OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL MARCADO CON ORO COLOIDAL

Yolanda Rojas, Viviana Falcón, Martha Legrá y Carlos Santizo.

División de Inmunotecnología y Diagnóstico.Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado 6162, La Habana 6, C.P.10600 Cuba.

Recibido en noviembre de 1993. Aprobado en junio de 1994.

Key words: gold, conjugated Mabs, HBsAg

SUMMARY

Here we describe an approach for the preparation and partial characterization of a gold labeled monoclonal antibody. The size and morphology of the conjugated where determined through transmission electron microscopy where the conjugated particle showed an average diameter of 15.56 nm. The best stabilizator was bovine serum albumin. The conjugate's biological activity was checked by Western blot against the Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) and also by the visualization of gold particles in the endoplasmatic reticulum of the hepatocyte cells isolated from monkeys infected with the Hepatitis B virus.

RESUMEN

En este trabajo nosotros describimos la preparación y caracterización parcial de un anticuerpo monoclonal marcado con oro coloidal. El tamaño y la morfología del conjugado se determinaron por microscopía electrónica de transmisión, siendo el diámetro promedio de la partícula conjugada 15.56 nm. El mejor estabilizador fue la albúmina de suero bovino. La actividad biológica del conjugado se chequeó por Western blot contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B (AgsHB) y por la visualización de partículas de oro en el retículo endoplásmico de hepatocitos de monos infectados por el virus.

INTRODUCCION

La primera observación al microscopio electrónico sobre la naturaleza metálica del oro coloidal fue llevada a cabo por Thiessen en el año 1942.

En 1939 Kausche y Ruska investigaron la morfología de la adsorción de proteínas al oro coloidal, donde mostraron microfotografías electrónicas del virus del mosaico del tabaco marcado con partículas de oro, pero fue en 1971 cuando Faulk y Taylor presentaron un método inmunocoloidal para ser utilizado en microscopía electrónica; ellos marcaron anticuerpos anti-salmonella para ser empleados en un marcaje específico a la superficie de la bacteria, desde entonces una gran variedad de ligandos tales como inmunoglobulinas, lectinas, toxinas, y proteína A, entre otros, han sido utilizados en la formación de complejos con oro coloidal para diferentes fines (1, 2).

En el presente estudio nosotros describimos la obtención y caracterización de un anticuerpo monoclonal marcado con oro coloidal.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal, específico para el AgsHB fue donado por la División de Inmunotecnología y Diagnósticos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Ciudad de la Habana.

La solución de anticuerpos purificada se dializó durante toda la noche en una solución de cloruro de sodio 5 mM.

Coloide de oro

El oro coloidal (1000 mL) se preparó por reducción controlada; a una solución de ácido tetracloroaurico al 0.01% se le adicionaron después de ebullición 40 mL de citrato trisódico 1%.

La cristalería se lavó y siliconizó cuidadosamente antes de su uso. La solución de cada uno de los reactivos se preparó con agua bidestilada y se filtró por 0.2 µm.

Preparación del conjugado AcM-oro

El pH del coloide se ajustó a 7.2 con carbonato de potasio 0.2 M y se le adicionó la solución de anticuerpos, quedando a una concentración final de oro coloidal de 0.0033 µg/mL según el cálculo de la estabilización de las partículas a diferentes concentraciones de la proteína (3, 4). Después de 10 min en reposo a temperatura ambiente, el conjugado se estabilizó con albúmina de suero bovino (ASB) o polietilenglicol (PEG). Si se empleó ASB para su estabilización, se le adicionó una solución de ASB al 10% para que quedara a una concentración final de 1%. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 45400 *xg*, 1 h, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en una solución tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2, ASB al 1%. El conjugado se guardó a 4°C (A_{520}= 1). Para el caso de la estabilización con PEG, se le adicionó una solución que contiene PEG al 1%, quedando a una concentración final de 0.02%, después de centrifugado, el pellet se resuspendió en una solución tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, PEG al 0.02%, y se guardó a 4°C (A_{520}= 1).

