



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN DE PIROFOSFATASA
CITOPLÁSMICA DE *RHODOBACTER CAPSULATUS*.
DETECCIÓN DEL COFACTOR METÁLICO MEDIANTE
LA TÉCNICA DE EMISIÓN DE RAYOS X INDUCIDA
POR PARTÍCULAS (PIXE)

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N :

ESLAVA ROSAS ÁNGEL FELIPE

MONROY ROSALES JAVIER HORACIO



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

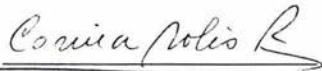
Presidente	Profra. Ernestina Cervera Flores
Vocal	Profr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Profra. Corina Solís Rosales
1er. Suplente	Profr. Eleazar Martínez Barajas
2o. Suplente	Profra. Erika María Ramírez Maya

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Instituto de Física, UNAM

Asesor

Dra. Corina Solís Rosales



Supervisor técnico

Dr. Heliodoro Celis Sandoval

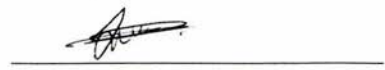


Sustentantes

Eslava Rosas Angel Felipe



Monroy Rosales Javier Horacio



Este trabajo se lo dedicó a la memoria de mí querida abuelita Juanita, gracias por tus cuidados y cariño

A mí mamá, María Isabel por su apoyo y amor, que siempre me motivaron para alcanzar todo lo que me propusiera en la vida

A mí hermano Benjamín, gracias por estar a mi lado

A mí tía América y mi prima Argelia, gracias por su cariño y cuidados que siempre me confesaron

A la familias Rodríguez Rosas y Granados Rosas, por su cariño, en especial a mí primas Ma. Esther, Elvira y Liz por sus consejos y atenciones que tuvieron conmigo

A toda mi familia, quienes creen en mí y me demuestran siempre todo su cariño y apoyo

A mi amigo Javier por compartir este trabajo conmigo, gracias carnal.

A todos mis amigos Nelly, Beatriz, Janet, Cinthya, Tania, José Juan, Jerson, Francisco, Efrén, Armando, Angel, Marco Antonio, por haberme brindado su amistad y haber compartido esos momentos que pasamos juntos que siempre recordare

....Angel Felipe

A Dios, porque en todo momento está conmigo mostrándome al camino de la verdad, la justicia y el amor.

A mi madre Rosa María, por todo el apoyo, cariño y confianza que siempre me ha brindado, por todo el esfuerzo que ha realizado por sacar adelante a nuestra familia, por ser tan noble y buena con las personas y porque siempre estaré orgulloso de ser tu hijo: GRACIAS MAMÁ.

A mis queridos abuelitos Carmelita y Marcos, por todo el cuidado y amor que me brindaron, por la educación que me dieron, por todas las cosas que me enseñaron y por haber sido los abuelitos más maravillosos del mundo.

A mi hermana Lucerito, por ser tan alegre y por todos los momentos felices que he pasado a su lado.

A mi padre Marco Antonio, que siempre tendrá un lugar especial en mi corazón.

A mis tíos, María Dolores y Martín, Carmen y Agustín, Teresa y Miguel, Carmela y Marcos, Luz María y Antonio, Rosario y Julián, porque todos me han enseñado algo y son parte de mi formación como persona.

A mis primos y sobrinos, por todos los momentos que he pasado con ellos y por creer en mí.

A mis padrinos Manolo Bernal e Irma Mena, por sus consejos y su cariño que siempre me brindaron.

A la familia González Ruiz, por haberme brindado su hogar y su apoyo incondicional en todo momento.

A la familia Jiménez Miranda, por el buen trato que me han brindado y por compartir parte de su tiempo conmigo.

A mis amigos del alma Armando, Manuel, Raquel, Ángel, Cinthya, Jerson, Francisco (Pony), José Juan, Nelly, Heréndira, Antonio (Rufo), Marco Antonio (Pastor), Saúl (Paz), Saúl (Yegros), Israel (Cometa), Alejandro (Limón), Juan Carlos (Bataco), Al Amín, Víctor (Wallebotas) y Juan Carlos (Llamas), por todos los momentos y aventuras que pasamos juntos, nunca los olvidaré.

A todas las personas que están más allá de los confines del espacio y el tiempo, pero siempre presentes en mis recuerdos y en mi corazón.

A todas las personas que no he nombrado, pero que han sido parte de mi vida y que han colaborado para bien de mi formación.

A la Justicia, al Honor y a la Libertad, por ser los valores que me inculcó mi familia.

A mi amigo Ángel por compartir este trabajo conmigo, gracias carnal.

Y a ti, Beatriz, por ser la luz de mi alma, la estrella más hermosa del universo que ilumina mi camino en los más oscuros pasajes del tiempo, por librar cada batalla a mi lado y por querer permanecer junto a mí más allá del tiempo.

JAVIER

Agradecimientos

A la Dra. Corina Solís Rosales por asesorarnos en todo momento durante este trabajo, por la confianza y apoyo incondicional que nos brindó, gracias por creer en nosotros.

Al Dr. Heliodoro Celis Sandoval, en especial, por los consejos y apoyo brindados que fueron vitales para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Irma Romero por sus consejos y observaciones hechas a este trabajo.

A la M. en C. Silvia Escobedo por su colaboración durante el este proyecto.

A los miembros de nuestro jurado por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por las valiosas observaciones que hicieron para mejorarlo.

A Karim López y Francisco Jaimes por su dedicación, eficiencia y por toda la ayuda brindada durante el análisis de las muestras en el Peletrón.

A las secretarías Guadalupe Zarza y María Teresa Cázares por el apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo.

A DGAPA UNAM (proyecto IN228603-3) por las becas otorgadas para la realización de este trabajo.

A los Institutos de Física y de Fisiología Celular de la UNAM por todos los recursos y facilidades brindados para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Objetivos	5
2.2. Hipótesis	5
3. ANTECEDENTES	6
3.1. Purificación de proteínas	6
3.1.1. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio	6
3.1.2. Diálisis	7
3.1.3. Cromatografía	7
3.1.4. Electroforesis	9
3.2. Enzimas	10
3.2.1. Características generales de las enzimas	10
3.2.2. Medida de la actividad enzimática	12
3.2.3. Pirofosfatasas	12
3.3. Características generales de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	13
3.4. Fundamentos de PIXE	14
3.4.1. Interacción de partículas cargadas con la materia	14
3.4.2. El acelerador de partículas	18
3.4.3. Detectores de radiación	20
3.4.4. Análisis de espectros	22
3.4.5. Origen de la radiación de fondo en los espectros de rayos X (Bremsstrahlung) ...	22
3.4.6. Preparación del blanco	23
3.4.7. Ventajas y limitaciones de PIXE	23
3.4.8. Campo de aplicación	24
3.4.9. Otros métodos analíticos	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Cultivo de bacterias	26
4.1.1. Medio de cultivo	26
4.1.2. Siembra y cosecha de bacterias	27
4.2. Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	27
4.3. Determinación de la cantidad de proteína	30
4.4. Actividad en tubo de pirofosfatasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	30
4.5. Geles de poliacrilamida	31
4.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	31
4.5.2. Actividad en gel de pirofosfatasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	32
4.5.3. Geles de calibración de elementos metálicos	33
4.5.4. Geles con enzima para PIXE	34
4.6. Muestras de pirofosfatasa en filtros de teflón (PVDF) para PIXE	34
4.7. Bandas de la enzima obtenida por PAGE en filtros de teflón	35
4.8. Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE)	37
4.8.1. Análisis mediante PIXE	37
4.8.2. Cuantificación de los metales asociados a una proteína	38

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1. Espectro UV-visible de bacterias de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	40
5.2. Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	41
5.2.1. Determinación de proteína y actividad en tubo para el extracto crudo y la muestra dializada	41
5.2.2. Actividad en gel para el extracto crudo y la muestra dializada	43
5.2.3. Determinación de proteína y actividad en tubo para las muestras de la columna de Sephacryl s-200	44
5.2.4. Actividad en gel para la fracción conjunta de Sephacryl s-200	45
5.2.5. Determinación de proteína y actividad en tubo para las muestras de la columna de DEAE-Biogel	46
5.2.6. Actividad en gel para las fracciones conjuntas de DEAE-Biogel	49
5.3. Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i> utilizando inhibidores de proteasas	50
5.4. Porcentaje de pirofosfatasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i> en la muestra purificada	57
5.5. Geles de calibración	58
5.6. Análisis de cianocobalamina (vitamina B-12) mediante PIXE	59
5.7. Análisis de PPasa citoplásmica de <i>Rhodobacter capsulatus</i> mediante PIXE	61
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA	69
8. ÍNDICE DE FIGURAS	72

ABREVIATURAS

AAS : Espectroscopía de absorción atómica

AEM : Microscopía electrónica analítica

ASB : Albúmina sérica de bovino

Bremsstrahlung : Radiación de fondo

EDTA : ácido etilendiaminotetraacético

KeV : Kilo electronvoltios

MeV : Mega electronvoltios

MOPS : Ácido 3-n-morfolino-propanosulfónico

MV : Megavolts

PAGE : Electroforesis en geles de poliacrilamida

Pi : Fosfato

PIXE : Emisión de rayos X inducida por partículas

PPasa : Pirofosfatasa

PMSF : Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPi : Pirofosfato

PVDF : Fluoruro de polivinilideno

SDS : Dodecil sulfato de sodio

Si(Li) : Silicio-litio

SOD : Súper óxido dismutasa

TCA : Ácido tricloroacético

TPCK : N-Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

TEMED: N,N-tetrametilendiamina

Ultra-LEGe : Ultra puro de germanio

XRF : Fluorescencia de rayos X

1. RESUMEN

La pirofosfatasa (PPasa) citoplásmica es una enzima que se encuentra en todos los organismos, desde las bacterias hasta el hombre, e hidroliza el pirofosfato (PPi) generado durante los procesos celulares. Se ha observado que esta enzima requiere para funcionar cationes divalentes, cuya estequiometría no ha sido reportada. En el presente trabajo se purificó la pirofosfatasa citoplásmica homodimérica de *Rhodobacter capsulatus* utilizando técnicas como la precipitación con sulfato de amonio, diálisis y cromatografía en columna (exclusión molecular e intercambio iónico) para su utilización en este estudio.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es una herramienta efectiva para separar y analizar enzimas. Se utilizó PAGE a fin de separar e identificar a la enzima en estudio.

La técnica de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) es una técnica que permite la detección de una gran cantidad de elementos a muy bajas concentraciones. Una combinación entre las técnicas PIXE y PAGE es capaz de brindar una información significativa sobre el tipo de cofactor metálico asociado a la enzima en estudio y su estequiometría.

La actividad específica de la enzima se vio beneficiada al utilizar cationes divalentes. La enzima fue purificada por las técnicas antes mencionadas hasta obtener un gel PAGE teñido con plata que presentó aproximadamente ocho bandas, de las cuales cuatro correspondían a la enzima (bandas de actividad) y representan el 60% del total en términos de la superficie de las bandas.

Para la detección y cuantificación del cofactor metálico asociado a la pirofosfatasa citoplásmica se realizaron diferentes estrategias para su análisis mediante PIXE: a) Barrido de geles PAGE; b) Enzima purificada y depositada en filtros de teflón (PVDF); c) Bandas de la enzima obtenidas por PAGE y depositadas en filtros de teflón (PVDF).

En primer lugar las bandas de actividad fueron analizadas mediante un barrido con PIXE en geles conteniendo diferentes cantidades de pirofosfatasa. Los datos obtenidos fueron analizados y se obtuvo una estequiometría de aproximadamente tres cobaltos por enzima.

A fin de determinar si el metal asociado a la enzima podía analizarse por PIXE omitiendo el empleo de PAGE, se analizó la enzima en filtros de teflón (PVDF) después de haber sido purificada y dializada para eliminar el cobalto del buffer que la contenía. En este caso, los datos mostraron la misma estequiometría.

Por último se analizaron las bandas de actividad obtenidas mediante PAGE mediante PIXE depositadas en filtros de teflón (PVDF), arrojando una estequiometría de aproximadamente cuatro cobaltos por enzima, lo cual puede asociarse a que la extracción de la enzima embebida en el gel no fue adecuada o completa.

A manera de conclusión, se propone que el cofactor metálico de la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* es el cobalto y que la estequiometría es aproximadamente de tres cobaltos por enzima, siendo esta la primera vez que se reporta este valor.

2. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que disminuyen la barrera denominada energía de activación y, por tanto, facilitan el progreso de una reacción. Las enzimas tienen el poder de catalizar, determinados procesos bioquímicos. El rasgo particular de las enzimas es que pueden catalizar procesos químicos a baja temperatura, compatible con la propia vida, sin el empleo de sustancias perjudiciales para los tejidos [4].

Desde el punto de vista químico, las enzimas están formadas de carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N) y ocasionalmente azufre (S) u otros elementos menores; tienen peso molecular elevado y propiedades catalíticas específicas. Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteínica que regulan la velocidad a la cual se realizan los procesos fisiológicos producidos por los organismos vivos. A diferencia de un catalizador inorgánico que puede catalizar numerosas reacciones, las enzimas producidas por los organismos vivos habitualmente catalizan un tipo de reacción; la especificidad de las enzimas es tan marcada que en general actúan exclusivamente sobre sustancias que tienen una estructura y configuración química precisa [16].

La habilidad catalítica de las enzimas depende de la facilidad con la que se pongan en contacto las sustancias reaccionantes para dar el producto o los productos de la reacción. Esto implica que el sistema enzimático adquiera una conformación especial, es decir, una disposición adecuada de los grupos funcionales (aminoácidos de la enzima y grupos prostéticos, cuando existen éstos) y de las moléculas mismas de los sustratos que se unirán a aquellos y permitirán que se lleve a cabo la reacción [15].

Dentro de las biomoléculas, las metaloproteínas son un subgrupo de enzimas de gran importancia para los organismos vivos. Estas proteínas están implicadas en numerosas reacciones metabólicas de las bacterias, plantas y animales. [27]

Las metaloproteínas contienen algunos metales que juegan un papel importante en la función fisiológica y en la catálisis enzimática en los organismos vivos. Como elementos estructurales confieren estabilidad a las proteínas, ejemplos conocidos son la hemoglobina y la mioglobina. Estas proteínas contienen hierro y son responsables del transporte de oxígeno en sangre y músculo, respectivamente [24]. El estudio de los metales asociados a proteínas permite conocer la estructura o funcionalidad de la proteína y ayudar a elucidar su estructura tridimensional, así como el mecanismo de reacción enzimática. Uno de los principales problemas en el estudio del papel de los metales en las proteínas es su cuantificación y localización debido a las bajas cantidades involucradas, que usualmente se encuentran bajo los límites de detección de técnicas analíticas convencionales [21]. Nuevos métodos físicos con límites de detección cada vez más bajos se han venido aplicando en tiempos recientes con el fin de resolver los problemas mencionados [24].

La PPasa citoplásmica es una enzima que se encuentra en todos los organismos, desde las bacterias hasta el hombre; la pirofosfatasa hidroliza el PPi generado durante los procesos celulares y se ha observado que requiere cationes divalentes, tanto para formar el sustrato (pirofosfato-metal) como para dar estabilidad estructural [30]. En el presente trabajo se realizó el estudio del metal asociado a la PPasa citoplásmica de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* por medio de las siguientes técnicas:

- La *electroforesis*, que es una importante técnica para la separación de proteínas basada en la migración de proteínas cargadas en un campo eléctrico [6]. PAGE es una herramienta muy poderosa y sensible para separar y analizar macromoléculas biológicas [27].
- PIXE, que es una técnica multielemental de gran sensibilidad y no destructiva de la muestra. Esta técnica es usada actualmente de forma rutinaria por geólogos, arqueólogos y bioquímicos [31].

Una combinación entre las técnicas PIXE y PAGE es capaz de brindar una información significativa sobre el tipo de metal (cofactor metálico) y su estequiometría para casos específicos como lo son las metaloproteínas y metaloenzimas.

La purificación de la proteína es algo primordial para su estudio. Para el análisis den PIXE es muy importante tener a la enzima lo más pura posible, por lo que las diferentes técnicas de purificación de proteínas serán de gran utilidad para este fin.

2.1. Objetivos

Los principales objetivos de este trabajo son:

- 1) Extraer y purificar la enzima pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* utilizando técnicas convencionales de purificación de proteínas.
- 2) Detectar el cofactor metálico asociado a la enzima mediante la técnica de Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE).
- 3) Proponer una estequiometría para el cofactor metálico asociado a la enzima

2.2. Hipótesis

Una combinación de las técnicas PIXE y PAGE es una herramienta que permite la detección y cuantificación de elementos metálicos asociados a biomoléculas, como las enzimas.

3. ANTECEDENTES

3.1. Purificación de Proteínas

Una parte fundamental en la mayoría de las investigaciones bioquímicas es la purificación de los materiales que se pretendan estudiar ya que si se desean caracterizar adecuadamente deben hallarse relativamente libres de contaminantes [26]. El objetivo de la purificación de una proteína o de una enzima es aislarla del conjunto de sustancias presentes en el fluido biológico del cual forma parte la macromolécula de interés. Para lograr dicho objetivo se aprovechan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas tales como son el tamaño, la solubilidad, la carga y/o la afinidad por ciertos ligandos, incluidos los llamados anticuerpos. Una combinación de técnicas de purificación de proteínas, las cuales aprovechan una o más de las propiedades antes mencionadas, puede lograr una purificación aceptable de una proteína para poder realizar estudios acerca de ella. [8]. En las siguientes secciones se explicaran brevemente las técnicas de purificación de proteínas relacionadas con este trabajo.

3.1.1. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio

La solubilidad de una proteína es afectada por la concentración de sales como tiocianatos, nitratos o sulfatos. La fuerza iónica ($I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$) es un parámetro útil para estudiar los efectos de las cargas iónicas. A una elevada fuerza iónica, la solubilidad de las proteínas disminuye; este fenómeno es conocido como *precipitación por salado (salting out)* y se debe básicamente a la competencia entre los iones de sal adicionados y las proteínas solvatadas por las moléculas de agua [26].

La precipitación con sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ se utiliza de manera rutinaria como primer paso en una separación de proteínas, pero también se utiliza en etapas de purificaciones avanzadas para

concentrar una proteína que se encuentre diluida [8]. La solubilidad del sulfato de amonio es de 4M, aproximadamente, y varía poco en un rango de temperatura de 0-30°C. Una importante ventaja de la precipitación con sulfato de amonio, es que en una suspensión de 2-3M de esta sal muchas proteínas precipitadas son estables durante años [20].

3.1.2. Diálisis

Las proteínas pueden separarse de moléculas de menor tamaño utilizando una membrana semipermeable, procedimiento llamado diálisis. Las moléculas cuyo tamaño sea mayor que el poro de la membrana utilizado, no podrán atravesarla [22]. En la diálisis, una muestra de proteínas y otras sustancias contaminantes es colocada dentro de una bolsa de membrana semipermeable. Cuando la membrana y su contenido sean suspendidos en una cantidad apropiada de buffer de una adecuada fuerza iónica, se producirá el intercambio de moléculas (más pequeñas que el tamaño de poro de la membrana) hacia el exterior y de buffer al interior. La diálisis puede ser ocupada, por ejemplo, para remover el sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ remanente de una preparación de proteína [6].

