R. esp. Fisiol., 13, n.º 4, págs. 247 a 252, 1957

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias. - Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Electroforesis en papel de citocromo C

por

R. Parés y J. Planas

(Recibido para publicar el 21 de noviembre de 1957)

El estudio sobre la pureza de preparados de citocromo C ha sido realizado por THEORRELL y AKESSON (10) y TINT y REISS (11, 12) con electroforesis libre, así como por PALEUS (6) con electroforesis en papel. Sin embargo, se consideró interesante llevar a cabo una comprobación de la pureza de los preparados obtenidos de citocromo C destinados a ensayos terapéuticos, relacionando su contenido en hierro con la homogeneidad de su migración en electroforesis en papel.

Algunos preparados de citocromo C de 0,34 % de hierro se resuelven en dos componentes electroforéticos (7, 10). No obstante, TINT y REISS (11, 12) encontraron que los preprados de citocromo de miocardio presentan distintos grados de pureza electroforética según la especie animal. Más tarde, PALEUS (6) purificó con electroforesis en papel preparados «standard» de citocromo C, logrando una riqueza en hierro de 0,45 % para el citocromo procedente del corazón de buey, y 0,40 % para el gallo.

Por otra parte, se ha comprobado (7) que la actividad por gramo de hierro era igual en el citocromo de 0,34 % que en el de 0,43 %.

Parece posible que existan diferencias específicas en cuanto al contenido en hierro, y que para el caso del caballo el límite de purificación se encuentre a una concentración de hierro de 0,34 % o poco mayor.

Material y métodos

El citocromo C fué obtenido a partir del miocardio de caballo según la técnica «standard» de KEILIN y HARTREE (2).

El contenido en hierro se determinó según el método de WONG (13). El nitrógeno total se tituló colorimétricamente por nesslerización directa, utilizando peróxido de hidrógeno como oxidante. Como en la etapa final de purificación se dializa frente a ClNa, se determinaron cloruros sobre materia seca, según el método de SENDROY (8).

El examen electroforético de las preparaciones de citocromo C fué llevado a cabo con un dispositivo de cubeta vertical. Los diferentes ensayos se realizaron con un potencial comprendido entre los 200 y 400 volts y una intensidad de 0,5 a 5 mA, durante 3 a 4 horas. Constantemente se emplearon de 2 a 3 tiras de papel de 3,5 × 34 cm. El volumen de muestra ensayada fué de 0,03 a 0,06 c. c. por tira. Se emplearon cuatro tipos distintos de papel : Schleicher & Schull n.° 2040-B, 2043-B, 2045-B ; y Munktell n.° 20. Los electrólitos empleados fueron : ácido acético 33 %, *p*H 2,10 ; tampón de fosfatos, *p*H 6,89 ; veronal, *p*H 8,13 y 8,44 ; y tampón de glicocola-NaOH, *p*H 8,62.

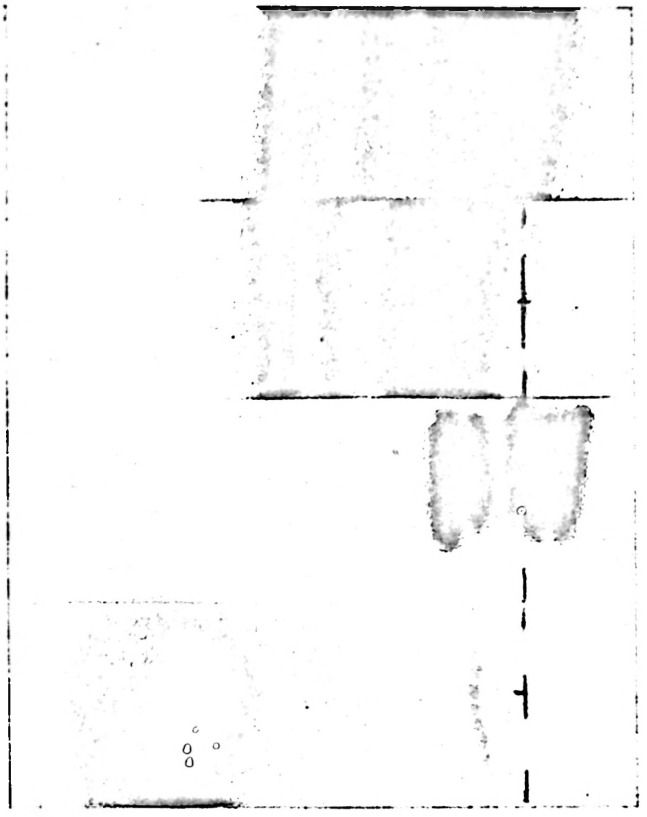
El revelado se efectuó con azul de bromofenol (1), y el lavado y viraje de acuerdo con la técnica de SLUYTERMAN (9).

