

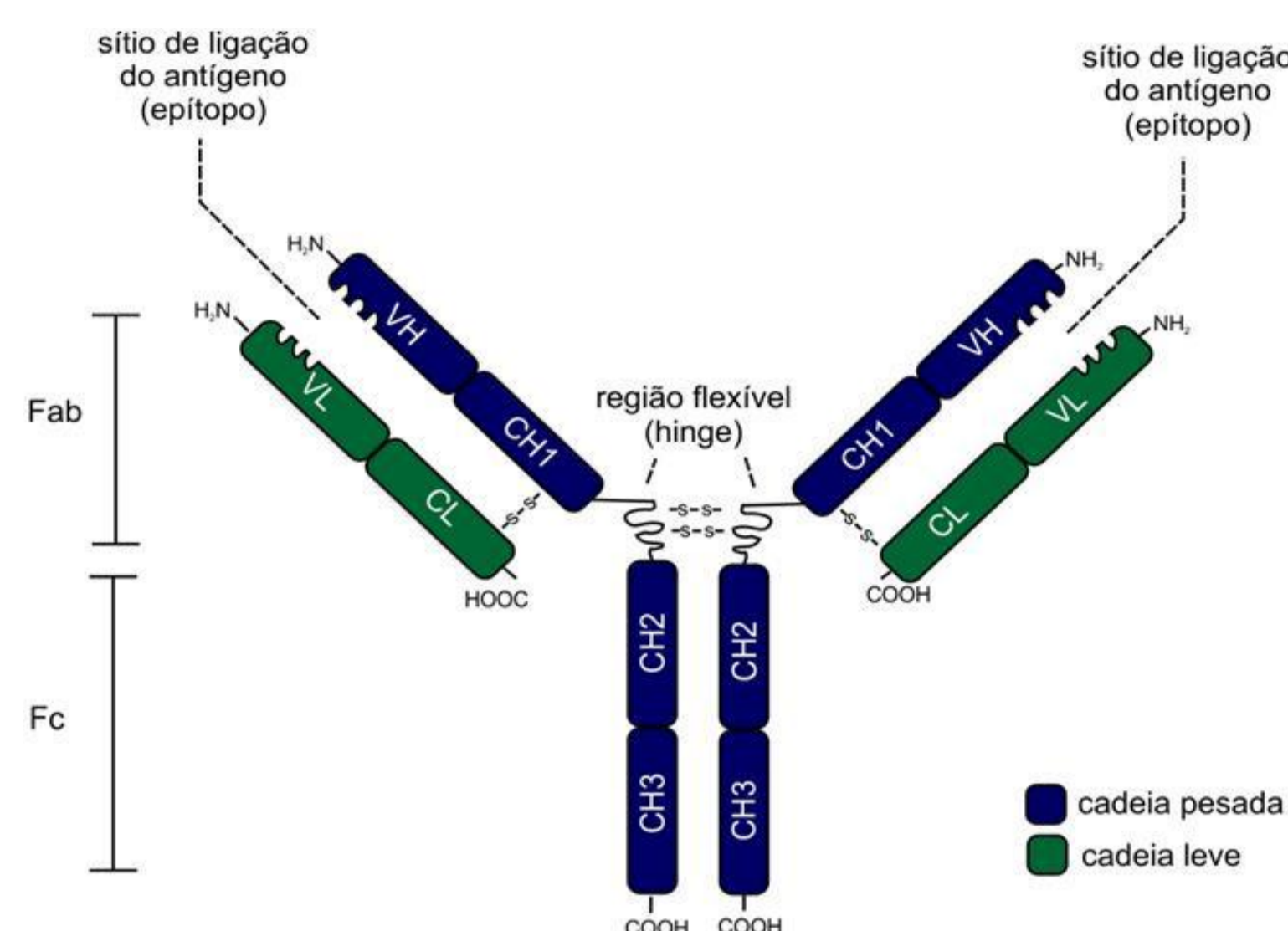
Igor Maciel de Oliveira e Silva e Sônia Maria Alves Bueno

Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia, LIMBio

igormosilva@gmail.com

Palavras-chave: purificação; IgG humana; IMAC.

## Introdução



### Imunoglobulina G humana (IgG)

- ✓ Sintetizada pelo organismo humano em resposta à introdução de um antígeno;
- ✓ Massa molecular de aproximadamente 150 kDa, composta de duas cadeias pesadas de 50 kDa e duas cadeias leves de 25 kDa, conectadas por ligações de sulfeto.