3.1.3. Cromatografía

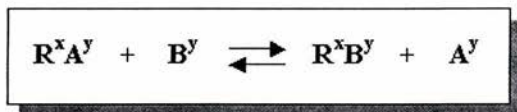
Los métodos más prácticos para el fraccionamiento de proteínas son los cromatográficos, las cuáles utilizan la carga, el tamaño, afinidad de enlace y otras propiedades para separar a las proteínas [6].

En la cromatografía, una mezcla de sustancias se disuelve en un líquido o fluido gaseoso conocido como fase móvil. La solución resultante se pasa por una columna que contiene una matriz sólida porosa conocida como fase estacionaria. La interacción de los solutos con la fase estacionaria retarda su

progreso a través de la matriz de acuerdo a las propiedades de los solutos. Esto causa una diferencia de migración la que produce la separación de los componentes de la mezcla. Los componentes pueden ser recolectados en fracciones para su análisis [26].

La *cromatografía de exclusión molecular*, conocida también como filtración en gel, separa proteínas de acuerdo con su tamaño. La matriz de la columna es un polímero hidratado que proporciona un tamaño de poro determinado [6]. Proteínas de gran tamaño no pueden entrar en los poros formados por el polímero por lo que sólo pueden deslizarse fuera de ellos. Proteínas de tamaño pequeño pueden entrar en los poros del polímero y estar más en contacto con ellos que con la solución en la que se encuentra el polímero. De acuerdo con lo anterior, las proteínas de gran tamaño pasaran de una manera más directa a través de la columna y las proteínas de tamaño pequeño tendrán un camino más largo que recorrer [2].

En la *cromatografía de intercambio iónico*, las proteínas se separan según su carga eléctrica neta. Los iones son unidos electrostáticamente a una matriz inerte y son reemplazados por iones en solución. Con la siguiente ecuación se ejemplifica el funcionamiento general de una columna de intercambio iónico.



Aquí R^xA^y es el intercambiador iónico y las formas A^y y B^y representan los iones en solución. Existen cromatografías de intercambio catiónico y de intercambio aniónico y ambas son de tipo reversibles [26]. Para separar proteínas cargadas negativamente se utilizan columnas intercambio aniónico debido a que las partículas de esta columna están cargadas positivamente. Para separar proteínas cargadas positivamente se utilizan columnas intercambio catiónico debido a que las partículas

de este tipo de columna están cargadas negativamente. Las proteínas pueden ser eluidas utilizando iones que desplacen a la proteína del intercambiador iónico. Para eluir las proteínas se puede utilizar un gradiente de cloruro de sodio o se puede alterar el pH de las soluciones amortiguadoras, este último afecta directamente a la carga neta de las proteínas [8].

3.1.4. Electroforesis

Otra importante técnica para la separación de proteínas está basada en la migración de proteínas cargadas en un campo eléctrico, un proceso llamado *electroforesis* (del griego *electro* que significa electrón y *phoresis* que quiere decir traslación) [19]. La migración de una proteína en este proceso depende del campo eléctrico, la carga de la molécula, su tamaño, forma y de la viscosidad de la solución. De acuerdo con lo anterior la velocidad de migración depende de la fuerza eléctrica (determinada por el campo eléctrico y la carga de la molécula) y el coeficiente de fricción, el que depende de la masa y forma de la molécula así como de la viscosidad del medio [26]. Esta técnica es usada generalmente como un método analítico. Dentro de sus ventajas están que las proteínas pueden ser visualizadas y separadas, permitiendo estimar rápidamente el número de diferentes proteínas en una mezcla o el grado de pureza de una proteína separada en particular [6].

La electroforesis en gel es una de las técnicas más usadas para la separación de macromoléculas. Los geles más utilizados son el de poliacrilamida y el de agarosa, los cuales forman poros de diferentes tamaños. Por lo anterior, la separación de proteínas en la electroforesis en gel esta basada, tanto en la exclusión molecular como en la velocidad de migración. La *electroforesis en geles de poliacrilamida* (PAGE) es una herramienta muy poderosa y sensible para separar y analizar macromoléculas biológicas [27], el gel se forma a partir de la polimerización de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida y el tamaño de poro dependerá de la concentración de estos [26].

La técnica conocida como SDS-PAGE puede separar las proteínas de acuerdo con sus masas moleculares. En esta técnica, una mezcla proteica es puesta en contacto con el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual es capaz de romper interacciones no covalentes de las proteínas y con β -mercaptoetanol o ditioneitol para reducir los puentes disulfuro [22]. El objetivo de la SDS-PAGE es proporcionar una relación similar de carga/masa en todas las proteínas para que difieran sólo en su peso molecular. El SDS se enlaza a todas las proteínas (aproximadamente un SDS por cada dos aminoácidos) enmascarando la carga neta de éstas y confiriéndole una carga negativa. Por lo tanto, las proteínas tratadas de esta manera asumen una forma pseudomicelar uniforme y un grado de carga-masa semejante. Al utilizar la SDS-PAGE, las proteínas serán separadas por el campo eléctrico de acuerdo con su peso molecular.

3.2. Enzimas

3.2.1. Características generales de las enzimas

Cada célula y cada tejido tienen su actividad propia, lo que trae consigo cambios continuos en su estado bioquímico, la base del cual son las enzimas, que tienen el poder de catalizar reacciones químicas para facilitar y agilizar determinados procesos sintéticos y degradativos. [16]. Con frecuencia existen múltiples formas moleculares de una enzima, a las que se denomina *isoenzimas*. Son enzimas con actividad catalítica que favorecen la misma reacción, pero que pueden distinguirse por alguna característica física, estructural o inmunológica. Un ejemplo es la deshidrogenasa láctica, el estudio electroforético de esta enzima muestra que la actividad está distribuida en cinco bandas diferentes [6].

Las enzimas son capaces de catalizar una amplia gama de reacciones químicas utilizando sólo sus grupos funcionales. Sin embargo muchas enzimas requieren de *cofactores* que se encuentren asociados a éstas para que sean activas [26].

Las coenzimas son un cofactor enzimático y se definen como moléculas orgánicas termoestables de peso molecular bajo. La mayor parte de las coenzimas se unen a las enzimas por enlaces no covalentes. Las que forman enlaces covalentes con las enzimas se denominan *grupos prostéticos* [6].

Los iones metálicos también son un cofactor importante para la actividad catalítica de la enzima. Destacan entre ellos los siguientes: K^{1+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{1+} , Cu^{2+} .

Los metales como el hierro (Fe) y el cobre (Cu) actúan a menudo como transportadores de electrones formando parte integral de un grupo prostético. Algunos aniones también son necesarios para la actividad de ciertas enzimas; por ejemplo, el cloruro (Cl^-), que puede sustituirse por el bromuro (Br^-), para la amilasa salival; o el propio radical fosfato que se requiere en reacciones de fosforilación.

Una *holoenzima* es el complejo enzima-cofactor y presenta actividad catalítica. Se le da el nombre de apoenzima cuando se separa el cofactor de una holoenzima; como consecuencia de la pérdida del cofactor la apoenzima es inactiva [26].

La estructura que permite la combinación con el sustrato y que confiere propiedades enzimáticas a la molécula se denomina *sitio activo*. El sitio activo esta formado por la contribución de grupos funcionales de aminoácidos situados en distintas cadenas o en diferentes lugares de la misma cadena polipeptídica, además del cofactor enzimático si se requiere. El concepto de arreglo tridimensional adecuado de los aminoácidos que forman la cadena polipeptídica de la enzima para lograr la actividad funcional correcta permite entender numerosos fenómenos: la necesidad de que la molécula proteica íntegra esté conservada en su forma, el hecho de que la desnaturalización de la enzima conduzca a la pérdida de la actividad y que al calentar una enzima con su sustrato se reduzca la tasa de desnaturalización que de otra forma se produciría [6].

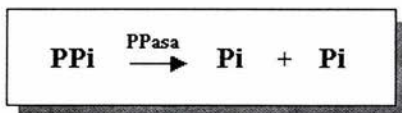
3.2.2. Medida de la actividad enzimática

Las enzimas se estudian mediante el seguimiento de la actividad de la reacción que catalizan, aceptando que dicha actividad es proporcional a la cantidad de enzima presente. Como la actividad de una enzima sólo rara vez se puede expresar con relación a su peso absoluto o a su concentración, lo habitual es expresarla en unidades fijadas de modo convencional con relación a la proteína presente en la preparación a lo que se denomina actividad específica. La unidad enzimática utilizada en el presente trabajo fue $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

La actividad enzimática se mide por la desaparición del sustrato o la aparición de alguno de los productos de la reacción, siguiendo dichos cambios en el tiempo. La actividad puede expresarse, una vez determinada la reacción, en relación con el tiempo empleado por la enzima para producir un cambio determinado; mientras mayor sea el tiempo, la actividad de la enzima es menor [4].

3.2.3. Pirofosfatasas

La PPasa citoplásmica es una enzima que cataliza la hidrólisis PPi de acuerdo con la siguiente reacción:



Existen dos tipos de pirofosfatasa en la célula, una citoplásmica y otra membranal. La citoplásmica sólo hidroliza PPi, mientras que la membranal sintetiza e hidroliza PPi [18].

La PPasa se subdivide en dos familias: PPasa I, como las encontradas en *Escherichia coli*, levaduras, plantas o en humanos, y una familia menos común, PPasa II, encontrada recientemente en una variedad de especies bacterianas y de arqueas. La familia PPasa II, como las encontradas en *Rhodobacter capsulatus* es una enzima homodimérica formada por subunidades más grandes que la familia bacteriana PPasa I. Se ha notado que el requisito de Mn^{2+} en vez de Mg^{2+} es necesario para la actividad óptima de la familia II [30]. La pirofosfatasa de *Rhodobacter capsulatus* se estabiliza y favorece su actividad por iones divalentes metálicos tales como el Mg^{2+} , Co^{2+} o Mn^{2+} [13].

Se ha determinado la estructura primaria en más de una docena de PPasas y se observa que la homología en la secuencia varía considerablemente; sin embargo, se conservan una docena y media de aminoácidos en la cavidad del sitio activo [1].

3.3. Características generales de *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus es una bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa que presenta desde una forma ovoidea hasta una forma de bastones y posee un diámetro de entre 0.5-1.2 μ m y entre 2.0-2.5 μ m de longitud, o algunas veces, más largas. El espectro de absorción al UV-visible de estas células muestra un máximo a valores de 376-378, 450-455, 478-480, 508-513, 590-592, 802-805, y 860-863nm. Estos máximos son debidos a la presencia de bacterioclorofilas a y b, así como de carotenoides típicos de este tipo de bacterias: licopeno, espiriloxantina, OH-esferoidenona y oquenona. Medios cultivados anaeróbicamente en la luz son de color amarillo-café hasta el café intenso y, en algunas ocasiones, de color verdoso. Cuando los medios son cultivados en la presencia de oxígeno, toman un color rojo hasta el púrpura-rojo. El crecimiento ocurre a un pH de entre 6.5-7.5 (pH óptimo de 7.0); la temperatura óptima de crecimiento está entre 30-35°C [9]. Algunas otras características se mencionan en la tabla 3-1.

TABLA 3-1. Características de *Rhodobacter capsulatus*

Diámetro celular (μm)	0.5-1.2
Movilidad	positiva
Requerimiento de NaCl	negativo
Crecimiento sobre atmósfera de H_2/CO_2	excelente
Crecimiento aeróbico sin luz	positivo
Factores de crecimiento requeridos	tiamina

Rhodobacter capsulatus está clasificada de la siguiente manera [9]:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Bacterias Púrpuras
Subdivisión:	Alfa
Género:	Rhodobacter
Especie:	capsulatus

3.4. Fundamentos de PIXE

3.4.1. Interacción de partículas cargadas con la materia

Los métodos de análisis nuclear hacen uso de las numerosas interacciones que pueden ocurrir cuando un haz de partículas se impacta sobre un blanco. Pueden ocurrir procesos atómicos inelásticos ó colisiones nucleares elásticas e inelásticas. Núcleos ligeros con una masa en el rango de 1-4 (desde los protones hasta las partículas alfa) son mayoritariamente empleadas, cada una de ellas dependiendo del interés particular para aplicaciones específicas. La energía de estas partículas oscila en un rango de entre 0.5 y 4 Mega electronvoltios (MeV). La mayoría de reacciones útiles en aplicaciones analíticas toman lugar en el rango de esta energía. A más baja energía la probabilidad de interacción viene a ser mucho más débil para producir una señal, susceptible de ser realmente explotada y paradójicamente el

análisis es más destructivo. Por encima de 4 MeV, otros fenómenos nucleares pueden inducir alguna señal de fondo extra y consecuentemente dar datos de dudosa interpretación [5].

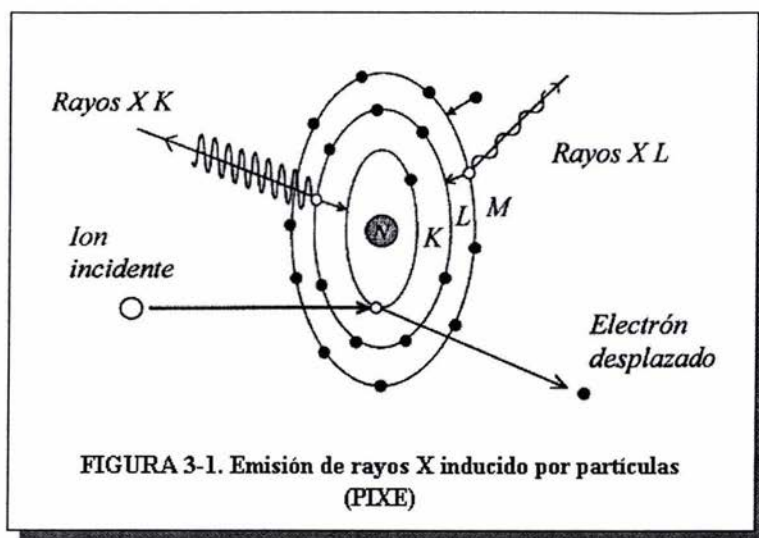
En el campo de la física nuclear, la probabilidad para una reacción nuclear u otra clase de interacción se expresa en términos de sección eficaz. La sección eficaz representa el área de un disco hipotético asociado con cada núcleo. Esta área es calculada en una vía en la cuál la reacción toma lugar con una probabilidad de 100% si la partícula incidente cruza ésta superficie. La sección eficaz (σ) es numéricamente igual a la velocidad de reacción (número de eventos por segundo, N_{ev}) calculados para un núcleo colocado en un flujo (ϕ) de partículas incidentes, donde ϕ es expresado en partículas / $cm^2 \cdot s$. Por ejemplo, a una mono capa de carbón elemental representa un número N de 10^{15} átomos / cm^2 . se le aplica un flujo incidente de 10^{10} partículas / $cm^2 \cdot s$ (1.6nA para iones monocargados) y asumimos una sección eficaz $\sigma = 1b$ (b es conocido como *barn*, donde $1b = 10^{-24}cm^2$) el número de eventos por segundo (N_{ev}) es de 10 eventos / s y ésta dado por la siguiente relación:

$$N_{ev} = N \sigma \phi$$

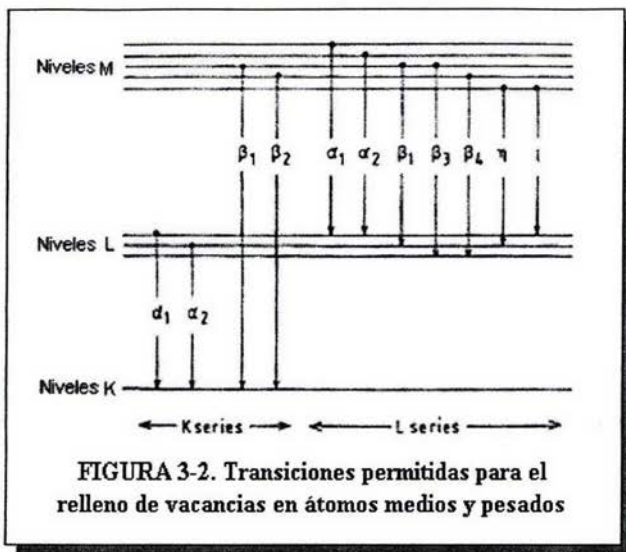
La clave de la identidad de un elemento es la carga de su núcleo, la cuál determina el número de sus electrones atómicos y, por tanto, sus propiedades físicas y químicas. Los electrones de las capas que se encuentran cerca del núcleo proporcionan información muy valiosa acerca de los átomos de los elementos estudiados y, por ende, de la muestra que forman parte [7].

Las partículas que pueden penetrar la materia pueden inducir muchos efectos. Uno de estos es la excitación de los electrones en las capas de los átomos. Si la energía transferida es suficiente, se puede crear una vacante en las capas internas electrónicas K o L. Las vacantes pueden ser llenadas por los electrones de las capas más externas. El exceso de energía puede ser liberado directamente por una emisión de rayos X, o transferido hacia un electrón periférico el cuál es subsecuentemente expulsado.

El primer fenómeno se conoce como PIXE y se muestra en la figura 3-1. El último fenómeno, en el que no hay emisión de radiación, es conocido como la emisión Auger [5].

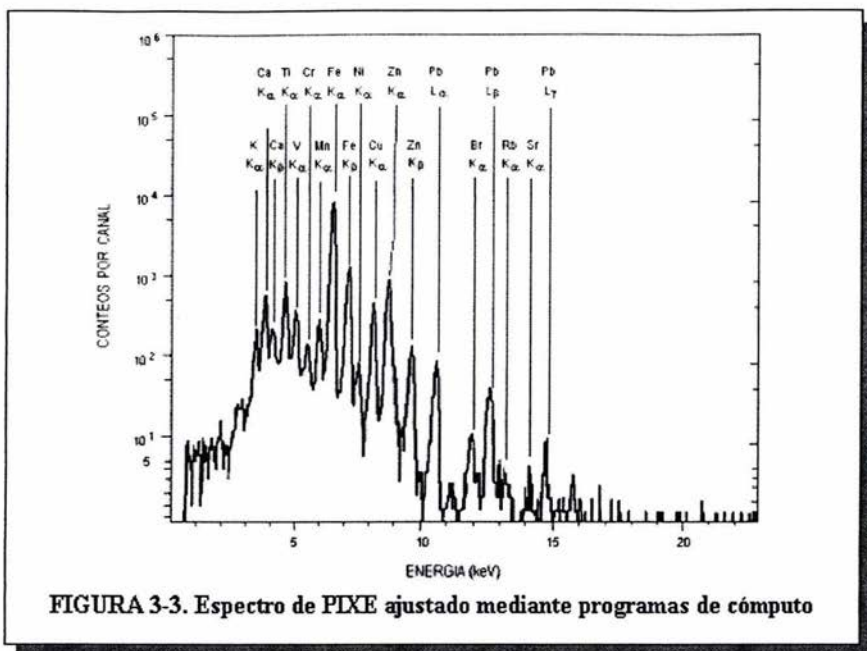


En la técnica de PIXE, se usa un haz de partículas cargadas (protones, partículas α o iones pesados) que se hace incidir sobre una muestra con el fin de expulsar electrones de las capas cercanas al núcleo. Para propósitos analíticos mediante PIXE generalmente se utilizan haces de protones [17]. El bombardeo con los iones de suficiente energía (generalmente protones del orden entre 1 y 4 MeV de energía) producidos por un acelerador de partículas, causará la ionización de los electrones de la capa interna de átomos en un espécimen. Los electrones de capas más externas pasan a ocupar la vacante creada en las órbitas emitiendo rayos X característicos de cada átomo (ver figura 3-1). El relleno de las vacantes, de acuerdo con la teoría cuántica, en la que sólo algunas transiciones entre niveles están permitidas, se produce según se muestra en la figura 3-2.



