

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Purificación y aislamiento de dos fosfatasa del hígado de oveja

por
F. Ponz y J. Prous

(Recibido para publicar el 29 de octubre de 1962)

En un trabajo previo (12) indicamos la posible existencia de seis tipos de fosfatasa de hígado de oveja (fosfohidrolasas de monoésteres del ácido ortofosfórico, 3.1.3.1 y 3.1.3.2, según *Report Comm. Enz. I.U.B.*) que se diferenciaban por su pH óptimo de actividad y por su distinto comportamiento frente a diversos efectores. Ulteriormente, hemos logrado aislar dos de estos tipos de fosfatasa, en estado de purificación muy avanzado. Una de pH óptimo 6, purificada cerca de 1000 veces, y otra de pH óptimo 9,8, purificada cerca de 600 veces.

En los pasos preliminares de purificación se sigue la técnica de MORTON (10) hasta lograr separar la actividad fosfatásica de su complejo lipoproteico, mediante un tratamiento con butanol. El paso ulterior más importante se lleva a cabo con resinas de intercambio iónico tipo Dowex 50 y Dowex 3, con lo cual se logran acumular, cómodamente, grandes cantidades de solución enzimática con actividad específica elevada.

Material y métodos

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. — De acuerdo con MORTON (9) y ROCHE-BOUXILLOUX (14) adoptamos como unidad enzimática, frente al β -glicerofosfato sódico, la cantidad de enzima que bajo condiciones óptimas hidroliza 1 μ g de fósforo por minuto. La actividad específica se expresa en μ g de fósforo hidrolizados

por minuto y por mg de nitrógeno proteico. Como condiciones óptimas se consideran: el pH de máxima actividad, la temperatura de 38° y la concentración del sustrato 0,02 M; en el caso de la fosfatasa alcalina la presencia de Mg^{++} 0,01 M. Soluciones amortiguadoras glicocola —NaOH 0,2 M y acético-acetato 0,2 M. La concentración del enzima se ajusta de forma que los preparados crudos den aproximadamente una hidrólisis del sustrato menor del 5 % en 5 minutos. El tiempo de incubación era de 15 minutos.

DETERMINACIONES QUÍMICAS.

Nitrógeno proteico. — Se determina por el procedimiento micro-Kjeldahl (1) y el nefelométrico de KUNITZ (8).

Fosfato inorgánico. — Se determina según FISKE-SUBBAROW (4).

Cromatografía sobre papel. — Con una micropipeta se colocan 7-12 μ l de solución enzimática sobre el papel de cromatografía (Schleicher-Schüll N.º 2040 b) de unos 50 cm de longitud y 20 cm de ancho, a intervalos de 3 cm. Se toman las máximas precauciones para colocar la solución enzimática en la menor área posible (mancha de disolución no superior a 1 cm). El desarrollo del cromatograma se lleva a cabo a la temperatura de 0-5°, con técnica ascendente, con etanol-agua (1:1) como disolvente.

El revelado de los cromatogramas se lleva a cabo sobre placa de agar según técnica de GIRI (5) modificada por nosotros en el sentido de emplear fenilfosfato 0,005 M como sustrato y solución alcohólica de dibromoquinonacloroimida al 1 %, como agente revelador.

Resinas de intercambio iónico. — Empleamos una resina catiónica, equivalente al tipo Dowex 50, de soporte estirénico y grupos activos sulfónicos, y otra aniónica poliamínica de base débil equivalente a Dowex 3.

Método de purificación

Se parte de hígados de oveja recién sacrificadas, de 500 a 850 gr de peso que se trasladan del Matadero al Laboratorio en nieve carbónica.

Después de numerosos experimentos establecemos las siguientes etapas del proceso de purificación, de las que las 3 primeras son comunes a las fases 1, 2 y 3 del método de MORTON (10).

1. *Extracción.*

Los hígados se disgregan (Turmix) en 3 veces su peso de agua a 0-2°. Se dejan transcurrir 24 horas. La suspensión resultante se centrifuga a 1.800xg durante 45 minutos y se separa el sobrenadante, que se hace pasar a través de una capa de algodón perfectamente lavada.

