

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

**Determinació dels Paràmetres
Estructurals d'una Glicoproteïna
amb Activitat de Grup Sanguini A**

JOAN ESTELRICH I LATRÀS

b) Mètode de Marchesi et al.

L'espectre I.R. de la part aquosa (figura 21) te, a cop d'ull, algunes diferències amb la part aquosa obtinguda segons Hamaguchi i Cleve, però la major part de les bandes d'absorció corresponen als grups presents en la fase aquosa de la tècnica esmentada: 1630 cm^{-1} , amida I; i 1070 cm^{-1} , absorbència deguda probablement a la vibració tensional dels grups C-O presents en els glúcids. Altres grups que apareixen són: 3400 cm^{-1} , grups hidroxil; 2900 cm^{-1} , enllaç C-H amb el carboni en forma sp^3 ; i també a 855 cm^{-1} i 530 cm^{-1} , de difícil assignació.

Pel que fa a la part orgànica (figura 22) hom hi observa moltes de les característiques dels fenols, com és el cas de l'absorció a 1370 cm^{-1} i 1230 cm^{-1} , i a 1595 cm^{-1} i a 1495 cm^{-1} , que caracteritza l'anell aromàtic.

Els altres pics sugereixen els següents grups: 3350 cm^{-1} , grup -OH associat intramolecularment en forma polimèrica; 1470 cm^{-1} , flexió antisimètrica dels grups CH_2 ; 1030 cm^{-1} , alcohol secundari i 1170 cm^{-1} , banda de l'esquelet $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

L'absència d'absorbència pels voltants de 1730 cm^{-1} , pròpia de l'enllaç $\text{P}=\text{O}$, present en els fosfolípids, indueix a pensar que aquests es troben en la interfase, que en aquesta tècnica ocupa un volum considerable.

c) Mètode de Finne

La part aquosa (figura 23) mostra un ample i feble pic en 1630 cm^{-1} , que caracteritza l'enllaç carbonil en l'amida I. També apareix un petit pic a 1730 cm^{-1} , la qual cosa indica que l'extracció lipídica no ha estat tan òptima com caldria desitjar.

Els altres pics que s'observen ja han estat descrits en les fases aquoses dels anteriors mètodes: 3150 , 1450 , 1330 i 1030 cm^{-1} .

La petita absorbència a 2910 cm^{-1} és de difícil assignació.

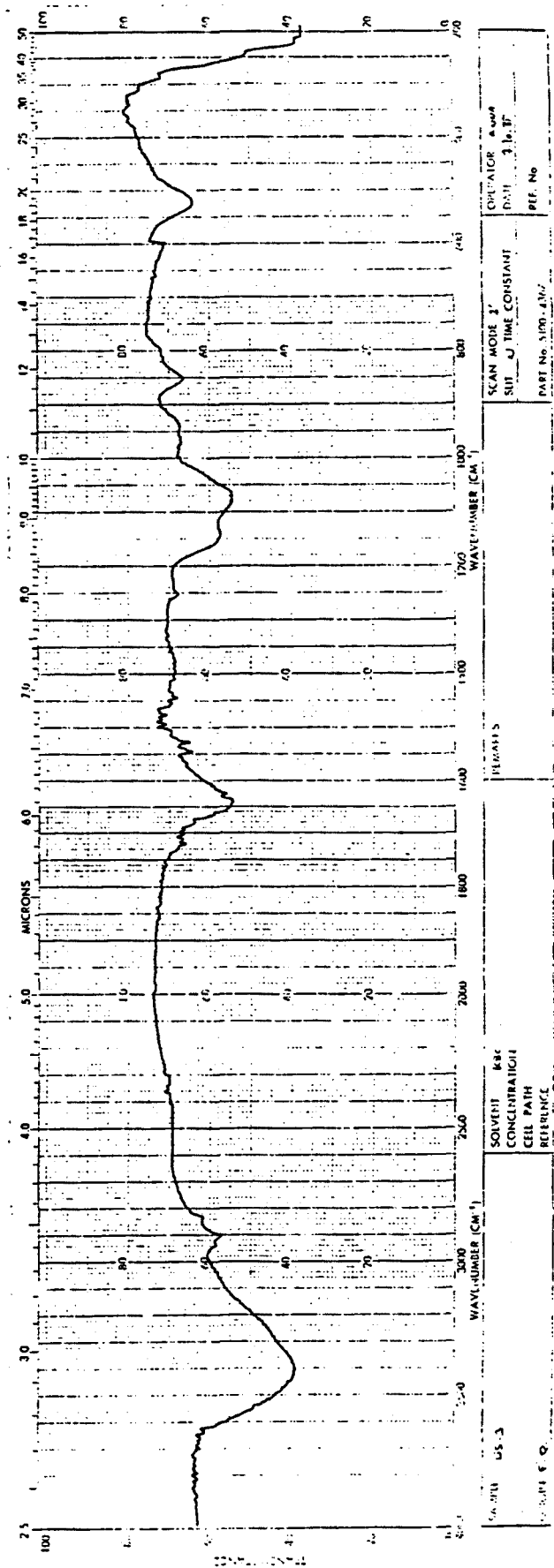


FIGURA 21.- Espectre I.R. de la fase aquosa obtinguda en la tècnica de Marchesi et al.

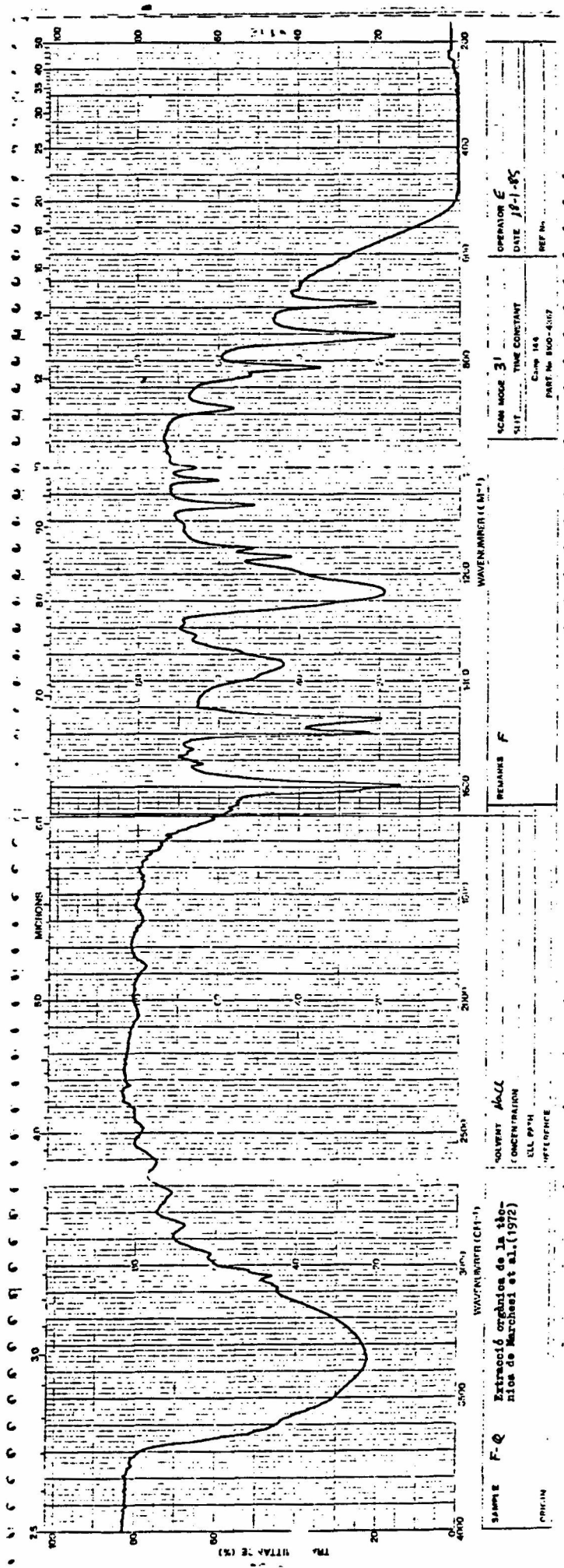


FIGURA 22. Espectre I.R. de la fase orgánica obtinguda en la técnica de Marchesi et al.

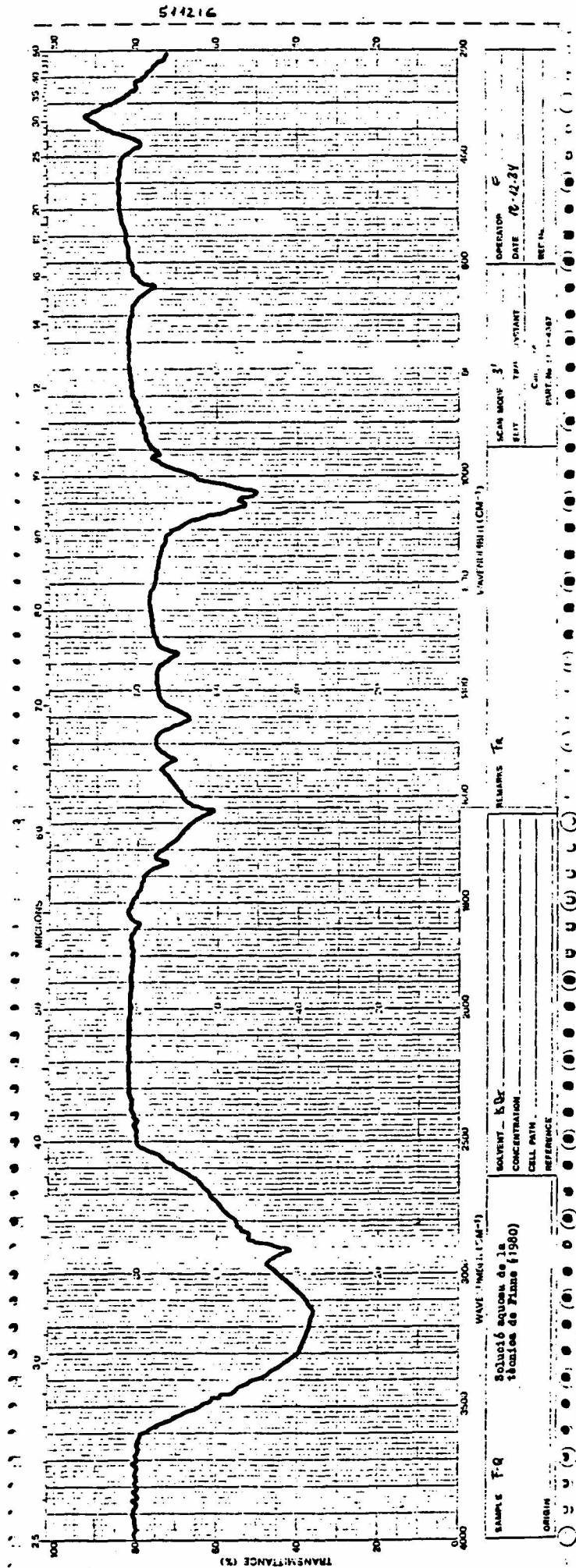


FIGURA 23.- Espectre I.R. de la fase aquosa obtinguda per la técnica de Finne.

La primera extracció lipídica dóna un espectre infraroig (figura 24) que té els trets característics dels lípids: pics a 2855 i 2925 cm^{-1} , propis de l'enllaç C-H, quan el carboni està en forma sp^3 ; pic a 1730 cm^{-1} , de l'éster C=O propi dels grups CH_2 i CH_3 i pic en la zona de 1060-1090 cm^{-1} propi de la vibració tensional P-O-C del grup. Altres pics que apareixen a 970 i 780 cm^{-1} , poden ésser deguts a diversos grups no característics d'un tipus de molècula especial.

En la fase inferior de la segona extracció -fase orgànica- hom pot observar (figura 25) que es troben els mateixos pics que hi ha en la primera extracció, i a més, pics a 1145 i 1379 cm^{-1} .

Els espectres de les dues extraccions butanòliques (figures 26 i 27) són qualitativament quasi idèntics entre si. Destaca l'absència d'absorbància entre 1460 i 2870 cm^{-1} , i l'absorbància a 3350 cm^{-1} que no apareixia en les dues anteriors extraccions.

Amb els espectres infrarojos obtinguts s'ha aplicat la tècnica de NAVARRO et al. (1984) fent les següents modificacions: les intensitats del grup amida I (A_p) s'han determinat a partir de l'àrea compresa entre 1630 i 1700 cm^{-1} , mentre que la intensitat del grup éster lipídic es determina segons l'àrea compresa entre 1730 i 1750 cm^{-1} (A_L).

Per altre part no s'ha tingut en compte la contribució de la proteïna a la intensitat pròpia de l'éster carbonil lipídic, car aquesta contribució només seria mesurable amb una certa exactitud si totes les fraccions analitzades tinguessin una proporció semblant en el contingut de lípid i proteïna.

Amb les àrees A_p i A_L , s'obté una relació comparativa entre el contingut d'amida I i el contingut d'éster lipídic (A_p/A_L). Aquesta relació és un paràmetre vàlid per a observar l'extracció lipídica en cadascuna de les tècniques.

En la taula 15 hom indica, en unitats arbitràries, els resultats obtinguts amb les tres tècniques, a més dels obtinguts amb l'estroma de partida i amb una molècula exenta de lípids com és la glicoproteïna humana sèrica de la fracció VI (Pentex, Miles, Estats Units).

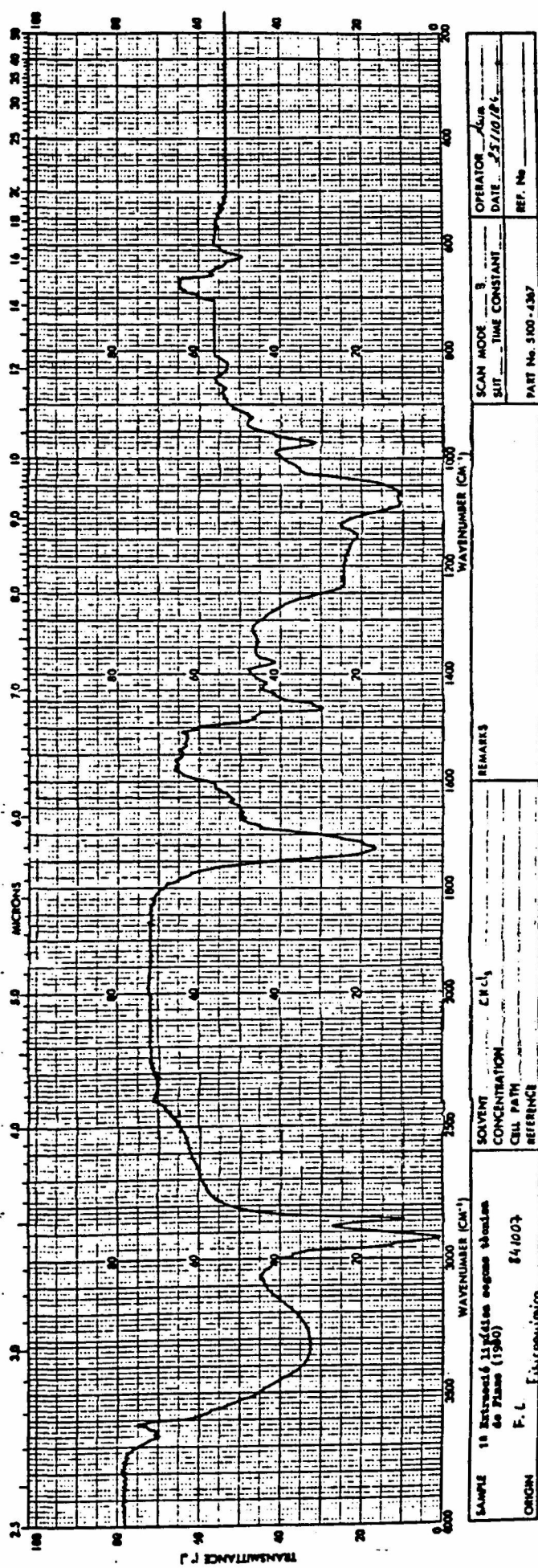


FIGURA 24.- Espectre I.R. de la primera extracció lipídica segons la tècnica de Finne.

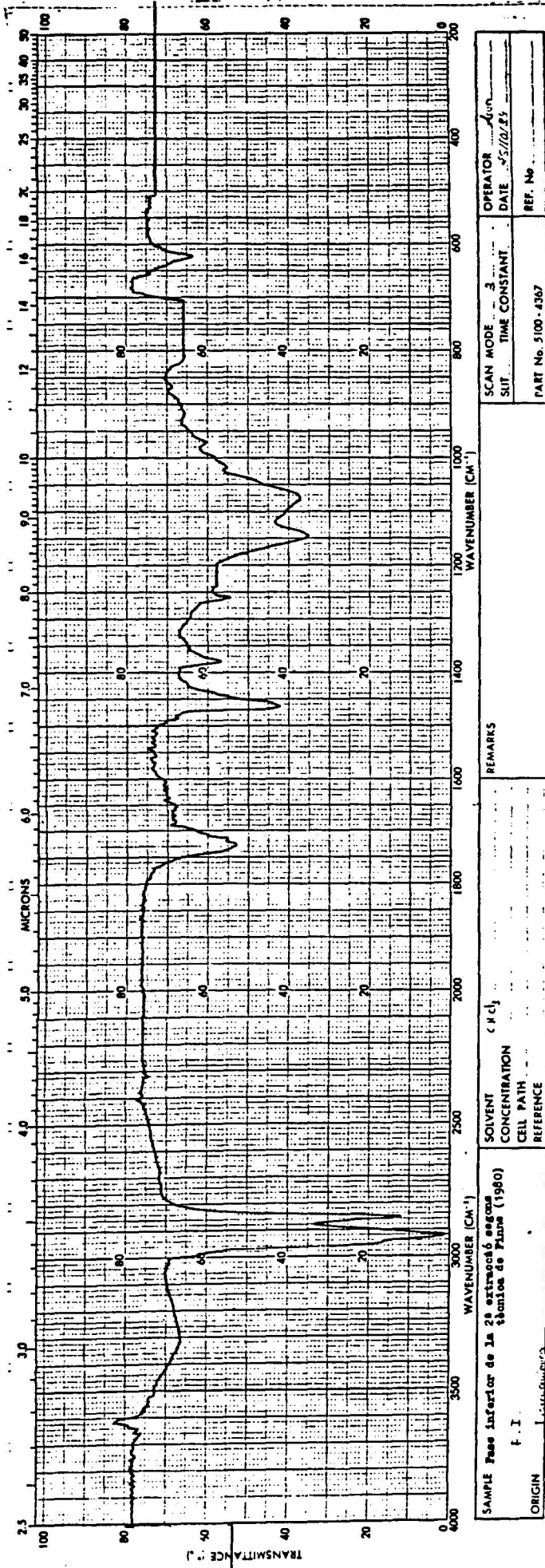


FIGURA 25.- Espectre I.R. de la fase orgànica de la segona extracció lipídica segons la tècnica de Finne.

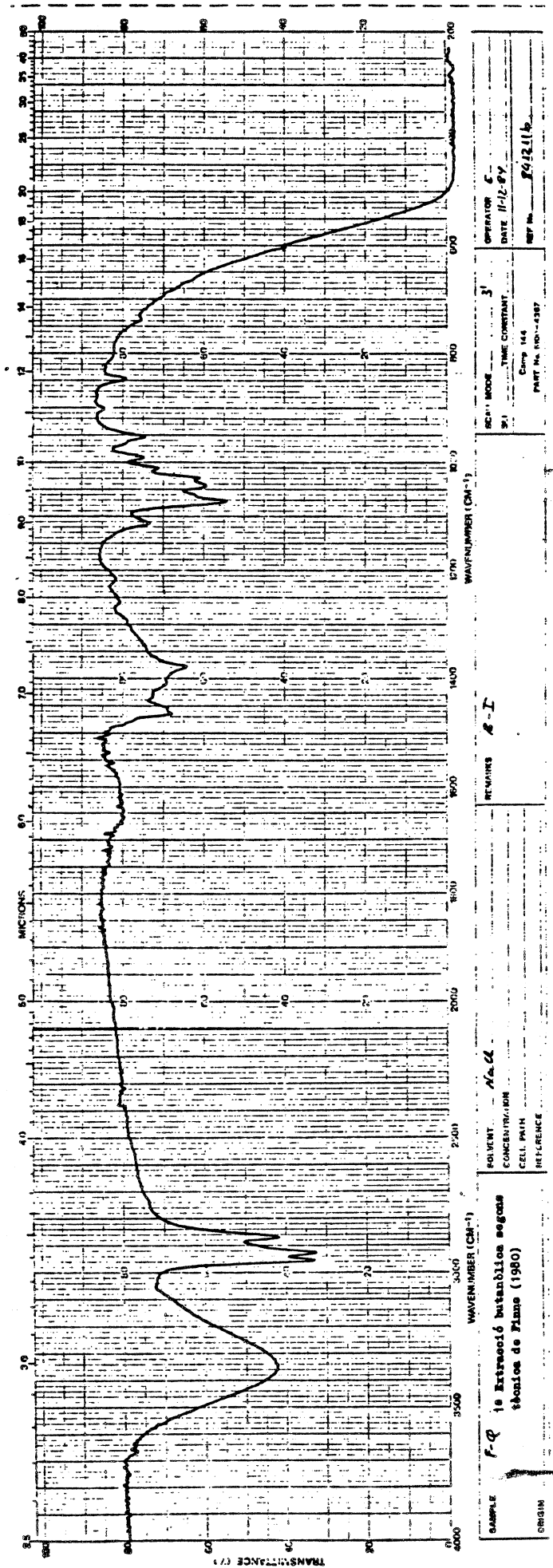


FIGURA 26.- Espectre I.R. de la primera extracció butànlica segons la tècnica de Finne.

