

Artículos sobre Técnicas

Sustrato de peroxidasa para revelado de conjugado de fosfatasa alcalina en ensayo tipo ELISA

A.J. OTERO,¹ B. RODRÍGUEZ,² I. RODRÍGUEZ² y C. PASCUAL²

¹ Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", Subdirección de Microbiología, Apartado 601, Zona Postal 13, Ciudad de La Habana, Cuba

² Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC), Ave. 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado 6880, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1989

Aprobado en abril de 1990

RESUMEN

Se describe un método en el cual un ensayo de tipo ELISA, que utiliza un conjugado de fosfatasa alcalina, puede ser revelado con un sustrato tradicional de la enzima peroxidasa como el ABTS. Se presenta una comparación con el 4-nitrofenil fosfato desarrollado como la clásica alternativa colorimétrica para la fosfatasa alcalina. Se sugiere que pueden ser introducidas nuevas aplicaciones potenciales relacionadas con los sistemas de peroxidasa a conjugados que incluyen a la enzima fosfatasa alcalina.

SUMMARY

A method is described whereby an enzyme linked immunosorbent assays using alkaline phosphatase conjugate can be revealed with a traditional peroxidase substrates as ABTS. A comparison is made with 4 nitrophenyl phosphate developing as classic colorimetric alternative for such conjugate. It is suggested that new potential applications related with peroxidase systems can be applied with alkaline phosphatase conjugates.

INTRODUCCION

Los ensayos de enzima ligada a inmunoabsorbente (ELISA) (Engvall y Perlman, 1971; Voller y Bidwell, 1980) están incluidos entre los más utilizados para el pesquiasaje de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975).

Generalmente estos ensayos involucran a las enzimas peroxidasa y fosfatasa alcalina en los conjugados con anticuerpos específicos. Los conjugados de peroxidasa han sido seleccionados muchas veces por su claramente perceptible reacción coloreada, utilizando el sustrato peróxido de hidrógeno y cromógenos como el ortofenilendiamina (OPD) 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina sulfonato] (ABTS®), 4-cloro-1-naftol y otros, principalmente en ensayos de umbral como los empleados en la detección de infección viral primaria y pesquiasaje de anticuerpos monoclonales.

Por otra parte, los conjugados de fosfatasa alcalina permiten el uso de métodos de inmunoensayo fluorescentes muy eficientes (Otero *et al.*, 1984) o han sido introducidos en ciclos amplificados de

detección colorimétricos, en los cuales se involucran otras enzimas que finalmente son acopladas a la reducción de una sal de tetrazolium (Downs *et al.*, 1988).

Actualmente la selección de uno u otro conjugado es muchas veces una cuestión circunstancial, a menos de que se impongan requerimientos técnicos imposibles de obviar, como en el caso de la detección de monoclonales relacionados con material vegetal, donde la peroxidasa endógena frecuentemente influye en el desarrollo del color, cuando se utilizan conjugados de peroxidasa.

En este artículo se describe un método en el cual es posible, si se desea o se requiere por alguna causa particular, utilizar un sustrato de peroxidasa como el ABTS en un ensayo tipo ELISA con un conjugado de fosfatasa alcalina. Este procedimiento es una alternativa para la clásica detección colorimétrica con 4-nitrofenil fosfato, que se caracteriza por colores menos intensos sobre todo en concentraciones bajas. El procedimiento propuesto está ilustrado en un ensayo para detectar anticuerpos monoclonales, contra antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

MATERIALES Y METODOS

Antígeno

El antígeno de superficie contra la hepatitis B (HBsAg) subtipo "adw" se purificó a partir de suero humano positivo a esta entidad (título por contrainmuno-electroforesis 1:32) mediante inmunoafinidad, utilizando un antisuero policlonal mono-específico de carnero, unido a una matriz de AH-Sepharose 4B, lavada con solución tamponada de fosfatos, pH 7,4 (PBS), siendo eluido el ligando con tampón glicina 0,2 M, pH 2,9 y dializado exhaustivamente contra PBS. La pureza de este antígeno fue evaluada en la Planta Piloto del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, en gel de poliacrilamida 12,5 % con dodecil sulfato de sodio (SDS), con tinción de plata y en gel de poliacrilamida

7,5 % sin SDS teñido en Coomassie Blue R250, no encontrándose contaminación apreciable. Con este material se preparó un patrón secundario tomando como referencia la norma de la OMS de 100 ng/ml (Alerm *et al.*, 1986).