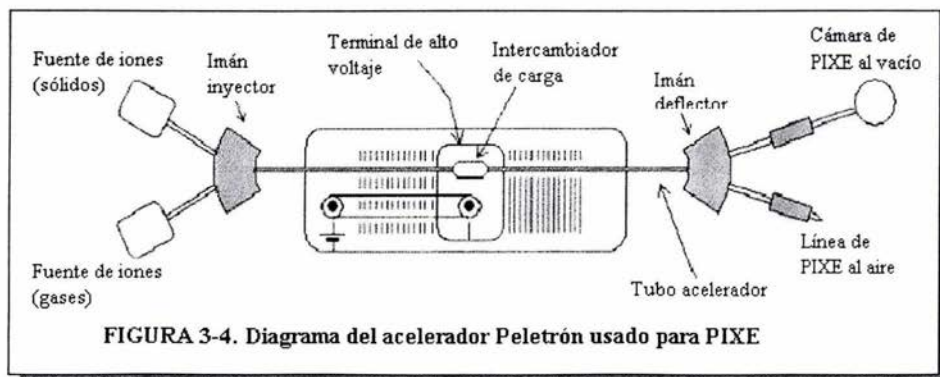
Las transiciones hasta la capa K se denominan K_α cuando provienen de la capa L y K_β cuando provienen de la capa M. Las transiciones hasta la capa L se denotan como L_α , L_β , etc. y tiene muchas componentes [10].

Los rayos X característicos dados por las bandas K_α , K_β , L_α y L_β son funciones únicas del número atómico del átomo emisor. Las bandas K_α y K_β para elementos desde el litio hasta el uranio cubren un rango de energía de 0.1-110 kilo electronvoltios (KeV), mientras que el rango de energía de las bandas L_α , L_β y L_γ para elementos desde el zinc hasta el uranio está entre 1-21.5 KeV. Tanto las bandas K y L pueden ser usadas para detectar cualquier elemento presente en una muestra [14]. Un ejemplo típico de un espectro de PIXE ajustado mediante programas de cómputo se muestra en la figura 3-3. Está compuesto fundamentalmente por las líneas K_α y K_β de los elementos ligeros y medios y las líneas L de los elementos pesados.



3.4.2. El acelerador de partículas

El acelerador con que cuenta el Instituto de Física es una máquina electrostática, Peletrón 9SDH-2, con una tensión de terminal máxima de 3 Megavolts (MV). La figura 3-4 muestra un diagrama del acelerador Peletrón.



El acelerador electrostático, de tipo tándem, es decir, que la aceleración de los iones se realiza en dos etapas. La fuente de iones (sólidos) suministra iones de hidrógeno cargados negativamente (H^-) que son inyectados en el extremo de la primera etapa (imán inyector). Desde el punto de inyección hasta la terminal de alto voltaje hay un “tubo acelerador” que permite a todos los iones negativos ser conducidos de este tubo al vacío hacia la terminal, acelerándose gradualmente hasta adquirir finalmente la energía correspondiente al potencial de la terminal. Así, si la terminal se opera a un voltaje de 2MV, los iones al llegar a ella tendrán una energía de 2MeV. Al llegar a la zona de la terminal los iones atraviesan una cámara con gas nitrógeno, que arranca electrones a los iones H^- , obteniéndose un haz de protones (H^+). En el momento en que protones salen del interior de la terminal de alto voltaje, por un nuevo tubo acelerador que los conduce siguiendo una línea recta hacia el exterior de la máquina, en lugar de ser atraídos por el potencial positivo, serán repelidos y nuevamente acelerados alejándose de la terminal. Por lo que se hace necesario un campo magnético (imán deflector), que permite inyectar los iones deseados (H^+ en nuestro caso) en la línea de investigación correspondiente. La principal ventaja de los aceleradores tipo tándem es su versatilidad, debida a que las fuentes de iones se encuentran fuera de la terminal de alta tensión y del tanque que contiene el tubo acelerador [33]. Esto permite un fácil acceso a las mismas, con lo que resulta posible operar rápida y cómodamente con haces de iones correspondientes prácticamente a cualquier elemento del sistema periódico.

En los experimentos de PIXE un haz de protones incide sobre la muestra, la cual se coloca en un porta-muestras en el interior de una cámara de vacío. La interacción de los protones con la muestra induce la emisión de rayos X. Estos rayos X son detectados por uno o más detectores situados a un cierto ángulo con respecto a la normal de la superficie de la muestra [10].

3.4.3. Detectores de radiación

Para los análisis de PIXE, se necesita ante todo una buena resolución de energía por lo que la opción más conveniente son los detectores semiconductores de silicio-litio [Si(Li)] o ultra puro de germanio (Ultra-LEGe).

Los rayos X emitidos durante el decaimiento electrónico (las líneas K en los elementos ligeros y las L en los más pesados), pueden detectarse mediante detectores de barrera de estado sólido de alta resolución del tipo Si(Li) o Ultra-LEGe, lo que permite identificar los elementos presentes en la muestra, incluso cuando se dispone de concentraciones muy pequeñas de material a analizar, y deducir las concentraciones de los mismos a partir de la intensidad de los rayos X [32].

El silicio (Si) y el germanio (Ge) forman estructuras cristalinas muy regulares en los que los 4 electrones de la última capa se unen por covalencia. Cuando se les agrega una impureza con 5 electrones de valencia (fósforo (P) o arsénico (As)) o 1 electrón de valencia (litio (Li)), se rompe la regularidad del cristal por un electrón en exceso. Las impurezas se llaman donadores de electrones y a los cristales se les designa con la letra "n". Del mismo modo, si se agregan impurezas con 3 electrones de valencia (boro (B) u oro (Au)), quedará una vacante que rompe la regularidad del cristal. Estos cristales son designados como del tipo "p". Cuando un material tipo p se pone en contacto con un material tipo n, los electrones libres del tipo n se recombinan con los huecos del tipo p formando una juntura o zona libre de cargas. Cuando la radiación incide en esta zona, provoca un par electrón-hueco. Los electrones fluyen en una dirección y los huecos en otra y se colectan en electrodos. El número total de cargas colectadas es proporcional a la energía de la radiación incidente.

En el caso de espectroscopía de rayos X o γ es necesario tener un área efectiva mayor que la juntura que normalmente se logra. Como es complicado producir materiales con un nivel muy bajo de impurezas, para favorecer las características del material puro, se hace un proceso de compensación

con litio. El litio se difunde en el material original tipo p hasta lograr un balance entre el material tipo p y el tipo n. Cuando el proceso de difusión se completa, a lo largo de casi todo el volumen se forma un material con propiedades similares a las intrínsecas del material puro.

La principal desventaja de este tipo de detectores reside en que la distribución de litio a temperatura ambiente resulta sumamente inestable, por lo que estos detectores se deben almacenar y operar a bajas temperaturas (normalmente a la temperatura de nitrógeno líquido, 77K). Este enfriamiento contribuye además a la disminución de los pares electrón-hueco en el cristal. Aunque este proceso de compensación con Li, es ampliamente usado en la fabricación de detectores de Si(Li), ya no es necesario para los detectores de Ge, debido a que se obtienen cristales de germanio suficientemente puros.

El detector de Si(Li) presenta una configuración denominada p-i-n. Está compuesto de una zona semiconductor de tipo p (con predominio de impurezas aceptoras de electrones), la zona de tipo i compensado (con un número similar de impurezas aceptoras y donadoras de electrones que se comporta como un material sin impurezas) y la zona n (con predominio de impurezas donadoras de electrones). Se fabrica partiendo de un cristal tipo p al interior del cuál se difunde Li. Los átomos de Li se comportan como impurezas donadoras, por pasar el electrón libre al ionizar un átomo de litio a la banda de conducción. El electrón secundario producido cuando un átomo de Si es excitado por un rayo X, produce una ionización, creando pares electrón-hueco que son colectados por la acción de una diferencia de potencial previamente establecida, dando lugar a una intensidad de corriente que se entrega al primer módulo de la electrónica.

El detector de Ultra-LEGe tiene la ventaja de que, al ser de mayor número atómico y de una mayor densidad que el de Si, presenta una mayor eficacia de detección para fotones de energía más altas y por lo tanto para átomos de números atómicos grandes.

3.4.4. Análisis de espectros

En el análisis cuantitativo de los espectros es necesario extraer áreas máximas de los espectros característicos (o intensidad) de los elementos de interés en el espectro de rayos X y convertir estas intensidades en concentraciones elementales, es decir, la cuantificación del espectro PIXE se realiza basándose en la relación directa que existe entre el área neta de una línea dada de rayos X de un determinado elemento en el espectro y la cantidad de dicho elemento presente en la muestra. Para obtener datos cuantitativos exactos de la concentración del elemento de espectros de PIXE, se utilizan programas de cómputo apropiados.

El análisis de los espectros PIXE se realiza mediante programas informáticos, por ejemplo, AXIL o GUPIX. Estos programas se basan en el ajuste de los espectros mediante simulaciones que incluyen funciones del tipo Gaussianas modificadas, que describen los picos característicos de rayos X, y funciones polinómicas que simulan el ruido de fondo. A partir del ajuste del espectro se pueden identificar las áreas de los picos de elementos presentes en la muestra analizada. En la figura 3-3 (pag. 18) se muestra un ejemplo típico de un ajuste de cómputo a un espectro de PIXE. El espectro ilustra algunos de elementos que se pueden determinar simultáneamente con PIXE [10].

3.4.5. Origen de la radiación de fondo en los espectros de rayos X (Bremsstrahlung)

Un espectro típico del material que se analiza se compone de un conjunto de rayos X característicos de los átomos que componen la muestra más una radiación de fondo que se superpone. Esta radiación de fondo conocida como Bremsstrahlung se produce cuando los electrones o los iones cambian su velocidad o su dirección (los mismos iones del haz que pierden energía dentro de la

muestra o que se desvían de sus trayectorias dentro de la misma) y emiten en consecuencia radiación electromagnética[11,14].

3.4.6. Preparación del blanco

Para obtener resultados exactos en el análisis con PIXE la preparación del blanco es crucial. La preparación de los blancos se puede llevar a cabo en blancos delgados, intermedios y gruesos. Cada aplicación tiene sus propias limitaciones, por lo que es necesario elegir una estrategia apropiada para cada caso específico. [17].

- Blancos delgados: esta técnica es realizada para pequeños volúmenes de muestra en solución (por ejemplo, proteínas), para las cuales el procedimiento de purificación es largo y el volumen final obtenido es bajo ($\approx 50\mu\text{L}$).
- Blanco intermedio ($1\text{-}6\text{mg}/\text{cm}^2$): solo cuando muy pequeñas cantidades (mg) de muestras particuladas (por ejemplo, polvo, materiales volcánicos, etc.) están disponibles, este tipo de blanco es el conveniente.
- Blancos gruesos: en los cuales el bombardeo de protones es completamente detenido y los rayos X emitidos son sujetos a ser absorbidos en la superficie [14].

3.4.7. Ventajas y limitaciones de PIXE

Dentro de las ventajas de PIXE se pueden mencionar las siguientes:

- Método multielemental y rápido. PIXE es una técnica multielemental simultánea que permite la detección de todos los elementos del sistema periódico a partir del Sodio (Na), en la práctica un

total de hasta 20 elementos incluyendo algunos de especial relevancia en estudios medioambientales, como son S, V, Ni, Cu, Zn, As y Pb.

- Alta sensibilidad para la mayoría de los elementos en la tabla periódica. El límite de detección mínimo (MDL) es del nivel de ppm o menores (10^{-6} - 10^{-7} g/g), con poca variabilidad de elemento a elemento.
- Rapidez en la realización de los análisis (de aproximadamente 5 por minutos por muestra).
- Técnica no destructiva y de fácil automatización.
- Otra ventaja de PIXE es que puede ser realizado al vacío como fuera de éste. PIXE al aire es útil en el análisis de las muestras que no se pueden poner al vacío [14; 17].

Las limitaciones de PIXE son las siguientes:

- El acceso a un acelerador de partículas es generalmente limitado.
- Efecto de la matriz donde se encuentra la muestra [14; 17].

3.4.8. Campo de aplicación

PIXE puede ser utilizado en muchas áreas de estudio, de entre las cuales tienen gran relevancia las que a continuación se mencionan:

- Proteínas, las metaloproteínas son importantes para los organismos vivientes. Están implicadas en muchas reacciones metabólicas en plantas, bacterias y animales. Muchos metales (como Co, Cu, Fe, Zn, etc.) contenidos en proteínas juegan roles catalíticos o estructurales.
- Materiales geológicos
- Medicina
- Ecología
- Arqueología

3.4.9. Otros métodos analíticos

La fluorescencia de rayos X es el término genérico comúnmente usado para diferentes técnicas analíticas basadas en la emisión de rayos X característicos. Acorde al modo de excitación (rayos X, haz de partículas o haz electrónico) uno puede distinguir respectivamente la fluorescencia de rayos X (XRF), microscopía electrónica analítica (AEM), espectroscopia de absorción atómica (AAS) y PIXE.

En la AEM se tienen límites de detección relativamente altos, aproximadamente $100\mu\text{g/g}$, esto implica que la detección de metales en biomoléculas sea bastante limitada [25].

La XRF tiene límites de detección comparables a los de PIXE ($1\text{-}10\mu\text{g/g}$), pero tiene la desventaja de que la cantidad de muestra debe de ser del orden de miligramos para su análisis con esta técnica [28].

La AAS tiene una buena sensibilidad en la detección de metales en muestras biológicas [23]. Sin embargo tiene la desventaja de analizar un elemento a la vez y de ser destructiva, además de presentar complicaciones al hacer un análisis multielemental [24].

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo de bacterias

4.1.1. Medio de cultivo

Se utilizó un medio líquido para el cultivo de bacterias y se preparó de acuerdo al procedimiento reportado por Cohen-Bazire [3].

La tabla 4-1 muestra las diferentes cantidades de las soluciones que hay que agregar para preparar 50L del medio de cultivo.

Tabla 4-1. Preparación del medio de cultivo		
	Concentración	50L
Base concentrada		1000mL
KH ₂ PO ₄ pH 6.8	1.0M	1000mL
Ácido succínico pH 6.8	0.84M	1000mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.75M	250mL
NaCl	0.85M	500mL
Ácido L-glutámico pH 6.8	0.679M	100mL
Ácido L-aspártico pH 6.8	0.150M	100mL
Para completar el medio se agrega:		
Extracto de carne	12.5g	50g
Ácido nicotínico	12.5mg	50mg
Tiamina	6.25mg	25mg
Biotina	0.125mg	0.5mg

Una vez agregados todos los ingredientes del medio de cultivo, se mezcló y ajustó el pH a 6.8. El medio se esterilizó 45min a 120°C y 15 atmósferas de presión en botellas de 9 litros.

4.1.2. Siembra y cosecha de bacterias

En el laboratorio se tenían muestras en pequeños frascos conteniendo a la bacteria *Rhodobacter capsulatus* en medio sólido [3]. A éstos se les agregó medio líquido (sección 4.1.1.), se agitaron, se dejaron toda la noche en el cuarto oscuro y al día siguiente se colocaron a la luz de los focos de filamentos de tungsteno de 40watts a 30 centímetros de distancia. Después de 7 días se obtuvieron las bacterias en el medio líquido. Este medio se transfirió a frascos de 100mL, a los cuales se les agregó medio líquido hasta colmar su capacidad, se repitió el proceso de oscuridad-luz y se dejaron dividir durante 7 días. El inóculo bacteriano así obtenido se trasladó a frascos de 1L y 9L sucesivamente, siguiendo los pasos descritos con anterioridad. Los frascos se cerraron con tapones de hule herméticos y se dejó el mínimo de aire entre el tapón y el medio de cultivo para evitar al máximo la presencia de oxígeno, ya que la fotosíntesis de estas bacterias se realiza bajo condiciones de anaerobiosis.

Las bacterias cultivadas en los frascos de 9L de capacidad se cosecharon mediante centrifugación a 7000rpm durante 15 minutos en frascos de 250mL. Una vez cosechadas, las bacterias se lavaron con ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS) 50mM, KCl 50mM pH 7.0 mediante centrifugación a 8000rpm durante 15 minutos para eliminar por completo los residuos del medio. La pastilla se pesó y éste peso se consideró como peso húmedo.

4.2. Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se resuspendieron 80g de bacteria (peso húmedo) en 450mL de buffer Tris-HCl 50mM pH 8.6, MgCl 10mM, CoSO₄ 0.4M con un homogenizador Potter.

- Las células resuspendidas se transfirieron a un matraz Erlenmayer, se les agregó la enzima DNAasa (1mg de DNAasa por cada 10mg de peso húmedo de bacteria) y se sonicaron en porciones de 30mL durante 2.5min interrumpiendo 1min y sonicando 2.5min nuevamente la misma porción. Se utilizó un sonicador Branson (sonifier250) a una lectura constante de 4 en la perilla del aparato; para evitar el calentamiento de la muestra se colocó en baño de hielo.
- La muestra sonicada se centrifugó a 40000rpm durante 1 hora 20 minutos a una temperatura de 4°C, en una ultracentrífuga Beckman XL-90.
- El sobrenadante (extracto crudo) obtenido se colectó en un matraz Erlenmayer y se mantuvo en hielo. Del extracto crudo obtenido se tomaron 500μL (para pruebas posteriores) y se midió el volumen de extracto crudo restante.
- El extracto crudo se precipitó con (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amonio) utilizando 60% de saturación y se centrifugó a 15000rpm durante 20 minutos, con una centrifuga Sorvall RC-5B. La cantidad de (NH₄)₂SO₄ se obtuvo a partir de la tabla 4-2 [20] de la siguiente manera:

$$\frac{390 \text{ g(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4}{1000 \text{ mL}} \times \text{mL}_{\text{ muestra}} = \text{g(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$$

- Al sobrenadante (SN) obtenido se le midió el volumen y se precipitó con (NH₄)₂SO₄, esta vez pasando de 60 a 80% de saturación; se centrifugó a 1500rpm por 20min. La cantidad de (NH₄)₂SO₄ se obtuvo a partir de la tabla 4-2 [20] de la siguiente manera:

$$\frac{143 \text{ g(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4}{1000 \text{ mL}} \times \text{mL}_{\text{ muestra}} = \text{g(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$$

		Tabla 4-2. Precipitación con sulfato de amonio									
		Concentración final de sulfato de amonio, % saturación									
		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
		Sulfato de amonio para ser añadido a un litro de solución (g)									
Concentración inicial de sulfato de amonio, % saturación	0	56	114	176	243	113	390	472	561	662	767
	10		57	118	183	251	326	406	494	592	694
	20			59	123	189	262	340	424	520	619
	25			30	93	158	230	307	390	485	583
	30				62	127	198	273	356	449	546
	33				43	107	177	252	333	426	522
	35				31	94	164	238	319	411	506
	40					63	132	205	285	375	469
	45					32	99	171	250	339	431
	50						66	137	214	302	392
	55						33	103	179	264	353
	60							69	143	227	314
65							34	107	190	275	
70								72	153	237	
75								36	115	198	
80									77	157	
90										79	

- El SN obtenido se desechó y la pastilla se resuspendió con buffer Tris-HCl 20mM pH 8.6 CoSO₄ 0.1mM. Una vez resuspendido se dializó en membrana YM30 con 3L del mismo buffer con agitación lenta durante toda la noche para eliminar el exceso de (NH₄)₂SO₄.
- La muestra dializada se pasó por una columna cromatográfica de sephacryl s-200 (columna de exclusión molecular), la cual se equilibró con buffer Tris-HCl 20mM pH 8.6, CoSO₄ 0.1mM, colectando 80 fracciones de 60 gotas por fracción (aproximadamente 1.5mL) mediante un colector Gilson. Para determinar proteína de manera cualitativa, se midió la absorbancia de 1mL de cada una de estas fracciones en celdas de cuarzo de 1cm en un espectrofotómetro Beckman DU 650; la medición se realizó a 280nm. A las fracciones que presentaban proteína se les realizó actividad de pirofosfatasa citoplásmica en tubo (ver sección 4.4.), y de acuerdo con el resultado de actividad se decidió qué fracciones juntar.

- La fracción conjunta obtenida mediante la columna de sephacryl s-200 se pasó por una columna cromatográfica de DEAE-Biogel (columna de intercambio iónico), la cual se equilibró con buffer Tris-HCl 20mM pH 8.6, CoSO₄ 0.1mM, colectando 80 fracciones de 60 gotas por fracción eluidas con un gradiente de NaCl mediante un colector Gilson. A las fracciones obtenidas se les determinó proteína y actividad de la misma forma que a las fracciones de la columna de sephacryl s-200, y se decidió qué fracciones juntar.

4.3. Determinación de la cantidad de proteína

El método utilizado para determinar la cantidad de proteína fue el de Lowry [20]. El método es espectrofotométrico y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 560nm, utilizando albúmina sérica de bovino (ASB) como estándar, en un espectrofotómetro LUCY 1 de Anthos Labtec Instruments.

4.4. Actividad en tubo de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*

La actividad de la pirofosfatasa se midió cuantificando el fosfato (Pi) liberado a partir de PPI. La reacción se inició al agregar la enzima al medio de reacción, el cual se incubó en baño de agua a 37°C durante 10 minutos y se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) al 6%. El fosfato libre se cuantificó utilizando el método de Sumner, midiendo absorbancia a 660nm. Las unidades de la actividad específica se reportaron como mmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

La actividad de la enzima se realizó en tres diferentes medios los cuales contenían Tris-HCl 500mM pH 8.6, Pirofosfato de Na 50mM pH 8.6 y agua; utilizando Mg²⁺ 50mM para uno, Mn²⁺ 50mM para otro y al tercer medio no se le agregó catión.

4.5. Geles de poliacrilamida

4.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Se prepararon geles de 5mL con un grosor de 0.75mm y 10mL con un grosor de 1.5mm, ambos con un porcentaje de 10 para el resolovedor y 4 para el concentrador. Las cantidades y reactivos utilizados en la preparación de los geles se muestran en la tabla 4-3.

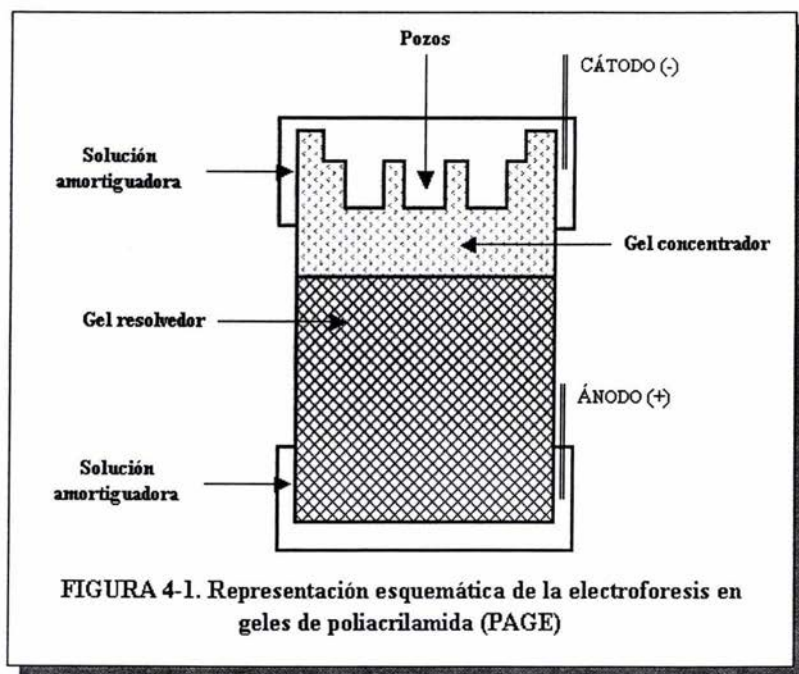
Reactivo	Gel resolovedor 10%		Gel concentrador 4%	
	5mL	10mL	5mL	10mL
Agua	2.45mL	5.16mL	2.83mL	5.91mL
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	1.667mL	3.334mL	0.666mL	1.332mL
Buffer resolovedor	0.625mL	1.25mL	-	-
Buffer concentrador	-	-	1.25mL	2.5mL
Persulfato de amonio 1.5%	250μL	250μL	250μL	250μL
TEMED*	4μL	6μL	4μL	6μL

* N,N-tetrametilendiamina

Los geles que se analizaron mediante PIXE tenían un ancho de 10cm, un alto 6cm y un grosor de 75mm. Como PIXE es técnica superficial, es decir, el haz de protones solo penetra las primeras 50 micras, no tiene caso hacer geles gruesos debido a que el haz no mediría todo el gel. Por lo anterior se escogió trabajar con geles de 0.75mm que al secarse quedaban de aproximadamente 85μm.

Como se observa en la tabla 4-3 los geles fueron preparados de forma nativa (condiciones no desnaturalizantes), para que la actividad de la enzima no se pierda. Una vez obtenido el gel se tiñó utilizando azul de Coomassie y para una mejor visualización de las bandas se utilizó la tinción con plata.

En la figura 4-1 se muestra el dispositivo para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida. Las muestras de enzima se cargan en los pozos del gel concentrador y enseguida se aplica una corriente eléctrica.



4.5.2. Actividad en gel de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*

Las soluciones utilizadas en la determinación de actividad de pirofosfatasa en gel se muestran en la tabla 4-4. Para determinar la actividad se realizó PAGE de la muestra de pirofosfatasa; después el gel se pasó a la solución I y se mantuvo con agitación durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el gel se pasó a la solución II (medio de reacción) y se mantuvo en baño de agua a 37°C durante 10 minutos e inmediatamente después del tiempo de reacción se enjuagó el gel con solución I. Por último

se reveló el gel con solución III en baño de agua a 45°C hasta que se observaron las bandas de actividad.

Tabla 4-4. Soluciones necesarias para realizar actividad en gel

<i>Solución I</i>	<i>Solución II</i>	<i>Solución III</i>
Tris-HCl 20mM pH 8.6	Tris-HCl 50mM pH 8.6	Molibdato-H ₂ SO ₄
ZnSO ₄ 0.1mM	MgCl ₂ 5mM	H ₂ SO ₄ 0.5M
β-Mercaptoetanol 0.2mM	Pirofosfato de Na 3mM	Ácido ascórbico 1.5%

4.5.3. Geles de calibración de elementos metálicos

Como el objetivo del análisis es determinar el número de sitios metálicos asociados a la enzima, es necesario transformar los rayos X detectados a unidades de concentración. Esto se logra mediante una calibración preparando geles con diferentes concentraciones del metal de interés. Estos geles se analizan mediante PIXE cada vez que se analizan los geles conteniendo las enzimas.

Se prepararon geles de calibración con un grosor de 0.75 mm y un porcentaje del gel resolvidor de 7.5% para un volumen de 5mL, Los geles se secaron colocándolos entre una capa de plástico (“egapack”) y otra de celulosa (celofán). Al momento del análisis con PIXE, el “egapack” era retirado y el análisis se realizó sobre esta cara. La tabla 4-5 muestra la preparación de los geles.

Tabla 4-5. Composición de geles de calibración

Concentración µg/mL	0	2	4	6	10	20
Metal µg/5mL	0	10	20	30	50	100
Agua desionizada	2.87mL	2.77mL	2.67mL	2.57mL	2.37mL	1.87mL
Estándar	0	100µL	200µL	300µL	500µL	1000µL
Acrilamida/bisacrilamida (30:0.8)	1.25mL	1.25mL	1.25mL	1.25mL	1.25mL	1.25mL
Buffer resolvidor	0.625mL	0.625mL	0.625mL	0.625mL	0.625mL	0.625mL
Persulfato de amonio al 1.5%	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL
TEMED	2.5µL	2.5µL	2.5µL	2.5µL	2.5µL	2.5µL

4.5.4. Geles con enzima para PIXE

El gel resolvidor se preparó al 10% y el concentrador al 4%. Se usó un peine de 5 pozos anchos para tratar de maximizar el volumen depositado de muestra.

A estos geles se les añadió cierta cantidad de pirofosfatasa en diferentes carriles y se sometieron a PAGE. El primer carril se utilizó para realizar actividad en gel y así visualizar la posición de la banda de actividad. Para estos carriles de control sólo se requería entre 10 y 20 μg de enzima. Los geles con la enzima, una vez perfectamente secados como se describe para los geles de calibración, se sometieron sin mayor tratamiento al análisis con PIXE, para detectar los metales asociados a las bandas. Se ensayaron varias concentraciones de enzima purificada que iban desde 150 a 310 μg por carril.

4.6. Muestras de pirofosfatasa en filtros de teflón (PVDF) para PIXE

La enzima purificada se dializó en una membrana YM30 con 4L de buffer Tris-HCl 20mM pH 8.6 durante 24 horas para tratar de eliminar el cobalto contenido en el buffer donde se encontraba la enzima. Después de la diálisis se prepararon 3 portamuestras con filtros de teflón previamente pesados. Las diferentes muestras se distribuyeron de la siguiente manera:

- A) Enzima dializada
- B) Enzima sin dializar
- C) Buffer sin enzima

En los tres casos se colocaron 35 μL de la muestra correspondiente, una vez por día durante 3 días, dando un total de 105 μL para cada uno de los casos. Los teflones con las diferentes muestras se

guardaron en un desecador hasta su análisis. El análisis con PIXE se realizó al aire para poder localizar más fácilmente la muestra en el filtro.

4.7. Bandas de la enzima obtenida por PAGE en filtros de teflón

Este gel se preparó de 1.5mm de grosor con un porcentaje de 10% para el resolovedor y 4% para el concentrador. Se colocó muestra de enzima en cuatro carriles; el primer carril se utilizó para determinar actividad de PPasa en gel (sección 4.5.2) y así poder visualizar las bandas de actividad (figura 4-2).

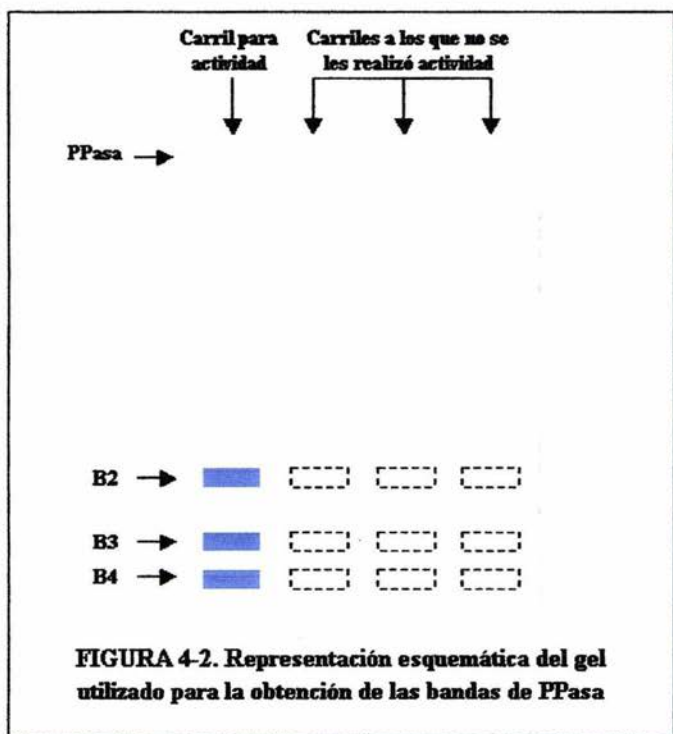


FIGURA 4-2. Representación esquemática del gel utilizado para la obtención de las bandas de PPasa

Una vez visualizadas las bandas, se procedió a identificarlas, mediante el Rf de cada banda, en aquellos carriles donde no se realizó actividad. Las bandas se cortaron, se colocaron en un mortero y se

maceraron con 10 μ L de HNO₃; posteriormente se transfirieron los macerados de cada banda a un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 3000rpm durante 10 minutos para eliminar la poliacrilamida. Por último, el sobrenadante obtenido de cada banda se transfirió a un filtro de teflón previamente pesado.

En los resultados experimentales se visualizaron hasta cuatro bandas (B1, B2, B3 y B4) de actividad pero en la mayoría de los geles se observaron tres (B2, B3 y B4).

A manera de resumen de las secciones anteriores, la figura 4-3 muestra las diferentes estrategias empleadas para detectar el metal asociado a la enzima.

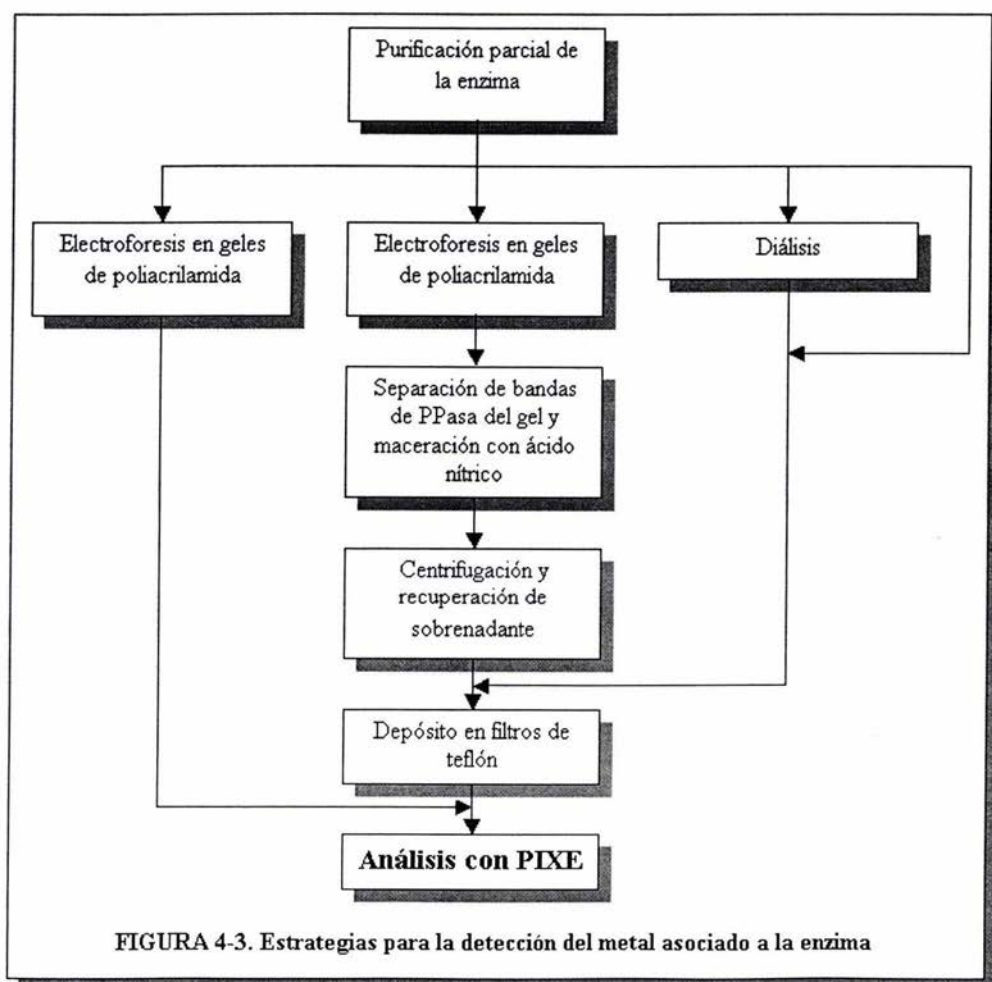
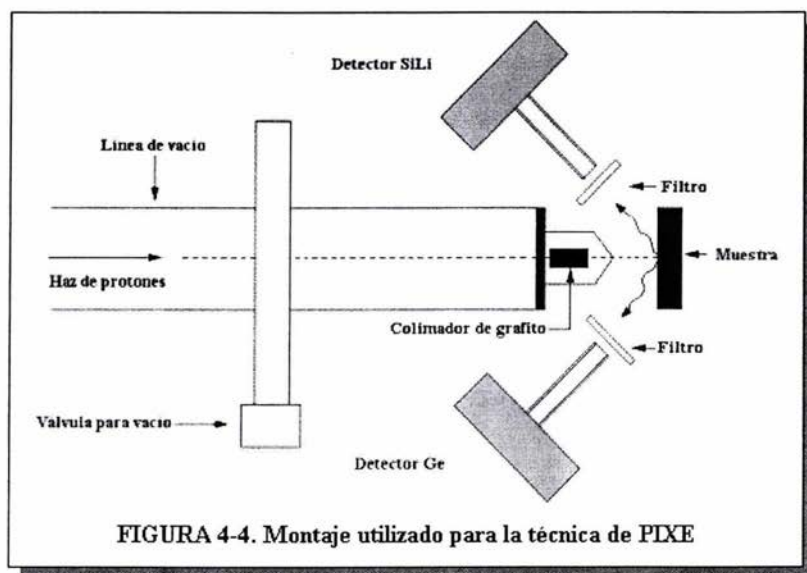


FIGURA 4-3. Estrategias para la detección del metal asociado a la enzima

4.8. Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE)

4.8.1. Análisis mediante PIXE

Para las muestras se usó un haz de protones de 3MeV de energía generado por el acelerador de partículas. El montaje se realizó como se muestra en la figura 4-4. Cada muestra fue colocada a 1.5 centímetros de la salida del haz. El bombardeo se realizó con un haz que cubría total o parcialmente la muestra. Los rayos X emitidos fueron detectados simultáneamente por dos detectores: uno de silicio-litio [Si(Li)] y otro de germanio puro (Ge) respecto al haz. Frente a los detectores se colocaron filtros de Mylar (10-35 μm) y de aluminio (Al) para reducir la alta tasa de conteo de elementos ligeros.



