

PRUEBA CUANTITATIVA PARA PROTEASAS USANDO PELÍCULAS FOTOGRÁFICAS

Quantitative Protease Assay Using Photographic Films

ANDREA PAREJA¹, OLGA INÉS MONTOYA¹, M.Sc.;

PABLO A. GUTIÉRREZ^{1*}, Ph. D.

¹Grupo de Biotecnología Microbiana. Escuela de Biociencias,
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede
Medellín, Colombia. Calle 59A N.º 63-20. Bloque 19A-211 A.A. 3840,
Medellín, Colombia. paguties@unalmed.edu.co

Presentado 10 de septiembre de 2008, aceptado 16 de febrero del 2009, correcciones 26 de agosto del 2009.

RESUMEN

Se han desarrollado dos métodos para la medición cuantitativa de la actividad proteasa basados en la prueba de la película fotográfica. Una prueba discontinua puede ser implementada mediante la cuantificación de la cantidad de pigmento remanente en la película con cualquier programa de edición de imágenes. La medición continua de la actividad proteasa se puede obtener a través del cambio de absorbancia generado por la liberación de las sales de plata unidas al negativo fotográfico si se cuenta con un espectrofotómetro equipado con una celda con agitación.

Palabras clave: proteasa, enzima, pruebas de actividad.

ABSTRACT

Two quantitative protease assays have been developed based on the classic photographic film test. A discontinuous assay can be performed by measuring the amount of pigment remaining in the film with any image editor software. A continuous assay can be implemented by the measuring the release of silver halide salts bonded in the film using a recording spectrophotometer equipped with a Peltier Cell.

Key words: Protease, Enzyme, Activity assay.

INTRODUCCIÓN

Durante la caracterización de enzimas es importante determinar su actividad a diferentes valores de pH, temperatura y fuerza iónica. Para esto existen diversas pruebas que pueden ser seleccionadas dependiendo del costo, grado de sensibilidad y la disponibilidad de equipos y reactivos apropiados. En el caso de las proteasas, algunas de las pruebas tradicionales se basan en la hidrólisis de derivados cromogénicos de proteínas como azocaseína y azoalbúmina o la unión de colorantes como el azul de Coomassie

(Goddard y Reymond, 2004; Eienthal y Danson, 2002; Zhao *et ál.*, 2004). Más recientemente, se han desarrollado metodologías que se fundamentan en la implementación de una gran variedad de nuevos marcajes y sistemas de señalización como nanopartículas de oro, FRET, proteínas fluorescentes, detección por electroforesis capilar y esferas magnéticas, entre otros (Guarise *et ál.*, 2006, Kainmüller *et ál.*, 2005; Marmé *et ál.*, 2004; Kohl *et ál.*, 2002; Abriola *et ál.*, 1999; Craig *et ál.*, 1998; Wu y Abeles, 1995). Sin embargo, la mayoría de estas técnicas son laboriosas o requieren de una instrumentación costosa y solamente disponible en laboratorios bien equipados.

Durante décadas, las películas fotográficas han sido utilizadas como sustrato para la detección cualitativa de la actividad proteolítica de extractos enzimáticos (Morris y Seastone, 1955; Schmitt y Deasy, 1963; Schmitt y Deasy, 1964; Fratello, 1968). Una película fotográfica consiste de una lámina plástica recubierta con una emulsión de sales de plata fijada a través de una capa de gelatina. Para el ensayo de actividad proteolítica se adicionan unas gotas de la solución que se desea probar sobre una película fotográfica expuesta y se incuba durante algún tiempo a la temperatura deseada. La digestión de la gelatina genera la liberación de los pigmentos fotosensibles dejando la película transparente. Este método es extremadamente barato y fácil de realizar pero desafortunadamente solo ha sido utilizado como una prueba cualitativa. En esta nota, mostramos que la prueba de la película fotográfica puede ser adaptada como prueba cuantitativa para determinar la actividad de proteasas si se dispone de un escaner y un programa de análisis gráfico e incluso como prueba continua en caso de disponer de un espectrofotómetro acondicionado con una celda de agitación.

