

Bioquimia

Volumen 27
Volume

Número 4
Number

Diciembre 2002
December

Artículo:

Obtención de las cadenas pesadas de la IgG humana para la preparación de un inmunosuero específico para su uso en el inmunodiagnóstico

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

Obtención de las cadenas pesadas de la IgG humana para la preparación de un inmunosuero específico para su uso en el inmunodiagnóstico

Antonio Melchor-Rodríguez^{*1}, Vivian Alonso-Ramos², Raquel López-Cisnero¹, Orlando Zulueta-Rodríguez¹, Carlos Martínez-Ortiz¹, Liliana Hernández-Pérez¹, Ivonne Gómez-Cordero³, Liliana López-Brauet⁴

¹ Bioquímica de las Proteínas, Grupo de Purificación de Proteínas, ² Departamento de Aseguramiento y Control de la Calidad, ³ Laboratorio de Péptidos, ⁴ Departamento de Control de la Calidad. Centro de Inmunoensayo, Ciudad Habana, Cuba.

*Sobretiros: División de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Ciudad de la Habana, Cuba. e-mail: iqpurifica@cic.sld.cu
Recibido: 20/12/01 Aceptado: 28/10/02

Resumen

Se describe un método para la purificación de las cadenas pesadas de inmunoglobulina G humana (IgG) a partir de una mezcla de sueros humanos normales. La IgG se purificó por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La preparación purificada fue homogénea por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) e inmunoelectroforesis. El recobrado final de purificación de la IgG fue de 68.78 % y un factor de purificación de 4.01. Las cadenas gamma se obtuvieron por reducción con ditioneol y alquilación con yodoacetamida de la IgG. La separación de las cadenas pesadas y ligeras se realizó por filtración en gel en Sephacryl S-100 en dos columnas conectadas en serie. La preparación obtenida fue homogénea por inmunodifusión doble y SDS-PAGE. El peso molecular relativo de las cadenas pesadas fue de 58.5 kDa. El rendimiento obtenido fue de 0.603 mg de cadenas pesadas/mg de IgG.

Palabras clave: IgG humana, separación de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG, inmunoglobulina, inmunoensayo, fraccionamiento.

Abstract

The method is described for purification of the heavy chain of immunoglobulin G (IgG) from a pool of normal human serum. The IgG was purified by ammonium sulphate precipitation and ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel. The purified preparation was homogeneous by sodium dodecylsulphate polyacrylamide (SDS-PAGE) and tested by immunoelectrophoresis. The final recovery of human IgG was 68.78 % and a purification factor of 4.01. The heavy chains of IgG were obtained by reduction with dithiothreitol and alkylation with iodoacetamide. The separation of heavy and light chains of IgG was done by gel filtration on Sephacryl S-100 HR in two columns connected in series. The obtained preparation was homogeneous by double immunodiffusion and SDS-PAGE. The relative molecular weight of heavy chains of IgG was 58.5 kDa. The yield was 0.603 mg of heavy chains per mg of IgG.

Key words: human IgG, separation of heavy and light chains of IgG, immunoglobulin, immunoassay, fractionation.

Introducción

Las moléculas de inmunoglobulinas están compuestas por dos clases de cadenas polipeptídicas diferentes, las de mayor tamaño denominadas pesadas (H) y las de menor tamaño ligeras (L), en igual número por lo que pueden representarse por la fórmula general $(H_2L_2)_n$. Las cadenas se mantienen unidas por fuerzas no covalentes y por puentes de disulfuro que forman una estructura con simetría bilateral. Se ha demostrado que todas las inmunoglobulinas normales tienen esta estructura básica, aunque algunas están compuestas de más de una unidad de cuatro cadenas. Cada cadena polipeptídica está constituida por numerosos dominios de tamaño bastante constante (100 - 110 residuos de aminoácidos) estabilizados por enlaces disulfuro intracadenas.^{1,2}

