

**CNEN/SP**

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA (IgG) DE  
COELHO PARA A PRODUÇÃO DE SEGUNDO ANTICORPO PARA  
RADIOIMUNOENSAIO

Sandra Rosa da SILVA e Vânia Caira BORGHI

IPEN-PUB -- 294

PUBLICAÇÃO IPEN 294

MARÇO/1990

20 pagos

**ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA (I<sub>g</sub>G) DE  
COELHO PARA A PRODUÇÃO DE SEGUNDO ANTICORPO  
PARA RADIOIMUNOENSAIO**

**Sandra Rosa da SILVA e Vânia Ceira BORGHI**

**DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CNEN/SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
SÃO PAULO - BRASIL**

**Série PUBLICAÇÃO IPEN**

**INIS Categories and Descriptors**

**C45.00**

**IMMUNOGLOBULINS  
SODIUM SULPHATES  
PRECIPITATION  
ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY  
RADIOIMMUNOASSAY**

---

**IPEN - Doc - 3572**

**Aprovado para publicação em 18/01/90.**

**Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).**

**ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA (IgG) DE COELHO  
PARA A PRODUÇÃO DE SEGUNDO ANTICORPO PARA RADIOIMUNOENSAIO.\***

Sandra Rosa da SILVA

Vânia Caira BORGHI

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP  
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES  
Caixa Postal 11049 - Pinheiros  
05508 - São Paulo - BRASIL**

**RESUMO**

Imunoglobulina (IgG) de coelho foi isolada e purificada pela precipitação com sulfato de sódio seguida de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. A eficiência do procedimento foi verificada pela determinação das proteínas totais durante várias etapas de purificação. Comprovou-se a pureza do produto final por meio de imunoeletroforese frente a soro de carneiro anti-soro total de coelho. Foram obtidos 850 mg de IgG pura, suficientes para a imunização de muitos carneiros a serem utilizados na produção de segundo anticorpo para radioimunoensaio.

(\*) Trabalho apresentado na "41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência" - Fortaleza (CE), de 9 a 15 de julho de 1989.

**ISOLATION AND PURIFICATION OF RABBIT IMMUNOGLOBULIN (IgG)  
FOR THE PRODUCTION OF A SECOND ANTIBODY FOR RADIOIMMUNOASSAY\***

**Sandra Rosa da SILVA**

**Vânia Caira BORGHI**

**BRAZILIAN NUCLEAR ENERGY COMMISSION  
NUCLEAR AND ENERGY RESEARCH INSTITUTE  
P.O. Box 11049 - Pinheiros  
05508 - São Paulo - BRAZIL**

**ABSTRACT**

Immunoglobulin (IgG) from rabbit serum was isolated and purified by sodium sulphate precipitation followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The efficiency of the procedure was followed by total protein determination during all purification steps. The purity of the final product was verified through immunoelectroforesis of IgG with sheep serum anti-rabbit whole serum. Were obtained 850 mg of pure IgG, enough for the immunization of several sheeps to be used in the production of a second antibody for radioimmunoassay.

(\*) Paper presented at 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, held in Fortaleza (CE), July, 9-15, 1989.

## INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas são proteínas séricas secretadas por linfócitos ativados, que têm a propriedade de reagir com substâncias estranhas ao organismo, com o intuito de defendê-lo contra possíveis agressões. Essas proteínas constituem um grupo de moléculas heterogêneas em termos de carga, massa e atividade biológica, representando as proteínas mais básicas do soro. Elas possuem mobilidade eletroforética lenta e suas solubilidades, aliadas aos seus pontos isoelétricos relativamente altos, servem de base para a maioria das separações das imunoglobulinas.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para sua purificação, dependendo do objetivo e do grau de pureza desejados. Vários métodos são usualmente empregados, compreendendo fracionamento com etanol, a precipitação com concentração elevada de sais neutros, a formação de complexos proteícos insolúveis e a formação de complexos antígeno-anticorpo (1,2). Os métodos não específicos, baseados nas propriedades físico-químicas dessas proteínas, são os mais utilizados devido a sua praticabilidade. O procedimento da precipitação com sais neutros apresenta algumas vantagens sobre os demais, pois além desta técnica ser bastante simples, o risco de denaturação das imunoglobulinas é pequeno (1).

