
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIUSEPPE TOLONE, FILIPPO CICCIMARRA, GIUSEPPE
MARIO PONTIERI

**Isolamento dal siero di maiale di globuline con
attività del terzo componente del complemento e
caratterizzazione immunochimica di esse**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 41 (1966), n.6, p. 565–573.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_41_6_565_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Isolamento dal siero di maiale di globuline con attività del terzo componente del complemento e caratterizzazione immunochimica di esse*^(*). Nota I di GIUSEPPE TOLONE, FILIPPO CICCIMARRA e GIUSEPPE MARIO PONTIERI, presentata ^(**) dal Socio L. CALIFANO.

SUMMARY. — Following addition of "Liquoid" (Sodium polyanetholsulphonate) to serum of different animal species, a precipitate is formed resulting of complexes between serum basic proteins and "Liquoid" itself. In the precipitate are enclosed globulins furnished with C_3 activity so that the procedure is routinely employed for the preparation of the so called R_3 , i.e., serum deprived of C_3 activity which can be successfully employed for the titration of such a component of complement in a given serum.

The present investigation was undertaken in order to show whether or not it is possible to obtain from the above mentioned complexes isolation and purification of the third component of complement and, if such were the case, to study also the possibility of immunization of animals of different species for the production of antibodies specifically reacting with C_3 .

Pig serum was selected as source of C' because of its richness in the third component.

A method is described which leads to the isolation of C_3 activity from the complexes obtained by addition of "Liquoid" to pig serum. The procedure is based on the assumption that the affinity of "Liquoid" for basic proteins, as lysozyme or protamine sulphate, is higher than that against serum proteins.

Following suspension of the precipitate resulting from serum globulins- "Liquoid" complexes in a medium containing either lysozyme or protamine sulphate, globulins, furnished with C_3 activity, become again soluble, free from the complexes with "Liquoid".

After separation of the precipitate, the supernatant obtained by such a procedure was filtered through Sephadex G-100. Among the several fractions obtained one was shown to contain C_3 activity, without presence of other components of complement, as demonstrated by its ability to lyse sensitized sheep erythrocytes (EA) in the presence of only a R_3 reagent or to lyse $EAC_{1,4,2}$ in the presence of EDTA.

Further investigations demonstrated the possibility of obtaining in rabbits antibodies specifically reacting with pig serum globulins furnished with C_3 activity. By addition of the immune serum to either pig serum or to the fraction isolated by filtration through Sephadex G-100, inhibition of the third component of complement takes place.

The precipitating reaction of these antibodies with the corresponding antigens was studied by help of immunodiffusion and immunoelectrophoretic methods.

È noto che per reagente si intende quel siero che, per opportuno trattamento, sia stato privato dell'attività di un solo componente del complemento (C') senza che gli altri componenti abbiano subito danno molto apprezzabile. Si conoscono essenzialmente 4 reagenti (R_1 , R_2 , R_3 ed R_4) ognuno dei quali possiede l'attività litica dei tre componenti non indicati nella sigla del reagente. Si è concordi nell'ammettere che una frazione di siero che dia lisi di emazie sensibilizzate in presenza di un R_1 contenga il 1° componente e così via.

(*) Lavoro svolto nell'Istituto di Patologia generale dell'Università di Palermo.

(**) Nella seduta del 12 novembre 1966.

In precedenti ricerche (Cavallo, Pontieri ed Imperato, 1963; Pontieri, Imperato e Cavallo, 1962) è stato dimostrato che l'aggiunta di proteine basiche quali il lisozima, il metil-lisozima ed il solfato di protamina, ad un reagente per la titolazione del 3° componente complementare (R_3) preparato con siero di cavia inattivato a mezzo di «Liquoid» (polianetolsulfonato di sodio), determina riacquisto da parte del reagente della piena attività emolitica. Il fenomeno si verifica in dipendenza dell'attività complessante esercitata dalle proteine basiche sul «Liquoid» che viene staccato dai complessi che esso ha formato con le proteine fornite di attività di C'_3 con conseguente restaurazione dell'attività emolitica da parte del siero precedentemente inattivato.

