

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS

1. MATERIAL VEGETAL

1.1. *Araujia angustifolia* (Hook. et Arn.) Decaisne.



Los frutos fueron obtenidos de plantas crecidas en la localidad de M. B. Gonnet, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La planta es una enredadera con hojas angostas, triangulares o lanceoladas, hastadas o sagitadas, con diminutas glándulas en la base y ápice del pecíolo. Presenta inflorescencias generalmente bifloras o de flores solitarias pubescentes, grandes, blanco-amarillentas.

Cáliz glanduloso, de lacinias ovadas agudas finamente pubescentes en ambas caras. Corola blanca pubérula en la superficie externa de tubo campanulado y lóbulos reflejos.

Corona de lóbulos anchos y carnosos de bordes algo lobulado, barbados en la cara interna. Ginostegio sésil. Anteras cartilaginosas subromboidales con membrana apical triangular, retináculo elipsoide con membrana apical oblonga de color café, caudículas descendentes, polineos ovoides. Apéndice estigmático totalmente exerto, grueso, subovoide, de superficie suavemente rugosa partido en el ápice. Folículos fusiformes acuminados con pubérulos, lisos. Semillas de contorno ovado oblongo, verruculosas (Burkart, 1979).

1.2. *Araujia hortorum* Fourn.



Los frutos fueron obtenidos de plantas crecidas en la localidad de Ringuelet, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La planta es una enredadera con hojas ovado triangulares, pecioladas, obtusas en la base, enteras, discolores, glabras en el haz y albo-tomentosas en el envés, de 4-9 cm de longitud. Flores de corola color blanco o rosado de 15 mm de largo, retináculo con apéndice membranáceo en

la parte superior, tubo de la corona soldado a la corola. Los frutos, son folículos ovoideos de 14 cm de longitud, verdes, lisos y glabros (Dimitri, 1972).

Ambas especies son autóctonas y se las conoce con los nombres vulgares de “tasi” o “doca”. Ejemplares de estas especies se encuentran depositados en el herbario de Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina (LPE).

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

2.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas

El látex de las dos especies estudiadas se obtuvo practicando incisiones superficiales en los frutos objetos de estudio y fue colectado de dos maneras, resultando dos suspensiones:

- 1) en buffer cítrico-citrato 50 mM de pH 4,5
- 2) en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,4

En ambos casos con el agregado de EDTA y cisteína 5mM. El EDTA es necesario para impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo (Anderson, 1968) y la cisteína para mantener el medio reductor, evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas. Los valores de pH utilizados son lo suficientemente alejados del pH óptimo a fin de minimizar la autodigestión durante los procesos de extracción enzimática.

La suspensión 1) fue centrifugada diferencialmente a 8.000 rpm durante 30 min y a 13.000 rpm por espacio de 45 min a 4°C en una centrífuga refrigerada.

La suspensión 2) fue centrifugada diferencialmente a 5.000 rpm durante 30 min a 4°C y luego ultracentrifugada a 65.000 rpm en una ultracentrífuga.

Los sobrenadantes resultantes, conteniendo las proteínas de interés, fueron denominados "*extractos crudos*" (EC). Los mismos se fraccionaron y conservaron a -20°C o se liofilizaron hasta el momento de ser utilizados en estudios posteriores.

En ambos casos se obtuvo una preparación clarificada libre de gomas y materiales vegetales insolubles presentes en el látex que pudieran interferir en el posterior estudio enzimático.

2.2. Determinación del contenido de proteínas

2.2.1. Método de Bradford

Para determinar la concentración de proteínas de los extractos crudos se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método es aconsejado para

extractos vegetales que suelen contener sustancias fenólicas, permitiendo la valoración de proteínas sin que esas sustancias interfieran, tal como sucede cuando se utiliza el clásico método de Lowry (Peterson, 1979), donde estos compuestos fenólicos modifican los valores de absorbancia).

El mecanismo implica la unión del colorante Coomassie brilliant blue G-250 a las proteínas, unión que produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína), por lo que las lecturas se realizan a esta última longitud de onda. Se utiliza albúmina bovina como proteína patrón.

2.2.1.1. Ensayo estándar

Se mezclaron 50 µl de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 min se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 100-1000 µg de proteína/ml.

2.2.1.2. Microensayo

Se mezclaron 250 µl de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 10-100 µg de proteína/ml.

Tanto los ensayos con las muestras problema como los respectivos blancos de reactivos se realizaron por triplicado. Para las curvas de calibración se utilizó seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Co) en el rango de 0,1 a 1 mg/ml para el ensayo estándar y entre 5 y 100 µg/ml para el microensayo.

2.2.2. Medida de la absorbancia directa a 280 nm

El contenido de proteínas en los eluatos de las cromatografías realizadas fue estimado por medida de la absorbancia a 280 nm.

