

00577
19j.
1



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION ESTUDIOS DE POSTGRADO

AISLAMIENTO DEL PEPTIDO " A " DE LA INSULINA HUMANA
A PARTIR DE CEPAS BACTERIANAS MODIFICADAS GENETICAMENTE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRIA EN QUIMICA ANALITICA

P r e s e n t a

LEOPOLDO GUERCA GURROLA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	pag.
1. / RESUMEN.	i
2. / OBJETIVO.	1
3. / INTRODUCCION.	2
4. / PARTE TEORICA.	
4.1. LOS METODOS DE SEPARACION.	8
4.1.1. Generalidades.	8
4.1.2. Características principales.	9
4.1.3. Elección de un método de separación.	11
4.2. SEPARACION DE MACROMOLECULAS.	13
4.2.1. Generalidades.	13
4.2.2. Separación de macromoléculas por cromatografía en fase líquida.	17
4.2.3. Separación de macromoléculas por electroforésis.	21
a) Electroforésis en gel de poliacrilamida.	25
b) Teoría de electroforésis en electrolitos discontinuos.	27
5. / PARTE EXPERIMENTAL.	
5.1. ESTUDIO PRELIMINAR DEL AISLAMIENTO DEL PEPTIDO "A" DE LA INSULINA HUMANA.	29
5.2. PURIFICACION DE LA PROTEINA HIBRIDA.	34
5.3. RESOLUCIÓN DE LOS PEPTIDOS DE CIANOGENOLISIS DE LA PROTEINA HIBRIDA.	45
5.4. DETECCION Y CARACTERIZACION DEL PEPTIDO "A" DE LA INSULINA HUMANA.	50
5.5. AISLAMIENTO DEL PEPTIDO "A" DE LA INSULINA HUMANA.	55

	pag.
6./ CONCLUSIONES.	69
7./ ANEXOS.	
7.1. ANEXO I. PROCEDIMIENTOS.	73
7.1.1. Anexo Ia. Primer procedimiento usado para obtener una porción enriquecida en proteína híbrida.	73
7.1.2. Anexo Ib. Primer procedimiento usado para liberar y proteger al péptido "A".	74
7.1.3. Anexo Ic. Procedimiento desarrollado para mejorar el enriquecimiento de la proteína híbrida.	75
7.1.4. Anexo Id. Procedimientos químicos adaptados.	76
7.1.5. Anexo Ie. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de DSS para proteínas de E. coli.	77
7.1.6. Anexo If. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de DSS para péptidos.	79
7.1.7. Anexo Ig. Electroforesis en gel de poliacrilamida para péptidos de cianogénesis en un electrolito continuo.	80
7.1.8. Anexo Ih. Electroforesis en gel de poliacrilamida selectiva para péptidos ácidos.	82
7.1.9. Anexo Ii. Aislamiento del péptido "A" de la insulina por electroforesis en medio ácido, en un gel granular.	84
7.2. ANEXO II. ASPECTOS TEORICOS Y METODOLOGICOS CONSIDERADOS EN EL DISEÑO DEL APARATO PARA ELECTROFORESIS PREPARATIVA EN GEL DE POLIACRILAMIDA.	85
8./ BIBLIOGRAFIA.	93

1. / RESUMEN.

Un análisis preliminar del problema sugirió la conveniencia de basar los trabajos de la detección y el aislamiento del péptido "A" de la insulina humana entre los péptidos obtenidos por ruptura química de una porción homogénea de la proteína portadora del péptido "A" de la insulina en forma de inserto carboxilo terminal (proteína híbrida beta-galactosidasa "A").

Para los estudios de purificación de la proteína híbrida se preparó una solución enriquecida hasta el 60% respecto al total de proteínas, a partir de una inicial con un contenido de 30%. El procedimiento se basó en un estudio del reparto de la proteína híbrida entre las porciones soluble e insoluble, en medios de diversa naturaleza.

La proteína híbrida se purificó por electroforesis en gel de poliacrilamida, incorporando un detergente iónico necesario para su solubilización. Se optimizaron las concentraciones de los electrolitos del sistema glicinato, cloruro, tris, con base en la teoría de electroforesis en sistemas de electrolitos discontinuos y se determinaron las concentraciones óptimas de monómero y las longitudes de los geles concentrador y separador, requeridos para conseguir la separación deseada. El resultado de la separación fue la recuperación total de la proteína híbrida sin contaminantes apreciables.

Como referencia para comparar los resultados obtenidos en la purificación por electroforesis, se estudió la separación de la misma muestra por cromatografía de permeación en gel, en presencia del mismo detergente iónico. Aunque el primer método resultó superior en resolución, selectividad y rapidez, el segundo presentó ventajas aprovechables en la separación a la escala de gramos.

Se estudiaron las posibilidades de separación por electroforesis en gel de poliacrilamida de los péptidos de bromuro de cianógeno de la proteína híbrida. Se diseñó un sistema de electrolitos que resultó

satisfactorio para conseguir la resolución de péptidos de 60 000 a 1 000 daltons, en presencia de un detergente iónico. En estas condiciones fué posible separar y detectar, entre los péptidos de cianogénolisis de la proteína híbrida "A", un péptido que migraba a la misma posición que el péptido "A" de la insulina.

Con el fin de aprovechar las posibilidades de separación por electroforésis, combinando los efectos de carga eléctrica y de talla molecular, se estudió la electroforésis del péptido "A" de la insulina tetra S-sulfonado en diversos electrolitos. Uno de los electrolitos probados se utilizó rutinariamente para investigar la composición de las porciones de péptidos de bromuro de cianógeno obtenidas en diversas etapas del aislamiento del péptido "A" de la insulina humana. También se diseñó y se probó un sistema de electrolitos para la separación por electroforésis de péptidos con carga negativa, en medio ácido, selectivo para el péptido "A" de la insulina tetra S-sulfonado. Las condiciones en las que ocurre la separación permiten procesar muestras de tamaño considerablemente mayor al usual en electroforésis de zona ya que solo participan en la separación los componentes de punto isoeléctrico menor a 4.2, cuya movilidad hacia el ánodo es mayor que la del ión acetato a ese pH.

Una porción de péptidos de bromuro de cianógeno, enriquecida en el péptido "A" de la insulina humana se sometió a electroforésis hacia el ánodo en medio ácido, en un gel granular. Los componentes concentrados entre los extremos rápido y lento del frente de migración se recuperaron y se pasaron por una columna de permeación en gel. Se investigó por cromatografía en fase líquida sobre un soporte apolar la composición de las fracciones recogidas alrededor del volúmen de elución observado para un estándar del péptido "A" en la misma columna de permeación. Entre los cromatogramas se encontró un pico con una retención similar a la de un estándar del péptido "A" de la insulina tetra S-sulfonado. Los resultados de electroforésis analítica en medio básico y de composición de aminoácidos de alícuotas de la fracción correspondiente al pico mencionado indican que corresponde a un componente singular, indistinguible de un estándar del péptido "A" de la insulina porcina, el cual tiene la misma composición de aminoácidos que el péptido "A" de la insulina humana.

2. // OBJETIVO.

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación cuyo objetivo final es la producción de insulina humana por asociación química de los péptidos que la constituyen. Los péptidos "A" y "B" de la insulina humana son sintetizados por dos cepas de E. coli modificadas genéticamente para producir cada uno de los péptidos de la insulina, unido covalentemente al extremo carboxilo terminal de la enzima beta-galactosidasa de E. coli.

El objetivo particular de este trabajo consiste en demostrar la presencia del péptido "A" de la insulina humana entre los péptidos provenientes del material protéico bacteriano, y caracterizarlo desde el punto de vista fisicoquímico con el fin de obtener la información necesaria para su aislamiento en el estado de pureza requerido para su asociación química con el péptido "B".

La cepa productora de la proteína híbrida beta-galactosidasa "A", constituye el material de partida para la investigación y fué proporcionada por el Doctor Francisco Bolivar Zapata, director del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología.

3./ INTRODUCCION.

La producción biosintética de la insulina humana por medio de microorganismos se basa en la inserción de genes sintéticos en el material genético extracromosomal, en este caso de la bacteria *E. coli*, para conseguir su expresión a través de la síntesis proteica y producir cada uno de los péptidos de la insulina. La naturaleza de la expresión de genes en bacterias requiere la clonación del gene sintético a un gene de características bien definidas, en este caso el gene de beta-galactosidasa. La clonación de los genes sintéticos para los péptidos de la insulina contempló la posibilidad de su liberación de la proteína híbrida expresada, por ruptura selectiva de la unión covalente entre la beta-galactosidasa y el péptido de la insulina

La beta-galactosidasa (β - Galactósido galactohidrolasa E.C. 3.2.1.23) constituye cerca del 5% del total de proteínas en cepas alopoides de *Escherichia coli*; sin embargo, se alcanzan niveles considerablemente mayores en ciertos merodiploides.

La secuencia de aminoácidos propuesta (1) se muestra en la figura 1. El monómero contiene 1 021 aminoácidos en una sola cadena polipeptídica. La determinación de la secuencia se hizo por procedimientos bioquímicos convencionales auxiliados por estudios de complementación.

La hormona insulina es un polipéptido producido por muchos organismos superiores del reino animal, y cuya composición de aminoácidos varía de una especie a otra, aunque su función biológica es siempre la misma. Todas las variantes de la insulina estudiadas contienen dos cadenas peptídicas interconectadas por dos puentes disulfuro.

La naturaleza química de los aminoácidos que componen a la cadena "A" le confieren propiedades ácidas, mientras que los aminoácidos de la cadena "B" le confieren propiedades básicas. Los péptidos "A" y "B" de la insulina humana contienen 21 y 30 aminoácidos respectivamente y,

en el péptido "A", un enlace disulfuro adicional conecta los residuos 6 y 11 formando un puente intramolecular. En la figura 2 se muestra la estructura de la insulina humana.

Cada uno de los péptidos de la insulina se produce "in vivo" como un segmento peptídico unido por medio de metionina al extremo carboxilo terminal de la betagalactosidasa. Las cadenas biosintetizadas de la insulina, las cuales no contienen metionina, pueden liberarse eficientemente por reacción con bromuro de cianógeno (2) y, finalmente, asociarse correctamente (3) "in vitro" con el fin de producir insulina humana biológicamente activa.

La acción del bromuro de cianógeno sobre las proteínas se caracteriza por un ataque selectivo al aminoácido metionina que provoca el rompimiento químico del enlace peptídico de la metionina en condiciones suaves. El resultado de este rompimiento es la liberación del aminoácido o aminoacilpéptido que sigue a la metionina, mientras que el residuo de metionina que originalmente ocupaba la posición endo se convierte en una lactona de homoserina y pasa a ser el aminoácido carboxilo terminal del fragmento peptídico. Aún en condiciones ácidas la lactona de homoserina producida está en equilibrio con la homoserina por lo que es necesario calentar en presencia de un ácido fuerte para lactonizarla o, preferentemente, formar la homoserina por tratamiento con un álcali a temperatura ambiente.

La selectividad de la reacción de bromuro de cianógeno con los aminoácidos depende del pH. En medio alcalino el bromuro de cianógeno reacciona con los grupos básicos de la proteína, pero esta reacción puede suprimirse fácilmente por protonación. En medios neutro y ácido solo la metionina y la cisteína se atacan con bromuro de cianógeno. La cisteína se oxida lentamente a ácido cistéico, aunque esta reacción no es importante debido a que los grupos SH son comparativamente poco frecuentes y, en todo caso, pueden protegerse ya sea irreversiblemente o reversiblemente.

10 20 30
 The-Met-Ile-The-Asp-Ser-Leu-Ala-Val-Val-Leu-Gln-Arg-Arg-Trp-Glu-Asp-Pro-Cys-Val-Thr-Gln-Leu-Ser-Arg-Leu-Ala-Ala-Met-
 CMB1
 HTA
 40 50 60
 Pro-Pro-Phe-Ala-Ser-Trp-Arg-Asp-Ser-Glu-Glu-Ala-Arg-The-Asp-Arg-Pro-Ser-Glu-Gln-Leu-Arg-Val-Leu-Ser-Gly-Glu-Trp-Arg-Phe-
 CMB1
 70 80 90
 Ala-Trp-Phe-Pro-Ala-Pro-Glu-Ala-Val-Phe-Glu-Ser-Trp-Leu-Glu-Cys-Asp-Leu-Pro-Glu-Ala-Asp-Thr-Val-Val-Val-Pro-Ser-Asp-Trp-
 HTA
 100 110 120
 Glu-Met-Met-Cys-Tyr-Asp-Ala-Pro-Ile-Tyr-Thr-Ser-Val-Thr-Tyr-Pro-Ile-Thr-Val-Asp-Pro-Phe-Phe-Val-Pro-Thr-Glu-Ser-Phe-Phe-
 CMB1
 130 140 150
 Gly-Cys-Tyr-Ser-Leu-Thr-Phe-Asn-Val-Asp-Glu-Ser-Trp-Leu-Glu-Gly-Glu-Thr-Arg-Ile-Ile-Phe-Asp-Gly-Val-Asn-Ser-Ala-Phe-
 CMB1
 160 170 180
 Met-Leu-Trp-Cys-Asn-Gly-Arg-Trp-Val-Gly-Tyr-Gly-Gln-Asp-Ser-Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe-Asp-Leu-Ser-Ala-Phe-Leu-Arg-Ala-Gly-
 CMB1
 190 200 210
 Glu-Asn-Arg-Leu-Ala-Val-Met-Val-Leu-Arg-Trp-Ser-Asp-Gly-Ser-Tyr-Leu-Glu-Asp-Gln-Asp-Met-Trp-Arg-Met-Ser-Gly-Ile-Phe-Arg-
 HTA
 220 230 240
 Asp-Val-Ser-Leu-Leu-Met-Iys-Pro-Thr-Thr-Gln-Ile-Ser-Asp-Phe-Met-Val-Ala-Thr-Arg-Phe-Asn-Asp-Asp-Phe-Ser-Arg-Ala-Val-Ile-
 CMB1
 250 260 270
 Glu-Ala-Glu-Val-Glu-Met-Cys-Gly-Glu-Leu-Arg-Asp-Trp-Leu-Arg-Val-Thr-Val-Ser-Leu-Trp-Glu-Gly-Glu-Thr-Gln-Val-Ala-Ser-Gly-
 HTA
 280 290 300
 Thr-Ala-Pro-Phe-Gly-Gly-Glu-Ile-Ile-Asp-Glu-Arg-Gly-Gly-Tyr-Ala-Asp-Arg-Val-Thr-Leu-Arg-Leu-Asn-Val-Glu-Asn-Pro-Lys-Leu-
 CMB1
 310 320 330
 Trp-Ser-Ala-Glu-Ile-Pro-Asn-Leu-Tyr-Arg-Ala-Val-Val-Glu-Leu-Met-Thr-Ala-Asp-Gly-Glu-Leu-Ile-Glu-Ala-Gly-Thr-Cys-Asp-Phe-
 CMB1
 340 350 360
 Arg-Glu-Val-Arg-Ile-Glu-Asn-Gly-Leu-Leu-Asn-Gly-Lys-Pro-Leu-Leu-Ile-Arg-Gly-Val-Asn-Arg-Met-Gln-Met-Met-Pro-Leu-
 CMB1
 370 380 390
 His-Gly-Gln-Val-Met-Asp-Glu-Gln-Thr-Met-Val-Glu-Asp-Ile-Leu-Leu-Met-Lys-Gln-Asn-Phe-Asn-Ala-Val-Ile-Arg-Cys-Ser-Met-Tyr-
 CMB1
 400 410 420
 Pro-Asn-Met-Pro-Leu-Trp-Tyr-Thr-Leu-Tyr-Asp-Arg-Tyr-Gly-Leu-Tyr-Val-Val-Asp-Glu-Ala-Asp-Ile-Glu-Thr-Met-Cys-Met-Val-Pro-
 CMB10
 HTA
 430 440 450
 Met-Asn-Arg-Leu-Thr-Asp-Asp-Pro-Arg-Trp-Leu-Pro-Ala-Met-Ser-Glu-Arg-Val-Thr-Arg-Met-Val-Glu-Arg-Asp-Arg-Asn-Met-Pro-Ser-
 CMB11
 HTA
 460 470 480
 Val-Ile-Ile-Trp-Ser-Leu-Gly-Asn-Glu-Ser-Gly-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Asp-Ala-Leu-Tyr-Arg-Trp-Ile-Lys-Ser-Val-Asp-Pro-Ser-Arg-
 CMB14
 490 500 510
 Pro-Val-Gln-Tyr-Glu-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Thr-Thr-Ala-Thr-Asp-Ile-Ile-Cys-Pro-Met-Tyr-Ala-Arg-Val-Asp-Glu-Asp-Gln-Pro-Phe-
 HTA

520 530 540
 Pro-Ala-Val-Pro-Lys-Trp-Ser-Ile-Lys-Lys-Trp-Leu-Ser-Leu-Pro-Gly-Glu-Thr-Arg-Pro-Leu-Lys-Leu-Cys-Glu-Tyr-Ala-Met-Met-
 CMB15
 HTA
 550 560 570
 Gly-Asn-Ser-Leu-Gly-Gly-Phe-Ala-Lys-Tyr-Trp-Gln-Ala-Phe-Arg-Glu-Tyr-Pro-Arg-Leu-Gln-Pro-Gly-Phe-Val-Trp-Asp-Trp-Val-Asp-
 CMB16
 580 590 600
 Glu-Ser-Leu-Ile-Lys-Tyr-Asp-Glu-Asn-Gly-Asn-Pro-Trp-Ser-Ala-Tyr-Gly-Gly-Asp-Phe-Gly-Asp-Thr-Pro-Asp-Asp-Arg-Glu-Phe-Cys-
 CMB17
 610 620 630
 Met-Asn-Gly-Leu-Val-Phe-Ala-Asp-Arg-Thr-Pro-Met-Pro-Ala-Leu-Thr-Glu-Ala-Lys-Met-Gln-Gln-Gln-Phe-Gln-Phe-Arg-Leu-Ser-
 CMB17
 640 650 660
 Gly-Gln-Thr-Ile-Glu-Val-Thr-Ser-Glu-Tyr-Leu-Phe-Arg-Met-Ser-Asp-Asn-Glu-Leu-Leu-Met-Trp-Met-Val-Ala-Leu-Asp-Gly-Ile-Pro-
 CMB18
 670 680 690
 Leu-Ala-Ser-Gly-Glu-Val-Pro-Leu-Asp-Val-Ala-Pro-Gln-Gly-Lys-Gln-Leu-Ile-Glu-Leu-Gln-Glu-Leu-Pro-Glu-Pro-Glu-Ser-Ala-Gly-
 CMB18
 700 710 720
 Pro-Leu-Trp-Leu-Thr-Val-Arg-Val-Val-Gln-Pro-Asn-Ala-Thr-Ala-Trp-Ser-Glu-Ala-Gly-Met-Glu-Ser-Ala-Ile-Glu-Gln-Trp-Arg-Leu-
 CMB19
 730 740 750
 Arg-Glu-Asn-Leu-Ser-Val-Thr-Leu-Pro-Ala-Ala-Ser-Met-Ala-Ile-Pro-Met-Leu-Thr-Thr-Ser-Glu-Met-Asp-Phe-Cys-Ala-Glu-Leu-Gly-
 HTA
 760 770 780
 Asn-Lys-Arg-Trp-Gln-Phe-Asn-Arg-Gln-Ser-Gly-Phe-Leu-Ser-Gln-Met-Trp-Ile-Gly-Asp-Lys-Lys-Gln-Leu-Leu-Thr-Pro-Leu-Arg-Asp-
 CMB19
 HTA
 790 800 810
 Glu-Phe-Thr-Arg-Ala-Pro-Leu-Asp-Asn-Asp-Ile-Gly-Val-Ser-Glu-Ala-Thr-Arg-Ile-Asp-Pro-Asn-Ala-Trp-Val-Glu-Arg-Trp-Lys-Ala-
 CMB20
 820 830 840
 Ala-Gly-Met-Tyr-Gln-Ala-Glu-Ala-Ala-Leu-Leu-Gln-Cys-Thr-Ala-Asp-Thr-Leu-Ala-Asp-Ala-Val-Leu-Ile-Thr-Thr-Ala-Met-Ala-Trp-
 CMB21
 850 860 870
 Glu-Met-Gln-Gly-Lys-Thr-Leu-Phe-Ile-Ser-Arg-Lys-Thr-Tyr-Arg-Ile-Asp-Gly-Ser-Gly-Gln-Met-Ala-Ile-Thr-Val-Asp-Val-Glu-Val-
 CMB22
 880 890 900
 Ala-Ser-Asp-Thr-Pro-Met-Pro-Ala-Arg-Ile-Gly-Leu-Asn-Cys-Gln-Leu-Ala-Gln-Val-Ala-Glu-Arg-Val-Asn-Trp-Leu-Gly-Leu-Gly-Pro-
 CMB21
 910 920 930
 Gln-Glu-Asn-Tyr-Pro-Asp-Arg-Leu-Thr-Ala-Ala-Cys-Phe-Asp-Arg-Trp-Asp-Leu-Pro-Leu-Ser-Asn-Met-Tyr-Thr-Pro-Tyr-Val-Phe-Pro-
 HTA
 940 950 960
 Ser-Glu-Asn-Gly-Leu-Arg-Cys-Gly-Thr-Arg-Glu-Leu-Asn-Tyr-Gly-Pro-Met-Gln-Trp-Arg-Gly-Asp-Phe-Gln-Phe-Asn-Ile-Ser-Arg-Tyr-
 CMB22
 970 980 990
 Ser-Gln-Gln-Gln-Leu-Met-Glu-Thr-Ser-Met-Arg-Met-Leu-Leu-Met-Ala-Glu-Gly-Thr-Trp-Leu-Asn-Ile-Asp-Gly-Phe-Met-Met-Gly-
 HTA
 CMB23
 1000 1010 1020
 Ile-Gly-Gly-Asp-Asp-Ser-Trp-Ser-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-Glu-Phe-Gln-Leu-Ser-Ala-Gly-Arg-Tyr-Met-Tyr-Gln-Leu-Val-Trp-Cys-Gln-Lys-
 CMB24

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la beta-galactosidasa aislada de la cepa A 324-5 de E.coli.

INSULINA HUMANA

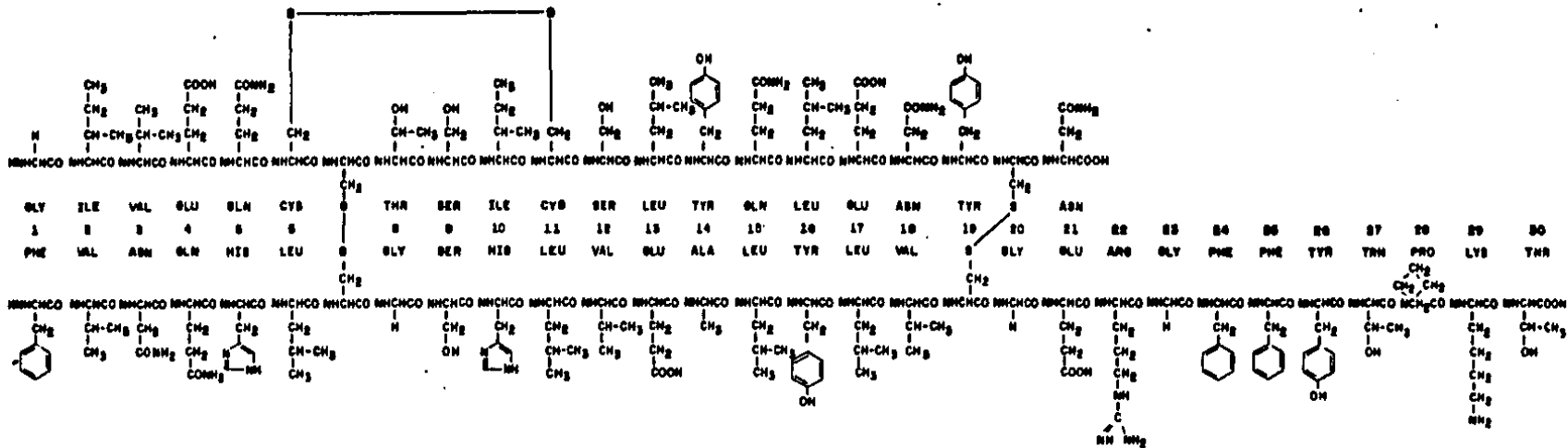
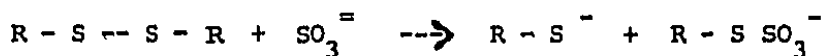


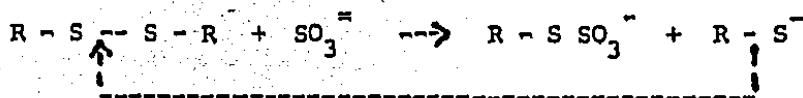
Figura 2. Esquema simplificado de la estructura de la insulina humana.

