

Comunicação

[Communication]

Purificação de IgG de codorna a partir de soro e gema de ovos

[Purification of Japanese quail IgG from serum and egg yolk]

D.D. Oliveira¹, J.S. Resende^{1*}, A.V.F. Flatschart¹, J.T. Abreu², R.B. Flatschart¹, N.R.S. Martins¹

¹Escola de Veterinária - UFMG
Caixa Postal, 567

30123-970 – Belo Horizonte, MG

²Curso de Medicina Veterinária - PUC – Betim, MG

A IgG é a imunoglobulina encontrada em maior concentração no soro das aves, pode passar para o ovo, conferindo imunidade passiva para o pintinho recém-eclodido (Rosenberg, 1996; Tini et al., 2002). A gema de ovo pode ser usada em testes sorológicos, porém, devido à grande quantidade de lipídeos presentes, os anticorpos precisam ser purificados (Tini et al., 2002). Os testes sorológicos convencionais utilizados para codornas (*Coturnix coturnix japonica*) têm sido baseados naqueles padronizados para galinhas (*Gallus gallus formadomestica*). Por isso, os objetivos deste trabalho foram a avaliação e a purificação de IgG, em amostras de soro e gema de ovos de codorna, para futura utilização em testes sorológicos.

A purificação de IgG do soro de codornas foi realizada segundo Bhanushali et al. (1994), com modificações. Foram usados 10mL de soro de codorna diluído a 1:5 em tampão acetato. A este material foi adicionado ácido caprílico na proporção de 25µL/mL de soro, mantido *overnight* a 4°C. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 10.000 x g (30min/4°C), filtrado em membrana (0,2µm, Millipore) e diluído com PBS (pH 7,2) na proporção 1:10. Uma segunda precipitação foi feita adicionando-se solução saturada de sulfato de amônio tamponada (pH 7,0), até atingir 36% de saturação final. Após centrifugação a 10.000 x g (30min/4°C), o *pellet* foi ressuscitado em 1mL de PBS (pH 7,2) e dialisado. As amostras foram armazenadas a 4°C sem conservantes como sugerido por Otani et al. (1993).

A purificação de IgG da gema de ovos de codorna foi realizado segundo Akita e Nakai (1992), Abbassi et al. (1999) e Bizhanov e Vyshniauskis (2000).

Para obtenção de IgG, a mistura contendo clorofórmio, *pool* de gemas e água 18,2mΩ acidificada com HCl 0,1N (pH final 5,0 a 5,2), foi centrifugada a 3000 x g 30min/temperatura ambiente (TA) para separação das fases. A fase aquosa superior, que continha a IgG, foi coletada, e para cada 10mL desta fase aquosa foram adicionados 5mL de uma solução 36% (p/v) PEG-6000 (Sigma Aldrich – St. Louis, EUA), a mistura foi mantida em repouso por 30min (4°C). O pelete, obtido por centrifugação a 3000 x g (10min/TA), foi ressuscitado em PBS (pH 7,2), em volume equivalente a 1% do volume original de gema utilizada. A precipitação da IgG foi realizada com etanol (-20°C) numa mistura final de 50% (v/v) e centrifugação a 10.000 x g (30min/4°C). O precipitado foi ressuscitado com PBS em 25% do volume do *pool* de gemas inicial, dividido em placas de Petri estéreis e colocado em estufa de 37°C por 2h para a evaporação do álcool. Os sólidos foram ressuscitados no mesmo volume inicial da gema com água 18,2mΩ estéril, e a dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry, utilizando-se o *kit protein assay*¹.

Para confirmar o grau de pureza das amostras de IgG purificadas do soro e da gema de ovos de codornas, foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, corado com azul de Comassie (Makkay et al., 1999). Para confirmar a identidade das proteínas purificadas, se compatíveis coma massa molecular de IgG

Recebido em 2 de fevereiro de 2009

Aceito em 29 de janeiro de 2010

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: jsresendvet@yahoo.com.br

Purificação de IgG...

(Makkay et al., 1999), foi realizado o *western blot*.

