

## MICROPURIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS ACTIVAS

Eugenio Hardy, Carlos Fernández-Patrón, Lila Castellanos-Serra,  
Elder Pupo y Ángela Sosa

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, La Habana 6, Cuba.  
E-mail: protchem@serverdos.cigb.edu.cu

### Introducción

Entre las más potentes técnicas analíticas y preparativas de biomoléculas se encuentran las basadas en la electroforesis de alta resolución en geles de agarosa o de poliacrilamida. Una vez efectuada la separación en un gel, las biomoléculas deben ser detectadas, de preferencia por métodos que conserven la integridad química, permitan altos recobrados y no interfieran con la actividad biológica. Tales técnicas deben ser simples, rápidas y aplicables a una amplia variedad de biomoléculas. Sin embargo, la mayoría de las técnicas actuales de detección no cumplen con todos estos requisitos de modo simultáneo. En adición, en el caso específico de las proteínas, aunque hoy en día es posible secuenciarlas y caracterizarlas a niveles picomolares (1) no existe un método de detección que permita estudiar la actividad biológica cuando sólo se dispone de muy pequeñas cantidades (p. ej., 1-5 picomoles) de material.

Nuestro grupo ha desarrollado un conjunto de técnicas que satisfacen los requerimientos mencionados anteriormente. Estas técnicas utilizan las sales de zinc e imidazol para la detección no destructiva y el recobrado cuantitativo de ácidos nucleicos, lipopolisacáridos (LPS) / lipooligosacáridos (LOS) y proteínas.

### Resultados y Discusión

#### Detección de ácidos nucleicos intactos

Las sales de zinc e imidazol permiten detectar a los ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida (3,5-20 %) como bandas transparentes (negativas) e incoloras, claramente visibles sobre el fondo del gel que aparece de color blanco, debido a la precipitación abundante del imidazolato de zinc (2). La sensibilidad del método es de 5-10 ng de ADN (0,1-6 kpb)/banda. Después de ser detectado, el ADN se puede eluir del gel, con alta eficiencia (85 % o más), mediante técnicas convencionales. Nosotros hemos demostrado que este tipo de tinción no causa modificaciones al ADN: cuando se reemplaza la detección estándar con bromuro de etidio seguido de iluminación a 302 nm (UV) por la nueva detección con zinc-imidazol, la frecuencia de transformación (colonias/μg de ADN) obtenida con fragmentos de ADN purificados electroforéticamente aumenta al menos 10 veces (2, 3). También hemos descrito (3)

un procedimiento nuevo para la visualización sensible de ácidos nucleicos intactos en geles de agarosa.

#### Detección de LPS/LOS en geles de poliacrilamida

Los LPS/LOS se pueden detectar en los geles de poliacrilamida con zinc-imidazol como típicas bandas de tinción negativa (4). La sensibilidad del método con los lipopolisacáridos rugosos de *N. meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *B. pertussis*, o los lisos de *E. coli* (cepas 0111:B4 y K-235) y *S. tiphimurium*, en geles de poliacrilamida de 1 mm de ancho, es de 1-5ng/banda. Estos valores son comparables a los obtenidos con el método convencional de plata (5). Al igual que los ácidos nucleicos, los LPS/LOS detectados con zinc-imidazol permanecen biológicamente activos. Esta es la primera tinción de LPS/LOS compatible con la determinación de su actividad biológica, y le confiere al método una ventaja considerable sobre la tinción con plata (5).

#### Un nuevo procedimiento de recobrado de proteínas en solución

El procedimiento (6, 7) consiste en la generación de partículas de gel de 32 μm mediante una jeringuilla (1 mL) de polipropileno que contiene dos membranas metálicas de 100 y 32 μm insertadas en su fondo. Las proteínas se eluyen por difusión pasiva, en 10 minutos con rendimientos del 85 % o en 20 minutos, con rendimientos de 91-98 % (en dependencia de su peso molecular), en un volumen mínimo de tampón (p. ej., de 100-150 μL para una banda que contenga 100 pMol de BSA). Con este procedimiento, pudimos demostrar y cuantificar el efecto de la reducción de las proteínas, antes de su separación por electroforesis, sobre la eficiencia de la elución. El procedimiento no requiere de equipamiento sofisticado y tiene notables ventajas sobre los métodos de electroelución convencional, principalmente cuando se dispone de cantidades picomolares de proteína.

