

29. 58



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química**

**TRABAJO MONOGRAFICO  
DE ACTUALIZACION**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

**Aplicaciones de la Cromatografía  
Líquida de Alta Resolución (FPLC)  
para la Separación de Biomoléculas**

**Homero Hernández Cazares**

**Químico Farmacéutico Biólogo**

1987



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	6
III	APLICACIONES	32
IV	CONCLUSIONES	116
V	BIBLIOGRAFIA	118

## I. INTRODUCCION

Por muchos años se ha intentado estudiar la composición de todo lo que nos rodea (el universo), sin embargo lo que más ha interesado al hombre es el estudio de la composición de la materia viva.

El atributo más sobresaliente de los seres vivos es, quizá, su complejidad y su alto grado de organización; poseen estructuras internas complicadas que contienen muchas clases de moléculas complejas. Se presentan además en una variedad asombrosa de especies diferentes. Por contraste la materia inanimada de su entorno, representada por el suelo, el agua y las rocas está constituida habitualmente por mezclas fortuitas de compuestos químicos sencillos de organización estructural más bien escasa. Cada uno de los componentes de la materia viva cumple un propósito o función específicos. Esto es cierto no solamente en lo referente a estructuras visibles como alas, ojos, flores y hojas, sino también a estructuras intracelulares tales como el núcleo, ribosomas, mitocondrias, membrana, etc. Además los compuestos químicos individuales de la célula como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos poseen también funciones específicas.

En los organismos vivos es completamente válido preguntarse cuál es la función de una molécula determinada en cambio carece de sentido plantear dicha pregunta con relación a la materia inerte.

Los filósofos medievales habrían contestado que los organismos vivos están dotados de una fuerza vital misteriosa y divina, tal filosofía fue reemplazada por completo por los grandes hallazgos en el campo de la fisiología, biología y bioquímica, de tal manera que en la actualidad el objetivo prin-

principal de las ciencias antes mencionadas es determinar de que manera el conjunto de moléculas inanimadas interactúan entre sí para dar lugar a un organismo vivo. Los compuestos orgánicos presentes en la materia viva muestran enorme variedad y la mayor parte de ellos son extraordinariamente complejos aun la más sencilla de las células contiene gran número de moléculas orgánicas distintas; se calcula que la bacteria Escherichia coli contiene alrededor de 5000 compuestos orgánicos diferentes entre ellos, unas 3000 clases diferentes de proteínas y mil tipos distintos de ácidos nucleicos. Además, la mayor parte de la materia orgánica en células vivas está constituida por macromoléculas de pesos moleculares muy grandes que incluyen no solamente a las proteínas y a los ácidos nucleicos sino también a sustancias poliméricas tales como el almidón y la celulosa.

Si consideramos ahora organismos mayores y más complejos como son los animales y las plantas superiores hallaremos que también contienen proteínas y ácidos nucleicos, en mayor variedad en el organismo humano, por ejemplo, puede haber hasta diez mil clases de proteínas diferentes en comparación con las tres mil distintas de Escherichia coli.

Aunque algunas de las proteínas de ésta actúan de modo muy semejante que determinadas proteínas humanas, ninguna de las moléculas proteicas de Escherichia coli es idéntica a cualquiera de las proteínas encontradas en el hombre. De hecho, cada especie de organismo posee su propio conjunto de moléculas proteicas y de ácidos nucleicos químicamente diferentes. Puesto que es probable que existan alrededor de 1.5 millones de especies de organismos vivos, puede calcularse que el conjunto de las especies vivientes debe conte-

ner entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  tipos distintos de moléculas protéicas y unas  $10^{10}$  clases diferentes de ácidos nucléicos ( 54 ). Si comparamos estas cifras con la totalidad de compuestos orgánicos cuya estructura sea conocida por los químicos tendremos que alcanza solamente  $10^6$ . Por lo tanto es claro que únicamente conocemos la estructura precisa de una fracción trivialmente pequeña del conjunto total de moléculas orgánicas que se cree existen en la materia viva. Por todo ésto parecería una empresa sin esperanza que los bioquímicos intentaran aislar, identificar y sintetizar todas las diferentes moléculas orgánicas presentes en la materia viva.

El número reducido de moléculas estructurales con que están construidas todas las macromoléculas, poseen otra característica importante: cada una de ellas desempeña más de una función en las células vivientes, y algunas son tan extremadamente versátiles que realizan buen número de funciones. Los aminoácidos no solamente son la estructura base de las moléculas proteicas sino que también son precursores de hormonas, los alcaloides, las porfirinas, los pigmentos y otras muchas biomoléculas. Diversos mononucleótidos no solamente constituyen las unidades fundamentales de los ácidos nucléicos, sino que actúan también como coenzimas y moléculas transportadoras de energía. Por todo ello, parece probable que las biomoléculas fundamentales de las estructuras complejas fueron seleccionadas en el curso de la evolución biológica, precisamente por su capacidad de desempeñar diversas funciones.

Por lo que sabemos hasta ahora, los organismos vivos no contienen normalmente compuestos sin una función definida, aunque existen algunas biomoléculas cuyas funciones se desconocen actualmente no obstante la complejidad de las

biomoléculas, su comportamiento aislado se ajusta a todas las leyes físicas y químicas que rigen el comportamiento de la materia inerte (peso molecular, carga, punto isoeléctrico, solubilidad, etc.).

Tomando ventaja de las características mencionadas es posible separar los del ambiente que las rodea con el objeto de analizarlas bioquímicamente y de esta manera tratar de comprender cual es su función dentro del microambiente en el cual se encuentran.

En las últimas décadas se han desarrollado técnicas de separación de biomoléculas, algunas sencillas otras tantas complejas, pero todas ellas fundamentadas en aprovechar las características físicas o químicas que presentan dichas moléculas, cabe mencionar dentro de estas técnicas:

- La centrifugación y la ultracentrifugación que se basa en la separación de moléculas por su coeficiente de sedimentación y peso molecular.
- La precipitación selectiva que se basa en la solubilidad de las moléculas en un medio altamente salino (efecto salting out).
- Electroforesis cuyo fundamento se basa en la separación molecular debido a la carga y peso molecular.
- La cromatografía de la cual veremos su fundamento más adelante, tiene muchas variantes, una de ellas la cromatografía líquida, la cual ha sido ampliamente utilizada para la separación de biomoléculas no solamente a nivel investigación sino que también a escala industrial ( 31 ). Dentro de

una nueva rama de la bioquímica llamada biotecnología.

Dada la creciente importancia que se le ha dado a la cromatografía líquida se decidió hacer la presente investigación bibliográfica, la cual no pretende ser un manual de cromatografía sino que más bien una recopilación de las nuevas aplicaciones de la cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) para la separación de compuestos bioquímicos importantes como: enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, linfocinas, toxinas, proteínas virales y polinucleótidos entre otros.



## II. GENERALIDADES

Cromatografía es el nombre que reciben los métodos de separación molecular en los cuales dos o más componentes de una mezcla son separados físicamente por distribución entre dos fases; una fase estacionaria la cual puede ser un soporte sólido o líquido y una fase móvil que puede ser un gas o un líquido el cual fluye continuamente entre la fase estacionaria. En la cromatografía líquida la fase móvil es un líquido mientras que en la cromatografía de gases la fase móvil es un gas.

La cromatografía fue descubierta y llamada así por Michael Tswet en 1906, separando pigmentos vegetales en solución, haciéndolos pasar a través de una columna empacada con carbonato de calcio; los pigmentos al pasar por la columna se separaron unos de otros formando bandas coloridas de aquí el nombre de Cromatografía del Griego cromatos = color y grafos = escritura.

El siguiente paso fue el desarrollo de la cromatografía líquido-líquido o de partición descubierta por Martín y Synge en 1941. Usando un adsorbente sólido como soporte de la fase líquida estacionaria, y como fase móvil un líquido inmiscible con la fase estacionaria; logrando la separación molecular en base a la solubilidad de las muestras.

Paralelamente se desarrolló la cromatografía en papel la cual es óptima para identificar pequeñas cantidades de compuestos purificados; de ésta derivó la cromatografía en capa fina en la que la separación se lleva a cabo en una capa muy delgada de un adsorbente sobre placas de vidrio o de cualquier otro material rígido inerte; este tipo de cromatografía ganó mucha populari

dad después del trabajo clásico de Sthal en 1958 (19) (73).

Un gran avance en las técnicas cromatográficas fue la cromatografía de gases descrita por Martín y James en 1952 (2), usada particularmente para separar mezclas de gases, de líquidos y sólidos volátiles.

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por la cromatografía líquida debido al desarrollo de nuevos geles de empaque y nueva instrumentación, dando lugar al desarrollo de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC); y de la cromatografía líquida de alta resolución para proteínas, polipéptidos y polinucleótidos (FPLC).

#### Principio Básico de la Cromatografía Líquida.

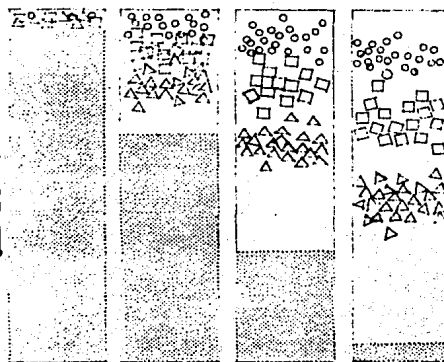
El sistema de cromatografía líquida comprende de una fase estacionaria o de empaque consistente de partículas sólidas porosas normalmente menores de 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, contenidas en un tubo de vidrio o columna; un pequeño volumen de la muestra en solución es inyectada a la columna, el eluyente o fase móvil arrastra a la muestra a través del material de empaque donde los compuestos se irán adsorbiendo y desadsorbiendo lentamente al gel de acuerdo a su afinidad por éste. Cada compuesto X es distribuido entre la fase estacionaria (e) y la fase móvil (m) al ir pasando por la columna de acuerdo a la siguiente relación:

$$X_m = K \cdot X_e$$

En donde el coeficiente de distribución para el compuesto X está dado por la siguiente fórmula:

$$K_x = \frac{X_e}{X_m}$$

En donde un valor grande de  $K_x$  indica que el compuesto es muy afin a la fase estacionaria y por lo tanto se mueve muy lentamente por la columna, mientras que a valores pequeños de  $K_x$  nos dice que el compuesto tiene mayor afinidad por la fase móvil y eluirá rápidamente de la columna. Al separarse los compuestos adquieren distintas velocidades, por lo que la separación se lleva a cabo por el flujo de la fase móvil a través de la columna como se muestra en la siguiente figura ( 51 ) ( 78 ).



La medida de concentración de cada componente al salir de la columna puede observarse en función del volumen de la fase móvil colectado y medido externamente por cualquier otro método, generalmente el flujo de la columna es monitoreado por un detector que mide propiedades físicas o químicas del soluto en la fase móvil.

#### Tipos de Cromatografía Líquida.

La diferencia en los tipos de cromatografía líquida se basa en el mecanismo

de separación y está dada por la fase estacionaria. Los tipos de cromatografía líquida de mayor interés son:

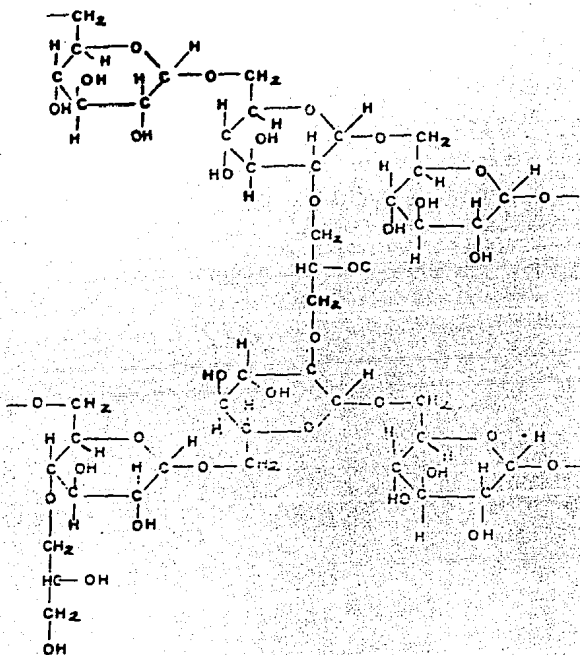
#### A) Cromatografía de Exclusión Molecular.

La cromatografía de exclusión molecular también llamada de filtración en gel ha jugado una posición clave en los últimos veinte años y se ha utilizado para la purificación de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, polisacáridos y algunas otras macromoléculas biológicas. En este tipo de cromatografía la separación de dichas moléculas se lleva a cabo de acuerdo a sus características intrínsecas (peso molecular, estructura, etc.) y no por su interacción con factores externos tales como el pH, concentración de iones metálicos, cofactores, etc. El soporte o matriz juega un papel muy importante ya que no debe presentar reacción química con la muestra a separar y debe ser estable a cambios de temperatura, pH, fuerza iónica, detergentes, etc. La cromatografía de exclusión molecular se basa en la separación de moléculas de acuerdo a su peso y tamaño, al hacerlas pasar por una columna empacada con un gel poroso en el cual las moléculas más grandes no pueden penetrar a la naturaleza intrínseca del gel siendo eluidas primero; las moléculas más pequeñas sí penetran, por lo que son retenidas y consecuentemente son eluidas en forma inversamente proporcional a su peso molecular, además de ser una técnica de separación también nos sirve para calcular el peso molecular aproximado de los componentes presentes en la muestra mediante el uso de marcadores de peso molecular conocido (73). Para llevar a cabo esta técnica se utilizan diferentes soportes; a continuación describiremos las características de cada uno de ellos.

##### A.1 Geles a Base Dextranas.

Estos geles están formados por esferas de dextranas entrelazadas con

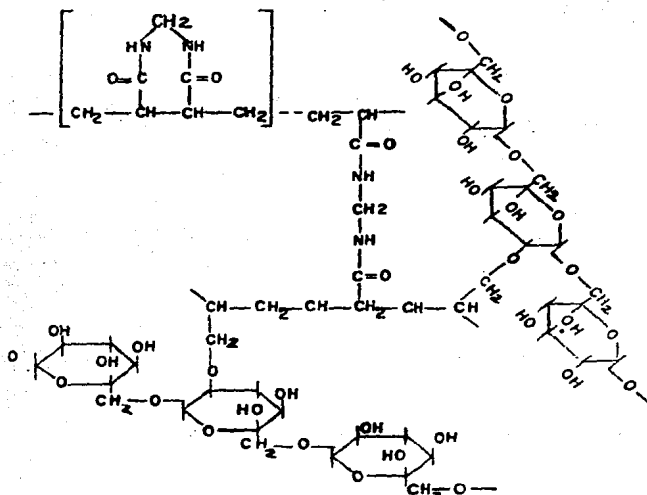
epiclorhidrinas, su estructura parcial es la siguiente:



El gran número de grupos hidróxilo hace que este gel sea demasiado hidrofílico, por lo que tiende a hidratarse al ponerse en contacto con agua, trayendo como consecuencia que el gel se hinche. Convenientemente se ha variado tanto el número de enlaces entrecruzados como el tamaño de las esferas de dextranas, lo que ha dado como resultado diferentes diámetros de esferas hinchadas (hidratadas) y consecuentemente un distinto intervalo de fraccionamiento molecular; estos gels son insolubles en casi todos los solventes, siendo estables en soluciones ácidas o básicas, sin embargo, al exponerlos a agentes oxidantes se afecta su estructura (72).

### A.2 Geles a Base de Dextranas-Acrilamida.

Este tipo de geles son preparados a base de enlaces covalentes de alil-dextranas con N,N-Metilenbisacrilamida, lo que aumenta la rigidez del gel considerablemente; su estructura hipotética es la siguiente:

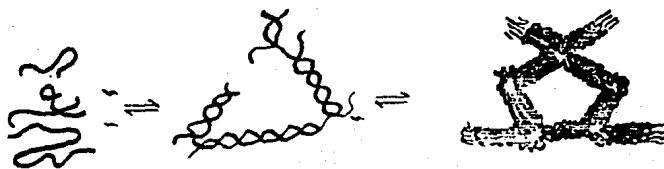


Los geles con esta estructura son insolubles en todos los solventes sin afectar su naturaleza química, se han utilizado para separar proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, algunos plásmidos e incluso virus de 300 a 400 nm de diámetro; al igual que los geles de dextranas la separación de moléculas se lleva a cabo de acuerdo al peso y tamaño de los componentes de la muestra. El intervalo de fraccionamiento molecular depende del número de enlaces de alil-dextranas con N,N-Metilenbisacrilamida.

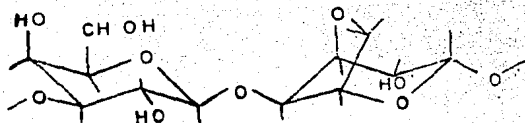
### A.3 Geles a Base de Agarosa.

En su estado natural la agarosa forma parte de una mezcla compleja

de polisacáridos a los cuales se les conoce genéricamente como agar. La agarosa que se utiliza en estos geles se obtiene por un proceso de purificación que remueve los polisacáridos cargados, quedando un gel con una carga neta muy cercana a cero. El gel se forma espontáneamente cuando a una solución previamente calentada de agarosa se le enfría, mediante este proceso las cadenas individuales de polisacáridos forman dobles hélices y subsecuentemente se forma un agregado en forma de gel estable como se muestra en la siguiente figura:

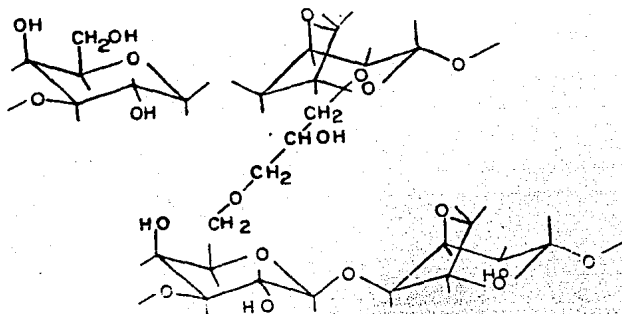


Las subunidades repetidas del polisacárido se muestran en la siguiente figura:



El intervalo de fraccionamiento está dado por el porcentaje de agarosa contenida en el gel, siendo los más comunes 2, 4 y 6%. Se ha comprobado que la estructura del gel de agarosa es estable por los enlaces de hidrógeno, y no por los enlaces covalentes (26).

Se han desarrollado nuevos geles de agarosa que se han acoplado a grupos 2, 3, dibromopropanol en condiciones alcalinas lo que permite una mayor estabilidad química y térmica, esta estructura es semejante a los geles de dextranas, su estructura se muestra en la siguiente figura:



La ventaja que ofrecen estos geles es que pueden utilizarse para separaciones a gran escala, así como para fines de investigación, utilizándolos con mayor velocidad de flujo sin afectar la resolución. Este tipo de geles son estables en medios acuosos y soluciones salinas en intervalos de pH entre 4 a 9, además los geles entrecruzados con 2, 3, dibromopropanol son estables en medios disociantes como clorhidrato de guanidina y urea; también en presencia de iones catiónicos como isotiocianato de potasio. Debido a la presencia de la 3, 6, anhidro-L-galactosa lo hacen resistente a la degradación biológica. Sin embargo, a diferencia de los otros dos tipos de geles no puede ser esterilizado por calor, para lo cual se tiene que recurrir al tratamiento con agentes químicos como el dietil-pirocarbonato (1).



### B) Cromatografía de Intercambio Iónico.

Otra alternativa en cromatografía líquida es el método de intercambio iónico, el cual ha sido ampliamente utilizado para fraccionar diferentes sustancias; el principio básico de esta técnica es que reconoce pequeñas diferencias de carga que poseen las diversas moléculas de una mezcla, estas características combinadas con las matrices hacen al intercambio iónico una técnica con buena resolución para la separación de biomoléculas ya que la mayoría de éstas son polares. En la cromatografía de intercambio iónico se utiliza una matriz insoluble a la cual se le han acoplado covalentemente grupos cargados que van a tener la función de intercambiador, es decir que pueden ser asociados a iones contrarios, los cua les pueden ser intercambiados reversiblemente sin alterar la matriz ni al intercambiador. Es posible cargar las matrices tanto positivamente como negativamente; los intercambiadores cargados positivamente interactúan con iones cargados negativamente (aniones) llamándosele a esta interacción intercambio aniónico; igualmente los intercambiadores cargados negativamente interaccionan con iones positivos (cationes) llamándosele a esta interacción intercambio catiónico. La siguiente figura muestra diferentes intercambiadores ( 5 ). ( 70).



Esta técnica se fundamenta primeramente en la adsorción de la muestra a la matriz por afinidad de cargas, las sustancias no enlazadas se elimi-

nan por lavados, posteriormente la muestra problema se eluye de la matriz. Esta separación se obtiene usando diversas sustancias que tienen distinta afinidad al intercambiador, debido a diferencias en su carga es tas afinidades pueden ser controladas variando condiciones tales como fuerza iónica y pH. Este tipo de cromatografía se ha utilizado en la se paración de compuestos con propiedades de carga muy similares, por ejemplo en la separación de proteínas que difieren en un sólo aminoácido, por lo que esta técnica tiene un alto nivel de resolución, prácticamente uno puede decidir entre adsorber a la matriz el compuesto de interés o bien adsorber los contaminantes y permitir que la sustancia de interés pase libremente a través del soporte; generalmente se utiliza la primera alternativa ya que permite un mayor grado de fraccionamiento.

Las matrices que se utilizan en esta técnica pueden ser compuestos inorgánicos, resinas sintéticas o polisacáridos; la naturaleza de la matriz determina sus propiedades físicas tales como resistencia mecánica y características de flujo, también determina su comportamiento hacia sustancias biológicas y hasta cierto grado su capacidad de intercambio.

Los primeros intercambiadores descritos fueron resinas sintéticas emplea das en tratamiento de aguas, procesos de desmineralización y recuperación de iones en aguas de desperdicio, estos intercambiadores consisten en polímeros hidrofóbicos altamente substituidos con grupos iónicos, teniendo alta capacidad de retención de iones pequeños; debido al alto gra do de entrecruzamiento requerido para darle suficiente resistencia mecánica a la matriz, la porosidad de estas matrices es muy baja para proteí nas y algunas otras macromoléculas. Además, debido a la densidad de car

ga tan alta, la unión es tan fuerte que la matriz hidrofóbica tiende a desnaturalizar compuestos biológicos lábiles, así que, a pesar de sus excelentes propiedades de flujo y su alta capacidad de retención de iones pequeños este tipo de intercambiadores no son adecuados para la separación de biomoléculas.

Los primeros intercambiadores descritos para el uso de muestras biológicas fueron hechos de materiales a base de celulosa desarrollados por Peterson y Sober (90). Ya que la celulosa es de naturaleza hidrofílica no existe el problema de desnaturalización de proteínas; desafortunadamente muchos intercambiadores de esta naturaleza tienen muy baja capacidad de retención (de lo contrario la celulosa sería soluble en agua). Además, sus propiedades de flujo son muy pobres (lento) debido a su forma irregular (71).

Posteriormente se desarrollaron soportes de dextranas y de agarosa, los cuales poseen gran capacidad de intercambio, forma esférica, uniformidad y gran porosidad incrementando así sus propiedades de flujo; la siguiente figura muestra distintos grupos funcionales utilizados para intercambio iónico (90) (54).

Intercambiador aniónico	Grupo	Estructura
A.E.	Aminoetil	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$
D.E.A.E.	Diethylaminoetil	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
T.E.A.	Triethylaminoetil	$-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
G.E.	Guanidoetil	$  \begin{array}{c}  \text{NH} \\    \\  -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH} \quad \text{CNH}_2  \end{array}  $

Intercambiador aniónico	Grupo	Estructura
P.A.B.	Para-aminobenzil	$-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$
Q.A.E.	Amina cuaternaria Diethyl 2-hidroxipropilamina	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \text{Cl}^-$
Intercambiador catiónico	Grupo	Estructura
C.M.	Carboximetil	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$
P	Fosfato	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
SE	Sulfoetil	$-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$
SP	Sulfopropil	$-\text{C}_3\text{H}_6-\text{SO}_3\text{H}$

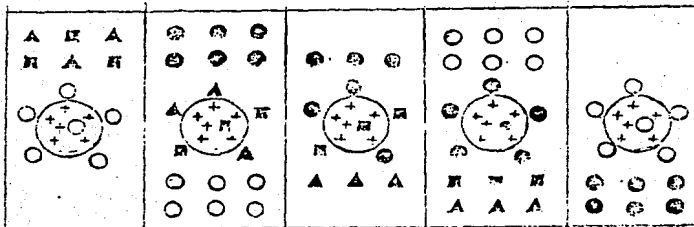
La presencia de grupos cargados es una propiedad fundamental de un intercambiador iónico, el tipo de grupo determina la fuerza de éste, su número total y disponibilidad determina su capacidad. Por ejemplo, los grupos sulfo y amins cuaternarias son intercambiadores iónicos fuertes, los grupos fosfato son intercambiadores con fuerza intermedia y los grupos dietilaminoetil y carboximetil son intercambiadores débiles (30).