MÉTODOS

Para la prueba de actividad proteolítica se utilizó una película fotográfica sin exponer y se obtuvieron discos de 7 mm con una perforadora. Para el ensayo se tomó un disco fotográfico y se adicionó a 1 mL de un extracto bacteriano de la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la actividad enzimática fue detenida mediante adición de 100 μ L de HCl 1 M. Los discos fueron escaneados como imágenes en tonos de gris de 8-bits con una resolución de 300 ppi. Los histogramas de distribución de intensidades fueron obtenidos con el programa *Corel Photo-Paint*®12. Para la prueba continua se utilizó un espectrofotómetro *Genesys 6* (*Thermo Scientific*) equipado con una celda Peltier SPG 1A. La reacción fue llevada a cabo en tampón fosfato (100 mM, pH 7,0) en un volumen de reacción de 1,5 mL. A la solución previamente equilibrada a la temperatura de la reacción (37° C) se le adicionó proteínaasa K (0,1; 0,5 y 1,0 unidades). El progreso de la reacción fue monitoreado a 400 nm cada 2 segundos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la búsqueda de bacterias productoras de proteasas, se ha utilizado rutinariamente la decoloración de películas fotográficas como prueba cualitativa. Sin embargo, al llevar a cabo la reacción proteolítica y detenerla mediante la adición de HCl 1 M la transparencia de la película varía de forma continua dependiendo del tiempo de incubación

(Fig. 1). Esto implica que junto con un método que permita la medición de la transparencia de los discos es posible llevar a cabo una prueba cuantitativa para la actividad proteolítica. Para probar la viabilidad del método, se escanearon los discos a alta resolución en tonos de gris de 8 bits y se midió la intensidad de los píxeles con un programa de edición gráfica como *Corel Photo-Paint*®12 o *Adobe Photoshop*®. La intensidad del color en este tipo de imágenes se mide en una escala de 0 a 255 correspondientes a negro y blanco respectivamente donde los valores intermedios representan diferentes intensidades de gris (Boyle y Thomas, 1988; Marion, 1991). En la figura 1 se aprecia que para el extracto analizado la transparencia de la película empieza a cambiar de manera significativa después de 20 minutos de iniciada la reacción. De esta manera, una vez estimado el tiempo de decoloración de la película se puede seleccionar un tiempo adecuado para comparar variaciones en la actividad proteasa en diferentes condiciones. En nuestro caso, hemos utilizado esta estrategia para determinar el pH y temperatura óptimo de extractos con actividad proteasa obtenidos a partir de bacterias nativas. En caso de requerir una comparación en términos de unidades de actividad tan solo es necesario realizar el mismo ensayo con una proteasa de concentración conocida y estimar el tiempo requerido para obtener una decoloración similar.

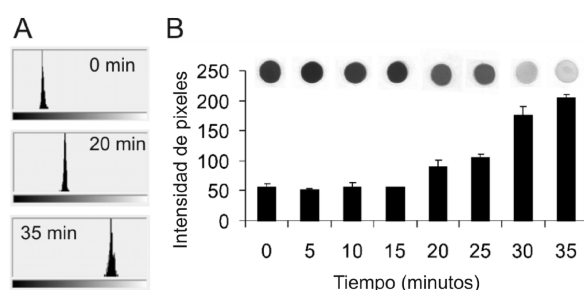


Figura 1. A. Histograma de la intensidad de píxeles obtenido con el programa *Corel Photo-Paint*®12. B. Variación de la intensidad de píxeles a diferentes tiempos para cada uno de los discos fotográficos (arriba).

Como el sobrenadante en el tubo de reacción toma diferentes tonalidades a medida que la reacción progresa, esta prueba puede ser utilizada como un ensayo continuo de actividad enzimática. Para la realización del experimento se adicionó un disco fotográfico al fondo de la cubeta de espectrofotometría y justo encima se posicionó un pequeño agitador magnético para homogenizar el pigmento liberado y garantizar que el disco permaneciera en el fondo sin alterar las mediciones espectrofotométricas, tal como se ilustra en el inserto de la figura 2A. La cinética de la reacción se da en dos etapas; en la primera fase de la reacción la gelatina fijada es el único sustrato disponible para la proteasa, sin embargo, a medida que progresa la reacción la gelatina hidrolizada actúa como competidor en la liberación del pigmento lo que se observa como una disminución en la tasa de reacción. Una vez se ha liberado todo el pigmento se alcanza una fase estacionaria que indica la completa decoloración de la película. En la figura 2A se aprecia que la cinética de la liberación de las sales de plata depende de la concentración de proteasa adicionada. Al analizar la primera derivada de las curvas cinéticas se aprecia que

la máxima velocidad de reacción es proporcional a la cantidad enzima con valores de 0,0016, 0,002 y 0,0025 unidades de absorbancia por minuto para 0,1, 0,5 y 0,5 unidades de proteinasa K, respectivamente (Fig. 2B). Otra variable que puede medirse para estimar la actividad enzimática es el tiempo requerido para alcanzar la fase estacionaria, el cual equivale al tiempo necesario para alcanzar una pendiente de cero. Este tiempo es inversamente proporcional a las unidades de enzima utilizadas tomando 453, 595 y 769 segundos para 1,0, 0,5 y 0,1 unidades de proteinasa K. Sin embargo, para utilizar este parámetro es necesario ser muy precisos en la medición del tiempo cero de la reacción y por lo tanto, está más sujeto a errores experimentales. Todo lo anterior sugiere que las pruebas de actividad proteasa basadas en la decoloración de negativos fotográficos pueden ser utilizadas como una prueba cuantitativa y continua de muy bajo costo, lo cual tiene aplicaciones inmediatas en la estimación de la actividad de inhibidores de proteasas o la caracterización de dichas enzimas.