La inmunoglobulina G (IgG) representa aproximadamente un 75% del total de las inmunoglobulinas del suero en adultos normales y es el anticuerpo más abundante durante la respuesta inmunitaria secundaria de tipo humoral.³ La caracterización y cuantificación de esta inmunoglobulina es un examen necesario para el diagnóstico y seguimiento de las inmunodeficiencias y otras enfermedades.⁴⁻⁸ Por otro lado, la investigación de la respuesta específica a antígenos internos o externos es una herramienta insustituible en la evaluación serológica de la respuesta inmunitaria, para ello se requiere detectar inmunoglobulinas específicas producidas frente a un agente extraño.⁹⁻¹²

Se han usado diversos métodos diagnósticos que van desde las técnicas de inmunoprecipitación, aglutinación e inmuno-

radiométricas, hasta los ensayos inmunoenzimáticos ampliamente difundidos hoy en día.^{13,14} Existen múltiples ejemplos que demuestran la importancia de estos métodos, como el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el virus de la hepatitis C (VHC), que se realizan fundamentalmente mediante la detección de sus anticuerpos específicos.

En el desarrollo de estas técnicas es necesario disponer de antisueros monoespecíficos de elevada calidad para esta inmunoglobulina. El objetivo de este trabajo fue la obtención de la cadena pesada de la IgG humana para mantener una producción más eficiente de antisueros monoespecíficos en ovinos contra esta inmunoglobulina y con una elevada calidad para su uso en los estuches de reactivos para la detección de IgG humana específica para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), *Tripanosoma cruzi*, HTLV, virus del dengue y Chagas, entre otras técnicas de inmunodiagnóstico que se desarrollan en el Centro de Inmunoensayo.

Materiales y métodos

Aislamiento y purificación de la IgG humana

El aislamiento y purificación de la IgG humana utilizada en la obtención de las cadenas pesadas se realizó a partir de una mezcla de sueros humanos, clarificada por centrifugación y filtración sobre papel filtro. El procedimiento empleado fue similar al descrito por Melchor en 1997¹⁵: 5 mL de una mezcla de sueros humanos se precipitó utilizando 5 mL de una solución saturada de sulfato de amonio. Posteriormente la fracción globulina precipitada se resuspendió y se dializó extensivamente contra fosfato de sodio 0.01 mol/L, pH 8. La muestra (3.5 mL con 55.83 mg de IgG) se aplicó en una columna de 1 x 10 cm empaquetada con 6 mL de DEAE-Sephacel (Pharmacia, Suecia), a una velocidad de flujo de 10 mL/h, previamente equilibrada con fosfato de sodio 0.01 mol/L pH 8. La concentración de IgG se determinó con el estuche de reactivos Turbimtest IgG producido en el Centro de Inmunoensayo,⁴ mientras que la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al.¹⁶

La evaluación de la pureza de las muestras de IgG se realizó por inmunolectroforesis según el método empleado por Melchor en 1997¹⁵ y por electroforesis en gel de poliacrilamida con un gradiente de 8-25 % en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) y β -mercaptoetanol según el procedimiento descrito por Laemmli en 1970.¹⁷ La tinción en ambos casos se realizó con azul de Coomassie (Pharmacia, Suecia).

Obtención de las cadenas pesadas de la IgG humana

La IgG humana obtenida se dializó frente a la solución reguladora Tris- HCl 0.5 mol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8. La muestra se centrifugó

a 16 000 g durante cinco minutos a 22°C. La solución de IgG se concentró por ultrafiltración en conos AMICON CF 25 (Amicon, E.U.A.) hasta una concentración de 28 mg/mL. La reducción se realizó con ditioneitol (Sigma, E.U.A., Gran Bretaña) y la alquilación con yodoacetamida (Merck, Alemania) según el método descrito por Fleischman et al. en 1961.¹⁸

La eliminación del exceso de los reactivos de la reducción y la alquilación se realizó por filtración sobre gel en Sephadex G-25 fino (Pharmacia, Suecia).

La separación de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina G se realizó en dos columnas conectadas en serie empaquetadas con 424,53 mL y 477.59 mL de Sephacryl S-100 HR (Pharmacia, Suecia) respectivamente, equilibradas con una solución de ácido acético 1 mol/L. Se aplicaron 10 mL de muestra a una velocidad de flujo de 15 mL/h y se colectaron fracciones de 2 mL/tubo. El pico que contenía las cadenas pesadas se concentró hasta 1 mg/mL por ultrafiltración en conos Amicon CF-25 (Amicon, E.U.A.).

