

PURIFICACION DE LAS IgG-ANTI ALFAFETOPROTEINA DE SUERO DE RATON*

Por J. Ventanas Barroso
A. López Pérez
J. Burgos

INTRODUCCION

La alfafetoproteína (AFP) es una glicoproteína sintetizada por el hígado y saco vitelino, que, en condiciones fisiológicas, se encuentra restringida al período fetal y neonatal^{1, 2}; apareciendo en el individuo adulto asociada a procesos tumorales como hepatomas y teratomas^{1, 3}.

La hipótesis de que la AFP desempeña un importante papel en la diferenciación celular (período fetal, desarrollo de neoplasias) ha constituido el punto de partida de numerosos trabajos realizados en torno a esta proteína. Particular importancia reviste su participación en la diferenciación sexual del cerebro, ya que la AFP presente en el suero sanguíneo de ratón y rata durante las 3-4 primeras semanas de vida posee la capacidad de «ligar» estrógenos (estradiol y estrona) con alta afinidad^{4, 5, 6}.

En este trabajo se describe la metodología encaminada al aislamiento de las IgG anti-AFP de suero de ratón. La obtención rápida de anticuerpos específicos contra la AFP abre el camino a múltiples posibilidades (bloqueo inmunológico de la AFP, estudio de su localización intracelular mediante inmunofluorescencia, purificación rápida de grandes cantidades de AFP por cromatografía de afinidad, etc.), que, sin duda, contribuirán a esclarecer el papel biológico de esta proteína.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon ratones albinos cepa NMRI de 1-3 días de edad para la obtención del suero. Los animales se sacrificaron por decapitación cervical y se recogió la

* Este trabajo ha sido realizado con fondos procedentes del proyecto n.º 4467 de la CAICYT.
An. Fac. Vet. León, 1982, 28, 245-254.

sangre con buffer fosfato 0,15 M (pH 7,4). El suero se separó de las células sanguíneas por centrifugación a 2.000xg durante 5 minutos. Para la preparación del suero anti-FP se utilizaron conejos New Zeland de 2,5 Kg. de peso, según el esquema descrito en la Tabla I. Las determinaciones de proteína se efectuaron por el método de Lowry⁷, utilizando seroalbúmina bovina cristalizada como proteína.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se efectuaron siguiendo el método de Davis⁸. El cálculo del peso molecular se realizó mediante electroforesis de disco en presencia de dodecilsulfato sódico según el procedimiento de Weber y Osborn⁹.

Para la inmunodifusión se emplearon geles de agarosa al 1 %, siguiendo la técnica de Ouchterlony¹⁰. La inmunoelectroforesis se efectuó de acuerdo con Scheidegger¹¹.

TABLA I
Esquema de inmunización seguido para la preparación del suero anti-alfafetoproteína de suero sanguíneo de ratón

Conejos New Zeland (2,5 Kg.)	
1. ^a inyección	0,5 mg. de AFP disueltos en 1 ml. de Pbs* y homogeneizados en 0,5 m. de adyuvante completo de Freund (Difco). Múltiples inyecciones en el dorso. Subcutáneas.
2. ^a inyección	(se realizó igual que la 1. ^a , 15 días después)
3. ^a inyección	(se realizó igual que la 1. ^a , 15 días después)
Toma de muestra (pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis)	
Sangría	
Centrifugación	(el sobrenadante se congeló hasta su uso)

* Pbs (Phosphate buffered saline): Solución salina tamponada a pH 7,3 con buffer fosfato sódico 0,15 M.

Para la obtención rápida de pequeñas cantidades de AFP se empleó el método electroforético descrito por Benassayag¹².