Los residuos de cisteína en las proteínas pueden formar puentes entre diferentes péptidos o mantener enlazadas diferentes partes de un mismo péptido. La validez de muchos estudios bioquímicos requiere la conversión de los residuos de cistina en derivados más estables. Esto elimina la posibilidad de reacomodos debidos principalmente al intercambio de disulfuros. Además, las proteínas en las que se han separado los residuos de cistina normalmente son más susceptibles al ataque enzimático y químico.

Los métodos más comunmente usados para la ruptura de enlaces disulfuro (4) son la oxidación con ácido perbórmico, la ruptura por reducción del disulfuro con un exceso de algún tiol y la fisión del puente disulfuro con sulfito. La oxidación con ácido perbórmico consiste en convertir la cistina en ácido cistéico y tiene el inconveniente de que la acción del agente oxidante no se limita a los residuos de cistina sino que degrada al triptofano, convierte casi cuantitativamente a la metionina en sulfona y puede modificar también a la tirosina. La ruptura por reducción del disulfuro por un exceso de tiol se emplea en muchos casos como el primer paso en el bloqueo de los azufres de cistina y cisteína de las proteínas, con reactivos con un halógeno activo o un doble enlace capaz de reaccionar con el SH. La fisión específica del puente disulfuro con sulfito consiste en la oxidación y reducción simultáneas de los azufres del puente, con la producción de un residuo de cisteína y un derivado S-sulfonado.



Por razones de estabilidad, es conveniente convertir todos los aminoácidos cisteína y cistina de las proteínas en grupos S-sulfonato. La forma más simple de conseguirlo es aportando un agente oxidante suave para mantener un ciclo de oxidación y reducción (3) hasta consumir los grupos SH.



Oxidante suave

Las propiedades de los derivados S-sulfonados de las proteínas son similares a las de los derivados de las mismas proteínas en los que los azufres de los residuos de cisteína y cistina se han convertido en ácidos fuertes; sin embargo, algunos de ellos presentan una fuerte tendencia a agregarse por lo que es necesario conservar el pH y la fuerza iónica de las soluciones en un intervalo estrecho con el objeto de no alterar su solubilidad.

Por su estabilidad bajo las condiciones usuales de aislamiento de péptidos, los derivados S-sulfonados tienen gran importancia en las aplicaciones preparativas. Además pueden convertirse fácilmente a su forma reducida por lo que se utilizan en la síntesis de proteínas con enlaces disulfuro.

Ya que el péptido "A" de la insulina humana se biosintetiza por medio de bacterias unido por medio de metionina a un fragmento de beta-galactosidasa (5), en forma de proteína híbrida que posee un número considerable de cisteínas y cistinas (6); para su aislamiento se requiere tanto de su liberación del fragmento de beta-galactosidasa por ruptura en la posición de metionina, como de la ruptura de los enlaces de cistina y de la protección reversible de los residuos de cisteína en vista de que su asociación química con el péptido "B" ocurre por medio de dos enlaces de cistina.

4.1: LOS METODOS DE SEPARACION.

4.1.1. GENERALIDADES.

Un grupo muy importante de métodos de separación es el de los procesos de separación basados en la migración diferencial de los componentes de la muestra ya sea a través de un medio (fase estacionaria) permeable al flujo de un fluido (fase móvil), o a través de una región homogénea por el efecto de algún campo de fuerza. Al inicio de la separación los componentes de la muestra ocupan la misma región en la zona de aplicación, pero mientras los componentes migran en el medio de separación se apartan gradualmente y eventualmente se separan. La cromatografía es el ejemplo clásico de migración diferencial producida por el flujo de un fluido, mientras que la electroforesis de zona ocurre por migración diferencial de moléculas con carga eléctrica en un campo eléctrico.

En los métodos con flujo la velocidad de migración de un componente está determinada por su distribución al equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. En un campo de fuerza las diferencias de velocidad de migración de los componentes ocurren como resultado de variaciones en propiedades como coeficientes de difusión o coeficientes de fricción entre los diferentes componentes. En ambos casos, estas diferencias de velocidad de migración entre los componentes de la muestra son las responsables de la separación.

La migración de los componentes va acompañada de una creciente dispersión de la zona inicial. Esta dispersión de las zonas se debe a un inadecuado intercambio entre las fases, a la difusión común, al mezclado y a algunas interacciones inespecíficas entre los componentes y el medio. Los perfiles de concentración de los componentes tienen la forma de una curva de Gauss cuya varianza es proporcional a la distancia migrada. El factor de proporcionalidad es función de varios parámetros del sistema y de las condiciones de operación, y se denomina Número de Platos Teóricos y es una medida directa de la eficiencia del método de separación.

La separación relativa de dos zonas adyacentes al cabo de una cierta distancia migrada depende de dos factores: (i) el grado de separación o la distancia entre los centros de las zonas y (ii) el grado de dispersión o el ancho de las zonas. Conviene expresar la separación relativa entre dos componentes adyacentes por la resolución. La resolución es la relación entre la distancia que separa los centros de dos zonas y el producto de la desviación estándar de los picos por una constante que define el ancho de banda correspondiente a una unidad de resolución.

4.1.2. CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES DE LOS METODOS DE SEPARACION.

CAPACIDAD DE MUESTRA.

La capacidad de muestra propia de un método de separación se refiere a la cantidad máxima de muestra que puede separarse con una eficiencia dada. La capacidad de muestra generalmente depende más del procedimiento o del equipo usado para llevar a cabo la separación que de las características intrínsecas del método mismo.

CAPACIDAD DE FRACCIONES.

La capacidad de fracciones de un método de separación es el número máximo de componentes que pueden separarse en una sola operación. Los mejores métodos para separar mezclas complejas en sus componentes individuales se caracterizan por su gran capacidad de fracciones, la cual depende de la eficiencia del proceso de separación. En la cromatografía y en la electroforésis de zona, la capacidad de fracciones es equivalente a la capacidad de picos o número máximo de bandas o componentes distinguibles que se pueden obtener con un sistema particular para ciertas condiciones experimentales.

SELECTIVIDAD.

La selectividad es una medida de la capacidad intrínseca de un método de separación para diferenciar a los componentes y está íntimamente relacionada con el fenómeno fisicoquímico fundamental en el que

se basa la separación. En el caso de la cromatografía, la selectividad se mide por el factor de separación, mientras que para la electroforé^sis la selectividad se mide como una relación de movi^lidades iónicas. En todos los casos, la selectividad de un método de separación es consecuencia de su capacidad de respuesta hacia las propiedades moleculares de los componentes.

Con mucha frecuencia las propiedades moleculares de los componentes de una muestra dan lugar a varias categorías de selectividad; en estos casos debe buscarse un método que aproveche alguna o varias de estas propiedades para realizar la separación, o bien buscar varios métodos en una secuencia que permita conseguir la separación de los componentes de interés. La selectividad de una separación puede variarse dentro de un rango muy amplio, dependiendo de las condiciones experimentales, por lo que además de buscar el método de separación apropiado es necesario establecer las condiciones que produzcan la mejor separación.

RAPIDEZ Y SIMPLICIDAD EXPERIMENTAL.

Cualquier esfuerzo por mejorar la rapidez de la separación y la simplicidad del procedimiento resulta muy valioso, particularmente para el trabajo rutinario. Por supuesto que la rapidez y la simplicidad de una separación están relacionadas con la eficiencia, la capacidad de fracciones y la capacidad de muestra. Estas características no pueden mejorarse simultáneamente por lo que la optimización de las condiciones de separación debe basarse en una serie de consideraciones de diversa índole.

4.1.3. ELECCION DE UN METODO DE SEPARACION.

La elección de un método de separación apropiado para solucionar un problema de separación particular se basa en una serie de consideraciones prácticas, entre las cuales la más obvia es la compatibilidad de las condiciones de la separación con la naturaleza de los componentes de la muestra. Evidentemente, la aplicabilidad de un método particular está determinada por las propiedades fisicoquímicas en las que se basa la separación.

La forma de abordar un problema de separación queda determinada por la información disponible sobre los componentes de la muestra y por los objetivos de la separación. El problema se simplifica notablemente cuando se dispone de amplia información sobre las propiedades de los componentes, o cuando se está interesado sólo en alguno (s) de ellos.

En los casos en los que la complejidad de la muestra no permite alcanzar el objetivo de la separación por medio de un solo método se hace necesaria la combinación de varios métodos o etapas de purificación. Para diseñar correctamente tales secuencias de purificación es necesario conocer las capacidades relativas de cada uno de los métodos disponibles. El diseño consiste en determinar cuántas etapas de purificación se emplearán par lograr el objetivo deseado, con qué criterios se seleccionaran las separaciones individuales, y en qué orden habrán de llevarse a cabo.

Uno de los aspectos más importantes a considerar en la elección de los métodos que integren el esquema de separación es la selectividad del método. La selectividad requerida para resolver un problema particular depende de la naturaleza de la muestra.

Las consideraciones sobre la selectividad de un método de separación no sólo permiten planear la separación de los componentes de una muestra ofreciendo la posibilidad de predecir el resultado de una separación, también permiten interpretar los resultados de una separación con

fines de identificación o de caracterización de los componentes. En ciertos casos esto permite la identificación de componentes de la muestra por comparación de los resultados de la separación de los componentes con los resultados obtenidos para compuestos de referencia. Aún cuando no se disponga de compuestos de referencia apropiados, los resultados de una separación pueden ofrecer información relacionada con la estructura de los componentes de la muestra siempre que se conozca la relación entre la estructura molecular y el comportamiento en la separación. El análisis del comportamiento de un componente en una separación para inferir su estructura molecular se complica cuando el método de separación se basa en más de un tipo de selectividad.

La capacidad de fracciones requerida para conseguir el objetivo de la separación depende de la complejidad de la muestra, es decir, el número de componentes individuales y sus concentraciones relativas. Para resolver mezclas de un centenar de componentes individuales normalmente se requiere de más de un método de separación, aún de gran capacidad de fracciones, tanto más cuanto menor sea la cantidad relativa de los componentes de interés.

Las características de capacidad de muestra, rapidez de separación y simplicidad del método tienen un gran interés práctico y deben tomarse seriamente en cuenta durante la elección de los métodos de separación que han de integrar un esquema de purificación. Una vez cumplidos los requerimientos básicos de selectividad y de capacidad de fracciones, lo mismo que el requisito elemental de aplicabilidad o compatibilidad con la naturaleza de la muestra, la elección final de los métodos disponibles debe perseguir la máxima conveniencia (simplicidad y rapidez) siempre que la capacidad de muestra de los métodos sea lo suficientemente grande para realizar la separación a una escala conveniente. En las separaciones preparativas lo mismo que en el análisis de componentes poco abundantes, la capacidad de muestra resulta particularmente importante en comparación con otras características.

4.2. SEPARACION DE MACROMOLECULAS DE ORIGEN BIOLOGICO.

4.2.1. GENERALIDADES.

Los criterios de pureza aplicables a una separación de proteínas están determinados por el propósito particular por el cual se realiza la separación. Los procedimientos de separación que integran un esquema de purificación están determinados por el grado de pureza requerido y por la abudancia relativa de los componentes de interés en la muestra inicial. Una característica muy importante de los métodos de separación escogidos es su rendimiento expresado en términos de la cantidad total de proteína recuperada (o de su actividad específica). Otro aspecto importante es la economía del proceso de purificación global, la cual incluye no solo el costo de los materiales usados y el tiempo requerido para llevar a cabo la separación hasta el grado de pureza (enriquecimiento) requerido, sino también el costo en función del rendimiento. La gran variedad de métodos de separación disponibles en la actualidad ofrece una gran libertad de elección aún para resolver problemas de separación muy particulares.

Siempre conviene revisar la información disponible acerca de la proteína de interés para establecer un plan inicial. Debe considerarse la naturaleza de la muestra en lo que se refiere a su volúmen, las cantidades de proteínas contaminantes, el pH y la fuerza iónica de la solución, con el fin de prever la escala de las separaciones y de planear la secuencia de métodos de separación de manera que la muestra obtenida a partir de cada etapa sea adecuada para su aplicación a la siguiente etapa. Naturalmente resulta muy valiosa cualquier información sobre las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra, como su tamaño (peso molecular), su punto isoeléctrico, su solubilidad y su hidrofobicidad. Algunas veces también resulta útil saber algo sobre sus propiedades químicas.

Para conseguir una separación pueden aprovecharse diferentes tipos de selectividad, entre ellos: la solubilidad, la talla molecular, la carga eléctrica, la hidrofobicidad y la actividad biológica. Los mejores

resultados de enriquecimiento se obtienen al incluir métodos de separación basados en diferentes selectividades dentro del esquema de purificación, ya que los contaminantes que no se eliminan en un procedimiento basado en cierto principio probablemente puedan eliminarse por un procedimiento basado en otro principio. Ya que algunos métodos de separación permiten una mayor recuperación que otros, conviene el uso de métodos de mayor recuperación hacia el final de la secuencia de purificación, cuando el valor de la muestra es mayor. Estos métodos de preferencia deben ser rápidos y ocurrir en condiciones controlables.

Aunque la teoría no preve el efecto del orden de las etapas en las que se eliminan los distintos contaminantes sobre el resultado final de la purificación, algunas consideraciones prácticas determinan la secuencia que deben seguir las etapas de separación de un esquema de purificación. Al inicio de la purificación, cuando es necesario manipular grandes cantidades de material, conviene aplicar métodos de gran capacidad como el intercambio iónico; en estas condiciones una gran resolución es un requerimiento secundario. La compatibilidad entre los procedimientos de separación adyacentes es otro aspecto a considerar la secuencia de etapas del esquema de purificación.

Aunque el material a partir del cual ha de aislarse la proteína está determinado por el estudio que se realiza, siempre conviene escoger un material particularmente rico en el componente deseado u otro que permita minimizar el número de contaminantes protéicos. Muchas veces el material de partida consiste en una fracción subcelular o de tejido, por lo que se necesita romper u homogeneizar el material celular en una solución reguladora de pH. Las fracciones soluble e insoluble se separan por filtración o por centrifugación y se examina la distribución de la proteína de interés en ambas fracciones. Si la proteína deseada está asociada con la fracción insoluble es necesario solubilizarla para su procesamiento posterior. Si está presente en la fracción soluble es posible proceder directamente a la siguiente etapa.

La preparación cruda que resulta de la extracción generalmente consiste de una gran variedad de proteínas, en un volúmen grande de muestra. La etapa siguiente debe ser capaz de procesar una cantidad de material considerable y, de ser posible, concentrar la muestra para su procesamiento posterior. La precipitación por adición de disolventes orgánicos, por efecto de cambios de pH, o de fuerza iónica con sales como el sulfato de amonio, es un paso inicial muy común en la purificación de proteínas. Es un método económico, simple y de gran capacidad; sin embargo no es apropiado para componentes de bajo peso molecular. La absorción es una buena alternativa a la precipitación. Se requiere de un material que absorba selectivamente las sustancias de interés a partir de la preparación cruda. Un enriquecimiento por intercambio iónico, por ejemplo, consiste en mezclar la muestra con el intercambiador (sólido) y dejarlos equilibrar durante algún tiempo para absorber a los componentes de interés. Entonces se lava el intercambiador y se desorben los componentes aumentando la fuerza iónica o cambiando el pH. Esta etapa gruesa de separación puede convertirse en un método bastante selectivo si se eligen apropiadamente el tipo de intercambiador y las condiciones experimentales de absorción y desorción. La absorción bioselectiva también puede ser un método muy útil en estas circunstancias si se aprovechan las propiedades biológicas de las proteínas por separar. Los materiales para la absorción por bioafinidad son más caros que los intercambiadores de iones y requieren técnicas de elución más cuidadosas; sin embargo, la gran selectividad de las técnicas de absorción por afinidad las convierte en métodos muy valiosos.

Una vez que la proteína de interés se extrajo de su fuente de origen y se le eliminaron algunos de los contaminetes mayores por medio de procedimientos de gran capacidad aunque poco selectivos (excepto que haya sido posible utilizar un procedimiento de separación por bioafinidad en una etapa inicial), los procedimientos siguientes debes ser más selectivos. Por otra parte, en cualquier etapa de la purificación, resulta de gran utilidad un método analítico de gran resolución como la electroforésis para comprobar que se han eliminado los contaminantes esperados.

Las separaciones gruesas por precipitación o por adsorción producen muestras concentradas contaminadas por los solutos usados en la precipitación o en la desorción, en concentraciones elevadas. La permeación en gel es un método particularmente adecuado para procesar este tipo de muestras, ya que su funcionamiento es casi insensible a la composición de la muestra. Esta propiedad de la permeación en gel también permite tener un control considerable sobre las condiciones de elución. Otro método aplicable a muestras con un contenido importante de sales es la cromatografía por interacciones hidrofóbicas.

La cromatografía de intercambio iónico es uno de los métodos selectivos más populares, además resulta particularmente útil después de un procedimiento de permeación en gel del cual se obtiene generalmente un producto diluido. Dado que tanto el pH como la fuerza iónica tienen una gran influencia en la unión de los componentes al intercambiador, es indispensable que el procedimiento anterior se haya realizado en el regulador adecuado o eliminar los solutos que puedan interferir con la separación y equilibrar la muestra al pH adecuado. Una forma simple y rápida para trasladar a los componentes de la muestra al regulador adecuado es una cromatografía por permeación en gel en una columna corta y ancha, con un gel permeable solo a los solutos de bajo peso molecular, equilibrado con el regulador indicado para el experimento de intercambio.

Es importante comprobar el grado de pureza de las muestras obtenidas después de cada una de las etapas del procedimiento de purificación con el propósito de conocer el grado en que se alcanzan los objetivos deseados. Por esto, los métodos de análisis usados deben ser aplicables a todo el rango de proteínas de las muestras y, naturalmente, deben ser rápidos y eficientes.

Virtualmente toda la información concerniente a la purificación de una proteína puede obtenerse por electroforésis en alguna de sus modalidades. Por medio de este método de separación es posible detectar contaminación de proteínas, estimar su peso molecular y su punto isoeléctico y aún obtener información sobre la actividad biológica de las proteínas.

La electroforésis en gel de poliacrilamida, en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato es un método estándar para establecer las condiciones de pureza de las muestras de proteínas. La separación se basa en las diferencias de tamaño de los componentes en condiciones disociantes. El método es eficiente, selectivo y rápido. El enfoque isoeléctrico es una técnica de separación de gran resolución, y puede usarse para aplicaciones preparativas lo mismo que para estudios analíticos ya que la determinación de los puntos isoeléctricos de los componentes también es importante para el desarrollo de otros métodos como el intercambio iónico. En términos generales, la detección de contaminantes por electroforésis en gel de poliacrilamida permite definir exactamente cuales métodos deben usarse para conseguir su eliminación.

Una vez que se ha alcanzado el grado de pureza requerido, conviene considerar la eficiencia del esquema de purificación en términos de rapidez, capacidad de muestra y conveniencia práctica. Finalmente, deben explorarse las reservas de capacidad y resolución de los métodos de separación para definir que tanto pueden modificarse las condiciones probadas para procesar mayores cantidades de muestra o muestras de menor calidad, sin perjudicar la calidad de la purificación.

4.2.2. SEPARACION DE MACROMOLECULAS POR CROMATOGRAFIA EN FASE LIQUIDA.

La separación de componentes en un sistema cromatográfico depende de su distribución diferencial entre una fase sólida estacionaria y una fase móvil líquida. Los componentes cuya concentración es mayor en la fase móvil son los primeros en eluir del lecho de fase estacionaria (columna), seguidos por los de menor concentración en la fase móvil. Las diferencias de elución de los componentes son consecuencia de la diferencia relativa entre sus coeficientes de distribución entre ambas fases. La exclusión selectiva a la talla molecular, el intercambio iónico, la interacción hidrofóbica sobre fases apolares y la afinidad bioespecífica son fenómenos que permiten disponer de métodos de separación por cromatografía en columna sensibles a las diferencias físicas o químicas de los biopolímeros.

La cromatografía de exclusión por tamaño permite separar moléculas basándose en sus diferencias de talla debido a su permeación diferencial en el material de la fase estacionaria. Cuando pasan a través de un lecho de partículas porosas, moléculas desde varios cientos hasta algunos millones de daltons, su comportamiento de elución sugiere que se puede considerar la existencia de distintas regiones o volúmenes dentro de la columna, un volumen (V_0) accesible a todas las moléculas y un volumen (V_1) que es accesible diferencialmente según es la talla del soluto. Estos volúmenes corresponden aproximadamente al volumen intersticial y al volumen de los poros del soporte, respectivamente. El volumen de elución de cualquier componente del lecho se expresa por la ecuación:

$$V_e = V_0 + K_D V_1$$

donde K_D se refiere al coeficiente de distribución de la exclusión por tamaño y corresponde a la fracción del volumen de poros accesible a la molécula.

Las gráficas del logaritmo del peso molecular de los solutos en función de K_D son aproximadamente lineales en un intervalo de valores de $0.15 < K_D < 0.80$. La pendiente (m) de esta curva de calibración está relacionada con la distribución del diámetro de los poros del empaque de la columna. En la medida en que la distribución del tamaño de poros es más heterogénea, m aumenta y el rango de selectividad de pesos moleculares de la columna se extiende pero disminuye el poder de resolución de la columna.

El poder de resolución de una columna de exclusión molecular es función principalmente del volumen de poros y de su distribución en el empaque, por un lado, y del ancho de los picos cromatográficos por el otro. Las primeras características están relacionadas con las propiedades inherentes del soporte, mientras que el ancho de los picos es función del tamaño de partículas del soporte, la homogeneidad de empacamiento de la columna, la velocidad de la fase móvil lo mismo que de su viscosidad, y del coeficiente de difusión del soluto.

Las técnicas de cromatografía por intercambio iónico, por interacción hidrofóbica (sobre un soporte apolar) y por afinidad se basan en mecanismos de retención muy diferentes, aunque en todas ellas interviene la superficie del soporte. Los biopolímeros (10 a 100 kilodaltons) pueden poseer cientos de residuos susceptibles a interacciones hidrofóbicas, iónicas y de formación de puentes de hidrógeno con la superficie de un soporte estacionario, muy probablemente estos puedan adsorberse en más de un sitio.

El factor que determina la retención de biopolímeros por interacción hidrofóbica es el área de contacto hidrofóbica entre el soluto y la fase estacionaria. Cuando el soporte es sílica porosa a la que se ha unido covalentemente un alquíl silano a una densidad de 2 a 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ de ligante, y los solutos se eluyen por medio de disolventes orgánicos, la técnica se conoce con el nombre de cromatografía en fase apolar o a polaridad de fases invertida. Los grupos alquilo se encuentran separados entre sí 7 Å en un soporte bien recubierto, situación que promueve la adsorción de los biopolímeros en múltiples sitios. La distribución de residuos hidrofóbicos en el espacio y el número de ellos capaces de interactuar con una superficie están determinados por la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria del polímero.

Actualmente no se dispone de una descripción exacta de la cromatografía de biopolímeros en fase apolar por varias razones. La estructura terciaria determina el grado de interacciones hidrofóbicas ya que los biopolímeros tienden a localizar los residuos hidrofóbicos dentro de su estructura tridimensional; sin embargo, las fases móviles usadas para eluir los componentes de las columnas de fase apolar alteran al menos parcialmente su estructura tridimensional, además de que con frecuencia se utilizan agentes formadores de pares de iones en la elución.

En la práctica, la elución de proteínas, péptidos y polinucleótidos de los soportes apolares requiere el uso de un disolvente orgánico y frecuentemente de un ácido. La función del disolvente orgánico

es la de disminuir las intensas interacciones hidrofóbicas entre los solutos y el soporte. Cuando un soluto contiene funciones químicas potencialmente ionizables, el ácido presente en la fase móvil puede influenciar su retención alterando el estado iónico del soluto, controlando la ionización de los silanoles superficiales del soporte y formando pares de iones con los grupos catiónicos del soluto. Cuando el ácido es hidrofóbico como el trifluoroacético, el soluto apareado con el trifluoroacetato es más hidrofóbico que el soluto nativo por lo que se retiene más fuertemente. Un par iónico hidrofílico como el formado con aniones del ácido fosfórico, la retención del soluto apareado es menor que la del soluto sin aparear.

