

25  
No 127

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA.

Acerca de la compartimentalización de las reacciones de oxidoreducción en el Centro de Reacción de la bacteria fotosintética - Rhodospseudomonas spheroides.

TESIS PROFESIONAL.

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO.

PRESENTADA POR:

Rubén Salcedo Hernández

Ciudad Universitaria

1982.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## RECONOCIMIENTOS

¿ Acaso podría saber en cuanto estoy agradecido con todas y cada una de las personas que me rodean ?.

Este trabajo ha sido el producto de tres años de labores, el primero de los cuales recibí un importante entrenamiento por parte del M. en C. Heliodoro Celis S. y de la Dra. Marieta Tuena de G. del CIFIC de la UNAM, con el cual fui introducido al apasionante mundo de la Investigación Científica en la Bioquímica. Para el segundo año, - - aproximadamente, recibí apoyo económico por parte del CONACyT y de la UNAM, a través del convenio UNAM-CONACyT de Becas, espero haber cumplido con el compromiso adquirido con estas instituciones.

No solo mis asesores fueron importantes sino también todos mis compañeros de este Centro, gracias a los cuales es posible estudiar y trabajar en armonía.

En la etapa final del desarrollo de esta tesis tuvieron un importante papel, y por lo cual estoy muy agradecido, la Dra. Ana María - - Cetto Kramis, el M. en C. Victor Manuel Valdez López y el Dr. Alfonso Torre Blanco, además de mis asesores, ya que revisaron, criticaron y corrigieron el manuscrito original y gracias a sus consejos pude darle una mejor presentación a mi trabajo.

Resultaría ocioso tratar de expresar en pocas palabras el apoyo de mis padres y hermanos, no obstante tengo la certeza de que ellos lo saben perfectamente.

## INDICE.

1. Introducción
  - 1.1. Bacterias fotosintéticas, sistemática y organización celular.
  - 1.2. El aparato fotosintético, pigmentos antena y Centro de Reacción.
    - 1.2.1. Fases de la Fotosíntesis.
    - 1.2.2. Unidad fotosintética y los fenómenos mas rápidos de la Fotosíntesis.
    - 1.2.3. El Centro de Reacción y la Era Fotoquímica.
  - 1.3. De los anticuerpos y de su utilidad.
  - 1.4. Bibliografía.
  
2. Material y Métodos.
  - 2.1. Aislamiento de Cromatóforos.
  - 2.2. Purificación del Centro de Reacción a partir de Cromatóforos.
    - 2.2.1. Cepa silvestre.
    - 2.2.2. Cepa R-26.
  - 2.3. De los ensayos con el Centro de Reacción.
    - 2.3.1. Estudios Cinéticos.
      - 2.3.1.1. Blanqueo 585-600.
      - 2.3.1.2. Oxidación del Cit. C.
    - 2.3.2. Espectros de absorción, absoluto y diferencial.
  - 2.4. Inmovilización del Cit. C.
  - 2.5. Bibliografía.
  
3. Resultados.
  - 3.1. Funcionalidad y pureza del Centro de Reacción.
    - 3.1.1. Espectros de absorción.
      - 3.1.2. Electroforesis del Centro de Reacción.
  - 3.2. Propiedades inmunológicas del Centro de Reacción y sus subunidades.
  - 3.3. Reacciones de óxido-reducción.
    - 3.3.1. Relación CR-Cit. C.
      - 3.3.1.1. Efecto de los detergentes y la Fuerza iónica.
      - 3.3.1.2. Efecto de los Anticuerpos anti-CR.
    - 3.3.2. Oxidación del Centro de Reacción por Ferricianuro de Potasio.
  - 3.4. Bibliografía.
  
4. Discusión y conclusiones
  - 4.1. Bibliografía.

- 5 Apéndices.
- 5.1 Cultivo y medios de cultivo.
  - 5.1.1. Crecimiento en medio sólido.
  - 5.1.2. Crecimiento en medio líquido.
- 5.2 Curva de crecimiento.
- 5.3. Electroforésis en gel de Poliacrilamida en presencia de SDS.
  - 5.3.1. Eliminación de sales por filtración molecular.
  - 5.3.2. Eliminación de detergentes por extracción orgánica.
- 5.4. Obtención de anticuerpos.
  - 5.4.1. Obtención de antisuero.
  - 5.4.2. Del ensayo por doble inmunodifusión.
  - 5.4.3. Purificación de gamma-globulinas.
    - 5.4.3.1. Purificación por intercambio catiónico.
- 5.5. Espectros de absorción de los filtros usados y de emisión de la lámpara del cuarto de purificación.
- 5.6. Bibliografía.

Abreviaturas.

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
Bcl	Bacterioclorofila
Cit.	Citocromo
CR	Centro de Reaccion.
DEAE-Cel.	Dietilaminoetilcelulosa.
DO	Densidad optica
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
LDAO	Oxido de laurildimetilamina
NAD	Nicotinamina adenindinucleotido
NADP	Nicotinamina adenindinucleotidofosfato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Hidroximetil aminoetano.

## RESUMEN.

La fotosíntesis comprende muchos aspectos, de entre los cuales el estudio desde el punto de vista de la Bioquímica es el que aquí abordamos. Aun restringiéndose al estudio bioquímico de la fotosíntesis nos enfrentamos a un enorme panorama, por lo que solo se ha planteado el estudio del Centro de Reacción de la bacteria Rhodopseudomonas spheroides, que es el lugar en donde se llevan a cabo las reacciones que transforman la energía luminosa en una energía químicamente aprovechable. Se dan las características del Centro de Reacción, especulándose alrededor de algunas de ellas, y con base en estas se diseñaron y elaboraron los experimentos aquí presentados, conformándose un modelo de como podrían estar organizados los componentes de dicho complejo.

## 1. Introducción.

La fotosíntesis es el proceso de transformación de la energía luminosa en energía química; es además la principal fuente de energía de la biosfera y casi el único mecanismo por el cual se mantiene el flujo de energía en los diferentes ecosistemas.

De la enorme energía luminosa que incide en la biosfera solo un pequeño porcentaje es capturada. Sin embargo la transformación de esta energía es sorprendentemente eficiente y puede llegar a valores cercanos al 100%, en los fenómenos de transferencia de energía entre moléculas de clorofila, sin embargo en los eventos posteriores observamos eficiencias de un 30% a un 20% (5), siendo aún muy altos. Es por esto que es importante estudiar los procesos fotosintéticos y los flujos de energía que en ellos se realizan.

El estudio de los procesos fotosintéticos ha sido abordado desde muchos puntos de vista, que van desde el complejo nivel ecológico hasta el nivel puramente físico, pasando por enfoques intermedios como el celular, el bioquímico o el de la biología molecular. En cualquiera de estos marcos es también posible estudiar una multitud de organismos que fotosintetizan, y se encuentran niveles de organización y complejidad que varían en gran medida.

El tema central de este trabajo, abordado desde el punto de vista bioquímico y en bacterias fotosintéticas, fue el estudio topográfico de las reacciones fotoquímicas que se llevan a cabo en los Centros de Reacción (CR). El CR es el lugar en donde se transforma la energía contenida en las clorofilas a manera de excitación electrónica, en un potencial de óxido-reducción.

Las bacterias fotosintéticas son el sistema del que se han aislado y purificado los CR, se usó la bacteria Rhodospseudomonas spheroides variedades silvestre y R-26. El análisis topológico se realizó usando anticuerpos inducidos en conejo y Citocromo C acoplado a Sefarosa.

Al final se postula un modelo en el cual se propone la localización de los diferentes componentes del CR respecto a la superficie del mismo, la polaridad propuesta se da con base en experimentos reportados en la bibliografía.

## 1.1. Bacterias fotosintéticas, sistemática y organización celular.

Las bacterias fotosintéticas pertenecen al orden Rhodospirillales, y se definen como aquellos procariontes que contienen bacterioclorofila (Bcl) y que son capaces de fotosintetizar usando donadores de electrones diferentes del agua.

Orden: Rhodospirillales.

Suborden: Rhodospirillineae; Contienen Bcl a ó b, en péptidos intramembranales.

Familia: Rhodospirillaceae; Son organismos con crecimiento fotoorganoheterotrófico, que no usan azufre como donador de electrones pues su transporte es cíclico. Se reproducen por fisión binaria.

Género y especie: Rhodospseudomonas spheroides, la variedad silvestre es café o café-verdosa, la membrana interna produce invaginaciones a manera de vecículas, en las cuales se localiza el aparato fotosintético, y que se inducen en cultivos iluminados y en anaerobiosis. Poseen Quinona-10 y los carotenos Esferoidenona y Esferoideno. Es estricta facultativa en la oscuridad. Auxótrofa para Biotina, Tiamina y Niacina. Son de forma aproximadamente esférica de 2 a 2.5  $\mu\text{m}$ , y su pared es Gram-negativa. El ADN es circular y no hay compartimentalización del citoplasma, con sistemas de membrana intracitoplásmicos. Son bacterias que poseen flagelos polares. La variedad R-26 es una mutante que carece de carotenos.

## 1.2. El aparato fotosintético, pigmentos antena y Centros de Reacción

### 1.2.1. Fases de la fotosíntesis.

La fotosíntesis se encuentra arbitrariamente dividida en dos fases; la fase luminosa y la oscura, quedando definida - la primera como la que va desde la captura de la energía luminosa hasta la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi con la concomitante reducción de  $\text{NAD}^+$  en bacterias y  $\text{NADP}^+$  en eucariotes. La segunda se lleva a cabo en un sistema no membranal, se conoce como el ciclo de Calvin-Benson y es en el que se fija el  $\text{CO}_2$

Otra manera de dividir los fenómenos fotosintéticos, a mi juicio mas útil, es la que propone Kamen en 1973 (8), en la que se tomó en cuenta la velocidad a la que transcurren los eventos fotosintéticos además de su localización, adaptandola a nuestro sistema queda, a saber:

a) Era de los fenómenos luminosos  $10^{-15}$  a  $10^{-6}$  seg.

En este rango se incluyen los eventos que van desde la excitación misma de los pigmentos fotosensibles hasta su estabilización, de tal manera que la energía atrapada queda como resonancia de electrones intermolecular para ser transferida al P870.

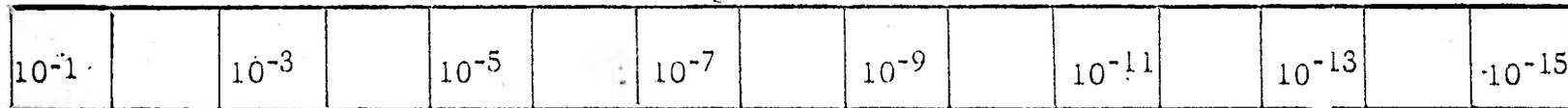
b) Era fotoquímica  $10^{-10}$  a  $10^{-3}$

Los fenómenos aquí incluidos ocurren dentro del CR mismo. Este periodo comprende desde que el P870 excitado pierde un electrón y lo cede al aceptor primario, hasta que el P870 es reducido por Cit. C.

c) Era bioquímica  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$ .

Este periodo incluye el transporte cíclico de electrones, la formación del potencial de membrana, la síntesis de ATP y la reducción del  $\text{NAD}^+$ , y por último la utilización de estos para mantener el metabolismo general. ver figura 1.

segundos



Era de los fenómenos luminosos

Era fotoquímica

Era bioquímica

Transporte de electrones  
síntesis de ATP y NADH  
energía al metabolismo.  
En membrana y citoplasma.

Oxidación del P870 y se -  
reducción por Cit. C. En  
CR en la membrana.

Desde la excitación de los  
pigmentos antena hasta la  
del P870. En membrana

Figura 1

### 1.2.2. Unidad fotosintética y los fenómenos más rápidos de la fotosíntesis

La existencia de una unidad fotosintética fué postulada por Arnold y Emerson en 1932 (6) al medir la cantidad de clorofilas necesarias para obtener una molécula de  $O_2$  y observar que había un exceso de clorofilas por fotón absorbido. En 1936 Gaffron y Cuhon (6) argumentaron que si tal unidad fotosintética no existiera, se debería observar un retardo en el cese de producción de  $O_2$  aún después de terminar el pulso de luz, si este fuera suficientemente intenso para excitar a todas las clorofilas, tal retardo nunca se observó. La unidad fotosintética se definió, entonces, como un complejo de clorofilas dedicadas a la captura de luz (complejo antena) y uno capaz de iniciar la separación de cargas aprovechando la energía capturada (Centro de Reacción).

La era de los fenómenos luminosos se desarrolla en los pigmentos antena, los cuales contienen Bel y carotenos, su peso molecular es de alrededor de 10 000 d y tienden a formar agregados de alto peso molecular entre  $10^5$  y  $1.5 \times 10^5$  d, por lo que se pueden separar por ultracentrifugación en gradiente de Sacarosa. Las funciones de este complejo proteína-pigmento son: aumentar la eficiencia de la captura de electrones y mantener siempre saturado al CR. La excitación de una clorofila del Complejo Antena producida por un fotón puede seguir varios caminos: decaer en fluorescencia, decaer en forma agitación térmica o ser transferida a otra molécula de clorofila, esta transferencia de excitación entre moléculas de clorofila es sumamente eficiente y se lleva a cabo sin pérdida de energía, pudiéndose mediante este mecanismo retener la energía el tiempo suficiente para que el P870 se excite.

### 1.2.3. El Centro de Reacción y la Era Fotoquímica.

La existencia de un CR fue demostrada por Duysens en 1956 (1,7), usando espectroscopia diferencial, al observar un blanqueo rápido de la absorción en la zona de 870 nm y años después Witt y Kar (1,7) descubrieron un fenómeno parecido en cloroplasto a una longitud de onda de 700 nm, el blanqueo a 870 de bacteria y a 700 en cloroplasto son atribuidos a Bel y clorofila dimerizadas (9). En eucariontes la presencia de dos fotosistemas indujo a la búsqueda de evidencias a favor de dos Centros de Reacción y en 1972 Döring y Witt (7,13) encontraron un blanqueo a 682 nm con una cinética de recuperación 100 veces mayor que la del P700, con lo cual se pudieron diferenciar ambos CRs.

El Centro de Reacción de la bacteria *Rhodospseudomonas spheroides*, es un complejo constituido por tres péptidos, cuyos pé

Los componentes moleculares son de 28, 24 y 21 Kd, denominandolas H (pesada), M (media) y L (ligera), respectivamente. Además cuenta con 4 Bcl., dos Bacteriofcofitinas, dos ubiquinodas y un grupo fierro no hemo. Un par de Bcl dimerizada forma el P870 y un agragado fierro-ubiquinona (Fe:Q) constituye el aceptor primario (10, 11). El CR es parcialmente hidrófobo lo cual le permite cruzar la membrana. Por difracción de neutrones se sabe que su forma es aproximadamente ovoidea (16).

En el CR se llevan a cabo los fenómenos de la Era Fotoquímica, al excitarse el P870 por transferencia de los pigmentos antena ó directamente por luz, cede inmediatamente un electrón al aceptor primario, aquí es donde se inicia el transporte de electrones. Mientras tanto el P870<sup>+</sup> es reducido por Cit. C, el cual se reduce, a su vez, por un electrón procedente de la cadena de transporte de electrones, cerrando así el ciclo.

No fue sino hasta 1968 que Reed y Clayton (2) lograron aislar el CR de la bacteria Rhodospseudomonas spheroides R-26 y Ginglas y Jolchine en 69 lo aislaron de Rhodospirillum rubrum G-9. En la actualidad se pueden obtener CR con alto grado de pureza de diferentes bacterias Tabla 1 (3).

La ventaja de contar con preparaciones de CR puras ha permitido conocer mas detalladamente su funcionamiento y su estructura, en la actualidad se sabe que el P870 es un dímero de Bcl por técnicas de Resonancia del Spin del Electrón (ASP) ó Doble Resonancia Núcleo-electrones (ENDOR). El aceptor primario del CR es la entidad que recibe el electrón del P870 excitado, Okamura et al ha propuesto que se trata de un complejo fierro-ubiquinona (2), utilizando evidencia aportada por espectroscopia ESP.

También se ha propuesto un intermediario entre el P870 y el aceptor primario, de vida media muy corta, entre  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$  segundos, cuya función se atribuye a la bacteriofcofitina.

El Centro de Reacción queda definido como la mínima unidad estructural capaz de llevar en su seno la transducción de la energía luminosa en un potencial REDOX.

TABLA 1

Propiedades fotoquímicas de los donadores de electrones  
de tres especies de bacterias fotosintéticas.

Organismo	Donador de electrones Par especial	Cambios máximos al oxidarse el Centro de Reacción	$E_m(v)$
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	P870 Bcl a	-810 -870 +795 +1250	0.45 a 0.5
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	P890 Bcl b	-850 -980 +810 +1370	0.4 a 0.5
<i>Chlorobium sp</i>	P840 Bcl a	-830 -842 +790 +1160	0.25 a 0.35

Tomado de Clyton (7)

### 1.3. De los anticuerpos y de su utilidad.

Los anticuerpos son moléculas glicoprotéicas, cuyas características de alta especificidad las hacen de especial interés en el campo de la Bioquímica (4). su especificidad consiste en la capacidad de reconocer unívoca e inequívocamente a otras moléculas, llamadas antígenos, y de unirse a ellas. Por lo que es posible decir que han sido hechas para reconocer a uno y solo un determinante antigénico, el cual puede ser tan pequeño como una molécula de 2-4 dinitrofenol o tan grande como una fracción protéica de aproximadamente 5 aminoácidos.

No todas las moléculas son capaces de inducir la respuesta inmune y por ello es necesario que se cumplan ciertas características, en seguida: a) que la molécula sea reconocida como extraña al sistema que se está utilizando. b) que sea suficientemente grande. Generalmente se acepta que un peso molecular de 10 000 d en proteínas ofrece un buen antígeno. Cuando se quieren obtener anticuerpos contra una molécula pequeña, se recurre a unirlo con otra más grande, de tal manera que se forme un complejo hapteno-acarreador, siendo el hapteno la molécula pequeña cuya antigenicidad queremos provocar. c) un factor importante es la complejidad estructural, ya que resultan mejores antígenos las moléculas más complejas.

