

CNEA 403

# Marcación de Proteínas con I-125 y Determinación Experimental de su Actividad Específica

AR7600009

R. A. Caro  
V. A. Ciscato  
S. M. V. de Giacomini

S. Quiroga  
R. Radicella

Comisión  
Nacional  
de Energía  
Atómica

República Argentina

Buenos Aires, 1975

CNEA 403

# Marcación de Proteínas con I-125 y Determinación Experimental de su Actividad Específica

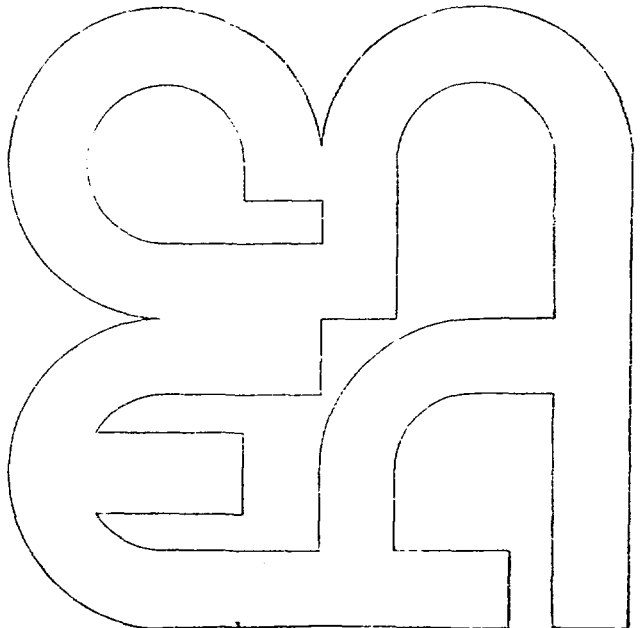
R. A. Caro  
V. A. Ciscato  
S. M. V. de Giacomini

S. Quiroga  
R. Radicella

Comisión  
Nacional  
de Energía  
Atómica

República Argentina

Buenos Aires, 1975



INIS CLASSIFICATION AND KEYWORDS

B13

PROTEINS  
LABELLING  
IODINE 125  
RADIOIMMUNOASSAY  
ELECTROPHORESIS  
CHEMICAL REACTION YIELD  
RADIOCHROMATOGRAPHY

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA  
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION

## MARCACION DE PROTEINAS CON I-125 Y DETERMINACION EXPERIMENTAL DE SU ACTIVIDAD ESPECIFICA

Caro, R.A.\*, Ciscato, V.A.\*, Giacomini, S.M.V. de\*,  
Quiroga, S.\* y Radicella, R

Aceptado en febrero de 1975

### RESUMEN

El objeto del presente trabajo consiste en la normalización de la técnica de marcación de proteínas con  $^{125}\text{I}$  y de los procedimientos de control de los productos obtenidos, en especial sus actividades específicas, con el fin de utilizarlos correctamente en radioinmunoensayos. Las cantidades de Cloramina-T y metabisulfito de sodio fueron disminuídas con respecto a las del método original, a 3,6 y 9,6  $\mu\text{g}$  respectivamente. En estas condiciones se obtuvieron rendimientos óptimos y las proteínas radioiodadas poseían una buena actividad inmunológica.

Se observó que la actividad específica calculada, como es corriente, a partir del rendimiento obtenido por electroforesis, es mayor que el valor real. Ello se debe a que una cierta cantidad de yodo radiactivo no unido a la proteína, queda en la zona correspondiente a la proteína marcada, si el análisis se efectúa por electroforesis. Esta diferencia no fue observada cuando el producto fue analizado cromatográficamente.

El conocimiento de la actividad específica real de la proteína marcada es importante, ya que este valor es necesario para la determinación de la ma-

\* Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, República Argentina.

sa de proteína puesta a reaccionar, a partir de su actividad absoluta. Por estas razones los rendimientos de marcación y las correspondientes actividades específicas fueron determinadas mediante cromatografía ascendente, usando metanol al 70% como solvente, durante dos horas en la oscuridad. Las curvas de desplazamiento de los radioinmunoensayos, obtenidos con proteínas marcadas con el método propuesto y cuyas actividades específicas fueron calculadas a partir de sus perfiles radiocromatográficos, fueron reproducibles y dieron una ordenada en el origen (fracción de proteína radioiodada unida en ausencia de proteína fría,  $B_0$ ) de  $50 \pm 4$  por ciento. Las uniones no específicas fueron siempre inferiores a 5 por ciento.

El presente trabajo ofrece por lo tanto la posibilidad de determinar la actividad específica real de las proteínas radioiodadas mediante una simple cromatografía, lo que debe considerarse como un paso más hacia la normalización metodológica del radioinmunoensayo.

#### SUMMARY

*Proteins labelling with  $^{125}\text{I}$  and experimental determination of their specific activity*

The purpose of the present work consists in the standardization of the labeling technique of proteins with  $^{125}\text{I}$  and the control of the obtained products, principally their specific activities, in order to utilize them correctly in radioimmunoassays. The quantities of chloramine-T and sodium metabisulphite were lowered, with regard to the original method, to 3,6 and 9,6  $\mu\text{g}$  respectively. Under these conditions, optimal yields and radioiodinated proteins with good immunological activities were obtained.

It was found that the specific activity calculated, as usual, from the yield obtained by electrophoresis, is higher than the real value. In fact, radioiodine not bound to the protein remains in the zone corresponding to the labeled protein, when analyzed by electrophoresis. This artifice was not found when chromatographic analysis was carried out.

