

Producción

Instituto de Hematología e Inmunología

PREPARACIÓN DE UN CONJUGADO PEROXIDASA-ANTI IgG HUMANA (CADENA γ) EN CONEJO

Lic. Julio C. Merlín Linares, Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco, Lic. Ana M. Guerreiro Hernández, Dr. Juan M. González González y Lic. Ada A. Arce Hernández

RESUMEN

Se preparó un conjugado con peroxidasa a partir de los anticuerpos específicos aislados de un suero de conejo anti cadenas γ de la IgG humana. Los anticuerpos específicos se aislaron por cromatografía de afinidad, y el conjugado se preparó por el método de oxidación con peryodato. El conjugado obtenido presentó una relación molar IgG/peroxidasa de 1,07, un valor de RZ de 0,33 y resultó evaluado satisfactoriamente en cuanto a su especificidad y reactividad en los ensayos inmunoenzimáticos realizados.

DeCS: ANTICUERPOS; CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD; PEROXIDASAS; IGG; CONEJOS.

Los anticuerpos específicos aislados por cromatografía de afinidad a partir de los antisueros policlonales permiten elevar considerablemente la especificidad y la sensibilidad de los métodos en los que se utilizan. Los resultados obtenidos con estos anticuerpos específicos son extraordinariamente superiores a los que se obtienen con el antisuero sin fraccionar, y generalmente muy superiores a los que se obtienen con la fracción gamma (obtenida por precipitación salina), y con la fracción IgG (obtenida por cromatografía de intercambio iónico) del antisuero original.

La utilización de anticuerpos aislados por cromatografía de afinidad para la preparación de conjugados con peroxidasa

se ha generalizado rápidamente entre los diferentes productores comerciales, pues este procedimiento posibilita la obtención de conjugados que poseen un nivel de calidad muy alto. Sin embargo, se ha demostrado que estos conjugados pueden ser preparados por el método de oxidación con peryodato en los laboratorios donde van a ser empleados,¹ y nuestra experiencia anterior nos ha permitido comprobar que por este procedimiento es posible la obtención de conjugados que poseen un nivel de calidad comparable con el de sus similares comerciales.²

Este trabajo se realizó con el objetivo de preparar un conjugado anti IgG humana (específico para las cadenas γ) en conejo,

con el fin de utilizarlo en métodos indirectos para la detección de anticuerpos.

MÉTODOS

Aislamiento y purificación de IgG. La IgG humana se purificó por cromatografía de intercambio iónico en resina de DEAE Sephacel, y por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-150.³ Las cadenas γ se prepararon por reducción de la IgG purificada con β -mercapto etanol, y se separaron de las cadenas ligeras por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-100. La IgG de conejo se purificó por cromatografía de intercambio iónico empleando resina tipo DE-52, y por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-150.

Producción de antisueros: El suero anti IgG (cadena γ) humana se obtuvo por inmunización intramuscular de las cadenas γ purificada en conejos, y el suero anti IgG humana (molécula completa) se obtuvo por inmunización intramuscular en carnero. El suero anti IgG de conejo se obtuvo por inmunización intramuscular en carnero. El suero anti proteínas séricas totales humanas se obtuvo por inmunización del suero normal diluido en conejos, y el suero anti proteínas séricas totales de conejo se obtuvo por inmunización del suero normal diluido en carnero. En todos los casos, se emplearon esquemas de inmunización diseñados por nuestro grupo de trabajo.

Purificación de los antisueros específicos. El suero de conejo anti IgG (cadena γ) humana se precipitó con sulfato de amonio al 50 % de saturación. El precipitado se resuspendió, se dializó exhaustivamente, y se aplicó en una columna cromatográfica que contenía gel de Sepharosa CL-4B acoplada con IgG humana pura, en una concentración de 2 mg/mL de gel.

