

Sección de Fisioparasitología  
Instituto «López-Neyra» de Parasitología  
C.S.I.C. - Granada

## Algunas aportaciones al fraccionado proteico del suero con DEAE-celulosa

por

J. López-Gorgé y M. Monteoliva

(Recibido para publicar el 3 de junio de 1966)

Desde la preparación e indicación de las aplicaciones de las celulosas modificadas por PETERSON y SOBER (12), han sido éstas objeto de un intenso estudio dirigido a su empleo en el fraccionado de substancias más o menos cargadas y de magnitud molecular relativamente alta. Aunque se ha introducido su uso en la resolución de mezclas lipídicas (13), es en el fraccionado proteico donde han encontrado un mayor campo de aplicación, en especial las carboximetil- y dietilaminoetil-celulosas, que han sido objeto de amplio uso en el aislamiento de insulina en extractos pancreáticos (14), en el fraccionado del material proteico del huevo (10), en la preparación de mioglobinas (3), en la purificación de antígenos vermiformes (1), en la obtención de preparados enzimáticos altamente purificados (5), en la resolución de proteínas séricas (7), etcétera.

En todos estos casos la variabilidad del método radica fundamentalmente en el empleo de un sistema de elución ade-

cuado, que, dados los diferentes factores que pueden intervenir en el proceso (pH, fuerza iónica, naturaleza de los solutos, etcétera), ha hecho que prácticamente hayan de plantearse para cada caso particular problemas nuevos en lo que a la elución respecta.

En lo concerniente al fraccionado de las proteínas del suero, han sido propuestos diferentes sistemas eluyentes, con amplia variabilidad en las condiciones de pH y concentración salina, usando soluciones tampones a base de citrato, tris, glicocola, fosfatos, etc. Nosotros, después de hacer un estudio exhaustivo de todos estos factores y su influencia en la obtención de buenos fraccionados, proponemos una técnica de elución basada en el empleo del sistema tampón de fosfatos, con gradiente continuo de pH y fuerza iónica, mediante un sistema de mezcla de fácil montaje.

Esta técnica la aplicamos al estudio proteico del suero de varias especies de mamíferos.

### Material y métodos

Se ensayó el fraccionado proteico de sueros de los siguientes mamíferos: vaca, cabra, oveja, cerdo, caballo, rata y hombre. En todos los casos la sangre procedía de ejemplares sin parasitismo evidente, y fue recogida en condiciones que evitaban cualquier tipo de hemolisis. No se efectuó diálisis previa al fraccionado.

Como agente cambiador se empleó DEAE-celulosa 50 (W. & R. Balston, Ltd.), de acuerdo con las directrices de PETERSON y SOBER (15). El proceso consta de los siguientes pasos:

#### a) Preparación de la DEAE-celulosa

Este cambiador, tal como viene en el comercio, necesita ser previamente sometido a un proceso de lavado y equilibrio. Para ello se lava unas cinco veces, con fuerte agitación, en solución N/10 de sosa. Al finalizar estos lavados, cuya suficiencia se manifiesta porque el cambiador ha perdido su tonalidad amarillenta y queda blanco, se enjuaga la DEAE-celulosa varias veces con agua destilada, hasta que los líquidos salgan con reacción neutra o ligeramente alcalina.

Para equilibrarla se agita vigorosamente unas cuatro veces con solución M/100 de fosfato disódico. Entre tiempo y tiempo se mantiene el cambiador en suspensión en la solución durante media hora. La última suspensión así obtenida no se escurre, sino que se utiliza de esa forma para proceder al llenado de la columna. Todas estas operaciones de lavado y equilibrio, con las agitaciones y escurridos subsiguientes, se efectúan muy cómodamente en el aparato de la figura 1.

