REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 28, 135-140. 1972

Aislamiento y purificación de la inmunoglobulina IgG en antisueros frente a hormonas gonadotróficas

M. Morell*, J. Peña, F. Garrido y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Granada (España)

(Recibido el 12 de enero de 1972)

M. MORELL, J. PEÑA, F. GARRIDO and C. OSORIO. *Gonadotrophin Antisera: Purification and Characterization.* R. esp. Fisiol., 28, 135-140. 1972.

A simple, economic and rapid method for the immunoglobulin G (IgG) purification is described. This method is reliable for IgG purification in antisera against different hormones, mainly gonadotrophic hormones (FSH, HMG, HCG, etc.). With this procedure we have got higher titres in the antisera and very high specifity of the antigen-antibody reaction in endocrinological methods. The purification method consists mainly in a previous Sephadex G-200 chromatography, in 0.05 M-phosphate and 0.4 M ClNa, *p*H 8, and DEASE-Sephadex chromatrography in 0.01 M-phosphate, *p*H 8. Also, the method for Fc fragment purification is described, as the immunization procedure in rabbits.

Desde que HORSFALL y COODNER (9) dividen los anticuerpos antendiendo a su cuerpo molecular en 7 S y 19 S, y TISELIUS y KABAT (21) identifican, por medio de la electroforesis, la fracción gamma como portadora de anticuerpos, el avance en el estudio de dichas moléculas ha sido constante.

GRABAR y WILLIAMS (6, 7) describen la técnica de la inmunoelectroforesis e individualizan los anticuerpos 11 S. HEREMANS (8) introduce el concepto de *inmunoglobulinas* y posteriormente se establece definitivamente la nomenclatura actual de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (4).

Dado que, en las reacciones inmunológicas de alta especificidad, el antisuero total contra determinados antígenos (11, 12, 15), presenta una serie de interferencias debido a su gran heterogeneidad y bajos títulos (1), se hace necesario aislar cada uno de los tipos de inmunoglobulinas y trabajar selectivamente, con una o varias de ellas.

En el presente trabajo se muestra un método sencillo para la obtención de una de las inmunoglobulinas, la IgG, siguiendo la técnica de SOBER y PETERSON (20), modificada por nosotros (17), y de esta forma aplicarla a los sistemas antigeno-

* Dirección actual: Departamento de Fisiología y Bioquímica. Facultad de Medicina. La Laguna, Tenerife (España).

anticuerpo que se utilizan en Endocrinología.

Material y métodos

Se parte de suero de conejo inmunizado que, debido a su heterogeneidad, hace que descienda el rendimiento. Los antisueros se prepararon frente a hormonas gonadotróficas, aisladas de hipófisis y orina de origen humano (1, 14, 15) y purificadas según los métodos descritos en trabajos anteriores (13, 14).

Para el aislamiento de IgG se utiliza, en primer lugar, filtración en gel (Sephadex G-200) y a continuación una resina intercambiadora en iones (DEAE A-50) (10).

En la preparación del Sephadex G-200 se siguió la técnica de KILLANDER (10), empleándose columnas de 80 × 3 cm con gradiante de presión negativo y tampón

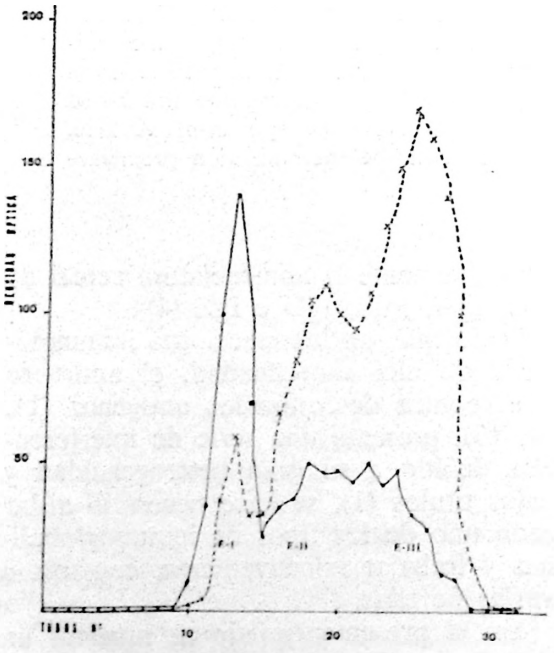

Fig. 1. *Filtración en Sephadex G-200* Columna: 80 × 3 cm; tiempo/tubo: 10 min; volumen/tubo: 3 ml; muestra: 1 ml/columna; tampón: fosfato 0,05 M, ClNa 0,4 M, *p*H 8; fracciones I, II y III (F-I, F-II y F-III).

