



PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G HUMANA POR CROMATOGRÁFIA NEGATIVA EM GEL AGAROSE POLI-L-LISINA

Matheus José Laureano Pinto e Sônia Maria Alves Bueno*

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Processos Biotecnológicos - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Caixa Postal 6066 - CEP 13081-970 - Campinas - SP
 sonia@feq.unicamp.br



Palavras-Chave: Purificação – IgG Humana – Cromatografia Negativa

Introdução

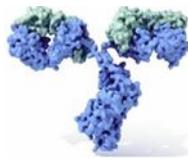
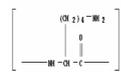


FIGURA 1: IMUNOGLOBULINA G

A imunoglobulina G (IgG) humana tem sido purificada em larga escala, empregando-se as técnicas de precipitação e cromatografia de afinidade com proteína A ou G imobilizada. A proteína tem sido empregada como prescrição terapêutica para inúmeros casos de doenças malignas, infecciosas, auto-imunes e inflamatórias [1]. A demanda real brasileira de imunoglobulinas estimada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em 2005 foi de 5,6 toneladas ao ano [2].

Objetivos do projeto:

Investigar o potencial da utilização do gel agarose Poli-L-Lisina em cromatografia negativa como uma alternativa de baixo custo e de fácil escalonamento aos ligantes proteínas A e G para purificação de IgG a partir do soro humano. Além disso o projeto visa comparar a ação de diferentes tampões no processo de purificação de proteínas.



Estrutura proposta para agarose Poli-L-Lisina

Cromatografias e eletroforese

Tampão Mops 25 mM pH 6,5:

Tabella 1: Balanço de massa com tampão Mops 25 mM a pH 6,5

Fração	Massa (ng)	Porcentagem
Adsorção	0,7	100%
Lavagem (Mes 25mM pH 6,5)	0,5	0,24%
Eluição (Mes 25mM aHCl 0,4M pH6,5)	0,86	102,46%
Regeneração (NaOH 25mM)	0	0,00%
Erros	-0,22	-10,20%
Recuperação	2,42	110,20%

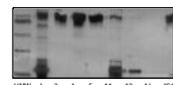


Figura 3: Eletroforese SDS-PAGE (Mops pH 6,5) HMW: Marcador de massa molecular; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; IgG: Abscissa do IgG humana.

Tampão Mes 25mM pH 5,5:

Tabella 2: Balanço de massa com tampão Mes 25 mM a pH 5,5

Fração	Massa (ng)	Porcentagem
Adsorção	0,3	100%
Lavagem (Mes 25mM pH 5,5)	0,61	197,4%
Eluição (Mes 25mM aHCl 0,4M pH5,5)	0,37	124,4%
Regeneração (NaOH 25mM)	0,04	0,26%
Erros	-0,58	-193,1%
Recuperação	0,21	110,2%

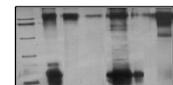
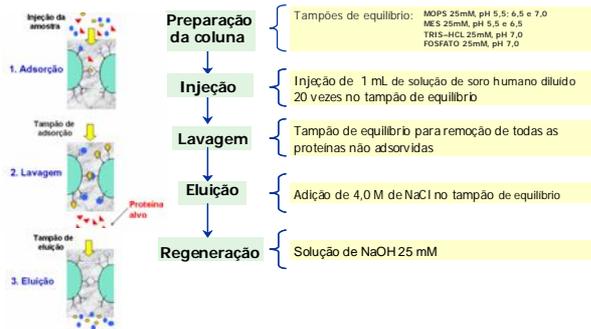


Figura 4: Eletroforese SDS-PAGE (Mes pH 5,5) HMW: Marcador de massa molecular; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; IgG: Marcador de IgG humana.

Metodologia

Procedimentos Cromatográficos



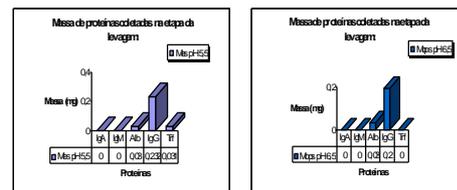
Análise das frações

Dosagem de proteína total: método de Bradford [3]
 Dosagem de IgG, IgA, IgM, Transferrina e albumina: nefelometria (Beckman, USA)
 Eletroforese SDS-PAGE: condições não redutoras, gel a 7,5% de poliacrilamida

Resultados

Neste trabalho, a IgG foi recuperada na etapa da lavagem, enquanto as demais proteínas permaneceram adsorvidas no gel (cromatografia negativa) [4]. Os melhores resultados foram obtidos com os tampões Mes a pH 5,5 e Mops a pH 6,5; e serão expostos a seguir:

Ensaio de Nefelometria:



Conclusões

A partir da análise dos resultados obtidos pelas cromatografias e eletroforeses pode-se concluir que os tampões Mops e Mes conduzem a um ótimo processo de purificação de imunoglobulina G (IgG) em coluna de agarose poli-L-lisina. A variação de pH de tais tampões exerce uma grande influência na eficiência de cada um deles, sendo o Mops 6,5 e o Mes 6,5, os tampões que obtiveram melhores resultados. Os tampões Tris-HCl e fosfato não proporcionaram bons resultados como tampões de adsorção, não sendo ideais para um processo de purificação de IgG em agarose poli-L-lisina. Assim sendo, o projeto de pesquisa teve seu objetivo cumprido, tendo conseguido a purificação de IgG com bom grau de pureza.

Referências Bibliográficas

- [1] BERNARD et al. (1990) *Clin. Immunol. Immunopath.*, 54, 484-494.
- [2] Biossegurança (ANBio), Rio de Janeiro-RJ, 2006.
- [3] BRADFORD (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- [4] PITIOT et al. (2001), *J. Chrom. B*, 758, 173-182