RESULTADOS

Purificación de la AFP de suero de ratón

Para la purificación de alfafetoproteína se eligió de entre los distintos métodos descritos (cromatografía de afinidad sobre CNEr 4B Sepharosa, tamizado molecular seguido de cromatografía en DEAE, cromatografía sobre inmunoabsorbente con antialbúmina y paso por DEAE —Sephacel, etc.), el método electroforético descrito por Benassayag¹² por la rapidez y facilidad con que se obtienen con él pequeñas cantidades de alfafetoproteína. Para ello, tras la electroforesis del suero de ratones en edad perinatal los geles se sumergieron en ANS (Anilo-Naftaleno-Sulfonato) y se expusieron a la luz ultravioleta, apareciendo dos bandas fluorescentes —la más «lenta» corresponde a la AFP y la «rápida» a la albúmina. Ambas bandas se cortaron por separado y, posteriormente, las proteínas se extrajeron del gel.

En las Figuras 2 y 3 puede apreciarse la eficacia del método de purificación seguido al comparar las AFP y albúmina obtenidas con los geles correspondientes al suero de ratón lactante, lográndose el aislamiento de ambas fracciones hasta la homogeneidad electroforética.

Parte del liofilizado se utilizó para el cálculo del peso molecular de la AFP purificada, sometiendo a electroforesis muestras de AFP y de proteínas de peso molecular conocido, de acuerdo con el método de Weber y Osborn⁹. Los resultados obtenidos demuestran que la alfa-fetoproteína de suero de ratón tiene un peso molecular de 72.000, semejante al encontrado por otros autores en muestras similares.

Preparación del suero anti-alfafetoproteína

El suero anti-AFP se preparó según el proceder descrito en la Tabla I, basado en los conocimientos actuales sobre la cinética de la aparición de inmunoglobulinas en respuesta a la inyección de un antígeno.

Una semana después de la última inyección se hizo una toma de sangre, y el antisuero obtenido se contrastó mediante inmunodifusión e inmunoelectroforesis (Figs. 4 y 5). La inmunodifusión, al objeto de descartar una posible reacción cruzada con la albúmina, apareciendo únicamente bandas de precipitación frente a las muestras que contienen alfa-fetoproteína (la AFP purificada y el suero de ratones lactantes), y la inmunoelectroforesis para comprobar la monoespecificidad contra la AFP del antisuero obtenido.

Aislamiento de la fracción IgG del suero anti-alfafetoproteína

De los cinco tipos de inmunoglobulinas descritas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) son las IgG —denominadas también γ -globulinas por su movilidad electroforética— las mayoritarias (10 mg./ml. en el suero de un adulto normal) y las principales responsables de la inmunidad humoral en las condiciones de trabajo seguidas por nosotros.

El aislamiento de la fracción IgG presente en el suero de conejo inmunizado con AFP se llevó a cabo mediante precipitación con sulfato amónico y purificación del material precipitado por absorción de la proteína inespecífica sobre un lecho de DEAE Sephadex A-50 (Tabla II).

En la primera etapa —precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50% de saturación— se obtiene un precipitado considerablemente enriquecido en IgG no exento de contaminación por transferrinas y albúminas (Fig. 6.2). El pase posterior del precipitado redisolto a través del gel de Sephadex permitió la purificación de las IgG, que aparecen como una banda nítida en el extremo superior del gel (Fig. 6.3).