2.2.3. Método de Biuret

Este método permite verificar la presencia y cantidad de proteínas o péptidos utilizando Cu^{++} en medio alcalino produciendo una coloración

violácea por formación de un complejo de coordinación entre el Cu^{++} y los pares electrónicos libres de los nitrógenos de los grupos imino de la unión peptídica. Son necesarias por lo menos dos uniones peptídicas para que tenga lugar la reacción. Dado que la reacción del biuret no es una específica para proteínas, un resultado positivo con este reactivo debe ser cuidadosamente evaluado para descartar los resultados falsos positivos.

El blanco de reacción se realizó utilizando agua en lugar de solución enzimática. Se mezclaron 0,5 ml de solución enzimática con 10 gotas de HONa 10% más una gota de SO_4Cu_2 al 1% en un tubo de ensayo

2.3. Ensayos de actividad hidrolítica

2.3.1. Actividad esterolítica

La actividad endoesterolítica se determinó utilizando los derivados N- α -carbобензохи-*p*-nitro fenil ésteres de aminoácidos (N-CBZ-aa, Sigma Chem. Co.). Estos sustratos se utilizan debido a que tienen bloqueados tanto el grupo α -NH₂ como el α -COOH del resto aminoacídico (en el último caso con un grupo cromóforo), lo que permite determinar la actividad endoesterásica relativa respecto al aminoácido que aporta el grupo carboxilo (Silverstein, 1974). La actividad de las preparaciones enzimáticas fue ensayada sobre los derivados de los siguientes aminoácidos: L-alanina, ácido L-aspartico, L-prolina, L-glutamina, L-isoleucina, L-asparagina, L-fenilalanina, glicina, L-leucina, L-lisina, L-tirosina, L-triptófano y L-valina. La mezcla de reacción contiene 1,8 ml de buffer Tris HCl 0,1 M de pH 8,0, 0,1 ml de solución de sustrato 1 mM en acetonitrilo y 0,1 ml del extracto crudo correspondiente. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C. La absorbancia del *p*-nitrofenolato liberado por las enzimas fue monitoreada en un espectrofotómetro Agilent 8453 E UV-visible a 405 nm durante 2 minutos en intervalos de cinco segundos. En cada caso la hidrólisis no enzimática correspondiente a cada uno de los sustratos se determinó reemplazando la solución de enzima por 0,1 ml del buffer. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

La unidad enzimática (Ucbz) fue definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de *p*-nitrofenolato por minuto a 37°C y pH 8,0. Para calcular los micromoles de *p*-nitrofenolato producidos en la reacción se confeccionó una curva patrón utilizando este reactivo en el rango de 5 a 50 µM.

2.3.2. Actividad amidásica

Se utilizó L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) 4 mM como sustrato, en buffer fosfatos 0,1M de pH 6,5, conteniendo KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: a 180 µl de sustrato se le adicionó 1,5 ml de buffer, se homogeneizó, se agregaron 120 µl de enzima y se mezcló por inversión de la cubeta. Posteriormente se leyó la absorbancia a 410 nm en forma continua cada 5 segundos durante 2 minutos (Filippova *et al.*, 1984, Morcelle *et al.*, 2004). El blanco de reacción se realizó de la misma manera, pero agregando buffer en lugar de enzima. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad enzimática se expresó en unidades PFLNA, definidas como la cantidad de enzima que libera un micromol de *p*-nitroanilina por minuto en las condiciones del ensayo.

2.3.3. Actividad pectinmetilesterasa

El fundamento de esta reacción se basa en la capacidad de gelificar que tiene la pectina en presencia de Cl₂Ca luego de ser sometida a una hidrólisis enzimática de los estéres métilicos de los ácidos glucurónicos. El Ca⁺⁺ forma puentes iónicos con los grupos carboxilatos libres de los ácidos glucurónicos y se forma el gel.

Se usó pectina al 1% en buffer cítrico fosfato 55mM de pH 6,8 conteniendo CaCl₂ 0,02M. La mezcla de reacción consistió en 600 µl de esta suspensión y 300 µl de extracto crudo, que se incubó a 37°C hasta aparición del gel. Los resultados se informan como actividad detectable (+) o no detectable (-) (Highley, 1997).

2.3.4. Actividades carboximetilcelulasa, poligalacturonidas y xilanas

Para verificar la existencia de estas actividades enzimáticas (Highley, 1997) se utilizaron los siguientes sustratos: carboximetilcelulosa al 1%, ácido poligalacturónico al 1% y xilano al 1%, en buffer cítrico fosfato 0,1 M, pH 5. Se dejó reaccionar 1 hora a 37°C. Los productos liberados, azúcares reductores, se evaluaron siguiendo el método de Somogy Nelson (Nelson, 1944; Somogy, 1952).

