

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SECUENCIADOR DE PROTEÍNAS AUTOMÁTICO Y COMPACTO, A PARTIR DE ELEMENTOS DISPONIBLES COMERCIALMENTE

José M Cruz¹, Vivian Huerta², Vivian Morera², Sergio López¹, Rolando del Rey¹, Jesús Randulfe¹, Alicia Rodríguez-Maribona¹, Elio Doncel¹, Irene Niubó¹ y Nelson Menéndez¹

¹Instituto Central de Investigaciones Digitales (ICID) P.O. Box 16055, Habana.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) P.O. Box 6162. Habana 6, Cuba.

ABSTRACT

We describe a protein sequencer, built-in with commercially available elements. It uses zero dead-volume membrane valves and a cross-flow-reactor. Solvents and reagents path lengths are minimal. As a consequence, the consumption of reagents is low. Miniature valves are used to control vacuum and inert gas supply. Sequencer and the chromatographic system are controlled by an IBM-compatible personal computer. A software was developed that offers several operational facilities, allows the acquisition of the absorbance signal and the chromatograms processing. The system can control either analogue or RS232 high performance liquid chromatography pumps. Sample amounts around 10 pmol can be sequenced with an initial yield of 57-74 %, a repetitive yield of 94-98 % and low background signals (<1 pmol).

Key words: PTH-amino acids, repetitive yield, automatic sequencing

Biotecnología Aplicada 1997;14:33-39

RESUMEN

Se describe un secuenciador de proteínas, construido a partir de elementos comercialmente disponibles. En él se utilizan válvulas de membrana de cero volumen muerto; las trayectorias de los reactivos y solventes es mínima y se usa una cámara de reacción de flujo transversal. Todo ello contribuye al bajo consumo de reactivos. Se emplean válvulas miniaturizadas para el control del gas inerte y del vacío. El secuenciador y el sistema cromatográfico son controlados a través de una computadora personal IBM-compatible. Se desarrolló un programa que brinda numerosas facilidades de operación, permite la adquisición de la señal de absorbancia y el procesamiento de los cromatogramas. El sistema puede manejar bombas de control analógico o por comunicación serie RS232. Permite secuenciar en el rango de 10 pmol de muestra con un rendimiento inicial de 57-74 %, un rendimiento repetitivo de 94-98 % y bajos niveles de fondo en los cromatogramas (<1 pmol).

Palabras claves: PTH-aminoácidos, rendimiento repetitivo, secuenciación automática

Introducción

A partir de la introducción del primer secuenciador automático descrito por Edman y Begg (1) en 1967, en el que acuñaron el término "sequenator", se comenzó a comercializar instrumentos cada vez más eficientes para esta función, los que han sido descritos en la literatura (1-5). El objetivo ha sido secuenciar cantidades de proteínas cada vez menores y obtener secuencias cada vez más largas y confiables. Debido al alto costo de los reactivos y solventes necesarios, se ha tratado de utilizar la menor cantidad posible de éstos.

Los avances fundamentales en el desarrollo de estos instrumentos después de la introducción del secuenciador de fase gaseosa (2) se deben al perfeccionamiento de los materiales utilizados, a las mejoras en los sistemas de detección de los derivados de feniltiohidantoína (PTH) de los aminoácidos y a los avances en el control automático y la computación de los datos.

En Cuba, el continuo desarrollo de la biotecnología ha generado la necesidad creciente del análisis

de secuencias de proteínas. Con este trabajo nos propusimos diseñar y construir un secuenciador automático a partir de elementos comercialmente disponibles, dado el alto costo de los equipos comerciales (> 150 000 USD) y nuestras dificultades para adquirirlos en el mercado internacional. Adicionalmente fue necesario desarrollar un programa que nos permitiera controlar el secuenciador, el sistema cromatográfico y la adquisición y el procesamiento de los datos de absorbancia desde una computadora.

Materiales y Métodos

Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia y separación de los PTH-aminoácidos

El secuenciador y su programa fueron concebidos de modo que pudieran utilizarse bombas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de control analógico o por comunicación serie RS232.

1. Edman P, Begg G. A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* 1967;1:80-91.

2. Hunkapiller MW, Hewick RM, Dreyer WJ, Hood LE. A new protein microsequenator using gas phase Edman reagents. En: Elzinga M (Eds.), *Methods in Protein Sequence Analysis* 1982;77-90.

3. Calaycay J, Rusnak M, Shively JE. Microsequence analysis of peptides and proteins. *Analytical Biochemistry* 1991; 192:23-31.

