

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA HORMONA LUTEINIZANTE BOVINA. ^a

Martha Elizabeth Carranza Salas ^b

Eugenio Villagómez Amezcu Manjarrez ^c

Rosario Neri Basurto ^b

Angélica Salas Valdés ^b

RESUMEN.

Se purificó hormona luteinizante bovina (bLH) de adenohipófisis congeladas. La extracción se realizó con agua y acetato de amonio-etanol, seguido de una purificación secuencial por cromatografías en CM-celulosa y DEAE-celulosa, con un rendimiento de 8.2 mg de proteína por Kg de adenohipófisis. La movilidad relativa en electroforesis nativa fue de 0.27, mientras que en SDS-PAGE en condiciones reductoras mostró un peso molecular de 35.4 kD. Su identificación inmunológica con Slot-blot, inmunoelectrotransferencia y radioinmunoanálisis se obtuvo con un anticuerpo contra LH ovina (oLH-CSU-204). Con este procedimiento se obtuvo una bLH de pureza y actividad inmunológica adecuadas para desarrollar sistemas analíticos como el RIA.

Palabras Clave: Hormona Luteinizante Bovina, bLH, Gonadotropinas, Purificación de gonadotropinas.

Tec. Pecu. Méx. Vol. 32 No. 1, (1994)

INTRODUCCION

La disponibilidad de sistemas analíticos homólogos para estudiar las concentraciones hormonales durante los diferentes estados fisiológicos de los mamíferos que alimentan al hombre, está garantizada cuando se cuenta con la hormona altamente purificada para el desarrollo de dichos sistemas.

En el caso de las hormonas hipofisarias bovinas, de las que se ha informado que son poco activas en relación a las de otras

especies (1) no solo hay una escasa información acerca de los procedimientos de obtención a partir de las hipófisis de la especie, sino que también es magra la disponibilidad de los patrones de referencia, según se aprecia en los anuncios del "National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" (NIADDK) en las revistas científicas (2).

La importancia de obtener hormona luteinizante bovina (bLH) altamente purificada radica en el hecho de que se trata de una hormona clave en los procesos reproductivos de cualquier especie; que es de difícil disponibilidad en el mercado y que es una de las hormonas con mayor demanda por los investigadores involucrados en el estudio de la reproducción animal. Así, el estudiar la fisiología reproductiva de bovinos con sistemas homólogos evitaría problemas de especificidad de especie y de exactitud para la cuantificación de la concentración de la LH bovina, que se

a Recibido para su publicación el 10 de marzo de 1993

b Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, Circuito Interior, A.P. 70228, México, D.F. Dirección actual del primer autor: Centro de Neurobiología, Circuito Interior, C.U. A.P. 70228, México, D.F.

c CENID-Microbiología. INIFAP-SARH. Km 15.5, Carretera México-Toluca, Palo Alto, C.P.05110.

La correspondencia y solicitudes de separatas deberán dirigirse a la Dra. Angélica Salas Valdés

presentan cuando se emplean sistemas heterólogos (3, 4).

La hormona luteinizante hipofisaria se ha extraído de varias especies: porcina (5), ovina (6), rata (7), equina (8), mono (9) y humana (10, 11), mientras que la bovina fué extraída por Reichert (12) y más tarde por Papkoff (11). Se trata de una glicoproteína que como la estimulante del folículo (FSH) y la estimulante de la tiroides (TSH), está constituida por dos subunidades: alfa y beta, ambas glicosiladas y unidas entre sí por un enlace no covalente, cuya secuencia de aminoácidos tiene semejanzas entre las diferentes especies (13). De algunas de ellas se conoce su peso molecular (PM), punto isoelectrico (pI) y se ha demostrado su heterogeneidad de carga (11, 14).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología eficiente para la extracción y purificación de la bLH a partir de su fuente natural (adenohipófisis bovinas), así como su caracterización bioquímica, con el fin de disponer de una hormona que pueda ser utilizada en los laboratorios de radioinmunoanálisis (RIA).

MATERIALES Y METODOS

Obtención de la bLH.

Recolección de la Materia Prima: Se colectaron 500 hipófisis de bovinos de diferente edad y sexo, recién sacrificados en el rastro de Ferrería. Las glándulas se depositaron en Nitrógeno líquido para su transporte y en el laboratorio se almacenaron a -70 C hasta su utilización.