2.3.5. Actividad ramnogalacturonidasa

Para medir esta actividad se utilizó como sustrato ácido ramnogalacturónico al 0,5% en buffer acético-acetato 50 mM, pH 4,5. El ensayo se realizó en placas de Petri conteniendo el sustrato gelificado sobre el cual se deposita la muestra a ensayar. Se incubó 4 h a 37°C y la actividad enzimática se detecta como un halo blanco sobre la superficie del gel por el agregado de rojo de rutenio el que se une al sustrato no hidrolizado (Highley, 1997).

2.3.6. Actividad peptidásica

Los ensayos de actividad proteolítica fueron realizados utilizando caseína tipo Hammarsten (Research Organics, Cleveland, OH) como sustrato. Las soluciones para los ensayos de actividad caseinolítica se prepararon como se indica a continuación:

Solución de caseína al 1 % (p/V): se dispersa 1g de caseína en un Erlenmeyer en 80 ml de solución buffer Tris 0,05 M, pH 8,0. Se coloca el recipiente en baño de María con agua hirviendo por 20 minutos, con agitación ocasional, hasta disolución completa de la caseína. Se filtra y se deja enfriar. Se adicionan 88 mg de L cisteína (5 mM) y 186 mg de EDTA 5 mM). Se ajusta el pH con solución de hidróxido de sodio 1 M para alcalinizar, o con solución de ácido clorhídrico 6 M para acidificar. Se transfiere a un matraz aforado de 100 ml y se completa el volumen con solución buffer Tris 5 M, pH 8,0.

Solución de ácido tricloroacético 5 % (p/V): se colocan 5 ml de solución acuosa saturada de ácido tricloroacético (TCA) 100 % en un vaso de precipitado de 50 ml. Se añaden aproximadamente 30 ml de agua destilada y se homogeniza. Se transfiere a un matraz aforado de 100 ml y se completa el volumen con agua destilada.

Ensayo de actividad caseinolítica: se mezclan 100 µl de solución enzimática y 1,1 ml del sustrato de caseína al 1 % en un tubo de ensayo colocado en un baño termostatzado a 37 °C. La reacción se corta por el agregado de 1,8 ml de TCA al 5 %, los tubos se conservan en frío 30 minutos para lograr una mejor precipitación del sustrato no hidrolizado. Luego son centrifugados a 5.000 rpm durante 20 minutos y se mide la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm (A₂₈₀). Cada ensayo se realizó por quintuplicado.

Para cada experimento se preparó el correspondiente blanco, mezclando 0,1 ml de solución enzimática, 1,8 ml de TCA al 5 % y 1,1 ml caseína al 1 %, en ese orden. De esta manera se asegura la inhibición de la enzima antes del agregado del sustrato. Los blancos se realizaron por triplicado.

Cálculo de la actividad caseinolítica: La actividad proteolítica se determinó según la ecuación:

$$Ucas = \frac{A_{280}}{t \times V} \times Fd$$

donde Ucas (unidad de actividad caseinolítica) se define como la variación en unidades de absorbancia que produce 1 ml de solución enzimática, debido a los productos de digestión de la caseína solubles en ácido tricloroacético al 5 % (m/V), por minuto, a 37 °C en el buffer de reacción al pH indicado (Priolo *et al.*, 1991).

t = tiempo de duración del ensayo de actividad en minutos.

V = volumen de la solución enzimática ensayada en ml.

Fd = factor de dilución de la solución enzimática.

2.3.7. Actividad carboxipeptidásica

Para el ensayo de actividad carboxipeptidásica se añadieron 25 μ l de EC en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico conteniendo 2 ml de buffer de reacción (Tris-HCl 0,05 M con NaCl 0,1 M de pH 7,5) y 10 μ l de solución de sustrato 10 mM [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] disuelto en DMSO. La actividad fue registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm. Se utilizó como control positivo carboxipeptidasa A bovina (Sigma) y en el blanco se reemplazó el EC por buffer (Trejo, 2005).

2.3.7.1. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa a (CPA)

Para este ensayo se utilizó el protocolo descrito en el paso anterior. La actividad inhibitoria del extracto ensayado se manifiesta por una disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción, que se corresponde con una disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato. Cabe mencionar que el EC empleado en este ensayo fue previamente inhibido (ECi) con ácido iodoacético para evitar que la proteasa cisteínica presente en el mismo degrade a la CPA y por ello disminuya su actividad

Se siguieron dos procedimientos diferentes para poner en evidencia la inhibición:

- *Sin preincubación del extracto y la enzima*

Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5 2000 μ l

Solución de CPA bovina (Sigma) 10 μ g/ml 7 μ l

Solución de sustrato 10 mM 10 μ l

Luego de 40 s de iniciada la reacción se agrega la muestra (ECi) 50 μ l

- *Con preincubación del extracto y la enzima*

Muestra (EPPi) 50 μ l

Solución de CPA bovina (Sigma) 10 μ g/ml 7 μ l

Incubar durante 6 min a 37 °C

Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M pH 7,5 2000 μ l

Solución de sustrato 10 mM 10 μ l

En ambos casos la reacción fue monitoreada por medidas continuas de absorbancia durante 6 min. En los blancos el EC fue reemplazado por buffer (Trejo, 2005).