La inmunopotencia es la capacidad de una región de la molécula antigénica de servir como un determinante antigénico, - induciendo la formación de anticuerpos específicos, para lo cual - se requiere que sea accesible al medio acuoso, y en el caso de presentar cargas de superficie su potencia se ve aumentada.

Dada la enorme especificidad de los anticuerpos, estos han sido muy usados en la investigación bioquímica. En este trabajo se usaron para poder diferenciar en condiciones suficientemente suaves, la superficie del interior del CR, de tal suerte que se conservara su actividad. Se aprovechó su especificidad - para, en resumidas cuentas, tener un reactivo que fuera capaz de diferenciar los componentes de nuestro medio de reacción y solo interaccionara con la superficie del CR dejando todos los demás reactantes intactos.

1. 4. Bibliografía.

1. - Clayton, R. K. 1980. Photosynthesis; Physical mechanisms and chemical patterns. Cambridge University Press. Cambridge.
2. - Feher, G. and M. Y. Okamura. 1978. Chemical composition and properties of Reaction Centers. En: The photosynthetic bacteria. Editado por R. K. Clayton y W. R. Sistrom. Plenum Press N. Y.
3. - Ginglas, J. M. 1978. A comparative review of photochemical Reaction Center preparations from photosynthetic bacteria En: The photosynthetic bacteria. Editado por: R. K. Clayton y W. R. Sistrom. Plenum Press. N. Y.
4. - Goodman, J. M. 1978. En Basic & clinical immunologi. Editado por: H. H. Fudenberg, D. P. Stites, J. L. Cadwell & J. V. Wells. Lange. California
5. - Govindjee & Govindjee. 1975. Introduction to photosynthesis. En: Bioenergetis of photosynthesis Editado por: Govindjee Academic Press. N. Y. p22.
6. - Idem p7.
7. - Idem p25.
8. - Kamen, M. D. 1973. Primary processes in photosynthesis. Academic Press. N. Y.
9. - Kats, J. J. & J. R. Norris, Jr. 1973. En: Current topics in bioenergetics. Vol5 Editado por: D. R. Sanadi & L. Porches Academic Press. N. Y.
10. - Okamura, M. Y., L. A. Steiner & Feher. 1974. Biochem. 13(7)p1344.
11. - Steiner, L. A., M. Y. Okamura, A. D. Lopes, E. Moskowtis, & G. Feher. 1974. Biochem. 13(7)p1403.
12. - Truper, H. G. & N. Pfennig. 1978. Taxonomy of the Rhodospirillales En: The photosynthetic bacteria. Editado por: R. K. Clayton & W. R. Sistrom. Plenum Press. N. Y.

13. - Witt, H. T. 1975. Energy consevation in the functional membrane  
En: Bioenergetys of photosynthesis Editado por: Govinjee.  
Academic Press. N. Y.
14. - Cohen-Bazire, G. , W. R. Sistrom. & R. Y. Stanier. 1956.  
J. Cell Comp. Physiol. 49:25.
15. - Lascells, J. 1956. Biochem. J. 62:78.
16. - Sadler, D. M. , H. Celis, A. R. Crofts. 1977. Datos no publicados.

c \_\_\_\_\_

## 2. Material y Métodos

### 2.1. Aislamiento de Cromatóforos.

Es posible aislar la membrana interna de estas bacterias por dos métodos generales; si sometemos a la bacteria a digestión de su pared con enzimas como la Lisozima en un medio isotónico, se obtienen esferoplastos, que es una membrana cuya polaridad es la misma de la bacteria, la otra manera es someter a la bacteria a una tensión mecánica ya sea por un choque de presión o por golpeo sónico, en este caso la polaridad de la membrana es invertida con respecto a la célula. En este trabajo se obtubieron las membranas por sonicación y las vecículas obtenidas son los Cromatóforos, todas las operaciones se hicieron bajo iluminación tenue para proteger los pigmentos fotosintéticos.

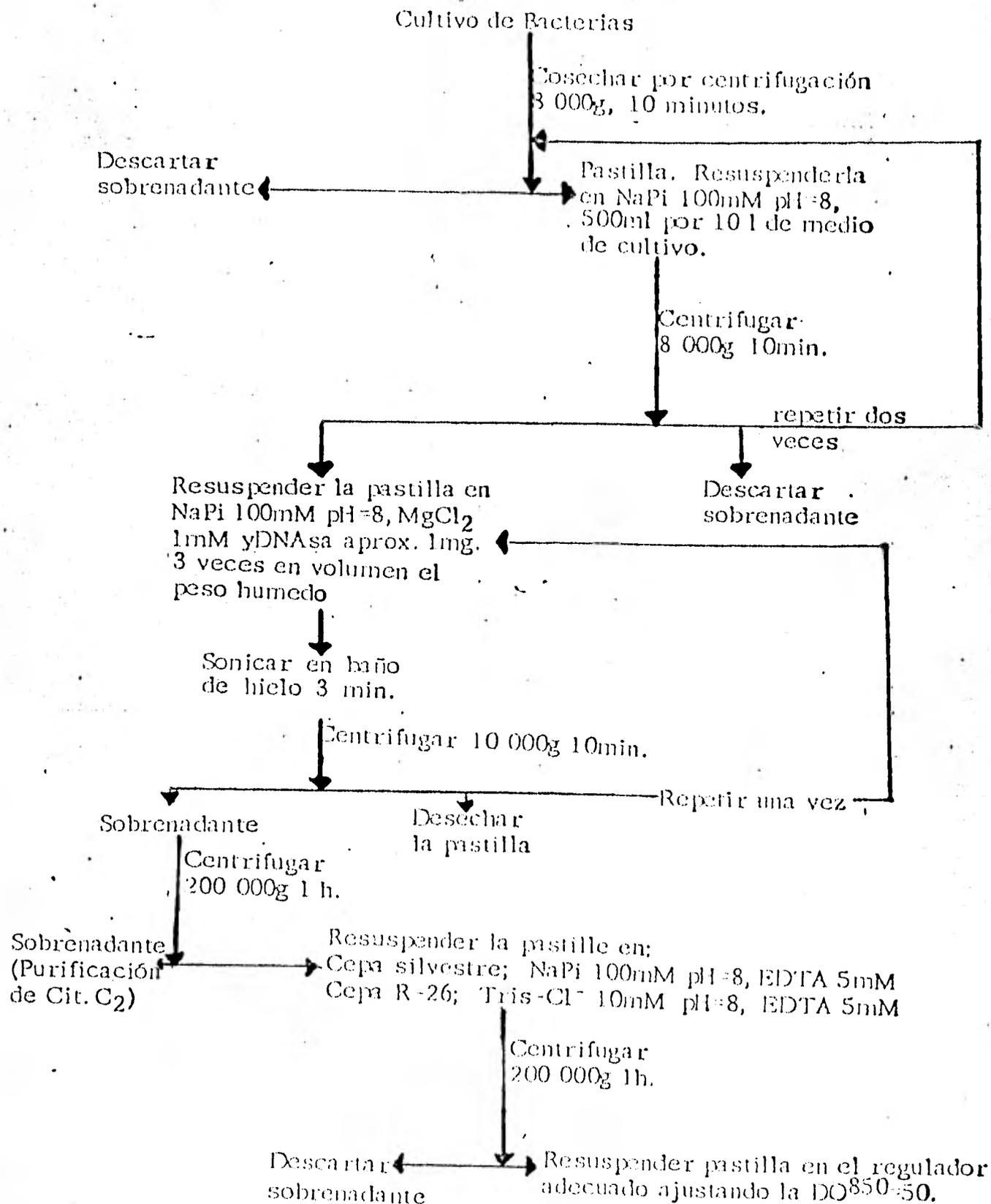
Apartir de bacterias obtenidas como se describe en los apéndices 1 y 2, se comenzó la purificación de los Cromatóforos. Las bacterias se lavaron por resuspensión en un medio regulado por sales del  $\text{PO}_4^-$  100 mM pH=8, y centrifugación a 8000 g durante 10 minutos, este proceso se repitió dos veces, ver Esquema 1. Las bacterias resuspendidas en el medio de fosfatos con un volumen en ml de aproximadamente 3 veces su peso en g, se les añada DNAsa de páncreas de bovino a razón de un microgramo por mililitro e iones  $\text{Mg}^{++}$  de la sal de sulfato o cloruro. Inmediatamente se sonicán en baño de hielo por 3 min. Los restos de pared y bacterias que no fueron rotas se eliminaron por centrifugación a 8 000g por 10 min, el sobrenadante se centrifugó a 200 000g por 1 hora. El precipitado obtenido contiene los Cromatóforos los cuales se depletaron de proteínas extrínsecas de membrana por un lavado resuspendiendo en  $\text{PO}_4^-$  100 mM pH=8, EDTA 5 mM, procediéndose a sedimentar por centrifugación a 200 000g por 1 hora. Los cromatóforos se resuspendieron en el medio adecuado (Esquema 1) y se ajustaron a una  $\text{DO}^{850}=50$ .

### 2.2. Purificación de Centros de Reacción a partir de Cromatóforos.

Las marchas de purificación dependen, en detalle, del tipo de bacterias utilizado (1, 2, 3, 4, 7). En general, el primer paso es fraccionar las membranas con detergentes, solubilizando gran parte de sus componentes. La fracción soluble es tratada ahora, con métodos tradicionales como precipitación por sales, ultracentrifugación, filtración molecular o fraccionamiento por intercambio iónico. A continuación describiremos la metodología usada para la obtención de CR en la cepa silvestre y en la cepa R-26. La descripción se hace detalladamente porque contiene algunas modificaciones que no aparecen en la literatura.

ESQUEMA 1.

Purificación del Centro de Reacción. Parte 1; Cromatóforos.



### 2.2.1. Ceba silvestre.

Los Cromatóforos ajustado a  $DO^{850}=50$ , en un medio de  $PO_4^{=}$  100 mM, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM pH=8 se les añadió un volumen igual de la misma disolución conteniendo LDAO para dar una concentración final del detergente de 0.4%, ver Esquema 2. Todas las operaciones de purificación del CR se realizaron en un ambiente exento de luz actínica y con una iluminación de color verde de baja intensidad, ver lámparas y filtros en el apéndice 5. La adición del detergente se hizo muy lentamente y con agitación suave y continua durante 30 minutos. La suspensión se centrifugó a 200 000g por una hora. El sobrenadante se precipitó con Sulfato de Amonio a una concentración final de 22% añadiendo la sal, en baño de hielo y con agitación lenta y constante, después de 10 minutos se centrifugó a 16 000g por 10 minutos, el levitado se resuspendió en 10 ml del medio original conteniendo 2.0% de LDAO y se dializó contra dos litros del mismo durante, al menos, 24 horas.

El dializado anterior se precipitó sucesivamente con Sulfato de Amonio al 22, 20 y 18% p/v, procediéndose en cada caso como en la primera precipitación. El levitado final se resuspende en el mismo medio y con un mínimo de volumen, los CR se almacenaron a  $-30^{\circ}C$ , pudiendo conservar su actividad durante meses.

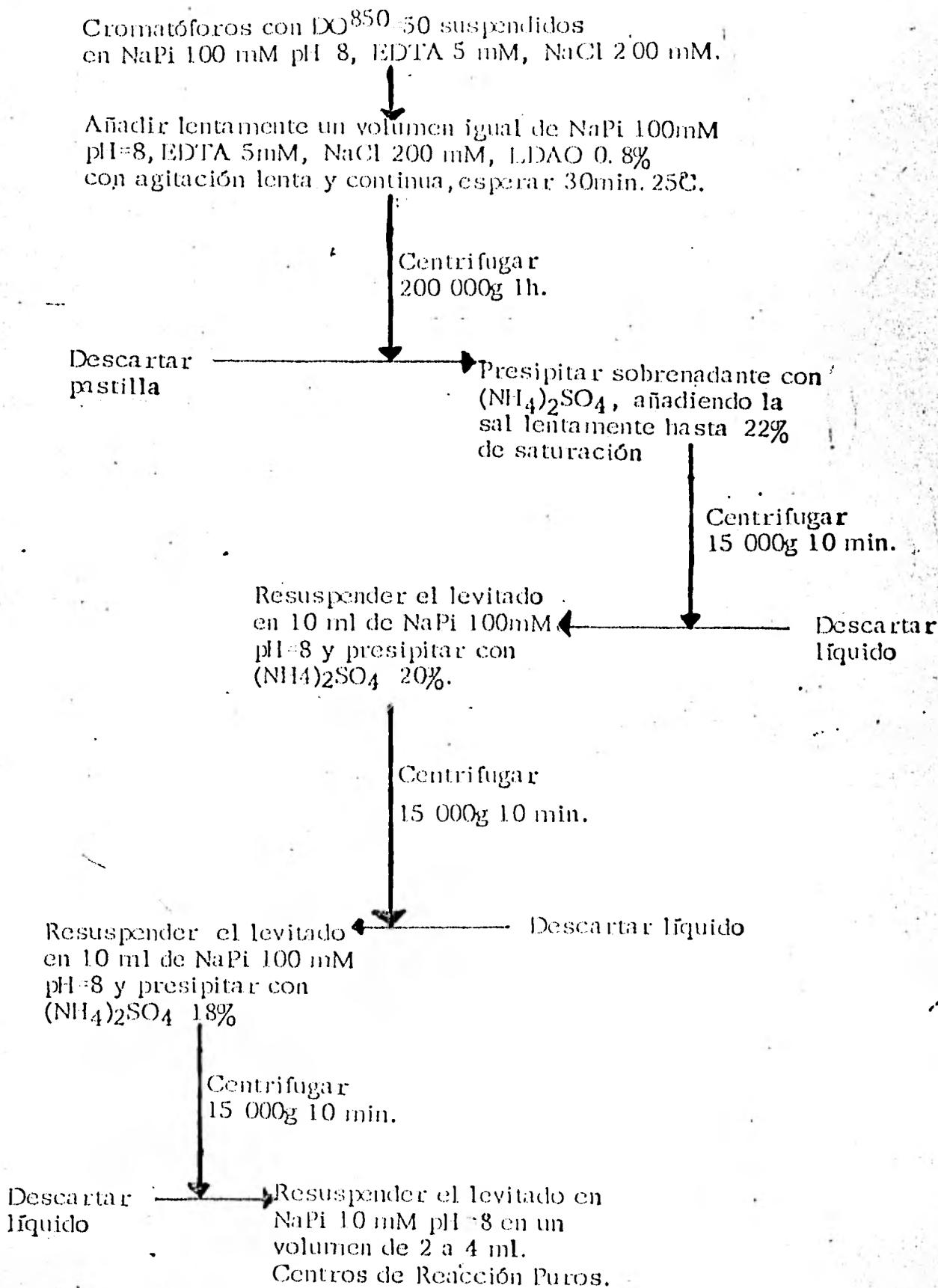
### 2.2.2. Ceba R-26.

Los Cromatóforos ajustados a una  $DO^{850}=50$  en un medio regulado por Tris- $Cl^{-}$  10 mM pH=8, se les añadió gota a gota un disolución de LDAO al 30% hasta una concentración final de 1%. En esta cepa se extremaron las precauciones para la protección de la luz, ya que los CR carecen de Carotenos y las Bcl se oxidan fácilmente. Después de agitar suavemente durante 10 minutos se sometieron a un gradiente de Sacarosa, formado de la siguiente manera: Del volumen total del gradiente se colocaron en el fondo del tubo 4/16 de muestra, con una aguja larga y ancha se depositaron en el fondo 6/16 del volumen total de Sacarosa 0.5 M, Tris- $Cl^{-}$  10 mM pH=8 de tal manera que la muestra se elevó y la Sacarosa quedó en la parte inferior del tubo, la misma operación se repite con 6/16 del volumen total de 1.0 M de Sac. Tris- $Cl^{-}$  10 mM pH=8. El gradiente se centrifugó en un rotor de ángulo fijo a 200 000g durante 90 minutos. La parte superior de la preparación contiene los CR crudos y la interfase entre 0.5 y 1.0 M de Sac. contiene los pigmentos antena.

La purificación de los CR se terminó precipitándolos selectivamente con Sulfato de Amonio en pasos sucesivos de 22, 20 y 18% p/v, como se describió para los CR de la variedad silvestre, utilizando en vez del medio de fosfatos un medio de Tris- $Cl^{-}$  10 mM pH=8.