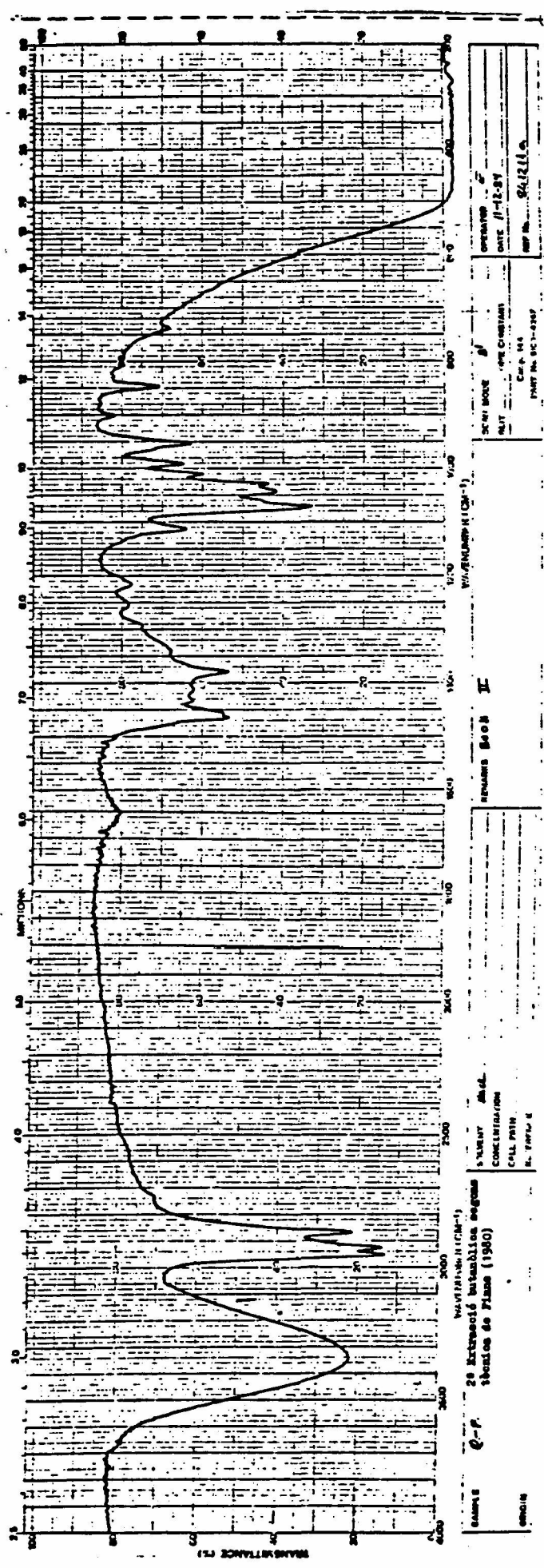


FIGURA 27.- Espectre I.R. de la segona extracció butànolica segons la tècnica de Finne.

	A_p	A_L	A_p/A_L
Estroma	533	84	6,3452
a) Hamaguchi i Cleve			
- solució aquosa	449	72	6,2360
- solució orgànica	324	88	3,6821
b) Marchesi et al.			
- solució aquosa	278	60	4,6333
- solució orgànica	246	50	4,9200
c) Finne			
- solució aquosa	476	152	3,1324
- primera extracció lipídica	364	228	1,5963
- fase inferior de la segona extracció	221	82	2,6953
- primera fase butanòlica	130	33	3,9348
- segona fase butanòlica	124	30	4,1332
Total fases orgàniques	839	373	2,2495
Glicoproteïna humana	424	66	6,4242

TAULA 15.- Valors de les àrees A_p i A_L determinades segons els espectres I.R.

Segons les dades d'aquesta taula hom observa que les fases aquoses de les tècniques d'Hamaguchi i Cleve i de Marchesi et al., tenen una relació A_p/A_L semblant a l'obtinguda amb la glicoproteïna de referència, que te aproximadament un 40% del pes total en contingut glucídic.

La fase aquosa de la tècnica de Finne forneix una relació significativament més baixa.

Les parts orgàniques tenen unes relacions més baixes, com era d'esperar, excepte en el cas de la fase fenòlica de la tècnica de Marchesi et al., que com ja s'ha indicat, és molt probable que els components lipídics es trobin en la quantiosa interfase que es produeix.

- *Contingut proteic*

La valoració del contingut proteic en les fases aquoses prèvies a l'extracció de les glicoproteïnes s'ha realitzant mitjançant la tècnica de fixació de colorant de BRADFORD (1976) per evitar la interferència del Tris en la tècnica de valoració de Lowry et al.

Els resultats obtinguts s'expressen en la taula 16 i són la mitja de tres determinacions, estant referits al percentatge de proteïna recuperada envers la proteïna de partida, suposant un contingut proteic en l'estroma liofilitzat del 49%, dada obtinguda anteriorment.

En realitat caldria aplicar un factor de correcció al resultat obtingut car la presència de substàncies glucídiques fa que el rendiment en color produït sigui menor al que te l'albumina sèrica bovina (READ i NORTHCOLE, 1981), però, com l'interès d'aquesta valoració, més que en l'obtenció d'un resultat quantitatiu, rau en la comparació de les tres solucions aquoses, s'ha prescindit d'aquesta correcció, que afectaria per igual a totes les alíquotes.

	Hamaguchi i Cleve	Marchesi et al.	Finne
Mostra 1	5,2	5,6	2,8
Mostra 2	5,4	5,3	2,9
Mostra 3	5,4	5,4	2,9
Valor mig	5,33 \pm 0,12	5,43 \pm 0,15	2,87 \pm 0,06

TAULA 16.- Percentatges de continguts proteics recuperats en les fases aquoses de les tres tècniques estudiades. Els valors són la mitja de tres determinacions realitzades segons la valoració de Bradford.

- Capacitat inhibidòria de l'hemaglutinació

La capacitat inhibidòria de l'hemaglutinació s'ha determinat en porta segons una tècnica que segueix en els seus trets principals la descrita per SPEE-BRAND et al.(1980).

Prèvia a la determinació s'han fet les dilucions necessàries de les fases aquoses obtingudes amb els tres mètodes, de forma que cada mL de solució aquosa correspongui la mateixa quantitat d'estroma de partida.

Així, un cop s'han fet aquestes dilucions, s'agafen alíquotes de 0.2 mL de cadascuna de les fases aquoses que teòricament contenen les substàncies antigèniques, i es dipositen sobre un porta. A continuació, hom afegeix, sobre el contingut de cada porta, 0.2 mL d'una sèrie de solucions que contenen l'antisèrum A (Knickerbocker, Barcelona) i que s'han obtingut per dilució a la meitat amb solució isotònica de NaCl al 0.09%. Després de 30 min a temperatura ambient, hom afegeix 0.2 mL d'una suspensió d'eritròcits al 10% en solució salina fisiològica i amb un títol aglutinant 1/128. Es mouen les plaques amb moviments circulars de forma que la mescla sigui homogènia. Després de 10 minuts, els portes s'observen al microscopi.

Es realitzen dos controls: un de positiu, amb antisèrum, solució salina lliure de substàncies antigèniques i suspensió d'eritròcits, i un de negatiu amb fase aquosa, solució salina i suspensió d'eritròcits.

La taula 17 mostra els resultats obtinguts. La dilució de l'antisèrum A és expressada per la dilució després de l'adició de la solució problema o de la solució salina.

	TITOL ANTISERUM				
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Hamaguchi i Cleve	c	++	++	+-	-
Marchesi et al.	c	++	++	+-	-
Finne	c	c	c	c	+++
Control positiu	c	c	c	c	c
Control negatiu	-	-	-	-	-

TAULA 17.- Resultats de les proves d'inhibició de l'hemaglutinació amb les fases aquoses obtingudes amb els diferents mètodes. La valoració establerta ha estat: C = aglutinació completa; +++ = moltes zones aglutinades; ++ = forces zones aglutinades; + = algunes zones aglutinades; +- = molt poques zones aglutinades; - = cap zona aglutinada.

2.1.2. CONCLUSIONS

A la vista dels resultats obtinguts es palesa clarament que la tècnica de Finne presenta una elevada pèrdua proteínica, que pot ésser deguda a una deficient solubilització de les proteïnes en la primera etapa, i que comporta, conseqüentment una disminució de l'activitat antigènica.

Les tècniques d'Hamaguchi i Cleve i de Marchesi et al. proporcionen resultats semblants tant en la solubilització de les proteïnes com en la capacitat delipidadora, si be en aquest darrer aspecte hi ha un lleuger aventatge de la tècnica d'Hamaguchi i Cleve. Ja en el treball original de Marchesi et al. (MARCHESI i ANDREWS, 1971) hom indica que es pot fer una extracció amb cloroform metanol (2:1, v/v) per a completar l'extracció lipídica.

A conclusions semblants arribà també l'estudi de LEE et al. (1978), que tampoc no trobà cap diferència significativa entre ambdues tècniques.

Així, doncs, davant la igualtat de resultats obtinguts amb aquestes dues tècniques, l'elecció de la tècnica a seguir s'ha decantat per la de Hamaguchi i Cleve simplement per raons purament econòmiques.

Sobre el mètode d'Hamaguchi i Cleve cal puntualitzar que en la doble extracció amb *n*-butanol, amb la que alguns investigadors han modificat aquest mètode, hi ha una considerable disminució de substància amb activitat antigènica. Es pot prescindir d'aquesta extracció fent la solubilització amb Cl₃CH/MeOH amb agitació enèrgica durant 40-60 min. Durant l'agitació, la temperatura del conjunt, degut a la volatilització del Cl₃CH, mai no sobrepassa els 10°C.

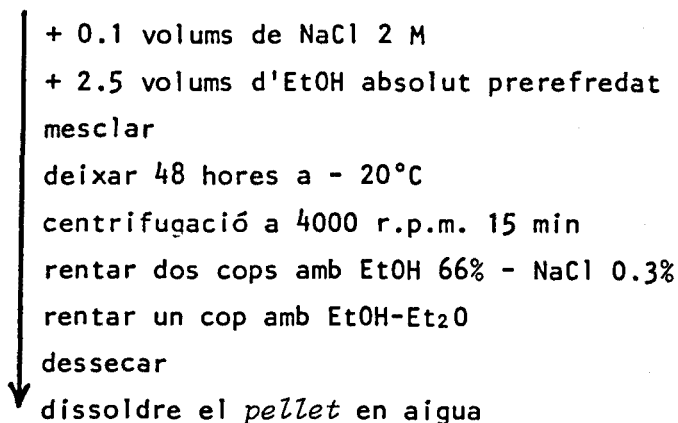
Fent d'aquesta manera l'extracció, no es visualitzen en els cromatogrames els glicolípidis de baix pes molecular que hauria d'extreure el *n*-butanol.

Pel que fa a la concentració en rotovapor, aquesta s'ha de fer sense sobrepassar els 37°C, i la concentració de la part aquosa pot completar-se amb l'ús de concentradors Immersible CX-10 (Millipore); aixó forneix una tècnica de concentració que no actúa contra les glicoproteïnes.

Després de la concentració cal fer una diàlisi enfront d'aigua bidestil·lada a 4°C durant 24-48 h, amb la finalitat d'eliminar el metanol present, la presència del qual dificulta tant la liofilització posterior com la precipitació amb etanol.

En la precipitació amb etanol s'han introduït algunes modificacions respecte a la simple adició de 9 volums d'etanol absolut per cada volum de solució a precipitar, que és la relació que més freqüentment es troba en la bibliografia. Aquests conjunt de modificacions (figura 28) produeixen una major quantitat de material precipitat, i es caracteritzen per la presència de NaCl, per una relació etanol absolut mostra que fa que la concentració final de l'etanol sigui del 66%, i per la permanència a baixes temperatures del conjunt a precipitar, la qual cosa afavoreix el procés de precipitació.

SOLUCIÓ CONCENTRADA DE LA FASE AQUOSA



SOLUCIÓ DE GLICOPROTEINES

FIGURA 28.- Esquema del procés de precipitació de les glicoproteïnes.

En resum les modificacions introduïdes en el mètode d'Hamaguchi i Cleve fan que la tècnica quedi tal com es mostra en la figura 29.

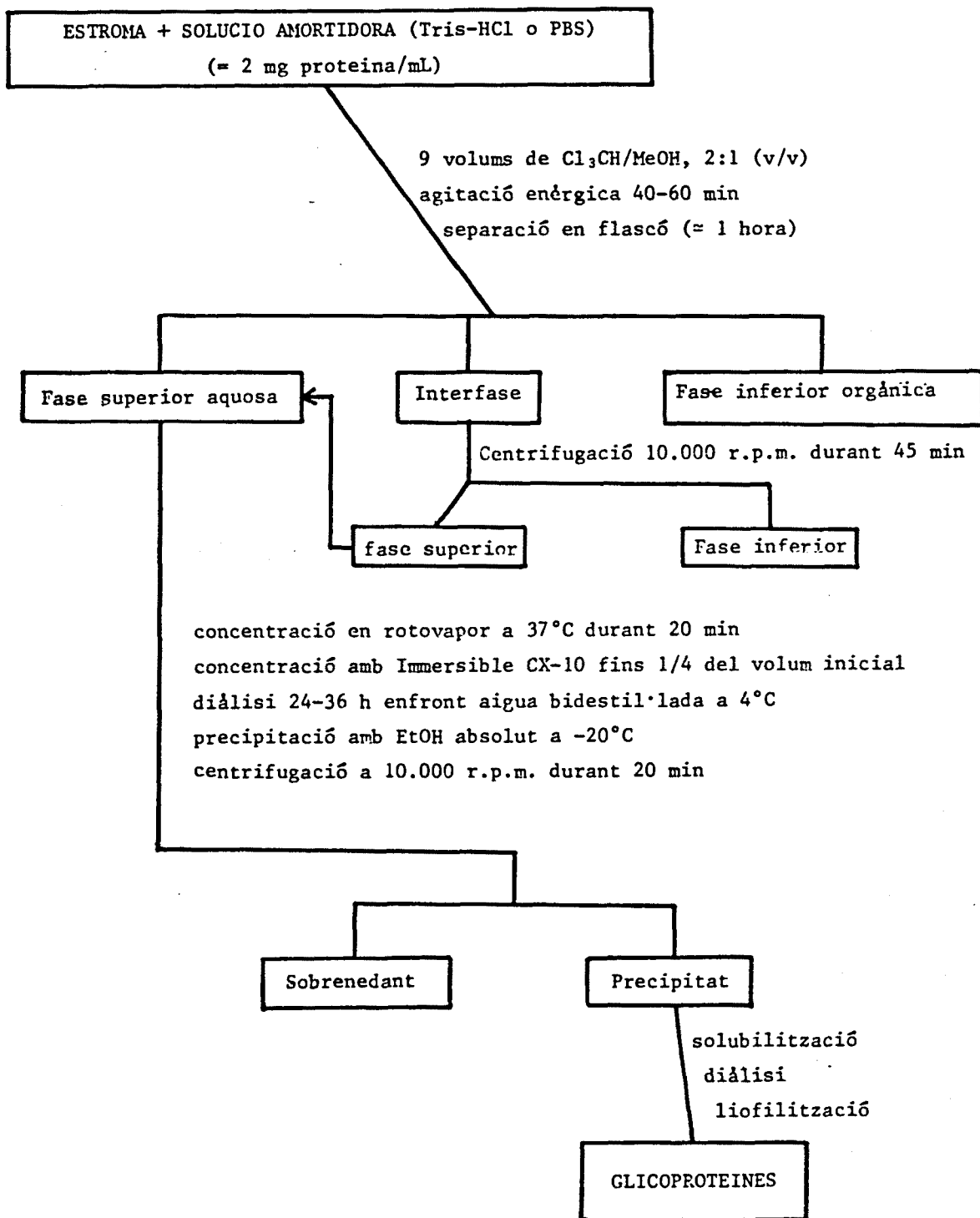


FIGURA 29.- Esquema del mètode definitiu emprat per a l'obtenció de glicoproteïnes segons el mètode d'Hamaguchi i Cleve.

2.2. CARACTERÍSTIQUES ANALÍTQUES DE LES GLICOPROTEÏNES OBTINGUDES

Les glicoproteïnes liofilitzades, obtingudes per la tècnica anteriorment descrita, tenen les següents característiques analítiques, un cop s'han solubilitzat amb solució amortidora P.B.S.

2.2.1. ABSORCIÓ A L'ESPECTRE ULTRAVIOLETA

Determinat en un espectrofotòmetre Hewlett-Packard A-8531 i enfront d'un blanc de solució amortidora PBS, l'espectre d'absorció U.V. d'una alíquota de la solució de glicoproteïnes és el representat en la figura 30.

En aquest gràfic hom observa un màxim a 210 nm ($A = 1.227$) i un petit màxim a 280 nm ($A = 0.105$).

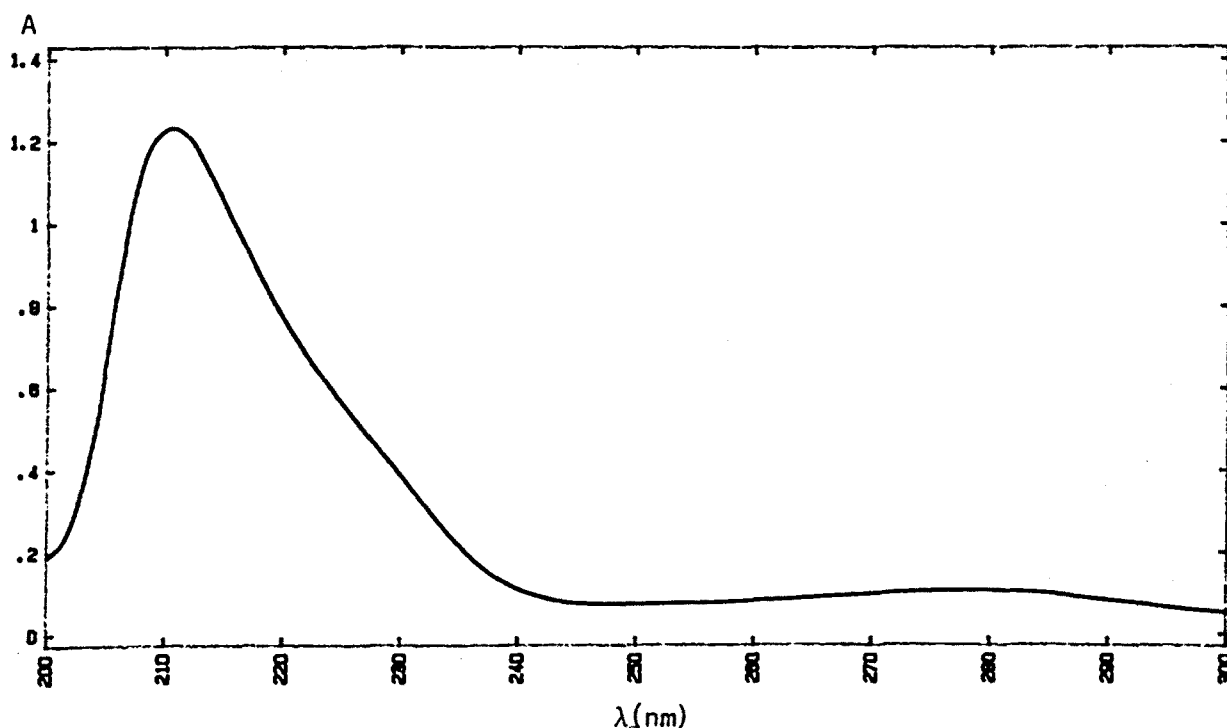


FIGURA 30.- Espectre d'absorció U.V. d'una solució de glicoproteïnes en PBS.

Fent la primera derivada hom troba un màxim a 206 nm ($A = 0.162$) i un altre a 266 nm ($A = 0.002$) (figura 31).

