

Laboratorio de Química-Técnica — Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Calvet)

Determinación de actividades ribonucleásicas por el método de difusión en placas de agar

por J. Martín-Esteve, P. Puig-Muset y F. Calvet

(Recibido para publicar el 2 de octubre de 1956)

Las ribonucleasas han adquirido un interés creciente como antimitóticos e inhibidores de la multiplicación vírica, por cuanto son fermentos que hidrolizan, de una manera específica, a los ácidos ribonucleicos, factores esenciales de la síntesis proteica en los organismos.

Para la determinación de la actividad enzimática de las ribonucleasas se pueden utilizar varios métodos, algunos excelentes, mereciendo especial mención los basados o en la determinación del fósforo (3), o en la del azúcar (1, 2) liberado como producto de digestión, así como el método espectrofotométrico de KUNITZ (5). Todas estas técnicas, sin embargo, presentan algunas limitaciones, cuando se trata de preparados enzimáticos pobres o coloreados y exigen o el empleo de aparatos costosos o prolijas manipulaciones.

El método que proponemos en el presente trabajo se basa en la difusión del fermento en el seno de un gel de agar, que contiene ácido ribonucleico (ácido nucleínico de la levadura). Su técnica es sencilla (está inspirada en la utilizada por SPEYER (1953) para la determinación de actividades tríplicas) consume poco tiempo, proporciona buenos resultados y es apropiada para efectuar determinaciones en serie. Su única limitación la establecen aquellos factores que pueden afectar a la velocidad de difusión del enzima, tales como sales presentes en elevada concentración. (Véase más adelante.)

Material y métodos

Se prepara un gel de agar calentando a ebullición 150 c. c. de tampón citrato (0,025 M de pH 6) y 4 gr. de agar en fibra («Hema Drug Co.» o de otra buena procedencia, comprobando que esté exento de sales de magnesio). Una vez conseguida una dispersión perfecta, se agrega a la mezcla caliente una solución que contiene 1 gr. de ácido nucleínico de la levadura («Merck» o de otra marca, que no este despolimerizado), en 50 cc. de tampón citrato (0,025 M de pH 6) y se agita cuidadosamente, evitando la formación de espuma; el conjunto se filtra con rapidez en caliente a través de una tela de nylon y, mediante una pipeta de vertido rápido, se distribuye en fracciones de 15 c. c. sobre placas Petri de fondo plano de 9 centímetros de diámetro, dispuestas sobre una superficie perfectamente horizontal. Una vez la capa de agar-substrato ha gelificado por enfriamiento, las placas así preparadas se pueden guardar en nevera a 5° C (conservando sus buenas propiedades durante unos ocho días), y pueden utilizarse para la determinación cualitativa y cuantitativa de actividades ribonucleásicas. Cuando debe realizarse un ensayo de valoración de actividad, la capa de agar-substrato se perfora mediante un taladracorchos de 7,5 mm. de diámetro, con el que se practican cuatro pocillos en cada placa, situándolos simétricamente, opuestos dos a dos. En cada pocillo se vierten 0,05 c. c. de la disolución del enzima en tampón citrato (0,025 M de pH 6), para permitir después que difunda el fermento durante 18-24 horas, abandonando las placas en una estufa regulada a 37° C. Terminada la incubación se inundan todas las placas mediante una disolución de ácido tricloroacético 0,3 M, con lo que se consigue que las zonas digeridas por la ribonucleasa, (en las que ya no existe ácido ribonucleico) destaquen como círculos transparentes, sobre un fondo general blanco opaco constituido por el ácido nucleico precipitado por la acción del reactivo. Entonces se determinan los diámetros medios de cada uno de los círculos resultantes de la digestión: las lecturas directas de cada uno de los diámetros se realizan con la ayuda de un papel milimetrado translúcido que se coloca entre la placa y un vidrio deslustrado iluminado por debajo.

Si solamente se trata de hacer una determinación cualitativa de actividad ribonucleásica es suficiente depositar una gota de la disolución a investigar sobre la superficie del agar-substrato y dejar en incubación en la estufa a 37° C durante una hora. Transcurrido este tiempo se revela tal como se ha indicado anteriormente. La aparición de una zona transparente indica que la solución ensayada era activa. Este método es apto