El rendimiento del proceso de obtención de las cadenas pesadas se calculó siguiendo el procedimiento descrito por Johnstone y Thorpe en 1987.¹⁹

La evaluación de la pureza de las cadenas pesadas se realizó utilizando dos métodos: la inmunodifusión doble frente a antisueros comerciales para cadenas ligeras y pesadas de IgG (Sigma, E.U.A.)²⁰⁻²¹ y la electroforesis en gel de poliacrilamida con un gradiente de 8-25 % en presencia de SDS y β -mercaptoetanol. La tinción se realizó en ambos procedimientos con azul de Coomassie (Pharmacia, Suecia).¹⁷

Se realizaron 5 replicas del aislamiento y purificación de la IgG humana y la obtención de las cadenas pesadas con el objetivo de demostrar la reproducibilidad de los procedimientos.

Resultados

La IgG humana se obtuvo en la fracción no adsorbida por la cromatografía de intercambio iónico como un pico asimétrico como se muestra en la figura 1.

En la precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación la recuperación promedio de IgG fue 92.28% y un factor de purificación de 2.67 veces. En la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel el recobrado final promedio (n=5) fue 68.78% y logró un factor de purificación de 4.01 veces.

En la Cuadro 1 se muestra la media de los valores obtenidos en cinco corridas cromatográficas (n = 5). El rendimiento final promedio

Cuadro 1. Resultados del proceso de aislamiento y purificación de IgG humana a partir de una mezcla de sueros humanos.

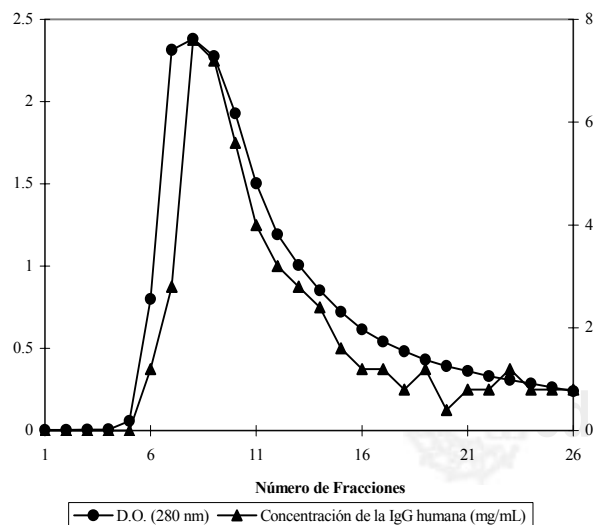
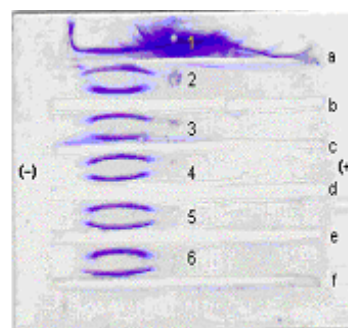
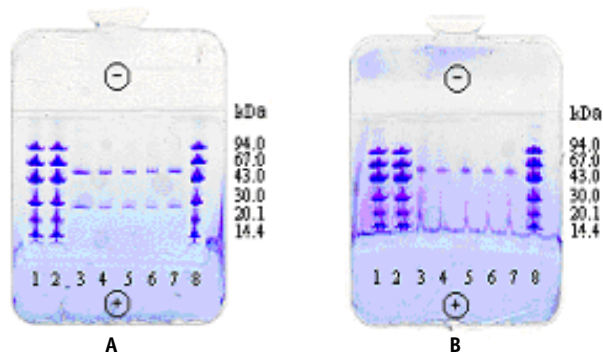
Etapa de purificación	Proteína Total (mg)	IgG total (mg)	Contenido específico de IgG (mg de IgG/mg de proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Mezcla de sueros humano	346.95	60.50	0.1744	1	100
Precipitación con sulfato de amonio	119.83	55.83	0.4659	2.67	92.28
Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel	59.46	41.61	0.7000	4.01	68.78

obtenido a partir de 5 mL de muestra inicial con una cantidad total de IgG de 60.50 mg, fue de 8.32 mg IgG/mL de mezcla de suero humano, con una desviación estándar de 0.3632 mg de IgG /mL de mezcla de sueros, y un coeficiente de variación de 4.36 %.