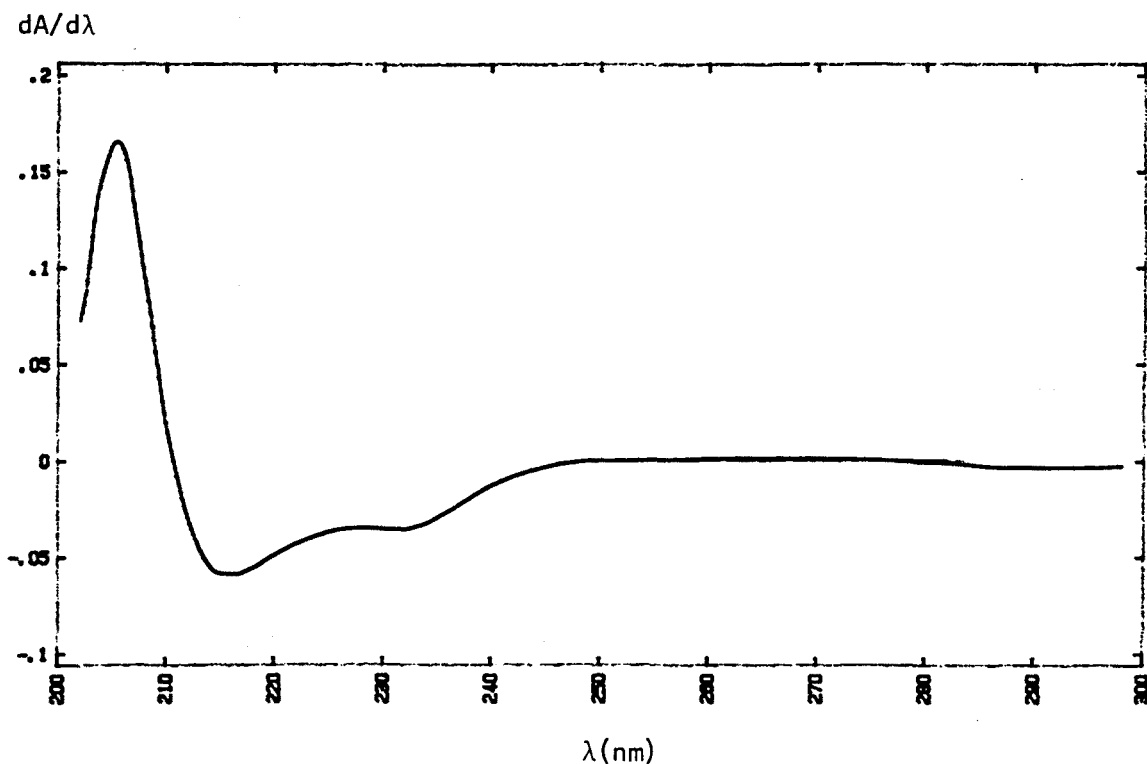


FIGURA 31.- Espectre d'absorció U.V. de la primera derivada de la solució de glicoproteïnes de la figura 30.

L'absència d'un màxim destacat d'absorbància a longituds d'ona pels voltants de 280 nm, que generalment caracteritza les substàncies proteïques, és deguda al baix contingut en aminoàcids cromòfors, com la tirosina i el triptofan, fet palès en l'anàlisi d'aminoàcids de la glicoproteïna.

Un altre fet remarcable és la variació de la longitud d'ona on apareix el màxim pels voltants de 200 nm i que en un principi és propi de l'enllaç peptídic. Dit màxim pot fluctuar, segons la concentració, de 206 a 220 nm, observant-se que una disminució de la concentració va acompanyada d'un desplaçament del màxim cap a longituds d'ona més baixes.

Aquest desplaçament concentració-dependent està influït, en part, per la presència en la molècula de N-acetil-galactosamina i N-acetil-glucosamina, les solucions aquoses de les quals també mostren aquesta variació.

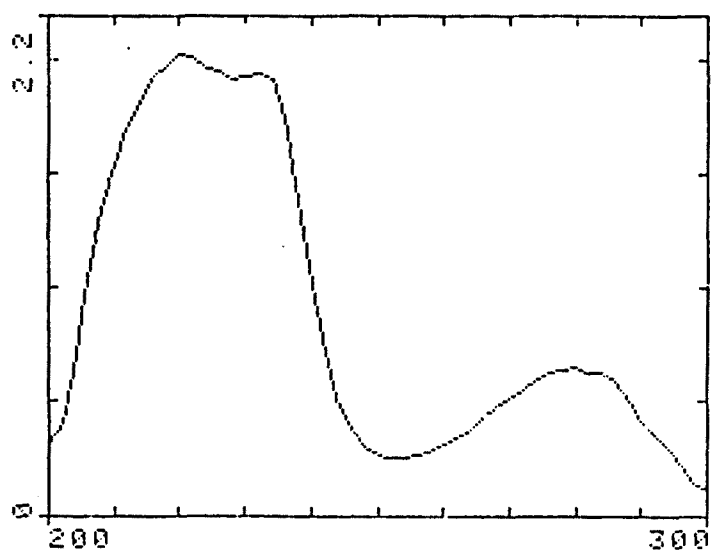
Per eliminar els possibles errors deguts a l'espargiment de la llum causat per les partícules en suspensió (WINDER i GENT, 1971), la solució de glicoproteïnes s'ha filtrat per filtre Durapore (Millipore) de 0,22 μ de porus.

Els espectres d'absorció U.V. realitzats amb substàncies amb activitat de grup sanguini, obtingudes a partir de cists ovàrics (AMINOFF et al., 1950; ANNISON i MORGAN, 1952 a, 1952 b; GIBBONS et al., 1954) formen uns resultats semblants: absència d'absorbància aparent a 280 nm i un augment ràpid de la mateixa des de 240 a 220 nm.

En les figures 32 i 33 es mostren els espectres d'absorció U.V. de quatre substàncies glicoproteïniques o amb elevat contingut glucídic dins la molècula; aquestes són: l' α_1 -glicoproteïna o orosomuroid (Sigma G9885) obtinguda del sèrum humà, el sèrum anti-A humà (Knickerbocker, lot 1419), la glicoproteïna humana de la fracció VI del sèrum (Pentex, Miles, 82-313-1) i una solució de substàncies específiques dels grups sanguinis A i B, d'origen porquí i equí (NeutrAB, Dade, B4830).

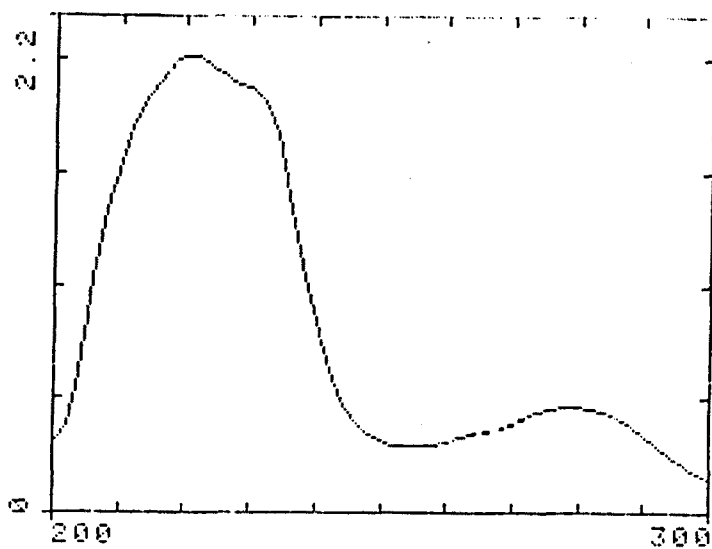
Hom pot observar certs trets de similitut entre la gràfica obtinguda amb la solució de glicoproteïnes provinent de l'estroma eritrocític i les quatre solucions comparatives, especialment amb les glicoproteïnes sèriques de la fracció VI. Amb tot, s'ha de tornar a destacar l'aparent absència d'absorbància a 280 nm.

OROSOMUCOIDE



Màxim a 220 nm ($A=2,0299$) i a 280 nm ($A=0,645278$)

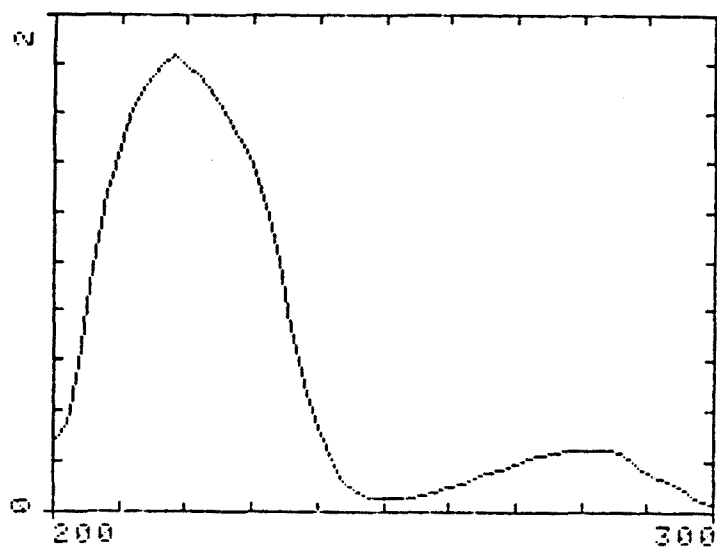
SERUM HUMA ANTI-A



Màxim a 220 nm ($A=2,01686$) i a 280 nm ($A=0,466537$)

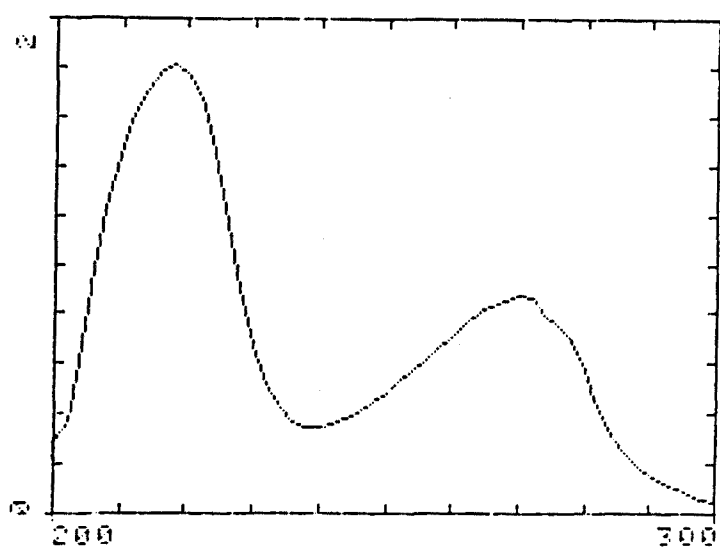
FIGURA 32.- Espectre U.V. de l'orosomucoïd i el sèrum anti-A.

GLICOPROTEINA HUMANA FRACCIO VI



Màxim a 218 nm ($A=1,82885$) i a 280 nm ($A=0,249572$)

NEUTR-AB



Màxim a 218 nm ($A=1,80496$) i a 270 nm ($A=0,87564$)

FIGURA 33.- Espectre U.V. de la glicoproteïna humana sèrica de la fracció VI i d'una mescla de substàncies amb activitat de grup sanguini A i B (NeutrAB).

2.2.2. DISPERSIÓ ROTATÒRIA ÒPTICA

El poder rotatori òptic de la solució de glicoproteïnes s'ha determinat en un polarímetre Perkin Elmer P-23.

Abans de realitzar la mesura, s'han filtrat tan la solució de glicoproteïnes com l'amortidora per filtres Durapore HVLP (Millipore) de 0.45 μ de pas de porus. La longitud del pas de llum en la cubeta és de 0.1 cm, la temperatura s'ha mantingut a 21 \pm 0.5°C i la concentració de la solució de glicoproteïnes ha estat de 1.02 mg/mL.

En la taula 18 hom indica els valors obtinguts amb la solució de glicoproteïnes, i que estan expressats en forma de poder rotatori òptic (α), que és la diferència entre la solució problema i la solució amortidora, el poder rotatori específic ($[\alpha]$) i la rotació específica mitja residual $[m']$.

La rotació específica mitja residual $[m']$, s'ha calculat segons la relació

$$[m'] = \frac{3}{n^2 + 2} [\alpha] \frac{M}{100}$$

on n és l'índex de refracció, suposat d'un valor igual a 1.3339 segons extrapolació dels valors descrits en les taules de FASMAN (1963), i M és el pes del residu mig, calculat a partir del contingut en aminoàcids determinat en l'apartat 2.2.6. i que és igual a 110.87.

Per sobre de 350 nm no hi ha diferències significatives amb el resultat obtingut per aquesta longitud d'ona. Per sota de 215 nm, l'aparell presenta problemes operatius.

Segons els resultats obtinguts no es palesa cap índex d'efecte Cotton, no obstant, cal fer de nou esment en les limitacions tècniques de l'aparell i per aixó no es pot tenir una certesa total en els resultats obtinguts per sota de 215 nm atés que en alguns casos l'efecte Cotton de substàncies glicoproteïniques es produeix a 195 nm.

λ (nm)	$[\alpha]$	$[\alpha]$	λ (nm)	α	$[\alpha]$	$[\alpha]$
345	-0,022	- 2156	230	-0,127	- 1898	-12451
340	-0,025	- 2451	229	-0,127	- 2156	-10958
335	-0,029	- 2843	228	-0,127	- 2502	-10958
330	-0,027	- 2647	227	-0,127	- 2330	-10958
325	-0,027	- 2647	226	-0,127	- 2330	-10958
320	-0,029	- 2843	225	-0,127	- 2502	-10958
315	-0,028	- 2745	220	-0,126	- 2416	-10872
310	-0,033	- 3235	219	-0,126	- 2847	-10872
305	-0,039	- 3824	218	-0,126	- 3365	-10872
300	-0,043	- 4216	217	-0,125	- 3710	-10785
295	-0,047	- 4608	216	-0,125	- 4055	-10785
290	-0,046	- 4511	215	-0,125	- 3969	-10785
285	-0,050	- 4902	214	-0,126	- 4314	-10872
280	-0,054	- 5294	213	-0,127	- 4659	-10958
275	-0,054	- 5294	212	-0,127	- 4659	-10958
270	-0,058	- 5686	211	-0,129	- 5004	-11130
265	-0,072	- 7059	210	-0,130	- 6213	-11217
260	-0,080	- 7843	209	-0,131	- 6903	-11303
255	-0,081	- 7941	208	-0,131	- 6989	-11303
250	-0,093	- 9178	207	-0,133	- 8077	-11475
245	-0,106	-10392	206	-0,134	- 9146	-11562
240	-0,111	-10882	205	-0,134	- 9577	-11562
235	-0,119	-11667	204	-0,135	-10268	-11648
234	-0,119	-11667	203	-0,136	-10268	-11734
233	-0,120	-11764	202	-0,136	-10353	-11734
232	-0,123	-12059	201	-0,136	-10613	-11734
231	-0,125	-12255	200	-0,138	-10785	-11907

TAULA 18.- Valors de D.R.O. de la solució de glicoproteïnes.

2.2.3. CONTINGUT EN PROTEINA

Determinat segons la tècnica de LOWRY et al.(1951) i emprant albúmina sèrica bovina (BSA) (Sigma A7030) com estàndard, el contingut proteic mig de les glicoproteïnes ha estat del 51.2% referit al pes de les glicoproteïnes liofilitzades.

2.2.4. CONTINGUT EN GLÚCIDS

Amb alíquotes de la mateixa mostra amb la que s'ha analitzat el contingut en proteïna, s'ha fet l'anàlisi del contingut en glúcids, determinant-se les hexoses neutre, la fucosa, l'àcid siàlic i les hexosamines. Les hexoses neutre, l'àcid siàlic i la fucosa s'han determinat segons les tècniques descrites per WINZLER (1955), mentre que les hexosamines s'han determinat mitjançant una reacció colorimètrica.

-Hexoses

Les hexoses presents en les glicoproteïnes s'han determinat espectrofotomètricament pel mètode de l'orcinol-sulfúric, fent lectures a 540 nm. Com estàndard s'ha emprat una mescla de galactosa-manosa, (Sigma, G0750 i M4625, respectivament) a relació 4.5:1, en pes, que és la relació d'aquests dos sucres present en l'estroma eritrocític (GUIDOTTI 1972).

El resultat obtingut és del 21.05% en pes del material liofilitzat.

-Fucosa

Determinada espectrofotomètricament pel mètode de la cisteïna amb lectures a 396 i a 430 nm i amb α -L-fucosa (Sigma F2252) com a patró, ha donat un valor igual al 3.23% del pes del material liofilitzat.

- Acid siàlic

S'ha determinat mitjançant la lectura de l'absorbància desenvolupada a 540 nm per la reacció amb àcid perclòric-triptofan. Com a patró s'ha emprat àcid N-acetilneuramínic obtingut d'orina humana (Sigma A4642) i el resultat obtingut representa el 2.50% del pes del material liofilitzat.

-Hexosamines

L'anàlisi d'hexosamines (N-acetil-D-galactosamina i N-acetil-D-glucosamina) s'ha realitzat per mitjà de la reacció colorimètrica d'Elson i Morgan (SPIRO, 1966).

Abans de la determinació colorimètrica, les hexosamines han estat alliberades de la molècula per hidròlisi àcida. La hidròlisi s'ha realitzat en vials tancats, que contenen nitrogen, amb àcid clorhídric 4 N, a 100 °C, durant 6 hores. Després de la hidròlisi l'àcid clorhídric remanent és eliminat per evaporació d'aquest en rotovapor a 50 °C. El residu es redissolt en aigua i es tracta amb acetilacetona.

L'acetilació en medi bàsic produïda per l'acetilacetona forneix derivats pirròlics, que unint-se al reactiu d'Ehrlich, produeixen derivats colorejats quantificables a 530 nm.

Com a substància patró s'ha emprat una solució 10 mM de N-acetil-D-glucosamina (Sigma A8625).

Atés que els sucres neutres poden també donar coloració, com a blanc s'ha emprat una concentració aquosa que contenia 8.5 mM de D-glucosa (Merck 8337) per cada gram de liofilitzat analitzat, que és la proporció, segons s'ha determinat previament, en la que els sucres es troben en les mostres a analitzar.

2.2.5. CONTINGUT EN GLICOPROTEINA

Les glicoproteïnes s'han valorat per un mètode que té com a fonament la determinació de la turbidesa produïda per l'etanol en la solució de glicoproteïnes.

En un estudi previ s'han establert les condicions (grau alcohòlic, relació etanol/solvent/glicoproteïnes, temperatura i angle d'espargiment).

Bàsicament l'assaig consisteix en afegir 9 mL d'etanol absolut (Merck 983) a un volum variable de la solució de glicoproteïnes portat amb solució amortidora PBS fins un volum final de 0.1 mL, i realitzar la lectura de les intensitats de llum espargida a 105°, entre l'interval de temps comprés entre els 10 i els 13 min després d'haver introduït la cubeta en l'aparell.

Les determinacions s'han portat a terme amb un fotòmetre per espar-
giment de la llum FICA 50, provist d'una font lluminosa d'arc fred, ob-
tinguda mitjançant una làmpara de descàrrega en vapor de mercuri a alta
pressió, a una longitud d'ona de 436 nm.

Tot l'assaig s'ha realitzat a una temperatura constant de $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Com a substància de referència s'ha emprat una solució d' α_1 -glico-
proteïna àcida (Sigma G9885) a una concentració de 0.722 mg/mL, calcula-
da espectrofotomètricament en base al coeficient d'absorció específica a
278 nm, que segons SCHMID (1953) és de $8.93 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Totes les mostres analitzades, tan les de referència com les proble-
mes, han estat filtrades previament a través de filtres Durapore (Milli-
pore), primer amb HVLP de 0.45μ de pas de porus, i després amb GWPP de
 0.22μ .

Els resultats que s'indiquen a la taula 19 són la mitja de tres de-
terminacions realitzades. A partir de la recta de calibració obtinguda
amb les diferents dilucions del problema s'obtenen uns valors d'unitats
d'espargiment (U.E.) que poden correspondre's amb els valors de l' α_1 -gli-
coproteïna àcida. Així, per una alíquota de 0.1 mL de solució de glico-
proteïnes problema hom obté un valor de 11.810 U.E. que corresponen a un
volum de 0.07 mL de glicoproteïna patró o sigui a una concentració de
0.505 mg/mL.

Si per l'obtenció d'aquestes glicoproteïnes s'ha partit de 25,35 mg
d'estroma i les glicoproteïnes precipitades per etanol s'han portat a un
volum final de 5 mL, es pot deduir que per cada mg d'estroma s'obtenen
uns 100 μg de glicoproteïnes. En aquest cas s'ha de tenir en compte que
no es pot acurar més el rendiment de glicoproteïnes degut a les petites
pèrdues en la interfase de l'extracció cloroform-metanòlica i les que
es produeixen en la precipitació i en la filtració prèvia a aquesta prova.

Volum de glicoproteïna en els 0,1 mL finals	Unitats d'espargiment	
	Glicoproteïna problema	Glicoproteïna de referència
0,01	1,287	--
0,02	2,695	2,035
0,03	3,702	3,114
0,04	5,426	6,417
0,05	5,879	7,605
0,06	--	9,728
0,07	8,371	11,848
0,10	11,746	--

Recta de calibració de la glicoproteïna problema:

$$y = 0,3455 + 114,6488x \quad (r = 0,998)$$

Recta de calibració de la glicoproteïna de referència:

$$y = -2,2210 + 200,2714x \quad (r = 0,993)$$

TAULA 19.- Valors d'espargiment obtinguts amb la solució glicoproteïna problema i amb la de referència (α_1 -glicoproteïna àcida). En les rectes de calibració, els valor de "y" representa les unitats d'espargiment, i el de les "x", el volum de la mostra en els 0,1 mL finals.

2.2.6. ANALISI D' AMINOÀCIDS

Aquesta determinació s'ha realitzat seguint la pauta descrita a l'apartat 1.4.6.

El cromatograma obtingut es mostra a la figura 34 i en la taula 20. Els resultats obtinguts s'expressen com grams d'aminoàcid per gram de glicoproteïnes liofilitzades, i també com nombre de mols per cada 1000 mols.

Els valors de la serina, treonina, cisteïna i tirosina s'han corregit en un 5% (10% en el cas de la serina) per a compensar la descomposició parcial que'ls afecta.

No s'ha determinat el valor del triptofan.

Aquest anàlisi dóna un perfil molt semblant a l'obtingut amb l'estroma de partida; la diferència més notable es troba en el contingut en arginina, que de representar en l'estroma un 4.26%, referit al nombre de residus, passa a un 7.82%.

2.2.7. INHIBICIÓ DE L'HEMAGLUTINACIÓ

Per a determinar el poder inhibitori de l'hemaglutinació de les glicoproteïnes obtingudes s'ha realitzat, en aquest cas, una valoració quantitativa, que seguint les tècniques clàssiques descrites per WILLIAMS i CHASE (1977) introdueix l'ús de l'espectrofotòmetre en la quantificació de la inhibició (SATSANGI et al., 1982).

La tècnica pot desglossar-se en tres apartats:

- a) preparació d'una suspensió estàndard d'eritròcits tripsinitzats
- b) determinació de la dosi hemaglutinant al 50% (DH₅₀) de la substància emprada com antiserum
- c) determinació de la dosi inhibidora de l'hemaglutinació al 50% (DIH₅₀).

a) Preparació d'una suspensió estàndard d'eritròcits tripsinitzats

La suspensió estàndard d'eritròcits tripsinitzats s'ha preparat segons LIS i SHARON (1972). Els eritròcits es col·lecten d'una suspensió estoc per centrifugació a temperatura ambient a 2000 r.p.m. durant 5 min. A continuació es renten 3 o 4 cops amb solució salina de NaCl al 0.85%.

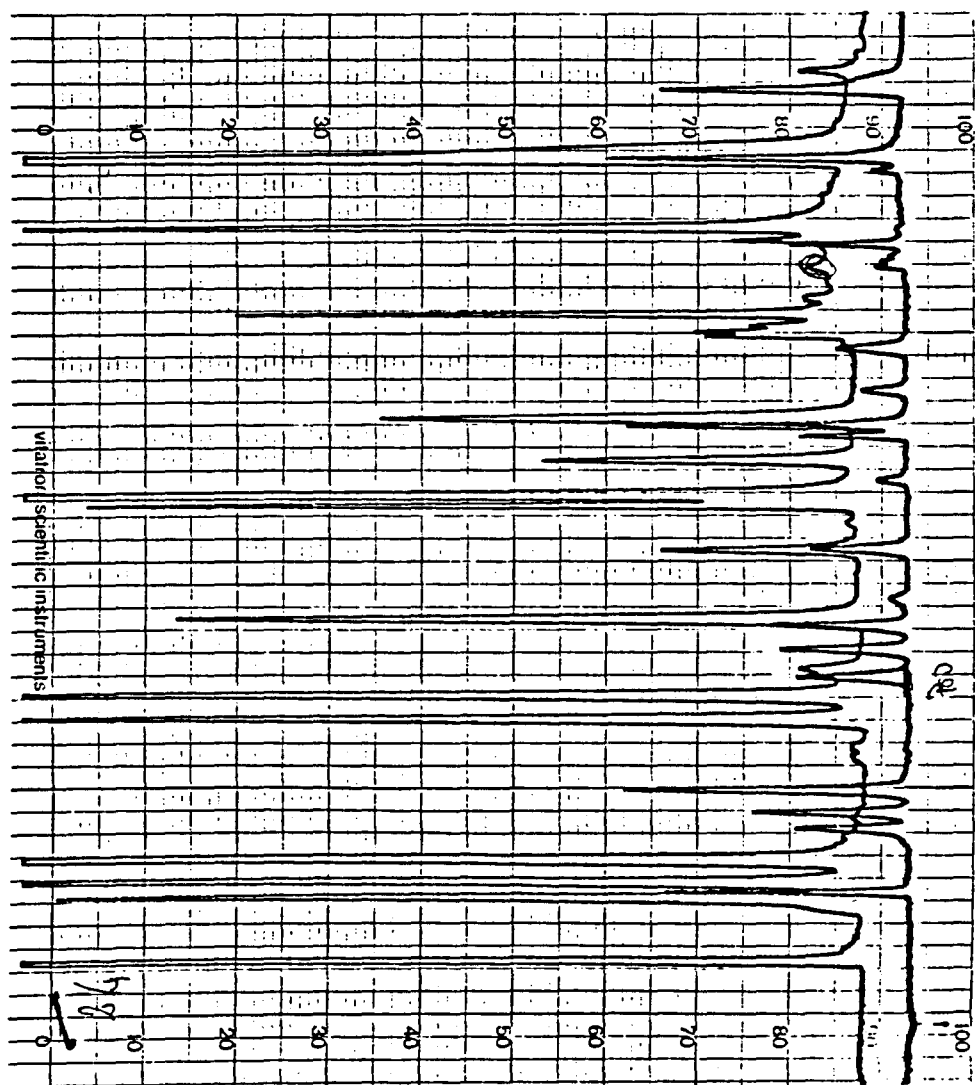


FIGURA 34.- Aminograma de les glicoproteïnes extreïtes de la membrana eritrocítica segons la tècnica d'Hamaguchi i Cleve.

Aminoàcid	Pes/Pes glicoproteïna	Residus/1000 residus
Hidrofòbics		
Metionina	0,0098	16,71
Valina	0,0288	68,71
Isoleucina	0,0215	45,47
Leucina	0,0380	84,03
Tirosina	0,0168	26,99
Fenilalanina	0,0271	45,40
Neutres		
Treonina	0,0283	69,16
Serina	0,0282	81,78
Prolina	0,0248	59,66
Glicocola	0,0192	70,82
1/2 Cisteïna	0,0054	12,89
Alanina	0,0282	87,64
Acídics		
Aspàrtic	0,0342	71,37
Glutàmic	0,0537	101,47
Bàsics		
Lisina	0,0265	50,21
Histidina	0,0181	30,02
Arginina	0,0492	78,24

TAULA 20. Composició en aminoàcids de les glicoproteïnes obtingudes. Els valors de l'aspàrtic i del glutàmic corresponen, en realitat a la suma aspàrtic + asparagina, i glutàmic + glutamina, respectivament.

Als eritròcits rentats se'ls adiciona PBS (al voltant de 4 mL de cèl·lules per 100 mL de suspensió) fins donar una suspensió d'una absorbància de 2 a 620 nm. Per cada 10 parts d'aquesta suspensió s'adiciona 1 part d'una solució (2 mg/mL) de tripsina 1:250 (Serva 37290) obtinguda de pàncreas boví i amb una activitat enzimàtica aproximada de 4 U/mL; la mescla s'incuba a 37°C durant 1 hora. Els eritròcits tripsinitzats es renten 4 o 5 cops amb solució salina per eliminar les restes de tripsina i se suspenen finalment en quantitat suficient de solució salina fins donar una suspensió estàndard d'una absorbància igual a 1 a 620 nm (1.2-1.5 mL de cèl·lules empaques per cada 100 mL de suspensió).

La tripsina (*E.C.3.4.21.4*) degrada les sialoglicoproteïnes de la superfície de l'eritròcit, fent que el potencial Z de la cèl·lula disminueixi afavorint la reacció d'aglutinació, car el potencial Z, junt amb les característiques dielèctriques del medi, són els factors més importants de la repulsió intercel·lular. Un altre aspecte positiu de la tripsina és l'eliminació d'antígens interferidors que poden ésser presents en la superfície eritrocítica.

b) Determinació de la DH_{50}

Com anticòs s'ha emprat una lectina parcialment purificada i obtinguda del cargol *Helix pomatia* (Sigma L7760) solubilitzada en PBS.

Per a calcular la DH_{50} , que es defineix com la quantitat d'antisèrum, anticòs o lectina, necessària per aglutinar el 50% d'una suspensió d'eritròcits estàndard, s'ha partir d'una solució de lectina de 5 mg/mL i s'han fet amb PBS dilucions seriades a la meitat.

Amb aquestes dilucions es fa una prova preliminar per obtenir una estimació de la concentració que dona una aglutinació del 50%. Un cop s'ha obtingut aquest valor s'empren dilucions de lectina que compreguin una forquilla de 2 dilucions per sobre i per sota de la dilució que en un principi sembla aglutinar el 50% dels eritròcits. Amb aixó s'obtenen com a mínim 4 punts en la regió d'aglutinació parcial (entre el 12 i el 95%).

De cadascuna d'aquestes dilucions s'agafen, per duplicat, 2 mL i es col·loquen en cubetes d'un espectrecolorímetre Spectronic 20 (Bausch Lomb). A cada cubeta hom afegeix 2 mL de la suspensió d'eritròcits.

Simultàniament, i també per duplicat, es realitzen uns controls positius (amb una dilució que aglutinava el 100%) i negatius (havent col·locat solució salina en comptes de lectina). Després d'agitació durant 10 min en un rotor, es deixen les cubetes en repòs durant 2.5 hores. Un cop ha transcorregut aquest temps, i amb molta cura per a no produir pertorbacions en el líquid, es fa la lectura de l'absorbància a 620 nm.

La relació de l'absorbància del control positiu (aglutinació total) i de l'absorbància de cada dilució dóna uns percentatges que transformats en unitats probit (PHILIPPE 1967) i enfrontats al logaritme de la quantitat de lectina emprada donen una línia recta, en la que hom pot calcular el valor de la dilució que aglutina el 50% dels eritròcits.

A partir dels valors obtinguts (taula 21 i figura 35) s'infereix una DH_{50} de la lectina igual a 18.28 $\mu\text{g/mL}$.

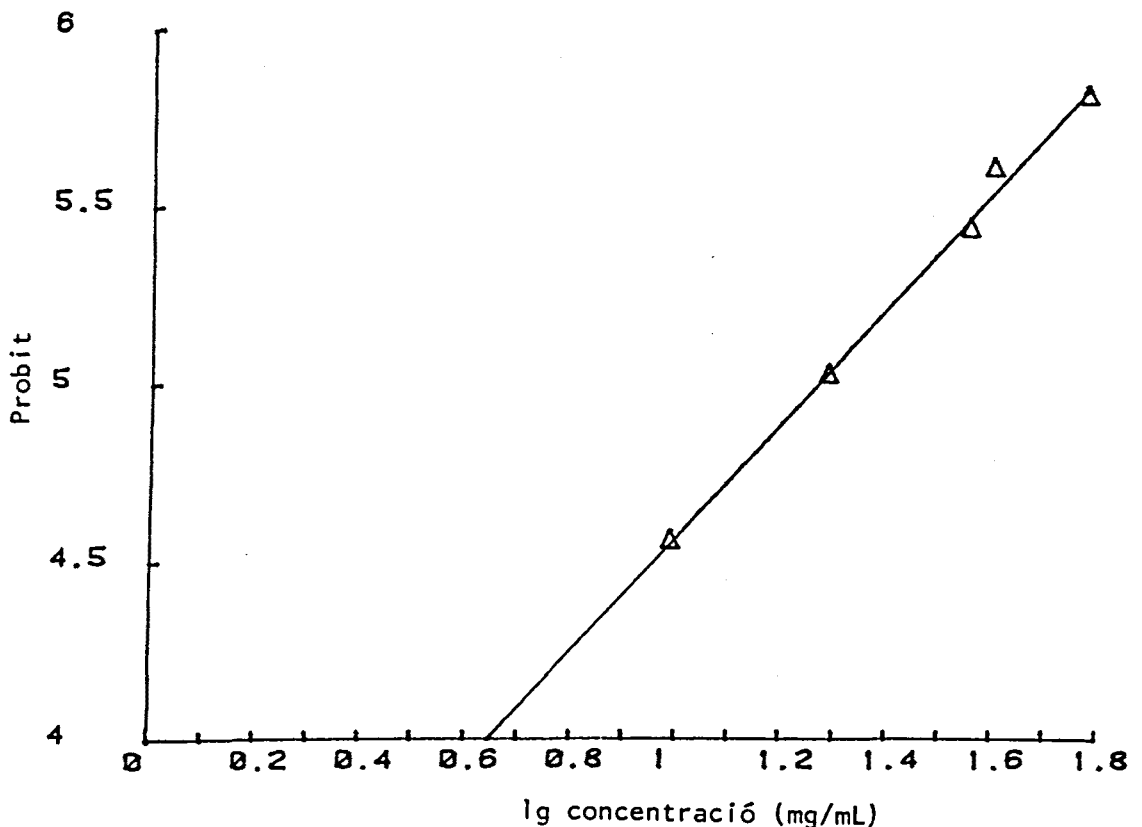


FIGURA 35.- Gràfica d'unitats probit vs concentració, emprada per al càlcul de la dosi hemaglutinadora del 50% dels eritròcits.

Concentració de lectina (mcg/ml)	Logaritme de la concentració	Absorbància	Relació d'absorbàncies	Probit
60	1,7781	0,24	0,79	5,81
38,89	1,5898	0,27	0,70	5,61
36	1,5563	0,28	0,68	5,47
19,44	1,2886	0,37	0,51	5,03
9,76	0,9894	0,57	0,33	4,56

Concentració aglutinant total: 120 mcg/ml
Absorbància de la dilució aglutinant total: 0,19

Equació de la recta: $y = 1,6292 \cdot x + 2,9492$ ($r = 0,997$)
 $y =$ probit; $x =$ logaritme de la concentració

$DH_{50} = 18,14$ mcg/ml

TAULA 21.- Valors obtinguts per al càlcul de la DH_{50} de la lectina Helix Pomatia.

c) *Determinació de la dosi inhibidora de l'hemaglutinació al 50%*
(DIH_{50})

La DIH_{50} es defineix com la quantitat de substància inhibidora (en aquest cas les glicoproteïnes) necessària per inhibir una dosi estàndard d'activitat aglutinant al 50% de l'aglutinació de la suspensió d'eritròcits de prova.

La metòdica de la prova és semblant a la seguida en la determinació de la DH_{50} . Es realitzen dilucions seriades a la meitat a partir d'una solució de glicoproteïnes en PBS ($c = 2.24 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Com a aglutinant s'empren $4 \text{ } DIH_{50}$ de lectina, o sigui $73.12 \text{ } \mu\text{g/mL}$. La mescla -1 mL de cada- es deixa incubant a 37°C durant 30 min. A continuació hom afegeix 1 mL de la suspensió estàndard d'eritròcits i es deixa durant 2.5 hores. També es realitza un control positiu (glicoproteïna, salina i eritròcits) i un negatiu (lectina, salina i eritròcits).

Després de realitzar la lectura de l'absorbància a 620 nm, es calculen els percentatges d'inhibició i es transformen en probits (taula 22). A partir de la recta obtinguda enfrontant les unitats probit als logaritmes de la concentració (figura 36) hom obté la DIH_{50} , que en aquest cas és igual a $50.03 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

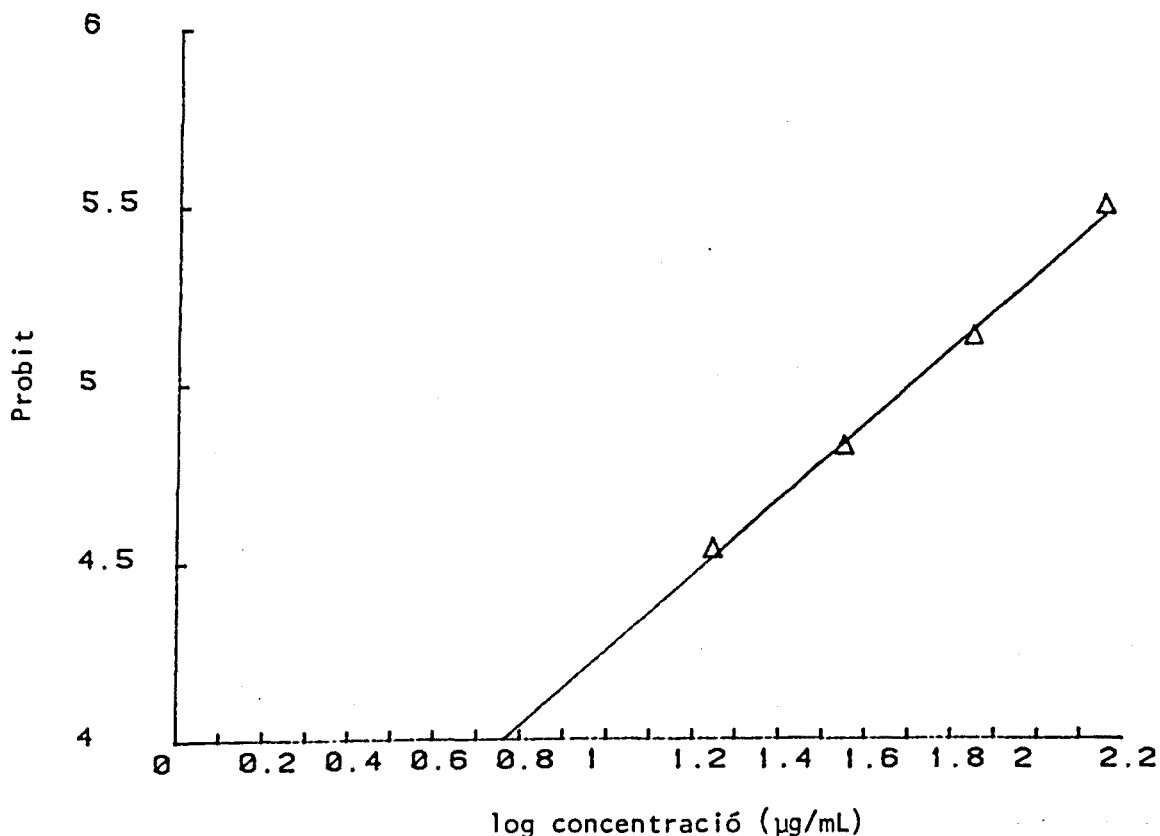


FIGURA 36.- Gràfica d'unitats probit vs concentració, emprada per al càlcul de la dosi inhibidora de l'hemaglutinació del 50% dels eritròcits.

Concentració en mcg/ml de glicoproteïna	Logaritme de la concentració	Absorbància	Relació d'absorbàncies	Probit
140	2,1461	0,21	0,68	5,47
70	1,8451	0,17	0,55	5,13
35	1,5441	0,13	0,42	4,80
17,5	1,2430	0,10	0,32	4,53

Concentració inhibidora total: Control positiu

Absorbància del control positiu: 0,31

Equació de la recta: $y = 1,0464 \cdot x + 3,2093$ ($r = 0,999$)

$y = \text{probit}$; $x = \text{logaritme de la concentració}$

$DIH_{50} = 51,44 \text{ mcg/ml}$

TAULA 22.- Valors obtinguts per al càlcul de la DIH_{50} .

3. PURIFICACIÓ DE LES GLICOPROTEINES AMB ACTIVITAT DE GRUP SANGUINI

El següent pas en l'obtenció de les glicoproteïnes ha estat la purificació d'aquestes.

En primer lloc les glicoproteïnes es purifiquen per filtració en gel, eliminant els productes formats en les ocasionals degradacions, i que tinguin una massa molecular inferior a 60000, car les glicoproteïnes característiques de grup sanguini A tenen un comportament cromatogràfic (taula 23) idèntic al que tindrien les proteïnes globulars amb masses moleculars que compreguessin una forquilla entre 65000 i 500000.

A continuació les glicoproteïnes amb el sucre N-acetil-D-galactosamina com a resta terminal -propi del grup sanguini A- són retingudes mitjançant cromatografia d'afinitat en columna, quedant d'aquesta manera, separades de les glicoproteïnes que tenen altres activitats.

Eluint amb diferents concentracions de N-acetil-D-galactosamina, es den agrupar diferents fraccions segons llurs afinitats amb la lectina que forma el lligand de la columna.

3.1. CROMATOGRAFIA DE FILTRACIÓ PER GEL

La cromatografia de filtració per gel s'ha realitzat en columna K16/70 (Pharmacia) de 1.6 cm de diàmetre i 70 cm de longitud, equipada amb Sephadex G-75 (Pharmacia), vàlid per un marge de masses moleculars, referit a proteïnes globulars, de 3000 a 80000.

Previament el xerogel s'ha suspès en aigua, deixant-lo inflar durant 2-3 dies, i després d'eliminar les partícules més petites per decantació, s'ha desgasat per succió a pressió reduïda.

L'empaquetament del gel s'ha realitzat per tècniques convencionals (FISCHER 1980). Un cop el gel s'ha sedimentat, s'ha equilibrat amb solució amortidora de fosfats 0.15 M, pH 7.5, i que contenia NaCl 0.1 M, a una velocitat de flux de 30 mL/h ($15 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), mantinguda per una bomba peristàltica (Miniplus-2, Gilson). El volum del gel dins de la columna era de 119 mL.

Referència	Gel	Eluent	Mostra cromatografiada	Resultats
Bakeman i Wasemiller (1967)	Bio Gel P (de P-30 a P-300)	Mateix solvent de la mostra	Membranes d'eritròcits solubilitzades amb detergent	A excepció del gel P-30, en tots els altres hi ha un retard per part de les proteïnes de membrana. Amb el gel P-30 apareixen 4 pics amb els següents volums relatius: 1, 1.36, 2.07 i 3.02 $V_e = V_0$
Blumenfeld i Puglita (1979)	Bio Gel P-100	Acetat de piridina 0,1 M, pH 5,0	Glicoproteïnes de grup sanguini ABO	$V_e = V_0$
Fiori et al. (1971)	Sephadex G-100 i G-200 Sephacrose 4B	Tris-HCl pH 7,3/0,05 M + NaCl 0,9% Fosfats pH 7,2/0,025 M	Proteïnes obtingudes pel tractament de l'estroma amb Triton X-100	Amb G-100 s'obtenen 3 fraccions la 1 ^a amb el V_0 . Amb G-200 hi ha també tres fraccions. Amb la Sepharose la major part s'elueix amb el V_0
Hamaguchi i Cleave (1972)	Sephadex G-100	Mateix solvent que la mostra	Glicoproteïnes presents en la fase aquosa en SDS al 1%	S'obtenen tres pics. El que té $V_e = 470$ ml, correspon a un pes de 24000
Jenkins i Tanner (1976)	Sephadex G-100	SDS al 1% + EDTA 1 mM pH 8,0	Fragment obtingut per lisi triptica del polipèptid 3	Pes del fragment de 60000
Lenard (1970)	Sephadex G-200	Bicarbonat amònic 0,05M + SDS al 1%	Proteïnes de membrana obtingudes per SDS	S'obtenen 4 fraccions de pesos 255.000, 240.000, 108.000 i 86.000
Rega et al. (1967)	Sephadex G-200	Fosfats pH 7,4, 10 mM + NaCl 150 mM	Proteïnes obtingudes per tractament amb n-butanol	$V_e = V_0$
Rosenberg i Guidotti (1968)	Sephacrose 4B	Mateix solvent que la mostra	Proteïnes solubilitzades amb SDS al 1%	El 70% surt amb el mateix V_e que l'albumina. Altres dos pics tenen pesos més elevats $V_e = V_0$
Whittemore et al. (1969)	Sephadex G-200 i Sepharose 4B	Solució amortidora de borats i de fosfats	Proteïnes obtingudes amb n-butanol	

TAULA 23.- Descripció d'algunes separacions per cromatografia de filtració per gel de proteïnes obtingudes a partir de membranes d'eritròcits.

Atés que els gels contenen una petita quantitat de grups carregats -calculats per ORTNER i PACHER (1972) en 4-8 $\mu\text{Eq/g}$ - que poden interaccionar per unió iònica i adsorbir, d'aquesta manera, una certa quantitat de proteïna, abans de cromatografiar la solució de glicoproteïnes, s'ha fet passar per la columna una solució aquosa d'albumina a fi de que els grups carregats quedin bloquejats.

La comprovació de l'empaquetament del gel i, alhora, la determinació del volum buit (V_0) s'ha realitzat amb una solució aquosa al 0.21% de Blue-Dextran (Pharmacia) de la que s'han aplicat 1.8 mL. Com a fase mòbil s'ha emprat la mateixa solució amortidora amb la que s'ha empaquetat la columna, ara a una velocitat de flux de 26.40 mL/h ($13.20 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). El líquid efluent s'ha recollit en alíquotes de 2.6 mL en un col·lector de fraccions (Microcol TDC-80, Gilson). El volum buit s'ha calculat determinant en les fraccions l'absorbància a l'espectre U.V. a 254 nm en un espectrofotòmetre Perkon Elmer 124.

El volum intern (V_i) s'ha determinat amb una solució de triptofan ($c = 0.26 \text{ mg/mL}$) en solució amortidora de fosfats pH 7.5 i força iònica $I = 0.16 \text{ mol/L}$, determinant-se el volum d'elució per l'absorbància de les fraccions a 280 nm.

La solució de les glicoproteïnes, aplicada en un volum de 1.8 mL, tenia una concentració de 3.78 mg/mL.

El volum d'elució (V_e) s'ha determinat a partir del registre d'absorbància de les fraccions en un interval de 235 a 210 nm.

Els resultats obtinguts indiquen que la major part de les glicoproteïnes s'elueixen amb el volum buit ($V_e = 38.75 \pm 1.3 \text{ mL}$), una petita quantitat surt en les fraccions corresponents al volum intern ($V_i = 89.20 \pm 1.3 \text{ mL}$) i ha de provenir dels productes degradats. En algunes alíquotes, apareix un petit pic d'absorbància ($A = 0.18$ a 235 nm) en un volum d'elució intermig ($V_e = 56.25 \text{ mL}$).

L'espectre d'absorció a l'U.V. d'aquesta fracció és semblant a l'obtingut amb les glicoproteïnes de partida (màxim a 208 nm, $A = 1.270$, i cap màxim definit a 280 nm, $A = 0.065$).

Per a calcular la masa molecular de la fracció eluïda en aquesta zona, s'ha realitzat una corba de calibrat en les mateixes condicions cromatogràfiques que les emprades amb la solució de glicoproteïnes.

El calibrat s'ha realitzat amb les següents substàncies: citocrom *c* (Sigma C7150), caseïna (Merck 2244), ovoalbúmina (Sigma A5503) i albúmina sèrica bovina (Sigma A1887).

Enfrontant els logaritmes dels pesos moleculars a la relació entre el volum d'elució respectiu i el volum buit (V_e/V_0) s'ha obtingut la recta de calibrat (figura 37). Per interpolació de la relació V_e/V_0 de la fracció hom obté la masa molecular de la mateixa, que equival a 33400, sempre i quan les glicoproteïnes d'aquesta fracció tinguessin el mateix comportament hidrodinàmic que les proteïnes globulars.

	Pes molecular	log (PM/1000)	V_e/V_0
CITOCROM <i>c</i>	12400	1,0934	1,790
CASEINA	23600	1,3729	1,574
OVOALBUMINA	43000	1,6335	1,355
ALBUMINA BOVINA	66000	1,8195	1,226
Equació de la recta	$y = -1,27260 \cdot x + 3,37122$ ($r = -0,9995$) $y = \log(\text{PM}/1000)$; $x = V_e/V_0$		
V_e/V_0 de la fracció: 1,452			
Masa molecular: 33400			

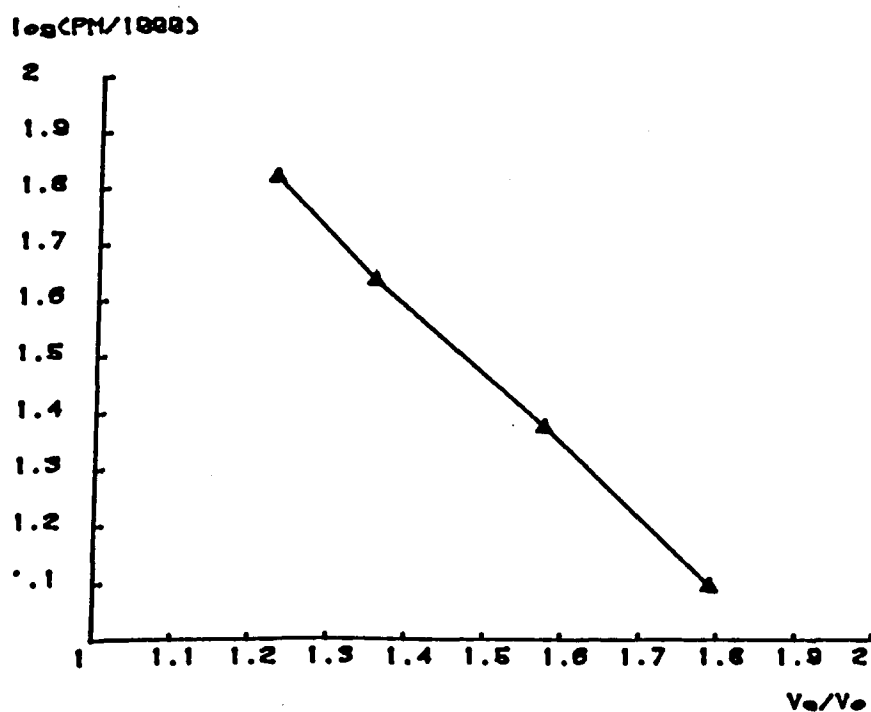


FIGURA 37 - Recta de calibrat

3.2. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT

Les glicoproteïnes amb activitat de grup sanguini A han estat separades selectivament de les altres glicoproteïnes mitjançant cromatografia d'afinitat.

La lectina obtinguda del cargol *Helix pomatia* s'uneix específicament a les molècules que tenen residus terminals N-acetil- α -D-galactosamina (PROKOP et al., 1968).

Estudis d'inhibició competitiva amb derivats glucídics (HAMMARSTRÖM et al., 1977) han palesat que aquesta lectina mostra una afinitat d'unió que va minvant en aquest ordre: α -D-GalNAc > α -D-GlcNAc \approx β -D-GlcNAc > β -D-GlcNAc. La desacetilació també minva dràsticament l'afinitat d'unió de qualsevol derivat glucídic.

Dins del conjunt d'eritròcits del grup sanguini A, es troba que aquesta lectina interacciona de forma diferent segons els diferents subgrups. Així, els subgrups A₂ i A₁B mostren evidències d'una notable heterogenicitat en la unió, cosa que probablement indica la presència de més d'un lloc d'unió.

La separació de les glicoproteïnes s'ha realitzat en una columna K9/15 (Pharmacia) de 9 mm de diàmetre intern i 15 cm de llargada. El gel emprat ha estat *Helix pomatia*-Lectin-Sepharose 6 MB (Pharmacia).

Com a solució equilibradora s'ha fet servir la solució amortidora PBS, essent la velocitat de flux de 7 mL/h. L'elució s'ha realitzat emprant un eluent selectiu (α -N-acetil-D-galactosamina).

Després d'aplicar la mostra, s'ha passat PBS fins que els eluits presenten el mateix espectre U.V. que la solució PBS.

En resum la tècnica emprada ha estat la següent:

- empaquetament de la columna
- determinació del volum del llit cromatogràfic
- equilibració amb 10 volums de PBS
- aplicació de la mostra: 5% del volum del llit cromatogràfic
- incubació durant 20 minuts
- elució amb PBS (generalment 2-3 volums)
- elució amb α -D-GalNAc 1 mM (2-3 volums)
- elució amb α -D-GalNAc 10 mM (2-3 volums)
- regeneració del gel

La visualització de la glicoproteïna en els eluits no es pot fer amb els mètodes clàssics basats en la determinació de l'absorbància a 280 nm, car, com ja ha quedat palés, a aquesta longitud d'ona l'absorbància és força petita. Per altre part, tampoc pot valorar-se l'enllaç peptídic puix aquest és interferit per la presència de N-acetil-D-galactosamina, que presenta un màxim en aquesta zona, màxim que no segueix la llei de Beer i que, per altre part experimenta un desplaçament batocròmic concentració-dependent. (Així, una solució 1 mM d'aquest aminosucre te una absorbància de 1,35 a 210 nm, mentre que una solució 10 mM te una absorbància de 1.94 a 218 nm).

Com a solució s'han visualitzat els tubs que contenen glicoproteïnes mitjançant precipitació amb àcid fosfotúngstic al 5% en HCl 2 N. A més s'ha assolit quantificar aquestes glicoproteïnes determinant la turbidesa que aquesta precipitació produeix. Així, amb una determinada relació entre l'àcid fosfotúngstic i els eluits (1:1.5, v/v), es pot fer una quantificació, sempre i quan aquesta es realitzi en un temps no superior als 30 minuts després de la sortida de l'eluit, determinant el valor de la transmitància a una longitud d'ona on ni l'àcid fosfotúngstic ni les substàncies eluides (470 nm) no mostren cap absorbància de *per se*. D'aquesta manera s'ha obtingut una bona correlació entre la glicoproteïna present i la transmitància determinada ($r = 0.999$).

La figura 38 mostra el perfil cromatogràfic obtingut. Hom observa un primer pic pertanyent a les substàncies que no tenen pas afinitat amb la lectina i que representen aproximadament un 20% del total aplicat; a partir dels 16.5 mL d'elució -i 3 després d'haver aplicat la N-acetil-D-galactosamina 1 mM, volum que correspon, si fa no fa, al volum buit- ja s'elueixen les glicoproteïnes que havien estat retingudes per la lectina i que representen més del 56% del total aplicat; finalment apareix un petit pic (quasi el 23% del total aplicat) amb un valor màxim a un volum d'elució igual a 37.5 mL, i que correspon a les glicoproteïnes que estaven fortament unides al gel de la columna i que han estat eluides per una concentració de l'aminosucre de 10 mM.

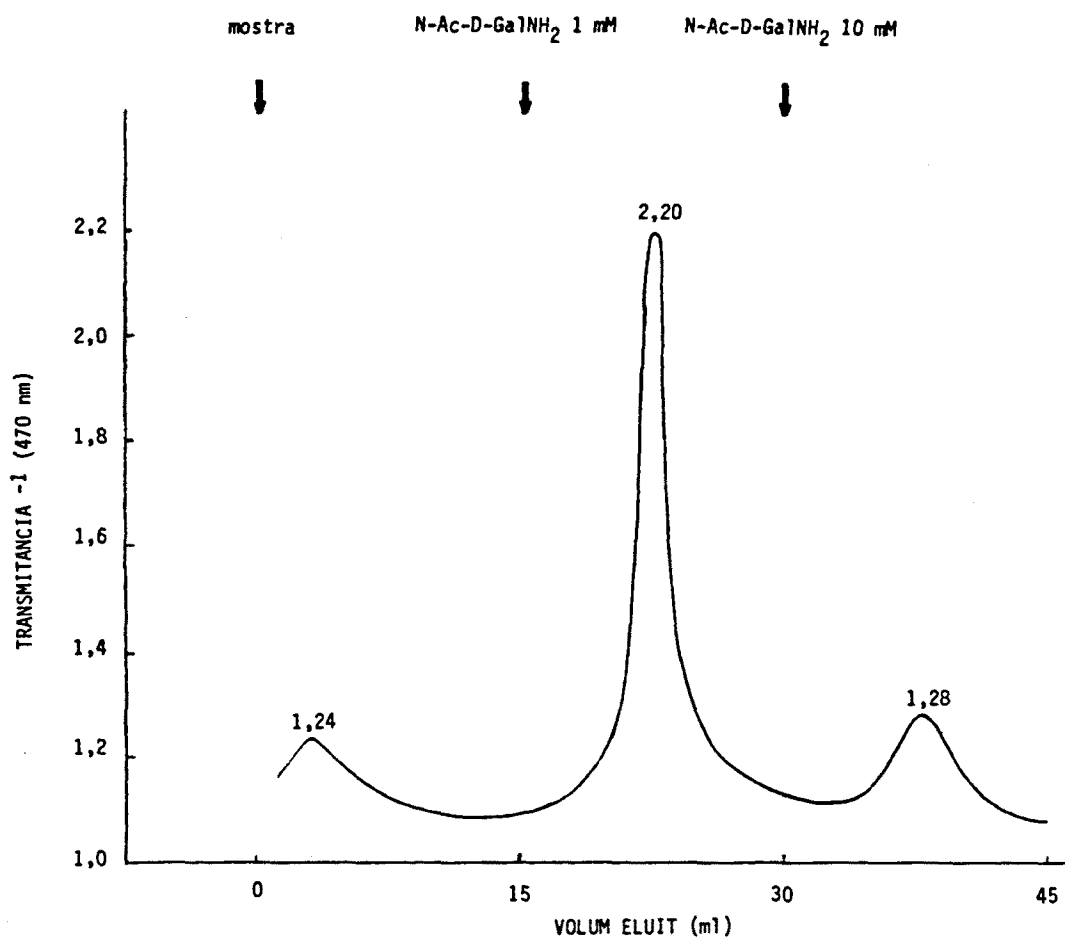


FIGURA 38.- Perfil cromatogràfic obtingut amb la purificació de les glicoproteïnes mitjançant cromatografia d'afinitat. Volum de la fase estacionària: 6.89 mL; volum de la mostra aplicada: 0.5 mL; velocitat de flux: 6.24 mL/h; temperatura: 4°C.

DETERMINACIO DELS PARAMETRES ESTRUCTURALS
DE LA GLICOPROTEINA ANTIGENICA

Els paràmetres estructurals i les característiques analítiques han estat determinats en les glicoproteïnes obtingudes segons s'ha indicat en l'apartat anterior, i eluïdes de la columna de Sepharose 6 MB-*Helix pomatia* per N-acetil-D-galactosamina a concentració lleugerament superior a 1 mM (1.1-1.3 mM).

El volum d'eluit que conté les glicoproteïnes s'ha concentrat aplicant el principi de l'òsmosi inversa: el volum s'ha introduït en una membrana de diàlisi Visking i la superfície d'aquesta s'ha recobert d'escates de polietilenglicol de masa compressa entre 15000 i 20000 (Sigma P2263), deixant a 4°C fins que el volum s'ha reduït a 1/2 - 1/4 del volum inicial. A continuació el volum es dialitza durant 48 h enfront aigua bidestil·lada a 4°C, renovant-se cada 6-8 hores.

Un cop dialitzat, el contingut del sac de diàlisi s'ha trasvassat als corresponents vials i s'ha liofilitzat.

1. CARACTERÍSTIQUES ANALÍTQUES

Com a característiques analítiques de les glicoproteïnes s'han definit l'anàlisi dels continguts en proteïna i glúcids, respectivament, així com la determinació de la glicoproteïna per mitjà d'una tècnica turbidomètrica, i la del poder inhibitori de l'hemaglutinació.

1.1. INHIBICIÓ DE L'HEMAGLUTINACIÓ

El poder inhibitori de l'hemaglutinació s'ha determinat segons la tècnica descrita en l'apartat 2.2.7. corresponent a L'AILLAMENT I PURIFICACIÓ DE LA GLICOPROTEÏNA ANTIGÈNICA:

En aquest cas la DH_{50} de la lectina *Helix pomatia*, emprada com a aglutinant ha estat de 21.31 µg/mL.

Pel que fa a la glicoproteïna, s'ha partit d'una solució en PBS a concentració de 0.87 mg/mL, i d'aquesta s'han fet diverses dilucions.

Per a cada dilució s'han realitzat tres proves i s'ha emprat el valor mig d'aquestes, sempre i quan no hi hagués una gran dispersió, en aquest cas les determinacions s'han tornat a repetir.

La figura 39 mostra la gràfica obtinguda enfrontant les unitats probit a la concentració. En la taula 24 es detallen els resultats, essent la DIH_{50} igual a $38,82 \mu\text{g/mL}$.

Els límits de confiança del valor obtingut (x_i) s'obtenen multipliant l'error estàndard $SEM(x_i)$ pel valor t donat per la llei d'Student-Fisher amb $v = n - 2$ graus de llibertat (DOMENECH i RIBA, 1983).

$$x_i \pm t(n - 2, \alpha) \cdot SEM(x_i)$$

En aquest cas i per uns límits de confiança $\alpha = 90$, hom obté un valor de $t(3, 0.010) = 5,841$, essent els límits de $39,43$ i $38,21 \mu\text{g/mL}$.

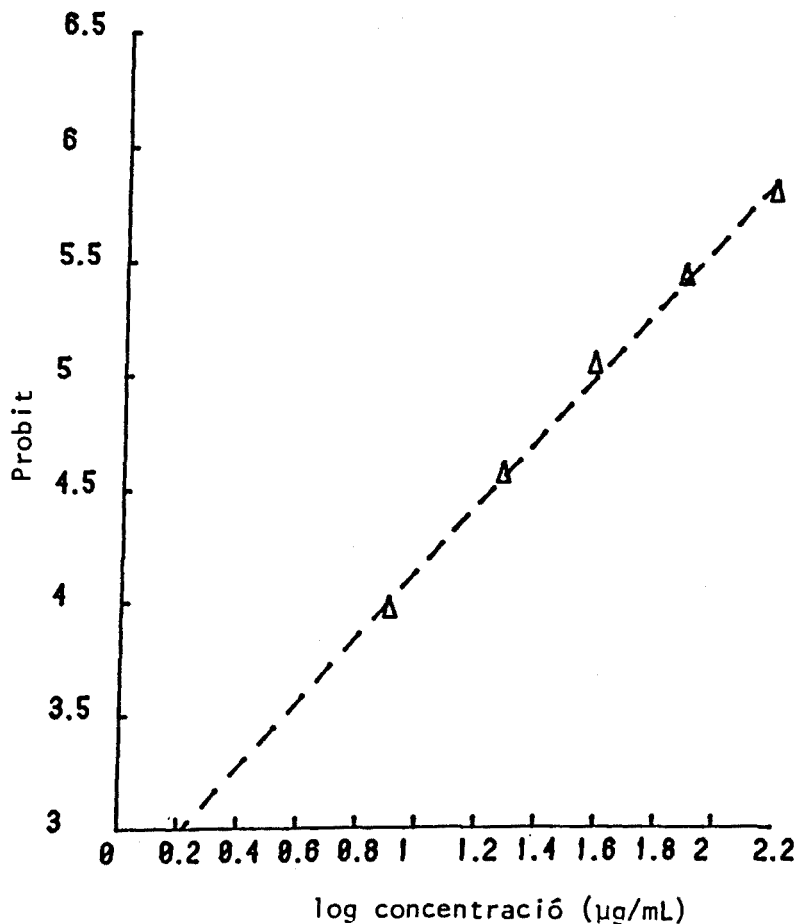


FIGURA 39.- Gràfica d'unitats probit vs concentració emprada per al càlcul de la dosi inhibidora de l'hemaglutinació del 50% dels eritròcits.

Concentració en mcg/ml de glicoproteïna	Logaritme de la concentració	Absorbància	Relació d'absorbàncies	Probit
151	2,1790	0,26	0,68	5,47
76	1,8808	0,22	0,67	5,44
38	1,5798	0,17	0,52	5,05
19	1,2788	0,11	0,33	4,56
8	0,9031	0,05	0,15	3,96

Concentració inhibidora total: Control positiu
Absorbància del control positiu: 0,33

Equació de la recta: $y = 1,4556 \cdot x + 2,6870$ ($r = 0,998$)
 $y =$ probit; $x =$ logaritme de la concentració

$DIH_{50} = 38,82$ mcg/ml

TAULA 24 .- Valors obtinguts en el càlcul de la DIH_{50} de la glicoproteïna antigènica.

1.2. CONTINGUT PROTEIC

La determinació del contingut proteic de la glicoproteïna antigènica ha tingut una doble finalitat: per una part, la quantificació de la proteïna present en la glicoproteïna, i per altre, la determinació del grau de validesa en la valoració de glicoproteïnes mitjançant les tècniques colorimètriques pròpies de les proteïnes estrictament dites.

1.2.1. MÈTODE DE LOWRY

Aquest mètode és el més adient per a l'estimació de les proteïnes de membrana. Com és sabut, el desavantatge més gran és que el color desenvolupat varia segons les proteïnes analitzades i la corba de calibració basada en una proteïna estàndard, com és ara l'albumina sèrica bovina, no és sempre satisfactòria. En l'anàlisi comparatiu entre diferents fraccions es produeixen diferències significatives, especialment si aquestes contenen glicoproteïnes (MADDY et al.1972), per la qual cosa cada fracció proteica hauria de calibrar-se enfront de si mateixa.

Per aquest motiu, la glicoproteïna antigènica s'ha valorat comparant la corba de resposta amb les que s'obtenen amb BSA (Sigma A4503) i amb l'orosomuroid humà (α_1 -acid glycoprotein, Sigma G9885).

Abans de l'assaig, la glicoproteïna antigènica empada, s'havia mantingut en un desecador al buit que contenia clorur càlcic fins obtenir un pes constant.

Les tres mostres s'han dissolt en solució PBS i les concentracions exactes de l'albumina i de l'orosomuroid s'han determinat per espectrofotometria emprant els següents valors de coeficient d'absorció específica: 65, a 280 nm, per a l'albumina i 89.3, a 278 nm, per a l'orosomuroid.

Les lectures d'absorbància del complex colorat s'han realitzat a 720 nm. Com s'observa a la figura 40, les corbes obtingudes tenen pendents molt diferents, fent la mínima sensibilitat en el cas de la glicoproteïna antigènica.

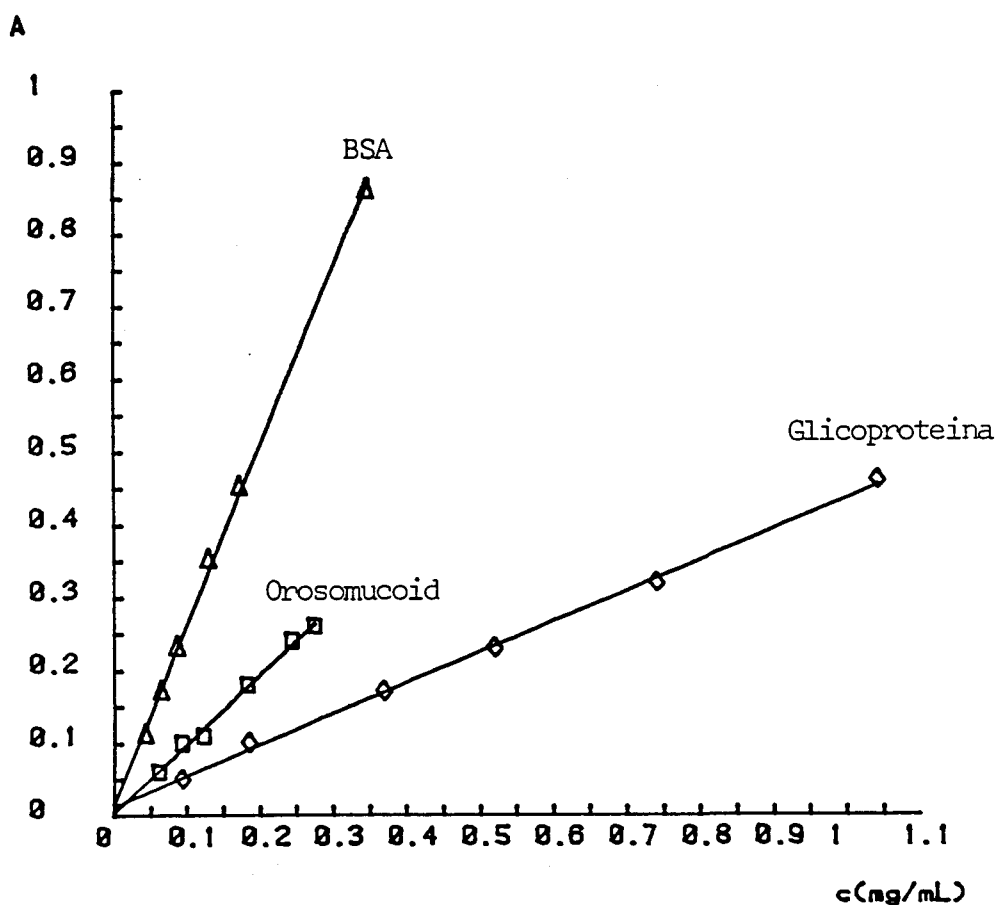


FIGURA 40.- Valors d'absorbància a 720 nm obtinguts en la valoració de Lowry de tres molècules biològiques.

Una comparació general de les dades obtingudes ens porta al fet que, per exemple, a una concentració de 0.2 mg/mL, a l'albúmina li pertoqui una absorbància de 0.510, de 0.189 a l'orosomuroid i només de 0.016 per a la glicoproteïna antigènica. Valors que, en termes percentuals i prenent com a referència del 100% l'absorbància produïda per l'albúmina, impliquen un 37.06% per a l'orosomuroid i un 3.14% per a la glicoproteïna.

1.2.2. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS

L'anàlisi del contingut en aminoàcids s'ha realitzat, seguint les línies generals de la tècnica descrita per MOORE i STEIN (1963), en un analitzador de aminoàcids Chromaspeck Rank Hilger equipat amb un integrador Varian CDS 111.

La glicoproteïna (0.33 mg) s'ha hidrolitzat amb 0.5 mL d'àcid clorhídric 6 M durant 24 h a 110°C dins de vials en els que s'ha fet el buit.

Per tal de reduir els possibles errors i solventar el problema que presenta el fet que la resposta a la fluorescència és diferent per a cada aminoàcid, es fan servir dues menes de patrons de referència: l'estàndard extern i l'estàndard intern.

L'estàndard extern és una solució comercial d'aminoàcids que en conté 17 a concentració de 50 mM (25 mM per a la cisteïna). A aquesta solució hom afegeix l'aminoàcid *l*-norleucina a la mateixa concentració.

L'estàndard intern és la mateixa *l*-norleucina esmentada la qual s'introdueix en el problema dissolguent-la en la solució clorhídrica 0.05 N que s'empra per a dissoldre l'hidrolitzat d'aminoàcids. L'ús de la *l*-norleucina com a estàndard intern es deu a que la *l*-norleucina és un aminoàcid que no es troba, normalment, entre els naturals.

Tal com es deia suara, la resposta de cada aminoàcid a la fluorescència no és la mateixa i cal, per tant, prendre unes referències quan s'ha de quantificar el contingut aminoacídic en la mostra. Aquestes referències es prenen envers la *l*-norleucina, estàndard intern, que ha estat introduïda a la solució estàndard de 17 aminoàcids i també al problema.

Admetent com a lineal la variació de la fluorescència amb la concentració d'aminoàcid en el marge de concentracions emprat, es defineix un *factor de referència relatiu* (f.r.r.) d'un aminoàcid determinat:

$$\text{f.r.r.} = \frac{C_1(\text{estàndard}) \cdot A_2(\text{estàndard})}{A_1(\text{estàndard}) \cdot C_2(\text{estàndard})}$$

on C_1 i C_2 són les concentracions respectives de l'aminoàcid i de la *l*-norleucina en la solució estàndard, i A_1 i A_2 són les àrees dels pics de l'aminoàcid i de la *l*-norleucina, respectivament, a l'estàndard.

En el problema, la concentració d'aquest aminoàcid es calcula segons:

$$C_1(\text{problema}) = \frac{A_1(\text{problema})}{A_2(\text{problema})} \cdot \text{f.r.r.} \cdot C_2(\text{problema})$$

Per a calcular els mols d'aminoàcids presents al problema cal multiplicar la concentració calculada pel volum en el que s'ha dissolt el problema.

L'aminograma obtingut amb una alíquota de l'hidrolitzat de la glicoproteïna es mostra a la figura 41. En la taula 25 s'indica el contingut d'aminoàcids trobat. El contingut corresponent al triptòfan s'ha obtingut espectrofotomètricament segons es detalla en l'apartat 1.2.3. El contingut en metionina s'ha obtingut amb un altre alíquota de l'hidrolitzat d'aminoàcids augmentant la sensibilitat per tal de poder valorar aquest aminoàcid. Els valors de la serina, treonina i tirosina s'han corregit per a compensar la descomposició parcial que aquests aminoàcids experimenten durant la hidròlisi.

1.2.3. DETERMINACIÓ DEL TRIPTOFAN

El triptofan pot determinar-se per tècniques espectrofotomètriques (GOODWIN i MORTON, 1946; BENCZE i SCHMID, 1957), o be colorimètricament emprant N-bromosuccinimida (SPANDE i WITKOP, 1967).

En aquest cas s'ha escollit la de Goodwin i Morton, ja emprada anteriorment (cf. Apartat 1.4.5. de l'AILLAMENT I PURIFICACIÓ DE LA GLICOPROTEÏNA ANTIGÈNICA), la qual proporciona el nombre de mols de triptofan i tirosina.

Partint d'una mostra de glicoproteïna de 3.2 mg, dissolta en 3 mL de NaOH 0.1 N, i després d'1 hora d'incubació a 37°C, s'obtenen els següents valors d'absorbància

$$A_{280} = 0.591$$

$$A_{294} = 0.443$$

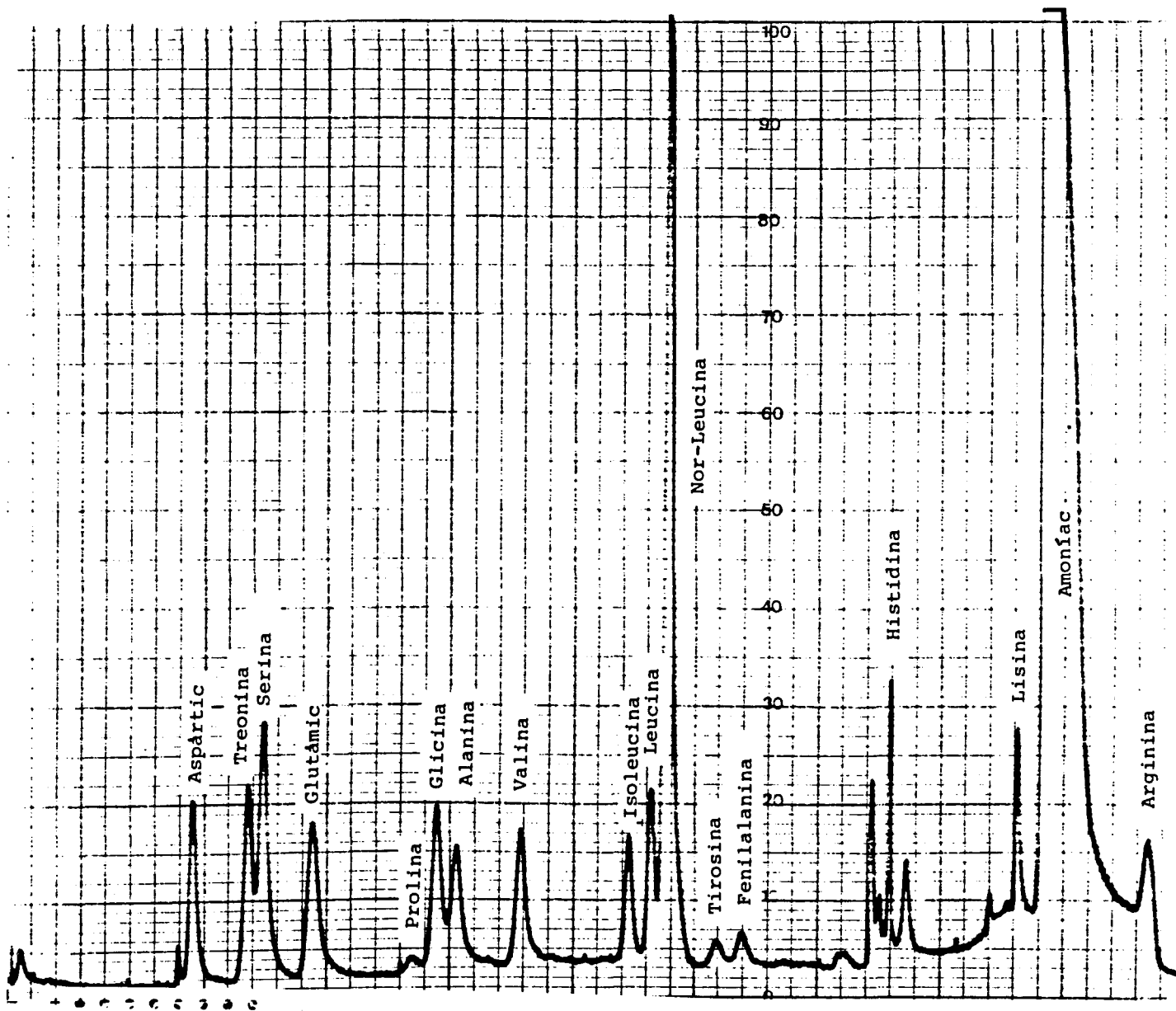


FIGURA 41.- Aminograma obtingut de la hidròlisi àcida de la glicoproteïna antigènica.

AMINOACID	RESIDUS/1000	$\mu\text{g}/\text{mg}$ GLICOPROTEINA
<u>Hidrofòbics</u>		
Metionina	11,57	2,163
Valina	58,90	8,648
Isoleucina	40,30	6,625
Leucina	59,49	9,780
Triptòfan	12,04	3,082
Tirosina	16,06	3,648
Fenilalanina	17,63	3,651
<u>Neutres</u>		
Treonina	95,71	12,606
Serina	128,17	16,882
Prolina	59,24	8,547
Glicocola	106,96	10,063
1/2 Cisteïna	0	0
Alanina	66,46	7,421
<u>Acídics</u>		
Aspàrtic	12,97	7,043
Glutàmic	102,83	18,833
<u>Bàsics</u>		
Lisina	79,11	14,594
Histidina	48,06	9,346
Arginina	54,95	12,068

TAULA 25.- Composició en aminoàcids de la glicoproteïna antigènica expressada en nombre de residus per cada 1000 i per μg per mg de glicoproteïna. El contingut en triptòfan s'ha determinat per hidròlisi alcalina.

Amb aquests valors i amb els coeficients d'absorció molar de la tirosina a 280 nm (1700), la del triptofan a aquesta mateixa λ (5920) i essent el coeficient d'absorció molar d'ambdós aminoàcids a 294.4 nm de 2630, s'obté una relació molar Tyr/Trp de 1.334.

1.2.4. DETERMINACIÓ DE LA CISTEÏNA

S'ha intentat quantificar la cisteïna, que no apareix en l'aminograma (figura 41), per un mètode basat en la transformació de la cisteïna en àcid sulfònic-cisteïna produïda per l'acció de l'àcid fosfotúngstic. L'absorbància del producte de la reducció a 720 nm és proporcional a la concentració de cisteïna.

La corba estàndard s'ha realitzat amb L-cisteïna (Sigma C7755) dissolta en HCl 1 N i afitava un marge de concentracions de 10 a 10^{-2} μ ols.

Els resultats observats no han permès cap tipus de quantificació significativa de la cisteïna. Així doncs, l'escasa o nul·la presència de cisteïna en la molècula, fa que la possibilitat d'error en la quantificació de la prolina al considerar com a tal certs derivats de la cisteïna que coelueixen amb aquest aminoàcid (GARDNER 1984) sigui menyspreable.

1.3. CONTINGUT GLUCIDIC

Amb base a les tècniques de tinció de glicoproteïnes en sistemes electroforètics, com és principalment la de McGUICKIN i MCKENZIE (1958) s'ha desenvolupat una tècnica qualitativa de visualització de la presència glucídica en glicoproteïnes. Aquesta tècnica comprén els següents passos:

- a) tractament d'un volum v d'una solució de glicoproteïnes amb $1/5v$ volums d'una solució d'àcid periòdic (Sigma P7875) al 1% en aigua, a bany maria durant 30 min. Aquest pas ha de fer-se a les fosques o be mantinguent la solució resultant en tubs topaci per a protegir la reacció de ruptura dels enllaços C-C en carbonis que porten grups hidroxil.
- b) refredament del tub amb gel o amb aigua a 0°C.

- c) adició de 1/10 v volums de reactiu de Schiff (Merck 9034).
- d) entre els 5 i 10 min de l'adició del darrer reactiu s'ha format una coloració que pot anar, en funció de la concentració, del color lil·la a una forta coloració magenta.

L'anàlisi quantitativ dels sucres s'ha realitzat per mitjà de cromatografia líquida d'alta resolució en l'anàlisi de sucres neutres (hexoses i metil-pentosa) i d'hexosamines, i per mitjà d'una clàssica tècnica colorimètrica pel que fa a l'àcid siàlic.

Una esquematització global d'aitals anàlisis es mostra en la figura 42.

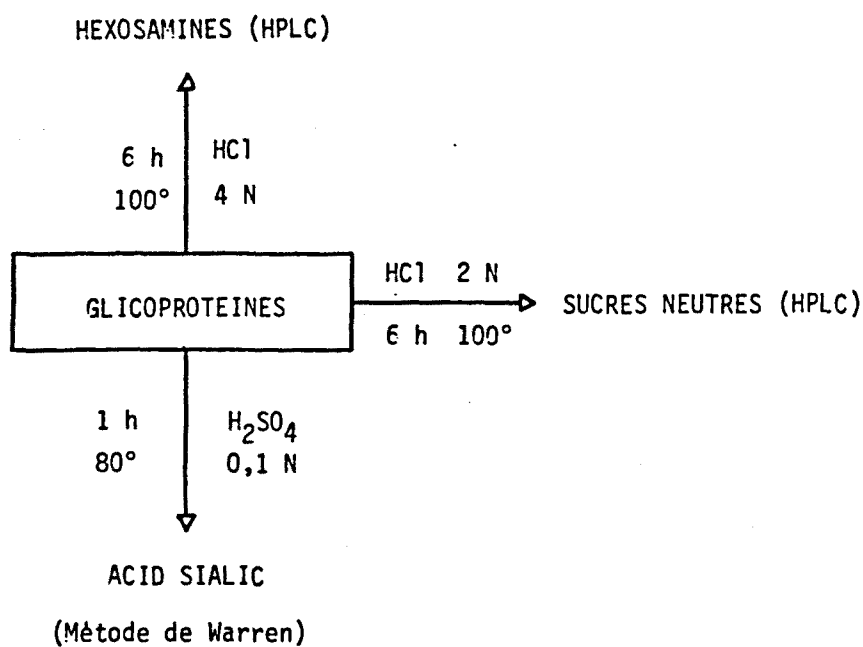


FIGURA 42.- Condicions experimentals de l'anàlisi dels sucres presents en la glicoproteïna.

1.3.1. SUCRES NEUTRES

Els sucres neutres s'han valorat per cromatografia líquida d'alta resolució fent ús d'unes condicions semblants a les emprades per MEAGHER i FURST (1976).

L'anàlisi s'ha realitzat en un cromatògraf líquid-líquid d'alta resolució Waters ALCI 200, equipat amb bombes 6000-A, injector U6K i detector d'índex de refracció R-401.

La columna emprada ha estat una μ -Bondapack Carbohydrate, amb fase mòbil d'acetonitril/aigua (80:20, v/v), flux de 1.5 mL/min, sensibilitat $\times 8$.

La mostra injectada ha estat de 25 μ L, la velocitat de registre de 0.5 cm/min i els patrons s'han preparat en solució aquosa a concentració de 10 mg/mL.

El tractament de la glicoproteïna inclou els següents passos:

- a) alliberament dels sucres neutres: a 9 mg de glicoproteïna s'han afegit 2 mL de HCl 2 N, s'ha desplaçat l'oxigen del vial per corrent de nitrogen i després de tancar-lo s'ha mantingut durant 6 hores a 100 °C.
- b) desproteïnitació: s'ha realitzat amb àcid tricloracètic al 20% (p/v) afegit fins una concentració final del 5%.
- c) neutralització de l'excés d'àcid: l'excés d'àcid s'ha anat neutralitzant fins que el pH de l'hidrolitzat estigués comprès entre 5.5 i 6. La neutralització s'ha portat a terme amb carbonat de plata, obtingut per la seva part de la reacció del nitrat de plata amb carbonat sòdic.
- d) preparació final: l'hidrolitzat s'ha centrifugat a 11500 r.p.m. durant 30 min, i el sobrenedant s'ha filtrat per Durapore (Millipore) de 0.22 μ de pas de porus.

