

El complejo avidina-biotina y su uso en la biología molecular

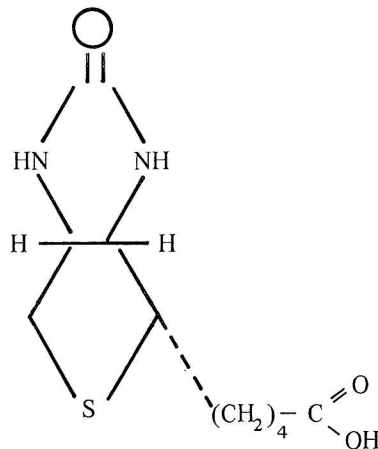
DAISY FERNANDEZ

En los últimos años, los científicos han estado mostrando su interés en la interacción única de tipo covalente que se produce entre la proteína simple, la avidina y la biotina. Este complejo, por sus características especiales constituye un medio analítico con grandes posibilidades de uso en la biología molecular. La alta afinidad que presenta, que lo hace prácticamente inseparable, le confiere una alta sensibilidad y especificidad a los procedimientos en que se usen.

La avidina es una glicoproteína obtenida de la clara de huevo. Algunas de sus características más importantes son:

- Peso molecular - 67 000
- Peso molecular (subunidades) - 15 600
- Residuos de oligosacáridos - 1
- Residuos de mannososa - 4-5
- Residuos de glucosamina - 3
- Residuos de triptófano - 4

La estructura de la biotina, o vitamina H, es la siguiente:



La biotina es capaz de unirse a muchos grupos funcionales como amino, carboxilo, tiol y fenol. Unida a una macromolécula puede mantener la interacción con la avidina. Así, hormonas biotinizadas, fagos, lectinas, anticuerpos y otras proteínas, pueden interactuar con la avidina. Si la avidina es inmovilizada, o unida covalentemente a una sonda perceptible (por ejemplo, un isótopo radiactivo o una enzima) el complejo avidina-biotina puede ser usado para la localización y aislamiento de los componentes antes mencionados y/o de sus receptores.

El uso del complejo avidina-biotina como sonda general en estudios de afinidad, se debe a diversas causas:

1. Con un solo conjugado (ferritina-avidina, fluoresceína-avidina, etcétera), se pueden caracterizar todos los sistemas de afinidad, por microscopía electrónica, de fluorescencia o procedimientos analíticos.
2. La biotina puede atacar eficientemente desde ligandos pequeños hasta macromoléculas en diferentes condiciones.
3. En la mayoría de los casos, las características y la actividad biológica de las proteínas biotinizadas, prácticamente no se afectan.
4. El complejo avidina-biotina es de una estabilidad y afinidad excepcionales.
5. El uso de este sistema permite la realización de estudios cinéticos, desde que la fijación y la vía de localización posterior del marcador conjugado puede realizarse en cualquier etapa durante la interacción del receptor y la sonda.
6. Tanto la avidina como la biotina son comercialmente rentables en grandes cantidades.
7. El complejo avidina-biotina, en unión de sistemas estándares de afinidad (conjugación directa de la proteína que se une al marcador), puede ser usado para estudios de doble marcaje.

Veamos a continuación algunos ejemplos de aplicaciones:

En estudios de purificación, por cromatografía de afinidad, por ejemplo usando Sepharosa 4B, cuando el ligando es la biotina, o cuando es la avidina. Los primeros en utilizar la Sepharosa para estos fines, fueron Cuatrecasas y Wilchek, en 1968. En este caso las condiciones de elución son muy difíciles, por la alta afinidad del complejo. Solamente es capaz de eluirse con 6M HCL-guanidina. No obstante, se han utilizado mucho columnas de biotina-sepharosa, para purificar avidina directamente de la clara de huevo. Existen reportes donde se logra purificar la avidina más de 4 000 veces con 90% de actividad, en un solo paso. También se usa para separar, de las enzimas biotinizadas, las subunidades que contienen la biotina. Por ejemplo, se utiliza una columna de avidina inmovilizada para separar, de la transcarboxilasa, las subunidades que contienen biotina, pues son las únicas que quedan unidas a la columna al disociar la enzima, a pH 9,00 (Berger y Wood, 1974). Las lectinas-biotinizadas y anticuerpos también quedan atrapados en las columnas de avidina, para su separación de las proteínas no deseables.

