

PURIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A₂ ACIDA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* UTILIZANDO EL SISTEMA CROMATOGRÁFICO AUTOMATIZADO DE PRESIÓN MEDIA NGC

Edwin Quispe, Andrés Agurto, Gustavo A. Sandoval, Fanny Lazo, Edith Rodriguez, Dan Vivas y Armando Yarleque

Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú

E-mail: edwin.quispe@unmsm.edu.pe

I. RESUMEN

El equipo de cromatografía automatizado de presión media -NGC, fue empleado para la purificación de una isoforma acida de la enzima fosfolipasa A₂ (Ba-Per-PLA_{2a}) como parte de la tesis de posgrado del Bach. Edwin Quispe Ceron con el título: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN DE UNA FOSFOLIPASA A₂ ACIDA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* “Jergon” Y SU RELACIÓN CON LA MIOTOXICIDAD, en la Maestría en Biología Molecular (FBC-UNMSM).

El empleo del equipo permitió la obtención de una proteína en su estado homogéneo. Se logró además la separación de contaminantes obteniéndose un mejor perfil cromatográfico a un flujo de 0.8 mL/min. Así, el empleo del sistema cromatográfico complementa nuestro procedimiento de separación de la enzima Ba-Per-PLA_{2a} hasta su estado homogéneo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

- Etanol al 20%
- Agua solo para equipos de cromatografía
- Buffer acetato de amonio 50mM pH 6.4 (esterilizado)
- Buffer acetato de amonio 50mM con NaCl 1.0M pH 6.4 (esterilizado)
- Tubos de colecta
- Colector de fracción Bio-Rad

- Sistema Cromatógrafo Automatizado de presión media- NGC (Bio-Rad)
- Sistema de computación.
- pH metro HANNA.
- Beackers

Metodologia:

- Se limpian las vías de flujo y bombas con etanol al 20% por 5 min aproximadamente, de modo que los restos de la corrida anterior se limpien. (inicio y al final).
- Se programa el equipo para la vía de flujo de desecho.
- Se eligió la resina ENrichQ como intercambiador aniónico.
- Se equilibró el sistema con el buffer de acetato de amonio 50 mM pH 6.4 y posteriormente con el mismo buffer conteniendo NaCl 1.0 (75%B)
- Tomar en cuenta que la cantidad de muestra puede ser hasta 30 mg en un volumen de 1 mL.
- Antes de aplicar la muestra verificar que no haya burbujas dentro del sistema (vías de flujo y bombas).
- Luego, se programó las condiciones de velocidad del flujo para el primer y segundo buffer.
- Cuando en la pantalla no muestra ningún pico de proteína, entonces estará limpia las vías de flujo y bomba.
- Por lo tanto, estará lista para inocular la muestra de un volumen de 1ml.

Mantenimiento:

- Normalmente al inicio el equipo se encuentra con etanol 20%.
- Luego, se hace una limpieza con agua de grado cromatográfico para retirar todo el etanol de (vías de flujo y válvulas).
- Después, se inicia la metodología descrito arriba.
- Cuando se termina el experimento se hace pasar agua por el equipo para quitar las sales ya que la permanencia de sales puede cristalizarse y ocasionar fracturas de las líneas y taponar las válvulas.
- Después, pasamos etanol al 20% por las vías de flujo y valvular.
- El equipo se queda con etanol 20%.

III. RESULTADOS

Se realizaron en los ensayos preliminares empleando el equipo con una resina de intercambio aniónico para separar a las proteínas según su carga. En la (Figura N° 1) muestra el perfil cromatográfico de la separación de 1 mg de muestra en 1 ml de volumen. Se observa, que la isoforma acida quedó retenida en la resina ENrichQ y cuando se aplicó el 100%B, entonces hay liberación de las proteínas de interés con algunos contaminantes. Tales picos, fueron evaluados sobre su actividad con yema de huevo y fosfatidilcolina para evidenciar que se trata de la isoforma acida de fosfolipasa A₂.

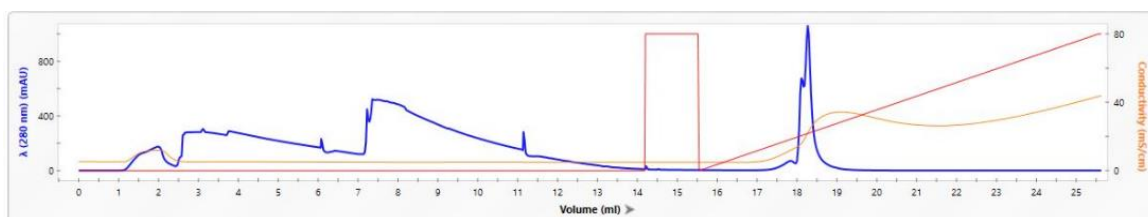


Figura N° 1. El flujo es de 1ml/min. La línea azul se muestra la absorbancia de la proteína. La línea naranja la conductividad y la línea roja el buffer con sal. En el isocrático muestra tres picos no uniformes, mientras que cuando se agrega el buffer con sal (0.1-1.0 M NaCl) se formó un pico bien definido con dos picos adyacentes.