La adición de ácidos a la fase móvil ha servido para mejorar la resolución y aumentar la recuperación de muchas proteínas. El más usado es el ácido trifluoroacético por ser un buen agente solubilizante y permitir la detección de péptidos hasta a 230 nm. Este ácido no es efectivo con proteínas de membranas, las cuales son muy hidrofóbicas y requieren el uso de ácido fórmico en concentraciones de 5 a 50% v/v.

4.2.3. SEPARACION DE MACROMOLECULAS POR ELECTROFORESIS.

En términos muy generales pueden distinguirse tres tipos de electroforésis: (i) la electroforésis de zona en electrolitos continuos, (ii) el enfoque isoeléctrico y (iii) la electroforésis en sistemas de electrolitos discontinuos, en cuyo principio se basa la isotacoforésis (8).

En la electroforésis en un medio continuo el electrolito es el mismo en los recipientes de electrólisis (anolito y catolito) y en toda la trayectoria de separación durante la electroforésis. La muestra se aplica en forma de zona delgada en un extremo de la trayectoria de separación. La separación es resultado de las diferencias de movilidad electroforética de los componentes cargados, al pH del electrolito usado.

En el enfoque isoeléctrico los componentes de la muestra mezclados con compuestos anfotéricos especiales ("anfolinas") se colocan entre dos recipientes con dos electrolitos, uno fuertemente básico y el otro fuertemente ácido, los cuales contienen a los electrodos positivo y negativo respectivamente. Cuando se impone un campo eléctrico entre los electrodos los anfolitos forman un gradiente de pH estable en el cual las biomoléculas anfotéricas migran hasta alcanzar una región de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. Dado que la carga eléctrica neta de las moléculas anfotéricas es nula en su punto isoeléctrico (pI), cesa su migración en el campo eléctrico por lo que los componentes se enfocan concentrados en diferentes partes del gradiente de pH, dependiendo de sus puntos isoeléctricos correspondientes.

En la electroforésis en sistemas discontinuos de electrolitos se produce un empacamiento de los componentes de la muestra en una zona delgada. Posteriormente se produce el desempacamiento acompañado de su separación en forma de zonas aisladas en el seno del electrolito que constituye la fase de resolución (fase PI) creada durante la electroforésis.

Un sistema discontinuo de electrolitos comprende un electrolito rápido y uno lento, los iones de la muestra se introducen en una región entre estos electrolitos. El electrolito rápido debe contener solo una especie de la misma carga que los iones por separar y debe tener una movilidad neta mayor que cualquiera de los iones de la muestra. La movilidad neta se define como la velocidad promedio expresada en unidades de campo eléctrico ($\text{cm}^2/\text{seg. volt}$); para electrolitos débiles es el producto de la movilidad iónica absoluta y el grado de ionización. El electrolito lento también debe contener solo una especie iónica de la misma carga pero de movilidad neta menor que cualquiera de los componentes de la muestra. Debe estar presente un contraíón común en todo el sistema. Cuando no se cumplen estos requisitos de movilidad, los iones de la muestra migran electroforéticamente como zonas en el seno de los electrolitos rápido o lento, dependiendo de su movilidad.

El campo eléctrico aplicado debe ser tal que el sentido de la migración de los componentes de la muestra va del electrolito lento al rápido. Después de un tiempo de migración suficiente los iones de la muestra se acomodan en forma de zonas contiguas en orden de sus movilidades, y si la densidad de corriente es constante las zonas continúan migrando a velocidad constante sin cambio alguno (estado estable de la isotacofrèsis). La velocidad de migración de cada zona es entonces igual a la velocidad de la zona del ión rápido y la concentración de cada especie iónica se ajusta automáticamente de manera que el campo eléctrico en cada zona sea inversamente proporcional a la movilidad de los constituyentes iónicos de la zona.

En la etapa de empacamiento los componentes se concentran en forma de zonas delgadas si sus movilidades relativas caen dentro del rango determinado por la movilidad relativa del componente lento (componente 1) en el electrolito que se produce al paso de la frontera móvil (electrolito ZETA) y la del componente rápido (componente 2) en el electrolito penetrado por la frontera móvil (electrolito BETA). El empacamiento en el estado estable se produce independientemente de la etapa de resolución posterior.

En general, el componente 1 debe ser un electrolito débil monovalente mientras que el componente 2 puede ser un ión, un electrolito débil monovalente o un electrolito débil divalente. El contraión común en todos los electrolitos (componente 6) puede ser un ión o un electrolito débil monovalente.

Cuando el frente de migración alcanza la línea de separación entre las fases de empacamiento y resolución ocurre un cambio de pH programado para que la movilidad relativa del componente 1 en el electrolito creado al paso de la frontera móvil en la fase de resolución (electrolito PI) sea de mayor magnitud que la de los componentes de la muestra los cuales migran en el seno del electrolito. Este resultado es similar al de una electroforésis de zona en un electrolito continuo (PI) pero difiere debido a la presencia de la frontera móvil, la cual puede visualizarse por la presencia de un colorante que migre junto con el frente (colorante trazador).

En la figura 3 se muestra un esquema de las fases que componen un sistema de electrolitos para electroforésis en fases discontinuas. Una vez iniciada la electroforésis y la migración de la frontera móvil, la fase BETA del sistema se transforma en una fase ZETA y posteriormente, la fase GAMA se transforma en una fase PI. Las fronteras móviles correspondientes se designan ZETA-BETA y PI-LAMBDA. Cada una posee un desplazamiento característico.

Los componentes rápido y lento que migran delante y detrás de ambas fronteras ZETA-BETA y PI-LAMBDA se designan 2 y 1 y 3 y 1 respectivamente. Las movilidades iónicas de las especies se expresan relativas a la del ión Na^+ , a la misma temperatura y fuerza iónica, como movilidades relativas R_M . Ya que $R_M(1, \text{ZETA})$ es la movilidad relativa del componente lento en la fase ZETA, este valor corresponde al límite inferior de empacamiento en la fase de concentración. De manera similar, $R_M(2, \text{BETA})$ es el límite superior de empacamiento, mientras que $R_M(1, \text{PI})$ es el límite de desempacamiento en la fase de separación o resolución.

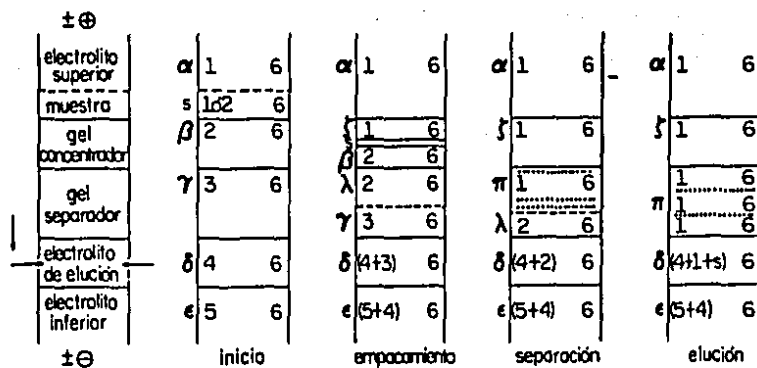


Figura 3. Etapas del proceso de electroforésis en sistemas discontinuos de electrolitos, aplicado a la electroforésis de zona. En el esquema izquierdo se indican las regiones físicas del sistema. Se supone que la migración de los componentes de la muestra ocurre hacia el gel de poliacrilamida, compuesto por un gel concentrador y un gel separador. La muestra se coloca entre el gel concentrador y el electrolito superior, en el cual se localiza uno de los electrodos. El electrodo de polaridad opuesta se localiza en el electrolito inferior, debajo del gel separador. En algunas aplicaciones preparativas es necesario introducir un electrolito de elución entre el gel separador y el electrolito inferior para recuperar a los componentes cuando alcanzan el extremo inferior del gel separador. En el segundo esquema de izquierda a derecha se indican los componentes que forman cada uno de los electrolitos al momento de iniciarse la electroforésis. En los esquemas subsiguientes se ilustran los procesos de empacamiento de los componentes de la muestra en la frontera móvil ZETA-BETA y posteriormente su separación detrás de la frontera móvil PI-LAMBDA, en el electrolito PI.

Dado que los valores de $RM(1,ZETA)$ y $RM(1,PI)$ pueden variarse sistemáticamente alterando la concentración de los electrolitos, o su naturaleza, es factible encontrar condiciones que permitan ya se empacar o desempacar al componente de interés o a cualquiera de los componentes de la muestra. Una manera de conseguir este empacamiento selectivo, además de cambiar la naturaleza y/o la composición de los electrolitos para variar $RM(1,ZETA)$ y/o $RM(1,PI)$ consiste en alterar la resistencia del medio a la migración de los componentes macromoleculares. Cuando el medio es un gel es posible manipular el empacamiento de macromoléculas actuando sobre el sistema de electrolitos, sobre el tamaño de los poros del gel, o sobre ambos simultáneamente.

4.2.3.a . ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Las separaciones por electroforésis en gel de poliacrilamida se han aplicado en la escala analítica para muestras del orden de microgramos y aún menores, en la escala preparativa se han hecho separaciones en el rango de varios miligramos a unos gramos. La técnica experimental es simple, solo se requiere formar el gel por polimerización de acrilamida en un molde (tubo o placa) y colocarlo entre dos compartimentos con electrolitos que contienen cada uno un electrodo inerte como se muestra en la figura 3. La muestra se deposita en un extremo del gel y se aplica un campo eléctrico entre los electrodos. La separación se consigue cuando los componentes migran en forma de bandas individuales con una movilidad electroforética que depende de su talla y carga neta.

Con este polímero sintético se consigue obtener geles hidrofílicos con un poro medio efectivo entre 0.5 y 3.0 nm simplemente ajustando la concentración total de monómero ($\%T$) y la concentración del monómero entrecruzador N, N'-Metilen-bis-acilamida ($\%C$) en la solución de polimerización. En este intervalo se puede variar el tamaño medio del poro para mejorar la separación entre los componentes de interés. También puede optimizarse la separación por efecto de carga eléctrica en condiciones de pH entre 3 y 11 para conseguir la diferencia máxima entre las cargas netas de los componentes.

La versatilidad que se consigue variando el tamaño de poro del gel de poliacrilamida puede extenderse si se incluyen en el gel aditivos no iónicos o se introducen al gel durante la electroforé^{sis} detergentes iónicos, agentes estabilizantes, agentes complejantes o agentes reductores.

El poder de resolución de la electroforé^{sis} en gel de poliacrilamida se puede determinar cuantitativamente para un experimento particular calculando el número de platos teóricos $N = x^2 / \sigma^2 = 5.55 x^2 / w^2$. En estas expresiones x es la distancia de migración, σ es la desviación estandar del ancho del pico y w es el ancho del pico a la mitad de su altura máxima. Frecuentemente se calculan 1 000 o más platos teóricos en trayectorias de migración de aproximadamente 10 cm, tanto en electroforé^{sis} libre como en electroforé^{sis} en gel, contrastando con valores de número de platos teóricos de aproximadamente 200 a 500 para columnas de permeación en gel de 1 m de largo.

Las principales razones del frecuente uso de la electroforé^{sis} en gel de poliacrilamida en la separación de proteínas desde su introducción en 1960 son su gran poder de resolución, su aplicabilidad a un rango muy amplio de tallas moleculares (pesos moleculares), su versatilidad y economía y el desarrollo de métodos de detección de las bandas aisladas de una gran sensibilidad. Desafortunadamente la mayoría de los resultados de separación en gel de poliacrilamida se han analizado solo cualitativamente, sin aprovechar la información cuantitativa que puede proporcionar. Los aspectos cuantitativos de la electroforé^{sis} en gel de poliacrilamida (9) se basan en el desarrollo de métodos que permiten un alto grado de reproducibilidad en el tamaño del poro del gel, el desarrollo de teorías fisicoquímicas sobre el movimiento de biopolímeros a través del gel y el desarrollo de una teoría exacta para el diseño de sistemas discontinuos de electrolitos en un intervalo amplio de pH y temperatura. Estos avances y su aplicación al desarrollo de la electroforé^{sis} preparativa permiten formular una estrategia general aplicable tanto a la separación, resolución y caracterización fisicoquímica, como al aislamiento y purificación de proteínas y de otras macromoléculas.

4.2.3.b. TEORIA DE ELECTROFORESIS EN ELECTROLITOS DISCONTINUOS.

El análisis de un sistema discontinuo de electrolitos para electroforésis se basa en la aplicación y generalización de la teoría de frontera móvil para electrolitos (10). La frontera y los tres componentes que la definen (componentes 1, 2 y 6) constituyen una unidad electroforética la cual no se altera por difusión bajo ciertas condiciones. El desarrollo de la teoría de electroforésis en electrolitos discontinuos (11) comprende un análisis fisicoquímico de diferentes combinaciones de electrolitos, las cuales se resumen en seis unidades electroforéticas básicas.

Componente	UNIDADES ELECTROFORETICAS BASICAS					
	EDM	EDM	EDM	EDD	ION	EDM
1	EDM	EDM	EDM	EDD	ION	EDM
2	ION	EDM	EDD	ION	ION	EDM
6	EDM	EDM	EDM	EDM	EDM	ION

EDM Electrolito débil monovalente

EDD Electrolito débil divalente

ION Ion univalente o multivalente

El análisis permite especificar completamente cada fase en términos de las concentraciones molares de los componentes (\bar{c}_i), la relación (θ) de concentraciones entre el componente 6 y los componentes 1 ó 2, según la fase de que se trate, el pH, la fracción (ϕ) de cada componente en su forma ionizada, la conductancia específica (κ) expresada en mhos cm^{-1} , la conductancia relativa (σ) expresada en C cm^3 , la fuerza iónica (\sqrt{I}) y la capacidad tampón (BV).

La teoría se basa en la definición de tres variables relacionadas con la frontera móvil y el equilibrio que se establece a través de ella: el desplazamiento de la frontera móvil (v) expresado en $\text{cm}^3 \text{C}^{-1}$, la relación entre la concentración del componente 1 en una fase y el componente 2 en la otra fase (μ) y la función de regulación de regulación o la ecuación de frontera móvil para el componente 6.

El cálculo de estos parámetros es consecuencia directa de la condición de electroneutralidad, de los equilibrios entre ácidos y bases y de la conservación de masa durante el proceso de transporte.

La formulación de la teoría es válida ya sea que las fronteras móviles migren hacia el ánodo o hacia el cátodo. El signo (+) identifica a los componentes que son cationes o bases e involucra migración hacia el cátodo. El signo (-) identifica a los componentes aniónicos y a los ácidos e indica migración hacia el ánodo.

PARTE EXPERIMENTAL

5.1. ESTUDIO PRELIMINAR DEL AISLAMIENTO DEL PEPTIDO "A"
DE LA INSULINA HUMANA.

La primera etapa de este trabajo consistió en obtener una solución enriquecida en proteína híbrida a partir del lisado de bacterias de una cepa hiperproductora de la proteína para someterse a tratamiento con bromuro de cianógeno reproduciendo un procedimiento reportado (5) en un trabajo en el que se demostró la presencia de los péptidos "A" y "B" de la insulina humana en cepas bacterianas similares a las disponibles. En el trabajo mencionado se demuestra la presencia del péptido "A" en la mezcla de los fragmentos de bromuro de cianógeno de la proteína híbrida "A" parcialmente enriquecida, por radioinmunoactividad de insulina producida por asociación química.

El procedimiento seguido para obtener una porción enriquecida en la proteína híbrida está descrito en el anexo Ia. Está basado en la solubilización parcial, en un medio desnaturizante para proteínas, de la porción insoluble que resulta del rompimiento mecánico de las bacterias en una solución de lisis.

La abundancia de la proteína híbrida en las porciones obtenidas en las etapas intermedias a la obtención de la solución enriquecida se estudió cualitativamente por medio de un procedimiento comúnmente empleado que consiste en separar a las proteínas de acuerdo a su talla molecular, en forma de zonas aisladas cuyas dimensiones son proporcionales a las abundancias de los componentes correspondientes. En la figura 4 se ilustran las abundancias relativas de las proteínas de *E. coli* en las soluciones de lisis y desnaturizante.

La porción enriquecida en proteína híbrida obtenida se trató con bromuro de cianógeno y posteriormente se sometió a sulfitólisis oxidativa siguiendo el procedimiento descrito en el anexo Ib.

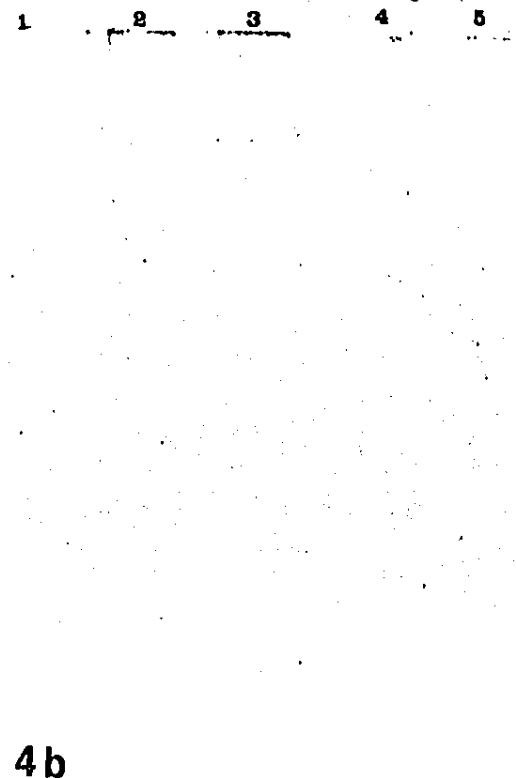
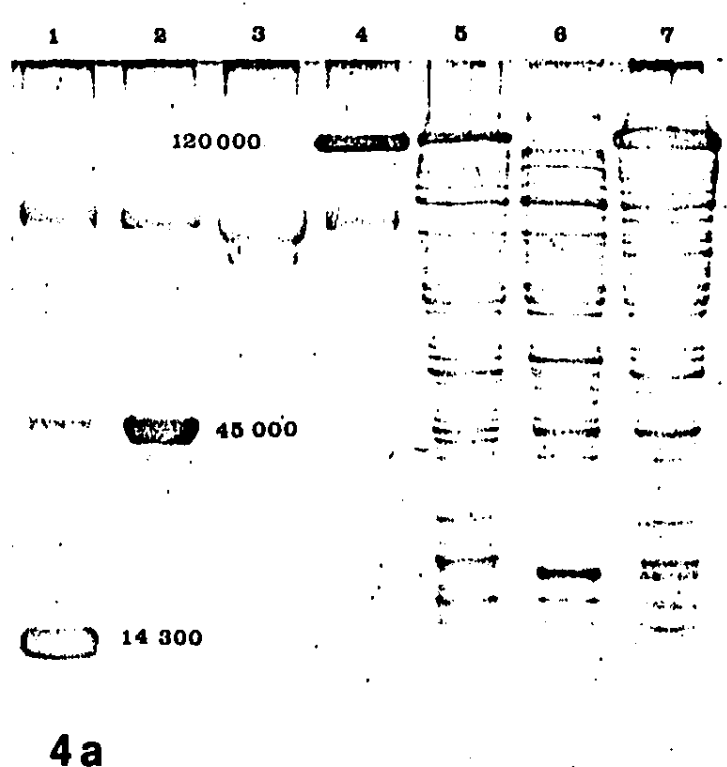


Figura 4. Abundancia relativa de las proteínas bacterianas en diversas etapas de la purificación.
 4a. Carriles 1, 2, 3 y 4: Proteínas de peso molecular conocido: lisosima de clara de huevo (14 300 d), ovoalbúmina (45 000 d), albúmina de suero de bovino (66 000 d) y beta-galactosidasa de *E. coli* (120 000 d), 5: Proteínas totales en el sonicado, 6: Proteínas solubles en la solución de lisis, 7: Proteínas insolubles en la solución de lisis.
 4b. 1: Proteínas solubles en la solución desnaturalizante, 2, 3: Proteínas de la porción enriquecida en proteína híbrida, 4, 5: Proteína híbrida purificada por electroforesis.

Los primeros intentos de detección y aislamiento del péptido "A" de la insulina se basaron en el producto de cianogénesis de la porción enriquecida en proteína híbrida "A".

El desarrollo de métodos fisicoquímicos para detectar la presencia del péptido "A" de la insulina humana, liberado de la proteína híbrida sin alteraciones estructurales concierne al estudio de las reacciones de cianogénesis y sulfitólisis oxidativa para liberar y proteger reversiblemente uno de los fragmentos peptídicos de una proteína producida por la expresión de un gene sintético, y sobre todo, a la obtención y aprovechamiento de la información necesaria para conseguir su aislamiento y purificación.

La exploración de los componentes producidos por cianogénesis y sulfitólisis oxidativa de una porción enriquecida en proteína híbrida por permeación en gel, electroforésis en gel de poliacrilamida e intercambio iónico, permitió formular las conclusiones siguientes:

1) La distribución de los pesos moleculares de los componentes es muy amplia y no permite concluir acerca de la eficiencia de cianogénesis, ya que indudablemente incluye fragmentos producidos por la ruptura de otras proteínas de composición desconocida. Esto anula la posibilidad de comprobar si se están produciendo los fragmentos esperados para la proteína híbrida y es razonable esperar la presencia del péptido "A" liberado.

2) El producto está constituido por un gran número (indeterminado) de componentes, de los cuales el péptido "A" de la insulina representa probablemente menos del 1% de la masa total de proteínas, por lo que se puede esperar que para su análisis se requiera de métodos de separación de gran eficiencia así como de métodos de detección de una gran sensibilidad.

Con el fin de mejorar las posibilidades de detección del péptido "A" de la insulina humana, se intentó la purificación de la proteína híbrida. Primeramente se determinó el límite de mayor enriquecimiento en solución. Se observó el reparto de la proteína híbrida entre las

porciones soluble e insoluble, en distintos medios solubilizantes. Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

1) La solubilización de las proteínas de esta cepa de *E. coli* en solución acuosa de cloruro de guanidinio 6M no es selectiva.

2) La solubilidad de todas las proteínas en la solución de lisis aumenta al aumentar el pH, en el intervalo de 5.6 a 9.6. A partir de pH 9 la solubilidad de la proteína híbrida deja de ser despreciable. La mayor parte de las proteínas insolubles en la solución de lisis se solubilizan en solución de carbonato de sodio 0.05M. En particular, la proteína híbrida se solubiliza casi totalmente si se mantiene la concentración de 2-mercaptoetanol al 1% v/v en solución.

3) Es posible solubilizar las proteínas insolubles en la solución de lisis, en soluciones acuosas de urea 4 a 8M, aunque en menores concentraciones que en soluciones de cloruro de guanidinio 4 a 8M.

4) Al disminuir la concentración de cloruro de guanidinio por debajo de 4M se observa que disminuye la concentración (a saturación) de las proteínas solubilizadas. Para concentraciones entre 2.5 y 1.0M de cloruro de guanidinio la solubilización parece ser selectiva hacia la mayoría de las proteínas, en tanto que se observan mayores proporciones del híbrido en la porción insoluble.

5) Si se repiten varias veces la eliminación de las proteínas solubles en la solución de lisis y la recuperación del material soluble en la solución de cloruro de guanidinio 6M, a partir de la segunda lixiviación cuyo rendimiento es menor que el de la primera, las lixivitaciones posteriores son indeseables. La validez de esta conclusión está condicionada a la ruptura completa de las bacterias y al empleo de volúmenes apropiados de las soluciones.

Esta información se aprovechó para preparar una solución enriquecida hasta aproximadamente un 60% de la proteína híbrida con respecto a la masa total de proteínas por el procedimiento descrito en el anexo Ic. La determinación del porcentaje de proteína híbrida respecto al total de proteínas bacterianas se basó en medidas de absorbancia (densitometría) de la banda correspondiente a la proteína híbrida separada

del resto de las proteínas por electorforé^sis en gel de poliacrilamida y teñida con un colorante para proteínas (azul de Coomassie BB R-250). Para obtener una curva estándar se incluyeron en el mismo gel tres o cuatro alícuotas de una solución estándar de beta-galactosidasa de E. coli. El contenido de proteínas (mg/ml) tanto de la solución estándar de beta-galactosidasa, como la de las muestras de proteínas bacterianas, se determinó por el método de Lowry (14) con respecto a una solución estándar (preparada por pesada) de albúmina de suero de bovino, grado radioinmuno análisis.

