

# GC PROTEINA PLASMATIKOAREN SUBTIPAKETA, ISOELEKTROFOKATZE ETA INMUNOTRANSFERENTZIAREN BIDEZ

Oscar Garcia Fernandez & Edorta Gonzalez Camino

## SUMMARY

*A method is described for the identification of group specific component (GC) subtypes by isoelectric focusing in micro-ultrathin polyacrylamide gels using a mixture of separators and narrow gradient of pH (4'5-5'4) followed by immunoblotting and detected using a double antibody enzyme immunoassay.*

## LABURPENA

*GC proteina plasmaticoaren identifikaziorako metodo bat deskribatzen da; poliakrilamidazko mikrogeletan buruturiko isoelektrofokatzetechnikaren bitartez egin, banatzaileen nahastea eta 4'5etik 5'4erainoko pH-gradiente estua erabiliz. Jarraian mintzerako immunotransferentzia egin da, entzimoinmunosaiotz detektatzen delarik.*

## SARRERA GISA

GC taldearen osagai espezifikoa alfa-2-globulina bat da, D bitaminaren garraioaz arduratzen da eta polimorfismo genetikoa erakusten du (1). Aipatu polimorfismoa Hirsefeld-ek (2) deskribatu zuen lehenbizi 1959.ean, agarezko geletan buruturiko immunoelektroforesiaren bidez. Sistema honek ohizko elektroforesiaren bitartez fenotipatzen denean bi alelo erakusten ditu; GC<sub>1</sub> eta GC<sub>2</sub>. Hala ere, Constans eta Viau-k (3) 1977.ean poliakrilamidazko geletako isoelektrofokatzetza hiru aleko, GC<sub>1S</sub>, GC<sub>1F</sub> eta GC<sub>2</sub> (zeintzuek sei fenotipo arrunt: 1F-1F, 1S-1S, 2-2,

1F-1S, 2-1F eta 2-1S determinatzen dituzten) erakusten dituela frogatu zuten. Gaur egun 120 bariante arraro baino gehiago deskribatu dira (4).

Detekzio-metodoak saio immunologikoe-tan oinarritzen dira. Metodoric erabiliena ondokoa da: antisero antiGC-ren bidezko immunofinkapena, Coomassie urdina eta Ponceau S-z burututako tindaketa jarraian zertzen delarik (5). Sentikortasuna handitu asmoz, zilar nitratozko tindaketa (6) ere erabili da. Hala-ber, beste metodo sentikorrako ageri dira; esaterako, GC xingolak immunotransferentziaz eta gero entzimoinmunosaiotz fokatzten dituztenak (7,8).

Lan honen helburua GC subtipaketarako metodo bat aurkeztea da, horretarako poliakrilamidazko mikrogeleak (elektrodoen arteko distantzia: 55 mm) erabiltzen dira, HEPES eta ACES banatzaileen nahastea pH-gradiente estuetan (4'5etik 5'4eraino) mikrogeletan daudelarik. Azkenik, immunotransferentzia burutzen da.

## MATERIALAK ETA METODOAK

### Tresna eta erreaktiboak

Isoelektrofokatzeari FBE-3000 (Pharmacia) eredu elektroforesirako ontzi batez eta 2303 Multidrive XL (LKB) energi iturri batez egin da. Erabiliriko erreaktiboak honakoak dira: akrilamida (Merck), N,N'-metilendiakrilamida (Merck), sakarosa (Sigma), persulfato amonikoa (Merck), pharmalyte pH 4'5-5'4 eta 2'5-5 (Pharmacia), HEPES (Merck), ACES (Merck), urea (Merck), Tween-20 (Merck), gelatina (Sigma), 4-kloro-1-naftola (Merck), behi-albumina % 30ean (Grifols), untxearen antiseroa (gizakiaren GC-ren kontra diharduena) (Dakopatts), txerriaren immunoglobulina (untxearenaren kontrakoa dena) (Dakopatts), tris(hidroximetil)aminometano (Merck), etanola (Merck) eta ur oxigenatua % 30ean pisua/bolumena (p/b) (Foret).

