

Bioteconología



Gemma Limones, Nieves Carcelén, Dolores Fernández-Esplá y Antonio Madejón
Biotools I+D Department

Las enzimas son proteínas que actúan como potentes catalizadores y cuya característica principal es su especificidad. Como proteínas las enzimas poseen una conformación natural, que es esencial para mantener su actividad. La mayoría de enzimas comerciales son inestables en soluciones acuosas a temperatura ambiente, por ello son almacenadas a -20°C o -70°C en presencia de estabilizantes. Sin embargo, cambios bruscos de temperatura pueden dar lugar a pérdidas importantes de actividad. Económicamente, **para la industria farmacéutica y biotecnológica es de gran importancia disponer de un sistema estabilizante** que posibilite la conservación y transporte de enzimas o macromoléculas biológicas a temperatura ambiente.

La **gelificación de mezclas de reacción** o reactivos: una revolucionaria tecnología con amplia proyección en farmacogenómica y biología molecular

La creación de un sistema estabilizante que permita incluir en un solo contenedor (vial o tubo) todos los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción enzimática, es de gran conveniencia para compañías de diagnóstico clínico y agroalimentario. El formato "one tube one reaction" disminuye la manipulación de reactivos así como los errores en el pipeteo, además evita contaminaciones cruzadas entre las muestras. Este formato sin embargo es normalmente desaconsejable, debido a reacciones químicas/bioquímicas indeseables que ocurren entre los componentes de la reacción, o a la generación de artefactos que interfieren en la interpretación de los resultados experimentales.

Para estabilizar cualquier mezcla de reacción enzimática es esencial mantener la conformación de la enzima, preservando las interacciones de la misma con las moléculas de agua y solutos que la rodean. Si la enzima se despliega o desnaturaliza, el ordenamiento tridimensional de su sitio activo es modificado y como consecuencia su actividad se verá afectada. Los métodos empleados para preservar la actividad de una enzima pueden clasificarse en cuatro grupos: I) adicción de excipientes; II) uso de solventes orgánicos; III) empleo de técnicas de ingeniería proteica; IV) inmovilización de la enzima.

Por excipientes se entiende sustancias inertes que dan a los solventes de la enzima las características deseables para que la actividad enzimática no se vea afectada negativamente. La adicción de excipientes es un

método sencillo y ampliamente utilizado, aunque no suele ser suficiente para otorgar estabilidad a una mezcla de reacción. En cuanto a las técnicas de ingeniería proteica e inmovilización son prometedoras pero encarecen en exceso el producto final.

Patentada y desarrollada por BIOTOOLS B & M Labs, la tecnología de la gelificación es una interesante alternativa que combina la inclusión de un excipiente estabilizante, con un tratamiento físico que inmoviliza la enzima y los reactivos incluidos en la mezcla. Consiste en la adicción de una mezcla de gelificación y la retirada parcial del agua presente a temperaturas próximas a las ambientales.

La gelificación impide las interacciones entre los reactivos hasta la activación de la reacción por parte del usuario. Lo más notable de esta innovadora tecnología es que la eficiencia enzimática de la mezcla de reacción gelificada es salvaguardada, de tal forma que no se ve alterada por el proceso tecnológico. No se trata de una desecación a alta temperatura, ni de una liofilización, y no está basada en matrices amorfas tales como agarosa.

La gelificación es un revolucionario proceso físico-químico que puede ser aplicado no sólo a enzimas, sino a una amplia variedad de macromoléculas biológicas de uso general tanto en Biología Molecular como Farmacogenómica, sin modificar la eficiencia de la reacción en la cual se vea involucrada. Más aun, en comparación con otros métodos de estabilización de mezclas de reacción como la liofilización, la desecación total o matrices

de agarosa representa un gran avance pues la gelificación es sencilla, eficiente y de muy bajo coste.

Ventajas de la implementación de la tecnología de gelificación

El formato gel de un reactivo o mezcla de reacción ofrece importantes ventajas respecto al formato líquido:

- Los productos gelificados pueden almacenarse a 4°C (24 meses), -20°C (24 meses) o temperatura ambiente (2-3 semanas), facilitándose así el transporte y almacenamiento de estos productos.
- La estabilidad de los componentes de la reacción se ve reforzada por la presencia de agentes estabilizantes en la mezcla de gelificación.
- Al encontrarse todos los componentes de una reacción en el mismo vial se simplifica su uso y disminuyen las manipulaciones, los errores y los riesgos de contaminación, permitiendo su uso en ensayos de campo y en químicas de one tube one reaction.
- Reduce el consumo de fungibles de laboratorio y permite una mayor automatización.
- Si se utilizan altas temperaturas para reconstituir el gel se consigue un efecto Hot Start.

¿Qué es una mezcla de gelificación?

En la mezcla de gelificación existen tres tipos de componentes con diferente fun-

ción: (i) protectores del proceso de desecación cuya función es reducir la actividad de agua de la mezcla y estabilizarla (ii) reductores de radicales libres que inhiben las reacciones de condensación entre grupos carbonilo o carboxilo y grupos amino o fosfato y (iii) polímeros inertes que forman celdillas donde se inmovilizan los reactivos, evitándose así que se produzcan reacciones químicas entre compuestos por proximidad de grupos reactivos.

En función del tipo de reacción/reactivo a gelificar se utiliza una u otra mezcla de gelificación. Biotools ha estudiado alrededor de 30 mezclas de gelificación, diez de ellas han dado los mejores resultados y poseen un amplio rango de uso.