Essendo, pertanto, la inattivazione del potere complementare del siero ad opera del «Liquoid» causata dalla formazione dei suddetti complessi, ci si è proposti nella presente indagine di osservare:

a) se riesce o meno possibile l'isolamento del terzo componente complementare dai complessi con il «Liquoid» e

b) se il materiale ottenuto, iniettato in animale di specie diversa determina formazione di anticorpi che reagiscono specificamente con il terzo componente di C' .

Dopo prove preliminari condotte con siero di uomo, di cavia e di maiale, questo ultimo, a causa della sua ricchezza in C'_3 , è stato prescelto per le indagini.

MATERIALI E METODI.

Complemento. - Come sorgente di complemento (C') è stato adoperato siero di maiale, che veniva conservato a -35°C , suddiviso in aliquote in modo da subire una sola volta lo scongelamento al momento dell'uso.

Frazionamento del siero. - È stato eseguito aggiungendo al siero di maiale polianetolsulfonato di sodio («Liquoid» della Hoffmann-La Roche). Le tappe del procedimento sono state riassunte nello schema presentato a pagina 569. È stato adoperato lisozima della Ditta SPA; il solfato di protamina è stato quello della Ditta Boots.

Eritrociti di montone. - Il sangue di montone, addizionato di soluzione di Alsever, è stato conservato a $+2^\circ\text{C}$. Le sospensioni di eritrociti sono state preparate secondo il metodo di Mayer e coll. (1948).

Emolisina. - Come emolisina è stato adoperato il siero di conigli immunizzati per via endovenosa con 1 ml di una sospensione di stromi di emazie di montone (1 mg di N/ml) tre volte la settimana per 4 settimane e poi salassati 4 giorni dopo l'ultima iniezione. È stato usato un pool di sieri ottenuti dal sangue di 4 animali e la attività sensibilizzante di esso è stata determinata secondo la tecnica riportata da Kabat e Mayer (1961).

Eritrociti sensibilizzati (EA). - Sono stati preparati per aggiunta di un volume di una opportuna diluizione di emolisina, in concentrazione ottimale per la sensibilizzazione, ad un volume di una sospensione di eritrociti. Dopo l'aggiunta della emolisina, la sospensione di EA, contenente $1 \cdot 10^9$ cellule/ml è stata incubata a $+37^\circ\text{C}$ per 40 minuti.

Preparazione di EAC_{1,4,2}'. — Tali cellule venivano preparate a 0°C incubando per 40 minuti EA con siero di cavia secondo il procedimento descritto da Levine e coll. (1954). Al termine della incubazione le EAC_{1,4,2}' venivano lavate due volte con tampone contenente versene (Na₂H₂ EDTA) in concentrazione 0,01 M e sospese in tale tampone in modo che la concentrazione risultasse sempre di 1 · 10⁹ cellule/ml.

Preparazione dei reagenti per la titolazione dei componenti di C'. — R₁, R₂ ed R₄ (siero di cavia rispettivamente privato del 1°, 2° e 4° componente) sono stati preparati secondo i metodi di Kabat e Mayer (1961).

Per la titolazione di C₃', avendo tenuto conto della dimostrazione data da Pontieri e Plescia (1965) e da Ciccimarra e coll. (1964) che con l'impiego di reagenti preparati rispettivamente con siero inattivato con formalina (R₃—F) e con siero inattivato con «Liquoid» (R₃—L) si titolano fattori differenti del gruppo C₃', sono stati adoperati due tipi di R₃, uno preparato inattivando il siero con il «Liquoid» secondo il metodo riportato da Kabat e Mayer (1961) e l'altro preparato con siero inattivato con formalina secondo le indicazioni di Rapp e coll. (1959). Ogni reagente è stato usato solo se privo di attività emolitica ed anticomplementare ed in grado di ricostituire l'attività litica se combinato rispettivamente con i reagenti per la titolazione degli altri componenti complementari.

Titolazione dell'attività di C' e dei suoi componenti. — Sono state adoperate le tecniche descritte in altri lavori (Pontieri e coll. 1962) basate sulla determinazione della densità ottica a 5410 Å dei sopranatanti limpidi dei sistemi emolitici in esame, incubati per 1 ora a 37°C con continua agitazione.

