

**CARACTERIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS DE SOYA MEDIANTE ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES Y PARTICIÓN EN FASES ACUOSAS****TRIDIMENSIONAL SOY PROTEIN CHARACTERIZATION USING TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS AND PARTITION IN AQUEOUS PHASES**O. Aguilar¹, M. Rito-Palomares^{1*} y C. E. Glatz²¹ Departamento de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Centro de Biotecnología, Tecnológico de Monterrey. Campus Monterrey, Ave. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, NL 64849, México.² Department of Chemical and Biological Engineering, 2114 Sweeney Hall, Iowa State University, Ames, Iowa 50011-2230, U.S.A.

Recibido 14 de Noviembre 2008; Aceptado 12 de Diciembre 2008

Resumen

El conocimiento general de las propiedades moleculares de las potenciales proteínas contaminantes favorece la selección y el diseño de estrategias adecuadas para la recuperación de proteínas recombinantes. Una nueva estrategia experimental resultado de la combinación de electroforesis de dos dimensiones (2DE) cuantitativa con sistemas de dos fases acuosas (SDFA) hidrofóbicos fue empleada para la caracterización tridimensional de proteínas de soya. Los gráficos tridimensionales formados por peso molecular (M_R), punto isoeléctrico (pI) e hidrofobicidad superficial ($\log K_p$) fueron obtenidos usando dos diferentes composiciones de SDFA (poli-etilenoglicol (PEG) 3350 (15.7%)-sulfato de sodio (8.9%)-NaCl (3%) y PEG 3350 (14.8%)-fósfato de potasio (10.3%)-NaCl (3%)). Los dos sistemas evaluados resultaron en diferentes valores de hidrofobicidad para el mismo extracto proteíco, sugiriendo una alta influencia de la sal empleada para formar los SDFA en el comportamiento de partición de las proteínas. La presencia de proteínas dominantes derivadas de las dos principales proteínas de almacenamiento, limitó el número de proteínas detectadas en los geles, y por tanto el número de puntos caracterizados en 3D. La identificación de las principales proteínas contaminantes y su proporción relativa en las gráficas tridimensionales, representa una etapa inicial para la selección de mejores estrategias de purificación o incluso la selección de un hospedero más adecuado en el desarrollo de procesos biotecnológicos.

Palabras clave: electroforesis 2D, sistemas de dos fases acuosas, soya, proteína.

Abstract

General knowledge of the molecular properties of the potential contaminant proteins benefits the selection and design of suitable strategies for the recovery of recombinant proteins. A novel experimental approach that resulted from the combination of quantitative 2D electrophoresis (2-DE) with hydrophobic partitioning in aqueous two-phase systems (ATPS) was applied for the three-dimensional characterization of soybean proteins. The three dimensional scatter plots of molecular weight (M_R), isoelectric point (pI) and surface hydrophobicity ($\log K_p$) were obtained using two different ATPS compositions, PEG 3350 (15.7%)-sodium sulfate (8.9%)-NaCl (3%) and PEG 3350 (14.8%)-potassium phosphates (10.3%)-NaCl (3%). Molecular properties of soybean proteins were obtained (M_R , pI and $\log K_p$) simultaneously using two different ATPS resulting in two different protein profiles, suggesting a high influence of the phase-forming salt on the partitioning behavior of soybean proteins. The presence of dominant proteins derived from two main storage proteins limited the number of spots detected in gels and consequently the number of 3D spots characterized. The identification of the major contaminants proteins and their relative concentration depicted in the tridimensional graph represents the first stage in the selection of better strategies for the purification of products or the selection of a potential host in the development of bioprocesses.

Keywords: 2D-electrophoresis; aqueous two-phase systems; soybean; protein characterization.

* Autor para la correspondencia. E-mail: mrito@itesm.mx

1. Introducción

A pesar de las numerosas ventajas económicas y técnicas del uso de plantas como bio-reactores, es relevante establecer un sistema de purificación eficiente que considere el sistema de expresión (Lerrick y col., 2001). Aunque los rendimientos de expresión son importantes, el desarrollo de procesos de extracción y purificación eficientes, es de interés primario (Twyman y col., 2003; Evangelista y col., 1998). Recientemente se han empleado diversas técnicas alternativas para la extracción y purificación de proteínas recombinantes (ej. sistemas de dos fases acuosas (SDFA), adsorción en cama expandida, etc.) independientemente del sistema de expresión (Benavides y col., 2006; Menkhaus y Glatz, 2005).

Los SDFA se han empleado como una técnica práctica que permite la recuperación y purificación de productos biológicos. Se forman cuando dos polímeros en solución acuosa o un polímero y una sal se mezclan en una proporción por arriba de la cual se forman dos fases inmiscibles (Albertsson, 1958). La partición en fases acuosas ha sido empleada para la recuperación primaria y purificación de proteínas de plantas (Benavides y Rito-Palomares, 2008; Rito-Palomares, 2004; Gu y Glatz, 2007a) y para medir la hidrofobicidad de las proteínas (Hachem y col., 1996).