La gelificación, una tecnología sencilla y eficiente

La complicación asociada a cualquier nueva tecnología es un factor determinante a la hora de su implementación. A continuación se expone brevemente el número de pasos a seguir en un proceso estándar de gelificación:

Paso 1- Preparación de las Soluciones Stock de la Mezcla de Gelificación - Deben prepararse en condiciones de esterilidad. Poseen una vida media de un mes almacenadas en refrigeración y protegidas de la luz.

Paso 2- Formulación de la Mezcla de Gelificación - A partir de las soluciones stock se prepara la mezcla de gelificación.

Paso 3- Preparación de Master Mix de Gelificación - Incluir los reactivos o mezclas de reacción que se desean gelificar en la mezcla de gelificación. De esta forma se crea una master mix de gelificación.

Paso 4- Distribución de la Master Mix de Gelificación en los viales o pocillos de una placa.

Paso 5- Proceso de Desecación - El tiempo empleado en gelificar una muestra está en función del volumen final a desecar. La muestra al final del proceso de desecación posee aproximadamente un 10% de humedad.

Manejo de las muestras una vez gelificadas

Una vez gelificada la mezcla reacción/reactivo para su reconstitución, el volumen del gel formado debe considerarse despreciable. Únicamente es necesario añadir el buffer de reacción y el sustrato a las concentraciones adecuadas.

La solubilización del gel puede realizarse mediante resuspensión mecánica si las enzimas o el sustrato son termolábiles o

mediante rehidratación por calor a bajas temperaturas o altas temperaturas. Para ello la enzima y el sustrato deben ser termoresistentes, existiendo un efecto Hot start.

Estabilidad de las mezclas de reacción /reactivos gelificados

La estabilidad de las muestras gelificadas es de dos años tanto a 4°C como a -20°C y -80°C. La estabilidad del gel no se modifica al cambiar de un tipo de almacenamiento a otro, por lo cual no existen puntos críticos asociados a fallos en la cadena del frío.

A temperatura ambiente las muestras gelificadas poseen una estabilidad de 2 semanas, propiedad de gran conveniencia a la hora de transporte de mercancías y ensayos de campo.

La tecnología de gelificación en la industria

La eficiencia y sencillez de la tecnología de la gelificación patentada por Biotools despertó gran interés entre compañías de diagnóstico clínico y agroalimentario así como en

biología molecular.

La gelificación ha sido empleada con éxito en: amplificación de ácidos nucleicos (PCR y PCR en tiempo real), ensayos de restricción (se han testado 20 enzimas de restricción diferentes), reacciones de hibridación y ligación, reacciones de secuenciación, estabilización de chips de proteínas, gelificación de bacterias, anticuerpos, etc.

Biotools comercializa todas sus enzimas y kits de diagnóstico en dos tipos de formato líquido y en gel. En el año 2006 Biotools participó con la tecnología de gelificación en el proyecto MYCOPLEX "Development of innovative immuno-PCR assay for the detection and quantification of ochratoxin and aflatoxin in complex matrices" dentro del 6º Programa Marco de la UE. Actualmente Biotools forma parte del consorcio europeo CARE-MAN "HealthCARE by biosensor measurements and networking" del 6º Programa Marco de la UE. A nivel nacional Biotools colabora en el Proyecto Nacional PROFIT "Desarrollo de un SmartBiocard para la detección de Legionella spp".

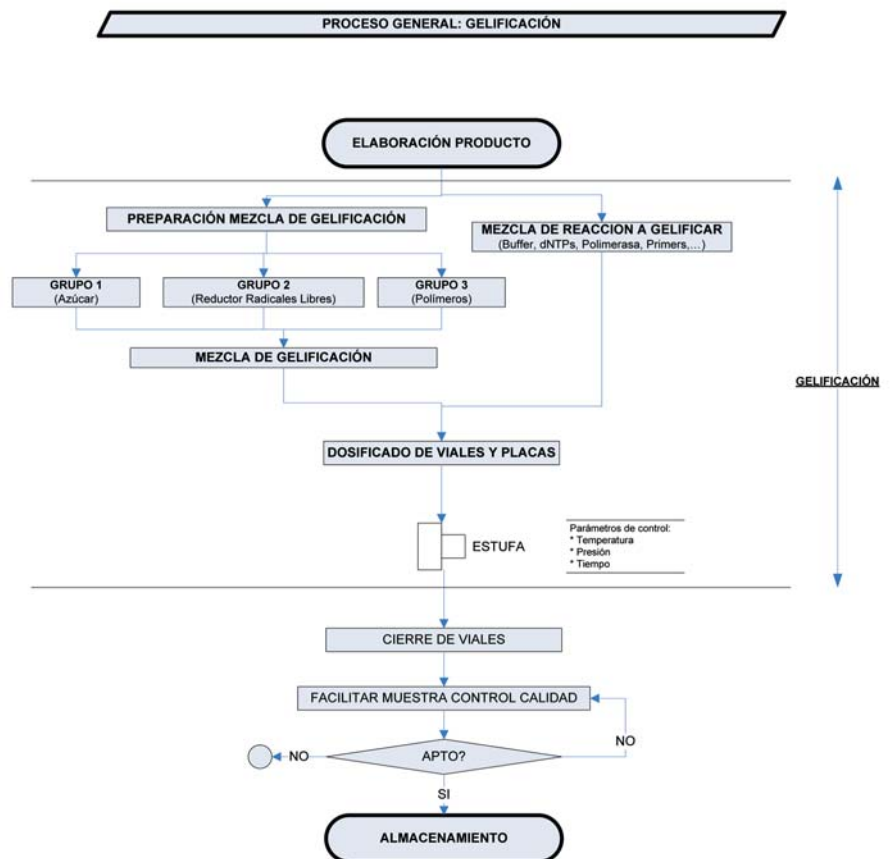


Diagrama de la Tecnología de Gelificación desarrollada por BIOTOOLS B & M Labs.