

## Aislamiento de una subclase de haptoglobina sérica y su caracterización física e inmunológica

P. Liso-Irurzun y M. Pérez-Miranda

Departamento de Investigaciones Médicas. C.S.I.C.  
Facultad de Medicina  
Universidad de Navarra  
Pamplona

(Recibido el 20 de febrero de 1975)

P. LISO-IRURZUN and M. PEREZ-MIRANDA. *Method to Isolate a Sericeous Haptoglobin Subclass and to Determine its Physical and Immunological Traits*. Rev. esp. Fisiol., 31, 207-214. 1975.

The immunological and electrophoretic traits are described, as well as the sedimentation constant of a haptoglobin fraction isolated from human serum through phenolic precipitation, filtering the supernatant through a Sephadex G-200 column. The antigenic analysis of the first peak of this elution has shown the existence of the fraction identified as haptoglobin. An anti-haptoglobin monoespecific serum, identical to the one used commercially, has been produced on immunizing rabbits with this peak. Its electrophoretic migration corresponds to an alfa-2. This haptoglobin system component possesses a 4.59  $S_{20}$  sedimentation constant, arrived at through analytic ultracentrifugation. Its approximate molecular weight is 100,000.

The immunogenic capacity of this haptoglobin has made possible the obtention of a highly immunitary monoespecific serum.

This isolated haptoglobin component, in accordance with its sedimentation constant, molecular weight and electrophoretic homogeneity, has been classified as a Hp 1-1.

This method to isolate Haptoglobin, Hp 1-1, has a great value on account of its simplicity. It produces highly purified and powerful immunoserums which facilitate the immunochemical studies of the haptoglobin system.

El aislamiento de la haptoglobina (Hp) del suero humano ha sido realizado por diferentes métodos: electroforesis en gel de almidón (27); rivanol y columna de DEAE celulosa (29); fraccionamiento salino y gel filtración (2); sulfato amónico (14, 17); acidificación del suero humano y absorción selectiva por DEAE (4); electroforesis en gel de acrilamida (7). Esta

diversidad de métodos se justifica por un doble motivo. Por una parte, su importante función biológica, como transportadora de hemoglobina (Hb) y activadora de su acción peroxidásica (24, 25), obliga al perfeccionamiento progresivo de métodos eficaces de aislamiento, con los que se facilita el estudio de las alteraciones del metabolismo de este sistema funda-

mental de transporte de  $O_2$  y Fe del organismo (9, 33). Por otra parte, la complejidad molecular de la Hp conlleva dificultades técnicas que obligan a reiterados ensayos metodológicos.

El objetivo del presente trabajo es presentar los resultados obtenidos mediante la aplicación de la precipitación del suero con fenol para el aislamiento de Hp, siguiendo una sistemática similar a la propuesta con éxito por KIRBY (15) para aislamiento de RNA celular.

### Material y métodos

*Sueros humanos normales (SHN).* Se han utilizado muestras de SHN, libres de hemólisis (28), procedentes de donantes normales de sangre (Banco de Sangre del Instituto Provincial de Higiene de Navarra). Estos sueros fueron manipulados en fresco, inmediatamente o tras un tiempo máximo de 72 horas después de haber sido depositados en nevera a 4° C.

*Técnica de aislamiento.* Fue utilizada la precipitación por fenol descrita por KIRBY para el aislamiento de RNA celular (15), con algunas modificaciones propias que permiten su aplicación al suero (19). El suero se precipitó mediante la adición de igual volumen de fenol líquido, bajo agitación lenta, por espacio de 60 minutos (13). Esta mezcla fue centrifugada a 1.750 r.p.m. y 0° C, durante 60 minutos, recogándose el sobrenadante acuoso.

El sobrenadante fue dializado contra ClNa 0,15 M, a 4° C, para total eliminación del fenol, tras ello fue eluido en una columna de 40 × 2,5 cm de Sephadex G-200 con ClNa 0,15 M a un flujo de 25 ml/hora.

*Antisueros.* Se emplearon inmunosue-ros polivalentes y monoespecíficos de dos orígenes: a) Comerciales (Hyland, Los Angeles, California, y Behringwerke, Marburg-Lahan); b) Propios: para la obten-

ción de los inmunosue-ros propios se utilizaron conejos machos de raza común de 2,5 a 3 kg de peso. Se les administró por vía subcutánea, durante cuatro semanas, una dosis antigénica semanal de 0,25 ml de una solución de haptoglobina a concentración de 5 mg/ml. Esta solución se mezclaba con 0,25 de Adjuvant de Freund.