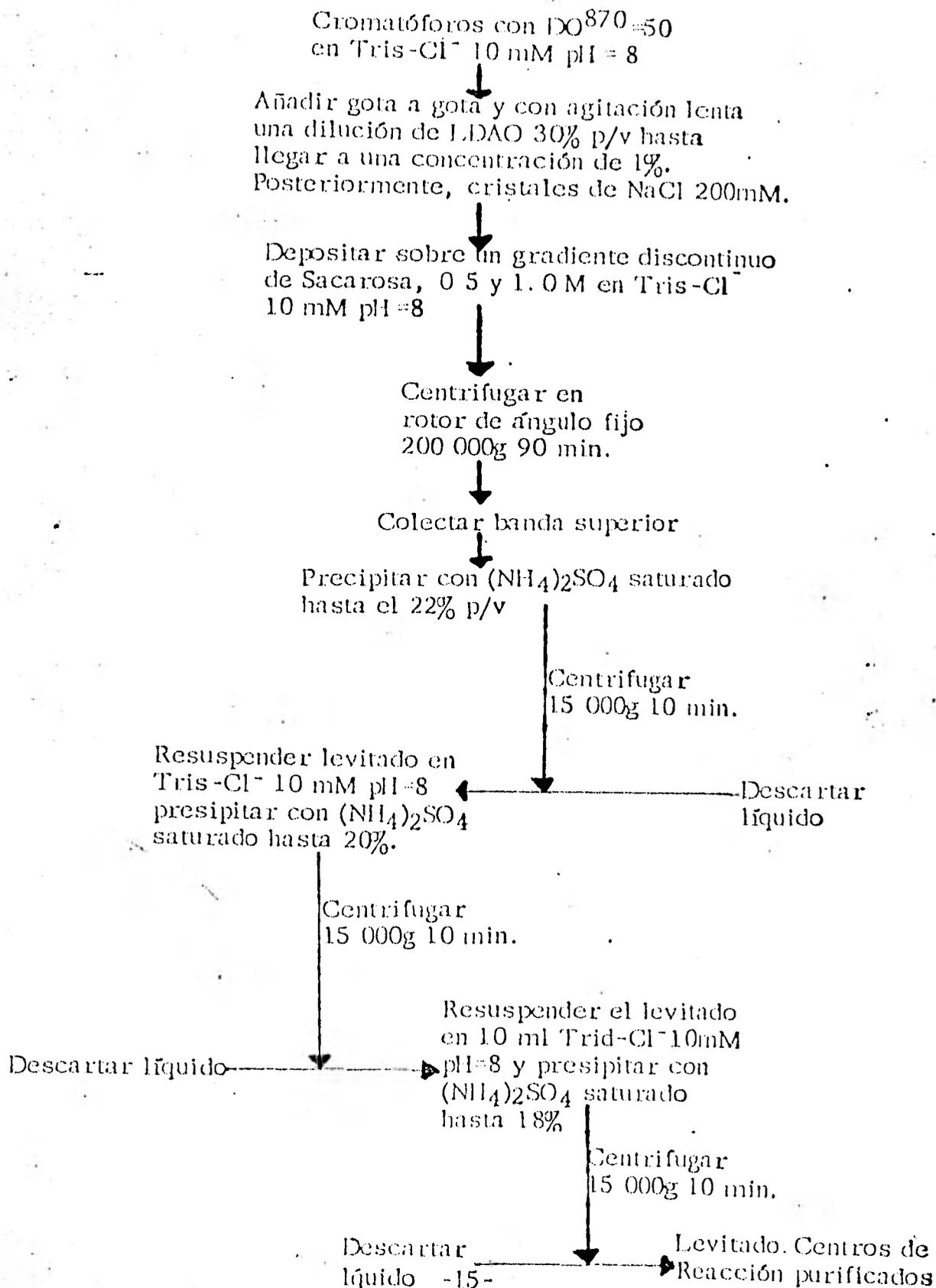
ESQUEMA 2

Purificación del Centro de Reacción Parte 2; Variedad Silvestre



ESQURMA 3

Purificación del Centro de Reacción. Parte 3; Variedad R-26



La pureza de los CR se comprobó siguiendo 3 criterios :

a) El Espectro de absorción del CR oxidado y reducido,

La forma de los espectros de absorción corridos de 350 a 900 nm nos dicen de la pureza de la preparación con respecto a las demás proteínas con clorofilas. La contaminación más frecuente de los CR es por pigmentos antena a los cuales se encuentra estrechamente asociado. El espectro muestra en estos casos un aumento del pico de 870 nm y un blanqueo incompleto del mismo pico al oxidarse el CR con Ferricianuro de Potasio.

b) La relación entre la absorción en 280 y 800 nm expresado como  $DO_{280/800} = 1.2$ .

c) Un patrón de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS que posea tres bandas en la zona de 30 000 d.

Cuando los CR no satisficieron los criterios de pureza, se hicieron pasar por una columna de intercambio iónico de DEAE-Celulosa, como la descrita para la preparación de gamma-globulinas en el apéndice 4, solo que la columna y la muestra se equilibran con Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8, LDAO 0.2% y los CR se eluyeron con NaCl 0.12 M.

## 2.3. De los ensayos con el Centro de Reducción.

### 2.3.1. Estudios Cinéticos.

Es posible medir la funcionalidad del CR estimulado por luz, siguiendo la oxidación del P870 o la oxidación del Cit. C de corazón de bovino. Para seguir estos eventos se procedió de la siguiente manera:

#### 2.3.1.1. Blanqueo 585-600.

En un espectrofotómetro de doble haz AMINCO-DW2a, se ajustó un monocromador a 585 (referencia) y el otro a 600 (máximo cambio), se iluminó con un haz de luz roja actínica, y se colocó un filtro complementario enfrente al fotomultiplicador, de tal manera que éste solo perciba la luz de medida de 585 y 600 nm, ver las figuras 14 y 15 en el apéndice 5.

El CR tiene un máximo relativo de absorción a 600 nm cuando se encuentra en su estado basal, al excitarlo con luz el P870 se oxida y se observa un blanqueo parcial a 600 nm quedando la absorbancia a 585 nm sin cambio, éste punto se llama isobéptico ya que no cambia al oxidarse el P870. Los ensayos se realizaron en un medio de Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8 y la cantidad de CR, detergente y anticuerpos usados se especifican en las figuras y tablas.

#### 2.3.1.2. Oxidación del Citocromo C.

Se colocó en la cubeta de ensayo una alícuota de CR y de Cit. C de Corazón de bovino en una relación 1:10, en un medio de Tris-Cl<sup>-</sup> 10mM pH=8, el detergente y cantidad de anticuerpos se especifica en cada fig. o tabla. El espectrofotómetro de doble haz se ajustó en 540 y 550 nm - Fig. 2-B. Se estimuló con luz, como en el caso anterior, y el Cit. C tiene un blanqueo en 550 al perder un electrón y reducir al P870.

Es importante evitar en lo posible que el Cit. C no presente oxidación espontánea como en la fig. 9-B debida a algún elemento del medio diferente del CR, por lo que es recomendable esperar a que la DO<sup>540-550</sup> se mantenga estable, antes de estimular al CR con la luz.

### 2.3.2 Espectros de absorción absoluto y diferencial.

El CR presenta un espectro de absorción característico en los estados oxidado y reducido por lo que es posible registrar su espectro absoluto y también su espectro diferencial. El espectro absoluto es la relación entre la Densidad Óptica y la longitud de onda, al graficar esta relación se obtiene una gráfica como la de la figura 3 ó 4. Cuando se añade ferricianuro de K<sup>+</sup>

al medio el CR se oxidó y redujo en un punto de la membrana. Por lo que se sabe de más fácilmente el grado de oxidación del CR, se realizó el espectro diferencial, que se lo ajustó a la ley de Beer-Lambert, para que se relacione el CR reducido, la oxidación del CR por el estado oxidado  $\Delta\epsilon$  con la longitud de onda la relación  $\Delta\epsilon$  es debido a la oxidación de la longitud de onda, ver figura 2.

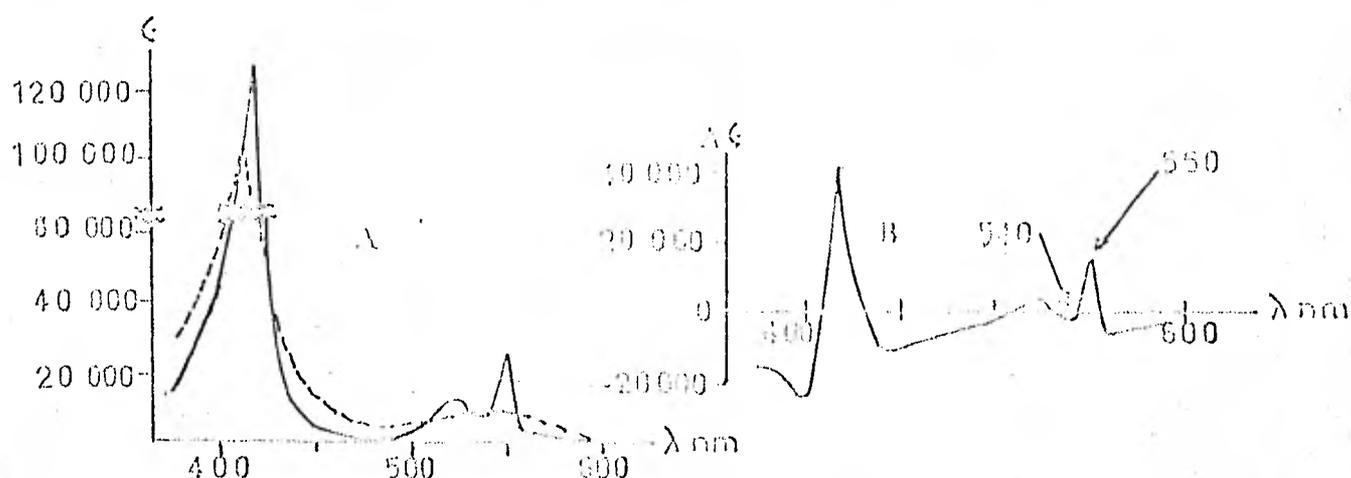


Figura 2

- A. - Espectro de absorción del Citocromo C de corazón de bovino, en estado reducido (línea sólida) y oxidado (línea abierta).
- B. - Espectro diferencial del Citocromo C, Oxidado menos Reducido.

#### 2.4. Inmovilización del Cit. C.

En Biología tenemos muchos ejemplos de reacciones que transcurren a través de interacciones superficie - superficie, de las cuales las más importantes y especializadas son las que se dan en las proteínas, que por su variabilidad y elasticidad son capaces de intervenir en todos los procesos de la vida, realizando funciones tan importantes como el transporte a través de membranas y en el citoplasma, además de su papel específico como catalizadores.

Una de las características de estas macromoléculas es que son capaces de adsorberse específicamente a otras superficies o de adsorber, también con poder discriminatorio, a moléculas pequeñas. Aprovechando esta propiedad se han podido purificar gran cantidad de proteínas, principalmente de naturaleza enzimática, a través de inmovilizar su sustrato o un análogo capaz de ser reconocido pero no modificado por la actividad enzimática. También se han aislado proteínas inmovilizando a otras proteínas, como es el caso de aislar antígenos a través de su fijación a sus anticuerpos específicos.

Una de las dificultades en el aislamiento del CR fue que al solubilizarse la membrana del Cromatóforo con Tritón X-100 el Cit. C<sub>2</sub> aparecía como contaminante. De esta propiedad nos valimos para suponer que sería posible formar un complejo entre el CR y el Cit. C<sub>2</sub> o sea, si el Cit. C se inmovilizaba sería posible unirlo al CR sacándolo de la disolución, ver resultados en la Tabla 2.

La inmovilización del Cit. C se realizó acoplándolo a Sefarosa 4B

activada con Bromuro de Cloruro (3, 9, 10), de Friso, serena;

Das granos de Sulfamida (Sigma Chemical) se lavó y lavó con 100 ml de HCl 0.1 M en un filtro de vidrio poroso, El Cit. C se disolvió en una disolución de Cloruro a 0.1 M pH 8 y en presencia de NaCl 0.5 M a un concentración de 3 mg/ml. La resina se lavó y resuspendió en la misma disolución, añadiéndose posteriormente el Cit. C a una concentración final de 10 mg de proteína por ml de gel lavado y empacado. La mezcla se agitó suavemente durante dos horas a temperatura ambiente, al cabo de las cuales con el objeto de bloquear los grupos de la resina que no reaccionaron con los amino p-aminos de la proteína, se le añadió un volumen igual de una disolución de 0.1 M de Glicina pH 8, agitándose durante otras dos horas. Finalmente se lavó y almacenó en Tris-Cl<sup>-</sup> pH=8.

2. Bibliografía

1. - Codgell, R. J., T. G. Monger y W. W. Parson. 1975. B. B. Acta 408p189.
2. - Codgell, R. J., W. W. Parson y M. A. Kerr. 1976. B. B. Acta 430 p83.
3. - Gingras, G. 1978. A comparative review of photochemical reaction center preparation from photosynthetic bacteria. En: The photosynthetic bacteria Editada por: R. K. Clayton. Plenum Press N. Y.
4. - Clayton, R. K. y R. T. Wang. 1971. Methods in enzymology San Pietro Eds. Vol. 32A p696.
5. - Jolchine, G. y F. Reiss-Husson. 1974. FEBS Lett. 40 p5.
6. - Schachman, H. K., A. B. Pardee y R. Y. Sainer. 1952 Arch. Biochem Biophys. 38p345.
7. - Snozzi, M. y Bachofen. 1979. B. B. Acta 546p236.
8. - Porath, J., R. Axén y S. Ernback. 1967. Nature. 215p1491.
9. - Axén, R., J. Porath y S. Ernback. 1967. Nature 215p1302.
10. - \_\_\_\_\_ Affinity chromatography principles and methos. Farmacia Fine Chemicals.

### 3. Resultados.

#### 3.1. Funcionalidad y pureza del Centro de Reacción.

##### 3.1.1. Espectros de absorción.

El espectro de absorción de los CR purificados indica la presencia de pigmentos tetrapirrólicos; las bandas de 600, 800 y 870 nm son debidas a las 4 Bcl del CR (figuras 3 y 4) y las bandas a 530 y 760 nm las producen las 2 bacteriofeofitinas de CR. En la cepa silvestre se observan además, tres bandas 440, 475 y 505 nm que corresponden al Caroteno (1, 2).

La relación de los picos de las longitudes de onda a 760, 800 y 870 nm de 1:2:1 nos muestra que hay 2 Bacteriofeofitinas (760 nm), 4 Bcl (800nm) de las cuales al dimerizarse nos dan la absorción a 870 nm. Con esto pudimos decir que nuestra preparación se encuentra libre de pigmentos del complejo antena; pues si estos hubieran estado presentes, el pico de 800 nm aparecería con una relación mayor con respecto al pico de 760 nm y el máximo de 870 nm se correría al 850 además de aumentar la absorción y dispersarse la curva. En los espectros de absorción no aparece la zona del ultravioleta cercano, pero la relación medida de la  $DO^{280/800}$  fue igual a 1.22, lo que nos da la relación de proteína/pigmento reportada (3).

Cuando los CR son excitados por luz actínica se producen cambios en el espectro de absorción, cambios que pueden mimetizarse oxidando al CR con Ferricianuro de Potasio. El CR purificado fue oxidado con Ferricianuro y se observó (figuras 3 y 4): un blanqueo parcial a 600 nm, corrimiento hacia el infrarrojo del pico a 760 nm, corrimiento hacia el azul del pico a 800 nm y blanqueo total del pico a 870 nm. Este es el comportamiento normal del CR al perder un electrón el P870, ya sea por excitación luminosa o por reacción con agentes oxidantes suaves. El aumento brusco de la absorción por debajo de 500 nm se debe a la presencia del Ferricianuro.

##### 3.1.2. Electroforesis del Centro de Reacción.

Los CR purificados se sometieron a análisis por electroforesis en presencia de SDS. El patrón electrofrético (figura 5) muestra que los CR que no habían sido depletados de LDAO contiene bandas de 78 y 45 Kd y en la zona de 30 Kd. Las bandas de alto peso molecular corresponden al CR completo (78 000) y las subunidades L y M sin separar (45 000) son debidas a un efecto de "protección" del LDAO contra la desnaturalización por SDS. Cuando el CR fue dializado o sometido a extracción orgánica del detergente por alcohol isoamílico (apéndice 3), la mezcla de digestión entonces sí fue capaz de separar las tres subunidades del CR completamente (figura 5).

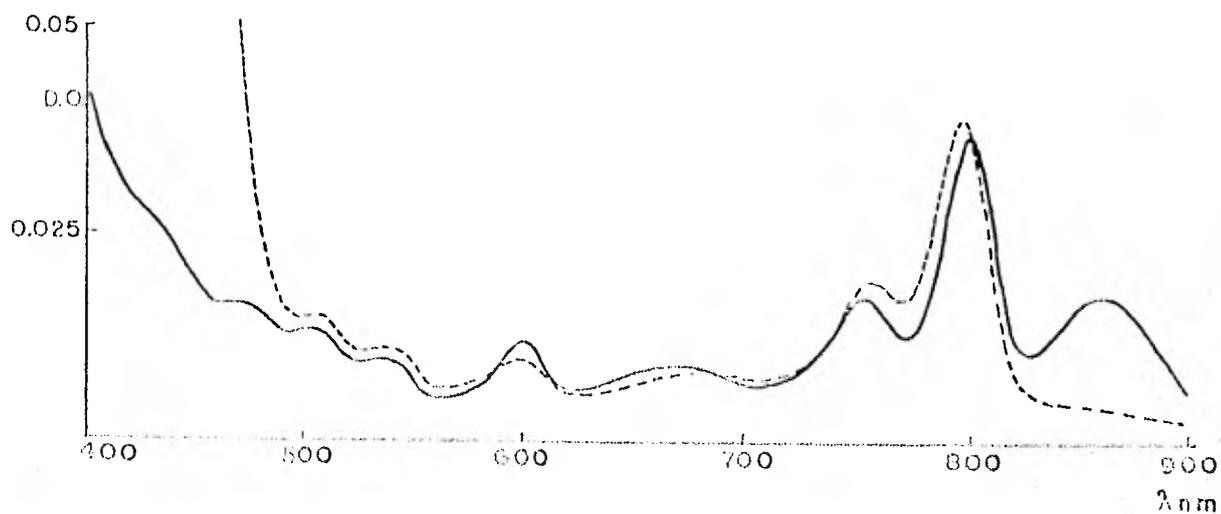


Figura 3  
Espectro de absorción del CR de *Rhodospirillum rubrum* silvestre, de 400 a 900 nm. CR reducido en línea continua y CR oxidado en línea abierta, el CR se oxidó con 4 mM de Ferriccloruro de Potasio, 0.025 mg/ml de proteína en Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8.

