

Purificación y separación de isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper**

Virginia Umaña

Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica

(Recibido para su publicación el 14 de enero de 1982)

Abstract: L-amino acid oxidase (E.C. 1.4.3.2) was purified from the venom of *Bothrops asper* snakes from Costa Rica. Three forms of this enzyme were obtained from the crude venom using only two steps: heating in the presence of L-leucine and chromatography on DEAE-cellulose. The isozymes were numbered 1, 2a and 2b on the basis of electrophoretic mobility towards the anode. Isozymes 1 and 2b were homogeneous by acrylamide gel electrophoresis and sedimentation velocity. They showed a molecular weight of 125,000 by sedimentation equilibrium.

Los venenos de serpiente constituyen la fuente más rica de la enzima L-aminoácido oxidasa. Las primeras observaciones al respecto fueron hechas por Zeller y Maritz (1944). Singer y Kearney (1950) lograron una preparación altamente purificada a partir del veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* y Wellner y Meister (1960) purificaron y cristalizaron la enzima del veneno de *Crotalus adamanteus*, y encontraron que las preparaciones de esta enzima exhiben tres componentes separables por electroforesis en el aparato de Tiselius, con la misma actividad específica y por lo tanto representan tres formas de la enzima.

Mientras fraccionaba el veneno crudo de *Bothrops asper* por electroforesis en gel de almidón, Jiménez-Porras (1964) distinguió 2 formas de la L-aminoácido oxidasa, fácilmente identificables sobre el gel debido a su color amarillo.

El presente trabajo se emprendió con el fin de purificar la L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. asper* y esclarecer el número de sus isoenzimas. La determinación del grado de homología entre ellas se tratará en una publicación posterior.

MATERIAL Y METODOS

El veneno de serpientes de la especie *Bothrops asper*, de procedencia conocida, fue colectado y gentilmente donado por el personal del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. Inmediatamente después de la extracción fue congelado y posteriormente liofilizado.

Durante el proceso de purificación de las isoenzimas se usó agua destilada y desionizada, y las sustancias químicas empleadas tuvieron calidad de reactivo analítico. La L-leucina y el Tris provenían de Sigma; la DEAE-celulosa, de Whatman y los productos para la electroforesis en gel de acrilamida de Eastman Kodak.

Medida de la actividad enzimática: La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente. Se midió el cambio en la absorbancia a 200 nm, ocasionado por la transformación enzimática del sustrato. La celda contenía L-leucina y KCl, ambos a una concentración final de 0,01 M, en una solución reguladora de Tris/HCl 0,025 M, pH 7,2. La reacción se inició agregando una alícuota de la preparación enzi-

* Departamento de Bioquímica del Centro Médico de la Universidad de Duke, Carolina del Norte y es parte de la tesis presentada en el Instituto Politécnico Nacional de México como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Bioquímica).

mática. El cambio en la absorbancia a 220 nm durante un minuto se expresó como unidades de actividad (Rajagopalan *et al.*, 1961). Todas estas determinaciones se llevaron a cabo a 25 C.

Medida de la cantidad de proteína: La cantidad de proteína fue calculada a partir de los datos de la absorbancia a 280 y 260 nm, según la tabla distribuida por "California Corporation for Biochemical Research", que se basa en los coeficientes de extinción de la enolasa y los ácidos nucleicos, dados por Warburg y Christian (1942). En algunas ocasiones se empleó el método de Lowry (1951) y no se encontró diferencia significativa en los resultados.

Purificación de la enzima y separación de sus isoenzimas: El veneno liofilizado fue disuelto (al 1%, p/v) en una solución acuosa de L-leucina 0,01 M, recientemente tratada con N₂ gaseoso durante 30 minutos, para eliminar el O₂ disuelto. La operación se llevó a cabo en un matraz erlenmeyer, cerrado con un tapón de hule con entrada y salida para gases y provisto de un termómetro. El burbujeo con N₂ se prolongó 10 minutos después de la adición del veneno.