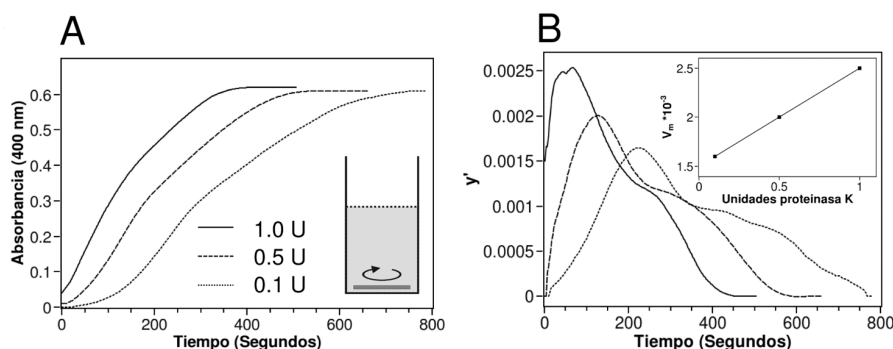


Figura 2. A. Prueba continua para la actividad proteasa utilizando diferentes concentraciones de proteinasa K. El montaje en la cubeta espectrofotométrica se ilustra en el inserto. B. Análisis de la primera derivada para los datos mostrados en A. La gráfica de la velocidad máxima sugiere una tendencia lineal para las concentraciones de enzima utilizadas (inserto).

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó con financiación de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (DIME, proyecto 20101006544).

BIBLIOGRAFÍA

ABRIOLA L, CHIN M, FUERST P, SCHWEITZER R, SILLS MA. Digital Imaging as a Detection Method for a Fluorescent Protease Assay in 96-Well and Miniaturized Assay Plate Formats. *J Biomol Screen*. 1999;4(3):121-127.

BOYLE R, THOMAS R. *Computer Vision: A First Course*. Blackwell Scientific Publications; 1988.

CRAIG DB, WONG JC, POLAKOWSKI R, DOVICH NJ. General protease assay method coupling solid-phase substrate extraction and capillary electrophoresis. *Anal Chem*. 1998;70(18):3824-3827.

EISENTHAL R, DANSON M. *Enzyme Assays: a Practical Approach*, Oxford University Press; 2002.

FRATELLO B. Enhanced interpretation of tissue protease activity by use of photographic color film as a substrate. *Stain Technol.* 1968;43(3):125-128.

GODDARD JP, REYMOND JL. Recent advances in enzyme assays. *Trends Biotechnol.* 2004;22:363-370.

GUARISE C, PASQUATO L, DE FILIPPIS V, SCRIMIN P. Gold nanoparticles-based protease assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(11):3978-3982.

KAINMÜLLER EK, OLLÉ EP, BANNWARTH W. Synthesis of a new pair of fluorescence resonance energy transfer donor and acceptor dyes and its use in a protease assay. *Chem Commun (Camb).* 2005;(43):5459-5461.

KOHL T, HEINZE KG, KUHLEMANN R, KOLTERMANN A, SCHWILLE P. A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12161-12166.

MARION A. *An Introduction to Image Processing*. Chapman and Hall; 1991.

MORRIS M, SEASTONE CV. The relationship of M protein and resistance to phagocytosis in the beta hemolytic streptococci. *J Bacteriol.* 1955;69(2):195-203.

MARMÉ N, KNEMEYER JP, WOLFRUM J, SAUER M. Highly sensitive protease assay using fluorescence quenching of peptide probes based on photoinduced electron transfer. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(29):3798-37801.

SCHMITT RR, DEASY C. A Test Method to Detect Delayed Cure in Hides. *J. Amer. Leather Chem. Assoc.* 1963;58:577-587.

SCHMITT RR, DEASY C. Additional Notes on a Test Method to Detect Delayed Cure in Hides. *J. Amer. Leather Chem. Assoc.* 1964;54:361-365.

WU Y, ABELES RH. Protease assay based on magnetic beads. *Anal Biochem.* 1995;229(1):143-144.

ZHAO Z, RAFTERY MJ, NIU XM, DAJA MM, RUSSELL PJ. Application of in-gel protease assay in a biological sample: characterization and identification of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in secreted proteins from a prostate cancer cell line PC-3. *Electrophoresis.* 2004;25(7-8):1142-1148.