Cálculo del diámetro de partículas

El diámetro de las partículas conjugadas se determinó por microscopía electrónica de trasmisión, mediante tinción negativa sobre rejillas de cobre (200 mesh) recubiertas con membranas de

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

formvar-carbón (Evaporador Jeol-JEE-4X, Japón), previamente desionizadas antes de su empleo (Jeol- Ion Sputter-JFC-1100, Japón).

La observación de las muestras se realizó con el microscopio Electrónico de Transmisión (MET) (Jeol JEM 2000 EX, Japón) con una aceleración de voltaje de 80-100 KV y magnificación entre 50 000 y 100 000 X.

Para el análisis de los resultados se utilizaron las microfotografías tomadas en cuadros aleatorios de la rejilla.

Inmunocitoquímica empleando AcM-oro

Las muestras de hepatocitos de chimpancés infectados con el virus de la hepatitis B se fijaron con glutaraldehído 3.2% y se mantuvieron en tetróxido de osmio al 1% durante 1 h, posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en resina Araldita. Después de cortadas, se incubaron con el AcM-oro durante 20 min. Los cortes ultrafinos se examinaron en el MET.

Western blot

La corrida electroforética del AgsHB se realizó en un gel de poliacrilamida al 12.5% conteniendo SDS y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa según el procedimiento establecido (5). Después de bloqueada la membrana se lavó con PBS y se incubó con el conjugado AcM-oro hasta que apareció la señal.

RESULTADOS Y DISCUSION

Nosotros hicimos el marcaje del anticuerpo monoclonal con oro a pH 7.2 (3, 4). Este proceso es un fenómeno complejo poco conocido que depende de muchos factores para su estabilidad, como son la concentración, conformación, y punto isoeléctrico del anticuerpo; así como de la fuerza iónica, pH, y temperatura del medio de suspensión (4, 6).

La microscopía electrónica de transmisión se empleó para determinar el tamaño de la partícula, pero la misma no nos brinda información sobre el diámetro real, que varía después de la adsorción del anticuerpo a su superficie, el cual se incrementa hasta alrededor de 30 nm teniendo en cuenta que el tamaño de una molécula de anticuerpo es alrededor de 15 nm (7).

El diámetro promedio, determinado por microscopía electrónica de transmisión, de las partículas conjugadas y estabilizadas con ASB fue 15.56± 2.02 (n= 100), coeficiente de variación 13.025. Se observó además que el conjugado AcM-oro estabilizado con ASB es más homogéneo que el AcM-oro estabilizado con PEG, encontrándose que las partículas estabilizadas con ASB tienen una morfología esférica y no se encuentran formando agregados, mientras que las estabilizadas con PEG contienen formas pleomórficas y agregadas.

El AcM-oro estabilizado con ASB fue estable al menos 8 meses, mientras que el conjugado AcM-oro estabilizado con PEG fue estable solamente 1 semana. La estabilización del conjugado es necesaria de esa forma para minimizar la formación de agregados y aumentar su estabilidad, ya que las partículas no conjugadas o que tengan sitios libres a los cuales no se han unido moléculas de anticuerpos pueden permanecer después del lavado en el conjugado y causar formación de agregados (8, 9). La obtención de conjugados AcM-oro estables tiene ventajas, sobre

Fig. 1. Western blot del antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante, donde se observan las formas monomérica y dimérica de dicho antígeno.