Preparación del conjugado. La conjugación de la peroxidasa (E.C.1.1.1.1.7; tipo VI, SIGMA) con los antisueros específicos anti IgG (cadena γ) humana se llevó a cabo por el método de oxidación con peryodato,¹ para lo cual se empleó una proporción de 0,5 mg de peroxidasa por cada mg de anticuerpo. El conjugado se dializó contra solución amortiguadora de fosfatos 0,01M de pH 7,2, que contenía NaCl 0,15 M (PBS), se purificó por cromatografía en Sepharosa CL-6B y al producto obtenido se le determinó la relación molar IgG/peroxidasa y el valor de RZ (D.O. a 403 nm/D.O. a 280 nm). Se le añadió albúmina de suero bovino al 1 % y timerosal al 0,01 % para su conservación en alícuotas a -30°C .

Evaluación de los productos obtenidos. La pureza de la IgG humana, de las cadenas γ , de la IgG de conejo y de los anticuerpos específicos, así como la reactividad y especificidad de estos últimos, se comprobaron por inmunoelectroforesis y por doble inmunodifusión en gel de agar.^{4,5} El conjugado se evaluó mediante ensayos inmunoenzimáticos heterogéneos tipo ELISA.

El primer ensayo inmunoenzimático se realizó por el método directo en placas recubiertas con diferentes concentraciones de IgG humana, saturadas con albúmina de suero bovino e incubadas con el conjugado. Posteriormente se incubó con la mezcla sustrato-cromógeno (H_2O_2 -OPD), se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2M y se leyó a 492 nm.

El segundo ensayo inmunoenzimático se realizó por un método indirecto, en placas recubiertas con diluciones de suero anti IgG humana, saturadas con albúmina de suero bovino, e incubadas con IgG humana, con el conjugado y con la mezcla de sustrato-cromógeno.

En el tercer ensayo inmunoenzimático se utilizaron placas preparadas de igual

forma que en el primero (recubiertas con 0,2 y 5 μg de IgG humana, respectivamente), que se incubaron con diferentes diluciones del conjugado.

RESULTADOS

La cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-100 permitió separar adecuadamente las cadenas pesadas (γ) de las ligeras (fig.1). La inmunoelectroforesis en gel de agar y la doble inmunodifusión permitieron comprobar la pureza de la IgG humana, de las cadenas γ , de la IgG de conejo, y de los anticuerpos específicos anti IgG (cadena γ) humana. En todos los casos se obtuvo una sola línea de precipitación debida a la IgG de la especie en cuestión, frente al suero anti IgG y frente al suero anti proteínas séricas totales.

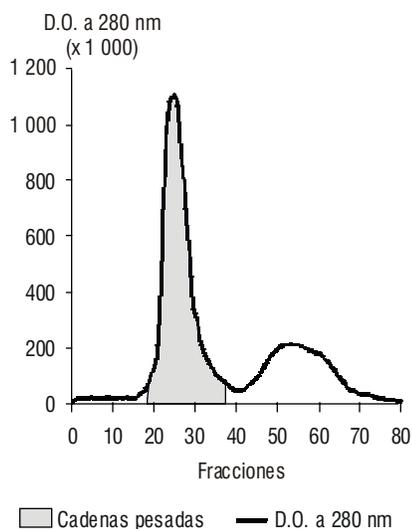


FIG. 1. Separación de las cadenas pesadas (γ) y ligeras de la IgG humana por cromatografía de filtración en gel de Sephadex C-100.

Al emplear la doble inmunodifusión y la inmunoelectroforesis para evaluar la reactividad y la especificidad de los anticuerpos específicos anti IgG (cadena γ) humana aislados, se observó que estos producían una sola línea de precipitación con las cadenas γ , con la IgG humana pura y con el suero normal humano. No se observaron líneas de precipitación con las restantes proteínas del suero humano. A partir de los anticuerpos aislados por cromatografía de afinidad, se preparó el conjugado con peroxidasa. Se empleó una relación molar de peroxidasa/IgG de 2. El conjugado, después de la purificación con Sepharosa CL-6B, presentó una relación peroxidasa/IgG de 0,93 y un valor de 0,33 para el índice RZ. El producto presentó el aspecto de un líquido transparente de color amarillo claro, sin contaminación con la peroxidasa ni la IgG sin conjugar, las que habían sido separadas por la cromatografía en Sepharosa CL-6B.