Un cambiador ya usado puede volverse a usar repetidas veces si previamente se le somete a un proceso de lavado y equilibrio, tal como se indicó antes. No obstante, después de unos quince frac-

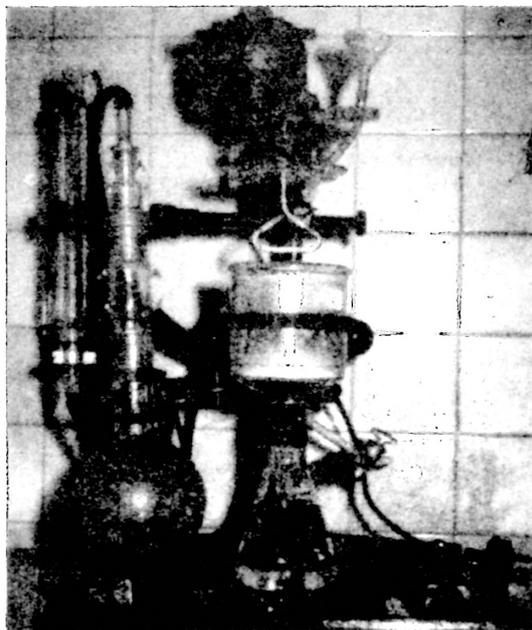


FIG. 1. Dispositivo de lavado y equilibración de la DEAE-celulosa.

cionados, la DEAE-celulosa empieza a perder su consistencia granular, la masa se torna pulverulenta a consecuencia de los repetidos tratamientos con sosa y las agitaciones subsiguientes, y se obtienen entonces columnas muy compactas de difícil elución. Por otro lado, el cambiador toma un tacto untuoso como consecuencia de su progresivo enriquecimiento en lípidos. Todo ello determina la obtención a partir de entonces, de fraccionados defectuosos e irregulares, cuya aparición ha de ser el principal criterio que ha de usar cada uno para desechar esa muestra de DEAE-celulosa.

#### b) Preparación de la columna

Usamos columnas de vidrio de 20 cm de largo y 2 cm de diámetro interior, provistas en su parte superior e inferior de ajustes esmerilados. Al extremo inferior se ajusta a esmeril una pequeña pieza, en la cual se ha introducido un

poco de lana de vidrio prensada, necesaria para mantener el peso de la columna de DEAE-celulosa. Dicha pieza se conecta por su otro extremo con un largo y fino tubo de goma, por donde se recogerán las diferentes fracciones eluidas. La columna, mientras se procede a su carga con el cambiador, se mantendrá perfectamente vertical en su soporte.

La última suspensión antes obtenida se va agregando a la columna por la parte superior, poco a poco, a medida que se va sedimentando por su propio peso la DEAE-celulosa. Este depósito se acelera colocando el tubo de goma de salida de la columna a una altura inferior a la del nivel de la suspensión, y desechando el líquido que drena. Conviene advertir el peligro que representa el que llegue a secarse la columna de cambiador, lo que motivaría la aparición de grietas a lo largo de ella.

De esta forma se consigue obtener una masa de DEAE-celulosa uniformemente sedimentada, y siempre con una capa líquida de 0,5-1,0 cm por encima del nivel superior de la misma, fácil de mantener elevando en ese instante el tubo de goma de salida por encima de ese nivel. Si por cualquier circunstancia se observara la existencia de burbujas de aire incluidas en el cambiador, se puede forzar su desprendimiento con ayuda de una fina varilla de vidrio, pero evitando siempre el empaquetamiento de la DEAE-celulosa como consecuencia de una sobrepresión.

### c) *Fraccionamiento*

Como muestra se utilizaron volúmenes variables, entre 3 y 6 ml, de los sueros antes mencionados. Éstos se depositaron suavemente con una pipeta sobre la superficie de la masa de DEAE-celulosa, y se deja que lentamente penetren en la masa del cambiador, bajando para ello la goma de salida de la columna.

El proceso de fraccionado consta de

dos fases: en una primera la elución se produce a un gradiente continuo que se establece entre una solución base M/100 de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  de  $\text{pH} = 8,52$  (150 ml) y una solución gradiente de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/50, que es simultáneamente M/10 en  $\text{ClNa}$ , de  $\text{pH} = 4,46$  (250 ml). En la segunda fase la elución se continúa con una solución M/10 de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  de  $\text{pH} = 4,40$  (300 ml).

Todo ello obliga a montar, acoplado a la parte superior de la columna, un dispositivo constituido por una cámara que alojará a la solución base de elución, y que servirá al mismo tiempo de cámara de mezcla con la solución gradiente, la cual fluye lentamente de un recipiente cerrado acoplado lateralmente a esta cámara, merced a un dispositivo de nivel constante. Finalmente, una varilla de vidrio acoplada a un motor llega al recipiente de mezcla por su ápice.