5.2. PURIFICACION DE LA PROTEINA HIBRIDA.

Considerando la gran resolución obtenida en la separación analítica de las proteínas de *E. coli* por electroforesis en gel de poli acrilamida en presencia del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (DSS), con los electrolitos glicinato, cloruro, tris(hidroximetil)-amino metano (tris) (13), se estudió la posibilidad de aplicar esta técnica para la purificación de la proteína híbrida a escala de miligramos. A continuación se muestran los resultados del análisis del sistema de electrolitos mencionado, de acuerdo con la teoría de electroforesis en sistemas de electrolitos discontinuos (11) y la composición de los electrolitos ALFA, BETA, GAMA, DELTA y EPSILON; así como de las fases creadas al paso de la frontera móvil, para el subsistema de límites de empacamiento y desempacamiento $RM(1, ZETA) = 0.129$ y $RM(1, PI) = 0.265$ respectivamente.

La elección de ese valor relativamente elevado de límite inferior de empacamiento se basó en la observación (15) de que las movilidades de los complejos proteína-DSS son mayores que las movilidades de las proteínas solas, ya que generalmente las primeras poseen densidades de carga mayores que las segundas a causa del DSS enlazado a la proteína, en condiciones de saturación. Experimentalmente se comprobó el empacamiento de las proteínas de la solución enriquecida en proteína híbrida, saturadas con DSS, en un gel de 3% T, 3% C, aún para $RM(1, PI) = 0.225$. A pesar de que el límite de desempacamiento es relativamente bajo, resulta adecuado para la resolución de la proteína híbrida de su componente más próximo en un gel de 4% T, 3% C, y suficiente para que la separación ocurra a velocidad razonable en condiciones en que la generación de calor resulta despreciable.

Las características del sistema calculadas difieren de las reportadas por Laemmli (13) y permiten disminuir el calentamiento debido al paso de corriente, aumentar la velocidad de la separación y economizar glicina. En estas condiciones se determinaron las características de concentración de acrilamida óptima y de trayectorias de concentración y de separación requeridas para conseguir la separación.

RESULTADOS DEL ANALISIS DEL SISTEMA DE ELECTROLITOS
GLICINATO, CLORURO, TRIS-AMONIO.

Componente	1	Glicina	$pK_1 = 9.74$	$r_1 = -0.72$
	2,3	Cloruro		$r_2 = -1.55$
	6	Tris	$pK_6 = 8.07$	$r_6 = +0.50$

pH^A	RM(1,PI)	θ^A	pH^Y	RM(1,ZETA)	pH^E	θ^E	pH^B
9.4	0.226	7.0306	8.74	0.100	8.95	1.1867	7.23
9.5	0.263	10.1977	8.93	0.120	9.04	1.7258	7.82
9.6	0.311	15.7945	9.13	0.140	9.12	2.3898	8.10

COMPOSICION DE LOS ELECTROLITOS

Concentraciones Molares

Componente	Fase:	ALFA	ZETA	BETA	PI	GAMA	DELTA	EPSILON
1		0.0600	0.0600		0.02738			
2				0.07688	0.03186			
3						0.03507 (0.04082)	0.00082	0.050
6		0.0600	0.103550	0.13791	0.27921 (0.22400)	0.28684 (0.23296)	0.00918	0.100

$r/2$			0.01		0.01			
pH		8.9	9.04	7.82	9.50 (9.40)	8.93 (8.74)	9.04	8.07
RM 1			0.120		0.263 (0.226)			

Se consideró como óptima la concentración de acrilamida que produjo la máxima separación entre la proteína híbrida (120 000 dal.) y el componente más próximo (90 000 daltons).

En la figura 5 se muestran las curvas de selectividad para geles de diversas concentraciones de acrilamida, para un valor constante de entrecruzamiento de 3% C. Entre ellas la correspondiente a 4% T permitió la separación de la proteína híbrida de aquellos componentes de peso molecular inferior a 70 000, los cuales forman un paquete que migra junto con el frente.

La separación deseada se consiguió en un gel concentrador de 3% T, 3% C, de 2 cm de longitud y un gel separador de 4.5% T, 3% C, de 3 cm de longitud con muestras de 3 mg de proteínas por cm^2 de sección transversal del gel. En todos los casos se aplicaron muestras de solución enriquecida en proteína híbrida en concentraciones de 2 a 5 mg de proteínas por ml de solución desnaturalizante para electroforesis en presencia de DSS. La concentración de proteínas de la muestra puede ser tan baja como 0.1 mg/ml y aún conseguir la misma separación siempre que la longitud del gel concentrador sea mayor que el volumen de muestra entre la sección transversal del gel. En un experimento simplificado en el que solo se polimerizó el gel separador y la muestra se aplicó disuelta en una solución desnaturalizante de la misma composición de electrolitos que el gel concentrador, a una concentración de 4 mg/ml de proteínas, se obtuvo una separación igual a las anteriores en un tiempo sustancialmente menor.

En la figura 6 se muestra la separación obtenida entre la proteína híbrida y los dos componentes más próximos en un gel de 5 mm de grueso, 2 cm de longitud de gel concentrador y 8 cm de longitud de gel separador, en el que se aplicó una muestra de 6 ml. de solución enriquecida en proteína híbrida con 24 mg de proteínas.

$$\%T = (g \text{ de acrilamida} + g \text{ de bis-acrilamida} / 100 \text{ ml}) \times 100.$$

$$\%C = (g \text{ de bis-acrilamida} / g \text{ de acrilamida} + g \text{ de bis-acril.}) \times 100.$$

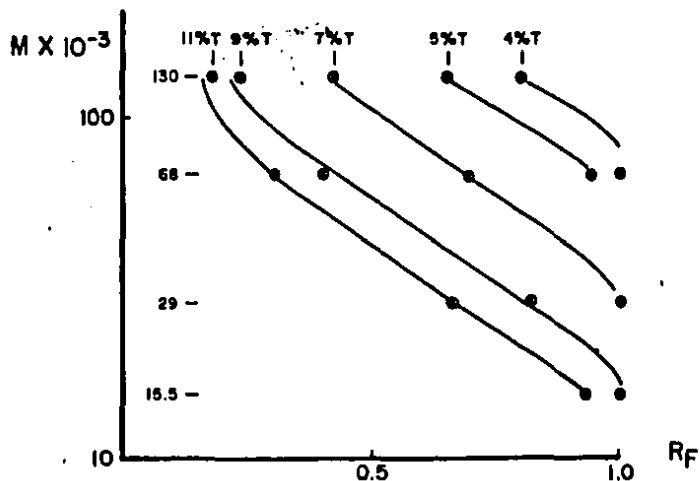


Figura 5. Curvas de selectividad. Posición de los componentes separados por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de DSS, referida al frente de migración, en función de su peso molecular, correspondientes al sistema de electrolitos glicinato, cloruro, tris, de RM (I.PI) = 0.226, para distintas concentraciones de monómeros (%T). Para todas las curvas %C = 3%.

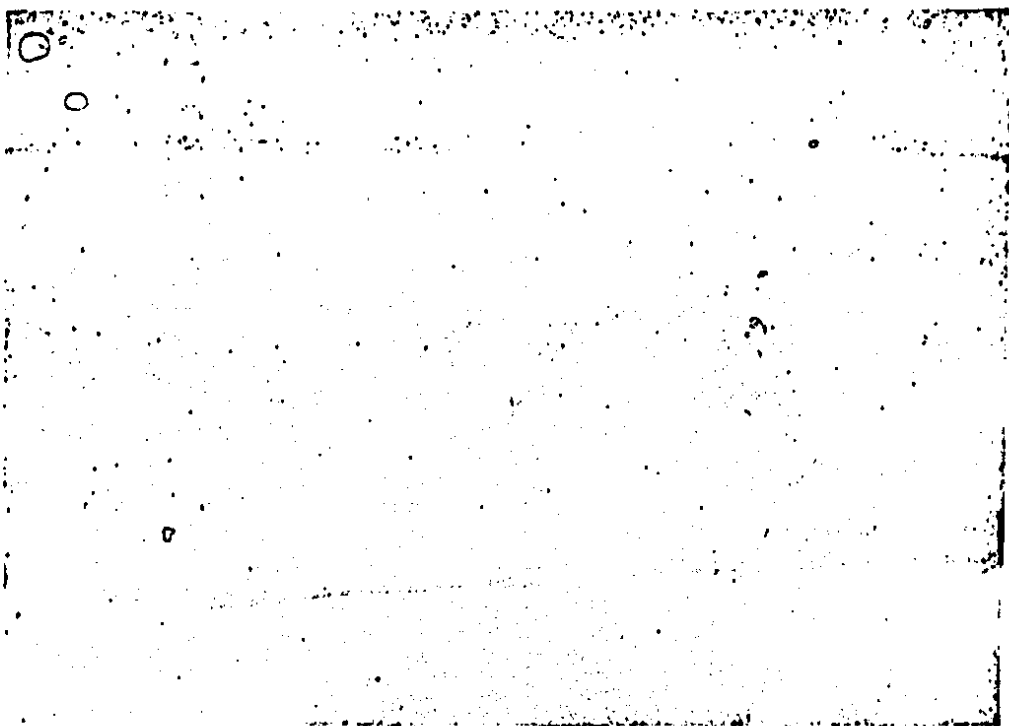


Figura 6. Resultado de la separación de una porción enriquecida en proteína híbrida por electroforesis en gel de poliacrilamida de 5% T, 3% C, en las condiciones escogidas para las aplicaciones preparativas. La banda señalada con asteriscos es la correspondiente a la proteína híbrida.

Se intentó recuperar a la proteína híbrida del gel de poli-acrilamida después de la separación por lixiviación con diversas soluciones (cloruro de guanidinio 6M, ácido fórmico 0.1M. y DSS al 1% p/v.) En ningún caso se logró recuperar un porcentaje importante de la cantidad total esperada de proteína híbrida. La proporción recuperada se determinó por electroforésis analítica en gel de poli-acrilamida de 9% T, de las muestras producidas por lixiviación comparadas con la muestra procesada por electroforésis preparativa.

También se intentó recuperar a la proteína híbrida del gel preparativo por un procedimiento (16) que consiste en aplicar la zona del gel donde se localiza la proteína de interés, previamente macerada, en el extremo catódico de una celda de electroforésis limitada por membranas de diálisis en un electrolito básico y provocar la migración de los componentes por electroforésis fuera del gel hacia el extremo catódico. En el experimento se utilizó un electrolito de la misma composición que el electrolito PI, con DSS al 0.075% p/v. Al analizar el contenido de los extremos de la cámara por electroforésis analítica se concluyó que el procedimiento de fijación y tinción para localizar la zona del gel que contiene a la proteína híbrida aislada afecta irreversiblemente su solubilización posterior.

La mejor recuperación se consiguió por migración de la proteína híbrida en el mismo frente electroforético ZETA-BETA del sistema preparativo, en un gel de poli-acrilamida hasta una cámara comprendida entre el gel y una membrana de diálisis. La zona del gel donde se localizó a la proteína híbrida se equilibró con agua destilada y se homogeneizó en un volumen igual (al del gel) de solución desnaturalizante para electroforésis. El homogeneizado se introdujo en un tubo de vidrio de 2.0 cm² de sección transversal cerrado en su extremo inferior por una membrana de diálisis Spectrapor/3. El tubo se colocó entre el electrolito ALFA (abajo y arriba) para realizar la electroforésis hacia el ánodo (arriba). La electroforésis se interrumpió una vez que la mayor parte del colorante (Coomassie BB R-250) abandonó la cámara. Se retiró la membrana de diálisis del extremo superior del tubo y se recuperó el contenido de la cámara con un pipeta Pasteur. En la figura 7 se muestra un esquema del equipo utilizado.

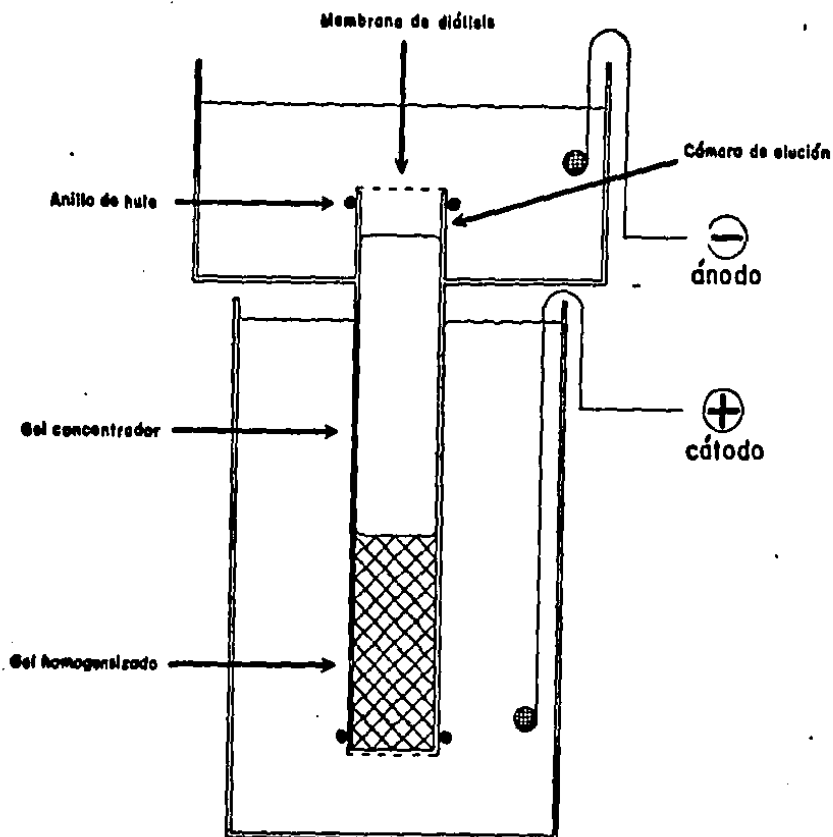


Figura 7. Esquema de la celda de electroforesis utilizada para recuperar a la proteína híbrida de un gel de poliacrilamida por electroforesis hasta una cámara de elución. Previamente la proteína híbrida se separa del resto de proteínas bacterianas por electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida. El gel homogeneizado se obtiene macerando las zonas de dos geles preparativos donde se localiza a la proteína híbrida como se ilustra en la figura 6. Sobre el gel homogeneizado se deposita la misma solución que se utiliza para formar el gel concentrador para la electroforesis preparativa.

El problema de la recuperación incompleta de la proteína híbrida purificada por electroforesis se resolvió permitiendo la migración de los componentes resultos, fuera del gel separador hacia un compartimento o cámara de elución provista de un dispositivo para recuperar cuantitativamente a los componentes "electroeluidos" del gel.

En el anexo II se describe el aparato utilizado para la purificación de la proteína híbrida y se discuten los aspectos teóricos y metodológicos considerados para su diseño.

En la figura 8 se muestra un perfil de elución obtenido por electroforesis preparativa de una muestra de solución enriquecida en proteína híbrida, de 10 mg. Los resultados de electroforesis analítica y de comparación de medidas de absorbancia a 280 nm, indican que más del 90% de la cantidad de la proteína híbrida en la muestra se recuperó en seis fracciones colectadas durante 12 minutos, alrededor de las cinco horas de iniciado el experimento. Aunque no se determinó el nivel de contaminación de la porción purificada se estima que es inferior al 5%, lo que correspondería al límite de detección promedio de proteína por tinción con Coomassie BB R-250 (0.1 µg) con respecto a la cantidad de proteína híbrida en la muestra (2.0 µg).

Aprovechando el poder de solubilización de la solución desnaturante para electroforesis en presencia de DSS, se estudió la posibilidad de efectuar la separación por permeación en gel en presencia de DSS, como un punto de comparación para evaluar los resultados obtenidos en la purificación por electroforesis.

La concentración de DSS monomérico en solución determina su poder de solubilización de las proteínas y depende de la fuerza iónica cuando la concentración total de DSS es mayor a la concentración micelar crítica a la temperatura de trabajo. Según datos publicados (17) la concentración máxima de DSS libre a 25° C es aproximadamente 0.1% p/v, siempre que la fuerza iónica sea inferior a 0.025.

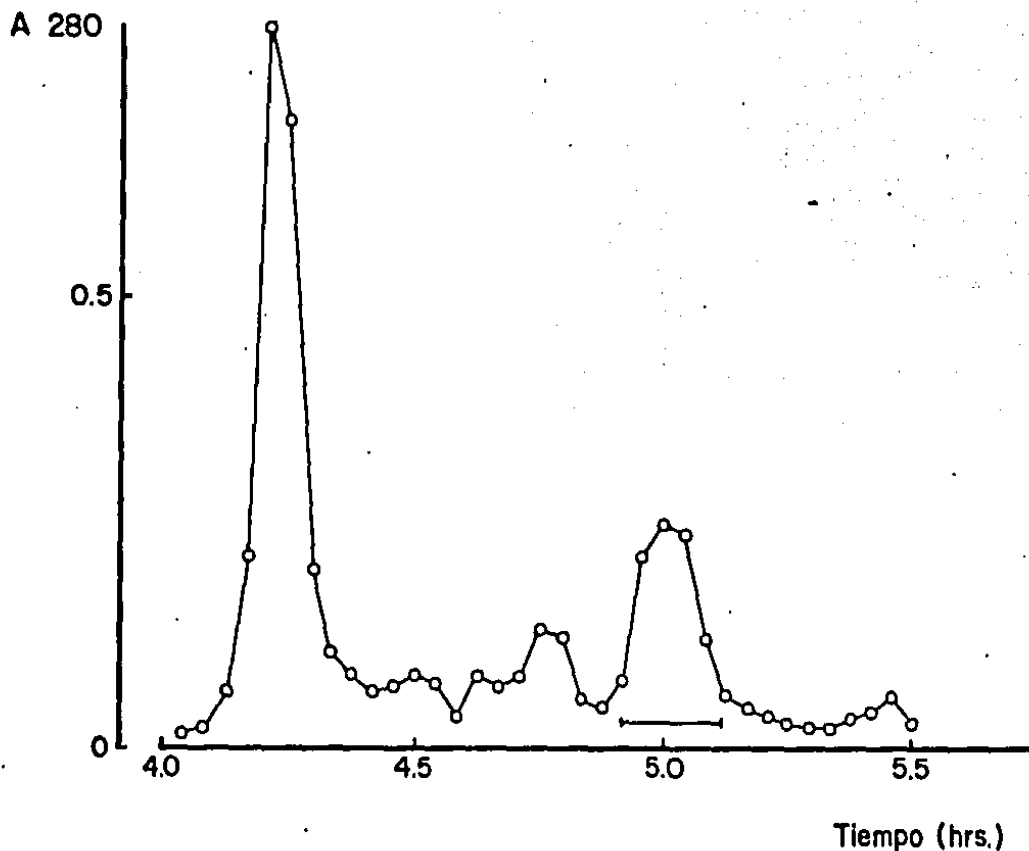


Figura 8. Perfil de elución obtenido en la separación por electroforésis preparativa en gel de poliacrilamida. El equipo y las condiciones en que se realizó la separación se describen en el anexo II. La separación ocurrió en una trayectoria de 5 cm de gel separador de 4.5% T, 3% C, con un gel concentrador de 3% T, 3% C, de 3 cm de longitud. La muestra aplicada consistió en 10 mg de proteínas de la porción enriquecida en la proteína híbrida, en 5 ml de solución desnaturalizante para electroforésis en presencia de DSS. El segmento en el electroforegrama indica la posición de elución de la proteína híbrida.

La concentración máxima de proteínas de la porción enriquecida en híbrido en solución desnaturalizante para electroforésis en presencia de DSS fué de 7 mg/ml. Se prepararon soluciones de 2 y de 5 mg/ml y se dializaron tresalícuotas de cada una contra soluciones de DSS al 0.1%, 0.2% y 0.5% p/v, amortiguadas a pH 9.2 con borax 10 mM, a 20 - 25° C. Las observaciones de aparición de precipitado permitieron escoger la composición del eluyente compatible con la muestra solubilizada en solución desnaturalizante.

La separación por permeación en gel se estudió en una columna de 12 mm de diámetro empacada con un lecho de 105 cm de altura, de Sepharosa 4 B en solución acuosa de DSS 0.25% p/v tamponada a pH 9.2 con borax 10 mM. La resolución obtenida para flujos de eluyente de 2.5 a 4.5 ml/hr es apropiada. Los perfiles de elución de la figura 9 indican que la calidad de la separación de una muestra de 10 mg en 2 ml es casi tan buena como la obtenida para otra de 2 mg en 0.4 ml. La posición del pico de elución de la proteína híbrida permite la aplicación de muestras sucesivas de tal forma que se haga coincidir la elución de los componentes totalmente incluidos de una muestra con la elución de los componentes totalmente excluidos de la muestra posterior, como se muestra en la figura 10.

En la tabla I se comparan las características de ambos métodos de separación. La cantidad de proteína híbrida en las fracciones del efluente de la columna se estimó por el procedimiento siguiente:

De las fracciones colectadas se tomaron alícuotas para electroforésis analítica en gel de poliacrilamida. La concentración de proteínas en las alícuotas se determinó por el método de Lowry (14). El contenido de proteína híbrida, el cual se relacionó con el total de proteínas, se estimó comparando las bandas correspondientes con estándares de beta-galactosidasa incluidos en el mismo gel. El porcentaje de proteína híbrida en cada fracción se estimó como la relación entre la cantidad aproximada de proteína híbrida en cada fracción y la suma del contenido de todas las fracciones.

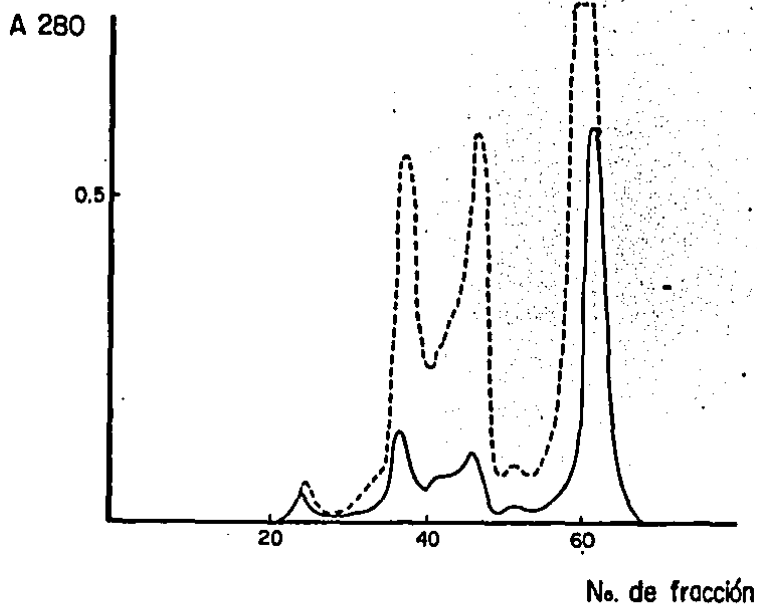


Figura 9. Perfil de elución de las proteínas de la porción enriquecida en proteína híbrida por permeación en gel en una columna de Sepharosa 4B de 1.2 x 110 cm. La línea continúa corresponde a una muestra de 2 mg de proteínas en 0.4 ml, la línea discontinúa corresponde a 10 mg de proteínas en un volúmen de 5 ml.

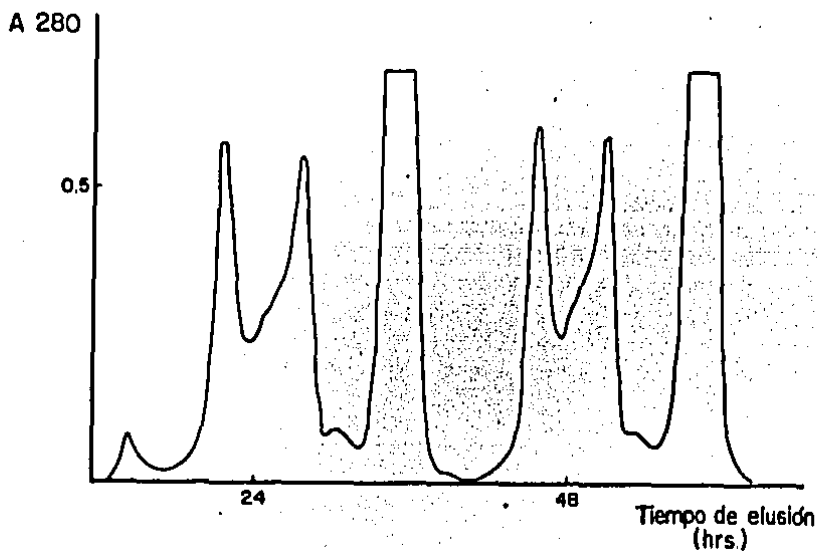


Figura 10. Perfil de elución de dos muestras de porción enriquecida en proteína híbrida de 10 mg en 5 ml, aplicadas en forma sucesiva.