The knowledge of the real specific activity is important since it is necessary for the determination of the mass of protein which must be put into reaction, from the absolute activity of the labeled protein. For these reasons the yields and the corresponding specific activities were determined from ascending chromatographies performed with 70 per cent methanol as solvent, during two hours in darkness. The radioimmunoassay displacement curves obtained with proteins labeled with the proposed method and the specific activities of which were calculated from their radiochromatographic patterns, were reproducible and gave a percentage of bound radioiodinated protein in the absence of cold protein of  $50 \pm 4$ . The non-specific unions were always smaller than 5 per cent.

The possibility of determining the actual specific activity through a simple chromatography, given by the present work, should be considered as one step more towards a methodological standardization of radioimmunoassay procedures.

## INTRODUCCION

La marcación de proteínas con iodo radiactivo mediante el método de la cloramina-T ha sido utilizado ampliamente desde hace trece años aproximadamente (1) (2). Las proteínas así marcadas son utilizadas comúnmente en métodos diagnósticos radioinmunológicos realizados "in vitro" (radioinmunoensayo). Para asegurar el éxito de dichas técnicas, la proteína marcada debe cumplir los siguientes requisitos:

- mantener su actividad inmunológica luego de la marcación;
- su actividad específica debe ser apropiada para los requerimientos de cada experiencia;
- debe conocerse la actividad específica promedio real, para poder calcular la masa correcta de proteína marcada a utilizar en el radioinmunoensayo, con el fin de lograr curvas de desplazamiento reproducibles en ensayos consecutivos.

En el presente trabajo se estudian las condiciones de marcación y los procedimientos de control de los productos obtenidos, con el objeto de normalizar y simplificar el método para varias proteínas. Las concentraciones de la cloramina-T y del metabisulfito de sodio fueron disminuidas con respecto al método original (2), lo que permitió lograr, con un buen rendimiento de marcación, una proteína radioiodada con actividad inmunológica apropiada para la realización del radioinmunoensayo respectivo.

Existen diferentes métodos para la determinación de la actividad específica, algunos de los cuales son bastante engorrosos (3-8). Comúnmente se emplea una técnica consistente en el análisis del producto obtenido por electroforesis sobre papel Whatman Nº 1 ó Nº 3 MM (9) (10). Sin embargo, si se realiza un blanco de marcación, es decir, se hace reaccionar yoduro-<sup>125</sup>I, cloramina-T y metabisulfito de sodio en ausencia de proteína, se observa un perfil radioelectroforético similar al que se logra con una proteína radioiodada. Por lo tanto el rendimiento y en consecuencia la actividad específica calculada por este método serán más elevadas que el valor real. En un trabajo anterior (11) se demostró que el rendimiento de marcación calculado a partir de perfiles radioelectroforéticos puede ser mayor que el valor máximo teóricamente posible.

Por estas razones hemos desarrollado una técnica rápida y simple que permite la determinación del rendimiento y de la actividad específica reales; el método consiste en una cromatografía ascendente sobre papel Whatman N°1 durante dos horas en la oscuridad, utilizando una solución de metanol al 70% como solvente (12).

Si se desea lograr una buena reproducibilidad en radioinmunoensayos consecutivos, es necesario utilizar siempre la misma masa de proteína radioiodada, la que se calcula a partir de la actividad absoluta y la actividad específica de la muestra. Este último parámetro, resultó ser correcto si se determina mediante el método propuesto, ya que las curvas de desplazamiento realizadas con proteínas marcadas en diferentes oportunidades poseen un porcentaje de proteína unida al anticuerpo en ausencia de proteína fría, o sea la ordenada en el origen generalmente simbolizada como  $B_0$ , de  $50 \pm 4$ ; la unión inespecífica fue siempre menor que 5 por ciento.

## PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIALES Y METODOS

#### INSTRUMENTOS

Se utilizó un radiocromatógrafo Berthold II con detector de flujo, integración automática de áreas y un accesorio para barrido bidimensional\*.

#### REACTIVOS

- a) La Tirotrófina humana (HTSH), Tirotrófina de rata (RTSH), Hormona luteinizante humana (HLH), Hormona folículo estimulante humana (HFSH) fueron provistas gentilmente por National Pituitary Agency (University of Maryland, School of Medicine), National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases, U.S.A.
- b) Insulina porcina recristalizada, Mann Research Laboratories, U.S.A.
- c) Fracción Fab del anticuerpo antirrábico, provisto gentilmente por el Dr. E. Levin del Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología.
- d) Gastrina I Humana sintética, División of Biological Standards, National Insitute of Medical Research, England.

\* Este equipo fue adquirido mediante un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (Legajo 4090/69 - Fondo de Farmacología).

- e) Ioduro -  $^{125}\text{I}$  en hidróxido de sodio, sin portador, New England Nuclear Corp., U.S.A. (NEZ 033 H).
- f) Se utilizó Sephadex G-25 para insulina, Sephadex G-50 para gastrina y Sephadex G-75 para HTSH, RTSH, HLH, HFSH y Fab antirrábico.
- g) Solución reguladora para la marcación: Fosfatos 0,05 M a pH = 7,4.
- h) Solución reguladora para la elución de las columnas de Sephadex luego de la marcación de HTSH, RTSH, HLH, HFSH, Fab antirrábico y gastrina: fosfatos 0,01 M, ClNa 0,15 M a pH 7,8; generalmente se lo denomina PBS.
- i) Solución reguladora para la elución de las columnas de Sephadex luego de la marcación de insulina: veronal-veronal sódico a pH = 8,6 y fuerza iónica igual a 0,05.
- j) Solución reguladora para electroforesis: tris-veronal-veronal sódico, pH = 8,8, fuerza iónica 0,05, Gelman Instrument Company, Michigan, U.S.A.
- k) Solvente para cromatografía: metanol-agua bidestilada (70:30), preparado recientemente.
- l) Solución de Seroalbúmina bovina al 1% en su correspondiente solución reguladora de elución. Se utilizó Fracción V de la Sigma Chemical Company, Missouri, U.S.A.