El complejo avidina-biotina se utiliza también en las técnicas de afinidad citoquímica (localización, visualización y evaluación de componentes celulares específicos por la luz visible, fluorescencia, microscopía electrónica). En general, están basadas en la preparación de un conjugado mixto, comprendiendo la molécula biológicamente activa (anticuerpos, lectinas, hormonas, etcétera) atacada químicamente por una sonda sensible (fluoresceína, ferritina, peroxidasa, biotina), donde el producto resultante retenga su detectabilidad y su actividad biológica. La ferritina es uno de los marcadores más usados en la microscopía electrónica, pero tiene el inconveniente de que el complejo resultante es de alto peso molecular y afecta las características físicas, las uniones químicas y la actividad biológica del conjugado. Si utilizamos la alta capacidad del complejo avidina-biotina, podemos resolver algunos de los problemas

de la conjugación ferritina-proteína: *i.* la biotina ataca directamente a los grupos funcionales en la superficie celular (azúcares, aminoácidos, etcétera) o a la molécula activa (anticuerpos, lectina, etcétera); *ii.* la incubación posterior con el conjugado ferritina-avidina-biotina permite la visualización ultraestructural de un receptor de superficie celular; *iii.* le ofrece gran estabilidad al complejo ferritina-avidina-biotina.

Como mencionamos anteriormente, el complejo avidina-biotina es utilizado en la localización de receptores. La superficie celular posee gran variedad de receptores para hormonas, anticuerpo, lectinas, diferentes drogas, toxinas y muchos otros componentes biológicamente activos. Y el uso directo del complejo ferritina-avidina-biotina permite un marcaje más específico de estos receptores (Bayer *et al*, 1976):

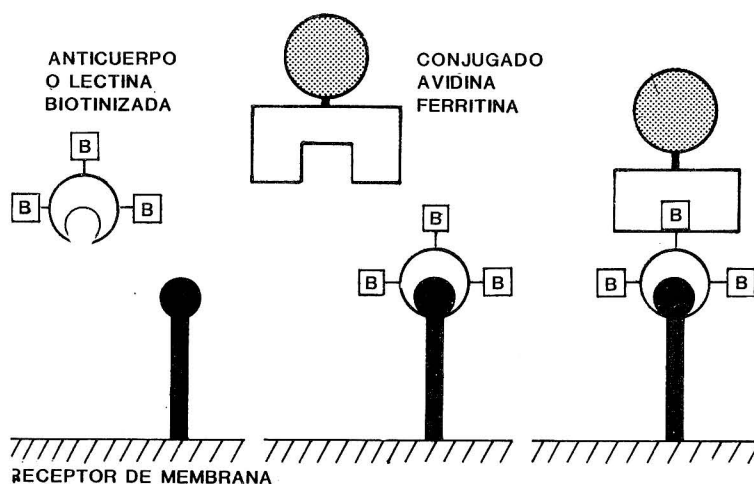


FIG. 1. Marcaje de un receptor de membrana con el conjugado ferritina-avidina-biotina.

En las hibridaciones de ácidos nucleicos, este complejo ofrece magníficos resultados. En 1977, Pelligini *et al* y Manning *et al*, purificaron ARNm, que se unió covalentemente a la biotina. Este ARNm modificado se hibridizó con una preparación de ADN total. Sólo el ADN específico reconoció el ARN, después de la hibridización, y se pudo localizar y aislar, por la interacción avidina-biotina. Esto se efectuó con una columna de avidina y se obtuvo un alto grado de pureza del gen (42-80%). Bayer *et al*, han utilizado esta técnica también para la separación de generaciones sucesivas de células proliferativas de levadura.

El sistema tiene gran aplicación, actualmente, en diferentes técnicas de diagnóstico viral rápido. Se utiliza mucho en los llamados ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay). En 1984, L.S. Nerurkar *et al*, lo utilizaron con mucho éxito para la detección rápida del *herpes simplex virus* de nuestras clínicas, introduciendo una variación: la estreptavidina, formando el complejo estreptavidina-biotina, que aumenta la especificidad del complejo anterior, al ser la estreptavidina una proteína y no una glicoproteína, como lo es la avidina.