*Técnicas de electroforesis, inmunodifusión (I.D.) e inmunoelectroforesis (I.E.).* Fueron realizadas sobre porta de vidrio en agar 1 %, pH 8,6, y siguiendo la metodología clásica (11, 22, 23, 30, 31, 33). La tinción de las preparaciones se realizó con negro amida.

*Cálculo de la constante de sedimentación y del peso molecular.* Para el cálculo de la constante de sedimentación se utilizó una ultracentrifuga analítica Spinco, Beckman, modelo E, siguiendo la metodología habitual (4, 27).

El peso molecular de la fracción aislada se obtuvo a partir de la constante de sedimentación previamente obtenida (3, 32).

### Resultados

El estudio por I.D. del sobrenadante acuoso de la precipitación por fenol de SHN reveló la presencia de dos componentes. Fueron identificados mediante antisue-ros específicos, como haptoglobina y alfa-1, glicoproteína ácida (fig. 1), en la que se reproduce este análisis inmunológico.

El análisis inmunoelectroforético del sobrenadante frente a un inmunosue-ro anti-humano polivalente, utilizando comparativamente SHN, reveló la existencia de dos líneas de precipitación correspondientes a ambas fracciones, y con migración en la zona alfa-2. La figura 2 es un ejemplo de uno de estos análisis realizados.

El paso a través de la columna Sephadex G-200 del sobrenadante acuoso de la

precipitación por fenol del SHN, permitió la obtención de una gráfica del filtrado (fig. 3). La curva de elución consta de los picos iniciales, claramente diferenciados.

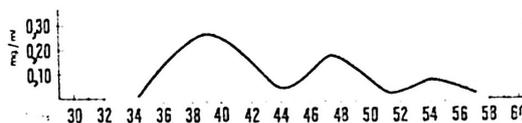


Fig. 3. Resultado de la filtración a través de Sephadex G-200 del sobrenadante acuoso de la precipitación de suero humano por fenol. En la gráfica se aprecian 2 picos iniciales claramente definidos.

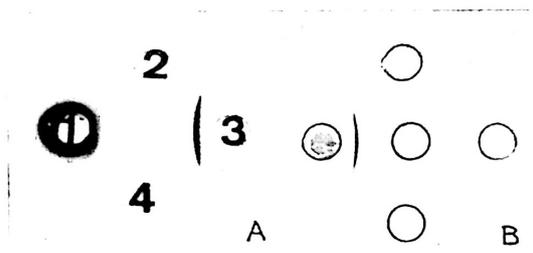


Fig. 1. Análisis de comunidades antigénicas por I.D., del sobrenadante acuoso (pocillos centrales), de una precipitación de SHN por fenol.

A. Los pocillos periféricos contienen antisueros humanos polivalentes, y sucesivamente, en rotación horaria, monoespecíficos anti- $\alpha_2$  macroglobulina, anti- $\alpha_1$ , ácido glicoproteína y anti-fibrinógeno, comenzando por el 1.

B. En la segunda preparación el pocillo superior, y sucesivamente también en rotación horaria, anti- $\alpha_1$ , lipoproteína, anti- $\alpha_2$  lipoproteína, anti- $\alpha_1$ , antitripsina y anti-haptoglobina.

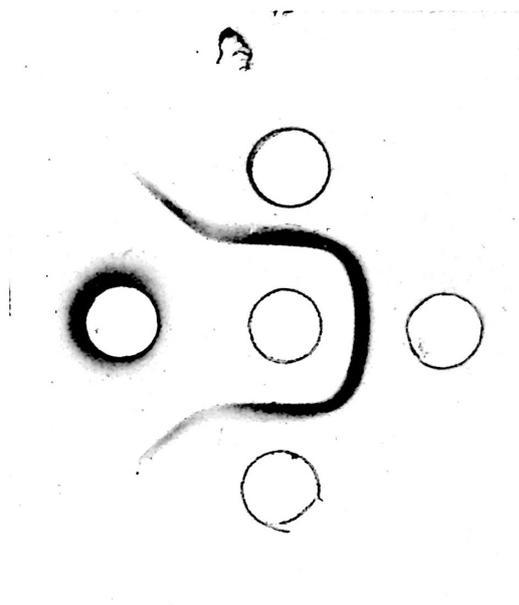


Fig. 4. Análisis de comunidades antigénicas por I.D. del pico 1 y de la elución de Sephadex G-200 situado en el pocillo central.