### Poliakrilamidazko mikrogelen prestakuntza

Akrilamidazko stock soluzioaren konposaketa ondokoa izan da: T = % 6,2, C = % 3,2 eta sakarosa % 12an (p/b). Anfilitoen eta stock soluzioari erantsitako banatzaileen kontzentrazioak hauexek izan dira:

- % 6 (b/b) pharmalyte, pH 4'5etik 5'4erainokoa delarik
- % 0,35 (b/b) pharmalyte, pH 2,5etik 5erainokoa delarik

- % 1,4 (p/b) HEPES
- % 0,7 (p/b) ACES

Nahastea desgasatu egin zen hamar minututan errotabaporean. Polimerizazioaren abiarazle bezala 15 µl persulfato amoniko (0,175 g/ml) erabili zen, stock soluzioaren 3 ml-ko. Gelak kristal silanizatuen (75 x 50 x 1mm) gainean eratu ziren, metakrilatozko moldeen gainean jarrita, kapilaritate-teknika erabili zelarik. Gelen azken dimentsioak 70 x 37,5 x 0,25 mm izan ziren eta nahastearen 1,5 ml gel bakoitzeko erabili zuten. Polimerizazioa 37°C-tan eta 10 minuturen buruan egin zen.

### Isoelektrofokatzeari-prozedura

Ez zen ez anolito eta ez katolitorik erabili: elektrodoak gelaren azalaren gainean zuzenki -55 mm-ko distantziara kokatu ziren.

Aurrefokatzeari 1W-etan (tentsioa eta intentsitatea mugarik gabe) burutu zen, 100 volt x orduraino. Laginak Whatman 3. zenbakia (0,5x1cm) paperaz eta katodotik 0,5 cm-ra aplikatu ziren. Fokatzeari aurrefokatzeari baldintza berdinekin hasi zen 200 volt x orduraino iritsi arte. Une horretan aplikagailuak langinetatik kendu egin ziren. Fokatzeari 2W-etan eta 100 volt x orduraino burutu zen.

### Inmunotransferentzia

GC xingolak polibinildifluorurozko (PVDF, Millipore) mintzetara kapilarki transferituak izan ziren. Mintzok hidrofoboak dira, horregatik alde aurretik 2-3 segundotan metanolez, 5 minutuz ur distilatuz tratatuak izan ziren, metanol hondarrak kentzeko. Geroxeago minutu batean PBS-z (tanpoi gatzadun fosfatoz) tratatu ziren.

Transferentziaren ostean, mintza PBS-en dagoen gelatinaz (% 1 p/b) tratatu zen agente blokeatzaile gisa iharduteko. Geroago, mintza 3 ordutan inkubatu zen, irabiaketa batera burutzen zelarik eta hurrengo nahastea erabiliz:

4,5 ml PBS-Tween 20 (% 0,02 b/b), 0,5 ml behi-albumina eta 10 µl untxearen antisero antiGC gizakiarena. Hiru garbiketa bigun egin ziren PBS-Tween 20 bakoitzak 10' irauten zuelarik. Ondoren bigarren antiseroa jartzen da. Honakoa: 4,5 ml PBS-Tween 0,5 ml behi-albumina eta 5 µl txerriaren immunoglobulinak (untxearenaren kontra diharduena eta peroxidazaz markatutakoak).

Iharduera peroxidasiakoa lortu zen mintza honako nahastean sartuz: 30 mg 4-kloro-1-naftola, 50 ml Tris-HCL 0,05 M tanpoia eta 50 µl ur oxigenatua % 30 p/b. Erreakzioa ur distilatuz gelditu zen.

