

Microanálisis por electroforesis capilar: análisis de enzimas a escala de nanolitros*

► Yoshimi Kanie y Osamu Kanie

Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS). Tokio, Japón

* Traducido de P/ACE Setter, volumen 7, enero de 2003.

Introducción

Los oligosacáridos que existen en la superficie celular y en la matriz extracelular como componentes de glicoproteínas y glicolípidos están involucrados en una gran variedad de fenómenos biológicos. Por lo tanto, es de gran importancia la investigación metodológica que trata de revelar las funciones de tales oligosacáridos.

Se han estudiado las enzimas relacionadas con los hidratos de carbono, especialmente aquellas que procesan oligosacáridos y se ha determinado la importancia de la electroforesis capilar de zona (ECZ) para analizar los productos de la reacción. Para conseguir una reducción progresiva en la cantidad de enzima necesaria para el análisis, se evaluó una prueba que usa el capilar no sólo como campo de separación sino como un canal de reacción enzimática. Este microanálisis mediado por electroforesis (MME) es muy ventajoso pues las cantidades de enzimas y sustrato son mínimas. La investigación práctica de MME puede ser muy valiosa en futuras estrategias proteómicas.

Básicamente, existen dos caminos para mezclar los componentes de la reacción en un capilar bajo condiciones electroforéticas: el formato continuo y el formato *plug-plug*. En el primero, el capilar se llena con uno de los reactantes en tanto es introducido el segundo componente. El formato *plug-plug* se basa en una interacción de dos componentes que forman como un tapón (*plug*) cada uno con diferentes movilidades electroforéticas y la reacción procede mientras uno de los componentes pasa a través del otro. Entonces, el producto de la reacción es resuelto en base a las movilidades eléctricas individuales y pasa por el detector a lo largo del camino hacia el final del capilar. En este estudio se propone el uso del método *plug-plug* para obtener la constante de Michaelis (K_m) de varias reacciones enzimáticas.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Materiales y Métodos

Enzimas: β -glucosidasa (β -Glc-asa-EC 3.2.1.21) de almendra dulce; α -glucosidasa (α -Glc-asa-EC 3.2.1.20) de *Saccharomyces sp.*; β -galactosidasa (β -Gal-asa-EC 3.2.1.23) de *Aspergillus oryzae*, β -N-acetilglucosaminidasa (β -GlcNAc-asa, EC 3.2.1.52) de riñón de bovino,

α -manosidasa (α -Man-asa, EC 3.2.1.24) de concanavalina A, α -fucosidasa (α -Fuc-asa, EC 3.2.1.38) de riñón de bovino.

Sustratos: ρ -nitrofenil- β -glucósido (PNP- β -Glc), ρ -nitrofenil- α -glucósido (PNP- α -Glc), ρ -nitrofenil- β -galactósido (PNP- β -Gal), ρ -nitrofenil- β -N-acetilglucosamida (PNP- β -GlcNAc), ρ -nitrofenil- α -manósido (PNP- α -Man), ρ -nitrofenil- α -fucósido (PNP- α -Fuc).

Estándar interno: uridina.

Instrumento de electroforesis capilar: P/ACE System 5500 (Beckman Coulter).

Condiciones de corrida:

- Capilar: 75 μ m (i.d.) x 37 cm de longitud total; 30,5 cm al detector (de sílica-bario)
- Temperatura del capilar: 37 °C.
- **Buffer** de separación: **buffer** borato de sodio 40 mM, pH 9,2.
- Campo eléctrico: 18 kV.
- Detección: detector UV PDA
- Modo de introducción de la muestra: presión

Proceso de introducción de la muestra:

1. Lavar con NaOH 0,1 N (2 min) y regenerar con agua (1 min).
2. Equilibrio del electrolito **buffer** (2 min).
3. Inyección de una solución que contenga enzima en **buffer** fosfato (3s).
4. Introducción del **buffer** fosfato (1s).
5. Inyección de una solución de sustrato en **buffer** fosfato (5s).

Concentración y pH del **buffer** fosfato: ver Tabla I.

Las soluciones *stock* de enzima, sustrato y *buffers* usadas fueron mantenidas a 20 °C.

Estimaciones:

Ecuación de Poiseuille:

$$V = \Delta P \pi r^4 t / 8 \eta L$$

ΔP : variación de la presión a través del capilar durante la inyección.

π : radio del capilar.

t : tiempo de inyección.

η : viscosidad del *buffer*.

L : longitud total del capilar.