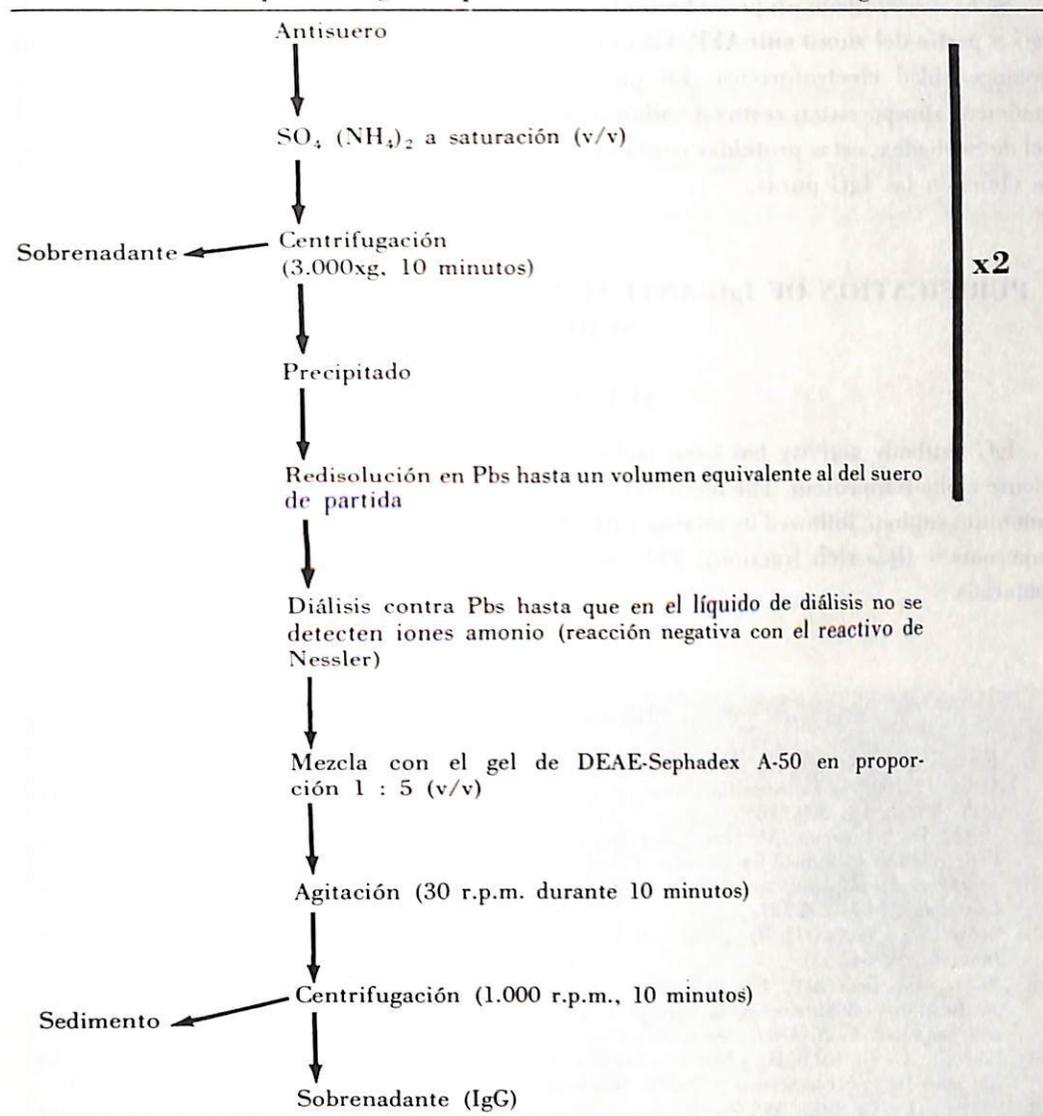
DISCUSION

Con el procedimiento seguido para su purificación, conseguimos aislar la α -FP hasta su pureza electroforética. La banda correspondiente a la α -FP tiene un Rbpb de 0,53 y un peso molecular de 72.000 daltons, semejantes al de la α -FP de otras especies: rata¹³, cerda¹⁴, hombre¹⁵, etc. La α -FP así preparada resultó ser un excelente antígeno, que, inoculado empleando como adyuvante la inmunidad el Adyuvante Completo de Freund, provocó la aparición de anticuerpos mono-específicos contra la α -FP de ratón en el suero de conejos New-Zeland. No observamos reacción cruzada con la albúmina de suero de ratón, lo cual confirma la pureza de las fracciones aisladas y que su determinante antigénico es distinto, a pesar de que algunos fragmentos de albúmina y alfafetoproteína muestran una secuencia de aminoácidos homóloga¹⁶.

A partir del antisuero aislamos la fracción IgG mediante precipitación con sulfato amónico y pase por un lecho de DEAE-SEPHADEX A-50. El método empleado es simple, rápido y a la vez consigue una buena separación de las restantes proteínas séricas.