El matraz se sumergió en un baño de agua a 90 C, con agitación, hasta que la temperatura de la solución alcanzó 70 C. Durante 5 minutos se mantuvo a temperaturas entre 70 y 73 C, e inmediatamente después se enfrió rápidamente a 0 C. A partir de este momento el proceso continuó a temperaturas entre 0 y 4 C.

El abundante precipitado fue separado por centrifugación a 15.000 rpm. El sobrenadante, que contenía toda la actividad, fue dializado contra una solución de Tris/HCL 0,025 M a pH 7,0.

A continuación se aplicó en una columna de DEAE-celulosa de 25 x 2,5 cm, previamente equilibrada con regulador de Tris/HCL 0,025 M de pH 7,0. Se hizo pasar 500 ml de esta solución antes del gradiente de elución, constituido por un litro de la solución reguladora inicial y un litro de la misma solución con KCl 0,2 M.

El eluido fue separado en fracciones de 10 ml en un colector automático, y en ellas se determinó la actividad enzimática y la absorbancia a 280 y 450 nm. Después de observar los resultados se vio la necesidad de una mayor separación dentro de un grupo de fracciones, y para ello se preparó otra columna de DEAE-ce-

lulosa (12,5 x 2,5 cm), equilibrada como la anterior. En ella se aplicó el grupo de fracciones que mostraron la actividad enzimática y constituyeron el pico 2 de la primera cromatografía, previamente dializadas contra la solución reguladora inicial. Se pasó 3 litros y posteriormente el gradiente de elución. La única diferencia entre este gradiente y el anterior fue la concentración del KCl: desde 0,05 hasta 0,10 M.

El eluido fue separado en fracciones de 2,0 ml. Después de las determinaciones de actividad enzimática y absorbancia a 280 y 450 nm, se construyó una gráfica con los resultados y se decidió reunir las fracciones con actividad en tres grupos: 2b, que comprende el volumen entre el mililitro número 55 y el número 85 del eluido; 2a, entre 120 y 200; y un grupo o zona intermedia, que representa una mezcla de los anteriores.

Estos tres grupos y el que constituye el pico 1 de la cromatografía en la primera columna, fueron concentrados por ultrafiltración en un aparato de Amicon hasta volúmenes de 1,5 ml. Después de determinarles su actividad específica fueron analizados por electroforesis en disco para observar su homogeneidad.

Electroforesis en disco: La electroforesis en disco se realizó según la técnica descrita por Davis (1964), empleando el equipo para electroforesis analítica en gel de acrilamida fabricado por LKB, Suecia.

Estudios de la sedimentación en la ultracentrífuga analítica: Para obtener el patrón de sedimentación y su coeficiente se utilizaron centrífugas analíticas Beckman, modelo E, equipadas con los sistemas ópticos adecuados (Schlieren o interferómetro Rayleigh) y control automático de la temperatura, y se procedió de acuerdo con el método de Archibald (Klainer y Kegeles, 1955). Se aplicó una velocidad de 56.100 rpm y la temperatura se mantuvo a 25 C. Después de 30 minutos se tomó las fotografías a intervalos de 8 minutos. La concentración de proteína en la celda unisectorial empleada fue de 7 mg/ml.

La determinación del peso molecular se hizo según el método de Yphantis (1960 y 1964; Schachman, 1963). La proteína, a una concentración de 0,2 mg/ml en una solución de KCl 0,1 M, fue dializada contra esta última solución durante 12 horas y colocada en una celda bisectorial, empleándose el líquido de diálisis

CUADRO 1

Purificación de la L-aminoácido oxidasa del veneno de B. asper y separación de dos isoenzimas.

<i>Etapa</i>		Actividad	Proteína	Actividad específica	Factor de Purificación
		unidades	mg	unidades/mg	
Solución acuosa de 2.2 g de veneno		220	2170	0,11	1,0
Después del calentamiento en presencia del sustrato		225	1350	0,17	1,5
Fraccionamiento por cromatografía en DEAE-celulosa					
Columna 1	Pico 1	69	12	5.8	
Columna 2	Pico 2b (55-85)*	70	11	6,4	
	Pico 2a (120-200)*	76	12	6,3	
	Zona mixta (86-119)*	94	14	6.7	
		309	49	6,3	57,2

* Los números representan la porción seleccionada del eluido.

como blanco. Se aplicó una velocidad de 18.000 rpm, manteniéndose la temperatura a 20 C. La medida del desplazamiento de las bandas de interferencia en relación con la distancia desde el eje de rotación, fue hecha en un aparato microcomparador de Gaertner Scientific Corp. Graficando el logaritmo natural de estos valores contra el radio al cuadrado (r^2), se obtuvo la pendiente $d \ln f / dr^2$. El peso molecular fue calculado según la ecuación

$$M = \frac{2 R T}{\omega^2 (1 - \bar{v}e)} \cdot \frac{d \ln f}{dr^2}$$

siendo R la constante de los gases, T la temperatura absoluta, ω la velocidad angular del rotor en radianes por segundo, f el desplazamiento de las bandas de interferencia, r la distancia en centímetros desde el eje de rota-

ción, e la densidad de la solución, \bar{v} el volumen específico parcial de la proteína, que puede ser calculado a partir de la composición de aminoácidos (Cohn y Edsall, 1943).

RESULTADOS

El calentamiento de la suspensión del veneno a temperaturas entre 70 y 73 C durante 5 minutos, estando la L-aminoácido oxidasa reducida y protegida por el sustrato (Wellner y Meister, 1960) elimina una considerable proporción de otras proteínas (aproximadamente el 50%), sin pérdida de la actividad de dicha enzima. Posteriormente, la mayoría de las proteínas son eliminadas al no fijarse en la DEAE-celulosa a pH 7,0.

La cromatografía en DEAE-celulosa permitió separar tres formas de la enzima, distinguibles también por electroforesis en gel de

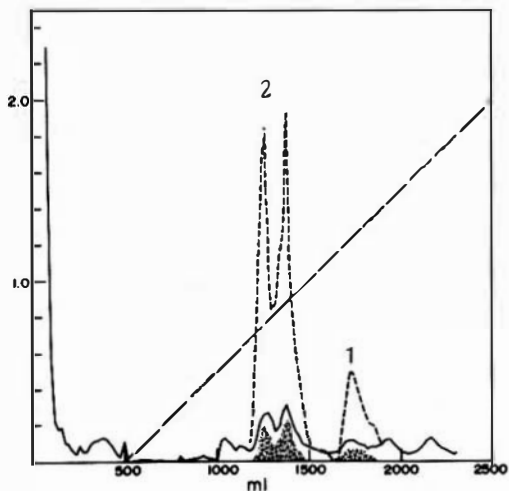


Fig. 1. Separación de las isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. asper* por cromatografía en DEAE-celulosa (columna 1). El eluido fue colectado en fracciones de 10 ml; cada 20 ml se determinó:

Absorbancia a 280 nm ———
 Absorbancia a 450 nm x 10
 (la zona sombreada representa el área)
 Actividad (unidades/ml) - - - - -
 Molaridad x 10 del KCl en el gradiente de elución - - - - -
 2 y 1 son los tipos de isoenzimas separadas.

acrilamida. Posteriormente fueron designadas 1, 2a y 2b según su velocidad decreciente de migración electroforética hacia el ánodo, aunque el orden de elución de la cromatografía en columnas de DEAE-celulosa fue 2b, 2a y 1 (Recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica, IUPAC-IUB 1978).

El Cuadro 1 muestra los resultados de la purificación. Aunque el factor de purificación es un número muy pequeño, conviene mencionar que esta enzima constituye más del 2% del peso seco del veneno (Singer y Kearney, 1950; Wellner y Meister, 1960).

La separación de las tres formas puede observarse en las Figs. 1 y 2. Las fracciones con actividad de L-aminoácido oxidasa fueron de color amarillo, cuya intensidad, medida como absorbancia a 450 nm, fue proporcional a la actividad. Al representar en una gráfica la actividad x 10⁻¹, la absorbancia a 450 nm x 10 y la absorbancia a 280 nm, se obtuvo la figura 2 en la cual los tres parámetros son casi equivalentes, tanto en el pico 2b como en el 2a.

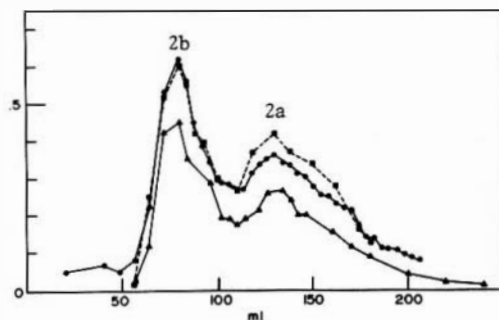


Fig. 2. Separación de las isoenzimas del tipo 2 de L-aminoácido oxidasa de *B. asper*, por cromatografía en DEAE-celulosa (columna 2).

Los símbolos indican:
 Absorbancia a 280 nm ●●●●●
 Absorbancia a 450 nm x 10 ▲▲▲▲▲
 Actividad (unidades/ml) x 10⁻¹ ▲▲▲▲▲

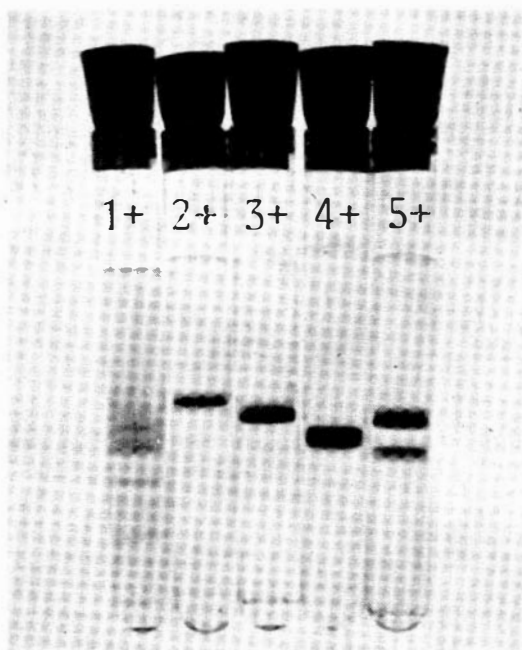


Fig. 3. Electroforesis en gel de acrilamida del veneno crudo de *B. asper* (1+) y las isoenzimas de L-aminoácido oxidasa de este veneno: 2b (2+), 2a (3+) y 1 (4+). (5+) muestra las tres isoenzimas en el mismo gel.

Análisis electroforético en gel de acrilamida: Según el resultado del análisis electroforético en gel de acrilamida, fue posible separar tres formas con actividad de L-aminoácido oxidasa. En la figura 3 podemos observar las numerosas bandas que contiene el veneno crudo (gel 1+), y la purificación que se logró al separar las