El establecimiento de estrategias adecuadas de purificación de proteínas requiere la caracterización de proteínas contaminantes de extractos de plantas. Es claro que un adecuado entendimiento de las características de las potenciales moléculas contaminantes (peso molecular, hidrofobicidad, pI, etc) puede beneficiar la selección, optimización y el diseño de estrategias de purificación (Asenjo y Andrews, 2004). En este contexto, las técnicas proteómicas proveen herramientas para definir aquellas propiedades de las proteínas recombinantes que pueden ser explotadas con el fin de facilitar la extracción y/o purificación. La electroforesis en dos dimensiones (2DE) facilita la separación de mezclas complejas de proteínas y provee información respecto al pI, peso molecular (M_R) y abundancia relativa, y se puede emplear para la caracterización de extractos proteicos complejos, como los de soya (Görg y col., 2004; Natarajan y col., 2006).

Las propiedades hidrofóbicas de una proteína, juegan un papel fundamental en la definición de su comportamiento en solución y su relación con otras biomoléculas. Diversos métodos se han empleado para media la hidrofobicidad de las proteínas, entre estos cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), de fase reversa (RPC), precipitación con $(NH_4)_2SO_4$, etc. Los SDFA miden la hidrofobicidad de superficie como resultado de la interacción entre residuos de la superficie de la proteína y el solvente (Andrews y col., 2005; Franco y col., 1996; Hachem y col., 1996).

Gu y Glatz (2007b) reportaron por primera vez el uso combinado de 2DE y SDFA para la caracterización de proteínas de origen vegetal, estableciendo un protocolo para el análisis tridimensional de proteínas del germen de maíz basado en sus propiedades moleculares. El método de mapeo tridimensional consiste en el uso de SDFA hidrofóbicos para la partición de proteínas de extractos complejos con base en su hidrofobicidad de superficie, seguido de electroforesis 2D de muestras de las fases superior e inferior para estimar M_R y pI. La densitometría de geles permite cuantificar proteínas individuales y determinar así coeficientes de partición que se correlacionan directamente con la hidrofobicidad de dichas proteínas. Las propiedades tridimensionales de las proteínas permitirán una mejor visualización del ambiente que rodea a una proteína recombinante dadas sus propiedades moleculares (M_R , pI e hidrofobicidad), permitiendo un mejor diseño de estrategias de purificación o incluso selección de un mejor medio de expresión.

El objetivo de este trabajo fue extender la aplicación de esta técnica de caracterización tridimensional a extractos de proteína de soya dado el potencial de aplicación de este cultivo para la expresión de proteínas recombinantes. Dos SDFA fueron evaluados: PEG 3350 (14.8% p/p), fosfato de potasio (10.3% p/p) NaCl (3% p/p) y el sistema previamente empleado en maíz: PEG 3350 (15.7% p/p)-Na₂SO₄ (8.9% p/p)-NaCl (3% p/p) para medir la hidrofobicidad de una mezcla de proteínas modelo, así como un extracto complejo de proteínas de soya y obtener los gráficos tridimensionales. La aplicación de esta técnica tridimensional a proteínas de soya servirá como base para su extensión a otros hospederos potenciales de proteínas recombinantes, y representa el primer paso para el diseño predictivo de estrategias de recuperación de proteínas expresadas en plantas.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

La harina de soya fue obtenida del Center for Crops Utilization Research de Iowa State University. Polietileno-glicol (PEG 3350), DL-ditiotreitol (DTT) y las proteínas modelo seleccionadas: quimotripsina A (CHY), citocromo C (CYC), ribonucleasa A (RNA), α -lactalbumina (LAC), albumina de suero bovino (BSA) y lisozima (LYS) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemicals (St Louis, MO). El buffer de rehidratación ReadyPrep[®], ReadyStrip[®] IPG (pH 3-10), iodoacetamida, estándares Precision Plus[®] y los geles Criterion[®] (4-20% p/v) fueron adquiridos de Bio-Rad (Hercules, CA). El ensayo Coomassie “Plus protein assay kit” de Pierce Biotechnology (Rockford, IL). El Azul de Coomassie R250 de

Acros Organics (Geel, Bélgica). Sales y otros reactivos de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

2.2. Extracción de proteína

La extracción de proteína a pH 7 fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo reportado por Gu y Glatz (2007b). Todas las determinaciones de proteína total fueron hechas mediante el ensayo de Bradford empleando BSA como estándar (Bradford, 1976). La concentración de proteínas modelo fue medida espectrofotométricamente a 280 nm. Todas las determinaciones de proteína fueron hechas empleando los solventes adecuados en cada caso para evitar interferencias.

2.3. Partición en sistemas de dos fases acuosas (SDFA)

Los sistemas de fases acuosas fueron formulados en base a experiencias previas en la partición de proteínas de plantas (Gu y Glatz, 2007b) y las correspondientes curvas binodales reportadas por Zaslavsky (1995) para dar un total de 5.0 g en los sistemas de proteína de soya y 2.0 g para las proteínas modelo. Se formularon sistemas PEG-sal con la siguiente composición: PEG 3350 15.7% p/p, Na₂SO₄ 8.9% p/p, NaCl 3% p/p para los sistemas de sulfato y PEG 3350 14.8% p/p, fosfato de potasio 10.3% p/p, NaCl 3% p/p para los sistemas de fosfato. La carga de proteína fue de 1 mg/g SDFA para el extracto de soya y de 0.35 mg/g SDFA para las proteínas modelo. El pH de los sistemas fue ajustado a 7.0. Todos los sistemas fueron realizados por triplicado. El coeficiente de partición se evaluó midiendo la concentración de proteína en cada fase mediante el ensayo de Bradford.