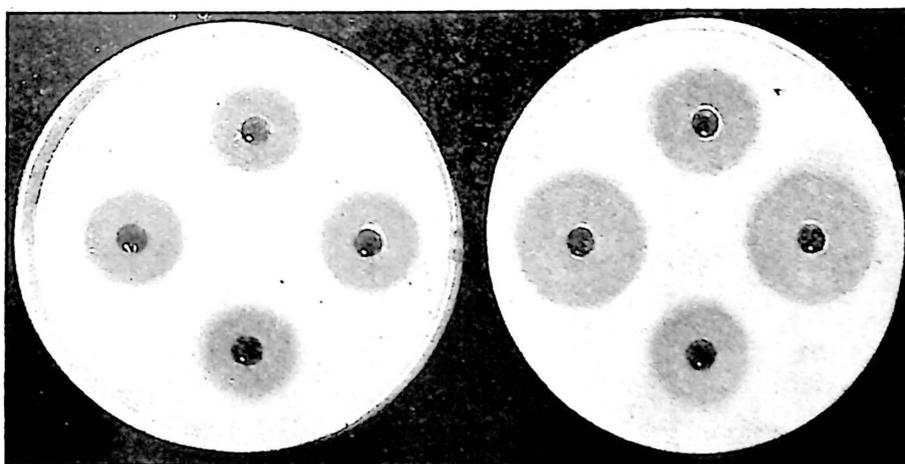
análogamente para la localización de manchas enzimáticamente activas en un papel donde se haya verificado una separación cromatográfica o electroforética. En estos casos la dispersión caliente del agar-substrato se vierte sobre una bandeja plana o recipiente análogo para obtener una capa gelificada delgada, y el papel ligeramente humedecido con tampón citrato, se aplica sobre dicha capa. El conjunto se abandona en la estufa a 37° durante dos horas y el revelado se efectúa análogamente a como se ha indicado anteriormente.

Resultados y discusión

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UNA MUESTRA

La actividad de una muestra de ribonucleasa se determina por comparación de su curva de actividad con una curva standard obtenida, simultáneamente, utilizando una serie de concentraciones sucesivas y crecientes de una ribonucleasa cristalizada de unidades conocidas, que se denomina «patrón»; se emplearon concentraciones comprendidas entre 50 y 1.000 gammas/c. c. de una ribonucleasa de 40 unidades Kunitz/mg., obtenida por nosotros, utilizando el método de KUNITZ (4) modificado por McDONALD (6).

Para homogeneizar los valores obtenidos en las distintas placas y hacerlos comparables entre sí, se dispone el ensayo en forma que en dos de los pocillos opuestos de cada placa, se sitúen porciones iguales (0,05 c. c.) de una misma disolución del enzima patrón de una concentración intermedia (por ejemplo, que contenga 500 gammas/c. c.). Los diámetros de los círculos obte-



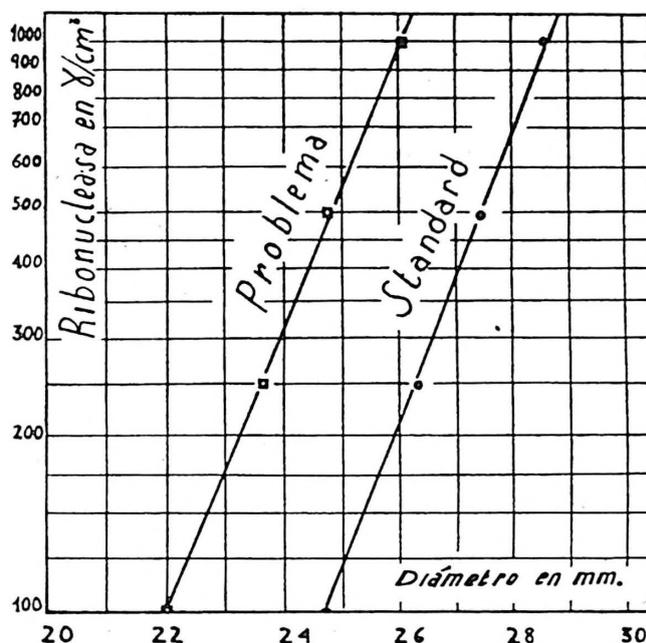
nidos con esta concentración, denominada «concentración tipo», servirán, en todos los casos, para establecer el factor de corrección de la variación individual de cada placa.

Para confeccionar la curva standard, en los otros dos pocillos, de una primera serie de placas, se introducen disoluciones de concentraciones crecientes de la ribonucleasa «patrón». Por otro lado, para obtener la curva problema, en los dos pocillos, de una segunda serie de placas, se colocan las distintas disoluciones (de concentración creciente) de la muestra problema.

Las placas se incuban, todas simultáneamente, después se revelan, como previamente se ha indicado, y se calcula el promedio de los diámetros de los círculos correspondientes a la «concentración tipo» (en todas y cada una de las placas de ambas series); a la media aritmética de dichos valores se le denomina «valor de corrección», y la diferencia entre esta cifra y el diámetro medio de la «concentración tipo» obtenido en cada placa particular, constituye su corrección individual y debe sumarse algébricamente (en cada placa) a los valores obtenidos para los diámetros medios de la disolución problema, o de la standard.