2.4. Caracterización de los extractos crudos (EC)

2.4.1. Perfil de pH de la actividad proteolítica

El efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto crudo fue evaluada utilizando caseína como sustrato (rango de pH entre 6,4 y 10, 5) disuelta en buffers de Good de concentración 10 mM (Good & Izawa, 1972).

La naturaleza de los buffers de Good los hace particularmente convenientes para aplicaciones biológicas debido a que su capacidad reguladora es independiente de la temperatura y la concentración. Esto asegura que en el experimento observamos esencialmente las variaciones causadas por los cambios de pH.

Se preparó un buffer de Good stock 50 mM mezclando las siguientes cantidades:

1,3265 g de TAPS (M = 265,3).

1,2462 g de AMPSO (M = 249,3).

1,156 g de MOPS (M = 231,2).

1,1065 g de CAPS disuelto en la menor cantidad posible de NaOH 0,1 M

1,0860 g de MES (217,2).

Agua destilada, c.s.p. 100 mL.

Se preparó el sustrato de caseína al 1 % en buffer de Good a pH; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 y 11,0.

2.4.2. Efecto de inhibidores

La acción de inhibidores de cisteín proteasas (Salvesen & Nagase, 2001) fue evaluada incubando el extracto crudo durante 15 y 30 min a 37 °C con iodoacetato de sodio 50 mM y E-64 15µM y también con HgCl₂ (inhibidor reversible) durante 10 y 30 min a 45°C .La actividad caseinolítica residual

después de cada tiempo de incubación fue medida utilizando caseína como sustrato según lo indicado anteriormente.

Las preparaciones enzimáticas para el ensayo se elaboraron agregando al extracto crudo agua destilada y soluciones stock de los inhibidores en las proporciones adecuadas a la concentración de enzima:

Enzima (aproximada, suponiendo su masa molecular 25 kD): 0,025 μ M.

E- 64: 0; 0,455 μ M; 1,364 μ M y 2,273 μ M.

Ácido iodoacético: 0; 0,455 mM; 1,364 mM y 2,273 mM.

Cloruro de mercurio: 0; 0,1 mM; 0,2 mM y 0,4 mM.

Se incubaron durante 30 min a 20 °C. La actividad caseinolítica residual se determinó a la solución incubada de enzima e inhibidor con el agregado de Cys 14 mM.

2.4.3. Efecto térmico o calor de inactivación

Las curvas de progreso de la reacción para diferentes temperaturas (37 °C, 45 °C, 50 °C, and 60 °C) fueron hechas midiendo la actividad caseinolítica del extracto crudo a 5, 10, 15, 20 y 30 min para cada una de las temperaturas indicadas (Dixon & Webb, 1979).

2.4.4. Estabilidad térmica

Para determinar el efecto de la temperatura las muestras fueron mantenidas por 0, 5, 10, 15, 20, y 30 minutos a 37, 45, 50, y 60 °C y luego se midió la actividad caseinolítica residual como se mencionó anteriormente.

La preparación enzimática para el ensayo se elaboró tomando 5 ml de EC en un matraz aforado de 25 mL y enrasando con solución buffer Tris 0,05 mol/L, pH 8,5.

Se tomaron alícuotas de 100 μ L y se incuban durante 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos a 25, 37, 45, 55, 65 y 75 °C. Finalizado el período de incubación, las muestras se colocaron en un baño de hielo hasta medir la actividad caseinolítica residual. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado y el ensayo repitió dos veces.

2.5. Análisis Electroforético

2.5.1. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

2.5.1.1. Tipos de SDS PAGE utilizados

2.5.1.1.1. Electroforesis con Tris-glicina

Esta técnica es la clásica electroforesis discontinua, desnaturalizante y reductora de Laemmli (1970), conocida como SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Se usaron geles de poliacrilamida 12,5 % m/v. La corriente se mantuvo constante en 40 mA durante el stacking y luego se incrementó a 60 mA, manteniéndose constante durante 40 min.

