

Obtención de suero Mono-específico

Anti-IgG preparado con antígenos purificados por electroenfoque

Doctores: MIGUEL A. GUZMAN*
ERNESTO BARBOSA**

INTRODUCCION

El siguiente trabajo tiene por objeto presentar y discutir la técnica de obtención de sueros mono-específicos Anti-Inmunoglobulina G preparados con antígenos purificados por Electroenfoque.

MATERIALES Y METODOS

Antígenos:

La Inmunoglobulina G, utilizada como antígeno fue obtenida y purificada a partir de una mezcla de sueros de personas supuestamente sanas.

Animales de Experimentación:

Para la producción de los sueros monoespecíficos se utilizaron conejos adultos.

Portadores de Anfólitos

Para la separación y purificación del antígeno (IgG) se utilizó un anfólito de un espectro de pH 7-10 comercialmente obtenido.

Sueros Hiperinmunes:

El antisuero humano total fue obtenido en cabra, según la técnica descrita por Proom¹.

* Jefe Sub-Grupo Microbiología e Inmunología INPES; Profesor Asociado, Inmunología Fac. Med. U. Nal.

** Jefe Grupo Bioquímica INPES; Profesor Asociado Bioquímica, Fac. Med. U. Nal.

Suero Normal:

El suero humano normal utilizado para obtener la IgG fue una mezcla de muestras de sueros de 50 voluntarios supuestamente sanos.

Estudio Inmunolectroforético:

Los estudios inmunolectroforéticos realizados fueron hechos en un sistema LKB de acuerdo a la técnica de Grabar y Williams².

Columna Electrofocal:

Para los estudios de electroenfoque se utilizó una columna Electrofocal LKB 8101 de 110 ml. de capacidad y una fuente de poder Beckman.

La obtención de suero normal se hizo mediante la toma de 10 ml de sangre de cada uno de 50 voluntarios, después de la retracción del coágulo los sueros fueron colectados, centrifugados y mezclados; de dicha mezcla se retiró una cantidad igual a 3 ml. para ser usada en el estudio Electrofocal, el resto de suero fue guardado en el congelador a -20° C. para ser usado posteriormente.

La columna fue montada, de acuerdo a las especificaciones dadas por Haglund³. El gradiente de pH junto con la proteína fue obtenido mediante un dispositivo mecánico, un

total de 3 ml. de la mezcla de sueros fue puesto en columna, los electrodos fueron dispuestos en forma tal que el cátodo quedase en el electrodo central con el objeto de que en la parte final de la columna quedasen los puntos Isoeléctricos entre 7 y 10 y así poder obtener las fracciones de Inmunoglobulina G evitando su contaminación al descargar la columna. Una vez montada la columna se sometió a una corriente continua de 500 voltios por 72 horas, tiempo considerado como óptimo para obtener un buen electroenfoque; al término de este tiempo, la columna fue desocupada en fracciones de 1 ml. mediante un colector automático de fracciones.

El pH de todas las fracciones obtenidas fue determinado en un potenciómetro Beckman de investigación con microelectrodos usando una cámara termomática a 18° C. Las fracciones con pH entre 7.62 - 8.92 (25 fracciones) fueron separadas para analizarse inmuno-electroforéticamente con el objeto de determinar si contenían Inmunoglobulina G. Una vez realizados estos estudios, las fracciones fueron mezcladas y usadas para la obtención de antisuero en conejos adultos, un total de 4

conejos fue inoculado I.M. 2 veces por semana con 0.5 ml. de la mezcla en adyuvante incompleto de Freund durante 4 semanas, al término de las cuales se tomó una muestra de sangre en la vena de la oreja para obtener suero y determinar inmuno-electroforéticamente si contenían niveles adecuados de anti-inmunoglobulinas G. Posteriormente los conejos fueron sangrados a muerte, el suero obtenido asépticamente fue adicionado de Merthiolate al 1:10.000 y guardado en congelador a -20° C. para ser usado posteriormente.