## MÉTODOS

### a) Marcación

Todas las proteínas a ser marcadas fueron fraccionadas previamente en frascos siliconados en cantidades que oscilaban entre 1 y 5  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 5  $\mu\text{l}$  de su correspondiente diluyente; fueron mantenidas a - 20° C.

Para marcar la proteína se agregaron 500 a 1000  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$  radioquímicamente puro, contenido en 10  $\mu\text{l}$  de la solución reguladora para la marcación, al frasco siliconado conteniendo la proteína. Inmediatamente después se adicionaron 3,6  $\mu\text{g}$  de cloramina -T en 20  $\mu\text{l}$  de solución reguladora para marcación. La duración óptima de la reacción en estas condiciones, 30 segundos, fue determinada en experiencias preliminares. Durante dicho tiempo el frasco se agitó manualmente; en experimentos con agitadores magnéticos o vórtex se logró un mayor rendimiento de iodación, pero la proteína marcada poseía menor actividad inmunológica. La reacción se suspendió agregan-



do 9,6  $\mu\text{g}$  de metabisulfito de sodio contenidos en 80  $\mu\text{l}$  de solución reguladora para la marcación, bajo agitación manual constante. Las soluciones de cloramina-T y de metabisulfito de sodio deben ser preparadas inmediatamente antes de su uso. Concomitantemente con cada experimento se efectuó un blanco de marcación, o sea la reacción de iodación en ausencia de proteína.

*b) Purificación de la proteína marcada*

Inmediatamente después de la marcación de la proteína, se la sometió a un proceso de purificación por filtración a través de gel, para lo cual se utilizó Sephadex de porosidad adecuada al peso molecular de cada proteína. La columna de Sephadex (50 cm x 0,9 cm), siempre se saturó previamente con 6 ml de solución al 1% de seroalbúmina bovina en su correspondiente solución reguladora de elución y se lavó con 60 ml de la misma solución reguladora. Una vez sembrada la proteína marcada, se eluyeron fracciones de 1 ml en viales siliconados que contenían 50  $\mu\text{l}$  de solución de seroalbúmina bovina.

*c) Controles electroforéticos y cromatográficos*

Estos controles se realizaron primeramente sobre la muestra de  $^{125}\text{I}$ , cada vez que se efectuaba una marcación con el objeto de verificar su pureza radioquímica, e inmediatamente después de las reacciones de marcación, sobre el blanco de marcación y la proteína radioiodada. Los controles electroforéticos y cromatográficos se llevaron a cabo en papel Whatman N<sup>o</sup> 1 usando portadores yoduro y yodato. Con el objeto de realizar corridas bidimensionales (ver más abajo) se utilizaron papeles de 26 cm x 29 cm.

La electroforesis fue desarrollada perpendicularmente a las fibras de papel, con un campo eléctrico de 12,5 Voltios/cm durante 40 minutos, usando la solución reguladora para electroforesis. La cromatografía ascendente fue desarrollada en el mismo sentido que las fibras del papel durante 2 horas en la oscuridad, utilizando metanol al 70% como solvente.

Con el objeto de estudiar más a fondo los perfiles obtenidos por uno y otro método, se efectuaron corridas bidimensionales en las siguientes dos secuencias:

- 1) - cromatografía con obtención de su perfil monodimensional.
- electroforesis en el mismo papel, desarrollada perpendicularmente a la dirección de la corrida cromatográfica; obtención del barrido bidimensional.

Esta secuencia se simboliza como 1C2E.

- II) - electroforesis con obtención de su perfil monodimensional.  
- cromatografía en el mismo papel, desarrollada perpendicularmente a la dirección de la corrida electroforética; obtención del barrido bidimensional. Esta secuencia se simboliza como 1 E 2 C.

*d) Determinación del rendimiento de marcación.*

Una vez finalizado el primer paso de una u otra secuencia o la cromatografía o electroforesis monodimensional, el rendimiento de marcación R se calculó mediante la siguiente expresión:

$$R = \frac{I - P}{I \cdot P + 1} \quad (1)$$

donde:

- I - P es el área bajo la curva correspondiente a la proteína radiiodada, en el perfil radiocromatográfico o radioelectroforético.  
I es el área bajo la curva correspondiente al yoduro radiactivo, en el perfil radiocromatográfico o radioelectroforético.

*e) Determinación de la Actividad específica*

La actividad específica (S), dada en  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , se calculó como sigue:

$$S = \frac{A \times R}{M} \quad (2)$$

donde:

- A es la actividad absoluta del  $^{125}\text{I}^-$ , dada en  $\mu\text{Ci}$ , utilizado en la marcación  
R es el rendimiento definido por la expresión (1)  
M es la masa de la proteína dada en  $\mu\text{g}$ .