2.4. Precipitación con ácido tricloroacético.

Se empleó la precipitación con ácido tricloroacético 20% p/p para separar los componentes que forman las fases de las proteínas (Gu y Glatz, 2007b). El precipitado obtenido fue resuspendido en el menor volumen posible de urea 8 M. La concentración de proteína fue nuevamente medida en esta etapa mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

2.5. Electroforesis de dos dimensiones

Después de la precipitación y resuspensión de las proteínas, las muestras fueron diluidas en buffer de rehidratación (ReadyPrep®, BioRad) a un volumen de acuerdo a su concentración de proteína, para alcanzar una carga de 200 mg de proteína por tirilla (11 cm, pH 3-10, ReadyStrip®, Bio-Rad). Las tirillas fueron rehidratadas por 16 h a temperatura ambiente. El enfoque isoeléctrico (IEF) fue llevado a cabo en una celda Amersham Ettan IPGphor II® por un total de 131,879 Vh. Las tiras fueron posteriormente

equilibradas según instrucciones del fabricante y colocadas sobre geles de poliacrilamida Criterion® (gradiente 4-20% p/v; BioRad). La electroforesis fue llevada a cabo usando una unidad Criterion Dodeca Cell (BioRad) a 200 V. Los geles fueron visualizados por tinción con azul de Coomassie G-250 y escaneados en un densitómetro Image Scanner (GE Healthcare) a 600 dpi en modo transmisor y analizados con el software PDQuest (Bio-Rad). La masa de las proteínas individuales fue determinada por densitometría (el área multiplicada por intensidad de píxel) relativa a la cantidad total de proteína y a la densidad total de cada gel. Una muestra de proteína total de soya fue corrida en paralelo en 2DE y empleada como *master* para la identificación y correlación de los puntos de proteínas separadas por fases acuosas, así como para los balances de masa. Las concentraciones de proteína obtenidas por densitometría fueron empleadas para calcular las constantes de partición (K_p) de las proteínas individuales. La sumatoria de la densidad total de cada gel fue empleada para calcular la K_p total como la razón de la densidad de todas las proteínas detectadas en el gel de fase superior entre la densidad de todas de las proteínas detectadas en el gel de fase inferior.

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción de proteína

Los extractos de proteína obtenidos a pH 7.0 con el protocolo descrito promediaron 30.7 mg proteína/mL, equivalentes a 0.31 ± 0.01 g proteína/g sólidos. Estos resultados son consistentes con los reportes de hasta 48% p/p de contenido de proteína en soya (Thanh y Shibasaki, 1976; Yaklich, 2001; Aguilar y Rito-Palomares, 2008).

3.2. Partición hidrofóbica de proteínas

La hidrofobicidad funcional, con frecuencia medida a través del parámetro $P = 1/m^*$ (inverso de la concentración salina a la cual las proteínas precipitan en una curva de precipitación con sales), es empleada como referencia para medir la hidrofobicidad de superficie de las proteínas en soluciones salinas. Hachem y col. (1996) reportan una buena relación lineal entre la hidrofobicidad medida a través de este método, y la hidrofobicidad medida a través del coeficiente de partición de proteínas modelo en SDFA hidrofóbicos. Esta técnica de correlación fue empleada para evaluar la capacidad de los SDFA formulados con fosfato y sulfato para proporcionar una escala adecuada de hidrofobicidad para un conjunto de proteínas modelo. Se correlacionó el valor de K_p obtenido con su correspondiente valor de $1/m^*$ reportado para esa proteína.

Los experimentos de partición de las seis proteínas modelo en los sistemas PEG/sal, resultaron

Tabla 1. Diferencial observado en la partición hidrofóbica de proteínas modelo seleccionadas en SDFA al cambiar la sal formadora de fase inferior.

	M_r	pI	$ \Delta(\log K_p) ^a$
a-Lactoalbúmina (LAC)	14.0	4.5	0.13
Albúmina de Suero (BSA)	66.5	4.9	0.85
Quimotripsina (CHY)	25.0	8.8	0.15
Ribonucleasa A (RNA)	13.7	9.6	0.19
Citocromo C (CYC)	12.3	10.2	0.61
Lisozima (LYS)	14.3	10.3	0.92

a Valores absolutos calculados como: $|\Delta(\log K_p)| = |(\log K_p\text{fosfato}) - (\log K_p\text{sulfato})|$, donde $K_p\text{fosfato}$ es el coeficiente de partición calculado del sistema PEG 3350-fosfato y $K_p\text{sulfato}$ es el coeficiente de partición calculado del sistema PEG 3350-Na₂SO₄; ambos sistemas a pH 7.0 y 25°C.

en diferencias importantes, como puede verse en la Tabla 1. Si se considera que estos dos sistemas fueron formulados para poseer composición similar con base a los diagramas binodales, este comportamiento de la proteína sugiere que la fuerza iónica de la sal empleada para formar la fase estaría involucrada en la definición de la hidrofobicidad intrínseca del sistema de dos fases. A diferencia de experiencias previas con extractos de proteína de soya en SDFA, el efecto de la fuerza iónica de la sal empleada sobre la hidrofobicidad del sistema es más evidente.