Realizou-se portanto, no presente trabalho, a purificação de IgG de coelho pela precipitação com sulfato de sódio seguida de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. A proteína assim purificada será utilizada na produção de um soro de carneiro anti-IgG de coelho, empregado como segundo anticorpo na separação de radioimunoensaios em que o primeiro anticorpo é produzido na mesma espécie animal da IgG (3).

O segundo anticorpo a ser produzido será empregado nos diversos radioimunoensaios realizados na Divisão de Medicina do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, cujos primeiros anticorpos são gerados em coelhos.

O preparo deste segundo anticorpo faz parte de um projeto que objetiva a nacionalização da produção de reagentes de radioimunoensaios hormonais; visto os produtos existentes no mercado serem em sua grande maioria importados.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se soro normal de coelhos Nova Zelândia adultos, obtido por sangria via punção cardíaca de animais provenientes dos biotérios do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Instituto Butantan e Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. A normalidade do soro empregado foi confirmada pela determinação da concentração das proteínas totais das diferentes amostras de soro obtidas nas várias sangrias, pelo método de Gornall e cols. (4), empregando um soro humano padronizado e cedido pelo Dr. Mario Hirata na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

As frações globulínicas foram separadas a partir de 800 ml de soro pela precipitação com sulfato de sódio (1). Realizou-se uma primeira precipitação com sulfato de sódio a 18%, permanecendo esta solução a temperatura ambiente por 20 horas e por mais duas horas a 37°C. A seguir, a solução foi submetida à centrifugação a 2000 RPM durante 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante reservado e o precipitado reconstituído com 320 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 8,0.

Foi realizada uma segunda precipitação com sulfato de sódio a 12%, sendo novamente o precipitado separado e reservado um segundo sobrenadante. Este precipitado foi então reconstituído com 160 ml do mesmo tampão fosfato de

potássio e clarificado por centrifugação nas mesmas condições. O precipitado foi reservado e o sobrenadante foi reprecipitado juntamente com os demais, com sulfato de sódio a 12% e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, juntamente com aquele reservado anteriormente, foi dialisado contra o mesmo tampão fosfato de potássio.

Após nova diálise contra tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 8,0, concentrou-se o material por meio de membrana Diaflo PM 30 em sistema de ultrafiltração Amicon. A fração de IgG foi então purificada por cromatografia de troca iônica em dietil-aminoetil (DEAE) celulose (5).

Realizou-se uma cromatografia prévia, a partir de uma pequena amostra de proteína isolada (0,5 g), a fim de se testar o emprego de um lote de DEAE-celulose (DE - 52, Whatman) estocado por mais de dez anos em nossos laboratórios. Utilizou-se portanto, uma coluna de pequenas dimensões, de 7,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro, equilibrada em tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 8,0. A amostra foi eluída no tampão de equilíbrio da coluna, empregando-se fluxo de 60 ml/h, sendo coletadas frações de 1,7 ml cada.

Confirmada a adequação do uso desta celulose, realizou-se a purificação do restante do material empregando-se uma coluna de maiores dimensões, 25,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, coletando-se nas mesmas condições, frações de 4 ml cada. A presença de proteína nestas frações foi verificada por leitura espectrofotométrica a 280 nm.

As frações relativas ao pico protéico foram reunidas e reprecipitadas com sulfato de sódio a 18%, permanecendo esta solução por 24 horas a 37°C, antes do precipitado ser separado por centrifugação a 2000 RPM, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este precipitado foi lavado por 3 vezes consecutivas com solução de sulfato de sódio a 18%, seguidas de centrifugação nas mesmas condições, a fim de se remover as impurezas que ainda pudessem estar presentes. O material assim obtido foi inicialmente diali-

sado contra água destilada para retirada do sulfato e a seguir contra solução fisiológica.