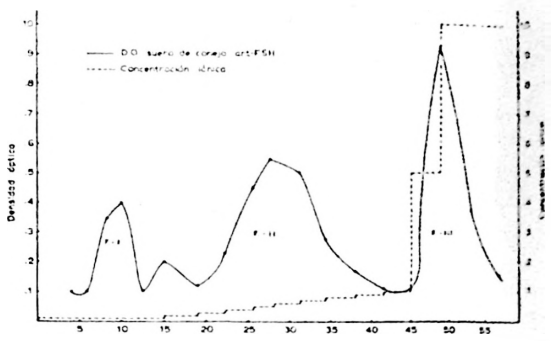

Fig. 2. *Filtración en DEAE Sephadex A-50.* Columna: 30 × 5 cm; tiempo/tubo: 10 min; volumen/tubo: 3 ml/columna de concentrado A; tampón de fosfato 0,01 M, *p*H 8; fracciones I, II y III (F-I, F-II y F-III).

fosfato (0,05) ClNa (0,04 M), a *p*H 8 siendo el volumen de muestra de elución de 3 ml/tubo (fig. 1).

La actividad se encuentra en la fracción I, que es dializada frente a tampón de fosfato (0,01 ml), a *p*H 8, durante 72 horas, con frecuentes cambios de tampón y posterior concentración en Carbowax 600 hasta alcanzar un volumen de 10 ml (concentrado A).

La preparación del DEAE-Sephadex A-50 se llevó a cabo según SOBER y PETERSON (20), empleándose columnas de flujo continuo de 30 × 5 cm con tampón de fosfato 0,01 M, *p*H 8, volumen de muestra de 3 ml de concentrado A/columna; tiempo/tubo 10 minutos y volumen de elución/tubo de 3 ml. La lectura se efectuó a 280 mμ (fig. 2).

Para la regeneración de la columna se utilizó tampón de fosfato 1 M y ClNa 0,4 M, *p*H 8. La actividad IgG se encuentra en los tubos 6-13 de la fracción I.

Control de pureza. Se efectuó mediante las técnicas de doble difusión radial de OUCHTHERLONY (16) inmunoelectroforesis y electroforesis en agar.

La fracción I es liofilizada (liof. A) para su conservación. Con este procedimiento las pérdidas de material y actividad son prácticamente despreciables.

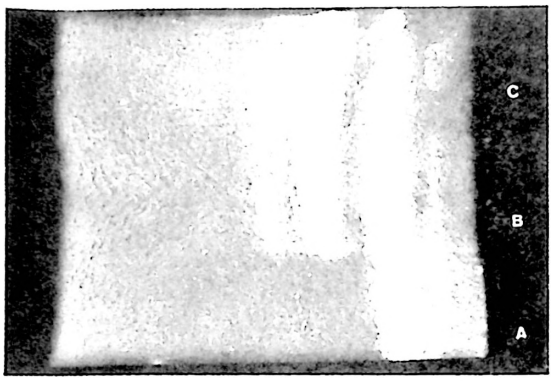

Fig. 3. *Electroforesis en gel de almidón-urea, tampón formato, pH 3,25.*
A) IgG sin digerir como una sola banda. B) IgG sin digerir más IgG digerida. Tres bandas. C) IgG digerida, en la que se observan tres bandas: Fc, Fab e igG sin digerir, respectivamente, de mayor a menor movilidad electroforética.