Animales de inmunización

Se inyectaron peritonealmente ratones BALB/c hembras (Jackson), de 4-6 con 20 μ g (0,5 ml) de HBsAg (adw) emulsificado en adyuvante completo de Freund. Dos semanas después, los ratones recibieron una segunda inyección intraperitoneal de 20 μ g de antígeno. Esta operación se repitió hasta que los animales lograron un título en ELISA indirecto para anticuerpos de ratón de 1:10 000, contra el suero de animales vírgenes. Se cosecharon entonces las células esplénicas de los animales apropiados 3-4 días después de la última inmunización.

Medio de cultivo

Se escogió RPMI 1640 (GIBCO Europe) suplementado con gentamicina (40 mg/l), doble sistema tampón consistente en Heps [ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina etanosulfónico], 18 mM/l y bicarbonato de sodio 17 mM/l, β -mercaptoetanol (0,05 mM/l), L-glutamina (2 mM/l) y suero fetal bovino (SFB) 20 %.

Células esplénicas

Se preparó una suspensión de esplenocitos, removiéndolas por perfusión de dos bazos con una aguja #18 y jeringuilla de 10 mililitros. Se lavaron las células tres veces por centrifugación (300xg) en medio RPMI que contenía SFB al 20 %, con excepción del último lavado.

Producción de hibridomas

De acuerdo, básicamente, con el método descrito por Otero *et al.*, 1984.

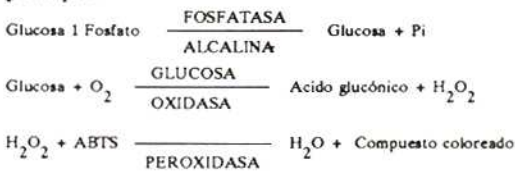
Purificación del anticuerpo monoclonal que reconoce HBsAg (adw)

Uno de los monoclonales anti HBsAg secretado por el hibridoma 1C4G9 e identificado como IGg₁ (ELISA para clase y subclase; Otero y Kennet, 1984) fue purificado partiendo de líquido ascítico, mediante cromatografía de intercambio iónico en una matriz de DEAE Shephacel, equilibrada en tampón fosfato de sodio 10 mM/l. La muestra fue diluida 1:2 y aplicada en el mismo tampón. El ligando fue eluido en un

gradiente lineal de cloruro de sodio (0-400 mM/l) y fraccionado en tres picos, uno de los cuales mostró toda la actividad anti HBsAg "adw" (Otero *et al.*, 1987). La pureza de la preparación fue evaluada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, conteniendo SDS la muestra reducida con β -mercaptoetanol y el gel teñido en Coomassie Blue R250 (Haas y Kennett, 1980), después de lo cual se encontraron solamente dos bandas correspondientes a las cadenas separadas (Otero *et al.*, 1989). La concentración de la fracción de anticuerpo con actividad anti HBsAg fue estimada a partir de la extinción molar para la IgG de ratón purificada.

