

PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINA M HUMANA

CARMEN ELISA ALARCON LOPEZ*, MIGUEL GUZMAN URREGO**

Utilizando un procedimiento combinado de precipitación con polietilenglicol y cromatografía de intercambio iónico se pudo obtener en forma simple IgM a partir de suero humano en buena cantidad y con un alto grado de pureza.

El método es fácil y permite por tanto purificar esta IgM como antígeno en la producción de suero homólogo tan útil en inmunología clínica.

INTRODUCCION

Existe dentro de la literatura, variada metodología para la purificación de IgM humana; pero es necesario tener en cuenta la producción de esta proteína para uso inmunológico y clínico, ya que el estudio de la respuesta inmunitaria requiere que en general, los tipos de inmunoglobulinas sean totalmente separadas unas de otras de tal forma que reúnan los requerimientos de estándares biológicos y se caractericen por tener un grado de pureza absoluto.

El uso de una determinada concentración de polietilenglicol como primer paso a la purificación de la IgM, seguido de una repurificación por cromatografía a través de resinas de intercambio iónico es la metodología que se utiliza en este trabajo para conseguir los requisitos antes mencionados.

MATERIALES Y METODOS

Obtención del suero: 50 ml de sangre obtenida por venopuntura de donantes normales. Después de incubación a 37°C durante una hora, se removió el coágulo y se centrifugó a 3.000 rpm, 4°C durante 20 minutos. 30 ml del suero fue diluido en proporción 1:1 con Buffer Veronal salino (B.V.S) pH 7.2; 0.004 M Barbitol; 0.15 M NaCl; 0.8 mM Mg²⁺ y 0.3 mM

Ca²⁺; el suero diluido fue delipidado (1) mediante dióxido de silicón en polvo (Cab-0-Sil. Unión Carbide, Denbury, CN) agregando 150 mg por cada 10 ml de suero diluido; la suspensión fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave ocasionalmente; después se centrifugó a 4.000 rpm por 20 minutos; el sobrenadante (55 ml) fue completamente clarificado a través de este procedimiento.

Purificación de IgM: se hizo una prepurificación de IgM mediante adición (1) de Polietilenglicol (Merck) (PEG) a 50% w/v en B.V.S al suero delipidado hasta obtener una concentración final de 5% PEG, después de 15 minutos de incubación en hielo, el precipitado fue colectado por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 minutos, luego se disolvió el precipitado en 30 ml de B.V.S y se reprecipitó con PEG a la misma concentración anterior, el precipitado colectado por centrifugación se disolvió en buffer fosfatos 0.0175 M y se dializó contra el mismo buffer.

Se determinó cualitativamente el grado de pureza de la proteína prepurificada, mediante una modificación del método inmunolectroforético, introducido por Williams, Grabar y Paulik (2),(3); en geles de agarosa al 1% disueltos en buffer veronal 0,06 M pH 8,6 con dimensiones de 7.6 cm de largo, 2.6 cm ancho y 0.3 espesor, se hizo electroforesis a la solución de IgM purificada por el método de PEG.

*Unidad de Inmunoquímica, Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud.

**Jefe Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud, Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Las condiciones de corrida fueron: 300 voltios; 70 m.a a 21 w durante 30 minutos en el mismo buffer de disolución. Luego se dejó reaccionar las proteínas separadas electroforéticamente contra antisuero Humano total y se incubó a 4°C durante 24 horas.

150 ml de suspensión de DEAE Sephacel (Pharmacia Anion Exchanger) fueron tratados según una modificación del método de Mollison (4) hecho por la casa productora, la cual equilibra la resina con buffer fosfatos 0.5 M pH 6.8 hasta obtener el pH. Luego se suspendió el gel en 400 ml de buffer fosfatos 0.0175 M pH 6.8; se degasificó y se empacó en una columna Pharmacia K 26/40 a una rata de flujo de 0.3 ml/min. Se eluyó con buffer fosfatos 0.0175 M pH 6.8 hasta obtener completo equilibrio; las dimensiones de la columna fueron: 60 cm largo x 2.5 cm de diámetro.

El precipitado obtenido por el método de PEG reconstituido en 10 ml de buffer fosfatos 0,0175 M pH 6.8 y dializado en la misma solución, presentó una concentración de proteína de 3.54 mg/ml según el método de Lowry (5).