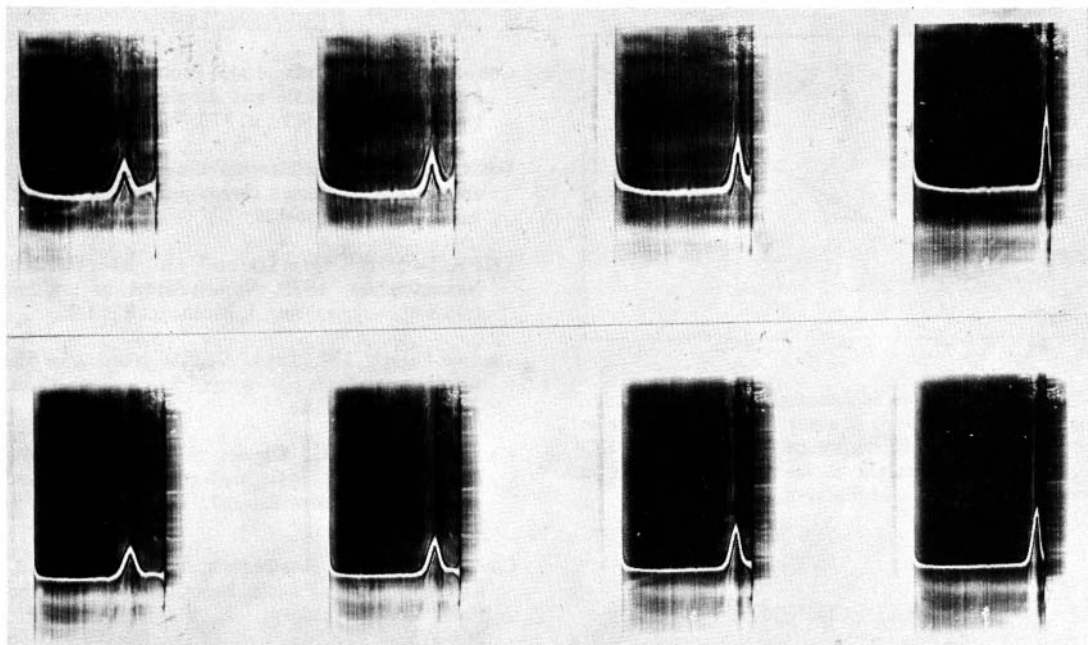


Fig. 4. Patrones de velocidad de sedimentación de L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. asper*: el superior corresponde a la isoenzima 2b y el inferior a la isoenzima 1. La concentración de proteína fue de 7 mg/ml. La temperatura del rotor se mantuvo a 25C, y su velocidad a 56.100 rpm. Las fotografías fueron tomadas cada 8 minutos, después de los primeros 30 minutos. Estas fotografías deben leerse de derecha a izquierda.

isoenzimas 2b (gel 2+), 2a (gel 3+) y 1 (gel 4+). El gel 5+ muestra la mezcla de las tres anteriores.

La isoenzima 2a aparece contaminada con una pequeña cantidad de la isoenzima 2b. Por este motivo no se incluyó en los siguientes estudios.

Patrones de la velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga analítica: Los patrones de la velocidad de sedimentación apoyan nuevamente la pureza de las dos isoenzimas analizadas, en cada uno aparece un solo componente (Fig. 4).

El valor de $S_{20,w}$ calculado es de 6,8 en ambos casos.

Determinación de los pesos moleculares: La figura 5 nos muestra la línea recta obtenida al representar en una gráfica el logaritmo natural del desplazamiento de las bandas de interferencia ($\ln f$) contra la distancia al cuadrado desde el eje de rotación.

En los dos casos analizados (isoenzima 1 e isoenzima 2b de la L-aminoácido oxidasa) se obtuvo la misma recta. Las condiciones experimentales fueron iguales para las dos, y cada

volumen específico parcial, calculado a partir del respectivo análisis de aminoácidos (Umaña, 1982), fue de 0,733. Por lo tanto, el peso molecular calculado para estas isoenzimas es el mismo: 125.000.

DISCUSION

El método empleado para la purificación de esta enzima permitió obtenerla en alto grado de pureza y separarla en isoenzimas, utilizando solamente 2 pasos. Además, se logró definir el número de sus isoenzimas. Wellner y Meister (1960) encontraron tres formas de L-aminoácido oxidasa en el veneno de *Crotalus adamanteus*, mientras en el de *B. asper* Jiménez-Porras (1964) observó dos formas debido a su diferente velocidad de migración sobre el gel de almidón.