Separazione su Sephadex G-100. — Due ml di siero di maiale sono stati filtrati attraverso una colonna (1 cm di diametro per 40 di altezza) di Sephadex G-100 (140-400 mesh) della Ditta Pharmacia di Uppsala, equilibrata con KH₂PO₄ 0,005 M. Come solvente è stata adoperata la stessa soluzione di KH₂PO₄ ed il frazionamento ha avuto luogo a + 4°C. Sono state raccolte frazioni di 1,5 ml ciascuna che venivano rispettivamente addizionate di 1,5 ml di NaCl 1,8 % onde renderle isotoniche. Delle frazioni ottenute veniva determinata la densità ottica a 2300, a 2600 ed a 2800 Å a mezzo di spettrofotometro di Hilger.

Immunizzazione dei conigli per l'ottenimento di anticorpi anti C'. — Come antigene immunizzante è stata adoperata una preparazione fornita di attività di C₃' ottenuta dal siero di maiale a mezzo di precipitazione con il «Liquoid» e successivo trattamento con lisozima, contenente 7 mg di proteine/ml. Ciascun coniglio riceveva nel corso di un mese, per via intramuscolare, una quantità di materiale per un totale di 24 mg di N. La soluzione di antigeni veniva inoculata insieme ad adiuvante di Freund, aggiunto in egual volume. Una settimana dopo l'ultima iniezione i quattro conigli immunizzati venivano salassati ed i rispettivi sieri, dopo le prove opportune atte ad accertare che contenessero quantità sufficienti di anticorpi precipitanti, venivano riuniti in un unico «pool». Con identico procedimento altri 4 conigli sono stati immunizzati con siero di maiale.

Prove di immunodiffusione in agar e di immunoelettroforesi. - Per le prove di immunodiffusione è stato adoperato agar (Difco) allo 0,8 % in NaCl 0,9 % addizionato di mertiolato (Lilly) in concentrazione finale 1:10.000 al fine di evitare eventuali inquinamenti. La distanza tra i margini del pozzetto della soluzione di antigene e quello contenente il siero immune è stata di 4 mm. Le fotografie venivano eseguite dopo 48 ore di permanenza a temperatura ambiente ed una settimana circa a + 4°C.

Per la separazione elettroforetica è stato adoperato un sistema tampone discontinuo, vale a dire con costituzione differente dei tamponi presenti rispettivamente nello strato di agar e nelle vasche degli elettrodi, secondo le indicazioni di Hirschfeld (1960). Sono stati adoperati i seguenti tamponi:

	nelle vasche degli elettrodi	nello strato di agar
Veronal	g 1,380	g 1,660
Veronal sodico	g 8,760	g 10,510
Calcio lattato	g 0,384	g 1,536
Acqua distillata a	ml 1000	ml 1000

Su ciascun vetrino venivano stratificati 4 ml di agar tamponato (2 %). I raccordi fra il gel d'agar e il tampone delle vasche venivano effettuati mediante strisce di carta Whatman n. 3 MM imbevute di tampone contenuto nelle vasche. Il pozzetto dell'antigene era di 1,2 mm di diametro, la fenditura per il siero immune di 2 mm di larghezza, la distanza fra il bordo del pozzetto ed il margine della fenditura di 4 mm, il tempo di migrazione in campo elettrico di 90 minuti, il potenziale usato pari a 6 V/cm lineare. Dopo il frazionamento elettroforetico veniva aggiunto siero immune nell'apposita fenditura. Le fotografie venivano eseguite dopo due giorni di permanenza a temperatura ambiente e una settimana a + 4°C.

RISULTATI.

Isolamento di C₃ dal siero di maiale.

10 ml di siero di maiale sono stati incubati a 37°C con 7 ml di «Liquoid» 1:1000 in NaCl 0,9 %. In seguito a centrifugazione a 12.000 g per 20' si ottiene la separazione di sedimento da un sopranatante. Avendo riscontrato nel sopranatante assenza di attività emolitica e presenza di notevole attività anticomplementare si è provveduto a sottoporlo a prolungata dialisi a + 4°C contro tampone di veronal. Tale sopranatante è indicato come S₁.