## RESULTADOS

### CONTROL DEL $^{125}\text{I}^-$

En la figura 1 se puede observar el perfil radioelectroforético (1a) y radiocromatográfico (1b) de una muestra de  $^{125}\text{I}^-$  radioquímicamente pura; ambos registros muestran, como es dable suponer, un solo pico de radiactividad. El análisis radioelectroforético (1c) de una muestra de  $^{125}\text{I}^-$  con impurezas radioquímicas, permite observar picos de radiactividad que no corresponden al yoduro, mientras que el perfil radiocromatográfico de la misma muestra (1d) exhibe solamente un pico en la zona del yoduro. Estos resultados demuestran que únicamente la electroforesis permite evaluar la pureza radioquímica del yoduro  $^{125}\text{I}$ .

### CONTROL DE LAS PROTEÍNAS MARCADAS

La figura 2a permite observar un perfil radioelectroforético de los productos obtenidos en la marcación de TSH. El rendimiento es de 88 por ciento y la actividad específica de  $208 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . La zona A corresponde a  $^{125}\text{I}^-$ . Los dos picos radiactivos de la zona B deben atribuirse a  $^{125}\text{I}$ -TSH.

La figura 2b muestra el perfil radiocromatográfico de la misma iodación. El análisis permite calcular que el rendimiento es de 80 por ciento, la actividad específica es de  $188 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . En la zona A puede observarse un pico de radiactividad correspondiente a productos no proteicos. La zona B exhibe un único pico de radiactividad atribuible a la proteína radioiodada.

Los barridos bidimensionales obtenidos a partir de los mismos productos de reacción pueden observarse en la misma figura.

*Secuencia 1E2C (fig. 2 c):* la zona A corresponde a  $^{125}\text{I}^-$ . Las dos manchas radiactivas de la proteína marcada que aparecen en la zona B, son las mismas que se observan en la zona B del perfil radioelectroforético (fig. 2a). La zona C es atribuible a impurezas radioquímicas no proteicas que poseen escasa movilidad electroforética pero un Rf cromatográfico similar al yoduro.

*Secuencia 1C2E (fig. 2 d):* el  $^{125}\text{I}^-$  aparece en la zona A. La zona B muestra una sola mancha radiactiva imputable a la  $^{125}\text{I}$ -HTSH, la que no posee movilidad electroforética luego de realizada la cromatografía. La zona C corresponde a impurezas radioquímicas no proteicas.

La figura 3 muestra los resultados del control de la iodación de Fab antirrábico, cuyo análisis es similar al de la  $^{125}\text{I}$ -HTSH. Resultados del mismo tipo fueron observados con todas las proteínas indicadas en la Tabla I.

#### CONTROL DEL BLANCO DE MARCACION

El perfil radioelectroforético del blanco de marcación (fig. 4 a) muestra el pico de  $^{125}\text{I}^-$  en la zona A. En la zona B, la que en las figuras 2a y 3a corresponde a la proteína radioiodada, aparece una amplia zona radiactiva imputable a impurezas no proteicas. El perfil radiocromatográfico del mismo producto posee un solo pico de radiactividad (fig. 2 b).

Los barridos de las corridas bidimensionales pueden ser igualmente observados.

*Secuencia 1E2C (fig. 4 c):* el  $^{125}\text{I}^-$  aparece en la zona A. La zona C es imputable a impurezas radioquímicas no proteicas que corresponden a la zona B del perfil radioelectroforético (fig. 4 a). Estas impurezas, cuya movilidad electroforética es baja, poseen un  $R_f$  igual al del yoduro cuando se los analiza en una corrida cromatográfica.

*Secuencia 1C2E (fig. 4 d):* la zona A corresponde al  $^{125}\text{I}^-$ . La zona C es atribuible a impurezas radioquímicas no proteicas. El pico único de radiactividad, que aparece en el perfil radiocromatográfico (fig. 2 b), corresponde a la suma de las actividades de las zonas A y C: dicho pico único es separado en sus componentes durante la corrida electroforética.

#### RESULTADOS DE RENDIMIENTO Y ACTIVIDAD ESPECIFICA

Los rendimientos de marcación calculados a partir de perfiles electroforéticos y cromatográficos,  $R_E$  y  $R_C$  respectivamente, y sus correspondientes actividades específicas, así como la relación  $R_E/R_C$ , se indican en la Tabla I para las diferentes proteínas marcadas y analizadas con la metodología propuesta en el presente trabajo.