Figura 1 - Estrutura da Imunoglobulina G (IgG)

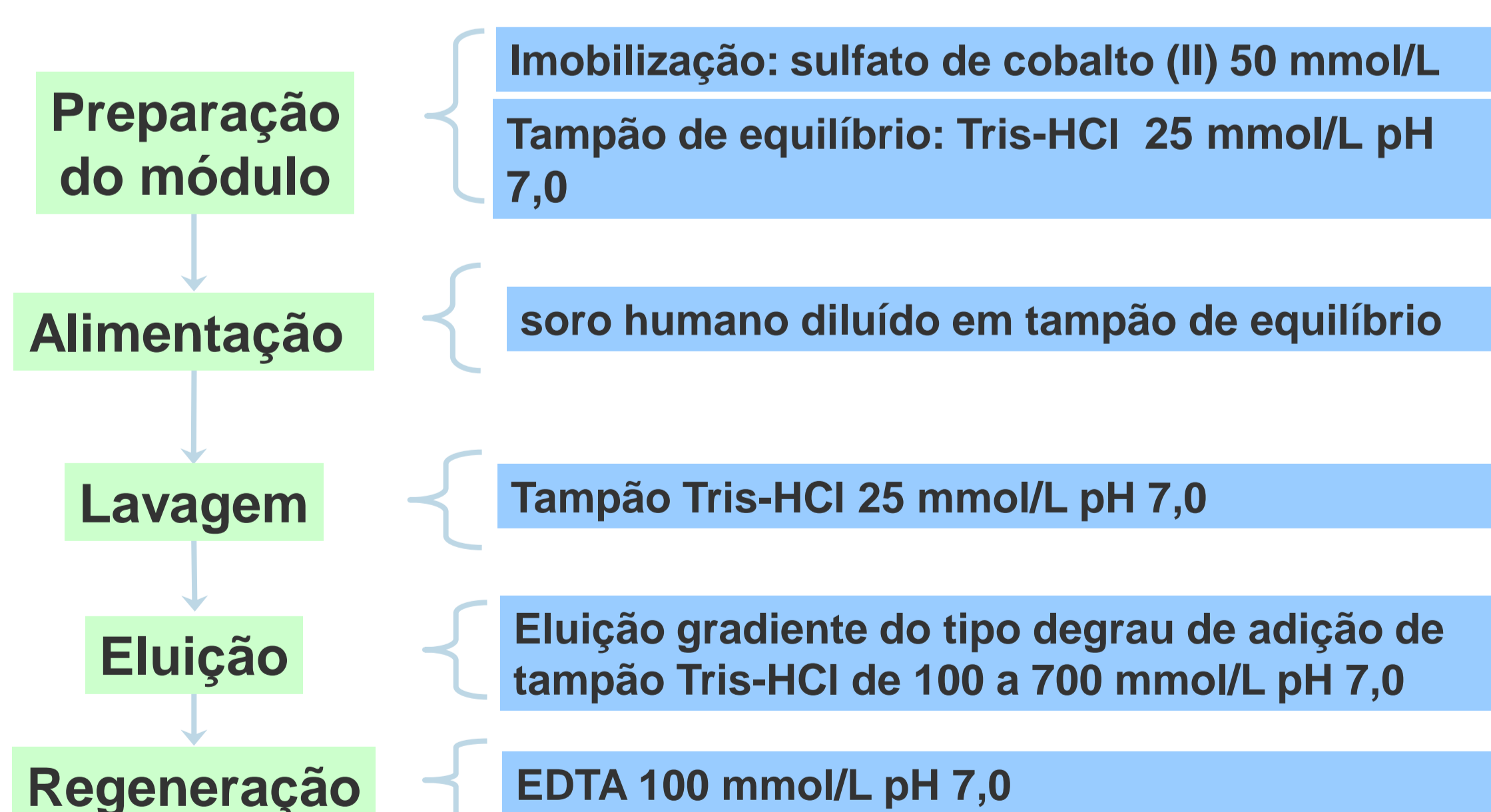
A imunoglobulina G (IgG) humana constitui de 75 a 80% de imunoglobulinas do soro humano adulto e tem sido empregada em tratamentos de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, de deficiências seletivas de anticorpo, de doenças auto-imunes e de alguns tipos de câncer, além de ser utilizada em testes diagnósticos. Diversas técnicas de purificação de IgG têm sido estudadas, dentre elas, a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados ("Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography", IMAC) tem se apresentado potencialmente atrativa.

## Objetivo

Este projeto teve como objetivo investigar o potencial de utilização do íon metálico cobalto (Co(II)) quelatado ao agente quelante ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) para purificação de IgG a partir do soro humano. A capacidade dinâmica do adsorvente agarose-CM-Asp-Co(II) foi avaliada por meio de curvas de ruptura ("breakthrough") a diversas diluições do soro humano.

## Metodologia

### Experimentos cromatográficos



Realizaram-se cromatografias injetando soro humano diluído a 2,5, 5 e 10 vezes, com vazão de alimentação em 0,5 mL/min para análise de seus efeitos na purificação de IgG.