Tabla I. Comparación entre las alternativas de purificación de la proteína híbrida probadas.

	<u>PERMEACION EN GEL</u>	<u>ELECTROFORESIS</u>
<u>Aparato</u>	Columna de vidrio.	Tubo de vidrio con enfriamiento de agua.
<u>Dimensiones</u>	1.2 x 110 cm.	2.0 x 10 cm.
<u>Material de empaque</u>	120 ml de Sepharosa 4B.	10 ml de solución de acrilamida al 4.5% p/v.
<u>Tiempo de separación</u>	24 h.	6 h.
<u>Capacidad de muestra</u>	10 mg.	10 mg.
<u>Selectividad</u>	$R_f = 2/3$	óptima (ajustable).
<u>Resolución</u>	2	5.
<u>Pureza del producto</u>	< 60% 75% 80% >90%	> 95%.
<u>Recuperación</u>	100% 80% 60% 40%	> 90%.
<u>Dilución de la muestra</u>	1:50	1:100.
<u>Gasto de reactivos por mg. de muestra procesada</u>	40 mg de borax 40 mg de DSS	315 mg de Tris 207 mg de glicina.
<u>Comentarios</u>	Material de empaque reusable un número <u>in</u> definido de veces.	Material de empaque no reutilizable. Gasto de energía eléctrica (0.2 W h/ mg de muestra).

5.3. RESOLUCION DE LOS PEPTIDOS DE CIANOGENOLISIS DE LA PROTEINA HIBRIDA "A".

Es posible purificar cada uno de los fragmentos de cianogenólisis de la beta-galactosidasa de E. coli A 324-5 por cromatografía en columna utilizando una combinación de diversos sistemas. Los procedimientos reportados (1) permitieron aislar a los péptidos producidos por cianogenólisis de la proteína purificada y carboximetilada, con el fin de determinar su secuencia de aminoácidos.

El aislamiento del péptido "A" de la insulina no requiere de la resolución del resto de péptidos de bromuro de cianógeno de la proteína híbrida. Sin embargo, se decidió estudiar la eficiencia de cianogenólisis y sulfitólisis oxidativa de esta proteína en términos de la talla molecular y de la carga neta de los fragmentos obtenidos, con referencia a los péptidos esperados.

Primeramente se consideró la aplicación de la electroforésis en gel de poliacrilamida para la resolución de los péptidos de cianogenólisis de la beta-galactosidasa. El tamaño de muestra requerido (20 a 50 μ l) permitiría realizar un número de experimentos suficiente para probar varios sistemas con un máximo de 1 mg de la proteína, a condición de que se dispusiera de métodos de detección aplicables a todos los componentes, con una sensibilidad adecuada a sus concentraciones, determinadas por la capacidad de muestra y el poder de resolución del método de separación.

En la tabla II se resumen algunos ejemplos de procedimientos reportados en la literatura (* citas en la misma tabla), para la ruptura de algunas proteínas con bromuro de cianógeno.

En una serie de experimentos de solubilidad de la proteína híbrida se observaron las siguientes características:

PROTEINA	Ribonucleasa pancreática	Beta-galactosidasa	gama-G Inmuno-globulina humana	Termolisina	beta-galactosidasa
PESO MOLECULAR	13 700 d	130 000 d	154 000 d	37 000 d	130 000 d
MOLES DE METIONINA/ MOLES DE PROTEINA	4	24	18	4	24
MEDIO DE REACCION	HCl 0.1N	HCOOH 70% v/v	HCOOH 70% v/v	CF ₃ COOH 75% v/v	HCOOH 70% v/v
CONCENTRACION DE PROTEINA	10 mg/ ml	5 mg/ ml	50 mg/ ml	12.5 mg/ml	
mg DE CNBr/ mg DE PROTEINA	0.9	1.0	1.5	2.0	2.0
MOLES DE CNBr/ MOLES DE METIONINA	30	50			
TIEMPO, TEMPERATURA	24 h, ambiente	16- 20 h, amb.	4 h, ambiente	15-20 h, amb.	18 h, ambiente
CITA BIBLIOGRAFICA	J. Biol. Chem. (1962), <u>237</u> , 1856.	J. Biol. Chem. (1965), <u>240</u> , 2478.	Biochemistry (1968), <u>7</u> , 1959.	Biochemistry, (1972), <u>11</u> , 2427.	J. Biol. Chem. (1978), <u>253</u> , 5499.

Tabla 2. Condiciones de cianogenólisis reportadas para algunas proteínas.

1) En soluciones de cloruro de guanidinio entre 4 y 6M, tamponadas con Tris 0.1M a pH 9.0, es soluble la proteína híbrida a una concentración de 10 mg/ml a 20° C. La proteína permanece soluble al disminuir el pH a 1.0 por adición de HCl 1N en cloruro de guanidinio 4M, lo mismo que al disminuir la temperatura a 5° C.

2) En solución acuosa de ácido fórmico al 70% v/v es soluble la proteína híbrida hasta una concentración entre 8 y 9 mg/ml a 20° C y de aproximadamente 6 mg/ml a 10° C.

3) En solución acuosa de ácido trifluoroacético al 75% v/v la solubilidad de la proteína híbrida es de aproximadamente 5 mg/ml, entre 10 y 20° C.

Considerando estas observaciones, se trataron tres muestras (1 mg) de beta-galactosidasa (E.C. 2.2.1.23) de Sigma (No. G-5635) en las condiciones que se indican a continuación:

MEDIO DE REACCION	(a) Cloruro de guanidinio 4M pH 1.0 con HCl.	(b) Acido fórmico 70% v/v.	(c) Acido trifluoroacético 75% v/v.
Concentración de proteína	8 mg/ml	5 mg/ml	4 mg/ml
mg de CNBr por mg de proteína	1.2	1.2	1.2
Tiempo, temp.	24 h, 5° C	16 h, 20° C	48 h, 10° C

Todas las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad. Al transcurrir el tiempo indicado se diluyó la mezcla de reacción con agua helada, se congeló y se liofilizó.

Primeramente se estudió la ruptura de la proteína híbrida con base en el tamaño de los péptidos producidos, por electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de DSS.

Se comprobó que la combinación de electrolitos glicinato, cloruro, Tris-amonio, no permite resolver péptidos en el intervalo de la talla molecular de los fragmentos de cianogenólisis de la beta-galactosidasa (15 000 a 1 000 daltons) en geles de concentraciones moderadas de acrilamida (menores a 20% T). La separación de los péptidos se consiguió aumentando la movilidad del frente electroforético al aumentar la ionización de la glicina. Para ello fué necesario sustituir al Tris por el 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (Amediol), un compuesto muy similar pero de mayor pKa que el Tris. A continuación se muestran las características del sistema de electrolitos glicinato, cloruro, Amediol. En las condiciones de operación elegidas ($RM(1,PI) = 0.32$) es posible resolver péptidos entre 60 000 y 1 000 daltons en un gel de 15% T, 5% C, en presencia de DSS.

La resolución de los péptidos de cianogenólisis de la beta-galactosidasa se vió afectada de manera adversa en todos los casos por un fondo continuo de material que tiñe como proteína, debido posiblemente al problema de la interconversión entre las formas homocisteína y lactona de los péptidos. Este inconveniente es menos grave si se trata la muestra aproximadamente una hora con amoniacó o etilendiamina 0.01M con agitación constante, antes del tratamiento con DSS y 2-mercaptoetanol. La resolución de las bandas separadas se mejora notablemente incorporando urea en el gel a concentraciones de 4 a 8M, y para valores de fuerza iónica en el electrolito en el que ocurre la separación entre 0.025 y 0.05. Las mejores separaciones se lograron adicionando DSS en el electrolito BETA a la misma concentración que en el electrolito ALFA (0.1% p/v).

Los perfiles de separación no permitieron concluir definitivamente sobre la eficiencia de cianogenólisis en las condiciones probadas pero indican que el resultado obtenido con cloruro de guanidinio fué comparable al obtenido con ácido fórmico, en ambos casos los fragmentos más abundantes son del tamaño esparado, mientras que la ruptura con ácido trifluoroacético produjo varios fragmentos de mayor tamaño. Entre los medios de reacción probados se escogió al ácido fórmico por su poder de solubilización y la posibilidad de eliminación y recuperación por evaporación para ser reutilizado.

RESULTADOS DEL ANALISIS DEL SISTEMA DE ELECTROLITOS
GLICINATO, CLORURO, AMEDIOL.

Componente	1	Glicina	$pK_1 = 9.74$	$r_1 = -0.72$
	2,3	Cloruro		$r_2 = -1.55$
	6	Amediol	$pK_6 = 8.83$	$r_6 = +0.50$

RM(1,PI)	pH^3	θ^1	pH^Y	RM(1,ZETA)	pH^E	θ^E	pH^B
0.300	9.59	2.8358	8.99	0.200	9.32	1.1462	7.89
0.320	9.64	3.3345	9.09	0.220	9.38	1.3984	8.32
0.340	9.74	4.5642	9.27	0.240	9.44	1.6881	8.56
0.400	9.84	6.2002	9.44				

COMPOSICION DE LOS ELECTROLITOS

Concentraciones Molares

Fase:	ALFA	ZETA	BETA	PI	GAMA	EPSILON
Componente 1	0.0360	0.0360		0.0225 (0.0180)		
2			0.04612			
3					0.02883 (0.02306)	0.01
6	0.04126	0.04126	0.05142	0.07503 (0.11160)	0.08136 (0.11666)	0.02
$\Gamma/2$	0.01	0.01		0.01		0.01
pH	9.32	9.32	7.89	9.64 (9.84)	9.09 (9.44)	8.83
RM1		0.200		0.320 (0.400)		

5.4 . DETECCION Y CARACTERIZACION DEL PEPTIDO "A" DE LA INSULINA HUMANA.

Por razones de estabilidad química conviene basar los trabajos de purificación del péptido "A" de la insulina, en su forma de tetra S-sulfonato. Este péptido, cuya talla molecular es relativamente pequeña posee una gran movilidad electroforética hacia el ánodo ya que permanece como polianión aún en medio ácido, por lo que en principio puede conseguirse su separación selectiva del resto de péptidos de cianogenólisis en condiciones en las que la mayoría de los péptidos poseen carga positiva. Esta situación favorece considerablemente la capacidad de la separación, la cual aumenta en relación inversa a la proporción de componentes aniónicos de la muestra.

Suponiendo que la detección de cantidades del orden de 1 μ g del tetra S-sulfonato del péptido "A", por tinción con un colorante aniónico, permitiría garantizar la detección del resto de los péptidos; se estudió la tinción de los electroforegramas con soluciones capaces de fijar y teñir simultáneamente a los péptidos dentro del gel.

Se probaron algunas combinaciones entre ácido tricloroacético (ATC) , ácido sulfosalicílico (ASC), metanol e isopropanol. Utilizando Coomassie BB G-250 (ó R-250) con ATC y ASC en una mezcla agua-isopropanol se consiguió una sensibilidad comparable a la obtenida para proteínas , aunque las bandas correspondientes a los péptidos de menos de 10 000 daltons resultan muy difusas, aparentemente debido a una fijación ineficiente. Se comprobó que tanto la sensibilidad de revelado como la eficiencia de fijación de los péptidos pequeños y/o ácidos se mejora notablemente al incluir pequeñas cantidades de sales de Hg(II), Cu(II) y Ag(I), y en ciertos casos, de Bi(III) y Al(III) en la solución para teñir.

Utilizando una solución saturada de Coomassie G-250 en ácido sulfúrico y neutralizada con hidróxido de potasio, a la que posteriormente se adiciona ATC (18) se observó que al aumentar el contenido de

ATC hasta el 50% p/v, se mejora la fijación de los péptidos en el gel. Aparentemente, debido al aumento en el contenido de ATC, disminuye la solubilidad del colorante en la solución, y por ello la sensibilidad de la tinción. Este inconveniente se resolvió adicionando ácido acético glacial hasta una concentración de 10% v/v. Con esta solución fue posible observar péptidos que no revelaban en otras condiciones ya que la tinción ocurre más rápidamente que la difusión de los péptidos pequeños hacia afuera del gel (10 a 15 min, a 20° C, en geles de 0.75 mm de grueso.

Este procedimiento de tinción resultó poco sensible para el péptido "A" tetra S-sulfonado el cual revela a partir de una cantidad de 20 µg. Se encontró que al adicionar cloruro mercurico entre 0.1 y 0.5% p/v en la solución para teñir, es posible alcanzar un límite de detección mejor que 0.5 µg del tetra S-sulfonato del péptido "A" de la insulina por carril de 0.75 x 8 mm, cuando el ancho de la banda es menor de 2 mm, como puede apreciarse en la figura 11.

Fue posible resolver al tetra S-sulfonato "A" de la insulina del resto de péptidos de cianogenólisis de la proteína híbrida por electroforesis, con el sistema de electrolitos glicinato, cloruro, Amel diol (sin DSS), en geles de poliacrilamida de 12.5% T, 5% C, 45% p/v de urea (7.5M) en condiciones en que $RM(1,PI) = 0.40$, y de 15% T, 5% C, urea 7.5M para $RM(1,PI) = 0.32$.

Por otra parte, el sistema de electrolitos borato, cloruro, Tris-amonio permitió aislar al tetra S-sulfonato del péptido "A" de la insulina del resto de péptidos de cianogenólisis de la proteína híbrida en geles de poliacrilamida de 15% T, 5% C, urea 7.5M, en condiciones de $RM(1,PI) = 0.38$, y de 18% T, 5% C, urea 7.5M, para $RM(1,PI) = 0.24$. A continuación se muestran los resultados del análisis de este sistema de electrolitos basado en la teoría de electroforesis en electrolitos discontinuos. Una característica particular de este sistema de electrolitos es la permanencia del péptido "A" en el frente de migración en un gel de poliacrilamida de 18% T, 5% C, urea 6M, aún pa-

RESULTADOS DEL ANALISIS DEL SISTEMA DE ELECTROLITOS
BORATO, CLORURO, TRIS-AMONIO.

Componente 1	Borato	$pK_1 = 9.20$	$r_1 = -0.62$
2,3	Cloruro		$r_2 = -1.55$
6	Tris	$pK_6 = 8.07$	$r_6 = +0.50$

pH^A	RM(1,PI)	θ^A	pH^Y	RM(1,ZETA)	pH^E	θ^E	pH^B
9.0	0.240	3.6851	8.36	0.200	8.88	2.3947	8.08
9.1	0.274	5.1629	8.55	0.180	8.81	1.8925	7.89
9.2	0.310	7.2448	8.73	0.160	8.74	1.4689	7.61
9.3	0.346	10.0643	8.89	0.150	8.70	1.2835	7.39
9.4	0.380	13.7036	9.04	0.140	8.66	1.1142	6.99
9.5	0.413	18.5944	9.18				

COMPOSICION DE LOS ELECTROLITOS.

Concentraciones Molares

Fase:	ALFA	ZETA	BETA	PI	GAMA	EPSILON
Componente 1	0.0443	0.0443		0.0258 (0.0163)		
2			0.0605			
3					0.03530 (0.02230)	0.01
6	0.0486	0.0486	0.0648	0.09508 (0.22337)	0.10470 (0.22971)	0.02
$\Gamma/2$	0.01	0.01		0.01		0.01
pH	8.66	8.66	6.99	9.00 (9.40)	8.36 (9.04)	8.07
RM1		0.140		0.240 (0.380)		

ra un límite teórico de desempaquetamiento (0.38) superior al del sistema glicinato, cloruro, Amediol (0.32), el cual permite resolver al péptido en un gel de 15% T, 5% C, urea 6M, en las mismas condiciones de fuerza iónica, lo cual hace pensar en algún tipo de interacción entre el tetra S-sulfonato del péptido "A" y el ión borato.

Por conveniencia práctica se decidió usar un electrolito continuo de Tris y ácido bórico para analizar en forma rutinaria las muestras de péptidos de cianogenólisis de la proteína híbrida por electroforésis en gel de poliacrilamida. Se buscaron las mejores condiciones de concentración de monómeros, pH, fuerza iónica y concentración de urea para investigar la composición de las preparaciones enriquecidas en el péptido "A".

Los métodos desarrollados para la separación y la detección del péptido "A" de la insulina humana, entre los péptidos de cianogenólisis de la proteína híbrida beta-galactosidas "A" se aplicaron en el estudio de la eficiencia de la obtención del péptido tetra S-sulfonado sin alteraciones estructurales, en términos de las condiciones de ruptura y sulfitólisis de la proteína híbrida. Se procesaron varias muestras de proteína híbrida purificada y de porción enriquecida en proteína híbrida al 50%, a dos secuencias de reacción diferentes: a) cianogenólisis seguida de sulfitólisis y b) sulfitólisis seguida de cianogenólisis, en condiciones idénticas. Los procedimientos se detallan en el anexo Id.

Se determinó la concentración de proteína en las porciones enriquecidas en proteína híbrida obtenidas y se evaporaron a sequedad varias alícuotas equivalentes a 100 µg de proteína para analizarse por electroforésis en gel de poliacrilamida. El análisis de los patrones de separación obtenidos indica lo siguiente:

- 1) Entre los componentes de la muestra se encontró uno, poco abundante (representaba entre 1 y 5% del total de péptidos, dependiendo de la preparación) cuyos valores de $R_f - \%T$ resultaron idénticos a los de un estándar del péptido "A" de insulina bovina, tetra S-sulfonado.

2) La naturaleza de los péptidos solubles a pH 4, a una fuerza iónica de 0.01 (porción enriquecida en el péptido "A") obtenidos por sulfitólisis y cianogenólisis de una porción enriquecida en proteína híbrida resultó similar a la de los péptidos que se produjeron invirtiendo el orden de las reacciones, para una misma preparación de proteínas.

3) Las diferencias encontradas entre una porción enriquecida en el péptido "A" obtenida por sulfitólisis y cianogenólisis de una porción enriquecida en proteína híbrida y otra obtenida a partir de una preparación de la proteína considerablemente pura, fueron mínimas. Esta es una indicación cualitativa de que la calidad de la preparación obtenida a partir de una porción enriquecida en proteína híbrida es tan buena como la obtenida a partir de la proteína purificada.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Figura 11. Placa de electroforésis en gel de poliacrilamida de 14% T, 5% C, en el sistema de electrolitos glicinato, cloruro, amediol. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.5, 10 y 15 μg de un estándar del péptido $(\text{ASSO}_3)_4$ de insulina bovina. Carril 10: 5 μg de un estándar de insulina bovina purificada.

5.5. AISLAMIENTO DEL PEPTIDO "A" DE LA INSULINA HUMANA.

En la separación de proteínas por efecto de su carga eléctrica es conveniente conseguir la máxima diferencia de carga ya que la separación normalmente es máxima cuando las cargas netas de los componentes son mínimas debido a que las diferencias relativas de carga eléctrica normalmente aumentan en la región cercana al punto isoeléctrico. En el caso extremo en que el pH de la solución está comprendido entre los puntos isoeléctricos de los componentes de interés la migración ocurre en sentidos opuestos en un campo eléctrico. Sin embargo, en estas condiciones la disminución de la carga eléctrica reduce considerablemente la movilidad electroforética; además del aumento en la duración de la electroforésis debido a la disminución de la movilidad, la mayoría de las proteínas son menos solubles en electrolitos de pH cercanos a su punto isoeléctrico. En las separaciones por electroforésis en electrolitos discontinuos esta limitación se acentúa debido a la necesidad de que los componentes alcancen al menos la movilidad del componente lento en el electrolito ZETA, y por el hecho de que el pH de este electrolito comunmente es una o dos unidades más próximo al punto isoeléctrico de los componentes que el pH de el electrolito PI.

En una serie de experimentos de enfoque isoeléctrico de muestras del péptido "A" de insulina obtenido por sulfitólisis oxidativa de insulina de páncreas de bovino (Sigma No. I-5500), y del mismo péptido reducido por un exceso de 2-mercaptoetanol, se encontró que el punto isoeléctrico del tetra S-sulfonato del péptido "A" es menor a 2, en tanto que el punto isoeléctrico del péptido reducido (tetra SH) es mayor a 3.

En todos los experimentos se usó como catolito una solución de etilendiamina al 0.4% v/v, y se varió la naturaleza y el pH del catolito en cada experimento. Las soluciones probadas fueron las siguientes: (a) ácido sulfúrico al 0.1% v/v, (b) ácido fosfórico al 0.25% v/v (pH 2.0) y (c) ácido glutámico 0.05M (pI= 3.2). En el experimento con el ácido sulfúrico se observó el enfoque del tetra S-sulfonato en el

extremo anódico del gel, pero a pH 2.0 el péptido abandonó el gel hacia el anolito por lo que se deduce que permanece cargado negativamente a este pH. Por otra parte, se observó el enfoque del tetra SH con el anolito de pH 3.2, por lo que se deduce que su punto isoeléctrico debe ser mayor que este valor.

Los experimentos se hicieron en tubos de vidrio de 4 mm de diámetro interno, con geles de poliacrilamida de 5% T, 3% C, con urea 8M y 1% p/v de anfolitos de pH 3 a 7 (Ampholine LKB). Se aplicaron muestras de 50 a 100 µg de muestra de péptidos en el extremo catódico del gel, en urea 8M. El enfoque se realizó a 50 volts durante 30 min, después a 300 volts durante 3 h y finalmente a 500 volts durante 30 min.

Los resultados anteriores sugirieron la posibilidad de aislar al péptido "A" tetra S-sulfonado por enfoque isoeléctico, en un anolito de pH 2.0. Se colocó una muestra de 1 mg de peptidos de la solución enriquecida en péptido "A" en 0.2 ml de urea 8M en el extremo catódico de un gel de poliacrilamida de las características descritas en un tubo de vidrio de 7 mm de diámetro interno. Se dejó un espacio vacío entre el gel y el extremo inferior del tubo, el cual se cerró con una membrana de diálisis Spectrapor 6 con un límite de retención de péptidos de 1 000 daltons. El enfoque se realizó en las condiciones descritas, usando ácido sulfúrico al 0.1% v/v como anolito, al cabo de este tiempo se reemplazó al ácido sulfúrico por ácido fosfórico al 0.2% v/v. Después de un enfoque adicional de 500 volts durante 15 min se recuperó la solución localizada entre el extremo inferior del gel y la membrana de diálisis y se analizó por electroforé^sis en gel de poliacrilamida en medio básico. En esta solución se determinó un contenido de aproximadamente 10 µg del péptido "A" sin contaminantes apreciables por electroforé^sis. No se investigó la presencia del péptido "A" en la membrana de diálisis ni en el gel de electroenfoque, ni se intentaron mejores condiciones para su recuperación ya que el elevado costo de los anfolitos (aproximadamente 1 000 pesos 1 ml de Ampholine LKB al 40% p/v) hace que este procedimiento resulte excesivamente caro.

Considerando la gran movilidad electroforética del péptido "A" S-sulfonado hacia el ánodo, y su valor de punto isoeléctrico desusualmente bajo, se estudiaron las posibilidades de su aislamiento con fines preparativos por electroforésis en medio ácido. Con este propósito se estudió la combinación de electrolitos acetato, cloruro, beta-alaninio. A continuación se muestran los resultados de su análisis.

Se estudió la movilidad electroforética del péptido "A" tetra S-sulfonado en geles de poliacrilamida de 8, 10 y 12% T, 5% C, con este sistema de electrolitos. Para cada concentración de monómeros se midió la migración del péptido en los siguientes electrolitos:

- a) electrolito ZETA, pH 4.24, fuerza iónica 0.02.
- b) electrolito PI, pH 4.54, fuerza iónica 0.02.
- c) electrolito BETA, pH 3.07, fuerza iónica 0.05.
- d) electrolito GAMA, pH 3.97, fuerza iónica 0.03.