Todos los análisis mediante PIXE se realizaron con protones de 3MeV de energía. La mayor parte de los experimentos se realizaron al vacío (pues se logra una mayor sensibilidad) bombardeando los geles con un haz de área de 1 cm de ancho por 1mm de alto obtenido mediante el uso de un colimador

de grafito. El bombardeo se realizó desplazando el gel a lo largo de la vertical en pasos de 1mm. Los rayos X emitidos se detectaron con un detector LEG de Ge. Para evitar quemar el gel, las corrientes empleadas no rebasaron los 10 nA y la irradiación se realizó durante 5 min.

Como el objetivo de los análisis PIXE dentro de este trabajo es determinar el número de sitios metálicos dentro de una proteína, es necesario transformar el número de rayos X detectados para un elemento en particular en una concentración. Esta calibración se realiza ocupando geles de electroforesis con concentraciones conocidas de metales (μg por mL de gel) cuya preparación se describe en la sección 4.5.3.

4.8.2. Cuantificación de los metales asociados a una proteína

Los geles conteniendo la enzima sometidos a PIXE se analizan y se obtienen los espectros correspondientes analizando los mismos por cada mm de gel. Los resultados obtenidos ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel) se ajustan por medio de una Gaussiana; calculando la superficie de esta curva ($\mu\text{g mm}/\text{mL}$) se puede determinar fácilmente el número de átomos ($N_{\text{átomos}}$) del elemento en cuestión por la siguiente relación:

$$N_{\text{átomos}} = \frac{N_{\text{av}}(\text{at / mol}) \cdot S(\mu\text{gmm / mL}) \cdot V(\text{mL / mm}) \cdot 10^{-6}}{A_{\text{átomos}}}$$

donde, N_{av} es el número de Avogadro (6.023×10^{23} átomos/mol), $A_{\text{átomos}}$ es la masa de una molécula del elemento en cuestión (g/mol), y V (mL/mm) es el volumen del gel líquido expuesto a la superficie del haz de protones. Si se utilizan geles de 0.75 mm de grosor, el volumen V es igual a $6 \mu\text{L}/\text{mm}$ de gel una vez secos éstos. Por otra parte, conociendo la masa de proteína (M_p) contenida en la banda electroforética, el número de proteínas (N_p) correspondiente se obtiene por la relación siguiente:

$$N_p = \frac{N_{av}(\text{moleculas / mol}) \cdot M_p(\text{g}) \cdot 10^{-6}}{A_p(\text{g / mol})}$$

donde A_p , es la masa de una molécula de una proteína (g/mol). El número de sitios (R) es entonces obtenido por la división de sus dos números:

$$R = \frac{N_{\text{átomos}}}{N_p}$$

Algunos ejemplos del cofactor metálico detectado para algunas enzimas por la metodología anteriormente descrita se dan en la tabla 4-6 [27].

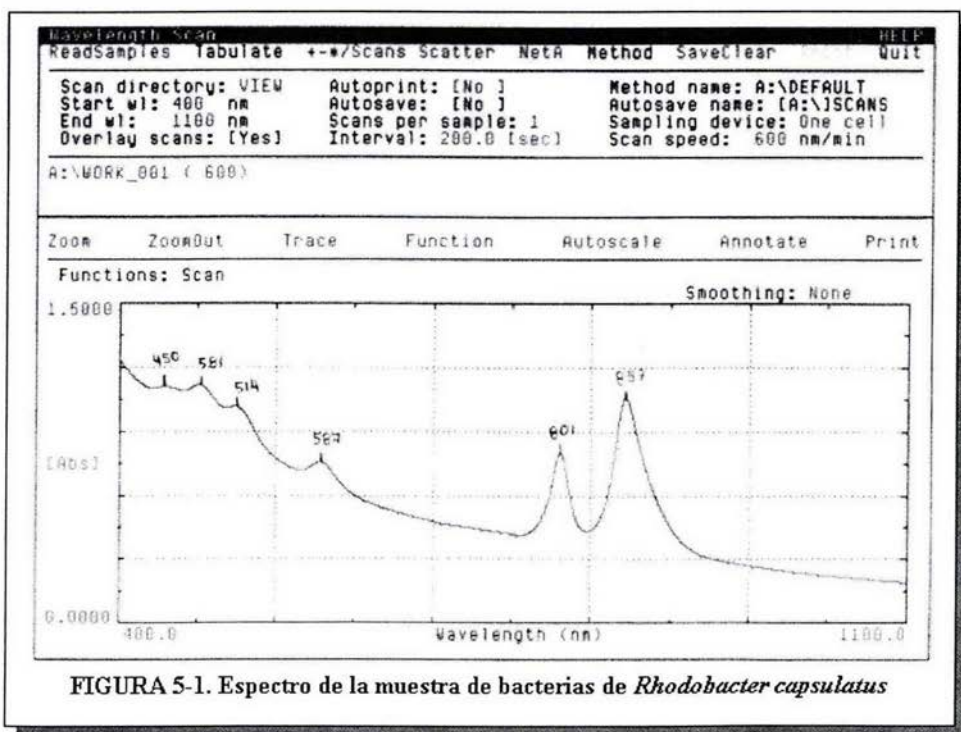
TABLA 4-6. Ejemplos de metales asociados a proteínas detectados mediante PIXE

Proteína	Cofactor metálico	Relación medida	Relación reportada
Citocromo C	Fe	1.09	1
Superóxido dismutasa (SOD)	Cu	0.88	1
	Zn	1.36	1

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Espectro UV-visible de bacterias de *Rhodobacter capsulatus*

Como una forma de saber si las bacterias cultivadas de *Rhodobacter capsulatus* no presentaban contaminación por otra u otras bacterias, se determinó su espectro de absorción de 400 a 1100nm y se compararon los picos del espectro obtenido (figura 5-1) con los de un espectro de la cepa pura (figura 5-2).



Los picos de absorción de la muestra de bacterias obtenidas son muy parecidos a los picos de absorción de la cepa pura. Estos dos espectros concuerdan con los valores máximos de absorción de la

bacteria, mencionado en los antecedentes (sección 3.3). Este método para determinar la presencia de la bacteria en cuestión es rápido y sencillo, sin embargo, no indica la ausencia de microorganismos contaminantes.

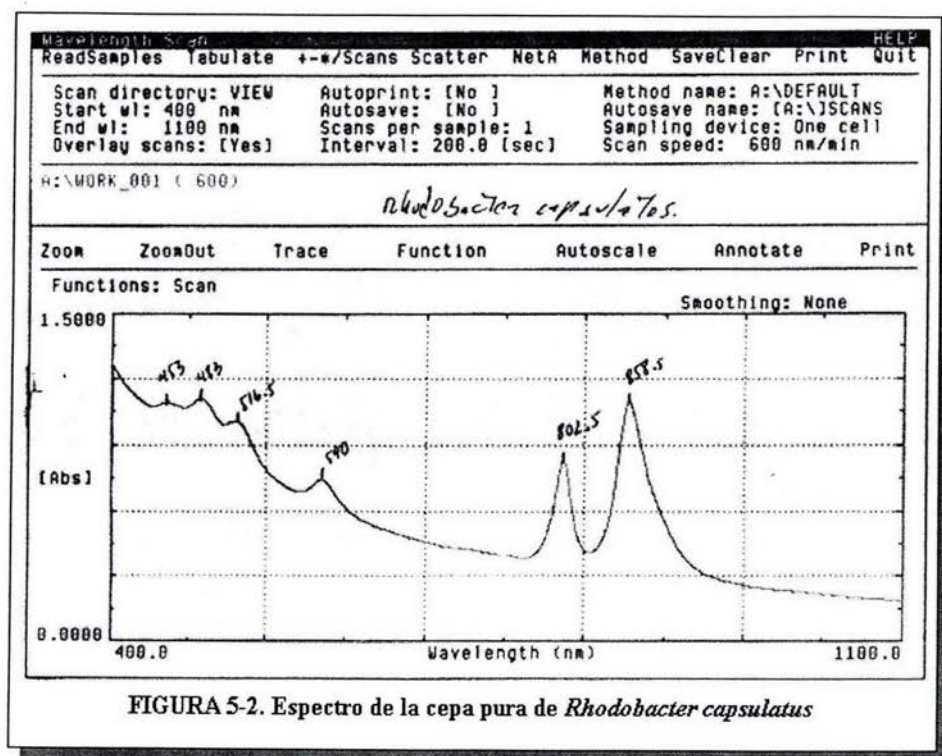


FIGURA 5-2. Espectro de la cepa pura de *Rhodospirillum rubrum*

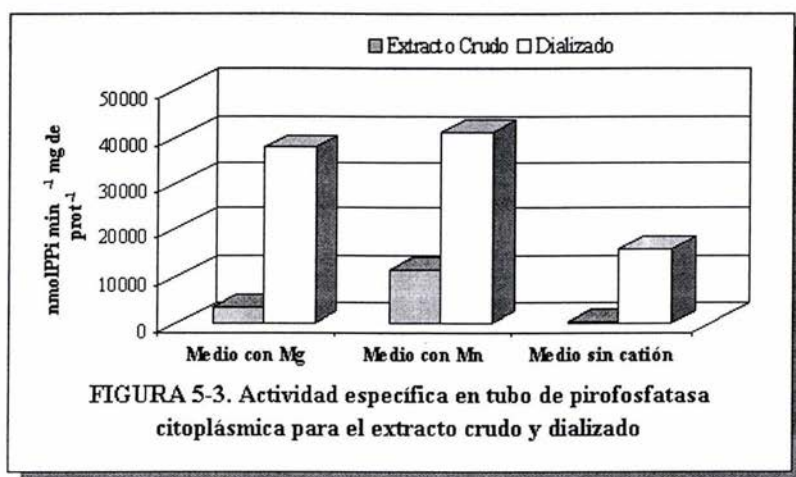
5.2. Purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodospirillum rubrum*

5.2.1. Determinación de proteína y actividad en tubo para el extracto crudo y la muestra dializada

A fin de monitorear la purificación de la enzima pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodospirillum rubrum* se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry (sec. 4.3.) y la actividad en

tubo (sec. 4.4), tanto para el extracto crudo como para la muestra dializada. Las primeras determinaciones de cantidad de proteína oscilaron entre 2 y 4mg/mL; en lo que respecta a la actividad en tubo se obtuvieron de 3,000 a 7,000 nmolPPi min⁻¹ mg de proteína⁻¹ para el extracto crudo y de 6,000 a 20,000 nmolPPi min⁻¹ mg de proteína⁻¹ para el dializado.

Después de haber realizado la purificación de la bacteria varias veces se notó un aumento en los valores obtenidos para la actividad en tubo con los tres diferentes medios mencionados en la sección 4.4 (figura 5-3); de acuerdo con dicha figura, la enzima mostró una gran actividad en los tres diferentes medios de reacción comparada con la pirofosfatasa de *Rhodospirillum rubrum*, para la cual se tiene reportada una actividad específica de 22,400 nmolPPi min⁻¹ mg de proteína⁻¹ después de una segunda precipitación con sulfato de amonio [12].



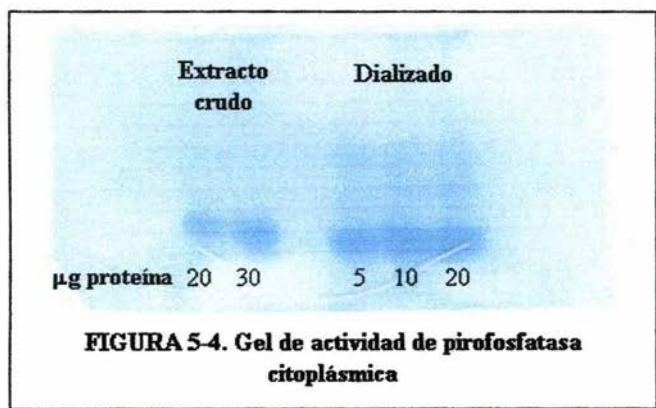
En el caso de la cantidad de proteína los resultados fueron similares a los obtenidos en las primeras determinaciones, obteniéndose para el extracto crudo 3.49 mg/mL y 4.06 mg/mL para el dializado.

La cantidad de proteína de la muestra dializada fue un poco mayor, debido a que después de la última precipitación con sulfato de amonio, el pastilla se resuspendió con la mínima cantidad de buffer

Tris-HCl 20mM pH 8.6 CoSO₄ 0.1mM, y con esto las proteínas remanentes a las precipitaciones con sulfato de amonio se concentraron.

5.2.2. Actividad en gel para el extracto crudo y la muestra dializada

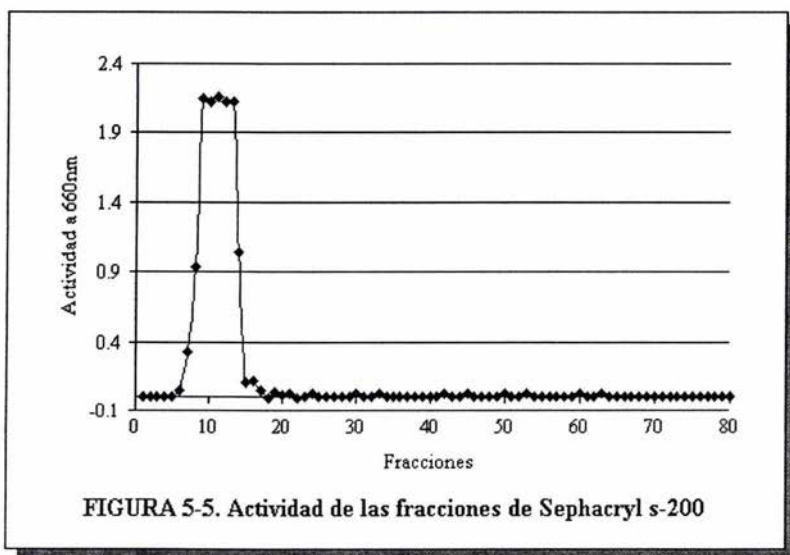
Se obtuvo un gel mediante PAGE (sec. 4.5.1.) cargado con muestra de extracto crudo y dializado; a este gel se le determinó actividad en gel (sección 4.5.2.) para la pirofosfatasa soluble, tanto para el extracto crudo como para el dializado (ambos en el mismo gel). El gel de actividad se muestra en la figura 5-4. El grosor del gel fue de 0.75mm, con gel resolvidor al 10% y concentrador al 4%.



En la figura anterior se muestra claramente la banda de actividad, tanto para el extracto crudo como para el dializado; las bandas de actividad para el dializado fueron más intensas, probablemente porque se encontraba en un grado de purificación mayor que el extracto crudo.

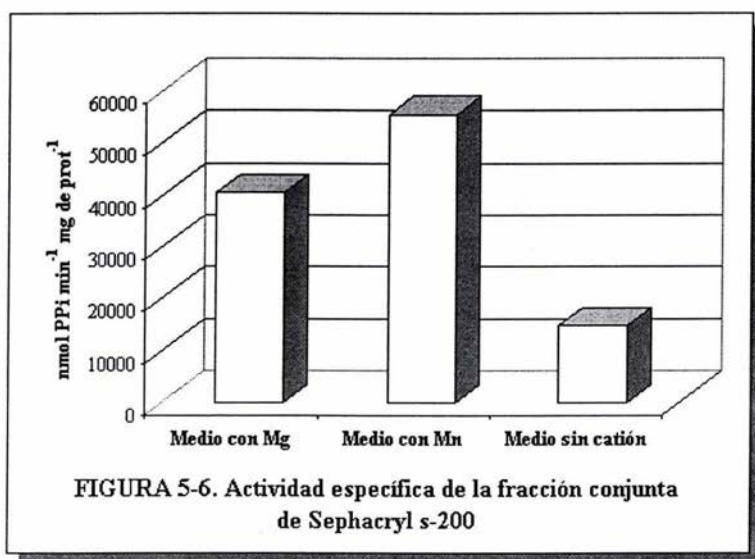
5.2.3. Determinación de proteína y actividad en tubo para las muestras de la columna de Sephacryl s-200

Una vez colectadas las fracciones de la columna de Sephacryl s-200 se les determinó proteína de manera cualitativa a 280nm (sec. 4.2.). A esta longitud de onda hay una fuerte absorción de la luz por parte de los aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano y fenilalanina) [20]. Se seleccionaron las fracciones 4-23 debido a que presentaban absorbancia y por lo tanto probable presencia de proteína. A las fracciones seleccionadas se les determinó actividad en tubo utilizando únicamente el medio que contiene magnesio. Las fracciones que presentaron mayor actividad fueron las 9-14 (figura 5-5) por lo que se juntaron en una sola fracción.



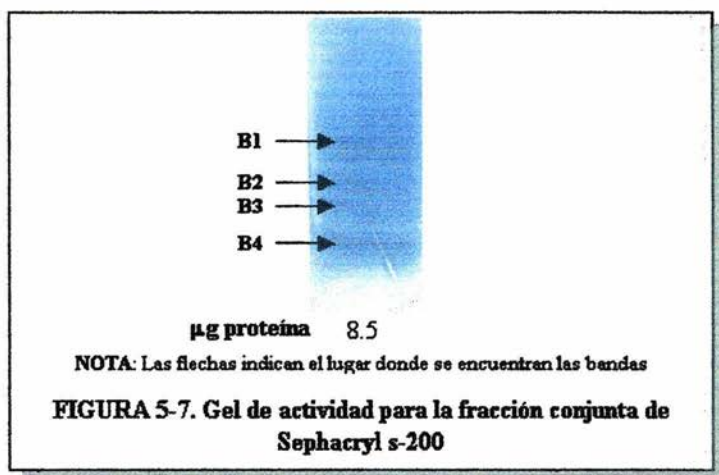
A la fracción conjunta se le determinó cantidad de proteína por Lowry, obteniéndose un valor promedio de 1.70mg/mL. La cantidad de proteína disminuyó con respecto a los resultados del extracto crudo y dializado, ya que al pasar la muestra dializada por la columna de Sephacryl s-200 se fueron

separando las proteínas de acuerdo con su peso molecular. También se determinó actividad en tubo para la fracción conjunta con los tres diferentes medios (figura 5-6). La fracción conjunta de Sephacryl mostró gran actividad en el medio con manganeso, tal vez debido a que este catión sea un mejor cosustrato para la enzima que el magnesio; sin embargo, la actividad específica obtenida utilizando magnesio no disminuyó con respecto a la actividad específica del dializado. La enzima mostró una actividad mucho menor en el medio sin catión: la presencia de cationes divalentes aumenta dicha actividad [18].