Los valores de K_p obtenidos para las proteínas modelo, fueron correlacionados con la hidrofobicidad calculada de las curvas de precipitación (m^*) reportadas por Hachem y col. (1996) y Gu y Glatz (2007b). Dos diferentes sales fueron empleadas para formular los sistemas resultando en SDFA donde las proteínas modelo tuvieron diferentes valores de K_p . La Fig. 1 muestra la escala de hidrofobicidad de las proteínas modelo para ambos sistemas. El orden consecutivo permanece inalterado a pesar de los diferentes valores de hidrofobicidad obtenidos ($\log K_p$). Los valores de correlación R^2 obtenidos demuestran que ambos sistemas proveen un método confiable para medir la hidrofobicidad funcional de las proteínas, en particular el sistema PEG/fosfato ($R^2=0.94$). Resulta claro también, al observar los diferentes valores de R^2 , que la linearidad obtenida entre $\log K_p$ y $\log(1/m^*)$ es altamente dependiente de la selección de sales para formar los sistemas de dos fases, de ahí la necesidad de efectuar un procedimiento de validación para cada sistema formulado.

Con el objetivo de probar la confiabilidad del método para proveer un mapa 3D, se empleó una mezcla simple de tres proteínas (BSA, LAC y LYS). La Fig. 2 muestra el resultado de la aplicación de la técnica. Se notan claramente las diferencias entre

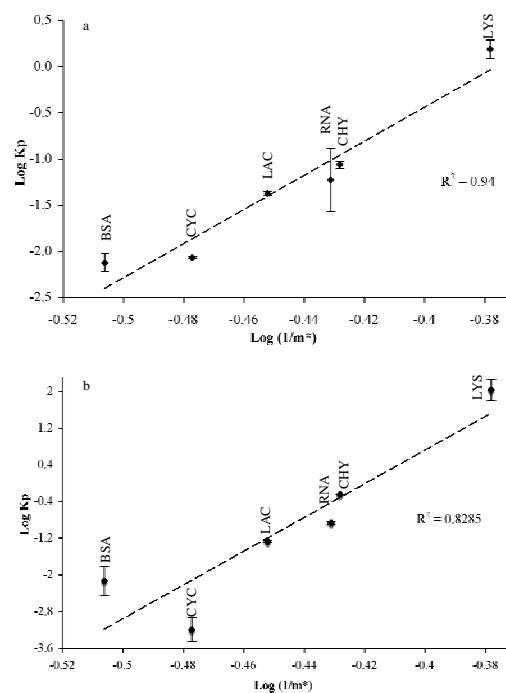


Fig. 1. Correlación entre la hidrofobicidad de superficie medida como el $\log K_p$ en SDFA y el valor $1/m^*$. K_p es el coeficiente de partición de la proteína en un sistema PEG 3350-sal a pH 7.0 y con una carga de proteína de 0.4 mg/g SDFA. m^* es la concentración de sal en el punto de discontinuidad en las curvas de precipitación reportadas por Hachem y col. (1996) para proteínas modelo seleccionadas usando una concentración inicial de 2 mg/mL. A. Sistema PEG-fosfato. B. sistema PEG-sulfato.

ambos sistemas en las propiedades hidrofóbicas obtenidas para cada proteína, en particular para LAC y BSA. Estas diferencias son atribuibles a la diferente hidrofobicidad intrínseca de los sistemas, lo que resulta en diferente comportamiento de partición. La K_p para cada proteína fue calculada mediante la razón de las densidades de cada proteína obtenidas del gel correspondiente (fase superior y fase inferior).

A pesar de las diferencias en K_p obtenidas a través de dos diferentes SDFA, el peso molecular (M_r) y el punto isoeléctrico (pI) de los puntos en el gel, fueron similares a los reportados por Gasteiger y col. (2005) para estas proteínas. Con ambos sistemas se demostró la aplicabilidad de esta técnica para la determinación de las propiedades moleculares de una mezcla de proteínas.

3.3. Caracterización molecular de proteínas de soya

La remoción de los componentes que forman las fases es una de las principales desventajas del uso de SDFA en combinación con la 2DE. En el caso de la fase superior, la remoción es necesaria debido a la posibilidad de interacción entre el polímero y la pro-