En el primer ensayo inmunoenzimático se observó que el conjugado se fijaba a la placa en cantidades directamente proporcionales a la concentración de IgG humana empleada en el recubrimiento (fig.2). Cuando la placa recubierta con IgG humana se incubó con un antisuero de carnero sin conjugar antes de añadir el conjugado (controles negativos), el conjugado prácticamente no se fijó a la placa.

En el segundo ensayo inmunoenzimático se observó que el conjugado se fijaba a la placa en cantidades proporcionales a las concentraciones del suero de carnero anti IgG humana (molécula completa), utilizado como anticuerpo para el recubrimiento (fig.3). En los controles negativos, en los que se substituyó el anticuerpo de recubrimiento por un suero

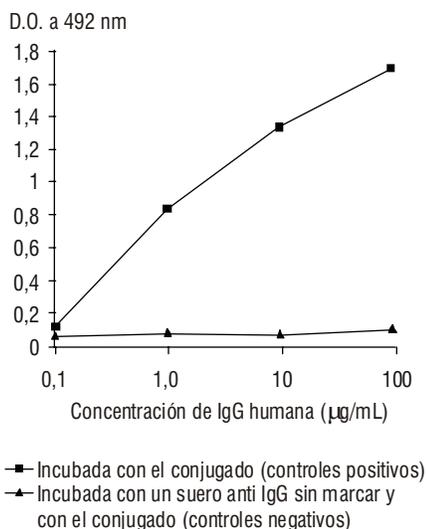


FIG. 2. *Ensayo inmunoenzimático en una placa recubierta con IgG humana. Influencia de la concentración de la IgG humana.*

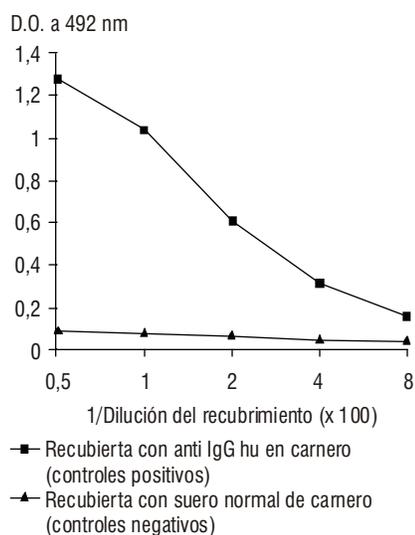


FIG. 3. *Ensayo inmunoenzimático en una placa recubierta con anti IgG humana. Influencia de la concentración del anticuerpo de recubrimiento.*

normal (no inmune) de carnero en iguales diluciones, no se produjo una fijación apreciable del conjugado.

En el tercer ensayo inmunoenzimático se observó un aumento proporcional de las lecturas al aumentar la concentración del conjugado. Se obtuvo una D.O. de 0,98 en una placa recubierta con 5 µg/mL de IgG humana e incubada con una dilución 1:2000 del conjugado, y una D.O. de 0,69 para una placa recubierta con 200 ng/mL de IgG humana e incubada con una dilución de 1:500 del conjugado (fig.4).