A concentração protéica foi avaliada pelo método do Biuret durante as diferentes etapas de purificação, sempre sucedendo à concentração e diálise do material.

A pureza da IgG foi verificada por imunoeletroforese frente a soro de carneiro anti-soro total de coelho, preparado pelo Dr. Hércio Corti Passos na Escola Paulista de Medicina e pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, desenvolvida de acordo com o método de Davis (6).

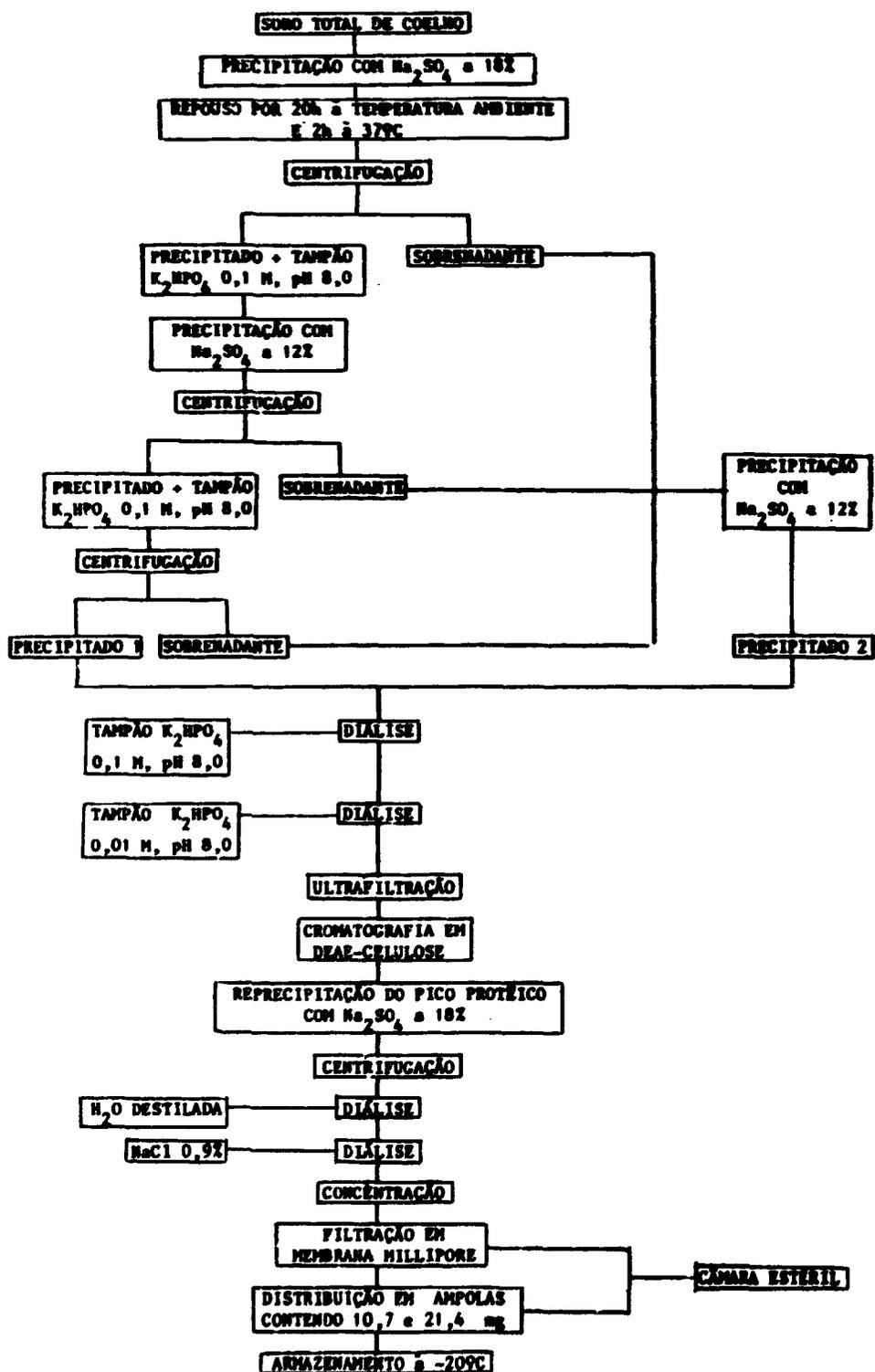
A solução de IgG resultante das duas purificações foi reunida e concentrada em saco de diálise, envolvido por Sephadex seco (G-50 médio, Pharmacia). Depois de determinada sua concentração, esta solução, sob fluxo laminar, foi esterilizada através de filtração em membrana Millipore de 0,22  $\mu$  de diâmetro, dividida em alíquotas e armazenada a -20°C para posterior imunização dos carneiros.