4. Fisher S, Reimann F, Wittman-Liebold B. A new modular sequencer. *Journal of Protein Chemistry* 1988;7:224-225.

5. Rusnak M, Shively JE, Calaycay JR. 1992; U.S. Patent No. 5, 137, 695.

✉ Autor de correspondencia

Los resultados presentados en este trabajo se obtuvieron con un módulo de gradiente para HPLC (Knauer). Incluye un desgasificador de vacío de conexión en línea, dos bombas modelo 64 con microcabezales, una cámara de mezclado dinámico, un horno compacto MII, un espectrofotómetro a 269 nm con celda de flujo de paso óptico de 10 mm y una válvula de inyección eléctrica tipo AA. El programa de gradiente envía los datos al convertidor digital/análogo que controla las bombas una vez por segundo.

La separación de los PTH-aminoácidos se llevó a cabo a una temperatura de 55 °C y a un flujo de 280 µL/min. Se utilizó una columna de fase inversa RP 18 de 5 µm (2 x 250 mm) (Knauer). Como solución tampón A se utilizó 3,5 % de tetrahydrofurano (THF), grado HPLC (Rathburn) en agua Milli Q, 2,5 mM de 1-octanosulfonato de sodio 98 % (Aldrich), 0,025 % de ácido acético glacial 100 % (Merck). Se ajustó la separación de los PTH-aminoácidos utilizando soluciones tampones de acetato de sodio 3 M (1:1, pH 3,8; pH 4,6), grado HPLC (Knauer). Como solución tampón B se utilizó acetonitrilo, grado HPLC (Merck). El gradiente utilizado fue: 3 min a 11 % de B, a los 10 min 29 % de B, a los 15 min 37 % de B hasta los 20 min, a los 22 min 47 % de B hasta los 26 min, a los 27 min 80 % de B hasta los 30 min.

Reactivos y solventes para la secuenciación

Estándar de PTH-aminoácidos (Pierce), difluoruro de polividileno (PVDF) (Millipore).

Todos los reactivos y solventes utilizados en el secuenciador se adquirieron comercialmente (grado

secuencia) de la firma Knauer. Los reactivos utilizados fueron los siguientes: como reactivo de acoplamiento, una solución al 5 % de fenilisotiocianato (PITC) en n-heptano y como base para ajustar el pH del acoplamiento, una solución al 6 % de trimetilamina (TMA) en una mezcla 1:1 (v/v) de metanol y agua. Para la ruptura se utilizó ácido trifluoroacético (TFA) anhidro y para la conversión una solución del mismo al 25 % en agua.

Los solventes usados para el lavado después del acoplamiento y para el traslado del derivado de anilinoiazolinona (ATZ) del aminoácido hacia el convertidor fueron acetato de etilo y cloruro de butilo. El solvente de lavado del convertidor fue metanol. Para disolver los PTH-aminoácidos e inyectarlos al HPLC se utilizó una solución de acetonitrilo al 20 % en acetato de sodio 75 mM.

Proteínas y péptidos

La proteína estándar fue la β-lactoglobulina b (Knauer), grado secuencia. Los péptidos St1 y St2 se obtuvieron por hidrólisis con bromuro de cianógeno de la proteína Sticholisina II (6).

Programa de degradación (Tabla 1) Aplicación de la muestra

Como soporte de la muestra se utilizó una pieza de forma elíptica de PVDF de 12 x 5 mm.

La aplicación de las muestras en solución se realizó activando la membrana con metanol y depositando en su centro 5 µL de la muestra disuelta en TFA 50 %. La pieza de PVDF con la muestra transferida se colocó directamente en el reactor.

6. Álvarez C, Tejuca M, Morera V, Besada V, Pazos F, Lanio ME, Padrón G. Novel primary structure of Sticholysin and its interaction with membranes. *Toxicon* 1996; 34:3.

Tabla 1. Resumen elaborado por bloques de pasos del programa de secuencia. Como los eventos son simultáneos cada bloque se nombra con la entrega de reactivo o solvente que ocurre.

Paso	Función	Tiempo (s)	Volumen (µL)
R2	Entrega de R2 al reactor	27	6
Dry2	Secado de la membrana	82	
R1	Entrega de R1 al reactor	36	12
R2	Entrega de R2 al reactor	27	6
B2	Lavado del bloque de membranas con S2	18	18
D4 Decp		2	
CPL2*	Reacción de acoplamiento	1542	
S2	Lavado del reactor con S2	54	18
R3**	Entrega de R3 al reactor	12	6
B3**	Lavado del bloque de membranas con S2	27	18
S3**	Entrega de S3 al convertidor	122	100
S4**	Lavado del convertidor con metanol	71	300
D4**	Secado del convertidor	22	
R4**	Entrega de R4 al convertidor	41	50
Dry3	Evaporación de R3 en el reactor	32	
S1	Traslado del ATZ hacia el convertidor	78	200
Total		2193	

*El tiempo del acoplamiento es de 25 min y 42 s. **El tiempo de ruptura es de 4 min y 55 s. El tiempo total del ciclo es de 36 min y 33 s. Temperatura del reactor 45 °C. Temperatura del convertidor 50 °C. R1: PITC en n-heptano, R2: TMA 6 % en agua:metanol 50 %, R3: TFA anhidro, R4: TFA 25 % en agua, S1: cloruro de butilo, S2: acetato de etilo, S3: acetonitrilo 20 % en acetato de sodio 75 mM, S4: metanol.