Il sedimento, dopo essere stato sospeso in 5 ml di tampone di veronal, è stato suddiviso in due aliquote di 2,5 ml ciascuna. Ad una di queste aliquote veniva aggiunto NaOH 0,05 N per ottenere solubilizzazione del materiale in sospensione ed in seguito la reazione veniva portata a neutralità per aggiunta di HCl 0,05 N mentre il volume era portato a 5 ml con tampone. I 5 ml così

ottenuti venivano, quindi, divisi in due aliquote di 2,5 ml ciascuno, delle quali una era addizionata di egual volume di tampone mentre l'altra di 12.500 μ g di lisozima disciolti in 2,5 ml di tampone. Dopo incubazione per 20' a 37°C i tubi venivano centrifugati a 12.000 g per 20'.

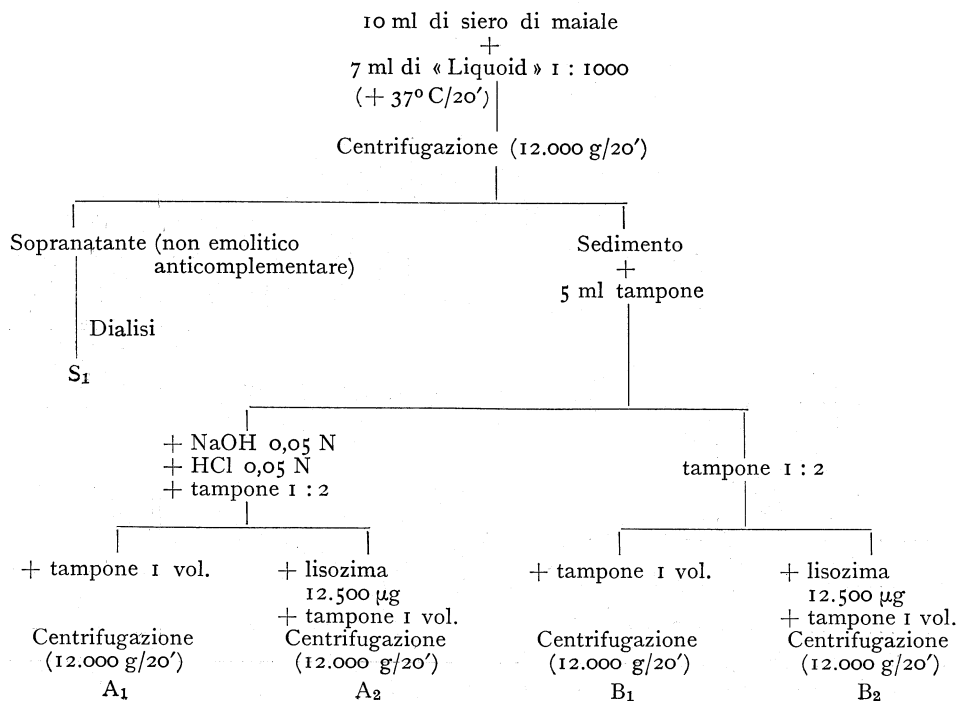
La seconda aliquota della sospensione del sedimento ottenuto per azione del «Liquoid» sul siero di maiale è stata sottoposta ad identico trattamento con la omissione della aggiunta di NaOH per la solubilizzazione e della successiva neutralizzazione.

In seguito alla centrifugazione per 20' a 12.000 g è stato riscontrato che in ogni caso la quantità di sedimento era maggiore nei tubi ai quali era stato aggiunto lisozima. Tutte le operazioni sono state condotte in bagno di ghiaccio.

Le tappe della preparazione sono sommarizzate nello schema 1.

Con tale procedimento sono stati ottenuti quattro sopranatanti terminali che vengono rispettivamente indicati come A₁, A₂, B₁ e B₂.