Extracción: Se disecaron los lóbulos anteriores (665g), que se licuaron y homogeneizaron en una solución acuosa que contenía al inhibidor de proteasas PMSF (Phenylmethanesulphonylfluoride) al 0.02 %, pH 7.2. La extracción y purificación se realizaron según la técnica de Stockell-Hartree (10), modificada en el laboratorio en la molaridad del segundo amortiguador del intercambio catiónico. El extracto se centrifugó a 8000 rpm (Refrigerated

Centrifuge, Sorvall RC5-B, Rotor GSA de ángulo fijo). Su sobrenadante se dializó con un amortiguador de acetato de amonio (Baker) al 10 % pH 5.1, con etanol (Baker) en una relación de 6:4, durante 48 horas y cambios cada 8 horas. El residuo se extrajo dos veces con agitación enérgica en el mismo amortiguador, durante 48 horas en presencia de PMSF, seguido de centrifugación como ya se señaló antes. Tanto al extracto acuoso inicial como los sobrenadantes de la centrifugación de los extractos salinos del residuo, se les ajustó el pH a 5.1 con ácido acético glacial (Baker); las proteínas se precipitaron con dos volúmenes de etanol, agregado gota a gota y en agitación magnética continua, la que se prolongó una hora más, después de añadido el etanol. La solución se dejó en reposo durante 48 horas, al cabo de las cuales se sifoneó el sobrenadante y el precipitado se recuperó por centrifugación a 8000 rpm. Este producto se designó como extracto glicoproteico (GLP).

Purificación: El GLP se aplicó a una columna de Carboximetil-celulosa (CM-celulosa, Sigma) previamente activada y equilibrada con acetato de amonio 0.005 M pH 5.1, que se eluyó secuencialmente con un gradiente discontinuo de: acetato de amonio 0.005 M pH 5.1, acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y acetato de amonio 1 M/glicina 0.1 M pH 9.5. Se obtuvieron así las fracciones observadas en la Figura 1. Por el comportamiento cromatográfico descrito en la literatura (15) así como por la electroforesis nativa, se sabe que la fracción CM-2ab contiene la mayor parte de LH, por lo que el procedimiento de purificación que a continuación se describe, se refiere exclusivamente a dicha fracción. Esta se repurificó en una columna de intercambio aniónico, Dietil-etilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa, Sigma) y se eluyó con un gradiente escalonado de: Gly 0.1 M pH 9.5, acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y acetato de amonio 1 M pH 5.1. Se obtuvieron así las fracciones observadas en la Figura 2, las que se

dializaron con agua desionizada y se liofilizaron. Todo el proceso de extracción y purificación se realizó a 4 C.

Caracterización de la bLH

Cuantificación de Proteína: Se hizo según el método de Lowry y col. (16), modificado por Hartree (17) con una curva patrón de albúmina sérica bovina y en concentraciones de 10 a 100 µg/ml.

Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (PAGE): El patrón electroforético y la movilidad relativa (Rf) de los productos en cada paso de extracción y purificación, así como de la muestra pura, se obtuvieron de geles en tubo, al 7 % pH 8.3, según la técnica de Nicoll y col. (18), a una corriente constante de 1.5 mA (concentrador) y 3 mA por gel (resolvedor).

Electroforesis en geles de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS): Los pesos moleculares (PM) aparentes se determinaron con electroforesis en placa según la técnica de Laemmli (19), a voltaje constante: 70 V en el gel concentrador y 140 V en el resolvedor. Esta electroforesis se realizó en condiciones no reductoras y reductoras.

En ambos casos los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.02 % disuelto en isopropanol al 25 % y ácido acético al 10 %; la decoloración se hizo con isopropanol al 10 % / ácido acético al 10 %.

Identificación inmunológica con slot-blot: Se realizó según la técnica de Towbin (15) con modificaciones. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm, Bio-Rad), en una cámara de Hybri-Slot (BRL-GIBCO). Se aplicaron 100 ng de las siguientes hormonas: CM-2ab-DEAE1ab, bLH (USDA-bLH-B-5, AFP-5500), FSH ovina (NIADDK-FSH-RP-1, AFP-56790), FSH humana (LER 907) y TSH ovina (NIH-TSH-S8). Después de saturar la membrana de nitrocelulosa con PBS-BSA al 3 %, se incubó con un anticuerpo dirigido contra LH ovina (CSU-204) a una dilución

1:800 por dos horas a 4 C. Se realizó otra incubación con un segundo anticuerpo anti IgG conjugado con peroxidasa (Zymed), en una dilución 1:500 a 4 C durante una hora. El revelado se hizo con una solución de 4-cloro-1-naftol, 30 mg; metanol, 10 ml; PBS, 50 ml; H₂O₂ al 30 %, 50 µl. La reacción se paró con agua desionizada.

Inmunoelctrotransferencia: Se llevó a cabo según la técnica de Towbin (15) con modificaciones. Después de elaborar una electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad), con un amortiguador de TRIS 25 mM, Gly 192 mM, metanol al 20 %, pH 8.3, a una corriente de 200 mA durante sesenta minutos, en refrigeración. La membrana de nitrocelulosa se saturó con PBS-BSA 3 %; luego se incubó con un anticuerpo dirigido contra oLH (CSU-204) diluido 1:1000, durante ciento ochenta minutos. Después se incubó con un segundo anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad) diluido 1:500, durante noventa minutos. Finalmente el revelado se realizó como se indicó para el slot-blot.