Los términos fuerte y débil se refieren a la variación en ionización del gel de acuerdo al pH. Los intercambiadores fuertes son completamente ionizables dentro de un intervalo amplio de pH y los intercambiadores iónicos débiles varían marcadamente con el pH en su capacidad de intercambio. La capacidad de un intercambiador iónico es la medida cuantitativa de su

habilidad de adsorber iones contrarios, la capacidad puede ser expresada como capacidad total y se da como la cantidad de grupos cargados por gramo de intercambiador iónico seco. La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo en varias etapas que son:

1. Equilibrar el intercambiador.
2. Adicionar la muestra.
3. Eluir contaminantes.
4. Cambiar las condiciones para eluir la muestra.
5. Regenerar el intercambiador.

Estas etapas se muestran en la siguiente figura ( 71 ).



Paso No. 1 Se equilibra el intercambiador con iones contrarios (amortiguador).

Paso No. 2 Los iones contrarios son reemplazados por la muestra.

Paso No. 3 Después de la adsorción de la muestra se aplica un gradiente de pH o fuerza iónica para eluirla.

Paso No. 4 Se reemplazan los iones del gradiente con iones contrarios para regenerar las condiciones iniciales.

Paso No. 5 El intercambiador está listo para ser usado nuevamente.

Elección de la Matriz.

No existe una matriz ideal para poder llevar a cabo este tipo de cromatografía, por lo que para seleccionarla se deberán tomar en cuenta los si-

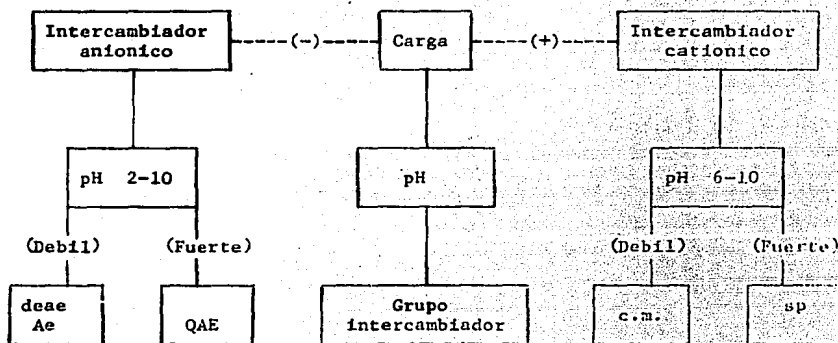
güientes parámetros:

1. Las características de los componentes de la muestra.

Las sustancias se unen al intercambiador iónico cuando su carga es contraria llevándose a cabo una interacción electrostática y reversible; para las sustancias que tienen un sólo tipo de carga es fácil escoger el intercambiador, sin embargo, para sustancias que poseen cargas tanto positivas como negativas (anfóteras) es necesario recordar que su carga depende del pH: por lo anterior es aconsejable conocer cual es el valor de pH en el cual alcanza su punto isoeléctrico; el punto isoeléctrico de una proteína se define como aquel valor de pH en el que la carga neta de la proteína es igual a cero, por lo tanto, si los componentes son más estables a valores de pH, más bajos de su punto isoeléctrico se debe utilizar un intercambiador catiónico, por el contrario a valores de pH más altos de su punto isoeléctrico se debe utilizar un intercambiador aniónico (70) (93).

2. Tamaño de los Componentes de la Muestra.

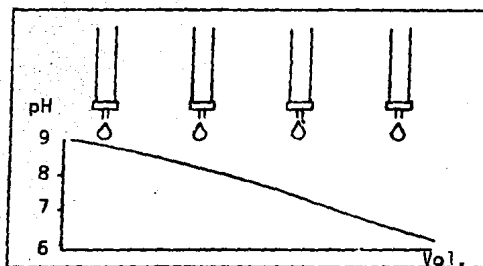
La porosidad de un intercambiador iónico no tiene efecto en el mecanismo de enlace de la muestra, pero sí tiene influencia en su capacidad ya que en matrices de baja porosidad los grupos cargados no se encuentran muy expuestos y las moléculas grandes no van a unirse adecuadamente; para evitar esto es necesario determinar cual es el intervalo de exclusión molecular del soporte a utilizar o aún mejor, es aconsejable conocer el peso molecular aproximado de los componentes para así seleccionar la matriz adecuada. La siguiente figura muestra un cuadro para seleccionar el intercambiador iónico adecuado (71).



### C) Cromatoenfoque.

El cromatoenfoque es un método diseñado para separar proteínas de acuerdo a sus puntos isoeléctricos, (PI) al igual que la cromatografía de intercambio iónico es una técnica de alta capacidad. El cromatoenfoque se lleva a cabo en columnas cromatográficas normales empacadas con un gel intercambiador hecho a base de agarosa al 6% entrecruzada con grupos cargados; una vez equilibrado con una solución amortiguadora inicial se aplica la muestra problema y es eluida con una solución amortiguadora especial llamada poliamortiguador ajustado a un pH más bajo que la solución amortiguadora inicial. Estos eluyentes poseen compuestos aminados con una amplia capacidad amortiguadora, por lo que forman gradientes de pH desde básicos hasta ácidos. El pH en la solución que eluye de la columna al comienzo de la elución es muy próximo al pH inicial a medida que la elución progresa, el pH en cada segmento de la columna se hace gradualmente

más ácido debido a que se está adicionando más solución eluyente poliamortiguadora generando de esta manera un gradiente de pH. En la etapa final de la elución casi toda la columna alcanza el equilibrio con el eluyente y el pH se acerca al pH de la solución poliamortiguadora, esto se muestra en la siguiente figura.

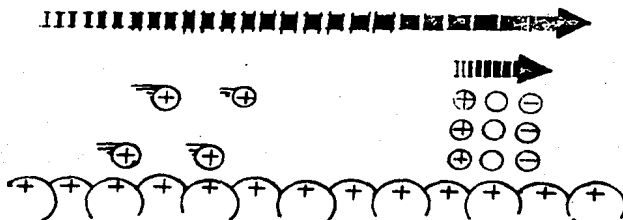


Un gradiente de pH se genera normalmente utilizando un mezclador de gradientes, en el cual una cámara de mezclado es llenada con una solución inicial a un cierto valor de  $pH_1$  y la otra cámara contiene la solución amortiguadora limitante a otro pH; el cromatofoco aprovecha la capacidad amortiguadora de los grupos cargados contenidos en los intercambiadores iónicos especiales por lo que el gradiente de pH se forma automáticamente a medida que la solución poliamortiguadora de elución titula los grupos del intercambiador especial.

Una proteína aplicada a la columna migrará con el eluyente hasta que el pH de éste sea igual a su punto isoelectrico, no puede migrar más allá de este punto porque si lo hace adquirirá una carga negativa y se unirá



al gel intercambiador, la proteína tampoco puede migrar hacia el tope de la columna porque adquirirá carga positiva y será repelida por la matriz del gel intercambiador. Por lo tanto, las proteínas eluyen como zonas muy estrechas (enfocadas) de acuerdo al valor de sus puntos isoeléctricos. Este efecto se ilustra en la siguiente figura en donde lo largo de las flechas sobre la zona representa la velocidad de migración.



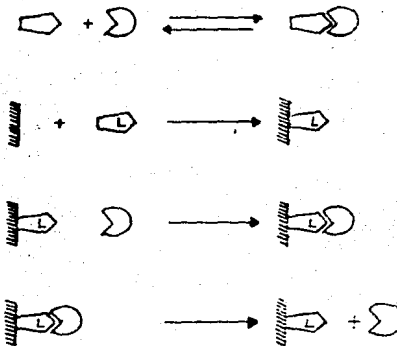
Proteínas con distintos puntos isoeléctricos migrarán a diferentes distancias en la columna antes de encontrar el valor de pH que sea igual a sus puntos isoeléctricos correspondientes, al agregar más eluyente poliamortiguador serán eluidas de acuerdo a sus respectivos puntos isoeléctricos (69) (93).

#### D) Cromatografía de Afinidad.

La cromatografía de afinidad ocupa un lugar único en la tecnología de separación molecular ya que nos permite purificar casi cualquier molécula en base a su función biológica y a su estructura química individual, llevándose a cabo una adsorción específica y reversible entre la molécula a purificar y una substancia complementaria llamada ligando, inmovilizada a un soporte insoluble. La alta selectividad de la separación está dada por la naturaleza específica de las moléculas interaccionantes aprovechando esta propiedad para purificar substancias biológicamente activas de mezclas; separar proteínas activas de proteínas desnaturalizadas, etc.

Las primeras aplicaciones de la cromatografía de afinidad fue la adsorción selectiva de amilasa en geles de almidón insoluble en 1910, en 1967 Axen y Porath reportaron el uso de matrices a base de polisacáridos para acoplar grupos amino primarios activados con Bromuro de cianógeno (78), lo que representó el inicio de la cromatografía de afinidad.

El principio de este tipo de cromatografía se muestra en la siguiente figura (68).



Para llevar a cabo este tipo de cromatografía se requiere de un ligando específico, el cual debe unirse covalentemente al material cromatográfico dejando libre la zona de especificidad del ligando para llevar a cabo la adsorción de la muestra a separar. Los compuestos comunmente utilizados como ligandos se muestran en la siguiente tabla:

Ligando	Substancia a separar
Substrato análogo, cofactor.	Enzima
Antígeno, célula, virus.	Anticuerpo
Polisacárido, glicoproteína.	Lectina
Base o secuencia complementaria.	Acido nucléico

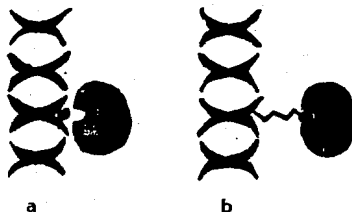
Receptor.	Hormona
Proteína específica de superficie celular.	Célula

La matriz formada comunmente de agarosa juega un papel muy importante para la inmovilización biológica de la molécula activa, los grupos hidroxilo de los residuos de azúcar pueden reaccionar covalentemente por ligandos. La elección del ligando está dada por dos factores:

1. El ligando debe ser específico y su enlace debe ser reversible para recuperar la substancia unida, purificándola de esta manera.
2. El ligando al unirse covalentemente a la matriz no debe modificar su sitio activo.

Comunmente el sitio activo de una substancia biológica debe ser localizado por el ligando que a su vez está acoplado directamente al gel de agarosa, ésto ha mostrado bajas capacidades de enlace por impedimento estérico entre la matriz y la substancia a enlazarse al ligando, por lo que se han interpuesto moléculas entre el gel y el ligando llamadas brazos espaciadores, facilitando un enlace efectivo. La longitud de estos brazos espaciadores es crítica, ya que si es muy corto el enlace del ligando con la muestra no se lleva a cabo, si por el contrario es muy largo hay una reacción inespecífica dando efectos que disminuyen la selectividad de separación.

La siguiente figura muestra el principio de los brazos espaciadores:



a) Ligando unido directamente a agarosa.

b) Ligando unido a agarosa por un brazo espaciador.

Existen brazos espaciadores de diferentes tamaños, siendo los más usados los de seis carbonos de longitud.

Los adsorbentes comunmente usados son:

Adsorbente	Bioespecificidad
Agarosa-proteína A	Región Fc de IgG
Agarosa-concanavalina A	Grupo (alfa)-D-glucopiranosil terminal
Agarosa-lentil lectina	Residuos carbohidrato simple
Agarosa-lectina de germen de trigo	Residuos N-acetil-D-glucosamina
Agarosa-poli U	Secuencia especifica de ácido nucléi-co (poli-A)
Agarosa-lisina	RNA Ribosomal
Agarosa-azul de cibacron	Enzimas que requieren cofactores

### E) Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

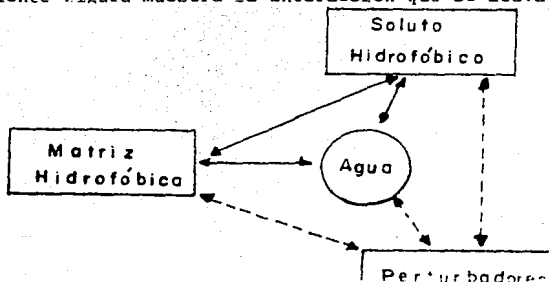
La cromatografía de interacción hidrofóbica es una técnica que separa sustancias en base a las diferentes fuerzas de interacción hidrofóbica con una matriz no cargada que contiene grupos hidrofóbicos expuestos en su superficie, dicha propiedad es utilizada en este tipo de cromatografía para separar proteínas y utiliza matrices sintetizadas por activación de la agarosa con Bromuro de Cianógeno haciéndolas reaccionar con grupos diamino-alcanos.

En este tipo de separación intervienen tres compuestos principales que son:

1. La matriz hidrofóbica.
2. El agua del solvente.
3. El soluto hidrofóbico.

La fuerza de interacción entre el soluto y la matriz depende de la hidrofobicidad del soluto, de la hidrofobicidad de la matriz y de las interacciones con y entre las moléculas de agua del solvente; cualquier perturbación en el cambio de temperatura, pH y fuerza iónica puede afectar el comportamiento de estos componentes básicos para una buena resolución.

La siguiente figura muestra la interacción que se lleva a cabo:



Las sustancias son separadas en base a la diferencia en la fuerza de sus interacciones hidrofóbicas con el material de la matriz sin carga que contiene grupos hidrofóbicos.

La fuerza de interacción entre el soluto y la matriz depende de la hidrofobicidad del soluto, la hidrofobicidad de la matriz (que depende del tipo y número de grupos hidrofóbicos que contenga), y de las interacciones con y entre las moléculas de agua del solvente. Los grupos acoplados a la matriz que le dan características hidrofóbicas son los siguientes:

Octilo, Fenilo, Aminohexil y Carboxihexil; los dos últimos se utilizan para casos especiales en donde se necesita un efecto mixto de interacción hidrofóbica con intercambio iónico. Las sustancias adsorbidas se fraccionan alterando las condiciones de elución, ésto puede realizarse de las siguientes maneras:

1. Disminuyendo la fuerza iónica.
2. Cambiando a un sistema de eluyente en el que los iones tengan un efecto caotrópico mayor, es decir una tendencia incrementada a romper la estructura del agua y disminuir la interacción hidrofóbica.
3. Disminuyendo la polaridad del eluyente.
4. Adicionando un detergente en el eluyente.
5. Elevando el pH del eluyente.

La fuerza iónica de la solución depende de la concentración de iones y ésto puede variar la fuerza de la interacción hidrofóbica de acuerdo a la naturaleza química de éstos (79); a continuación se muestra una tabla de iones clasificados de acuerdo a su hidrofobicidad.

← Aumento en el efecto saltin out

Aniones:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$

Cationes:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$

Aumento en el efecto caotrópico →

#### F) Cromatografía en Fase Reversa.

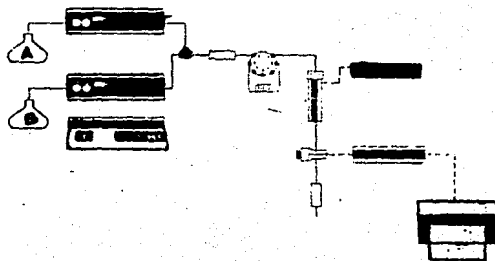
La cromatografía en fase reversa es una técnica de separación de moléculas en base a su hidrofobicidad, la separación de los componentes de la muestra depende de sus características respectivas de solubilidad; ya que la matriz se comporta lipofílicamente, mientras que el eluyente tiende a cambiar sus propiedades hidrofílicas por hidrofóbicas al adicionar un solvente orgánico en forma de gradiente, esto permite que los componentes de la muestra que sean solamente solubles en soluciones acuosas y aquellos que sólo sean solubles en solventes orgánicos puedan separarse unos de otros en base a la solubilidad, al unirse a la matriz lipofílica en forma reversible.

El mecanismo de separación se da por la adsorción de los componentes de la muestra a la fase estacionaria dada por las condiciones de la fase móvil, la matriz está hecha a base de esferas de sílica recubiertas por una capa de lípidos de cadenas de 2, 8 y 18 carbonos, usándose generalmente cadenas de 2 a 18 carbonos para separación de péptidos y de 1 y 8 carbonos para proteínas; para aminoácidos se utilizan esferas de sílica más pequeñas y cadenas lipídicas de 8 a 18 carbonos; la fase móvil determina las condiciones de hidrofobicidad e hidrofílicidad al aumentar en forma de gradiente la composición de un solvente orgánico. Los solventes comúnmente usados en orden de hidrofobicidad son: Tetrahidrofurano,

Acetonitrilo, Propanol y Metanol.

### G) Cromatografía Líquida de Alta Presión.

La cromatografía líquida moderna se basa en una alta rapidez de separación y análisis de mezclas de complejos químicos, combinando las diferentes técnicas tradicionales como son la filtración molecular, intercambio iónico, cromatoenfoque y fase reversa. Inicialmente la cromatografía líquida era una técnica de separación lenta realizada en columnas verticales utilizando un flujo por gravedad, recientes desarrollos le han proporcionado gran versatilidad. El aumento en la velocidad de flujo está dada por la presión, ya que la solución eluyente se bombea a la columna a presiones muy altas. Un diagrama del sistema de cromatografía líquida se muestra en la siguiente figura (82 ), ( 14 ).



Los componentes de la muestra son eluidos de la columna y pasan a través de uno o más detectores basados en: absorción de luz U.V., absorción de luz visible, pH, conductividad, índice de refracción, etc.



El uso de distintos tipos de detectores en serie nos da mayor información de los componentes separados, las señales del detector son registradas en base a la desviación de una línea base, la posición de los picos a lo largo de la elución nos muestra los componentes en particular, los cuales dependen de sus características de elución.

En este tipo de cromatografía no se pueden utilizar geles convencionales debido a que la alta presión utilizada los colapsa; para evitar esto se han utilizado geles con diámetros de esfera muy pequeños, lo cual aumenta enormemente el área de superficie que al aplicarles una gran presión permite buenas separaciones con alta resolución para moléculas pequeñas, desafortunadamente al intentar pasar moléculas grandes por estas matrices se observaba que se desnaturalizaban ( 4 ), ( 30 ).

A principios de los ochentas Ugelstald y colaboradores ( 7 ), (103), desarrollaron un proceso para hacer partículas esféricas, rígidas y porosas de un mismo diámetro con una desviación estándar muy pequeña hechas a base de poliéter estas pequeñas esferas se han usado para empacar columnas cromatográficas y se han denominado monoesferas monodispersas ( 91 ). Eluyendo con presiones relativamente altas, se ha separado biomoléculas grandes (proteínas, polipéptidos y polinucleótidos), conservando su actividad biológica ( 47 ), ( 5 ).

Johansson B.L. ha reportado el uso de esferas de agarosa para cromatografía líquida de filtración en gel de alta resolución obteniendo magníficos resultados ( 45 ), ( 46 ), ( 47 ).

Las cualidades más importantes de las matrices utilizadas para la cromatografía

tografía líquida de alta resolución son:

- a) Estabilidad como matriz en un intervalo de pH de 2 a 12.
- b) Tamaño de poros intraesféricos mayores de 500 Å, lo cual permite que la muestra a separar no pierda su actividad biológica.
- c) Su composición química debe permitir altas velocidades de flujo con bajas presiones de rebote.
- d) Resistencia a solventes orgánicos.
- e) Inertes ya que no deben reaccionar con muestras y/o eluyentes.

Estas propiedades deben conservarse cuando se les une grupos intercambia<sup>do</sup>dores iónicos, así como cadenas lipídicas para poder utilizarse en técnicas como son la cromatografía líquida de intercambio iónico, cromatografía de, cromatografía en fase reversa y filtración molecular (19), (73).

### III. APLICACIONES

En este capítulo se describen las aplicaciones de la cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) publicadas en revistas de interés científico en los últimos años, así como los resultados y cromatogramas obtenidos en cada reporte, mostrando las ventajas de esta tecnología que podrían resumirse en:

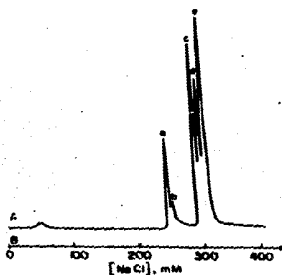
1. Minimizar tiempos de corrida.
2. Aumentar la resolución de la separación.
3. Preservar la actividad biológica de la muestra permitiendo hacer posteriores pruebas de actividad biológica.

Estas ventajas se deben al uso de matrices hechas a base de sílica y de resinas sintéticas hidrofílicas porosas, con un tamaño de esfera específico permitiendo realizar, cromatografía líquida de intercambio aniónico, cromatografía líquida de intercambio catiónico, cromatografía líquida de filtración molecular, cromatografía líquida en fase reversa; dependiendo del grupo que se le acople a dicha matriz.

#### ATPasa.

Finel, M. y Rubinstein, M. (32) reportan la purificación de un factor acoplado a cloroplastos de espinaca que tiene una actividad enzimática alta de ATPasa; utilizando un lisado de cloroplastos de espinaca, haciéndolo pasar por una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias; (columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC). Encontrando cinco picos los cuales fueron caracterizados por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida, la actividad enzimática

tica de los picos fue determinada según Nelson y Lien (63), la siguiente figura muestra el cromatograma obtenido.

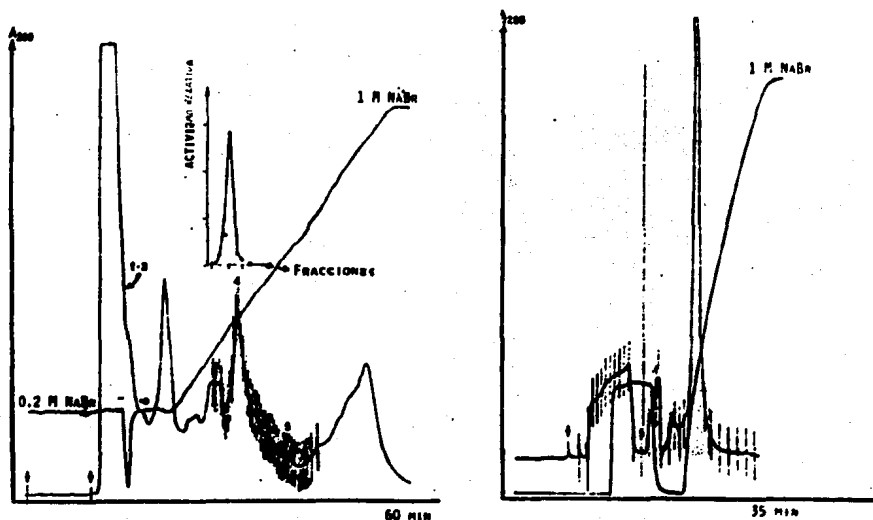


Las condiciones de elución fueron p.H. 8.5, gradiente de NaCl de 0 a 400 mM de los cinco picos obtenidos, cuatro de ellos conservaron su actividad enzimática de ATPasa. Lo que muestra que la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico es una herramienta útil para la separación y purificación de biomoléculas con actividad de ATPasa.

#### Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa.

Lindblom, H. (55) reporta la purificación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de un concentrado de enzimas de levadura; utilizando una columna preparativa preempacada con esferas de sílica de 17  $\mu\text{m}$  de diámetro, sustituidas con aminas terciarias y una columna analítica preempacada con esferas de sílica de 8  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminas terciarias; ambas son intercambiadores aniónicos de alta resolución (Columnas Polyanión S.I. 17  $\mu\text{m}$  y Polyanión S.I. 8  $\mu\text{m}$  respectivamente). Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, la actividad enzimática fue me-

dida en placas de microtitulación, incubando con glucosa 6-fosfato como sustrato midiendo la reacción espectrofotométricamente. Las siguientes figuras muestran los respectivos cromatogramas.



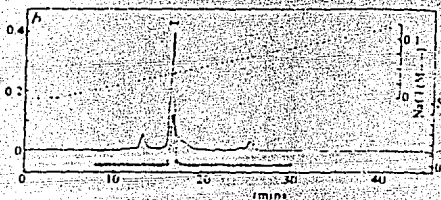
Condiciones de elución para ámbos fueron pH 6.8 gradiente de NaBr 0.2 a 1 M.

1. Columna preparativa Polyanion S.I. 17  $\mu\text{m}$ .
2. Columna analítica Polyanion S.I. 8  $\mu\text{m}$ .

De acuerdo a estos resultados podemos concluir que para una mejor separación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa por cromatografía líquida de alta resolución se deberá utilizar una columna con esferas de sílica de 8  $\mu\text{m}$ , ya que es en la que se observó una mejor separación molecular.

### Proteasa.

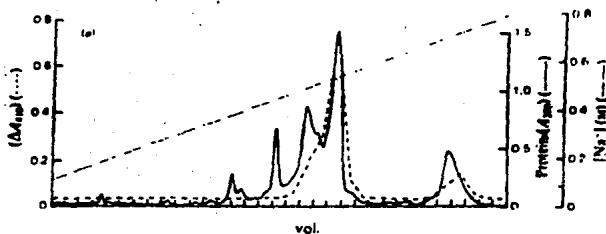
Mizuno, K. y Matsuo, H. (62) reportan la purificación de una proteasa con actividad específica de corte en los residuos básicos lisina-arginina; de Sacharomyces cerevisiae utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  sustituidas con aminos cuaternarios (columna Mono Q, HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC). De la máxima densidad óptica obtenida se le midió la actividad proteolítica específica por el método de radioinmunoensayo, utilizando leucin-encefalina-arginina como sustrato; revelando con un anticuerpo anti-leucin-encefalina-arginina marcado radioactivamente, la intensidad de la marca radioactiva es inversamente proporcional a la actividad enzimática. Además el pico se caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en sistema discontinuo; analizado por tinción de plata. La siguiente figura muestra el cromatograma obtenido:



Condiciones de elución pH 8.0 gradiente de NaCl de 0-0.125 M columna Mono Q, HR 5/5 cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico FPLC. Concluyendo de este cromatograma que esta técnica es bastante buena permitiendo obtener esta proteasa en un solo pico, para posteriormente hacer estudios de actividad enzimática.