A figura 1 apresenta um diagrama dos procedimentos empregados no isolamento e purificação da IgG de coelho.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração média de proteínas totais determinada nas amostras de soro dos coelhos foi de 6,94  $\pm$  0,60 g/100 ml, variando de 6,2 a 8,2 g/100 ml, cujos valores individuais estão representados na tabela 1. Estes valores são compatíveis com o padrão de normalidade para coelhos descrito na literatura (7).

A tabela 2 apresenta os valores de proteínas totais e respectivos rendimentos percentuais obtidos na purificação da IgG de coelho. Pela análise desta tabela observa-se que a mistura de soro de coelhos empregada (800 ml) forneceu 55,2 g de proteínas totais. Após precipitação do soro com sulfato de sódio obteve-se 3,5 g de proteína, correspondendo a um rendimento de apenas 6,34%. Este valor poderia ser explicado pelo tipo de sal neutro utilizado na precipitação,



**FIGURA 1** - Representação diagramática do isolamento e purificação da IgG de coelho.

visto que Higuchi e cols. (8) empregando sulfato de amônio, obtiveram rendimento da ordem de 30%.

Outro fator que pode ter contribuído para este rendimento baixo foi a cristalização do sal observada durante as centrifugações realizadas a 4°C, provavelmente devido ao fato deste sal ser menos solúvel a baixas temperaturas (1,9). A obtenção de rendimento da ordem de 25% em purificação anterior (dados não publicados), quando as centrifugações foram realizadas a temperatura ambiente (10), corrobora essa suspeita.

A figura 2 exibe os perfis cromatográficos das purificações da IgG em DEAE-celulose, realizadas a partir de 0,5 g (purificação teste) e das 3,0 g restantes de proteína. As frações que foram reunidas, correspondentes aos picos protéicos obtidos nessas duas cromatografias, apresentaram respectivamente 0,2 e 1,3 g de IgG, fornecendo valores de recuperação similares; 40 e 43% respectivamente. Entretanto, Higuchi e cols. (8) obtiveram nessa mesma cromatografia recuperação duas vezes maior (83%). Obteve-se, portanto, nas duas purificações uma quantidade total de 1,5 g de IgG, que correspondeu a um rendimento de 2,71% (tabela 2).

Após a reprecipitação com sulfato de sódio a recuperação obtida foi novamente muito próxima para as duas purificações; 55 e 66% para a purificação teste e purificação ulterior, respectivamente. Nessa etapa obteve-se nas duas purificações um total de 0,97 g de proteína, correspondendo a um rendimento de 1,75% (tabela 2).

Durante a concentração final da solução de IgG resultante das duas purificações ocorreu uma pequena perda de material, obtendo-se 0,85 g de proteína em 80 ml de solução, que correspondeu a um rendimento final apreciável, de 1,54%. Outros autores empregando procedimentos relacionados referem-se a rendimentos finais que vão de 0,42 a 8,1% a partir do soro total (8,11,12).