### Análise das frações cromatográficas

Dosagem de proteína total: método de Bradford [1]

Eletroforese SDS-PAGE: condições não redutoras, gel a 7,5% de poli(acrilamida) [2], e revelação com nitrato de prata [3]

## Resultados

### Injeção de soro humano a diferentes diluições

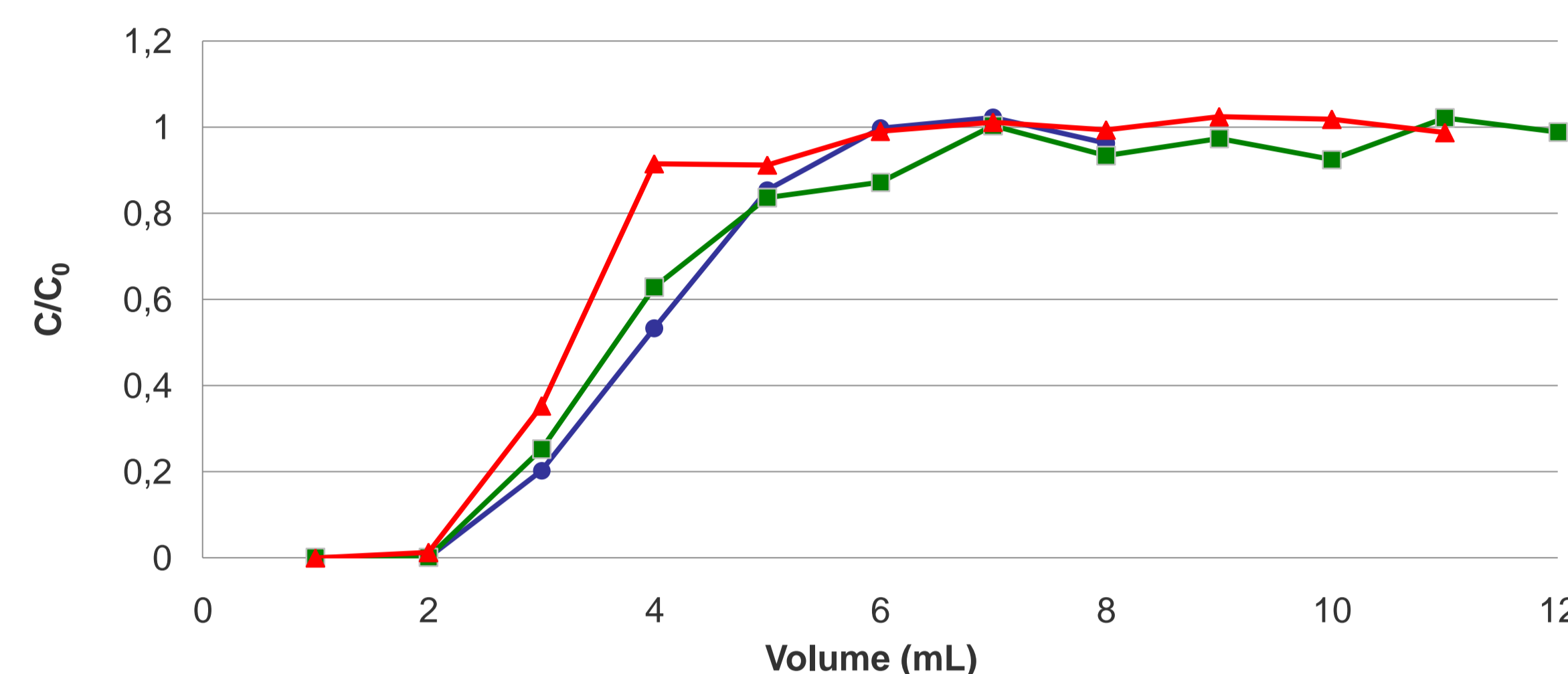


Figura 2 - Curvas de ruptura das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co(II) realizadas com soro humano diluído com tampão Tris-HCl em pH 7,0. (●) diluição a 2,5 vezes; (■) diluição a 5 vezes; (▲) diluição a 10 vezes.