Identificación por RIA: Se realizó con un RIA heterólogo para bLH según la técnica de Niswender (4). En el ensayo se corrió una curva de referencia con bLH pura (USDA-bLH-B-5), en la que se hizo una incubación por 24 horas con un primer anticuerpo dirigido contra oLH (CSU-204) diluido 1:30 000; se agregó ¹²⁵I-bLH y después de cuarenta y ocho horas se añadió un segundo anticuerpo anti IgG de conejo diluido 1:20. Al mismo tiempo se corrieron seis concentraciones de la fracción CM-2ab-DEAE-1ab, comprendidas en el intervalo de la curva patrón y con el mismo protocolo.

Los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo, obtenidos con suero bovino por duplicado y a tres niveles de dosis fueron: dosis alta (20.87ng) 6.26 % y 15.34 %, dosis media (13.45 ng) 4.23 % y

CUADRO 1. RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DURANTE EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA LH BOVINA, SEGÚN LA TÉCNICA DE LOWRY (16) MODIFICADA POR HARTREE (17). LOS DATOS SE REFIEREN A 1 KG. DE ADENOHIPÓFISIS.

MUESTRA	RENDIMIENTO DE PROTEINA (mg)
GLP	1981
CM-2ab	359
CM-2ab-DEAE-1ab	8.2

CUADRO 2. COMPARACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA bLH SEGUIDO EN EL LABORATORIO, CON RESPECTO AL INFORMADO POR EL "NATIONAL HORMONE AND PITUITARY PROGRAM".

	USDA-bLH-B-5 (AFP 5500)	(CM-2ab-DEAE-1ab)
	NIADDK-oLH-26 (AFP 5551-B)	
Almacenamiento	En congelación	A - 70 C
Deslipidización	Con acetona	No se hizo
Homogenización	No se hizo	En presencia de inhibidores de proteasas
Extracción	Con AcONH ₄ y etanol pH 5.1 por 48 h	Diálisis de 48 h con AcONH ₄ 10% etanol pH 5.1 y extracción con el mismo amortiguador por 48 h
Purificación	En CM-celulosa y DEAE-celulosa; en CM-celulosa se eluyó con AcONH ₄ (no se indica la concentración) y en DEAE-celulosa se eluyó con Gly pH 9.5 (no se indica la concentración). En sephadex G-100	En CM-celulosa se eluyó con AcONH ₄ 0.1 M pH 6.8. En DEAE-celulosa se eluyó con Gly 0.1 M pH 9.5

CUADRO 3. PESOS MOLECULARES CALCULADOS PARA LA bIH PURIFICADA Y LA bIH Y oLH PATRONES. DETERMINADOS EN SDS-PAGE AL 12.5%, pH 8.6 EN CONDICIONES NO REDUCTORAS..

bIH USDA-bLH B-5	oLH NIADDK-oLH-26	bIH CM2ab-DEAE-1ab
(d)	(d)	(d)
* 95 000	* 95 000	* 97 000
		* 87 000
		70 700
* 48 900	* 48 900	* 48 900
		33 800
* 30 200	* 30 200	
16 900		
		* 10 400
* Bandas mayoritarias		

CUADRO 4. PESOS MOLECULARES CALCULADOS PARA LA bIH PURIFICADA Y LA bIH Y oLH PATRONES. DETERMINADOS EN SDS-PAGE AL 12.5%, pH 8.6 EN CONDICIONES REDUCTORAS..

bIH USDA-bLH B-5	oLH NIADDK-oLH-26	bIH CM2ab-DEAE-1ab
(d)	(d)	(d)
95 500	95 500	
	95 100	
85 100		
74 100	74 100	
		64 500
* 61 600	* 61 600	
* 50 100	* 50 100	50 100
41 600	41 600	
		* 35 400
		33 100
* 31 600	* 31 600	
* 21 300	* 21 300	
		* 15 400
		10 400
* Bandas mayoritarias		

CUADRO 5. BANDAS OBTENIDAS DE UNA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA. LA INMUNOTINCIÓN SE LLEVÓ A CABO CON UN PRIMER ANTICUERPO ESPECÍFICO PARA oLH (CSU-204) Y UN SEGUNDO ANTICUERPO ANTI IgG CONJUGADO CON PEROXIDASA (Bio-Rad).

bLH (CM-11ab-DEAE-1ab)	bIH- (USDA-bLH B-5)	oLH (NIADDK-oLH-26)
(d)	(d)	(d)
	74 000	
	61 600	
50 100	50 100	50 100
	41 600	41 600
35 400		
15 400		