RESULTADOS

Como puede verse en la tabla N° 1 el pH de las fracciones Nros. 12 a 36 están comprendidas entre 7.62-8.92 rango que cubre el punto isoeléctrico de la Inmunoglobulina G., la figura N° 1 muestra claramente el gradiente de pH obtenido. Como puede verse, en la figura N° 2 el estudio inmuno-electroforético de la mezcla de estas fracciones frente a un suero antihumano y comparado con un control de suero humano total muestra una banda nítida de Inmunoglobulina G pura. Los sueros de los conejos estimulados usando como antígeno dicha mezcla de frac-

CUADRO N° 1
VALORES DE pH DE LAS FRACCIONES 12-36 QUE CONTIENEN IgG
Gradiente de pH de fracciones positivas para inmunoglobulina G.

Fracción N°	pH	Fracción N°	pH	Fracción N°	pH
12	7.62	21	8.17	30	8.69
13	7.65	22	8.19	31	8.71
14	7.70	23	8.20	32	8.74
15	7.92	24	8.29	33	8.87
16	7.99	25	8.42	34	8.89
17	8.06	26	8.42	35	8.90
18	8.14	27	8.54	36	8.92
19	8.16	28	8.57		
20	8.17	29	8.57		

ciones dieron una respuesta de anticuerpo altamente específico, como puede verse en la figura N° 3 en que un suero humano normal fue estudiado inmunolectroforéticamente usando como antisuero, suero obtenido en la forma anteriormente descrita, puede verse por comparación con antisuero humano total que el suero anti-Inmunoglobulina G es claramente monoespecífico toda vez que solo se ve una banda de precipitación correspondiente a la zona de la Inmunoglobulina G.

GRAFICA DEL GRADIENTE DE pH

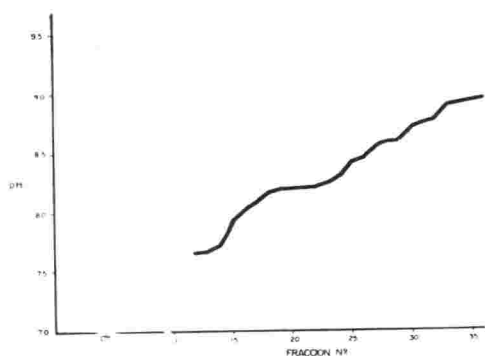


Figura 1

Gráfica que muestra el gradiente de pH.

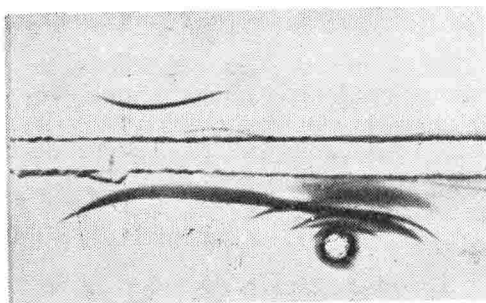


Figura 2

Inmunolectroforesis de la mezcla de fracciones positivas para IgG frente a suero anti-humano total. Nótese que la banda de precipitación de la mezcla es IgG pura.

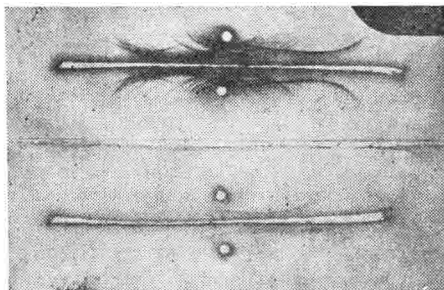


Figura 3

La parte inferior muestra una inmunolectroforesis de suero humano total con el antisuero obtenido, nótese que es claramente monoespecífico para IgG, identificada por comparación en la inmunolectroforesis superior con suero antihumano total.

