

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOLICLONAIS DE COELHO ATRÁVES DA PRECIPITAÇÃO DO SULFATO DE AMÔNIO

**XAVIER, Marina Amaral^{1,2}; LEAL, Fernanda Munhoz dos Anjos^{1,2}; RIZZI,
Caroline³; COLLARES, Tássia; HARTLEBEN, Cláudia² Pinheiro**

¹Graduação em Biologia, Universidade Federal de Pelotas; ²Laboratório de Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas; ³Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas
xaviermarinaa@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A produção de anticorpos policlonais (pAbs) tem sido de grande valia-
 como inúmeros métodos biológicos em testes de diagnóstico sorológico -
 Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e imunofluorescência. Para a obtenção
 destes anticorpos, métodos biológicos são utilizados. A produção de
 hipocriomas, os quais devem ser purificados separadamente das enzimas
 de fluxo (HARLOW; LANE, 1988).

A precipitação do amônio é uma técnica amplamente utilizada
 para remover proteínas em solução. O método é baseado na precipitação
 das proteínas em solução com a água saturada de glicina, as proteínas
 ficam expostas. Cíons de sulfato de amônio de pesos moleculares e altamente
 carregados, assim, quando são adicionados à solução, a interação
 competitiva com as proteínas a água, removendo as moléculas de água
 da proteína, diminuindo a solubilidade e resultando em precipitação. A
 eficiência na concentração de proteínas varia dependendo da posição
 dos grupos polares, o peso molecular da proteína e o ponto de precipitação
 de anticorpo varia entre as espécies. Anticorpos de coelho podem ser precipitados com
 solução de sulfato de amônio 40%, enquanto que anticorpos de camundongos
 precipitam com concentração de 50%. Dado que a maioria dos componentes
 do soro são precipitados nessa concentração, é mais difícil distinguir
 as concentrações, então 50% de saturação é um nível adequado para a
 maioria dos casos (HEBERT *et al.*, 1973).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de anticorpos
 policlonais de coelho a partir de soro hiperimune para utilização com o sistema
 de imunologia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a precipitação dos anticorpos, uma solução 80% saturada de sulfato
 de amônio foi preparada: 112,2 g de sulfato de amônio em um volume de
 aproximadamente 250 mL de água destilada fervente. A solução foi
 por 48 h para precipitação de células de coelho (500 mL) foi preparado
 principalmente através de centrifugação a 3.000 rpm a 4 °C para retirada
 de catálise, seguido da adição de 15 mL de 1M (solução total). Uma
 parte do sobrenadante resultante da precipitação (25 mL) foi

vagarosamente adicionada ao soro, sob agitação. Após uma hora a agitação a solução foi filtrada durante 20 min a 10.000 x g a 4 °C foi recolhido o sobrenadante ao qual foi adicionado 96 mL da solução de amônio, sob agitação com constante. A solução foi novamente centrifugada por 20 min a 10.000 x g a 4 °C. O pellet ressuspenso em 50 mL de tampão 0,02 M (PBS).

A presença de anticorpos foi analisada por SDS-PAGE 12%, nos pellets da primeira e segunda centrifugação dos sobrenadantes (JIANG *et al.*, 2004). A solução contendo o soro foi submetida a 16 h de diálise em PBS a 4 °C após a diálise os anticorpos foram concentrados utilizando polietileno glicol 20 kDa (PEG). A solução de anticorpos foi por adsorção em uma Paratall, diluição de 1:100, 1:250 e 1:500 da solução foi feita em primeira em espectrofotômetro a solução contendo o anticorpo foi filtrada em membranas filtrantes de 0,8 µm e 0,22 µm e estocada a -20 °C. A pureza e concentração final dos produtos foram avaliadas por SDS-PAGE 12% e 15%, nas diluições de 1:20, 1:60 e 1:100 e por espectrofotometria a 280 nm nas diluições 1:250 e 1:500.