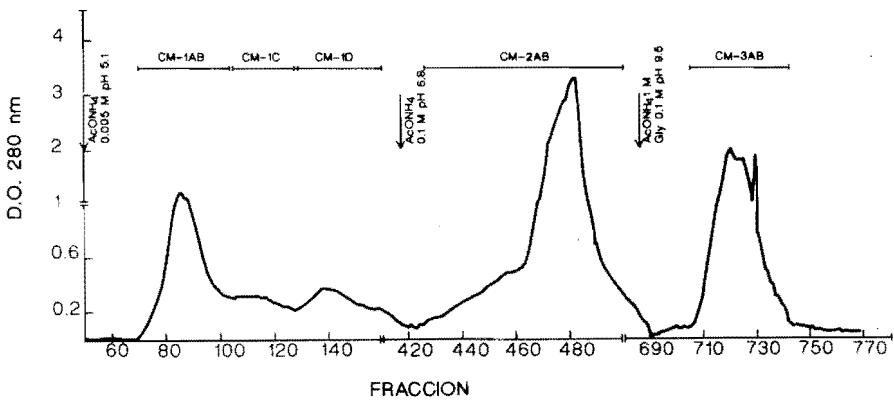


Figura 1. Cromatografía del Extracto Glicoprotéico (1.03 g de polvo / 837 mg de proteína / 28 ml) en una columna de CM-celulosa de 4.5 x 44 cm. Se colectaron fracciones de 5 ml a un flujo de 25 ml/h

10.37 %, dosis baja (0.92 ng) 5.49 % y 13.46 %, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Los rendimientos de los productos obtenidos con el procedimiento descrito se presentan en el Cuadro 1. Los dos primeros extractos glicoproteicos dieron origen a 1981 mg de proteína por kg de adenohipófisis. La purificación de estos extractos en CM-celulosa (Fig.1) produjeron la fracción CM-2ab, con 359 mg de proteína por kg de adenohipófisis y su repurificación en DEAE-celulosa (Fig.2) dió origen a 8.2 mg de proteína por kg de adenohipófisis de la fracción CM-2ab-DEAE-1ab.

Aunque el comportamiento cromatográfico en CM-celulosa fue semejante al obtenido por Stockell-Hartree (10) en la fracción que contenía la LH, debe hacerse notar que con la modificación introducida (dis-

nición de la fuerza iónica del segundo eluyente), se obtuvo una tercera fracción (Fig. 1), que por su movilidad electroforética (datos no mostrados) sugiere diferentes propiedades ácido-básicas a las de la LH y su identificación continúa en este laboratorio. El rendimiento de la CM-2ab-DEAE-1ab (bLH) es menor que el informado por otros autores (12, 20), lo que puede explicarse porque solamente se utilizó la fracción "CM-2ab-DEAE-1ab", la cual corresponde a una parte de la proteína no retenida en DEAE-celulosa, ya que se encontró con PAGE, que las fracciones "CM-2ab-DEAE-1c" y "CM-2ab-DEAE-1d" (Fig.3) estaban aparentemente contaminadas con un componente menos catiónico que la banda considerada como LH (20, 21, 22). El rendimiento obtenido en este trabajo es semejante al informado para la LH de rata (23) y la LH equina (12), y menor que el de la LH ovina (20) y de la porcina (5). A pesar de este bajo rendimiento, lo obtenido es suficiente para caracterizar la hormona, para inducir su

anticuerpo, así como para desarrollar su correspondiente sistema analítico de RIA y/o ELISA.

El patrón electroforético del GLP (Fig.4) es similar al informado por Stockell-Hartree (10) y Cheng (21). La CM-2ab-DEAE-1ab dio lugar a una sola banda catiónica, homogénea, con una movilidad relativa de 0.27, como lo informan Ward (22); Papkoff (20) y Cheng (21). Courte (24) observó heterogeneidad electroforética de la bLH, lo que también se ha observado en este laboratorio, cuando el producto final se somete a una diálisis alcalina de elevada fuerza iónica (resultados no mostrados).

Debe hacerse notar que cuando se compararon la bLH purificada en el laboratorio y los patrones de LH en PAGE (Fig. 5), se observó en estos últimos una banda mayoritaria con una movilidad electroforética más catiónica ($R_f = 0.09$) que la presentada por la fracción CM-2ab-DEAE-1ab. Además, los patrones a diferencia de la hormona purificada en el laboratorio, mostraron otras bandas de carácter aniónico, con movilidades relativas de 0.3 y 0.4.

La diferencia entre la movilidad electroforética de la banda mayoritaria de los patrones y la fracción CM-2ab-DEAE-1ab, se podría explicar por el efecto de las diferencias en los procedimientos de obtención de la LH; es decir, mientras los patrones se obtuvieron con la técnica clásica descrita por Stockell-Hartree (datos indicados en las especificaciones del NIADDK), la fracción CM-2ab-DEAE-1ab se obtuvo con un procedimiento semejante con algunas modificaciones (Cuadro 2).

Estas diferencias pudieron influir en las propiedades fisicoquímicas de la hormona, dando como resultado el comportamiento observado en la electroforesis nativa en PAGE.