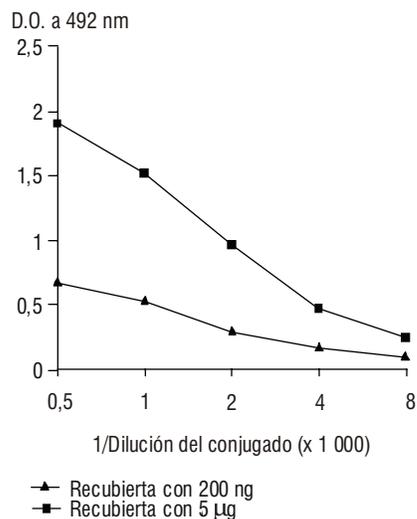


FIG. 4. *Ensayo inmunoenzimático en una placa recubierta con IgG humana. Influencia de la concentración del conjugado.*

DISCUSIÓN

En este trabajo se purificó la llamada cadena pesada (γ) de la IgG humana para

emplearla en la producción de un antisuero en conejo, a partir del cual se aislaron los anticuerpos específicos anti IgG (cadena g) humana por cromatografía de afinidad, para garantizar la preparación de un conjugado que tuviera un alto grado de especificidad.

Para la preparación del conjugado se mantuvo la relación molar peroxidasa/anticuerpo de 2, aunque las concentraciones fueron inferiores a las recomendadas en la técnica original,¹ para evitar la precipitación de los anticuerpos de conejo específicos para la IgG humana. La relación molar peroxidasa/IgG del conjugado obtenido indica la proporción de moléculas de anticuerpo marcadas con la enzima (aproximadamente el 90 % como promedio), la cual resultó comparable con las obtenidas por otros autores y con las de los productos comerciales.^{1,6}

A partir de los resultados del tercer ensayo inmunoenzimático, se pudo estimar el título del conjugado en el rango de

diluciones entre 1:1000 y 1:2000. Este título constituye uno de los parámetros que permiten caracterizar el conjugado, junto con la relación molar IgG/peroxidasa (1,07), el valor del índice RZ (0,33), y las diluciones de trabajo recomendadas para diferentes tipos de técnicas, especialmente para los ensayos heterogéneos tipo ELISA (que en este caso fue de 1:2000).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprobó que con la utilización de anticuerpos anti IgG humana purificados por cromatografía de afinidad, se lograba preparar un conjugado con un alto grado de especificidad y una reactividad elevada. Los ensayos inmunoenzimáticos permitieron evaluar satisfactoriamente este conjugado, por lo que se puede considerar como un producto adecuado para su utilización en técnicas de este tipo o similares, así como en el pesquisaje de anticuerpos monoclonales humanos.

SUMMARY

A peroxidase conjugate was prepared starting from the specific antibodies isolated from an anti-chain rabbit serum and from human IgG. The specific antibodies were isolated by affinity chromatography and the conjugate was prepared by the method of oxidation with periodate. The conjugate obtained presented a molar IgG/peroxidase relation of 1.07, a RZ value of 0.33 and it was satisfactorily evaluated as regards its specificity and reactivity in the immunoenzymatic assays carried out.

Subject headings: ANTIBODIES; CHROMATOGRAPHY, AFFINITY; PEROXIDASES; IGG; RABBITS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilson MB, Nakane PK. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. En: Knapp W, Hollubak K, Wick G, eds. Immunofluorescence and Related Staining Techniques. New York: Academic, 1978:215.
2. Merlín JC, Villaescusa R, Guerreiro AM, González JM, González R, Arce AA. Preparación de un conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa en cabra. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter (en prensa).

3. Fahey JL. Chromatographic separation of immunoglobulins. En: Chase W, ed. Methods in immunology and immunochemistry. New York: Academic, 1978;vol 1:321.
4. Stites DP. Métodos clínicos de laboratorio para la detección de antígenos y anticuerpos. En: Stites DP, Stabo JD, Fudenberg HH, Wells JV, eds. Inmunología básica y clínica. La Habana, 1985:316. (Edición Revolucionaria).
5. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: Weir DM, ed. Handbook of experimental immunology. Vol 1. Oxford: Blackwell Sci, 1978;vol 1:1-44.
6. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase abeled antibody. A new method of conjugation. J Histochem Cytochem 1974;22:1084-91.

Recibido: 15 de noviembre de 1999. Aprobado: 21 de noviembre de 1999.

Lic. **Julio C. Merlín Linares**. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800 Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537)578268. Fax: (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu