Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Cromatografía en papel de proteínas

Cabib, Enrique

1951

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Cabib, Enrique. (1951). Cromatografía en papel de proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0662_Cabib.pdf

Cita tipo Chicago:
Cabib, Enrique. "Cromatografía en papel de proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1951.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0662_Cabib.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

T.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE PROTEINAS

Tesis presentada por

ENRIQUE CABIB

Tesis: 682

para optar al título de Doctor en Química

- 1951 -

Deseo expresar mi agradecimiento al Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, por haberme concedido una beca, que hizo posible la realización de este trabajo, al Dr. L. F. Leloir, por su constante ayuda y consejos, y a los Dres. R. Caputto, C.E. Cardini y A.C. Paladini, por muchas sugestiones y críticas valiosas.

La albúmina cristalina y la γ-globulina utilizadas en esta investigación fueron facilitadas por el Dr. N. Mittelman y varios de los sueros y plasmas por el Dr. A. Parodi, a quienes hago extensivo mi agradecimiento.

A MIS PADRES

FOSFINA

INTRODUCCION

Desde el año 1944, en que Consden, Gordon y Martin, basándose en los trabajos anteriores sobre cromatografía de partición de Martin y Synge, publicaron su primer artículo de cromatografía en papel (1), éste método ha tenido un enorme desarrollo, y se ha revelado extraordinariamente fructífero en sus aplicaciones a la química, especialmente en sus aspectos biológicos. Se lo ha utilizado así para la separación de microcantidades de las más diversas substancias: aminoácidos, azúcares, purinas, nucleósidos y nucleótidos, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, antibióticos, cationes inorgánicos, etc. (ver p. ej. 2).

El terreno que hasta ahora se ha resistido más a esas investigaciones ha sido probablemente el de las proteínas. Esto se ha debido en primer lugar a la dificultad con que se tropieza para la separación en el papel de moléculas grandes y muy complejas, y probablemente en no pequeña parte también a la falta, hasta hace muy poco tiempo, de reactivos sensibles para el revelado de los cromatogramas. En efecto, por un lado la mayoría de las proteínas no suelen correr en el papel como manchas redondeadas y bien definidas, sino por lo común dan manchas muy alargadas o, peor aún, estrías; por otro lado los reactivos que se utilizan comúnmente para identificarlas en solución resultan muy poco sensibles cuando son aplicados al papel.

Los investigadores que se han dedicado a estos problemas han tratado de superar en varias maneras las dificultades citadas.

Uno de los primeros trabajos sobre cromatografía en papel de proteínas fué el de Franklin y Quastel (3). Estos autores incorporan hemina a la solución de proteína, antes de correrla. La hemina forma complejos con muchas proteínas y por lo tanto se mueve en

el papel junto con ellas. Una vez desarrollado el cromatograma, se lo revela con una solución de bencidina, que reacciona con la hemina, dando una coloración azul o a veces roja o verde. Aparecen así manchas donde se encuentran las proteínas combinadas con la hemina. De las fotografías que acompañan este trabajo, se desprende que el método de revelado no es muy bueno, por aparecer muchas manchas secundarias en lugares donde no hay proteínas. Como solventes estos autores utilizan distintos buffers (fosfato, citrato, oxalato, etc.) efectuando corridas a diferentes pH; experimentaron con albúmina de bovino, γ-globulina y β-lactoglobulina, y además con algunas enzimas, como papaína, pepsina y ureasa. Consiguieron una separación buena entre dos proteínas sólo efectuando cromatografía en dos dimensiones, con diferentes solventes. Las manchas resultaron en algunos casos ovaladas y otras veces aparecen como estrías alargadas.

En el caso de la ureasa, su posición fué determinada en el papel recortando tirillas transversales del mismo e incubándolas con el substrato (urea) en un respirómetro de Warburg, determinando así la actividad enzimática en cada una. Se llegó así a la conclusión de que la mayor parte de la actividad estaba distribuída en una zona del papel de aproximadamente 6 cm de ancho.

Posteriormente Franklin y Quastel aplicaron su método al estudio de la combinación entre la tiroxina y las proteínas del plasma (4), y más recientemente volvieron a estudiar la separación de las fracciones proteicas de la sangre (5). De este último artículo trataremos en la discusión (pág.44).

En un reciente trabajo Reid (6) utilizando la técnica de Franklin y Quastel, consiguió separar la enzima poligalacturonasa de la pectina esterasa de hongos.

Ya anteriormente a estos trabajos, Tiselius (7) había encontrado que ciertas proteínas son capaces de ser fuertemente adsorbidas de sus soluciones, en presencia de sales en concentraciones mucho menores que las necesarias para precipitarlas. Uno de los adsorbentes ensayados fué el gel de sílice y otro el papel de filtro. Las sales empleadas fueron sulfato de amonio y fosfatos. La concentración de proteínas residual en la solución fué calculada en base a la densidad óptica de la misma a 280 m μ. Se hicieron también algunas tentativas de separar proteínas en el papel, basadas en la diferente adsorción (llamada por Tiselius "salting out adsorption"), tentativas que tuvieron algunos éxitos, según el autor, el cual da sin embargo muy pocos detalles al respecto, tanto en el trabajo citado, como en una conferencia posterior (8).

Mitchell, Gordon y Haskins (9) utilizaron para la separación de enzimas una columna hecha con discos de papel de filtro superpuestos, la "cromatopila", por ellos ideada. Se embebían en la solución de enzimas cierto número de discos de papel, que se colocaban en la parte más alta de la columna. Se desarrollaba el cromatograma haciendo pasar solvente por la columna desde arriba hacia abajo. Se sacaba luego uno de cada 10 ó 20 discos y se determinaba que actividad había en cada uno, de las enzimas que interesaba separar. Se podía construir así un gráfico que daba la concentración de cada enzima en función del número de discos (o de la longitud de la columna). El solvente de mayor poder resolutivo fué una solución acuosa de sulfato de amonio, a la cual se iba agregando continuamente agua durante el desarrollo del cromatograma, en forma tal que la solución que penetraba a la columna era cada vez más diluída. Se creaba así a través de la columna un gradiente de sulfato de amonio: los discos infe-

riores contenían concentraciones de la sal mucho más altas que los superiores. Con este método Mitchell y colab. pudieron separar parcialmente entre sí las enzimas adenosina deaminasa, amilasa y fosfatasa, contenidas en un preparado de "takadiastasa". Los mismos autores ensayaron también con resultados parecidos, aunque en general menos alentadores, el uso de un gradiente de pH, a concentración constante de $SO_4(NH_4)_2$. Otro solvente utilizado fué $SO_4(NH_4)_2$ de concentración constante a pH fijo: este último no fué muy satisfactorio, distribuyéndose en general cada enzima a lo largo de toda la columna y no en una zona definida.

Los trabajos comentados se ocúpan de la separación de las proteínas por cromatografía en papel; por otra parte han aparecido recientemente otros artículos que tratan sobre el revelado de las proteínas en el papel. Para eso se ha aprovechado la propiedad de las proteínas de combinarse con varios colorantes. Jones y Michael (10) utilizan una solución ácida de "Solway Purple", entre otros, en la cual sumergen el papel por cierto tiempo. Lavando luego con agua tibia, se arrastra el colorante, excepto en los sitios donde ha quedado fijado sobre las proteínas, que aparecen así como manchas coloreadas sobre fondo blanco. Durrum (11), en un trabajo que trata sobre electroforesis en papel, emplea azul de bromofenol en solución alcohólica saturada con Cl_2Hg, lavando luego con agua. Cremer y Tiselius (12) modificaron este método para hacerlo cuantitativo. El método modificado incluye una serie de lavados del papel con diferentes solventes, elución del colorante y determinación colorimétrica del mismo.

El presente trabajo se inició con el objeto de aplicar la cromatografía en papel a la separación de enzimas. Se empezó por

ensayar soluciones buffer como solventes, luego se pasó a los gradientes de sulfato de amonio, en general con poco éxito. Finalmente se utilizó el alcohol etílico en solución acuosa o en mezcla con buffers, pudiéndose separar así las enzimas invertasa y fosfoglucomutasa entre sí, y desdoblar la invertasa de levadura de cerveza en dos fracciones. A raíz de la publicación de métodos sensibles para el revelado de las proteínas en el papel, que ya hemos citado, se pudo extender este trabajo a la separación de las proteínas del suero. Se llegó a separar con relativa facilidad la albúmina de las globulinas y se efectuó un estudio sistemático de la influencia de varios factores sobre estas separaciones.

PARTE EXPERIMENTAL

Substancias utilizadas y métodos generales

Los métodos se detallarán en cada caso particular. Se expondrán aquí sin embargo algunos que fueron de uso general en todo el trabajo.

Substancias.

El glucosa-1-fosfato fué preparado enzimáticamente según Sumner y Somers (13) y el glucosa-1,6-difosfato sintéticamente por el método de Leloir et al. (14).

La albúmina de suero humano era una muestra cristalina y la γ-globulina de suero de caballo era electroforéticamente homogénea.

La sacarosa, maltosa, rafinosa, xilosa y α-metil glucósido eran todas drogas comerciales.

Papel.

En todos los casos se usó papel Whatman Nº 1.

Aplicación de la solución a cromatografiar sobre el papel.

La solución fué aplicada sobre el papel en la línea de partida, a unos 5 cm de un extremo del mismo, como una gota, o como una banda obtenida yuxtaponiendo una serie de gotas una al lado de la otra. Se utilizaron pipetas capilares de enrase automático de capacidad entre 2,5 y 5 μl. La cantidad puesta en el papel como banda fué, en las experiencias llevadas a cabo con sulfato de amonio como solvente, de aproximadamente 0,01 ml por cm de ancho del papel, y en la mayoría de las con alcohol de 0,005 ml por cm.

Una vez aplicada la solución al papel, se puso siempre en marcha inmediatamente la cromatografía sin dejar secar las gotas, para evitar en lo posible la desnaturalización de las proteínas.

Extractos de levadura.

La levadura de leche Saccharomyces fragilis se cultivó y se secó al aire, según el método de Caputto et al. (15).

Se usó además levadura de cerveza marca Palermo, secada al aire a temperatura ambiente.

El jugo de Lebedev de cualquiera de las dos levaduras se preparó en la siguiente forma: se suspende la levadura seca en tres veces su peso de una solución de fosfato de amonio 2,2% y se deja una hora a temperatura ambiente, agitando de vez en cuando. Luego se deja en la heladera 1-2 días. Entonces se centrifuga a 4-5000 r.p.m. y se decanta el sobrenadante, que contiene las enzimas extraídas.

Para la cromatografía se utilizaba generalmente el extracto dializado en capa fina por tubos de celofán 4-5 horas contra agua, en la heladera.

Experimentos preliminares

Los primeros experimentos se llevaron a cabo por el método de ascenso capilar (16 y 17, ver fig. 1). Como solución de proteínas a fraccionar se utilizó un extracto de Lebedev de S. fragilis. Las tiras de papel eran en este caso de 4 cm de ancho por 40 cm de largo. La solución fué aplicada al papel como gota o banda, según el experimento.

Se ensayaron varios reactivos para revelar las proteínas, entre otros la ninhidrina, el reactivo de Folin y Ciocalteau, el de Pauly, etc.; pero con resultados muy poco satisfactorios; la reacción más sensible fué la de la ninhidrina, llevada a cabo en la misma forma que para la cromatografía en papel de aminoácidos (1), pero se obtuvieron coloraciones muy débiles (').

Con este método se ensayaron primero papeles impregnados con $Al(OH)_3$ según Datta et al. (18), usando agua como solvente y luego papeles no impregnados usando buffers de fosfato como solventes. En todos los casos apareció sólo una mancha o banda de proteínas, no habiéndose éstas aparentemente separado entre sí.

Estos resultados sin embargo son dudosos, debido a la ineficiencia ya señalada de los métodos de revelado. Se resolvió por lo tanto utilizar para ese fin la banda de absorción que presentan las proteínas cerca de 280 mμ (19).

Se procedió de la siguiente manera: una vez desarrollado el cromatograma, el papel fué cortado en tiras transversales de 2 cm de ancho. Cada tira fué colocada en un tubo de ensayo de 8 ml, al cual se agregaron 3,5 ml de buffer de fosfatos de Sörensen (20) de

(') La reacción con azul de bromofenol apareció en la literatura cuando esta investigación se hallaba mucho más adelantada.

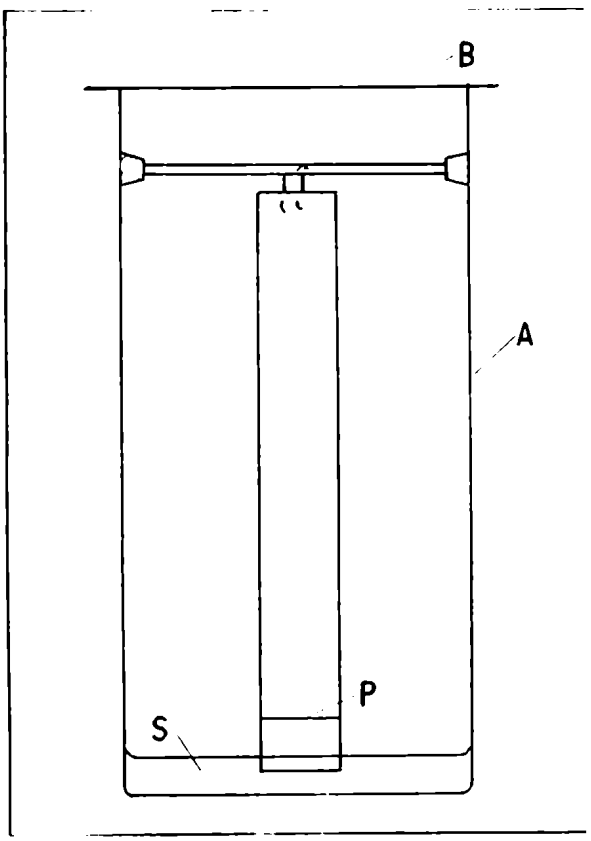

Fig. 1 - Aparato para cromatografía por ascenso. A: cilindro de vidrio. B: tapa de vidrio. P: línea de partida. S: solvente.

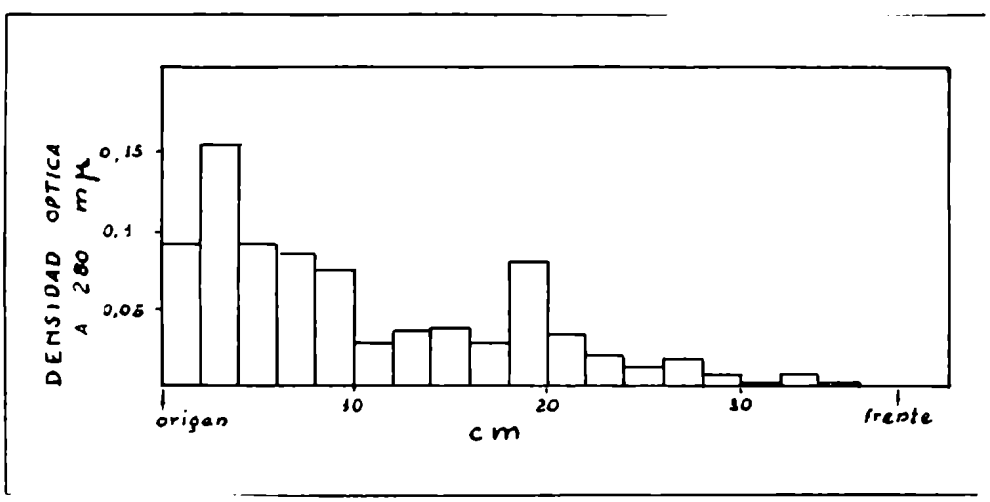

Fig. 2 - Distribución de proteínas en el papel. Cromatografía de extracto de Lebedev de S. fragilis con gradiente de $SO_4(NH_4)_2$. Concentración inicial: 33% de saturación.

pH 6,5. Se extrajo así el papel durante 12 horas, agitando de vez en cuando, y luego se midió la densidad óptica de la solución a 280 m μ en el espectrofotómetro de Beckman. Representando luego la densidad óptica en función de la longitud del papel, se obtiene un gráfico que muestra la distribución de proteína en el mismo (ver fig. 2). Antes de representar cada lectura hay que restarle la del blanco, obtenido extrayendo un trozo de papel igual a los otros, pero sin proteínas.

Este método es mejor que los anteriores, pero deja bastante que desear en cuanto a sensibilidad. Se lo utilizó sin embargo en algunos experimentos que se efectuaron para producir en el papel un gradiente de $SO_4(NH_4)_2$, análogo al obtenido por Mitchell et al. (9) en la cromatopila.

Cromatografías con gradiente de $SO_4(NH_4)_2$.

Métodos

Dispositivos para la cromatografía.

En la fig. 3 está representado el primer dispositivo armado para este fin, que llamaremos dispositivo I: A es un tubo de ensayo común que fué cortado por la mitad aproximadamente y al cual se hizo además un reborde. B es un tubo de vidrio abierto en los dos extremos, en uno de los cuales se adaptó el taponcito de algodón C. B es mantenido vertical en el centro de A por medio de un corcho horadado y todo el conjunto se sostiene por el reborde de A en un agujero practicado en la tablita de madera D. A lo largo de una arista de la misma corre la varilla de vidrio E, que está asegurada a la tablita por medio de dos gomitas. El tubo B contiene una solución de sulfato de amonio de cierta concentración y en el espacio entre B y A hay agua. La comunicación entre la solución y el papel es establecida por medio de una mecha compuesta de varias tirillas del mismo papel de filtro (F), unidas unas a otras con broches metálicos. Toda la instalación se encuentra dentro de un caño de cemento G, cerrado por una tapa de vidrio. Al difundirse la solución salina por la mecha y el papel, baja el nivel en el tubo B y para restablecerlo entra agua de A, diluyéndose así la solución. Este proceso se renueva constantemente, determinando que lleguen al papel soluciones de $SO_4(NH_4)_2$ cada vez más diluídas.

Para controlar la eficacia del sistema, una vez efectuada la corrida, se cortó el papel en tiras transversales de 2 cm. Se extrajeron con agua o buffer (se usaron eventualmente los mismos extractos que servían para la determinación espectrofotométrica de

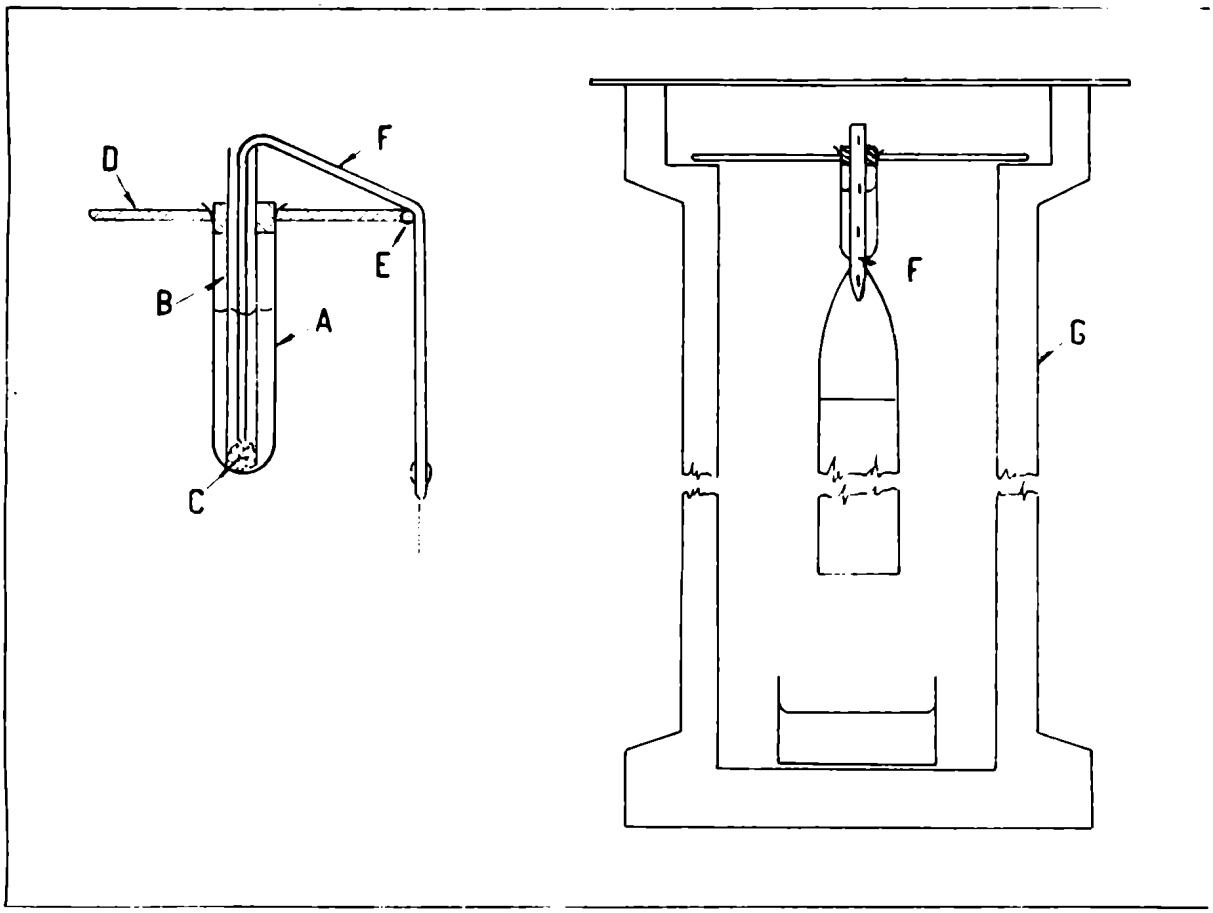

Fig. 3 - Dispositivo I para producir gradiente de $SO_4(NH_4)_2$.

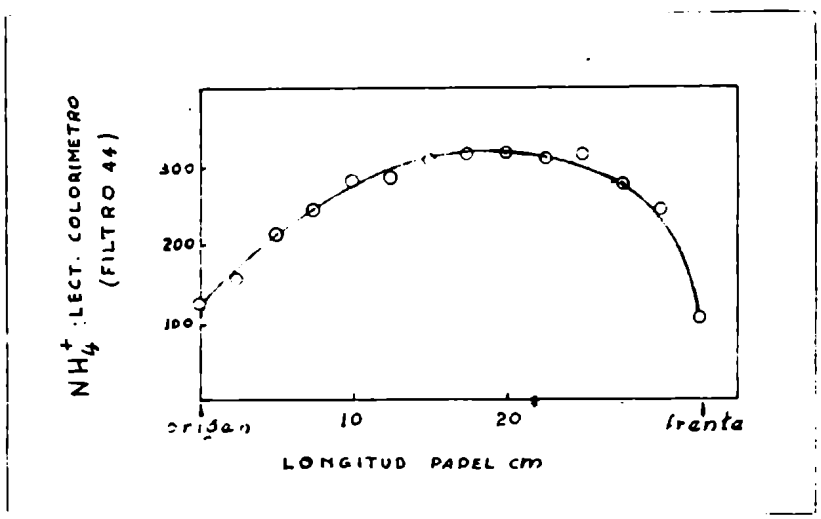

Fig. 4 - Distribución de $SO_4(NH_4)_2$ en el papel, usando el dispositivo I. En el tubo B del mismo $SO_4(NH_4)_2$ 33% de saturación.

proteínas) y se valoró el contenido en NH_4^+ de una alícuota de cada extracto con el reactivo de Nessler. Contrariamente a lo esperado no se obtuvo un gradiente continuo, sino una curva con un máximo (ver fig. 4). Parece que el agua se difunde más rápidamente que la sal a través del papel. La comprobación se efectuó haciendo una cromatografía por ascenso "en blanco", es decir sin colocar substancias en el papel, y utilizando como solvente una solución de sulfato de amonio al 40% de saturación (sin producir gradientes). Al determinar luego la concentración de la sal en el papel se obtiene una curva que está representada en la fig. 5: la concentración del sulfato de amonio disminuye desde el punto de partida hasta el frente del solvente. Un efecto similar ya había sido encontrado por Horne y Pollard (16) y recientemente por Reid (6). Hay que advertir sin embargo que los resultados obtenidos pueden atribuirse en parte al hecho de que el papel está generalmente más cargado de líquido (y por lo tanto de sal) cerca de la superficie del solvente que cerca del frente de avance. Para decidir definitivamente sería necesario determinar no sólo la cantidad de sal sino también la de agua, en función de la longitud de papel.

Para tener un mejor control de las condiciones y sobre todo una variación más rápida en la concentración del sulfato de amonio, fué ideado el aparato representado en la fig. 6, que será llamado dispositivo II: A es un tubo de vidrio de unos 8 cm de ancho y 40 de alto. Está cerrado arriba por la tapa de vidrio B y abajo por el cierre hidráulico que efectúa el mismo solvente.. El papel está colgado de la varilla C sostenida por dos corchos contra las paredes del tubo A. Este a su vez está sostenido por una abrazadera unida a un soporte, que no está representada en la figura. Para evitar en lo po-

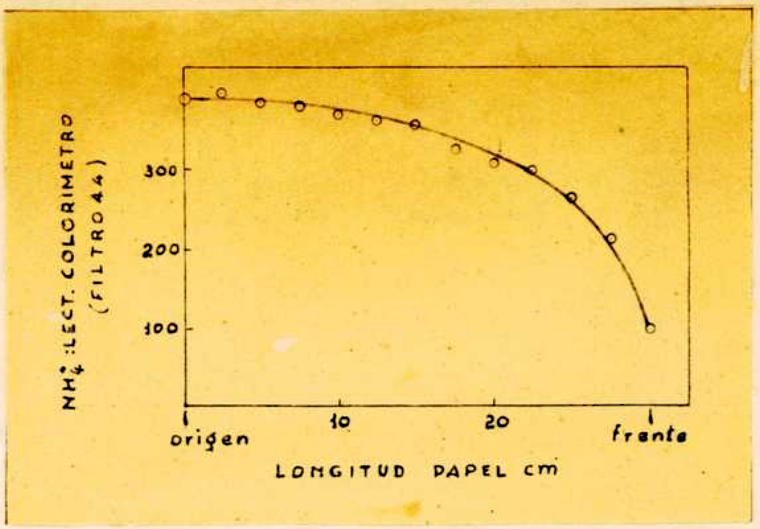

Fig. 5 - Distribución de $SO_4(NH_4)_2$ en el papel en cromatografía "en blanco".

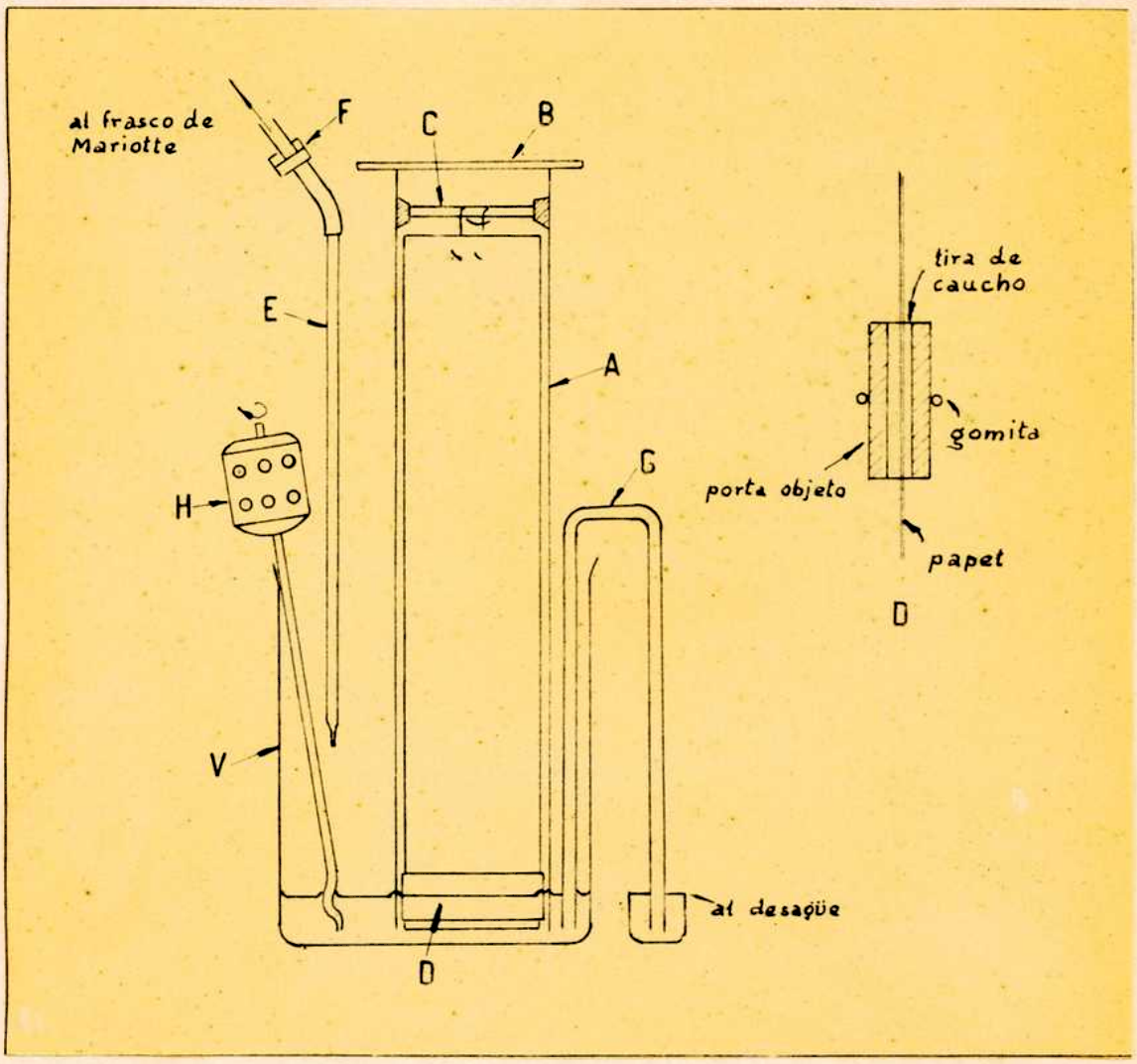

Fig. 6 - Dispositivo II para producir gradiente de $SO_4(NH_4)_2$.

sible que la tira de papel sea afectada por el movimiento del solvente, se le agregaron como peso dos portaobjetos (D), unidos por una gomita, y separados al mismo tiempo del papel por medio de dos tiras finas de caucho. En el vaso V se coloca el $SO_4(NH_4)_2$ concentrado, mientras que el agua cae desde el tubo E, que está conectado con un frasco de Mariotte, no dibujado en la figura, para que la velocidad de salida sea constante. Esta velocidad se puede regular con la pinza de Mohr F. El aparato está provisto además de un nivel constante G, y de un agitador eléctrico H que uniformiza la concentración de la solución.

La concentración de sulfato de amonio en el papel también aquí presentó un máximo (ver fig. 7), que no se puede atribuir en este caso a imperfecciones del aparato. Por otra parte la concentración de sulfato de amonio en el solvente llegó, con la velocidad de pasaje del agua de 3 ml/min, desde el 60% de saturación hasta casi cero al finalizar la experiencia que duraba de 3 a 4 horas. En el papel la concentración de $SO_4(NH_4)_2$ tiene una variación máxima de 1 a 10 aproximadamente.

Determinaciones de actividad enzimática.

Se procedió de la siguiente manera: el papel se subdivide con trazos suaves de lápiz en la forma indicada en la fig. 8. A lo largo de la línea PP' se coloca una banda de la solución de enzimas en la forma explicada en la pág. 6. Una vez efectuada la corrida, se retira el papel y se lo deja secar parcialmente a temperatura ambiente; cuando todavía está húmedo se lo corta en trozos según las líneas trazadas de antemano. Cada uno de los trozos de la tira "a", cortado en pedacitos más pequeños, se coloca en un tubo de ensayo de

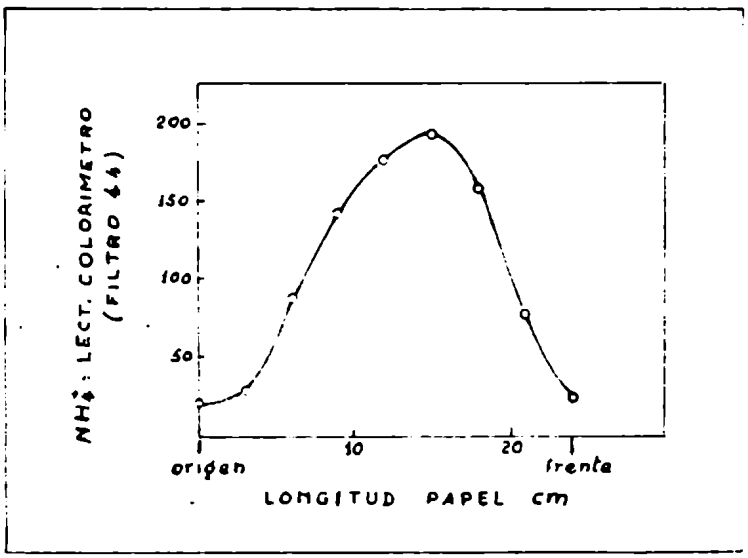

Fig. 7 - Distribución de $SO_4(NH_4)_2$ en el papel, usando el dispositivo II. Concentración inicial de $SO_4(NH_4)_2$: 40 % de saturación.

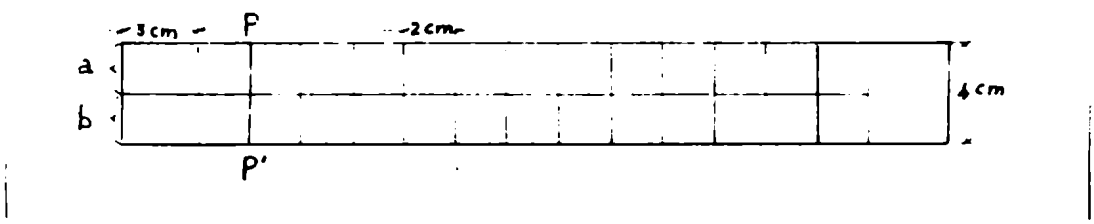

Fig. 8 - Forma en que se subdivide el papel para las determinaciones de actividad enzimática.

8 ml. al cual se agrega el substrato. Los trozos de la tira "b" se colocan en sendos tubos con agua, como blancos. Se incuban todos los tubos un cierto tiempo a 37º C y luego se determina la cantidad de substrato transformada en cada uno. Además en un tubo se coloca el substrato sin enzima para medir el valor del blanco del mismo. Se puede luego representar la actividad enzimática en función de la longitud del papel, según se observa por ejemplo en la fig. 9.

Para valorar más de una enzima a la vez, basta usar un papel más ancho y recortar una tira más, colocando los trozos en el substrato que corresponda. Las dimensiones dadas en la figura no se han mantenido siempre iguales, sino se las ha variado según el experimento efectuado. Por ejemplo, para valorar fosfoglucomutasa e invertasa a la vez se usó un papel de 7,5 cm de ancho, que fué cortado después de la corrida en 4 tiras longitudinales, de las cuales una se destinó para determinación de fosfoglucomutasa, una para la invertasa, una para blanco y otra para $SO_4(NH_4)_2$ y proteínas (con las pequeñas cantidades de enzima utilizadas esta última determinación resultaba muy dudosa). Cada tira fué cortada, como ya se explicó, en trozos transversales, pero en este caso los trozos fueron de 3 cm de ancho para no hacer demasiado laboriosa la determinación (aún así hacían falta por lo menos treinta tubos de ensayo cada vez).

Con el dispositivo I (fig. 3) se hicieron cromatografías con determinación de actividad de fosfoglucomutasa y con el II de fosfoglucomutasa e invertasa.

La fosfoglucomutasa transforma el glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato (21) en presencia de Mg y de glucosa-1,6-difosfato (22), su coenzima. Como el glucosa-6-fosfato es reductor, mientras el glucosa-1-fosfato no lo es, se puede seguir la reacción midiendo

la reducción que aparece. El método seguido fué el ya empleado para la misma enzima por Cardini et al. (22), que utilizan los reactivos de Somogyi y de Nelson para la determinación colorimétrica del poder reductor, efectuando las lecturas con un fotocolorímetro de Klett-Summerson con filtro 52.

La enzima se inactiva en buena parte por el solo hecho de ser puesta sobre el papel. Para reactivarla se ensayó el CNK. Se aplicaron gotas de 0,02 ml de jugo de Lebedev dializado de S. fragilis diluído al $\frac{1}{2}$, sobre trocitos de papel; luego se colocaron los papeles en sendos tubos de ensayo y se agregó el substrato: éste estaba compuesto en todos los casos por 6 μM de glucosa-1-fosfato, 6 μM de Mg^{++}, 5 x 10^{-4} μM de glucosa-1,6-difosfato; además en los tubos con CNK la concentración final de éste era 0,01 M (el CNK fué neutralizado antes de agregarlo). Volumen total 0,6 ml. La incubación a 37ºC duró 15 minutos y la reacción se detuvo agregando 1,5 ml de reactivo de Somogyi; luego se determinó reducción con el método ya indicado. Al mismo tiempo se efectuaron ensayos paralelos de actividad con la misma cantidad de enzima, pero puesta en solución y no sobre papel. Los resultados, representados en el cuadro I, demuestran que el CNK restituye buena parte de la actividad. Por lo tanto la mezcla ya indicada, con el agregado del CNK, fué la utilizada para valorar fosfoglucomutasa. El tiempo de incubación fué por lo general de 40 min. a 37º C.

En los experimentos efectuados con el dispositivo II la mezcla de reacción fué algo diferente: habiéndose comprobado que la concentración del substrato estaba en gran exceso, se la disminuyó. Como activador se agregó en vez de CNK, histidina (23), que es muy efectiva y tiene poco blanco de reducción. La mezcla usada era

Cuadro I

Reactivación de Fosfoglucomutasa con CNK

Procedimiento descripto en el texto. Los números indican μ M de substrato transformado.

	Sin CNK	Con CNK
En solución	1,04	1,09
Sobre papel	0,52	0,84

pués la siguiente: 2 μ M de glucosa-1-fosfato, 1 x 10^{-5} μ M de glucosa-1,6-difosfato, 2 μ M de SO_4Mg y 1,2 μ M de histidina. Volumen total 0,6 ml.

En los casos en que se determinó actividad de invertasa el substrato estaba compuesto de 1 M de sacarosa en 0,6 ml de agua. La glucosa y levulosa liberadas por la acción enzimática se valoraron por reducción, con el mismo método usado para la fosfoglucomutasa.

Estos métodos de determinación de las dos enzimas se mantuvieron iguales prácticamente en todas las experiencias siguientes.

Preparados enzimáticos.

Con el dispositivo I se corrió extracto de Lebedev de Saccharomyces fragilis, dializado, cuya preparación ya fué descripta.

Con el aparato II la solución de enzimas empleada fué en algunos casos la anterior y la mayoría de las veces, en cambio, la fracción de proteínas de un jugo de Lebedev de levadura de cerveza,

que precipita entre 50 y 75% de saturación de sulfato de amonio y que contiene la mayor parte de la actividad de fosfoglucomutasa e invertasa. Esta modificación se efectuó con el objeto de tener una preparación de enzimas algo más concentrada y también parcialmente purificada. Se usó levadura de cerveza marca Palermo, secada al aire. El fraccionamiento se efectuó de la siguiente manera: a un extracto de Lebedev dializado, preparado según la técnica ya indicada, se agregó $SO_4(NH_4)_2$ sólido hasta 50% de saturación. Se centrifugó y se separó el sobrenadante al cual se agregó más $SO_4(NH_4)_2$ sólido hasta alcanzar el 75% de saturación. Se filtró en la heladera por papel plegado y se suspendió el precipitado en una pequeña cantidad de agua (alrededor de 1/10 del volumen original). Se dializó por 5-6 horas en capa fina, por tubos de celofán, contra agua en la heladera con 4-5 cambios de agua en el tiempo indicado. En esta diálisis el volumen de solución aumenta bastante, de 2 a 3 veces por lo general. La solución obtenida, cuya actividad en fosfoglucomutasa e invertasa es algo mayor que la original, se utiliza directamente para la cromatografía.

Resultados.

Con el aparato I se efectuaron varios ensayos, dos de los cuales están representados en las figuras 9 y 10. Los gráficos parecen indicar que la fosfoglucomutasa tiene más de un componente; pero la actividad residual es tan pequeña (debido probablemente a la acción inhibitoria de altas concentraciones de sales (21), sulfato de amonio en este caso) que poco se puede deducir de estos resultados, excepto el hecho de que la enzima se mueve en el papel y que este movimiento parece depender de la concentración inicial de sulfato

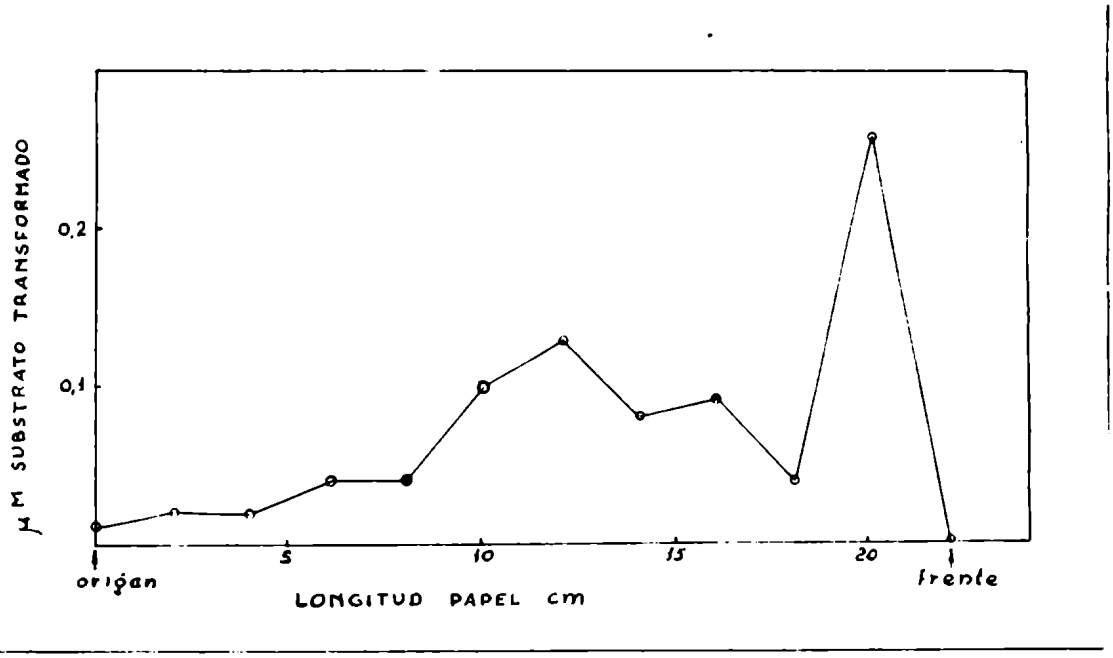

Fig. 9 - Cromatografía de jugo de Lebedev dializado de S.fragilis. Actividad de fosfoglucomutasa. Concentración inicial de $SO_4(NH_4)_2$: 30 % de saturación.

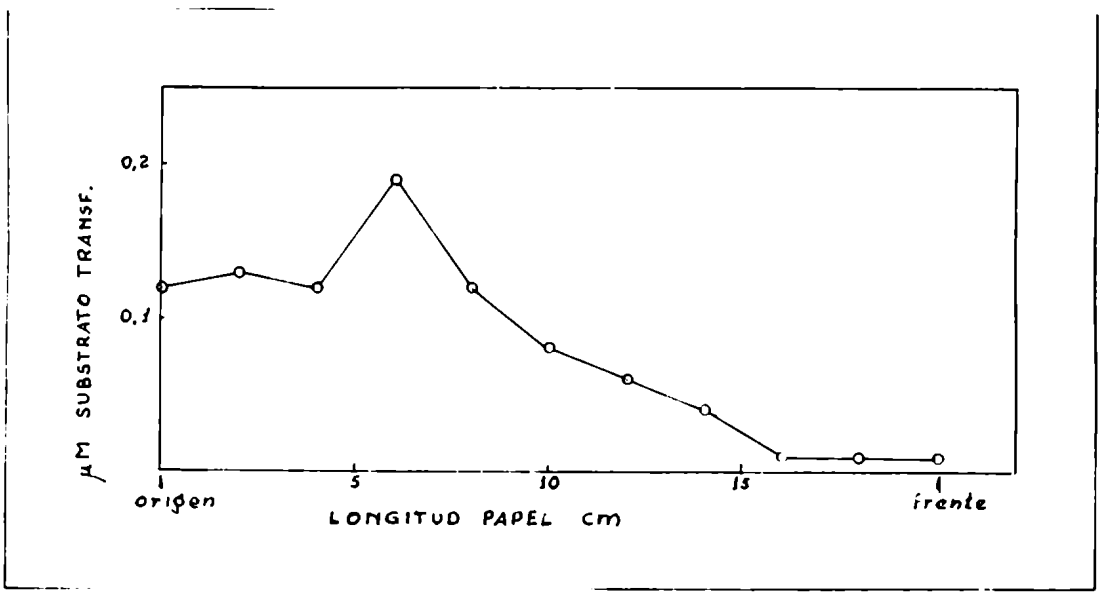

Fig. 10- Cromatografía de jugo de Lebedev dializado de S.fragilis. Actividad de fosfoglucomutasa. Concentración inicial de $SO_4(NH_4)_2$: 45 % de saturación.

de amonio en el tubo B (ver fig. 3), como por otra parte podía esperarse.

Con el dispositivo II se corrió primero el mismo extracto de Lebedev de S. fragilis con determinación de actividad de fosfoglucomutasa: en una serie de experiencias en las cuales la concentración inicial de $SO_4(NH_4)_2$ era de 40% de saturación, la fosfoglucomutasa dió la mayor parte de las veces un solo pico de actividad y no dos como en los casos anteriores.

A continuación se efectuaron corridas con determinación de dos actividades enzimáticas contemporáneamente: las de fosfoglucomutasa e invertasa, usando el extracto de levadura de cerveza cuya preparación se ha descripto en la pág. 15 . En la fig. 11 se pueden ver los resultados de dos de estos experimentos: mientras la fosfoglucomutasa se muestra muy poco activa y no da un pico bien definido, la invertasa da uno o dos picos de actividad (ver más adelante, pág. 25).

Como la inactivación de las enzimas, especialmente de la fosfoglucomutasa, era muy grande, debido probablemente en gran parte a la acción inhibitoria del sulfato de amonio en alta concentración, lo que hacía dificil una interpretación de los resultados, no se siguió experimentando con este método. Se comprueba, sin embargo, que por medio de un gradiente de sulfato de amonio y variando la concentración inicial de la sal, las enzimas pueden moverse más o menos en el papel, dando en varias oportunidades picos definidos de actividad.

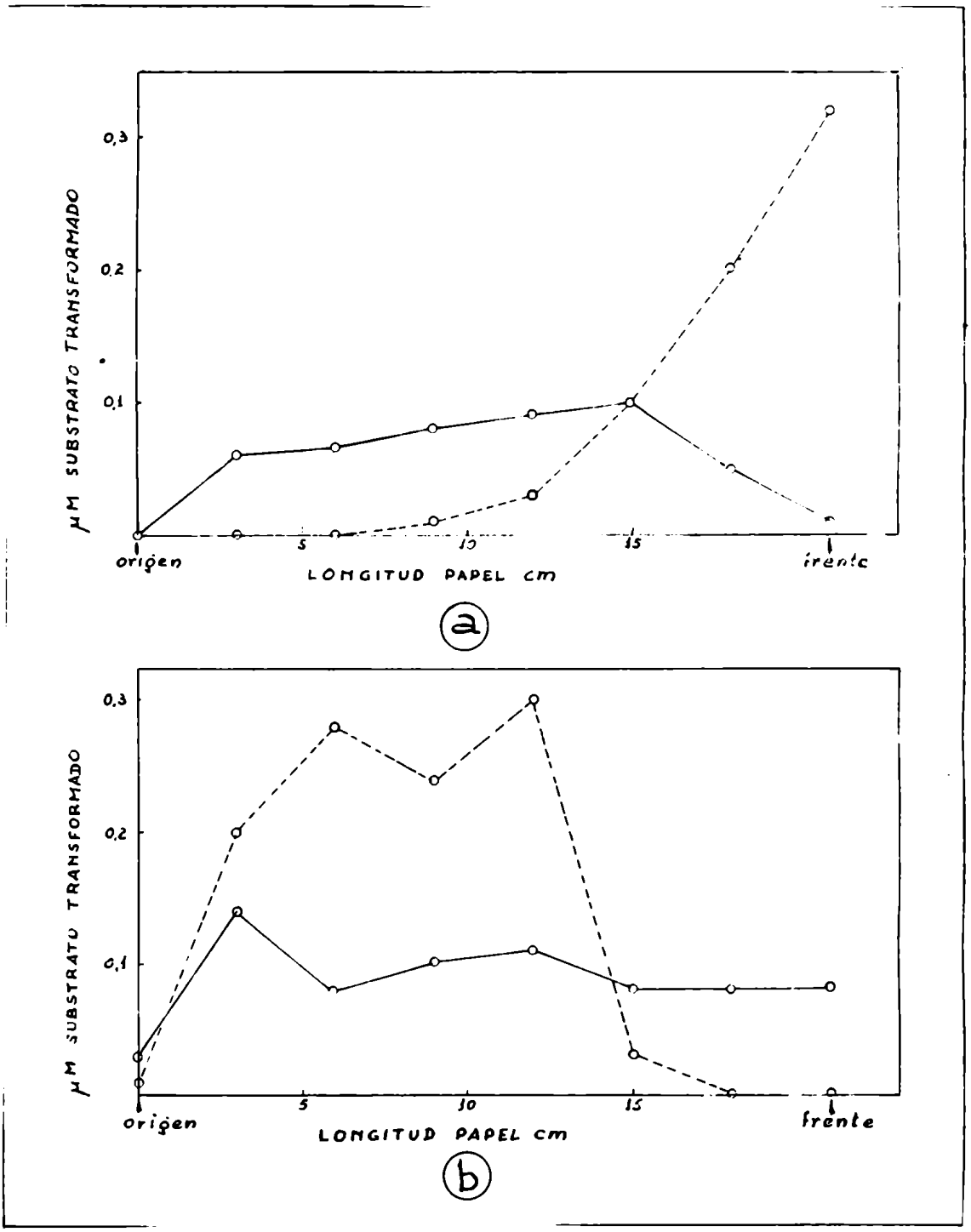

Fig. 11 - Cromatografía de extracto purificado de levadura de cerveza. Linea llena: actividad de fosfoglucomutasa. Línea de puntos: actividad de invertasa.

a) Concentración inicial de $SO_4(NH_4)_2$: 40% de saturación.

b) " " " " 60% " "

Cromatografías con mezclas etanol-agua y etanol-buffer

La introducción de los solventes orgánicos miscibles con agua en los métodos de separación de las proteínas ha significado un notable progreso en estos últimos, especialmente en cuanto se refiere al fraccionamiento de las proteínas del plasma (ver p. ej. 24).

Los solventes orgánicos muestran a menudo especificidad mucho mayor como agentes de precipitación, que las sales minerales. Sin embargo tienen la propiedad de desnaturalizar las proteínas, con velocidad tanto mayor cuanto mayor sea la temperatura a la cual se trabaja. De ahí que sea necesario, al utilizar el alcohol etílico o la acetona, hacerlo a temperaturas alrededor o a veces a menos de 0º C, según la concentración del solvente.

Se pensó que, en la misma forma que era posible usar el sulfato de amonio tanto como agente precipitante, cuanto como solvente en cromatografía sobre papel de proteínas, podría también verificarse lo mismo con respecto al alcohol o la acetona.

Métodos

Dispositivos para la cromatografía.

Se adoptó el método de ascenso capilar. Como recipientes de cromatografía se utilizaron probetas de 1 ó 2 litros (según el tamaño de los papeles) cerradas con una lámina delgada de caucho A (ver fig. 12), apretada con una gomita. El solvente estaba contenido en el fondo de la probeta. Por medio de dos cortes practicados en la parte inferior del papel, se le adaptó una varilla de vidrio, B, que lo mantiene vertical, por su peso. Para asegurar la sa-

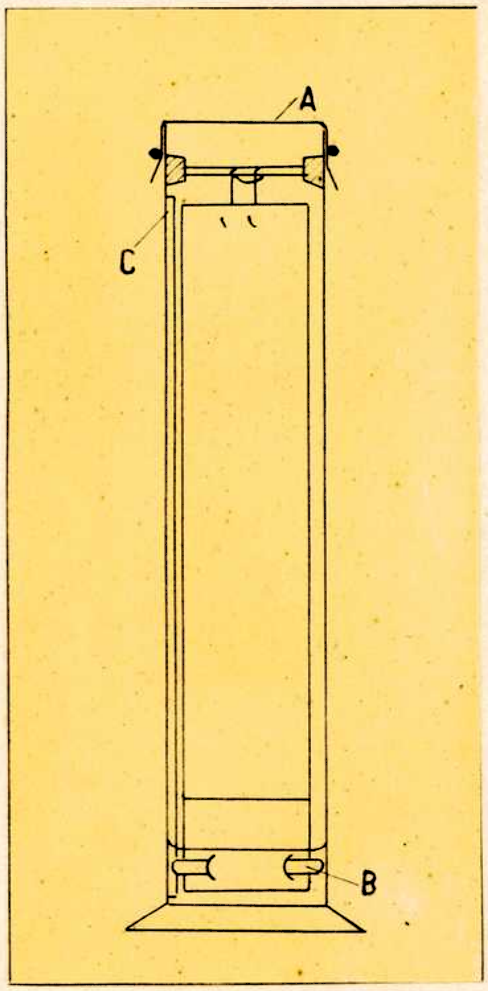

Fig. 12 - Dispositivo usado para cromatografías con etanol.

turación del ambiente se pegó a la pared interior de la probeta una tira de papel de filtro C, mojada con el solvente. La probeta se dejaba en la heladera por toda la duración de la cromatografía, a una temperatura de aproximadamente 4ºC, para evitar en lo posible la desnaturalización de las proteínas.

Papeles.

Las tiras de papel fueron de varias medidas en ancho y de unos 35 cm de largo.

Para la impregnación de papeles con buffer se procedió de la siguiente manera: se sumerge el papel en el buffer por algunos segundos, se escurre y se cuelga a secar a temperatura ambiente. Los papeles fueron impregnados en todos los casos en que los solventes eran mezclas de alcohol y buffer.

Solventes.

Mezclas alcohol etílico-agua y alcohol-buffer, de varias concentraciones. Los buffers de fosfato fueron los de Sörensen (20) de concentración M/15. El buffer de maleato se preparó según Smits (25).

Tiempo de desarrollo de los cromatogramas.

Mientras que con las soluciones de sulfato de amonio el solvente recorría 25 cm del papel en unas 4 a 6 horas, con las soluciones alcohólicas se tenían tiempos de desarrollo que variaban entre 10 y 16 horas, aumentando proporcionalmente a la concentración de alcohol en la mezcla.

Técnica de la cromatografía.

Fué en general similar a la ya descripta para los ca-

sos anteriores. Las soluciones enzimáticas o de albúmina fueron aplicadas al papel como bandas.

Valoración de actividad enzimática.

El método para la determinación de fosfoglucomutasa e invertasa fué generalmente idéntico al utilizado en las corridas efectuadas con gradiente de sulfato de amonio con el dispositivo II (ver pág. 14).

En los casos en que se midió actividad de maltasa no se pudo usar el reactivo de Somogyi, que es reducido por la maltosa. Se recurrió por lo tanto al reactivo de Barfoed, modificado por Caputto et al. (15). Además no conviene como solvente alcohol con buffer de fosfato, porque el fosfato en altas concentraciones interfiere con el reactivo citado. Se tuvo que efectuar pues la cromatografía con mezcla de alcohol y buffer de maleato. Se comprobó previamente que el extracto de enzimas utilizado (fracción del extracto de Lebedev de levadura que precipita entre 40 y 65% de saturación de sulfato de amonio: ver más adelante) contenía maltasa, y que el buffer de maleato no interfería en la determinación. Para eso se colocó una gota de 0,0024 ml del extracto sobre un trocito de papel de filtro de 2 x 3 cm y otra sobre un papel igual, pero impregnado previamente con buffer de maleato. Cada uno se incubó durante 30 minutos con 0,6 ml de una solución de maltosa que contenía 1 μM del azúcar. La reacción se detuvo agregando 1,5 ml del reactivo de cobre y luego se efectuó la valoración del poder reductor. La cantidad de substrato transformado fué la misma en los dos casos, 0,33 μM. Por lo tanto la enzima es activa y el buffer no afecta los resultados.

Para determinar maltasa después de cromatografía se

procedió en la forma ya descripta para las otras enzimas, colocando en cada tubo 1 μ M de maltosa disuelto en 0,6 ml de agua.

En los ensayos para averiguar si se hallaba presente una sacarosa-fosforilasa, se utilizaron dos series de tubos (como en general en la valoración simultánea de dos enzimas): en una serie el substrato era 1 μ M de sacarosa en 0,6 ml de agua. En la otra se había agregado además a cada tubo un buffer de fosfato de Sörensen de pH 6,5 en cantidad tal que contenía 3 μ M de P: el volumen total era aquí también de 0,6 ml. En las dos series se determinó actividad de invertasa con el método general.

Para medir actividad de rafinasa, se empleó también el método de reducción, ya que la rafinosa no es reductora (la droga comercial que se utilizó tenía sin embargo bastante blanco de reducción) mientras que sí lo son sus productos de descomposición por la invertasa, es decir melibiosa y fructosa. El substrato estaba constituído por 6 μ M de rafinosa en 0,6 ml de agua. El tiempo de incubación fué más largo que con sacarosa: 2 horas, porque la enzima era menos activa con rafinosa.

Soluciones de proteínas ensayadas.

La albúmina cristalina humana fué disuelta en agua en la concentración del 3%.

La fracción de jugo de Lebedev de S. fragilis que precipita entre 40 y 65% de saturación de sulfato de amonio se aisló en forma exactamente similar a la descripta para la levadura de cerveza en la pág. 15 y sig., excepto por los diferentes límites de concentración de la sal.

Con el mismo método se preparó la fracción de Lebedev

de levadura de cerveza que precipita entre 45 y 60% de saturación de sulfato de amonio.

Experimento para determinar los productos de reacción en los dos picos de actividad de invertasa.

Se efectuó una cromatografía en la forma habitual con buffer de fosfato y alcohol (20%) y otra con buffer de maleato y alcohol (25%). Se recortaron de cada papel dos trozos, cada uno de los cuales se sabía por experimentos anteriores que correspondía a un pico de actividad. Cada trozo de papel se colocó en un tubo de ensayo que contenía 7 ml de solución de sacarosa de 3/4 M/ml y se incubaron los 4 tubos por 3 horas a 37º C. Se detuvo la reacción coagulando las proteínas por calentamiento en bañomaría hirviente. Se decantaron los líquidos resultantes de la incubación y se midió el poder reductor de cada uno para determinar la cantidad necesaria para la sucesiva cromatografía. Se evaporaron luego a sequedad 2 ml de cada solución en sendas concavidades de una placa de toque sobre bañomaría hirviente. Se agregó alrededor de 0,01 ml de agua a cada residuo para redisolverlo y se procedió finalmente a efectuar la cromatografía de estos extractos utilizando la técnica de descenso. El solvente fué una mezcla de piridina, acetato de etilo y agua, preparada según Jermyn e Isherwood (26). Se usó papel Whatman Nº 1 en tiras de 4 cm de ancho. La solución a cromatografiar fué colocada en la línea de partida en forma de una banda de alrededor de 1 cm de ancho, por medio de una pipeta capilar. Con la mezcla ternaria utilizada los R_f de los azúcares son muy bajos y es necesario permitir que el solvente corra más allá del extremo del papel. Para eso se unió a éste por medio de broches metálicos una almohadilla absor-

bente de papel secante. Como con esta instalación no es posible calcular directamente el R_f de las substancias, fué necesario agregar a cada papel, en el punto de partida, una banda de solución al 1% de xilosa, que corre más que las hexosas y por lo tanto no molesta dando manchas mezcladas con las de los otros azúcares, y sirve además como punto de referencia: luego de desarrollados y revelados los cromatogramas, se mide la distancia desde el origen hasta el centro de cada mancha obtenida y se calcula para cada una de ellas el

$$R_{xi} = \frac{\text{distancia desde el origen hasta el centro de la mancha}}{\text{" " " " " " " " " de xilosa.}}$$

Se pueden luego comparar entre sí los R_{xi} como si fueran R_f, e identificar los distintos azúcares. Para esto último, en una de las tiras de papel se colocó una banda de una solución que contenía glucosa, fructosa, sacarosa y xilosa en la concentración del 1% de cada uno, como patrones.

Para el revelado de glucosa y xilosa se pulverizó sobre los papeles el reactivo de ftalato de anilina en butanol, según Partridge (27), calentando luego 10 minutos en la estufa a 105ºC. Para la revelación de fructosa y sacarosa se usó el reactivo de resorcina en ClH según Forsyth (28), calentando en la estufa a 85-90º C tres o cuatro minutos, hasta aparición del color. Para poder revelar un mismo papel con los dos reactivos, se lo cortó por el largo en dos tiras, una de las cuales fué tratada con ftalato de anilina, y la otra con resorcina.

Resultados

Las primeras corridas exploratívas se efectuaron con

albúmina cristalina humana y alcohol etílico acuoso de diferentes concentraciones. Se determinó la distribución de proteínas en el papel con el método de la densidad óptica a 280 mμ ya descripto. Los resultados están representados en los gráficos de la figura 13. Como se ve la albúmina se mueve en el papel como una zona bastante estrecha, cuyo R_f depende de la concentración de alcohol utilizada y es tanto mayor cuanto menor sea ésta. Estos resultados nos indujeron a repetir los experimentos, pero con extractos de enzimas y mediciones de actividad.

Para los primeros se usó la fracción del jugo de Lebedev de S. fragilis, que precipita entre 40 y 65% de saturación de sulfato de amonio. El primer solvente empleado fué alcohol 40% v/v. Se obtuvieron dos picos de actividad de fosfoglucomutasa, pero con gran difusión de las zonas de actividad a lo largo del papel. Se intentó entonces llevar a cabo cromatografías con mezclas de alcohol y buffers como solventes y con papeles impregnados con buffer (ver 29). La idea era que la modificación continua del equilibrio de las diferentes formas iónicas de las proteínas podía ser responsable de las largas "colas" observadas, y que utilizando buffers se estabilizaría el equilibrio ácido-base. Los resultados de cromatografías con buffers de fosfato de pH 7 y alcohol de diferentes concentraciones están representados en los gráficos de las figuras 14, 15 y 16. Como se ve, es posible, con una concentración adecuada de alcohol (20 ó 25%) separar fosfoglucomutasa de invertasa en forma prácticamente completa.

Se ensayó entonces la separación de las mismas enzimas de la fracción de jugo de Lebedev de levadura de cerveza que precipita entre 40 y 65% de saturación de sulfato de amonio. En la figura 17 se puede observar el resultado de una de estas experiencias: mien-

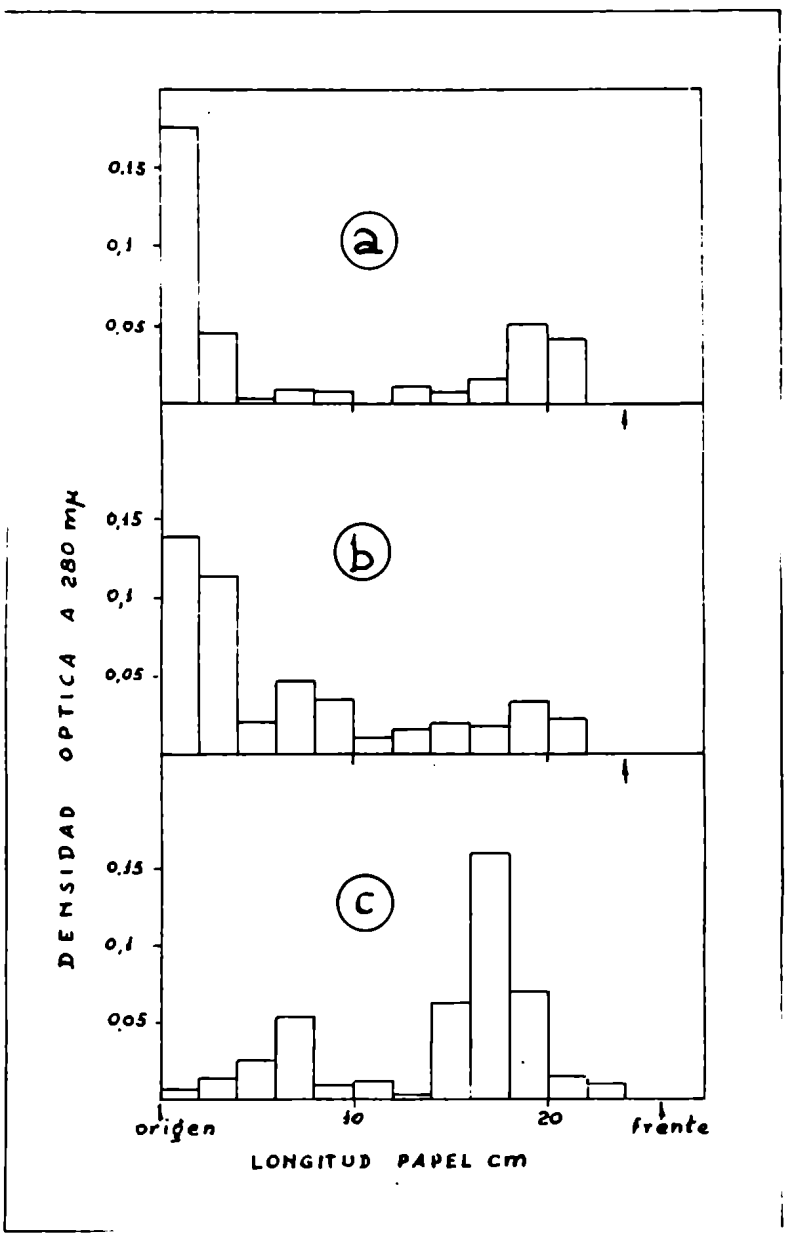

Fig. 13 - Cromatografías de albúmina cristalina de suero humano. Solvente: (a) etanol 70% v/v; (b) etanol 50% v/v ; (c) etanol 40% v/v.

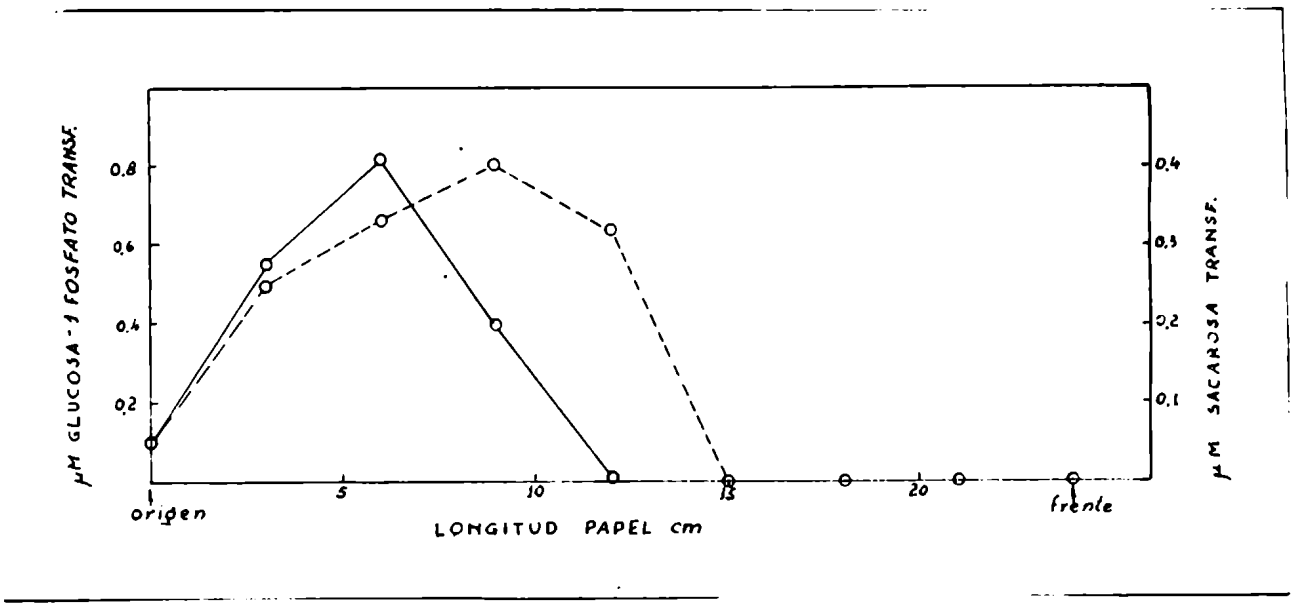

Fig. 14 - Cromatografía de extracto purificado de S. fragilis. Línea llena: actividad de fosfoglucomutasa. Línea de puntos: actividad de invertasa. Solvente: etanol 30 % v/v en buffer de fosfato de pH 7.

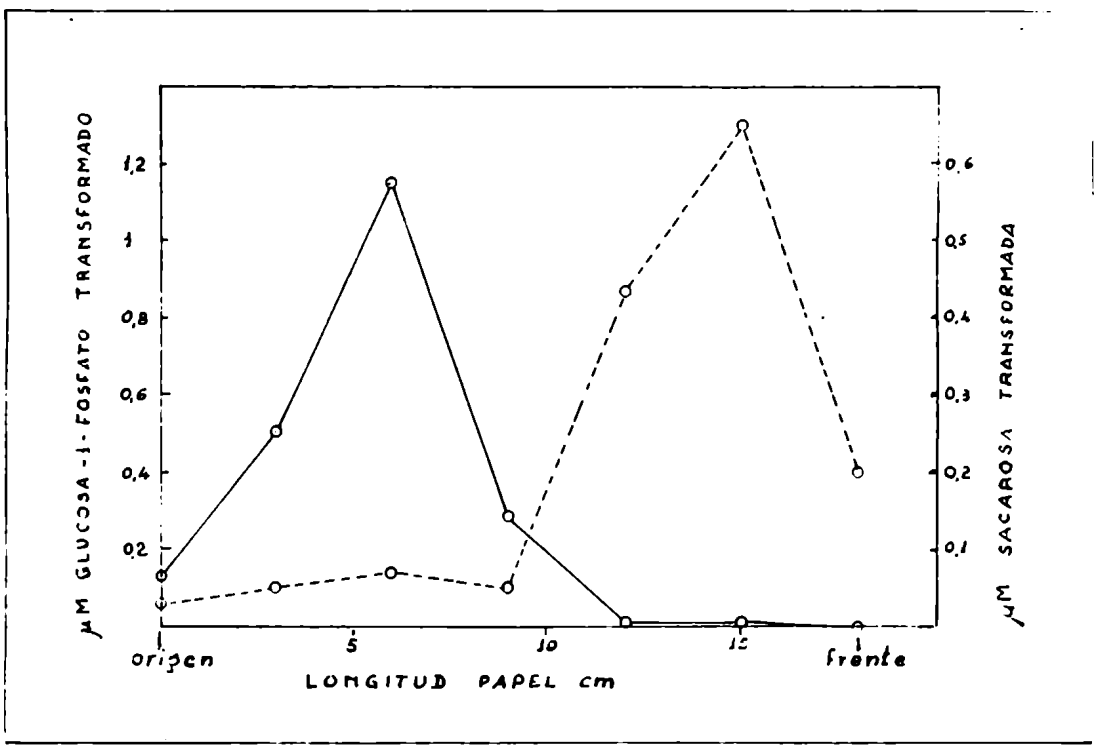

Fig. 15 - Cromatografía como en la fig. 14, pero con etanol 25% v/v en buffer de fosfato de pH 7.

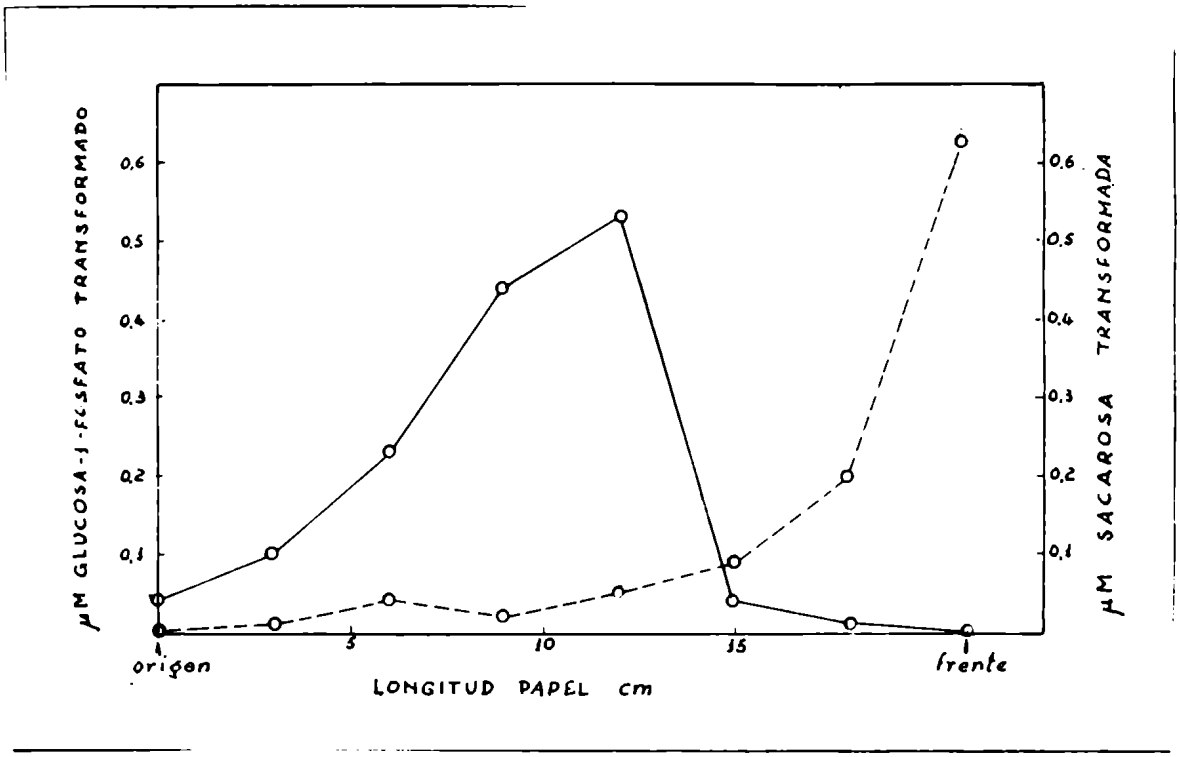

Fig. 16 - Cromatografía como en la fig. 14, pero con etanol 20% v/v en buffer de fosfato de pH 7.

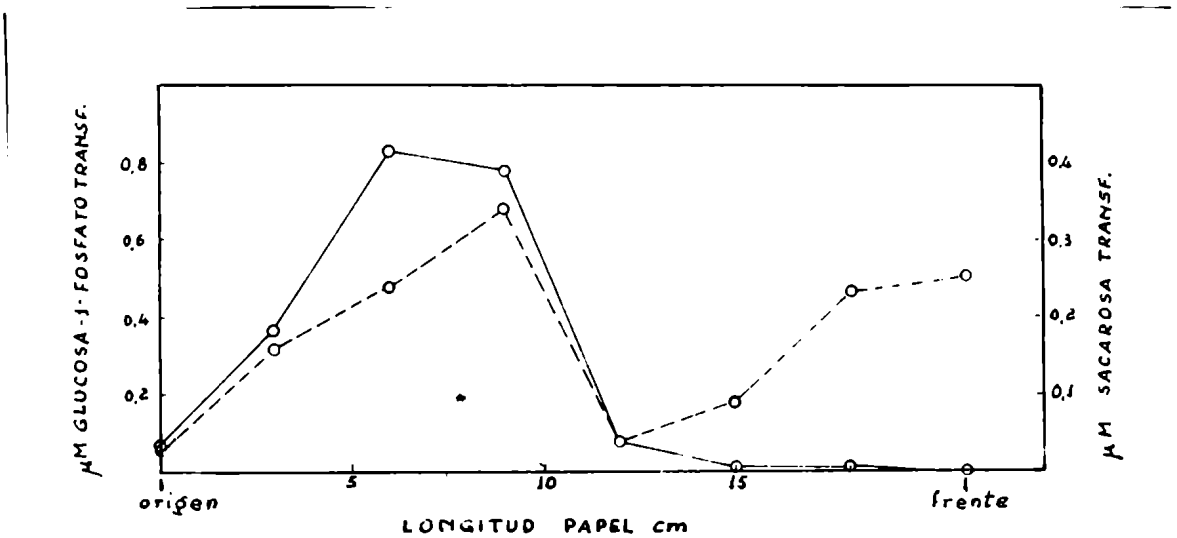

Fig. 17 - Cromatografía de extracto purificado de levadura de cerveza. Linea llena: actividad de fosfoglucomutasa. Línea de puntos: actividad de invertasa. Solvente: etanol 25% v/v en buffer de fosfato de pH 7.

tras la fosfoglucomutasa se comporta análogamente a los otros casos, la invertasa da aquí dos picos de actividad. Este hecho llamó inmediatamente la atención: por otra parte, al utilizar extracto de levadura de cerveza en cromatografía con gradiente de $SO_4(NH_4)_2$ ya se habían observado dos picos de actividad (ver pág. 17). Después de confirmar los resultados, se trató de investigar si las dos zonas de actividad enzimática correspondían o no a dos diferentes enzimas. Podían verificarse, en efecto, varias posibilidades:

1º) Una de las dos enzimas podía ser invertasa y la otra una α - glucosidasa. Según la teoría de Weidenhagen (30), las glucosidasas son específicas, existiendo una para cada tipo de unión glucosídica. Como la sacarosa es un β-fructofuranósido de α-glucosa, puede ser atacada tanto por la invertasa que es una β-fructosidasa, como por la maltasa, que es una α-glucosidasa: cada enzima atacaría la molécula en un extremo diferente, pero dando al final los mismos productos de la reacción: glucosa y fructosa. Si uno de los dos picos de acción enzimática correspondiera a una α-glucosidasa y el otro a una β-fructosidasa, eso se podría poner de manifiesto utilizando como substrato un α-glucósido: con éste se obtendría actividad en una sola zona del papel, mientras que con sacarosa se desarrolla poder reductor en la reacción en las dos.

A causa de interferir el fosfato con la determinación de poder reductor, se intentó efectuar la cromatografía con mezcla de alcohol y buffer de maleato 0,1 N a pH 6,5. Como se ve en la fig. 18 el aspecto de la curva de actividad, con sacarosa como substrato es similar al obtenido con el otro buffer. Sin embargo al efectuar las determinaciones con maltosa, después de la corri-

da, se observó que la actividad con este azúcar era prácticamente nula, es decir que se inactivaba totalmente la enzima que descomponía este substrato, posiblemente por acción del alcohol. Otras pruebas, efectuadas con α -metil-glucósido como substrato en vez que maltosa, dieron el mismo resultado. Tuvo pues que ser descartada la hipótesis con la cual se habían conducido los experimentos.

2º) Uno de los dos picos de actividad podría corresponder a la invertasa y el otro a una sacarosa fosforilasa (31): esta enzima cataliza la siguiente reacción:

$$\text{sacarosa} + \text{fosfato} \rightleftharpoons \text{glucosa-1-fosfato} + \text{fructosa}$$

Esto no parece de antemano muy probable, porque al utilizar buffer de maleato en la corrida, en vez de fosfato, al faltar este último en la mezcla reaccionante, no debía haber actividad en uno de los picos, lo que es contradicho por la experiencia (fig. 18). Sin embargo se efectuó una cromatografía con buffer de maleato y alcohol y la determinación enzimática se llevó a cabo con dos series de tubos, a una de las cuales se había agregado fosfato. Como se ve en la figura 19, las dos series dieron un resultado prácticamente idéntico. Se descartó pués también esta hipótesis.

3º) Suponiendo que se trate de dos β-fructosidasas muy parecidas, podría ser que estas difirieran en su actividad con diferentes β -fructósidos como substratos. Se valoró por lo tanto la actividad enzimática después de cromatografía con buffer de maleato y alcohol, usando como substratos sacarosa y rafinosa; esta última es el $\left[6\text{-}\alpha\text{-galactopiranosil-}\alpha\text{-D-glucopiranosa}\right]\beta$-D-fruc-

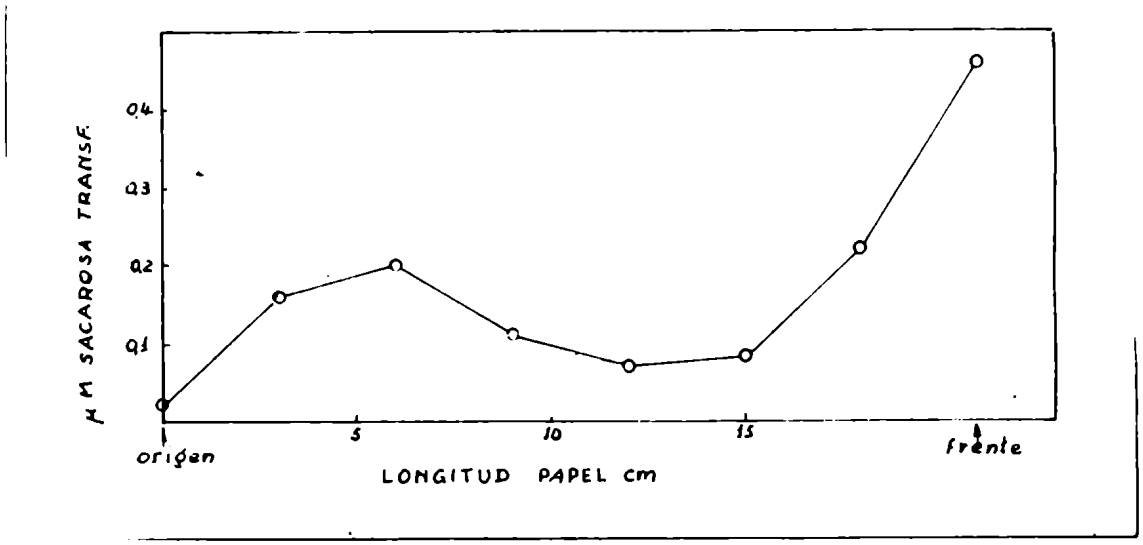

Fig. 18 - Cromatografía de extracto purificado de levadura de cerveza. Actividad de invertasa. Solvente: etanol 25% v/v en buffer de maleato de pH 6,5.

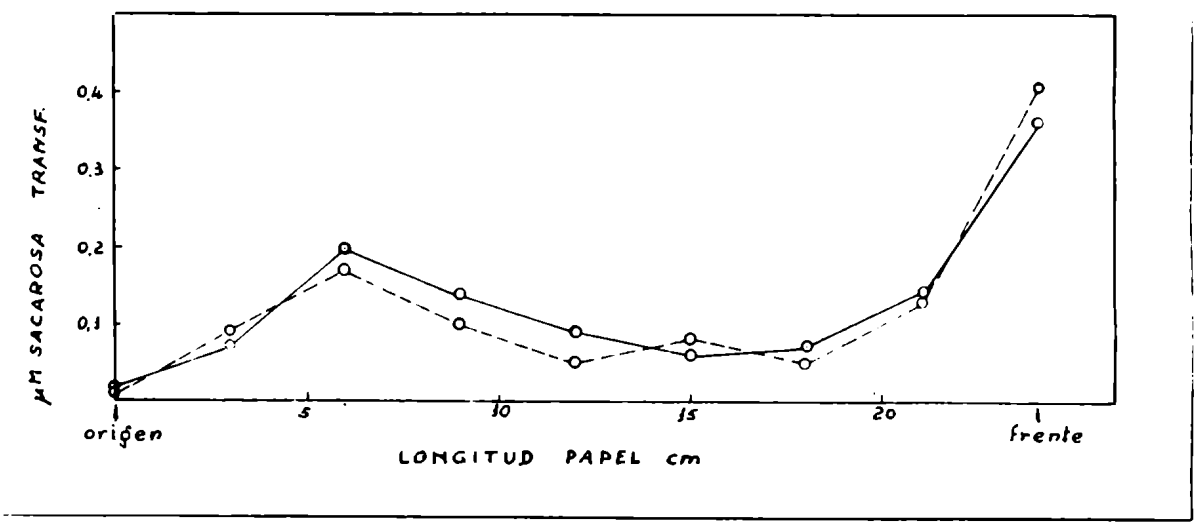

Fig. 19 - Cromatografía de extracto purificado de levadura de cerveza. Línea llena: actividad con sacarosa. Línea de puntos: actividad con sacarosa + fosfato. Solvente: etanol 25% v/v en buffer de maleato de pH 6,5.

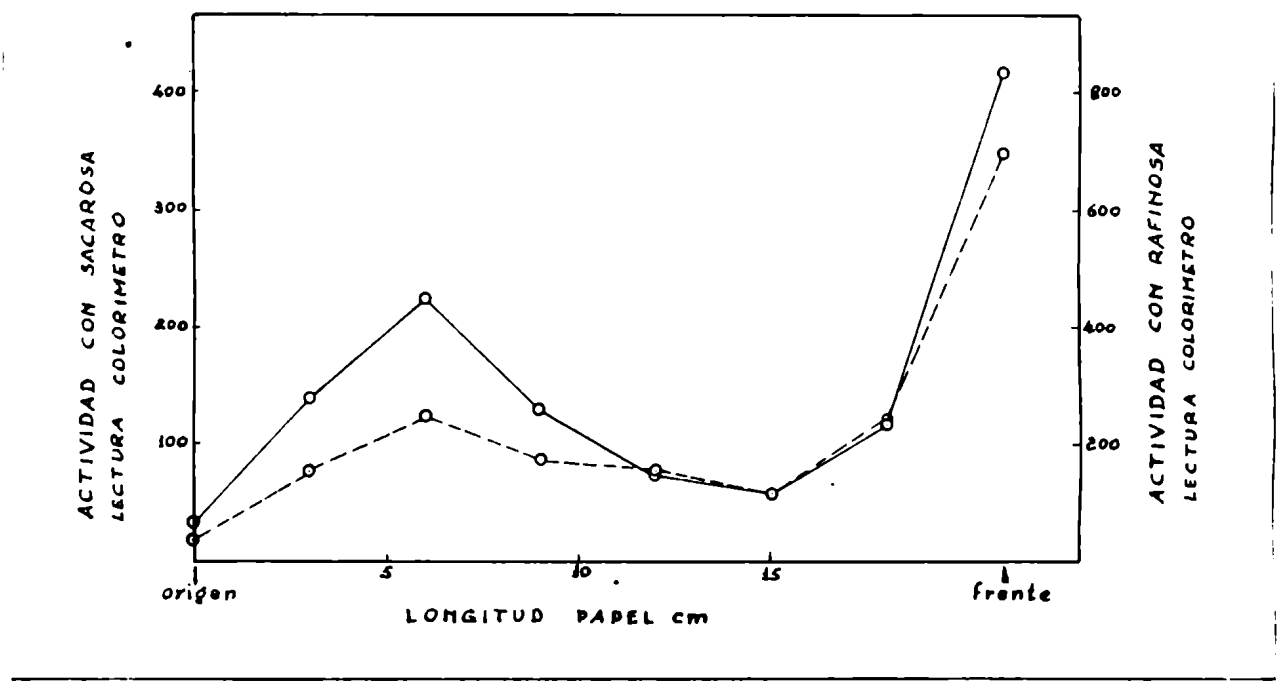

Fig. 20 - Cromatografía de extracto purificado de levadura de cerveza. Línea llena: actividad con sacarosa. Línea de puntos: actividad con rafinosa. Solvente: etanol 25% v/v en buffer de maleato de pH 6,5.

tofuranósido y contiene por lo tanto la unión de β -fructósido. La fig. 20 muestra las curvas obtenidas en uno de estos experimentos. Como se ve las curvas con los dos substratos son similares. Se obtuvieron las actividades totales de cada uno de los picos sumando los valores individuales correspondientes, y se vió que la relación de actividad entre el 1º y el 2º pico era aproximadamente la misma (entre 1,5 : 1 y 1 : 1) en los dos casos.

En cambio, al correr la enzima con buffer de fosfato y alcohol (20% v/v), se observó en tres experimentos efectuados que, mientras que con sacarosa el primer pico (el más lento) era más activo que el segundo (relación de actividad aproximadamente 2: 1), con rafinosa sucedía al revés (la relación era aproximadamente 1: 3). La explicación de este hecho no es clara y no parece ser sencilla.

Para asegurarse finalmente que los productos de la reacción con sacarosa eran los mismos para las dos zonas de actividad y con cualquiera de los dos buffers, se los identificó por cromatografía de papel. Los detalles experimentales se hallan en la pág. 22 . Se tenían 4 papeles, cada uno de los cuales correspondía a uno de los picos con uno de los buffers. En cada papel aparecieron dos manchas de cetosas, una de aldosa y una de pentosa, esta última proveniente de la xilosa agregada. Se calcularon los R_{xi} para cada mancha, que están representados en el cuadro II. Como se ve, en los 4 líquidos resultantes de la incubación había sacarosa (substrato no transformado) glucosa y fructosa. Se comprueba así que los dos picos corresponden con toda probabilidad a actividades de invertasa.

Cuadro II

Identificación de los Productos de la Reacción en los dos Picos de Actividad de Invertasa

Procedimiento explicado en el texto.

	Color con ftalato	Color con resorcina	R_{xi}			
			Pico I		Pico II	
			Buffer fosfato	Buffer maleato	Buffer fosfato	Buffer maleato
Mancha Nº 1	-	rosado	0,49	0,51	0,50	0,38
" Nº 2	marrón	-	0,66	0,65	0,65	0,65
" Nº 3	-	rosado	0,74	0,75	0,75	0,77
" Nº 4	rojizo	gris azulado	1	1	1	1
Sacarosa	-	rosado	0,52			
Glucosa	marrón	-	0,68			
Fructosa	-	rosado	0,78			
Xilosa	rojizo	gris azulado	1			

Cromatografía de proteínas del suero y plasma

Al aparecer en la literatura reciente algunos métodos sensibles para revelado de proteínas en el papel, se pudo extender el presente trabajo al estudio de la posibilidad de separar cromatográficamente las proteínas del plasma.

Métodos.

Dispositivo para la cromatografía.

En general se usó el mismo que para la cromatografía de enzimas: método de ascenso y como recipientes probetas de 1 ó 2 litros, mantenidas en la heladera. Cuando se ensayaron gradientes de $SO_4(NH_4)_2$ se empleó el aparato I.

Papeles.

Los papeles tenían un ancho de 4 cm cuando se corría una sola muestra y de 7,5 cm cuando se corrían 3 muestras a la vez. En todos los casos en que el solvente contenía buffer, el papel se impregnó con éste, según la técnica ya descripta en la pág. 19.

Solventes.

Las mezclas de alcohol etílico-agua fueron de varias concentraciones. La acetona se usó en la concentración del 30% v/v. Los buffers de fosfato y de maleato fueron los mismos que se utilizaron para la separación de enzimas. El buffer acético-acetato se obtuvo mezclando soluciones 0,1 N de ácido acético y acetato de sodio.

Técnica de cromatografía.

Las soluciones de proteínas fueron depositadas en el papel en gota o en banda, según el método ya descripto. Las gotas fue-

ron de 5 μ l.

El solvente se dejaba subir unos 20 a 25 cm, lo que tardaba diferente número de horas según el solvente empleado (ver pág.19) Luego se sacaba el papel de la probeta, se marcaba con lápiz el frente del solvente y se secaba durante 5 minutos en la estufa a 100ºC.

Revelado.

Se usó el método de Durrum (11), que consiste en sumergir por 5 minutos el papel en una solución alcohólica saturada de Cl_2Hg que contiene un 0,1% de azul de bromofenol; luego el papel se lava en agua corriente hasta que haya desaparecido el color azul de las partes donde se sabe que no puede haber proteínas. Los sitios donde se encuentran éstas quedan coloreados en azul sobre fondo blanco.

Soluciones de proteínas ensayadas.

Albúmina cristalina de suero humano: solución al 6%.

γ -globulina de suero de caballo: solución al 2%.

Plasma de caballo: se obtuvo haciendo sedimentar sangre oxalatada.

Suero humano: dejando coagular sangre normal y centrifugando.

Suero de conejo: se obtuvo por centrifugación de sangre desfibrinada.

Separación de albúmina y globulinas del suero de conejo.

A 5 ml de suero de conejo se agregó igual volumen de solución saturada de sulfato de amonio; se centrifugó, se separó el sobrenadante (fracción I) y se redisolvió el precipitado en 4 ml. de

agua. Se repitió la precipitación con $SO_4(NH_4)_2$ a 50% de saturación (concentración final) y la misma se efectuó dos veces más. El último precipitado se disolvió en unos 2 ml de agua y se dializó por tubos de celofán contra buffer de fosfato de Sörensen de pH 6,5 unas 18-20 horas en la heladera. Durante la diálisis una parte de las proteínas precipitó. Se agregó entonces PO_4H_2K en pequeñas porciones hasta redisolución casi completa del precipitado. Para clarificar la solución algo opalescente, se centrifugó: el líquido obtenido contiene prácticamente todas las globulinas: el volumen final fué de 5,2 ml.

A la fracción I se agregó solución saturada de sulfato de amonio hasta llegar a una concentración final del 75% de saturación. Se filtró por papel plegado y el precipitado se redisolvió en el menor volumen posible de agua y luego se reprecipitó llevándolo de nuevo a 75% de saturación con solución saturada de sulfato de amonio. Se filtró, se redisolvió el precipitado en 1-2 ml de agua y se dializó por 6-8 horas contra agua en la heladera. La fracción obtenida contenía la albúmina. El volumen final fué de 2,4 ml pero no se llevó a los 5 ml originales porque al sacar los precipitados de los filtros se producen inevitables pérdidas de material.

Naturalmente cada una de las fracciones queda contaminada con pequeñas cantidades de la otra.

Resultados.

Mezclas alcohol etílico-agua.

Se observó en general con el suero o el plasma, que una parte de la proteína quedaba en el origen o se movía muy poco, dando una estría más o menos alargada, mientras que otra parte se mo-

vía con mayor o menor rapidez, dando una mancha, que coincidía aproximadamente con la de albúmina: esta última no dejaba estría en el origen (ver fig. 21).

La hipótesis más probable era que la estría en el origen correspondía a las globulinas y la mancha a la albúmina de suero o plasma. Como se verá más adelante, esta hipótesis fué comprobada.

La mancha de albúmina va variando su R_f según la concentración de alcohol; también varía su forma, y se hace tanto más alargada y difusa, cuanto más diluído es el alcohol. Además la albúmina, cuando se corre suero o plasma enteros, tiene un R_f menor que cuando se corre sola. La confirmación de este hecho y su probable explicación se tratarán más adelante (pág. 43).

El cuadro III muestra los R_f de albúmina en diferentes condiciones. La albúmina cristalina corrida con alcohol 40% v/v da origen a 2 manchas, una de $R_f \simeq 0{,}1$ y la otra de $R_f \simeq 0{,}60$. Esto no ha tenido explicación hasta el momento.

Se observó además, y esto es general, también para los solventes de los cuales se tratará más adelante, que, aún en el caso en que se corre una proteína presumiblemente pura, como la albúmina cristalina, se produce, además de una mancha más o menos nítida, una especie de larga "cola", o sea una estría, que va desde el punto de partida hasta la mancha, y que muestra una débil coloración azulada, como si la proteína al avanzar dejara una especie de reguero tras sí. Esta cola es mucho más pronunciada cuando se corre suero, que cuando se corre albúmina sola. (ver fig. 21).

Por lo que se refiere a las globulinas, el comportamiento de éstas varía sólo en cuanto la estría que originan se hace tanto más larga cuanto más diluído es el alcohol. Sin embargo no

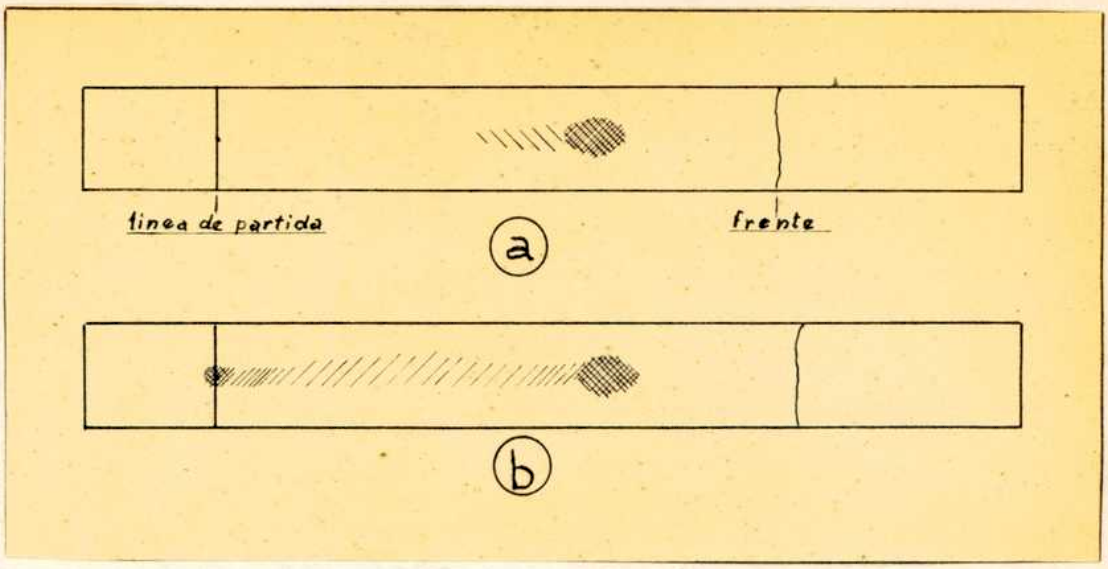

Fig. 21 - (a) Cromatografía de albúmina cristalina. Solvente: etanol 30% v/v. R_f = 0,68. (b) Cromatografía de suero humano. Mismo solvente que en (a). R_f de la mancha de albúmina = 0,67. El rayado representa aproximadamente la intensidad de coloración de las manchas.

Fig. 22 - Cromatografía con etanol 40% v/v en buffer de fosfato de pH 6,5. A: plasma caballo. B: albúmina cristalina. C: suero humano.

hay separación visible entre las varias globulinas a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Vale la pena recordar, finalmente, que cuanto más alta sea la concentración del alcohol, tanto más intenso resulta el color que da el reactivo con las proteínas. Aparentemente el alcohol afecta a las proteínas en forma tal que aumenta su capacidad de combinación con el colorante.

Mezclas alcohol etílico-buffer de fosfato.

Se hicieron primero experiencias a pH constante (6,5) y variando la concentración de alcohol (de 10 a 40% v/v). Comparando los resultados obtenidos con alcohol-agua con los de alcohol-buffer a igual concentración de alcohol, se pueden observar algunas diferencias:

1º) Generalmente las manchas son más alargadas con buffer que con agua. Las globulinas sobre todo dan estrías mucho más extendidas.

2º) A la concentración de 10 y 20% de alcohol en buffer la albúmina se separa de las globulinas y tiene un R_f poco mayor que en el caso de las correspondientes mezclas de alcohol-agua (ver cuadro III); al aumentar la concentración de alcohol hasta 30 ó 40% las diferentes proteínas del suero no se separan : el cromatograma tiene el aspecto representado en la fig. 22.

Las variaciones en pH tienen influencia en los resultados. Se ensayaron los pH 4,4 , 5,3 , 6,5 (éste en los experimentos ya citados) y 8. El pH 4,4 fué obtenido por medio de buffer

Cuadro III

Variación del R_f de la Mancha de Albúmina con la Concentración de Etanol

Concentración de etanol v/v	Solución corrida	R_f	
		Con agua	Con buffer
10%	Albúmina	0,86	0,91
"	Suero humano	0,80	0,88
"	Plasma caballo	-	0,81
20%	Albúmina	0,81	0,90
"	Suero humano	0,75	0,78
"	Plasma caballo	-	0,83
30%	Albúmina	0,68	-
"	Suero humano	0,67	-
40%	Albúmina	0,60	-
"	Suero humano	0,45	-

de ácido acético-acetato de sodio 0,1 N. Los otros, todos con buffers de fosfato. En todos estos experimentos la concentración de alcohol fué del 20% v/v.

A pH 5,3 y 8 los resultados no difieren mucho de los obtenidos a pH 6,5, como se ve de los R_f del cuadro IV. Sin embargo hay algunas variaciones en el aspecto de los cromatogramas: a pH 8 las coloraciones son muy débiles: aparentemente a ese pH el colorante no se combina fácilmente con las proteínas del suero. A pH 5 se observan colas muy largas detrás de las manchas de albúmina. A pH 4,4 en cambio se obtuvieron, tanto con suero y plasma como con albúmina, largas estrías que partían del origen, sin separación de las fracciones.

Cuadro IV

Variación del R_f de la Mancha de Albúmina con el pH

Concentración de etanol: 20% v/v.

Solución corrida	R_f		
	pH 5,3	pH 6,5	pH 8
Albúmina	0,83	0,90	0,81
Suero humano	0,78	0,78	0,81
Plasma caballo	0,77	0,83	0,81

Los experimentos a pH 5,3 y 4,4 se repitieron más tarde utilizando suero de conejo y las fracciones de albúmina y globulinas del mismo, separadas por precipitación con sulfato de amonio. A pH 5,3 los resultados fueron parecidos a los alcanzados con suero de hombre y plasma de caballo. Se confirma que la albúmina corre dejan-

do larga cola, pero dentro de ésta se puede distinguir otra mancha, como se indica en la fig.23. Las globulinas, como en casos anteriores, dan una estría que parte del origen, sin separarse entre sí.

A pH 4,4 el comportamiento es algo diferente. Como se ve en la fig. 24, al correr suero se obtiene una estría en el origen y una mancha; la estría en el origen corresponde a las globulinas, pero también, como se ve, a una fracción de la albúmina, que aquí aparentemente se divide en dos partes.

Mezclas de alcohol con otros buffers.

Ya hemos descripto los resultados con buffer de acetato. Fué ensayado también buffer de maleato a pH 6,5, con un 25% de alcohol. Con este solvente la fracción de albúmina del suero de conejo parece también dividirse en dos partes, la principal de las cuales da una mancha bien definida, y la otra una estría larga. Las globulinas dejan una mancha en el origen, que posiblemente puede atribuirse a proteína desnaturalizada "in situ" y otra, la principal, que se aleja un poco: ver fig. 25. Si se corre γ-globulina de suero de caballo, ésta da manchas del mismo aspecto que la fracción de globulinas totales: parece por lo tanto que tampoco en este caso ha habido separación entre las fracciones.

Mezclas acetona-agua.

Se usó una mezcla que contenía el 30% v/v de acetona. Los resultados son parecidos a los obtenidos con alcohol, con la diferencia que, en forma algo semejante al caso del buffer de maleato, las globulinas dan una mancha en el origen y otra que se aleja del mismo. Un resultado típico está representado en la fig. 26. Aquí también el uso de la γ-globulina no aclaró las cosas.

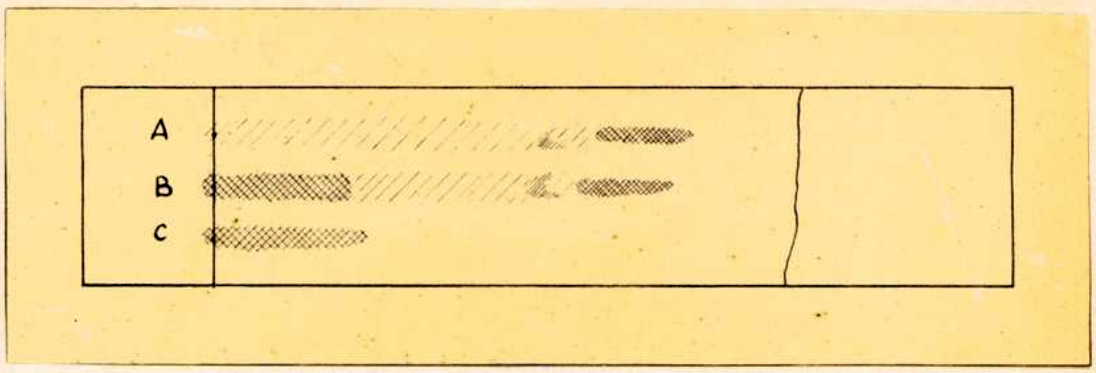

Fig. 23 - Cromatografía de suero de conejo y sus fracciones con etanol 20% v/v en buffer de fosfato de pH 5,3. A: fracción albúmina. B: suero entero. C: fracción globulinas.

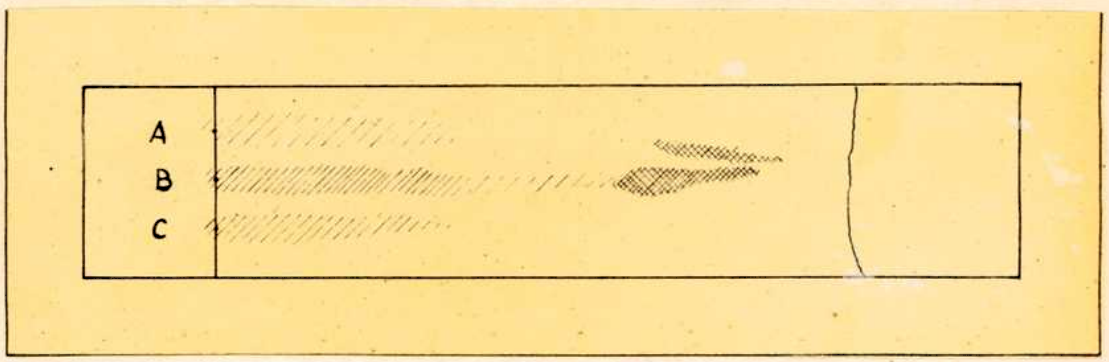

Fig. 24 - Cromatografía de suero de conejo y sus fracciones con etanol 20% v/v en buffer de acetato de pH 4,4. A: fracción albúmina. B: suero entero. C: fracción globulinas.

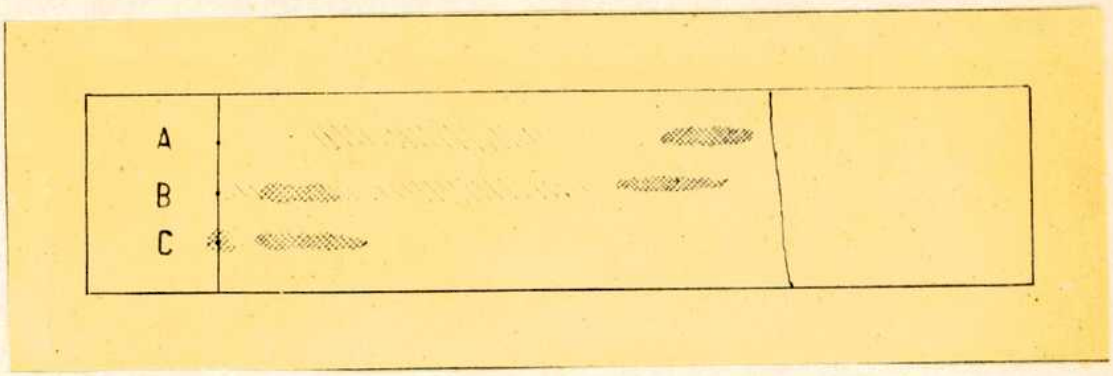

Fig. 25 - Cromatografía de suero de conejo y sus fracciones con etanol 20% v/v en buffer de maleato de pH 6,5. A: fracción albúmina. B: suero entero. C: fracción globulinas.

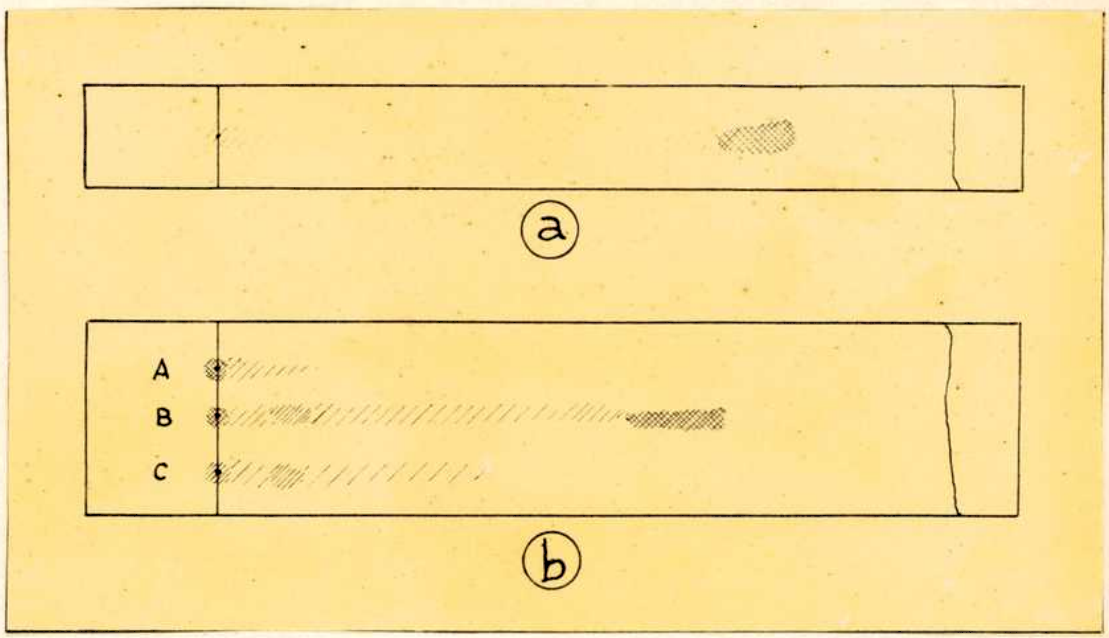

Fig. 26 - Cromatografías con acetona 30% v/v :

(a) Fracción albúmina de suero de conejo: $R_f = 0,73$.

(b) A: γ-globulina de suero de caballo. B: suero de conejo; R_f de la mancha de albúmina: 0,62. C: fracción globulínica del suero de conejo.

Buffers sin solvente orgánico.

Experimentos de este tipo ya fueron llevados a cabo por Franklin y Quastel (3). Corriendo suero de conejo con buffer de fosfato de Sörensen de pH 6,5 se observa una sola mancha, de R_f 0,8-0,9, seguida por una cola larga y tenue. La fracción de globulinas del mismo suero, corrida independientemente, da una estría larga, sin manchas definidas. Parece así que este tipo de solvente no es apto para dar buenas separaciones.

Con otros sueros y con plasma los resultados son parecidos.

Soluciones de sulfato de amonio.

Al poder efectuar eficientemente el revelado de las proteínas, se repitieron, ésta vez con suero y sus fracciones, algunas experiencias efectuadas al comienzo de este trabajo. Se produjo un gradiente de $SO_4(NH_4)_2$ con el aparato I (fig. 3), colocando en el tubo B del mismo sulfato de amonio de 40% de saturación. Aunque se obtuvo cierta separación entre albúmina y globulinas, ésta fué inferior a la conseguida con solventes orgánicos, debido a la forma muy alargada de las manchas y las colas muy extendidas. Por otra parte el $SO_4(NH_4)_2$ de concentración constante, 20, 40, ó 60% de saturación, se revela como un solvente menos conveniente aún, por un aumento ulterior de los defectos citados.

Cambio de temperatura.

Se efectuó una corrida a -5ºC con mezcla de alcohol-agua (20% de alcohol) para ver si, por menor desnaturalización de las proteínas, variaban los resultados; pero no se obtuvo cambio apreciable en la separación ni en el R_f.

Confirmación de la separación entre albúmina y globulinas.

Para este fin se procedió a separar la albúmina de las globulinas del suero de conejo por precipitación diferencial con $SO_4(NH_4)_2$: las globulinas son precipitadas por el sulfato de amonio a 50% de saturación, mientras que la albúmina queda en solución en esas condiciones. Se efectuó una serie de corridas colocando en el papel, una al lado de la otra, 3 gotas, una de la fracción albúmina, otra de la fracción globulinas y otra de suero: el resultado se puede observar en la fig. 27. Se ve perfectamente la correspondencia de las manchas dadas por cada una de las dos fracciones con las originadas por el suero entero.

Se observa además, como ya se vió en una oportunidad anterior, que el R_f de la albúmina es mayor cuando se la corre sola, que cuando se encuentra en el suero. Para descartar que la proteína hubiera sido modificada por el procedimiento de fraccionamiento empleado, se mezclaron entre sí cantidades iguales de las fracciones albúmina y globulinas obtenidas, y se corrió la mezcla al lado de cada una de las fracciones separadas. El resultado fué idéntico: se reprodujo prácticamente el mismo cromatograma dado por el suero, con la diferencia de R_f de las dos manchas de albúmina.

Por otra parte debemos observar de nuevo que, cuando se corre sea suero, sea una mezcla artificial de las fracciones albúmina y globulinas, se tienen colas mucho más marcadas que cuando la albúmina se corre sola: la interpretación de estos hechos se discutirá más adelante (pág. 43).

La separación en diferentes fracciones del suero de conejo, sirvió además para repetir experiencias con éstas, en casos

Fig. 27 - Cromatografía de suero de conejo y sus fracciones con etanol 30% v/v. A: fracción albúmina: R_f = 0,73. B: suero entero; R_f de la mancha de albúmina: 0,66. C: fracción globulinas.

Fig. 28 - Albúmina cristalina corrida como banda. Solvente: etanol 30% v/v.

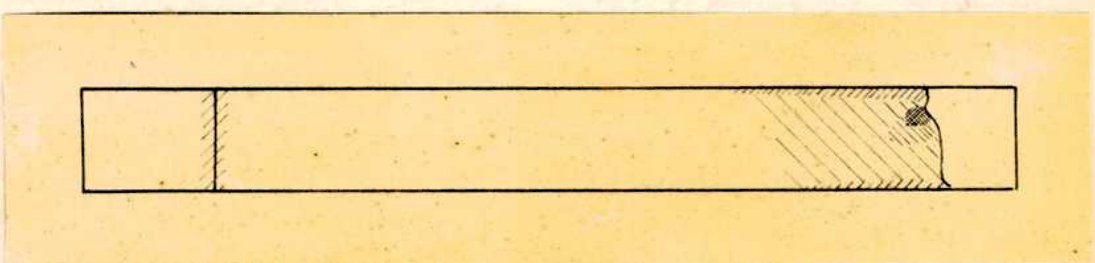

Fig. 29 - Albúmina cristalina corrida como banda. Solvente: etanol 10% v/v.

que habían quedado dudosos después de las cromatografías con suero humano, plasma de caballo y albúmina pura. Ya nos hemos referido anteriormente a esos experimentos, como también a varios de los que se efectuaron con γ-globulina. En general, al ser corrida ésta al lado de la fracción globulínica del suero de conejo dió una mancha parecida a la de ellas, aunque por lo común menos alargada: como tanto la γ-globulina sola como la mezcla de todas las globulinas se quedan prácticamente en el origen, no es posible decidir con seguridad si hay o no alguna separación.

Diferencias provenientes de la manera de colocar la solución en el papel.

Aunque la mayoría de las veces la solución de proteínas fué colocada en el papel en forma de gota, han sido efectuadas también muchas experiencias en las cuales se ha extendido la solución a todo lo ancho de la tira, en forma de una banda, como por otra parte se había hecho siempre con las enzimas. Se observaron dos diferencias fundamentales respecto del método anterior: en primer lugar el R_f de una misma proteína es algo mayor cuando se la coloca en banda que cuando se la deposita como gota. Algunos ejemplos están representados en el cuadro V. Otro hecho interesante es que el aspecto de la banda, una vez desarrollado el cromatograma, varía entre ser muy uniforme (ejemplo fig. 28) y sumamente irregular (ejemplo fig. 29), dependiendo ésto en gran parte del solvente usado. Al disminuir la concentración de alcohol, suele aumentar la inhomogeneidad de la banda, que llega inclusive a dividirse en una serie de sectores (fig. 29). Las irregularidades son sobre todo evidentes en los bordes del papel, donde se pueden observar a menudo largas estrías.

Cuadro V

Influencia de la Forma de colocar la Solución sobre el Papel

En el caso del suero los R_f se refieren a la mancha de albúmina.

Solvente	Proteínas	R_f	
		En gota	En banda
Etanol 30 %	Albúmina	0,68	0,72
"	Suero humano	0,67	0,73
Etanol 40 %	Albúmina	0,60	0,68
"	Suero humano	0,45	0,57

Reproducibilidad de los resultados.

La reproducibilidad de los resultados es bastante buena. Los R_f varían de una vez a otra, pero generalmente en no más del 10 %, lo cual es bastante satisfactorio en experimentos de esta clase.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Cromatografía de enzimas.

Los experimentos efectuados con gradiente de sulfato de amonio demuestran que en algunos casos es posible obtener picos definidos de actividad de las enzimas en el papel. Sin embargo el método presenta varios inconvenientes: en primer lugar, a menos que las enzimas corran con el frente, éstas se distribuyen en una zona muy amplia del papel; en segundo lugar, la alta concentración salina puede interferir con la actividad de muchas de ellas, y finalmente existe la imposibilidad comprobada de obtener un gradiente continuo de concentración.

El uso de mezclas de alcohol con agua y con buffer parece representar una mejora importante: las enzimas corren manteniéndose en zonas más restringidas, con menos "cola"; la recuperación de actividad es mejor, en parte, posiblemente, debido a la baja temperatura a la cual se lleva a cabo el experimento y además a causa de la baja concentración de sales; el método es más sencillo, no existiendo necesidad de emplear aparatos más o menos complicados para producir gradientes; se puede hacer variar casi a voluntad el movimiento de las enzimas en el papel, cambiando la concentración de alcohol. Sin embargo, no obstante haberse comprobado la posibilidad de separar enzimas entre sí, es indudable que el método dista de tener el poder resolutivo de la cromatografía en papel de azúcares o de aminoácidos, por ejemplo. Aún en los casos más favorables se encuentra la actividad enzimática distribuída a lo largo de seis o siete centímetros de papel, sobre una distancia total recorrida por el solvente de unos 25 cm. No parece que el aumento de este recorrido

pueda mejorar mucho las cosas, ya que los picos tienen tendencia a achatarse y ensancharse en esas condiciones.

Por otra parte la reproducibilidad de los resultados es bastante grande, considerando el material con que se trabaja y los errores de los métodos de valoración: en experimentos duplicados o repetidos varias veces, las curvas obtenidas fueron esencialmente las mismas, aunque podían variar un poco en el aspecto cuantitativo, lo que no puede sorprender, conociendo la cantidad de factores de los cuales depende la actividad enzimática.

Un caso interesante parece ser el de la invertasa con sus dos picos de actividad. En una reciente publicación Reid (6) observa un comportamiento similar en la enzima poligalacturonasa corrida con los métodos de Franklin y Quastel, y afirma además que la misma enzima da origen a cuatro picos diferentes de actividad, cuando se usan como solventes mezclas de acetona y agua. Parecería pues que las enzimas pueden existir en diferentes especies moleculares, aunque no es posible determinar en forma definitiva si en realidad no difieren estas moléculas en algunas propiedades enzimáticas, además de físicas y estructurales. Esto último lo indicarían algunos de los experimentos descriptos con sacarosa y rafinosa como substratos.

No obstante sus imperfecciones, parece pues que el método puede tener algunas aplicaciones útiles: por ejemplo cuando se dude de si es una sola o son varias las enzimas que actúan sobre diferentes substratos; y también posiblemente en casos en que se tenga que decidir si una determinada transformación química se efectúa a través de uno o más pasos, catalizados por diferentes enzimas.

Un factor que es importante no olvidar, finalmente, es que el método puede serespecialmente útil en los casos en que se dis-

ponga de cantidades muy pequeñas de material. El volumen total de soluciones de enzimas sometidas a cromatografía en toda esta investigación no pasa de algunos mililitros.

Cromatografía de proteínas de la sangre.

Como ya se ha dicho, ha sido posible encontrar gran número de solventes que separan con bastante facilidad la albúmina del suero de las globulinas. La diferencia de movilidad es muy grande, puesto que las globulinas se quedan prácticamente en el origen. Con ninguno de los solventes utilizados ha sido posible separar las globulinas en varias fracciones, ni hacerlas mover en forma más o menos compacta a lo largo del papel. Con los solventes más diluídos en alcohol y con los buffers acuosos las globulinas se mueven más, pero dando largas estrías sin apariencia de separación entre los componentes, como lo confirma por otra parte la comparación con la γ-globulina.

Además se ha hecho notar en la parte experimental que cuando la albúmina se corre junto con las globulinas, sea en el suero o en mezclas formadas artificialmente con las fracciones separadas previamente, su R_f es menor y las "colas" son más pronunciadas. La explicación más inmediata de estos hechos es que la albúmina se combina con las globulinas, cosa por otra parte que ya se sabe que ocurre en solución. El hecho que, cuanto más concentradas sean las soluciones alcohólicas usadas para desarrollar el cromatograma, tanto más nítidas son las separaciones, hace pensar que el alcohol en concentraciones relativamente elevadas disocia con mayor facilidad estas combinaciones.

Ya se ha hecho referencia a las diferencias observadas según la manera de depositar la solución de proteínas en el papel, en gota o en banda. Estos fenómenos tienen probablemente su explicación

en el hecho de que el solvente no sube de manera uniforme a través de la banda de proteína, sino que se infiltra por puntos determinados, desplazándose después lateralmente, hasta llenar todo el ancho del papel y produciendo por lo tanto movimientos horizontales de material proteico, que se distribuye así irregularmente. Es lógico que este fenómeno sea más pronunciado en los casos en que el solvente sube con mayor rapidez por el papel, que es justamente con las soluciones alcohólicas más diluídas.

Esta dificultad del solvente para penetrar a la solución de proteínas se verifica naturalmente también cuando ésta se encuentra en forma de gota: aquí el solvente suele rodear la gota antes de arrastrar las proteínas, lo que determina probablemente que los R_f resulten más pequeños.

Con los buffers sin alcohol por otra parte y con las mezclas que contienen pequeña concentración del mismo es dable observar un desplazamiento lateral de las manchas, respecto del punto de partida, que se puede atribuir a las mismas causas.

Probablemente tienen alguna explicación parecida las dos manchas que se producen con la albúmina corrida con alcohol 40%, según hemos indicado en la página 32, ya que si la misma albúmina se corre como banda, no se descompone en dos fracciones.

La dificultad que experimenta el solvente para penetrar en la gota de solución aumenta mucho cuando se deja secar la misma antes de efectuar la corrida.

En un reciente trabajo Franklin y Quastel (5) obtienen una serie de resultados que podrían ser explicados por las consideraciones arriba formuladas. Estos autores extienden sus anteriores métodos de separación de proteínas, que ya hemos citado, al caso del sue

ro humano y de varios animales, por medio de la cromatografía en papel bidimensional. Para eso colocan una gota de suero, por ejemplo, en una esquina de un cuadrado de papel de 20 cm de lado, y, una vez dejada secar la gota, la corren en una dimensión con solución de sacarosa 0,1 N. Dejan secar luego el papel y efectúan una corrida en la otra dimensión (a 90º de la primera) con tartrato sódico-potásico 0,1 N. El revelado lo efectúan estos autores con el método que ya emplearon otra vez (3), agregando hemina a la solución proteica y pincelando el papel con una solución de bencidina. El resultado es un diagrama como el representado en la fig. 30. Si se agregan detergentes sintéticos al suero antes de correrlo, el aspecto del cromatograma es del tipo de la fig. 31. Aunque los autores no lo dicen muy explícitamente, parece ser que suponen que cada una de las manchas es una diferente fracción proteica. Eso no es muy probable por varias razones:

1º) Repetimos las experiencias de Franklin y Quastel (') con suero de conejo y comprobamos que la reproducibilidad de los resultados es muy pobre: se obtiene cada vez un cromatograma de la misma apariencia general, pero sin correspondencia entre las manchas.

2º) Cuando estos autores corren la fracción globulínica del plasma, ésta se mueve sólo en la primera dirección, dando una larga estría. Por lo tanto todas las fracciones aparentemente separadas deberían provenir de la albúmina.

3º) El frente del solvente es sumamente irregular y las manchas de

---

(') La única diferencia fué el método de revelado para el cual se utilizó el azul de bromofenol.

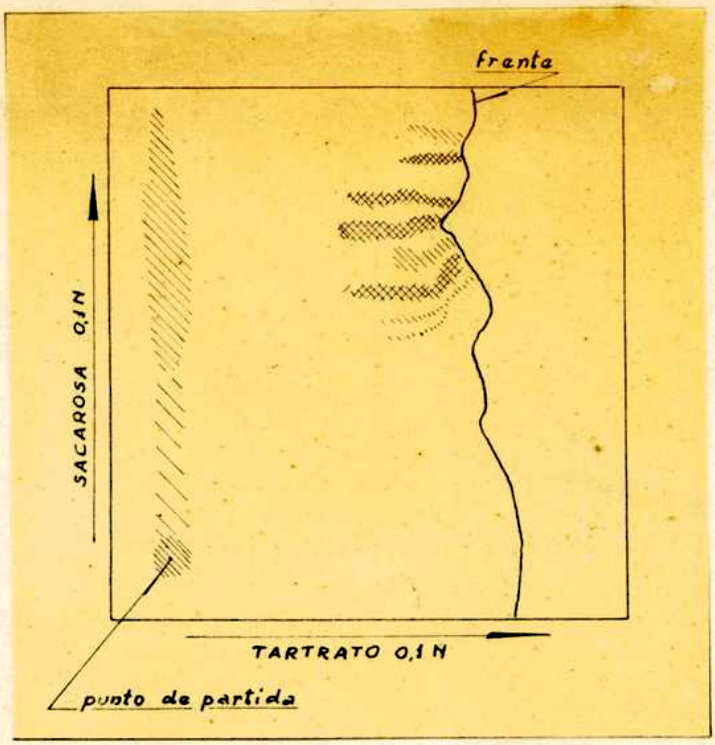

Fig. 30 - Cromatografía bidimensional de suero humano (dibujado de una fotografía del trabajo de Franklin y Quastel (5).).

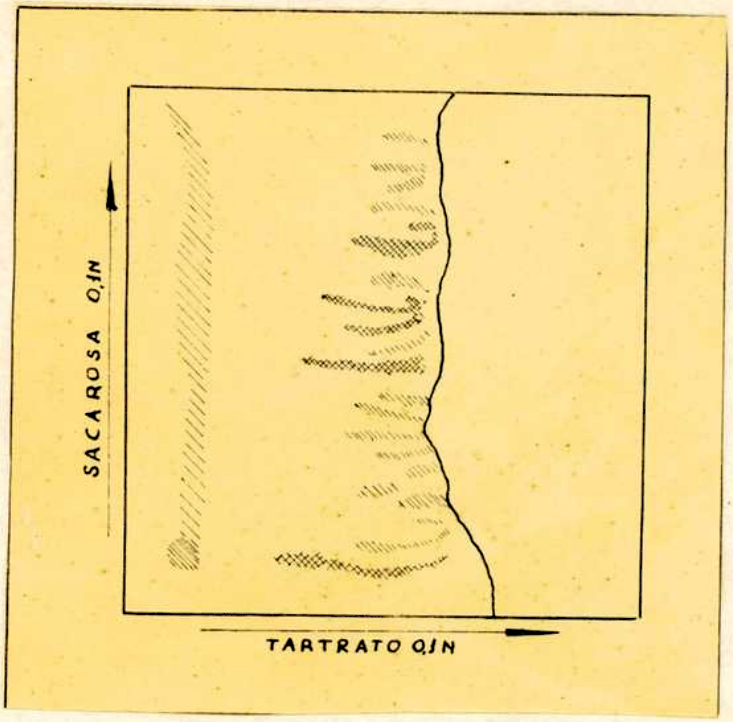

Fig. 31 - Cromatografía bidimensional de suero humano, mezclado con el detergente "Span 20" antes de correrlo (dibujado de una fotografía del trabajo de Franklin y Quastel(5)).

proteína se encuentran por lo general en el interior de los pequeños "golfos" formados por el mismo.

La explicación más adecuada para los resultados de Franklin y Quastel podría ser la siguiente: al correr en la primera dirección, con la solución de sacarosa, la proteína se extiende en una estría larga, como suele hacerlo con los solventes de poco poder resolutivo; al correr luego en la otra dirección, se verificaría el fenómeno que se ha descripto anteriormente para el caso en que la proteína está puesta en banda sobre el papel: es decir que el solvente se infiltraría en una serie de puntos, determinando desplazamientos laterales de las proteínas y repitiendo en grande el resultado representado en la figura 29. Para verificar esta posibilidad se efectuó la siguiente experiencia: se extendió una banda de suero a lo largo de un papel de 20 cm de ancho y se la corrió en una sola dirección, con solución 0,1 N de tartrato, obteniéndose así un cromatograma muy parecido a los de Franklin y Quastel (fig. 32). Aquí sin embargo no podría hablarse de separación de proteínas.

Además el hecho de que los autores citados dejaban secar la solución de proteínas antes del desarrollo del cromatograma, habla también en favor de nuestra hipótesis: ya hemos dicho que las irregularidades son mayores en esas condiciones.

Fig. 32 - Cromatografía de suero de conejo aplicado al papel como b anda.

CONCLUSIONES

1º) Se ha comprobado la posibilidad de correr proteínas en el papel utilizando un gradiente de sulfato de amonio; se han ideado dos dispositivos para formar dicho gradiente.

2º) Se ha introducido el uso del alcohol etílico en mezclas con agua o con diferentes buffers, como solvente para cromatografía de proteínas. Se ha podido así separar dos enzimas entre sí, la invertasa y la fosfoglucomutasa de levadura.

3º) Se ha desdoblado la invertasa de la levadura de cerveza en dos fracciones y se ha estudiado el comportamiento de las dos en diferentes condiciones y frente a distintos substratos.

4º) Se ha extendido el trabajo a la cromatografía de suero y de plasma, consiguiéndose separar la albúmina de las globulinas. Se ha efectuado un estudio sistemático de la influencia del pH, de la concentración de alcohol y de otros factores sobre estas separaciones.

5º) Se han discutido los resultados obtenidos, comparándolos con algunos de otros autores.

BIBLIOGRAFIA

1. CONSDEN, R., GORDON, A. H. y MARTIN, A. J. P., Biochem. J. 38 224 (1944)
2. CLEGG D.L., Anal. Chem. 22, 48 (1950)
3. FRANKLIN A.E. y QUASTEL J.H., Science 110, 447 (1949)
4. GROSS J., LEBLOND C.P., FRANKLIN A.E. y QUASTEL J.H., Science 111, 605 (1950)
5. FRANKLIN A.E. y QUASTEL J.H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 803, (1950)
6. REID W.W., Nature 166, 569 (1950)
7. TISELIUS A., Arkiv Kemi Mineral. Geol. 26B, 1 (1948)
8. TISELIUS A., Chem. Eng. News 27, 1041 (1949)
9. MITCHELL H.K., GORDON M. y HASKINS F.A., J. Biol. Chem. 180, 1071 (1949)
10. JONES J.I.M. y MICHAEL S.E., Nature 165, 685 (1950)
11. DURRUM E.L., J. Am. Chem. Soc. 72, 2943 (1950)
12. CREMER H.D. y TISELIUS A., Biochem. Z. 320, 273 (1950)
13. SUMNER J.B. y SOMERS G.F., Arch. Biochem. 4, 11 (1944)
14. LELOIR L.F., REPETTO O.M., CARDINI C.E., PALADINI A.C., y CAPUTTO R., Anales Asoc. Quím. Argentina 37, 187 (1949)
15. CAPUTTO R., LELOIR L.F. y TRUCCO R.E., Enzymología 12, 350 (1948)
16. HORNE R.E. y POLLARD A. L. J., J. Bact. 55, 231 (1948)
17. WILLIAMS R.J. y KIRBY H., Science 107, 481 (1948).
18. DATTA S.P., OVERELL B.G. y STACK DUNNE M., Nature 164, 673 (1949)
19. LEWIS S.J., Proc. Roy. Soc. Series B 93, 178 (1922)
20. SORENSEN S.P.L., Biochem. Z. 21, 131, 201 (1909)
21. NAJJAR V.A., J. Biol. Chem. 175, 281 (1948)
22. CARDINI C.E., PALADINI A.C., CAPUTTO R., LELOIR L.F. y TRUCCO R.E. Arch. Biochem. 22, 87 (1949).

23. SUTHERLAND E.W., J. Biol. Chem. 180, 1279 (1949)

24. EDSALL J.T., en "Advances in Protein Chemistry", tomo IV, pág.384, Academic Press Inc., New York, 1947.

25. SMITS G., Biochim. et Biophys. Acta 1, 280 (1947)

26. JERMYN, M.A. e ISHERWOOD F.A., Biochem. J. 44, 402 (1949).

27. PARTRIDGE S.M., Nature 164, 443 (1949)

28. FORSYTH W.G.C., Nature 161, 239 (1948)

29. BLACKBURN S. y LOWTHER A.G., Proc. Biochem. Soc. XXVII (1950)

30. WEIDENHAGEN R., en Nord F.F. y Weidenhagen R. "Handbuch der Enzymologie", pág. 514, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1940.

31. DOUDOROFF M., KAPLAN N. y HASSID W. Z., J. Biol. Chem. 148, 67 (1943).

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
PARTE EXPERIMENTAL	6
Substancias utilizadas y métodos generales	6
Experimentos preliminares	8
Cromatografías con gradiente de $SO_4(NH_4)_2$	10
Métodos	10
Resultados	16
Cromatografías con mezclas etanol-agua y etanol-buffer	18
Métodos	18
Resultados	23
Cromatografía de proteínas del suero y plasma	29
Métodos	29
Resultados	31
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	41
Cromatografía de enzimas	41
Cromatografía de proteínas de la sangre	43
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48