### Quimopapaína.

Buttle, A. J. y Barret, A. J. (13) reportan la purificación de papaína a partir de fruta de papaya (carica papaya). Utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  sustituidas con grupos sulfonato (intercambiador catiónico de alta resolución columna Mono S HR 5/5 FPLC). De los picos eluidos se identificaron los residuos N-Terminales, al reaccionar con cloruro de dansilo; la actividad inmunológica fue medida por el método de doble inmunodifusión utilizando anticuerpos anti-quimopapaína, la actividad enzimática fue determinada por la hidrólisis de BZ-ARG-NPh-NO<sub>2</sub> espectrofotométricamente, la actividad proteolítica fue determinada usando azocaseína como sustrato. La siguiente figura muestra el cromatograma obtenido:

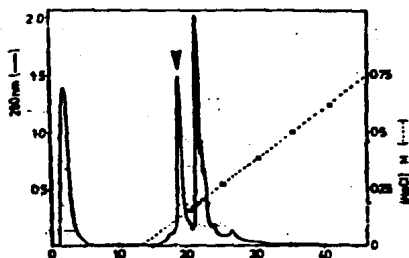


### Purificación de Quimopapaína de Papaya.

Condiciones de elución pH 5.0 gradiente de NaCl de 0.15 a 0.8 M columna Mono S HR 5/5 cromatografía líquida de alta resolución FPLC. Identificando tres tipos de enzimas papaína, quimopapaína y papaya proteasa, la línea punteada muestra la actividad de quimopapaína. Concluyendo que la cromatografía líquida de alta resolución es una técnica que nos ayuda a reconocer y a separar distintas enzimas producidas por la fruta papaya (carica papaya).

### Desoxiribonucleasa I.

Markey, F. (60) reporta la purificación de la enzima desoxiribonucleasa I, utilizando una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m sustituidas con aminos cuaternarias (columna Mono Q. HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC). Las fracciones eluidas con mayor densidad óptica a 280 nm fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y su actividad enzimática de DNAsa se determinó por inhibición de la actividad de DNAsa por actina; la siguiente figura muestra el cromatograma obtenido.



Purificación de DNAsa I por cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico (columna Mono Q. HR 5/5 FPLC).

Condiciones de elución pH 7.6 gradiente de NaCl de 0-0.75 M monitoreando a 280 nm. La flecha vertical (  $\blacktriangledown$  ) muestra el pico con mayor actividad de nucleasa, lo que indica que por este método podemos separar satisfactoriamente enzimas del tipo de la desoxiribonucleasa I.

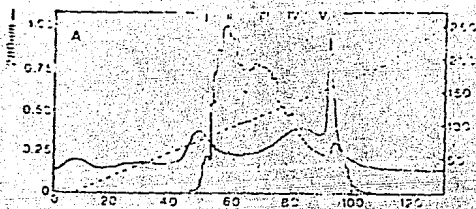
### Fosfoprotein Fosfatasa.

Sahyoun, N. y Cuatrecasas, R. (86) (108) reportan la purificación de una fosfo-



protein fosfatasa que actúa desfosforilando la histona H 1 fosforilada, aislada de citosol de hígado de rata; se utilizó una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias (columna Mono Q. HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC).

A las fracciones eluidas se les midió su actividad enzimática de fosfatasa utilizando como sustrato histona H-1, se caracterizó por electroforesis en SDS-Poliacrilamida para identificar histona H-1 fosforilada e histona H-1 no fosforilada; además se observó la especificidad de esta fosfoprotein fosfatasa utilizando como sustrato las siguientes histonas: H 1, H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H 3 y H 4 encontrando una gran especificidad hacia H 1. La siguiente figura muestra las fracciones con mayor actividad.

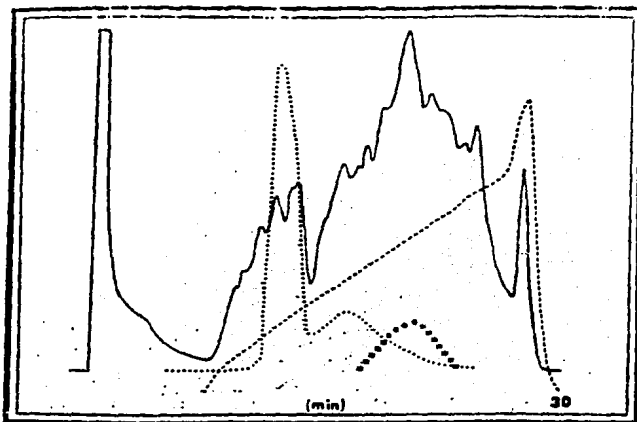


Purificación de fosfohistona fosfatasa por cromatografía líquida de alta resolución columna Mono Q. HR 5/5 FPLC. Condiciones de elución: pH 7.5 gradiente de NaCl de 0-0.5 M.—Actividad enzimática,  $\square$  concentración de proteína.

Esta figura nos muestra que por cromatografía líquida de alta resolución se conserva la actividad enzimática de fosfatasa.

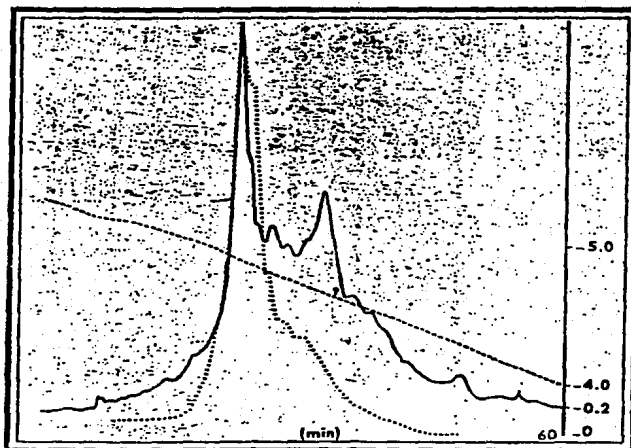
### Fosfatasa Alcalina.

Britton, V.I., Barry, A. y Ezra, E. (9) (27) reportan la purificación de fosfatasa alcalina de un extracto crudo de intestino equino utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m sustituidas con aminas cuaternarias columna Mono Q. HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. A las fracciones obtenidas se les midió la actividad de fosfatasa alcalina; de las cuales las que tuvieron mayor actividad fueron analizadas ahora por cromatoenfoque utilizando una columna preempacada con esferas de sílica de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con poliaminas columna Mono P HR 5/20 y eluida con una solución poliamortiguadora, separando por puntos isoeléctricos caracterizando los picos obtenidos por enfoque isoeléctrico.



Cromatograma de fosfatasa alcalina de intestino equino utilizando una columna Mono Q. HR 5/5 cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico FPLC. Condiciones de elución: pH 8.0 gradiente de NaCl de 0-0.35 M ( ) 280 nm (....) actividad de fosfatasa alcalina. (---) gradiente de NaCl,

(\* \* \*) actividad de nucleasa.



Cromatograma obtenido en una columna Mono P HR 5/20 el pico muestra el aislamiento de la enzima fosfatasa alcalina.

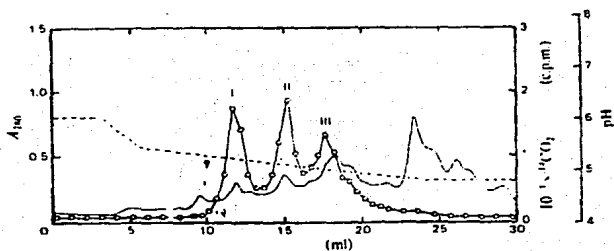
Condiciones de elución: eluido con polybuffer 74 a pH 4.0 ( - ) 280 nm (....) actividad enzimática de fosfatasa alcalina ( - - - ) gradiente de pH.

En resumen la cromatografía líquida de intercambio iónico de alta resolución con monoesferas puede ser usada para purificar y asegurar la calidad de enzimas utilizadas en tecnologías como la de DNA recombinante por la rapidez y versatilidad del método aplicado en este estudio.

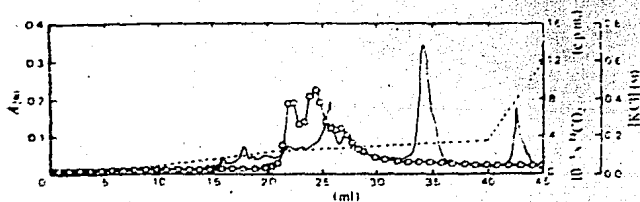
Butirotetaina Hidroxilasa.

Lindstedt, S. y Nordin, I. (58) reportan la separación de tres tipos de gama-bu-

tirobetaína hidroxilasa de riñón humano, utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con poliaminas, columna Mono P HR 5/20 cromatoenfoco de alta resolución FPLC; a las fracciones eluidas con mayor absorción a 280 nm se les hicieron pasar a través de una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q. HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC, logrando separar tres picos a los que se les midió actividad enzimática de hidroxilasa, incubando la enzima purificada con 2-OXO-1- $^{14}\text{C}$ -glutarato. Observando la cantidad desprendida de  $^{14}\text{CO}_2$ ; cuantificaron el contenido de proteínas por el método de Lowry y caracterizaron por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y enfoque isoeléctrico.



Cromatograma que muestra la separación de gama-butirobetaina hidroxilasa en una columna Mono P HR 5/20 cromatoenfoco de alta resolución FPLC. Condiciones de elución: pH de la columna 6.0 eluida con polybuffer 74 pH 4.8.



Cromatogramas de los picos obtenidos por cromatoenfoco y pasados por una columna Mono Q. HR 5/5 intercambio aniónico FPLC condiciones de elución para los tres fue: pH 6.5 ( - - ) actividad enzimática ( o ) 280 nm ( - - - ) gradiente de KCl de 0- 0.2 M.

El uso de monoesferas para purificación de gama butirotetaina hidroxilasa es una buena herramienta para obtenerla en forma altamente pura para su posterior caracterización bioquímica.

#### Leucotrien A<sub>4</sub> Hidrolasa.

Radmark, O. y Samuelson, B. (77) reportan el aislamiento de la enzima leucotrien A<sub>4</sub> hidrolasa de leucocitos humanos; los leucotrienos constituyen un grupo de metabolitos oxigenados de ácidos grasos derivados del ácido araquidónico con funciones relacionadas a inflamación e hipersensibilidad inmediata; después de un proceso de precipitación y cromatografía en Deae-Celulosa utilizan la cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución columna Polyanion SI FPLC. Después de este proceso las fracciones con actividad de hidrolasa se hicieron pasar por una columna Aca 44 100 X 1.5 de filtración en gel, de este paso se escogieron las fracciones con actividad y se purificaron por cromatoenfoco de alta resolución, columna Mono P. HR 5/20 eluida con una solución polybuffer 74.

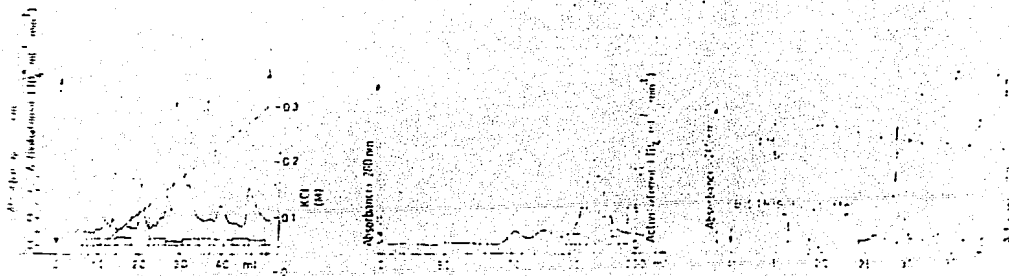


Figura 1 Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución FPLC. columna Polyanion SI eluida a pH 7.7 gradiente de KCl de 0- 0.3 M.

Figura 2 Cromatografía de filtración en gel columna AcA 44 100 X 1.5 eluida a pH 8.0.

Figura 3 Cromatografía de alta resolución columna Mono P HR 5/20 FPLC eluida con polybuffer 74 pH 4.8.

Las actividades enzimáticas fueron determinadas en alícuotas de 1.5 ml, pH 7.8 incubando con  $LTA_4$  durante 1 min. a  $37^\circ C$  y midiendo la concentración de subproductos por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa HPLC.

Como podemos observar en las figuras se logró una alta purificación por distintos métodos cromatográficos.

#### Transhidrogenasa.

Persson, B. y Rydstrom, J. (67) reportan la purificación de nicotinamida nucleotido transhidrogenasa de corazón de bovino; utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu m$  de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. A los picos eluidos se les determinó la actividad enzimática de transhidrogenasa por reducción de 3-oxo-acetil piridina dinucleotido, en presencia de NADPH; se caracterizó por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida revelando por tinción de plata.

Nota: Esta referencia no muestra cromatograma.

La purificación de transhidrogenasa mitocondrial por medio de la cromatografía líquida de alta resolución FPLC, en combinación con otros métodos de fraccionamiento dio lugar a una preparación con actividad altamente específica y con un contenido homogéneo de dicha enzima, lo anterior se pudo comprobar mediante corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida; la preparación obtenida comparada con preparaciones previas tiene mayor pureza y el método ofrece gran reproducibilidad, recuperándose grandes cantidades de la enzima transhidrogenasa.

#### Isocitrato Deshidrogenasa.

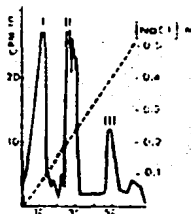
Danson, M. J. y Wood, P. A. (17) reportan la purificación de la enzima isocitrato deshidrogenasa de un cultivo bacteriano de Sulpholobulus acidocaldarius. Utilizando una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. A las fracciones eluidas con mayor densidad óptica a 280 nm se les midió su actividad enzimática de deshidrogenasa incubando las fracciones a 55°C con isocitrato como sustrato; midiendo la reacción espectrofotométricamente; además, se caracterizó por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.

Nota: Esta referencia no muestra cromatograma.

La separación de enzimas del tipo deshidrogenasa es posible utilizando este tipo de cromatografía, en especial con una columna Mono Q. HR 5/5 de intercambio aniónico de alta resolución FPLC.

### Fosfoprotein Cinasa.

Gacon, G. y Comoglio, P. M. (34) reportan la purificación de la enzima tirosin fosfoprotein cinasa de una línea celular de linfoma murino. Primero se realizó el ensayo de actividad enzimática de cinasa en el extracto crudo, utilizando gastrina como sustrato e incubando con  $^{32}\text{P}$ -ATP, para separar la enzima. Se hizo pasar una fracción solubilizada por detergentes de un extracto de células marcada con  $^{32}\text{P}$ -ATP por una columna de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5 FPLC; encontrando tres picos, los cuales fueron analizados por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y revelados por autoradiografía.



Cromatograma de tirosin fosfoprotein cinasa purificada de un cultivo celular de linfoma murino. columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-0.5 M pH 7.0, los picos fueron detectados en un contador de centelleo.

Como podemos observar la cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución es útil para separar compuestos radioactivos a los que se les determinará la actividad enzimática de tirosin fosfoprotein cinasa por fosforilación de la gastrina como sustrato.



### Lisofosfolipasa Transilasa.

Gross, R. W. y Sobel, B. E. (36) reportan la purificación de la enzima lisofosfolipasa transilasa de miocardio de conejo utilizando tres métodos cromatográficos:

1. Cromatografía de intercambio iónico con Deae-Celulosa.
2. Cromatografía en Hidroxiapatita.
3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución columna Mono Q HR 5/5 FPLC.

A los picos eluidos en cada cromatografía se les midió su actividad enzimática de lisofosfolipasa transilasa al incubar las fracciones con  $^{14}\text{C}$ -Liso Palmitoil fosfocolina; a pH 7.0 y  $37^\circ\text{C}$ ; separando los productos de reacción por cromatografía en capa fina. Una vez desarrollada la placa, las regiones correspondientes a ácidos grasos y fosfatidilcolina fueron analizados en un contador de centelleo, además cada pico fue caracterizado por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.



Cromatogramas que muestran la purificación de lisofosfolipasa transilasa:

1. Deae-Celulosa; 2. Hidroxiapatita; 3. Columna Mono Q HR 5/5 FPLC.
- ( o ) Ácidos grasos radioactivos.  
 ( • ) Fosfatidilcolina radioactiva.  
 ( - ) D.O. 280 nm.

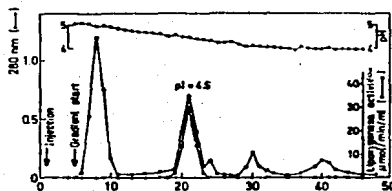
(---) Gradiente de fosfatos 0-150 mM.

(.....) Gradiente de NaCl 0-1 M.

De acuerdo a estas figuras, el método en el que se obtiene mayor resolución es utilizando la columna Mono Q. HR 5/5 FPLC; obteniendo una concentración de la muestra de 19,000 veces en su actividad de lisofosfolipasa y de 69,000 veces en su actividad de transilasa, con respecto al extracto crudo.

#### Lipoxigenasa Sintasa.

Shimizu, T. y Samuelson, B. (89) reportan la purificación de una enzima con actividades de lipoxigenasa y de sintasa, que actúa en la síntesis de ácido araquidónico; la purificación se llevó a cabo utilizando métodos cromatográficos tradicionales como cromatografía líquida de intercambio iónico y de filtración molecular con Deae-sephadex A-50 y sephacryl S-300 respectivamente, después de estos pasos se hizo pasar la muestra por una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con poliaminas llevando a cabo cromatofoco de alta resolución columna Mono P HR 5/20. A los picos obtenidos por esta columna se les probó su actividad enzimática de lipoxigenasa utilizando un monitor de oxígeno, incubando a 24°C pH 6.3 más ácido linoleico; midiendo la cantidad consumida de oxígeno; la actividad enzimática de sintasa se midió en una mezcla de reacción a pH 6.3 con ácido 5-hidroxi-6-trans-8-icosatetraenoico, analizando los productos de reacción por cromatografía líquida en fase reversa de alta presión HPLC, columna nucleosil 50-S C<sub>2</sub>. Además midieron la cantidad de proteínas por el método de Lowry.



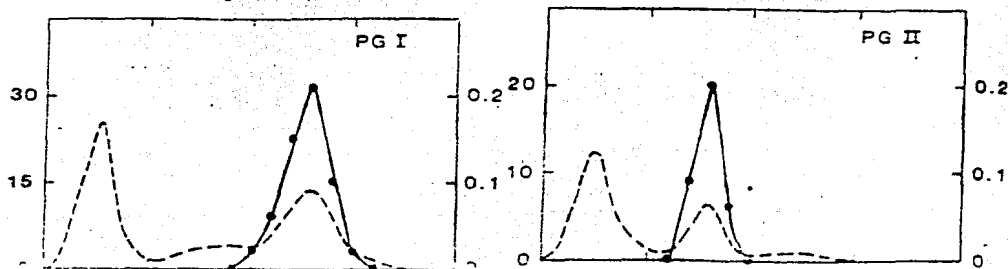
Cromatograma obtenido de la purificación de la enzima lipoxigenasa sintasa de tuberculos de papa. Columna Mono P HR 5/20 de cromatoenfoco de alta resolución FPLC.

(-.-) pH ( — ) D.O. 280 nm.

Como se puede observar este método es altamente confiable para separar enzimas del tipo lipoxigenasa sintasa.

Poligalacturonidasa.

Pressey, R. (75) reporta un método rápido para la separación de la enzima poligalacturonidasa de tomate utilizando una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con grupos sulfonato; columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución FPLC. A los picos obtenidos se les midió su actividad enzimática de poligalacturonidasa utilizando ácido poligalacturónico como sustrato a pH 4.2 y 37°C, cuantificando la cantidad de grupos reducidos por el método de arsenomolibdato.

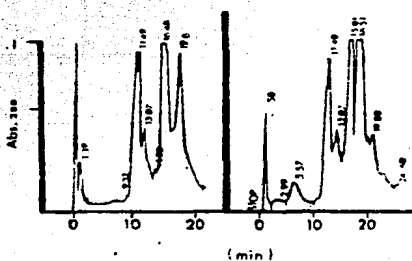


Cromatogramas que muestran la purificación de poligalacturonidasa, utilizando en ambos una columna Mono S HR 5/5 FPLC eluida con NaCl 0.15 M, pH 6.0.

Una de las ventajas de este método es que la resolución de la enzima poligalacturonidasa se lleva a cabo en 20 min., se pueden analizar extractos conteniendo niveles bajos de actividad y además se requieren volúmenes pequeños para ser separados.

#### Anticuerpos Monoclonales de Fluidos.

Burchiel, S. W. y Alber, T. R. (11). (81) reportan el aislamiento y purificación de anticuerpos monoclonales reactivos contra algunos antígenos de eritrocitos de borrego de fluido de ascitis murino utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono D HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. Los picos obtenidos fueron probados inmunológicamente por el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA), utilizando anti-IgG conjugada con fosfatasa alcalina; midiendo la reacción a 405 nm.

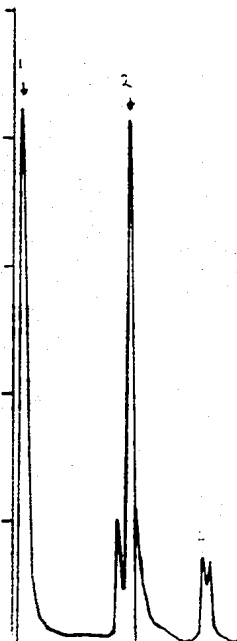


Cromatograma que muestra la purificación de anticuerpos monoclonales obtenidos de fluido ascítico murino. columna Mono D HR 5/5 FPLC eluida con un gradiente de NaCl 0-0.05 M y 20 mM tris, pH 7.7.

En este cromatograma se reconocieron los anticuerpos monoclonales IgG<sub>3</sub>, IgG 2b; los cuales fueron caracterizados por electroforesis en gel de SDS-P<sub>0</sub> liacrilamida. Este método combinado con cromatografía líquida de alta resolución de filtración molecular da como resultado la separación de IgG en un 95% del total de material protéico presente en el líquido de ascitis.

Inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM.

Domicel J. A. (21) reporta la separación de las inmunoglobulinas IgG, IgA, e IgM de plasma humano utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m sustituidas con aminas cuaternarias columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. Los picos obtenidos fueron identificados inmunológicamente por el método de doble inmunodifusión radial, al hacerlos reaccionar con anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA, respectivamente.

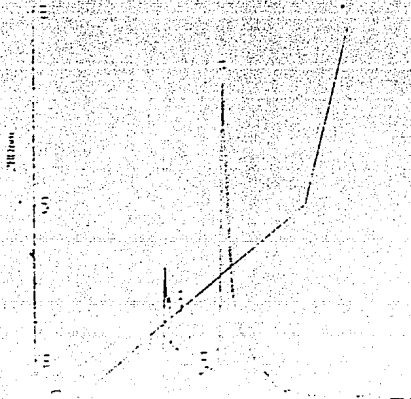


Cromatograma que muestra la separación de: IgG pico No. 1; IgA con trazas de IgG pico No. 2 y IgM con trazas de IgA pico No. 3. Columna Mono Q. HR 5/5 eluida con un gradiente de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.025-0.3 M, pH 6.5.

Como se puede observar la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico resulta muy útil para la separación de IgG, IgA e IgM de plasma humano.

#### Anticuerpos Monoclonales de Híbridomas.

Tasaka, K. E. Inagaki, C. (99) reportan la rápida purificación de anticuerpos monoclonales de clase IgG 2b contra ácido etacrínico, producidos por híbridos y mantenidos en líquido ascítico de ratones Balb-C; utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q. HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. A las fracciones eluidas con mayor densidad óptica a 280 nm se les midió su actividad inmunológica por el método de inmunoperoxidasa indirecta utilizando anti-gama globulina de ratón ligada a peroxidasa, utilizando cortes histológicos de cerebro de rata ricos en ácido etacrínico, encontrando gran actividad tanto en el líquido de ascitis como en los picos analizados.

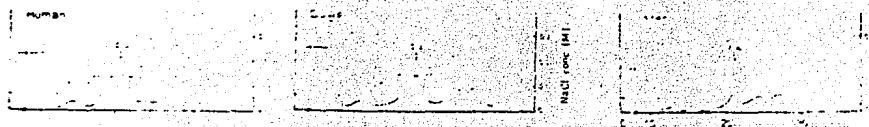


Cromatograma que muestra la purificación de anticuerpos monoclonales de hidromas, columna Mono Q HR 5/5 eluida con NaCl 1 M a pH 8.0.

En este caso la cromatografía líquida de alta resolución FPLC no solamente ofrece ventajas de rapidez para la separación de anticuerpos monoclonales, sino que también es necesaria para la purificación de todos los componentes de líquido ascítico cuando van a ser utilizados en el campo de la inmunohistología.