Tabla 2. Rendimiento repetitivo obtenido para diferentes pares de aminoácidos en cinco corridas de 200 pmol de β -Lactoglobulina B. Se muestra además el rendimiento inicial para cada corrida. Todos los valores en la tabla están expresados en por ciento.

Aminoácido	Ciclos (n, m)*	β Lac1	β Lac2	β Lac3	β Lac4	β Lac5
L	1,10	95	96	91	95	95
I	2,12	95	92	92	94	93
V	3,15	97	95	93	95	93
T	4,18	92	99	91	92	94
Q	5,13	97	99	100	95	99
K	8,14	n.d	n.d	92	93	90
G	9,17	112	88	99	91	94
RR promedio		98	95	94	94	94
RI		57	67	58	74	66

* Para el cálculo de los rendimientos ver Materiales y Métodos; n.d.: no determinado.

Cálculo de los rendimientos

El rendimiento inicial (RI) del equipo se calculó cuantificando la cantidad de PTH presente en el primer ciclo y corrigiendo según el por ciento de la muestra inyectada en el HPLC. El rendimiento repetitivo (RR) se calculó mediante la expresión:

$$RR = \sqrt{\frac{pmol(m)}{pmol(n)}}$$

donde:

m y n : ciclos donde aparece un aminoácido dado en la secuencia (Tabla 2).

Resultados y Discusión

Diseño del instrumento

En la Figura 1 se muestra la vista frontal del instrumento y en la Figura 2 la vista posterior. El secuenciador S6000 mide 68 cm de ancho, 54 cm de profundidad y 54 cm de altura. Resulta más pequeño que el modelo 910 Knauer (87 x 53 x 64 cm) y sólo un poco más grande que la versión compacta del secuenciador de fase gaseosa desarrollada por [Calaycay *et al.* en 1991] (25 x 38 x 44 cm) (3). El suministro de gas se realiza desde los balones a 3 bar a través de reguladores de alta pureza (Aldrich). Tiene una trampa indicadora de humedad R&D Separations (modelo MT400-2-S) en cascada con un filtro de partículas Balston (modelo L9933-05-AQ). El suministro de reactivos y solventes, así como las transferencias entre el reactor, el convertidor y el sistema cromatográfico se efectúan por diferencia de presión utilizando el gas a una de las presiones, 70 o 320 mbar. Para obtenerlas se usan dos reguladores de presión de precisión Brooks Instruments (modelo 8601D), y se indican por medio de dos manómetros situados en el panel frontal.

Las entregas de reactivos y solventes se logran presurizando (70 mbar) los frascos correspondientes y entregando durante un tiempo determinado, con excepción de la TMA y el TFA anhidro que se dosifican por programa y del solvente de inyección en el sistema cromatográfico y la mezcla estándar de PTH-aminoácidos que se inyectan en cantidades fijas determinadas por un lazo volumétrico. Tanto las

entregas, el suministro de gas para el secado y los movimientos de los ATZ y PTH-aminoácidos entre el reactor, el convertidor y el sistema cromatográfico se realizan a través de válvulas de membrana de teflón y vidrio de cero volumen muerto tipo Wittmann-Liebold (7). La disposición vertical de los bloques de vidrio de las válvulas brinda un mejor

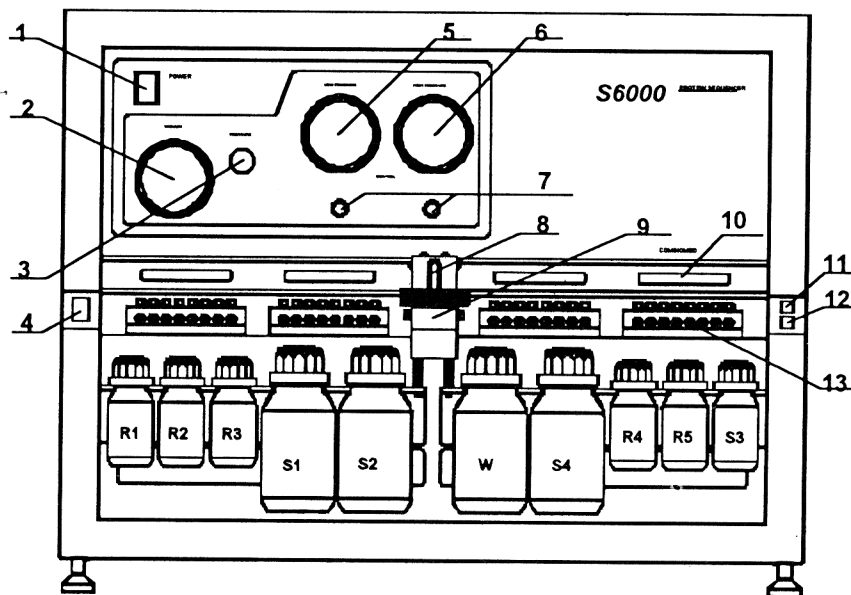


Figura 1. Vista frontal.

