

USO DEL FRACCIONAMIENTO OFFGEL EN EL ESTUDIO PROTEÓMICO DEL PLASMA BOVINO

Sentandreu¹, E., Sierra², V. y Sentandreu^{1*}, M.A.

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Calle Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna (Valencia). ²Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Alimentario (SERIDA), Carretera de Oviedo, s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias)
*ciesen@iata.csic.es

INTRODUCCIÓN

El estudio de las proteínas del plasma sanguíneo representa una importante vía de investigación para determinar el estado fisiológico de los animales de granja. El estudio proteómico en este tipo de muestras no resulta fácil debido a la presencia de proteínas abundantes, como la albúmina y diversas inmunoglobulinas. Estas proteínas mayoritarias pueden representar hasta el 70 % del contenido proteico total, lo que dificulta el estudio de otras proteínas minoritarias que sin embargo pueden ser de gran valor diagnóstico (Bueno *et al.*, 2011). Aunque se ha trabajado en el desarrollo de métodos para tratar de retirar las proteínas abundantes del plasma, éstos no están exentos de ciertas limitaciones y dificultades (Stempfer *et al.*, 2008). Otro problema surge del hecho que la albúmina presenta múltiples sitios de unión a proteínas, con lo que su retirada del plasma implica también la pérdida de proteínas minoritarias (Curry *et al.*, 1998). Se necesitan métodos de análisis más eficaces en lo que respecta al estudio de proteínas minoritarias. Aquí se presenta una estrategia para el análisis del proteoma del plasma sanguíneo basado en el fraccionamiento del mismo mediante isoelectroenfoque en medio líquido (OFFGEL), seguido del análisis por electroforesis monodimensional (SDS-PAGE).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del plasma sanguíneo. Se recogió sangre en tubos con EDTA en el momento del sacrificio de vacunos de la raza Asturiana de los Valles. El plasma se obtuvo por centrifugación de la misma, recogiendo el sobrenadante.

Fraccionamiento del plasma sanguíneo mediante OFFGEL. 1 mg de proteína total plasmática se fraccionó en 12 fracciones líquidas empleando tiras de isoelectroenfoque en el intervalo de pH 3-10 mediante un fraccionador OFFGEL Agilent 3100 según se describe en Fuente-García *et al.* (2019).

SDS-PAGE. De cada una de las 12 fracciones OFFGEL obtenidas se tomaron 20 µL, diluyéndolos (50:50) con tampón de muestra (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 50 % glicerol, 10 % SDS, 0,2 M DTT y 0,04 % azul de bromofenol) y calentando la mezcla 4 min a 95 °C. Estas muestras se fraccionaron en geles de policrilamida (10 %) de 8x9 cm para posteriormente teñirse con azul de Coomassie coloidal.

Digestión en gel de las proteínas seleccionadas y análisis por LC-MS/MS. Las bandas representativas del proteoma del suero sanguíneo bovino se recortaron del gel, digiriéndose con tripsina e identificando la secuencia de los péptidos generados mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) según Beldarrain *et al.* (2022).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante esta estrategia de análisis, la albúmina se identificó a lo largo de las fracciones 5-11, aunque la mayor parte de la misma apareció focalizada en la fracción 6, reduciendo notablemente el problema que supone la presencia de esta proteína mayoritaria en el estudio de proteínas minoritarias al estar estas últimas distribuidas en regiones diferentes del isoelectroenfoque. Se seleccionaron un total de 26 bandas para su análisis por LC-MS/MS, consiguiéndose identificar un total de 24. Estas corresponden principalmente a diferentes isoformas de inmunoglobulinas y fibrinógeno, inhibidores de peptidasas, apolipoproteína A-I, fibronectina, serotransferrina y diferentes globulinas.

CONCLUSIÓN

El perfil de separación después del fraccionamiento OFFGEL combinado con la electroforesis en gel ha puesto de manifiesto la idoneidad de esta estrategia para el estudio eficaz de las proteínas minoritarias del proteoma plasmático bovino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bueno, Y. *et al.* 2011. Rev. Colomb. Quím. 40(2): 131-148.
- Stempfer, R. *et al.* 2008. Electrophoresis 29: 4316-4323.
- Curry, S. *et al.* 1998. Nat. Struc. Biol. 5(9): 827-835.
- Fuente-García, C. *et al.* 2019. J. Prot. 198: 59-65.
- Beldarrain, L.R. *et al.* 2022. Meat Sci. 188: 108804.

Agradecimientos: Trabajo financiado por el proyecto PID2021-123933OR de la AEI.