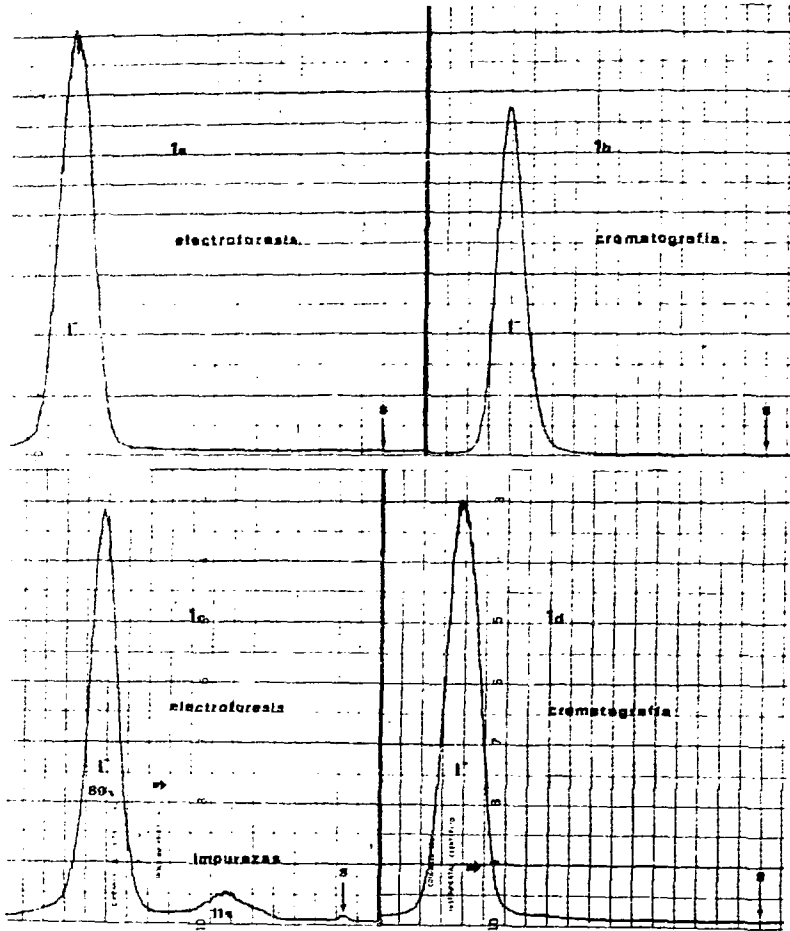


FIGURA I  
Control de  $^{125}\text{I}^-$

- a) Perfil radioelectroforético de una muestra de  $^{125}\text{I}^-$  radioquímicamente pura. S: siembra.
- b) Perfil radiocromatográfico de una muestra de  $^{125}\text{I}^-$  radioquímicamente pura. S: siembra.
- c) Perfil radioelectroforético de una muestra de  $^{125}\text{I}^-$  con 11 por ciento de impurezas radioquímicas. S: siembra.
- d) Perfil radiocromatográfico de una muestra de  $^{125}\text{I}^-$  con 11 por ciento de impurezas radioquímicas. S: siembra.

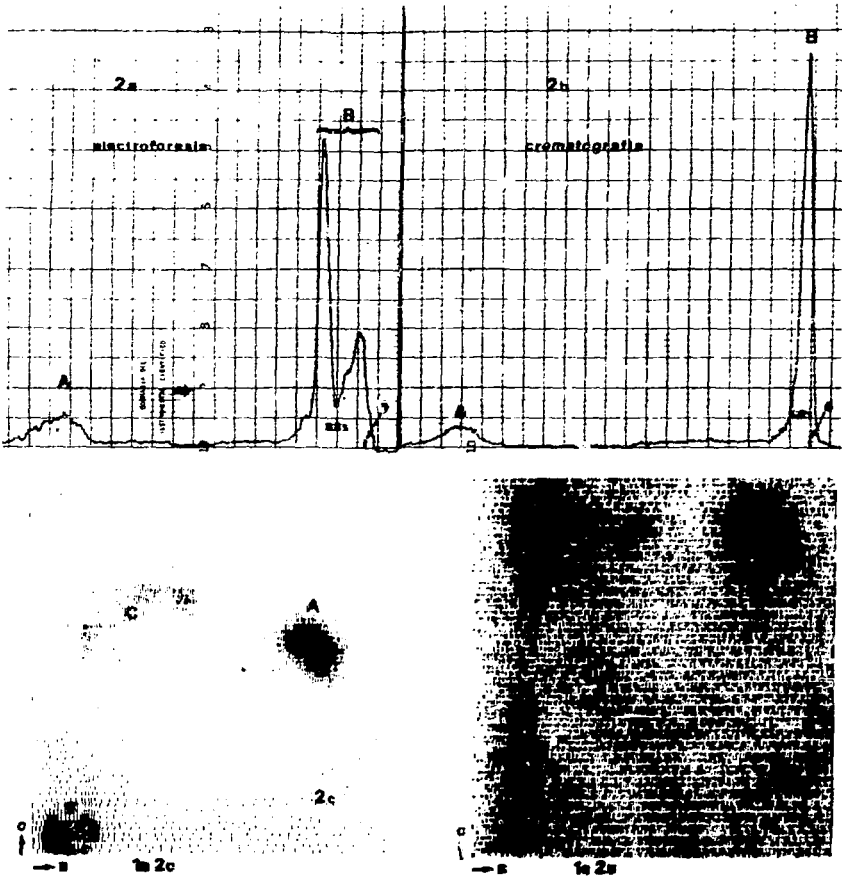


FIGURA 2  
Control de HTSH radioiodado

- a) Perfil radioelectroforético.
  - b) Perfil radiocromatográfico.
  - c) Barrido de la corrida bidimensional de secuencia 1E2C.
  - d) Barrido de la corrida bidimensional de secuencia 1C2E.
- A: zona correspondiente al  $^{125}\text{I}$ .
- B: zona correspondiente a la proteína marcada.
- C: zona correspondiente a impurezas radioquímicas no proteicas.
- S: siembra.

