

## COMUNICACION BREVE

# EVALUACION DE HIDROXIAPATITAS PARA LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DE ENZIMAS DE RESTRICCION

R. González Santos y A. Suria Martínez\*

Centro Nacional de Investigaciones Científicas y \*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 2 de noviembre de 1991.

La hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  en forma de gel<sup>1</sup> y microcristalina,<sup>2</sup> es empleada ampliamente como soporte cromatográfico para la separación de proteínas, enzimas, anticuerpos monoclonales y un gran número de biomoléculas orgánicas.<sup>3-7</sup> Los parámetros cromatográficos: capacidad de intercambio o adsorción, velocidad de flujo, etc., dependen en gran medida de los métodos de síntesis y de la preparación del soporte.

En Laboratorio de Biomateriales del Centro Nacional de Investigaciones Científicas,<sup>8</sup> se ha desarrollado recientemente un procedimiento, mediante el cual, a partir de una misma solución que contiene iones  $Ca^{2+}$  y  $PO_4^{3-}$  se pueden obtener varios tipos de hidroxiapatitas con una composición molar Ca/P de 1,66 y con distintos tamaños de partícula o cristales. Estos materiales fueron caracterizados, tanto química como estructuralmente, por métodos de difracción de rayos X y espectroscopia IR (Figuras 1 y 2) y su efectividad fue comprobada en la purificación de anticuerpos monoclonales.<sup>9</sup>

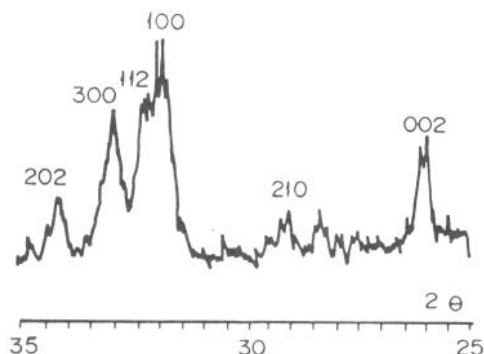


Fig. 1. Patrón de difracción de rayos X de la muestra HA-3 en la zona de 25 - 35° (2θ), mostrando las reflexiones fundamentales que caracterizan a la hidroxiapatita (Difractómetro HZG-4, Cu Kα).

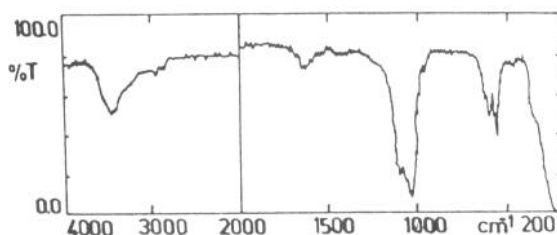


Fig. 2. Espectro IR de la muestra HA-3 (Espectrómetro PU-9512, en pastillas de KBr) donde aparecen las bandas características de la hidroxiapatita en 570, 610, 635, 1 045, 1 095 y 3 600  $cm^{-1}$ .

En el presente trabajo, se reporta la utilización como soporte cromatográfico para la purificación de endonucleasas de restricción, de tres tipos de hidroxiapatitas (HA-1, HA-2 y HA-3), obtenidas por la vía antes mencionada.

Para la evaluación de la eficacia de estos productos, se tomó la hidroxiapatita comercial HTP (Bio-Rad) como control positivo.

Las columnas se montaron con 5 mL de leche, se equilibraron con el amortiguador H ( $K_3PO_4/EDTA/2$ -mercaptoetanol) hasta que la absorbancia fue nula a 280 nm. Posteriormente, se aplicó la suspensión enzimática (Eco RI YT 89091, Enzibiot, 10 U/μL) a una velocidad de flujo de 10 mL/h (se tomaron muestras del eluato para controlar la actividad). Una vez aplicada la muestra, se lavó con 10 volúmenes de amortiguador H y se aplicó un gradiente lineal de 25 a 250 mmol/L de  $K_3PO_4$  y se colectaron fracciones de 1 mL.

Las fracciones con actividad de cada columna se unieron y se concentraron dializando contra el amortiguador de conservación de la enzima y se determinó la actividad final de cada lote.

