

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CNBr-SEPHAROSE 4B PARA EMPREGO COMO MATRIZ SÓLIDA NO ACOPLAMENTO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM ENSAIOS IMUNORADIOMÉTRICOS

Esther Piltcher Haber*, Sandra Rosa da Silva*,
Vânia Caira Borghi* e Bernardo Leo Wajchenberg**

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP)
Travessa R nº 400 - Cidade Universitária
05508-900, São Paulo, SP, Brasil

**Laboratório de Investigação Médica (LIM-25)
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455
01246, São Paulo, SP, Brasil

ABSTRACT

The present work verifies the stability of a CNBr-Sepharose 4B product (Pharmacia) stored at our laboratory one year after its expiry date in view of its application as solid phase antibodies in the development of an immunoradiometric assay for measurement of serum human proinsulin (hPI). From rabbit IgG antiserum previously purified and concentrated by ultrafiltration (Publication IPEN 294, 1990) the antibodies were isolated by affinity chromatography. Sheep antiserum anti-rabbit IgG were coupled to cyanogen bromide activated Sepharose 4B and the rabbit IgG which were bound to the immunosorbent could be obtained by elution with stepwise pH gradient from pH 7.0 to pH 2.5. The coupling efficiency of the sheep antiserum to this solid phase material was 97%. The elution profile obtained shows identity of the sample related to the antiserum anti-rabbit IgG by affinity chromatography. These results suggest that this CNBr-Sepharose 4B lot can be used satisfactorily to attach antibodies for use in the two-site immunoradiometric assay.

INTRODUÇÃO

O acoplamento de anticorpos específicos a um sistema de fase sólida é essencial ao desenvolvimento de um ensaio imunoradiométrico sensível e específico para dosagem de antígenos.

Esta técnica envolve a ligação covalente do anticorpo monoclonal a um suporte sólido insolúvel para adsorção a um epítipo de um determinado antígeno. Os suportes sólidos que têm sido usados incluem poliestireno e p-aminobenzyl-celulose (1), celulose (2), derivados do dextran como Sephadex G-25 (3) e Sepharose (4). Os suportes sólidos devem ser quimica e mecanicamente estáveis, apresentarem boas características de fluxo, serem inertes (para minimizar a adsorção inespecífica), serem prontamente ativados para acoplamento do anticorpo, terem uma alta capacidade e permitir uma alta recuperação.

O presente trabalho descreve o estudo da estabilidade de um lote de CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia) estocado em nosso laboratório com validade vencida por mais de um ano visando sua aplicação como matriz sólida para o desenvolvimento de um ensaio imunorradiométrico para determinação de proinsulinemia humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

A partir de IgG de coelho previamente purificada e concentrada por ultrafiltração (5) procedeu-se ao isolamento dos anticorpos por cromatografia por imunoafinidade em CNBr-Sepharose 4B envolvendo acoplamento de um antissoro de carneiro anti-IgG de coelho (6) e subsequente eluição da IgG de coelho em múltiplas etapas.

Acoplamento de antissoro de carneiro anti-IgG de coelho a matriz sólida

O procedimento de acoplamento de anticorpos a Sepharose 4B ativada por CNBr (2 mg por g de imunoadsorvente) foi realizado segundo protocolo descrito pelo laboratório NETRIA (North East Thames Region Immunoassay Unit, Londres, Inglaterra) (7).

O gel (1 g) foi pesado em um bequer, entumescido com ácido clorídrico 0.001 M (30 ml) por 15 minutos e então transferido a um funil de porcelana de vidro sinterizado (porosidade G3) ajustado a um frasco de Buchner e lavado com HCl 0.001 M (200 mL). O excesso de HCl 0.001 M foi removido do gel sob vácuo e o gel transferido a uma solução de IgG de carneiro anti-IgG de coelho (2 mg em 4 ml de bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,3) e misturado por agitação lenta em um rotador de tubos (15 rpm), durante 2 dias a 4 °C.

A matriz sólida foi centrifugada a 2000g, durante 15 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante separado para controle do rendimento do acoplamento da IgG ao gel através da diferença da leitura espectrofotométrica ($A = 280 \text{ nm}$) antes e após o acoplamento.

Os grupos ativos remanescentes no imunoadsorvente foram bloqueados por reação com TrisHCl 0,1 M pH 8,0, a 4 °C, durante 16 hs. Proteínas inespecíficas adsorvidas ao gel foram removidas por 3 ciclos alternados de lavagem com tampão bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,3 (300 ml) e tampão acetato 0,1 M, pH 4,0 (300 ml). Em seguida, a IgG de carneiro acoplada a CNBr-Sepharose 4B foi lavada e armazenada a 4 °C em tampão fosfato 0,05 M (4 ml) contendo thimerosal (0,01%) até seu uso.