Preparación de las muestras

En un primer paso las muestras se concentraron por precipitación con tres volúmenes de acetona fría (-20 °C), redisolviendo los precipitados en un volumen de buffer de muestra, de modo de obtener una concentración final de proteínas de 1-10 µg/µl. En el caso de muestras con actividad enzimática se agregó ácido iodoacético 5 mM para evitar su autodegradación. Para ello se tomaron 250 µl de muestra y se las incubó con 25 µl de iodoacetato de sodio 50mM en baño de hielo durante 30 min.

Buffer de muestra	
Tris	1,57 g
SDS	2 g
Mercaptoetanol	5 ml
Glicerol	8 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
Agua destilada c.s.p.	100 ml

En un segundo paso, las muestras fueron llevadas a ebullición durante 5 min y centrifugadas a 16.000 g. Los sobrenadantes obtenidos constituyen las muestras a sembrar.

Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad. La composición de los sistemas buffer y de los geles se indican a continuación.

Buffer de resolución	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 8,8
AD, c.s.p.	100 ml

Buffer de stacking	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 6,8
AD, c.s.p.	100 ml

Gel de resolución (12,5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS 10%	100 µl
AD	4,39 ml
Persulfato de amonio (PSA) 5%	105 µl
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	5 µl
Volumen final	10 ml

Gel de stacking (5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer de stacking	0,87 ml
SDS 10%	70 µl
AD	4,79 ml
PSA 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	7 ml

En primer lugar se colocaron 5 ml de la mezcla del gel de resolución en cada placa y se dejaron polimerizar sin mover el formador de geles. Sobre la mezcla del gel de resolución se colocaron 100 µl de n-butanol para alinear la interfase en contacto con el aire y facilitar la visualización de la polimerización. Luego de la polimerización se retiró el alcohol, se lavó la superficie con agua y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación se colocó la mezcla del gel de apilamiento y de inmediato los peines.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton de 25 µl de capacidad. Los volúmenes de siembra fueron de 5 µl para los patrones de peso molecular. En el caso de las muestras, se calculó el volumen necesario para sembrar entre 10 y 20 µg de proteína por calle (volumen máximo 20 µl). Los patrones de PM (Bio-Rad) utilizados fueron: fosforilasa b (97,4 kD), seroalbúmina (66,2 kD), ovalbúmina (45 kD), anhidrasa carbónica (31 kD), inhibidor de tripsina (21,5 kD) y lisozima (14,4 kD).

Los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III, Bio-Rad se llenaron con buffer de reservorio.

Buffer de reservorio	
Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
AD, c.s.p.	1000 ml

La electroforesis se desarrolló empleando una intensidad constante de 30 mA durante el apilado y de 60 mA hasta la finalización de la corrida (llegada del colorante al borde inferior del gel).

2.5.1.1.2. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina

Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kD, fue utilizado en primera instancia por Shägger & von Jagow (1987) y tiene la particularidad de usar dos buffers distintos. Un buffer catódico de tricina y un buffer anódico de Tris-HCl. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Laemmli, 1970). Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kD, con un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C) y un gel de resolución (16,5% T y 6% C). En algunos casos se utilizó un gel espaciador (10%T, 3%C).

Otra ventaja de este sistema, si se lo desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias que ocurrirían en el curso del mencionado procedimiento.

Se usaron marcadores de peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio Rad) para estimar los pesos de los diferentes componentes.

Preparación de las muestras

Los precipitados acetónicos se redisolviaron en buffer de muestra para electroforesis. Se llevaron a ebullición durante 5 min y se centrifugaron durante 10 min a 9.000 rpm.

Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad. La composición de los buffers y de los geles se indican a continuación:

Buffer del gel	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,45
AD, c.s.p.	100 ml

Reactivos	Gel de Stacking (4%T, 3%C)	Gel Espaciador	Gel de Resolución
		(10%T, 3%C)	(16,5%T, 6%C)
Acril-Bis (48:1,5)	0,4 ml	2 ml	
Acril-Bis (46,5:3)			3,3 ml
Buffer del gel	1,25 ml	3,3 ml	3,3 ml
AD	3,4 ml	4,7 ml	3,4 ml
PSA 10%	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron como se indicó anteriormente.

En los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III, Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Buffer anódico	
Tris	24,2 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,9
AD, c.s.p	1000 ml

Buffer catódico	
Tris	12,1 g
Tricina	17,9 g
SDS	1 g
AD, c.s.p	1000 ml

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, aumentando progresivamente el voltaje cada 10 s al ingresar las proteínas al gel espaciador hasta llegar a 100 V, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

2.5.1.1.3. Electroforesis en gradiente de poliacrilamida

Los gradientes de poliacrilamida (Hames, 1996) se obtuvieron mezclando cantidades iguales (2,2 ml) de las dos soluciones de poliacrilamida que definen los extremos del gradiente, utilizando para ello un formador de gradientes (modelo 385, Bio-Rad) colocado sobre un agitador y adosado al mismo una bomba peristáltica (modelo P-1, GE HealthCare, Biosciences). En los geles resultantes la concentración de poliacrilamida se incrementa en forma lineal desde la zona de siembra hacia el fondo de la placa.