El sobrenadante obtenido (IgG) tiene un aspecto incoloro, a menos que haya hemólisis, con la consiguiente contaminación por hemoglobina de las IgG; hemoglobina que puede eludirse por cromatografía en columna de Sephadex G-200. Tampoco resulta problemático la posible contaminación por IgA y IgM del sobrenadante: en este sentido, Webb¹⁷ ha señalado la ausencia de IgA y IgM, mediante micro-electroforesis y doble difusión contra anti IgA y anti IgM, tras el pase de suero sanguíneo por una columna de DEAE Sephadex A-50.

TABLA II
Esquema seguido para la obtención de la fracción IgG



Ninguna de las dos etapas del procedimiento de purificación afecta sensiblemente a la actividad inmunógena de los anticuerpos. El inconveniente que plantea la dilución de la IgG (del orden de 1:20) respecto al suero inicial puede paliarse mediante la liofilización del producto final (fracción IgG) y posterior redisolución hasta el volumen deseado.

RESUMEN

Se ha desarrollado un procedimiento ultra rápido para la obtención de la fracción IgG a partir del suero anti-AFP. Con el método se consigue aislar las IgG hasta su homogeneidad electroforética. En una primera etapa, precipitación con sulfato amónico, aún persisten restos de albúmina y transferrinas. Mediante el paso por el gel de Sephadex, estas proteínas contaminantes se absorben, con lo que, finalmente, se obtienen las IgG puras.

PURIFICATION OF IgG-ANTI-ALPHAFETOPROTEIN OF MOUSE SERUM

SUMMARY

IgG antibody activity has been isolated in good yield from rabbit antiserum to mouse alpha-fetoprotein. The method requires the fractionation of serum with 50% ammonium sulphate followed by mixing with DEAE Sphadex A-50 and aspiration of the supernatant (IgG rich fraction). This method is easy and economical on time and materials.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ABELEV, G. I.; ALPERT, E.; HULL, E. W.; MASSEYEFF, R.; DE NECHAUD, B.; TATARINOV, J. S., y URIEL, J. (1970).—Fetospecific serum proteins: Recomendations for a uniform terminology. *Bull. WHO*, **43**: 309-310.
- 2) GITLIN, D., y BOESMAN, M. (1967).—Fetus-specific serum proteins in several mammals and their relation to human-fetoprotein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **21**: 327-336.
- 3) ABELEV, G. I.—Alpha-fetoprotein in ontogenis and its association with malignant tumors. *Adv. Cancer Res.*, **14**: 295-307.
- 4) AUSSEL, C., y MASSEYEFF, R. (1978).—Rat alpha-fetoprotein-estrogen interaction. *J. of Steroid. Biochem.*, **9**: 547-551.
- 5) NÚÑEZ, E.; ENGELMAN, F.; BENASSAYAG, G., y JAYLE, M. F. (1971).—Identification et purification préliminaire de la foetoprotéine liant les oestrogènes dans le sérum de rata nouveaux-nés. *C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **273**: 831-834.
- 6) URIEL, J.; DE NECHAUD, B., y DUPIERS, M. (1972).—Estrogen-binding properties of rat, mouse and man fetospecific serum proteins. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **46**: 1.175-1.180.
- 7) LOWRY, O. H.; ROSSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. (1951).—Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- 8) DAVIS, B. J. (1964).—Disc. electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427.
- 9) WEBER, K., y OSBORN, M. (1969).—The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4.406-4.412.
- 10) OUCHTERLONY, O. (1953).—Antigen-antibody reactions in gels; types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**: 231-240.
- 11) SCHEIDEGGER, J. J. (1955).—Une micro-méthode de l'immunoelectrophorese. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.*, **7**: 103-109.
- 12) BENASSAYAG, C.; VALLETE, G.; CITTANOVA, N.; NÚÑEZ, E., y JAYLE, M. (1975).—Isolation of two forms of rat alpha-fetoprotein and comparison of their binding parameters with estradiol-17B. *Biochem. Biophys. Acta*, **412**: 295-305.