Se conecta la columna por su esmerilado superior con la cámara de mezcla, se llenan ambos recipientes, el de la solución base y el de la solución gradiente,

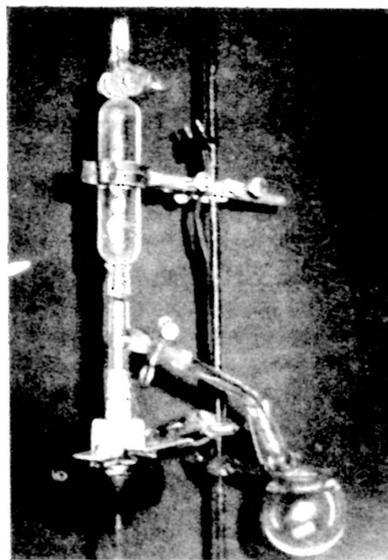


FIG. 2. Montaje de la columna de DEAE-celulosa con el dispositivo de gradiente continuo.

y se inicia la elución. Las fracciones se recogen en volúmenes de 10 ml con un colector automático de fracciones (11). Una conexión eléctrica que acopla el motor del agitador con el colector de fracciones provoca la puesta en marcha de aquél, mientras el tambor del colector gira hacia el siguiente tubo.

Una vez concluida la primera fase, se vuelve a llenar la cámara de mezcla con la solución M/10 de fosfato monopotásico, y se continúa la elución. En esta fase se puede desconectar el agitador del colector automático, ya que no existe proceso gradiente. En conjunto, el dispositivo utilizado viene esquematizado en la figura 2.

El control del fraccionado lo seguimos determinando proteínas sobre 1 ml de cada fracción mediante la técnica de LOWRY (9). Los valores obtenidos fueron llevados a un sistema coordinado, expresando en abscisas el orden de las fracciones, y en ordenadas la cantidad de proteínas eluidas en cada una de ellas.

En algunos casos se midió el pH de cada fracción con un pH-metro Polymetron Mod. 45B. En otros se calculó indirectamente la concentración iónica midiendo las resistividades con un puente de medida de conductividad tipo PR9500 con microcélula PR9512/01.

Finalmente, otras veces se estudió el comportamiento electroforético de las distintas fracciones obtenidas en el proceso de elución. Se empleó tampón veronal de pH = 8,6 con negro de amido como revelador (8), en papel Whatman número 1 a 110 voltios durante 16 horas, con cubeta «en tejado» tipo Durrum.

### Resultados

La figura 3 muestra el fraccionado obtenido con sueros de las siguientes especies: cabra, oveja, cerdo, caballo, rata y hombre, con expresión de todos los datos que afectan al fraccionado.

La figura 4 corresponde al fraccionado de suero de vaca en las mismas condi-

ciones anteriores, indicándose, además, el gradiente de pH que tiene lugar a lo largo del proceso, tanto a la entrada como a la salida del cambiador. También se expresa el gradiente salino en fun-

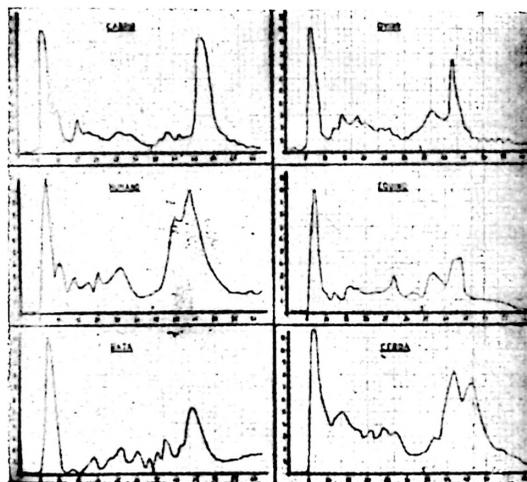


FIG. 3. Muestra: 3-6 ml. Fracciones: 10 ml. Determinación de proteínas sobre 1 ml. de cada fracción. Elución: Gradiente continuo entre: 150 ml. de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  M/100 pH = 8,52 250 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/50 y  $\text{ClNa}$  M/10 pH = 4,46. Elución final: 300 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/10 pH = 4,40.