En la Figura N° 2, se muestra una purificación con intercambio catiónico a un flujo de 2 mL/min, donde se observa que la fosfolipasa es eluída en el medio isocrático, ya que estas proteínas tienen carga negativa, por ello son liberadas en el medio isocrático, en tanto que durante la gradiente de sal (NaCl) no libero nada de proteínas.

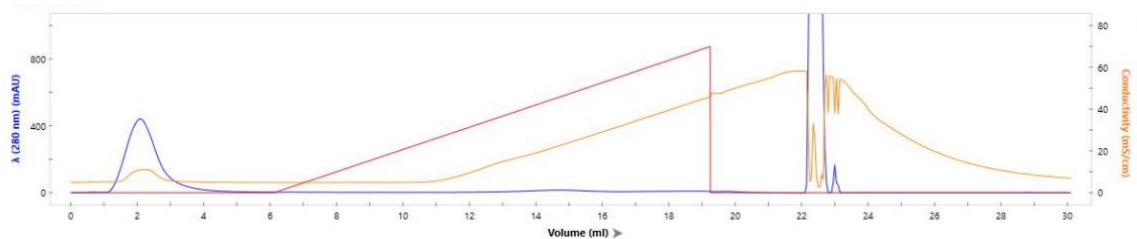


Figura N°2. Se probó a un flujo de 2 mL/min. La resina fue de intercambio cationico. La línea azul se muestra la absorbancia de la proteína. La línea naranja la conductividad y la línea roja el buffer con sal. En el isocratico se muestra un solo pico uniformes con una base pronunciada, mientras que cuando se agrega el buffer con sal con una gradiente de (0.1-1.0 M NaCl) no se liberó proteína.

Por otro lado, en la Figura N°3, se observa un aislamiento con mejor perfil cromatográfico donde se cargó 1.5 mg de muestra y se colectó 0.275 mg de enzima purificada. Se corrió a un flujo mucho más lento (0.8 mL/min) y se colectó a un volumen de 0.5 mL con el objeto de separar a otras posibles isoformas de fosfolipasa A₂ acidas. Se muestra después de programar el equipo en gradiente de sal (0.1-1.0 M NaCl), la formación de tres picos bien separados, lo cual indica el aislamiento de la proteína de interés.

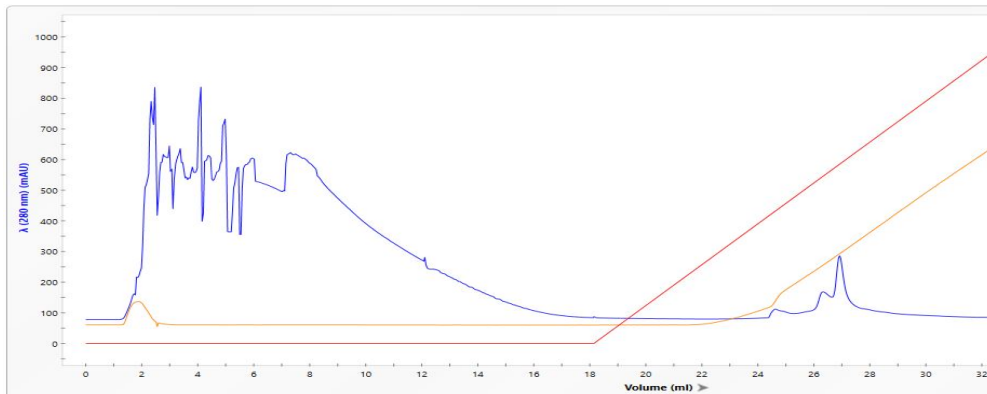


Figura N°3. Se un flujo de 0.8 mL/min. La línea azul se muestra la absorbancia de la proteína. La línea naranja la conductividad y la línea roja el buffer con sal. En el isocrático muestra un solo pico pequeño con interferencias de burbujas, mientras que cuando se agrega el buffer con sal (0.1-1.0 M NaCl) se formó tres picos bien definidos y separados.

IV. CONCLUSIONES

- Se purificó una cantidad de 0.275 mg de proteína pura a partir de una muestra de 1 mg.
- Empleando un flujo de 0.8 mL/min se obtiene una mejor separación de las proteínas.
- Se purificó la isoforma fosfolipasa A₂ acida en su estado homogéneo de 14.5kDa empleando el sistema cromatográfico como un tercer paso de purificación.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.bio-rad.com/es-pe/product/ngc-100-medium-pressure-chromatography-systems?ID=N1KHM04VY>
2. Ph.Dr. Carlo Bravo. Conferencia y capacitación con el equipo Cromatográfico automatizado de presión media -NGC (BIO-RAD). 2019-UNMSM.