- 13) VERSEE, V., y BAREL, A. O. (1978).—Rat-fetoprotein: Purification, physicochemical characterization, oestrogen-binding properties and chemical modification of the thiol group. *Biochem. J.*, **175**: 73-81.
- 14) LÓPEZ, A., y BURGOS, J. (1977).—Alfa-fetoproteína de líquido amniótico de cerda. *An. Fac. Vet. León*, **23**: 173-183.
- 15) KERCHAERT, J. P.; BAYARD, B., y BISERTE, G. (1979).—Micro-heterogeneity of rat, mouse and human alfa-fetoprotein as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, **576**: 99-108.
- 16) ROUSLAHTI, E., y TERRY, W. D. (1976).—Fetoprotein and serum albumin show sequence homology. *Nature*, **260**: 804-805.
- 17) WEBB, A. J. (1972).—A 30 minute preparative method for isolation of IgG from human serum. *Vox Sang.*, **23**: 279-290.

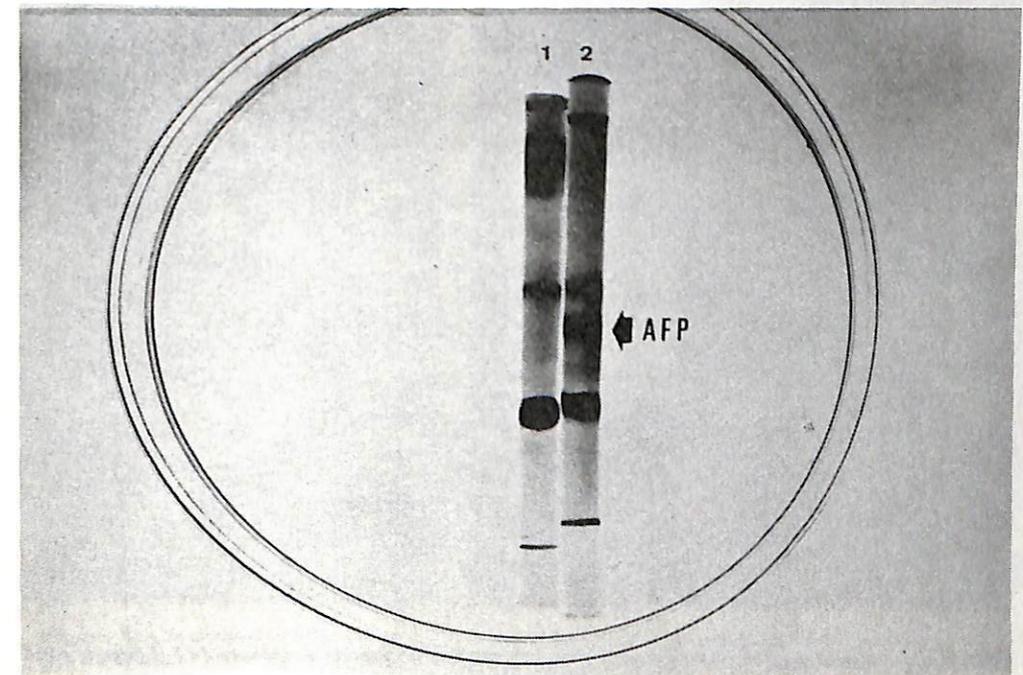


Figura 1.—Electroforesis en gel de acrilamida del suero sanguíneo de ratones adultos (1) y de 1-3 días de edad (2), revelando en estas últimas la presencia de alfa-fetoproteína (afp) (Rbpb = 0.53).