Por otro lado, se podría pensar que la fracción CM-2ab-DEAE-1ab y los patrones son variantes de la bLH, pues Matteri (11)

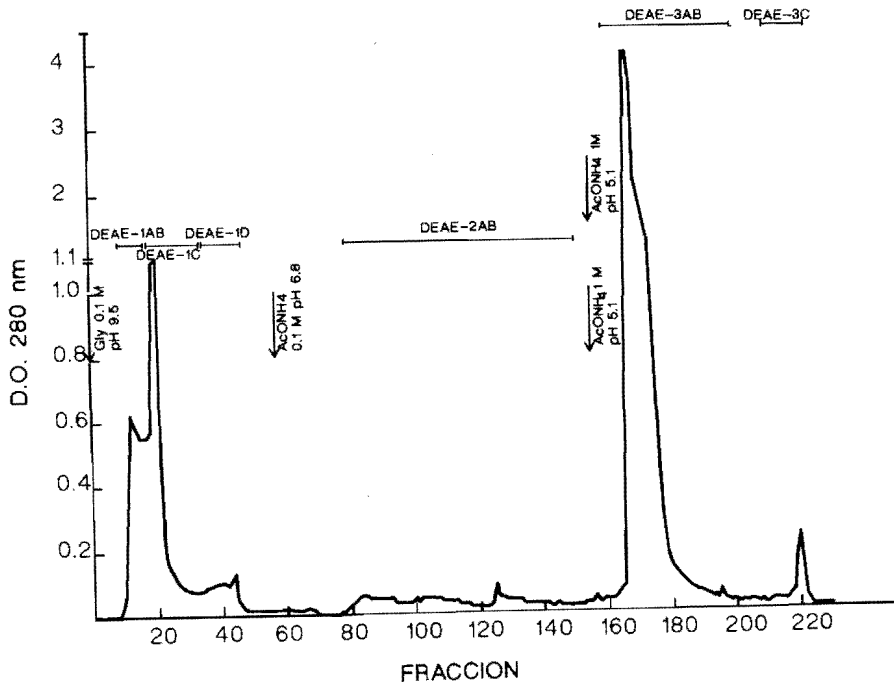


Figura 2. Cromatografía de la fracción CM-2ab (289 mg de polvo / 239 mg de proteína / 14 ml) en una columna de DEAE-celulosa de 1.2 x 42 cm. Se colectaron fracciones de 3 ml a un flujo de 24 ml/h

informó la purificación de las variantes de LH equina con patrones electroforéticos semejantes tanto a la banda mayoritaria de bLH y oLH patrones, como a la fracción CM-2ab-DEAE-1ab en electroforesis nativa en PAGE. Además, cuando Peckman (26) purificó LH humana con la técnica de Stockell-Hartree, separó 3 componentes en electroforesis nativa en PAGE; de estos componentes, el más activo tiene el mismo patrón electroforético en PAGE que la hormona purificada en el laboratorio.

Por otra parte, en el caso de la bLH y oLH patrones, la presencia de bandas más aniónicas que la mayoritaria y su ausencia en la fracción CM-2ab-DEAE-1ab, sugiere

que la hormona purificada en este laboratorio está menos contaminada que los patrones.

Cuando la fracción CM-2ab-DEAE-1ab y los patrones de bLH (USDA-bLH-B-5 AFP 5500) y oLH (NIADDK-oLH-26) se analizaron con el sistema electroforético SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Fig.6) y reductoras (Fig. 7) se resolvieron las bandas cuyo PM se muestra en los cuadros 3 y 4.

Puede observarse que en condiciones no reductoras, las tres hormonas producen formas agrupadas de alto peso molecular, en particular la bLH del laboratorio. En condiciones reductoras, parece haber predominio de formas agrupadas en las

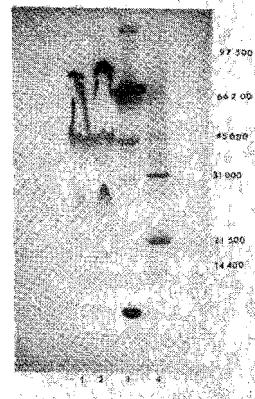
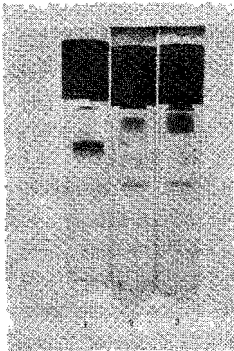
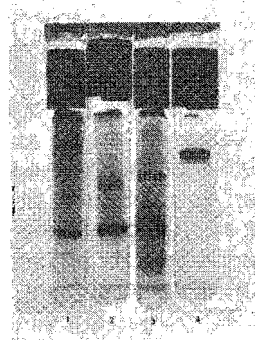
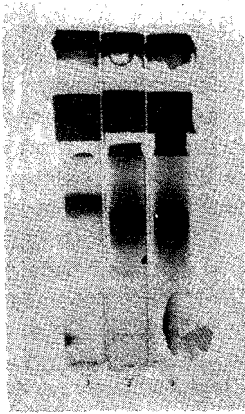


Figura 3. Electroforesis discontinua en PAGE al 7 %, pH 8.3 de alcuotas (100 μ g) de las fracciones no retenidas en DEAE-celulosa. (1) CM-2ab-DEAE-1ab; (2) CM-2ab-DEAE-1c; (3) CM-2ab-DEAE-1d.