### C<sub>1q</sub>.

Stemmer, F. y Loos, M. (95) reportan la purificación y caracterización del componente C<sub>1q</sub> del complemento de suero humano, de suero de cordero, y de suero de ratón. Precipitando primeramente las euglobulinas presentes en el suero, disolviendo el precipitado y pasando esta solución por una columna de Superosa 6B llevando a cabo una filtración molecular, posteriormente a las fracciones que presentaron actividad hemolítica se les hizo pasar a través de una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituida con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución FPLC. Las fracciones obtenidas fueron analizadas inmunológicamente por inmunoelectroforesis y caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y comprobando su actividad hemolítica.

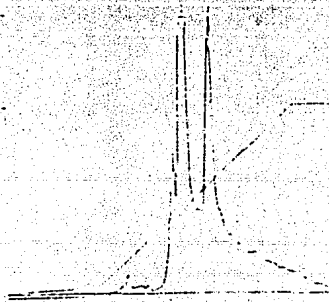
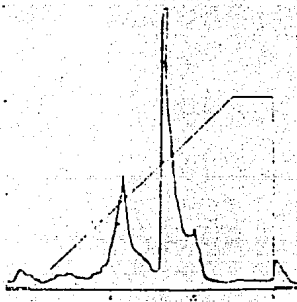


Cromatogramas que muestran la separación de  $C_{1q}$  de: a) Suero Humano, b) Suero de cayo, c) Suero de ratón. Columna Mono Q HR 5/5.

Los componentes del complemento al ser separados por métodos convencionales frecuentemente se contaminan con IgG, por lo que se recomienda utilizar la cromatografía líquida de alta resolución FPLC para separar componentes del complemento sin tener contaminación alguna de IgG.

Cadenas Ligeras Kappa y Lambda de IgG (Proteínas de Bence Jones).

Turner, R. y Crockson (102) reportan la separación de las cadenas ligeras Kappa y Lambda de inmunoglobulina G. de orina de pacientes con mielomatosis. Utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC; y por otro lado se utilizó una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución FPLC. Las fracciones obtenidas de ambas columnas fueron identificadas inmunológicamente por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-Kappa y anti-Lambda, encontrando que las fracciones con mayor densidad óptica a 280 nm tenían mayor actividad inmunológica.





Cromatogramas que muestran la separación de las cadenas ligeras de IgG a partir de orina de pacientes con mielomatosis.

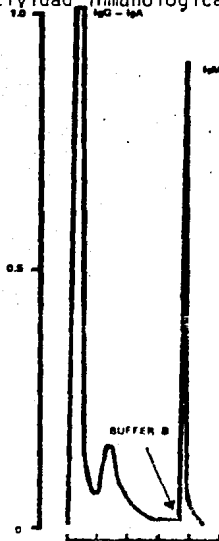
Fig. 1. Columna Mono Q HR 5/5.

Fig. 2. Columna Mono S HR 5/5.

Por este método es posible examinar muestras de pacientes con mielomatosis o con proteinurias fácilmente ya que los tiempos de corrida son mínimos.

#### Inmunoglobulina M.

Sampson, I.A. y Arthur, I.H. (87) reportan la separación y purificación de inmunoglobulina M al pasar directamente suero humano a una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. A las fracciones eluidas de esta columna con mayor densidad óptica a 280 nm se les probó su actividad inmunológica por inmunodifusión radial.



Cromatograma que muestra la purificación de inmunoglobulina M IgM de suero humano.

Pico No. 1: IgG, IgA.

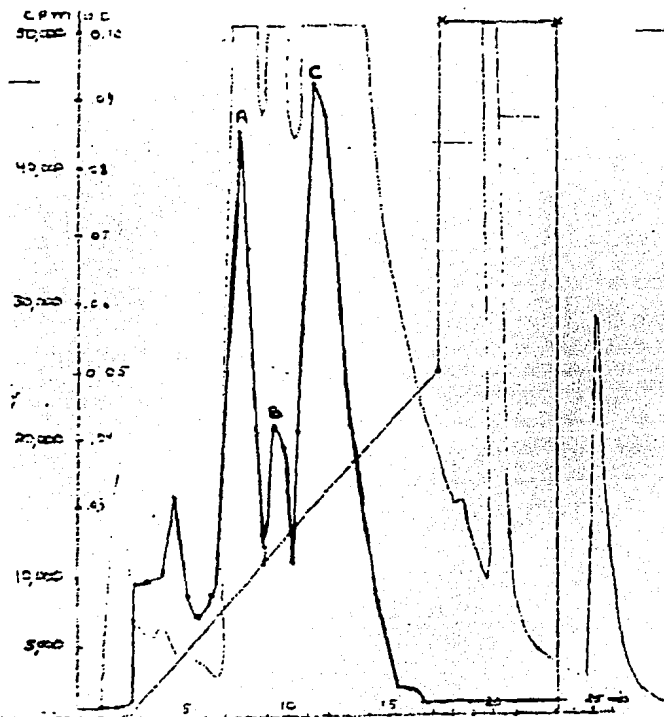
Pico No. 2: IgM.

El uso de este tipo de columnas para la separación de IgM de suero humano, demostró ser de gran utilidad para este estudio, ya que la separación se lleva a cabo en cuestión de 6 minutos, aplicando un volumen de 500  $\mu$ l conteniendo aproximadamente 60% de suero humano.

La IgM obtenida está virtualmente libre de IgG y su función biológica no se ve alterada.

Interleucina 1.

Newton, F. C. y Reed, D. L. ( 64) reportan la purificación de interleucina 1 (ITL-1) de monocitos de sangre periférica humana utilizando una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono O HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. A las fracciones eluidas se les midió su actividad de interleucina 1.



Cromatograma de interleucina 1 de monocitos humanos, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-1 M pH 7.0, encontrando tres subtipos de ITL-1.

Este tipo de cromatografía dio como resultado un incremento de 100 veces en la actividad específica de interleucina 1.

Fragmentos de IgA.

Biewenga, J. y Bruin, G. M. (6) reportan la purificación de fragmentos de inmunoglobulina A, estos fragmentos se obtuvieron al tratar IgA con las enzimas: proteasa de IgA y pepsina, la separación se realizó utilizando una columna

preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC y una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con poliaminas columna Mono P HR 5/20 de cromatografía de alta resolución FPLC. Las fracciones eluidas de ambas columnas con mayor densidad óptica a 280 nm fueron identificadas inmunológicamente por inmunoprecipitación y caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.

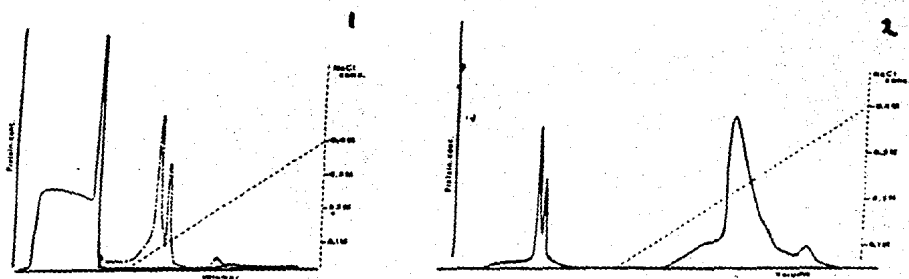


Fig. 1. Purificación de los fragmentos Fab y Fc de IgA.

Fig. 2. Purificación del fragmento Fab de IgA.

Ambos cromatogramas se realizaron en una columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-0.4 M pH 8.4.

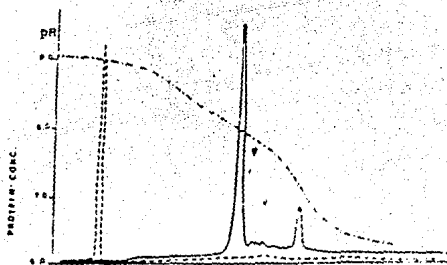
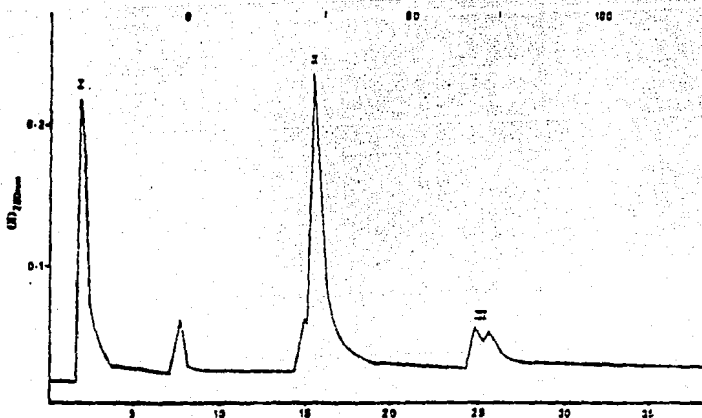


Fig. 3 Purificación de Fab y Fc, columna Mono P HR 5/20 (---) pH ( - )  
D.O. 280 nm eluida con polybuffer 96 pH 6.0.

Estos resultados demuestran la heterogeneidad de las moléculas Fc y Fab de IgA; debida al contenido de carbohidratos; obteniendo diferentes patrones de elución en las columnas de intercambio aniónico y cromatofoco de cromatografía líquida de alta resolución FPLC.

Inmunoglobulina M Contra Rubeola.

HO-Terry, L. y Terry, G. M. (42) reportan el aislamiento de IgM específica contra virus de rubeola; obtenida de suero de mujeres embarazadas utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. Los picos obtenidos de esta columna fueron identificados por el método inmunoenzimático de ELISA indirecta, utilizando virus de rubeola como control e IgM anti-rubeola conjugada con fosfatasa alcalina incubando a 4°C durante 2 horas, midiendo la reacción a 410 nm.

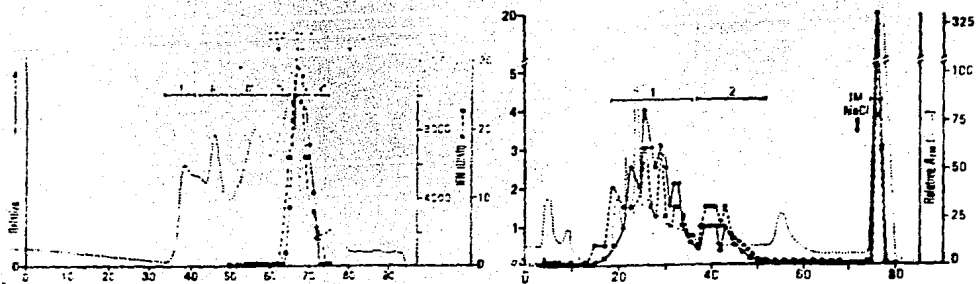


Cromatograma obtenido de suero de mujeres embarazadas identificando pico No. 1 IgG, pico No. 2 IgA y Pico No. 3 IgM columna Mono Q HR 5/5 eluida a pH 6.5.

El uso de la cromatografía líquida de alta resolución para la purificación de IgM es de suma importancia ya que contribuye a que el diagnóstico de rubéola en mujeres embarazadas sea más eficiente.

Factor Activador de Macrófagos (MAF).

Schreiber, R. D. y Katz, D.H. (28) e Higuchi, M. y Osawa, T. (40) (66) reportan la purificación del factor activador de macrófagos (MAF) producido por una clona hibridoma de células T llamada 24/G1, utilizando una columna de filtración molecular de alta resolución, columna Biosil TSK-250 y una columna de cromatofoco de alta resolución, columna Mono P HR 5/20. A las fracciones obtenidas de ambas columnas se les probó su actividad de MAF, poniéndolas en contacto con macrófagos tratados con proteasa de peptona, una vez activados, se les puso en contacto con una línea de células de mastocitoma P 815 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ , la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  al medio es debida a que la fracción con que se trató al macrófago tenía actividad de MAF.



Cromatogramas que muestran la separación del factor activador de macrófagos (MAF).

Fig. 1. Columna Biosil TSK-250, Fig. 2. Columna Mono P HR 5/20 (.-.-) actividad de MAF. (....) D.O. 280 nm.

Las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución se utilizan en combinación no solamente para separar componentes de una mezcla, sino también para caracterizar bioquímicamente a las biomoléculas, tal es el caso de este reporte (88) en donde se llega a la conclusión que la actividad de MAF y de interferón gama residen en una misma molécula. Por otra parte Higuchi, M. y Osawa, T. (40) (66) establecieron otro tipo de línea hibridoma de células T, la cual produce dos clases distintas de factor activador de macrófagos, uno responsable de activar macrófagos para consumir glucosa (MAF-G), y otro responsable de activarlos para la formación del ión  $O_2^-$  (MAF-O), sin embargo estas dos moléculas carecen de actividad de interferón, reportado por Schreiber y Katz (88).

Nuevamente para llegar a esta conclusión se tuvo que hacer una separación de estas dos moléculas de todo el sobrenadante del cultivo, siendo la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico el método de elección.

#### Factor de Diferenciación Celular.

Yoshizaki, K. y Kishimoto, T. (110) reportan la purificación del factor de diferenciación de células B., secretado por una clona de una línea celular linfoblastoide B, purificado directamente de un concentrado de sobrenadante de cultivo, utilizando las siguientes columnas:

1. Columna de filtración molecular ACA 34 HPLC.
2. Columna de cromatoenfoco Mono P HR 5/20 FPLC.
3. Columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 FPLC.
4. Columna de filtración molecular TSK G-2000 SW HPLC.
5. Columna de filtración molecular I-125 HPLC.

A las fracciones obtenidas de cada una de estas columnas se les midió su actividad biológica de linfocina incubando estas fracciones en un cultivo celular de células B. a 37°C durante 2-4 horas midiendo la producción de IgG. u IgM.

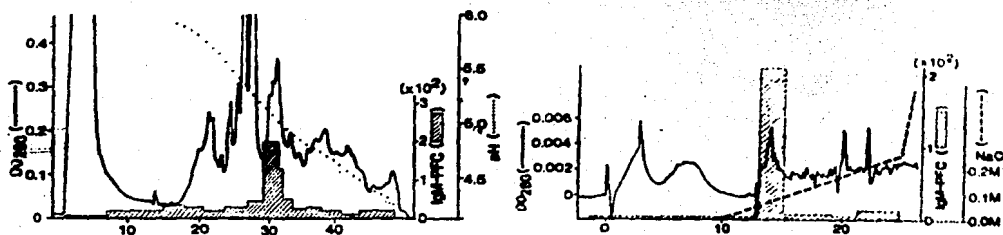


Fig. 1. Cromatograma del factor de diferenciación celular, columna Mono P HR 5/20 (—) D.O. 280 nm. (.....) actividad biológica (....) pH eluido con polybuffer 74 pH 4.5.

Fig. 2. Cromatografía de intercambio aniónico de la fracción enfocada a pH 5.1-5.2 por cromatoenfoco; Columna Mono Q HR 5/5 eluida con NaCl 0.02 M pH 7.0.



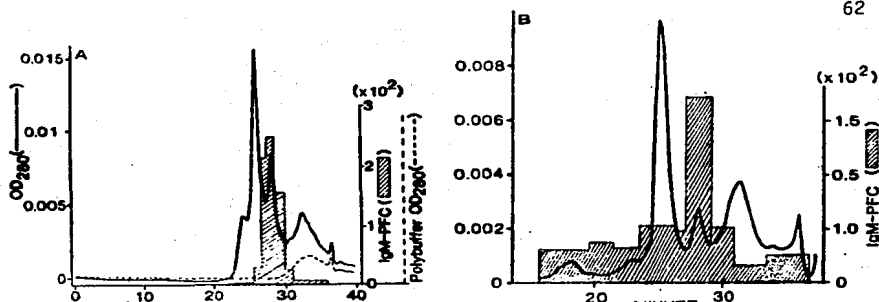


Fig. 3. Cromatografía de filtración molecular de la fracción enfocada a pH 5.1-5.2 por cromatoenfoco; Columna I-125 ( - ) D.O. 280 nm (□) actividad biológica.

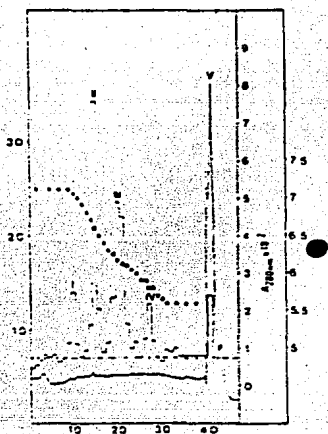
Fig. 4. Cromatografía de filtración molecular de la fracción enfocada a pH 5.1-5.2; y fraccionada en la columna Mono Q HR 5/5 de intercambio aniónico para remover el polybuffer; Columna TSK G-2000 SW.

Todas las fracciones fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida. Como puede observarse el análisis por cromatoenfoco mostró una gran actividad biológica, la fracción enfocada a pH 5.1-5.2, esta primera purificación sirvió para una segunda purificación por filtración molecular; además la utilización de la cromatografía de intercambio aniónico sirvió para afinar aún más el factor de diferenciación celular en un grado altamente puro.

#### Interleucina 2.

Bell, S.M. y Stern, P.L. (3) reportan la caracterización por puntos isoeléctricos de interleucina 2 producida por células T, llevando a cabo una precipitación del sobrenadante del cultivo de células de bazo de rata con sulfato de

amonio, posteriormente el precipitado se redisolvió y se pasó a través de una columna de hidroxapatita para finalmente pasar las fracciones con actividad a una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m sustituidas con aminas terciarias; columna Mono P HR 5/20 de cromatoenfoco de alta resolución FPLC; encontrando cinco diferentes puntos isoeléctricos, la actividad inmunológica fue probada incubando estas fracciones con células derivadas de timo a 37°C con metil  $^{-3}$  [H] -timidina; midiendo la incorporación de marca.

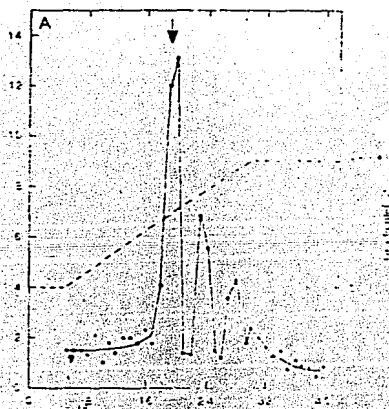


Cromatograma de interleucina 2. Utilizando una columna Mono P HR 5/20 de cromatoenfoco, pH 7.1 eluida con polybuffer 74 pH 5.0.

Este método no solamente es útil para separar moléculas por puntos isoeléctricos, sino que también es útil para identificar diferentes moléculas con una misma actividad biológica.

Factor de Crecimiento Mitogénico (MGF).

Brockes, J.P. (10) reporta el aislamiento del factor de crecimiento mitogénico de cerebro de un anfibio, dicho factor interviene en el proceso de regeneración celular cuando al organismo se le ha amputado uno de sus miembros. La purificación se llevó a cabo en una columna preempacada con esferas de poliestireno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución F.P.L.C. A las fracciones eluidas se les midió su actividad biológica incubándolas con un cultivo celular conteniendo  $^3\text{H}$ -Timidina, y midiendo la incorporación de marca en núcleos celulares de células de Schwan, estas fracciones fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.



Cromatograma del factor de crecimiento mitogénico de células cerebrales de anfibio; Columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de acetato de amonio 0.5-1.3 M, pH 6.0 la mayor actividad se muestra en la flecha ( $\blacktriangledown$ ).

En este caso la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio ca-

tiónico resultó ser la mejor técnica para separar un factor de diferenciación celular producido por células nerviosas contribuyendo así al conocimiento en el campo de las neurociencias.

#### Interferon Gama.

Stone-Wolf, D. S. y Vilcek, J. (98) reportan la purificación de interferon gama y su interrelación con linfotoxinas producidas por monocitos humanos, utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con aminos cuaternarios, columna Mono Q HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. Las fracciones que presentaron actividad biológica fueron subsecuentemente cromatografiadas en una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5, intercambiador catiónico de alta resolución FPLC. La actividad biológica fue medida por la acción antiviral del interferon presente en las fracciones eluidas por ambas columnas, observando inhibición del efecto citopático en un cultivo celular infectado con virus de la encefalomiocarditis, todas las fracciones fueron caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida; enfoque isoelectrico, pH 3.5-10 y por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-interferon gama humano.

Nota: Esta referencia no muestra cromatograma.

Con la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución en combinación con las técnicas arriba señaladas, fue posible separar del sobrenadante de cultivo de células adherentes (linfocitos), una molécula con actividad de linfotoxina y una con actividad de interferon.

### Factor de Crecimiento de Fibroblastos de Pituitaria.

Böhlen, P. y Gospodarowicz, D. (8) reportan la purificación del factor de crecimiento de fibroblastos producido por la glándula pituitaria utilizando dos procedimientos:

#### Procedimiento No. 1:

El homogenizado se hace pasar por una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución FPLC, posteriormente se hace pasar por una columna preempacada con esferas de sílica de 5  $\mu\text{m}$  sustituidas con cadenas alifáticas de 3 carbonos, columna C-3 de fase reversa de alta presión HPLC; y después por una columna preempacada con esferas de sílica de 7  $\mu\text{m}$  de diámetro sustituidas con cadenas alifáticas de 8 carbonos, columna Aquapore RP-300 fase reversa de alta presión HPLC.

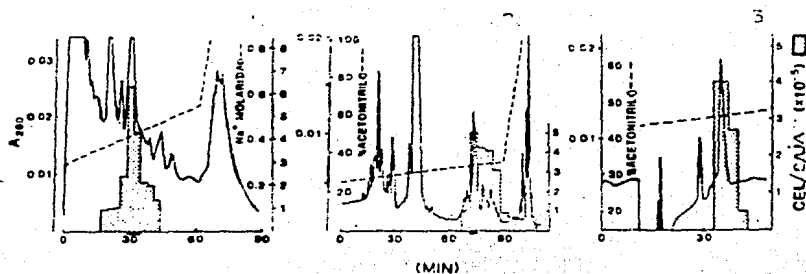


Fig. 1. Cromatograma del factor de crecimiento de pituitaria, columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0.3-0.55 M, pH 5.0. (—) D.O. 280 nm. (---) Actividad biológica.

Fig. 2. Material con actividad biológica de la columna Mono S HR 5/5 reCro-



matografiado en una columna  $C_3$  eluida con un gradiente de acetonitrilo-ácido trifluoroacético. ( - ) D.O. 280 nm. (  ) Actividad biológica.

Fig. 3. La fracción de la columna  $C_3$  con actividad biológica se recromatografió en una columna Aquapore RP-300 eluida con un gradiente de acetonitrilo al 42%. ( - ) D.O. 280 nm. (  ) Actividad biológica.

#### Procedimiento No. 2:

El homogenizado de pituitaria se hizo pasar por una columna empacada con un gel de filtración molecular biogel P-10, y posteriormente por una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5; intercambiador catiónico de alta resolución FPLC; después de este fraccionamiento se midió la pureza del factor de crecimiento de fibroblastos de pituitaria tomando la fracción colectada en la columna Mono S HR 5/5, con mayor actividad biológica y haciéndola pasar por una columna preempacada con esferas de sílica de 5  $\mu$ m de diámetro sustituidas con radicales alifáticos de cuatro carbonos; Columna Vydac  $C_4$  de fase reversa de alta resolución HPLC.

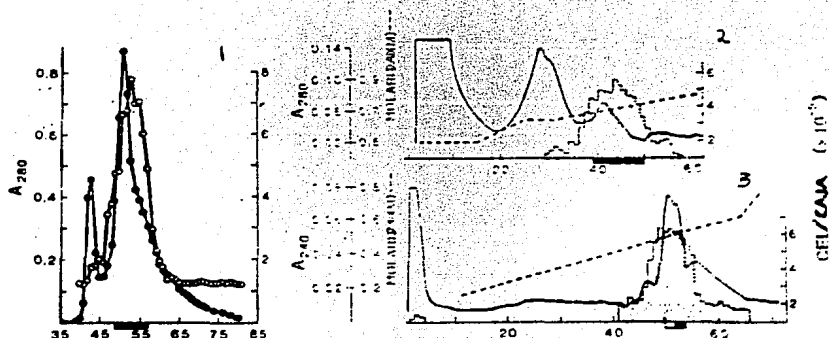


Fig. 1. Filtración en gel con Biogel P-10 eluida a pH 9.2 ( . ) D.O. 280 nm.  
( o ) Actividad biológica.

Fig. 2. Intercambio catiónico de una fracción obtenida con Biogel P-10; Columna Mono S HR 5/5 FPLC eluida con un gradiente de formato de amonio de 0.5-0.9 M, pH 6.0.

Fig. 3. Fracciones 40-50 de la columna Mono S HR 5/5, recromatografiada en la misma columna Mono S HR 5/5 y eluida con un gradiente de NaCl 0.1-0.6 M, pH 8.3.

Fig. 4. Alicuota de la columna Mono S HR 5/5 fracciones S3 y S4 cromatografiada en una columna Vydac C<sub>4</sub> de fase reversa eluida con ácido trifluoroacético/acetonitrilo.