La longitud y el volumen (V) de los *plugs* de enzima y sustrato se estima que son de 6.5 y 10 mm y 29 y 45 nL, respectivamente, los cuales fueron aislados por un *plug* de *buffer* fosfato de 2 mm (9 nL).

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se presenta en forma esquematizada una micro-reacción en un capilar bajo condiciones electroforéticas. Los *plugs* aislados de enzima y sustrato son introducidos en el capilar. El orden de introducción se determina en base a las movilidades relativas. La reacción se produce durante las interacciones *plug-plug* ($t_2 - t_1$) y los *plugs* individuales de sustrato, enzima y producto son subsecuentemente separados.

Luego de examinar el efecto de la concentración del *buffer* fosfato sobre la sensibilidad de ρ -nitrofenol se concluyó que la concentración del *buffer* sustrato debería ser inferior a 200 mM. Esto se basó en la observación de disturbios en la línea de base, asociados probablemente con los límites frontales y terminales del *buffer* fosfato que afectan los picos de sustrato y de ρ -nitrofenol, respectivamente. También se investigó el efecto del pH. La transformación óptima se observó alrededor de pH óptimo de cada enzima.

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de la reacción usando condiciones optimizadas para el análisis cinético de cada una de las enzimas de la micro-reacción. La Figura 2 muestra las corridas electroforéticas de cada reacción. El ensayo se desarrolló a 37 °C y se detectó a 214 nm. Los valores de K_m fueron obtenidos

Tabla I. Concentración y pH del *buffer* fosfato.

Reacción	Buffer fosfato para enzima		Buffer fosfato para sustrato		pH óptimo informado
	conc. (mM)	pH	Conc. (mM)	pH	
β -Glc-asa	40	4.5	200	6.0	5.5
β -Glc-asa	40	7.0	200	7.0	6.8-7.0
β -Gal-asa	40	4.5	200	4.2	4.5-5.0
β -GlcNAc-asa	40	4.5	80	4.4	4.0-5.0
α -Man-asa	40	4.5	40	4.5	4.5
α -Fuc-asa	40	5.0	200	6.0	5.3

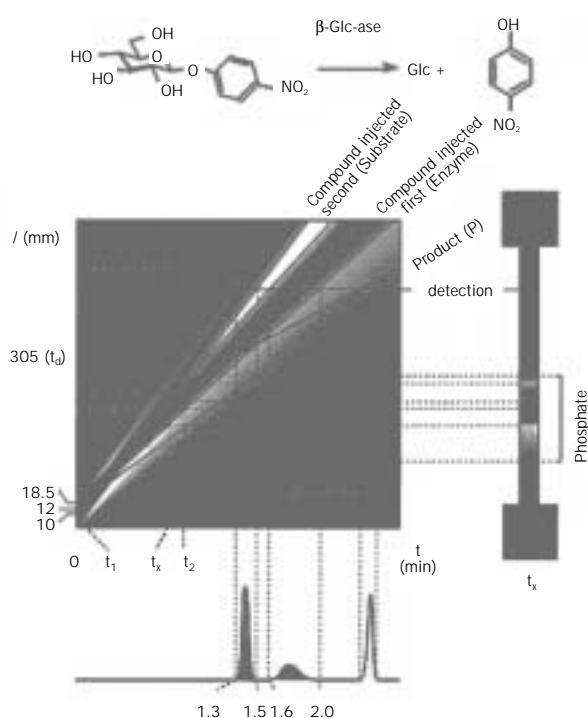


Figura 1. Esquema de una microrreacción en un capilar.

de un gráfico doble-recíproco donde el área relativa se usó para indicar las concentraciones de productos los cuales fueron usados en lugar de velocidad inicial de la reacción enzimática.

En la Figura 3 se muestra un ejemplo de gráfico doble-recíproco para la reacción de α -Glc-asa. La reacción enzimática se describe mediante la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = V_{max}[S] / (K_m + [S])$$

donde

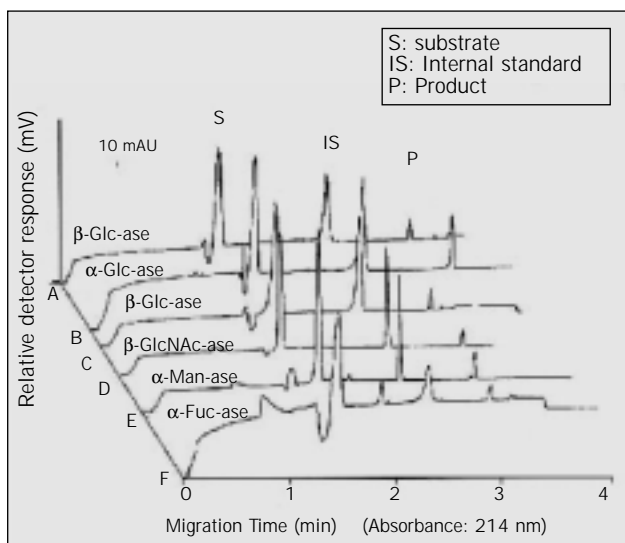


Figura 2. Corridas electroforéticas de las distintas enzimas.