Preparación de los geles

Las soluciones de poliacrilamida utilizadas para la obtención de los geles en gradiente se prepararon de acuerdo a las fórmulas que se indican a

continuación (las cantidades consignadas son las necesarias para preparar dos placas). El buffer de resolución empleado para preparar el gel fue Tris-HCl 3 M de pH 8,8.

Solución A	
Sacarosa	0,9 g
Buffer de resolución	0,75 ml
AD	1 ml

Gel de resolución	5%	20%
Acril-Bis (30:0,8)	1 ml	4 ml
Buffer de resolución	0,75 ml	-----
Solución A	-----	2 ml
AD	4,25 ml	-----
Tomar 2,7 ml y agregar:		
TEMED	5 µl	5 µl
PSA al 5%	12 µl	12 µl

Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 80 min a corriente constante (40 mA), empleando como buffer de reservorio buffer Tris 0,05 M - glicina 0,384 M con SDS 1% (Hashimoto *et al.*, 1983) de pH 8,5.

2.5.1.2. Fijación y Tinción

2.5.1.2.1 Tinción con Coomassie brilliant blue R-250

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos por inmersión en solución colorante durante 2 h. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

Solución colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie brilliant blue R-250	100 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	34 ml
AD, c.s.p.	100 ml

2.5.1.2.2 Tinción con Coomassie coloidal

La tinción de proteínas por éste método (Neuhoff *et. al.*, 1988) provee niveles de detección en el orden de los ng (permite detectar al cabo de una hora cantidades menores a 100 ng de seroalbúmina bovina). Las condiciones del medio en el que se encuentra el colorante (alta concentración salina en un medio acuoso-metanólico) le confiere un carácter coloidal que reduce en gran medida la coloración inespecífica de fondo (background) debido a un efecto hidrofóbico que al mismo tiempo hace aumentar su afinidad por las proteínas fijadas en el gel.

Solución colorante	
Sulfato de amonio	17 gr
Acido acético glacial	500 µl
Metanol	34 ml
Coomassie brilliant blue G-250	0,1 g
AD, c.s.p.	100 ml

2.5.1.2.3 Tinción con plata

En los casos en que fue necesario se coloreó mediante la tinción de plata, que alcanza una sensibilidad hasta 100 veces mayor que la tinción de Coomassie brilliant blue R-250 (Hames, 1996).

Para realizar esta coloración se siguió el método de O'Connell y Stults (1997), basado en la unión de los iones plata a las proteínas y su posterior reducción; la propiedad del tiosulfato de formar complejos solubles de plata permite eliminar luego el background producido por precipitación de sales insolubles.

Fijación

Las proteínas fueron fijadas por inmersión de los geles en solución fijadora durante 30 min, repitiendo la operación 3 veces; este procedimiento previene la difusión de las proteínas y remueve sustancias interferentes.

Solución fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	30 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Lavado y sensibilización de los geles

Luego de la fijación, los geles fueron lavados con etanol al 20% (10 min) y luego con AD (10 min) para eliminar el ácido acético, cuya acidez interfiere en la siguiente etapa. Posteriormente, y con el fin de sensibilizarlos, fueron sumergidos en una solución de tiosulfato de sodio (0,2 g/l) durante un min. El exceso de tiosulfato fue removido mediante dos lavados sucesivos con AD.

Tratamiento con plata

Los geles previamente sensibilizados fueron sumergidos en una solución de AgNO₃ (2,0 g/l) y se mantuvieron en oscuridad durante 30 min.

Posteriormente fueron lavados con AD 5 veces durante 10 s cada vez para remover el AgNO_3 en exceso.

Desarrollo de la coloración

Los geles se sumergieron en la solución de desarrollo hasta que no se observó la aparición de nuevas bandas, evitando la sobrecoloración del gel por depósito de precipitados de AgS . La reacción se detuvo sumergiendo los geles en solución de "stopping" durante 1 min.

Solución desarrolladora	
Na_2CO_3 anhidro	3,0 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución de "stopping"	
Ácido acético	2,5 ml
Tris	5,0 g
Agua c.s.p.	100 ml

Secado y almacenamiento de geles

Los geles se sumergieron en una solución de glicerol al 40% (v/v) durante 24 h a temperatura ambiente. Luego se colocaron entre 2 filminas, dejando un borde a su alrededor no menor a 3 cm. Estos bordes se mantuvieron bajo presión durante otras 24 h, agregando luego mayor presión sobre los geles durante 3 días o hasta que estos estuviesen deshidratados. Luego de esto, se recortaron los bordes y sellaron con cinta de papel.

