



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



REPLEGAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE HIALURONIDASA RECOMBINANTE MONITOREADO POR FLUORESCENCIA.

Aurora Antonio Pérez¹, Herlinda Clement², Alejandro Alagón², Jaime Ortega López¹,
1CINVESTAV-IPN, Laboratorio de Biotecnología de proteínas, Dept. de Biotecnología y Bioingeniería
Bioengineering, Av. IPN No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco. México D.F., C.P. 07360. 2. Instituto de Biotecnología,
UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca Mor., 62250, México. jortega@cinvestav.mx

Palabras clave: Replegamiento cromatográfico, Hialuronidasa recombinante, Desnaturalización química.

Introducción. El replegamiento de proteínas es una operación unitaria crucial en la producción de proteínas recombinantes por lo general con bajos rendimientos (1%-8%). Recientemente, hemos desarrollado un sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo asistido por DA_{GrOEL}, DsbA y DsbC inmovilizados a una matriz de celulosa por medio de la fusión al CBD_{Cex}; como una alternativa para mejorar los rendimientos del replegamiento. El sistema ha probado ser eficiente para el replegamiento de lisozima (1) e hialuronidasa recombinante (2). Para facilitar el uso de este sistema en los casos donde la proteína a replegar carece de actividad enzimática o su ensayo enzimático es complejo y tedioso, como en el caso de la hialuronidasa, se requiere una alternativa para medir el grado de replegamiento. En el presente trabajo se determinó la fluorescencia intrínseca de la hialuronidasa en función de la concentración de GdnHCl (curva de desnaturalización). Estos datos se usaron como referencia para estimar el % replegamiento obtenido en el sistema de replegamiento cromatográfico asistido de la hialuronidasa.

Metodología. Muestras de hialuronidasa (replegadas por replegamiento cromatográfico) a 0.0435 mg/ml se incubaron a 25°C en Tris-HCl pH 8.0 adicionado con GdnHCl a concentraciones crecientes (0M-6M) durante 16h. Posteriormente, se determinaron los espectros de emisión de fluorescencia de 300-350 nm con excitación a 295 nm en un espectrofluorómetro FluoroMax-3 (Horiba) a 25°C. Después de normalizar el promedio de tres barridos, mediante la ecuación de Weibull de 5 parámetros (Sigma Plot v10.0) se determinó la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión (3,4).

Resultados. Como se esperaba, los espectros de emisión mostraron un desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión hacia el rojo en función de la concentración de GdnHCl; (344 nm hasta a 358 nm a 6M) como puede observarse en la Figura 1. La tabla 1 muestra los valores de replegamiento obtenidos para cada ciclo del sistema cromatográfico asistido (85%-100%), al extrapolar los espectros de fluorescencia en la curva de desnaturalización. El contraste entre los % de replegamiento de cada método, puede deberse a diferencias como la glicosilación entre el veneno de tarántula, usado como control, y la proteína recombinante

que podrían influir en la desnaturalización por SDS y la subsecuente renaturalización, en determinación de actividad (% plegamiento) por zimograma. Por lo anterior, se postula al monitoreo de la fluorescencia intrínseca como un método rápido y confiable, para la determinación de % replegamiento.

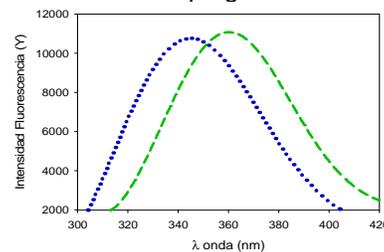


Fig. 1. Espectros de emisión de fluorescencia de hialuronidasa recombinante. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en el fluorómetro FluoroMax-3 (Horiba) las muestra analizadas contenían 0.0435 mg/ml de hialuronidasa y GdnHCl a (---) 0M y (---) 6M.

Tabla 1. Interpolación de la λ_{onda} máxima de cada ciclo de replegamiento, en la curva de desnaturalización de hialuronidasa.

No. ciclo	%Replegamiento por zimograma	%Replegamiento por fluorescencia
1	7.1	80
2	9.8	82
3	7.9	84
4	11.3	84.1
5	17.9	87.4
6	38.7	94
7	58.5	100

Conclusiones. Se monitoreó el replegamiento cromatográfico oxidativo asistido de hialuronidasa por medio de fluorescencia de forma rápida y confiable.

Agradecimiento. Agradecemos a DGAPA-UNAM (IN226906), CONACyT por el financiamiento mediante el proyecto P49987-Z (JOL) y la beca 10458 (AAP).

Bibliografía.

1. Antonio-Pérez.2010. *Chromatographic refolding of lysozyme assisted by AD_{GrOEL}, DsbA and DsbC immobilized in cellulose.* 14th IBS 2010..
2. Antonio-Pérez. *Chromatographic refolding of recombinant hyaluronidase assisted by AD_{GrOEL}, DsbA and DsbC immobilized in cellulose.* 24th Symposium of The Protein Society.
3. Pace N. and Scholtz M. 1997. *Measuring the conformational stability of a protein.*
4. Royer C. A. 2006. *Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence.* Chem. Rev. 106, 1769-1784.