A imunoeletroforese da IgG obtida nessas duas purificações apresentou padrões similares revelando, frente ao

soro de carneiro anti-soro total de coelho, uma única linha de precipitação com mobilidade de IgG, indicando serem preparações de pureza elevada (Fig. 3). Em purificação anterior de IgG de coelho empregando metodologia similar, obteve-se uma preparação igualmente pura (10) com rendimento final da ordem de 3% (dados não publicados).

A figura 4 apresenta o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida da IgG obtida nas duas purificações, a qual revelou uma banda principal confirmando sua pureza. Higuchi e cols.(8) obtiveram resultados similares pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%.

As 850 mg de IgG em solução, resultantes dessas duas purificações, foram distribuídas em ampolas estéreis contendo 10,7 e 21,4 mg cada e mantidas a -20°C. Evitou-se, portanto, a estocagem da IgG na forma liofilizada, pois a liofilização usualmente causa alguma agregação quando a IgG é reconstituída ( 13 ).

Considerando que na obtenção de anticorpos empregam-se pequenas doses de imunógeno, da ordem de 0,1 mg por injeção (14,15), a quantidade de IgG isolada neste trabalho é suficiente para a imunização de centenas de carneiros utilizados na produção de segundo anticorpo para radioimuno-ensaio.

**TABELA 1 - Concentração de proteínas totais de amostras séricas de coelhos obtidas em diferentes sangrias.**

AMOSTRA (nº)	PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS	VOLUME (ml)	PROTEÍNAS TOTAIS (g/100 ml)
1	IMT	30	6,6
2	IPEN	22	7,8
3	IPEN	20	8,2
4	IMT	20	7,5
5	IB	170	6,7
6	IB,IMT	280	7,1
7	IB	160	6,7
8	IMT,IPEN	40	6,2
9	IPEN	20	6,6
10	IMT	20	6,3
11	IPEN	10	6,4
12	IPEN	10	7,2
		Total= 802	Média = 6,94 Desvio= ± 0,60 Padrão

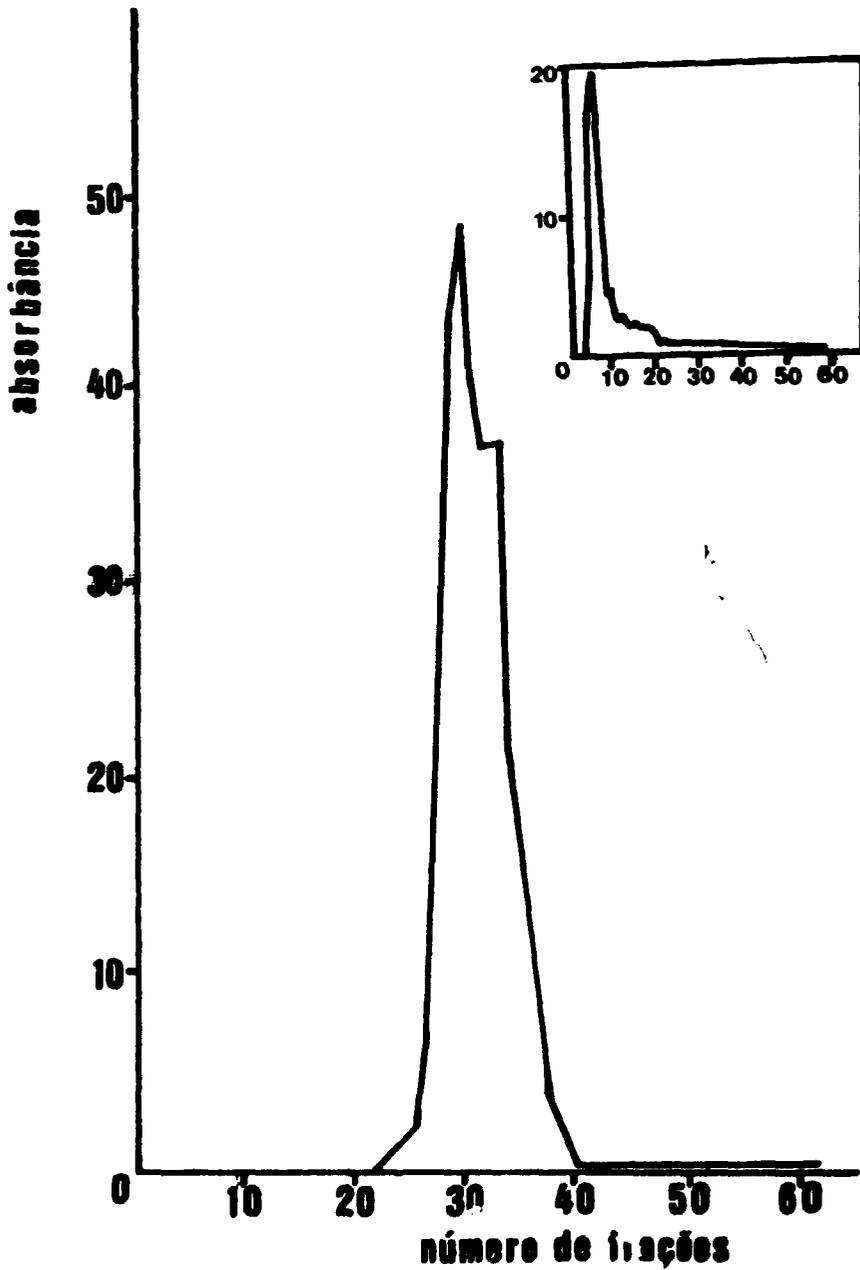
IB - Instituto Butantan  
 IMT - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo  
 IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