Inmunoensayo para la detección de los anticuerpos monoclonales

Se diseñó un ensayo de tipo ELISA heterogéneo indirecto como el que se detalla: Como fase sólida se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (NUNC), recubiertas con 100 μ l (10 μ g/ml) de HBsAg (adw) en tampón carbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6 durante 2 h a 37°C. Después de dos lavados [en todos los casos la solución de lavado fue tampón PBS, conteniendo Tween-20 0,05 %, (PBS-T20)], se añadió una solución bloqueadora consistente en PBS más SFB al 4 %. La placa fue entonces lavada cuatro veces y se añadieron 100 μ l de solución de anticuerpo monoclonal, incubándose durante 2 h a 37°C. Se lavó entonces la placa cuatro veces, después de la adición de 100 μ l de conjugado antinmuglobulina de ratón (cadena completa) -fosfatasa alcalina (conejo) (SIGMA 1902), diluido 1:1000 en PBS-T20 por 2 h a temperatura ambiente (TA). La placa fue lavada finalmente seis veces antes de recibir la solución de sustrato. El método de sustrato de peroxidasa para fosfatasa alcalina que se propone en este trabajo está basado en el siguiente principio:



Fue desarrollado en la siguiente secuencia: cada pocillo recibió 100 μ l de glucosa-1-fosfato (G1P) 0,02 mM/l en tampón dietanolamina 10 % pH 9,8 conteniendo 0,5 mM/l MgCl₂ y la placa incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron entonces 10 μ l de HCl 0,54 N a cada pocillo e inmediatamente 100 μ l de solución de ABTS, 30 mg/ml (tomado del kit GOD PERID,

Boehringer Mannheim, para la determinación de glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano picante). A los diez minutos la reacción fue detenida con 40 μ l de ácido sulfúrico 2,5 M/l y la placa sometida a un lector de microplacas MULTISKAN MCC/340, para determinar la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 620 nm.

Este método propuesto fue comparado en la misma placa con el método colorimétrico convencional para la fosfatasa alcalina, que consistió brevemente en lo siguiente: a cada pocillo se le añadió 200 μ l de solución de 4-nitrofenil fosfato (4NFF) (1 mg/ml) en tampón dietanolamina (10 %), pH 9,8; diez minutos después la reacción se detuvo añadiendo 50 μ l de hidróxido de sodio 1 eqq/l y después se determinó la densidad óptica a 405 nanómetros. Cada curva de calibración fue sometida a una regresión polinomial (Paquete Estadístico Sistema SAS).

El establecimiento de una asociación estadísticamente significativa entre los dos sistemas de revelado se realizó mediante la prueba de significación de la correlación. Se utilizó entonces el error estándar del coeficiente de correlación y la H₀: ρ = 0 se contrastó en una prueba "t" con (n-2) grados de libertad.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las figuras 1 y 2 se muestran las curvas de calibración para las diferentes concentraciones del monoclonal purificado IgG1 que reconoce al HBsAg adw (desde 14 ng/ml hasta 898 ng/ml), utilizando el sustrato 4NFF y el intercambiador electrónico ABTS respectivamente. El análisis de varianza de clasificación simple para los datos de cada sistema sustrato demostró un coeficiente de variación de 2,43 % para el 4NFF y 2,41 % para el ABTS en el cual se usaron valores triplicados para cada punto de la curva. Se observa claramente una mayor pendiente en el comportamiento polinomial entre 14 y 224 ng/ml en el caso del 4NFF, indicando más sensibilidad para interpolaciones en este rango con respecto al ABTS (téngase en cuenta que las escalas de densidades ópticas son diferentes, pero

las longitudes de onda de lectura para cada sistema también lo son).