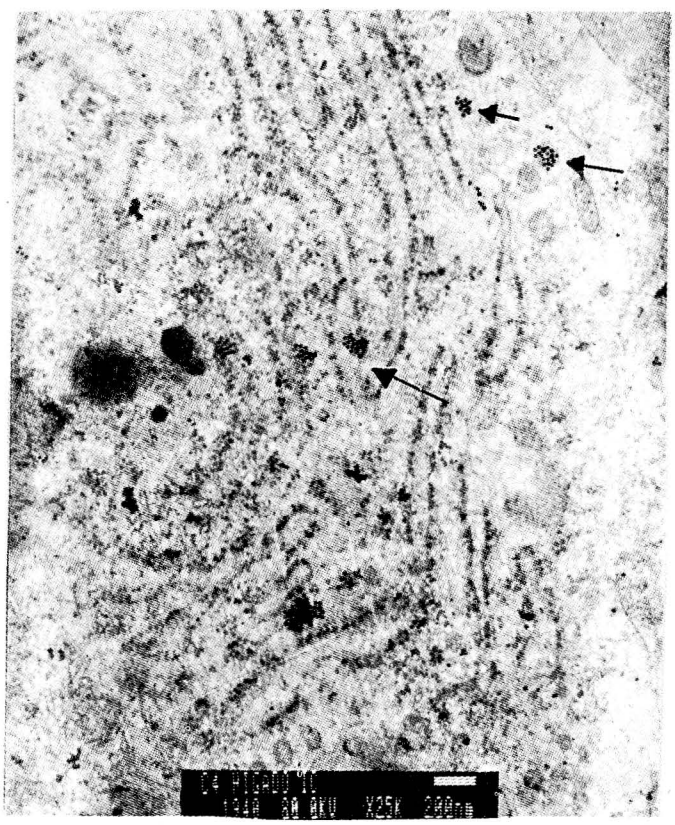

Fig. 2. Inmunocitoquímica empleando anticuerpo monoclonal marcado con oro coloidal a hepaticitos de chimpancés infectados con el virus de la hepatitis B.

todo cuando el anticuerpo monoclonal disponible para ser usado en inmunoquímica o inmunocitoquímica (2) pertenece a una subclase que no es reconocida por la proteína A, pudiéndose lograr una buena estabilización del mismo con ASB. El Western blot y la técnica de inmunocitoquímica empleada fueron indicativos de la actividad biológica del conjugado (figuras 1 y 2), observándose en el Western blot la presencia de bandas en la zona correspondiente a las formas monomérica y dimérica del antígeno recombinante de la hepatitis B y marcajes específicos en la membrana del retículo endoplásmico rugoso de los hepatocitos de chimpancés infectados con el virus, lo cual es indicativo de la síntesis de la proteína viral a este nivel.

REFERENCIAS

1- DE HARVEN, F. and D. SOLIGO (1987). Immunogold labeling of human leukocytes for scanning electron microscopy and light microscopy: quantitative aspects of the methodology. ***Scanning Microscopy*** **1**:713-718.

2- FALCON, V.; N. BARANOSKY; F.O. CASTRO; C. MONTERO; M. GONZALEZ; O. HAYES.; O.A. BIENVENIDO and S. MANDALOS (1993). Ultrastructural and immunocytochemical characteristics of hepatocytes from Hepatitis B virus infected chimpanzees. ***Tissue and Cell*** **25**:6

3- DE MEIJ, J.R. (1983). Colloidal gold probes in immunocytochemistry. In: *Immunochemistry: Practical Aplications in Pathology and Biology*. Eds Polack, J.M and Van Noorden, S. John Wright and Sona, Bristol-London- Boston, 82-112.

4- FRENS, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science* 241: **20-22.**

5- SAMBROOK, J.; E.F. FRITSCH and T. MANIATIS (1989). Detection and analysis of proteins expresed from cloned genes. In: ***Molecular Cloning: A laboratory manual*** Eds. N. Irwin, N. Ford, C. Nolan, M. Ferguson, and M. Ockler. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America., **3**:60.

6- GEOGHEGAN, W.D. and G.A. ACKERMAN (1977). Adsorption of horse radish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ aglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: A new method theory and application. *J. Histochem. Cytochem* **11**:1187-1200.

7- HAINFELD, J.F. (1987). A small gold-conjugated antibody label: Improved resolution for electron microscope. ***Science*** **236**:450- 453.

8- ROTH, J. (1983). The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In: *Techniques in Immunocytochemistry*. Eds. G.R. Bullock, and P. Petrusz. Academic Press, London., **2**:217-284.

9- COCO, J.M. (1990). Characterization of antibody labelled colloidal gold particles and their applicability in a sol particle immunoassay (SPIA). *Journal of Immunoassay* **11**:31-47.