La figura 43 mostra el cromatograma obtingut. El pic amb temps de retenció 5.05 correspon als sucres neutres i el de temps de retenció de 3.37 a les hexosamines.

Quantificada l'àrea corresponent als sucres neutres amb un integrador Kontron Messgeräte MOP-20, i per comparació amb l'àrea mitja de la D-glucosa, D-galactosa, D-mannosa i L-fucosa, s'obté que el contingut en sucres neutres equival al 27.92% del pes total de glicoproteïna.

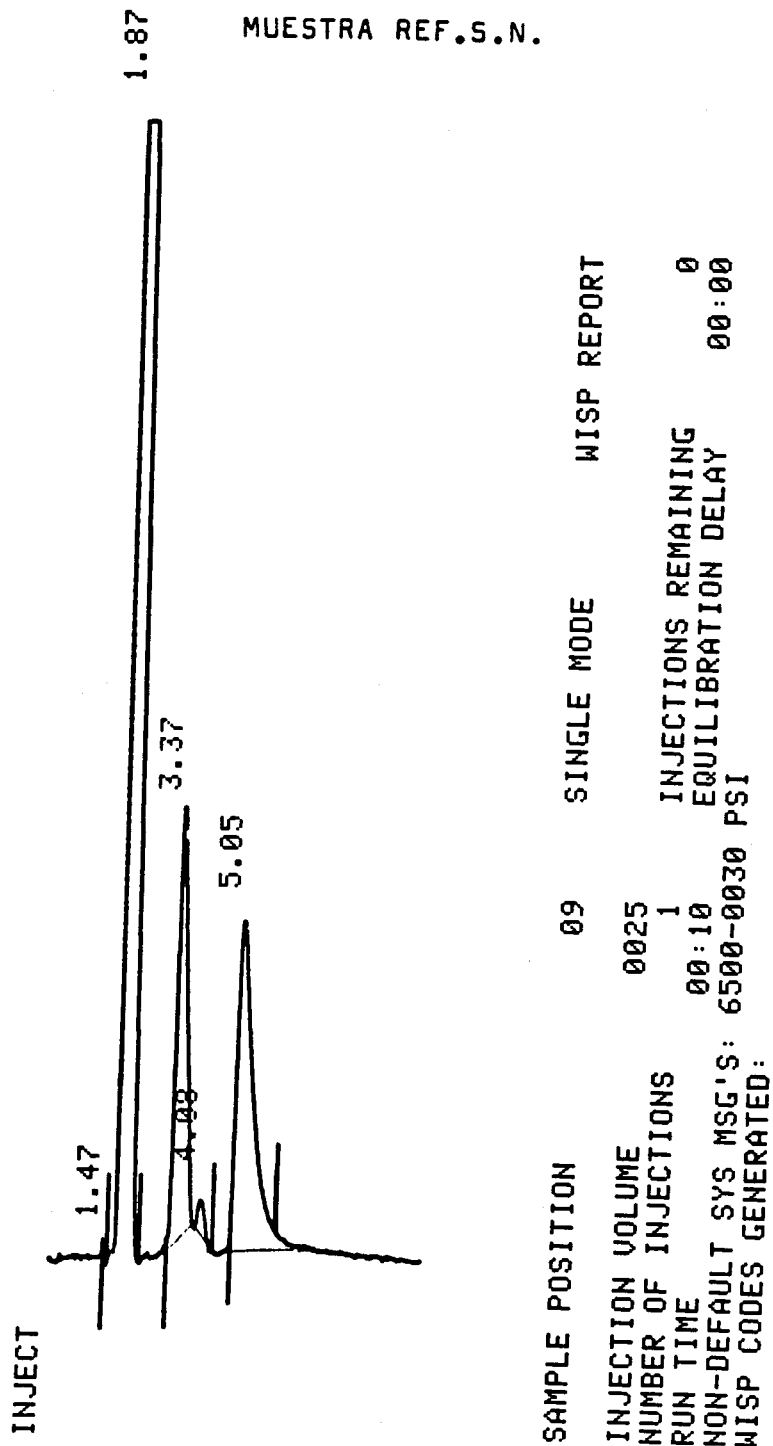


FIGURA 43.- Cromatograma obtingut en l'anàlisi dels glúcids de la glicoproteïna en condicions adients per a sucres neutres.

1.3.2. HEXOSAMINES

S'han analitzat amb les mateixes condicions que els sucres neutres amb la diferència que l'alliberament de les hexosamines s'ha realitzat en una alíquota de 7 mg hidrolitzada amb 2 mL de HCl 4 N.

La figura 44 mostra el cromatograma obtingut. El pic amb temps de retenció 3.41 correspon a les hexosamines. Quantificada llur àrea i per comparació amb l'àrea mitja de la N-acetil-D-galactosamina i N-acetil-D-glucosamina, s'obté que el contingut en hexosamines equival al 26.67 % del pes total de la glicoproteïna.

1.3.3. ACID SIÀLIC

En aquest cas el terme *àcid siàlic* inclou els dos àcids neuramínics acilats presents en les membranes biològiques: l'àcid N-acetilneuramínic i l'àcid N-glicolilneuramínic.

Tres alíquotes de glicoproteïna, de 10.2, 12.6 i 13.5 mg s'han hidrolitzat cadascuna amb 2 mL de H₂SO₄ 0.1 N, durant 1 h a 80°C.

La quantificació de l'àcid siàlic s'ha realitzat pel mètode de l'àcid 2-tiobarbitúric descrit per WARREN (1959), amb una única lectura a 549 nm.

Els μmols d'àcid siàlic, valorats com a àcid N-acetilneuramínic, es calculen segons

$$\mu\text{mols} = 0.090 \times A_{549}$$

on 0.090 és un factor que prové del coeficient d'absorció molar de l'àcid N-acetilneuramínic, i A_{549} l'absorbància a 549 nm.

Dividint pel volum emprat en la prova s'obté la concentració molar i d'aquí el nombre de mols en cadascuna de les alíquotes valorades.

Referit al pes total de la glicoproteïna s'obté un percentatge d'àcid siàlic igual a 1.7 ± 0.15 .

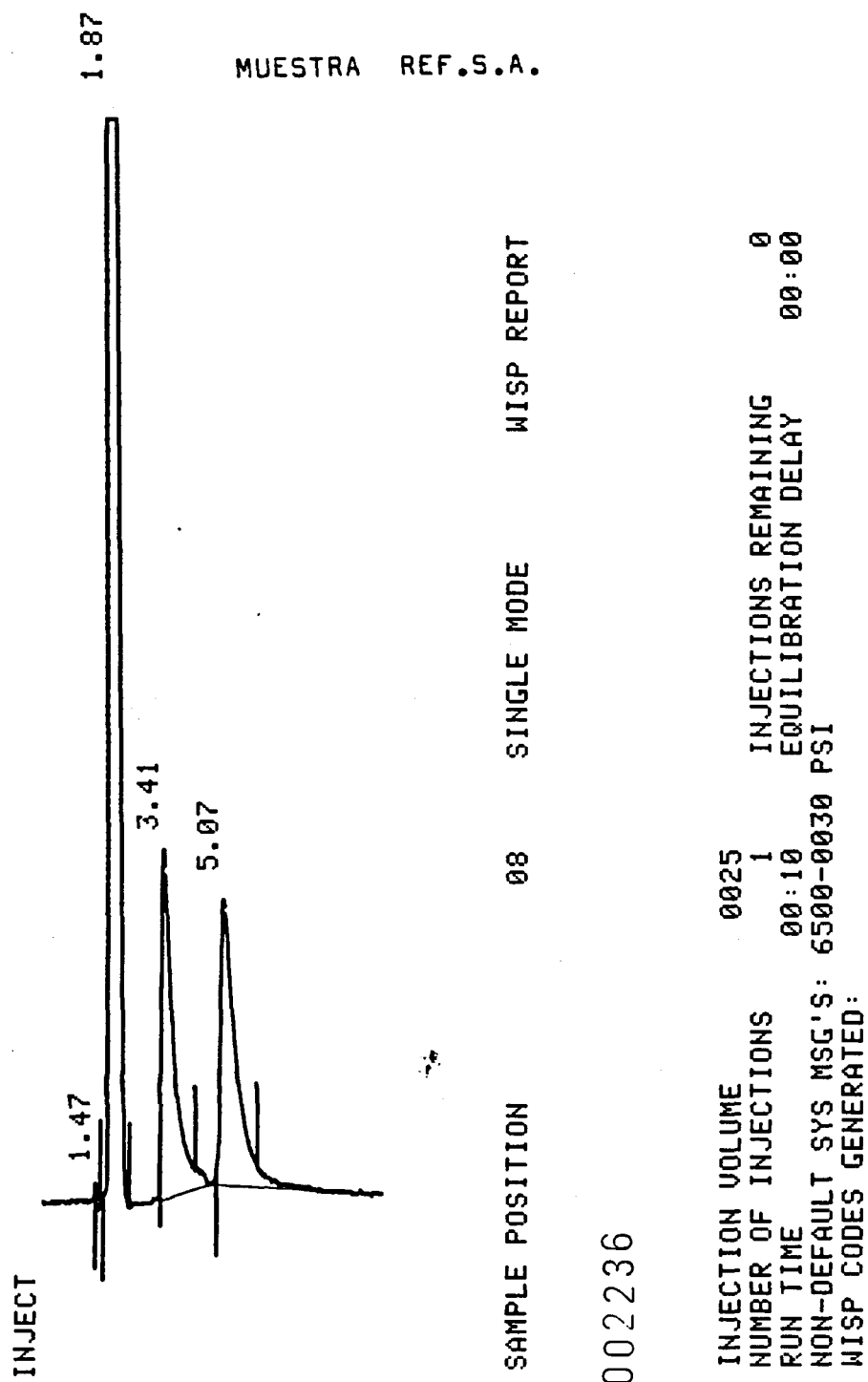


FIGURA 44.- Cromatograma obtingut en l'anàlisi dels glúcids de la glicoproteïna en condicions adients per a hexosamines.

1.4. CONTINGUT GLICOPROTEÏNIC

El contingut glicoproteïnica s'ha determinat segons el mètode descrit en l'apartat 2.2.5. de l'AILLAMENT I PURIFICACIO DE LA GLICOPROTEINA ANTIGENICA.

La mostra a valorar ha estat una solució en PBS de la glicoproteïna a concentració de 0.307 mg/mL.

Després de realitzar la valoració per duplicat i de comparar els resultats amb els obtinguts amb una glicoproteïna de referència, com és ara l'orosomuroid, hom observa (taula 26) que, per un mateix pes, la glicoproteïna antigènica produeix una intensitat d'espargiment superior a la produïda per l'orosomuroid; així, per exemple, per a produir 10 unitats arbitràries d'espargiment, calen 29.61 µg de la glicoproteïna antigènica, mentre que són 44.25 µg els que s'han de menester en el cas de l'orosomuroid.

µg de glicoproteïna presents en l'alíquota valorada	Unitats d'espargiment	
glicoproteïna antigènica	glicoproteïna antigènica	α ₁ glicoproteïna àcida
30,7	10,394	11,848
27,63	9,349	9,728
26,10	9,012	7,605
24,56	8,132	6,417
23,03	7,845	3,114
21,49	7,210	2,035
12,28	4,319	

TAULA 26.- Valoració de la glicoproteïna per espargiment de la llum i comparació amb els valors obtinguts amb l'orosomucoïd.

2. MASA MOLECULAR

La masa molecular s'ha determinat com a masa molecular de tota la molècula o com a masa molecular de la part proteica.

2.1. MASA MOLECULAR TOTAL

La masa molecular de la glicoproteïna s'ha calculat per una banda per dues tècniques fisicoquímiques (electroforesi en gel de poliacrilamida i filtració per gel) que comparen unes mobilitats amb les que tenen unes proteïnes de masa molecular definida. En aquest cas el valor trobat és un valor relatiu envers les proteïnes que es prenen com a referència. Per tant, qualsevol desviament del capteniment físicoquímic de la glicoproteïna envers aitals proteïnes produeix un allargament en l'exactitud de l'extrapolació del valor obtingut amb la glicoproteïna envers la recta de calibrat.

Per altre banda, també s'ha emprat l'espargiment de la llum (*light scattering*) que forneix una masa molecular promig en pes (M_w), sempre i quan les interaccions tant intra com intermoleculares siguin menyspreables. En aquest cas l'exactitud del valor determinat, a més de la cura en la manipulació operatòria rau en l'homogenitat de la mostra a determinar.

Un altre tècnica de la que es disposava, com és ara la viscositat, no s'ha emprat amb aquesta finalitat, atés que els paràmetres K i a de l'equació de Mark-Houwink, no han estat definits per a proteïnes amb tant elevat contingut glucídic (AHMAD i MCPHIE, 1978, 1979).

2.1.1. DETERMINACIÓ PER ESPARGIMENT DE LA LLUM

La masa molecular determinada per espargiment de la llum ho ha estat amb un fotòmetre per espargiment de la llum FICA 50 (SOFICA, França) que permet lectures a 365, 436, 546 i 578 nm, a diferents angles des de 30° fins a 150°.

La cubeta que conté la mostra és cilíndrica i està immersa en benzè, substància amb un índex de refracció ($n_B = 1.50108$) similar al de la cubeta, eliminant-se d'aquesta manera quasi completament les reflexions i refraccions produïdes per la cubeta.

L'aparell forneix les intensitats espargides per la solució I , i pel solvent I' pels diferents angles θ . Amb aquests valors pot obtenir-se la relació Rayleigh (R_θ) a partir de:

$$R_\theta = \Delta I \frac{R_{B,90}}{I_B} \cdot \frac{(\sin \theta)}{(1 + \cos^2 \theta)}$$

on ΔI és la diferència d'intensitat espargida entre la solució i el solvent; $R_{B,90}$ és la relació Rayleigh que presenta el benzè a 90°, i que per a $\lambda=546$ nm és igual a $16.4 \cdot 10^{-6}$; I_B és l'espargiment produït per una cubeta de quarz que serveix de control.

En el cas concret de la glicoproteïna s'ha partit d'una solució en PBS a concentració de 300 $\mu\text{g/mL}$, dialitzada durant 48 hores enfront de la solució amortidora per assolir un potencial electroquímic constant.

La solució de la glicoproteïna, a l'igual que l'amortidora, s'ha-vien prefiltrat amb un filtre Durapore HVLP (Millipore, Estats Units) de 0.45 μ de pas de porus, i filtrades a través d'un filtre Durapore GWP de 0.22 μ de pas de porus.

A partir de la concentració inicial s'han realitzat dilucions i s'han determinat els valors de l'espargiment de la llum a diferents angles per a les diferents concentracions.

La longitud d'ona de la radiació incident ha estat de 546 nm i la cubeta s'ha termostatitzat a $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

El valor de la constant òptica K

$$K = \frac{2\pi^2 n_1^2}{\lambda^4 N_A} (\delta n / \delta c)^2$$

ha estat de $2.272 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$, partint d'un valor $n_1 = 1.3345$, d'índex de refracció del solvent, i de l'increment de l'índex de refracció ($\delta n / \delta c$) igual a 0.1879 mL/g (cf. Apartat 3.9.); N_A és el número d'Avogadro i λ la longitud d'ona emprada.

Amb aquestes dades es troben els valors de $K \cdot c / R_\theta$ a concentració (c) 0, a partir dels valors a les diferents concentracions, i també els valors de $K \cdot c / R_\theta$ a $\theta = 0$, segons els valors de $K \cdot c / R_\theta$ enfront del $\sin^2(\theta/2)$.

En el primer dels casos, els resultats extrapolats permeten determinar M_w a partir de la intersecció en l'ordenada, i el segon coeficient del virial, A_2 , a partir del pendent.

En el segon cas, la representació $(K \cdot c / R_\theta)_{c \rightarrow 0}$ vs $\sin^2(\theta/2)$ permet la determinació de M_w a partir de la intersecció en l'ordenada, i del radi de gir $\langle s^2 \rangle$, segons el pendent igual a:

$$\frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \cdot \frac{\langle s^2 \rangle}{M_w}$$

L'extrapolació simultània d'ambdues variables (concentració i angle) en una mateixa representació (*diagrama de Zimm*) permet una exactitud més gran en les determinacions (figura 45).

El valor obtingut en la interceptació en l'eix d'ordenades és igual a $1.8692 \cdot 10^{-5} (\pm 0.1625 \cdot 10^{-5}) \text{ g}^{-1}$, i per tant, el pes molecular promig en pes (M_w) serà de 53500 ± 4280 .

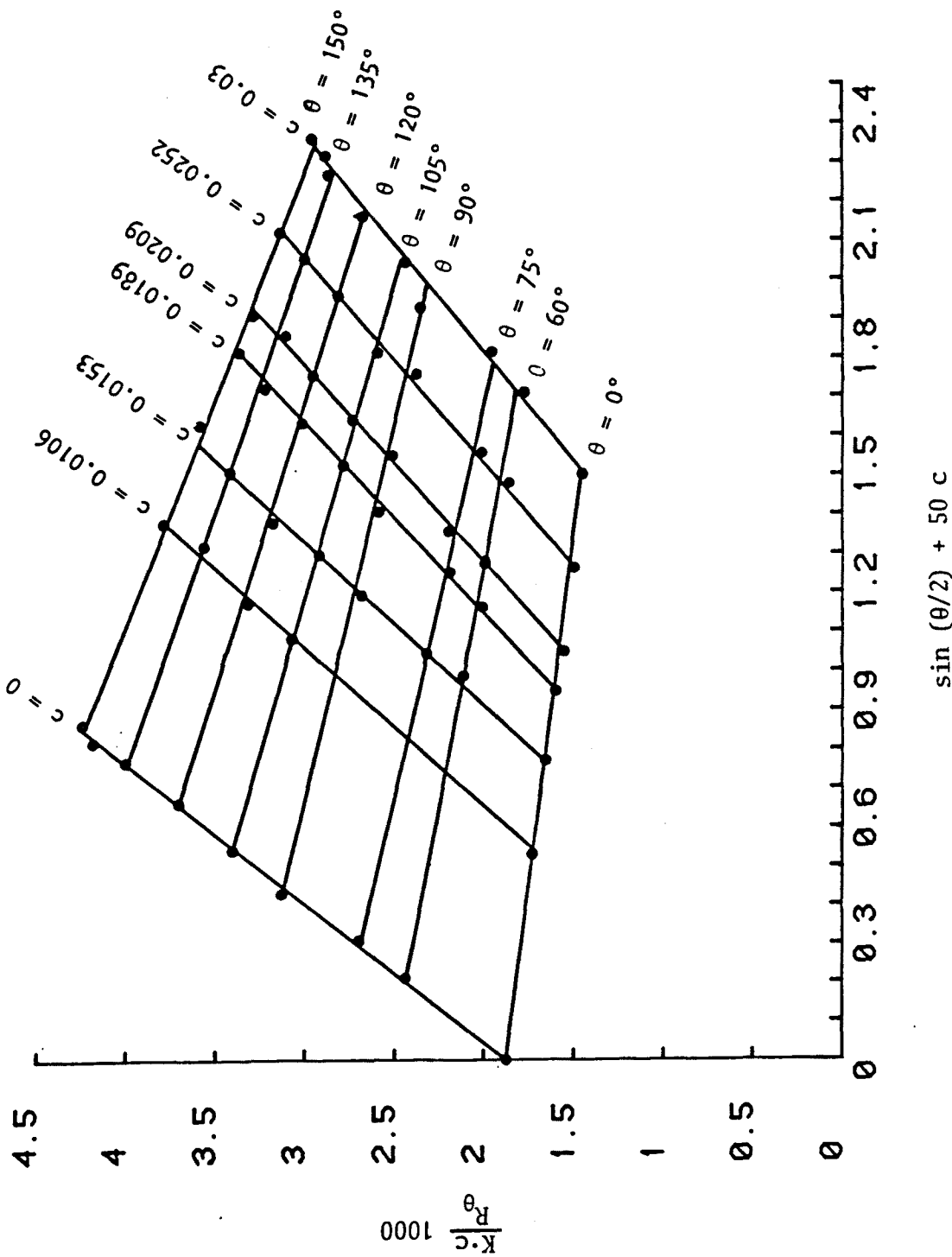


FIGURA 45.- Diagrama de Zimm per a les mesures de llum espargida per la glicoproteïna a 25°C amb $\lambda = 546$ nm. El valor de c va en g/dl.

2.1.2. MASA MOLECULAR PER CROMATOGRÀFIA DE FILTRACIÓ PER GEL

La determinació de la massa molecular de la glicoproteïna per cromatografia de filtració per gel s'ha realitzat en una columna K16/70 (Pharmacia) de 1.6 cm de diàmetre i 70 cm de longitud. Com a llits cromatogràfics s'han emprat els següents:

- gel de poliacrilamida porosa (Bio Gel P-300 Fine)(BioRad) que permet la separació de proteïnes globulars compreses en un marge de 60000 a 400000 daltons.
- gel de dextrans (Sephadex G-200)(Pharmacia), amb un marge teòric de separació de 5000 a 600000 daltons.
- gel d'agarosa (Sepharose CL-4B)(Pharmacia), que pot separar masses de fins 20 milions de daltons.