En el caso de los geles teñidos con plata, se trataron previamente con una solución de metanol al 30% durante 30 min a 4 °C, seguido por otros 30 min en solución de glicerol al 3%.

2.5.1.3. Análisis de los geles por densitografía

Digitalización de los geles

La digitalización de los geles se llevó a cabo con un escáner UMAX modelo Astra 610P con una resolución de 300 dpi (24 bits, 16,7 millones de colores) y las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato TIFF no comprimido.

Análisis densitográfico

Las imágenes escaneadas fueron procesadas mediante el software Scion Image for Windows beta 4.0.2, (<http://www.scioncorp.com>) para la obtención de los correspondientes densitogramas.

2.5.2 . Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) es un método de alta resolución en el cual las proteínas son separadas en un gradiente continuo de pH cuando se aplica un campo eléctrico. En este gradiente las proteínas migran hasta llegar al pH correspondiente a su punto isoeléctrico (pI). Permite resolver muestras muy complejas y determinar diferentes valores de pI en una misma corrida, tanto en trabajos analíticos como preparativos.

Preparación de las muestras

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 µg/µl y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a precipitarlas con 3 volúmenes de acetona fría (-20 °C), dejándolas reposar durante 20 min a -20 °C, para luego centrifugarlas a 10.000 rpm durante 15 min, redisolviendo el precipitado en agua bidestilada (en el caso de muestras con bajo contenido proteico el volumen final se redujo respecto al inicial de modo de lograr una concentración adecuada). Este procedimiento se repitió dos veces para disminuir al mínimo la presencia de iones en las muestras, dado que éstos producen distorsiones en las corridas.

Preparación de los geles

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

Solución de poliacrilamida al 5%	
Acrilamida-bisacrilamida (25% T, 3% C)	2,0 ml
Agua bidestilada	5,5 ml
Anfolitos (Pharmalyte 3-10)	0,5 ml
Glicerol (25% P/V)	2,0 ml

La solución de poliacrilamida se desgasificó en un kitasato conectado a una bomba de vacío durante 20 min y luego se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización:

Reactivos de polimerización	
Riboflavina (sol. saturada)	200 µl
TEMED	3 µl
PSA al 10%	60 µl

La mezcla fue depositada con pipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo tapado e inmóvil durante 2 h a temperatura ambiente y en presencia de luz para obtener la polimerización total. Al cabo de ese tiempo, los geles se removieron cuidadosamente con ayuda de una espátula delgada.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volumen de siembra 1-5 μ l y 7 siembras por placa, como máximo) permitiendo que difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con AD) de la celda de IEF, con la cara del gel sembrado hacia abajo. La celda se cerró herméticamente y se conectó a la fuente de poder.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas, a voltaje constante: 100 V durante los primeros 15 min, 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales.

Fijación y Coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 min en la siguiente solución fijadora:

Solución fijadora	
Acido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
TCA	12,5 g
AD, c.s.p.	100 ml

Finalizada la etapa anterior, los geles se trataron durante 2 h con la solución colorante y luego fueron decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución colorante	
CuSO ₄ (disolver primero en agua)	500 mg
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie brilliant blue R-250	40 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante I	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO ₄	500 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante II	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Estimación de los pI

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de pI [Broad pI kit, GE Health Care, Biosciences: Amiloglucosidasa (pI 3,50); Inhibidor de Tripsina (pI 4,55); β -Lactoglobulina A (pI 5,20); Anhidrasa carbónica B, bovina (pI 5,85); Anhidrasa carbónica B, humana (pI 6,55); Mioglobina, banda ácida (pI 6,85); Mioglobina, banda básica (pI 7,35); Lentil lectina, ácida (pI 8,15); Lentil lectina, media (pI 8,45); Lentil lectina, básica (pI 8,65) y Tripsinógeno (pI 9,30)].

La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por ellas, tomando como referencia la posición del cátodo.

2.5.2.1. Detección de actividad caseinolítica en geles: Zimograma

Preparación de las placas de agarosa-caseína

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película plástica (Agarose GelBond, GE Health Care, Biosciences) de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% en glicina-NaOH 0,1 M de pH 9,75 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida durante 20 min en una solución de caseína al 1% conteniendo cisteína 20 mM en el buffer adecuado, enjuagada con AD y escurrida durante 10 min (Westergaard *et al.*, 1980).

Para confirmar cuáles fracciones proteicas presentan actividad proteolítica, los geles de IEF sin teñir se pusieron en contacto con un gel de agarosa-caseína al 1 % .

Incubación

El gel de poliacrilamida fue dispuesto sobre la placa de agarosa-caseína evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 50 °C durante 10 min.