Após bloqueio da membrana de nitrocelulose com leite em pó desnatado 3%, foi adicionado IgG de coelho anti-IgG de galinha (Sigma Aldrich), na diluição 1:5000, com posterior lavagem com PBS tween 20 0,5%. A revelação foi feita com o seguinte substrato: 10mL de tampão AP (Tris HCl pH 9,5, NaCl, MgCl₂) 64μL de nitro blue tetrazolium (Sigma Aldrich), e 34μL de BCIP (5-bromo, 4-cloro, 3 indolyl-phosphate (Promega Co.- Madison, EUA),

mantido em agitação à TA até o aparecimento das bandas. Para interromper reação, o substrato foi descartado e a membrana lavada três vezes com água 18,2mΩ estéril por 15min.

Determinou-se a concentração de proteína das amostras de IgG purificada do soro e da gema de ovos de codorna. As amostras de IgG dos soros tinham, em média, 4939,4μg de proteína total/mL e as das gemas 7467,5μg de proteína total/mL. Na Tab. 1 mostram-se as concentrações de proteína (IgG) obtidas de cada amostra.

Tabela 1. Concentração de proteína das amostras de IgG purificadas do soro e das gemas dos ovos de codornas

Amostra	Proteína (μg/mL)	
	IgG purificada do soro	IgG purificada da gema
Amostra (1)	6285,7a	6454,5a
Amostra (2)	5428,6b	7532,4b
Amostra (3)	3103,9c	8415,6c
Média	4939,4	7467,5

(1, 2, 3): primeira, segunda e terceira centrifugações.

Pela análise de cada amostra de IgG purificada, observa-se que a concentração de proteínas decresce à medida que é feita uma nova centrifugação. As concentrações de proteína obtidas da purificação de IgG do soro e das gemas dos ovos de codorna apresentaram coerência com os resultados encontrados em estudos anteriores (Otani et al., 1993; De Meulenaer e Huyghebaert, 2001; Tini et al., 2002) para purificação de IgG de galinha.

Os resultados da eletroforese (SDS-PAGE) e *western blot* confirmaram a purificação das amostras (Fig. 1). Na eletroforese, verificou-se a separação das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas do soro, com aproximadamente 25 e 65kDa, respectivamente, que coincidiram com o padrão de tamanho molecular utilizado (Fig. 1A). No SDS-PAGE, IgG purificada de gema, (Fig. 1A, canaletas 5 e 7), foi possível observar a presença das bandas, com tamanho molecular em torno de 45,5kDa, diferentes das cadeias leve e pesada de IgG da amostra padrão.

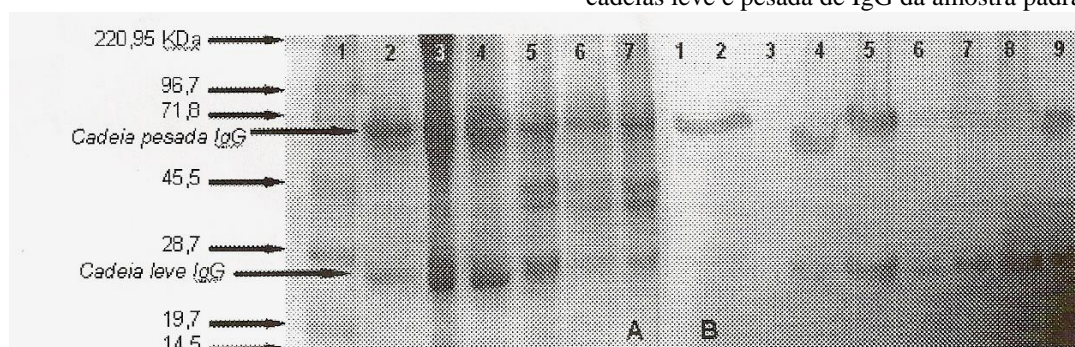


Figura 1. A) Eletroforese em SDS-PAGE, corado com azul de Coomassie das amostras de IgG purificadas do soro e das gemas dos ovos de codorna. Canaletas - 1: padrão de tamanho molecular 14,5 a 220,95KDa; 2, 3, 4: IgG do soro de codornas; 5, 6, 7: IgG da gema de ovos de codornas. B) Membrana de nitrocelulose do *western blot* das amostras de IgG purificadas do soro e gema de ovos de codorna e IgG de galinha, revelada com IgG de coelho anti-IgG de galinha e corada com NBT e BCIP. Canaletas - 1, 2, 4, 5: IgG da gema de ovos de codornas; 6: de IgG galinha; 7, 8, 9: IgG do soro de codorna; 3: tampão de amostra.