A todas las fracciones obtenidas por las distintas columnas utilizadas se les midió su actividad biológica de la siguiente forma: midiendo la habilidad de estimular la proliferación de células endoteliales de aorta bovina y detectando el factor de crecimiento de fibroblastos por el método de radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos anti-factor de crecimiento de fibroblastos conjugados a un isótopo radioactivo, la caracterización se realizó por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.

Como puede observarse en los cromatogramas se pueden obtener diferentes perfiles de actividad biológica debido a que la glándula pituitaria contiene múltiples especies moleculares en donde la combinación de diferentes técnicas cromatográficas de alta resolución, fue de gran ayuda para obtener los resultados óptimos de purificación del factor de crecimiento de fibroblastos.

### Factor de Crecimiento Epidérmico Murino.

Burgess, A. W. y Nice, E. C. (12) reportan la purificación del factor de crecimiento epidérmico murino presente en glándulas salivales, utilizando una columna de filtración molecular, columna TSK 3000 SW de alta resolución HPLC, y una columna de intercambio aniónico, columna Mono Q HR 5/5 de alta resolución FPLC y una columna de fase reversa, columna Ultrasphere ODS de alta resolución HPLC. Todas las fracciones fueron detectadas por D.O. a 280 nm. U. V. y por fluorescencia de triptófano, la actividad biológica fue registrada en un cultivo de fibroblastos conteniendo suero fetal bovino y un pulso de  $^3\text{H}$ -Timidina incubando a 37°C durante dos horas, midiendo la incorporación de marca en un contador de centelleo.

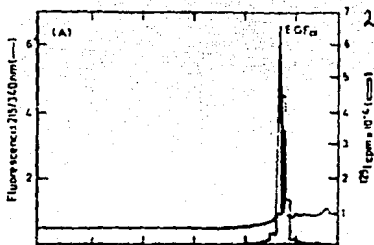
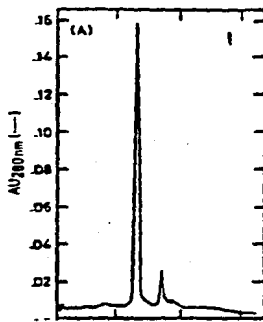


Fig. 1. Cromatografía de intercambio aniónico, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl, 0-2.5 M, pH 6.5

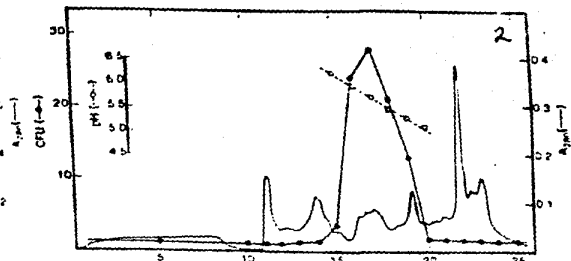
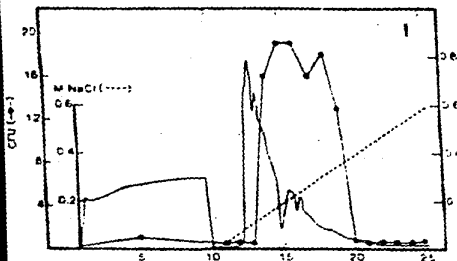
Fig. 2. Cromatografía en fase reversa, columna Ultrasphere ODS eluida con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetonitrilo-Agua, el paso de purificación por filtración molecular fue reemplazado por la columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5.



Todas las fracciones fueron caracterizadas por enfoque isoelectrico pH 4-6.5. El análisis del factor de crecimiento epidérmico por cromatografía líquida de alta resolución permitió encontrar dos subclases del factor llamándolos EGF- $\alpha$  y EGF- $\beta$ , permitiendo además la purificación rápida para poder realizar posteriores estudios, como son: la cristalografía y la espectroscopía ya que también es posible utilizar este tipo de cromatografía a nivel preparativo.

#### Factor Citostático.

Nissen-Meyer, I. y Andersen, O. K. (65) reportan la purificación del factor citostático a partir de un sobrenadante de cultivo de monocitos humanos, utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución FPLC y una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m sustituidas con poliaminas, columna Mono P HR 5/20 cromatoforo de alta resolución FPLC. A todas las fracciones se les midió su actividad biológica incubándolas con un cultivo de células K 562 en un medio conteniendo metil- $^3\text{H}$ -Timidina y midiendo la incorporación de la marca a las 10 horas de incubación. Además se les caracterizó por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y se reveló por autoradiografía.



Todas las fracciones fueron caracterizadas por enfoque isoelectrico pH 4-6.5. El análisis del factor de crecimiento epidérmico por cromatografía líquida de alta resolución permitió encontrar dos subclases del factor llamándolos EGF-Alfa y EGF-Beta, permitiendo además la purificación rápida para poder realizar posteriores estudios, como son: la cristalografía y la espectroscopía ya que también es posible utilizar este tipo de cromatografía a nivel preparativo.

#### Factor Citostático.

Nissen-Meyer, I. y Andersen, O. K. (65) reportan la purificación del factor citostático a partir de un sobrenadante de cultivo de monocitos humanos, utilizando una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con grupos sulfonato, columna Mono S HR 5/5 intercambiador catiónico de alta resolución FPLC y una columna preempacada con esferas de polietileno de 10  $\mu$ m sustituidas con poliaminas, columna Mono P HR 5/20 cromatografía de alta resolución FPLC. A todas las fracciones se les midió su actividad biológica incubándolas con un cultivo de células K 562 en un medio conteniendo metil- $^3$ H-Timidina y midiendo la incorporación de la marca a las 10 horas de incubación. Además se les caracterizó por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y se reveló por autoradiografía.

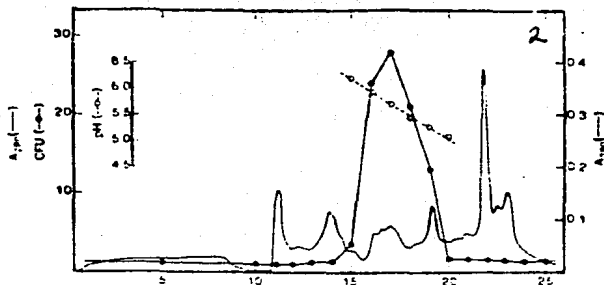
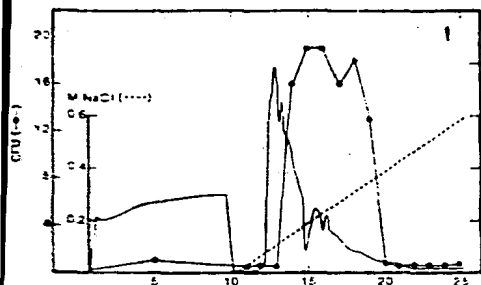


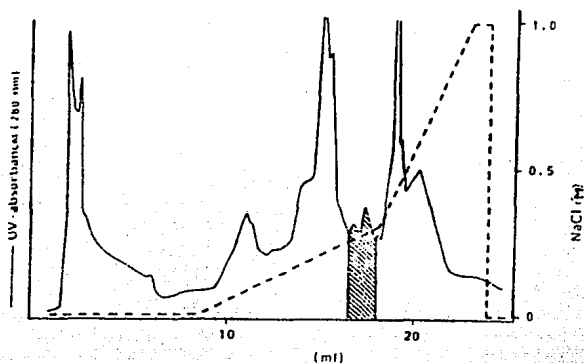
Fig. 1. Cromatografía de intercambio catiónico del factor citostático, columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente lineal de NaCl 0-0.6 M, pH 5.7.

Fig. 2. Cromatoenfoco de la misma muestra que la Fig. 1, columna Mono P HR 5/20, pH 7.4 eluida con polybuffer 74, pH 4.0.

En este estudio se encontró que el factor citostático está constituido por una población heterogénea de proteínas que difieren en sus puntos isoeléctricos de pH 6.0-5.0 determinado por cromatoenfoco, además estas proteínas difieren en su carga dada por la composición de aminoácidos, determinada por intercambio catiónico.

#### Inhibina Testicular.

Dijk, S. V. y Van Der Molen, V. (20) reportan la purificación de la hormona testicular inhibina de fluido folicular bovino utilizando una combinación de cromatografía de afinidad en rojo de proción 3 B, cromatografía de filtración en gel, en sephadex G-25 y una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono O HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. La actividad biológica de las fracciones eluidas se midió por inhibición de la liberación de folitropina, por células de pituitaria de rata, en un cultivo celular y se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, revelado por tinción de plata.

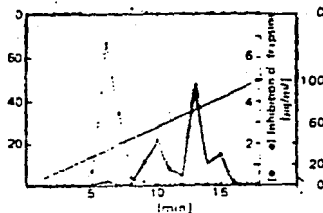


Perfil de elución de la hormona testicular inhibina utilizando una columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-1.0 M, pH 7.9.

Estos resultados muestran que la hormona testicular inhibina fue identificada y aislada por cromatografía líquida de alta resolución FPLC, sin alterar su función biológica a diferencia de la cromatografía de alta presión HPLC.

#### Inhibidor de Acrosina en Plasma Seminal Humano.

Huhtala, M. L. (43) reporta la purificación de un inhibidor de acrosina aislado de una paciente con cáncer de ovario y aislado por primera vez en plasma seminal de individuos sanos de sexo masculino. Utilizando una combinación de técnicas cromatográficas como son: filtración en gel, en sephadex G-75; cromatografía en fase reversa, columna preempacada Hewlett-Packard RP-8, y cromatografía de intercambio catiónico, columna Mono S HR 5/5. A todas las fracciones eluidas se les midió su actividad inmunológica por el método de radioinmunoensayo (RIA), y la actividad biológica de tripsina se detectó utilizando un sustrato cromogénico, midiendo la reacción espectrofotométrica en 405 nm.



Cromatograma de plasma seminal, identificando por métodos enzimáticos e inmunológicos los inhibidores de acrosina y tripsina, columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de acetato de amonio de 0.1-1.0 M.

Este es el primer reporte de el uso de la cromatografía líquida de alta resolución para separar compuestos con actividad biológica del plasma seminal como son el inhibidor de acrosina y el inhibidor de tripsina.

#### Inhibidor de Alfa Tripsina.

Jochum, M. y Bitner, A. (44) reportan la purificación del inhibidor inter-alfa tripsina de suero humano, utilizando una columna preempacada con esferas de polieter de 10  $\mu$ m de diámetro sustituidas con aminas cuaternarias, columna Mono O HR 5/5 intercambiador aniónico de alta resolución FPLC. La actividad inmunológica de las fracciones eluidas se detectó por inmunoelectroforesis en cohete (Laurell), y la actividad biológica se midió por la inhibición de la producción de la enzima elastasa lisosomal granulocítica, producida por colimorfonucleares humanos.

Se recomienda utilizar esta técnica de intercambio aniónico como un método conveniente y rápido para aislar inhibidores lábiles y totalmente activos de suero humano siempre y cuando se eviten las condiciones ácidas.

Nota: Esta referencia no muestra perfil cromatográfico.

### Inhibidores de Proteasas.

Kuenn y Reinauer, H. (53) reportan la purificación de tres distintos inhibidores de proteasa de suero de rata,  $\alpha$ 1 P1, RP-I, RP-II, utilizando una combinación de cromatografía de afinidad (Affi-Gel Blue), intercambio iónico (Deae-Sephacel) y por último cromatografía líquida de alta resolución con una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 FPLC, a las fracciones eluidas se les determinó su actividad inhibitoria contra quimotripsina, elastasa y tripsina, utilizando SUC-ALA-ALA-PRO-PHE-NPH-NO<sub>2</sub> como sustrato, a las fracciones con actividad inhibitoria se les caracterizó por electroforesis en SDS-Poliacrilamida.

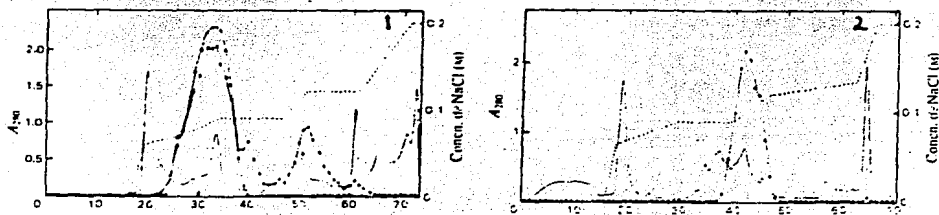


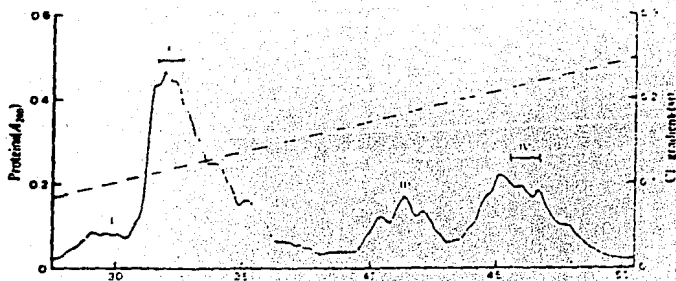
Fig. 1. Separación de los inhibidores  $\alpha$ 1 P1, y RPI, utilizando una columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-2.0 M, pH 6.0 ( - ) D.O. 280 nm. ( .-. ) Actividad biológica ( ..... ) Gradiente.

Fig. 2. Separación del inhibidor RPII, columna Mono Q HR 5/5 mismas condiciones de elución.

La relación entre estos tres inhibidores se hizo por inmunodifusión doble, encontrando que inmunológicamente difieren de los inhibidores de proteasa de origen humano, el uso de la cromatografía líquida de alta resolución en combinación con otras técnicas cromatográficas enunciadas anteriormente fueron de gran ayuda a establecer estos resultados.

#### Inhibidor de Alfa Cistein-Proteasa ( $\alpha$ CPI).

Goumaris, A. D. y Barret, A. J. (35) reportan la purificación del inhibidor de alfa-cistein proteasa de plasma humano utilizando un gel de cromatografía de afinidad (CM-Papain-Sepharosa) y una columna preempacada de cromatografía líquida de alta resolución, de intercambio aniónico, columna Mono Q HR 5/5 FPLC. Las fracciones eluidas con mayor densidad óptica a 280 nm se les determinó la actividad inhibitoria por titulación por fluorometría, utilizando amino metil cumarina como sustrato en una reacción medida a 360 nm. Las fracciones con mayor actividad biológica fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.



Cromatograma del inhibidor de alfa cistein-proteasa, columna Mono Q HR 5/5, eluida con un gradiente de cloruros de 0.18-0.25 M, pH 8.0. El uso de esta metodología permitió encontrar dos tipos de inhibidores de diferente P.M. con la misma actividad, por otra parte al tener purificada el  $\alpha$  CPI fue posible obtener un suero hiperinmune, con el cual se corrieron ensayos inmunolectroforéticos para cuantificar  $\alpha$  CPI en el suero humano.

#### NADP.

Hansson, K (38) reporta la purificación de nicotin-adenin-dinucleotido fosforilado grado comercial, utilizando dos columnas de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico, la primera a nivel preparativo, columna Polyanion SI-17  $\mu$ m y la otra a nivel analítico, columna Polyanion SI-8  $\mu$ m.

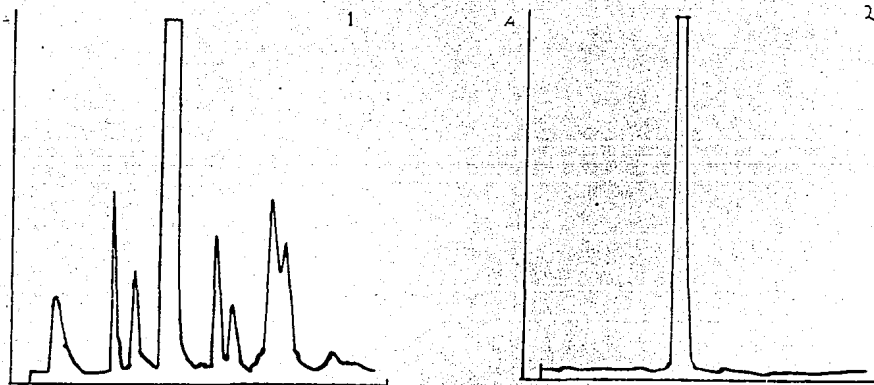


Fig. 1. Cromatograma de NADP, columna Polyanion SI-17  $\mu$ m eluida con un gradiente de fosfatos de 0-0.5 M, pH 6.0.

Fig. 2. Misma muestra columna Polyanion SI-8  $\mu$ m, mismas condiciones.



Como podemos observar la mejor separación se hizo en la columna analítica, sin embargo, al utilizar cantidades mayores de muestra es conveniente utilizar primero la columna a nivel preparativo, con el fin de eliminar impurezas y posteriormente utilizar la columna analítica. Siendo sus aplicaciones principales, que pequeñas cantidades de muestra se pueden utilizar para optimizar el proceso y el uso de dos matrices similares simplifican el procedimiento para llevarla a gran escala, otro dato importante es que al utilizar un ión eluyente como fosfatos, la concentración utilizada es de 0.5 M, en cambio cuando se utilizan iones acetato la concentración deberá de ser aumentada hasta 3 M para obtener resultados reproducibles.

#### Polímeros de Paraproteína.

Cooper, E. H. y Crockson, R.A. (16) reportan la identificación y purificación de polímeros de paraproteína de IgA de pacientes con macroglobulinemia de Waldströms. Utilizando una columna preempacada con esferas de agarosa de 13  $\mu\text{m}$  de diámetro, columna Superosa 6, de cromatografía líquida de filtración molecular de alta resolución FPLC, las fracciones eluidas con mayor densidad óptica a 280 nm fueron identificadas inmunológicamente con anticuerpos monoclonales, específicos por la técnica de inmunoprecipitación.

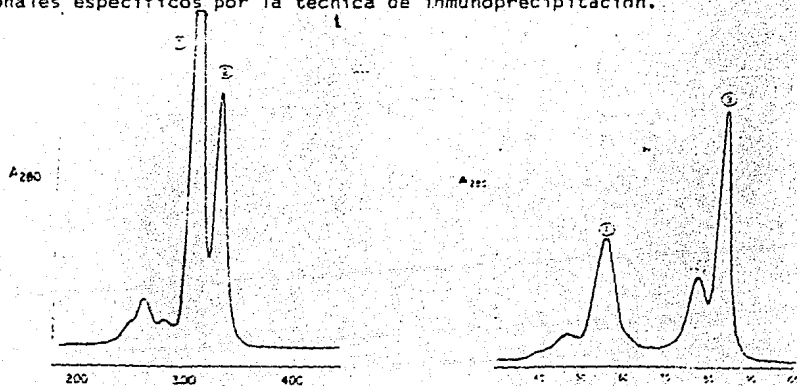


Fig. 1. Cromatografía de un mieloma de suero pico 1 = IgG<sub>3</sub>, pico 2 = Albúmina columna Superosa 6, eluida con fosfatos -KCl.

Fig. 2. Aislamiento de IgM pico 1 = IgM monomérica 2 = IgG, 3 = Albúmina.

La separación de paraproteínas por filtración molecular de alta resolución es un paso adelante en la reproducibilidad para la purificación de este tipo de moléculas, lo cual es de gran importancia para la valoración de pacientes neoplásicos.

#### Proteína con Afinidad a Somatomedina.

Povoa, G. y Hall, K. ( 74 ) reportan el aislamiento y caracterización de una proteína con afinidad a somatomedina de líquido amniótico humano, realizando una precipitación con sulfato de amonio, el precipitado fue resuspendido y se hizo pasar a través de una columna de interacción hidrofóbica utilizando como soporte Phenyl Sepharosa, las fracciones obtenidas de esta columna con afinidad a somatomedina fueron recromatografiadas en una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5 FPLC. La caracterización de las proteínas separadas por los métodos señalados anteriormente se realizó por cromatografía de exclusión molecular de alta resolución columna ACA 44, utilizando marcadores de peso molecular para determinar el peso de la proteína con afinidad a somatomedina, también utilizaron una columna preempacada de cromatofoco de alta resolución, columna Mono P HR 5/20, con el fin de conocer los puntos isoeléctricos de las proteínas presentes. A las fracciones eluidas se les caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes. Además se hizo el análisis de secuenciación de aminoácidos en su residuo N-Terminal; el ensayo de actividad se hizo utilizando un

sistema de radioreceptor unido a  $I^{125}$ , utilizando placenta humana como sistema de identificación.

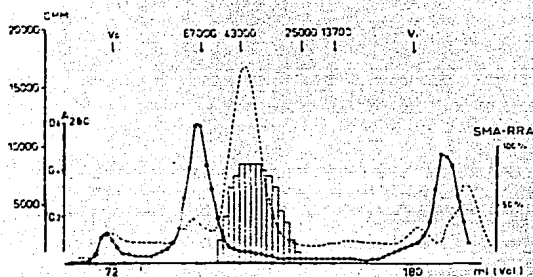


Fig. 1. Cromatografía de exclusión molecular directamente de fluido amniótico; columna Aca 44 pH 7.5 (—) D.O. 280 nm. (.....) radioactividad.

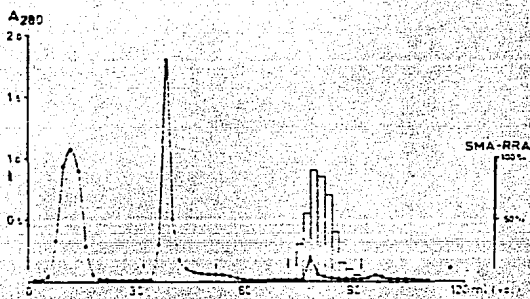


Fig. 2. Cromatografía de interacción hidrofóbica, columna Phenyl-Sepharosa del precipitado con sulfato de amonio de fluido amniótico humano eluida en tres pasos. Primero con tris 0.05 M, pH 7.5 más 0.5 NaSCN; segundo tris 0.02 M, pH 9.0 y finalmente con agua destilada.

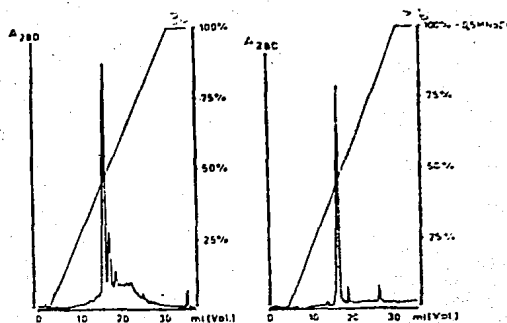


Fig. 3. Cromatografía de intercambio aniónico, columna Mono Q HR 5/5; de las fracciones obtenidas por Fenil Sepharosa. Fig. 3a) Corrida original; Fig. 3b) Corrida por segunda vez en la misma columna.

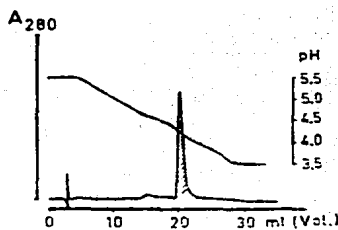


Fig. 4. Cromatoenfoco, columna Mono P HR 5/20 pH inicial de la columna 5.5 eluida con polybuffer 74 pH 3.5; el pico con actividad mostró un P.I. de 4.3.

Este estudio tiene como objeto aislar una proteína con afinidad a somatomedina utilizando distintos tipos de cromatografía líquida con el fin de obtenerla pura y conservando su actividad biológica para posteriormente desarrollar una técnica de cromatografía líquida de afinidad específica para el aislamiento de somatomedina.

### Transferrina.

Soderberg, L. y Fagerstam, L. ( 92 ) reportan la purificación de transferrina humana grado comercial al pasarla a través de una columna de cromatografía de afinidad empacada con un gel de agarosa acoplada con neuraminidasa, con el fin de eliminar el ácido siálico contaminante, la eficiencia de este método fue evaluada utilizando una columna preempacada de cromatoenfoque de alta resolución FPLC, columna Mono P HR 5/20.

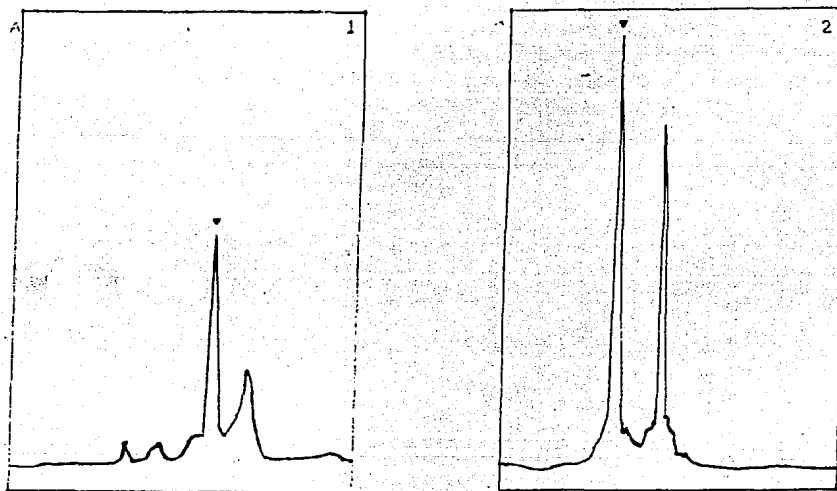


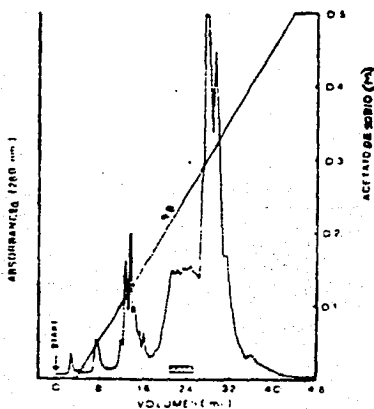
Fig. 1. Cromatoenfoque de transferrina antes de pasarla por la columna neuraminidasa-sepharosa, pH inicial 7.0 eluida con polybuffer 74 pH 3.5, columna Mono P HR 5/20.