5.2.4. Actividad en gel para la fracción conjunta de Sephacryl s-200

Se realizó un gel de actividad para la fracción conjunta de Sephacryl s-200. El gel fue preparado con un porcentaje de 10% para el gel resolvidor, 4% para el concentrador y un grosor de 0.75mm. El gel de actividad se muestra en la figura 5-7.



En la figura 5-7 se pueden apreciar cuatro bandas de actividad (B1-B4); es probable que éstas bandas sean isoformas de la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* o tal vez subunidades activas debido a la acción de proteasas. Si se tratara de proteasas, en el gel de actividad del extracto crudo y dializado tuvieron que haber aparecido más bandas de actividad y no una sola, a menos que la proteasa no haya actuado en el extracto crudo.

5.2.5. Determinación de proteína y actividad en tubo para las muestras de la columna de DEAE-Biogel

La fracción conjunta de Sephacryl s-200 (fracciones 9-14) se pasó por una columna de DEAE-Biogel. De la misma manera que a las fracciones de Sephacryl s-200, se determinó proteína de manera cualitativa (midiendo absorbancia a 280nm).

Las fracciones que presentaron absorbancia en la determinación de proteína fueron: 4-10, 14, 25 y 30; a estas fracciones se les realizó actividad en tubo utilizando únicamente el medio con magnesio. Se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 5-8.

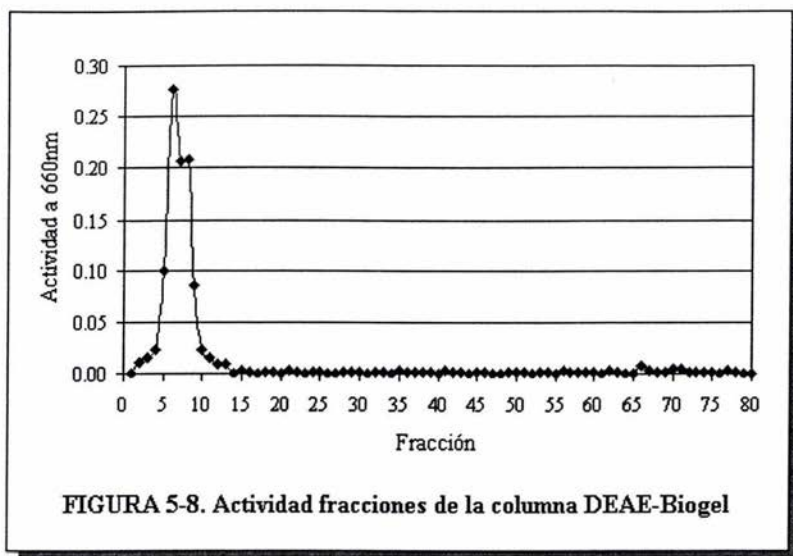


FIGURA 5-8. Actividad fracciones de la columna DEAE-Biogel

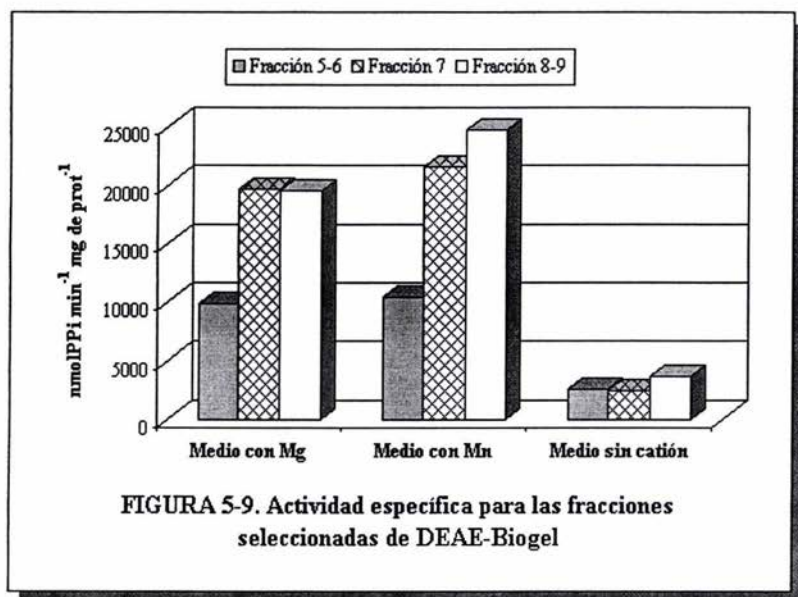
De acuerdo con la figura 5-8 se juntaron las fracciones 5-6 y 8-9, y la fracción 7 se analizó individualmente. A estas fracciones conjuntas y a la fracción 7 se les determinó cantidad de proteína por Lowry, cuyos resultados se muestran en la tabla 5-1.

Tabla 5.1. Cantidad de proteína para las fracciones conjuntas de DEAE-Biogel

Fracción	mg/mL promedio
5-6	0.86
7	0.76
8-9	0.62

Como se puede observar en los resultados, la cantidad de proteína disminuyó nuevamente al pasar la fracción conjunta de Sephacryl s-200 debido a que DEAE-Biogel es una columna de intercambio iónico y por lo tanto las proteínas se separaron de acuerdo con su carga.

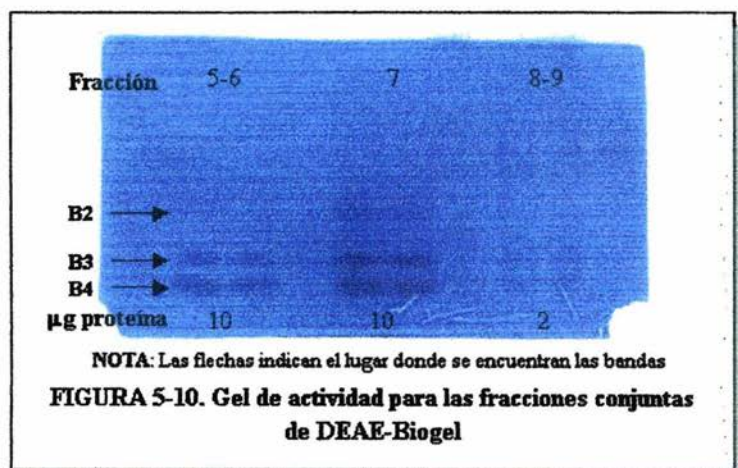
A estas fracciones se les determino actividad en tubo con los tres diferentes medios, los resultados de la actividad se muestran en la figura 5-9.



Los resultados de la actividad específica en tubo de las fracciones analizadas fueron menores que los de las fracciones de la columna de Sephacryl s-200; probablemente influyó que la muestra se mantuvo a temperatura de refrigeración (4-7°C) varios días afectando la actividad de la enzima, ya que ésta se conserva mejor si se congela a -70°C. Los resultados de la actividad muestran la misma tendencia que los anteriores: ligeramente mayor en el medio con manganeso que en el medio con magnesio y poca actividad en el medio sin catión.

5.2.6. Actividad en gel para las fracciones conjuntas de DEAE-Biogel

El gel se preparó con los mismos porcentajes y el mismo grosor que los geles de actividad anteriores. En este gel de actividad se apreciaron tres bandas de actividad para la fracción conjunta 5-6 y también tres bandas para la fracción 7 (figura 5-10); en lo que respecta a la fracción conjunta 8-9 sólo se apreciaron 2 bandas, tal vez porque se cargó menor cantidad de ésta en el gel.



De acuerdo con los resultados obtenidos con los geles de actividad, se decidió realizar una nueva purificación pero esta vez utilizando inhibidores de proteasas en los buffers.

5.3. Purificación parcial de PPasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* utilizando inhibidores de proteasas

Como se pudo observar en los geles de actividad de PPasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*, aparecieron cuatro bandas de actividad después de pasar la muestra dializada por la columna de Sephacryl s-200 y tres después de la columna de DEAE-biogel. Por lo anterior se decidió usar inhibidores de proteasas.

Los primeros inhibidores de proteasas utilizados fueron “Portease inhibitor cocktail for general use” (P2714, Sigma-Aldrich 2003). Siguiendo las indicaciones del marbete se agregaron 2mL de los inhibidores de proteasa por cada 1000mL de solución amortiguadora. Esto se llevó a cabo en el buffer Tris HCl 50mM pH 8.6, MgCl₂ 10mM, CoSO₄ 0.4mM y en el buffer Tris HCl 20mM pH 8.6, CoSO₄ 0.1mM. Con los buffers que contenían inhibidores se realizó la purificación de la enzima de la manera descrita en la sección 4.2.

Los resultados de la determinación de proteína en el extracto crudo y en el dializado de esta purificación presentaron valores de 4.58 y 8.15mg/mL, respectivamente. Estos valores mostraron un aumento con respecto a los resultados de la purificación en la que no se usaron inhibidores. Al utilizar inhibidores de proteasas se disminuyó el grado de proteólisis, por lo que se mantuvo una mayor cantidad de proteína intacta.

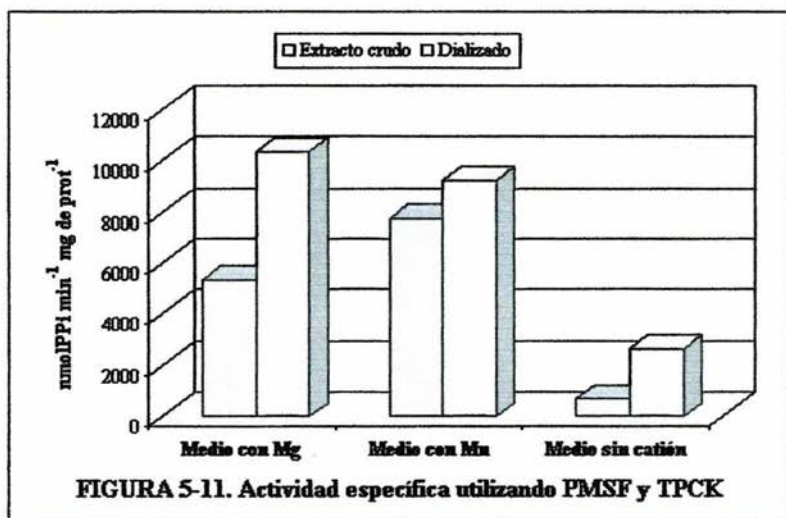
Las muestras de extracto crudo y dializado no presentaron actividad en tubo. Esto puede explicarse porque los inhibidores empleados contenían EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en su formulación. Este compuesto es un poderoso agente quelante y posiblemente atrapó al cofactor metálico de la enzima impidiendo de esta forma su actividad. Cuando se determinó la actividad en gel no se detectó ninguna banda, reforzando la idea de que el cofactor metálico de la enzima fue quelado por el EDTA.

Lo anterior no era conveniente para fines de la investigación: era necesario conocer la localización de las bandas de actividad para así poder cortar el gel y someter la enzima a PIXE. Además, si el EDTA capturó al cofactor metálico, pudo haber roto su asociación con la enzima, por lo que su determinación por PIXE no hubiera sido posible.

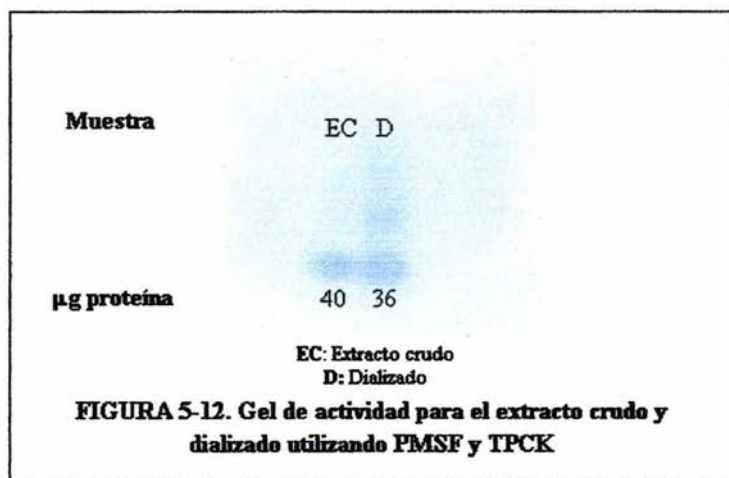
En segundo lugar se utilizó una mezcla de los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride P7626, Sigma-Aldrich 2003) y TPCK (N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone T4376, Sigma-Aldrich 2003). Se preparó una solución inicial para cada inhibidor de proteasa a las siguientes concentraciones: PMSF 200mM y TPCK 100mM. Se agregaron 2.87 μ L de solución de PMSF y 2.78 μ L de solución de TPCK por cada mL de buffer. Los inhibidores de proteasas PMSF y TPCK se agregaron a las soluciones amortiguadoras mencionadas en la sección 5.3.1. y con ellas se realizó la purificación de la enzima (sec. 4.2.).

De igual manera que con los inhibidores anteriores, se presentó un incremento en la cantidad de proteína para el extracto crudo (4.53mg/mL) y para el dializado (7.48mg/mL) utilizando PMSF y TPCK. Este aumento pudo deberse a la acción de los inhibidores que, como ya se mencionó, evitan la lisis de las proteínas, conservando un mayor porcentaje de proteína.

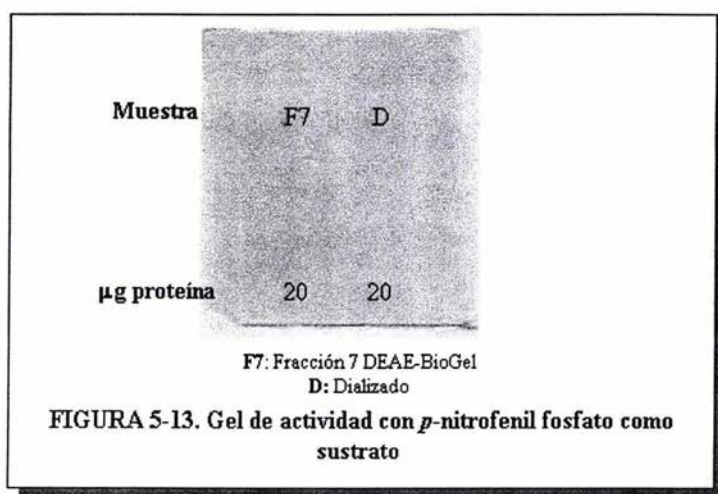
Los resultados de la determinación de actividad en tubo se muestran en la figura 5-11. Los valores de actividad específica para el dializado disminuyeron con respecto a los valores obtenidos sin inhibidores (sec. 5.2.5.). La actividad específica está expresada por miligramo de proteína; como muestran los resultados de la cantidad de proteína, en el dializado aumentó casi al doble y como consecuencia la actividad específica se redujo. Cabe mencionar que la intensidad de color azul en los tubos fue la misma que la obtenida sin inhibidores.



Los resultados de actividad en gel para el extracto crudo y el dializado se observan en la figura 5-12. En dicha figura se aprecian varias bandas de actividad para el dializado; esto puede atribuirse a que el fraccionamiento de la enzima tal vez no sea debido a la acción de proteasas, sino a la presencia de fosfatasas (el método de determinación de actividad en gel no diferencia entre fosfatasas y pirofosfatasas).



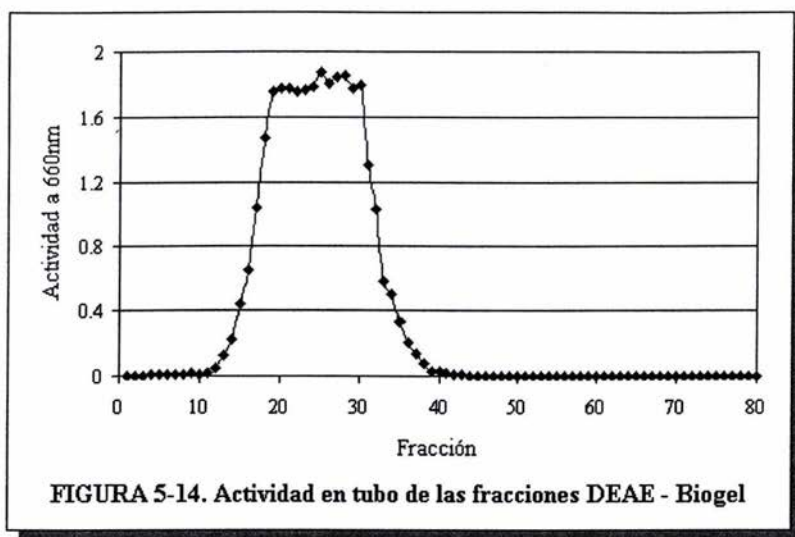
Para descartar la posibilidad de la presencia de fosfatasas se preparó un gel para determinar actividad exclusivamente de estas enzimas, utilizando *p*-nitrofenil fosfato como sustrato. El medio de reacción se preparó como en la sección 4.5.2 pero cambiando la cantidad de pirofosfato por *p*-nitrofenil fosfato; la actividad en gel se realizó de la misma manera que en la sección antes mencionada. El gel se cargó con muestra obtenida de la purificación parcial de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*. En la figura 5-13 se muestra el gel de actividad para fosfatasas; la ausencia de bandas de actividad indica que la muestra estudiada no contenía fosfatasas.



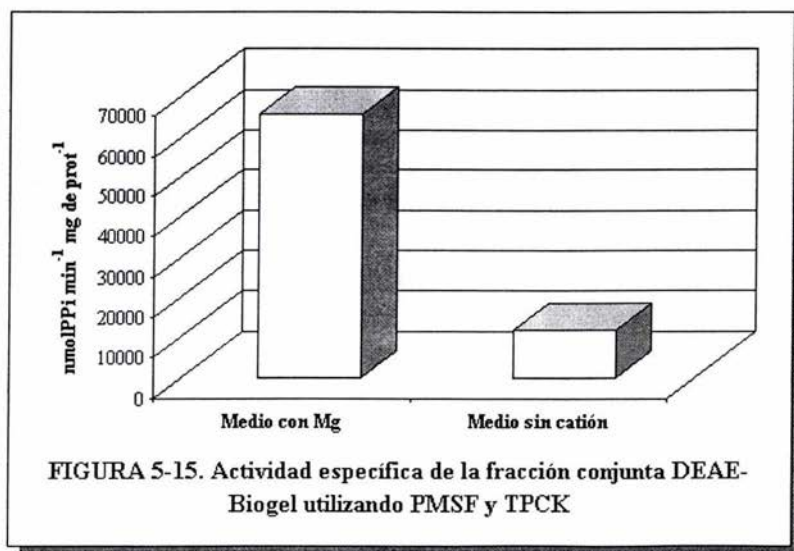
En el gel de la figura 5-13 se colocaron 20µg de la fracción 7 de la columna de DEAE-BioGel (sección 5.2.6) y 20µg del dializado obtenido con PMSF y TCPK; en ambos casos el resultado fue negativo. Se determinó actividad en tubo (sección 4.4.) de la fracción 7 de la columna de DEAE-BioGel y del dializado utilizando *p*-nitrofenil fosfato como sustrato en lugar de pirofosfato: el resultado fue nulo; de acuerdo con los resultados la presencia de fosfatasas se descartó.

