

Radioinmunoensayo de insulina. Modificaciones al método de Yalow y Berson ¹

M. E. Lázaro-Martínez, J. Gómez-Acebo ² y R. Parrilla

Instituto G. Marañón (C.S.I.C.). Velázquez, 144. Madrid - 6

(Recibido el 19 de julio de 1969)

M. E. LAZARO-MARTINEZ, J. GOMEZ-ACEBO and R. PARRILLA, *Insulin Immunoassay. Modifications to the Yalow and Berson Method*. R. esp. Fisiol., 26, 21-26, 1970.

We describe some modifications to the immunoassay of insulin (Yalow-Berson method). The insulin was labelled with I¹²⁵ instead of I¹³¹ and chromatography was done at room temperature instead of high voltage cromatoelectroforesis at 4° C. The purification of labelled hormone filtering through Sephadex was very simple and efficient. The disadvantages of using labelled insulin I¹²⁵ were resolved increasing the width of cromatographic paper, the volumen of the applied sample and using a good radiactivity counter.

This modifications reduce considerable the cost of the method and makes it very useful for its use in any laboratory without special equipment.

Desde la primera descripción de YALOW y BERSON sobre la posibilidad de valorar pequeñas concentraciones de insulina por métodos inmunológicos (1), han aparecido innumerables procedimientos de valoración que difieren fundamentalmente en la forma en que se separa la insulina libre de la ligada al anticuerpo. Si bien es cierto que algunos procedimientos han conseguido acortar el tiempo de valoración, ninguno de ellos ha permitido ganar en sensibilidad al de YALOW y BERSON (1).

En el proceder de YALOW y BERSON la separación del complejo antígeno-anticuerpo de la insulina libre se hace mediante cromatoelectroforesis de alto voltaje a 4° C, hecho que puede hacer inasequible su montaje dado el elevado costo del equipo.

En el presente trabajo se describen algunas modificaciones que se han introducido en este método y que permiten hacer rutinario su empleo sin utilizar ningún

equipo especial y a un costo inferior o similar al de cualquier otro método de radioinmunoensayo de insulina.

Material y métodos

Se utilizan anticuerpos de cobaya anti-insulina de cerdo (Wellcome), especialmente seleccionados para pruebas de inmunoensayo.

La insulina ³ utilizada para el marcaje y para curvas standard es insulina de bovino altamente purificada.

(1) Trabajo realizado, en parte, con una ayuda para la Investigación concedida por Lilly Indiana de España, S. A.

(2) Becario del Ministerio de Educación y Ciencia dentro del Plan de formación de personal investigador.

(3) Los autores agradecen a la casa Lilly Española el suministro de la insulina empleada en la realización del presente trabajo.

El papel de cromatografía empleado es Wathman 3 MM.

Las cubetas de cromatografía fueron construidas, según diseño nuestro, por Lagoplast, S. A. (Madrid). Se trata de recipientes de 65 cm de largo, 5 de alto y 3 de ancho, en el que se introduce un extremo de las tiras. Una de las paredes, más elevada (7 cm) sirve de soporte a las tiras; a 29 cm de la cubeta un soporte longitudinal, paralelo a la cubeta y a la misma altura del soporte de ésta, sirve de apoyo al extremo distal de las tiras. Estas cubetas acomodan bien hasta 14 tiras de 4 cm de anchura.

Se emplea yodo radioactivo, I^{125} (Amersham, Inglaterra), con actividades específicas entre 7,9 y 10 mC/mg. Se trata de I^{125} carrier free, y 1 mC es suficiente para el marcaje de 2,5 μ g de proteína que puede ser empleada en gran número de valoraciones. Para la purificación de la insulina utilizamos geles de Sephadex (Pharmacia, Upsala).