Situando en la escala isométrica de un papel semilogarítmico los valores de los diámetros corregidos y consignando en la logarítmica las concentraciones de las disoluciones utilizadas, se obtienen dos rectas paralelas, una para las disoluciones standard y otra para las del problema. La proporcionalidad loga-

Placa N.º	$\gamma/c.c.$	Lecturas ensayo		Valor medio	Lecturas conc. tipo 500 $\gamma/c.c.$		Valor medio	V. C.	C.	Diámetros corregidos	
Patrón	1	100	24,5	25	24,7	27,5	27,5	27,5	27,5	0,0	24,7
			25	24,5		27,5	27,5				
	2	250	26,5	26,5	26,5	27,5	27,5	27,6		-0,1	26,4
			26,5	26,5		28	27,5				
	3	1.000	28,5	28,5	28,5	27,5	27	27,4	0,1	28,6	
			28	29		27,5	27,5				
Problema	4	100	22	22,5	22,2	27,5	28	27,7	27,5	-0,2	22
			22	22,5		27,5	28				
	5	250	23	23	23,2	27,5	27	27,1		0,4	23,6
			23,5	23,5		26,5	27,5				
6	500	24,5	24,5	24,7	27,5	27,5	27,5	0,0	24,7		
		25	25		27,5	27,5					
7	1.000	25,5	27	26,3	27,5	28	27,6	-0,1	26,2		
			26	27,5	27,5	27,5					



rítmica que existe entre diámetros y concentraciones, permite comparar dos diámetros iguales en sendas curvas y deducir, directamente, la riqueza enzimática del preparado problema.

En la tabla y gráfica se consigna un ejemplo de determinación de la actividad de una ribonucleasa desconocida.

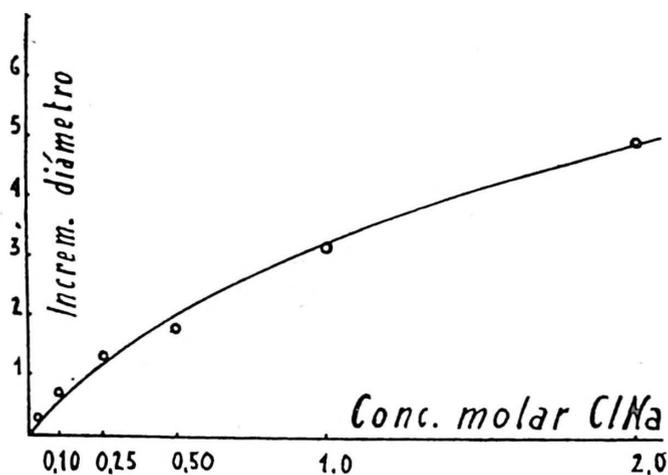
En la gráfica se observa que 1.000 gammas de la ribonucleasa problema producen una zona de digestión cuyo diámetro corresponde a una concentración de ribonucleasa cristalizada de 210 gammas/c. c. y, por tanto, su riqueza es: $0,21 \times 40 = 8,4$ unidades/mgr.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN SALINA

Limitan la validez del método y de las técnicas anteriormente descritas las variaciones substanciales de concentración salina que, aunque no son frecuentes en las determinaciones ordinarias, deben tenerse en cuenta en determinados casos especiales. La influencia de las sales se traduce en una modificación de la velocidad de difusión del enzima en el medio. Los resultados obtenidos con distintas concentraciones de cloruro sódico, sobre una misma disolución de enzima, se consignan en la siguiente tabla y gráfica.

Conc. ClNa mols/litro	Diámetro en milímetros			Correc.	Diámetros corregidos
	Conc. tipo	Valor correc.	Disolución problema		
0,005	23,4		23,4	-0,3	23,1
0,025	23,0		23,2	0,1	23,3
0,05	23,1		23,5	-0,0	23,5
0,10	23,1		23,7	-0,0	23,7
0,25	23,1	23,1	24,4	-0,0	24,4
0,50	22,9		24,6	0,2	24,8
1	22,4		25,6	0,7	26,3
2	23,2		28,1	-0,1	28,0
3	23,5		30,5	-0,4	30,0

Concentración de Ribonucleasa: 250 gammas/c.c.
Tiempo de incubación: 20 horas.



Obsérvese que las concentraciones de cloruro sódico que realmente introducen una modificación substancial sobre la velocidad de digestión del enzima, significarían que el preparado enzimático ensayado contiene más de un 50 % de cloruro sódico, lo cual no es frecuente. (*)

Resumen

Las técnicas conocidas que se utilizan para determinar la actividad enzimática de las ribonucleasas adolecen de algunas limitaciones cuando se trata

* Al tiempo de corregir las pruebas de la presente nota ha aparecido un trabajo de DICKMAN, AROSKAR y KROFF, *Biochim. et Biophys. Acta*, 21, 539 (1956), en la que los autores describen una activación de la ribonucleasa provocada por limitadas concentraciones de algunas sales inorgánicas (ClNa, SO₄K, etc.).

de preparados enzimáticos pobres o coloreados, y exigen el empleo o de aparatos costosos o prolijas manipulaciones.