Fijación y coloración

Una vez finalizado el período de incubación, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 min en la solución fijadora cuya composición se indica a continuación:

Solución fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Una vez fijadas las proteínas, la placa de agarosa-caseína fue deshidratada entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm² durante 20 min. Luego fue secada con pistola de aire y sumergida durante 10-30 min en la siguiente solución colorante:

Solución colorante	
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg
Solución fijadora, c.s.p.	100 ml

La decoloración se realizó por inmersión de la placa de agarosa-caseína en la solución fijadora durante 10 min y luego se secó con pistola de aire.

3. PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

3.1. Cromatografía de intercambio iónico

Araujia angustifolia

La purificación se realizó utilizando un sistema FPLC de GE Health Care, Biosciences, con bombas peristálticas B - 500, unidad de control UV - 1, programador GP - 250 Plus, unidad óptica UV - 1; válvula V - 7, mezclador Mixer, colector de fracciones FRAC - 100 y registrador REC 112.

Se emplearon como soportes para la cromatografía SP - Sepharose HP y Q - Sepharose HP, empaquetados en columnas XK 16/40 con adaptadores K16 (GE, Health Care, Biosciences).

La purificación de los componentes proteolíticos fue realizada por cromatografía de intercambio catiónico. Un ml de extracto crudo conteniendo 1,5 mg de proteínas fue sembrado en una columna de intercambio catiónico Pharmacia XK 16/40 con adaptadores AK16, empaquetada con relleno SP-Sepharose Fast Flow y equilibrada con 0,055 M Tris-HCl (pH 7,4) y posteriormente eluida con un gradiente de NaCl (0-0,5, 0,5-0,8 y 0,8-2,0 M) en el mismo buffer. La cromatografía de intercambio catiónico fue monitoreada espectrofotométricamente por lectura de la absorbancia a 280 nm.

Araujia hortorum

El extracto crudo fue purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico en el equipo mencionado anteriormente utilizando una columna (Pharmacia K 15/30) rellena con CM Sepharose CL-6B Fast Flow, equilibrada y lavada con buffer cítrico fosfato 55 mM de pH 6,4. Se sembraron 14 ml de extracto crudo conteniendo 75 mg de proteínas y la elución fue realizada con un gradiente lineal de ClNa (0-0,6 M) en el mismo buffer.

En ambos casos la actividad caseinolítica, la cantidad de proteínas y el contenido de péptidos (reacción de Biuret) fue testada en las fracciones eluidas.

3.2. Caracterización de las fracciones purificadas

3.2.1. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas de cada una de las fracciones purificadas fue evaluado por el método de Bradford según se indica en el ítem 2.2.1 de M&M.

3.2.2. Actividad peptidásica

La actividad caseinolítica fue determinada tal como se indicó en el ítem 2.3.6. de M&M.

3.2.2.1. Perfil de pH de la actividad proteolítica

El perfil de de las enzimas purificadas se ensayó según el protocolo descrito en el ítem 2.4.1. de M&M.

3.2.2.2. Efecto de inhibidores

El mecanismo catalítico de las enzimas puras fue determinado utilizando inhibidores específicos de proteasas, tal como se describió en el punto 2.4.2.

3.2.3. Actividad esterolítica

La actividad endoesterolítica de cada enzima purificada se determinó utilizando los derivados N- α -carbобензохи-*p*-nitro fenil ésteres de aminoácidos de acuerdo al método descrito en el ítem 2.3.1.

3.2.4. Actividad amidásica

Según se indica en el punto 2.3.2. se utilizó L-piroglutamил-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) 4mM para medir actividad amidásica.

3.2.5. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina y Electroforesis en gradiente de poliacrilamida

Se realizaron estas electroforesis con el objeto de verificar el proceso de purificación de las proteasas a partir de los extractos crudos. Ver apartado 2.5.1.1.2. y 2.5.1.1.3., respectivamente.

3.2.6. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} se emplearon como sustratos sintéticos L-piroglutamил-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) y los derivados N- α -carbобензохи-*p*-nitro fenil ésteres de aminoácidos por los que cada una de las enzimas ensayadas presentaron mayor preferencia.

La valoración de tales parámetros fue realizada de acuerdo al método descrito previamente para estos sustratos, tal como se describió en los ítems 2.3.2 y 2.3.1., respectivamente.

La velocidad inicial de la reacción fue determinada monitoreando cada 10 s durante 3 min la absorbancia correspondiente para cada caso. El k_{cat} y el K_m fueron calculados usando el análisis de regresión no linealizada de la ecuación de Michaelis-Menten. En cada caso se utilizaron nueve concentraciones de sustrato en el rango 1,25 - 60 μM .