MARCAJE DE INSULINA CON I^{125} . Se sigue básicamente el proceder de HUNTER y GREENWOOD para marcar hormona del crecimiento por medio de la cloramina T (2). Las adiciones de tampón, insulina, cloramina T y metabisulfito se realizaron sobre el mismo vial que contenía 1 mC de I^{125} . Durante el marcaje, el vial quedó introducido en un pequeño blindaje de plomo y se tomaron toda serie de precauciones para evitar contaminación. En cada marcaje se realiza una cromatografía de una pequeña muestra de la mezcla de marcaje, en tampón veronal 0,1 M, pH 8,6. La tira de papel (35 \times 3 cm) se corta transversalmente en pedazos de 1 cm para medir radioactividad. La figura 1 muestra la distribución de la radioactividad en el origen (proteína intacta), con la albúmina (proteína dañada) y yodo libre. Conocido el porcentaje de yodo unido a la proteína (insulina) y la actividad específica de éste, se puede calcular fácilmente la actividad

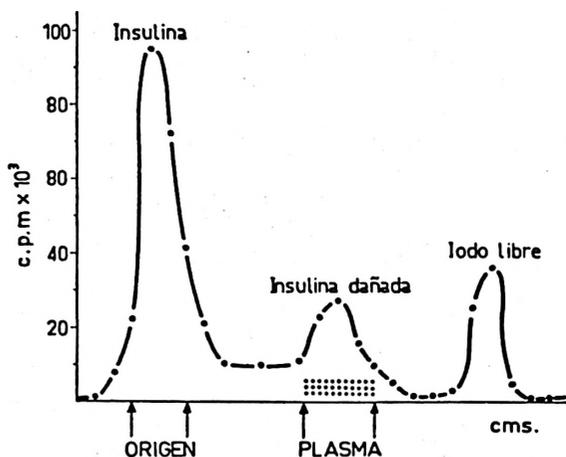


Fig. 1. Cromatografía de alto voltaje (25 vol./cm) en veronal 0,1 M, pH 8,6 en papel Wathman 3MM, de una alícuota de la mezcla de marcaje de insulina (2,5 μ g) con I^{125} (1 mC, actividad específica 10,7 mC/mg).

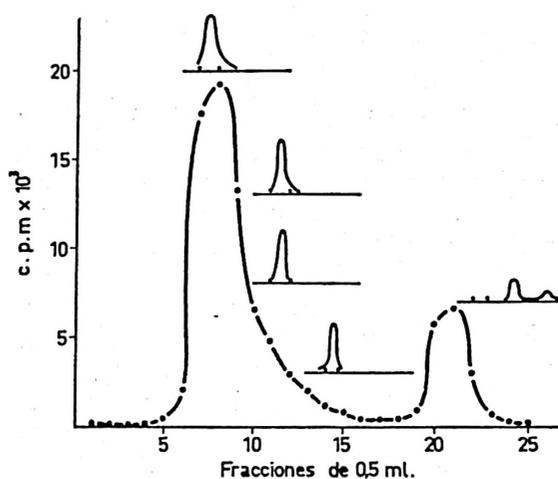


Fig. 2. Purificación de insulina en Sephadex G-25.

Se eluye una alícuota de la mezcla de marcaje con veronal 0,1 M pH 8,6, albúmina humana 0,25 % y se toman fracciones de 0,5 ml. La insulina purificada sale inmediatamente después del volumen vacío, fracciones 6-15, y la degradada entre 20-25. La comprobación electrofórica de los eluatos (representados gráficamente en menor escala) demuestran que los de la parte descendente son los más puros (9-12).

específica que poseerá la insulina marcada después de la purificación.

PURIFICACIÓN. Para la purificación, la mezcla de marcaje se filtra a través de una columna de Sephadex G-25 o G-50 montada en una pipeta de 5 ml, previamente equilibrada con tampón veronal 0,1 M, pH 8,6 y albúmina humana 0,25 %. La proteína intacta aparece inmediatamente después del volumen vacío (en el caso de Sephadex G-25), mientras que la degradada sale inmediatamente después y completamente separada (fig. 2). La comprobación electroforética de la pureza de los eluatos demuestra que los de la rama descendente del primer pico (fig. 2) son los más puros, que diluidos oportunamente pueden ser usados para la valoración de la hormona.

El porcentaje de proteína dañada en los eluatos puros es siempre menor del 5 %. Habida cuenta que la vida media del I^{125} es de dos meses y que durante el almacenamiento de la hormona marcada, aún a -20°C , se produce un daño progresivo, se concluyó por purificar la cantidad de hormona a ser usada en el día o al día siguiente. El proceder es muy rápido y sencillo, teniendo la ventaja de poder trabajar en condiciones de gran pureza.