Esta solución fue diluida a través de la resina primero con el buffer anterior; enseguida se hizo la lectura a 280 nm. Después de colectada toda la fracción se cambió el buffer a un fosfatos 0.08 M pH 6.6 y se leyó a 280 nm hasta obtener toda la fracción. Nuevamente se cambió el buffer a un fosfatos 0.3 M pH 6.5 y se leyó toda la fracción.

Se graficó las densidades ópticas halladas y se hizo un pool de cada fracción tomando los valores mayores de 0.8 . Finalmente la columna fue lavada con cloruro de sodio 0.5 M y buffer fosfatos 0.0175 M pH 6.8, 0.1% azida de sodio y se almacenó a 4°C.

Se determinó el grado de pureza de IgM purificada igual que la forma descrita anteriormente.

RESULTADOS

El procedimiento de delipidación mediante Cab-0-Sil permitió total clarificación del suero, proporcionando buena resolución inmunolectroforética y de fraccionamiento.

La figura No. 1 muestra la separación de las bandas proteicas IgG, IgM, IgA, IgE, Beta, Alfa y Albúmina,

en suero delipidado, frente a suero sin delipidar. (Fig. No.1).

Se detecta que la distancia de migración fue mayor en el suero dilipidado que en el sin delipidar, lo cual proporciona mayor visibilidad de las bandas de proteína por lo tanto pueden ser mejor identificadas.

La purificación de IgM mediante Polietylenglicol fue aproximadamente de 60% como se observa en la figura No. 2. La inmunorreacción de la fracción de IgM con anti-suero humano total, muestra que hay contaminación con albúmina, proteínas, Beta y Trazas de IgG, si se compara con las bandas de proteínas del suero humano total. (Fig. 2). El perfil de elusión de la cromatografía de intercambio iónico descrito antes, presentó tres picos como se puede observar en la figura No. 3. (Fig. 3). Las fracciones de mayor densidad óptica de cada pico fueron recolectadas y analizadas por inmunolectroforesis en geles de agarosa. Estas permiten analizar el contenido de cada una. La figura No. 4 muestra que la fracción No. 1 únicamente contiene IgG. (Fig. 4). La figura No. 5 corresponde a la inmunolectroforesis del pico II y muestra la presencia de IgA, trazas de IgM y albúmina frente al control. (Fig. 5). La fracción de nuestro interés, el pico III contiene IgM como lo muestra la figura No. 6 (Fig. 6). Se comparó la IgM producida en el laboratorio con IgM producida por Sigma. Los resultados obtenidos fueron similares. (Fig. 7).

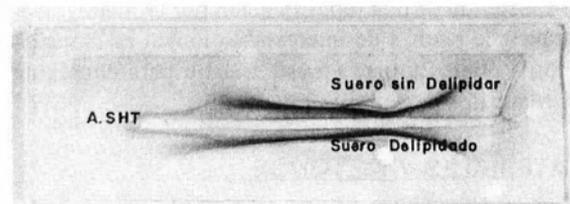


Figura 1.

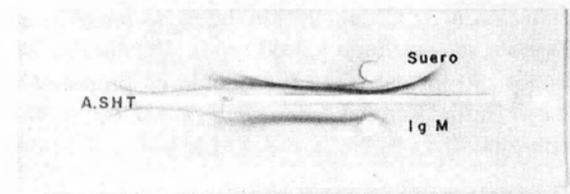


Figura 2.

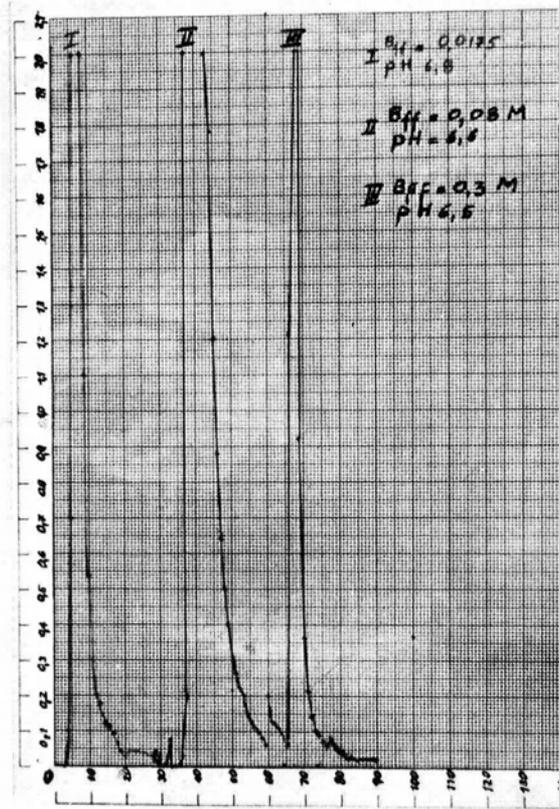


Figura 3.