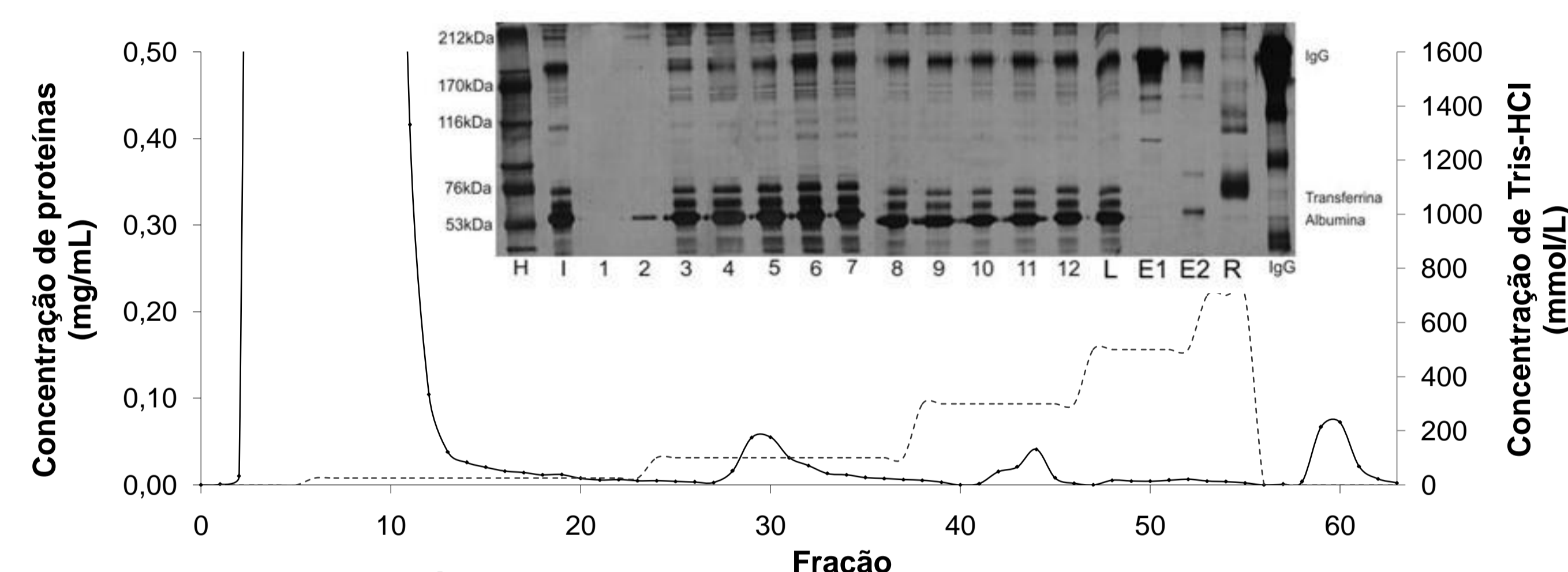


Figura 3 - Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas do soro humano a diluição de 10 vezes em Tris-HCl pH 7,0 em agarose-CM-Asp-Co(II). Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Tris-HCl, pH 7,0; dessorção: degrau de Tris-HCl 100, 300, 500 e 700 mmol/L, pH 7,0; regeneração: EDTA 100 mmol/L, pH 7,0.

Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Faixas: (H) marcador de massa molecular; (I) injeção; frações enumeradas de alimentação "flow-through"; (8) lavagem; (9) "pool" de frações eluição com Tris-HCl 100 mmol/L pH 7,0; (10) "pool" de frações eluição com Tris-HCl 300 mmol/L; (11) "pool" de frações da regeneração; (IgG) Marcador de IgG (Aventis Behring, Alemanha).

### Quantificação de proteínas totais

Tabela 1: Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co(II) a diferentes diluições de soro humano em Tris-HCl pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris-HCl.

Fração	Molaridade de Tris-HCl (mmol/L)	Fator de diluição					
		2,5 vezes		5 vezes		10 vezes	
		mg	(%)	mg	(%)	mg	(%)
Solução inicial	25	80,45	100,00	105,02	100,00	96,27	100,00
"Flow-through"	25	58,10	72,21	75,08	71,49	87,24	90,62
Lavagem	25	23,48	29,18	28,70	27,33	13,10	13,61
Eluições	100 a 700	0,37	0,45	2,96	2,83	3,84	4,00
Regeneração		0,17	0,22	0,04	0,03	0,32	0,34
Recuperação		82,12	102,07	106,78	101,68	104,51	108,56
PT ads. (mg)		0,54	0,68	3,00	2,85	4,17	4,33

## Conclusões

A partir da alimentação do soro humano diluído a 5 vezes com tampão Tris-HCl, o adsorvente agarose-CM-Asp-Co(II) apresentou boa seletividade para IgG, segundo a eletroforese SDS-PAGE. Observou-se que a capacidade de adsorção de proteínas no adsorvente é mais eficiente para baixos valores de condutividade e pH próximos a 7,0.

## Referências Bibliográficas

- [1] BRADFORD, M. M. Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.
- [2] LAEMMLI, U. K. Nature, 227, 680-685, 1970.
- [3] MORRISSEY, J. H. Anal. Biochem., 117, 307-310, 1981.