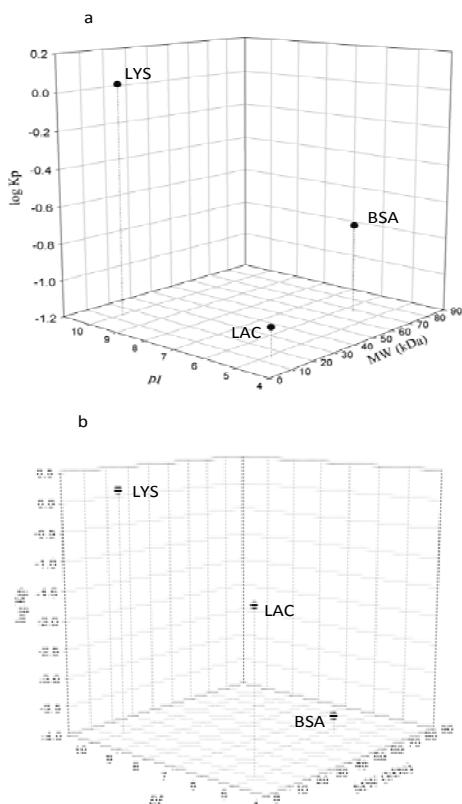


Fig. 2. Mapa 3D de una mezcla artificial de tres proteínas modelo fraccionadas en SDFA. Sistema PEG 3350-sal a pH 7.0 y carga de proteína de 0.35 mg/g SDFA para cada proteína. A. Sistema PEG fosfato. B. Sistema PEG-sulfato.

teína que afecte su movilidad electroforética. La fase inferior, con una alta concentración de sales, hace prácticamente imposible su uso directo debido a la alta corriente que se generaría durante el enfoque isoelectrónico. La precipitación con ácido tricloroacético (TCA) fue empleada como estrategia para la remoción de estos compuestos interferentes, y etapa de concentración previa al electro-enfoque. Sin embargo la pérdida de proteína durante la etapa de precipitación es una consecuencia inevitable. Se observaron porcentajes de pérdida de proteína hasta de 68% para muestras de la fase superior y de hasta 60% para muestras de la fase inferior. Los bajos porcentajes de recuperación demostraron la fuerte interacción que existe entre el PEG y las proteínas. La precipitación con TCA resultó en porcentajes de recuperación en algunos casos de hasta 32% de la proteína medida originalmente en los SDFA. Estos porcentajes de pérdida fueron evaluados y considerados de manera individual en la determinación de la concentración de proteínas individuales por densitometría. Esta etapa del proceso representa la principal área de oportunidad para mejorar el perfil de proteínas obtenido, ya que las pérdidas por precipitación fueron considerables y

se presentaron en diferentes proporciones en función del tipo de muestra tratada.

Como resultado de la aplicación de las técnicas conjuntas (SDFA y 2DE), las Tablas 2 y 3 muestran la lista de puntos de proteínas caracterizados a partir de los geles de fase superior e inferior para los sistemas PEG 3350-sulfato y PEG 3350-fosfatos, respectivamente. Del total de puntos identificados, un reducido grupo de puntos fueron identificados y correlacionados como proteínas correspondientes en ambas fases. Las proteínas presentadas en la Tabla 2 corresponden al total de los puntos encontrados en ambas fases. En el caso del sistema PEG 3350-sulfato, un total de 72 puntos de proteína fueron detectados y cuantificados de acuerdo con la intensidad de pixel de los puntos y relativos a la cantidad original de proteína cargada en cada tira de electro-enfoque como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Solo 15 puntos fueron detectados en ambas fases, superior e inferior y sus propiedades moleculares pudieron ser evaluadas (Tabla 2). Estos puntos corresponden al 44% del total de las proteínas detectadas en ambas fases. De forma similar, un total de 68 puntos fueron detectados y cuantificados en el sistema PEG 3350-fosfato, sin embargo, solo 11 puntos se encontraron presentes en ambas fases, superior e inferior y se listan en la Tabla 3. Estos puntos corresponden al 25% del total de proteína detectada en ambas fases.

A partir del análisis de los geles, y a pesar de tratarse de condiciones desnaturalizantes, resultó evidente la presencia de proteínas dominantes donde los principales puntos detectados en los geles corresponden a las subunidades de glicinina y β -conglicinina. La presencia de estas proteínas dominantes resulta más evidente al considerar el contenido de proteína de cada punto por densitometría y agregarlo a las gráficas tridimensionales (figs. 3a y 3b). El sistema PEG-fosfato permitió la detección de las subunidades de glicinina, que corresponden a los puntos con pI de 5.4-5.7 y peso molecular de 25 kDa (Yaklich, 2001). El rango de pI reportado para las subunidades de glicinina (pI 4.7-5.4 para las subunidades acidas y 8-8.5 para las subunidades básicas) resultaron correspondientes con los principales puntos detectados en la Fig. 3a. El sistema PEG-sulfato también permitió la detección de las subunidades acidas de la glicinina, sin embargo adicionalmente aparecieron puntos que corresponden a las subunidades α y α' de β -conglicinina con un pI de 5.2 y un peso molecular de 59.4 kDa, como se muestran en la Fig. 3b. El resultado final de la partición fue altamente influenciado por el comportamiento de partición de estas proteínas de almacenamiento, que mostraron una alta hidrofilicidad y por tanto una mayor preferencia hacia la fase inferior. Este comportamiento afecta igualmente a ambos sistemas, sin importar el tipo de sal utilizada.

Tabla 2. Propiedades moleculares y balance de masa de las proteínas de soya obtenidas mediante 2DE y SDFA PEG 3350-sulfatos.