Figura 4. Electroforesis discontinua en PAGE al 7 %, pH 8.3 de alcuotas (100 μ g) de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificaci3n de la LH bovina. (1) Extracto Crudo; (2) Extracto Glicoprot3ico; (3) CM-2ab.; (4) CM-2ab-DEAE-1ab

Figura 5. Electroforesis discontinua en PAGE al 7 %, pH 8.3 de la LH bovina purificada en el laboratorio y LH patrones (100 μ g). (1) LH bovina (CM-2ab-DEAE-1ab); (2) LH bovina patr3n (USDA-bLH B-5, AFP 5500); (3) LH ovina patr3n (NIADDK-oLH-26, AFP 5551B).

Figura 6. Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 12.5 %, pH 8.6 en condiciones no reductoras. (1) LH ovina patr3n (NIADDK-oLH-26, AFP 5551B, 70 μ g); (2) LH bovina patr3n (USDA-bLH-B5, AFP 5500, 70 μ g); (3) LH bovina purificada en el laboratorio (CM-2ab-DEAE-1ab, 70 μ g); (4) Marcadores de peso molecular (Bio-Rad, 12 μ g).

hormonas patrones, no así en la bLH del laboratorio en la que se observan pocos agregados, mientras que se enriquecen las bandas de 35 400 y la de 15 400 d.

Se debe hacer notar que el PM informado (2) para los patrones es de aproximadamente 19 000 d en condiciones reductoras, lo cual no se reproduce en el laboratorio bajo las mismas condiciones. Esto se debe posiblemente al almacenamiento prolongado de dichos patrones. La determinación del PM por otros autores (23, 24, 27) obtenido mediante electroforesis en SDS-PAGE, ultracentrifugación y osmometría para la bLH y la oLH va desde 26 000 a 34 000 d. Con estos antecedentes, se podría pensar que el monómero de la fracción CM-2ab-DEAE1ab corresponde a la banda de 33 800 d en condiciones no reductoras y a la de 35 400 d en reductoras. Por otro lado, la presencia de bandas de alto PM en la fracción CM-2ab-DEAE-1ab, podría corresponder a agregados de PM ya que en condiciones reductoras estas desaparecen casi en su totalidad y se enriquece la banda de 35 400 d (Fig. 6 y 7).

Cuando se analizaron la CM-2ab-DEAE-1ab y las glicoproteínas patrones en presencia de un anticuerpo contra oLH (CSU-204) en el sistema de slot-blot, se observó una reacción positiva entre el anticuerpo utilizado y las bLH, tanto la obtenida en el laboratorio como los patrones, mientras que con las otras hormonas glicoproteicas la reacción fue débil (Fig.8). Esto indica que la fracción CM-2ab-DEAE-1ab es LH y que la débil reacción observada con las otras hormonas, se debe a que éstas están contaminadas con LH o a que comparten determinantes antigénicos con la LH.

La inmunoelectrotransferencia de la fracción CM-2ab-DEAE-1ab y de las LH estándar, tanto bovina como ovina (Fig. 9), con el anticuerpo estándar ovino (CSU-204), mostró reconocimiento para las bandas mostradas en el cuadro 5.

En el caso de la fracción CM-2ab-DEAE-1a, la banda de 50 100 d podría ser un agregado resultado de uniones débiles - puesto que no se desagrega en condiciones reductoras-; la banda de 35 400 d podría corresponder al monómero como ya se había indicado mientras que la de 15 400 d probablemente se trate de una de las subunidades de la hormona, pues además el PM de esta banda se encuentra entre los PM reportados para las subunidades de la bLH (13). En el caso de las bandas que no fueron reconocidas por el anticuerpo, la banda de 64 600 d podría ser un contaminante; la banda de 10 400 d podría ser el resultado de la fragmentación de la bLH durante el proceso de purificación o un contaminante.

Finalmente, la fracción CM-2ab-DEAE-1ab fue inmunoreactiva en un sistema de RIA heterólogo para bLH, realizado según la técnica de Niswender (4). Como se observa en la Fig. 10 la curva de desplazamiento de la fracción CM-2ab-DEAE-1ab no solo es paralela sino que hay identidad con respecto a la curva patrón de bLH (USDA-bLH-B-5 AFP 5500) en un RIA heterólogo.

Esto, aunado a las evidencias del slot-blot y de la inmunoelectrotransferencia en donde se enfrentó a la hormona purificada y a los patrones (USDA-bLH/B-5 y NIADDK-oLH-26) con un anticuerpo dirigido contra oLH (CSU-204), confirma que la fracción CM-2ab-DEAE-1ab es bLH.

Se puede concluir que se desarrolló una metodología confiable para la extracción y purificación de la hormona luteinizante bovina a partir de hipófisis frescas. Mediante ésta, se obtuvieron cantidades suficientes de bLH de pureza adecuada para desarrollar sistemas analíticos tal como el RIA homólogo para bovinos.