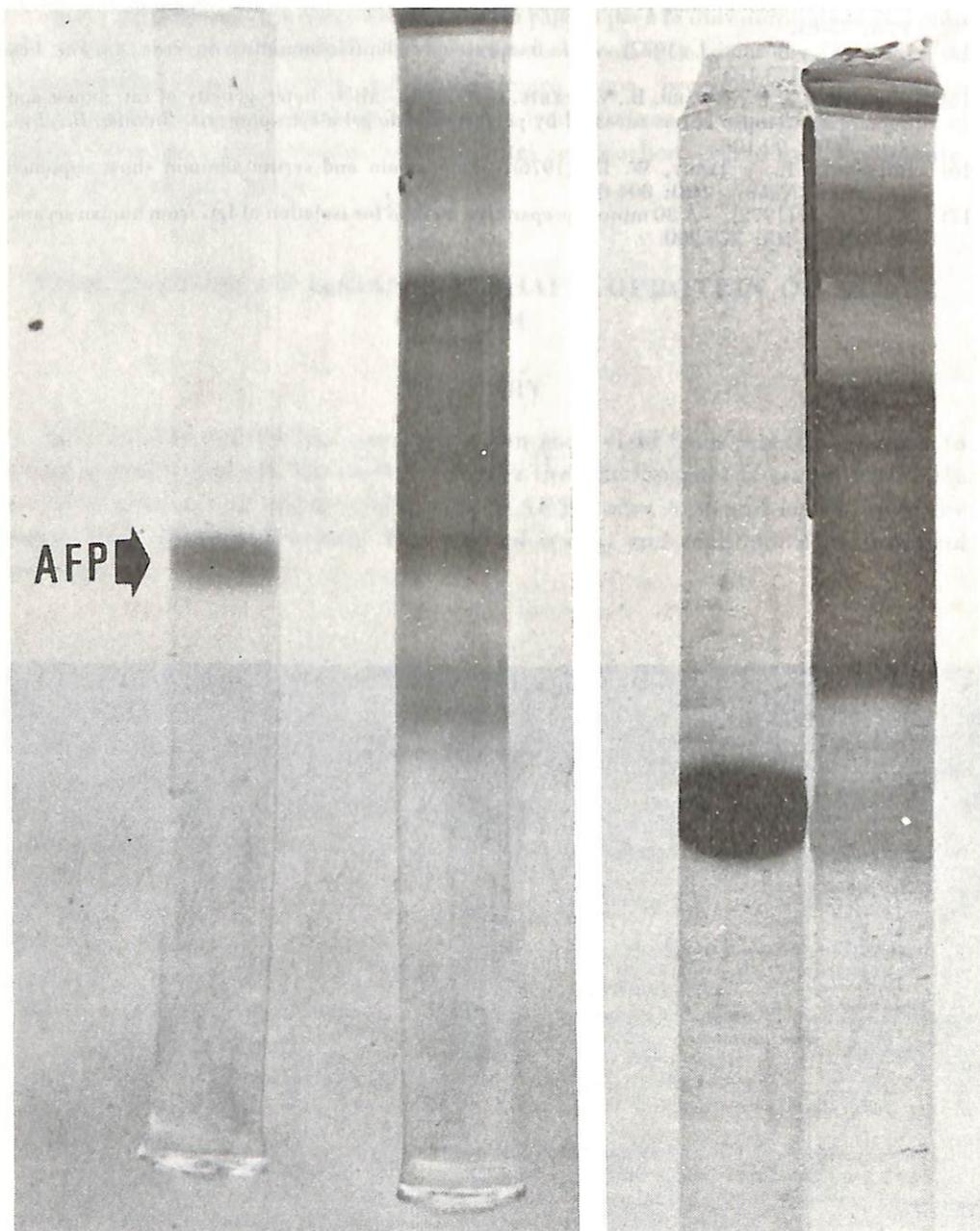


Figura 2.—Electroforesis en gel de acrilamida de suero sanguíneo no fraccionado de ratones de 1-3 días de edad y de α -FP purificada.

Figura 3.—Electroforesis en gel de acrilamida de una muestra de albúmina de suero de ratón purificada por el método descrito y de suero sanguíneo no fraccionado.