El método que se propone en este trabajo se basa en la difusión del fermento en el seno de un gel de agar (que contiene ácido ribonucleico) depositado uniformemente en placas Petri de fondo plano y, según nuestra experiencia, es de realización sencilla y proporciona buenos resultados. La lámina del gel de agar-ribonucleico que posee un espesor de unos 2,5 mm. se perfora mediante un taladracorchos de 7,5 mm. de diámetro con el que se practican cuatro pocillos opuestos en cada placa, dispuestos simétricamente. En dos de los pocillos opuestos se introduce la disolución enzimática standard, y en los otros dos la disolución problema, y así se hace, en una serie de placas, con concentraciones crecientes de ambas muestras, para construir después sendas curvas, standard y problema, y poderlas comparar. Todas las placas se incuban a 37° C. durante 18-24 horas, con objeto de que los enzimas difundan y digieran el ácido ribonucleico, y finalmente se «revelan» inundándolas con una disolución de ácido tricloroacético que precipita al ácido ribonucleico, con lo que se consigue que los discos de difusión del enzima (en los que el ribonucleico ha sido digerido) destaquen como zonas transparentes en un fondo general opaco de color blanco, constituido por el ácido precipitado. Los diámetros de los distintos discos se leen situando las placas sobre un papel milimetrado transparente que se superpone a un vidrio deslustrado iluminado inferiormente, y una vez aplicadas las correcciones correspondientes a cada placa, los valores hallados se representan gráficamente en papel semilogarítmico, construyendo curvas standard y problema, de cuya comparación se puede deducir la actividad de la disolución investigada (Para ulteriores detalles operatorios nos remitimos al texto del trabajo «in extenso».)

El método es exacto y de técnica simple y solamente hay que precaerse frente a la existencia de concentraciones salinas elevadas, las cuales modifican la velocidad de difusión del enzima y conducen a erróneos resultados.

Summary

Estimation of ribonuclease activities by the diffusion method in agar

The known methods generally used to establish the activities or ribonuclease preparations offer some limitations when dealing with poor or coloured enzyme solutions, and demand the use of expensive apparatus or of rather complicated techniques.

The method proposed in this paper is based on the diffusion of the enzyme through an uniform layer of agar gel (containing ribonucleic acid) spread over flat-bottomed Petri dishes, and in our experience, is easy to perform and gives satisfactory results.

In the ribonucleic acid-agar layer, which should be of about 2.5 mm thick, four pools of about 7.5 mm diameter are carved by means of a convenient cork-borer, distributing them symmetrically on the dish surface. The standard enzyme solution is introduced in two of the oposed holes, whereas the problem

solution is deposited in the other two ; and the same is repeated in a series of dishes but with increasing concentrations of both samples. All the dishes are then incubated at 37° during 18-24 hours, so that the enzymes may diffuse and digest the ribonucleic acid, and finally they are «developed» by flooding them with a solution of trichloroacetic acid, which precipitates the ribonucleic acid of the non digested zones thus appearing white opaque. On the other hand, the enzymatic diffusion disks, where the ribonucleic acid has been digested, stand out as completely transparent, and the corresponding diameters can easily be measured by placing the dishes upon a milimetric paper lying over a frosted glass illuminated from below. After the convenient corrections have been applied, the resulting values are represented graphically on a semilogarithmic paper, and by a proper comparison of the resulting standard and problem curves, the activity of the investigated sample can be deduced (for further details, see the preceding full text).

The method has proved to be accurate and the technique is simple. The only limitation observed is the presence of high saline concentrations in the product examined, which certainly modify the rate of diffusion of the enzyme and may lead to erroneous results.

Bibliografía

- (1) CERIOTTI, J. : *J. Biol. Chem.*, **214**, 60, 1955.
- (2) DISCHE, SCHWARZ : *Mikroch. Acta*, **2**, 13, 1937.
- (3) HOLDEN, M., PIRIE, N. W. : *Biochem. J.*, **60**, 53, 1955.
- (4) KUNITZ, M. : *J. Gen. Physiol.*, **24**, 15, 1940.
- (5) KUNITZ, M. : *J. Biol. Chem.*, **164**, 563, 1946.
- (6) McDONALD, M. R. : *J. Gen. Physiol.*, **32**, 39, 1948.
- (7) SPEYER, E. : *Arzneimittelforsch.*, **3**, 309, 1953.