Se continuó la purificación parcial pasando la muestra dializada por la columna de Sephacryl S-200 y la fracción conjunta obtenida de ésta se pasó por la columna de DEAE-BioGel. A las fracciones obtenidas por la columna de DEAE-BioGel se les determinó proteína de manera cualitativa (sección

4.2.) y posteriormente actividad en tubo utilizando únicamente el medio con magnesio; las fracciones fueron seleccionadas de acuerdo con la figura 5-14.

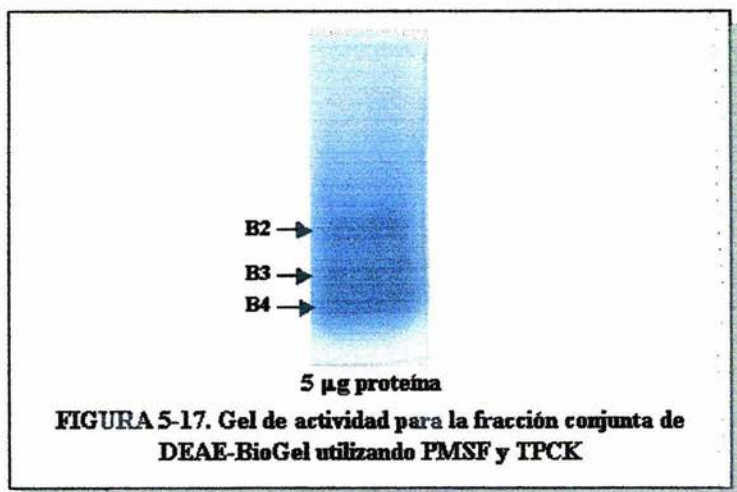


De acuerdo con la figura 5-14 se juntaron las fracciones 20-30. A esta fracción conjunta se le determinó cantidad de proteína (0.16mg/mL) y actividad específica (figura 5-15).

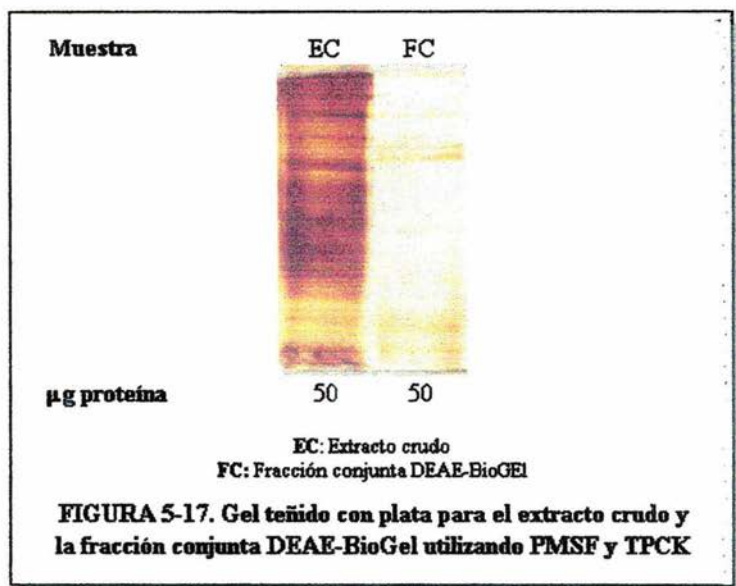


Los resultados de la actividad específica mostraron que la enzima tenía gran actividad, que fue mayor que en los casos anteriores.

Se determinó la actividad en gel de la fracción conjunta de DEAE-BioGel. En la figura 5-16 se observa el resultado de dicha actividad.



En la actividad en gel se observaron tres bandas y por la cantidad de muestra cargada en el gel se demostró que la enzima presentaba gran actividad. Se preparó un gel de 1.5mm de grosor con un porcentaje de 10 para el resolvidor y 4 para el concentrador; se llevó a cabo la técnica de PAGE y el gel obtenido se tiñó con plata. La figura 5-17 muestra el gel teñido con plata en donde se cargaron 50µg de extracto crudo y 50µg de DEAE-BioGel, utilizando en ambos PMSF y TCPK en los buffers empleados durante la purificación.



En la figura anterior se puede apreciar el grado de purificación logrado, pasando de incontables bandas en el extracto crudo a sólo ocho aproximadamente en la muestra de DEAE-BioGel. Teniendo en cuenta que sólo cuatro bandas presentan actividad de PPasa, es posible que las demás sean contaminantes.

Las bandas de proteínas contaminantes no están cercanas a las bandas de la PPasa, por lo que no interfirieron en el estudio de la enzima mediante PIXE. Para fines del estudio del metal asociado a la enzima, las técnicas empleadas para la purificación de la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* funcionaron adecuadamente.

5.4. Porcentaje de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* en la muestra purificada

A partir de los geles de poliacrilamida teñidos con tinción de plata se obtuvo el porcentaje de PPasa, utilizando un programa de computo llamado Osiris. Este programa permite obtener la proporción relativa de las bandas presentes en el gel con base a la intensidad de cada banda presente en el gel. La proporción relativa se obtiene a partir de un barrido del gel con un scanner, el gel utilizado fue gel teñido con plata (utilizando únicamente el carril correspondiente a la fracción conjunta de DEAE-Biogel, (figura 5-17, sección 5.3.) El porcentaje se obtiene a partir de la intensidad de cada banda. Este porcentaje se utiliza posteriormente para calcular la cantidad de proteína presente y así determinar la estequiometría metal/proteína. En la tabla 5-2 se muestra el porcentaje obtenido para la enzima en cuestión.

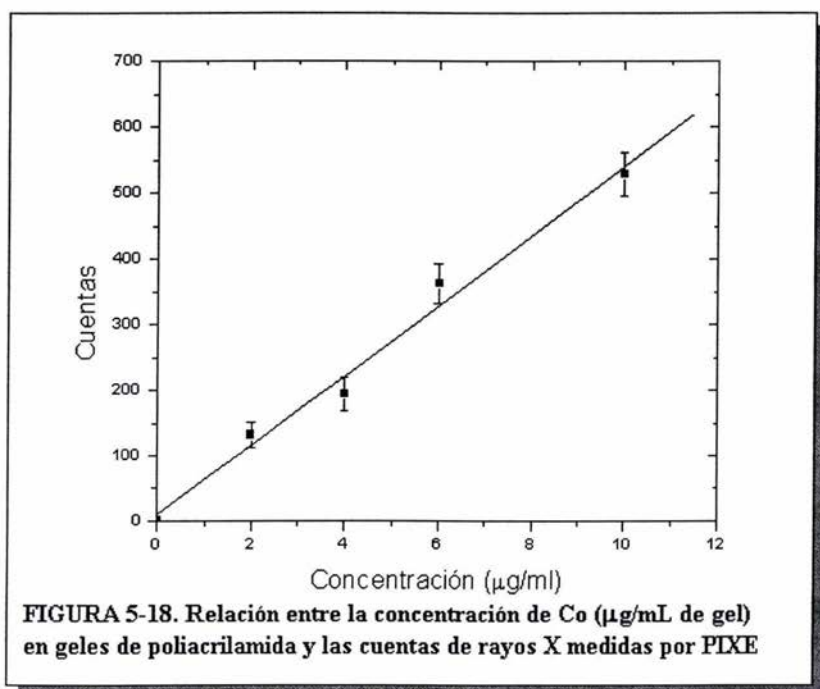
Tabla 5-2. Porcentaje de pirofosfatasa en muestra purificada, obtenido por densitometría

Tipo de bandas	Banda	Intensidad de banda	Intensidad total de bandas de actividad	% Total de las de bandas actividad	% Individual con respecto al total de bandas actividad
Contaminantes	1	3845	306560	60	
	2	16744			
	3	40605			
	4	117005			
Actividad PPasa	B1	28980	306560	60	9.5
	B2	82492			26.9
	B3	83911			27.4
	B4	111170			36.3

La B1 a veces no aparecía en los geles a los que se les realizaba actividad de pirofosfatasa, debido quizá al tiempo de reacción o al del revelado ya que estos factores son de suma importancia para la visualización de las bandas de actividad.

5.5. Geles de calibración

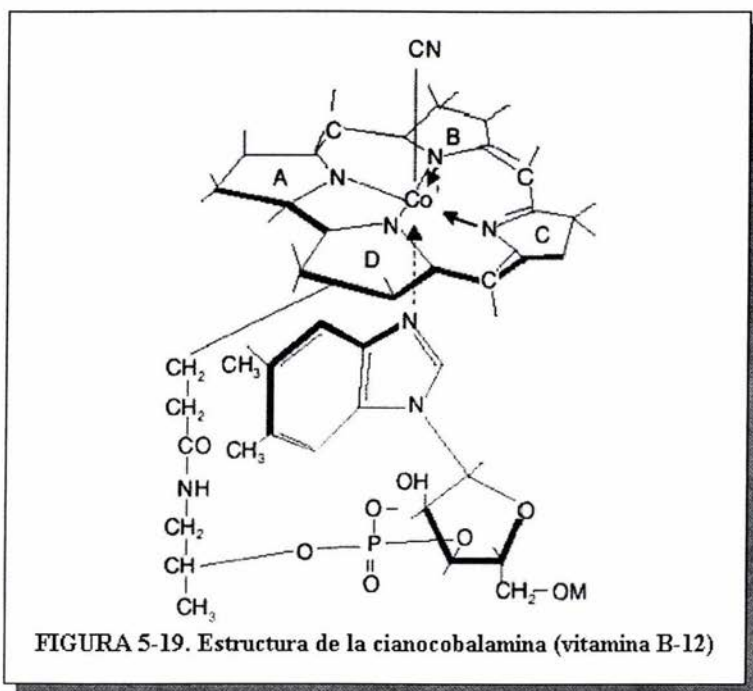
En la figura 5-18 se muestra la relación entre la concentración de Co en $\mu\text{g/mL}$ y las cuentas de rayos X. En el rango de concentraciones estudiadas se obtiene una relación lineal. Estas curvas de calibración se generaron cada vez que se analizaron geles de PAGE con pirofosfatasa mediante PIXE para calcular la concentración del metal en las bandas.



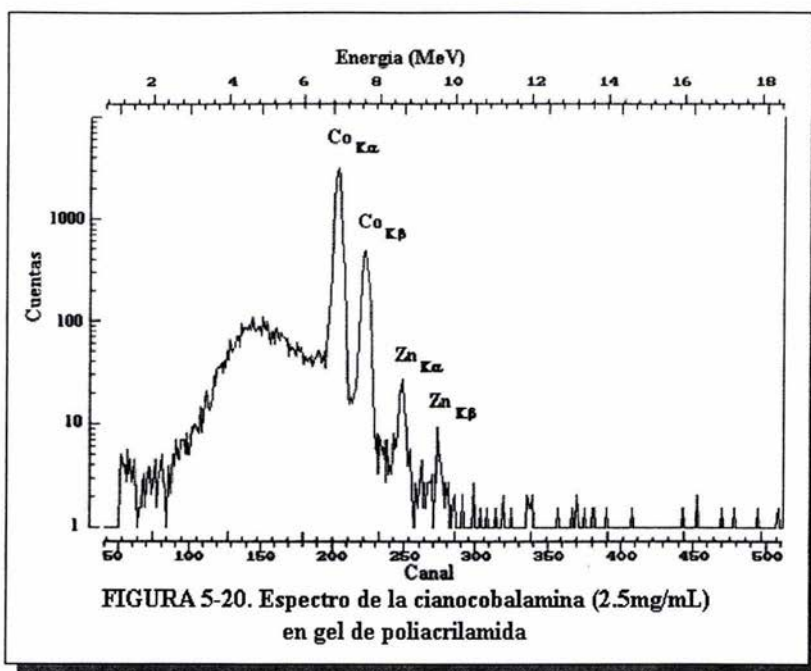
5.6. Análisis de cianocobalamina (vitamina B12) mediante PIXE

La cianocobalamina o vitamina B-12 es una molécula bien caracterizada que contiene Co. Su estructura se muestra en la figura 5-19 donde puede verse que cada molécula (cuyo peso molecular es de aproximadamente 1355 daltons) porta un átomo de Co.

Para verificar que PIXE permite determinar correctamente el Co asociado a esta vitamina, se analizaron geles preparados con cianocobalamina a distintas concentraciones (0.025, 0.25, 2.5 y 5mg/mL).



La figura 5-20 muestra un espectro obtenido mediante el análisis con PIXE de la cianocobalamina ($\mu\text{g/mL}$) embebida en un gel de poliácridamida. Puede verse que además del Co se detecta un pico de Zn proveniente probablemente de alguno de los reactivos utilizados durante la preparación de los geles.



En la tabla 5-3 se muestran los resultados obtenidos para la cianocobalamina. El Co esperado se calcula suponiendo una estequiometría de Co/Cianocobalamina $R = 1$. La concentración de Co se determinó utilizando geles de calibración.

Tabla 5-3. Resultados del análisis de PIXE para la cianocobalamina			
<i>Cianocobalamina en gel</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Co esperado</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Co PIXE</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Co PIXE/Co</i> <i>esperado</i>
25	1.08	1.46	1.34
250	10.86	9.08	0.84
2 500	108.7	108.4	1.00
5 000	218.7	227.3	1.04
Promedio			1.05 ± 0.21

De acuerdo con los resultados obtenidos, a las concentraciones analizadas PIXE nos permite cuantificar la estequiometría. Co/cianocobalamina, ya que el Co determinado mediante PIXE fue muy

parecido al Co calculado suponiendo un Co por vitamina. Los resultados obtenidos muestran que la relación Co/cianocobalamina es muy cercano a 1, lo cual indica que la cianocobalamina posee un Co en su estructura. como lo muestra la figura 5-19. Por lo anterior comprobamos que PIXE nos permite cuantificar metales asociados a moléculas en geles de poliacrilamida.

5.7. Análisis de PPasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* mediante PIXE

La muestra de enzima purificada se colocó en geles de poliacrilamida para su análisis mediante PIXE. En la figura 5-21 se muestra el barrido sobre el gel mediante PIXE. La determinación de Co (en $\mu\text{g/mL}$ de gel*mm) se hizo en un gel conteniendo 200 μg totales de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*. El barrido se realizó con un haz de 1mm x 7mm en pasos de 1mm a partir del borde inferior. Las flechas indican la posición de las bandas en el gel teñido por actividad.

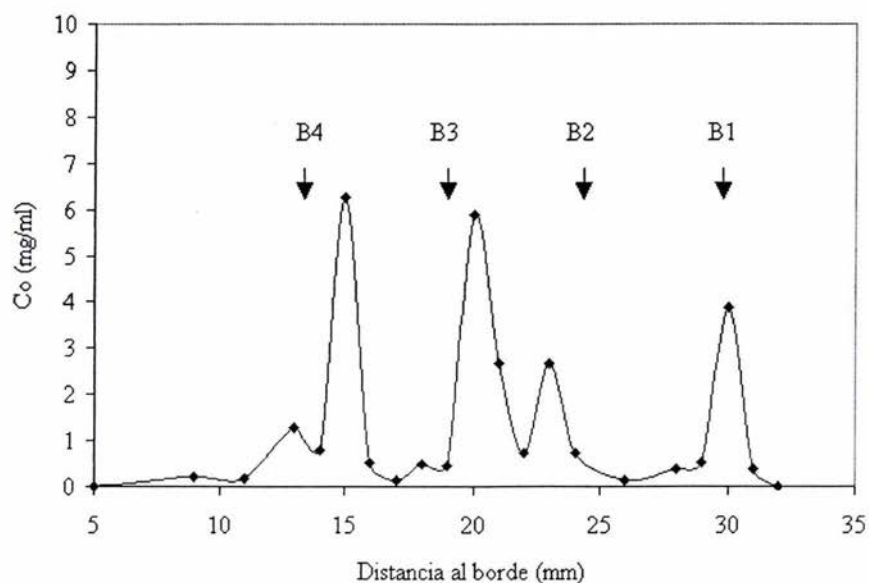


FIGURA 5-21. Barrido sobre el gel mediante PIXE

En la figura 5-22 se muestra el barrido sobre el gel mediante PIXE, pero esta vez la determinación de Co (en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel*mm) se llevó a cabo utilizando un gel con $150\mu\text{g}$ de la muestra de pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*. El barrido se hizo con un haz de $1\text{mm} \times 7\text{mm}$ en pasos de 1mm a partir del borde inferior. La línea continua muestra las tres gaussianas obtenidas al ajustar los datos experimentales. Las flechas indican la posición de las bandas en el gel teñido por actividad.

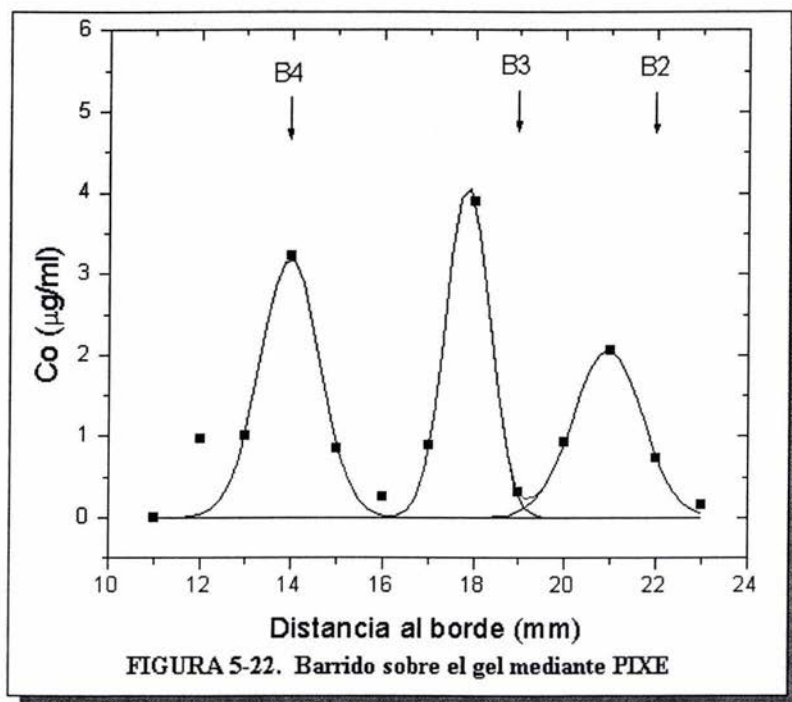


FIGURA 5-22. Barrido sobre el gel mediante PIXE

En la figura anterior (5-22) sólo se cuantificó el cobalto en tres bandas ya que la banda 1 no apareció en el gel de actividad y no se pudo asignar a que distancia se tenía que bombardear con el acelerador de partículas.