Resultados

En el cuadro I se especifican las características analíticas de seis preparados de citocromo C. Como coeficiente de pureza se utiliza la relación N/Fe, que se determina con exactitud mucho mayor que el porcentaje absoluto de hierro. Los preparados con un contenido en hierro inferior al 0,34 % (relación N/Fe superior a 177) de la preparación de KEILIN y HARTREE, fueron obtenidos ocasionalmente o por omisión intencionada de alguna etapa de purificación (preparado n.° 8).

En todos los medios empleados el citocromo migra hacia el cátodo y, cuando hay otras fracciones, es la que presenta la mayor velocidad de desplazamiento. Sin embargo, la definición de las impurezas es distinta (Fig. 1), apreciando que el tampón de veronal y el de glicocola-NaOH son los que suministran resultados más satisfactorios.

Los papeles Schleicher & Schull n.° 2040-B y Munktell n.° 20 son los que proporcionaron los ionogramas más aceptables, aunque dejan «colas». No se mejora la definición desionizando previamente el papel con bromuro de didecildimetilamonio, como se recomienda para las proteínas catiónicas (5).



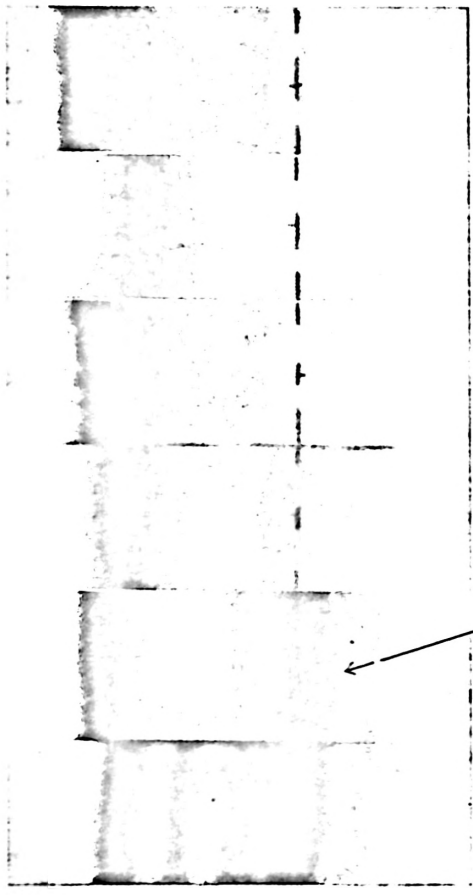
D. — Tampón veronal; 400 volts; duración: 3 h. Papel S. & S. 2040 B.

C. — Tampón de glicocola-NaOH; 200 volts; duración: 17 horas. Papel S. & S. 2040 B.

B. — Tampón fosfatos; 400 volts; duración: 1,45 h. Papel S. & S. 2045 B.

A. — Acido acético; 400 volts; duración: 2 h. Papel S. & S. 2045 B.

FIG. 1. — Ionogramas del preparado n.º 8 de citocromo C, obtenidos con distintos electrolitos.



F. — Preparado n.º 3, relación N/Fe 177. Duración : 3 h. Papel S. & S. 2040 B.

E. — Preparado n.º 4, relación N/Fe 177. Duración : 3 h. Papel S. & S. 2040 B.

D. — Preparado n.º 11, relación N/Fe 157. Duración 3,3 h. Papel Munktell n.º 20.

C. — Preparado n.º 10, relación N/Fe 177. Duración : 3,15 h. Papel S. & S. 2040 B.

B. — Preparado n.º 5-6-7, relación N/Fe 500. Duración : 3 h Papel S. & S. 2040 B.

A. Preparado n.º 8, relación N/Fe 667. Duración : 3 h. Papel S. & S. 2040 B.

FIG. 2. — Ionogramas de varios preparados de citocromo C. Tampón veronal, *p*H 8,44. Potencial : 400 volts.

CUADRO I

Datos analíticos de preparaciones de citocromo C de miocardio de caballo

Preparado	Hierro mg./1000	Nitrogeno mg./1000	Cloruros gr./1000	Residuo seco gr./1000	N/Fe en gr.	N/Fe en at. g	Electroforesis
3	28,6	1.260	5.8	13	44.21	177	homogéneo
4	21	937,5	3.3	8.75	44.64	179	"
5-6-7	16	2.000	5,3	17,8	125	500	heterogéneo
8	14	2.333	2.5	20,4	166.66	667	"
10	34,1	1.500	5,2	15,7	43.99	177	homogéneo
11	31,4	1.230	5,06	13,6	39,17	157	"

El estudio comparativo de la pureza electroforética de los distintos preparados (Fig. 2), nos muestra que las preparaciones con una relación N/Fe de 177 o inferiores, se presentan prácticamente puras. Por el contrario, los preparados con una relación N/Fe de 667 y 500 presentan impurezas que disminuyen claramente de uno a otro preparado.

Discusión

TINT y REISS (12) encuentran que el citocromo C de buey con un contenido en hierro de 0,36 %, el de cerdo de 0,38 % y el de gallo de 0,37% no resultan todavía homogéneos en la electroforesis libre. En cambio, dichos autores (11) pueden estimar como puro el citocromo de caballo de 0,45 %, y PALEUS (6), por electroforesis en papel, el de buey de 0,45 % y el de gallo de 0,40 %. THEORRELL y AKESSON (10) no indican la especie animal utilizada, pero se presupone que sea de buey por las referencias señaladas en su trabajo. El preparado que obtienen no migra homogéneamente hasta un contenido de hierro del 0,43 %.

De otra parte, con el mismo método de fraccionamiento se consiguen resultados que proporcionan valores de la relación N/Fe que oscilan entre 157 y 177 (Cuadro I). Además, la modificación de KEILIN y HARTREE (3), que permitió conseguir por fraccionamiento químico un citocromo de 0,45 % de hierro, no introduce ninguna variación substancial del método y, de hecho, PAUL (7) señada que con ella no ha conseguido sobrepasar el 0,41 % de hierro, que corresponde a un valor de N/Fe de 154, muy próximo al de 157 obtenido por nosotros con la técnica ordinaria. Es más, comúnmente para conseguir una relación de N/Fe de este orden es necesario repetir el fraccionamiento final con sulfato amónico. De lo expuesto se deduce que la

impureza que trata de eliminarse de los preparados de 0,34 % de hierro está presente en mucha mayor proporción en los preparados de un contenido de hierro más bajo. Así, las purificaciones superiores a una relación N/Fe de 177 no parecen consistir en la separación de una impureza particularmente unida al citocromo C.

En los ionogramas de citocromo C de alta concentración de hierro (igual o superior al 0,34 %), las impurezas se hallan sobre una banda única que migra hacia el ánodo en el tampón de veronal de *p*H 8,42 (11, 12). En estas condiciones, el citocromo migra hacia el cátodo y, por tanto, de hallarse en suficiente cantidad, debe separarse bien claramente de la impureza.

Las consideraciones precedentes permiten identificar con bastante seguridad a la impureza del citocromo de 0,34 a 0,40 % de hierro (10, 11, 12) con la banda X de nuestras tiras (Fig. 2). Nosotros hemos encontrado que en electroforesis en papel esta banda deja de hacerse aparente para relaciones N/Fe superiores a 177 (Fig. 2), en las preparaciones de citocromo C de miocardio de caballo. Este resultado nos ha sugerido que el límite de purificación para el citocromo C de caballo debe estar poco alejado del valor de la relación N/Fe de 177.

Examinando los datos de otros autores sólo encontramos en TINT y REISS (12) un preprado de citocromo de caballo con un título de hierro claramente superior (N/Fe de 143), aunque el método de obtención no difiere substancialmente del nuestro. Nosotros no hemos podido reproducir este resultado. En cambio, para el citocromo C de buey parece bastante constante la posibilidad de obtener preparaciones con relaciones N/Fe de 145 a 150 (6, 10. 11, 12), mientras que en el cerdo y el gallo el límite de purificación parece ser también más bajo (6). Estos resultados admiten dos interpretaciones: que existen diferencias específicas en el citocromo C o en las impurezas. Nosotros nos inclinamos por la primera, aunque consideremos que no hay todavía suficientes datos experimentales para pronunciarse en seguridad por una u otra interpretación. La posibilidad de que el citocromo C de caballo y el de buey sean distintos está de acuerdo con el hecho de que TINT y REISS (11) pudieron separarlos por electroforesis libre. Además, la existencia de cierta especificidad en el citocromo C no sería un hecho aislado en proteínas de esta naturaleza, pues es bien conocida una propiedad análoga para la hemoglobina (4) y, en general, para muchas otras proteínas.

Los autores agradecen la ayuda técnica prestada para la realización de este trabajo por el Sr. J. PARÉS y la Srta. M. MARTÍ, del Departamento de Investigación de la Sociedad General de Farmacia.

Resumen

Por medio de la técnica de electroforesis en papel se estudia la pureza de distintas preparaciones de citocromo C de miocardio de caballo. Dichas preparaciones presentan una relación N/Fe que oscila entre 157 y 667.

Se señalan y discuten las condiciones adecuadas para obtener el ionograma del citocromo C. En las muestras estudiadas, además de la banda correspondiente al citocromo se ponen de manifiesto otros tres componentes para el preparado con una relación N/Fe de 667 y uno en la 500. Los que poseen una relación N/Fe igual o superior al 177 se muestran homogéneas.