Di essi, così come del sopranatante S₁ è stata determinata l'attività complementare e quella dei singoli componenti eventualmente presenti. Prove sono state, inoltre, condotte per la titolazione dell'attività emolitica su eritrociti allo stato di EAC_{1,4,2}, sospesi in tampone contenente versene. In tali condizioni la lisi delle emazie si verifica solo se nel materiale in esame è contenuto il 3° componente di C', l'unico, cioè, dei componenti che possa fissarsi alle emazie in assenza di cationi bivalenti.



Schema 1.

I sistemi emolitici in esame erano rispettivamente costituiti da:

0,2 ml di EA + 0,2 ml di soprnatante per la determinazione dell'attività complementare *in toto*;

0,2 ml di EA + 0,2 ml di soprnatante + opportuna quantità di reagente (0,2 ml eccetto il caso di R₁ che è stato adoperato nella quantità di 0,6 ml) + siero riscaldato (H) in quantità di 0,1 ml che è stato aggiunto nelle prove per la titolazione di C₁ e C₂;

da 0,2 ml di EAC_{1,4,2} + 0,2 ml di soprnatante in esame. Il volume veniva portato in ogni caso a 1,1 per aggiunta di opportune quantità di tampone e le miscele venivano incubate a 37°C in bagno termoregolato a 37°C con continua agitazione. Il grado di lisi subito dalle emazie veniva giudicato a mezzo della determinazione della densità ottica a 5410 Å dei soprnatanti ottenuti per centrifugazione dei tubi dopo l'aggiunta, alla fine della incubazione a 37°C, di 2 ml di tampone di veronal a +4°C.

I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella I e dimostrano che:

a) in seguito all'aggiunta di «Liquoid» al siero di maiale si ottiene la formazione di complessi che precipitano;

b) il soprnatante S₁ contiene i quattro componenti di C' con notevole riduzione di C₃;

c) dai complessi proteine-«Liquoid» si ottiene, per aggiunta di lisozima, passaggio in soluzione del 3° componente complementare, in quantità apprezzabile, mentre si rinvenivano solo tracce dell'attività di C₁, C₂ e C₄;

d) tale evenienza si verifica solo quando si omette l'aggiunta di NaOH 0,05 N al sedimento ottenuto dal siero di maiale per aggiunta di «Liquoid».

TABELLA I.

Analisi dell'attività di C' e dei componenti complementari in frazioni di siero di maiale.

Sorgente di attività emolitica	EA	R ₁ +H + EA	R ₂ +H + EA	R ₃ L+EA	R ₃ F+EA	R ₄ +EA	EAC _{1,4,2}
Siero di maiale (1 : 20)	0,580	0,585	0,580	0,580	0,580	0,580	0,580
S ₁	0,210	0,500	0,550	0,250	0,220	0,560	0,160
A ₁	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A ₂	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B ₁	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B ₂	0,030	0,050	0,050	0,210	0,200	0,050	0,200

(Per dettagli: vedi testo).

Le cifre indicano i valori di D.O. a 5410 Å dei soprnatanti dei sistemi emolitici in esame.

Determinazione della quantità ottimale di «Liquoid» per la precipitazione di C_3 dal siero di maiale.

Al fine di determinare la quantità ottimale di «Liquoid» da aggiungere al siero di maiale, per la formazione dei precipitati, sono state condotte le prove seguenti: ad una serie di tubi contenenti ciascuno 2 ml di siero di maiale venivano aggiunte quantità di «Liquoid» progressivamente crescenti da 0,2 a 2 mg ed il volume di ogni miscela veniva portato a 5 ml per aggiunta di