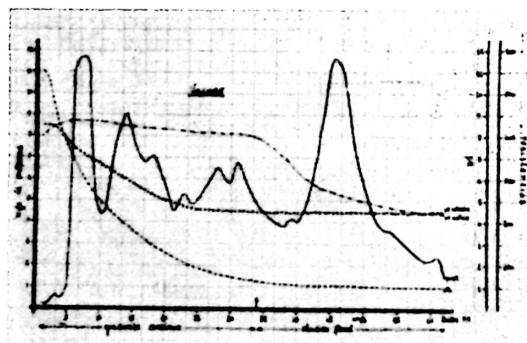


FIG. 4. Muestra: 5 ml. Fracciones: 10 ml. Determinación de proteínas sobre 1 ml de cada fracción. Elución: Gradiente continuo entre: 150 ml. de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  M/100 pH = 8,52 250 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/50 y  $\text{ClNa}$  M/10 pH = 4,46. Elución final: 300 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/10 pH = 4,40.

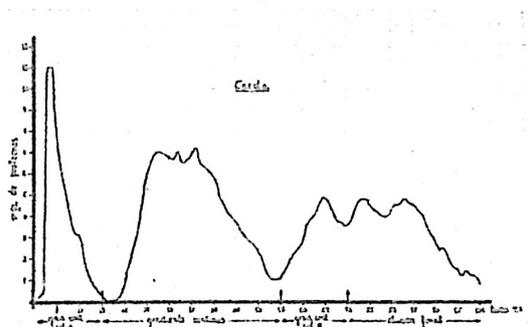


FIG. 5. Muestra : 5 ml. Fracciones : 10 ml. Determinación de proteínas sobre 1 ml. de cada fracción. Elución: Gradiente continuo (sol. A): 150 ml. de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  M 100  $\text{pH} = 8,52$ . entre : 150 ml. de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  M 100  $\text{pH} = 8,52$  250 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M 50 y  $\text{ClNa}$  M 10  $\text{pH} = 4,46$ . Gradiente continuo (sol. B) : 150 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M 50 y  $\text{ClNa}$  M 10  $\text{pH} = 4,46$ . Elución final : 300 ml. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M 10  $\text{pH} = 4,40$ .

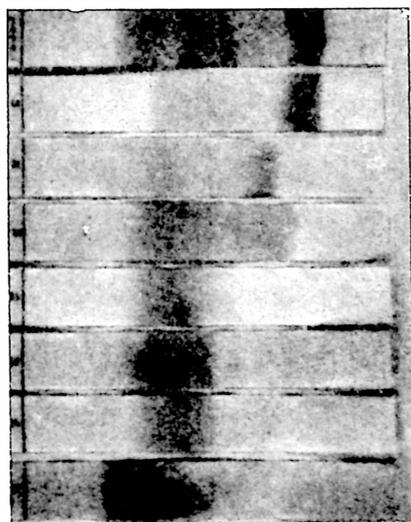


FIG. 6. Electroforesis  $\text{pH} = 8,6$  tampón veronal. Voltaje : 110 voltios. Tiempo : 16 horas. Coloración negro de amido.

ción de la resistencia al paso de la corriente en las fracciones eluidas.

La figura 5 corresponde a un fraccionado de suero de cerdo efectuado en con-

diciones especiales, con establecimiento de fases de elución suplementarias mediante las soluciones base y gradiente aisladas, antes y después, respectivamente, de establecerse el gradiente continuo entre ambas.

La figura 6 nos muestra el fraccionado electroforético del mismo suero de vaca desdoblado en la figura 4, así como las movilidades electroforéticas, obtenidas paralelamente con el fraccionado anterior, de cada uno de los eluidos que vienen a constituir el máximo de las siete fracciones obtenidas sobre DEAE-celulosa.

### Discusión

Mediante esta técnica de fraccionado vemos que se obtienen para el suero un número de fracciones que varían de 7 a 10, según la especie animal de que se trate. Comparando todos los casos estudiados se pone de manifiesto, en primer lugar, la presencia constante de una fracción de salida de alto contenido proteico, comprendida entre los tubos 5 y 10 aproximadamente. Estudiada electroforéticamente, esta fracción presenta una movilidad de gamma-globulina, lo que está de acuerdo con su elución a la cabeza del fraccionado, si bien el desarrollo electroforético presenta, además, una precola difusa que marcha por delante de la fracción gamma (fig. 6). Esta precola, de movilidad global comprendida entre las beta y gamma-globulinas, bien pudiera estar constituida por trazas de beta-globulinas procedentes de la segunda fracción eluida, cuya separación de la primera, si bien es muy nítida, no lo es de forma total por no llegar el valle entre ambas a la línea de base.