Fig. 2. Misma columna, con la muestra después de pasarla por la columna neuraminidasa-sepharosa, mismas condiciones de elución.

Como podemos observar el contenido de iones contaminantes es posible de detectar utilizando esta técnica cromatográfica; tal es el caso de la transferrina que cambia sus características debido al contenido de iones hierro o bien de su contenido en ácido siálico.

#### Alfa-Fetoproteína Bovina.

Wong, L. T. y Hsia, J. C. ( 109) reportan la purificación de alfa-fetoproteína bovina utilizando una columna de afinidad que utiliza azul de cibacrón como ligando y una columna preparada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Polyanión SI; a las fracciones eluidas se les determinó la cantidad total de proteínas por el método de Biuret y su actividad biológica por inmunodifusión radial, además fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.



Cromatograma de alfa-fetoproteína bovina; aislada de suero fetal bovino, columna Polyanión SI, eluida con un gradiente de acetato de sodio 0-0.4 M, pH 8.0.

La combinación de técnicas cromatográficas como son la cromatografía de afinidad y el intercambio aniónico han demostrado ventajas en la purificación de alfa-fetoproteína sobre métodos convencionales. Ya que el azul de cibrón retiene selectivamente la albúmina y la alfa-fetoproteína, todas la demás proteínas son eluidas ya que no tienen afinidad hacia el ligando, posteriormente en una segunda cromatografía las fracciones adsorbidas son separadas en base a su diferencia de cargas por cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución.

#### Neocarsinostatina.

Denklau, D. y Stellmach, J. (18) reportan la purificación de un antibiótico anti-tumoral llamado neocarsinostatina, secretado por Streptomyces carzinostaticus. Utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5 FPLC, a las fracciones obtenidas se les probó su actividad de antibiótico, impregnando discos de papel filtro de 6 mm de diámetro con las fracciones obtenidas y determinando una zona de inhibición de crecimiento bacteriano de una placa de agar sobre la cual se sembró una cepa de Bacillus subtilis.

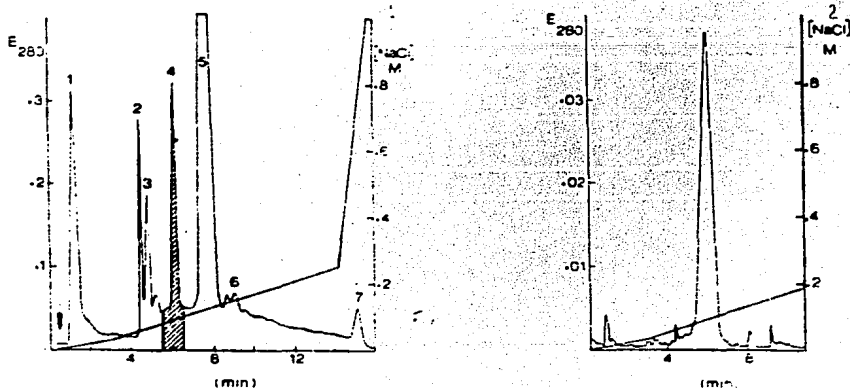


Fig. 1. Cromatograma de homogenizado de Streptomyces carsinostaticus; Columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-0.8 M pH 5.0 ( - ) D.O. 280 nm. ( ■ ) actividad biológica de antibiótico.

Fig. 2. Pico con actividad biológica recromatografiado por segunda vez en la misma columna y bajo las mismas condiciones.

El uso de este tipo de columnas para la separación de proteínas de extractos crudos del tipo zinostatina permite la reproducibilidad de resultados y la hacen ideal para su uso a gran escala en trabajos preparativos.

Peptidos de Termolisina.

Vita, C. y Fontana, A. (104) reportan el aislamiento de grandes péptidos obtenidos por fragmentación selectiva de termolisina en los residuos metionina por acción del bromuro de cianógeno. Utilizando dos métodos cromatográficos:

- 1) Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5.
- 2) Cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución, columna Mono S HR 5/5.

Las fracciones eluidas de ambas columnas fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.



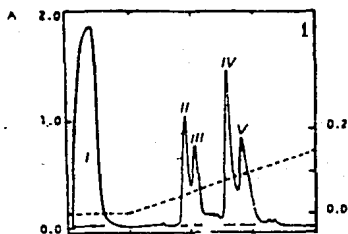


Fig. 1. Cromatograma de termolisina fragmentada con bromuro de cianógeno, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.15 M, pH 6.0 urea 7 M, E.D.T.A. 1 mM.

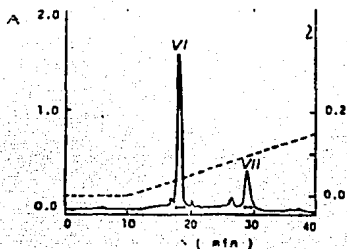


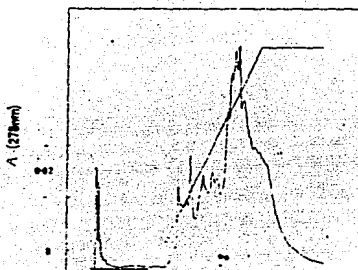
Fig. 2. Cromatograma del pico No. 1 obtenido en la cromatografía anterior; Columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de acetato de sodio 0-0.15 M pH 5.0.

El uso de la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico puede ser orientado para el aislamiento de péptidos medianos y grandes obtenidos por fragmentación de una proteína nativa con CNBr, los resultados pueden ser analíticos o preparativos, además, las fracciones obtenidas son de tal pureza que pueden utilizarse para otro tipo de análisis como secuenciación de aminoácidos.

#### Proteínas de Pituitaria Humana.

Staton, P.G. y Hearn, T.W. ( 94 ) reportan la separación de distintas proteínas de pituitaria humana rica en prolactina, utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5, las fracciones eluidas de esta columna con mayor densidad óptica a 280 nm fueron

identificadas por radioinmunoensayo competitivo, utilizando prolactina unida a iodo radioactivo, determinando al mismo tiempo si la prolactina obtenida era inmunoreactiva.



Cromatograma de un extracto crudo de pituitaria humana, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-300 mM pH 9.6.

En este reporte se describe la separación rápida de mezclas complejas de proteínas, dicha rapidéz es debida a una combinación de la manipulación del pH con fuerza iónica del eluyente, la capacidad de la columna va desde un nanomol de muestra hasta niveles preparativos.

#### Receptor de Progesterona.

Heubner, A. Pollow, K. ( 39) reportan la purificación de receptores de progesterona uterina humana a partir de muestras de citosol de tejidos humanos, utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5, y una columna preempacada de cromatoenfoco de alta resolución, columna Mono P HR 5/20; a los receptores presentes en el citosol se les marcó radiactivamente por medio de una reacción de afinidad con  $21\text{-}^3$  [  $\text{H}$  ]-Dehidro- $01\text{g}$  2058 el cual es altamente específico hacia el receptor

de progesterona, por lo tanto las fracciones eluidas de ambas columnas con marca se identificaron como receptores de progesterona; y se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida.

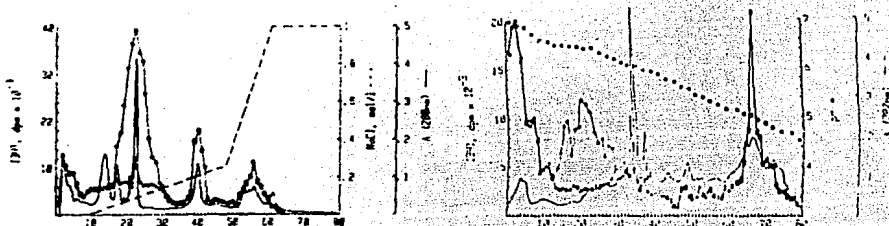


Fig. 1. Cromatograma de receptores de progesterona, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl de 0-1.0 M, pH 7.0.

Fig. 2. Misma muestra eluida en la columna Mono P HR 5/20 pH inicial 7.0 eluida con polybuffer 74 pH 4.0.

Por esta metodología fue posible separar un sólo pico que tiene la función de receptor de progesterona, además en el análisis electroforético en SDS-Poliacrilamida aparecen dos bandas, lo cual indica que la proteína está constituida por dos péptidos.

#### Proteínas de Membrana de Eritrocitos Humanos.

Lundahl, P. y Greijer, E. (59) (61), reportan la separación de las proteínas de membrana de eritrocitos humanos obtenidas a partir de un lisado de eritrocitos en presencia de diversos detergentes como: octilglucosido, Bero1 185, Mega 9 entre otros. Utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico

de alta resolución; columna Mono Q HR 5/5; Las fracciones eluidas de esta columna fueron caracterizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

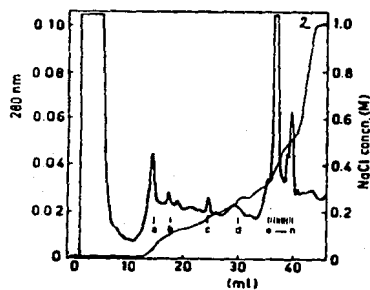
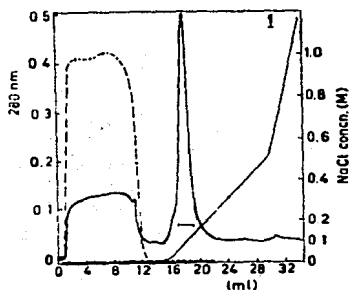


Fig. 1. Cromatograma de proteínas membranales de eritrocitos humanos, columna Mono Q HR 5/5 equilibrada con 50 mM de etanolamina pH 9.0 en presencia de 2mM de ditiotreitolo, eluida con un gradiente de NaCl 0-1.0 M pH 9.0.

Fig. 2. Aislamiento de glucosa transportasa a partir de una preparación parcialmente purificada de eritrocitos humanos; misma columna y condiciones de elución que la figura 1.

El uso de este tipo de cromatografía permite una muy buena separación de proteínas membranales de eritrocitos humanos en presencia de detergentes, no iónicos, de tal forma que fue posible purificar la glucosa transportasa para llevar a cabo una secuenciación de aminoácidos. Además también fue posible separar adecuadamente glicoproteínas y la proteína transportadora de iones.

Proteínas del Virus Sendai.

Welling, G. W. y Welling-Wester, S. (106) (107) reportan la separación de la

proteína de fusión (F) del virus sendai, utilizando primeramente una columna preempacada de filtración molecular de alta resolución, columna TSK 4000 SW, por otra parte un extracto de proteínas virales se hicieron pasar por una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5; por último otro extracto de proteínas fueron cromatografiadas en una columna preempacada de fase reversa de alta resolución, columna C<sub>18</sub> TMS-250, a las fracciones eluidas de todas las columnas se les probó su actividad inmunológica por el método ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando anticuerpos anti-virus sendai unidos a peroxidasa, todas las fracciones fueron caracterizadas por electroforesis en gel de poliácridamida.

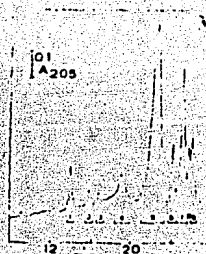
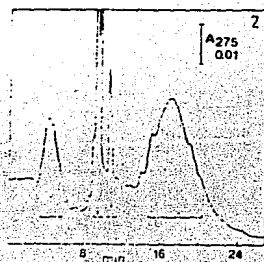
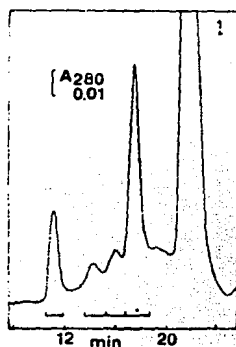


Fig. 1. Filtración molecular de proteínas del virus sendai, columna TSK 4000 SW.

Fig. 2. Intercambio aniónico del mismo extracto, columna Mono Q HR 5/5.

Fig. 3. Cromatografía en fase reversa del mismo extracto, columna C<sub>18</sub> TMS-250.

De los tipos de cromatografía realizados se concluye que la filtración molecular y el intercambio iónico son los adecuados para separar la proteína F, así como otras proteínas constitutivas del virus, ya que de la cromatografía en fase reversa se obtienen fracciones que no son inmunoreactivas, debido principalmente a los solventes utilizados para su elución.

#### Proteínas de Superficie del Virus de la Diarrea Bovina.

Karsnäs, P. y Moreno-López (48) reportan la purificación de proteínas de superficie del virus de la diarrea bovina, utilizando una columna de cromatografía de afinidad a base de un gel de agarosa unida a lectinas y una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5. las fracciones eluidas fueron caracterizadas por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida.

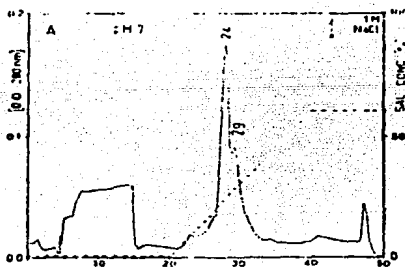


Fig 1. Cromatograma de las proteínas de superficie del virus de la diarrea bovina separadas previamente por cromatografía de afinidad a lectinas, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-1.0 M pH 7.0.

Fig. 2. Picos con actividad biológica de la figura 1 pasados por la misma columna, eluida con un gradiente de NaCl 0-1.0 M pH 6.0 en amortiguador de piperazina.

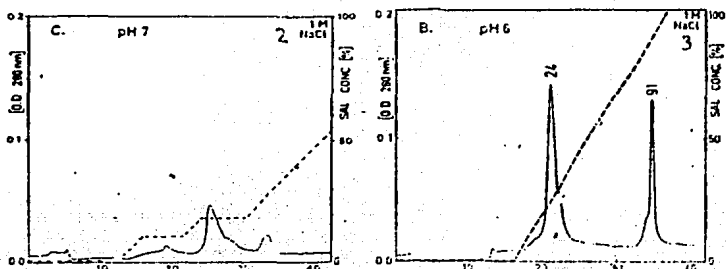


Fig. 3 Cromatograma del material obtenido de la primera cromatografía en la columna Mono Q HR 5/5 bajo las mismas condiciones de elución.

En esta revisión podemos observar que el material purificado bajo unas primeras condiciones de elución puede ser recromatografiado utilizando la misma columna incrementando la resolución de las proteínas aisladas sobre todo si el material con que se está trabajando contiene detergentes. La resolución será mayor si en la segunda corrida se varían las condiciones iniciales.

#### Proteínas Ribosomales de Escherichia coli.

En Technical Review Series, summer (1985) (80) se reporta la purificación de proteínas ribosomales de Escherichia coli utilizando primeramente una columna preempacada de intercambio catiónico de alta resolución, columna Mono S HR 5/5 y posteriormente una columna preempacada de fase reversa de alta resolución, columna PRO-RPC HR 5/10, todas las proteínas separadas fueron identificadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones.

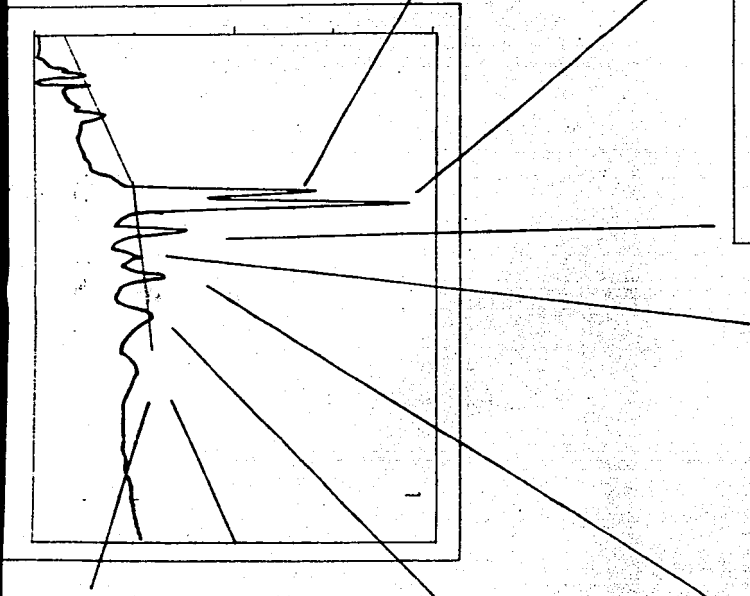
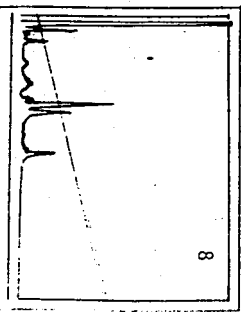
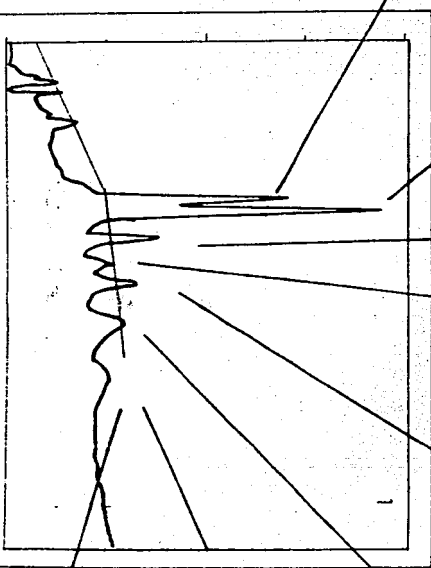
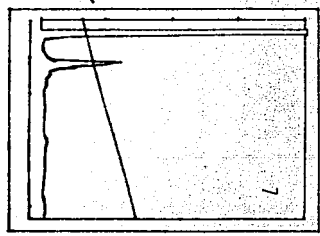
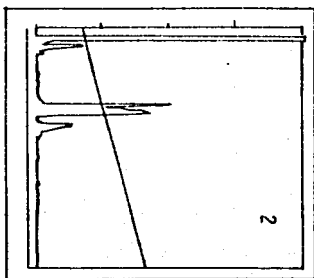
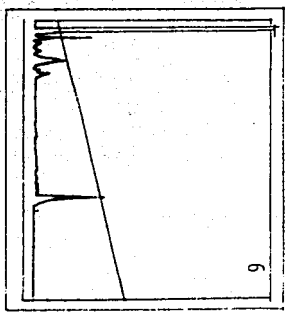
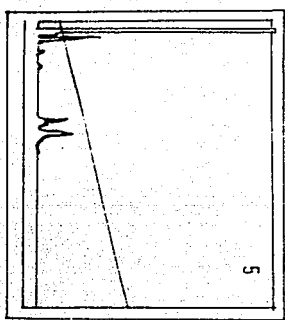
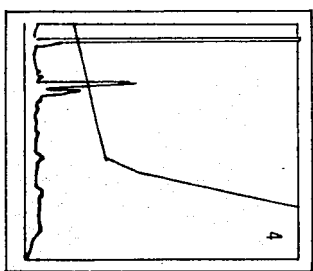
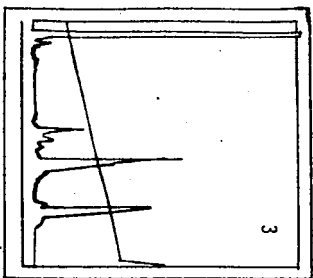




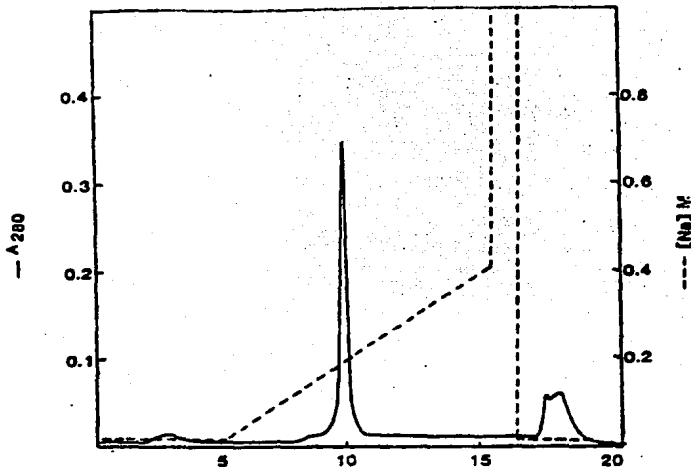
Fig 1. Cromatografía de intercambio Catiónico de proteínas Ribosomales de E. coli, columna Mono S HR 5/5 eluida con urea 6 M, Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, 6mM-2-Mercaptoetanol pH 6.5; añadiendo un gradiente de 10-45% con NaCl 1 M.

Figs. 2 a 8. Picos de la figura 1, Columna RPC eluida con un gradiente de trietilamonio/acetonitrilo 18-45% pH 7.2.

Como se puede apreciar en este trabajo la combinación de estas dos técnicas cromatográficas dan resultados óptimos para la separación y caracterización de proteínas ribosomales bacterianas; otra ventaja es que utilizando una columna de fase reversa relativamente corta (5 X 0.5 cm) los resultados obtenidos fueron aún mejores que en aquellos experimentos en donde se utilizan columnas más grandes.

#### Enterotoxina de E. coli.

Ronnberg, B. y Wadstrom, T. ( 85) reportan la purificación de la enterotoxina de Escherichia coli estable al calor (ST) pasando un sobrenadante de cultivo por una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica con octil-sepharosa CL-4B, posteriormente se pasó por una columna de filtración molecular empacada con biogel P-6, para finalmente utilizar una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna mono Q HR 5/5, la actividad biológica de las fracciones se determinó inoculando diluciones seriadas de la enterotoxina purificada en ratones lactantes y observando la dosis mínima efectiva que está reportada como la cantidad mínima necesaria de toxina que provoca una respuesta positiva, caracterizada por acumulación de líquidos en el intestino del ratón lactante.



Cromatograma de la enterotoxina ST de E. coli, columna mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-400 mM, pH 7.6.

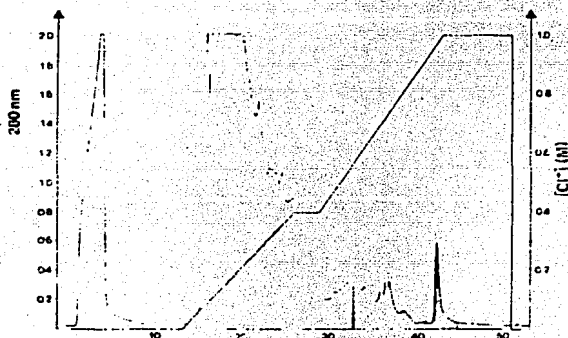
Podemos decir que el uso de la cromatografía líquida de alta resolución es de gran ayuda ya que nos da una gran pureza de la enterotoxina sustituyendo así a métodos cromatográficos lentos y no tan eficientes como la cromatografía líquida tradicional.

Enterotoxina de Clostridium difficile.

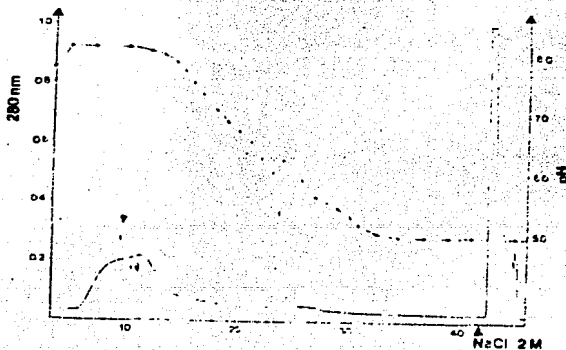
Rihn, B. y Monteil ( 83) reportan la purificación de una enterotoxina de Clostridium difficile. Utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5 y una columna preempacada de cromatoenfoco de alta resolución, columna Mono P HR 5/20; a las fracciones e-

luidas de ambas columnas se les probó su actividad enterotoxigénica por los siguientes métodos:

1. Inoculando el intestino delgado de conejos por el método de asa ligada, observando la acumulación de fluidos.
2. Observando el efecto citopático en un cultivo de células Mac Coy.



Cromatograma de proteínas de la toxina de C. difficile, columna Mono O HR 5/5, eluida con un gradiente de NaCl 0-1.0 M, pH 7.4.

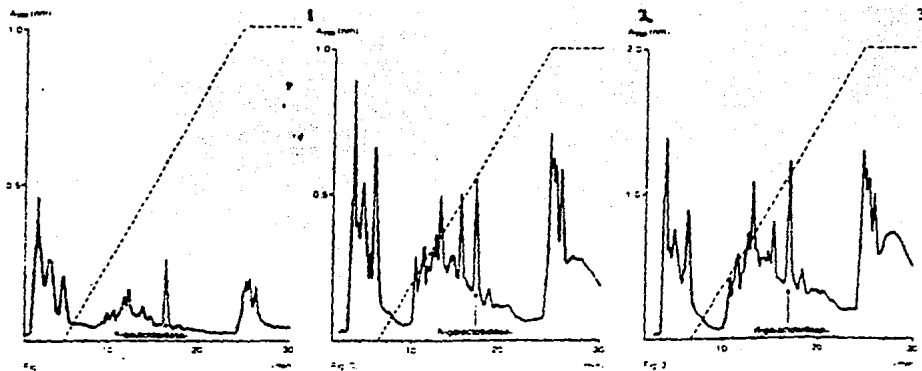


Cromatograma de las fracciones obtenidas en la columna Mono Q HR 5/5 que presentaron actividad biológica, columna de cromatoenfoco, Mono P HR 5/20 determinando la actividad enterotoxigénica por los mismos métodos. pH inicial de la columna 8.3; eluida con polybuffer 74 pH 5.0.