Los resultados fueron muy satisfactorios, ya que las hidroxiapatitas HA-1, HA-2 y HA-3, tuvieron un comportamiento similar al producto comercial HTP, con un rendimiento de 10 000 U/g.

En la figura 3, se observan los resultados de las electroforesis de las muestras obtenidas en las diferentes columnas cromatográficas. La concentración inicial y final de la preparación enzimática fue la misma, evidenciando que no hubo pérdidas de material purificado.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tiselius A., Hjerten S., Levin O. **Arch. Biochem. Biophys.**, **65**, 132, 1956.
2. Mazin A.L. **Anal. Biochem.**, **61**, 62, 1974.
3. Horigome T., Hiramura T., Sugano H. **Eur. J. Biochem.**, **186**, 63, 1989.
4. Hatayama T., Fujio N., Yukioka M. **J. of Chromatography**, **481**, 403, 1989.
5. Tanaka H., Miyajima K., Nakagaki M., Shimabayashi S. **Chem. Pharm. Bull.**, **37** (11), 2897, 1989.
6. Krezak M., Moreno E.C., Zahradnik R.T., Hay D.I. **J. Colloid Interface Sci.**, **59**, 283, 1977.
7. Yamakawa Y., Chiba J. **J. Liquid Chrom.**, **11**, 665, 1988.
8. González R., Melo M.C. Procedimiento para la obtención de hidroxiapatita para uso cromatográfico. RPI 182/90, Pat. No. 22180/93, ONIITEM, Cuba.
9. Otero A., Rodríguez B., González R. III Sim. Cubano e Internacional sobre Interferón. (Resúmenes). La Habana, Cuba, 1989.

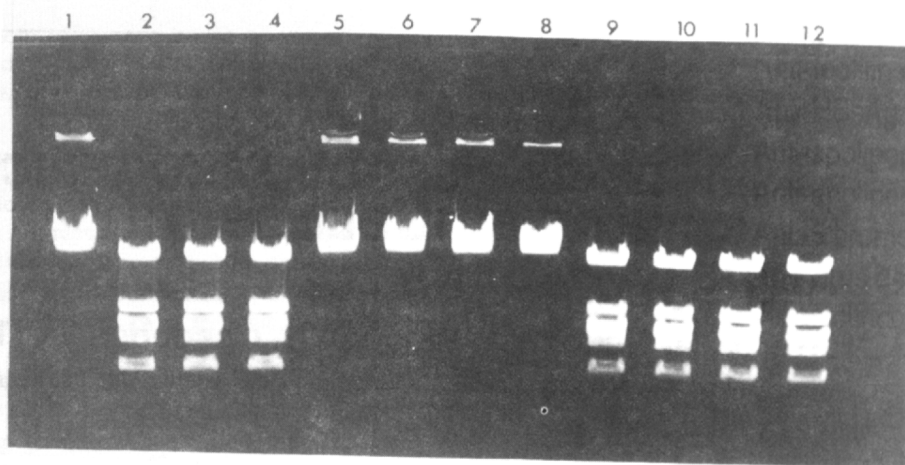


Fig.3. Electroforesis de las fracciones correspondientes a los cromatogramas en las diferentes columnas.

- 1.- Control negativo (DNA del fago  $\lambda$ ). 2.- 1  $\mu$ L directo de la preparación enzimática (10 U/ $\mu$ L).  
 3.- 1  $\mu$ L de una dilución 1/5 de la preparación enzimática. 4.- 1  $\mu$ L de una dilución 1/10 de la preparación enzimática.  
 5.- 1  $\mu$ L del eluato después de aplicada la muestra en HTP. 6.- 1  $\mu$ L del eluato después de aplicada la muestra en HA-1.  
 7.- 1  $\mu$ L del eluato después de aplicada la muestra en HA-2. 8.- 1  $\mu$ L del eluato después de aplicada la muestra en HA-3.  
 9.- 1  $\mu$ L de una dilución 1/15 de la elución de la HTP. 10.- 1  $\mu$ L de una dilución 1/15 de la elución de la HA-1.  
 11.- 1  $\mu$ L de una dilución 1/15 de la elución de la HA-2. 12.- 1  $\mu$ L de una dilución 1/15 de la elución de la HA-3.