Separación de los productos de la digestión. Se utiliza electroforesis preparativa en urea-gel de almidón, tampón formiato, *p*H 3,25 y 12 horas de desarrollo. El bloque de almidón es seccionado longitudinalmente en dos trozos, uno pequeño, que se tiñe para la identificación del desarrollo electroforético y otro grande que se congela a —4° C, que será utilizado para la obtención de los productos de la digestión (figura 3).

El primero muestra tres bandas bien definidas que, identificadas en placas de doble difusión de Ouchtherlony, corresponden de mayor a menor movilidad electroforética a los fragmentos de Fc, Fab e IgG sin digerir. El bloque de almidón congelado, una vez conocido el lugar donde se encuentra la fracción, se secciona transversalmente para individualizar cada una de ellas. Los productos Fc, Fab e IgG sin digerir se liofilizan (liof. B, C y D, respectivamente).

El liofilizado B se utiliza para la *inmunización de conejos* con la siguiente pauta: una inyección subcutánea semanal conteniendo 5 mg de liof. B y 0,5 ml de coadyuvante de Freund, durante cuatro semanas, y 2 inyecciones intravenosas conteniendo 3 mg de liof. B en días alternos.

Los conejos se sangraron a los 5 días de la última inyección. Se tomó por título la dilución más alta de antisuero que da banda de precipitación frente a 1 mg de antígeno en placas de OUCHTHERLONY (16, 17).

Resultados

La homogeneidad de IgG en las fracciones seleccionadas se demuestra electroforéticamente en la figura 4, donde se observa un aumento monoclonal en la zona de las gammaglobulinas, que corresponden a IgG, como se comprueba inmunoelectroforéticamente en la figura 5, donde se observa una inflexión en la línea de precipitación correspondiente al sistema IgG.

Su aislamiento se ha realizado en dos etapas, basadas, respectivamente, en el

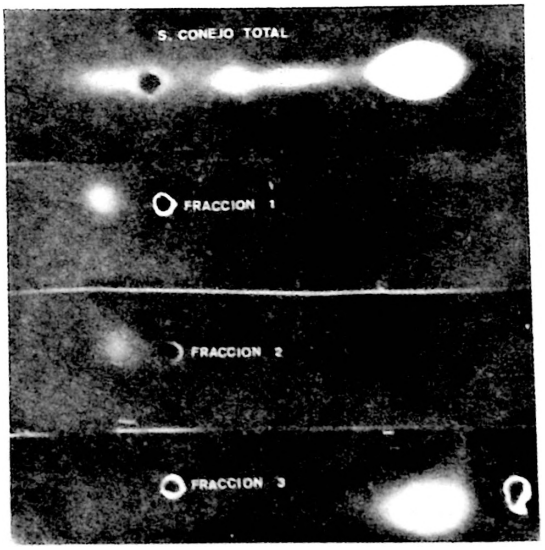

Fig. 4. *Electroforesis en agar del suero de conejo inmunizado y de las distintas fracciones obtenidas tras el paso en una columna de DEAE Sephadex A-50.*
Nótese el aumento monoclonal en la zona de las gammaglobulina (parte superior) y la presencia de globulinas y albúmina en las fracciones I, II y III.

Suero de conejo inmunizado
↓
Sephadex G-200
↓
Fracción I (IgG con impurezas) — Fracción II y III (Desechadas)
↓
DEAE Sephadex A-50
↓
Fracción I (IgG inmunológicamente pura) — Fracción II y III (Desechadas)
↓
Liofilización
↓
Liofilizado A
↓
Digestión (papaína)
↓
Electroforesis (urea-almidón)
↓
Liofilizado B — Fc (Para inmunización)
Liofilizado C — Fab (Para adsorción de otras inmunoglobulinas)
Liofilizado D — IgG (Sin digerir)

Esquema I. *Aislamiento y digestión de la inmunoglobulina IgG y obtención del Fc correspondiente.*