2. *Precipitación a pH 5.*

El sobrenadante anterior se acidifica a pH 5, con ayuda de acetato buffer 2 M (pH = 4,0), a 0°. Se dejan transcurrir 30 minutos y se centrifuga a 1.800xg durante 45 minutos. Se desecha el sobrenadante y se recoge el precipitado, que se dispersa en solución de cloruro sódico 0,15 M. El pH se ajusta al valor de 7,5 con carbonato sódico 0,5 M y se dejan transcurrir 24 horas a 0°. Se vuelve a acidificar a pH 5 como antes y se recoge el precipitado por centrifugación a 1.800xg durante 45 minutos. El sedimento se suspende en agua y se separa de nuevo por centrifugación. El precipitado se suspende en agua.

3. *Tratamiento con n-butanol.*

A la suspensión anterior se le añade 2/5 de su volumen de n-butanol, muy despacio y con agitación vigorosa, durante 15 minutos. La emulsión se calienta a 38° (5 minutos) y, acto seguido, se centrifuga a 1.800xg (20 minutos). La capa acuosa clara es separada por succión y filtrada a través de papel Schleicher-Schüll N.º 2040 b. El filtrado se ajusta a pH 8,5, se dejan transcurrir 24 horas a 0° y se vuelve a filtrar.

4. *Absorción sobre resinas de intercambio iónico.*

La solución anterior se hace pasar a 0° a través de una columna conteniendo resina catiónica, tipo Dowex 50, y acto seguido, a través de otra columna conteniendo resina aniónica tipo Dowex 3.

La solución que sale de la primera columna presenta un pH = 4, y una vez ha pasado por la segunda columna el pH es de 7. La solución final se deja reposar 24 horas a 0°, y si se forma un precipitado débil se separa por centrifugación. La actividad enzimática queda prácticamente invariable una vez ha pasado por la resina catiónica; en cambio, la resina aniónica retiene gran cantidad de proteínas inactivas, lo que produce notable enriquecimiento.

5. Precipitación con sulfato amónico 45-85 %.

La solución enzimática anteriormente obtenida es precipitada con sulfato amónico. La temperatura se mantiene a 0° y se va añadiendo sulfato amónico muy despacio y con enérgica agitación hasta alcanzar una concentración 1,1 M., equivalente aproximadamente a un 45 % de saturación. Después de cada adición de sulfato amónico el pH se debe ajustar al valor de 7 con solución de amoníaco. Se centrifuga, y se descarta el

TABLA I
Fraccionamiento de la solución 4 con sulfato amónico.

% Saturación de sulfato amónico a 0°	% Nitrógeno precipitado	% Actividad fosfatásica precipitada
30	26	12
40	45	20
45	53	30
50	60	40
55	70	55
80	95	95

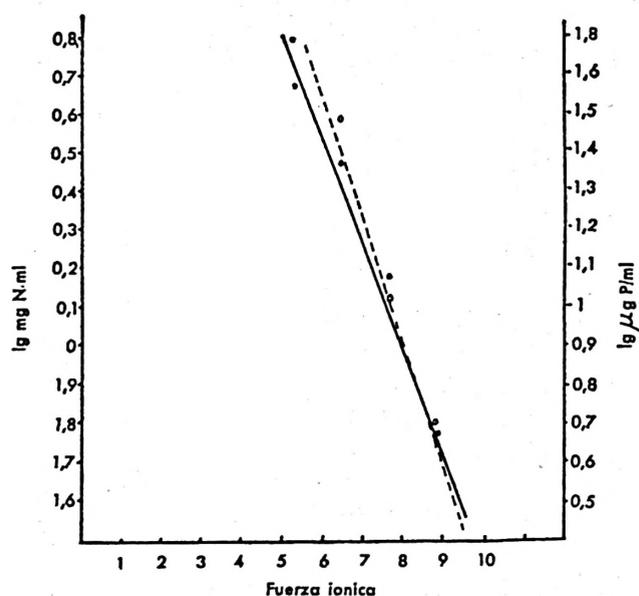


FIG. 1. Diagrama de solubilidad de las proteínas (trazo continuo) y de la actividad fosfatásica pH 9,8 (trazo discontinuo) de la solución 5 frente al sulfato amónico.