En esta investigación se logró obtener tres isoenzimas de L-aminoácido oxidasa a partir del veneno de *B. asper*. El peso molecular (125.000), calculado por equilibrio de sedimentación, no difiere mucho del de la misma enzima del veneno de *Crotalus adamanteus*: 135.000, calculado por Wellner y Meister (1960) por el mismo método.

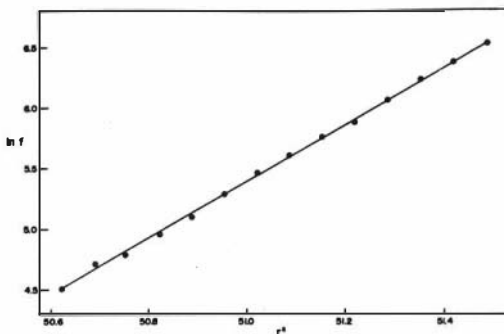


Fig. 5. Equilibrio de sedimentación de L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. asper*. La concentración de proteína fue de 0,18 mg/ml de una solución de KCl 0,1 M. La temperatura se mantuvo a 20 C, y la velocidad del rotor a 18,000 rpm.

AGRADECIMIENTOS

El Profesor Philip Handler y el Dr. K.V. Rajagopalan, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Duke, proporcionaron todo el apoyo y guía para la realización de este trabajo. El personal del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica donó generosamente los venenos. A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

Se purificó y se separó del veneno de serpientes *Bothrops asper* capturadas en Costa Rica en tres isoenzimas la L-aminoácido oxidasa, empleando solamente dos pasos: calentamiento en presencia de L-leucina y cromatografía en columnas de DEAE-celulosa. Las isoenzimas fueron denominadas 1, 2a y 2b, según su velocidad electroforética hacia el ánodo, siendo 1 la más rápida y 2b la más lenta.

La pureza de las isoenzimas 1 y 2b se demostró por electroforesis en gel de acrilamida y por estudios de velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga analítica. El peso molecular, calculado por equilibrio de sedimentación, fue de 125.000 en ambas.

REFERENCIAS

- Cohn, E.J. & J.T. Edsall. 1943. Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions. Reinhold Publishing Corp., N.Y., p. 370.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. 1978. Nomenclature of multiple forms of enzymes. *Eur. J. Biochem.*, 82: 1-3.
- Jiménez-Porras, J.M. 1964. Venom proteins of the fer de lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon*, 2: 155-166.
- Klainer, S.M. & G. Kegeles. 1955. Simultaneous determination of molecular weights and sedimentation constants. *J. Phys. Chem.*, 59: 952-955.
- Lowry, O.H. N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall. 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Rajagopalan, K.V., I. Fridovich & P. Handler. 1961. Competitive inhibition of enzyme activity by urea. *J. Biol. Chem.*, 236: 1059-1065.
- Schachman, H.K. 1963. The ultracentrifuge: problems and prospects. *Biochemistry*, 2: 887-905.
- Singer, T.P., & E.B. Kearney. 1950. The L-amino acid oxidase of snake venom. II. Isolation and characterization of homogeneous L-amino acid oxidase. *Arch. Biochem.*, 20: 190-209.
- Umaña, V. 1982. Estudio comparativo de las isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.*, 30: 79-84.
- Warburg, O., & W. Christian. 1942. Isolierung und Kristallization des Garungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, 310: 384-421.
- Wellner, D., & A. Meister. 1960. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. *J. Biol. Chem.*, 235: 2013-2018.
- Yphantis, D.A. 1960. Rapid determination of molecular weights of peptides and proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 88: 587-601.
- Yphantis, D.A. 1964. Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochemistry*, 3: 297-317.
- Zeller, E.A., & A. Maritz. 1944. A new L-amino acid oxidase. *Helv. Chim. Acta*, 27: 1888.