En todos los experimentos el electrolito ALFA (pH 4.24, fuerza iónica 0.02) sirvió como anolito y catolito simultáneamente y como disolvente de la muestra.

Ya que las condiciones de pH de los electrolitos hacen inoperante el sistema catalizador Persulfato/TEMED (N, N, N', N'-Tetrametilendiamina) usado comunmente en la polimerización de acrilamida, se utilizó el sistema catalizador Peróxido de hidrógeno/Sulfato ferroso/Ácido ascórbico (19). Se variaron las proporciones de los reactivos y se disminuyeron al máximo sus concentraciones. El inconveniente encontrado al catalizar así la reacción de polimerización es que se produce un gel de malas propiedades mecánicas, que además se adhiere a las placas de vidrio del molde.

Para evitar estos inconvenientes se diseñó un sistema auxiliar de electrolitos que produjera, por electroforésis hacia el cátodo en sentido contrario al de la electroforésis en el sistema principal, electrolitos ZETA y PI idénticos a los electrolitos GAMA Y BETA, respectivamente, originales del sistema acetato, cloruro, beta-alaninio. El sistema auxiliar de electrolitos está constituido por la com

RESULTADOS DEL ANALISIS DEL SISTEMA DE ELECTROLITOS
ACETATO, CLORURO, BETA-ALANINO.

Componente 1	Acetato	$pK_1 = 4.72$	$r_1 = -0.80$
2,3	Cloruro		$r_2 = -1.55$
6	Beta-alanina	$pK_6 = 3.59$	$r_6 = +0.53$

RM(1,ZETA)	pH^Z	θ^Z	pH^B	RM(1,PI)	pH^P	θ^P	pH^Y
0.300	4.50	3.4102	3.88	0.300	4.50	3.4102	3.88
0.280	4.45	2.8923	3.77	0.320	4.54	3.9972	3.97
0.260	4.40	2.4359	3.65	0.340	4.59	4.6625	4.06
0.240	4.35	2.0344	3.51	0.360	4.63	5.4166	4.14
0.220	4.30	1.6821	3.33	0.380	4.68	6.2723	4.22
0.200	4.24	1.3741	3.07	0.400	4.72	7.2448	4.29
0.180	4.18	1.1062	2.52	0.420	4.76	8.3525	4.36
				0.440	4.81	9.6180	4.43
				0.460	4.85	11.06914	4.50

COMPOSICION DE LOS ELECTROLITOS

Concentraciones Molares						
Fase:	ALFA	ZETA	BETA	PI	GAMA	EPSILON
Componente 1	0.0400	0.0400		0.0250 (0.0200)		
2			0.04956			
3					0.03097 (0.02478)	0.01
6	0.05496	0.05496	0.06453	0.09993 (0.14490)	0.10590 (0.14967)	0.02
r/2		0.01	0.04956	0.01	0.03097	
pH	4.24	4.24	3.07	4.54 (4.72)	3.97 (4.29)	3.59
RM		0.200		0.320 (0.400)		

binación de beta-alaninio, amonio y cloruro. A continuación se ilustra el procedimiento de obtención del gel ácido a partir del auxiliar por electroforésis.

POLARIDAD	<u>POLIMERIZACION</u>			<u>PREELECTROFORESIS</u>			<u>ELECTROFORESIS</u>		
	Componentes	pH	electrolito	Componentes	pH	electrolito	Componentes	pH	electrolito
-	NH ₃ HCl	5.6	c'	NH ₃ HCl	5.6	c' → a	Acetato Beta-ala.	4.24	a
	NH ₃ HCl	8.46	γ'	Beta-ala. HCl	3.10	γ' ≡ β	Acetato Beta-ala.	4.24	ξ
	NH ₃ HCl	9.06	β'	Beta-ala. HCl	3.99	ξ' ≡ γ	Acetato Beta-ala.	4.54	η
+	Beta-ala. HCl	3.59	α'	Beta-ala. HCl	3.59	α' ≡ c	HCl Beta-ala.	3.59	c
						MIGRACION DEL FRENTE †			MIGRACION DEL FRENTE †

* Cambio de catolito y aplicación de las muestras.

La posición de un estándar del péptido "A" de la insulina tetra S-sulfonado, en un gel de 10% T, 5% C, obtenido por preelectroforésis del gel auxiliar fué la misma que la que se obtuvo en un gel de poliacrilamida de la misma concentración de monómeros polimerizado en medio básico.

Los resultados observados de migración del tetra S-sulfonato del péptido "A" de la insulina se ilustran en la figura 12. Según estos resultados la movilidad del péptido es la misma a pH 4.54 que a pH 4.24 para una misma concentración de monómeros; es decir que aparente-

mente no se observa un cambio apreciable en su estado de ionización a estos dos valores de pH. Sin embargo, el pH del electrolito si afecta la velocidad del frente de migración cuando se trata de la electroforesis en el sistema discontinuo de electrolitos, según lo demuestra la separación del péptido del frente de migración PI-GAMA en un gel de 8% T, 5% C, en tanto que el péptido permanece en el frente de migración ZETA-BETA en un gel de la misma concentración de monómeros y fuerza iónica. De este gráfico se deduce que el péptido tetra S-sulfonado migra con el frente ZETA-BETA en geles de concentraciones de monómeros inferiores a 7% T, 5% C, y que para separarlo del frente PI-GAMA conviene utilizar geles de 8 a 17% T, 5% C ($0.2 < R_f < 0.8$).

Al estudiar la separación de los componentes de algunas porciones enriquecidas en péptido "A" no se detectaron péptidos de mayor movilidad que el péptido "A"; sin embargo se detectaron algunos péptidos (un número variable que depende del origen de la muestra) de menor movilidad, que abandonan el frente ZETA-BETA en un gel concentrador de 6% T, 3% C, pero permanecen el frente en un gel de 4% T, 15% C. Este sistema de electrolitos admitió hasta 100 μ l de muestras de 1 a 2.5 μ g/ μ l de péptidos por carril de 0.75 x 8 mm sin que se observara ningún efecto adverso en la separación.

Los resultados obtenidos en la separación analítica de las porciones enriquecidas en el péptido "A" por electroforé^sis en el sistema de electrolitos acetato, cloruro, beta-alaninio, sugirieron la posibilidad de aprovechar el empacamiento selectivo de este péptido en la frontera móvil ZETA-BETA, para su aislamiento con fines preparativos. Para demostrar esto se utilizó un electrolito BETA capaz de producir un electrolito ZETA de pH 4.24 y fuerza iónica 0.01. Como medio anticonvectivo se usó un gel de dextrano (Sephadex G-100), el cual se equilibró con el electrolito BETA y se empacó dentro del tubo del aparato esquematizado en la figura 7.. El procedimiento seguido en la electroforé^sis preparativa de frontera móvil (empacamiento hasta el estado estable) de una porción de péptidos enriquecida en el péptido "A", en el gel granular, se describe en le anexo Ie.

La porción del gel granular que contenía al frente de migración se depositó sobre una columna de permeación en gel (Bio-Gel P-2) con el fin de reemplazar el disolvente original por una solución diluida de acetato de amonio de pH 4. Se colectaron varias fracciones de la elución de esta columna y se liofilizaron para estudiar su composición por cromatografía en fase líquida sobre un soporte apolar. Las condiciones de elución se basaron en las consideraciones presentadas en la parte teórica de la tesis; sin embargo, su implementación para resolver este problema particular no forma parte de este trabajo. Los análisis se realizaron con un cromatógrafo de líquidos (Spectra-Physics SP8000B) en un cartucho de compresión radial Radial-PAK empacado con μ BONDAPAK C18 (Waters), a 24^o C, con una elución en gradiente lineal de las siguientes características:

tiempo (min)	Acido trifluoroacético al 0.1% v/v en agua.	Acetonitrilo
0.0	100%	0
2.0	100%	0
16.0	60%	40%
20.0	60%	40%
22.0	0	100%

Los componentes eluidos se detectaron por absorbancia a 280 nm (Spectra-Physics SP8400). La forma en que se trazaron los cromatogramas no permitió establecer una escala de unidades de absorbancia. En la figura 13 se muestran los cromatogramas correspondientes a algunas de las fracciones colectadas de la columna de permeación en gel. En la fracción #3 se observa la presencia de un componente con un tiempo de retención similar (876 seg) al del tetra S-sulfonato del péptido "A" de insulina porcina (836 seg).

Una alícuota de la fracción correspondiente al pico de $t_r = 876$ seg se analizó por electroforésis en gel de poliacrilamida en medio básico, junto con una alícuota de la fracción del estándar eluida del cromatógrafo, y en presencia de muestras de 0.5, 2, 5, 10 y 20 μ g del mismo estándar sin cromatografiar. El resultado se muestra en la figura 14. En todos los carriles se observa el mismo patrón de migración.

Para comprobar la reproducibilidad del aislamiento por electroforésis del péptido que demostró tener cierta identidad con el péptido "A" de la insulina, se equilibró nuevamente el gel granular con el electrolito inicial (BETA) y se proceso otra muestra de péptidos de cianogenólisis, enriquecida en el péptido "A", en las mismas condiciones de electroforésis. Los componentes presentes en el frente de migración se recuperaron del gel granular usando la columna de permeación en gel y se recogieron algunas fracciones eluidas alrededor del volumen de elución del péptido "A". En estas fracciones se observó la presencia de un componente con el mismo tiempo de retención en cromatografía en fase líquida que el de un estándar del péptido "A" de la insulina porcina (de la misma composición que el péptido "A" de la insulina humana). En la figura 15 se comparan los cromatogramas obtenidos para el péptido de origen bacteriano solo y adicionado de una pequeña cantidad del péptido de la insulina porcina. Las alícuotas correspondientes a los picos del péptido bacteriano, lo mismo que las correspondientes a los picos de los estándares cromatografiados de origen porcino y bo-

vino, se sometieron a análisis de aminoácidos. Los resultados de composición de aminoácidos se resumen en la tabla III.

Los aminogramas obtenidos para los estándares del péptido "A" de origen porcino y bovino presentan diferencias claras que coinciden fielmente con sus diferencias de composición; es decir que el análisis de aminoácidos es sensible a la diferencia de un aminoácido en la composición del péptido "A". Por otra parte, los aminogramas correspondientes al péptido de origen bacteriano solo y adicionado del estándar del péptido "A" de la insulina porcina son prácticamente indistinguibles entre sí, y estos a la vez son indistinguibles del aminograma del estándar del péptido "A" de la insulina porcina solo. Finalmente, considerando las condiciones de hidrólisis, se concluye que la composición de aminoácidos del péptido de origen bacteriano coincide con la esperada para el péptido "A" de la insulina humana.

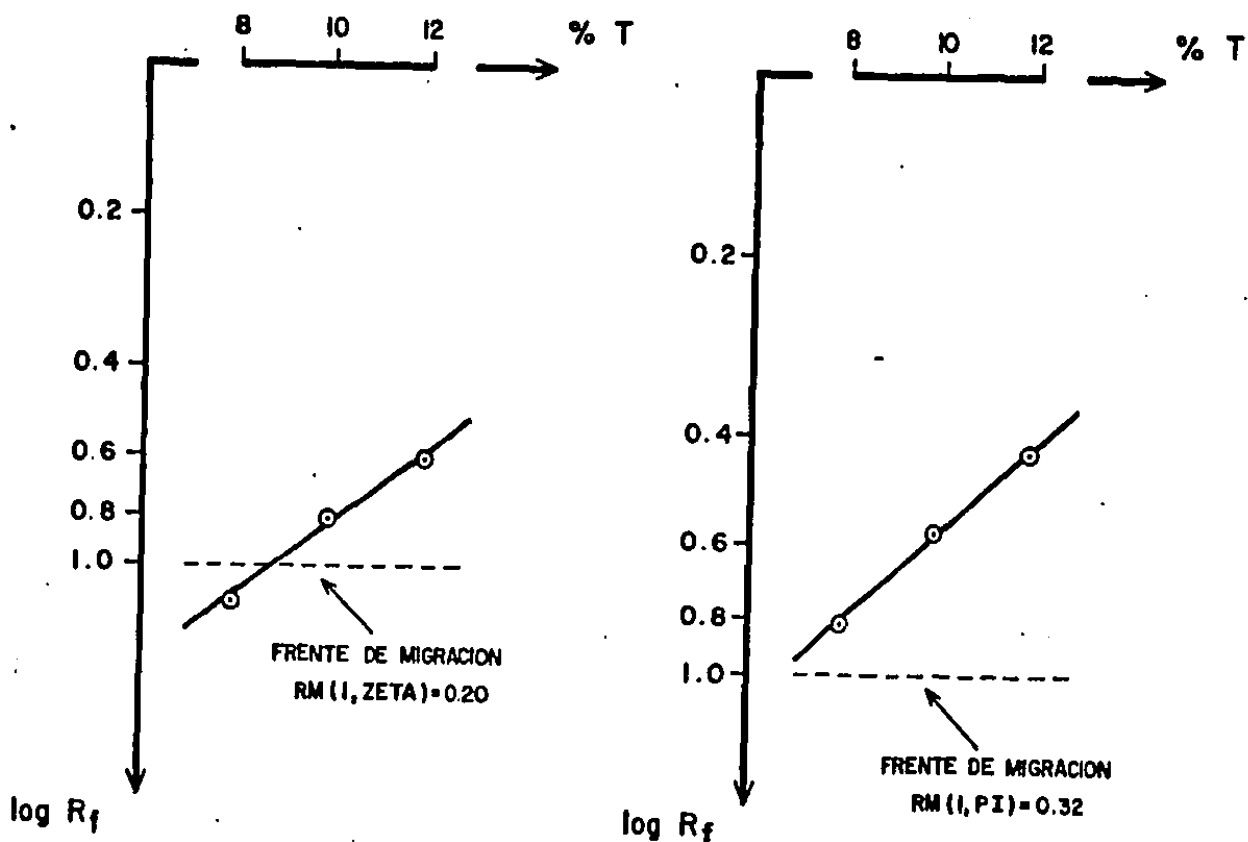


Figura 12. Variación del $\log R_f$ en función de la concentración de monómeros (%T) en la electroforesis en gel de poliacrilamida en el sistema de electrolitos acetato, cloruro, beta-alaninio, para el péptido "A" de la insulina, tetra S-sulfonado. Los valores de R_f están referidos al frente de migración y se calcularon como el cociente del R_f^* del péptido "A" en los electrolitos (A) ZETA y (B) PI, con respecto a la posición de migración del azul de bromofenol, entre el R_f del péptido "A" referido al frente de migración (A) ZETA-BETA y (B) PI-GAMA. En todos los gels la proporción del monómero entrecruzador fué de 5% C.

(A) Electrolito ZETA $\text{pH}^E = 4.24$ $\text{RM}(1, \text{ZETA}) = 0.20$

(B) Electrolito PI $\text{pH}^H = 4.54$ $\text{RM}(1, \text{PI}) = 0.32$

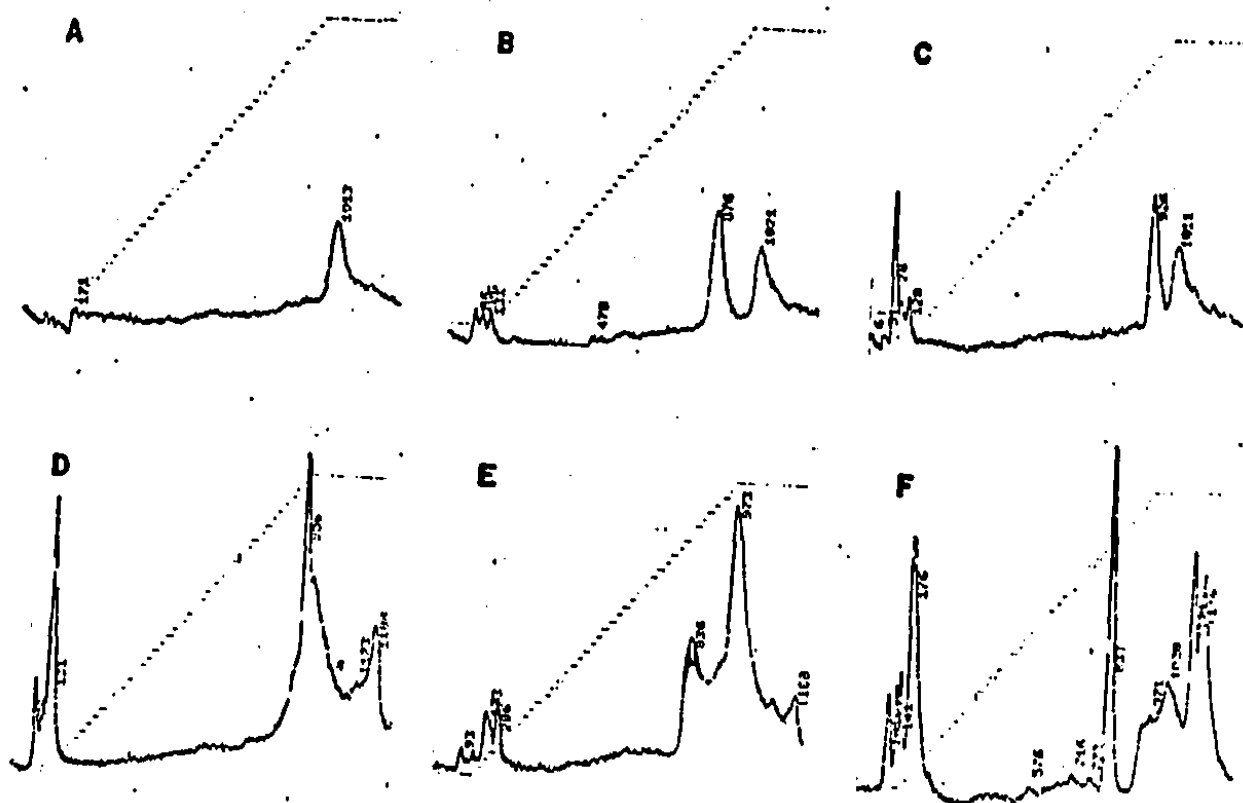


Figura 13. Cromatogramas de algunas fracciones de la columna de permeación en gel, liofilizadas y redisueltas en 500 μ l de solución de ácido trifluoroacético al 0.01% v/v. Las condiciones de la cromatografía y el equipo usado se describen en el texto. En todos los casos se inyectaron 100 μ l de muestra.

(A) Acido trifluoroacético al 0.01% v/v.

(B) Fracción #3 de la columna de permeación en gel.

(C) Fracción #5

(D) Fracción #7

(E) Fracción #7 (50 μ l) adicionada de 5 μ g de un estándar del péptido $A(SSO_3^-)_4$.

(F) Fracción #10 de la columna de permeación en gel.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

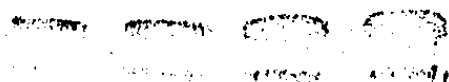


Figura 14. Placa de electroforésis analítica en gel de poliacrilamida de 15% T, 5% C, urea 45% p/v, en un electrolito de Tris y ácido bórico de pH 8.66, a fuerza iónica 0.02.

Carriles 1, 2, 3, 4 y 5: 0.5, 2, 5, 10 y 20 μg respectivamente, del péptido $\text{A}(\text{SSO}_3^-)_4$ de insulina porcina.

Carril 6: Péptido $\text{A}(\text{SSO}_3^-)_4$ de insulina porcina, cromatografiado.

Carril 7: sin muestra.

Carril 8: Pico de elución de 876 seg de tiempo de retención en cromatografía en fase líquida correspondiente a la fracción #3 de la columna de permeación en gel.

Carriles 9 y 10: Picos de elución de 926 seg y de 956 seg de tiempo de retención en cromatografía en fase líquida correspondientes a las fracciones 5 y 7 de la columna de permeación en gel, respectivamente.

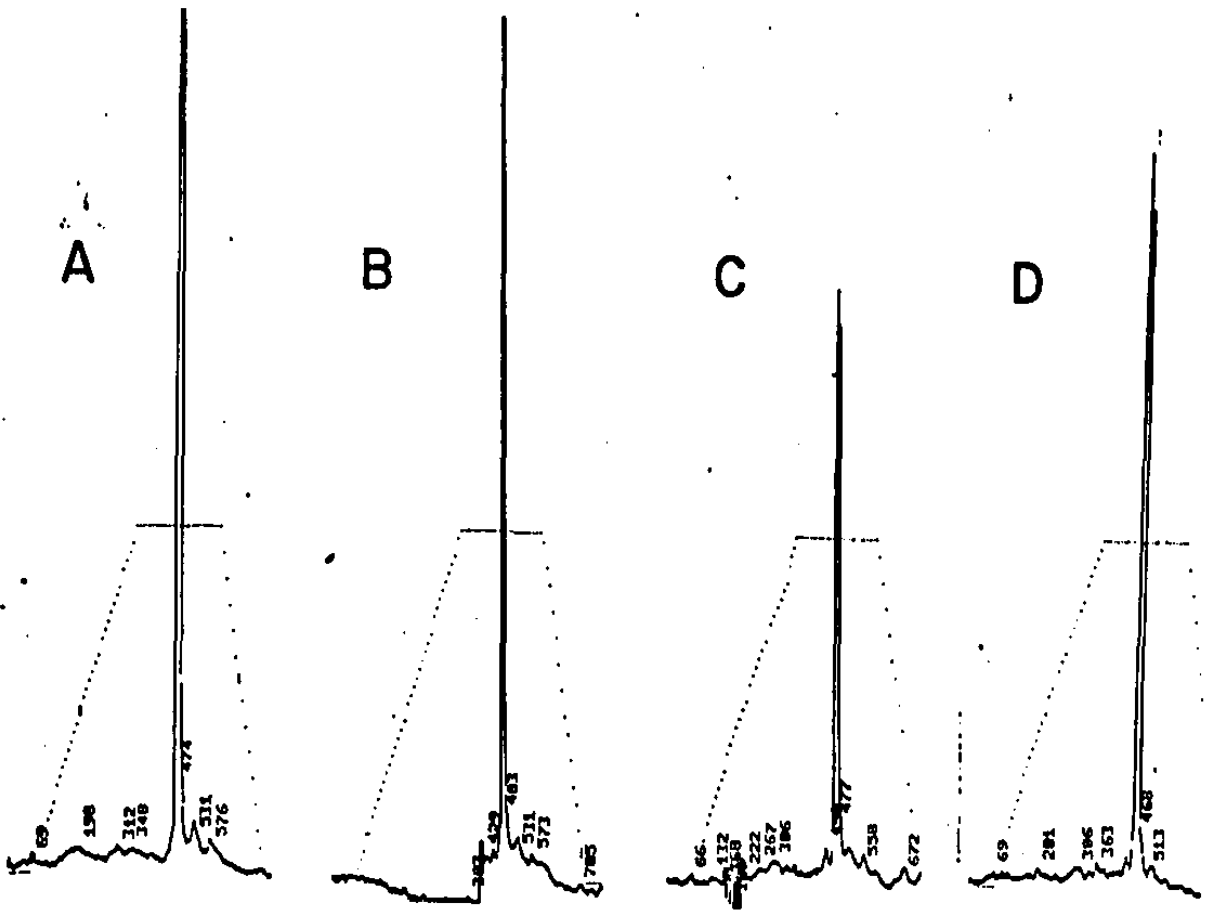


Figura 15. Cromatogramas correspondientes a:

(A) 10 μg de un estándar del péptido "A" de la insulina bovina, tetra S-sulfonado.

(B) 10 μg de un estándar del péptido "A" de la insulina porcina, tetra S-sulfonado.

(C) alícuota del péptido de origen bacteriano aislado por electroforesis.

(D) misma alícuota, adicionada con 1 μg de un estándar del péptido "A" de la insulina porcina, tetra S-sulfonado.

Las condiciones de elución y el equipo utilizado se describen en el texto.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS

	(A)		(C)		(D)	
	Obtenida	Esperada	Obtenida	Esperada	Obtenida	Esperada
ASP	2.0	2	2.0	2	2.0	2
THR			0.93	1	0.92	1
SER	1.93	2	1.98	2	2.30	2
GLU	3.66	4	3.72	4	3.70	4
PRO			0.08			
GLY	1.06	1	1.07	1	1.13	1
ALA	0.88	1				
1/2 CYS	1.46	4	1.49	4	2.06	4
VAL	1.09	2	0.43	1	0.40	1
MET						
ILE	0.17	1	0.68	2	0.75	2
LEU	1.66	2	1.57	2	1.75	2
TYR	1.57	2	1.61	2	1.56	2

Tabla III. Resultados de los análisis de aminoácidos de tres muestras del péptido "A" de la insulina, tetra S-sulfonado, correspondientes a los picos de los cromatogramas A, C y D de la figura 15.