La preparación de IgG obtenida resultó homogénea por inmunoelectroforesis, se obtuvo un único arco de precipitación (figura 2), para cada una de las muestras evaluadas frente a los antisueros utilizados.

En la figura 3 se muestra la electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol. Los pesos moleculares relativos calculados para las cadenas pesadas y ligeras fueron de 58.2 kDa y 28.4 kDa respectivamente.

En la figura 4 se muestra el perfil cromatográfico típico de la separación de las cadenas pesadas y ligeras de IgG por filtración sobre gel en Sephacryl S-100 HR. Los volúmenes de elución fueron de 400 mL y 467.5 mL respectivamente. Los pesos moleculares relativos calculados fueron 56.3 kDa y 29.9 kDa respectivamente.

**Figura 1.** Perfil cromatográfico típico de la IgG obtenida por Cromatografía de Intercambio Iónico en DEAE-Sephacel.**Figura 2.** Inmunoelectroforesis de las muestras de IgG obtenidas por Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. Pozo 1: Suero humano. Pozo 2: IgG corrida 1. Pozo 3: IgG corrida 2. Pozo 4: IgG corrida 3. Pozo 5: IgG corrida 4. Pozo 6: IgG corrida 5. Canales a, c, e: Suero de caballo para proteínas séricas totales humanas. Canales b, d, f: Suero de conejo Anti-IgG humana (cadena γ) (Sigma, E.U.A.).**Figura 3. A.** Electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol de las muestras de IgG obtenidas por intercambio iónico en DEAE-Sephacel.

A: Posiciones 1 y 2: Proteínas patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Suecia). Posición 3: IgG corrida 1. Posición 4: IgG corrida 2. Posición 5: IgG corrida 3. Posición 6: IgG corrida 4. Posición 7: IgG corrida 5. Posición 8: Proteínas patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Suecia). **B.-** Electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol de las muestras de las cadenas pesadas obtenidas por filtración sobre gel en Sephacryl S-100 HR. **B:** Posiciones 1 y 2: Proteínas patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Suecia). Posición 3: Cadenas γ corrida 1. Posición 4: Cadenas γ corrida 2. Posición 5: Cadenas γ corrida 3. Posición 6: Cadenas γ corrida 4. Posición 7: Cadenas γ corrida 5. Posición 8: Proteínas patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Suecia).

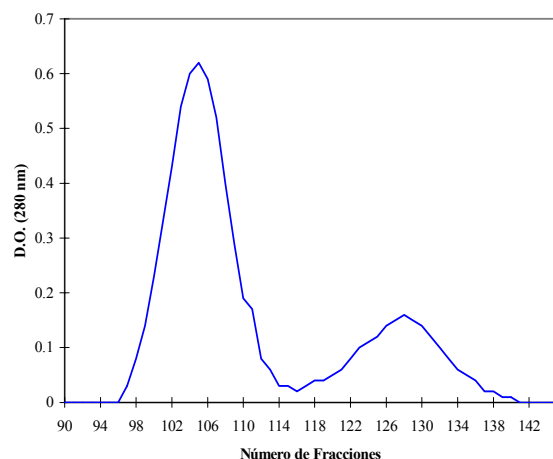


Figura 4. Perfil cromatográfico típico de la separación de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG por Filtración sobre Gel en Sephacryl S-100 HR.

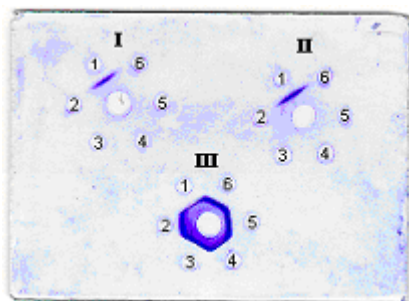


Figura 5. Inmunodifusión doble de las cadenas pesadas obtenidas por filtración sobre gel en Sephacryl S-100 HR.