1. Interruptor general
2. Vacuómetro
3. Indicador de presencia de argón
4. Interruptor de la lámpara fluorescente
5. Manómetro de la presión baja
6. Manómetro de la presión alta
7. Controles de las presiones baja y alta
8. Recinto del convertidor
9. Recinto del reactor
10. Indicadores de válvulas activadas (abiertas)
11. Interruptor de la luz del convertidor
12. Interruptor de la luz del reactor
13. Bloques de válvula de membrana

acceso a las mismas para las operaciones de mantenimiento que el que es posible lograr en otros secuenciadores modulares comerciales. Las conexiones entre los bloques de válvulas, los frascos de reactivos y el de desecho se realizan con tuberías de teflón o tefzel de 0,7 y 0,5 mm de diámetro interno, 1,6 mm de diámetro externo y de longitud mínima. Las tuberías se unen a las válvulas por medio de conexiones de teflón tipo "pull-through". Como consecuencia, el consumo de reactivos y solventes es bajo.

Las válvulas de membrana son accionadas por electroválvulas Festo (modelo MOZH3-M3) de 24 Vcd montadas sobre bloques múltiples. Gracias al pequeño tamaño de las electroválvulas, éstas se pudieron montar de forma que todas las conexiones con las válvulas de membrana son cortas y de la misma longitud, lo cual reporta consumos de gas y vacío reducidos con la correspondiente disminución de los gastos de operación y mantenimiento. El vacío se produce por una bomba con membrana de teflón (Vacuubrand, modelo MZ 2 C) y su nivel se indica por un vacuómetro en el panel frontal (Figura 1).

El reactor es del tipo de flujo transversal Knauer (4) con un volumen de 15-20 μ L y como convertidor se utiliza un vial Pierce de fondo cónico de 1 mL. La inyección al sistema cromatográfico se realiza a través de una válvula de seis puertos y dos posiciones con un lazo volumétrico de 50 μ L. Dicha válvula es manejada eléctricamente por el secuenciador. La disposición de las conexiones entre el convertidor, la línea de desechos y el sistema de HPLC responden al esquema descrito por Keith Ashman en 1986 (8). La detección de la condición de lazo lleno se realiza por un detector ultrasónico construido para ese fin. La inyección al sistema cromatográfico constituye el 50 % de la muestra presente en el convertidor. Este valor es inferior al 70 % que se considera típico para estos equipos actualmente (9).

En el secuenciador se utiliza una fuente de alimentación de 24 Vcd para la operación de las electroválvulas y la electrónica interna. Esta última comprende: los circuitos que reciben las señales de control del nivel "transistor-transistor-logic" (TTL) de la computadora y las acondicionan para manejar las electroválvulas; el circuito que detecta la ausencia de gas o de vacío, acciona la alarma sonora y se lo comunica a la computadora para que detenga el proceso; el circuito que controla el arranque y parada de la bomba de vacío; los acondicionadores de las señales de muestreo de las temperaturas del reactor y el convertidor y de accionamiento de los calefactores correspondientes; el detector ultrasónico de lazo lleno que controla la inyección y el manipulador de las bombas del sistema cromatográfico si éstas son de control analógico. Las bombas de control por comunicación serie son manejadas a través de dos puertos serie RS232 de la computadora.

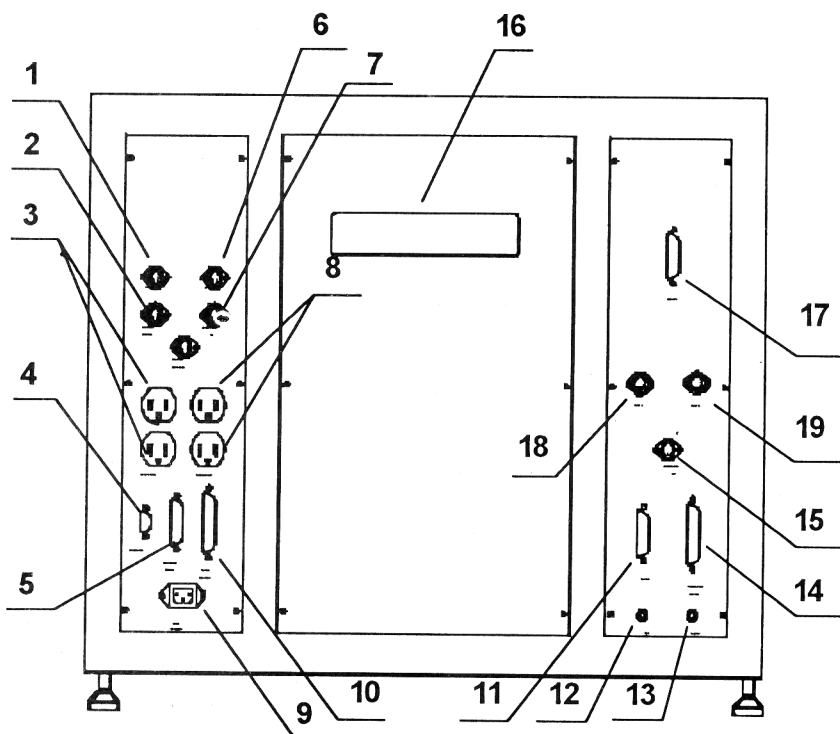


Figura 2. Vista posterior.