Los pocillos periféricos contienen antisuero polivalente el superior y, sucesivamente, en rotación horaria, anti-haptoglobina, anti-pico 1 propio y anti- $\alpha_1$ , ácido glicoproteína.

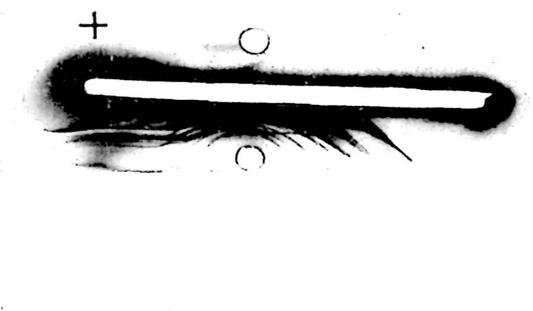


Fig. 2. Resultado de un estudio por I.E. del sobrenadante acuoso de la precipitación por fenol de SHN (pocillo superior), comparativamente con suero humano (pocillo inferior) frente a inmunosuero anti-humano polivalente.

El contenido del pico 1 fue estudiado por I.D. frente a inmunosuero anti-humano polivalente, anti-haptoglobina, anti-pico 1 y anti- $\alpha_1$  glicoproteína ácida. El resultado de este análisis se reproduce en la figura 4. Como se observa en ella, se comprobó una reacción de identidad con el antisuero polivalente y mono específico anti-haptoglobina y anti-pico 1. No



Fig. 5. Estudio por I.E. empleando el inmunosuero monoespecífico anti-pico 1 frente a suero humano normal.



Fig. 6. Estudio por electroforesis en gel de agar de los componentes de los picos 1 y 2, en la parte superior e inferior de la figura.

se obtuvo resultado positivo para el pico 2. Este fue identificado como alfa 1-glicoproteína ácida.

Un nuevo análisis por I.E. utilizando nuestro inmunosuero anti-pico 1 frente al SHN (fig. 5), proporciona una única línea de precipitación superponible a la correspondiente a este componente sérico en el desarrollo inmunolectroforético del SHN y a una de las fracciones separadas del SHN en el sobrenadante acuoso de la precipitación por fenol.

La figura 6 muestra un estudio por electroforesis de ambas fracciones séricas, haptoglobina y alfa 1-glicoproteína ácida, confirmando la motilidad ya descrita y la formación de una sola banda para la haptoglobina previamente aislada.

La inmunización a conejos permitió obtener un inmunosuero monoespecífico para el componente haptoglobina de un

excelente potencial, como ya hemos visto en los estudios por I.D. e I.E.

La ultracentrifugación analítica a 42.000 r.p.m. dio como resultado la obtención de un solo pico bien definido para la fracción haptoglobina (fig. 7), que permitió calcular la constante de sedimentación de este componente ( $S_{20} = 4.59$ ). De acuerdo con los cálculos, a este valor de  $S_{20}$  corresponde un peso molecular aproximado de 100.000.

### Discusión

Los componentes del sistema haptoglobina del SHN han sido aislados utilizando diferentes técnicas de precipitación (2, 14, 17, 29), usando resinas de intercambio iónico (4), o mediante electroforesis (7, 9, 27).

El fenol ha sido empleado para la preparación de orosomucoide y prealbúmina del suero humano (10, 20) y para la separación de ácidos ribonucleicos celulares (13, 15, 16).

La técnica de precipitación por fenol que se ha utilizado para el SHN representa una ligera modificación del método original de KIRBY (18). Tras la precipitación se hizo una filtración del sobrenadante acuoso a través de una columna de Sephadex G-200. Con ello se consiguió aislar dos fracciones séricas, reveladas por I.D. frente a un inmunosuero anti-humano completo.

El análisis antigénico del primer pico por I.D. evidenció precipitación positiva frente al inmunosuero anti-haptoglobina. El primer pico cuando fue inyectado a conejos proporcionó un inmunosuero monoespecífico. Este inmunosuero se comportó tanto en la I.D., como por I.E., como el suero monoespecífico anti-haptoglobina. Este tipo de inmunosuero no reaccionó frente a la fracción contenida en el pico 2, ni frente a la del pico 3. El pico 2 se identificó como alfa 1-glicoproteína ácida; el 3 demostró contener ácidos ribonucleicos.