precipitado obtenido. La solución se lleva a una concentración 3,1 M de sulfato amónico, equivalente aproximadamente a un 85 % de saturación, se centrifuga y se recoge el precipitado. Este se disuelve en solución de bicarbonato 0,1 N $pH = 8,6$. La solución resultante se dializa durante 12 horas a 0° .

La Tabla I resume los datos de la precipitación fraccionada con sulfato amónico de la solución 4, que aconsejaron adoptar este paso, reteniendo la proteína precipitada entre 45 y 85 % de saturación. La figura 1 muestra el diagrama de solubilidad con sulfato amónico de la solución 5, según FALCONER-TAYLOR (3). Por el paralelismo de las curvas de proteína y de actividad fosfatásica ($pH 6$ y $pH 9,8$) precipitadas no es posible proceder a un ulterior fraccionamiento por este medio.

6. Precipitación con acetona 60 %.

La solución 5, anteriormente obtenida, prácticamente a $pH = 7$, es precipitada con acetona al 60 % (v/v). La operación se lleva a cabo a unos $-12^{\circ} C$ con intensa agitación mecánica. Se deja reposar la suspensión resultante por espacio de 12 horas a $0^{\circ} C$, se centrifuga y se recoge el sedimento. Este se disuelve en agua a $pH 7,5$ y se dializa a 0° durante dos horas para eliminar la acetona residual.

7. Cromatografía sobre papel.

Se parte de la solución anterior y como disolvente de arrastre se emplea alcohol etílico-agua (1 : 1). Se separan dos fracciones con R_f 0,37 y 0,48, que presentan actividad con pH óptimos 6 y 9,8 respectivamente. La figura 2 muestra el revelado de los cromatogramas. Por elución con agua es posible separar las dos fracciones.

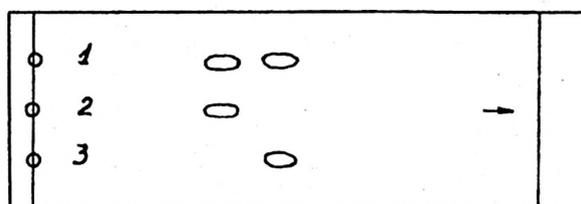


FIG. 2. Cromatogramas obtenidos a partir de la solución 6. Como disolvente de arrastre se emplea alcohol etílico-agua (1 : 1). 1) Revelado con azul de bromofenol, mostrando dos manchas proteicas de R_f 0,37 y 0,48. 2) Revelado de la actividad fosfatásica a $pH 6$ sobre placa de agar. 3) Igual revelado a $pH 9,8$.

La Tabla II resume los pasos de purificación con indicación de las actividades específicas, el enriquecimiento y el rendimiento obtenidos en cada paso.

TABLA II

Purificación de fosfatasas hepáticas de oveja

Fase purificación	Proteína mg N/ml	Actividad específica		Rendimiento		Purificación	
		pH 6	pH 9,8	pH 6	pH 9,8	pH 6	pH 9,8
1	2,2	35	48	100	100	1	1
2	0,72	98	130	31,2	30,4	2,8	2,7
3	0,2	310	400	26,8	25,4	8,8	8,3
4	0,01	4.600	6.333	19,9	20,7	131	132
5	0,9	6.500	9.800	12,6	13,7	185	204
6	1	10.500	14.600	9,4	9,6	300	303
7	0,05	33.000	28.000	8,9	9,4	943	584

1. Dispersión en agua, centrifugación y filtrado.
2. Precipitaciones a pH 5 y dispersión del precipitado en agua.
3. Solución resultante del tratamiento con butanol.
4. Solución resultante del tratamiento con resinas de intercambio iónico.
5. Precipitación con sulfato amónico, disolución y diálisis.
6. Fraccionamiento con acetona, disolución y diálisis.
7. Cromatografía sobre papel y elución.