DISCUSION

El múltiple uso de los sueros monoespecíficos anti-Inmunoglobulinas humanas, tiene actualmente gran importancia para la determinación de estas Inmunoglobulinas tanto en clínica humana^{4 5 6}, como en estudios inmunológicos básicos^{7 8 9 10}, por tanto se hace indispensable que se cuente con procedimientos de obtención de dichos anti-sueros en forma sencilla. El trabajo aquí presentado demuestra la ventaja del sistema electrofocal en la obtención de antígenos para preparación de

sueros homólogos específicos en forma ciertamente más sencilla que los procedimientos usuales^{11 12}. En un previo estudio¹³ se demostró que el anfólitico no interfería para nada la reacción antígeno-anticuerpo, en el presente trabajo se demuestra además que este no afecta en nada la respuesta inmunitaria del huésped no siendo por lo tanto necesario remover dicho anfólitico por diálisis, crítica que algunos^{14 15} hacen al uso de los anfóliticos.

RESUMEN

La obtención y purificación de Inmunoglobulina G humana por el procedimiento de electro-enfoque; y su uso como antígeno en la produc-

ción de suero específico homólogo se presenta en este trabajo, la ventaja de este procedimiento frente a los usuales se discute.

SUMMARY

Obtention and purification of IgG by electrofocusing column and its use as an antigen to elicit homolo-

gous antibodies in rabbits are presented in this paper. The advantages of this procedure are discussed.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la señorita Elizabeth

Castañeda por su valiosa cooperación.

REFERENCIAS

1. Proom, H. 1943: The preparation of precipitating sera for identification of animal species. *J. Path. Bact.* 55: 419-426.
2. Grabar, P. and Williams, C. A. 1953: Méthodes permettant l'étude Conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques de un mélange de protéines. Application au serum sanguin *Biochim. Biophys. Acta* (Amst.) 10: 193-194.
3. Haglund, H. 1967: Isoelectric focusing in natural pH gradients. A technique of growing importance for fractionation and characterization of proteins. *Science Tools* 14 (2): 17-24.
4. Darcy, D. A. 1960: A Quantitative application of the agar-diffusion plate. The estimation of specific proteins in serum. *Immunology* 3: 325-335.
5. Kingdon, L. and Shanbrom E. 1967: Immunodiffusion Techniques in Clinical Medicine. *J. A. M. A.* 200: 323.
6. Simmons, P., Penny, R. and Goller I. 1969: Plasma Proteins: A Review. *Med. J. Australia* 2: 494-506.
7. Laurell, C. B. 1966: Quantitative estimation of Protein by electrophoresis in agarose-gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15: 45-52.
8. Fahey, J. L. and Mckelvey, E. M. 1965: Quantitative Determination of Serum Immunoglobulins in Antibody Agar-plates. *J. Immunol.* 94: 84-94.
9. Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. I. 1965: Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion *Int. J. Immunochem.* 2: 235-254.
10. Crowle, A. J. *Immunodiffusion*. New York: Academic Press. 1961.
11. Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M. and Peterson, E. A. 1956: Chromatography of Proteins. II Fractionation of serum protein on Anion-exchange Cellulose. *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 756-763.
12. Fahey, Y. L. and McLaughlin, C. 1963: Preparation of Antisera Specific for δ , ϵ , γ -Globulins, β , α Globulins γ -1 Macroglobulins and for Type I and II Common γ -Globulin determinants. *Immunol.* 91: 484-497.
13. Guzmán, M. A. y Barbosa, E. 1971: Estudio Imuno-Electrofocal de Proteínas Plasmáticas. *Rev. Microbiol. (Rio Janeiro)* 2 (3): 137-144.
14. Luners, S. J. and Kolin, A. 1970: New approach to isoelectric Focusing and fractionation of protein in a pH gradient. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 66 (3): 898-903
15. Kolin, A. 1970: pH Gradient Electro-phoresis: in "Methods in Medical Research". Vol. 12: 326-358. (Year Book Medical Publishers, Inc.).