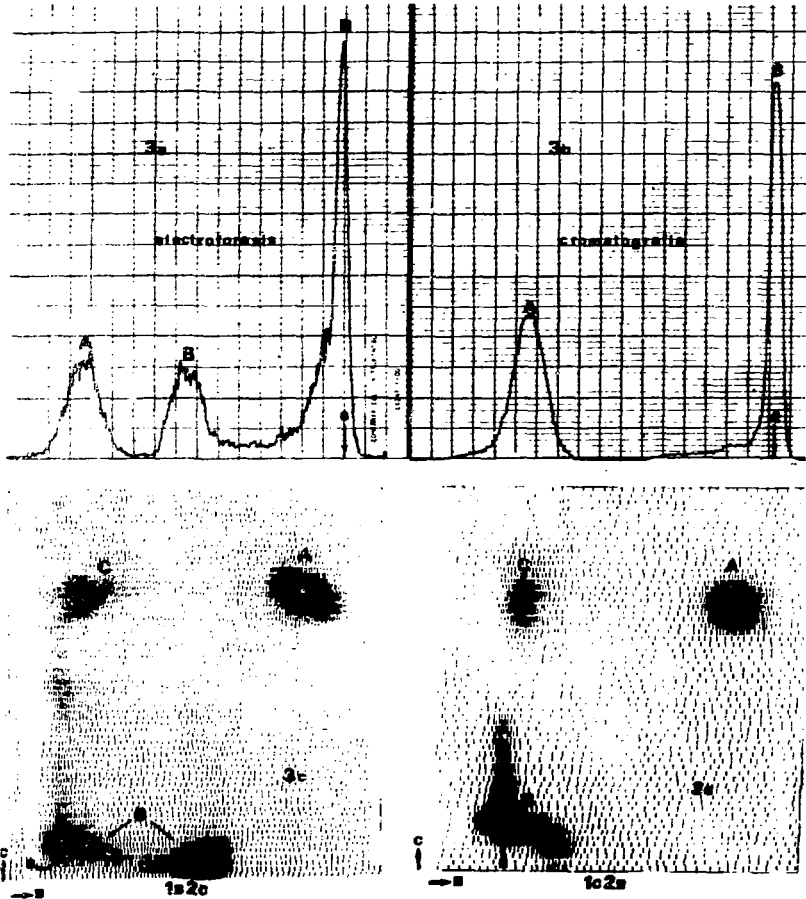


FIGURA 3

Control de Fab anti-rábico radioiodado

- a) Perfil radioelectroforético.
- b) Perfil radiocromatográfico.
- c) Barrido de la corrida bidimensional de secuencia 1E2C.
- d) Barrido de la corrida bidimensional de secuencia 1C2E.

A: zona correspondiente al  $^{125}\text{I}$ .

B: zona correspondiente a la proteína marcada.

C: Zona correspondiente a impurezas radioquímicas no proteicas.

S: Siembra.

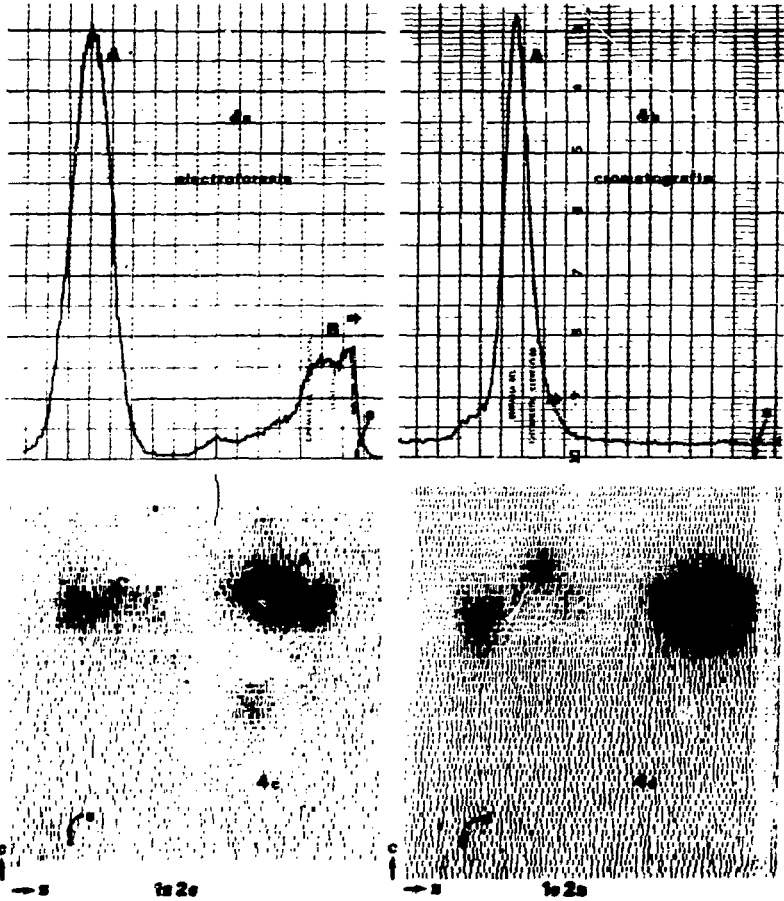


FIGURA 4  
Control del blanco de marcación.

- a) Perfil radioelectroforético.
- b) Perfil radio cromatográfico.
- c) Barrido de la corrida bidimensional de secuencia 1E2C.
- d) Barrido de la corrida bidimensional de secuencia 1C2E.

A: zona correspondiente al  $^{125}\text{I}$ .

B: (fig. 4 a) y C (fig. 4 c y 4 d): impurezas radioquímicas no proteicas.

S: siembra.



TABLA I  
 Rendimientos porcentuales y actividades específicas (S) obtenidas  
 de los resultados cromatográficos y electroforéticos.

PROTEINA	CROMATOGRAFIA		ELECTROFORESIS		RELACION $R_E / R_C$
	$R_C$	S	$R_E$	S	
	%	$\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$	%	$\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$	
RTSH	37	75	94	193	2,6
	33	85	100	256	3,0
	59	146	95	235	1,6
HTSH	52	104	95	191	1,8
	80	188	88	212	1,1
	48	133	88	241	1,8
Insulina	38	44	86	100	2,3
	47	58	95	120	2,0
	52	55	87	82	1,7
HLH	25	88	92	284	3,7
	65	98	93	140	1,4
	35	74	82	172	2,3
HFSH	25	65	70	175	2,8
	52	99	84	160	1,6
	45	99	92	202	2,0
Fab antirrábico	52	122	73	171	1,4
	41	133	63	204	1,5
	58	60	79	82	1,4
Gastrina	25	126	80	403	3,2
	61	335	91	500	1,5
	37	177	88	415	2,4

## DISCUSION

El objeto del presente trabajo consiste en una contribución a la normalización metodológica de la técnica de marcación con cloramina-T y de la evaluación de la actividad específica de las proteínas radiiodadas, con el objeto de utilizarlas correctamente en radioinmunoensayos.