Por otra parte, las sensibilidades de ambos métodos en términos de cantidad

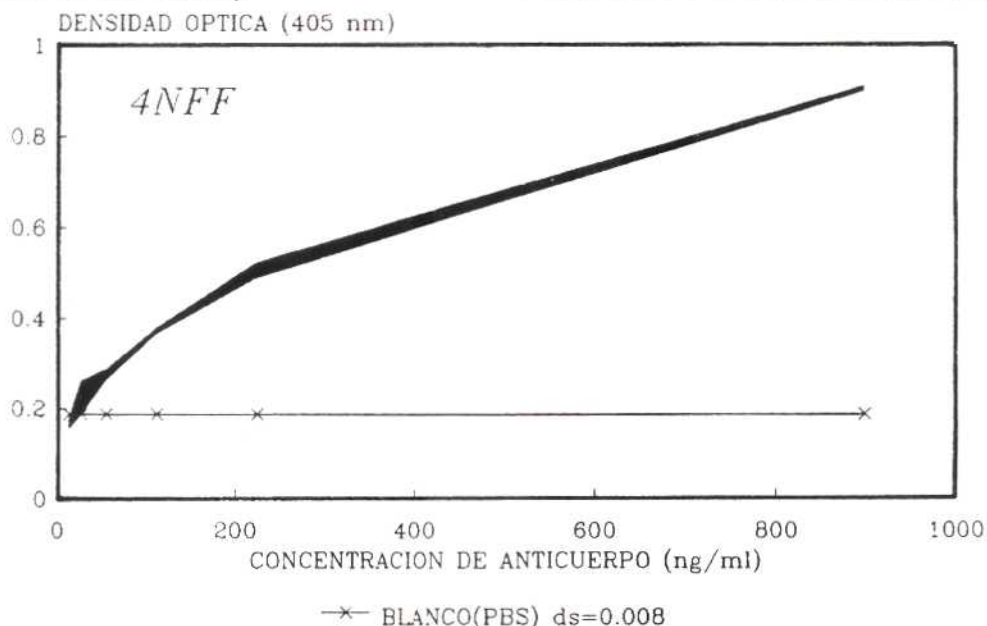


FIG. 1. Curva de calibración (ELISA indirecto) para la detección del anticuerpo monoclonal anti HBsAg purificado utilizando 4-nitro fenilfosfato como sustrato para un conjugado de fosfatasa alcalina. El área sombreada indica los límites de la desviación estándar (ds) para cada punto.

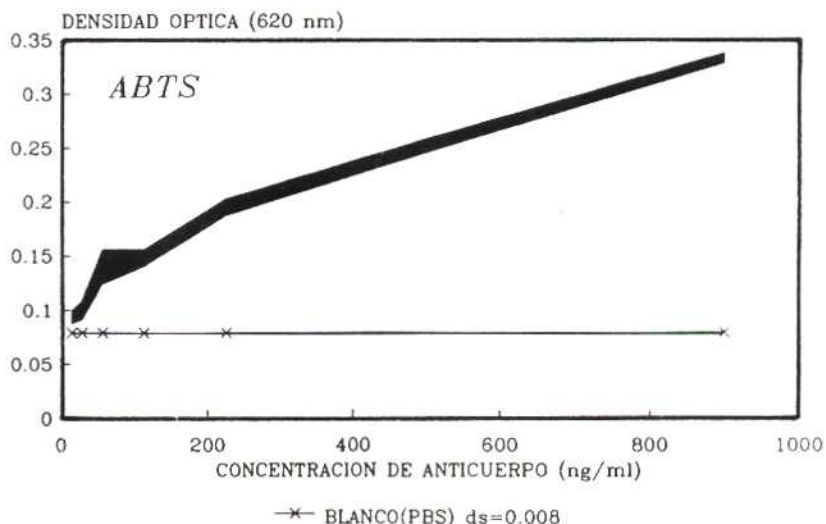


FIG. 2. Curva de calibración (ELISA indirecto) para la detección del anticuerpo monoclonal anti HBsAg purificado utilizando ABTS como intercambiador electrónico acoplado a peroxidasa para un conjugado de fosfatasa alcalina. El área sombreada indica los límites de la desviación estándar (ds) para cada punto.

mínima detectada de acuerdo con el criterio de dos desviaciones estándar (2ds), calculadas por interpolación en una regresión polinomial sobre los valores de los blancos fueron para el ABTS 950 pg/ml de anticuerpo ($r^2 = 0,9810$), y para el 4NFF de 21,5 ng/ml ($r^2 = 0,9930$). El análisis de correlación como medida de la asociación del comportamiento de ambos sistemas sustrato en función independiente de la concentración de anticuerpo, indicó que es posible rechazar la hipótesis nula $H_0 \rho = 0$ con una probabilidad de error $P < 0,05$ y un coeficiente de correlación de $r = 0,98502$. Los valores críticos r_c para una y dos colas en la tabla de significación del coeficiente de correlación fueron 0,40096 y 0,46696, respectivamente. La figura 3 muestra el diagrama de dispersión de los valores de ambas curvas de calibración para los dos sistemas desarrolladores de color, partiendo de valores triplicados de densidad óptica para cada concentración de anticuerpo.