No obstante, nos inclinamos a pensar que se trata más bien de gammas-globulinas cuya naturaleza físico-química se haya modificado más o menos como consecuencia del proceso de elución, con pérdida parcial de su capacidad de orientación molecular en el proceso de elec-

troforesis. En favor de esta suposición viene el hecho de que esa cola no sea asimilable en su emigración ni a las gamma- ni a las beta-globulinas de una manera estricta, como se ve por comparación con el desarrollo electroforético del suero completo.

A las mismas conclusiones llegan FAHEY y col. (4), los cuales, aun utilizando un sistema gradiente distinto, obtienen también esta fracción de salida en la elución; estudiados electroforéticamente los distintos tubos que la componen, observan la aparición de una banda gamma-globulínica en todos los casos, pero cuya movilidad va insensiblemente creciendo de forma gradual a medida que se avanza en el orden de los tubos. JAMES y STANWORTH (6) identifican por análisis inmunoelectroforético la fracción gamma-globulina de menor movilidad y más rápida elución como la 7S-gamma-globulina.

En esta primera fracción se recogen las gamma-globulinas de una forma prácticamente cuantitativa. Desde luego, el desarrollo electroforético de las fracciones subsiguientes presenta también trazas de gamma-globulina, pero que a la inversa de antes y por la misma razón, bien pueden ser debidas a una separación no del todo radical entre las distintas fracciones en el proceso de elución. A este fin efectuamos un nuevo ensayo en el cual hicimos pasar a través de la columna en la fase inicial 150 ml de solución M/100 de fosfato disódico, es decir, la solución base de la técnica standard, sin gradiente alguno. Se obtuvo entonces una curva perfectamente definida, cuyo tramo descendente llega ya a la línea de base, comportándose esta fracción como gamma-globulina homogénea en el desarrollo electroforético.

Esta técnica resulta, pues, idónea para el aislamiento de gamma-globulina en un material biológico con fines preparativos. Sin establecimiento de gradiente alguno, y, por tanto, sin complicaciones de mon-

taje, y en un intervalo de 4-5 horas, se consigue obtener gamma-globulinas en un alto estado de pureza, solamente impurificadas con componentes de bajo peso molecular, fácilmente dializables posteriormente. El montaje de todo el sistema de fraccionado en cámara frigorífica permite, finalmente, eliminar una posible alteración proteica por la temperatura.

Por arriba del tuzo 10, y hasta terminar la fase gradiente, se obtiene un número de fracciones con amplia gama de variación en su contenido relativo de proteínas, según la especie animal estudiada. El número de ellas varía también entre estrechos límites, de 5 a 8, guardando en general este método de fraccionado sérico en esta zona una homogeneidad menor que la electroforesis clásica. En comparación con ésta, el estudio electroforético de las fracciones obtenidas entre los límites indicados plantea una diferencia evidente entre las resoluciones obtenidas por uno y otro método, como corresponde a la diferente naturaleza físico-química de ambos procesos.

Las fracciones así delimitadas presentan movilidades de globulinas beta y alfa, sin separación evidente de ambas, existiendo a lo más un predominio de las beta en las fracciones de elución más temprana, y de las alfa en las más tardías. En aquéllas, además, se observan trazas de gamma-globulinas, cuya existencia vimos cómo podía explicarse; no hay evidencia alguna de albúmina.

Constituye ésta, sin lugar a dudas, la zona de mayor heterogeneidad proteica, y por ello no resulta extraño que se obtenga para ella un fraccionado complejo. FAHEY y col. (4) detectan hasta tres componentes beta-globulínicos y siete alfa-globulinas diferentes, separados por un procedimiento de elución parecido al propuesto por nosotros, si bien algunos de ellos sólo en trazas y otros incluidos en la zona de elución de las albúminas.

En ninguno de los casos estudiados

llegan a eluirse componentes séricos de naturaleza albuminoidea en la fase de elución con gradiente continuo, lo que habla en favor de una fuerte unión de la albúmina a la DEAE-celulosa. La sustitución del sistema gradiente por la solución M/10 de fosfato monopotásico provoca la elución inmediata de la albúmina, con una subida brusca de la cantidad de proteína que fluye de la columna. La heterogeneidad de esta fracción salta a la vista desde el principio, y mientras que en los sueros de ciertas especies (vaca y cabra) se observa la existencia de un solo componente mayoritario, en los de otras (cerdo, caballo, rata, oveja y hombre) son dos los componentes proteicos mayoritarios de esta zona de elución. En cualquier caso, la vuelta a la línea de base con anulación de la cantidad de proteínas eluidas, es muy lenta, lo que indica la existencia de componentes fuertemente ligados al cambiador, solamente eluibles a bajos valores de pH y fuertes concentraciones iónicas.