En primer lugar debe mencionarse que el yoduro -  $^{125}\text{I}$  utilizado para la marcación debe tener menos que 5 por ciento de impurezas radioquímicas, para poder lograr una proteína radiiodada con buena actividad inmunológica. La figura 1 demuestra que el control de las muestras de  $^{125}\text{I}$  debe realizarse mediante electroforesis, ya que la cromatografía no permite evidenciar algunas impurezas radioquímicas. También hemos observado que el rendimiento de marcación decrece a medida que la muestra de  $^{125}\text{I}$  envejece.

Por otra parte, hemos logrado mejorar los resultados disminuyendo las cantidades de cloramina-T y metabisulfito de sodio. El rendimiento de marcación óptimo y las proteínas radiiodadas con mejores actividades inmunológicas, fueron obtenidos con 3,6  $\mu\text{g}$  de cloramina-T y 9,6  $\mu\text{g}$  de metabisulfito de sodio, lo que representa 28 y 25 veces menos respectivamente, que las cantidades indicadas por Greenwood y col. (2). En estas condiciones hemos marcado las proteínas indicadas en la tabla I con la actividad específica adecuada, con las cuales se han logrado obtener curvas de radioinmunoensayo sensibles y reproducibles con uniones inespecíficas siempre menores que 5 por ciento.

Uno de los métodos utilizados para la determinación de la actividad específica, consiste en su cálculo a partir del rendimiento de marcación obtenido en corridas electroforéticas. Sin embargo, el perfil radioelectroforético del producto obtenido en la preparación del blanco de marcación, en el que teóricamente debiera observarse un pico único de radiactividad, muestra en realidad una zona radiactiva en el lugar correspondiente a la proteína marcada, la que en este caso no está presente en la solución analizada (zona B de la fig. 4 a). Por lo tanto, la zona B de los perfiles radioelectroforéticos de las proteínas marcadas (figs. 2a y 3a) corresponden a la suma de las radiactividades atribuibles a la proteína marcada y la que aparece en la misma zona cuando se analiza el blanco de marcación. Estos resultados demuestran que el rendimiento de marcación y por lo tanto la actividad específica, calculados por este método, son más elevados que los valores reales. Debe señalarse que estas observaciones parecen apoyar la hipótesis de que aquellas fracciones clásicamente consideradas como proteína "dañada", corresponden en parte al producto visualizado en la zona B de los perfiles radioelectroforéticos del blanco de marcación. La misma conclusión puede extraerse del análisis de

los barridos de las corridas bidimensionales. La electroforesis corrida en cellogel y papel Whatman N° 3 MM, dió resultados similares.

Estos problemas nos indujeron a realizar el análisis de las proteínas radiiodadas y del blanco de marcación mediante diferentes métodos cromatográficos, de los cuales elegimos como la técnica más rápida y sencilla, la cromatografía ascendente en papel Whatman N° 1 durante 2 horas en la oscuridad, utilizando metanol al 70 por ciento como solvente (12). El perfil radiocromatográfico del blanco de marcación muestra un pico único de radiactividad en la zona del yoduro. No aparece radiactividad en o cerca del origen de los cromatogramas (fig. 4b). Las figuras 2b y 3b demuestran que los perfiles radiocromatográficos de las proteínas marcadas exhiben un pico radiactivo correspondiente a la proteína radiiodada (zona B) y otro pico neto en la zona del  $^{125}\text{I}^-$  (zona A).

El análisis de los barridos de las corridas bidimensionales de HTSH (figs. 2c y 2d), Fab antirrábico (figs. 3c y 3d) y las otras proteínas indicadas en la Tabla I, así como las correspondientes al blanco de marcación (figs. 4c y 4d), permite estudiar mejor este problema. En efecto, en las figuras 2d, 3d y 4 d se visualiza perfectamente que la mancha que corre como yoduro en la cromatografía, o sea la que corresponde al pico A de las figuras 2 b, 3 b y 4 b respectivamente, se descompone principalmente en una mancha que posee la movilidad electroforética del yoduro (zona A de las figuras 2 d, 3 d, y 4 d) y otra que prácticamente no posee movilidad electroforética (zona C de las figs. 2 d, 3 d y 4 d). Esta última mancha integra junto con la correspondiente a la proteína marcada, el pico B del perfil radioelectroforético (figs. 2 a y 3 a). Por otra parte las figuras 2 c y 3 c permiten observar que la radiactividad que permanece en el origen de la corrida electroforética (pico B de las figs. 2 a y 3 a) se descompone principalmente en las manchas que prácticamente no corren cromatográficamente (zona B de las figs 2 c y 3 c) y otra u otras manchas que poseen un Rf cromatográfico similar al yoduro (zona C de las figs 2 c y 3 c). Este último análisis permite justificar la diferencia entre los rendimientos obtenidos por electroforesis y cromatografía. Si bien la causa de la diferencia entre los perfiles radioelectroforéticos y radiocromatográficos de los productos obtenidos en el blanco de marcación no puede explicarse con claridad, resulta evidente que los productos radiactivos que se encuentran en la zona B de la electroforesis del blanco de marcación (fig. 4 a), corren como el yoduro en la radiocromatografía. La discusión anterior permite concluir que el análisis electroforético proporciona resultados incorrectos y que los productos que permanecen en o cerca del origen de los cromatogramas en los que se analizan las proteínas marcadas, corresponden realmente a las proteínas radiiodadas.