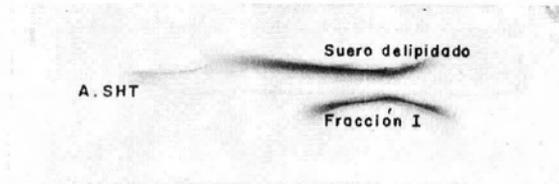


Figura 4.

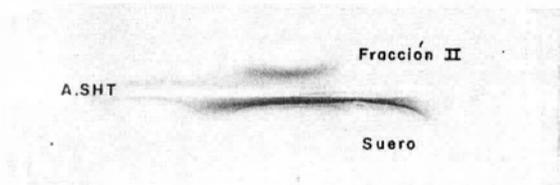


Figura 5.

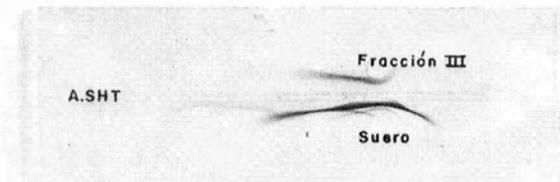


Figura 6.

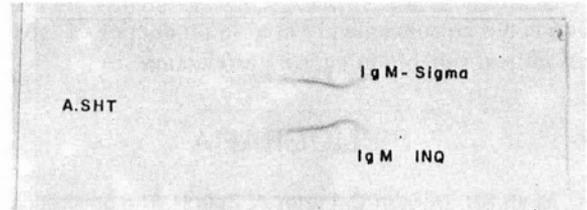


Figura 7.

DISCUSION

La presencia de lípidos desfavorece la producción y el grado de pureza de la fracción de IgM que se desea obtener.

El método de delipidación con dióxido de silicón utilizado aquí, permitió la reducción de estos inconvenientes sin que se afectara la actividad biológica de la proteína.

El fraccionamiento con PEG ofrece rapidez, rendimiento y aproximadamente un 60% de pureza. Este, como todos los métodos de separación fraccionada se funda principalmente en consideraciones acerca del peso molecular. Al aumentar la concentración de PEG las proteínas precipitan en un orden que en términos generales va desde las moléculas mayores hasta menores. La purificación obtenida de IgM fue aproximadamente de un 60% con una concentración de 5% PEG en la reacción final.

Mediante el incremento de la fuerza iónica dada en la cromatografía de gradiente discontinuo, se hace que decrezca la fuerza de unión de cada ión debido al incremento de la competición por los sitios de unión, inicialmente las proteínas se unen al intercambiador iónico; como IgG es la más electronegativa, eluye con el buffer de menor fuerza iónica 0,0175 M pH 6.8 a través de la resina de intercambio aniónico. El resto de proteínas son paulatinamente eluidas debido al aumento gradual de la fuerza iónica del tampón que se coloca a la columna: 0.08 M pH 6.6 y luego 0.3 M pH 6.5 con el cual obtenemos la IgM libre de otras proteínas.

SUMMARY

Using a combined procedure of polyethylene glycol precipitation and ion exchange chromatography it was possible to recover IgM in a fairly appreciable amount

with a high degree of purity. The method is simple and could be conveniently used in production of IgM as antigen suitable to antisera production.

BIBLIOGRAFIA

1. Neah SH, Gordon C, Porter A, Zola H. The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid. *Immunology Meth.* 1986; 91: 231.
2. Stites, DP, Fudenberg HH, Stobo JD, Wells JV. *Inmunología básica y clínica.* 1985; 5a Ed. Edt. El Manual Moderno.
3. Hudson L, Hay FC. *Practical Immunology* 1979 Ed. Jims.
4. Kiga s. Nw cellulose gel for Chromatography *J Crhomat* 1980; 195: 221.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.