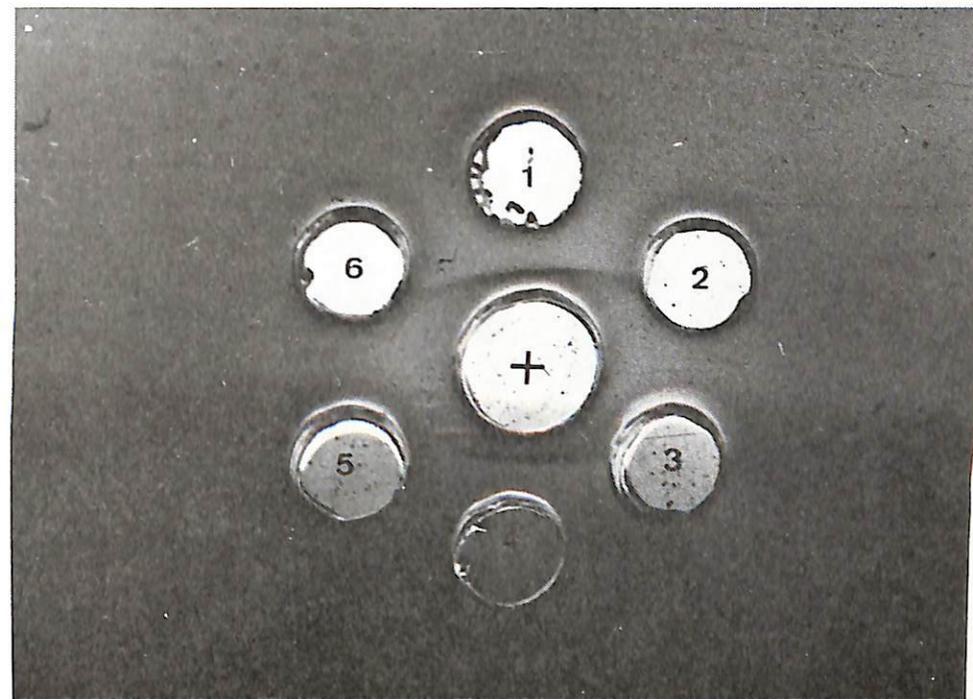


Figura 4.—Prueba de inmunodifusión demostrativa de la especificidad del antisuero obtenido, tras la inmunización de conejos New Zeland con fetoproteína de suero de ratón.

+ Antisuero.

1 AFP de suero de ratón electroforéticamente pura.

4 Suero de ratón de 1-3 días.

2 y 5 Albúmina de suero de ratón electroforéticamente pura.

3 y 6 Suero de ratón adulto (60 días no gestantes).

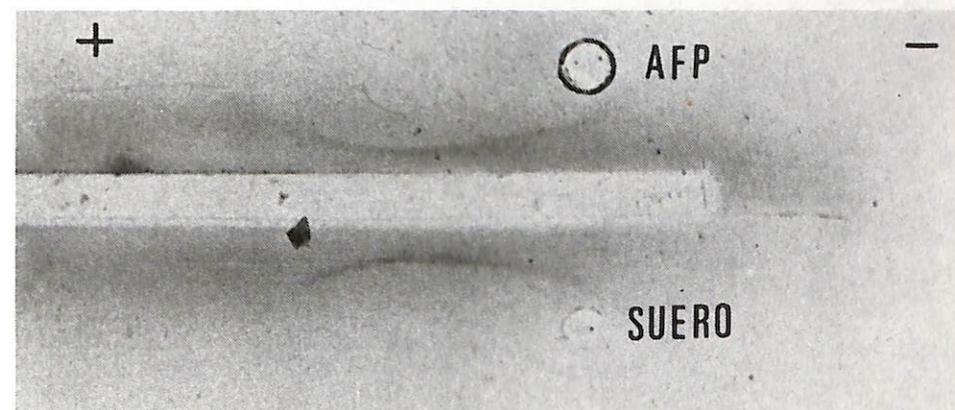


Figura 5.—Inmunolectroforesis para la comprobación de la monoespecificidad del suero anti-AFP. La AFP purificada y el suero de ratones de 1-3 días se depositaron en los pocillos correspondientes y se sometieron a un campo eléctrico de 10 voltios/cm. Una vez finalizada la separación se dejaron difundir las proteínas y el antisuero. Las bandas de precipitación se tiñeron con Coomassie Blue.