1. Conexión al lazo volumétrico
2. Control de la válvula de inyección
3. Alimentación del detector de UV
4. Conexión del integrador
5. Conexión de señales de alarma a la computadora
6. Autocero para el detector de UV
7. Entrada señal de absorbancia del detector de UV
8. Alimentación de la bomba de vacío
9. Conexión a la red de alimentación de CA
10. Control de válvulas
11. Control de temperatura
12. Entrada de argón
13. Entrada de vacío
14. Control de válvulas
15. Salida señal de absorbancia para la computadora
16. Trampa de humedad
17. Control de bombas y temperatura
18. Conexión de la bomba A
19. Conexión de la bomba B

Teniendo en cuenta los costos de los materiales necesarios para la construcción del equipo éste resultó de cinco a seis veces más económico que los secuenciadores comerciales, en el mismo año (en este valor de costo no está incluida la mano de obra calificada de la que fue necesario disponer). Por otra parte, la experiencia adquirida en este tipo de tecnología es ventajosa económicamente ya que permite enfrentar los servicios técnicos y de mantenimiento del equipo que son igualmente costosos cuando hay que contratarlos a las firmas comercializadoras.

7. Wittmann-Liebold B. En: Beers RF Jr, y Basset EG (eds.), *Polypeptide Hormones* 1980; 87-120.

8. Ashman K. The use of on-line high performance liquid chromatography for phenylthiohydantoin amino acid identification. En: Wittman-Liebold B, Salnikow J, y Erdmann VA (eds.), *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* 1986; cap 4:219.

9. Tempst P, Geromanos S, Elicone C, Erdjument-Bromage H. Improvements in microsequencer performance for low picomole sequence analysis. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1994; 6:248-261.

Programa elaborado para el manejo del secuenciador y el sistema de HPLC

Aunque existen programas que controlan sistemas similares al que describimos en este trabajo todos responden a la configuración del fabricante. Debido a esto fue necesario elaborar un programa que sincronizara el trabajo de todos los elementos (secuenciador, sistema de HPLC, adquisición de la señal de absorbancia y procesamiento de los cromatogramas) en tiempo real, manejados desde una computadora personal. Dicho programa fue confeccionado en el lenguaje Turbo Pascal versión 7.0. Su estructura es de forma jerárquica compuesta por un menú principal y submenús asociados al mismo.

Las funciones que realiza son las siguientes:

- editar y compilar los programas diseñados por el usuario para realizar la degradación de Edman según sus necesidades
- ejecutar los programas de usuario. Durante la ejecución el programa puede ser modificado por el usuario e interrumpido a voluntad
- brindar un conjunto de programas utilitarios para la comprobación y ajuste del secuenciador, cambio o llenado de los frascos de reactivos y solventes y lavado de las tuberías y cámaras
- permitir el control manual de las válvulas
- controlar las temperaturas del reactor y del convertidor, cuyos puntos de consigna son establecidos por el usuario
- controlar el encendido del detector de luz ultravioleta y su autocero
- controlar las bombas del sistema de HPLC de acuerdo al programa de gradiente seleccionado
- adquirir la señal de absorbancia ciclo a ciclo y almacenarla en el fichero seleccionado por el usuario
- procesar la señal adquirida, detectando e identificando los picos según los parámetros establecidos por el usuario y mostrando el cromatograma en la pantalla si se desea
- crear tablas de calibración y tablas de picos para la identificación
- procesar los cromatogramas, mostrando la sustracción de dos cromatogramas consecutivos y otras tareas
- seleccionar diferentes parámetros para la impresión de los cromatogramas y las sustracciones, así como la tabla de calibración y la tabla de picos identificados con los picomoles calculados

Simultáneamente con la operación del secuenciador, el usuario puede procesar cromatogramas de degradaciones anteriores que se encuentren almacenados en el disco. El operador puede utilizar el ratón o el teclado.