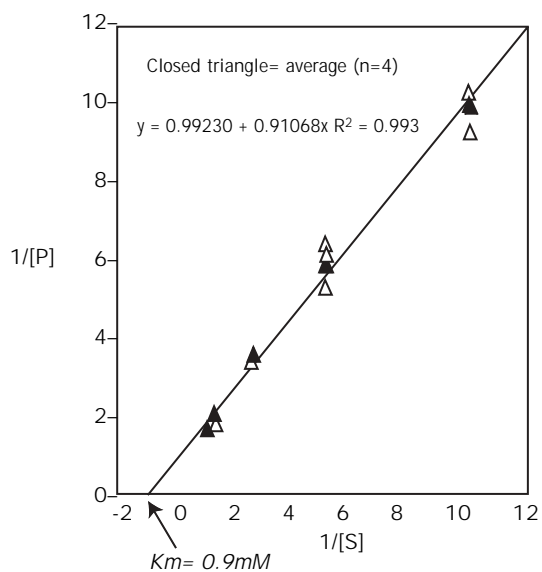


Figura 3. Gráfico doble recíproco para α -Glc-asa.

v: velocidad inicial de la reacción.

[S]: concentración de sustrato.

K_m : constante de Michaelis.

A pesar de que el tiempo de reacción no es dado directamente en la MME debido a la naturaleza heterogénea de la reacción que tiene lugar durante la interacción *plug-plug*, la linealidad se obtuvo del área relativa del producto p-nitrofenol sobre uridina durante el experimento a una concentración fija de *buffer* fosfato. Por lo tanto, se usó el área como un valor equivalente de v para obtener la constante. Las K_m así obtenidas se muestran en la Tabla II junto con las calculadas por el método convencional.

En las Figuras 4 y 5 se muestran otros ejemplos de utilidad potencial de MME en el análisis funcional de hidratos de carbono relacionados con enzimas o con otros hidratos de carbono. En la Figura 4 se muestran las corridas electroforéticas de la reacción selectiva que usó una mezcla de PNP- β -glicósidos de glucosa y galactosa con β -Glc-asa. La diferencia estructural de estos glicósidos es una quiralidad simple en la posición C-4 de la molécula del azúcar. Se ve claramente en la Figura 4A que estos compuestos se resolvieron usando *buffer* bora-

Tabla II. Constantes de Michaelis obtenidas por MME y ensayo fotométrico.

Reacción	MME (mM)	Ensayo fotométrico (mM)
β -Glc-asa	1.4	2.6
α -Glc-asa	0.9	0.7
β -Gal-asa	1.0	1.2
β -GlcNac-asa	1.1	1.8
α -Man-asa	0.8	1.0
α -Fuc-asa	0.7	1.1

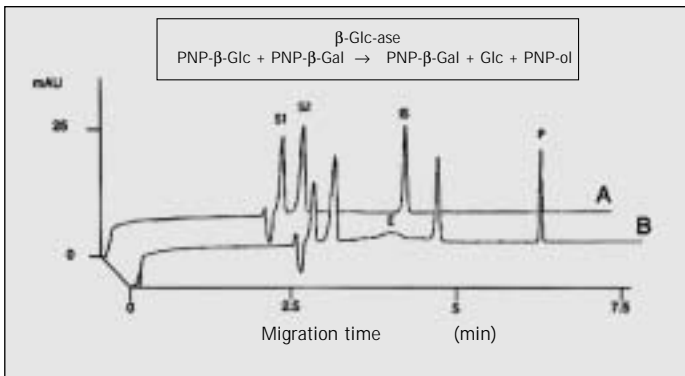


Figura 4.A. Inyección de 0,5 mM de PNP- β -Glc (S1) y 0,5 mM PNP- β -Gal (S2) en buffer fosfato 200 mM que contiene estándar interno (IS), después de la inyección de buffer fosfato 40 mM (3s) y buffer fosfato 200 mM (1s).

4.B. Inyección de PNP- β -Glc 0,5 mM (S 1) y PNP- β -Gal 0,5 mM (S 2) en buffer fosfato luego de la inyección de β -Glc-asa 0.5 mM (E) en buffer fosfato 40 mM (3s) y en buffer fosfato 200 mM (1 s). Longitud total del capilar: 47 cm; Absorbancia: 214 nm.

