



FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNA DE SUERO DE SANGRE HUMANA MEDIANTE SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS PARA ANÁLISIS PROTEÓMICO

Jorge Benavides, Marcos Garza Madrid, Sergio Serna-Saldívar y Marco Rito-Palomares. Centro de Biotecnología, Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Tecnológico de Monterrey. Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, CP 64849, México. Teléfono y fax: (81) 83 58 2000 ext 4820. toronto888@hotmail.com

Palabras clave: sistemas de dos fases acuosas, proteómica, suero

Introducción. Actualmente es posible llevar a cabo el diagnóstico temprano de enfermedades mediante estudios de proteínas presentes en sangre susceptibles a ser analizadas mediante proteómica. En este contexto se ha empleado cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para el diagnóstico temprano de enfermedades cuya pronta atención incrementa las posibilidades de éxito de tratamiento (1). Sin embargo la presencia de proteínas como albúmina de suero humano (HSA) e inmunoglobulina gamma (IgG) representa un obstáculo para la detección y análisis de proteínas que se encuentran en menor cantidad en suero (2). Los sistemas de dos fases acuosas (SDFA) son una técnica de recuperación y purificación primaria que ha demostrado ser eficiente para el fraccionamiento de proteínas de muy diversas fuentes (3).

El objetivo de este trabajo fue demostrar el potencial de SDFA como un método para fraccionar proteínas de suero de sangre humana con el fin de ser utilizada como etapa de fraccionamiento previa al diagnóstico temprano de enfermedades mediante estudios de proteínas en sangre.

Metodología. Los experimentos con SDFA para evaluar el comportamiento de partición de las proteínas del suero de sangre humana se prepararon por conveniencia utilizando una base másica fija. Como muestra se utilizó HSA, IgG o bien suero de sangre humana.

Todos los sistemas estudiados fueron construidos a pH 7 y la relación de volúmenes de 1. Las fases del sistema (incluyendo la interfase) fueron recuperadas para realizar análisis de concentración de proteína total mediante el método de Bradford. El fraccionamiento de las proteínas de suero se verificó mediante geles de poliacrídama - SDS (SDS-PAGE, 12%, 120V).

Resultados y discusión. El peso molecular del PEG y la longitud de línea de corte (LLC; la cual es función de la concentración de polímero y sal en el sistema) mostraron tener una influencia significativa sobre el comportamiento de partición de HSA, IgG y otras proteínas de suero de sangre humana. El Cuadro 1 muestra el comportamiento de partición de HSA e IgG en función de su porcentaje de recuperación en cada una de las fases del sistema.

El uso de sistemas construidos con PEG de bajo peso molecular (400 g/gmol) generó la migración de ambas proteínas hacia una misma fase (superior). Al utilizar SDFA con PEG 1000, 3350 y 8000 g/gmol se pudieron encontrar las condiciones en las cuales ambas proteínas se particionan a fases diferentes del sistema.

Cuadro 1. Partición de HSA e IgG en sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol – fosfato de potasio.

Sistema	PEG (g/gmol)	LLC (% p/p)	Recuperación HSA (%)		Recuperación IgG (%)	
			Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior
I	400	25	102 ± 1	ND	72 ± 1	ND
II		45	105 ± 7	ND	76 ± 1	ND
III	1000	25	14 ± 0	54 ± 1	20 ± 1	2 ± 0
IV		45	55 ± 1	1 ± 0	ND	ND
V	3350	25	ND	87 ± 0	ND	50 ± 0
VI		45	1 ± 0	86 ± 3	ND	ND
VII	8000	25	ND	128 ± 3	ND	18 ± 1
VIII		45	1 ± 0	48 ± 6	1 ± 0	ND

En los estudios realizados con suero de sangre se encontró que la mayoría de las proteínas susceptibles a análisis proteómico (como podrían ser factores de coagulación, hormonas peptídicas y globulinas de transporte) se particionan hacia la interfase en sistemas con PEG 1000, 3350 y 8000 g/gmol, mientras que al utilizar PEG 400 g/gmol la mayoría migra hacia la fase superior (datos no mostrados). Esto permite generar una estrategia de fraccionamiento en la cual las proteínas contaminantes (HSA e IgG) se pueden concentrar en fases opuestas a las otras proteínas presentes en el plasma. En particular el sistema V (PEG 3350, LLC 25% p/p) permite concentrar HSA e IgG preferentemente en la fase inferior. Consecuentemente, las proteínas acumuladas en la interfase estarán libre de HSA y con aproximadamente el 50% de IgG.

Conclusiones. Los resultados obtenidos permiten demostrar el potencial de los SDFA para llevar a cabo el fraccionamiento de proteínas de suero de sangre humana, al lograr remover gran proporción de HSA (la principal proteína presente en suero) e IgG de otras proteínas presentes.

Agradecimientos. A la Cátedra de Investigación CAT005 del ITESM por el apoyo económico otorgado.

Bibliografía.

1. Aebersold, R, Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198-207.
2. Qian, WJ, Jacobs, JM, Liu, T, Camp II, DG, Smith, RD. (2006) Advances and Challenges in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Proteomics Profiling for Clinical Applications. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:1727-1744.
3. Rito-Palomares, M. (2004) Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B* 807: 3-11.