(A) Péptido "A" de la insulina bovina.

(C) Péptido de origen bacteriano aislado por electroforé^sis y purificado por cromatografía en fase líquida.

(D) Péptido de origen bacteriano aislado por electroforé^sis al que se añadió 1 µg de un estándar del péptido "A" de la insulina porcina como estándar cromatográfico, purificado por cromatografía en fase líquida.

6. / CONCLUSIONES.

Los estudios de solubilidad de las proteínas de la cepa bacteria na hiperproductora de la proteína híbrida "A" se aprovecharon para desarrollar un procedimiento de solubilización selectiva que permitió preparar una porción enriquecida hasta el 60% p/p de la proteína híbrida. Esta porción enriquecida se utilizó como la muestra de partida para los estudios de la purificación de la proteína híbrida. Dadas las características de solubilidad de esta proteína, los estudios de purificación se limitaron a la electroforé^{sis} en gel de poliacrilamida y la permeación en gel, ambos en presencia de dodecilsulfato de sodio (DSS). De los resultados obtenidos se concluyó que por electroforé^{sis} se pueden purificar algunos miligramos de la proteína híbrida hasta una pureza mejor que 95% p/p, en un tiempo relativamente corto (4 a 6 horas). Los principales inconvenientes del método son su complejidad en comparación con los métodos usuales de cromatografía en columna y los gastos de operación relativamente elevados para un proceso a mayor escala. La permeación en gel en cambio permite conseguir solo un enriquecimiento parcial de la proteína híbrida si se recupera su recuperación total, ya que solo a costa de una recuperación incompleta se pueden obtener porciones sustancialmente enriquecidas (más de 90% p/p) en la proteína híbrida. La ventaja de este método es que puede escalarse fácilmente para procesar algunos gramos de proteínas (1 a 5 g) en columnas de dimensiones modestas (10 a 20 cm de diámetro por 150 cm de largo).

La resolución de los péptidos de bromuro de cianógeno de la beta-galactosidasa, por electroforé^{sis} en gel de poliacrilamida en presencia de DSS, con el sistema de electrolitos glicinato, cloruro, amediol se aprovechó para estudiar la influencia de las proteínas presentes en la porción enriquecida en proteína híbrida, sobre la factibilidad de detección del péptido "A" de la insulina humana entre los péptidos de cianogenólisis, y para comparar los productos de cianólisis de la proteína híbrida de purificada con los de la beta-galactosidasa. Uno de las posibles aplicaciones de este método es el estudio de la eficiencia de las reacciones de cianogenólisis y sulfitólisis oxidativa de la beta-galactosidasa en términos de los péptidos esperados de acuerdo con su secuencia de aminoácidos.

La observación de algunos péptidos de cianogenólisis, de mayor talla que los esperados, obtenidos tanto para la beta-galactosidasa como para una muestra de la proteína híbrida purificada indicó la posibilidad de una ruptura incompleta en las condiciones utilizadas. La distribución de los péptidos producidos por cianogenólisis de porciones parcialmente enriquecidas en proteína híbrida se usó como elemento de comparación entre las diversas preparaciones de proteína híbrida. Por medio de este método se obtuvo la primera evidencia de la presencia de un componente de un componente de la misma movilidad que un estándar del péptido "A" de la insulina, en una proporción de 0.5 a 1.0 μg por 50 μg de péptidos, una cantidad muy próxima al límite de detección del método más sensible para su detección en un gel de 0.75 x 8.0, en muestras de un tamaño cercano al límite de resolución de al electroforésis en gel de poliacrilamida.

La necesidad de condiciones más selectivas para la separación del péptido "A" condujo a la introducción del sistema de electrolitos borato, cloruro, tris-amonio. La observación de una movilidad inexplicablemente elevada del péptido "A" en presencia del ión borato determinó la conveniencia de usar un electrolito continuo para investigar rutinariamente la composición de las preparaciones enriquecidas en el péptido "A" por electroforésis en gel de poliacrilamida. En estas condiciones se observó un componente claramente resuelto presente en una proporción de 1 a 5% de los péptidos, dependiendo de la preparación, caracterizado por valores de R_f - $\%T$ idénticos a los de un estándar del péptido "A" de insulina bovina, tetra S-sulfonado. Otro resultado interesante fué la observación de patrones de separación de porciones enriquecidas en el péptido "A" (péptidos solubles a pH 4, y fuerza iónica 0.01) producidos por sulfitólisis y cianogenólisis de una porción enriquecida en proteína híbrida, similares a los observados para otras porciones enriquecidas producidas invirtiendo el orden de las reacciones, para una misma porción enriquecida en proteína híbrida. Sorprendentemente, los patrones de separación de estas muestras resultaron poco diferentes a los correspondientes a los producidos por cianogenólisis y sulfitólisis de una preparación de proteína híbrida considerablemente pura.

Los resultados anteriores condujeron al estudio del aislamiento del péptido "A" de la insulina a partir de muestras enriquecidas, obtenidas por sulfitólisis seguida de cianogenólisis de una porción enriquecida en proteína híbrida preparada por un procedimiento más simple y rápido, que consiste en precipitar selectivamente a la proteína híbrida por dilución del extracto protéico en cloruro de guanidinio, redissolver la porción insoluble para llevar a cabo la sulfitólisis y finalmente eliminar las sales y algunos péptidos de bajo peso molecular.

Para conseguir el aislamiento selectivo del péptido "A" tetra S-sulfonado se aprovechó su punto isoeléctrico desusualmente bajo. El sistema de electrolitos diseñado para este fin permite procesar muestras de péptidos considerablemente mayores (10 veces) a las usuales para electroforésis en gel de poliacrilamida, ya que solo participan en la separación los componentes de punto isoeléctrico menor a 4.2. La propiedad del péptido "A" S-sulfonado de migrar junto con la frontera móvil ZETA-BETA en este sistema de electrolitos se aprovechó con fines preparativos aislando a los componentes de la porción enriquecida en el péptido "A" concentrados en la frontera móvil en un gel granular como medio anticonvectivo. Por diversos procedimientos se comprobó que la gran mayoría del material peptídico recuperado de la región del gel donde se localizaba la frontera móvil correspondía al péptido "A" de la insulina humana

La afirmación de que el péptido aislado por electroforésis preparativa es precisamente el péptido "A" de la insulina humana se basa en los siguientes elementos:

1) En la muestra de péptidos de cianogenólisis de una porción enriquecida en proteína híbrida, por electroforésis analítica en gel de poliacrilamida en presencia de DSS, se observa la presencia de un componente que comigra con un estándar del péptido "A" de insulina bovina.

2) En una muestra enriquecida en el péptido "A", por electroforésis analítica en gel de poliacrilamida en medio básico, se observa la presencia de un componente cuya movilidad es idéntica a la de un estándar del péptido "A" para varias concentraciones de acrilamida.

3) En la misma muestra, por electroforésis analítica en gel de poliacrilamida en medio ácido, se observa la presencia de un componente

cuya movilidad es idéntica a la del mismo estándar para varias concentraciones de acrilamida. La importancia de esta prueba radica en la poca probabilidad de que otros componentes de la muestra posean las mismas características de talla molecular y de carga neta en las condiciones (medio ácido) en las que ocurre la separación (hacia el ánodo).

4) En la reducida fracción de los péptidos de cianogenólisis, concentrados por electroforé^{sis} hacia el ánodo en medio ácido, se aisló un componente por permeación en gel, en una fracción congruente con la talla molecular del péptido "A"; el cual además se caracterizó por un tiempo de retención similar al de un estándar del péptido "A" de insulina porcina, por cromatografía en fase líquida sobre un soporte apolar.

5) La fracción que contenía al componente cuyo tiempo de retención fué similar al del estándar del péptido "A" en cromatografía en fase líquida, se analizó por electroforé^{sis} analítica en gel de poliacrilamida en medio básico, junto con un testigo del péptido "A" de insulina porcina recuperado del cromatógrafo, y cantidades variables del mismo estándar sin cromatografiar. Se comprobó que la fracción mencionada contenía solo un componente cuya migración coincidió con la de los estándares indicados.

6) Se determinó la composición de aminoácidos de una alícuota de la fracción que contenía al péptido bacteriano del mismo tiempo de retención en cromatografía en fase líquida que el péptido "A" de insulina porcina. El análisis se repitió adicionando una pequeña cantidad del estándar. Los resultados indican que se trata de un solo péptido cuya composición de aminoácidos coincide con la del péptido "A" de la insulina humana. El aminograma obtenido para esta muestra es indistinguible del obtenido para la misma muestra adicionada del estándar del péptido "A" de insulina porcina, cuya composición de aminoácidos es idéntica a la del péptido "A" de la insulina humana.

7.1. ANEXO I. PROCEDIMIENTOS.

7.1.1. Anexo I a.

PRIMER PROCEDIMIENTO USADO PARA OBTENER UNA PORCIÓN ENRIQUECIDA EN PROTEÍNA HÍBRIDA.

Se suspendieron 20 g de bacterias (paquete celular húmedo) en 30 ml de solución de lisis* y se sonicaron (Soniprep 150 MSE) a la máxima potencia en un baño de agua con hielo, en seis intervalos de 20 seg con interrupciones de 40 seg.

El lisado celular se centrifugó a 15 000 rpm durante 15 min (Sorvall SS-34) y se resuspendió el precipitado en 40 ml de una solución de cloruro de guanidinio 6M y 2-mercaptoetanol al 1% v/v, agitando vigorosamente durante 2 h. La suspensión se centrifugó a 30 000 rpm durante 60 min (Beckman Ti-30) y se recuperó el sobrenadante para dializarse con dos cambios de 4 l de agua destilada en una bolsa de diálisis Spectrapor 6 con un límite inferior de retención de 50 000 daltons.

El dializado se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min (Sorvall SS-34) y se recuperó el precipitado que constituye la porción enriquecida en proteína híbrida.

* Solución de lisis.

Tris 0.2M pH 7.6 a 4° C.

Acetato de magnesio 0.02M

Glicerol 5% v/v

2-mercaptoetanol 0.01M

7.1.2. A N E X O I b.

PRIMER PROCEDIMIENTO USADO PARA LIBERAR Y PROTEGER
AL PEPTIDO "A" DE LA PROTEINA HIBRIDA.

Se disolvió 1 g de la porción enriquecida en proteína híbrida liofilizada, en 25 ml de solución de ácido fórmico al 70% p/v, y se le adicionaron 1.3 g de bromuro de cianógeno, dentro de un matraz con tapón esmerilado y cubierto en su exterior con papel aluminio. La mezcla de reacción se dejó agitando durante 16 h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se conectó el matraz de reacción a un evaporador rotatorio conectado a un vacío de 20 a 30 mm de Hg durante las primeras 4 h, y a 100 μ m de Hg hasta sequedad. Los vapores se retuvieron en una trampa de condensación con hielo seco en acetona.

El residuo sólido se disolvió en 50 ml de cloruro de guanidinio 8M, pH 8.0 con tris 0.2M y se le añadieron 1 g de tetrionato de sodio y 2g de sulfito de sodio (anhidro). La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Al cabo de 24 h se le añadió al producto de reacción suficiente solución de ácido acético 1M para ajustar el pH de la solución a 5 y se dializó con tres cambios de 2 l (cada 8 h) de solución de acetato de amonio 0.01M ajustada a pH 5 con ácido acético 1M en una bolsa de acetato de celulosa benzoilada (Sigma No. D-7884) con un límite superior de difusión de 2 000 daltons.

El dializado se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min (Sorvall SS-34) y se recuperó el sobrenadante que constituye la porción enriquecida en el péptido "A" de la insulina.

7.1.3. A N E X O I c.

PROCEDIMIENTO DESARROLLADO PARA MEJORAR EL ENRIQUECIMIENTO DE LA PROTEINA HIBRIDA.

Se suspendieron 100 g de bacterias (paquete celular húmedo) en 100 ml de solución de lisis para sonicarse en las condiciones descritas en el anexo Ia. La porción soluble del lisado celular se resuspendió en 100 ml de solución de cloruro de guanidinio 8M y 2-mercaptoetanol al 1% v/v para centrifugarse a 18 000 rpm durante 30 min (Sorvall SS-34). El sobrenadante se recuperó junto con el sobrenadante obtenido al centrifugar en las mismas condiciones el precipitado anterior en 50 ml de solución de cloruro de guanidinio 6M, 2-mercaptoetanol al 1% v/v y Tris 0.1M de pH 7.2.

Los sobrenadantes combinados (150 ml) se dializaron durante 24 h con 450 ml de agua destilada recién hervida, en una bolsa de diálisis Spectrapor 6 con un límite superior de difusión de 50 000 dal. El dializado se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min (Sorvall SS-34) para recuperar el precipitado (10 g peso húmedo), el cual constituye la porción enriquecida en proteína híbrida; éste se resuspendió en 200 ml. de agua recién hervida y 2-mercaptoetanol 0.01M para eliminar el resto de cloruro de guanidinio por centrifugación (descartando el sobrenadante). En algunos casos la porción enriquecida en proteína híbrida se resuspendió en 20 ml de agua recién hervida, con 0.01M de 2-mercaptoetanol, para dializarse con agua destilada recién hervida, con tris 0.01M a pH 7.2 y finalmente liofilizarse.

7.1.4. ANEXO I d.

SULFITOLISIS OXIDATIVA Y CIANOGENOLISIS.

A una muestra de 1 g de proteínas disueltas en 25 ml de solución 6M de cloruro de guanidinio a pH 8.0 (Tris 0.1M), se adicionaron sucesivamente, a intervalos de 15 min, 0.5 g de tetratiónato de sodio, 2.0 g de sulfito de sodio y 0.5 g de tetratiónato de sodio otra vez. La mezcla se dejó reaccionar durante 24 h con agitación, a temperatura ambiente. El producto se dializó exhaustivamente con agua destilada en una bolsa de diálisis Spectrapor 6 con un límite superior de difusión de 50 000 daltons.

El dializado se evaporó a presión reducida, a temperatura ambiente, y se redisolvió el residuo sólido producido en 80 ml de ácido fórmico concentrado. A esta solución se le adicionaron 20 ml de una solución de ácido fórmico al 10% v/v y bromuro de cianógeno al 10% p/v. La mezcla se agitó protegida de la luz, durante 16 h a temperatura ambiente. El producto se diluyó con tres volúmenes de agua destilada helada y se evaporó inmediatamente a presión reducida, a temperatura ambiente.

CIANOGENOLISIS Y SULFITOLISIS OXIDATIVA.

A una muestra de 1 g de proteínas disueltas en 80 ml de ácido fórmico concentrado se le adicionaron 20 ml de solución al 10% v/v de ácido fórmico y al 10% p/v de bromuro de cianógeno. La reacción transcurrió en las condiciones indicadas y el producto se diluyó con tres volúmenes de agua helada y se concentró hasta el volumen original por evaporación a presión reducida, a temperatura ambiente. Al concentrado se le añadieron tres volúmenes de agua helada para después congelarse y liofilizarse.

El liofilizado se redisolvió en 25 ml de solución 6M de cloruro de guanidinio a pH 8.0 (Tris 0.1M). La reacción de sulfitólisis

7.1.5. ANEXO I e.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DSS
PARA PROTEINAS DE E. coli.

Se forma un gel de acrilamida y bis-acrilamida compuesto por un gel separador (gel inferior) y un gel concentrador (gel superior). Las muestras disueltas en una solución desnaturalizante se aplican entre el gel superior y el cátodo (electrolito superior).

Los electrolitos del gel separador (electrolito GAMA) y del gel concentrador (electrolito BETA) producen por electroforesis otros electrolitos de composición diferente, de fuerza iónica 0.01 (PI y ZETA respectivamente). Los electrolitos concentrados deben diluirse 1:4 para obtener las concentraciones mencionadas, o en una proporción directa para obtener electrolitos de la fuerza iónica deseada.

SOLUCIONES CONCENTRADAS.

Electrolito superior	Tris	0.24M
100 ml 4x pH 8.90	Glicina	0.24M
Electrolito BETA (gel sup.)	Tris	0.5516M
100 ml 4x pH 7.82	Ac. clorhídrico	0.3075M
Electrolito GAMA (gel inf.)	Tris	0.9320M
100 ml 4x pH 8.74	Ac. clorhídrico	0.1633M
Electrolito inferior	Tris	0.20M
100 ml 4x pH 8.10	Ac. acético	0.10M
Solución de acrilamida	Acrilamida	
100 ml 40% T, 3% C.	Bis-acrilamida	

PREPARACION DEL GEL.

	3% C				
	4% T	5% T	7% T	9% T	11% T
Agua	1.80 ml	3.75 ml	3.25 ml	2.75 ml	2.25 ml
Elect. BETA	2.50 ml	--	--	--	--
Elect. GAMA	--	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml
Sol. de acrilamida	0.50 ml	1.25 ml	1.75 ml	2.25 ml	2.75 ml
Sol. de DSS (100 mg/ml)	50 µl				
Sol. de persulfato (100 mg/ml)	50 µl	100 µl	80 µl	60 µl	40 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

PREPARACION DE LA MUESTRA.

La muestra libre de sales se disuelve en el electrolito BETA diluído 1:2, en concentraciones entre 0.2 y 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas. Se adiciona un décimo del volúmen de la muestra de una solución de DSS al 10% p/v y 2-mercaptoetanol (opcional) hasta una concentración de 1% v/v. La muestra se calienta a 80° C durante 10 min.

Antes de aplicar la muestra se mezcla con un volúmen igual de solución de sacarosa al 10% p/v, con azul de bromofenol y/o rojo de fenol al 0.01% p/v. Las muestras aplicadas deben contener entre 10 y 50 μg de proteína por carril de 10 x 0.75 mm, en volúmenes de 20 a 100 μl . Cuando se dispone de muestras concentradas (más de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se puede formar un solo gel hasta los carriles con el electrolito GAMA, preparar las muestras como se indicó y aplicarlas en volúmenes pequeños (10 a 20 μl por carril).

CONDICIONES DE ELECTROFORESIS.

La electroforésis se empieza a 50 volts constantes hasta la entrada de toda la muestra al gel concentrador y posteriormente a 10 mA constantes hasta el paso del frente de migración al gel inferior. La separación de los componentes en el gel inferior se realiza a potencia constante entre 2 y 5 watts, hasta que el frente de migración se aproxima al borde del gel (entre 90 y 40 min).

7.1.6. ANEXO If.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DSS
PARA PEPTIDOS DE 2 000 a 100 000 DALTONS.

El principio del método es el mismo que el descrito para proteínas de E. coli, en el anexo If.

SOLUCIONES CONCENTRADAS

Electrolito superior	Amediol	0.1650M
100 ml 4x pH 9.32	Glicina	0.1440M
Electrolito BETA (gel sup.)	Amediol	0.2057M
100 ml 4x pH 7.89	Ac. clorhídrico	0.1845M
Electrolito GAMA (gel inf.)	Amediol	0.3254M
100 ml 4x pH 9.09	Ac. clorhídrico	0.1153M
Electrolito inferior	Amediol	0.20M
100 ml 4x pH 8.90	Ac. acético	0.10M
Solución de acrilamida 40%	Acrilamida	38% p/v
100 ml 40% T, 5% C	Bis-acrilamida	2% p/v
Solución de acrilamida 10%	Acrilamida	9.7% p/v
100 ml 10% T, 3% C	Bis-acrilamida	0.3% p/v

PREPARACION DEL GEL

	3% C 5% T	5% C			
		8% T	10% T	12% T	14% T
Agua	-----	3.0 ml	2.5 ml	2.0 ml	1.5 ml
Elect. BETA	5.0 ml	-----	-----	-----	-----
Elect. GAMA	-----	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml
Sol. de acrilamida 10% T	5.0 ml	-----	-----	-----	-----
Sol. de acrilamida 40% T	-----	2.0 ml	2.5 ml	3.0 ml	3.5 ml
Sol. de DSS (100 mg/ml)	75 µl	-----	-----	-----	-----
Sol. de persulfato (100 mg/ml)	50 µl	50 µl	45 µl	40 µl	35 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

PREPARACION DE LA MUESTRA Y CONDICIONES DE ELECTROFORESIS.

El procedimiento para la preparación de las muestras es el mismo que el descrito en el anexo If. Se recomiendan las mismas condiciones de electroforésis que las del mismo anexo. En las mismas condiciones de electroforésis, el frente electroforético de este sistema de electrolitos migra a una cierta posición aproximadamente en 2/3 del tiempo observado con el sistema de electrolitos del anexo If.

7.1.7. ANEXO I g.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA PARA PEPTIDOS DE BROMURO DE CIANOGENO EN UN ELECTROLITO CONTINUO.

El electrolito continuo Tris-ácido bórico 0.0486M-0.0443M (fuerza iónica 0.01), de pH 8.66, corresponde al electrolito ZETA que se produce por electroforésis con el sistema de electrolitos borato, cloruro, Tris-amonio, a partir de un electrolito BETA de Tris-HCl 0.0648M-0.0605M, de pH 6.99. En el gel se incorpora urea a concentraciones entre 6 y 8M. La urea, la acrilamida y la bis-acrilamida se pesan y se disuelven al momento de preparar el gel.

Experimentalmente se observa que conviene realizar la separación de los péptidos de bromuro de cianógeno a una fuerza iónica mayor a 0.02. Por otra parte, para que la separación ocurra en un tiempo razonable y se evite un calentamiento excesivo conviene que la fuerza iónica sea menor a 0.05.

PREPARACION DEL GEL

Electrolito ZETA ($\Gamma/2 = 0.1$)	H ₃ BO ₃	0.443M	2.74 g
100 ml 10x pH 8.66	Tris ₃	0.486M	5.89 g

	5% C			
	12% T	13% T	14% T	15% T
Bis-acrilam.	0.072 g	0.078 g	0.084 g	0.090 g
Acrilamida	1.368 g	1.482 g	1.596 g	1.710 g
Urea	5 g	5 g	5 g	5 g
Elect. ZETA	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Agua	Se afora con agua destilada a 12 ml.			
Sol. de persulfato (100 mg/ml)	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

PREPARACION DE LA MUESTRA.

La muestra libre de sales se disuelve en el electrolito ZETA diluído 1:10 con una solución de urea 8M, azul de bromofenol y rojo de fenol al 0.01% p/v, en concentraciones de 2 a 5 mg de péptidos por ml de solución. Las posibilidades de comparar las bandas de los distintos carriles entre sí son máximas cuando se aplican entre 20 y 40 µg de péptidos por carril de 0.75 x 10 mm.

CONDICIONES DE ELECTROFORESIS.

La electroforesis se inicia a 50 volts constantes durante la entrada de la muestra al gel y posteriormente a 300 volts constantes hasta que el colorante rojo alcanza el borde inferior del gel.

PROCEDIMIENTO DE TINCION PARA EL PEPTIDO A(SO₃⁻)₄.

La solución de tinción se prepara mezclando volúmenes iguales de una solución de Azul de Commassie G-250 al 0.2% p/v en agua, y de una solución de ácido sulfúrico 2N, lentamente y con agitación constante. La mezcla se agita durante 3 horas y se filtra a través de papel Whatman No. 1. El filtrado se neutraliza con una solución 10N de hidróxido de potasio hasta observar el vire de color: café - azul - púrpura. Se adiciona ácido tricloroacético sólido hasta una concentración final del 40% p/v, y se añade un décimo del volumen de ácido acético glacial saturado con cloruro mercuríco.

El gel se sumerge en la solución de tinción durante 15 a 20 minutos, con agitación. Al cabo de este tiempo, se reemplaza la solución de tinción por agua destilada.

7.1.8. ANEXO I h.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SELECTIVA PARA PEPTIDOS ACIDOS.

Por razones prácticas el gel se polimeriza en medio básico fijado por los electrolitos de un sistema auxiliar que produce por electroforésis hacia el cátodo, un gel concentrador y un gel separador, en medio ácido con los electrolitos del sistema deseado. El sistema de electrolitos acetato, cloruro, beta-alaninio (sistema principal) reemplaza al sistema auxiliar beta-alaninio, amonio, cloruro por preelectroforésis en sentido opuesto al de la electroforésis en el sistema principal.

COMPOSICION DEL GEL AUXILIAR.