Discusión

La purificación de fosfatasas hepáticas no específicas ha ofrecido en la práctica especiales dificultades, por lo que el grado de actividad específica alcanzado con preparados hepáticos estaba muy por bajo de los conseguidos a partir de otras fuentes. Basta comparar los preparados de fosfatasa alcalina obtenidos por MORTON (10 y 9) a partir de leche y de mucosa intestinal de ternera, con una actividad específica de 15.315 y 83.500 unidades (μg de P/mg N/min.) respectivamente, con el escaso enriquecimiento que el mismo MORTON consigue con fosfatasa alcalina de hígado de actividad específica 2.800. GOODLAND (6) ha llegado con posterioridad a actividades todavía inferiores a partir de hígado de rata, con actividad específica de 75 unidades.

Parecía claro que la aplicación de la técnica completa de Morton al tejido hepático no resultaba satisfactoria y procedía ensayar algunos nuevos métodos de separación que pudieran ofrecer mayor eficacia.

El excelente resultado alcanzado por MORTON con su técnica de disociar los complejos lipoproteicos, sin desnaturalización, mediante el empleo del n-butanol, aconsejó seguir su método de purificación de fosfatasa hasta después de este tratamiento.

Ocasionalmente, utilizando resinas de intercambio iónico, para separar iones inorgánicos en algunas fases de la purificación, se advirtió que estas resinas retenían proteínas inertes. La utilización de resinas para la cromatografía de enzimas era bien conocida (7). Aunque se ha empleado con más frecuencia resinas catiónicas en procesos de absorción positiva para retener a enzimas u otras proteínas específicas de carácter básico, en nuestro caso al hacer pasar el extracto, después del tratamiento con n-butanol, por la columna de la resina catiónica se obtenía una buena separación de cationes inorgánicos sin progreso en la purificación. Al pasar a continuación la solución resultante por la resina aniónica tipo Dowex 3 se retenía una enorme cantidad de proteína inerte de modo que en este paso se ha alcanzado un enriquecimiento de 14 a 15 veces para la fosfatasa de pH óptimo 6 y cerca de 16 veces para la de pH 9,6 con muy escasa disminución de rendimiento. La correspondiente actividad específica de la fosfatasa alcalina supera notablemente con este solo paso a las actividades alcanzadas previamente a partir de hígado.

Se practicaron algunos ensayos para ver la utilidad del empleo de algunas celulosas substituidas de acuerdo con los principios expuestos por PETERSON-SOBER (11). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios por alterarse en la mayoría de los ensayos la actividad fosfatásica.

La precipitación ulterior con sulfato amónico entre un 45-85 % de saturación proporciona una preparación de proteína algo más activa, aunque el rendimiento disminuye apreciablemente. El fraccionamiento con acetona aumenta aún más la purificación con escasa pérdida de rendimiento.

El ensayo cromatográfico sobre papel del preparado obtenido reveló la posibilidad de diferenciar las dos fracciones de actividad fosfatásica, con pH óptimos 6 y 9,8, que mostraron un R_f suficientemente distinto para poder separarlas en diferentes tiras de papel y eluirlas convenientemente.

La actividad así conseguida, 28.000 unidades para la fosfatasa de pH óptimo 9,8 y 33.000 para la de pH 6, representa una purificación elevada. La fosfatasa activa a pH 6 queda así purificada cerca de 1.000 veces sobre la actividad del homogenado inicial. La fosfatasa activa a pH 9,8 se ha purificado algo menos, cerca de 600 veces, pero lo alcanzado supone un enriquecimiento más de 12 veces superior al máximo conse-

guido hasta la fecha para la fosfatasa alcalina hepática, aún cuando su actividad específica quede por debajo de las alcanzadas a partir de leche (9), mucosa intestinal (10) y riñón (2).