Una de las ventajas del método propuesto, además de su mayor sensibilidad en la zona baja de la curva, radica en el hecho de que es posible utilizar el sistema de reveladores de la peroxidasa sin que la presencia de peroxidasa endógena pueda interferir, como en el caso de la utilización de materia vegetal en forma de extracto crudo en alguna fase del inmunoensayo, pues en este caso la densidad óptica obtenida a partir de la intensidad del color no depende de la concentración o cantidad de peroxidasa retenida en forma de conjugado, sino de la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en el ciclo que dependerá de la cantidad de fosfatasa alcalina retenida como conjugado en el pocillo en un tiempo determinado. Otra ventaja radica en la estabilidad del color después de desarrollado con respecto al tiempo durante las cinco primeras horas después del revelado, sin cambio significativo en la intensidad de los blancos

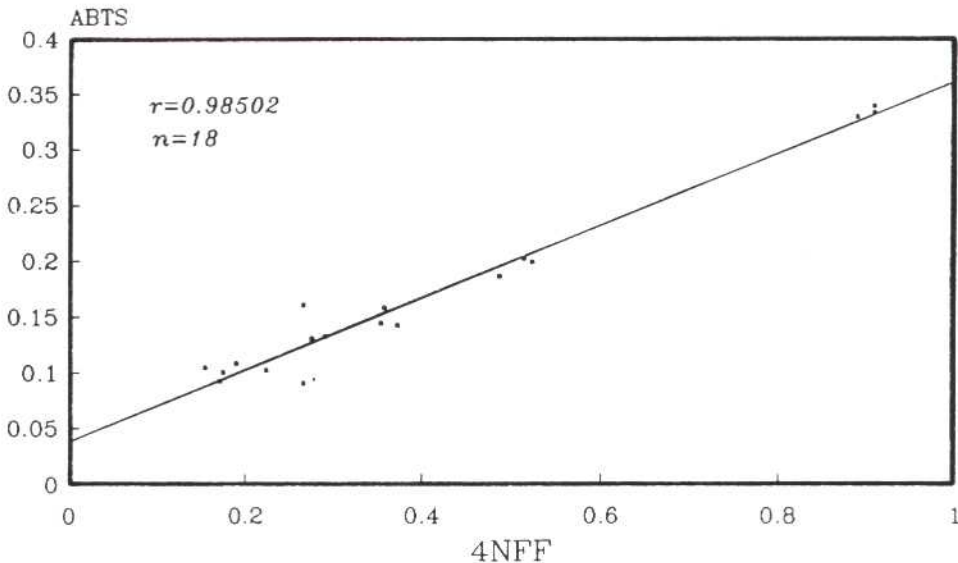


FIG. 3. Correlación entre las curvas de calibración (ELISA indirecto) utilizando 4-nitro fenilfosfato y ABTS para un conjugado de fosfatasa alcalina. $H_1: \rho \neq 0, P < 0,05$.

que mantienen un nivel muy bajo de densidad óptica.

La tabla 1 muestra resumidamente los parámetros de calidad de ambos sistemas.

A partir de estas consideraciones pudiera ser posible que este método trascienda a una simple detección de anticuerpos monoclonales, y pueda

Tabla 1
PARAMETROS DE CALIDAD

	4NPP	ABTS
Precisión (C.V. %)	2,43	2,41
Sensibilidad (2D.S., pg/ml)	21 500	950
Desarrollo del color (minutos)	10	10
Estabilidad del color (horas)	0,5	5,0
Correlación (r) H ₁ : $\rho \neq 0$, $P < 0,05$	0,98502	

Por otra parte, la conexión entre la fosfatasa alcalina y un sustrato de peroxidasa permite, además, la incursión en métodos luminiscentes en los cuales puede llegarse a sensibilidades extraordinarias detectadas, tanto en luminómetros de fotodiodos como en sistemas de placas hipersensibles, como la Polaroid instantánea (blanco y negro) tipo 612 (Bronstein y McGrath, 1989).