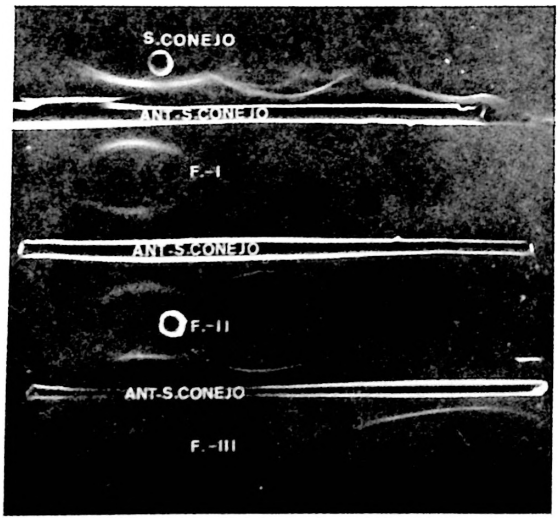

Fig. 5. *Inmunoelectroforesis en agar-tampón veronal, pH 8,6 del suero de conejo inmunizado (en la superior) y de las fracciones obtenidas mediante el uso de DEAE Sephadex A-50.* En la fracción I se puede comprobar una inflexión única en la zona de la IgG.

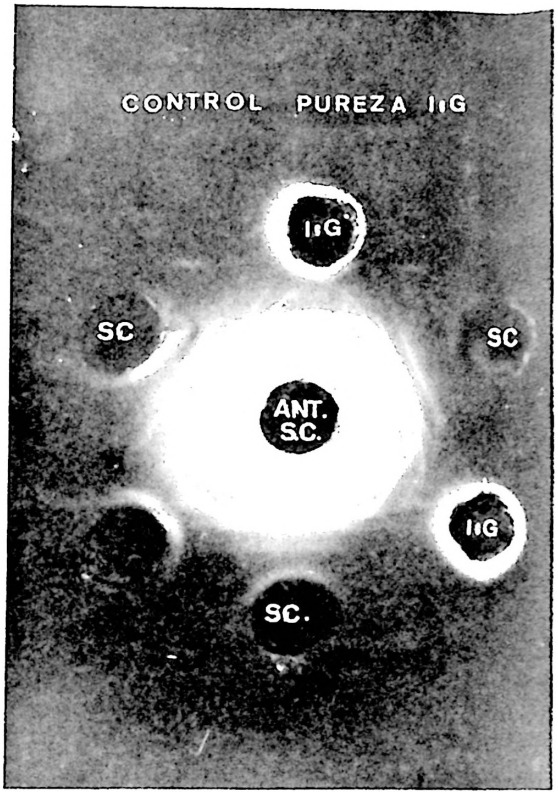

Fig. 6. *Control de pureza de la inmunoglobulina G (IgG).*
Los tubos 9 y 10 de la fracción I de DEAE Sephadex dan una sola banda de precipitación frente a antisuero de conejo total (ant. SC). Los controles de suero de conejo (SC) dan múltiples líneas.

p.m. y la carga eléctrica (esquema 1). En la primera, empleando el Sephadex G-200, se obtiene una preparación en la que cerca del 90 % del contenido proteico corresponde a IgG, habiendo eliminado una serie de proteínas, principalmente transferrina, que es su principal contaminante.

En la segunda, empleando DEAE Sephadex A-50, se consigue, por elución directa, IgG inmunológicamente pura (figura 6), donde se aprecia una sola banda de precipitación frente a antisuero total. El rendimiento obtenido es del 70 %.

Los anticuerpos obtenidos son específicos y su título por término medio correspondió a 1/140.

La pauta de inmunización es eficaz, si se tiene en cuenta el bajo gasto de antígeno y los títulos obtenidos en los correspondientes antisueros.

Discusión

Se presenta un método de aislamiento de una clase de inmunoglobulina, la IgG, que por su sencillez y economía, puede ser útil en los procedimientos inmunológicos en general y especial en los radioinmunológicos de valoración hormonal y muy especialmente en los referentes a las hormonas gonadotróficas (12).