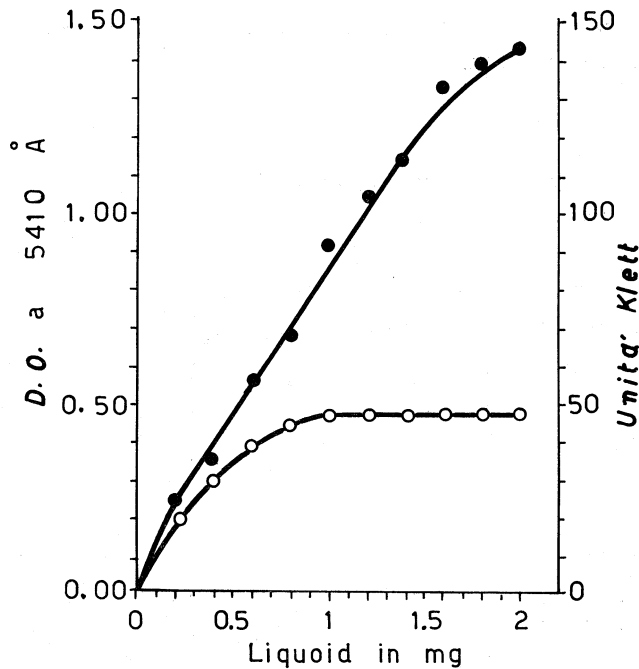


Fig. 1. - Formazione dei complessi insolubili dal siero di maiale per aggiunta di «Liquoid» in varie concentrazioni (●-●-●) e passaggio in soluzione di C_3 per azione del lisozima (o-o-o).

opportune quantità di tampone. Dopo incubazione per 20' a 37°C è stata determinata nei tubi la torbidità a mezzo di un nefelometro di Klett-Summerson. Dopo tale determinazione i tubi sono stati centrifugati a 12.000 g per 20', i sopranatanti sono stati scartati ed i sedimenti venivano risospesi in 0,75 ml di tampone contenente in soluzione 12.500 μ g di lisozima. I tubi venivano ulteriormente incubati a 37°C per 20' con agitazione e quindi di nuovo centrifugati a 12.000 g per 20'; i sedimenti venivano eliminati e dei sopranatanti si determinava l'attività emolitica su eritrociti allo stato di $EAC'_{1,4,2}$ in presenza di versene. I sistemi emolitici erano costituiti da 0,2 ml di $EAC'_{1,4,2}$ e da 0,4 ml di ciascuno dei sopranatanti. I risultati di tali prove sono riportati nella fig. 1 e da essi si evince che:

a) la quantità di precipitato che si forma per aggiunta di «Liquoid» al siero di maiale aumenta progressivamente alla quantità di «Liquoid»;

b) qualunque sia la concentrazione di « Liquoid » si ottiene precipitazione di globuline fornite di attività del 3° componente complementare, pur notandosi incremento proporzionale alla quantità di « Liquoid » aggiunto.

Passaggio in soluzione di C_3 dai complessi globuline-« Liquoid » in funzione della quantità di proteine basiche aggiunte.

Il sedimento ottenuto per centrifugazione da siero di maiale (20 ml) addizionato di « Liquoid » (12 ml di una soluzione 1 : 1000, corrispondente ad 1,2 mg/ml) è stato sospeso in 5 ml di tampone; la sospensione veniva, quindi, divisa in aliquote di 0,5 ml.

TABELLA II.

Passaggio in soluzione di C_3 per aggiunta di lisozima o di solfato di protamina in varie concentrazioni a complessi ottenuti per azione del « Liquoid » sul siero di maiale.

μg di lisozima	D.O. a 5410\AA	μg di solfato di protamina	D.O. a 5410\AA
250	0,180	20	0,195
500	0,330	50	0,275
750	0,360	100	0,325
1000	0,430	250	0,455
1250	0,420	500	0,475
2500	0,410	1000	0,315
5000	0,340	2000	0,300
7500	0,280	2500	0,275
10000	0,230	5000	0,250

(Per dettagli vedi testo).

Sistemi emolitici costituiti da 0,2 ml di $EAC'_{1,4,2}$ + 0,4 ml di ciascun sopranatante (vol. finale 3,1 ml).

Ad una serie di tubi contenenti ciascuno 0,5 ml della suddetta sospensione veniva aggiunto lisozima in quantità progressivamente crescenti da 250 μg a 10.000 μg mentre ad altra serie di tubi si aggiungeva solfato di protamina in quantità progressivamente crescente da 20 μg a 5.000 μg . Dopo incubazione a 37°C per 20', seguita da centrifugazione, i sopranatanti ottenuti venivano saggiati per il contenuto in C_3 su eritrociti allo stato di $EAC'_{1,4,2}$ con la metodica riportata nel paragrafo precedente.