En electroforesis nativa, la bLH se resolvió en una banda homogénea con un Rf de 0.27. La inmunoelectrotransferencia de esta fracción, reveló que la heterogeneidad observada en SDS-PAGE corres-

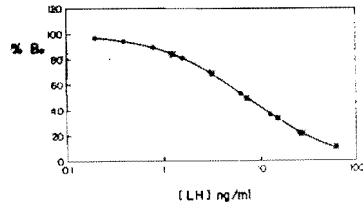
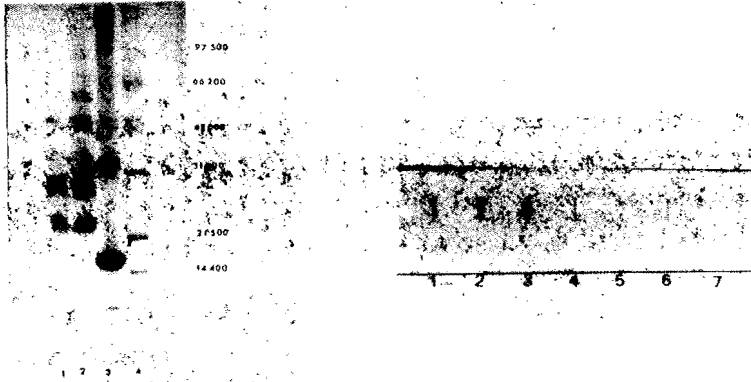


Figura 7. Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 12.5 %, pH 8.6 en condiciones reductoras. (1) LH ovina patrón (NIADDK-oLH-26, AFP 5551B, 70 μ g); (2) LH bovina patrón (USDA-bLH-B5, AFP 5500, 70 μ g); (3) LH bovina purificada en el laboratorio (CM-2ab-DEAE-1ab, 70 μ g); (4) Marcadores de peso molecular (Bio-Rad, 12 μ g).

Figura 8. Slot-blot de la LH bovina purificada (CM-2ab-DEAE-1ab) y otras glicoproteínas, en presencia de anticuerpo para LH ovina (CSU-204). (1) y (2) CM-2ab-DEAE-1ab; (3) LH bovina patrón (USDA-bLH B-5, AFP 5500); (4) FSH ovina patrón (NIAMDD-FSH-RP-1); (5) FSH humana patrón (LER 907); (6) TSH ovina patrón (NIH-TSH-S8); (7) Control

Figura 9. Inmunoelctrotransferencia de la LH bovina purificada y de patrones de LH (1) LH ovina patrón (NIADDK-oLH-26, AFP 5551B); (2) LH bovina patrón (USDA-bLH-B5, AFP 5500); (3) LH bovina purificada (CM-2ab-DEAE-1ab, 70 μ g); (4) CM-2ab; (5) Extracto Glicoproteico; (6) Extracto Crudo. Se utilizó el mismo anticuerpo indicado para el Slot-blot (Fig. 8).

Figura 10. Curva Patrón obtenida de un RIA heterólogo para la LH bovina (USDA-bLH-B5, AFP 5500); 125 IbLH, LH bovina para yodación (USDA-bLH-11, AFP 6000); 1er. Anticuerpo: contra oLH (CSU-204) utilizado a una dilución inicial de 1:30 000; 2o. Anticuerpo: anti IgG de conejo en cabra, diluido 1:20. o Curva Patrón; * CM-2ab-DEAE-1ab

ponde a formas agrupadas de bLH y probablemente a las subunidades; dado que no todas las bandas fueron reconocidas por el anticuerpo, es posible que la fracción CM-2ab-DEAE-1ab no sea completamente pura.

Tanto el Rf como el PM de la bLH son semejantes a los de la bLH, oLH y hLH encontrado por otros autores.

Finalmente, la bLH purificada así como la bLH estándar mostraron reacción positiva en un sistema de slot-blot, no así las otras hormonas glicoproteicas patrones analizadas.

Se encontró identidad entre la fracción CM-2ab-DEAE-1ab y el estándar USDA-bLH-B-5 en un RIA heterólogo.

Todos estos datos permiten afirmar que se cuenta con una bLH altamente purificada con actividad inmunológica, y que por lo tanto, se tiene ya parte de la materia prima para desarrollar sistemas analíticos, útiles para la cuantificación de la concentración de LH en estudios de reproducción en bovinos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al "National Hormone and Pituitary Program" por la donación de las siguientes hormonas patrón: bLH, oLH, hFSH y oTSH. Se expresa también gratitud al Dr. Felino Ortiz Rodríguez y a la M.V.Z. Laura Zapata Salinas por su colaboración técnica en la extracción y purificación de la hormona.

SUMMARY

Bovine luteinizing hormone (bLH) was purified from frozen pituitary glands. The method involved an extraction with water and ammonium acetate-ethanol pH 5.1 buffer, followed by CM-cellulose and DEAE-cellulose chromatographies. The yield of bLH was 8.2 mg/kg of tissue. When analyzed by disc electrophoresis at pH 8.3 the hormone migrated as an homogeneous band with a relative mobility of 0.27. The molecular weight of the monomeric form was 35.4 kD by SDS-PAGE under reducing conditions. The

immunological identification of bLH was made by slot-blot, immunoblot and a radioimmunoassay with an antibody against ovine LH (CSU-204). The procedure has allowed the isolation of bovine luteinizing hormone with enough purity and immunoreactivity to develop analytical systems as radioimmunoassay (RIA).