Se identifica uno de los compuestos de nuestras tiras con la impureza de los citocromos C de elevado contenido en hierro estudiados por otros autores, mostrando que para el citocromo C de miocardio de caballo deja de hacerse ostensible para valores de N/Fe del orden de 177.

Se concluye que el límite de purificación del citocromo C de miocardio de caballo no puede hallarse muy lejos de la relación de N/Fe de 157 y que probablemente difiere del citocromo obtenido de otros animales, en los que dicha relación alcanza valores más bajos.

Summary

Paper electrophoresis of Cytochrome C

Several authors have performed electrophoretic tests on the purity of preparations of cytochrome C both by free electrophoresis (10, 11, 12), and by paper electrophoresis (6).

Electrophoretic purity varies with the iron content of the preparation, and it seems that the limit of chemical purity is different for each animal species from which the preparation proceeds.

Various preparations of cytochrome C from the myocardium of the horse have been obtained according to the standard method of KEILIN and HARTREE (2), the analytical characteristics of which are expounded in table II, and they have been tested by papel electrophoresis. The electrolytes used were: 33 % acetic acid *p*H 2,10; phosphate buffer *p*H 6,89; veronal *p*H 8,13 and 8,44; glicocola-NaOH buffer *p*H 8,62. Tests were performed with a potential oscillating between 200 and 400 volts, for 3 to 4 hours. Paper employed was Schleicher and Schull No. 2040-B, 2043-B, and 2045-B, and Munktell No. 20, in strips of 3,5 × 34 cm. Dyeing was done with bromophenol blue (I), and washing by Sluyterman (9).

Veronal and glicocola buffer were those which gave the greatest definition in the separation of impurities (Fig. I). With the electrolytes employed, cytochrome C emigrates to the cathode. The absorption of part of the preparation by the paper diminishes the cleanness of displacement even in papers S & S. 2040-B and Munktell n.° 20, which are those which gave

the best results. Previous deionisation of the paper with didecyldimethylammoniun bromide, recommended for cationic proteins (5) did not improve definition.

Adequate conditions for obtaining the ionogram of cytochrome C are indicated and discussed. In the samples studied, in addition to the band correspondig to the cytochrome three other components of the preparation are shown with a relation N/Fe of 667 and one in that of 500. Those which possess a N/Fe relation aqual to or lower than 177 are seen to be homogeneous.

Both electrophoretic behaviour (11, 12) and purification conditions (2, 3, 7, 11) suggest that the impurity found in cytochrome C preparations of high concentration is much more concentrated in the more impure preparations. Thus, it is probable that one is dealig with the band X of the strips of Fig. 2 wich in our preparations disapears from relations N/Fe of 177. This appears to indicate that the limit of purification of cytochrome C of horse myocardium may not be far from this value. If we discard the possibility of a specific impurity particularly united to this cytochrome C, the preceding considerations cause one to reach the conclusion that there must exist some differences between cytochrome C of the horse and that obtained from other animals, such as the ox, in which the possibility of obtainig preparations with relations N/Fe of 145 to 150 is fairly constant (6, 10, 11, 12).

Bibliografía

(1) DURRUM, E., PAUL, M. H y SMITH, E. R. B. : *Science*, **116**, 428, 1952.

(2) KEILIN, D., y HARTREE, E. F. : *Proc. Roy. Soc.* (Londres), **B 122**, 298, 1937.

(3) KEILIN, D., y HARTREE, E. F. : *Biochem, J.*, **39**, 289, 1945.

(4) LANDSTEINER, K., LONGSWORTH, L. G., y VAG DER SCHEER. J. : *Science*, **88**, 83, 1938.

(5) MONTY, K. J., MORRISON. M., ALLING, E., y STOTZ, E. : *J. Biol. Chem* **220**, 295, 1956.

(6) PALEUS, S. : *Acta Chem. Scand.*, **6**, 969, 1952.

(7) PAUL, K. G. : The Enzymes, Acad. Press. Vol. II, part 1, pág. 357, año 1951.

(8) SENDROY : *J. Biol. Chem.*, **142**, 171, 1942.

(9) SLUYTERMAN, L. A. AE. : *Biochem. et Biophys., Acta*, **17**, 169, 1955

(10) THEORELL, H., y AKESSON, A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1804, 1941.

(11) TINT, H., y REISS, W. : *J. Biol. Chem.*, **182**, 385, 1950.

(12) TINT, H., y REISS, W. : *J. Biol. Chem.*, **182**, 397, 1950.

(13) WONG : *J. Biol. Chem.*, **77**, 409, 1926.