SDFA ^a	M _r (kDa)	pI	Log K _p	% Recuperación ^b
Sistema PEG 3350-SO ₄	24.68	4.68	-0.761	37.3±5
PEG 3350 15.7% p/p	26.04	4.69	-0.688	58.9±15
Na ₂ SO ₄ 8.9% p/p	17.54	4.84	-1.017	31.5±3
NaCl 3.0% p/p	28.03	4.99	-1.998	52.8±6
	59.36	5.24	-2.746	39.5±7
TLL 32%	27.46	5.35	-2.268	65.5±15
Vr ~ 1.0	33.7	5.4	-2.874	50.6±2
	14.5	5.58	-1.722	26.0±6
	27.9	5.6	-2.687	68.1±15
	29.56	6.23	-1.995	15.7±0
	25.18	6.25	-1.234	192.8±18
	24.96	6.33	-0.699	28.9±9
	30.96	6.65	0.160	78.4±0
	16.56	6.68	-1.164	33.9±0
	69.76	7.54	-1.400	165.6±40

a Todos los datos son el promedio de experimentos duplicados a pH 7.0 y 25°C. La carga de proteína fue 1.0 mg/g SDFA.

b Calculado usando la suma de densidades de fase superior + fase inferior dividido entre la densidad de la misma proteína identificada en el gel del extracto total sin partición en fases acuosas.

Tabla 3. Propiedades moleculares y balance de masa de las proteínas de soya obtenidas mediante 2DE y SDFA PEG 3350-fosfatos.

SDFA ^a	M _r (kDa)	pI	Log K _p	% Recuperación ^b
Sistema PEG 3350-PO ₄	13.5	4.91	-0.361	58.2±6
PEG 3350 14.8% p/p	24.99	5.35	-2.409	79.7±11
Fosfato de potasio 10.3% p/p	22.46	5.65	-1.469	91.6±11
NaCl 3.0% p/p	23.4	5.77	0.164	83.8±17
	24.12	6	0.353	44.5±8
TLL 30%	27.26	6.17	-0.386	54.6±15
	29.69	7.14	1.295	139.3±32
	12.9	7.06	-0.144	5.3±1
	16.21	7.93	-2.168	320.2±92
	30.15	7.78	1.064	1901.2±10
	30.96	9.46	0.386	36.3±3

a Todos los datos son el promedio de experimentos duplicados a pH 7.0 y 25°C. La carga de proteína fue 1.0 mg/g SDFA.

b Calculado usando la suma de densidades de fase superior + fase inferior dividido entre la densidad de la misma proteína identificada en el gel del extracto total sin partición en fases acuosas.

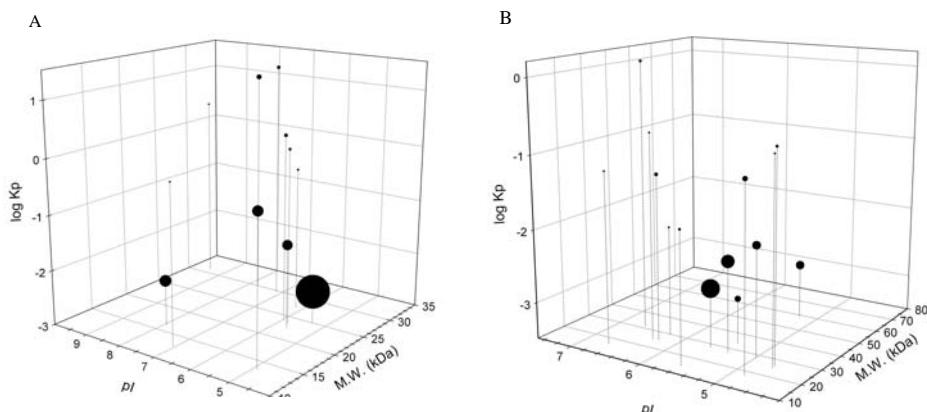


Fig. 3. Mapa tridimensional de proteínas de soya obtenido a partir de sistemas de dos fases acuosas PEG 3350-sal a pH 7.0 y una carga de 1 mg de proteína/g SDFA. A. Sistema PEG-fosfato de potasio. B. Sistema PEG-sulfato. El volumen de las esferas corresponde a la concentración relativa de proteína para cada punto.

En comparación con los reportes previos del uso de esta técnica en proteína de maíz, en el caso de la proteína de soya, el análisis produjo un menor número de puntos, probablemente como resultado de la perdida de proteínas en la etapa de precipitación con TCA. En especial en la fase superior, donde más del 50% de las proteínas se pierden en las etapas de lavado. También es importante considerar el perfil de las proteínas contenidas en la soya, las dos principales proteínas glicinina y β -conglicinina representan el 70% de las proteínas solubles totales, por tanto, estas dos proteínas proporcionalmente representan la mayor parte de las proteínas cargadas en el gel.