Key Words: Bovine Luteinizing Hormone, bLH, Gonadotropins, Gonadotropin Purification.

REFERENCIAS

1. Sairam M R, Papkoff H. Chemistry of Pituitary gonadotropins. In: Greep R O, Astwood E B, Knobil E Sawyer W 'H, Geiger S R. (eds.) Handbook of Physiology. American Physiological Society Washington D.C. 1974: 112-113.
2. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Polypeptide hormones, subunits and antisera available to qualified investigators for research. *Endocrinol.* 1992; 130: 560.
3. Cheng K. Purification and properties of bovine pituitary Follitropin. *Biochem. J.* 1976; 159: 651.
4. Niswender G D, Reichert L E Jr, Midgley A R Jr, Nalvandov A V. Radioimmunoassay for bovine and ovine Luteinizing hormone. *Endocrinol.* 1969; 84: 1166.
5. Shedlovsky T, Rothen A, Greep R O, Van Dyke H B, Chow B F. The isolation in pure form of the Interstitial Cell-Stimulating (Luteinizing) Hormone of the anterior lobe of the pituitary gland. *Science.* 1940; 92: 178.
6. Steelman S L, Segaloff. Recent studies on the purification of the pituitary gonadotropins. *Recent Progr. Hormone Res.* 1959; 15: 115.
7. Fontaine Y A, Burzawa Z W. Fractionnement d'hypophyses de rats étude des activités thyrotrope gonadotropes et heterothyrotrope des produits purifiés. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1969; 11: 160.
8. Braselton W E Jr, McSha W H. Purification and properties of Follicle-Stimulating and Luteinizing Hormones from horse pituitary glands. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970; 139: 45.
9. Monroe S E, Peckham W M, Neill J D, Knobil E. A Radioimmunoassay for rhesus monkey luteinizing hormone. *Endocrinol.* 1970; 86: 1012.
10. Stockell H A. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands. *Biochem. J.* 1966; 100: 754.
11. Papkoff H. In: *Excerpta Med. Intern. Congr. Ser.* (eds.) Recent Studies on the purification and properties of ovine, bovine and human Interstitial Cell-Stimulating Hormone (ICSH-LH) and ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH). *Proc. Sixth Pan-Am. Congr. Endocrinol., México City.* 1965: 112; 234.
12. Reichert L E Jr. Preparation of purified bovine Luteinizing Hormone. *Endocrinol.* 1962; 75: 970.

13. Ryan J R, Charlesworth C, McCormick D, Millius R P, Keutmann H T. The glycoprotein hormones : recent studies of structure-function relationships. *FASEB J.* 1988; 2: 2661.
14. Wakabayashi K, Hattori M, Sakamoto K, Minegishi T. Mammalian gonadotropins-polymorphism, biosynthesis and release. *Gumma Symp. on Endocrinol.* 1984; 21: 93.
15. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76: 4350.
16. Lowry O H, Rosenbrough N V, Farr A L, Randall R V. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Biol. Chem. J.* 1951; 193: 265.
17. Hartree E F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Ann. Biochem.* 1972; 48: 422.
18. Nicoll S C, Parsons J A, Friorindo R P, Nichols C W Jr. Estimation of prolactin and GH levels by polyacrylamide disc electrophoresis. *Endocrinol. J.* 1969; 45: 183.
19. Laemmli L V K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 224: 680.
20. Papkoff H, Gan J. Bovine Interstitial Cell-Stimulating Hormone: purification and properties. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 1970; 136: 522.
21. Cheng K. Purification and Properties of bovine pituitary Folitropin. *Biochem. J.* 1976; 159: 651.
22. Ward D N, Adams-Mayne M, Ray N, Belke D E, Coffey J, Showalter M. Comparative studies of Luteinizing Hormone from beef, pork and sheep pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1967; 8: 44.
23. Ward D. Isolation and properties of subunits of rat pituitary LH. *Biochem.* 1971; 10: 1796
24. Courte C, Hurault M, Clary C, De la Llosa P, Jutisz M. Purification and physicochemical properties of bovine Luteinizing Hormone (LH) and comparison between bull and cow LH preparation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1972; 18: 284.
25. Matteri R L, Papkoff H, NG D A, Swedlow J R, Chang Y-S. Isolation and characterization of three forms of Luteinizing Hormone from the pituitary gland of the horse. *Biol. of Reprod.* 1986; 34: 571.
26. Peckman W D, Parlow A F. Isolation from human pituitary glands of three discrete electrophoretic components with high Luteinizing Hormone activity. *Endocrinol.* 1969; 85: 618.
27. Gospodarwicz, D. Determination of molecular weight of ovine Luteinizing Hormone (LH) and of its two subunits by Sodium Dodecil Sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. *Endocrinol.* 1972; 1101.