A lo largo del proceso de purificación se van perdiendo las otras actividades fosfatásicas con diferentes óptimos de pH (3,5, 4,8, 8,5 y 9,2) que podían revelarse en el homogenado y en los preparados de polvo de acetona (12). Las actividades a pH 3,5, 8,5 y 9,2 se pierden por el paso a través de la resina aniónica. La solución residual después del tratamiento con resinas de intercambio iónico conserva la actividad de pH 4,8, pero después del fraccionamiento con sulfato amónico esta actividad no se recupera ni en el precipitado ni en el sobrenadante.

Las propiedades de las fracciones purificadas con actividad a pH 9,8 y 6 se describen en otro trabajo (13).

Resumen

Se describe un método de purificación de fosfatasas hepáticas de oveja que inicialmente sigue la técnica de Morton hasta después del tratamiento con n-butanol, para continuar con paso por resinas de intercambio iónico, precipitación con sulfato amónico, fraccionamiento con acetona y cromatografía sobre papel. El tratamiento con las resinas de intercambio iónico proporciona el mayor avance en la purificación.

Por el método propuesto se ha obtenido un preparado de fosfatasa alcalina con pH óptimo 9,8 de una actividad específica de 28.000 unidades ($\mu\text{g P/mg N/min.}$), lo que supone una purificación de cerca de 600 veces sobre el homogenado inicial. Se ha obtenido asimismo otro preparado de fosfatasa con pH óptimo 6, que posee una actividad específica de 33.000 unidades, lo que representa una purificación de cerca de 1.000 veces la actividad original.

Summary

Purification and isolation of two phosphatases from sheep liver

The levels of purification of phosphatases (orthophosphoric monoester phosphhydrolases, 3.1.3.1, 3.1.3.2) from the liver were much below those obtained from other sources. A method is described which includes as a fundamental step the treatment with ion-exchange adsorbents (like to Dowex 50 and Dowex 3), a great quantity of inert protein being retained in the anionic resin. The resulting solution is precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ between 45-85 % saturation, redissolved and then precipitated with acetone (60 %). Dissolved in water it is chromatographed on paper (ethanol-water, 1 : 1), where two fractions are distinguished (R_f 0.48 and 0.37) with optimal pH 9.8 and 6 respectively, which can be recovered by elution.

Preparations of alkaline phosphatase are by this way obtained with optimal pH 9.8, specific activity 28.000 units ($\mu\text{g P/mg N/min}$) and of acid phosphatase with optimal pH 6, specific activity 33.000 units. The purification is with respect to the initial homogenate of some 600 and 1.000 times respectively.

Bibliografía

- (1) *Ass. J. Off. Agr. Chem.*, **32**, 561. 1949.
- (2) BINKLEY, J. : *Biol J. Chem.*, **236**, 735. 1961.
- (3) FALCONER, J. S. and TAYLOR, B. D. : *Biochem. J.*, **40**, 831. 1946.
- (4) FISKE SUBBAROW : *Biol. J. Chem.*, **66**, 375. 1925.
- (5) GIRI, K. V. : *Biochem. J.*, **51**, 123. 1952.
- (6) GOODLAND, G. A. J. and MILLS G. J. : *Biochem J.*, **66**, 346. 1957.
- (7) HIRS, C. H. W. : Tomo I, pág. 133, *Methods in Enzymology.*
- (8) KUNITZ, M. : *J. gen. Physiol.*, **35**, 423. 1952.
- (9) MORTON, R. K. : *Biochem. J.*, **55**, 795. 1953.
- (10) MORTON, R. K. : *Biochem. J.*, **57**, 595. 1954.
- (11) PETERSON, E. A., SOBER, H. A. : *Amer J. Chem. Soc.*, **78**, 751. 1956.
- (12) PROUS, J. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, **16** Supl. II, 143. 1960.
- (13) PROUS, J. y PONZ, F. : *R. esp. Fisiol.*, pendiente de publicación.
- (14) ROCHER, J. et BOUXILLOUX : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 567. 1953.