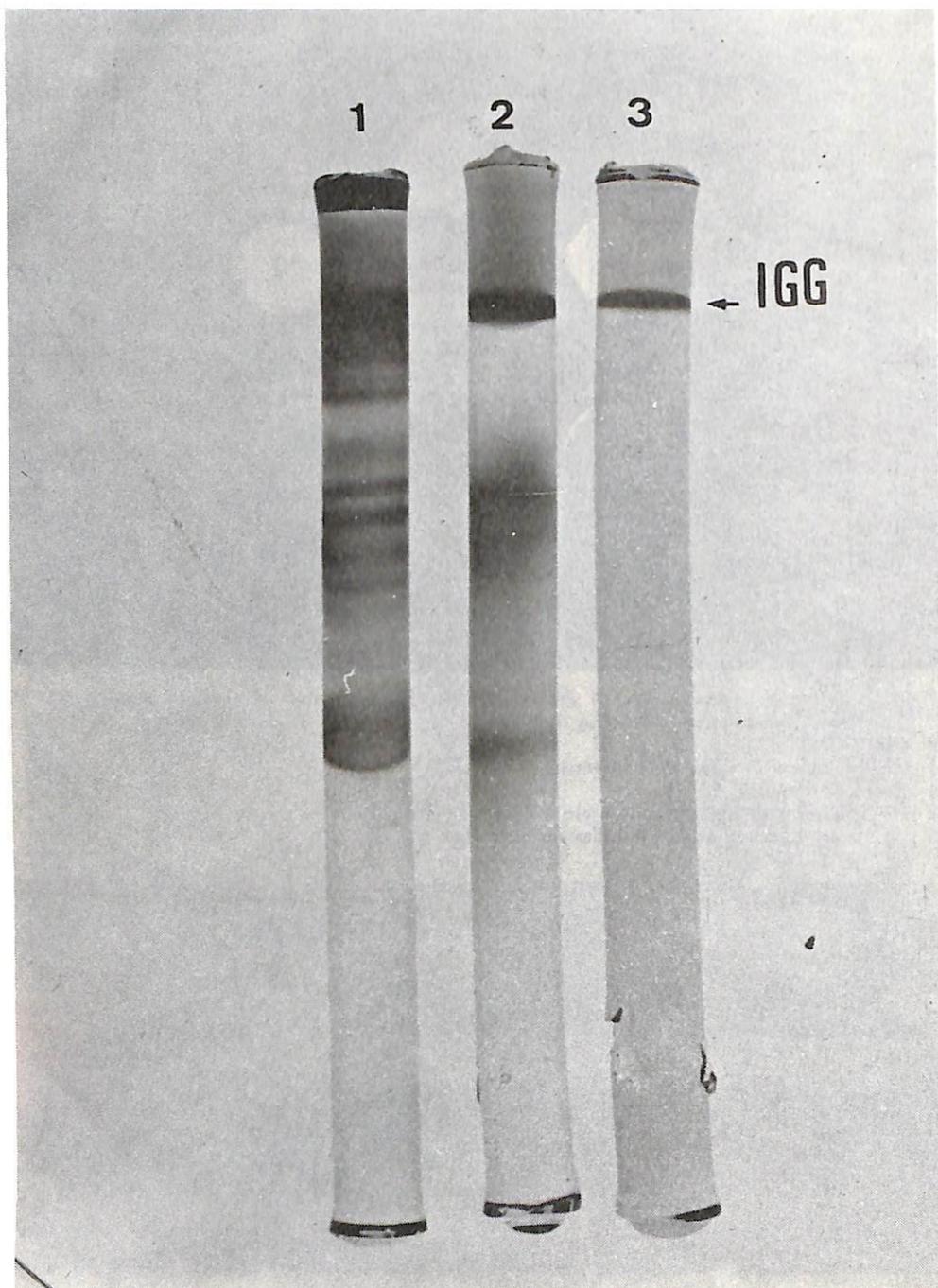


Figura 6.—Estudio electroforético del proceso de purificación de la IgG del suero de conejo inmunizado contra la AFP de suero de ratón.

1. Suero no fraccionado.
2. Precipitado con $\text{SO}_3(\text{NH}_4)_2$; 50% de saturación.
3. Sobrenadante de la mezcla del precipitado con sulfato amónico, redisolto, con DEAE-Sephadex A-50.

EXTRACTOS DE TRABAJOS
PUBLICADOS EN OTRAS
REVISTAS ESPECIALIZADAS