Las diferencias en los perfiles de proteínas obtenidos pueden ser explicadas por el uso de dos SDFA diferentes, lo cual resultó en dos conjuntos distintos de proteínas distribuidas entre fases superior e inferior. Esto resultó más evidente al graficar los datos en un espacio tridimensional (figs. 3a y 3b). Como se menciona anteriormente, en ambos sistemas, el número de proteínas cuantificadas resultó ser relativamente bajo y diferente uno de otro. Sin embargo se pudo observar que el sistema PEG-fosfato a pesar del limitado rango de pesos moleculares obtenido (13-31 kDa), este sistema permitieron la identificación de proteínas en un rango más amplio de pI, resultando en la detección de las subunidades básicas de la glicinina como se mencionó anteriormente. Adicionalmente, se obtuvieron más puntos con valores de Log Kp positivos, indicando preferencia de éstas proteínas por la fase superior en este sistema PEG-fosfato. En contraste, cuando se usó el sistema PEG-sulfato para la partición de proteínas, se detectó un rango mayor de pesos moleculares. Sin embargo, la mayor parte de estas proteínas resultan tener valores de Log Kp negativos, indicando mayor preferencia por la fase inferior. Es importante considerar que este comportamiento es el resultado de un análisis limitado por el número de puntos que pueden ser identificados como correspondientes en ambas fases, además del número de proteínas que pudieron perderse durante la etapa de precipitación con TCA. Estos resultados invitan a considerar el uso de una estrategia distinta para la remoción de los compuestos que forman las fases previo a la técnica electroforética.

Para ambos sistemas, los porcentajes de recuperación de proteínas específicas son relativos a la cantidad total de la misma proteína identificada y cuantificada en el gel del extracto total, que no fue sometido a partición por fases acuosas, pero sí a la precipitación con TCA previo a la electroforesis. Para algunas proteínas, los porcentajes de recuperación fueron mayores al 100% (ver Tablas 2 y 3), estos resultados podrían explicarse si se considera que no todas las proteínas son afectadas de la misma forma por la precipitación con TCA en un medio rico en PEG en el que las proteínas mantienen

afinidadades diferentes con el polímero debido a interacciones de tipo hidrofóbicas. Una suposición común es que todas las proteínas precipitan de la misma forma (Gu y Glatz, 2007b); sin embargo la diferente afinidad de las proteínas por el polímero y/o la sal podría afectar la respuesta ante el agente precipitante. Otra posible explicación es el empalmado de proteínas con peso molecular y pI similares que son cuantificadas como una sola, de esta forma, pequeñas variaciones presentadas entre geles replicas, pueden dar lugar a correlaciones incorrectas entre puntos. Esta posible fuente de error fue parcialmente corregida mediante la selección manual de puntos de referencia durante el procesado de las imágenes, sin embargo, las principales fuentes de error siguen siendo la correlación incorrecta de puntos, la sobre-detección de puntos agrupados, o la no detección de puntos muy débiles.

La Tabla 4 presenta una comparación final entre los valores de Kp obtenidos por el método colorímetrico más común para medir concentración de proteína (reacción de Bradford) y los valores obtenidos mediante densitometría de puntos. El ensayo de Bradford realizado a las muestras de fases superior e inferior de cada sistema se empleo para calcular la Kp total para cada tipo de muestra. El valor de Kp obtenido por densitometría se obtuvo al considerar la densidad total de los geles de fase superior entre la densidad total de los geles de fase inferior para cada sistema. De esta forma, mediante ambos métodos se obtiene el mismo parámetro para evaluar la partición de proteínas en el sistema de dos fases acuosas. Al observar el sistema PEG-sulfato, se puede apreciar que no existe diferencia significativa entre los valores de Kp obtenidos usando cualquiera de los métodos, ambos valores son coincidentes tanto para las proteínas del extracto de soya como para la mezcla de proteínas modelo (Fig. 2). En el caso del sistema PEG-fosfato, el valor de Kp medido por medio de la reacción de Bradford resultó ser mayor que el obtenido por densitometría, este comportamiento podría estar influenciado por el numero de etapas que provocan perdidas de la muestra en fase inferior como la precipitación con TCA o la redisolución de la muestra en el buffer de rehidratación. Aunque existan pequeñas diferencias en Kp para algunos casos, la electroforesis bidimensional representa un método confiable para la determinación de los coeficientes de partición.

Los resultados aquí reportados resaltan la importancia de una cuidadosa selección del sistema de partición de proteína para la estimación del Kp. Se recomienda una etapa previa de preselección con el objetivo de formular un sistema con una composición de PEG-sal tal que maximice la partición a la fase superior sin comprometer la resolución hidrofóbica del sistema. Una de las aplicaciones inmediatas de la información generada de la integración de estas dos técnicas experimentales (SDFA + 2DE) lo es sin duda el es-

Tabla 4. Comparación entre la Kp obtenida mediante densitometría vs el método colorimétrico Bradford^a.