Para el control del secuenciador se utilizan en la computadora dos tarjetas de entrada/salida progra-

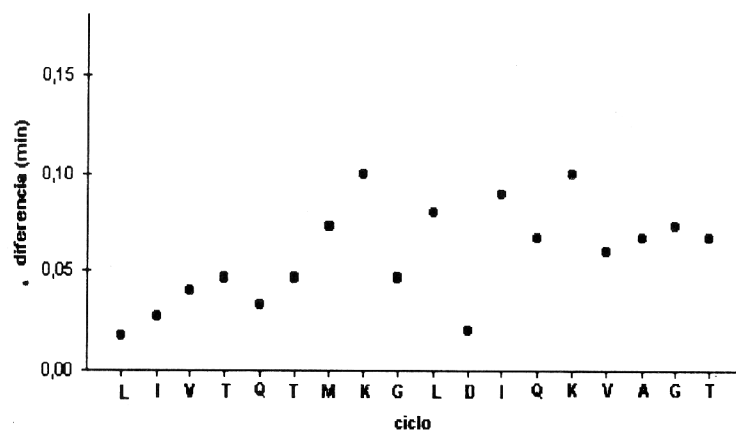


Figura 3. Diferencia de los tiempos de retención de los PTH-aminoácidos eluidos en cada ciclo, con su tiempo en el estándar. Los valores corresponden al promedio de cinco corridas de β -lactoglobulina b (200 pmol).

mables, cada una de 32 bits de entrada o de salida. La adquisición de la señal de absorbancia se realiza con una tarjeta que además puede controlar un registrador. El control de las temperaturas del reactor y del convertidor se ejecuta por un control tipo proporcional-integral-derivativo (PID), a través de una tarjeta analógica/digital de alta prestación Advantech Co. Ltd. (modelo PCL-818).

Control del sistema de HPLC

Para probar la efectividad de la dirección del sistema de HPLC se evaluó la repetibilidad de los tiempos de retención durante cinco corridas de β -lactoglobulina b (18 ciclos). La Figura 3 muestra una tendencia a aumentar la diferencia entre los tiempos de retención obtenidos y los del estándar. No obstante, pudimos comprobar que esta diferencia no llega a ser mayor de 0,15 min en el ciclo 60 por lo que es posible realizar la asignación de los residuos correspondientes sin ambigüedad. Los principales factores que originan este fenómeno son la diferencia de volatilidad existente entre los componentes del tampón A y la reproducibilidad de los flujos que es posible lograr en una separación por gradiente. Por tanto estas pequeñas variaciones en los tiempos de retención pueden considerarse un fenómeno inherente a la cromatografía y no un producto de la automatización de la inyección ni del control de las bombas de HPLC.

Parámetros de trabajo del equipo

En la Tabla 1 se muestran las entregas de reactivos y solventes que se realizan durante un ciclo de secuencia y el consumo por ciclo de los reactivos y solventes. Los valores obtenidos son comparables con los reportados para la versión compacta del secuenciador de fase gaseosa (3). El tiempo total del ciclo de 36 min y 33 s (Tabla 1) se encuentra en el

rango de los equipos actuales (25-50 min). Reducciones posteriores podrían realizarse utilizando variantes más rápidas de separación de los PTH-aminoácidos.

En los cromatogramas (Figura 4) se puede apreciar la elución de los principales subproductos de las reacciones, la dimetilfeniltiourea (DMPTU, pico 4) con 18 pmol en el ciclo 1 que disminuyen hasta 8 pmol en el ciclo 4, la difenilurea (DPTU, pico 5) con una disminución de 7 a 1,5 pmol y el éster metílico de la tianilina (ATM, pico 6) de 95 a 50 pmol. Ninguno de los tres coincide en la elución con los derivados de los aminoácidos más comunes en las proteínas. De las otras señales de fondo que se observan, la más significativa (pico 1) disminuye de 4 a 1 pmol y eluye muy cercano al PTH-aspartico, las señales restantes (picos 2, 3, 8 y 9) son de 1-2 pmol en el primer ciclo y llegan a desaparecer. El pico 2 puede obstaculizar la asignación de la asparagina en el primer ciclo si se trabaja en el orden de los 10 pmol de muestra.

Eficiencia de degradación

Durante la secuenciación de una proteína o péptido se suman diversos factores que provocan la caída de los rendimientos de un ciclo a otro. Entre ellos pueden citarse la pérdida de muestra durante los lavados para la extracción de los subproductos no volátiles, los propios rendimientos de las reacciones de acoplamiento y ruptura y otros dependientes de la secuencia aminoacídica de la muestra en estudio (1, 8, 9). La eficiencia de degradación de los secuenciadores automáticos se evalúa a través de sus rendimientos inicial y repetitivo. Pequeños aumentos en estos valores se traducen en un número considerable de residuos que se pueden identificar (1, 2). En los secuenciadores actuales el valor del RI oscila entre el 50-60 %, mientras que el RR se encuentra en el rango de 92-98 % (3, 8).

En la Tabla 2 mostramos el RR obtenido en cinco corridas de 200 pmol de la proteína estándar, β-lactoglobulina b. En el cálculo del RR se utilizan pares de aminoácidos con diferente comportamiento ante la química de los secuenciadores. Los valores alcanzados para el RR oscilan entre 94-98 % y para el RI entre 57-74 %.

