado iodado. Além de sua simplicidade técnica, pode permitir maior vida útil da proteína marcada. Os tubos de reação revestidos com o reagente, podem ser armazenados indefinidamente, evitando-se assim, a preparação muitas vezes tediosa dos reagentes comumente utilizados no método de marcação pela Cloramina T

TABELA 1  
EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO

Partida	Cloramina T		Iodogen	
	TCA	Ae	TCA	Ae
Nº	%	uCi/ug	%	uCi/ug
1	81	205	79	197
2	78	195	77	192
3	76	190	80	200
X	78	195	79	197

$$T_{TCA} \times I_{TCA} : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

$$T_{Ae} \times I_{Ae} : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

TABELA 2

Valores percentuais de pureza nos 4 eluatos da coluna de celulose (TCA)

FLUATOS									
Partida	Cloramina T				Iodogen				
	Nº	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1	98	97	95	91	96	96	92	90
2	2	97	97	94	90	97	96	94	90
3	3	96	97	94	90	98	96	93	90
X		97	97	94	90	96	96	93	90

$$T_1 \times I_1 : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

$$T_2 \times I_2 : p < 0,05$$

$$T_3 \times I_3 : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

$$T_4 \times I_4 : p > 0,05 \text{ (NS)}$$

TABELA 3

Razão do nível de radioatividade do complexo anticorpo-insulina de porco  $^{125}\text{I}$  adicionada ao tubo de reação na ausência de insulina fria (PO/T)

Partida	FLUATOS							
	Percentagem de ligação (PO/T)							
Nº	Cloramina T				Iodogen			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	44	46	38	34	40	42	35	31
2	43	45	36	32	37	40	33	29
3	44	47	34	33	36	39	31	28
X	44	46	36	33	37	40	33	29
T <sub>1</sub>	X	I <sub>1</sub>	p < 0,05					
T <sub>2</sub>	X	I <sub>2</sub>	p < 0,05					
T <sub>3</sub>	X	I <sub>3</sub>	n > 0,05 (NS)					
T <sub>4</sub>	X	I <sub>4</sub>	p < 0,05					

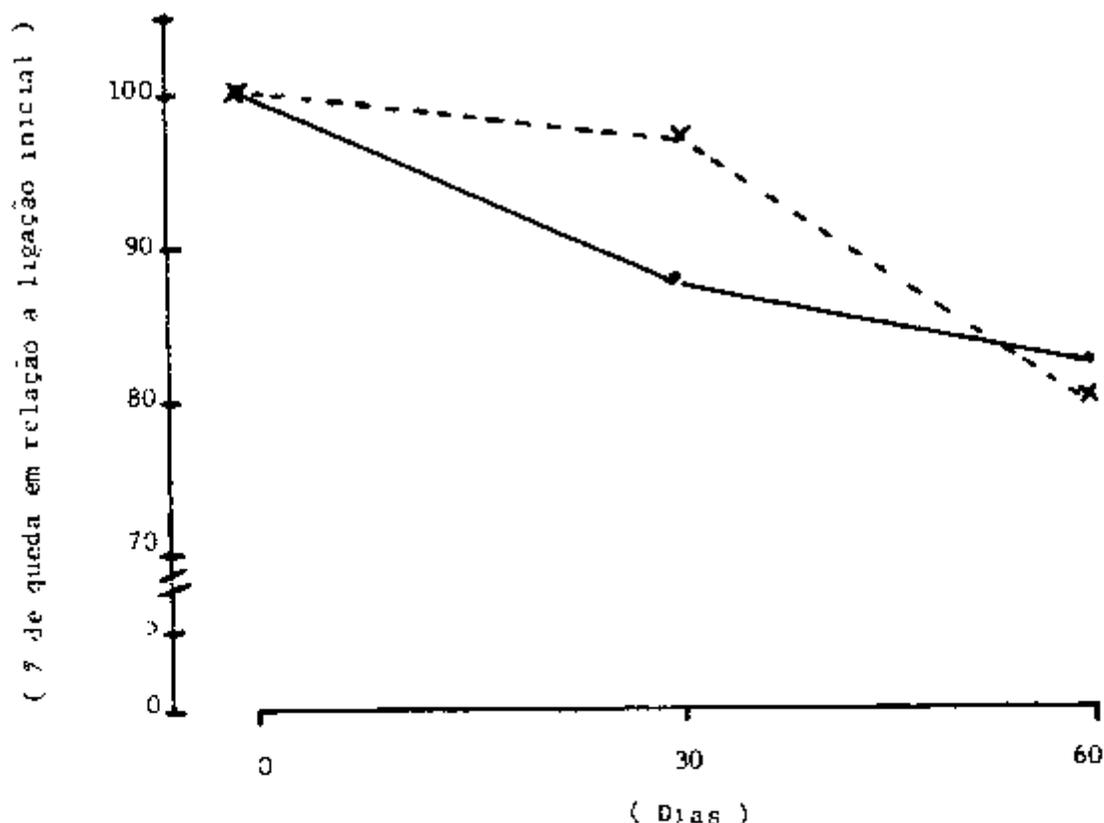
TABELA 4

Estocagem (Fluato 2) Percentagem de Ligação  
FO/T

Partida	DIAº					
	Cloramina T			Iodogen		
Nº	1	30	60	1	30	60
1	43	40	39	37	36	22
2	46	41	39	32	31	30
3	48	43	40	40	37	35
X	46	41	40	37	36	30
T <sub>1</sub>	X	I <sub>1</sub>	p < 0,05			
T <sub>30</sub>	X	I <sub>30</sub>	p < 0,05			
T <sub>60</sub>	X	I <sub>60</sub>	p > 0,05 (NS)			

Figura 1

Percentagem de queda da ligação máxima (30) em relação ao tempo de marcação (30 e 60 dias) com os métodos de cloramina T (•—•) e iodogen (—x—)



#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 BEPSON, S A & YALOW, R S General methodology In YALOW, R S Methods in radioimmunoassay of peptide hormone Amsterdam North-Holland 1976 p 14-7
- 02 FRANKER, P J & SPECK, J C Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a-6a-Diphenylglycoluril Biochem Biophys Res Comm, **80** 849-57, Feb., 1978
- 03 FREYCHET, P, ROTH, J, NEVILLE JR, D M Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes Biochem Biophys Res Comm, **43** 400-8, Apr., 1971

U

04 HUNTER, W M & GREENWOOD, F D Preparation of iodine 131  
labeled human growth hormone of high specific activity  
Nature, 194 495-6, May, 1962