S1: PNP- β -Glc; S2: PNP- β -Gal; IS: uridina; P: PNP-ol.

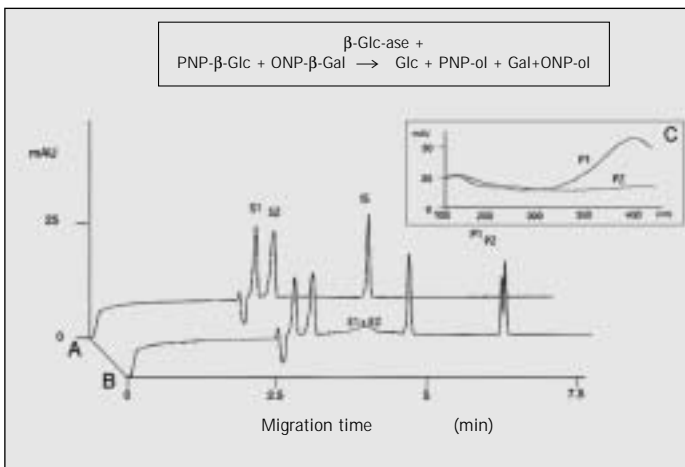


Figura 5.A. Inyección de PNP- β -Glc (S1) 0,5 mM y ONP- β -Gal (S2) 0,5 mM en buffer fosfato 200 mM luego de la inyección de buffer fosfato 40 mM (3s) y buffer fosfato 200 mM (1s).

5.B: Corrida electroforética de la reacción enzimática donde ambos sustratos PNP- β -Glc y ONP- β -Gal y los productos PNP-ol y ONP-ol están claramente aislados. Inyección de PNP- β -Glc 0,5 mM y ONP- β -Gal 0,5 mM en buffer fosfato 200 mM luego de la inyección de 0,5 mg/mL β -Glc-asa (E) y 0,26 mg/mL de β -Gal-asa (E2) en buffer fosfato 40 mM (3s) y buffer fosfato 200 mM (1s). Longitud del capilar: 47 cm; Espectro en caja. Espectro UV de cada pico en la corrida electroforética B.

S1: PNP- β -Glc; S2: ONP- β -Gal; 1s: uridina; P1: PNP-ol; P2: ONP-ol.

to como electrolito de separación. Además, como se observa en la Figura 4B es evidente que la reacción catalizada por la β -Glc-asa tuvo lugar donde fue observada la formación de p-nitrofenol y el área de PNP- β -Glc disminuyó mientras que PNP- β -Gal no se afectó. La Figura 5 muestra las corridas electroforéticas de la reacción usando dos enzimas y los sustratos correspondientes (PNP- β -Glc y ONP- β -Gal) para el uso potencial de una mezcla de enzimas relacionadas funcional o estructuralmente. Para conformar ambas reacciones fueron usados p-nitro y o-nitrofenil glucósidos. Las Figuras 5A y 5B demuestran que los dos sustratos y fenoles se resolvieron bien bajo condiciones de MME sin enzimas, respectivamente. La Figura 5C muestra que es posible la reacción enzimática mezclada y pueden diferenciarse e identificarse fácilmente con detector PDA UV los picos de los productos correspondientes.

Conclusiones

Se consiguieron desarrollar, bajo las condiciones de un microanálisis mediado por electroforesis capilar, las reacciones de glicoenzimas nativas usando un formato *plug-plug*. Se llevó a cabo una evaluación de la constante cinética bajo las condiciones de la corrida. Se consiguió reducir radicalmente la escala de la reacción enzimática (por lo menos 1000 veces en comparación con el análisis llevado a cabo en un tubo de microcentrifuga). De esta manera, se pudo realizar una reacción enzimática a escala de nanolitros cuando el límite, en cuanto al volumen de reacción para los métodos tradicionales, era a escala de microlitros. Consideramos que se trata de una importante herramienta analítica para el examen de pequeñas cantidades de mezclas de enzimas donde se desean conocer sus actividades y especificidades.

Referencias bibliográficas

- Kanie Y, Kanie O. Electrophoretically Mediated Microscale Reaction of Glycosidases: Kinetic analysis of some glycosidases at nanoliter scale. *Carbohydr Res* 2002; 337: 1757-62.
- Kanie Y, Kanie O. Electrophoretically Mediated Reaction of Glycosidases at Nanoliter Scale. *Electrophoresis* 2002; 28: 255-60.