En este sentido, la fosfatasa alcalina está cobrando cada día más importancia y ya se ha descrito un sustrato luminiscente con el que se obtienen magníficas sensibilidades, pero que todavía parece difícil de obtener pues es un fosfato de adamantil 1-2 dioxetano (AMPPD) que después de defosforilado origina un ion inestable que se descompone espontáneamente en adamantona, y el ion metil-metaoxibenzoato capaz de emitir eficientemente cuantos de luz detectables en fase acuosa (Voyta et al., 1988).

insertarse como una aplicación en sistemas de señal amplificada mucho más sofisticados a partir de conjugados con fosfatasa alcalina.

REFERENCIAS

- ALERM, A.; A. CADIZ; A.M. TORRES; M.V. HERNANDEZ; M. ARAÑA; A. SALGADO; J.A. MALBERTY; R. BLANCO; C. SANTIZO; N. FERNANDEZ y A. GONZALEZ (1986). Purificación de antígeno de superficie de la hepatitis B mediante cromatografía de intercambio iónico y de afinidad. *Libro de resúmenes. II Seminario Cubano sobre Interferón y I Seminario Cubano sobre Biotecnología*. La Habana, Cuba, págs. 06-232.
- BRONSTEIN, I. y P. McGRATH (1989). Chemiluminescence lights up. *Nature* **338**: 599-600.
- ENGVALL, E. y P. PERLMAN (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochem.* **8**: 874-879.

- DOWNS, M.E.A.; P.J. WERNER; A.F.P. TURNER y C. FOTHERGILL (1988). Optical and electrochemical detection of DNA. *Biomaterials*. 9: 66-70.
- HAAS, J.B. and R.H. KENNET (1980). "Characterization of hybridoma immunoglobulins by sodium dodecil sulphate poliacrylamide gel electrophoresis". In: *Monoclonal Antibodies. Hybridomas: a new dimension in Biological Analysis*. Kennett, R.H; McKearn, T.J. and Bechtold, K.B. (eds.) Plenum Press, New York and London, pp. 407-411.
- KÖHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-496.
- OTERO, A.J. and R.H. KENNET (1984). "ELISA for Immunoglobulin subclass determination". En *Monoclonal antibodies and Functional cell lines. Progress and applications*. Kennett, R.H.; Bechtold, K.B. and McKearn, T.J. (eds) Plenum Press, New York, pp. 374-376.
- OTERO A.J.; I. RODRIGUEZ y B.L. RODRIGUEZ (1989). Inmunoensayo potenciométrico de enzima ligada (IPELI) para la detección del subtipo "ad" del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). *Interferón y Biotecnología*. 6(3): 299-302.
- OTERO, A.J.; I. RODRIGUEZ y B.L. RODRIGUEZ (1987). Mouse monoclonal antibodies against hepatitis B surface antigen (HBsAg). A micro ELISA for "ad-ay" classification of HBsAg in serum. *Libro de resúmenes. I Taller y Curso Internacional sobre la Tecnología de Anticuerpos Monoclonales. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba*.
- OTERO, A.J.; J. SARRACENT; J.L. FERNANDEZ YERO e I. RODRIGUEZ (1984). A 10 microliter ultramicro ELISA for detection of monoclonal antibodies against alpha-fetoprotein. *Hybridoma*. 3: 391-396.
- VOLLER, A. y D. BIDWELL (1980). *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. vol. I, pp. 7-59. Micro Systems Ltd. Summerfield House, Vale Guernsey.
- VOYTA, J.C.; B. EDWARDS e I. BRONSTEIN (1988). Ultrasensitive chemiluminescence detection of alkaline phosphatase activity. *Clin. Chem.* 34: 1157-1160.