Los cálculos para determinar la relación Co/enzima se hicieron usando las ecuaciones de la sección 4.8.2. A continuación se muestra un ejemplo de cálculo para la banda 4 del gel de 200µg:

$$N_{\text{átomos}} = \frac{N_{\text{av}}(\text{at} / \text{mol}) \cdot S(\mu\text{gmm} / \text{mL}) \cdot V(\text{mL} / \text{mm}) \cdot 10^{-6}}{A_{\text{átomos}}}$$

$$N_{\text{átomos}} = \frac{6.023 \times 10^{23}(\text{at} / \text{mol}) \cdot 21.3 \times 10^3(\mu\text{g} \cdot \text{mm} / \text{mL}) \cdot 5.25 \times 10^{-6}(\text{mL} / \text{mm})}{58.93 \times 10^6(\mu\text{g} / \text{mol})} = 11.4 \times 10^{14} \text{Co}$$

$$N_p = \frac{N_{\text{av}}(\text{moleculas} / \text{mol}) \cdot M_p(\text{g}) \cdot 10^{-6}}{A_p(\text{g} / \text{mol})}$$

$$N_p = \frac{6.023 \times 10^{23}(\text{moleculas} / \text{mol}) \cdot 43.56 \times 10^{-6}(\text{g})}{66 \times 10^3(\text{g} / \text{mol})} = 3.9 \times 10^{14} \text{Enzimas}$$

*[13]

$$R = \frac{N_{\text{átomos}}}{N_p}$$

$$R = \frac{11.42 \times 10^{14}(\text{Co})}{3.9 \times 10^{14}(\text{Enzimas})} = 2.93 \text{ Co / enzima}$$

La tabla 5-4 muestra la relación de Co/enzima para los geles de 200 y 150µg. Para el gel de 150µg la B1 no se analizó con PIXE debido a que no apareció en el gel de actividad y por lo tanto no se determinó a que distancia tenía que ser bombardeada. Para este experimento se obtuvo una relación estequiométrica promedio de aproximadamente 3 Co/enzima.

TABLA 5-4. Relación estequiométrica Co / enzima para la pirofosfatasa citoplásmica medida con PIXE para dos geles diferentes

<i>Cantidad total</i>	<i>Banda</i>	<i>Área (µg/mL*mm)</i>	<i>Átomos Co x 10¹⁴</i>	<i>No. Enzimas x 10¹⁴</i>	<i>R Co / Enzima</i>
200µg	B1	4.6	6.4	1.1	5.8
	B2	3.7	5.1	2.9	1.8
	B3	8.2	11.3	3.0	3.8
	B4	8.3	11.4	3.9	2.9
Promedio					3.5
150µg	B2	3.9	5.4	2.2	2.5
	B3	10.1	6.9	2.2	3.1
	B4	5.22	7.2	3.0	2.4
Promedio					2.7

En la tabla 5-5 se muestran los resultados obtenidos para el análisis mediante PIXE de geles de 310 y 150µg. Para este barrido se utilizó un haz de 10x5mm el cual abarcaba toda la banda enzimática en el gel, y es por eso que el área aparece constante. Como se observa en la tabla 5-5 los promedios de la relación metal/enzima es muy cercano a 3 metales/enzima.

TABLA 5-5. Relación estequiométrica Co / enzima para la pirofosfatasa citoplásmica medida con PIXE utilizando haz de 10x5mm

<i>Cantidad total</i>	<i>Banda</i>	<i>Área µg/ml*mm</i>	<i>Átomos Co x 10¹⁴</i>	<i>No. Enzimas x 10¹⁴</i>	<i>R Co / Enzima</i>
310µg	B2	37.5	19.2	5.1	3.8
	B3	37.5	12.0	4.7	2.6
	B4	37.5	19.7	6.2	3.2
Promedio					3.2
150µg	B2	37.5	9.31	3.4	2.7
	B3	37.5	4.22	2.2	1.9
	B4	37.5	12.67	2.96	4.3
Promedio					3.0

Los resultados para la enzima purificada que se dializó para tratar de eliminar el cobalto del buffer y posteriormente depositada en filtros de teflón se muestran en la tabla 5-6. En este experimento la enzima dializada mostró una relación de 3 Co/enzima. El error asociado a la determinación de Co en tres réplicas es del orden de 5%. Como era de esperarse la enzima sin dializar tuvo mayor cantidad de

Co, demostrándose que al dializar la enzima se eliminó el Co del buffer, aunque es probable que no se haya eliminado del todo.

TABLA 5-6. Relación estequiométrica Co / enzima para la pirofosfatasa citoplásmica analizadas por PIXE en filtros de teflón

<i>Muestra</i>	<i>Co total en filtro promedio (ng)</i>	<i>Átomos Co promedio $\times 10^{14}$</i>	<i>No. Enzimas $\times 10^{14}$</i>	<i>R promedio Co / Enzima</i>
Buffer con Co	620.00	63.34	0	0.00
Enzima dializada	874.96	89.39	29.8	3.00
Enzima sin dializar	1783.47	181.84	29.8	6.10

La figura 5-23 muestra el espectro de la enzima dializada, en donde claramente se señalan los picos correspondientes al Co. En este espectro se observa la k_{α} y la k_{β} características de este metal mediante el análisis por PIXE.

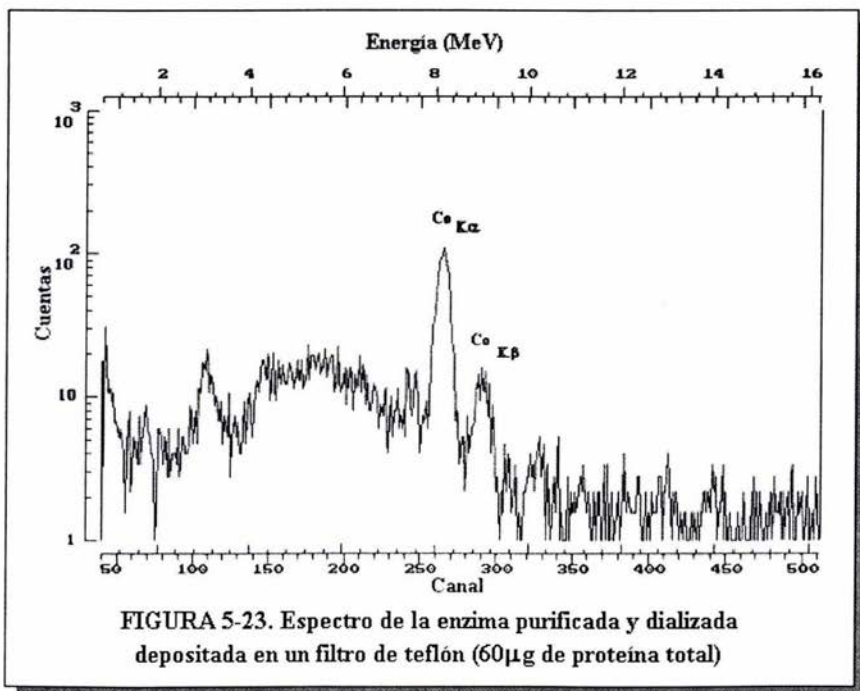


FIGURA 5-23. Espectro de la enzima purificada y dializada depositada en un filtro de teflón (60 μ g de proteína total)

La tabla 5-7 muestra los resultados obtenidos cuando las bandas son extraídas del gel, digeridas con HNO₃ y la enzima es depositada en filtros de teflón (sección 4.7). Como se puede observar en dicha tabla, en las bandas 2 y 3 la relación estequiométrica de Co/enzima es mayor, debido tal vez a que a la extracción de la enzima no fue completa y por lo tanto la cantidad de proteína se redujo.

TABLA 5-7. Relación estequiométrica Co / enzima para las bandas obtenidas por PAGE analizadas por PIXE en filtros de teflón

<i>Banda</i>	<i>Co total en filtro (ng)</i>	<i>Átomos Co $\times 10^{14}$</i>	<i>No. Enzimas $\times 10^{14}$</i>	<i>R Co / Enzima</i>
B2	1337.89	136.68	27.36	5.00
B3	857.29	84.4	36.5	2.31
B4	1780.18	181.8	27.36	6.64
Promedio		402.88	91.22	4.4

De acuerdo con los resultados anteriores, se detectó presencia de cobalto en las cuatro bandas de actividad de la enzima. Como se discutió en la sección 5.3.2 estas cuatro bandas no son fragmentos activos de la enzima producto de la acción de proteasas, por lo que tal vez se trate de isoformas activas de esta enzima.

A excepción de las bandas depositadas en los filtros de teflón, los resultados obtenidos con los diferentes barridos de los geles de poliacrilamida y la enzima dializada y depositada en filtros de teflón han mostrado que la tendencia de la relación estequiométrica es de 3 Co/enzima. La estequiometría o cantidad de Co por proteína para esta enzima no ha sido reportada, siendo ésta la primera vez que se propone tal dato. Sin embargo, se tiene reportado que para la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodospirillum rubrum*, enzima con Zn como cofactor metálico, se tiene una estequiometría de aproximadamente 2 Zn/enzima [21]. La diferencia en las estequiometrías de ambas pirofosfatasas indica que aunque tengan la misma función, probablemente no existe una regla que determine el número de cofactores metálicos que deban tener las pirofosfatasas.

Por otra parte sería bueno realizar estudios de cofactores metálicos de pirofosfatasas de diferentes organismos, los cuales podrían servir para saber que tanto afecta la naturaleza del cofactor o el número de cofactores a este tipo de enzimas.

Es necesario realizar mas experimentos de metales asociados a biomoléculas con diferentes estrategias de preparación de muestra para una óptima aplicación de PIXE a este tipo de estudios, y así determinar que estrategia ofrece mejores resultados para detectar y cuantificar cofactores metálicos asociados a biomoléculas.

6. CONCLUSIONES

- El estudio mediante PIXE de la cianocobalamina embebida en geles de poliacrilamida permitió obtener una estequiometría de 1Co/cianocobalamina, mostrando que ésta técnica permite cuantificar metales asociados a este tipo de moléculas.
- PIXE permitió también detectar y cuantificar el cobalto asociado a la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus* a diferentes concentraciones de enzima en geles de poliacrilamida.
- La estequiometría propuesta para el cobalto asociado a la pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobacter capsulatus*, la cual se obtuvo del análisis de distintas preparaciones, es de tres cobaltos por enzima. En algunas preparaciones la estequiometría fue de 4Co/enzima.
- En geles de poliacrilamida nativos se encontraron cuatro bandas con actividad de PPasa, las cuales tienen un promedio de 3Co/enzima. Es probable que estas bandas corresponden a isoformas de la misma enzima.
- Todos los aspectos experimentales de este trabajo son susceptibles de perfeccionamiento y de esta manera la técnica de PIXE abre una vía novedosa de investigación en el estudio de metales asociados a enzimas en geles de poliacrilamida mediante un análisis directo que hasta el momento no puede llevarse a cabo con otras técnicas convencionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Avaeva, M. *Active Site Interactions in Oligomeric Structures of Inorganic Pyrophosphatases*. Rusia, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1999. pp 1-20.
- [2]. Boyer, R. *Modern experimental biochemistry*. 2ª ed. EUA, Benjamín-Cummings, 1993. pp. 75-76, 82-83.
- [3]. Cohen-Bazire, G., et al. "The kinetic studies of pigment synthesis by non-sulphur purple bacteria" *J. Cell. Com. Physiol.* 49: 25-68, 1957.
- [4]. Colby, D. "Biochemistry: A Synopsis". *Lange Medical Publications*, 1985. pp. 22, 43-55
- [5]. Cuevas, R. *Detección de metales en enzimas y proteínas mediante la técnica de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE)*. México, Facultad de ciencias, UNAM, 1999. pp. 1-39.
- [6]. David, N., Cox, M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 3ª ed. EUA, Worth Publishers, 2000, pp 130-137, 243-246.
- [7]. Halliday, D., Resnick, R. y Krane, K. *Física*. México, Edit. CECSA, 1997. p. 691.
- [8]. Hames, B.D., Hooper, N.M. *Biochemistry*. 2ª ed. EUA, Edit. Springer-Verlag, 2000. pp. 50-52, 54-55.
- [9]. Imhoff, J. "The anoxygenic phototrophic purple bacteria" en Boone, D. y Castenholz, R., *Bergey's of systematic bacteriology: the archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria*, Vol. I, EUA, Edit. Board, 2001. pp. 631-637.
- [10]. Johansson, A. Campbell, J. Malmqvist, K. *Particle-Induced X-Ray Emission Spectrometry (PIXE)*. EUA, edit. John Wiley & Sons, 1995. pp. 1-31.

- [11]. Johansson, A. Campbell, J. *PIXE: A Novel Technique for Elemental Analysis*. EUA, Edit. Jonh Wiley & Sons, 1988. p. 11-16, 177-182.
- [12]. Klemme, J., Gest, H. "Regulation of cytoplasmic Inorganic Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*." *Eur. J. Biochem.* 22: 529-537, 1971.
- [13]. Klemme, J., Klemme, J., Gest, H. "Catalytic Properties and Regulatory Diversity of Inorganic Pyrophosphatases from Photosynthetic Bacteria." *Journal of Bacteriology.* 108: 1122-1128, 1971.
- [14]. Koltay, E. *Particle induced X-ray emission: basic principles, instrumentation and interdisciplinary applications*. Hungría, Institute of Nuclear Research (ATOMKI) of the Hungarian Academy of Sciences. pp. 301-334.
- [15]. Laguna, J. *Bioquímica*. 2ª ed. México, Edit. Fournier, 1969. pp. 25-32.
- [16]. Rodwel et al. *Bioquímica de Harper*. 13ª ed. 1980. pp. 140-165.
- [17]. Roelandts, I. y Weber, G. "Two decades with PIXE spectrometry at the University of Liege." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 240(2):413-424, 1999.
- [18]. Romero, I., Celis, H. "El pirofosfato y la pirofosfatasa. Una opción en la bioenergética". *Ciencia.* 41: 297-305, 1990.
- [19]. Rosas, M. *La electroforesis en geles de poliacrilamida como una herramienta más en el laboratorio*. México, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, I.P.N. pp. 31-35.
- [20]. Scopes, R. *Protein purification: Principles and Practice*. 3ª ed. EUA, Sringer-Verlag, 1994. pp. 46-48, 81-82.
- [21]. Solís, C., Oliver, A., Andrade, E., Ruvalcaba-Sil, J. L., Romero, I., Celis, H., "PIXE analysis of Zn enzymes". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research.* B150:222-225, 1999.

- [22]. Stryer, L. *Bioquímica*. 4ª ed. España, Reverté, 1995. pp. 46-50.
- [23]. Szökefalvi-Nagy, “Applications of PIXE in the life sciences” en Schrauzer, *Biological Trace Element Research*. EUA, The Human Press Inc., 1994. pp. 73-78.
- [24]. Szökefalvi-Nagy, Z., Demeter, I., Bagynka, C. y Kovacs, K. “PIXE analysis of proteins separated by Polyacrylamide gel electrophoresis.” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. B22: 156-158, 1987.
- [25]. Thellier, M., C. Ripio, C. Quintana, F. Sommer, P. Chevellier, J. Dainty. “Physical Methods to locate metal atoms in biological systems”. *Methods in Enzymology*. 227:535-589, 1993.
- [26]. Voet, D, Voet, J. *Bioquímica*. España, Omega, 1992. pp. 79-110,347,353.
- [27]. Weber, G., et al. “Quantitative measurement of metal ion concentration of proteins separated by electrophoresis”. *International Journal of PIXE*. 6: 215-225, 1996.
- [28]. Willis, J. P. “XRFS and PIXE: Are they complementary or competitive techniques? A critical comparison”. *Nucl. Instr. and Meth*. B35: 378-387, 1988.
- [29]. cams.llnl.gov/microprobe/pixe.html
- [30]. www.biocenter.helsinki.fi/bi/xray/projects/ppase.html
- [31]. www.mrsec.harvard.edu/cams/PIXE.html
- [32]. www.uam.es/otroscentros/cmam/espanol/tecnicas/node7.html
- [33]. www.uam.es/otroscentros/cmam/espanol/acelerador/acelerador.html

8. ÍNDICE DE FIGURAS

3-1. Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE)	16
3-2. Transiciones permitidas para el relleno de vacancias en átomos medios y pesados	17
3-3. Espectro de PIXE ajustado mediante programas de cómputo	18
3-4. Diagrama del acelerador Peletrón usado para PIXE	18
4-1. Representación esquemática de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	32
4-2. Representación esquemática del gel utilizado para la obtención de las bandas de PPasa	35
4-3. Estrategias para la detección del metal asociado a la enzima	36
4-4. Montaje utilizado para la técnica de PIXE	37
5-1. Espectro de la muestra de bacterias de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	40
5-2. Espectro de la cepa pura de <i>Rhodobacter capsulatus</i>	41
5-3. Actividad específica en tubo de pirofosfatasa citoplásmica para el extracto crudo y el dializado	42
5-4. Gel de actividad de pirofosfatasa citoplásmica	43
5-5. Actividad de las fracciones de Sephacryl s-200	44
5-6. Actividad específica de la fracción conjunta de Sephacryl s-200	45
5-7. Gel de actividad para la fracción conjunta de Sephacryl s-200	46
5-8. Actividad fracciones de la columna DEAE-Biogel	47
5-9. Actividad específica para las fracciones seleccionadas de DEAE-Biogel	48
5-10. Gel de actividad para las fracciones conjuntas de DEAE-Biogel	49
5-11. Actividad específica utilizando PMSF y TPCK	52
5-12. Gel de actividad para el extracto crudo y dializado utilizando PMSF y TPCK	52
5-13. Gel de actividad con <i>p</i> -nitrofenil fosfato como sustrato	53
5-14. Actividad en tubo de las fracciones DEAE-Biogel	54
5-15. Actividad específica de la fracción conjunta DEAE-Biogel utilizando PMSF y TPCK	54
5-16. Gel de actividad para la fracción conjunta de DEAE-Biogel utilizando PMSF y TPCK	55
5-17. Gel teñido con plata para el extracto crudo y la fracción conjunta DEAE-Biogel utilizando PMSF y TPCK	56
5-18. Relación entre la concentración de Co ($\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel) en geles de poliacrilamida y las cuentas de rayos X medidas por PIXE	58
5-19. Estructura de la cianocobalamina (vitamina B-12)	59
5-20. Espectro de la cianocobalamina ($2.5\text{mg}/\text{mL}$) en gel de poliacrilamida	60
5-21. Barrido sobre gel mediante PIXE	61
5-22. Barrido sobre gel mediante PIXE	62
5-23. Espectro de la enzima purificada y dializada depositada en un filtro de teflón ($60\mu\text{g}$ de proteína total)	65