El tractament dels xerogels, l'empaquetament de la columna i les operacions prèvies a la determinació són, en llurs trets principals, els mateixos que els descrits en l'apartat 3.1. de l'AILLAMENT I PURIFICACIÓ DE LA GLICOPROTEÏNA ANTIGÈNICA.

Degut a la naturalesa dels gels de tipus tou (Bio Gel P-300 i Sephadex G-200), es produeix una compressió contínua del llit cromatogràfic, cosa que fa que disminueixi la velocitat de flux, el gel s'ha reempacat de nou cada 3 determinacions cromatogràfiques.

En qualsevol dels casos, el volum de gel dins de la columna ha estat de 138-140 mL.

Quan el gel era Sephadex G-200 o Bio Gel P-300, el flux ha estat de 6.9-7.3 mL/h (3.45-3.65 cm/h). Per a la Sepharose 4B-CL ha estat de 15.82 mL/h (7.91 cm/h).

El calibrat s'ha realitzat amb una sèrie de proteïnes caracteritzades per tenir uns radis friccionalis o volums específics parcials que no es desvien de la mitja pròpia de les proteïnes. Aquestes han estat: albúmina sèrica bovina (Sigma A1887), β -galactosidasa (Sigma I1875), immunoglobulina G (Sigma I4506), β -amilasa (Sigma A8781) i fibrinogen boví (Sigma F4753), sempre dissoltes en solució amortidora PBS.

La determinació del volum buit (V_0) s'ha realitzat amb una solució aquosa de Blue-Dextran (Pharmacia) al 0.20 % que contenia 0.02 M de NaCl per a proporcionar la força iònica adient.

S'han aplicat 2 mL de cada proteïna -i de Blue-Dextran- i s'han recollit fraccions de 2.5 mL.

Les proteïnes es determinaren a 280 nm i el Blue-Dextran a 254 nm en un espectrefotòmetre Perkin Elmer 124.

El volum intern (V_i) s'ha determinat amb L-tirosina (Sigma T3754) en solució amortidora de PBS ($c = 0.21$ mg/mL). S'han aplicat alíquotes de 2.5 mL, determinant-se llur absorbància a 280 nm en l'espectrefotòmetre abans citat.

La solució de glicoproteïna en amortidor PBS ($c = 2.56$ mg/mL) s'ha aplicat a volums de 2 mL, recollint-se fraccions de la mateixa quantitat. L'absorbància s'ha determinat en el punt màxim que es presenta entre 274 i 284 nm en un espectrefotòmetre Hewlett Packard A-8531, emprant com a blanc les fraccions eluïdes a l'inici.

En els gels Sephadex G-200 i Bio Gel P-300 la glicoproteïna s'elueix en el volum corresponent al volum buit. Quan s'ha cromatografiat en Sepharose 4B-CL apareix un sol pic, la relació V_e/V_0 del qual és de 2.092 ± 0.005 (mitja i desviació estàndard de 4 determinacions realitzades) que extrapolada a la recta de calibració previament establerta, forneix un valor de masa molecular de 750000 (amb una forquilla de 700000 a 800000).

2.1.3. DETERMINACIÓ PER PAGE-SDS

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) en presència del detergent aniònic dodecil sulfat sòdic (SDS) és una tècnica ràpida per a la determinació de la masa molecular de les proteïnes atés que el SDS dissocia les proteïnes en llurs cadenes polipeptídiques constituents (WEBER i OSBORN, 1969).

L'èxit d'aquest procediment per acurades determinacions de mases moleculars es basa en dos factors:

- (1) les proteïnes s'uneixen, en general, a quantitats constants de SDS per gram de proteïna, quan el detergent està en quantitats saturants. Llavors, la proteïna té una càrrega total negativa que enmascara la càrrega intrínseca, resultant una relació càrrega/massa constant. Per mitjà de diàlisi d'equilibri enfront d'aigua, PITT-RIVERS i IMPION-BATO (GORDON 1975) han comprovat que les proteïnes que no contenen grups S-S s'uneixen a un 140% del seu pes en SDS.
- (2) les proteïnes saturades amb SDS prenen una configuració semblant a una vareta, essent la longitud de la mateixa proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica i, d'aquesta manera, al seu pes molecular.

Tanmateix, aquest procediment no és totalment extrapolable per a determinar masses moleculars de glicoproteïnes, car les glicoproteïnes amb més d'un 10% de glúcids presenten un captament anòmal quan es comparen per PAGE-SDS amb les proteïnes estàndard (SEGREST i JACKSON, 1972). La raó d'aquest captament anòmal és la menor unió al SDS per gram de glicoproteïna en comparació amb les proteïnes. La menor unió al SDS implica una disminució en la relació càrrega/massa i, per tant, una mobilitat inferior durant l'electroforesi, la qual cosa en el cas de les proteïnes normals, seria característic de masses moleculars altes. Aquest desviament de la massa molecular depèn de diversos factors, principalment el contingut glucídic, la presència d'àcid siàlic i la concentració de poliacrilamida del gel.

Així, doncs, tinguent en compte que la massa molecular obtinguda pot desviar-se de la real, la determinació d'aquesta s'ha realitzat segons el sistema discontinu de LAEMMLI adaptat per THOMAS i KORNBERG (1978) en gels de placa verticals de PAGE-SDS amb un gruix de 0.75 mm. Les principals característiques d'aquesta lectroforesi s'indiquen a continuació:

- gel separador: 18% d'acrilamida en solució amortidota Tris 0.375 M, pH 8.8 + SDS al 0.1%
- gel espaiador: 3% d'acrilamida en solució amortidora Tris 0.125 M, pH 6.8 + SDS al 0.1%

En ambdós gels s'ha emprat TEMED com a catalitzador i persulfat amònic al 1% com a iniciador de la reacció de polimerització.

- solució amortidora de separació: Tris 0.05 M, pH 8.3, glicina 0.38 M, SDS al 0.1%

- solució amortidora de la mostra: Tris 0.0625 M, pH 6.8, SDS al 2%, glicerol al 12.5%, β -mercaptoetanol al 5%
- colorant de migració: Bromofenol Blue al 1% en glicerol al 40% ajustat a pH 7
- tractament de les mostres: escalfament previ a 100°C durant 1-3 min
- condicions de separació:
 - a) intensitat constant: 0.6 mA/0.5 mm gruix/cm longitud del gel
 - b) voltatge: el de partida se situa en 60-80 V augmentant gradualment fins a un valor final de 150 V
 - c) la mobilitat oscil·la entre 2-2.5 cm/hora
- fixació: amb la mescla aigua-metanol-àcid acètic (5:5:1) durant 1 hora
- tinció: Blue Coomassie en aigua-metanol-àcid acètic (5:5:1) durant un mínim de 30 min
- destenyit: acètic al 10% -- metanol al 5%, renovant el líquid fins el destenyit complet.

Com a substàncies de referència emprades per a calcular la recta de calibrat, s'ha fet ús de les proteïnes especificades a la taula 27.

PROTEINA	PM SUBUNITAT	ORIGEN
Fosfotilasa b	94000	múscul de conill
Albúmina	67000	sèrum boví
Ovoalbúmina	43000	ou blanc
Anhidrasa carbònica	30000	eritròcit boví
Inhibidor de la tripsina	20100	soja
α -Lactoalbúmina	14400	llet de vaca

TAULA 27.- Proteïnes emprades per al càlcul de la recta de calibrat determinada per PAGE-SDS. Les proteïnes formaven part d'un kit específic per aquesta funció (Pharmacia).

En la figura 46 s'observa el gel electroforètic obtingut. Ultra la glicoproteïna purificada per la columna d'afinitat i les proteïnes de calibrat també es troba present una alíquota de les glicoproteïnes en l'estat previ al pas per la columna d'afinitat.



FIGURA 46.- Gel electroforetic de la glicoproteïna eluïda per la columna d'afinitat específica per a grups N-acetil-D-galactosamina (B), de la glicoproteïna abans d'eluir-se per aquesta columna (A) i de les proteïnes emprades per a realitzar la recta de calibrat (C).

La glicoproteïna antigènica apareix com una molècula altament purificada i que presenta dues bandes. Si hom enfronta el logaritme neperià de la massa molecular de les proteïnes de referència a llur R_f s'obté una recta de calibrat (figura 47).

Extrapolant els valors dels Rf de les bandes obtingudes amb les glicoproteïnes, s'obtenen unes masses moleculars de 76000 i 43000 per aquestes bandes, per la qual cosa es pot suposar que la banda superior correspon a la forma dimèrica de la molècula mentre que la inferior és la monomèrica.

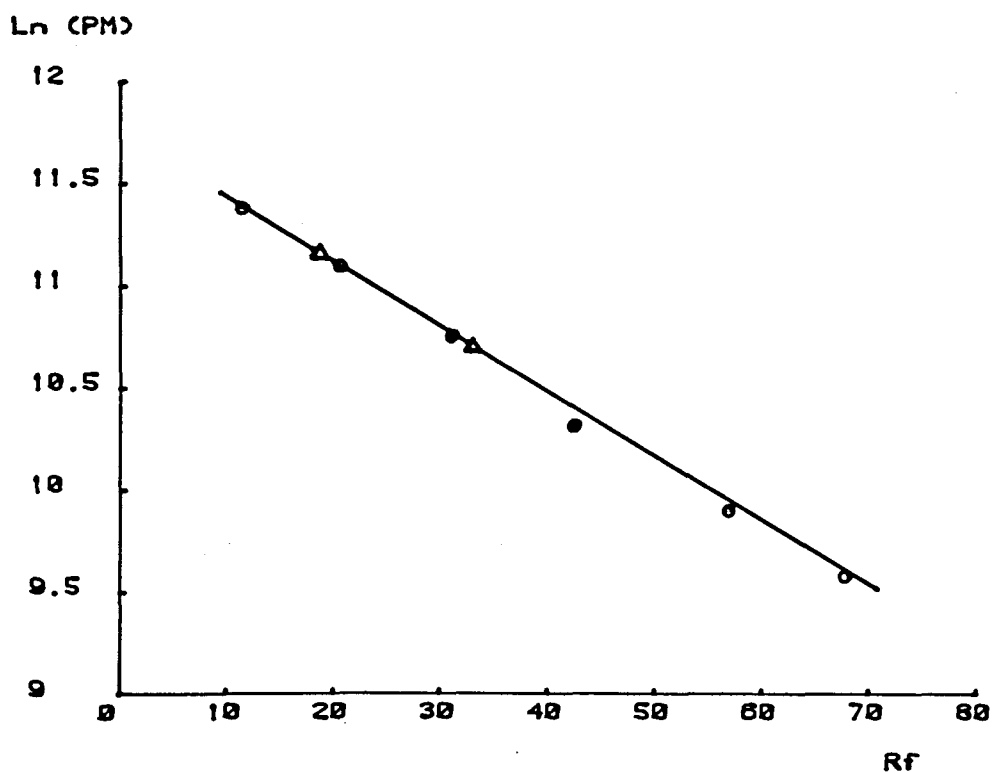


FIGURA 47.- Recta de calibrat emprada per a la determinació de la massa molecular de les bandes obtingudes en l'electroforegrama: (o) proteïnes del kit de calibració; (Δ) bandes obtingudes amb la glicoproteïna antigènica.

L'*scanning* densitomètric del gel es mostra en la figura 48.

Quantificant els pics corresponents a la glicoproteïna purificada es palesa un equilibri entre ambdues bandes atés que la massa inferior té un àrea equivalent al 56% del total d'ambdues i la de massa superior és del 44%.

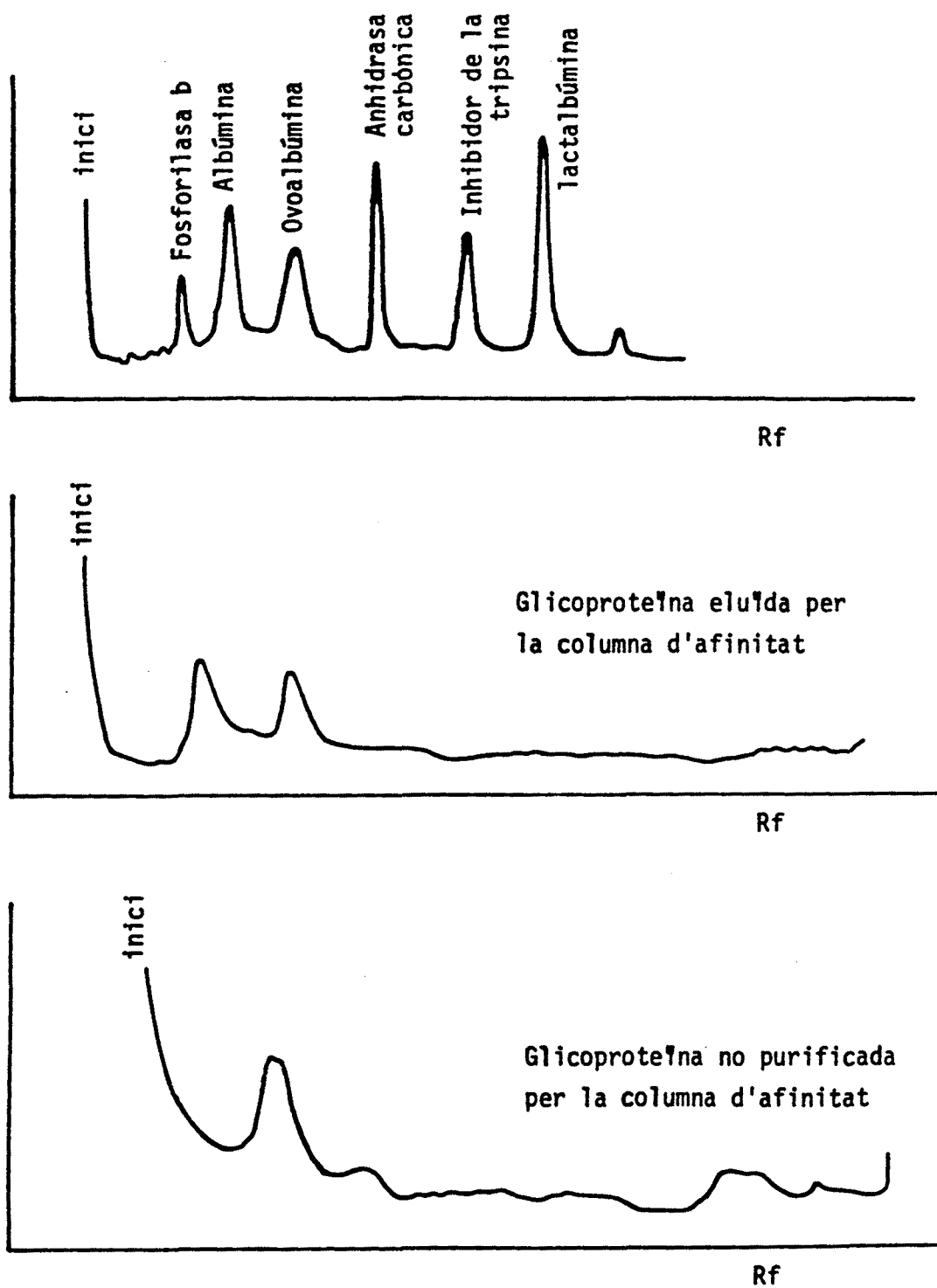


FIGURA 48.- Densitometria de les bandes obtingudes amb l'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS.

2.2. MASA MOLECULAR DE LA PART PROTEICA

La masa molecular de la part proteica s'ha calculat segons el contingut en aminoàcids (cf. apartat 1.2.2.). Aquest càlcul està fonamentat en el fet que el valor real de la masa molecular ha de correspondre a un nombre enter de residus d'aminoàcids.

D'aquesta manera, la relació d'aminoàcids que correspon a la verdadera masa molecular presenta unes desviacions envers la fracció d'aquests, la suma de les quals és mínima.

Els dos principals mètodes per a calcular matemàticament aquesta masa molecular són el de NYMAN i LINDSKOG (1964) i el de KATZ (1968).

S'ha adoptat el primer, seguint la sistemàtica de BLACK i HOGNESS (1969), que consta dels següents passos:

a) càlcul de la freqüència residual (F_i) corresponent a cada residu d'aminoàcids (taula 28).

Residu d'aminoàcid	Freqüència residual
Cisteïna	0,00000
Metionina	0,01157
Triptofan	0,01204
Aspàrtic	0,01297
Tirosina	0,01606
Fenilalanina	0,01763
Isoleucina	0,04030
Histidina	0,04806
Arginina	0,05495
Valina	0,05890
Prolina	0,05924
Leucina	0,05949
Alanina	0,06646
Lisina	0,07911
Treonina	0,09571
Glutàmic	0,10283
Glicocola	0,10696
Serina	0,12817

TAULA 28 .- Freqüències dels residus d'aminoàcids.

- b) amb les fraccions obtingudes (F_i) s'aplica per a una masa molecular determinada, M , la fórmula

$$n_i = F_i \left(\frac{M - 18}{\sum F_i R_i} \right)$$

que dóna el nombre de residus (n) per a cada aminoàcid (i), essent R el pes del residu de cada aminoàcid.

- c) a cada nombre de residus (n_i) hom assigna l'enter més proper (E_i).
- d) es troba la diferència (D_i) entre n_i i el respectiu enter assignat.
- e) es calculen els valors D_i/E_i per a cada aminoàcid i es calcula el sumatori de tots els valors ($\sum\{D_i/E_i\}$).
- f) per a cada aminoàcid es calcula el valor $1/E_i$ i el sumatori de tots els valors ($\sum\{1/E_i\}$).
- g) es calcula el valor f que indica la desviació en funció de la masa molecular

$$f = \frac{\sum(D_i/E_i)}{0.5\sum(1/E_i)}$$

- h) es comparen els valors de f obtinguts segons les masses moleculars preestablertes (taula 29).

MASA MOLECULAR	f	MASA MOLECULAR	f
10000	0.486	20000	0.621
11000	0.517	30000	0.552
12000	0.616	40000	0.543
13000	0.581	50000	0.629
14000	0.590	60000	0.535
15000	0.570	70000	0.386
16000	0.465	80000	0.438
17000	0.319	90000	0.463
18000	0.351	100000	0.564
19000	0.442	110000	0.446

TAULA 29.- Valors de f segons diferents masses moleculars. Aquestes comprenien una forquilla de 8000 fins a 130000 a intervals de 500.

El valor de f més petit s'ha obtingut per una massa molecular de 17000, i agafant l'interval comprés entre 17000 i 18000, amb variacions de massa de 100, s'obté el mínim valor de f ($f = 0.2507$) per una massa molecular de 17200 (figura 49).

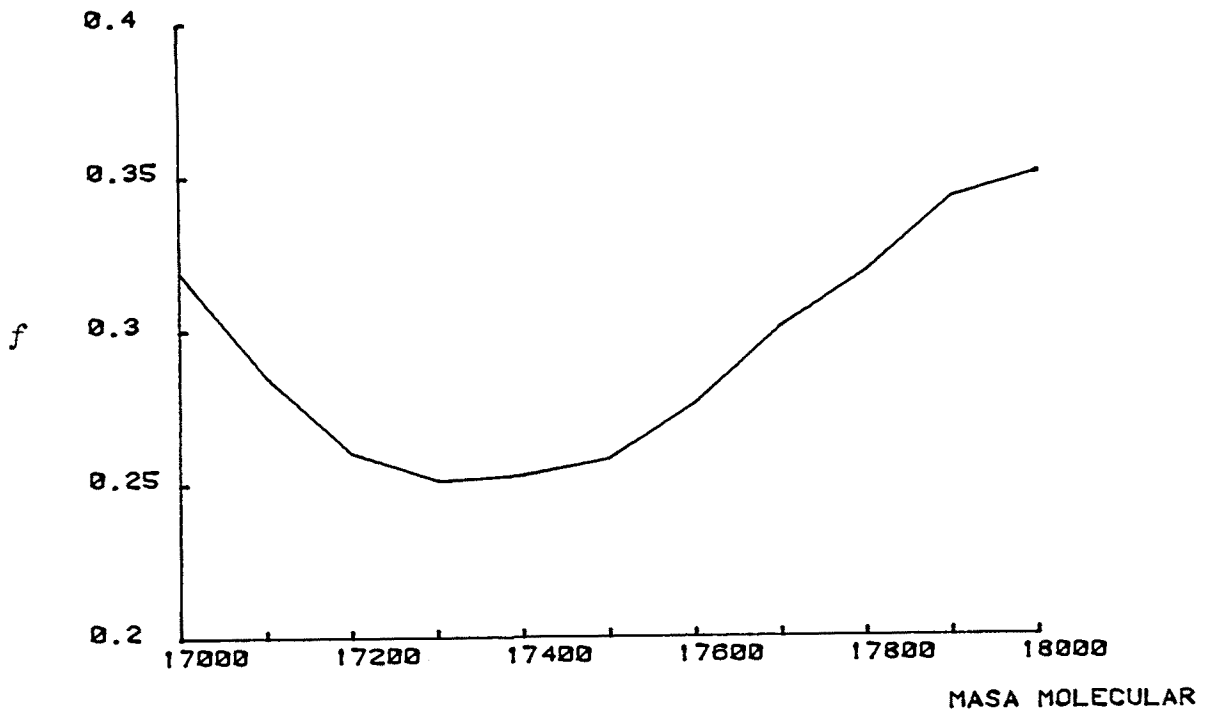


FIGURA 49.- Desviació en funció de la massa molecular (f) per un interval de 17000 a 18000.