. As amostras de números 6 e 8 referem-se a mistura de soros de animais provenientes de diferentes Instituições.

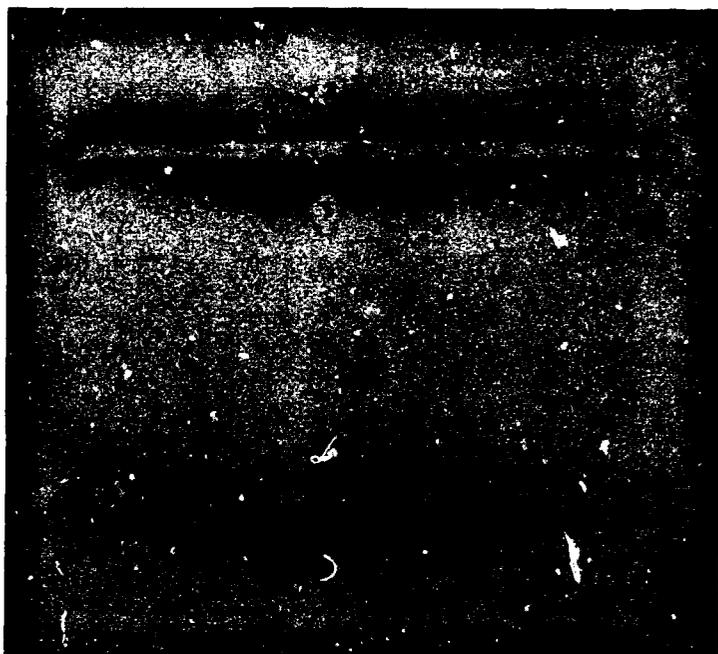
**TABELA 2 - Purificação de IgG de coelho. Valores de proteínas totais avaliadas pelo método do Biuretto e respectivos rendimentos percentuais.**

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	PROTEÍNAS TOTAIS (g)	RENDIMENTO (%)
Soro total	55,20	100
Precipitação com sulfato de sódio	3,50	6,34
Cromatografia em DEAE - celulose	0,20 1,30	2,71
Reprecipitação com sulfato de sódio	0,11 0,86	1,75
Concentração final	0,85	1,54

- Os valores das proteínas totais determinados após as etapas de cromatografia em DEAE-celulose e reprecipitação com sulfato de sódio, referem-se a purificação teste (indicados acima) e a purificação do restante do material (indicados abaixo). Os rendimentos estimados nessas etapas referem-se à soma dos valores das proteínas totais obtidos nas duas purificações.