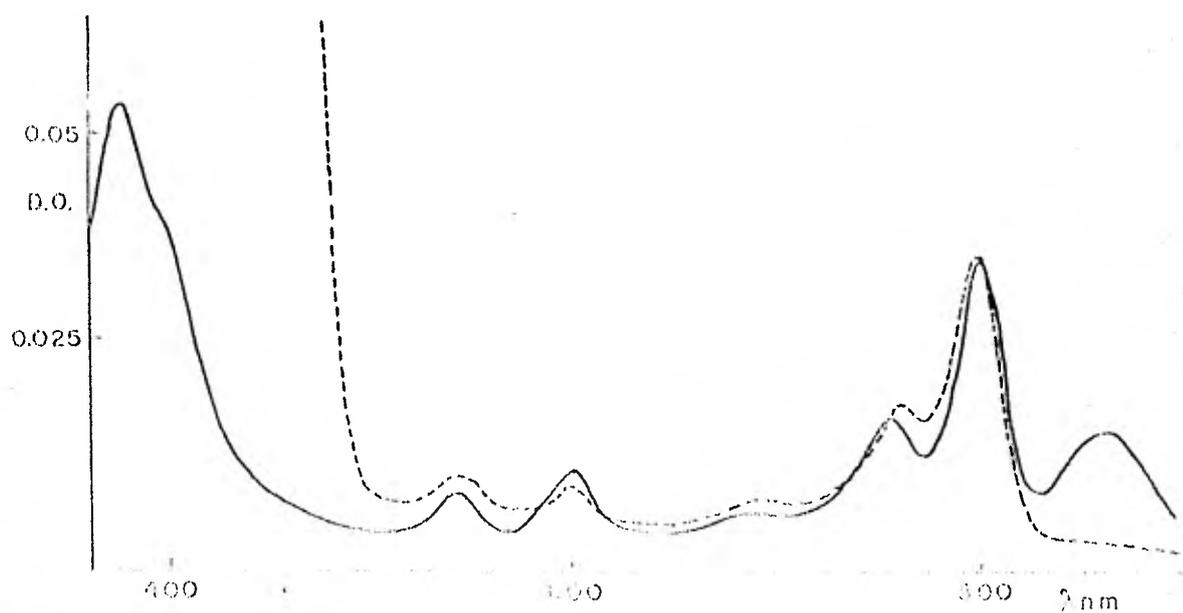


Figura 4  
Espectro de absorción del CR de *R. rubrum* a  $\lambda = 400$  de 350 a 900 nm, en las mismas condiciones de la fig. anterior.

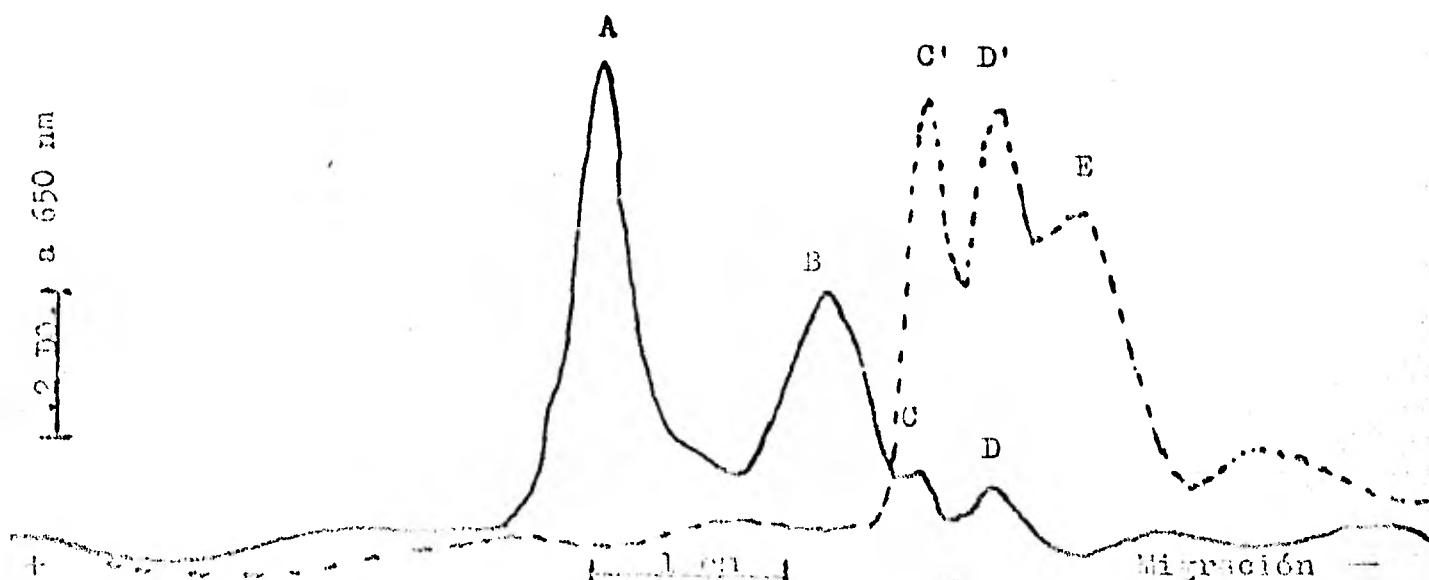


Figura 5

Trazo densitométrico de gels de poliacrilamida teñidos con azul de Coumasie, La línea continua representa las bandas obtenidas después de 24 horas de diálisis, la línea punteada después de 78 horas. Los CR que no fueron dializados presentaron artefactos como la no definición de bandas, en algunas ocasiones. A 78 000. ; B 45 000. ; C y C' 28 000. ; D y D' 24 000. ; E 21 000.

Los pesos moleculares fueron calculados con base en un patrón constituido por: Albumina bovina, Tripsina y Cit.C.

### 3.2. Propiedades inmunológicas del CR y sus subunidades.

La fig. 6 nos muestra que los CR de las cepas silvestre y R-26 no son inmunológicamente distinguibles, pues hay una correspondencia inmunológica total. Cuando los anticuerpos dirigidos contra el CR de R-26 se probó contra las subunidades del CR, todas dieron banda de inmunoprecipitación, lo que nos dice que las 3 subunidades contienen determinantes antigénicos, y por lo tanto las tres subunidades exponen una parte de su superficie al medio acuoso.

Los CR probados fueron aislados por los métodos ya descritos. Las subunidades se obtubieron de un gel poliacrilamida-SDS, por lo que no tienen seguramente su estructura activa. Los anticuerpos dado que fueron inducidos contra un CR cuya estructura era funcional, están dirigidos contra determinantes antigénicos únicamente de la superficie del CR.

La suposición de que los anticuerpos están dirigidos contra la estructura nativa del CR se basa en el hecho de que el adyuvante de Freund es de naturaleza lipofílica y el último diseño por vía intravenosa se hizo en presencia de Desoxicolato de Sodio, el cual es un detergente que mantiene al CR funcional.

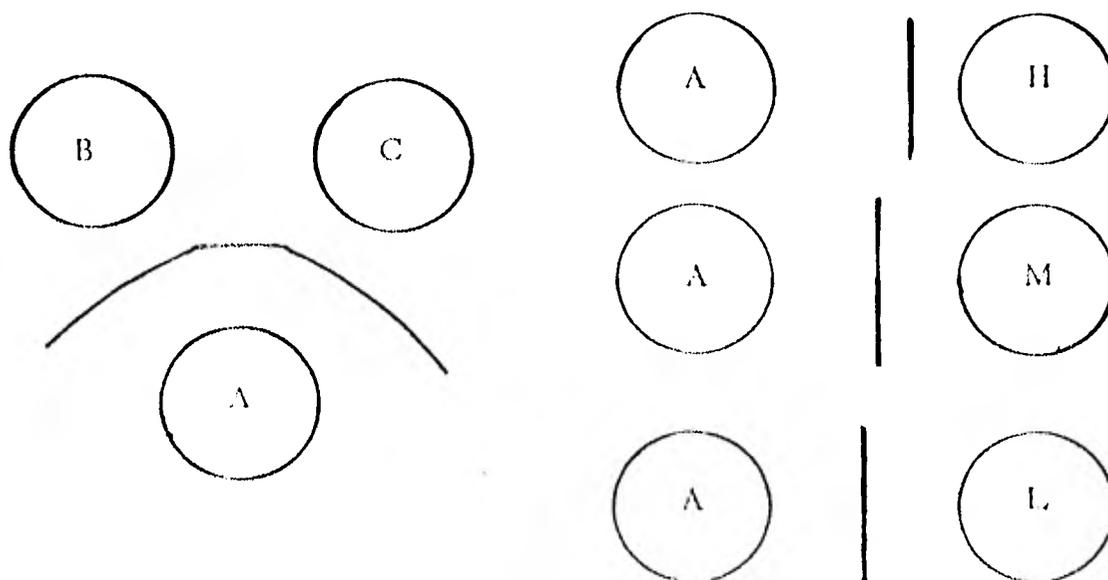


Figura 6

Doble inmunodifusión del Centro de Reacción y anticuerpos Anti-CR. Se corrieron 200 mg de gama-globulinas y 16  $\mu$ g de CR ó 15  $\mu$ g de subunidades. A. -Anticuerpos. B. -CR var. silvestre C. - CR R-26 H. -subunidad pesada 28 000d. M. - subunidad mediana 24 000 d L. -subunidad ligera 21. 000 d.

### 3.3. Reacciones de óxido-reducción.

Los siguientes experimentos fueron diseñados para localizar topológicamente las diferentes funciones llevadas a cabo en el CR, mediante su interacción con surfactantes, Cit. C, Sefarosa-Cit. C y anticuerpos, factores todos ellos que afectan las reacciones que se llevan a cabo en el CR.

#### 3.3.1. Relación CR-Cit. C.

El transporte de electrones en este tipo de bacterias es cíclico y el donador de electrones del CR es el Cit. C. Cuando se extrae al CR de su membrana sigue conservando su actividad y es capaz de excitarse por luz, reducir su aceptor primario y su PS70 oxidado puede a su vez aceptar un electrón del Cit. C. Son múltiples los factores que afectan a todas estas reacciones, pero los mas importantes son: el detergente que se usa para mantener al CR en disolución y la fuerza iónica del medio.

### 3.3.1.1. Efecto de los detergentes y la fuerza iónica.

El Cit. C reacciona a una velocidad y con una cinética que dependen, entre otras cosas, del surfactante que se use y de la cantidad de iones en el medio (4, 5). Cuando la reacción de oxidación del Cit. C por el CR excitado con luz se verifica en un medio en presencia de LDAO la reacción transcurre con una cinética de 2<sup>o</sup> orden y es posible disminuir su velocidad si se añade KCl al medio, a una concentración aproximada de 200 mM (5). En el caso de que la reacción se lleve a cabo en presencia de Tritón X-100 la cinética es de orden cero. La técnica para calcular estas cinéticas es con base en registros rápidos y estímulos con destellos muy cortos e intensos, de sólo algunos microsegundos (4, 5).

En lugar de utilizar destellos cortos, se estimuló al CR durante intervalos amplios (fig. 7). Cuando se usó LDAO se produjo un estado estacionario al estimular al CR, que al apagar la luz de estímulo el Cit. C tiende a regresar a su estado basal. Este estado estacionario puede ser debido a que se forme un ciclo (esquema 4) de oxido-reducción, el cual es roto al apagar la luz.

En el caso de la reacción en presencia de Tritón X-100 (fig. 7), la cantidad de Cit. C oxidado fué mayor y no se mantuvo ningún estado estacionario.

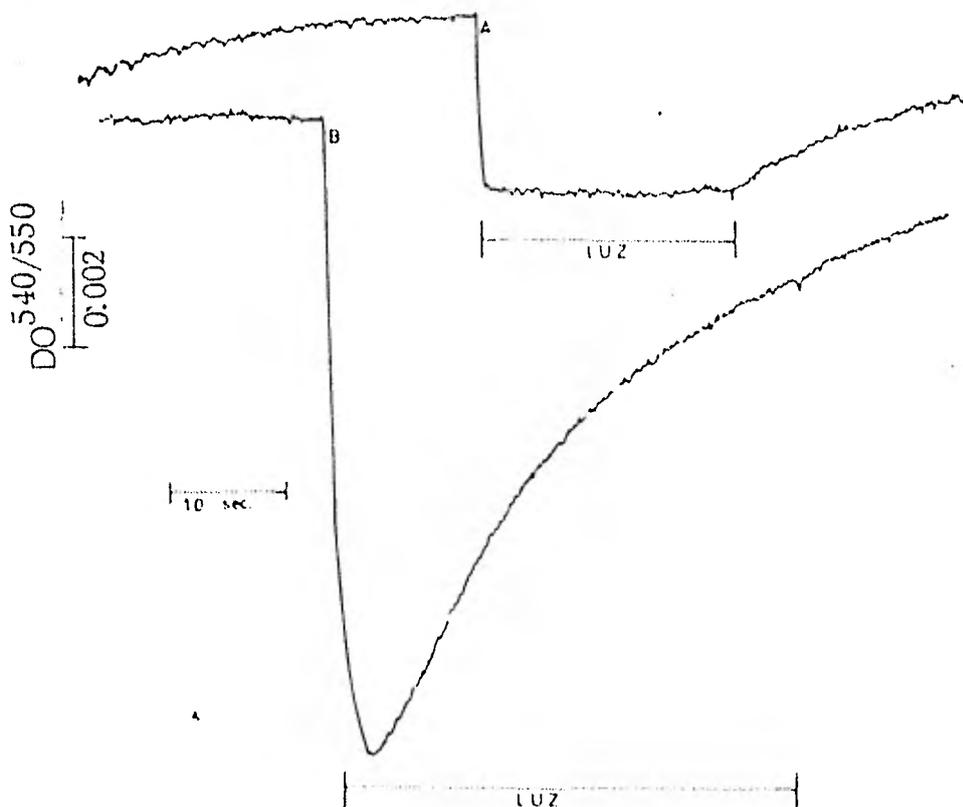


Figura 7. Oxidación del Cit. C por un CR excitado con luz. El ensayo se realizó en un volumen final de 3 ml., en Tris-Cl 10 mM pH=8 y detergente, 50  $\mu$ g de CR DO<sup>800</sup>-0.75, 40  $\mu$ l de Cit. C 7.5 mg/ml. A. - LDAO 0.2% p/v. B. - Tritón X-100 0.1% v/v.

nario lo que nos dice que el transporte de electrones no se efectúa cíclicamente (esquema 5), además el CR se desnaturaliza pues pierde su capacidad de oxidar Cit. C aún después de un nuevo estímulo.

El CR fue capaz de interaccionar con el Cit. C no obstante haber sido unido covalentemente a sefarosa 4B. Como lo muestra la Tabla 2. Esta interacción depende tanto del detergente como de la cantidad de ión en el medio. El tritón X-100 permitió que el CR se pegara a la Sef-Cit. C revirtiéndose tal efecto por KCl 50 mM. El LDAO no permite que el CR

TABLA 2

% de CR en el Condicio- nes del ensayo	LDAO	Tritón X-100	Desoxicolato
CR	100	100	100
CR + Sefarosa	93	108	59
CR + Sefarosa - Cit. C	82	31	61
CR + Sefarosa - Cit. C KCl 50 mM	99	90	74

Tabla 2

Que muestra la relación del Cit. C unido a sefarosa 4B activada con Bromuro de Cianógeno. Se incuban por 5 min. 100  $\mu$ l de sefarosa-Cit C (la sefarosa contiene 10 mg de Cit. C por ml de gel y esta equilibrada con tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH= 8; LDAO 0.6% - Tritón X-100 0.1% o Desoxicolato de Sodio 0.6% según el caso) con 10  $\mu$ l de CR con DO<sup>800</sup>= 0.75, los cuales fueron dializados contra 4 l de Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH= 8 con cambio diario durante 15 días a 4°C. Después de la incubación se lleva la muestra a 3 ml con la disolución reguladora de Tris y el detergente adecuado. El KCl se añade después de la incubación antes de aforar de una disolución de KCl 2.0 M, la concentración de la tabla es la final. La muestra de 3 ml se centrifuga a 2 000 rpm por 3 min. y el sobrenadante se toma para graficar su espectro de absorción desde 400 hasta 825 nm, los porcentajes se dan con base en la máxima absorción a 800 nm, ninguno de los espectros dió muestras de desnaturalización.

se pegue significativamente a la Sef-Cit. C. Resulta un hecho interesante que la reacción CR-Cit. C en tritón X-100 sea de orden cero, y que esto se pueda explicar a través de un complejo CR-Cit. C. En contra posición, la reacción en presencia de LDAO la cinética es de segundo orden, de menor magnitud que en tritón X-100 ( figura 7 ), y el CR no se acompleja con el Cit. C (tabla 2) lo que podríamos interpretar como que el orden de reacción si corresponde a la molecularidad.

### 3.3.1.2. Efecto de los anticuerpos anti-CR.

Los datos anteriores nos sugieren que debe haber una interacción directa entre las superficies del CR y el Cit. C mas estable que un simple encuentro fortuito con un ángulo y una velocidad adecuados, para que puedan reaccionar. Al bloquear la superficie del CR con reactivos tan específicos como los anticuerpos, deberíamos ver una inhibición de la oxidación del Cit. C por CR.