#### Aplicación a la concentración en solución y la secuenciación de proteínas poco abundantes

Se demostró la aplicación de este procedimiento de elución a la purificación de nuevas proteínas naturales (6, 7). Además se desarrolló un nuevo proce-

1. LeGendre N, Matsudaira PT. Purification of proteins and peptide by SDS-PAGE. In: A practical guide to protein purification for microsequencing. Matsudaira, P. T. (ed.) Academic Press Inc 1993;49-69.

2. Hardy E et al. Electrophoresis 1996;17: 1537-1541.

3. Hardy E et al. Electrophoresis 1996;17: 26-29.

4. Hardy E et al. Anal Biochem 1997; 244: 28-32.

5. Tsai CM, Frasch CE. Anal Biochem 1982; 119:115-119.

6. Castellanos-Serra L et al. Electrophoresis 1996; 17:1564-1572.

7. Castellanos-Serra L et al. J Prot Chem 1997; en prensa.

dimiento cromatográfico para aplicar volúmenes relativamente grandes de solución (5-10 mL) a las membranas utilizadas para secuenciación automática de proteínas. Con las técnicas existentes normalmente no es posible aplicar volúmenes superiores a unas decenas de microlitros (1). Con este procedimiento es posible aplicar un volumen que va de pocos microlitros a varios mililitros lo que permite concentrar sobre una membrana grandes volúmenes de soluciones muy diluidas de proteína hasta acumular una cantidad suficiente de material para obtener una secuencia clara.

#### Recobrado en solución de proteínas biológicamente activas

Las proteínas separadas en geles que contienen SDS (la técnica más común de electroforesis) se desnaturalizan y pierden su actividad biológica. Recientemente hemos informado (8) un procedimiento que permite renaturalizar (ganar la actividad biológica) con Tritón X-100 las proteínas dentro del gel de

electroforesis, después de ser detectadas con imidazol-SDS-zinc (9) y a continuación, mediante la aplicación del nuevo procedimiento de elución (6, 7), recuperarlas rápidamente en solución y determinar su actividad biológica.

Los valores de actividad específica (UI/mg de proteína) recuperados con este procedimiento para tres proteínas recombinantes/estándar de muestras puras fueron:  $4,19 \times 10^4 / 5,35 \times 10^4$  (estreptocinasa),  $1,1 \times 10^8 / 2,3 \times 10^8$  (interferón humano- $\alpha 2b$ ), y  $3,0 \times 10^6 / 9,0 \times 10^6$  (interferón humano- $\gamma$ ). Como la eficiencia de reactivación de cualquier proteína en el gel depende en gran medida de su naturaleza, las condiciones específicas de renaturalización (p. ej., el tampón, el tiempo de incubación) se deben ajustar caso por caso.

Este nuevo conjunto de técnicas conecta las separaciones rutinarias en geles de electroforesis con las caracterizaciones estructurales y biológicas de muestras valiosas, de un modo más eficiente que los métodos convencionales de detección y de recuperación.

8. Hardy E *et al.* *Anal Biochem* 1996; 240:150-152.

9. Fernández-Patrón C *et al.* *Bio/Techniques* 1992; 12:564-573.



## VIII Feria Internacional del Libro Habana '98

Del 4 al 10 de febrero de 1998

### 8th International Book Fair Havana '98

From February 4<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup>, 1998

PABEXPO, Ciudad de La Habana, Cuba

# El espacio ideal para un encuentro con el libro científico

#### Comité Organizador/ Organizing Committee

##### Cámara Cubana del Libro

Calle 15 No. 604 entre B y C  
Vedado, CP 10400  
Ciudad de La Habana, Cuba.  
Tel: (53 7) 36 034/ 32 8829  
Fax: (53 7) 33 3441  
Telex: 511881 feria cu

##### Palacio de Convenciones

Ferías y Exposiciones  
Apartado 10046, Zona 16,  
Ciudad de La Habana, Cuba.  
Tel: (53 7) 215513  
Fax: (53 7) 219065  
Telex: 511392 pabex cu