En las electroforesis de la marcación de HTSH, Fab antirrábico y otras proteínas, se puede observar dos fracciones protéicas, mientras que en los perfiles radiocromatográficos aparece solamente un pico radiactivo debido a la proteína marcada. Esta diferencia se nota más claramente en los barridos de las corridas bidimensionales, en los cuales puede observarse que en secuencia

IE2C (figs. 2 c y 3 c) existen dos manchas radiactivas en la zona de la proteína marcada, mientras que en la secuencia IC2E (figs. 2 d y 3 d) aparece solamente una mancha. Estos resultados deben atribuirse probablemente a la precipitación de las proteínas por acción del metanol utilizado como solvente cromatográfico.

Como es sabido, las curvas de desplazamiento de radioinmunoensayos sucesivos son reproducibles solamente cuando se hace reaccionar la misma masa de proteína marcada, la que se calcula a partir de su actividad absoluta y de su actividad específica. Si la relación  $R_E/R_C$ , que es igual a la relación entre las respectivas actividades específicas, fuese siempre constante, la cantidad de proteína radiiodada usada en ensayos sucesivos sería siempre la misma, independientemente del método utilizado para calcular la actividad específica, siempre y cuando se utilice la misma técnica en todos los ensayos. Sin embargo, dado que la relación  $R_E/R_C$  varía de una marcación a otra (ver tabla I), existirán diferencias sustanciales de la masa de proteína marcada puesta a reaccionar, si ésta es calculada por uno u otro método. Puede demostrarse que las curvas de radioinmunoensayo realizadas con las proteínas marcadas de acuerdo al método propuesto poseen una ordenada en el origen,  $B_0$ , de  $50 \pm 4$  por ciento; ello siempre y cuando la masa de proteína radiiodada utilizada en el radioinmunoensayo y en la valoración del antisuero haya sido determinada a partir de la actividad específica obtenida de los perfiles radiocromatográficos. Si las actividades específicas se calculan de resultados electroforéticos, aparecen diferencias sustanciales en los distintos valores de  $B_0$ .

Por lo tanto, puede concluirse que las actividades específicas determinadas mediante el método cromatográfico, representan los valores reales de dicha magnitud, lo que implica una mejor normalización de los radioinmunoensayos. Es evidente que todas las actividades específicas a las que nos referimos en este trabajo, tanto las determinadas por cromatografía como electroforesis, deben considerarse en realidad actividades específicas promedio (ver Introducción), debido al carácter estadístico del proceso de iodación. También resulta claro que para el análisis rutinario de los productos de marcación, es suficiente la realización de una cromatografía ascendente monodimensional, lo que representa un método simple, rápido y preciso para la determinación de la actividad específica real de las proteínas radiiodadas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Sr. V.H. Rizzo por su asistencia técnica durante el trabajo experimental y a la Dra. S. García-Pomé (II Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires), a la Dra. M. Butmasch (Comisión Nacional de Energía Atómica), al Dr. S. Damilano (Instituto de Análisis Clínicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) y a la Dra. O. Ogawa (Policlínico Alejandro Posadas, Buenos Aires) por los resultados de los diferentes radioinmunoensayos utilizados en el presente trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) HUNTER W.M. y GREENWOOD F.C. *Nature*, Lond. 194, 465 (1962).
- 2) GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. y GLOVER J.C. *Biochem. J.* 89, 114 (1963).
- 3) HALLABA E., EL WETERY A.S. y AZZAM R.: Labelling of Human Serum Albumin with Radioiodine, en "Symposium on new developments in radiopharmaceuticals and labeled compounds", I.A.E.A. and W.H.O., pp. 123-130. Copenhagen, Marzo 26-30 (1973).
- 4) TICHELL J.J. y JOHANSSON B.G.: *Biochim. Biophys. Acta* 251, 363 (1971).
- 5) CATT K.J., DUFAY M.L. y TSURUHARA T.: *Clin. Endocr. and Metab.* 3, 125 (1971).
- 6) BARMASCH M., NIETO DE NUÑEZ G., ALTSCHULER N. y MITTA A. E.A. C.N.E.A. N° 346 (1973).
- 7) KIRKHAM K.E. y HUNTER W.M. (Editores): "Radioimmunoassay Methods". Section I. Iodination. Churchill Livingstone, Edimburgh and London (1971).
- 8) HUNTER W.M.: "Radioimmunoassay", en: Weir D.M. (Editor): "Handbook of Experimental Immunology", Volume I, Chapter 17. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburgh, Melbourne, 2nd. Edition (1973).
- 9) FLYNN F.V. y DE MAYO P. *Lancet* 261, 235 (1951).
- 10) GLOVER J.S., SALTER D.N. y SHEPHERD B.P. *Biochem J.* 103, 120 (1967).
- 11) CARO R.A., CISCATO V.A., G'ACOMINI S.M.V., KURCBART H., QUIROGA S. y RADICELLA R. *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes* (En prensa).
- 12) CORREIA R.J., MITTA A.E.A., NICOLINI J.O., NUÑEZ G.N., QUIROGA, S., y RADICELLA R. *Manual de Controles Radiofarmacéuticos*, p. 64, C.N.E.A. (1971).