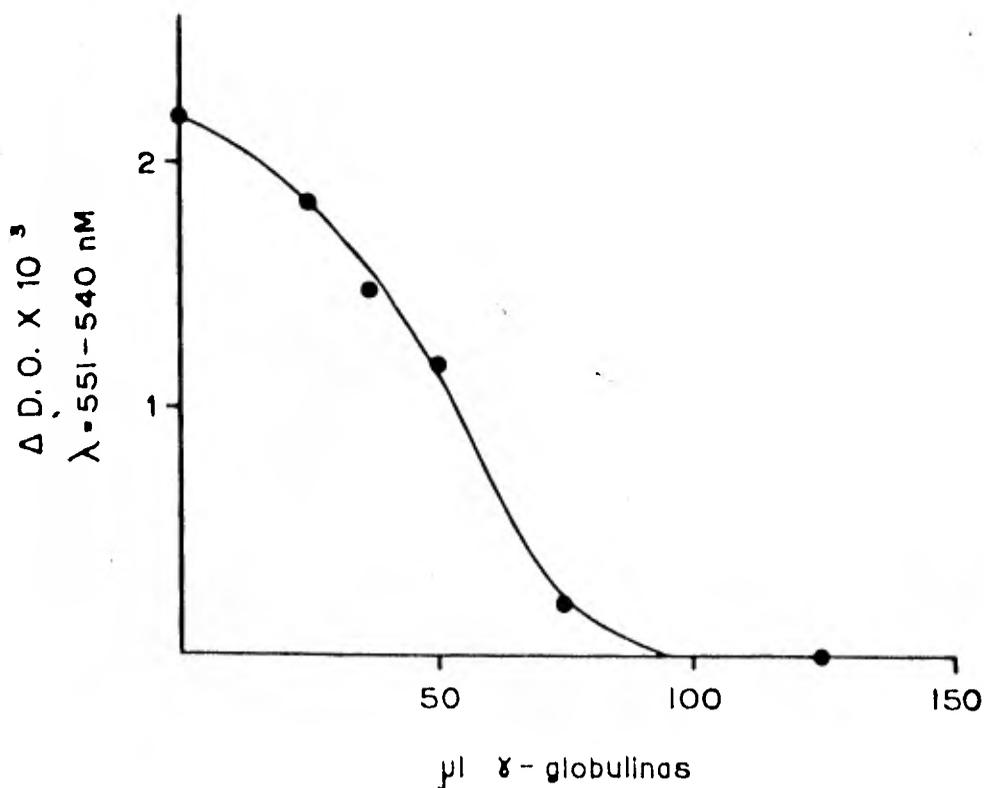


Figura 8 Inhibición de la oxidación del Cit. C por CR excitado con luz debida a la presencia de gamma-globulinas anti-CR. Se incubaron - 2.5 μl de CR-R26 con  $DO_{800} = 9.0$  durante 5 min. con anticuerpos anti-CR, posteriormente se agregó 2.5 μl de Cit. C 7 mg/ml y regulador de Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8 LDAO 0.2% hasta completar 1 ml.

Las gamma-globulinas preparadas contra los CR se probaron sobre la reacción de oxidación del Cit. C, produciéndose una inhibición de dicha reacción figuras 8 y 9.

El hecho de que los anticuerpos inhibieran la oxidación del Cit. C por el CR exitado, podría deberse a una inactivación o desnaturalización, para poder eliminar esta posibilidad, medimos la actividad del P870 en el espectrofotómetro de doble haz, como el blanqueo a 600 nm, tanto en presencia como en ausencia de los anticuerpos anti-CR, pudiéndose demostrar que no obstante obtener una completa inhibición de la reacción con el Cit. C la actividad del P870 queda intacta (figura 9), también se pudo observar que el espectro de absorción del CR no se ve alterado por la reacción con los anticuerpos anti-CR, explicándose el aparente aumento en la DO como un aumento en la dispersión de luz, provocada por la turbidez generada por los complejos antígeno-anticuerpo (figura 10). Los controles con gamma-globulinas preinmunes no dan tales efectos.

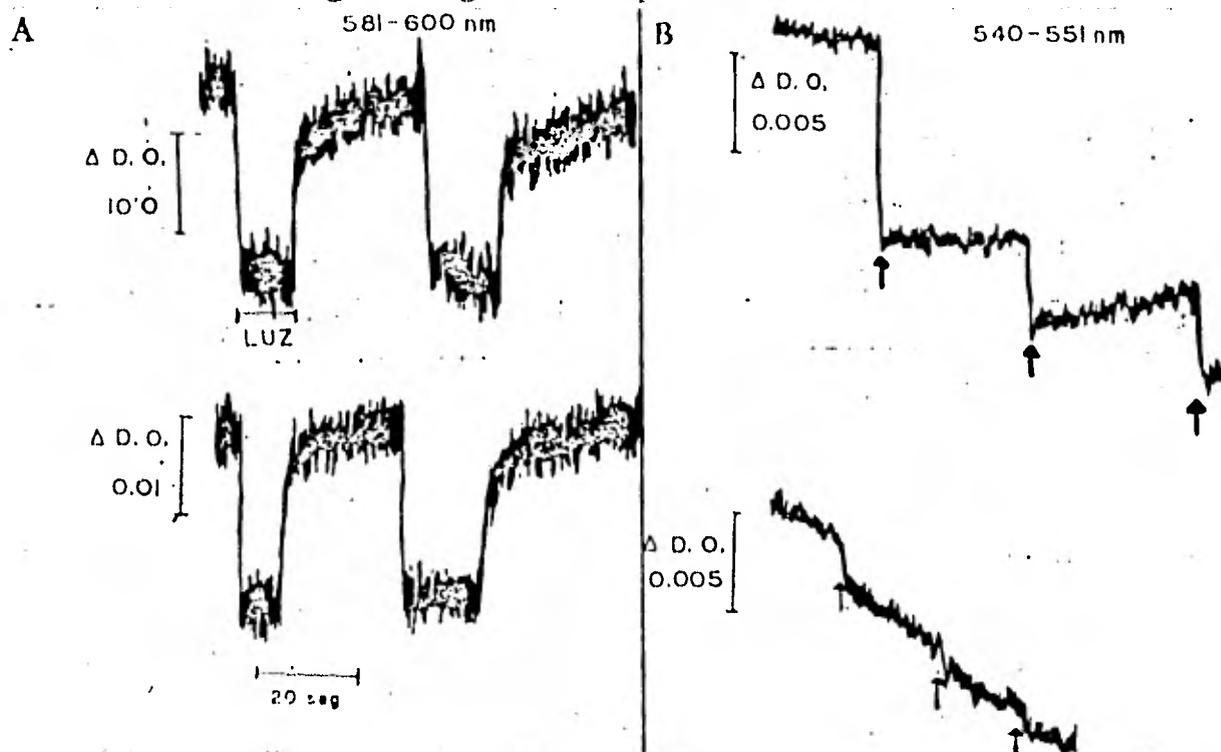


Figura 9

A. - Oxidación del P870 por luz, el trazo superior es el control con  $\gamma$ -globulinas preinmunes y el inferior con  $\gamma$ -globulinas anti-CR.

B. - Oxidación del Cit. C por CR exitado con destellos de 1s indicados por las flechas, el trazo superior es el control con  $\gamma$ -globulinas preinmunes, y el inferior con  $\gamma$ -globulinas anti-CR.

Se incubaron por 5 min. 2.5 l de CR con  $DO^{800} = 9.0$  en presencia de 1 mg de  $\gamma$ -globulinas, llevándose a un volumen final de 1 ml con Tris- $Cl^-$  10 mM pH=8, LDAO 0.2%, NaCl 0.9%. En los trazos marcados con B se realizaron añadiendo a la misma cubeta de A 75  $\mu$ g de Cit. C. Las longitudes de onda usadas se indican en cada caso y en la metodología.

### 3.3.2. Oxidación del CR por Ferricianuro de Potasio.

Cuando se grafica el espectro de absorción oxidado y reducido (figura 10) del CR en presencia de sus anticuerpos, la turbidez que provocan los complejos CR-Anti-CR no permiten una apreciación adecuada de la cantidad de CR oxidado, aunque si se puede ver que con la misma cantidad de Ferricianuro no se logra oxidar totalmente al CR cuando se protege con sus anticuerpos (ver figura 10 trazos 1 y3)

En obvio de evitar este efecto se graficaron los espectros diferenciales (figura 11) y con base en ellos se trazó una curva de titulación de la oxidación del CR expresado como un blanqueo en 870 nm contra la cantidad de ferricianuro añadida (figura 12), en esta se ve claramente que la cantidad de CR que es posible oxidar con ferricianuro es aproximadamente el 50% en condiciones saturantes.

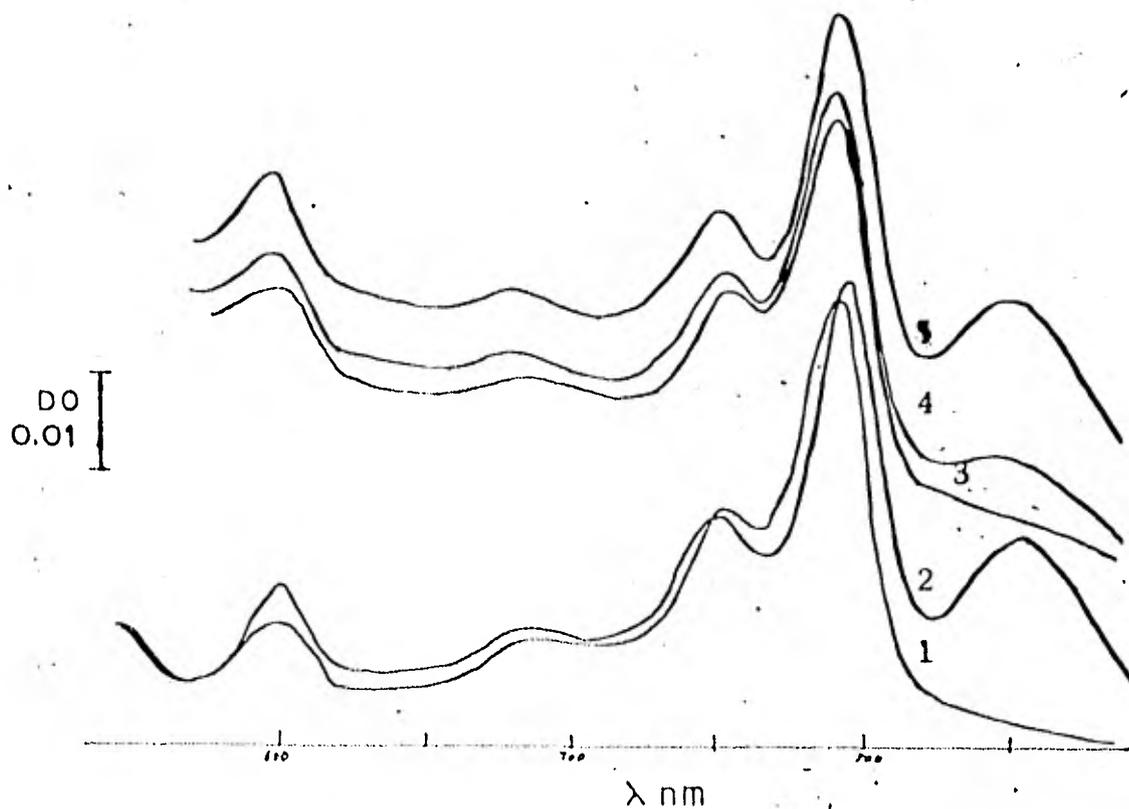


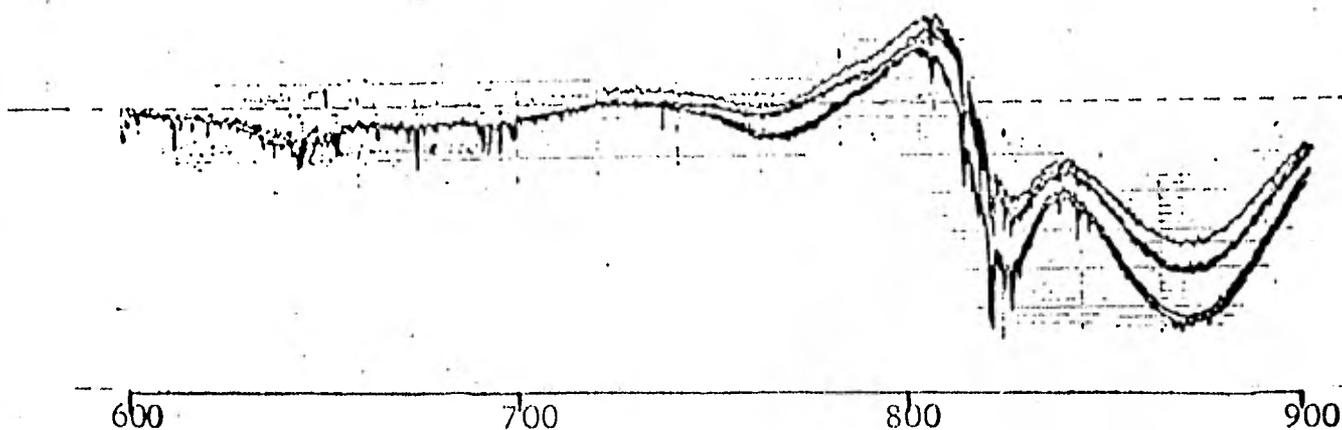
Figura 10

Espectro de absorción del CR variedad silvestre de 450 a 900 nm

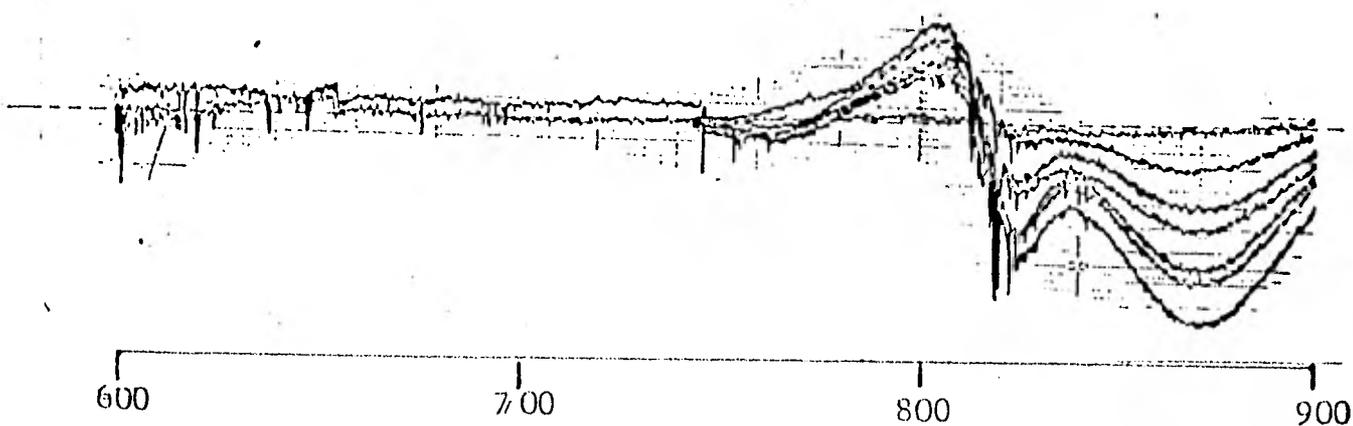
1. - Oxidado con 4 mM de Ferricianuro de Potasio
2. - Reducido
3. - Con  $\gamma$ -globulinas saturantes, oxidado con 8 mM de Ferricianuro
4. - Con  $\gamma$ -globulinas saturantes, Oxidado con 4 mM de Ferricianuro
5. - Con  $\gamma$ -globulinas saturantes, reducido.

Figura 11

Espectro diferencial del CR R-26 oxidado menos reducido de 600 a 900 nm. El CR se oxida con Ferricianuro de Potasio que va desde 0.4 mM a 4 mM (ver figura 10)



A. -  $5\mu\text{l}$  de CR con  $\text{DO}^{800}=9.0$  llevados a 2 ml con Tris- $\text{Cl}^-$  10 mM pH=8 y LDAO 0.2% , se coloca 1 ml en cada cubeta, el Ferricianuro se añade a la cubeta de ensayo dejando los CR de la cubeta de referencia reducidos.



B. -  $5\mu\text{l}$  de CR se incuban durante 5 min. con 2 mg de anticuerpos anti-CR y posteriormente se sitúan en las mismas condiciones que el ensayo A.

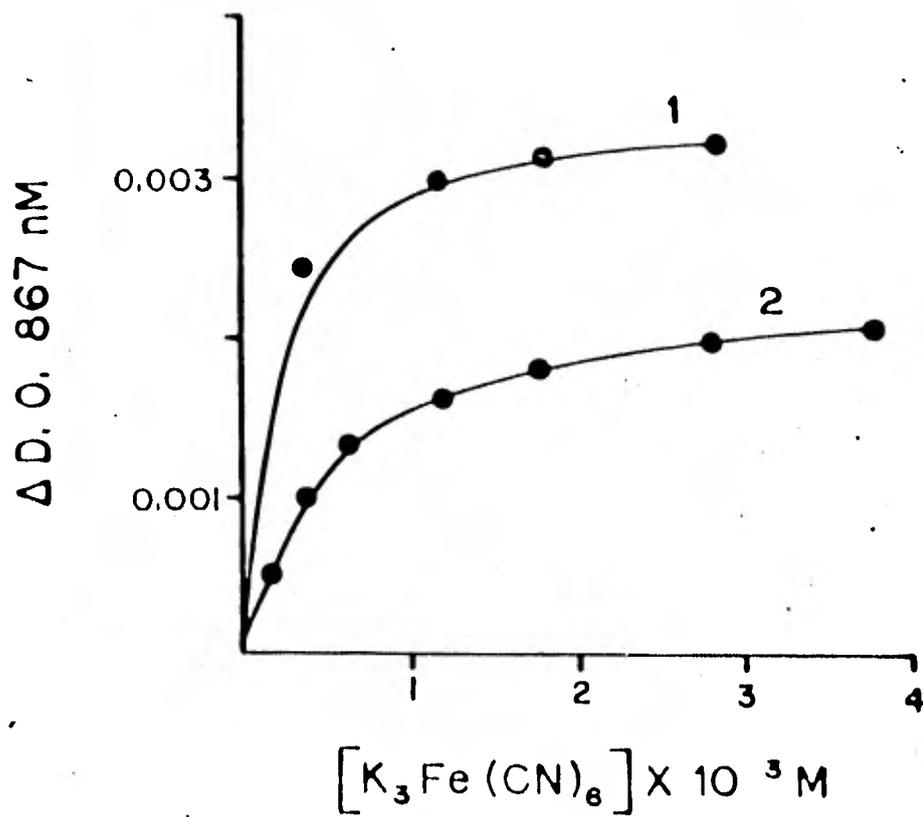


Figura 12

De las gráficas de la figura 9 se toman los incrementos de la DO en 870 nm y se grafican contra la cantidad de Ferricianuro de K<sup>+</sup> que le corresponde.