MONTAJE DEL INMUNOMÉTODO. Se emplea la técnica de YALOW y BERSON (1),

yendo todas las muestras diluidas en tampón veronal 0,1 M, pH 8,6, albúmina humana 0,25 % y plasma de cobaya 1 %; la adición de estas proteínas evita la pérdida por adsorción, a la superficie del vidrio, del antígeno y anticuerpo, respectivamente.

Se reproduce un protocolo de un experimento tipo (tabla I). Al final de la incubación y antes de aplicar las muestras sobre las tiras de cromatografía, a cada tubo se le añaden 50 μl de plasma de cobaya con azul de bromofenol como indicador. De cada tubo problema se hace una aplicación de 250 μl sobre el origen de una tira de cromatografía de papel Wathmann 3 MM (4 cm de ancho) puestas a equilibrar una hora antes en tampón veronal 0,1 M, pH 8,6. No es conveniente hacer aplicaciones de más de 250 μl sobre el origen de cada tira.

Se permite correr las muestras en cámara fría a 4°C con ventilación y a temperatura ambiente. En estas condiciones la evaporación es demasiado rápida, lo que obliga a usar unas cubiertas con superficie de cristal, que hace que la evaporación sea más lenta y permite en todo momento ver cómo corren las muestras. A temperatura ambiente se requiere un tiempo mucho más corto, y no se ha encontrado ninguna variación con los resultados obtenidos con las mismas muestras puestas a correr a 4°C . Esto hace que el trabajo se facilite por la rapidez y

Tabla I. Protocolo tipo (orden de la adición de los reactivos).

Tampón	Concentración	Insulina	Insulina- I^{125}	Anticuerpo	Incubación
Veronal 0,1 M	Insulina	(2,5 m $\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\approx 100\mu\mu\text{g}$)	(1/10.000)	4°C
μl	m $\mu\text{g}/\text{ml}$	μl	μl	μl	3-4 días
410	---	---	50	40	
390	0,05	20	↓	↓	
370	0,10	40			
330	0,20	80			
210	0,50	200			
10	1,00	400			
MNE 450	---	---		--	

comodidad. Cuando las muestras han llegado hasta el final de las tiras, se secan en estufa a 120° C durante 30 minutos, sobre soportes adecuados. Las tiras se cortan a mitad de distancia entre origen y proteína; cada mitad se enrolla con la parte más radioactiva hacia el interior y se introduce en tubos de vidrio para leer radioactividad en un contador Tricarb de radiación Gamma, modelo 3002.

Los cálculos se hacen valorando el porcentaje de migración no específica (M.N.E.) en los tubos control (insulina I¹²⁵ más tampón en ausencia de anticuerpo), que equivale al porcentaje de hormona degradada en los 3-4 días de incubación. Este se descuenta de cada muestra, para así poder calcular la cantidad real de radioactividad que en cada muestra quedó en el origen o que migró con la proteína. Sobre una

gráfica se expresan los valores de insulina ligada al anticuerpo en tanto por ciento o el cociente B/F (hormona ligada/hormona libre) versus concentraciones de hormona fría en m μ g o μ U/ml.

En la figura 3 se representa una curva patrón de un experimento tipo. Como puede verse, la caída más importante del cociente B/F se produce entre las concentraciones 0 y 1 m μ g/ml de insulina fría de bovino.

Discusión

El conseguir gran sensibilidad en un método de radioinmunoensayo depende de que se empleen anticuerpos que reaccionen con gran energía y que la cantidad de dosis trazadora de hormona marcada sea lo más pequeña posible frente a la concentración de hormona fría. Para esta segunda premisa se requiere la utilización de insulina marcada con gran actividad específica. Su obtención con I¹³¹ es fácil, pero no así con el I¹²⁵, que en igualdad de condiciones tiene unas cinco veces más de yodo frío, es decir, una actividad específica mucho más baja. El trabajar con I¹²⁵ supone un doble ahorro, primero que se requiere menor cantidad de mC para marcar la misma cantidad de hormona y, en segundo lugar, que, siendo su vida media ocho veces más larga que la del I¹³¹, se puede utilizar en gran número de pruebas durante al menos dos meses. Por este procedimiento se obtienen marcajes de hormona con actividades específicas del orden de los 400 μ C/ μ g, y en estas condiciones la sensibilidad en el inmunoensayo es similar a la descrita con el I¹³¹. Esto se debe a que el inconveniente de la menor actividad específica se pudo suprimir a expensas de aumentar la anchura de la tira de cromatografía y, por lo tanto, el volumen de la muestra a aplicar en cada una.