Pozo central de la roseta I: Suero de conejo para cadenas λ (Sigma, E.U.A.). Pozo central de la roseta II: Suero de conejo para cadenas κ (Sigma, E.U.A.). Pozo central de la roseta III: Suero de conejo para cadenas γ (Sigma, E.U.A.). Pozos periféricos de las tres rosetas: Pozo 1: IgG humana (molécula completa). Pozo 2: Cadenas pesadas obtenidas en la corrida 1. Pozo 3: Cadenas pesadas obtenidas en la corrida 2. Pozo 4: Cadenas pesadas obtenidas en la corrida 3. Pozo 5: Cadenas pesadas obtenidas en la corrida 4. Pozo 6: Cadenas pesadas obtenidas en la corrida 5.

El rendimiento promedio ($n=5$) del proceso de obtención de las cadenas pesadas de IgG fue 0.603 mg cadenas pesadas/mg IgG. La desviación estándar fue de 0.0198 mg de cadenas pesadas/mg IgG y el coeficiente de variación obtenido en la preparación de las cadenas gamma fue de 3.29%, lo que demuestra que el método utilizado es reproducible. El rendimiento promedio ($n=5$) obtenido de cadenas ligeras fue de 27.1 %.

El peso molecular relativo de las cadenas pesadas estimado por el método cromatográfico (filtración sobre gel en Sephacryl S-100 HR) que fue 56.3 kDa.

En la inmunodifusión doble frente a los antisueros para cadenas ligeras (Rosetas I y II) (figura 5) sólo se observó una línea de

precipitación en el pozo correspondiente a IgG (molécula completa), y frente al antisuero para cadenas pesadas (Roseta III) se observaron líneas de precipitación para la IgG (molécula completa) empleada como control y las muestras de cadenas pesadas de las cinco corridas cromatográficas.

Discusión

El recobrado final promedio para la IgG humana obtenida por la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel ($n=5$) fue 68.78%, este valor es similar al obtenido por Leyva en 1991 (69.3%)²² y Robaina en 1995 (64.07%)²³, lo que demuestra la reproducibilidad del método seleccionado para purificar la IgG humana.

El único arco de precipitación obtenido en la inmuno-electroforesis nos demostró que la preparación de IgG obtenida resultó homogénea (figura 2) y que podía emplearse en la obtención de las cadenas pesadas de esta molécula.

Los pesos moleculares calculados para las cadenas pesadas y ligeras por la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol (figura 3) y por el método cromatográfico (figura 4) fueron similares y concuerdan con los valores referidos por Goodman y Parslow en 1994.²⁴

Inicialmente en el laboratorio se empleaba una sola columna empacitada con Sephacryl S-100 HR, que no permitía la separación completa de las cadenas pesadas y ligeras, lo cual conllevaba a un proceso de recromatografía y provocaba una disminución del rendimiento. El empleo de las columnas colocadas en serie permitió aumentar la resolución y elevó el rendimiento.

El rendimiento promedio ($n=5$) obtenido de cadenas ligeras (27.1 %) coincide con el reportado por Johnstone y Thorpe en 1987 (25-28 %),¹⁹ estos investigadores plantean que un rendimiento más bajo indicaría la presencia de cadenas ligeras, presumiblemente en forma dimérica en el pico correspondiente a las cadenas pesadas (primer pico de la figura 4).

Se demostró por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol (figura 3) e inmunodifusión doble (figura 5) que las preparaciones obtenidas correspondían a las cadenas pesadas de la IgG.

El procedimiento empleado para la obtención de las cadenas pesadas de la IgG es un método sencillo y reproducible (coeficientes de variación inferiores al 10 %).

El grado de pureza logrado para la IgG y las cadenas pesadas, comprobados por los métodos de control de la calidad utilizados, hacen factible su empleo como inmunógeno para la obtención de inmunosueros específicos a estas moléculas que son útiles en el inmunodiagnóstico.