SDFA ^b	Tipo de Muestra ^c	Método para obtención de Kp	
		Método de Bradford	Densitometría de Geles 2D ^e
PEG 3350-fosfato de potasio	Extracto de Soya	0.08±0.003	0.04±0.01
	Proteínas modelo ^d	0.13±0.003	0.11±0.001
PEG 3350-sulfato de sodio	Extracto de Soya	0.09±0.01	0.11±0.03
	Proteínas modelo	0.13±0.001	0.13±0.004

a Todos los datos son el promedio de experimentos duplicados en el caso de 2DE y triplicados para el ensayo Bradford.

b SDFA a 25°C y pH 7.0.

c La carga de proteína fue de 1.0 mg/g SDFA para ambos métodos.

d Mezcla de proteínas modelo: lisozima, albúmina de suero bovino y a-lactoalbumina.

e Calculado como la razón de la densidad total de las proteínas detectadas en el gel de fase superior entre la densidad total de las proteínas detectadas en el gel de fase inferior, considerando las perdidas promedio en cada muestra.

tablecimiento y diseño predictivo de etapas más eficientes de recuperación y/o purificación de proteínas recombinantes expresadas en plantas.

Conclusiones

La aplicación de la técnica de caracterización tridimensional proporcionó valiosa información acerca de la naturaleza molecular de las potenciales proteínas contaminantes presentes en soya. Sin embargo, nuevos retos y limitaciones se identificaron por la presencia dominante de las proteínas de almacenamiento de la soya. El limitado número de proteínas detectadas en los geles afectó el número de proteínas caracterizadas en tres dimensiones. La composición del sistema PEG-sulfato (PEG 3350 15.7% p/p, Na₂SO₄ 8.9% p/p, NaCl 3.0% p/p) resultó en un número mayor de puntos detectados en ambas fases mediante 2DE, comparado con el sistema PEG-fosfato (PEG 3350 14.8% p/p, fosfato de potasio 10.3% p/p, NaCl 3.0% p/p). Sin embargo, fue evidente la necesidad de llevar a cabo una cuidadosa selección del sistema de partición a emplear y cumplir así con el criterio de selección de un sistema adecuado para partición hidrofóbica: i) un Kp cercano a 1, ii) los más altos porcentajes de recuperación de proteína y iii) una hidrofobicidad comprobada como el principio que rige la partición de las proteínas. Considerando estos criterios, el sistema PEG-fosfato, resultó ser mejor para la caracterización tridimensional. Se demostró además que la sal empleada para formar las fases ejerce una gran influencia sobre la hidrofobicidad intrínseca del sistema usado para la determinación de Kp para el caso de las proteínas modelo, así como en los extractos de proteína de soya. La identificación de las principales proteínas contaminantes y su proporción relativa de las gráficas tridimensionales, pueden servir como una etapa inicial para la selección de mejores estrategias

de purificación o incluso la selección de un hospedero más adecuado dadas las propiedades moleculares de la molécula objetivo y las proteínas contaminantes del hospedero.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero a la Cátedra de Investigación de Bioingeniería y Nanobioparticulas (CAT161) del Tecnológico de Monterrey y al Departamento de Ingeniería Química y Biológica de Iowa State University.

Referencias

- Aguilar, O. y Rito-Palomares, M. (2008). Processing of soybeans (*Glycine max.*) extracts in aqueous two-phase systems as a first step for the potential recovery of recombinant proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83, 286-293.
- Albertsson, P.A. (1958). Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems. *Nature* 182, 709-711.
- Andrews, B.A., Schmidt, A.S., Asenjo, J.A. (2005). Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity and charge. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 380-390.
- Asenjo, J.A., Andrews, B.A. (2004). Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. *Journal of Molecular Recognition* 17, 236-247.
- Benavides J., Rito-Palomares, M. (2008). Aplicación genérica de sistemas de dos fases acuosas polietilénglico-sal para el desarrollo de procesos de recuperación primaria de compuestos biológicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7(2), 99-111.

Benavides, J., Mena, J., Cisneros, M., Ramirez, O.T., Palomares, L.A. y Rito-Palomares, M. (2006). Rotavirus-like particles primary recovery from the insect cell in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 842, 48-57.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry* 72, 248-254.

Evangelista, R.L., Kusnadi, A.R., Howard, J.A., Nikolov, Z.L. (1998). Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant beta-glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress* 14, 607-614.

Franco, T.T., Andrews, A.T., Asenjo, J.A. (1996). Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 300-308.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En: *The Proteomics Protocols Handbook*, (John M. Walker eds.), Pp. 571-607. Humana Press, New Jersey. Disponible en: <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.

Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.

Gu, Z., Glatz, C.E. (2007a). Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts. *Journal of Chromatography B* 845, 38-50.

Gu, Z., Glatz, C.E. (2007b). A method for three-dimensional protein characterization and its application to a complex plant (corn) extract. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 1158-1169.

Hachem, F., Andrews, B.A., Asenjo, J.A. (1996). Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microbiology Technology* 19, 507-517.

Lerrick, J.W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S., Wycoff, K. (2001) Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering* 18, 87-94.

Menkhaus, T.J., Glatz, C.E. (2005). Antibody Capture from Corn Endosperm Extracts by Packed Bed and Expanded Bed Adsorption. *Biotechnology Progress* 21, 473-485.

Natarajan, S.S., Xu, C., Hanhong, B., Caperna, T.J., Garret, W.M. (2006). Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycinemax*) soybean seeds using proteomic analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 3114-3120.

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.

Thanh, V.H., Shibasaki, K. (1976). Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 24, 1117-1121.

Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21, 570-578.

Yaklich, R.W. (2001). β -conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 729-735.

Zaslavsky, A. (1995). *Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, U.S.A.