Debido a la utilización de estas dos técnicas cromatográficas se pudo separar la enterotoxina de C. difficile en 2 subunidades que la constituyen, para su posterior caracterización electroforética.

#### Detección de Productos del Metabolismo de Cultivos Celulares.

Frej, A. y Hedman, P. ( 33 ) ( 37 ) reportan el análisis de los productos del metabolismo de cultivos celulares, utilizando las columnas preempacadas de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5, y de intercambio catiónico de alta resolución columna Mono S HR 5/5; los productos de metabolismo analizados fueron: la producción de anticuerpos monoclonales IgG 1 contra Neisseria gonorrhoeae por cultivo de hibridomas; la producción de proteínas por un cultivo de E. coli, y la identificación de beta galactosidasa producida por fermentación.

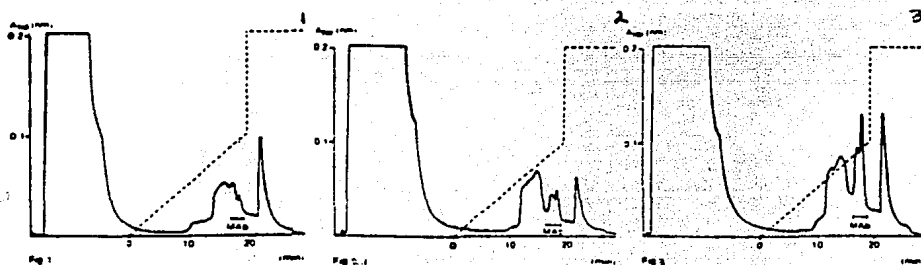


Cromatogramas de los productos del metabolismo de un cultivo de E. coli, separados en la columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.6 M, pH 5.8.

Fig. 1 Comenzando la fermentación.

Fig. 2 Tres horas de crecimiento.

Fig. 3 Después de seis horas de crecimiento.



Análisis cromatográfico del sobrenadante de cultivo de hibridomas utilizando la columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.5 M, acetato de sodio 20 mM, pH 5.0.

Fig. 1 Después de 16 horas de crecimiento.

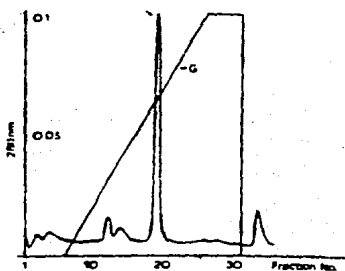
Fig. 2 Después de 120 horas de crecimiento.

Fig. 3 Después de 230 horas de crecimiento.

Como se puede observar el uso de la cromatografía líquida de alta resolución resulta ideal para el análisis de los productos de metabolismo de cultivos celulares.

#### Partículas de 22 S de Oocitos de Ovario.

Kleinschmidt, J. A. y Franke, W. (50) reportan la purificación de partículas con un coeficiente de sedimentación de 22 S de oocitos de ovario de Xenopus laevis, obtenidos por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Las fracciones 22 S se purificaron haciéndolas pasar por una columna de Deae-sephacel y posteriormente por una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por microscopía electrónica (ME) y caracterizadas por electroforesis bidimensional.

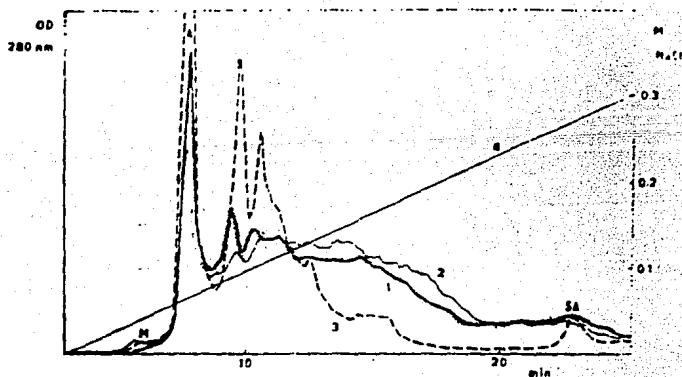


Cromatograma de partículas 22 S de Xenopus laevis, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de KCl 0-0.06 M.

El uso de la cromatografía líquida de alta resolución permite la purificación de partículas 22 S presentes en células de ovarios de Xenopus laevis, por análisis en electroforesis bidimensional se concluyó que dichas partículas están constituidas por doce polipéptidos y por M. E. se observó que su morfología es de cilindros de 10 nm de diámetro por 16 nm de altura. A pesar de tener una buena caracterización bioquímica, se desconoce a la fecha la función de estas partículas.

#### Hemoglobina Piridoxilada.

Pristoupil, T. I. y Kramlova V. (76) (52) reportan la purificación de hemoglobina copolimerizada con albúmina sérica, por medio de la acción de piridoxal 5-Fosfato y gluraraldehído, utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5.



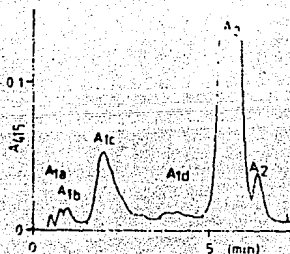
Cromatograma de hemoglobina piridoxilada separada en la columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.3 M, pH 8.0.

Las proteínas separadas fueron albúmina sérica, hemoglobina piridoxilada, me-

tahemoglobina y algunos otros picos que corresponden a la hemoglobina polimerizada; además se comprobó que la cromatografía líquida de alta resolución muestra reproducibilidad en trabajos de rutina por lo que se aconseja el uso de este tipo de columnas para separar mezclas de hemoglobinas o bien mezclas complejas de proteínas.

#### Hemoglobina Glicosilada.

Stenman, U. H. y Teramo, K. (97) reportan la purificación rápida y cuantificación de hemoglobina glicosilada humana a partir de un lisado de eritrocitos, utilizando una columna preempacada de intercambio catiónico de alta resolución, columna Mono S HR 5/5. Las fracciones fueron identificadas espectrofotométricamente por el método de Trivelli (101).



Cromatograma de lisado de eritrocitos identificando Hb A1a, Hb A1b, Hb A1c, Hb F, Hb A1d, Hb A<sub>o</sub>, Hb A2. Columna Mono S HR 5/5.

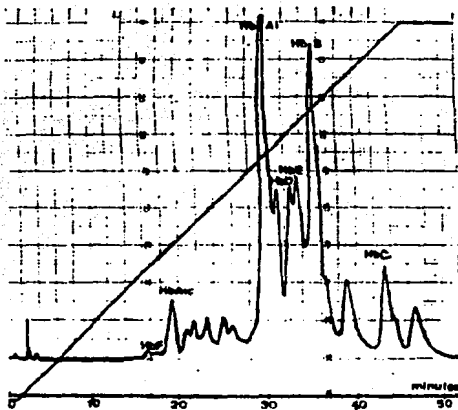
Los resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución son comparables con la técnica de elección propuesta por Trivelli, la cual utiliza



una matriz llamada Bio-rex para la separación, pero con la ventaja de que por cromatografía líquida de alta resolución los resultados se obtienen en 7 minutos contra 40 minutos que se lleva la técnica de elección.

#### Identificación de Hemoglobinas Humanas Anormales.

Robinet, D. y Funes, A. ( 84) reportan la identificación de hemoglobinas anormales en pacientes con hemoglobinopatías a partir de muestras de sangre hemolizadas y deslipidizadas utilizando las columnas de intercambio aniónico y catiónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5 y columna Mono S HR 5/5; las fracciones eluidas de ambas columnas fueron caracterizadas por electroforesis en acetato de celulosa utilizando hemoglobinas anormales de origen comercial como controles, además éstas fueron cromatografiadas por separado con el objeto de determinar su tiempo de retención.



Cromatograma de un hemolisado proveniente de un paciente con hemoglobinopatía, utilizando la columna Mono S HR 5/5.

Se identificaron la presencia de las siguientes hemoglobinas Hb F, Hb A1c, Hb A1, Hb Bd, Hb E, Hb S, Hb C1.

Con el advenimiento de la cromatografía líquida de alta resolución es posible separar las distintas variantes de hemoglobinas descritas en la literatura evitando técnicas como la electroforesis la cual sólo da resultados satisfactorios cuando las concentraciones de hemoglobina son altas; el único requisito indispensable es que las muestras que se van a aplicar a la columna estén saturadas de CO para obtener resultados reproducibles, sobre todo en el caso de la Hb A1.

#### Trombospondina.

Cleazardin, P. y Clemetson, K. J. (15) reportan el aislamiento de trombospondina de un lisado de plaquetas humanas estimuladas con trombina, utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5; las fracciones eluidas fueron identificadas por inmuno-electroforesis en cohete (Laurell) y radioinmunoensayo (RIA), caracterizadas por electroforesis en SDS-Poliacrilamida.



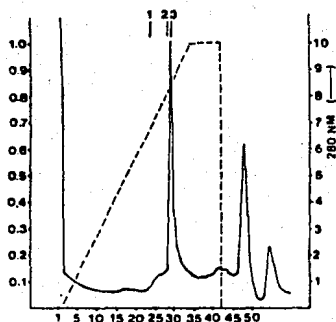
Fig. 1 Cromatograma de un extracto crudo de plaquetas humanas, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-1.0 M, pH 6.0 (el pico con la flecha es la trombospondina con actividad biológica).

Fig. 2 Separación de la trombospondina de otras proteínas contaminantes, columna Mono Q HR 5/5 eluida con las mismas condiciones.

Como se puede observar la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico puede utilizarse para separar proteínas secretadas por plaquetas humanas, y así llevar a cabo estudios posteriores para comprender mejor su función evitando de esta manera la desnaturalización de la muestra. Por otra parte el proceso de separación es rápido (20 min.). Es importante señalar que esta proteína también se puede separar por cromatografía de afinidad empleando Heparin-Sepharosa como soporte; sin embargo el proceso no es tan rápido como el mencionado.

#### Beta-Endorfina.

Stenman, V. H. y Huhtala, M. L. ( 96) reportan la purificación de beta-endorfina en plasma de mujeres embarazadas en labor de parto, primeramente las proteínas plasmáticas fueron eliminadas por un proceso de precipitación a pH ácido dejando solubles a las beta-endorfinas presentes; el sobrenadante se pasó por una columna preempacada de intercambio catiónico de alta resolución, columna Mono S HR 5/5; las fracciones eluidas fueron analizadas por radioinmunoensayo utilizando anti-beta-endorfina acoplada a <sup>125</sup>I.



Cromatograma de beta-endorfina purificada de plasma humano en la columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de acetato de amonio 0.05-0.5 M conteniendo 20% de acetonitrilo, pH 5.5.

El uso de esta metodología permite la separación de beta-endorfina en plasma de mujeres embarazadas, además de separación la técnica de intercambio iónico de alta resolución tiene un efecto de concentración el cual fue aprovechado para hacer más sensible el método de análisis posterior a la cromatografía.

#### Separación de Proteínas del Plasma.

Tomono, T. y Tokunaga, E. (100) reportan el análisis de plasma humano por cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico, utilizando las columnas preempacadas Mono O. HR 5/5 y Polyanion S.I. Después de encontrar los factores ideales para la separación como son: composición del solvente, pH,

fuerza iónica, etc., se obtuvieron varios picos, los cuales fueron caracterizados por electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida y por inmunoelectroforesis.

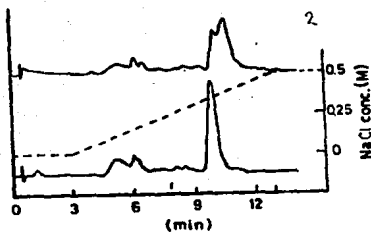
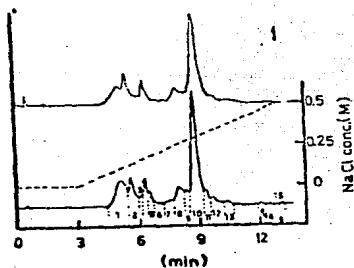


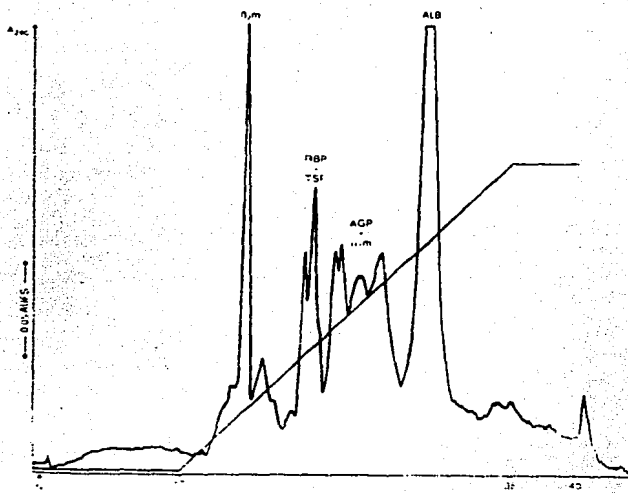
Fig. 1 Cromatograma de plasma humano en la columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.5 M, pH 6.0.

Fig. 2 Misma muestra columna Polyanion SI, mismas condiciones de elución.

Se observó que en la columna Mono Q HR 5/5 se obtuvo mayor número de proteínas separadas que con la columna Polyanion SI; por lo que la hace ideal para el análisis de plasma de pacientes con anomalías como mielomas y leucemia; además las fracciones obtenidas conservaron su actividad biológica.

#### Proteínas Humanas Anormales.

Hill, E. (41) reporta la detección de proteínas anormales presentes en suero y orina de pacientes con padecimientos renales, utilizando una columna de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5, encontrando principalmente albúmina, beta-2-microglobulina, etc.



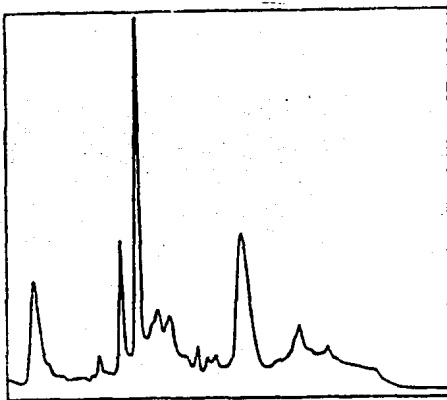
Cromatograma de una muestra de orina de un paciente con padecimiento renal y proteinuria, columna Mono Q HR 5/5.

La identificación de proteínas excretadas en orina han sido detectadas tradicionalmente por técnicas electroforéticas; ahora utilizando la cromatografía líquida de alta resolución mezclas complejas de proteínas son separadas fácilmente, recomendando utilizar patrones para su identificación; el tiempo requerido para la separación es mínimo en comparación con técnicas tradicionales.

Proteínas de Suero Humano.

Fagerstam, L. y Wahlstrom, L. ( 28 ) ( 29 ) (105) reportan el análisis de proteínas de suero humano por cromatoenfoco de alta resolución utilizando la columna

na preempacada Mono P HR 5/20; los picos obtenidos fueron caracterizados por enfoque isoelectrico y por electroforesis en gel de poli-acrilamida e identificados inmunológicamente por electro-inmunodifusión en cohete (Laurell).



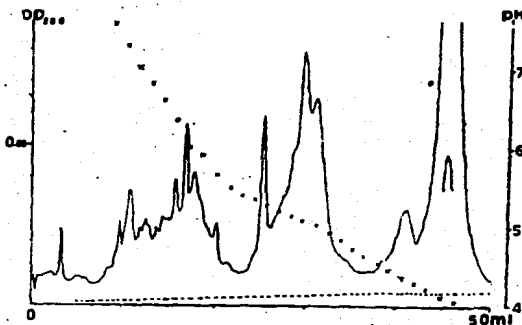
Cromatograma de suero humano en la columna Mono P HR 5/5, pH inicial de la columna 6.3 eluida con polybuffer 74 pH 4.0; se identificaron las proteínas  $\alpha$ -fa-1 antitripsina y globulina Gc.

El uso de cromatoenfoco permitió separar las proteínas de suero humano en un intervalo de pH de 4.3-3.8 realizado en menos de 60 minutos. Esta técnica tiene las mismas ventajas que el enfoque isoelectrico, pero además puede ser utilizada con fines preparativos.

#### Análisis de Proteínas del Líquido Cefalorraquídeo.

Kjellin, K. G. y Hallander, L. B. (49) reportan el análisis de las proteínas que componen el líquido cefalorraquídeo, utilizando cromatoenfoco de alta resolución, columna preempacada Mono P HR 5/20, las fracciones eluidas fueron

caracterizadas por inmunolectroforesis e inmunonefelometria.



Cromatograma de L.C.R. columna Mono P HR 5/20, pH inicial de la columna 7.4 eluida con polybuffer 74, pH 4.0.

El uso del cromatoenfoco en cromatografía líquida de alta resolución permite el análisis de las proteínas de líquido cefalorraquídeo por puntos isoeléctricos, lo que puede ser utilizado para detectar proteínas anormales en L.C.R.; por otra parte la separación se obtiene en forma rápida y las fracciones eluidas pueden ser analizadas por otros métodos como los inmunolectroforéticos.

#### Proteínas en Orina.

Lindblom H. y Turner R. ( 57) ( 56) reportan el análisis de orina humana de pacientes con problemas renales utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono O HR 5/5 y una columna preempacada de cromatoenfoco de alta resolución, columna Mono P HR 5/20; a los picos eluidos de ambas columnas se les identificó por inmunolectroforesis y se



caracterizaron por electroforesis en gel de poliácridamida.

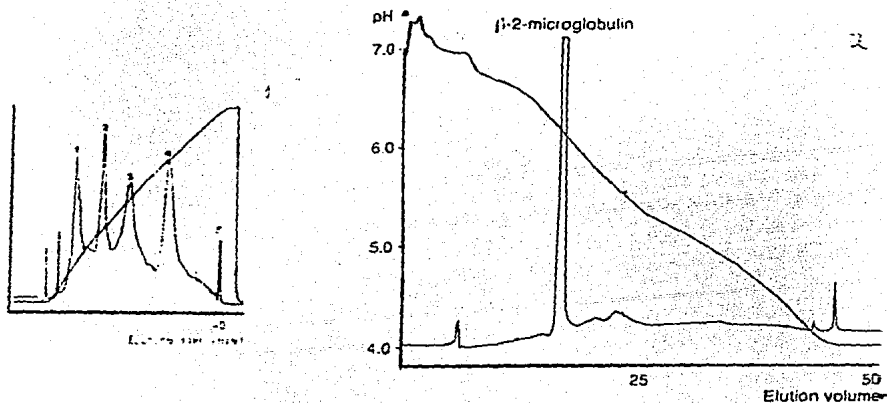


Fig. 1 Cromatograma de orina de pacientes con deficiencia renal identifican-  
do:

1. Beta-2-microglobulina, 2. Cadenas L de IgG, 3. Transferrina, 4. Al-  
fa microglobulina, Alfa anti-tripsina y glicoproteína ácida, 5. Albú-  
mina columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.35 M,  
pH 9.5.

Fig. 2 Misma muestra separando Beta-2-microglobulina, columna Mono P HR 5/20,  
pH inicial de la columna 7.1 eluida con polybuffer 74, pH 4.0.

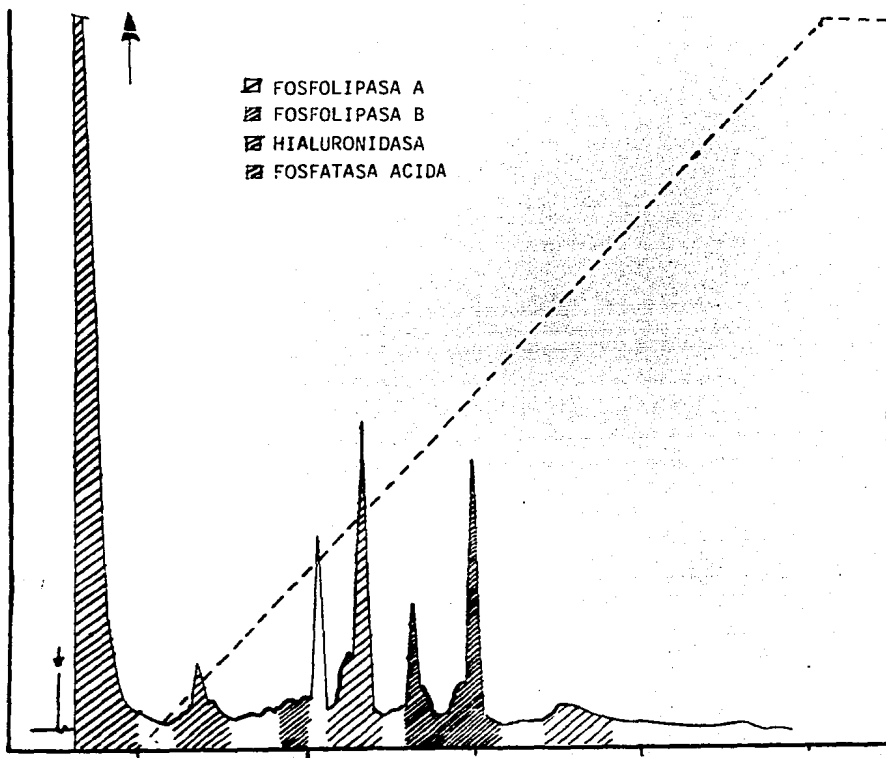
El uso de estas dos técnicas cromatográficas resultan complementarias para el  
análisis de proteinurias en pacientes con deficiencia renal; por otra parte,  
resulta muy útil que antes de llevar a cabo los corrimientos cromatográficos,  
se efectúe una curva de titulación electroforética, con el fin de facilitar

la elección del pH al cual se lleva a cabo el intercambio iónico.

#### Venenos de Insectos de Origen Proteico.

Einarsson, R. y Renck, B. (23) (24) reportan la separación de las proteínas presentes en venenos de insectos como abejas y vespidos utilizando una columna preempacada de intercambio catiónico; columna Mono S HR 5/5; previamente las condiciones de elución se establecieron llevando a cabo una curva de titulación electroforética de la muestra; a las fracciones obtenidas se les probó las siguientes actividades:

1. Actividad de fosfatasa ácida por hidrólisis de un sustrato cromogénico.
2. Actividad de fosfolipasa medida por difusión en agarosa utilizando como sustratos lecitina y lisolecitina.
3. Actividad de hialuronidasa utilizando ácido hialurónico como sustrato.
4. Actividad proteolítica demostrada por difusión radial en agarosa conteniendo albúmina como sustrato.



Cromatograma de veneno de insectos; columna Mono S.HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 50 mM-350-mM, pH 8.4.

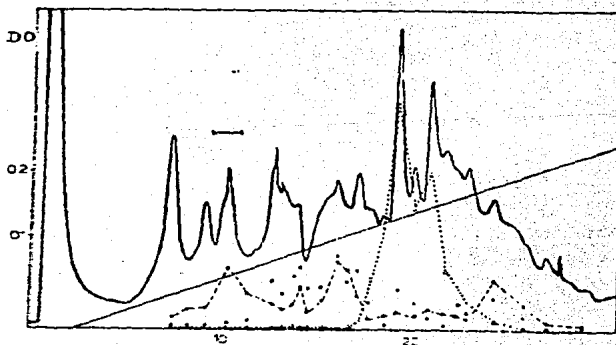
La cromatografía líquida de alta resolución es una herramienta útil en la caracterización de los componentes en ponzoñas y venenos de insectos, y tomando en cuenta que el tiempo de corrida es muy corto. Este método es ampliamente

utilizado para el control de calidad en la preparación de alérgenos con fines terapéuticos.

#### Veneno de Echis carinatus.

Dyr, J. E. y Vodrazka, Z. (22) reportan la separación de las proteínas presentes en el veneno de la serpiente Echis carinatus, utilizando una columna preempacada de intercambio aniónico de alta resolución, columna Mono Q HR 5/5, a las fracciones eluidas se les detectó las actividades de:

1. Acción coagulante.
2. Hidrólisis de un sustrato cromogénico que se utiliza para la prueba de trombina (TS-TOS-GLY-PRO-ARG-pNa-HCl).
3. Actividad fibrinolítica determinada por el aumento del tiempo de coagulación de una muestra control.