A membrana de *western blot*, revelada, confirmou a identidade das bandas das cadeias leve e pesada do gel de SDS-PAGE. Os dados encontrados de eletroforese assemelham-se aos resultados de De Meulenaer e Huyghebaert (2001), mostrando a eficiência dos processos de purificação para IgG do soro e da gema dos ovos de codorna. Provavelmente, devido à grande concentração de IgG na gema dos ovos de codorna, o processo de separação das cadeias leves e pesada da IgG não tenha sido totalmente eficiente, devido à presença de outra banda, com tamanho molecular em torno de 45,5kDa. Essa banda, provavelmente, refere-se à ovalbumina, proteína presente em grande quantidade na gema do ovo (Otani et al., 1993). Quando revelada a

membrana de *western blot*, foi possível verificar a identidade das bandas das cadeias leve e pesada das IgG do gel de SDS-PAGE. Para confirmar os dados utilizou-se, também, da amostra de IgG de galinha comercial purificada. O padrão de bandas encontrado no SDS-PAGE e *western blot* foram semelhantes.

Com base nos dados de dosagem de proteína, foi comprovada a eficiência dos métodos utilizados para purificação de IgG de codornas a partir do soro e da gema de ovos.

Palavras-chave: codorna, imunoglobulina, gema de ovo, purificação, soro de codorna

ABSTRACT

The purification of Japanese quail IgG from serum was performed using caprylic acid and ammonium sulfate, and from egg yolk using PEG-6000 and ethanol. After confirming the purification and the concentration of IgG, the yolk samples had twice the amount of protein compared to serum samples. The IgG extracts were analyzed by SDS-PAGE and western blot showing similar results as the ones of chicken IgG used as the standard. So, these methodologies can be used for purifying quail serum or egg yolk IgG, which would enable the development of diagnostic assays.

Keywords: quail, immunoglobulin, egg yolk, purification, quail serum

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASSI, P.H.; TOQUIN, D.; GUITTET, M. et al. Comparaison de trois méthodes d'extraction des immunoglobulines vitellines: application à l'extraction d'anticorps neutralisant dans le virus de la bursite infectieuse. *Rec. Med. Vet.*, v.3, p.107-117, 1999.

AKITA, E.M.; NAKAI, N. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.*, v.57, p.629-634, 1992.

BHANUSHALI, J.K.; GILBERT, J.M.; McDOUGALD, L.R. Simple method to purify chicken immunoglobulin G. *Poult. Sci.*, v.73, p.7-9, 1994.

BIZHANOV, G.; VYSHNIAUSKIS, G.A. Comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Vet. Res. Commun.*, v.24, p.103-113, 2000.

DE MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A. Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review. *Food Agri. Immunol.*, v.13, p.275-288, 2001.

MAKKAY, A.; KRELL, P.J.; NAGY, E. Antibody detection-based differential ELISA for NDV-infected or vaccinated chickens versus NDV HN-subunit vaccinated chickens. *Vet. Microbiol.*, v.66, p.209-222, 1999.

OTANI, H.; MATSUMOTO, K.; HIRAO, M. Antigenic reactivity of the egg yolk antibody in the Japanese quail towards the anti-chicken IgG antibody. *Anim. Sci. Technol.*, v.64, p.28-31, 1993.

ROSENBERG, I.M. *Protein and analysis and purification* – Benchtop techniques. 2.ed. Boston: Birkhäuser Boston, 1996. 434p.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp. Biochem. Physiol. A*, v.131, p.569-574, 2002.