### EMAITZAK ETA EZTABAIDA

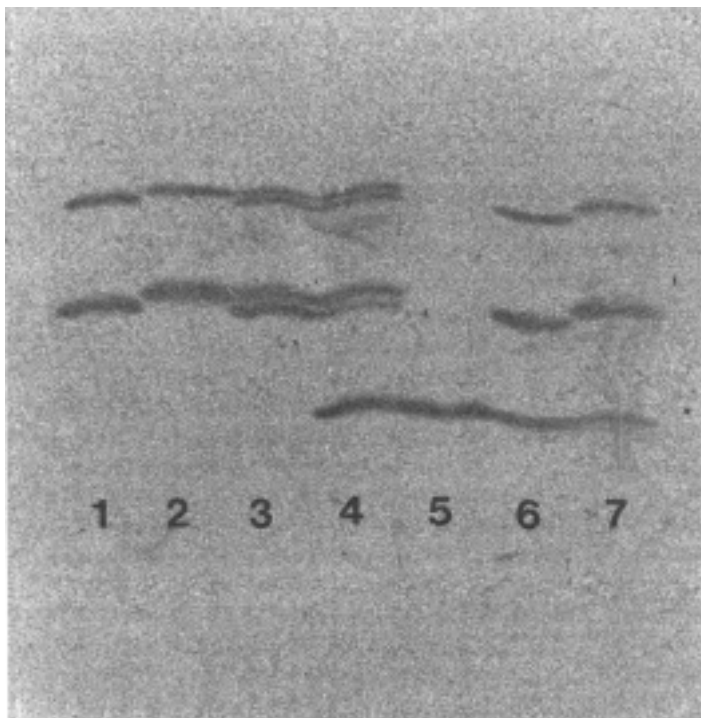
Lehenengo irudiak, goian aipaturiko teknikaz lorturiko sei GC fenotipo aman-komunak erakusten ditu. 1S eta 1F xingolen

arteko separazioa 1 mm-koa da. Laginak diluitu egin ziren 1:100 urea 6M-an, xingola sekundarioak (GC-aktinazko konplexuez osaturikoak) agertzeari ekiditeko (9).

### ONDORIOAK

GC proteina plasmaticoaren subtipaketa oso erabilgarria da aitatasun-azterketan nahiz odol- eta hazi-hondakinen ikerketa kriminalean. Teknika honekin, emaitza positiboa izanik, ziurta daiteke odola gizakiarena dela. Hau oso garrantzitsua da odol-hondarrekin arituz gero. Izan ere, hondarrak askotan oso urri direlako azterketa bat bakarra egin daiteke.

Beste aldetik, pH gradiente estuan (4,5-5,4) buruturiko isoelektrofokatzeteknikak erabiltzeak, HEPES eta ACES banatzaileak erabiltzearekin batera, GC proteina plasmati-



koaren subtipaketarako metodo arin eta ekonomikoa eskaintzen du.

Entzimoinmunosaioaren aplikazioa, mintzerako immunotransferentziaren ondoren egindakoa, oso metodo sentikorra da GC subtipoak detektatzeko; inmunoinkapena baino zehatzagoa, zilar nitratoz tindatu arren.

## ESKERRAK

Jaione Zaballari lan informatikoagatik eta Joseba Arnaiz eta Pablo Sedanori lan fotografikoagatik.

## BIBLIOGRAFIA

1. Thomas, W.C.; Morgan, H.G.; Connors, T.B.; Haddock, L.; Bills, C.E.; Hovord, J.E.: *Studies of antirickettic activity in sera from patients with disorders of calcium metabolism and preliminary observations on the mode of transport of vitamin D in human sera*. J. Clin. Invest. 38: 1078–1085 (1959).
2. Hirschfeld, J.: *Immunoelectrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins*. Acta Path. Microbiol. Scand. 47: 160–168 (1959).
3. Constans, J.; Viau, M.: *Group-Specific Component: Evidence for two subtypes of the GC 1 gene*. Science 198: 1070–1071 (1977).
4. Cleve, H.; Constans, J.: *The mutants of vitamin D binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system*. Vox. Sang. 54: 215–225 (1988).
5. Kido, A.; Oya, M.; Komatsu, N.; Shibata, R.: *A stability study on GC subtyping in bloodstains: Comparison by two different techniques*. Forensic. Sci. Int. 26: 39–43 (1984).
6. Westwood, S.A.: *Silver staining of immobilized Group-specific component GC on cellulose acetate membranes after isoelectric focusing in narrow pH interval gels*. Electrophoresis 6: 498–503 (1985).
7. Pflug, W.: *Isoelectric focusing of GC subtypes on reusable immobilized pH gradient gels followed by detection with antibody conjugated alkaline phosphate* in Advances in Forensic Haemogenetics, I.B. Brinkmann and K. Henningsen, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 372–377 (1986).
8. Hoste, B.M.: *Advantages of enzyme immunoassay after blotting in bloodstain/grouping. Application to the GC subtypes* in Advances in Forensic Haemogenetics, I.B. Brinkman and K. Henningsen, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 382–385 (1986).
9. Budowle, B.: *A method for subtyping Group-specific component in bloodstains*. Forensic Sci. Int. 33: 187–196 (1987).