**FIGURA 2** - Perfis cromatográficos das purificações em DEAE-celulose das proteínas séricas precipitadas com sulfato de sódio. O painel interno refere-se ao perfil obtido na purificação teste e o externo representa o perfil obtido na purificação final.



**FIGURA 3** - Padrão imunoeletroforético das purificações de IgG obtidas nas cromatografias em DEAE - celulose.

Preparações obtidas nas purificações teste (A) e final (B). (1) soro total de coelho; (2) fração eluída em DEAE-celulose; (3) soro de carneiro anti-soro total de coelho.

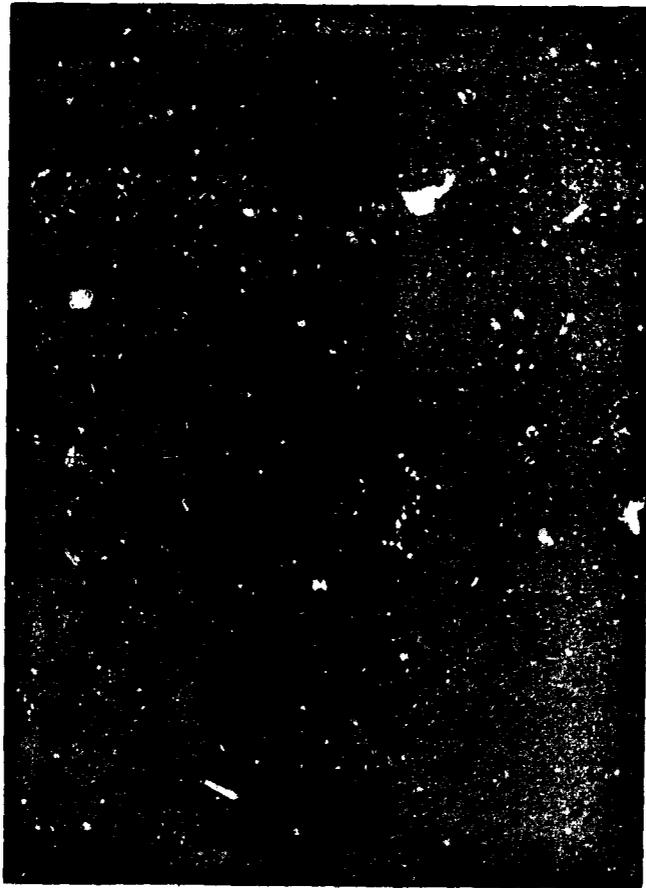


FIGURA 4 - Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida das purificações de IgG em DEAE-celulose. O gel da esquerda se refere a purificação teste e o da direita a purificação do restante do material. A seta indica o sentido de migração eletroforética.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- 1 - Foi possível reproduzir um procedimento eficiente para a purificação da IgG de coelho baseado na precipitação com sal neutro seguida de cromatografia de troca iônica.
- 2 - A IgG assim purificada apresentou grau de pureza elevado, sendo muito adequada para a indução de anticorpos específicos.
- 3 - A quantidade de IgG isolada é suficiente para a imunização de centenas de carneiros a serem utilizados na produção de um segundo anticorpo para radioensaio.
- 4 - A IgG obtida foi acondicionada apropriadamente, de forma a permitir sua utilização na obtenção de anticorpos, por um longo período.

## AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a Dra. J.K. Kloetzel do IMT e ao Sr. C.E. Lopes do IB a doação das amostras séricas dos coelhos, a MSc. R.M. Piatti do Instituto Biológico pelas valiosas sugestões, as Dras. Y.U. Gomes do IMT e C.A.C.Vaz do ICB da USP pelas facilidades na realização das imunoelektroforeses e a Sta. M.H. Bellini do IPEN a ajuda na sangria e manuseio dos animais. Agradecem também a CNEN e ao CNPq (processo nº 405-557/86) os recursos e auxílio recebido para a realização deste trabalho, bem como ao CNPq a bolsa de mestrado concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - DEUTSH, H.F. Preparation of immunoglobulin concentrates. In: WILLIAMS, C.A.; CHASE, M.W., eds. Methods' in immunology and immunochemistry. New York, N.Y., Academic Press, 1970. v.1, p. 315-21.
  - 2 - BIER, O.G.; MOTA, I.; SILVA, W.D.; VAZ, N.M. Imunologia básica e aplicada. Rio de Janeiro, R.J., Guanabara Koogan, 1977. P. 100-18.
  - 3 - BORGHI, V.C. Dosagens hormonais in vitro com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. Cien. cult. 35(10):1456-66, 1983.
  - 4 - GORNALL, A.C.; BARDAWILL, C.J. DAVID, M.M.. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J.Biol. Chem., 177:751-66, 1947.
  - 5 - FAHEY, J.L. Chromatographic separation of immunoglobulins. In: WILLIAMS, C.A.; CHASE, M.W., eds. Methods in immunology and immunochemistry. New York, N.Y., Academic Press, 1970. v.1, p. 321-32.
  - 6 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121:404-27, 1964.
  - 7 - KRAUS, A.L., WEISBROTH, S.H.; FLATT, R.E.; BREWER, N. Biology and diseases of rabbits. In: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEM, F.M. eds. Laboratory animal medicine. New York, N.Y., Academic Press, 1984. p.206-40
  - 8 - HIGUCHI, T.; OGATA, H.; VEIGA, S.S.; NOGUEIRA, Z.M.; FELIPPE, J.M.S. Purification of rabbit IgG, obtention of sheep antirabbit IgG and their use in ra -
-

- radioimmunoassay of avian leukosis virus-p 15. Rev. Microbiol., 19(1):82-8,1988.
- 9 - HUDSON, L. & HAY, F.C. Practical immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1976. p.152-91.
- 10 - BORGHI, V.C. Contribuição ao conhecimento das alterações do eixo hipotálamo - hipófise - tireóideo na hipoproteïnemia experimental em ratos Wistar Albinos (*Rattus norvegicus albinus*). São Paulo, 1978. (Tese de doutoramento, Instituto de Biociências, Univ. São Paulo).
- 11 - OGATA, H. & HIGUCHI, T. Obtenção de anti-IgG de coelho. - Determinação do sistema precipitante do radioimmunoensaio. Cien. Cult. 369(7):694,1984.
- 12 - HIGUCHI, T.; SOUZA, J.M.M.; NOGUEIRA, Z.M.; OGATA, H. Perspectives on avian and bovine leukemia virus immunological studies. In: ACADEMIA DE CIÊNCIAS DE SÃO PAULO. Science and technology: 4<sup>th</sup> Japan-Brazil symposium on... held in São Paulo, 06-10 August, 1984. São Paulo, 1984. v.2, p.77-86.
- 13 - JOHNSTONE, A. & THORPE, R. Immunochemistry in practice. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1987. p. 48-55.
- 14 - CHAPMAN, R.S.; MUNRO, A.C.; TEMPLETON, J.G.; FATORI, P. Production of second antibody for radioimmunoassay. In: HUNTER, W.M.; CORRIE, J.E.T., eds. Immunoassay for clinical chemistry. London, Churchill Livingstone, 1983. p. 456-68.

- 15 - FISHER, D.A. Production of antibody for use in radioimmunoassay. In: ROSE, N.R.; FRIEDMAN, H., eds. Manual of clinical immunology. Washington, American Society of Microbiology, 1980. p.339-42.