Dai risultati riportati nella Tabella II si deduce che il solfato di protamina è più attivo del lisozima nel determinare passaggio in soluzione di C_3 dai com-

plessi proteine-«Liquoid». Tale prova trova conferma in precedenti risultati riguardanti la restaurazione dell'attività emolitica del terzo reagente complementare ad opera di proteine basiche (Pontieri e coll., 1962).

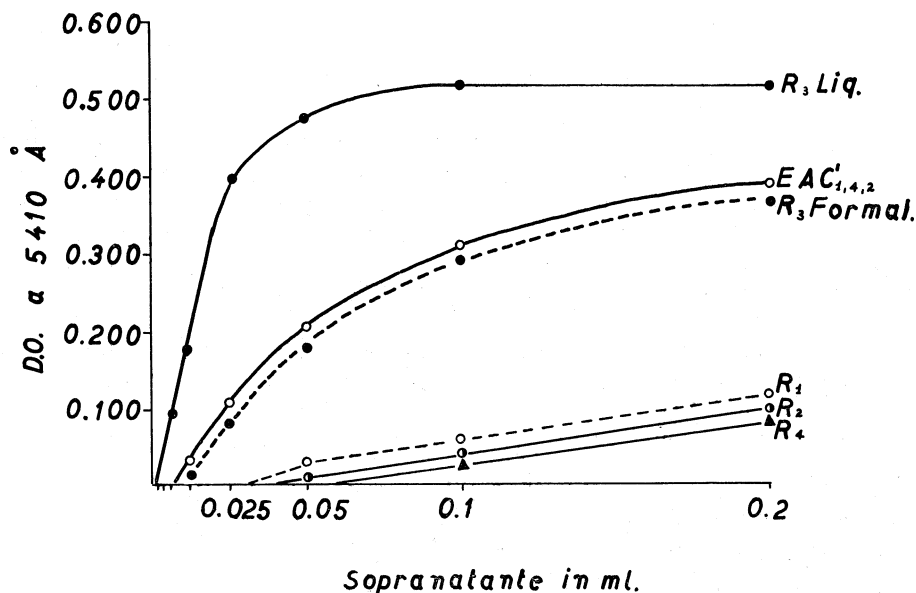


Fig. 2. - Titolazione dell'attività dei componenti di C' nei sopranatanti ottenuti aggiungendo 12.500 µg di lizozima ai complessi insolubili ottenuti per azione del «Liquoid» sul siero di maiale (600 µg/ml).

Adoperando le quantità di «Liquoid» e di lizozima che nelle prove precedenti erano state indicate ottimali, si sono ottenute altre preparazioni delle quali è stata determinata l'attività emolitica su eritrociti sensibilizzati (EA) in presenza ed in assenza di reagenti per la titolazione dei componenti di C'. Dai risultati, esposti nella fig. 2, si deduce che nei sopranatanti è contenuta quantità di C₃ titolabile sia con lo R₃-L che con lo R₃-F, mentre pressocché assenti si possono considerare gli altri componenti complementari.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] CAVALLO G., PONTIERI G. e IMPERATO S., «Experientia», 19, 36 (1963).
- [2] CICCIMARRA F., ZAPPACOSTA S. e SCHIANO S., «Giorn. Microbiol.», 12, 199 (1964).
- [3] HIRSCHFELD J., «Science Tools», 7, 18 (1960).
- [4] KABAT E. A. and MAYER M. M., *Experimental Immunochemistry*, Thomas Publ. Springfield Ill., U.S.A., (1961).
- [5] LEVINE L., MAYER M. M. and RAPP H. J., «J. Immunol.», 73, 435 (1954).
- [6] MAYER M. M., CROFT C. C. and GRAY M. M., «J. Exptl. Med.», 88, 427 (1948).
- [7] PONTIERI G., IMPERATO S. e CAVALLO G., «Giorn. Microbiol.», 10, 93 (1962).
- [8] PONTIERI G. M. and PLESCIA O. J., «Experientia», 21, 81 (1965).
- [9] RAPP H. J., SIMS M. R. and BORSOS T., «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 100, 730 (1959).