A atividade biológica dos anticorpos foi avaliada diretamente/indireto e in vitro e in situ (IFI). Para tal, o pAb foi adsorvido em placas de poliestireno nas concentrações de 10, 200, 400 e 800 ng por placa e detectado através de conjugado anti-espécie e espécie (peroxidase conjugate SIGMA) em ELISA direto; utilizado como anticorpo em ELISA indireto contra seu antígeno específico adsorvido em placas de poliestireno; e IFI contra o antígeno nativo presente em látex de *Spirulina*. Soro normal de coelho e os conjugados anti-espécie e bovínia, ovina e humana foram utilizados como controles.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A precipitação do soro foi efetiva a uma velocidade de 10.000 x g, após centrifugação, de tamanho esperado de 25 e 50 kDa, correspondendo as cadeias leves e pesadas das Imunoglobulinas G (Fig. 1). A concentração de anticorpo obtida foi de 40 mg/mL.

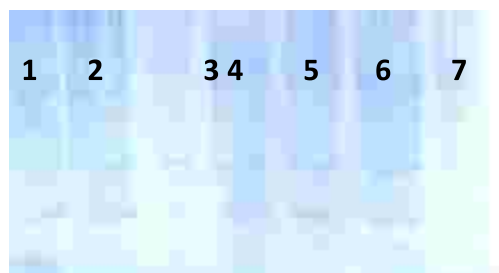


Figura 1 - Avaliação da purificação de anticorpos de coelho por SDS-PAGE 12%. Colunas 1 a 7. pellets das frações

O pAb foi reconhecido pelo conjugado anti espécie em ELISA direta e manteve a capacidade de reconhecer o antígeno gerado, reconhecendo o antígeno rLipL32 em ELISA indireto (Fig. 2) e detectando o antígeno proteico em suco de *Aspergillus* patogênico.

Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de amostragem que pode ser realizada com rapidez e sem comprometer a atividade biológica (JIANG et al., 2004). Os próximos experimentos previstos são a otimização deste sistema de precipitação por sulfato de amônio.

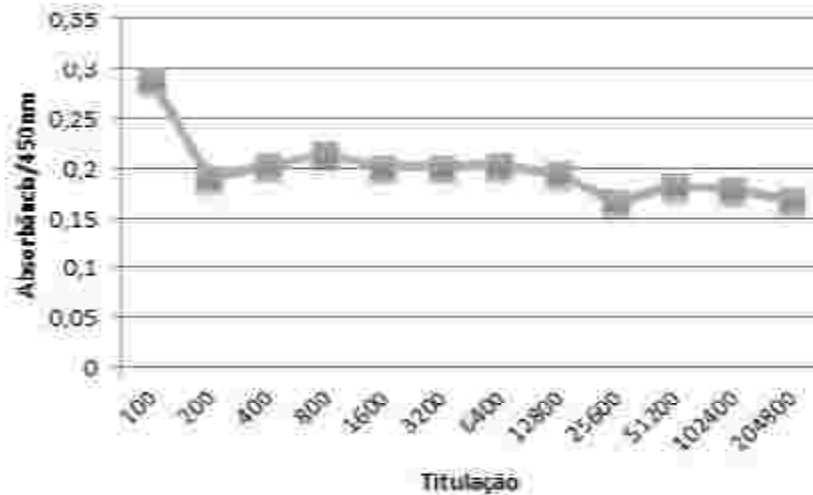


Figura 2 - Avaliação da atividade biológica de anticorpo policlonal (pAb) precipitado por sulfato de amônio através de ELISA indireto. Titulação contra antígeno A (esp. *Escherichia coli* O157:H7).

4 CONCLUSÃO

A produção de anticorpos a partir de soros hiperimunes pode ser realizada eficientemente por precipitação com sulfato de amônio.

5 REFERÊNCIAS

HARLOW, E. D.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

HEBERT, G. Ann; PELHAM, Patricia L.; PITTMAN, Bertie. Determination of the Optimal Ammonium Sulfate Concentration for the Fractionation of Rabbit, Sheep, Horse, and Goat Antisera. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 26-36, 1973.

JIANG, Lei; HE, Lin; FOUNTOULAKIS, Michael. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1023, p. 317-320, 2004.