Los grandes esfuerzos dedicados a reducir las cantidades de muestra requeridas para lograr la mayor cantidad de información posible han permitido que hoy se consideren de rutina secuencias con cantidades de muestra entre los 10 y los 100 pmol. Con estas cantidades de muestra se obtiene información para un mínimo de 10 ciclos (10). Para conocer la cantidad de residuos posibles a identificar con los rendimientos alcanzados, se realizaron corridas con distintas cantidades de muestra aplicada

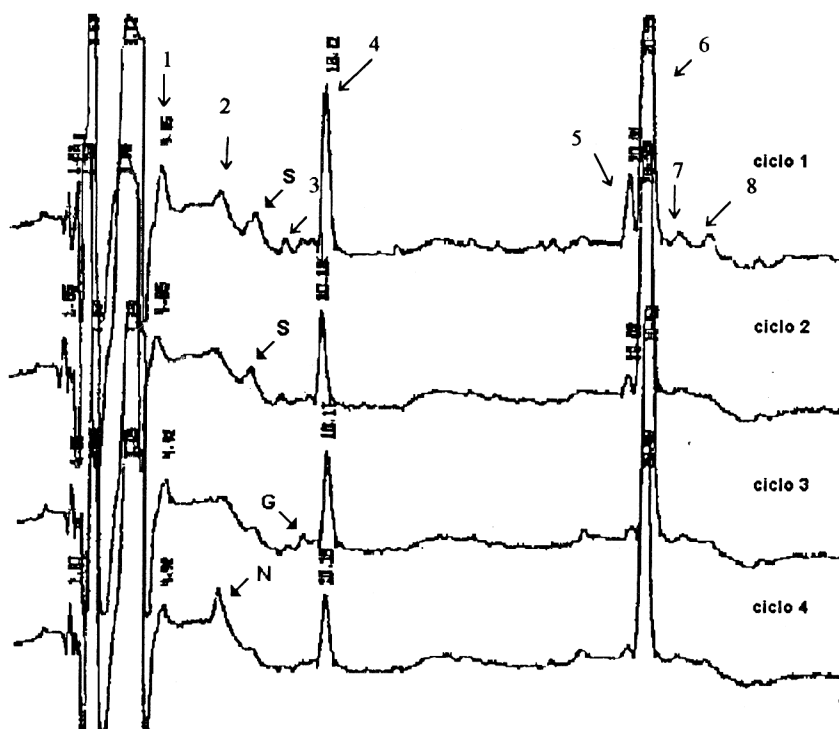


Figura 4. Cromatogramas obtenidos para los cuatro primeros ciclos de secuencia del péptido St2 (ver Figura 5). Se señalan los picos correspondientes a los principales subproductos de las reacciones: Dimetilfeniltiourea (pico 4), Difenilurea (pico 5), éster metílico de la tianilina (pico 6). Los picos 1, 2, 3, 7 y 8 corresponden a señales de fondo de productos no identificados.

al secuenciador. Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran un comportamiento similar al de los equipos comercializados hoy en día.

Secuenciación de péptidos

La Figura 5 muestra los rendimientos obtenidos en la secuenciación de péptidos de diferentes tamaños. Para el péptido St1 de 26 residuos se obtuvo información en 24 ciclos partiendo de 56 pmol identificados en el primer ciclo de secuencia. No se pudieron detectar la histidina del ciclo 16 y el triptófano del 17 debido a los bajos rendimientos que usualmente se logran con estos residuos. En el caso de la histidina se debe a la dificultad para extraer el derivado de ATZ de la membrana de PVDF por el solvente orgánico utilizado y en el del triptófano a que una parte considerable de este aminoácido se destruye durante las reacciones de derivatización.

10. Bailey JM. Chemical methods of protein sequence analysis. Journal of Chromatography A 1995;705:47-65.

Tabla 3. Valores promedios del número de residuos identificados para cada cantidad de muestra aplicada al secuenciador y su desviación estándar. Los números entre paréntesis indican la cantidad de corridas realizadas en cada caso.

Picomoles aplicados	Residuos identificados
200 (n = 4)	51 ± 5
100 (n = 2)	35 ± 1
50 (n = 2)	27 ± 2
20 (n = 3)	20 ± 4

Para el péptido St2, de 37 aminoácidos se obtuvo información de 19 residuos. En la Figura 4 se muestran los cuatro primeros ciclos de la secuencia de este péptido. Se detectaron 3 pmol en el primer ciclo por lo que considerando un rendimiento inicial promedio de 64 % (Tabla 2) se obtiene una cantidad aplicada al secuenciador de 10 pmol. No fue posible identificar el triptófano en el ciclo 18.