<u>Componente</u>	<u>Electrolito inferior</u>	<u>Gel inferior D.E. (A.E.)*</u>	<u>Gel superior D.E. (A.E.)*</u>	<u>Electrolito superior</u>
Beta-ala.	0.020	0.1094	0.06567	
Amoniaco		(0.2105)	(0.1263)	0.0126
Ac. clorhíd. r.	0.010	0.031 (0.1321)	0.0496 (0.1102)	0.0110
<u>Características</u>				
fuerza iónica		0.031 (0.1321)	0.0496 (0.1102)	
pH	3.59	3.99 (9.06)	3.10 (8.46)	8.46

SOLUCIONES CONCENTRADAS.

Electrolito inferior	Beta-ala.	0.10M
100 ml 5x pH 3.59	Ac. clorhídrico	0.05M
Electrolito gel conc.	Ac. clorhídrico	0.6605M
100 ml 5x pH 9.06	Amoniaco	1.0525M
Electrolito gel sep.	Ac. clorhídrico	0.5510M
100 ml 5x pH 8.46	Amoniaco	0.6315M
Electrolito superior	Ac. clorhídrico	0.055M
100 ml 5x pH 8.46	Amoniaco	0.063M

* D.E. significa después de la preelectroforésis.

* A.E. significa antes de la preelectroforésis.

COMPOSICION DEL GEL PRINCIPAL.

<u>Componente</u>	<u>Concentraciones molares</u>			<u>Electrolito inferior</u>
	<u>Electrolito superior</u>	<u>Gel inferior D.E. (A.E.)*</u>	<u>Gel superior D.E. (A.E.)*</u>	
Ac. acético	0.040	0.040	0.025	
Ac. clorhídr.		(0.0496)	(0.031)	0.01
Beta-ala.	0.055	0.055 (0.0645)	0.100 (0.1059)	0.02
<u>Características</u>				
fuerza iónica		0.01 (0.0496)	0.01 (0.031)	
pH	4.24	4.24 (3.07)	4.54 (3.97)	3.59

El gel inferior se forma con una concentración de acrilamida de 9.5% p/v y de bis-acrilamida de 0.05% p/v. Como catalizador se usan 100 µl de solución de persulfato de amonio (50 mg/ml) y 10 µl de TEMED por cada 10 ml de gel. El gel superior se forma con una concentración de acrilamida de 3.4% p/v y de bis-acrilamida de 0.6% p/v, con las mismas cantidades de persulfato y de TEMED que para el gel inferior.

El gel principal se produce por electroforesis hacia el cátodo (arriba) hasta que el frente de migración (visible debido a las diferencias de refracción entre los electrolitos) sale del gel superior, en condiciones de corriente o de voltaje tales que no se sobrepasen 10 watts. Después de esta preelectroforesis se descarta el electrolito superior y se lava el compartimiento del electrolito con agua destilada antes de aplicar las muestras e introducir el nuevo electrolito superior.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CONDICIONES DE ELECTROFORESIS.

Las muestras libres de sales se disuelven en un electrolito de beta-alanina 0.0645M y ácido clorhídrico 0.0496M (pH 3.07) o en el electrolito superior (pH 4.24) con 5% p/v de sacarosa o urea 4M y azul de bromofenol al 0.01% p/v. Se pueden aplicar muestras de péptidos de bromuro de cianógeno y sulfitólisis de 0.1 a 5 mg/ml, en volúmenes de hasta 100 µl por carril de 0.75 x 8 mm. Conviene aplicar las muestras del péptido "A" tetra S-sulfonado estándar (1 a 10 µg por carril) en volúmenes iguales a los de las muestras de péptidos.

7.1.9. A N E X O I i.

AISLAMIENTO DEL PEPTIDO "A" DE LA INSULINA POR ELECTROFORESIS
EN MEDIO ACIDO DE UNA PORCION ENRIQUECIDA, EN UN GEL GRANULAR.

La solución enriquecida en el péptido "A" se obtuvo por sulfitolisis y cianogenólisis de una porción enriquecida en proteína híbrida al 50% p/p. El residuo sólido obtenido al evaporar el ácido fórmico después de la cianogenólisis se suspendió en 50 ml de una solución diluída de acetato de amonio a pH 4 para liofilizarse. El liofilizado se resuspendió en una solución de beta-alanina-HCl de fuerza iónica 0.01, a pH 3, y se recuperó la fracción soluble junto con una segunda fracción obtenida equilibrando nuevamente el precipitado con la misma solución.

Una alícuota de 3 ml de la fracción soluble se depositó sobre la superficie del lecho del gel empacado en la columna y equilibrado con una solución de beta-alanina 0.0645M y ácido clorhídrico 0.05M. La muestra se hizo migrar hacia el ánodo a 2 watts durante 3 horas, hasta la llegada del frente ZETA-BETA al extremo inferior del lecho empacado.

Como electrolito superior (catolito) se usó una solución de ácido acético 0.04M y beta-alanina 0.055M de pH 4.24, y como electrolito inferior (anolito) una solución de beta-alanina 0.02M y ácido sulfúrico 0.01N, de pH 3.6. Antes de aplicar la muestra se le adicionó sacarosa hasta una concentración del 2% p/v y rojo de fenol y azul de bromofenol, ambos al 0.01% p/v.

En el caso particular en el que las curvas $u = f(T)$ se intersecan para $T = 0$, $(Y_0)_a = (Y_0)_b$, como ocurre para las proteínas desnaturizadas con DSS (20). A $T = 0$ no hay separación, al aumentar T aumentan Δu y Δx hasta un único máximo, para $T = T_{\max}$ (por definición). Al aumentar T más de T_{\max} , las movibilidades de ambos componentes se aproxima asintóticamente a cero, Δu también se aproxima a cero. -

En las aplicaciones analíticas de la electroforésis, T_{\max} no es necesariamente la concentración óptima de monómeros del gel debido a la dependencia del coeficiente de difusión aparente de los componentes con la concentración de monómeros (el ancho de la banda y la concentración del gel). Si se considera la desviación estándar del perfil de concentración de las bandas en función de la distancia viajada, se observa que la resolución óptima ocurre para un valor de $T = T_{\text{opt}}$ mayor que T_{\max} . Para valores de T mayores a T_{\max} se reduce la separación entre los centros de los picos, pero también se reduce el grosor de la banda debido a la disminución del coeficiente de dispersión (la difusión pura contribuye parcialmente al ensanchamiento de la banda). Se consigue mejorar la resolución; sin embargo, si se aumenta demasiado la concentración de monómeros, la disminución en la separación se sobrepone al efecto de la agudeza de las bandas y se pierde la resolución.

En las aplicaciones preparativas de la electroforésis en gel de poliacrilamida es necesario optimizar la resolución por unidad de tiempo. En este caso la variable de respuesta no es la distancia migrada sino el tiempo de elución del componente de interés, por lo que se requiere optimizar tanto la concentración de monómeros del gel como su longitud. En una electroforésis analítica (de duración fija) es posible detectar componentes de R_f muy pequeño. En una electroforésis preparativa (de trayectoria fija) estos componentes eluirían en tiempos excesivamente grandes en comparación con el tiempo de elución del frente. Esto representa inconvenientes ya que la concentración de los componentes disminuye conforme pasa el tiempo por lo que se dificulta su detección o simplemente se diluyen innecesariamente. Como una aproximación válida, T_{\max} , como se define para la electroforésis en gel de poliacrilamida de duración fija, representa la

mejor concentración de monómeros para electroforesis en gel de poliacrilamida de trayectoria fija (preparativa). Para valores de T mayores disminuye el coeficiente de difusión, pero aumenta la duración de la electroforesis antes de la elución. En las condiciones mencionadas, para valores fijos de campo eléctrico y de longitud del gel, el ensanchamiento de las bandas es casi constante e independiente de los coeficientes de reparto. Ya que la resolución es similar para valores de T entre T_{\max} y T_{opt} , para valores de T cercanos a T_{\max} la elución es más rápida, por lo que se mejora la resolución por unidad de tiempo.

El tamaño de muestra aplicada por unidad de área de sección transversal afecta notablemente la resolución y en cierto grado la recuperación de los componentes, de manera que para conseguir cierta resolución y recuperación en las separaciones preparativas por electroforesis en gel de poliacrilamida es necesario limitar la cantidad de los componentes de interés o de los componentes adyacentes. Idealmente, los contaminantes deben poseer movibilidades mayores que los componentes de interés para que ocupen los sitios de adsorción del gel y reduzcan la reactividad de los sitios donadores de radicales libres estacionarios en el gel.

Las dimensiones de los aparatos comerciales para electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida permiten procesar algunos miligramos de muestra. Un aumento en la sección transversal del gel proporciona un aumento proporcional de capacidad de muestra; sin embargo, existen ciertas limitaciones al respecto.

El gel constituye al mayor resistencia eléctrica del sistema por lo que ahí se genera la mayor cantidad de calor cuando fluye corriente, el cual debe retirarse instantánea y uniformemente del gel. Si el gel se enfría inadecuadamente se producen gradientes de temperatura dentro de él, el campo eléctrico se distorsiona en forma cóncava en la dirección en que migran las bandas. Cualquier distorsión de las bandas o desviación de su paralelismo reduce considerablemente la capacidad de resolución del sistema usado. Al aumentar el área de la sección transversal del gel, manteniendo el mismo gradiente de potencial, se obtiene un aumento proporcional en la corriente eléctrica y por supuesto en el calentamiento ohmico. En cambio,

la disipación de calor no aumenta en la misma proporción ya que se aumenta la distancia entre las superficies de intercambio de calor. En un tubo, la geometría anular minimiza el gradiente radial de temperatura. Considerando los voltajes requeridos para realizar una separación razonablemente rápida, el anillo del gel no debe exceder ciertas dimensiones, a causa de la reducida conductividad térmica de los geles de poliacrilamida.

Para valores fijos de fuerza iónica y densidad de corriente, al aumentar el gradiente de potencial disminuye la duración de la electroforé^usis (para una longitud del gel fija), con lo que se disminuye la dispersión de las bandas por difusión. El tiempo de elución es inversamente proporcional al voltaje; sin embargo, el calentamiento ohmico varía proporcionalmente al cuadrado del voltaje. El calentamiento ohmico por unidad de área de sección transversal limita el tamaño del aparato y por ello, la cantidad de muestra que puede procesarse sin que las bandas se deformen apreciablemente debido a gradientes de temperatura dentro del gel.

En un aparato para electroforé^usis preparativa, inmediatamente debajo del gel debe haber una cámara del menor volúmen posible a través de la cual fluya constantemente un electrolito. Esta cámara de elución sirve para coleccionar las bandas que migren fuera del gel. El dispositivo de elución debe permitir la recuperación cuantitativa de los componentes separados, evitando su dilución excesiva. Por razones técnicas, el flujo a través de cámaras de sección circular no es uniforme. Además, durante la electroforé^usis se degorma el lado anódico del gel, lo que causa disturbios en el flujo del electrolito provocando el mezclado de las zonas dentro de la cámara de elución. Los defectos del flujo a través de cámaras de elución de sección circular conducen a la necesidad de mejorar la elución de las bandas por otros medios.

La concentración del electrolito en la cámara de elución determina la conductividad específica, la cual tiene influencia sobre el campo eléctrico ($E = i/\kappa$) en la cámara de elución. El objetivo principal del dispositivo de elución es conseguir que cada una de las sustancias que llegan al final del gel separador entren tan rápido como sea posible en el elec-

trolito de elución para ser retiradas del aparato. Esto significa que el campo eléctrico debe ser mayor en la cámara que en el gel para que las sustancias que lleguen al final del gel se aceleren hasta su movilidad libre en el electrolito de elución, conservandose la resolución de los componentes con el mínimo de dilución. Si se usan estas condiciones de elución, es conveniente contar con otra cámara debajo de la de elución en la que fluya el mismo electrolito a mayor concentración, para evitar la pérdida de las sustancias a través de la cámara de elución hacia el electrodo. Los electrolitos de estas cámaras pueden separarse por medio de una membrana semi permeable.

El aparato construido para purificar a la proteína híbrida por electroforésis en gel de poliacrilamida se muestra en la figura 17. Consiste en un tubo de vidrio con una sección transversal anular de 3 cm^2 , provisto de una chaqueta exterior de enfriamiento. Las esferas de vidrio laterales contienen a los electrodos y a los electrolitos correspondientes, los cuales se renuevan continuamente durante la electroforésis. La cámara de elución está comprendida entre la parte inferior del gel separador y una membrana de diálisis Spectrapor 3 sujeta por un anillo de vidrio y un empaque de goma a la pared del tubo. Dentro de la cámara se encuentran, en la parte inferior, el extremo del tubo que succiona el electrolito de elución, y en la parte superior el extremo del tubo que introduce el electrolito de elución. Del otro lado de la membrana se hace pasar el electrolito inferior para mantener estables las características de la interfase. Las concentraciones iónicas del gel separador, del electrolito de elución y del electrolito inferior se basaron en las consideraciones mencionadas respecto a la influencia de las concentraciones iónicas en torno a la cámara de elución, sobre su eficiencia de elución.

CELDA PARA ELECTROFORESIS PREPARATIVA

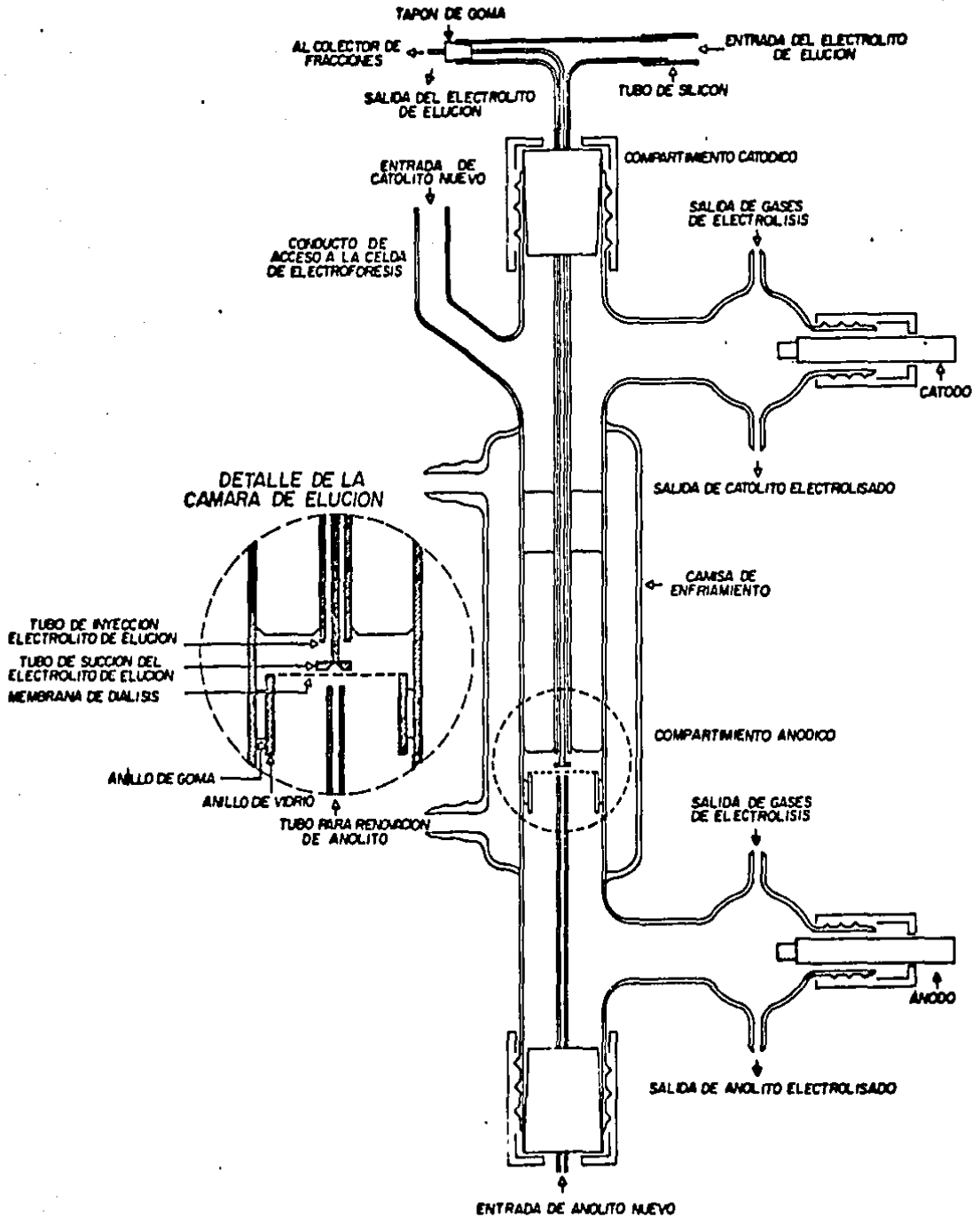


Figura 17. Esquema del aparato utilizado para purificar a la proteína híbrida por electroforesis en gel de poliacrilamida.

PROCEDIMIENTO DE OPERACION DEL APARATO.

El aparato se coloca en posición vertical, sujeto por medio de pinzas a un soporte, y se colocan los electrodos y las mangueras de electrolitos (arriba) y de gases (abajo), en las esferas de vidrio.

Se coloca el anillo de vidrio que sujeta la membrana de diálisis de manera que quede invertida con respecto a la posición indicada en la figura. Se coloca (arriba) el tapón que sujeta el tubo de alimentación del electrolito inferior el cual se introduce al tubo de vidrio, sobre la membrana de diálisis, hasta llenar la esfera de vidrio.

El aparato se gira 180° de manera que la burbuja de aire que se forma debajo del tapón (ahora en la parte inferior) se pase a la esfera de vidrio y se elimine por la manguera de escape de los gases de electrólisis.

Se hace pasar agua por la chaqueta exterior y se coloca (arriba) el tapón de los tubos del sistema de elución, de manera que el extremo inferior del tubo de succión quede a 102 mm de la superficie de la membrana de diálisis.

Se introduce al tubo una solución de sacarosa al 20% p/v, en el electrolito del gel separador, por medio del tubo de succión hasta una altura de 3 a 4 cm sobre la membrana de diálisis. Sobre esta solución densa se deposita cuidadosamente la solución del gel separador por medio de una manguera de teflón. Se succiona la solución densa por medio del tubo de succión hasta que la interfase con el gel separador quede de 2 a 3 mm arriba del nivel inferior del tubo de inyección. Sobre la parte superior del gel separador se deposita un volumen pequeño del electrolito del gel separador y se deja polimerizar durante una hora.

El aparato se inclina ligeramente y se succiona el electrolito remanente sobre el gel separador. Se deposita la solución del gel concentrador y se recubre con un volumen pequeño del mismo electrolito del gel. Una vez polimerizado el gel concentrador se elimina el remanente de electrolito y se introduce el electrolito superior hasta llenar la esfera de vidrio.

Se inyecta el electrolito de elución a la cámara de elución por medio del tubo de succión (completamente lleno de la solución densa) hasta llenar la trayectoria del tubo de inyección al recipiente del electrolito de elución. En ese momento se invierte el sentido del flujo, el cual se ajusta al escogido para la elución y se inicia la colección de fracciones.

La muestra disuelta en la solución desnaturalizante se deposita entre la superficie del gel concentrador y el electrolito superior por medio de una manguera de teflón y se inicia inmediatamente la electroforé^usis.

La muestra de mayor tamaño que se proceso con buenos resultados fué de 15 mg de proteínas disueltas en 5 ml, empleando una trayectoria de 3 cm de gel concentrador y de 5 cm de gel separador. Durante el empacamiento de la muestra se mantuvo constante la corriente a 50 mA; la separación se realizó a una potencia constante de 5 watts.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES PARA LA POLIMERIZACION DEL GEL.

Gel separador 4% T, 3% C (15 ml)

1.4 ml de agua destilada
7.5 ml de electrolito GAMA *
6.0 ml de solución de acrilamida de 10% T, 3% C.
100 µl de solución de persulfato de amonio al 10% p/v
15 µl de TEMED

Gel concentrador 3% T, 3% C (9 ml)

2.4 ml de agua destilada
4.5 ml de electrolito BETA *
3.0 ml de solución de acrilamida de 10% T, 3% C
100 µl de solución de persulfato de amonio al 10% p/v
10 µl de TEMED

* Los electrolitos GAMA y BETA se preparan como se indica en el anexo If.

8./ BIBLIOGRAFIA

- (1) Fowler A. V.
Aminoacid Sequence of β -Galactosidase. VII. Isolation of the 24
Cyanogen Bromide Peptides.
J. Biol. Chem., (1978), 15, 5499 - 5504.
- (2) Gross E.
The Cyanogen Bromide Reaction.
Methods in Enzimology, (1967), 11, 238 - 254.
- (3) Katsoyannis, P. G., and A. Tometsko.
Insulin Synthesis by Recombination of A and B Chains: A Higly
Efficient Method.
Proc. Natl. Acad. Sic., (1966), 55, 1554 - 1561.
- (4) Bailey J. L.
Techniques in Protein Chemistry, (1967), 110 - 133.
Elsevier Publishing Company. Amsterdam. Segunda edición.
- (5) Goeddel, D. V., D.G. Kleid, F. Bolivar, H.L. Heyneker, D.G. Yansura,
R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura, and A.D. Riggs.
Expression in Escherichia coli of Chemically Synthesized genes
for Human Insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1979), 76, 106 - 110.
- (6) Craven, G. R., E. Steers Jr., and Ch. B. Anfinsen.
Purification, Composition, and Molecular Weight of β -Galactosidase
of Escherichia coli K 12.
- (7) Karger, B. L., Snyder, L. R., and Horvath, C.
An Introduction to Separation Science, (1973), 109 - 178; 557 - 578.
John Wiley and Sons. New York.

- (8) Bier, M., and Allyger, T. T.
Electrokinetic Separation Methods, (1979), 443 - 469.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
(Righetti, P. G., Van Oss, C. J., and Vanderhoff, J. W. ed.)
- (9) Chrambach, A., Jovin, T. M., Svendsen, P. J., and Rodbard, D.
Methods of Protein Separation, Vol 2, (1976), 27 - 144.
Plenum Press, New York. (Catsimpoolas, N. ed)
- (10) Nichol, J. C., E. B. Dismukes, and R. A. Alberty.
Weak Electrolyte Moving Boundary Systems Analogous to the
Electrophoresis of Two Proteins.
J. Amer. Chem. Soc., (1958), 80, 2610 - 2615.
- (11) Jovin T. M.
Multiphasic Zone Electrophoresis. I. Steady-State Moving-Boundary
Systems Formed by Different Electrolyte Combinations; II. Design
of Integrated Discontinuous Buffer Systems for Analytical and
Preparative Fractionation; III. Further Analysis and New Forms
of Discontinuous Buffer Systems.
Biochemistry, (1973), 12, 871; 879; 890 - 898.
- (12) Regnier, F. E.
High- Performance Liquid Chromatography of Biopolymers.
Science, (1983), 222, 245 - 252.
- (13) Laemmli, U. K.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the
Head of Bacteriophage T4.
- (14) Hess, H. H., M. B. Lees, and J. E. Derr.
A linear Lowry-Folin Assay for Both Water-Soluble and Sodium
Dodecyl Sulfate-Solubilized Proteins.
Anal. Biochem., (1978), 85, 295 - 300.

- (15) Wickoff, M., D. Rodbard, and A. Chrambach.
Polyacrilamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate-Containing Buffers Using Multiphasic Buffer Systems: Properties of the Stack, Valid R_f -Measurement, and Optimized Procedure.
Anal. Biochem., (1977), 78, 459 - 482.
- (16) Allington, W. B., A. L. Cordry, G.A. Mc Cullough, D. E. Mitchell, and J. W. Nelson.
Electrophoretic Concentration of Macromolecules.
Anal. Biochem., (1978), 85, 188 - 196.
- (17) Reynolds, J. A., and Ch. Tanford.
Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1970), 66, 1002 - 1007.
- (18) Righetti, P. G., and F. Chillemi.
Isoelectric Focusing of Peptides.
J. Chromatogr., (1978), 157, 243 - 251.
- (19) Jordan, E. M., and S. Raymond.
Gel Electrophoresis: A New Catalyst for Acid Systems.
Anal. Biochem., (1969), 27, 205 - 211.
- (20) Neville, D. M., Jr.
Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System.
J. Biol. Chem., (1971), 246, 6328 - 6334.