Tras una experiencia previa con IgG procedentes de mieloma humano (17) y después de haber encontrado dificultades en la producción de antisueros de calidad apropiada frente a algunas hormonas gonadotropas (13), especialmente frente a la hormona folículo-estimulante (FSH), se decidió emplear selectivamente las distintas inmunoglobulinas (Ig) — en este caso la IgG — contenidas en los antisueros ya obtenidos, pensando en que se ganaría en especificidad y rendimiento. Para ello, se iniciaron una serie de experimentos con la intención de poner a punto un método de aislamiento y purificación de las distintas inmunoglobulinas (Ig) aplicable a los antisueros producidos por nosotros frente a este grupo de hormonas.

En este método se ha empleado cromatografía en columna (Sephadex DEAE A-50), de donde se obtiene la IgG por elución directa. Previamente han sido eliminados otros contaminantes (la transferrina, etc.), mediante su pase por Sephadex G-200, con lo que se consigue aumentar la concentración de IgG en la muestra y superar el rendimiento de técnicas similares (2, 3, 5). Con este procedimiento el rendimiento final es alto y el grado de pureza conseguido aceptable.

La digestión enzimática y la ulterior separación de los fragmentos (fig. 3) mediante gel de almidón-urea (17, 18, 19), pueden hacer que el método sea más reproducible y eficaz, al mismo tiempo que evita las interferencias en los procesos de inmunización (1), si bien estos últimos aspectos necesitan de una confirmación en el futuro.

Resumen

Se presenta un método sencillo y rápido para la purificación de la inmunoglobulina IgG, aplicable a los antisueros producidos frente a diversas hormonas, especialmente las gonadotrofinas (FSH, LH, HCG y HPL) con objeto de obviar los bajos títulos obtenidos e incrementar la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo en los métodos endocrinológicos.

El método consiste fundamentalmente en un paso previo por Sephadex G-200 y después por una resina intercambiadora de iones (DEAE Sephadex A-50). Se presenta también el procedimiento para la obtención de su Fc específico, la separación de los restantes productos de la digestión y la inmunización de conejos y obtención de su antisuero correspondiente.

Bibliografía

1. Butt, W. R., Crooke, A. C. y Counningham, F. J.: *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*. Vol. 141, Inmunoassay of hormones, p. 310, 1962.
2. Cohen, S.: *Biochem. J.*, **89**, 334, 1963.
3. Cohen, S. y Porter, R. R.: *Biochem, J.*, **90**, 278, 1964.
4. Commitee on Nomenclature of Human Inmunoglobulins: *Bull. World Health, Organ*, **30**, 447, 1964.
5. Edelman, G. M.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **101**, 246, 1962.
6. Grabar, P. D.: Glick, Ed., **37**, 1, 1959.
7. Grabar, P. y Williams, C. A.: *Biochim. Biophys, Acta*, **10**, 193, 1953.
8. Heremans, J. F.: *Clin. Chim. Acta*, **4**, 639, 1959.
9. Horsfall, F. l. y Coodner, K.: *J. Expe. Med.*, **62**, 485, 1935.
10. Killander, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 1, 1964.
11. Mancini, G., Carbonara, A. y Heremans, J. E.: *Immunochemistry*, **2**, 235, 1965.
12. Midgley, A. R., Rebar, R. W. y Niswen-

DER, G. D.: *Acta Endocr. Supp.*, **142**, 247, 1969.
13. MORELL, M. y BUTT, W. R.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 95, 1971.
14. MORELL, M., CROOKE, A. C. y BUTT, W. R.: *J. Endocr.*, **41**, 571, 1968.
15. MORI, K. F., HIYAI, K., AMINO, N., AZIKIZAWA, M. y KUMAHRA, N.: *Acta Endocr.*, **67**, 209, 1971.
16. OUCHTHERLONY, O.: *Acta Path. Microb. Scand.*, **26**, 507, 1949.
17. PEÑA, J.: *Tesis Doctoral.* Granada, 1971.
18. PORTER, R. R.: *Biochem. J.*, **73**, 119, 1959.
19. POULIK, M. D.: *Nature*, **202**, 1174, 1964.
20. SOBER, H. A. y PETERSON, E. A.: *Fed. Proc.*, **17**, 1116, 1958.
21. TISELIUS, A. y KABAT, E. A.: *J. Exp. Med.*, **69**, 119, 1939.