Secuenciación de proteínas transferidas a PVDF

Entre los métodos que más éxito han obtenido en el microaislamiento de proteínas para el análisis de secuencia se encuentran la separación en geles de poliacrilamida seguida de la transferencia de las bandas de proteínas a membranas de PVDF. Este procedimiento permite la secuenciación de unos pocos picomoles e incluso femtomoles de proteína. En la Figura 5 C se muestran los rendimientos alcanzados en la secuenciación de una proteína transferida. Para esa muestra se obtuvieron 30 ciclos de secuencia partiendo de 26 pmol, con un RR de 98 %.

Conclusiones

El primer criterio para evaluar la utilidad de un secuenciador de proteínas lo constituye el rendimiento de la degradación ciclo a ciclo. Esto determina la cantidad de información que será posible obtener a partir de la muestra aplicada. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el secuenciador de proteínas S6000 permite obtener información de secuencia de proteínas y péptidos con rendimientos repetitivos de 94-98 %. Lo anterior es válido tanto para muestras aplicadas en solución como para las transferidas a una membrana de PVDF. Las señales de fondo en los cromatogramas se encuentran en el orden de los 2-4 pmol en el primer ciclo de secuencia y menos de 1 pmol del ciclo 2 en adelante. El tiempo del ciclo obtenido es de 36 min 33 s.

El secuenciador y el sistema de HPLC son controlados mediante una computadora personal IBM compatible. Se desarrolló un programa que brinda numerosas facilidades de operación, permite la adquisición de la señal de absorbancia y el procesamiento de los cromatogramas.

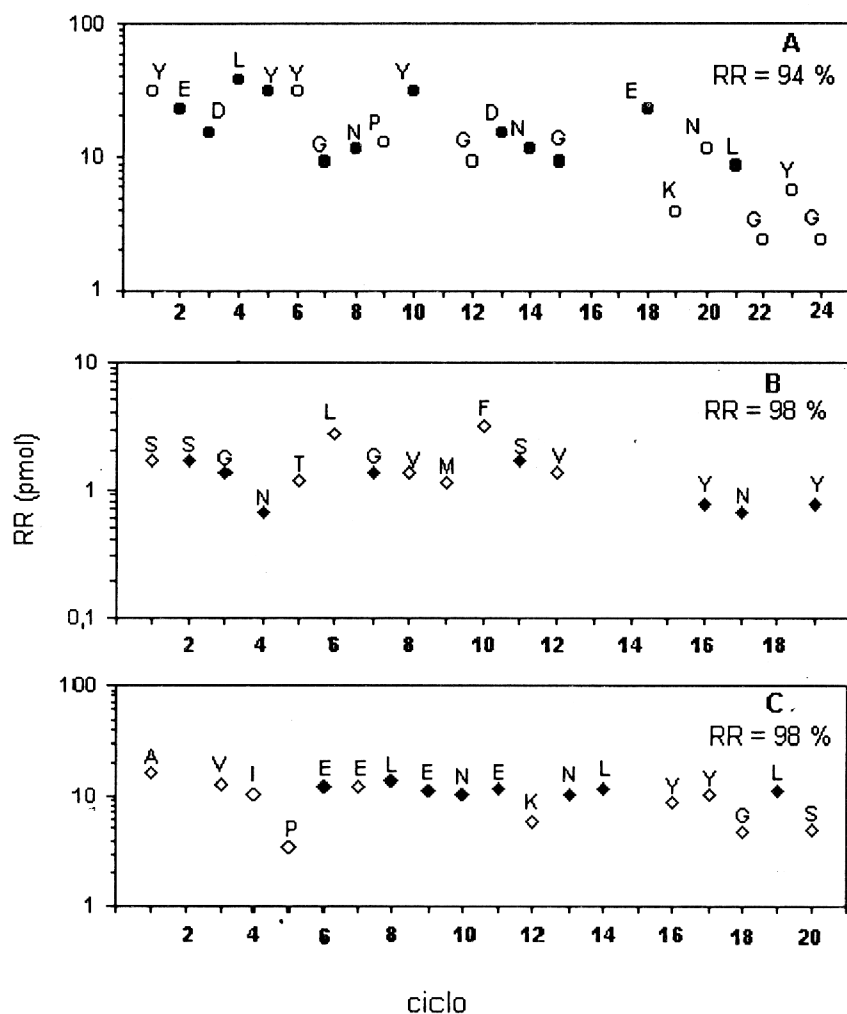


Figura 5. Rendimiento repetitivo obtenido en la secuenciación de A: St1 (RI = 56 pmol), B: St2 (RI = 3 pmol) (ver Figura 4) y C: proteína aislada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y transferida a PVDF (RI = 26 pmol). Las marcas destacadas en negrita señalan los pares de aminoácidos utilizados en el cálculo del RR.

El S6000 es compacto y robusto. Su construcción resulta económicamente ventajosa y el consumo de reactivos y solventes es comparable al de otros equipos descritos en la literatura (3).

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Carlos Fernández-Patrón por suministrarnos la membrana de PVDF con la proteína transferida.