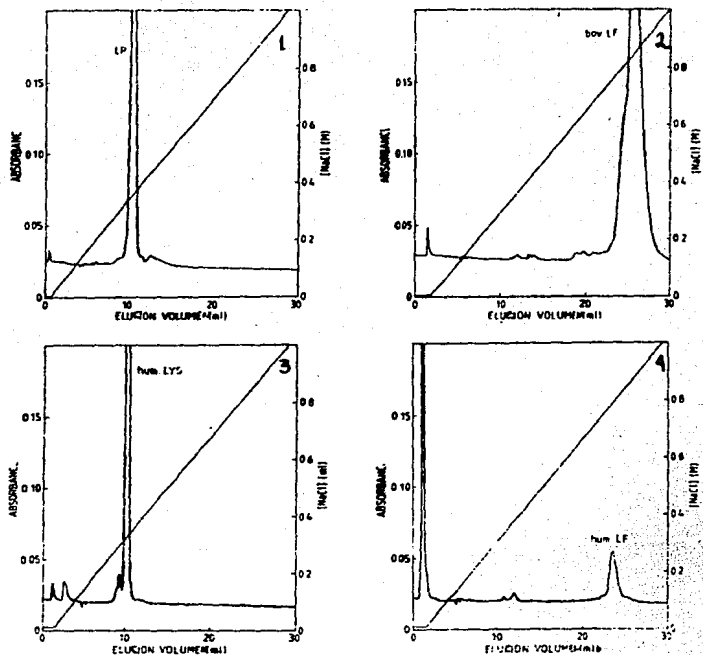


Cromatograma del veneno de Echis carinatus identificando las proteínas que lo componen, columna Mono Q HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-0.35 M, pH 8.0.

Con el uso de la cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico se pudo no solamente fraccionar en sus diversos componentes el veneno de Echis carinatus, sino que también se comprobó que algunas fracciones tienen actividad procoagulante (ecarina); y otras tienen actividad fibrinolítica. Además las fracciones separadas pueden ser caracterizadas por otros métodos como la electroforesis en SDS-Poliacrilamida.

Compuestos Antibacterianos no específicos en Leche.

Ekstrand, B. y Bjorrrck, L. (25) reportan la separación de diferentes factores antibacterianos no específicos como lactoferrina, lactoperoxidasa, lisosima, utilizando una cromatografía previa con CM-cellulosa y posteriormente cromatografía líquida de alta resolución en una columna preempacada de intercambio catiónico, columna Mono S HR 5/5, las fracciones eluidas se les midió su actividad de lactoperoxidasa utilizando un sustrato cromogénico (2.2-Azino-01-3-etil-benzotiazolin sulfonato) (ABTS), y se les hizo un análisis de aminoácidos.



Cromatogramas de proteínas antibacterianas presentes en leche, columna Mono S HR 5/5 eluida con un gradiente de NaCl 0-1.0 M, pH 7.0 en 0.01 M de imidazol.

Fig. 1) Lactoperoxidasa, 2) Lactoferrina, 3) Lisosima Humana, 4) Lactoferrina humana. Además se aplicaron a la columna muestras de lactoferrina bovina, lisosima humana, y lactoferrina humana purificadas y de origen comercial con el objeto de determinar los tiempos de retención de la columna.

El uso de la cromatografía líquida de alta resolución da como resultado el tener un método rápido, cuantitativo o cualitativo para el análisis de proteínas

antibacterianas presentes en la leche, además permite el estudio de la variación de estos componentes durante los distintos períodos de secreción de leche.

## IV. CONCLUSIONES

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada se puede concluir que;

1. La cromatografía líquida de alta resolución FPLC permite separar grandes biomoléculas sin afectar su estructura ni su función biológica.

2. Este método ofrece una gran versatilidad en la separación ya que podemos realizar técnicas cromatográficas como filtración molecular, intercambio iónico, cromatografía de afinidad y fase reversa, basándose en gran medida en la naturaleza intrínseca de cada soporte, así como también del grupo funcional con el cual estos hayan sido sustituidos, por ejemplo aminos cuaternarios, grupos sulfonatos, poliaminas, etc.

3. La separación de biomoléculas por esta metodología está dada exclusivamente por las matrices utilizadas y de éstas depende una buena resolución en la separación.

4. La cromatografía líquida de alta resolución FPLC aprovecha las características fisicoquímicas de las moléculas tales como pH, punto isoelectrico, densidad de carga, solubilidad, etc. para poder separarlos.

5. La cromatografía líquida de alta resolución FPLC es sin duda una alternativa para la separación de biomoléculas de origen proteico tales como enzimas, factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos, proteínas virales, toxinas, así como también ácidos nucleicos y polinucleótidos.

6. Esta técnica puede utilizarse en combinación con otras técnicas de separación tales como ultracentrifugación, precipitación selectiva por concentración de sales, precipitación con solventes orgánicos, para obtener



mejores resultados y por otra parte pueden complementarse con técnicas analíticas como la electroforesis, secuenciación de aminoácidos o bien secuenciación de ácidos nucleicos.

7. Por último se concluye que los resultados que se encuentran en esta revisión bibliográfica pueden servir como una guía para todos aquellos laboratorios de investigación y laboratorios clínicos interesados en separar una biomolécula dada debido a que se plantean diversas alternativas y se hace referencia a la cita bibliográfica original para que ésta pueda ser consultada oportunamente, ayudando de esta manera a tener más clara la estrategia de purificación por parte del investigador.

## V. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andersson, T., Janson, J.C. et al. "Agarose-based media for high-resolution gel filtration of biopolymers". *Journal of Chromatography*, 326/33-34 (1985).
- 2.- Bayer, H.H., Christian, G.D., O'Reilly, J.E. *INSTRUMENTAL ANALYSIS*. Allyn and Bacon, Inc. Boston (1978).
- 3.- Bell, S.M., Priddle, J.D., Stern, L. "Heterogeneity of rat TCGF defined by Mono PISOelectric Focusing". *Molecular Immunology* 21/4/271-276 (1984).
- 4.- Bergström, J., Hansson, K-A. et al. "Recommendations for obtaining optimal separations on MonoBeads ion exchangers" *Protides Biol. Fluids* 30/641-646 (1983).
- 5.- Bergström, J., Wahlström, L. et al. "Sample loading capacity on MonoBeads ion exchangers". *Protides Biol. Fluids* 30/647-651 (1983).
- 6.- Bioewenga, J., Bruin, G.M. et al. "Fast protein liquid chromatography of IgA fragments". *Protides Biol. Fluids*. 32/1089-1092 (1985).
- 7.- Bilder, R. "Fast protein liquid chromatography: A new method for analysing large biological molecules". *Int. LabMate* 8/5-6 (1983).
- 8.- Böhlen, P., Gospodarwicz, D. et al. "Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor" *Proc. Natl Acad Sci.* 81/5364-5368 (1984).
- 9.- Britton, V.J., Beadling, L.C., and Barry, A. "Application of new ion-exchange media in the high performance chromatography of alkaline phosphatase". *Liquid Chromatography* 1/3/176-179 (1983).
- 10.- Brokhes, J.P. "Mitogenic growth factors and nerve dependence of limb regeneration" *Science* 225/1226-1226 (1984).
- 11.- Burchiel, S.W., Billman, J.R. and Alber, T.R. "Rapid and efficient purifi

- cation of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid using high performance liquid chromatography". *Journal Immunological Methods* 69/33-42 (1984).
- 12.- Burgess, A.W., Lloyd, C.J. and Nice, E.C. "Murine epidermal growth factor: Heterogeneity on high resolution ion-exchange chromatography". *The Embo - Journal* 2/11/2065-2069 (1983).
- 13.- Buttle, D.J. and Barrett, A.J. "Chymopapain, chromatographic purification and immunological characterization". *Biochem. J.* 223/81-88 (1984).
- 14.- Calvin, J., Grushka, E., Keller, R.A., Cazes, J. *ADVANCES IN CHROMATOGRAPHY*. Waters Associates Inc. Milford Massachusetts. Marcel Dekker Inc. New York, Vol. 12 p. 61-67 (1975).
- 15.- Cleazardin, P., Clemetson, K.J. et al. "Isolation of thrombospondin related from thrombin-stimulated human platelets by fast protein liquid chromatography on an anion exchange Mono-Q column". *Journal of Chromatography* 296/249-256 (1984).
- 16.- Cooper, E.H., Crockson, R.A. et al. "Identification and measurement of paraprotein polymers by high performance gel filtration chromatography". *Biomedicine and Pharmacotherapy* 39/78-82 (1985).
- 17.- Danson, M.J. Wood, P.A. "Isocitrate dehydrogenase of the thermoacidophilic archaebacterium Sulpholobus acidocaldarius". *Febs Letters* 172/2/289-293 - (1984).
- 18.- Denklaue, D., Stellmach, J. et al. "Isolation and fast purification of neocarzinostatin by FPLC ion exchange chromatography". *Z. Naturforsch.* 38/939-342 (1983).
- 19.- Dick, J.G. *QUIMICA ANALITICA*. ED. El Manual Moderno, México, p. 652-658 (1979).
- 20.- Dijk, S., Molen, H.J. et al. "Use of fast protein liquid chromatography in

- the purification of inhibin from bovine follicular fluid". Biochem. -- Biophys. Res. Commun. 125/1/307-314 (1984).
- 21.- Domicelj, A. "A method for separating IgG, IgA and IgM in human blood - plasma". Separation News 1, Pharmacia Fine Chemicals. (1982).
- 22.- Dyr, J.E., Kornalik, F., et al. "Fast protein liquid chromatography of Echis carinatus venom". Journal of Chromatography 261/163-165 (1983).
- 23.- Einarsson, R. "Application of high-performance cation-exchange chromatography for characterization of stinging insect venoms". Acta. chem. -- Scand. Ser. B 2083/2-21 (1983).
- 24.- Einarsson, R., and Renck, B. "Ion-exchange chromatographic characterization of stinging insect vespid venoms". Toxicon. (Pergamon Press) 22/1/154-160 (1984).
- 25.- Ekstrand, B. and Björck, L. "Fast protein liquid chromatography of anti bacterial components in milk. Lactoperoxidase, lactoferrin and lysozyme". J. Chromatogr. 358/429-433 (1986).
- 26.- Epton, R. CHROMATOGRAPHY OF SYNTETIC AND BIOLOGICAL POLYMERS. Ed. Chemical Soc. Vol 2, p. 1-9 y 25-41 (1978).
- 27.- Ezra, E., Blacher, R. and Udenfriend, S. "Purification and partial sequencing of human placental alkaline phosphatase". Biochem. Biophys. -- Res. Commun: 116/3/1076-1083 (1983).
- 28.- Färgerstam, L.G., Nylund, V. et al. "Analysis of human blood plasma by chromatofocusing on Mono P followed by pore gradient gel electrophoresis". Protides. Biol. Fluids. 30/657-659 (1983).
- 29.- Färgerstam, L.G., Wahlström, L. et al. "Fast chromatofocusing of human serum proteins with special reference to  $\alpha_1$ -antitrypsin and Gc-globulin". Journal of Chromatography 266/523-532 (1983).
- 30.- Färgerstam, L., Wallden, E. et al. "Basic principles used in the selec-

- tion of MonoBeads ion exchangers for the separation of bipolymers" *Proti-des. Biol. Fluids*. 30/621-628 (1983).
- 31.- Fiechter, A. *ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York, Vol. 25 p. 43-99 (1982).
  - 32.- Finel, M., Rubinstein, M. and Pick, U. "Preparation of an e-deficient -- chloroplast coupling factor I having a high ATPase activity". *Febs Lett*. 1143-166/1/85-89 (1984).
  - 33.- Frej, A.K., Gustafsson, J.G., and Hedman, P. "FPLC for monitoring micro-- bial and mammalian cell cultures". *Biotechnology* 777-781 (1984).
  - 34.- Gacon, G., Comoglio, P.M. et al. "Identification of a 58,000 daltons phos phoprotein with tyrosine protein kinase activity in a murine lymphoma -- cell line". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122/2/563-570 (1984).
  - 35.- Gounaris, A.D., Barret, A.J. et al. "Human plasma a-cystein proteinase in hibitor". *Biochem. J.* 221/445-452 (1984).
  - 36.- Gross, R.W., Drisdell, R.C. and Sobel, B.E. "Rabbit myocardial lysophospho lipase transacylase". *Journal of Biological Chemistry* 1/15165-15172 - - (1983).
  - 37.- Gustafsson, J-G., Frej, A-K., and Hedman, P. "Monitoring of protein pro-- duct formation during fermentation with fast protein liquid chromatography". *Biotechnology and Bioengineering* 28/16-20 (1986).
  - 38.- Hansson, K.A. "Purification of NADP by high-performance anion-exchange -- chromatography". *Journal of Chromatography* 266/395-399 (1983).
  - 39.- Heubner, A., Pollow, K., et al. "High-performance and ion-exchange chroma tography and chromatofocusing of the human uterine progesterone receptor: It's application to the identification of 21- <sup>3</sup>H dehidro org 2058-labelled receptor". *Journal of Chromatography* 297/301-311 (1984).
  - 40.- Higuchi, M., Osawa, T. "Macrophage-activating factor for cytotoxicity pro

- duced by a human T-cell hybridoma". *Cellular Immunology* 87/626-636 - - - (1984).
- 41.- Hill, E. "Clinical applications of fast protein liquid chromatography". - *Laboratory Technology*, September-October, p. 231-236 (1983).
- 42.- Ho-Terry, L. Cohen, A., Terry, G.M. "Detection of rubella virus specific IgM by fast protein liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay *J. Med. Microbiol.* 17/177-180 (1984).
- 43.- Huhtala, M.L. "Demonstration of a new acrosin inhibitor in human seminal Plasma" *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365/819-825 (1984).
- 44.- Jochum, M., Bittner, A., et al. "Inter-a-trypsin inhibitor of human serum" *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem* 364/1709-1715 (1983).
- 45.- Johansson, B-L. and Ahsberg, L. "Column lifetime of superose 6 at 37°C -- and basic pH". *Journal of Chromatography* 351/136-139 (1986).
- 46.- Johansson, B-L. and Ellström, C. "Column lifetime of a new agarose medium for high-performance gel filtration chromatography at basic pH". *Journal of Chromatography* 330/360-364 (1985).
- 47.- Johansson, B-L., and Stafström, N. "Column lifetime in fast protein liquid Chromatography". *Journal of Chromatography* 314/396-401 (1984).
- 48.- Kornäs, P., Moreno-López, J. and Kristeansen, T. "Bovine viral diarrhoea - virus: purification of surface proteins in detergent-containing buffers - by fast protein liquid chromatography" *Journal of Chromatography* 226/643-649 (1983).
- 49.- Kjellin, K.G., Hallander, L.B. "Analysis of CSF-protein compounds by fast protein liquid chromatography". *IRCS Med. Sci. Biochem. Biomed. Tech:* - *Clin. Biochem. Clin. Med. Nervous System: Pathology* 10/942-943 (1982).
- 50.- Kleinschmidt, J.A., Franke, W.W. et al. "The 225 cylinder particles of -

- Xenopus laevis. I. Biomedical and electron microscopic characterization". Eur. J. Cell Biol. 32/3/143-156 (1983).
- 51.- Kopaciewicz, W., Regnier, F.E. et al. "Retention model for high performance ion-exchange chromatography". Journal of Chromatography 266/3-21 - - (1983).
- 52.- Kramlová, M., Kantardjiev, N. et al. "Fast protein liquid chromatography of pyridoxalated and glutaraldehyde-treated human haemoglobin". Journal of Chromatography 249/403-404 (1982).
- 53.- Kuehn, L., Reinauer, H. et al. "Proteinase inhibitors in rat serum: Purification and partial characterization of three functionally distinct - - trypsin inhibitors". Biochem. J. 218/3/953-959 (1984).
- 54.- Lenninger, A.L. Bioquímica 2a. edición, Ediciones Omega S.A. 1981.
- 55.- Lindblom, H. "Rapid chromatographic method for the isolation of glucose-6 phosphate dehydrogenase from yeast enzyme concentrate" Journal of Chromatography 266/265-271 (1983).
- 56.- Lindblom, H., Turner, R. et al. "Separation of urine proteins on the anion exchange resin Mono Q". Journal of Chromatography 273/107-116 (1983).
- 57.- Lindblom, H., Turner, R. et al. "Urinary protein isolation by high performance ion-exchange chromatography". Journal of Chromatography 266/187-196 (1983).
- 58.- Lindstedt, S., and Nordin, I. "Multiple forms of  $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase (EC1.14.11.1)". Biochem. J. 223/119-127 (1984).
- 59.- Lundhal, P., Färgerstam, L.G. et al. "Fractionation of human red cell membrane protein by ion exchange chromatography in detergent on Mono Q, with special reference to the glucose transporter". Journal of Chromatography 297/129-137 (1984).
- 60.- Markey, F. "Rapid purification of deoxyribonuclease I using protein li-

- quid chromatography". *Febs Letters* 167/1/155-159 (1984).
- 61.- Mascher, E., Lundhal, P. "High performance agarose gel chromatography in sodium dodecyl sulfate of integral membrane proteins from human red cells, with special reference to the glucose transporter" *Biochem. Biophys. Acta* 856/505-514 (1986).
- 62.- Mizuno, K., and Matsuo, H. "A novel protease from yeast with specificity towards paired basic residues". *Nature* 309/558-560 (1984).
- 63.- Nelson, N. *Curr. Tap. Bioenerg.* 11 1-33 (1981).
- 64.- Newton, F.C., Reed, D.L. "The introduction and isolation of interleukin-1 from human peripheral blood monocytes". *Fed. Proc.* 42/3916/960 (1983).
- 65.- Nissen-Meyer, J. Kildahl-Andersen, O. "Purification of cytostatic protein factors released from human monocytes". *Scand. J. Immunol.* 20/317-325 - - (1984).
- 66.- Osawa, T. "Human T cell hybridomas producing inflammatory lymphokines". - *Trends in Biotechnology* 2/2/39-42 (1984).
- 67.- Persson, B., Rydström, J. et al. "Energy-linked nicotinamide nucleotide - transhydrogenase". *The Journal of Biological Chemistry* 259/13/8626-8632 (1984).
- 68.- Pharmacia Fine Chemicals. AFFINITY CHROMATOGRAPHY PRINCIPLES AND METHODS.
- 69.- Pharmacia Fine Chemicals. CHROMATOFOCUSING WITH POLYBUFFER AND PBE.
- 70.- Pharmacia Fine Chemicals. ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY PRINCIPLES AND -- METHODS.
- 71.- Pharmacia Laboratory Separation Division. FPLC ION EXCHANGE AND CHROMATO FOCUSING.
- 72.- Pharmacia Laboratory Separation Division. GEL FILTRATION THEORY AND PRACTICE.



- 73.- Pickering, W.F. QUIMICA ANALITICA MODERNA. Reverté S.A. Barcelona; México 556-564 y 632-638 (1976).
- 74.- Póvoa, G., Hall, K. et al. "Isolation and characterization of a somatostatin binding protein from mid-term human amniotic fluid" Eur. J. Biochem. 114/199-204 (1984).
- 75.- Pressey, R. "A rapid method for separating tomato polygalacturonidases by HPLC". Hort Science 19/4/572-573 (1984).
- 76.- Pristoupil, T.I., Kraml, J. et al. "The reproducibility of fast protein liquid chromatography of pyridoxalated haemoglobin copolymerized with serum albumin". Journal of Chromatography, 280/165-166 (1983).
- 77.- Rådmark, O., Samuelsson, B. et al. "Leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase in human leukocytes". The Journal of Biological Chemistry 259/20/12339-12345 (1984).
- 78.- Rawn, J.D. BIOCHEMISTRY. Harper and Row, New York, p. 174-192 (1983).
- 79.- Regnier, F.E. "High performance liquid chromatography of biopolymers". Science 222/4621/145-152 (1983).
- 80.- Review. "Purification of ribosomal proteins from Escherichia coli by high performance liquid chromatography" Technical Review Series, Summer (1985).
- 81.- Review. "Rapid purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by fast protein liquid chromatography" Technical Review Series, -- Summer (1985).
- 82.- Richey, J. "FPLC: A comprehensive separation technique for biopolymers". American Laboratory, 14/10/104-129 (1982).
- 83.- Rihn, B., Monteil, H. et al. "A new purification procedure for Clostridium difficile enterotoxin". Biochem. Biofis. Res. Commun. 124/3/690-695 (1984).
- 84.- Robinet, D., Funes, A. et al. "Separation of haemoglobins using monodisperse cation exchanger" Journal of Chromatography, 297/333-337 (1984).
- 85.- Rönnerberg, B., and Wadström, T. "Improved method for purification of human Escherichia coli heat-stable enterotoxin by hydrophobic interaction and --

- fast protein liquid chromatography". *Prep Biochem.* 13/245-260 (1983).
- 86.- Sahyoun, N., Cuatrecasas, P. et al. "A specific Phosphoprotein phosphatase acts on histone H1 phosphorylated by protein kinase C". *Proc. Natl - Acad. Sci.* 80/6760-6764 (1983).
- 87.- Sampson, I.A., Hodgen, A.N., and Arthur, I.H. "The separation of immunoglobulin M from human serum by fast protein liquid chromatography". *Journal of Immunological Methods.* 69/9-15 (1984).
- 88.- Schreiber, R.D., Katz, D.H. "Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: Physicochemical and biosynthetic resemblance to  $\gamma$ -interferon". *The Journal of Immunology* 131/2/826-832 (1983).
- 89.- Shimizu, T., Rådmark, O. and Samuelsson, B. "Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene  $A_4$  synthesis from arachidonic acid". - - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81/689-693 (1984).
- 90.- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY. John Wiley and Sons New York, p. 1-45 y 168-183 (1979).
- 91.- Söderberg, L. "Physicochemical considerations in the use of MonoBeads for the separation of biological molecules". *Protides. Biol. Fluids.* 30/629-634 (1983).
- 92.- Söderberg, L., Müller, R.-M., Färgerstam, L. "Chromatofocusing of desialylated human transferrin on Mono P". *Protides. Biol. Fluids.* 30/661-665 - (1983).
- 93.- Söderberg, L. Wahlström, L. and Bergström, J. "Fast protein separations - on Mono Q, Mono S and Mono P". *Protides. Biol. Fluids.* 30/635-640 (1983).
- 94.- Stanton, P. G. Hearn M.T. et al Analytical and semi-preparative separation of several pituitary proteins by high performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography* 266/273-279 (1983).

- 95.- Stemmer, F., Loos, M. "Purification and characterization of human, guinea pig and mouse C<sub>1q</sub> by fast protein liquid chromatography (FPLC)" *Journal of Immunological Methods* 74/9-16 (1984).
- 96.- Stenman, U-H., Huhtala, M.L., Leppäluoto, J. et al. "Rapid extraction and separation of plasma B-endorphin by cation-exchange high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.* 297/399-403 (1984).
- 97.- Stenman, U-H., Teramo, K., et al. "Rapid chromatographic quantitation of glycosylated hemoglobins". *Journal of Chromatography* 297/327-332 (1984).
- 98.- Stone-Wolff, D.S., Vilcek, J. "Interrelationships of human interferon-gamma with lymphotoxin and monocyte cytotoxin" *J. Exp. Med.* 159/828-843 - (1984).
- 99.- Tasaka, K., Inagaki, C. "Rapid purification of monoclonal antibody in ascites by high performance ion exchange column chromatography for diminishing non-specific staining". *Acta-Histochem. Cytochem.* 17/283-286 (1984).
- 100.- Tomono, T., Ikeda, H., and Tokunga, E. "High-performance ion-exchange chromatography of plasma proteins" *Journal of Chromatography* 266/39-47 - (1983).
- 101.- Trivelli, L.A. Ranney, H.M. *New Engl. J. Med.* 284 (1971) 353.
- 102.- Tuner, R., Cooper, E.H. and Crocksson, R.A. "Separation of light chains in myelomatosis by fast protein liquid chromatography". *Protides Biol. Fluids* 31/715-718 (1984).
- 103.- Ugelstad, J., Bergström, J. et al. "Monodisperse polymer particles—a step forward for chromatography". *Nature* 303/95-96 (1983).
- 104.- Vita, C., Fontana, A. et al. "Isolation of large peptides derived by cyanogen bromide cleavage of thermolysin using fast protein liquid chromatography (FPLC)". *Int. J. Peptide Protein Res.* 24/104-111 (1984).

- 105.- Wahlström, L., Fredriksson, U-B. et al. "Two dimensional analysis of human sera by chromatofocusing on Mono P followed by fused rocket immunoelectrophoresis". *Protides. Biol. Fluids* 30/653-655 (1983).
- 106.- Welling, G.W., Groen, G. and Welling-Wester, S. "Isolation of Sendai virus F protein by anion-exchange high-performance liquid chromatography in the presence of triton X-100". *Journal of Chromatography* 266/629-632 - (1983).
- 107.- Welling, G.W., Welling-Wester, S. et al. "Isolation of detergent-extracted Sendai virus proteins by gel-filtration, ion-exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography and the effect on immunological activity". *Journal of Chromatography* 297/101-109 (1984).
- 108.- Wolf, M., Cuatrecasas, P. et al. "Protein Kinase C: rapid enzyme purification and substrate-dependence of the diacylglycerol effect". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 122/1268-1275 (1984).
- 109.- Wong, L.T. Hsia, J.C. "High-performance liquid chromatography of proteins: Purification of  $\alpha$ -fetoprotein from fetal calf serum". *J. Chromat. Biomed. Applic.* 310/19-29 (1984).
- 110.- Yoshizaki, K., Kishimoto, T. "Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line". *J. Immunol.* 132/6/2948-2954 (1984).