A. - En ausencia de anticuerpos anti-CR

B. - En presencia de anticuerpos anti-CR

### 3.3. Bibliografía

1. - Pearson, W. W. , y R. Cogdell 1975. B. B. Acta 416 pl05.
2. - Kats, S. S. y J. R. Morris 1973. En Current topics in bioenergetics. Editado por D. R. Sandi y L. Parker Vol 5p41 Academic Press N. Y.
3. - Okamura, M. Y. , L. A. Steiness y G. Fejer 1978. Biochem. 13(7)p1344.
4. - Ke, B. , T. H. Charry y P. W. Reed. 1970. B. B. Acta216p373.
5. -Prince, R. C. , R. J. Cogdell y A. R. Crofts. 1974. B. B. Acta347pl.

#### 4. Discusión y conclusiones.

El fraccionar un sistema para estudiar sus parte, es una metodología tradicional, que complementa los estudios en sistemas íntegros. El estudio de los CR<sub>S</sub> en sistemas fotosintéticos se ha abordado en tres diferentes grados de complejidad; a) el estudio de los CR in situ, ya sea en cloroplastos, bacteris fotosintética o en las membranas respectivas purificadas, b) el estudio del CR purificado, como en las bacterias o en preparaciones enriquecidas como en eucariontes y cianofíceas y c) los estudios realizados en el CR purificado y reconstituido en membranas artificiales, controlando tanto la cantidad como la calidad de los fosfolípidos usados.

La purificación del CR se realiza rompiendo la membrana del cromatóforo con detergentes, las primeras preparaciones del CR se hicieron con Tritón X-100 y frecuentemente aparecían contaminaciones de proteínas del complejo antena, Cit. C y Cit. b562. Las preparaciones con el detergente LDAO son mas reproducibles y con menos posibilidad de contaminación (1).

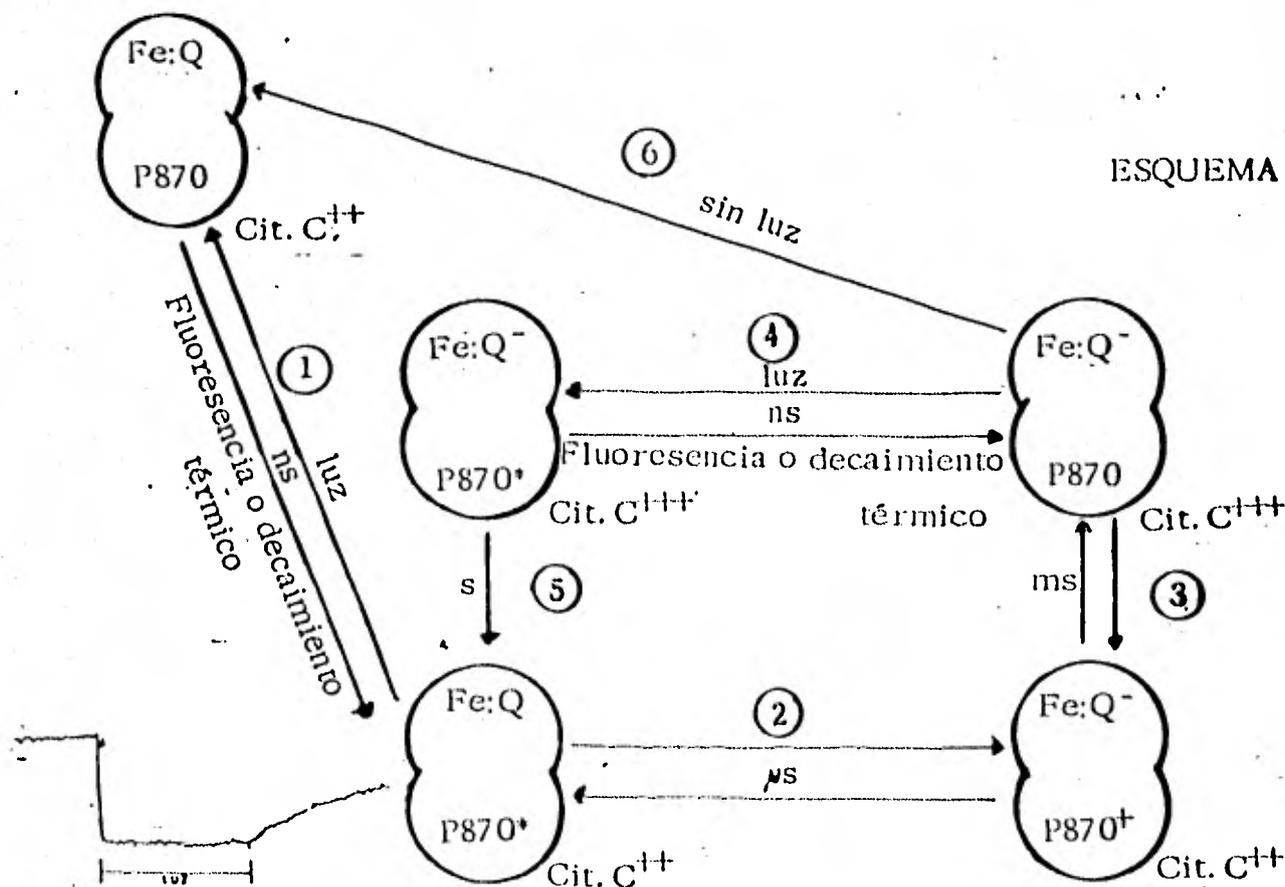
El comportamiento diferente del CR al ser solubilizado con Tritón X-100 o con LDAO no solo es en lo referente a su facilidad de ser purificado sino que estos detergentes también afectan el orden de la cinética con la que reaccionan el CR y el Cit. C. Esto podría sugerir una interacción directa entre el CR y el Cit. C, de tal manera que formaran un complejo en presencia de Tritón X-100 (tabla 2).

En la figura 7 se ve que la cantidad de Cit. C oxidado debido a la excitación por luz del CR, se mantiene en equilibrio dinámico mientras dura el estímulo luminoso, cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de LDAO. El esquema 4 nos muestra que el electrón queda atrapado en un ciclo en donde la reacción cuesta arriba se provoca al excitar el P870, esquematizado como P870\*, inmediatamente el electrón tiende a un estado mas estable, y reduce al aceptor primario. Cuando el Fe:Q es reducido tiende a su vez a ceder su electrón através de un quinona (no esquetatizada) secundario al Cit. C, reacción que es sumamente lenta.

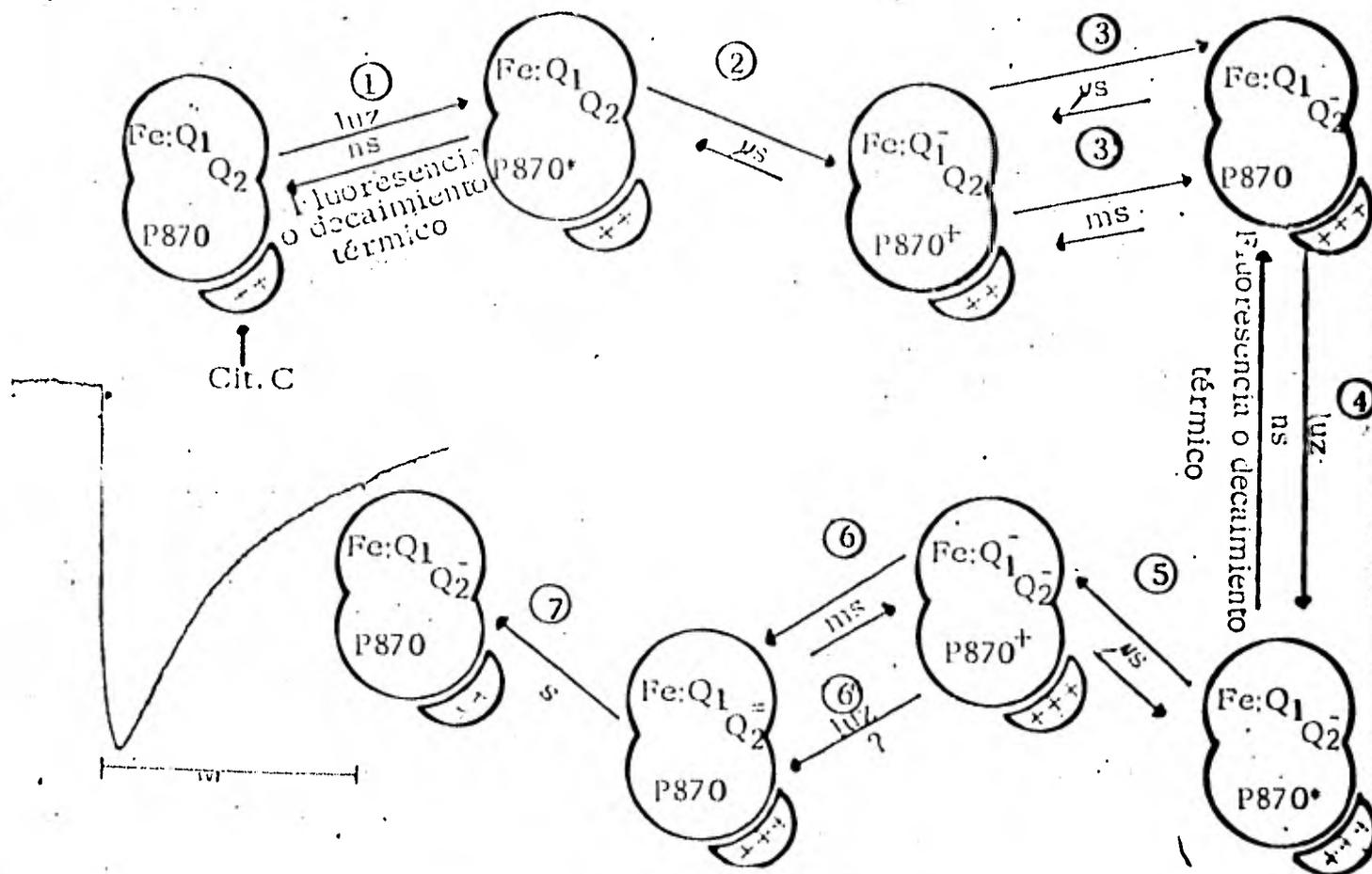
El hecho de que el aceptor primario reduzca al Cit. C es completamente artificial y es posible gracias a que el Cit. C puede moverse libremente y en un momento dado, interaccionar por "el otro lado" del CR. Como se demuestra en la figura 7 a apagar la luz la reacción 6 del esquema 4 se realiza con un vida media del orden de segundos, reacción que debe ser tan lenta como la reacción 5.

Quando el ensayo se lleva a cabo en presencia de Tritón X-100 en lugar de LDAO, se puede observar en la figura 7 que la cantidad de Cit. C oxidado es mayor, e inmediatamente se reduce, no obstante el estímulo luminoso, es mas, cuando cesa el estímulo la velocidad de reducción del Cit. C no se altera. Este fenómeno puede explicarse si se supone que el Cit. C en

estas condiciones, forma un complejo con el CR, tal hipótesis es apoyada en los datos discutidos en la sección anterior. La reacción 3 tanto en el esquema 4 como en el 5 transcurren tan rápidamente que nuestra manera de registrar no sirve, pero por datos bibliográficos (1, 2) sabemos que es mucho más rápida en presencia de Tritón X-100. En el esquema 4 es probable que el Cit. C reduce al CR como un evento de choque molecular, recambiándose este, de manera constante por Cit. C reducido, sin embargo en presencia de Tritón X-100 el recambio es mucho más lento, como se ve en las reacciones 5, 6, y 6' se tiende a un acúmulo de electrones en la quinona secundaria, y un aumento en el tiempo de permanencia del P870 oxidado, lo hace inestable y susceptible de ser desnaturalizado, el P870 desnaturalizado queda representado como P870<sub>d</sub>.



ESQUEMA 5



Una de las reacciones superficie-superficie más valiosa en la bioquímica es la reacción de reconocimiento específico del antígeno por su anticuerpo. Aprovechando esta característica se probó, mediante el efecto de los anticuerpos anti-CR sobre las reacciones del CR, que al formarse el complejo antígeno-anticuerpo el sitio de reconocimiento del Cit. C queda bloqueado, demostrándose que es menester una interacción directa y estrecha entre el CR y el Cit. C. Afortunadamente el CR posee un monitor interno de su actividad, el espectro de absorción no se modifica (fig. 10) y la reacción de excitación del P870 y reducción del aceptor primario queda intacta, manifestándose este último como un blanqueo en 600 nm fig. 9.

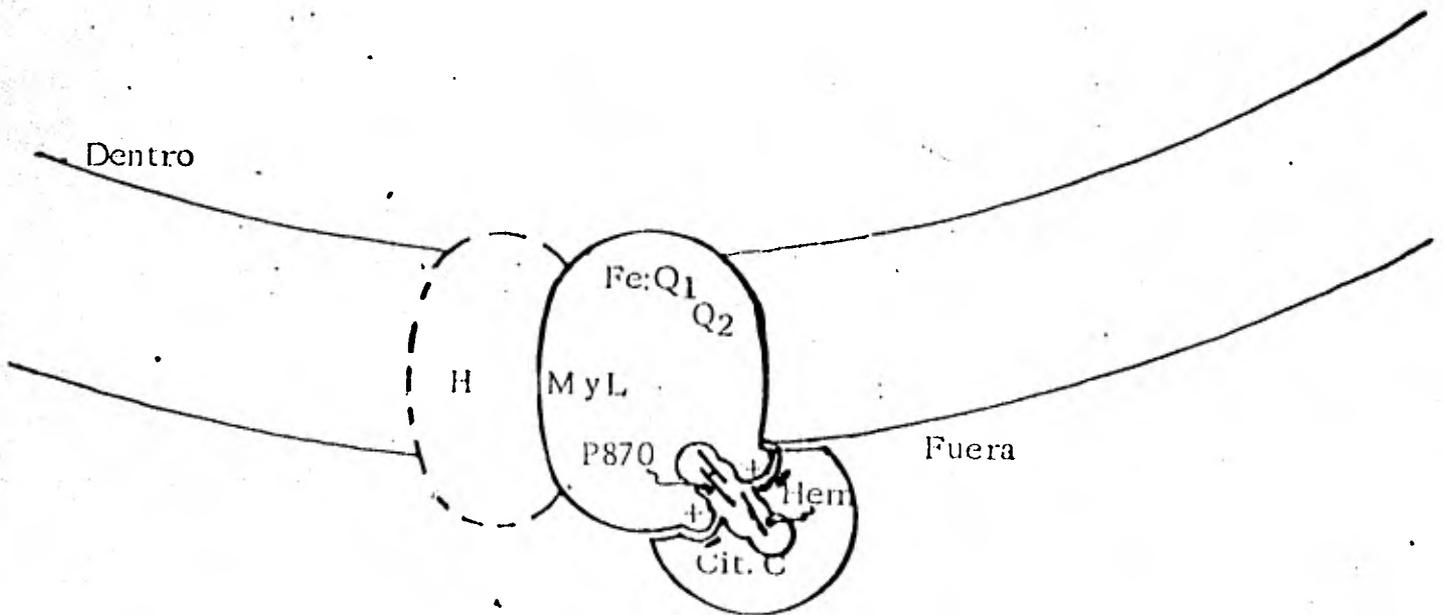
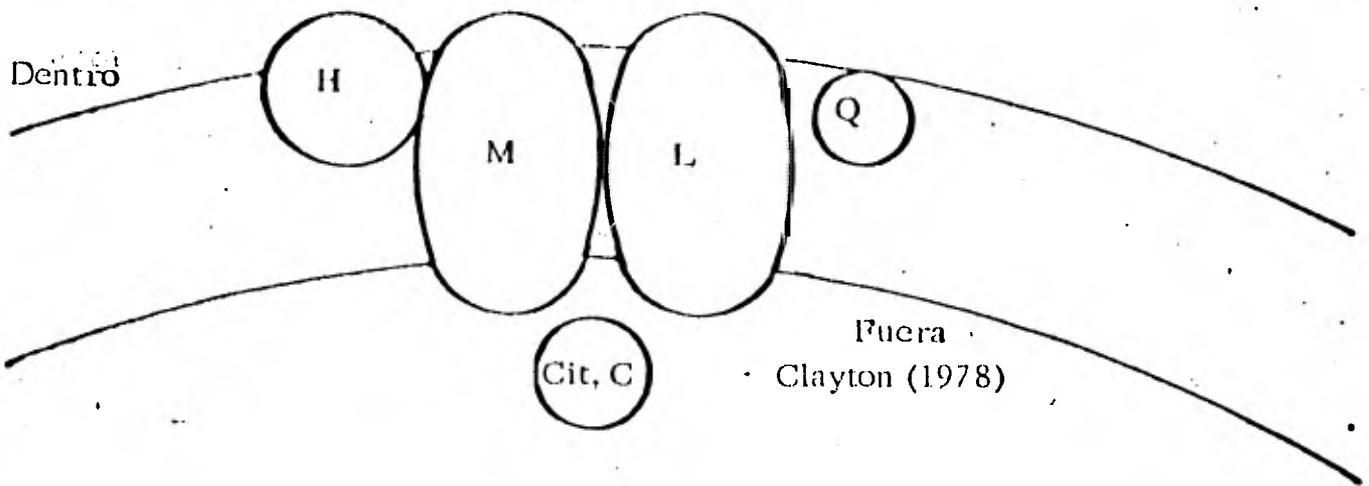
De esta manera hemos creado, artificialmente, una delimitación de los componentes del CR y de su interacción con el Cit. C, de tal suerte que es posible, hasta aquí, decir que: a) los componentes del CR (P870 y Aceptor primario) son internos y no hay relación directa con la superficie, b) el Cit. C tiene al menos un sitio en el CR por el que es reconocido tanto por carga como estéricamente.