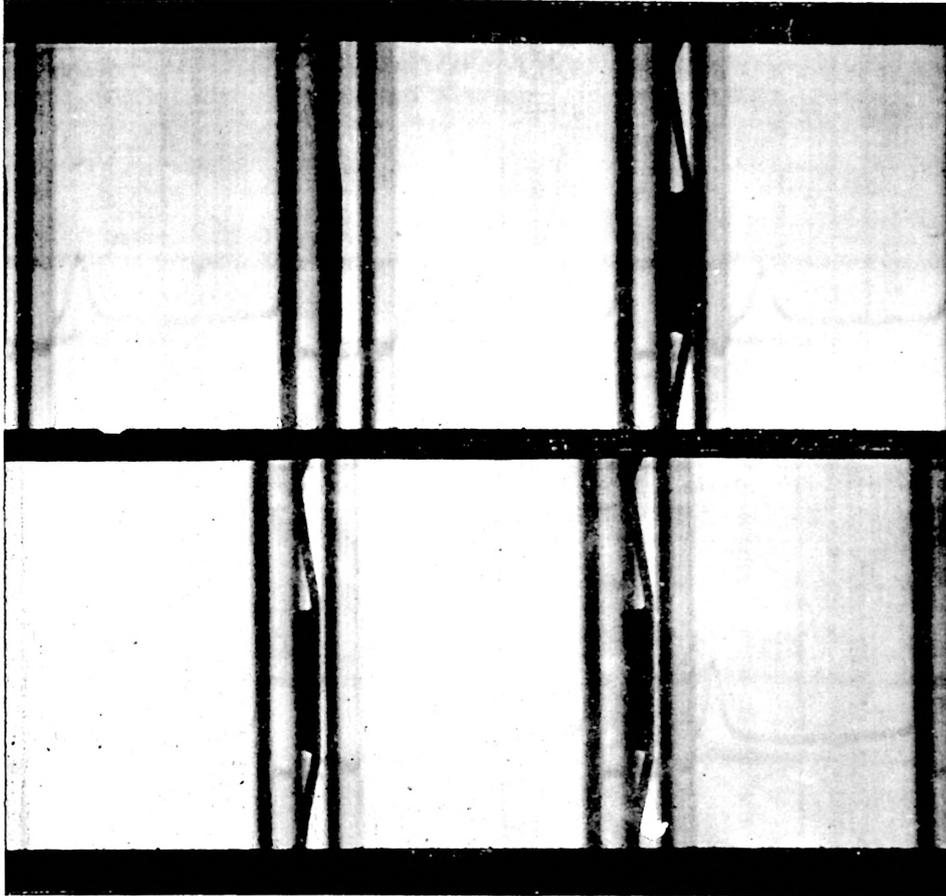


Fig. 7. Resultado del estudio por ultracentrifugación analítica del componente pico 1 a 42.040 r.p.m.

El elevado grado de pureza con que se consiguió el aislamiento de un único componente sérico en el pico 1 queda evidenciado por las características del análisis antigénico que hemos comentado, que no permitió demostrar la presencia de otros componentes proteicos. Este hecho se ratifica porque ni con el análisis inmunoelectroforético, ni con la ultracentrifugación analítica se pudo detectar la presencia de contaminantes.

La migración en la zona alfa 2 (1, 26) y, sobre todo, su identificación inmunológica permite afirmar que la fracción sérica aislada en el pico 1 de la elución del

sobrenadante acuoso de la precipitación por fenol es un componente del heterogéneo sistema haptoglobina (5, 21, 28). La presencia de una sola banda en la electroforesis (8) y, sobre todo, la constante de sedimentación y peso molecular calculado sugieren que se trata de una subclase Hp 1-1, puesto que para ésta se describen cifras semejantes (8). Por el contrario, son muy diferentes a las de los componentes Hp 2-1 ó 2-2. Estas últimas, debido al mayor peso molecular de las cadenas alfa-2 y a su tendencia a formar polímeros (8) dan lugar a moléculas heterogéneas y, en todo caso, de más elevada

constante de sedimentación y peso molecular (8, 12, 17).

La capacidad inmunológica de esta fracción es elevada, proporcionando inmunosuero monoespecífico de suficiente potencial para los análisis por I.D e I.E. utilizando la pauta de inmunización que habitualmente se emplea en nuestro laboratorio (19).