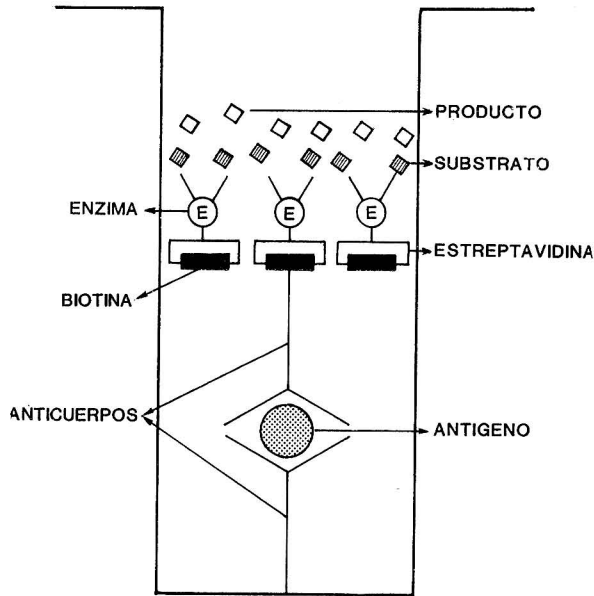


FIG. 2. Captura del antígeno de HSV por ELISA con B/SA.

Otros autores han utilizado diferentes modificaciones de ELISA, como Hsi-Chi Chang *et al* (1984), que reportaron el uso de un ELISA con proteína A marcada con biotina para la determinación de anticuerpos de encefalitis japonesa en sueros humanos, y de otras especies animales.

El complejo avidina-biotina es utilizado en estudios de estimulación de linfocitos, en estudios de interacción hormona-receptor, y en estudios de inactivación de fagos. Aquí Becker y Wilchek, en 1972, demostraron cómo la biotina unida artificialmente a un sistema viviente, y a su vez con la avidina, provoca la inactivación de los fagos.

El uso de anticuerpos anti-biotina, da una nueva versatilidad al sistema, creando un sistema de interacción nativa (avidina-biotina), más otro de interacción artificial (anticuerpos-biotina). Estos dos sistemas pueden ser usados complementariamente. Por ejemplo, se ha comprobado la acción estimuladora en las células biotinizadas de los anticuerpos anti-biotina, acción producida en mayor escala que la producida por la avidina (en linfocitos biotinizados).

Aquí hemos presentado diferentes ejemplos de aplicaciones del complejo avidina-biotina en la biología molecular, de manera que permita comprender a los lectores el gran potencial de uso que posee este sistema.

REFERENCIAS

- BAYER, E. A. (1976). *Isr. J. Med. Sci.*, **12**: 1361.
 BAYER, E. A.; E. SKUTELSKY; D. WYNNE y M. WILCHEK (1976a). *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 933-939.
 BAYER, E. A.; M. WILCHEK y E. SKUTELSKY (1976b). *FEBS Lett.* **68**: 240-244.
 BAYER, E. A. y M. WILCHEK (1979). *Methods of Biochemical Analysis*, **26**: 1-45.
 BECKER, J. M. y M. WILCHEK (1972). *Biochem. Bioph. Acta*, **264**: 165-170.

- BERGER, M. y H. G. WOOD (1974). *J. Biol. Chem.*, **250**: 927-933.
- CUATRECASAS, P. y M. WILCHEK (1968). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**: 235-239.
- CHANG, HSI-CHI; I. JAKASHIMA; J. ARIKAWA y N. HASHIMOTO (1984). *J. Virol. Methods*, **9**: 143-151.
- PELLEGRINI, M.; D. S. HOLMES y J. MANNING (1977). *Nucleic Acids. Res.* **4**: 2961-2973.
- NERURKAR, L. S.; M. NAMBA; G. BRASHEARS; A. J. JACOB; Y. J. LEE y J. L. SEVER (1984). *J. Clin. Microbiol.*, **20**: 109-114.