De manera congruente con lo antes dicho cabría esperar que los anticuerpos fueran capaces de proteger al CR de la oxidación por Ferricianuro de Potasio, pues este reactivo debe penetrar al CR para poder actuar. Experimentos hechos por Crofts y Célis (1977) en liposomas de muestran que el sitio de acción del Cit. C está diametralmente opuesto al sitio del Ferricianuro con respecto al plano de la membrana.

En la figura 12 se ve que el Ferricianuro si es capaz de oxidar a aproximadamente la mitad de los CR, este efecto parcial de los anticuerpos se debe fundamentalmente a dos factores; el más obvio es el que se observa en el espectro de absorción de la figura 10 en donde se ve que el hecho de tener complejos antígeno-anticuerpo genere un considerable aumento en la turbidez de la muestra, turbidez que disminuye en presencia del Ferricianuro, por lo cual el Ferricianuro "per se" rompe la unión del anticuerpo con su antígeno dejándose el camino libre para oxidar al P870. Otro factor no observable tan directamente, aunque no por ello menos importante, es la estrechez (?) de la región superficial por la cual pasa el Ferricianuro, en este caso bastarían dos determinantes antigénicos suficientemente cercanos para poder ser mutuamente excluyentes, es decir, cuando uno es ocupado por su anticuerpo el otro no puede reaccionar, de tal manera que uno bloquea la entrada de Ferricianuro y el otro la deja accesible. El primer factor mencionado explica la inhibición parcial a altas concentraciones de Ferricianuro y el segundo en concentraciones bajas.

Por técnicas de marcaje y de digestión por proteasas se ha demostrado que las tres subunidades del CR cruzan la membrana y presentan parte de su superficie al medio acuoso (4, 5, 6 y 7), apoyados en esto se puede añadir que el CR solubilizado también presenta parte de su superficie expuesta al medio acuoso como lo demuestra el hecho de tener bandas de inmunoprecipitación para las tres subunidades, pues es sabido que la antigenicidad depende en mucho de que el determinante antigénico exponga su superficie al medio acuoso.

Es posible entonces, proponer un modelo como el del esquema 6 en el que se compara con uno propuesto por Clayton (1978). Nuestros experimentos no fueron hechos en la membrana pero basándonos en los experimentos de Crofts y Célis, ya mencionados, es posible darle un sentido al CR en la membrana. La subunidad H permanece en tela de juicio, pues no se ha encontrado ninguna función aparente en ella, aquí se esquematiza como cruzando la membrana pues hay evidencia que así lo demuestra (7). El P870 se pone de manera tal que interacciona con el grupo hemo casi directamente, sin tener por ello relación inmediata con la superficie, así es como se explica la cinética de orden cero (1) y su comportamiento frente al Cit. C tanto en complejo con defarosa como cinéticamente, además de su comportamiento frente a los anticuerpos. Es importante recalcar que los anticuerpos no afectan la estructura interna del CR.



4. Bibliografía

1. - Reed, Dan W. 1969. J Biol. Chem. 244(18) p 4936.
2. - Ke, B. , T. H Chaney y D. W. Reed 1970. B. B. Acta 261 p373
3. -Crofts, A. y H. Celis 1977. Datos no publicados.
4. - Surrer, H. , M. Snozzi, K. Hanselmann y R. Bachofen 1977. B. B. Acta. 460 p273.
5. -Bachofen., R. 1979. FEBS Letters 107(2) p409.
6. - Odermatt, E. , M. Snozzi y R. Bachofen. 1980. B. B. Acta 591 p372.
7. - Bachmann, R. C. , K. Gillies y J. Y. Takemoto. 1981. Biochem. 20(16) p4590.
8. - Clayton, R. K. 1978. Photosynthesis; physical mechanisms and chemical patterns. Cambridge University Press.p. 176.

## 5. Apéndices.

### 5.1. Apéndice 1. cultivo y medios de cultivo.

#### 5.1.1. Crecimiento en medio sólido

Es posible mantener a las cepas por mucho tiempo (6 a 12 meses) en un medio sólido, el cual contiene: Agar 2%, extracto de levadura 3g, y bactopectona 2g, para 1l. de medio. Se esteriliza en frascos pequeños (15 a 20 ml), llenándose aproximadamente hasta la mitad. El inóculo se realiza por punción, se mantienen por 14 horas en la oscuridad y se ponen en un lugar con iluminación constante por lámparas con filamento de Tungsteno.

#### 5.1.2. Crecimiento en medio líquido.

Con el objeto de obtener grandes cantidades de bacterias, se cultivan en medio líquido. Se utilizó el medio reportado por Cohen-Bazire y col. (1), modificado del de Huntner, el cual se detalla en seguida:

##### 1. - Base concentrada para dos litros:

Acido Nitrili-Acético	$N(CH_2COOH)_3$	20	g
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	28.9	g
Cloruro de Calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8.7	g
Molibdato de Amonio	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.185	g
Sulfato Ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.195	g
Metales "44"		100.0	ml
Se ajusta a pH=8 con NaOH			

##### Metales "44" para un litro.

EDTA	2.5	g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0	g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	11.0	g
$MnSO_4$	1.54	g
$MnCl \cdot 4H_2O$	1.37	g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.392	g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.248	g
$NaB_4O_7 \cdot 6H_2O$	0.177	g

Al final se acidifica el medio con cinco gotas de  $H_2SO_4$  concentrado, para evitar precipitación.

2. - Fosfato de Potasio monobásico 136g en 1 litro de agua, pH=8 con KOH.
3. - Succinato de Potasio 100g en 1 litro, pH=6.8 con KOH.
4. - Sulfato de Amonio 100g en 1 litro.
5. -Cloruro de sodio 50g en 1 litro.
6. - Acido Glutámico 25g en 250 ml, pH=6.8 con NaOH.
7. - Acido L-Aspártico 5g en 250 ml. pH=6.8 con NaOH.

Teneiendo las disoluciones de reserva se mezclan como sigue para obtener

12.5 l. de medio:

1. - Base concentrada	250	ml
2. - Fosfato de Potasio	250	ml
3. -Acido Succínico	250	ml
4. - Sulfato de Amonio	62.5	ml
5. -Acido L-Aspártico	25	ml
6. - Cloruro de Sodio	125	ml
7. - Acido L-Glutámico	25	ml
8. - Hidrolizado de Caseína	12.5	g
9. -Acido Nicotínico	12.5	mg
10 Tiamina (Aneurina)	6.25	mg
11 D-Biotina	0.125	mg.

Se mezclan los componentes y se ajusta el pH a 6.8 con NaOH, se ponen en frascos de volumen conveniente y se esterilizan en autoclave a 15 libras por 45 min. El medio se precipita cuando esta caliente, pero cuando se enfria queda transparente.

Con el objeto de obtener cultivos grandes de estas bacterias, se cambian sucesivamente de volúmenes pequeños a volúmenes grandes. Se comienza con frascos de 15 a 20 ml de medio sólido, los cuales tienen la cepa deseada, a este se le agraga medio líquido y se agitan, se deja toda la noche en la oscuridad y al terminar se colocan bajo iluminación con lámparas de Tungsteno de 40 watts a 30 cm. Después de 8 días se ven bacterias en el medio líquido, y es cuando se transfiere a frascos de 100 ml, siguiendo el mismo procedi-

miento. Después de 8 días se transfieren a frascos de 1 litro y posteriormente a frascos de 12.5 litros. Los frascos se sellan con tapón de hule con el objeto de tener un cultivo anoxigénico.

## 5.2. Apéndice 2. curva de crecimiento.

El cultivo de las bacterias, en las condiciones que hemos impuesto, no crece a velocidad constante, por lo que resulta importante determinar en que momento la velocidad de crecimiento es tal que no conviene dejarlas crecer mas.

La forma que presenta la gráfica de la magnitud de la población (expresada en Unidades Klett) contra el tiempo ( en horas), es una curva logística típica y esta dada por: 
$$N = \frac{K}{1 - \exp. a - r_m t}$$
, en donde N es la magnitud de la población, "a" es una constante que es proporcional a la magnitud inicial,  $r_m$  es la capacidad de crecimiento y K la capacidad de carga del medio para sostener una determinada población.

Aparentemente si se mantiene la cantidad de medio constante, tanto en nutrientes como el luz, K permanecería constante, pero es importante aclarar que esta también depende de la velocidad de deterioro del medio, de tal suerte que si se introduce un inóculo pequeño este se va a tardar mas en "dispararse" y a la misma magnitud poblacional, comparando conotra población originada por un inóculo mas grande, el deterioro del medio debido a productos de desecho del metabolismo va a ser mayor, por lo que la calidad es diferente y, es consecuencia, su K cambia. Esto sin contar con el estado de las bacterias que constituyen el inóculo.

Debido a esto a cada cultivo se le controla su crecimiento y se cosecha inmediatamente después de que empieza a decrecer la velocidad de crecimiento, como un ejemplo ponemos una gráfica que muestra tanto el crecimiento como su velocidad hasta llegar a la fase estacionaria, es decir, a el momento en que la población deja de crecer, en general

no se permite que los cultivos llegen a esta fase pues el deterioro celular es excesivo (14).

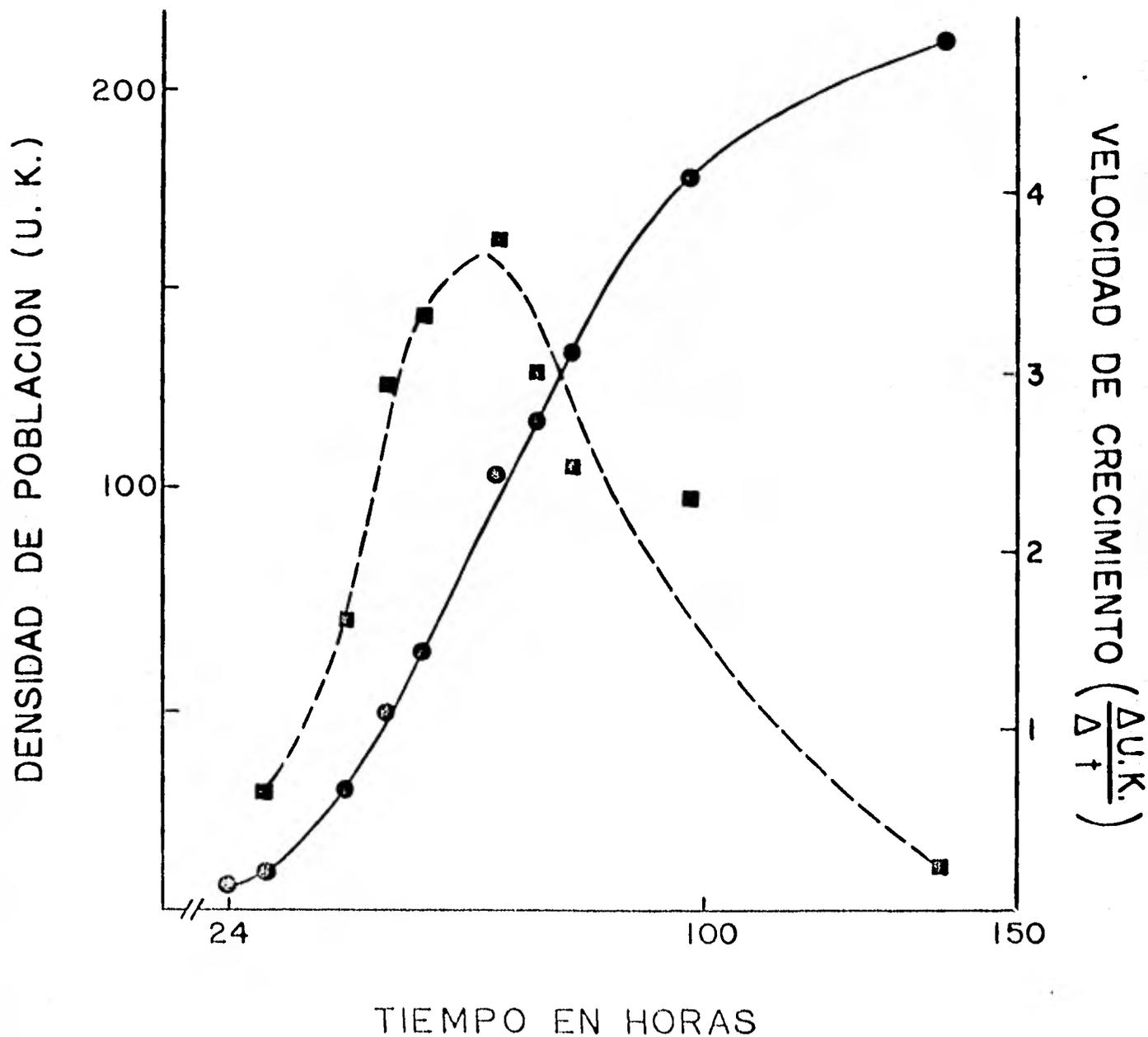


Figura 13  
 Curva de crecimiento de las bacterias fotosintéticas en medio líquido, la cantidad de bacterias se considera directamente proporcional a las unidades Klett (UK), línea sólida. En línea discontinua se grafica la velocidad promedio de crecimiento. Las bacterias se cosechan justamente cuando la curva de velocidad empieza a decaer.

5.3. Apéndice 3. electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de sds.

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica muy poderosa para poder determinar la pureza de preparados macromoleculares, si se le añade el detergente SDS, podemos además, determinar pesos moleculares de proteínas con gran precisión (3, 4, 5, 7)

El gel se preparó con una concentración de Acrilamida del 10% y una relación N, N-Metilenbisacrilamida/Acrilamida de 0.0265. Tanto el gel como los reservorios se ajustan a un pH=8.0 regulado por Tris-Cl<sup>-</sup> 50 mM y una concentración de SDS de 0.1%, para polimerizar el gel se agregan 15  $\mu$ l de TEMED y 50  $\mu$ l de Persulfato de Amonio al 10% por cada 20 ml de gel.

Se usaron geles en tubo de 0.6 cm de diámetro por 10 cm de largo, o placas de 10 x10 x 0.8 cm, los cuales se corren a 6 volts por cm durante 6 horas.

La muestra se desnaturaliza con una mezcla de digestión que contiene: SDS 4% y  $\beta$ -Mercaptoetanol 10%, para evitar que la muestra se diluya al ser colocada, se hace la mezcla de digestión con Glicerol al 5% o sacarosa 10%. Cuando se va a correr una muestra de Centro de Reacción no conviene hervirla pues esta se precipita (16)

La proteína conviene colocarla con una concentración de cuando menos 1 mg/ml, soportando los tubos muestras con un contenido total de hasta 100  $\mu$ g. En las placas, cuando se usan separadores de 1 cm, la muestra puede ser de hasta 50  $\mu$ g.

Dos cosas importantes cabe aclarar en este punto: tanto si la muestra contiene alta fuerza iónica, como si presenta restos de otros detergentes, se producen artefactos. En nuestro laboratorio se utilizan columnas de Penefsky para desalar y una extracción orgánica de alcohol isoamílico para eliminar los detergentes, a continuación detallamos ambas técnicas .

### 5.3.1. Eliminación de sales por filtración molecular.

Se utiliza sefadex G-50 mediano, el cual es hidratado y equilibrado con Tris-Cl<sup>-</sup> 50 mM pH=8, SDS 0.1%, una vez preparada la resina se empaqueta en tubos pequeños ( jeringas de 1 ml taponadas con plástico poroso) y se centrifuga a 2 000 rpm por 1 min. , se coloca la muestra con un volumen de 0.05 a 0.2 ml y se vuelve a centrifugar para recuperar la muestra, colocándose la jeringa en un tibo de ensayo. Esta técnica es capaz, también, de eliminar parte del LDAO , pero no es suficiente para quitarlo por completo , sin embargo es capaz de eliminar restos de Sulfato de Amonio o de Cloruro de Sodio (8).

### 5.3.2. Eliminación de detergentes por extracción orgánica.

Las técnicas usuales para eliminar detergentes son , en general, demasiado lentas, por ejemplo; para poder eliminar el LDAO del CR es necesario dializar contra volúmenes grandes durante 15 días. En nuestro laboratorio desarrollamos una técnica con base en la extracción de detergente a una fase de alcohol isoamílico. Se toma el volumen deseado de la muestra y se le añaden 3 volúmenes de alcohol isoamílico para agitar en "vortex" durante 3 min. , posteriormente se centrifuga a 2 000 rpm por 15 min. . Se elimina la fase orgánica y se lava el exeso de alcohol con cloroformo

por último, el cloroformo se elimina por evaporación por arrastre de aire o N<sub>2</sub> si la muestra es muy labil. Generalmente cuando la proteína es muy hidrófoba se precipita y queda entre la fase acuosa y la orgánica.

Finalmente se resuspende la muestra en un volumen conveniente de SDS 5%, se determina proteína y se añade la mezcla de digestión. El SDS tiene la ventaja de no generar artefactos en la determinación de proteína por Lowry. (6, 9, 10).

#### 5.4. Apéndice 4 Obtención de anticuerpos.

##### 5.4.1. Obtención de antisuero.

Una de las condiciones para crear anticuerpos específicos contra un antígeno dado, es su pureza, no es recomendable tratar de inducir la formación de anticuerpos si no se está seguro de la pureza de la muestra.