Referencias

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 2ª ed. UK: Interamericana Mc Graw Hill; 1995.
2. Davies D, Chacko S. Antibody structure. *Act Chem Res* 1993; 26:421-427.
3. Bradwell AR. IgG and IgA Subclasses in Disease. 1ª ed. UK: The Binding Site; 1995.
4. Alonso V, Fanego N, López R, Melchor A. Estudios de reactivos para la cuantificación de IgG, IgA e IgM humanas. *Revista CNIC, Número Especial* / 1995; 26:16.
5. Duarte AJ, Vasconcelo DM, Sato MN, Sale JM, Yamaguchi N H. Common variable immunodeficiency (hipogammaglobulinemia of late onset or acquired hipogammaglobulinemia) initial follow-up of 11 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1990; 45: 95-104.
6. Fontan G, Garcia M, Pascual-Salcedo D, López T, Alvarez D, Ferreira A. New indications for gammaglobulins. *Ann Esp Pediatr* 1992; 38:135-138.
7. Goddard E, Hughes E, Beatty D. Hyper IgM with combined immunodeficiency. *J Clin Lab Immunol* 1991; 35:183-188.
8. Mendez E, Osuna C, Sánchez A, Revilla Y, Soriano F, Montalban C, et al. The Structure of Two IgMs Showing Different Activity from a Patient with Waldenstrom's Macroglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:472-477.
9. Laferté J, Marrero M, Jomarrón L, García S, Vázquez S, Morrier L, et al. UltramicroELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales a citomegalovirus en suero humano. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 33: 43-47.
10. Guzmán G, Alberti E, Laferté J, Rosario D, González G, Otero A, et al. Standardization and evaluation of an indirect ultraMICROELISA for Rubella serology (RUBELLA-UME). *Rev Biotecnol Apl* 1993; 10(3): 166-170.
11. Nakagiri I, Ichihara K. ELISA for anti-HCV antibody employing a shorter synthetic core region peptide. *J Virol Methods* 1995; 52:195-207.
12. Robert-Guroff M, Roilides E, Muldoon R, Venzon D, Hudson R, Gallo R, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 strain MN neutralizing antibody in HIV-infected children: correlation with clinical status and prognostic value. *J Infect Dis* 1993; 167: 538-546.
13. Azar de Aldao N, Moretti E. Cuantificación de inmunoglobulinas. Correlación entre dos métodos. *Act Bioquím Clin Latin* 1989; 4:493-500.
14. Trotti DR, Melzi d'Eril GV. Metodi Immunoturbidimetrici. Principi di applicazioni, Italia: Edizione Gennaio; 1991.
15. Melchor A. Obtención de antiseros ovinos monoespecíficos para IgG, IgA e IgM humanos. Tesis para optar por el Grado de Maestro en Ciencias, Universidad de La Habana, Ciudad de Habana, Cuba, 1997.
16. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
17. Laemmli, UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*, 277: 680-685
18. Fleischman JB, Pain R, Porter RR. Reduction of γ -globulins. *Arch Biochem Biophys suppl* 1961; 1:174.
19. Johnstone A, Thorpe R. Immunochimistry in practice. 2ª ed. UK: Blackwell Scientific Publications; 1987.
20. Hudson L, Hay F. Practical Immunology, 3ª ed., UK: Blackwell Scientific Publications; 1989.
21. Ouchterlony Ö, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En *Handbook of Experimental Immunology: Immunochimistry*. Weir, D.M; Herzenberg, L.A.; Blackwell, C. (eds). Blackwell, Oxford, 1986.p. 32.1-32.50.
22. Leyva J. Purificación de Inmunógenos para la producción de antiseros contra inmunoglobulinas humanas. Tesis para optar por el Título de Licenciado en Bioquímica, Universidad de La Habana, Ciudad de la Habana, Cuba 1991.
23. Robaina O. Purificación de IgG humana e inmovilización en AH-Sepharosa 4B. Tesis para optar por el Título de Técnico en Química. Instituto Politécnico de Química, Ciudad de la Habana 1995.
24. Goodman J, Parslow T. Immunoglobulin Proteins. In *Basic & Clinical Immunology*. Stite DP, Terr A I, Parslow T G. 8ª ed. UK: Appleton & Lange; 1994.p. 66-79.