La purificación en geles de Sephadex ha demostrado ser útil y muy rápida, puesto que no necesita la comprobación diaria de la pureza de cada fracción. Actualmente, tomando siempre fracciones del mismo vo-

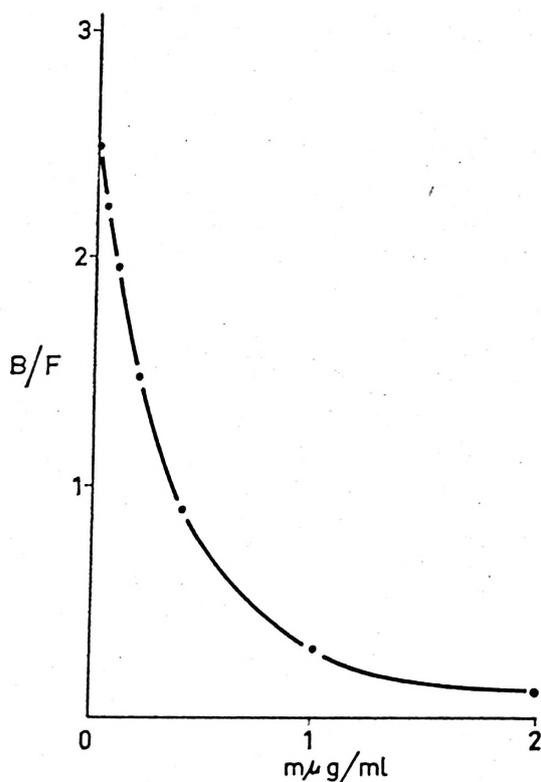


Fig. 3. Representación gráfica de cocientes B/F (hormona ligada/hormona libre) versus concentraciones de hormona fría.

lumen, se utiliza una fracción, siempre la misma, y lo único que se hace es diluirla oportunamente antes de ser usada. En estas condiciones nunca se hallan impurezas que excedan del 3-4 %. Tampoco requiere este procedimiento el consumo de grandes cantidades de proteína como en el caso de la purificación en celulosa, sino sencillamente eluir con el mismo tampón utilizado en el montaje de inmunoensayo.

La cromatografía en papel ha resuelto la dificultad de obtención de fuentes de alimentación y cubetas apropiadas para la cromatografía y hace asequible el método a cualquier laboratorio. En nuestra experiencia, el haber obtenido resultados idénticos a 4° C y a temperatura ambiente evita la necesidad de poseer cámaras refrigeradas para desarrollar tiras en cubetas de ciertas dimensiones.

Resumen

Se introducen modificaciones al método de YALOW y BERSON para el inmunoensayo de in-

sulina. Se marca la hormona con I¹²⁵ en vez de I¹³¹, y se hace cromatografía a temperatura ambiente en vez de cromatografía de electroforesis de alto voltaje a 4° C. La purificación de la hormona marcada, filtrando a través de Sephadex mostró ser eficaz y muy sencilla, evitando el consumo de grandes cantidades de proteína, como es el caso de la purificación en celulosa. Los inconvenientes de la menor actividad específica de la insulina marcada con I¹²⁵ fueron resueltos aumentando la anchura de las tiras de cromatografía y el volumen de muestra aplicada en ellas, y utilizando un contador de radioactividad con buena eficiencia. Estas modificaciones, además de disminuir considerablemente el costo, pueden hacer asequible a cualquier laboratorio el empleo de este inmunoensayo de gran sensibilidad sin requerir equipos especiales para su montaje.

Bibliografía

1. BERSON, S. A. y YALOW, R. S.: *J. Clin. Invest.*, **40**, 1803, 1961.
2. GREENWOOD, F. C., HUNTER, W. M. y GLOVER, J. S.: *Biochem. J.*, **89**, 114, 1963.