Isolamento de anticorpos específicos

IgG de coelho foi adsorvido ao imunoadsorvente no período de 1 a 2 dias e subsequentemente eluído em múltiplas etapas. Este método de eluição baseia-se na obtenção de IgG de coelho específicos por lavagem do conjugado anticorpo-imunoadsorvente em uma coluna (0,9 x 16 cm, Pharmacia) com solução salina 0,9% e então eluição por redução sucessiva do pH de tampão de eluição de 7,0 a 2,0 em presença de acetonitrila 20% a 6 ml/h. Frações de 2,0 ml foram coletadas e o perfil de eluição foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

RESULTADOS

Obteve-se uma eficiência de acoplamento da IgG de carneiro a CNBr-Separose 4B, monitorada espectrofotometricamente, de 97%. O perfil de eluição da IgG de coelho apresentado na Figura 1 revela que o material apresentou identidade frente ao antissoro anti-IgG de coelho pelo método de cromatografia por imunoafinidade. Estes resultados sugerem que a CNBr-Separose 4B empregada é estável e pode ser utilizada em acoplamento de anticorpos a matriz sólida para uso nos ensaios imunorradiométricos.

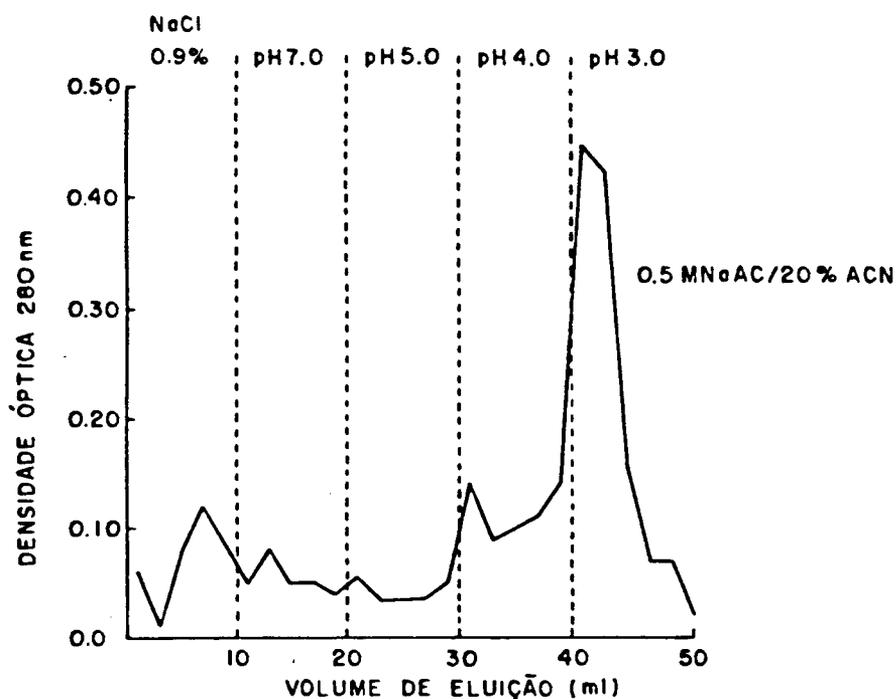


FIG. 1 - PERFIL DE ELUIÇÃO DO ANTICORPO APÓS CROMATOGRAFIA EM CNBr-SEPHAROSE 4B DA IgG DE COELHO. O PRINCIPAL PICO DO ANTICORPO PURIFICADO É ELUIDO EM pH 3.0.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o produto comercial CNBr-Separose 4B disponível nos nossos laboratórios, com validade vencida por mais de um ano, preenche os requisitos necessários para uma boa eficiência de seu acoplamento. Assim sendo, anticorpos monoclonais de captura têm sido acoplados a esta matriz sólida para uso no desenvolvimento de um ensaio imunorradiométrico específico para dosagem de proinsulinemia humana.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à FAPESP o auxílio concedido (Processo nº 93/4703-0).

REFERÊNCIAS

- [1] CATT, K., TREGGAR, G.W. Solid phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. Science v.153, p.1570-72, 1967.
- [2] WIDE, L. Radioimmunoassay employing immunosorbents. Acta Endocrinol Suppl v.142, p.207-218, 1969.
- [3] WIDE, L., PORATH, J. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex coupled antibodies. Biochim Biophys Acta v.130, p.257-60, 1966.
- [4] GARDNER, J., BAILEY, G., CHARD, T. Observations on the use of solid-phase coupled antibodies in the radioimmunoassay of human placental lactogen. Biochem J v.137, p.469-76, 1974.
- [5] SILVA, S.R., BORGHI, V.C. Isolamento e purificação da imunoglobulina (IgG) de coelho para a produção de segundo anticorpo para radioimunoensaio. Publicação IPEN, 294, 1990.
- [6] SILVA, S.R. Produção de duplo anticorpo para radioimunoensaio (antissoro de carneiro anti-IgG de coelho). S Paulo, 1993. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
- [7] EDWARDS, R., LITTLE, J.A., ZAMAN, M.R., KNOTT, J.A., NEWMAN, D.J. Affinity chromatography of polyclonal antisera to prepare specific antibodies. Development in radioimmunoassay and related procedures, IAEA, Vienna, 26-30 Aug 1991, p.205-12.