### Resumen

Se describen las características inmunológicas, electroforéticas y la constante de sedimentación de una fracción de haptoglobina que se ha aislado del suero humano. El aislamiento se ha realizado mediante precipitación por fenol, y ulterior filtración a través de una columna de Sephadex G-200 del sobrenadante acuoso de la precipitación. En el primer pico de esta elución, el análisis antigénico ha demostrado la existencia de la fracción identificada como haptoglobina. La inmunización de conejos con este pico ha dado lugar a un suero monoespecífico anti-haptoglobina, idéntica al de origen comercial. Su migración electroforética corresponde a una alfa-2. Este componente del sistema haptoglobina posee una constante de sedimentación de  $4,59 S_{20}$ , calculada por ultracentrifugación analítica, con un peso molecular aproximado de 100.000. De acuerdo con su constante de sedimentación, peso molecular y homogeneidad electroforética, la fracción aislada ha sido identificada como Hp 1-1.

### Bibliografía

- ARQUEMBOURG, P. C., SALVAGGIO, J. E. y BICKERS, J. N.: Primer of Immunoelectrophoresis. S. Karger, Basilea, 1970.
- BETLACH, CH. J. y McMILLAN, D. E.: *Annal. Biochem.*, **49**, 103-108, 1972.
- BOYD, W. C.: Fundamentals of Immunology. Interscience Publ. Co. Inc., New York, 1966.
- CONNELL, G. E. y SHAW, R. W.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1013-1019, 1961.
- CONNELL, G. E., DIXON, G. H. y SMITHIES, O.: *Nature*, **193**, 505-506, 1962.
- ELIAS, H. G.: Ultrazentrifugen Methoden. Beckman Instruments. Munchen, 1961.
- FULLER, G. M., McCOMBS, M. L y BARNETT, D. R.: *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exptl. Biol.*, **30**, 1071, 1971.
- FULLER, G. M., RASEO, M. A., McCOMBS, M. L., BARNETT, D. R. y BOWMAN, B. H.: *Biochemistry*, **12**, 253-258, 1973.
- GORDON, S. y BEARN, A. G.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **121**, 846-850, 1966.
- GOT, R., BOURRILLON, R. y MICHON, J.: *Proc. 10th Coll. Bruges*, 1962.
- GRABAR, P. y WILLIAMS, C. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 193-194, 1953.
- GUINAND, S., TONNELAT, J., BOUSSIER, G. y JAYLE, M. F.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **38**, 329-341, 1956.
- HARSHAM, S., DUKE, L. J. y SIX, H.: *Immunochemistry*, **6**, 175-188, 1969.
- HERMAN-BOUSSIER, G.: Préparation et propriétés physiques et chimiques des haptoglobines humaines. Foulon, Paris, 1960.
- KIRBY, K. S.: *Biochem. J.*, **64**, 405-408, 1956.
- KIRBY, K. S.: *Biochem. J.*, **96**, 266-269, 1965.
- LAURELL, C. B.: *Chim. Clin. Acta*, **4**, 78-81, 1959.
- LISO-IRURZUN, P.: *Allerg. Immunopathol.*, **2**, 85-92, 1974.
- LISO-IRURZUN, P. y PÉREZ-MIRANDA, M.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **15**, 297-318, 1971.
- MICHON, J.: *Nature*, **193**, 1077-1078, 1962.
- NANCE, W. E. y SMITHIES, O.: *Nature*, **198**, 869-870, 1963.
- OUCHTERLORY, O.: *Progr. Allergy*, **5**, 1-78, 1958.
- OUCHTERLORY, O.: *II Progr. Allergy*, **6**, 30-154, 1962.
- POLONOVSKY, M. y JAYLE, M.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 66-91, 1939.
- SCHULTZE, H. E., HAUPT, H., HERDE, K. y HENINBURGER, N.: *Clin. Chim. Acta*, **8**, 207-214, 1963.
- SCHULTZE, H. E. y HEREMANS, J. F.: Molecular Biology of Human Proteins. Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1966.
- SMITHIES, O.: *Biochem. J.*, **61**, 629-641, 1955.
- SMITHIES, O., CONNELL, G. E. y DIXON,

- G. H.: *Am. J. Human Genet.*, 14, 14-21, 1962.
29. STEINBACH, M. y PEJAUDIER, L.: *Nature*, 184, 362, 1959.
30. TISELIUS, A.: *Clin. Chim. Acta*, 3, 1-9, 1958.
31. TISELIUS, A. y FLODIN, P.: *Adv. Prot. Chem.*, 8, 461-486, 1953.
32. WEIR, D. M.: *Experimental Immunology*, F. A. Davis Co., Philadelphia, 1967.
33. WEST, E. S., TODD, W. R., MASON, R. S. y VAN BRUGGEN, J. T.: *Biochemistry*, McMillan Co., New York, 1968.