Para inducir la formación de anticuerpos, es de uso generalizado los adyuvantes que son mezclas que potencian la respuesta inmune (11), con lo que es posible trabajar con cantidades realmente pequeñas de antígeno

La formación de anticuerpos contra el CR se realizó, en conejo, de la siguiente manera:

- a) Se mezclan 500  $\mu$ g de CR en un volumen de 1 ml de una disolución de NaCl 150 mM con un ml de adyuvante completo de Freund's, agitando vigorosamente, después se pasa varias veces por una aguja hipodérmica con una jeringa hasta que se logra una mezcla de alta viscosidad, de tal manera que una gota puesta en agua no se disperse. Esta mezcla es inyectada intramuscularmente en las patas traseras del conejo.
- b) Quince días después se reinocula una muestra en las mismas condiciones.
- c) Una semana después del segundo desafío se obtiene una pequeña cantidad de suero para ver si se ha iniciado la formación de anticuerpos ( como el título de anticuerpo en esta etapa es muy pequeño no conviene extraer mucha sangre ).

d) Una semana posterior al sangrado se realiza un nuevo desafío, como el conejo ya reconoce al antígeno no es necesario utilizar adyuvante, pues se corre el riesgo de generar una respuesta violenta y perder al animal. En este caso se inoculan 100  $\mu$ g de CR por una de las venas de la oreja en un volumen de 1.0 ml de una disolución regulada por fosfatos ( $\text{PO}_4^{=}$  5 mM pH=7.2, NaCl 140 mM, Desoxicolato de Sodio 4mM ), en esta disolución es necesaria la presencia de un surfactante no tóxico como el Desoxicolato para poder mantener a la proteína en disolución.

e) A la semana de este último desafío se obtienen 40 ml de sangre, ya sea por una incisión de la vena externa de la oreja o, de manera más conveniente, por punción cardiaca. La sangre se guarda en el refrigerador (10°C) hasta el día siguiente, con lo que forma un coágulo que es fácilmente removible, se puede centrifugar la muestra a 5 000 rpm durante 10 min., el antisuero así obtenido se prueba contra el antígeno, en este caso por doble inmunodifusión.

#### 5.4.2. Del ensayo por doble inmunodifusión.

En esta técnica el antisuero o las  $\gamma$ -globulinas purificadas, se ponen en un medio propicio para que generen un halo de difusión a partir de un punto determinado de tal manera que los halos de difusión se intersecten. Con tal se hace una placa de agar al 1% con un espesor de 0.2 mm la cual contiene: NaCl 140 mM, Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8, azida de Sodio 0.05% y Tritón X-100 1%. En estas placas sostenidas por un portaobjetos para microscopía se hacen perforaciones de 3 mm de diam. a una distancia de 4 mm, nosotros usamos una disposición de roceta, en los pozos se introduce la muestra y el anticuerpo, esperandose a que difundan por un lapso de 16 a 24 horas, en una cámara húmeda, cuando se detectan bandas de precipitación se "lava" la placa durante 6 horas en 500 ml de NaCl 150 mM y Tritón X-100 1%.

Inmediatamente después se seca la placa al aire (para que el secado no sea muy brusco y se fracture la placa, se cubre esta con un papel filtro empapado en la solución de lavado). Una vez que la placa ha secado se tiñe con Azul de Coomassie 0.25% durante 10 min., en una disolución de Met. 30% y Acido Acético 7%. El exceso de colorante se lava con una disolución de Met. 30% y Acido Acético 7%.

### 5.4.3. Purificación de gama-globulinas

### 5.4.3. Purificación de gama-globulinas

El antisuero obtenido se enfría en baño de hielo y se le agrega gota a gota y agitando suavemente una disolución saturada de Sulfato de Amonio, hasta lograr un 33% de saturación, se deja agitando de 20 a 30 min., la muestra se enturbia y el presipitado se colecta por centrifugación, a 2 500g durante 10 min. El botón que se forma se resuspende en PBS (NaCl 135 mM, KCl 3 mM,  $\text{PO}_4^{=}$  10 mM pH=7.2). Con un volumen

Con un volumen igual al del antisuero original  
igual al del antisuero original, esta operación se repite dos veces mas, al resuspender por tercera ocasión se usa un volumen pequeño (aproximadamente 1/10 de volumen original) y se dializa por 24 horas contra cuatro litros de Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8 y NaCl 140 mM, de esta manera queda suficientemente la preparación de  $\gamma$ -globulinas (12, 13).

Cuando se requiere de un mayor grado de pureza la dialisis se realiza únicamente contre Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM pH=8 para pasar la muestra através de una columna de intercambio iónico.

#### 5.4.3.1. Purificación por intercambio catiónico (deae-celulosa)

a) Activación de la DEAE-Celulosa: a cada 10g de Celulosa se le agrega n 150 ml de una desolución de HCl 0.5 N con una agitación lenta durante 30 min. procediéndose a lavar la celulosa con agua destilad, cuando el pH del agua este cercano a 4 se resuspende la Celulosa en una disolución de NaOH 0.5 N durante 30 min. lavandose también con agua destilada, cuando el pH este cercano a 8 la Celulosa queda lista para ser usada.

b) Columnas: La Celulosa lavada y activada se empaca en columnas de tamaño apropiado, en este caso usamos columnas de 2.5 cm por 80 cm, la columna empacada se equilibra con un regulador de pH apropiado, nosotros usamos  $\text{PO}_4^{=}$  10 mM pH 7.2, a la columna equilibrada se le aplica la muestra con 50 mg de proteína por gramo de Celulosa como máximo, al aumentar la fuerza iónica de el regulador de elución salen la -globulinas en las primeras fracciones del eluato (13)

5.5. Apéndice 5. espectros de absorción de los filtros usados y de emisión de la lámpara del cuarto de purificación.

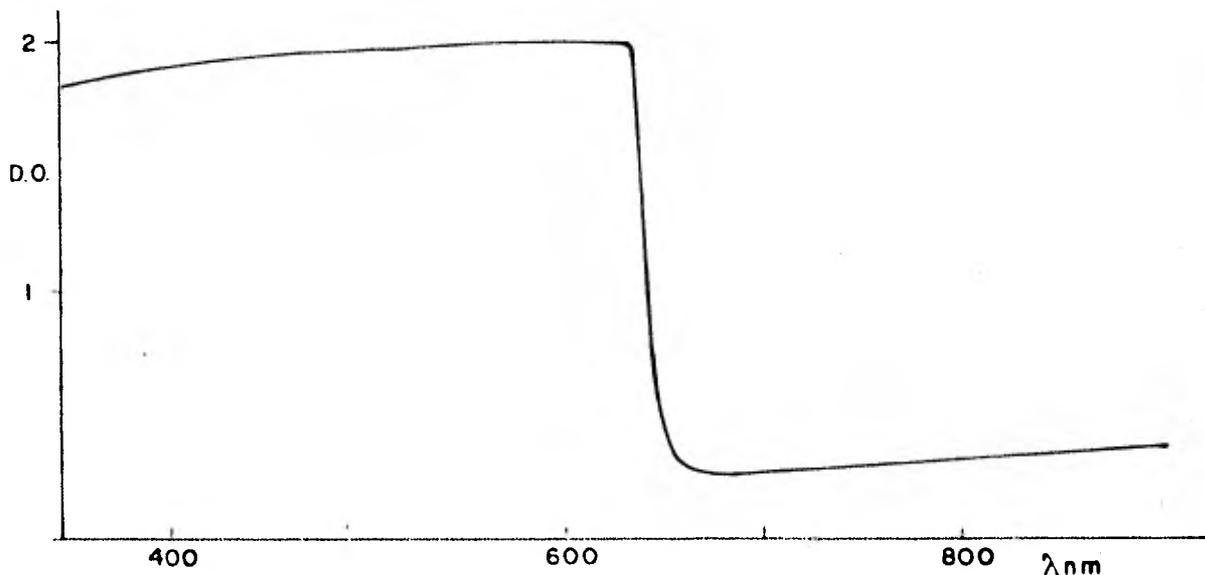


Figura 14  
Espectro de absorción del filtro rojo, usado para estimular los CR

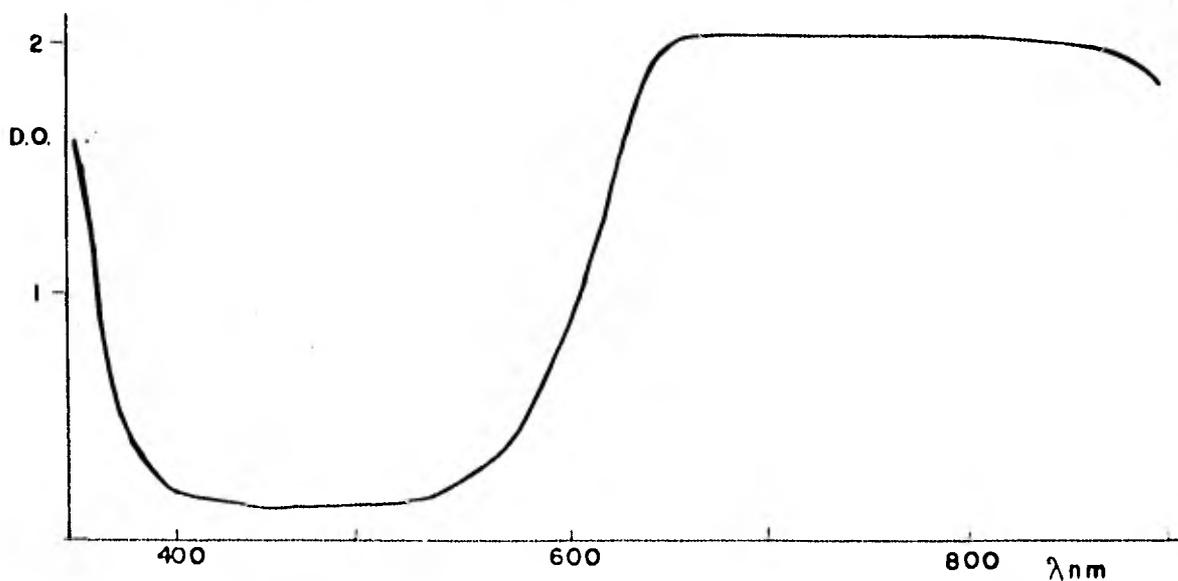


Figura 15  
Espectro de absorción del filtro azul usado para eliminar la luz estimulante y permitir solo el paso de los haces de medida del espectrofotómetro, si se compara con el filtro de la figura 12 se verá que son filtros complementarios.

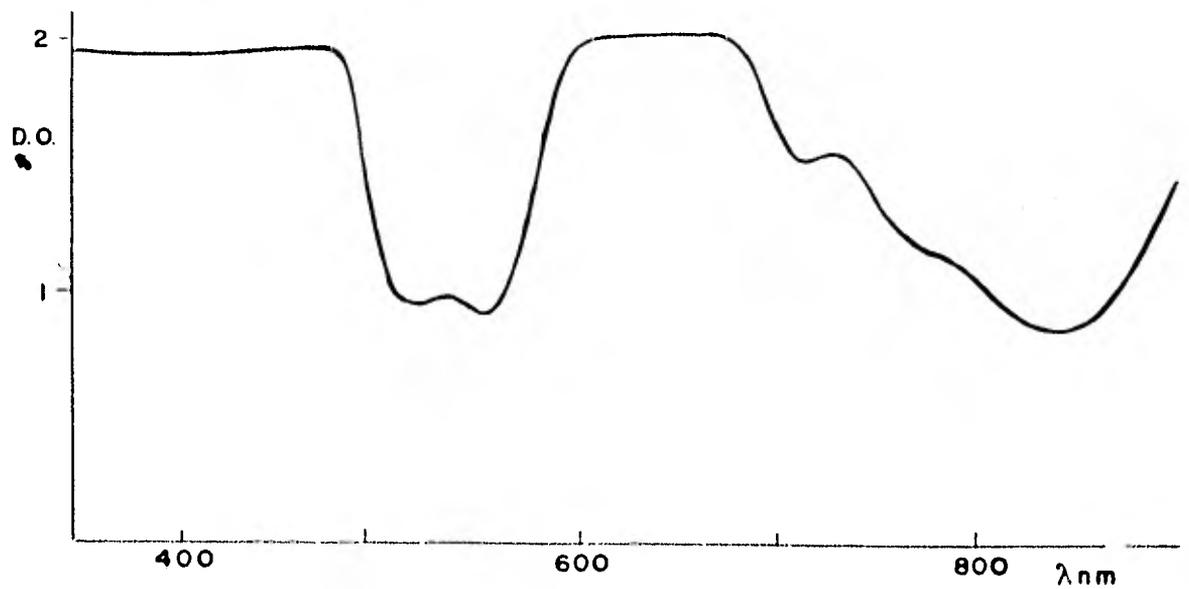


Figura 16

Espectro de absorción del filtro verde usado para proveer al laboratorio de iluminación no actínica, durante la extracción y purificación de los CR. Si se compara con los espectros de absorción de los CR de las figuras 3 y 4 se verá que no hay absorción de las Clorofilas en la zona que no corta el filtro.

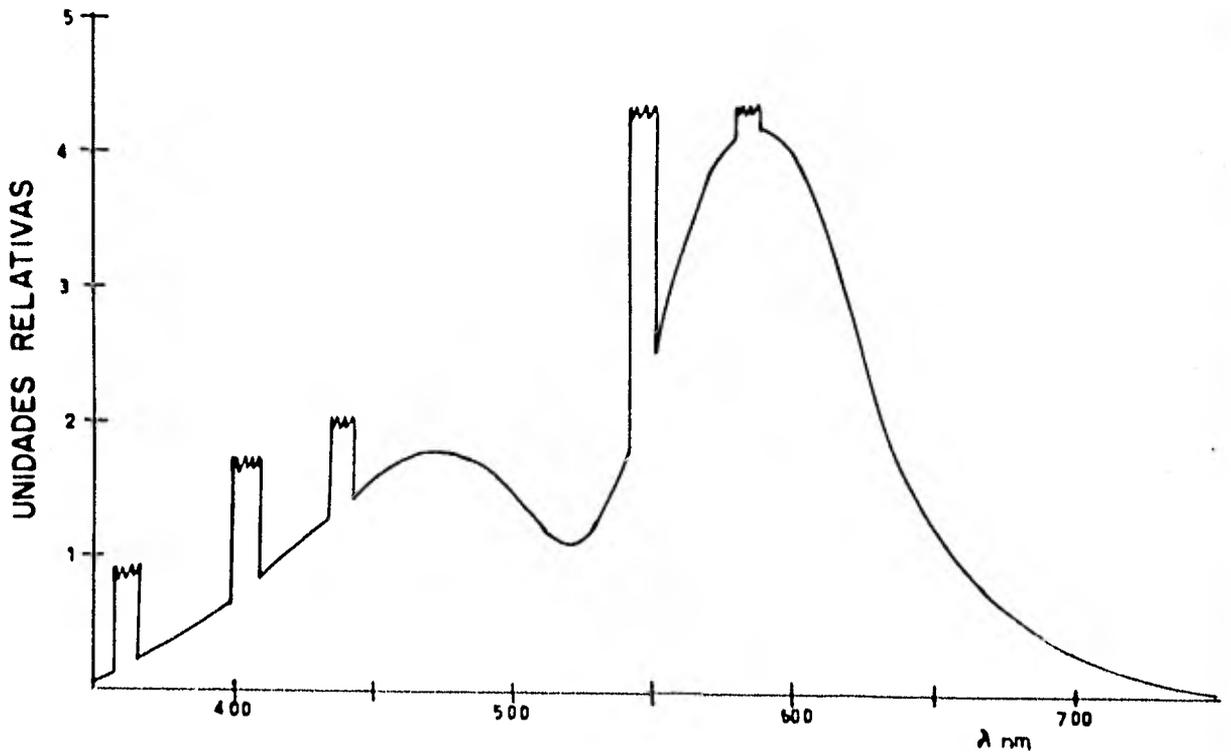


Figura 17

Espectro de emisión de las lámparas usadas para iluminar el laboratorio durante la extracción de los CR, que junto con el filtro de la figura 16 - nos da una iluminación solo en la zona de luz verde (15).

5.6. Bibliografía.

1. - Cohen-Bazire, G., W. R. Sistrom y R. Y. Sainer. 1957. J. Cell. Comps. Physiol. 49 p25.
2. - Hunter, S. H. 1950. J. Gen. Microbiol. 4 p286.
3. - Shapiro, A. 1967. B. B. Res. Commun. 28(5) p815.
4. - Shuter, L. 1971. Preparative Acrylamide Gel Electrophoresis: Continuous and Disc. Techniques. Methods in Enzimology XXII p412.
5. - Gabriel, O. 1971. Analytical Disc. Gel Electrophoresis. Methods in Enzimology XXII p565.
6. - Ramirez, J. S., R. Salcedo-H y H. Celis. 1981. Eliminación de surfactantes de proteínas hidrófobas por iso-pentanol. Para su análisis en electroforesis con SDS. II Reunión de la Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. p49.
7. - Gabriel, O. 1971. Locating Enzymes on Gels. Methods in Enzimology XXII p578.
8. - Penefsky, H. S. 1977. J. Biol. Chem. 252 p891.
9. - Mather, I. H. y C. B. Tamplin. 1979. Biochem. 93 p139.
10. - Peterson, G. L. 1979. Anal. Biochem. 100 p201.
11. - Whebb, D. R. Jr. y A. Winhelstein. 1978. En: Basic and Clinical Immunology Editado por: H. H. Fundenberg, D. P. Stites, J. L. Caldwell y J. V. Well. Lange Medical Publications. California USA.
12. - Good, R. A. 1974. Principles of Modern Immunology. Lea and Febiger Philadelphia USA.
13. - Garveg, J. S., N. E. Cramer, Susdorf. 1977. Methods in Immunology. W. A. Benjamin, Inc. London.
14. - Krebs, Ch. J. 1972. Ecology. Ed. Harper and Row Publishers. N. Y.
15. - \_\_\_\_\_ 1977. ISCOTABLES a Handbook of Data for Biological and Physical Scientists. Editor: Hunter Hofmann. Lincoln, Nebraska. USA.
16. - Kam, M. H. y R. H. Hurlbert. 1979. J. Bacteriol. 138(1) p. 207.