El análisis electroforético de la fracción albúmina revela la presencia muy mayoritaria de ésta, y de sólo trazas de otros componentes proteicos de movi- lidades asimilables a beta- y alfa-globulinas, por comparación con el desarrollo del suero global. La presencia de globulinas en esta zona de elución tardía ya se indicó anteriormente, y aún se ha descrito la existencia de proteínas más fuertemente ligadas, eluidas en la fracción de cola del fraccionado.

Varios son los factores que pueden alterarse en el fraccionado manteniendo constante el gradiente de pH y fuerza iónica propuestos. En primer lugar, podemos variar el volumen de las fracciones con sólo cambiar el sifón calibrado del colector. La recogida de fracciones de pequeño volumen tiene la ventaja de una mayor capacidad resolutive, pero multiplica enormemente las operaciones posteriores de dosificación proteica.

Estas últimas pueden acortarse efectuando la dosificación de proteínas por lectura espectrofotométrica directa al ultravioleta (280 milimicras), técnica que, si bien es apreciablemente menos sensible que la de LOWRY (2), es mucho más fluida.

El tamaño de la columna puede siempre ser cambiado si mantenemos la proporción 10:1 entre longitud y diámetro interno de la misma; en cualquier caso, el peso de DEAE-celulosa que admite una columna es aproximadamente en gramos la cuarta parte del volumen de ella. Simultáneamente, a medida que crece el peso de cambiador, aumenta también el volumen de suero que puede fraccionarse.

El someter la muestra a fraccionar a una diálisis previa es un procedimiento muy extendido (1). Nosotros, en experiencias que hemos efectuado sobre otros materiales biológicos, hemos encontrado fraccionados de muy distinta naturaleza, según se emplearan extractos directos o previamente dializados, con un mayor poder resolutive cuando se usaban estos últimos, especialmente en la fracción que eluía en cabeza, que apareciendo perfectamente homogénea con muestras sin dializar, se subfraccionaba tres y cuatro veces cuando la diálisis se efectuaba previamente; además, las fracciones obtenidas aparecen ahora exentas de sustancias de bajo peso molecular. Por el contrario, es prácticamente imposible de evitar que durante el proceso de diálisis precipiten algunas proteínas, que quedan así eliminadas. En cualquier caso, la diálisis será conveniente en aquellos materiales biológicos ricos en sales, ya que a la presencia de éstas se debe solamente la baja capacidad resolutive en las fracciones iniciales del fraccionado.

El empleo del sistema de evolución propuesto, a base de soluciones de fosfato, viene limitado muchas veces cuando lo que se desea es aislar una determinada fracción proteica de naturaleza

más o menos incompatible con dichos iones inorgánicos, bien porque actúen como inactivadores de una proteína enzimática, porque bloqueen un activador inorgánico, o porque la naturaleza del proceso de localización enzimática sea incompatible con ellos (aislamiento de fosfatasas, por ejemplo). En tales casos, la sustitución de este sistema por otro no incompatible, da resultados prácticamente análogos cuando las condiciones de pH y fuerza iónica se mantienen inalteradas.

### Resumen

Se describe un nuevo sistema gradiente a base de soluciones tampón de fosfatos, con el cual se hace variar de forma continua el pH de 8,52 a 4,40 y la concentración iónica de  $M/100$  a  $M/10$  mediante un sistema de mezcla de sencillo montaje.

Con él se ha estudiado el fraccionamiento proteico del suero de diversos mamíferos (hombre, vaca, oveja, cabra, cerdo, caballo y rata) sobre columnas de DEAE-celulosa, obteniéndose en todos los casos una gran uniformidad en el fraccionamiento, con variaciones prácticamente sólo de orden cuantitativo.

La única diferencia evidente de orden cualitativo radica en la albúmina, que en algunas especies es completamente homogénea y en otras aparece dividida en dos fracciones mayoritarias.

En todos los casos la fracción gamma-globulínica aparece perfectamente homogénea, en la zona de más rápida elución, y circunscrita a un número muy limitado de tubos. Estas condiciones resultan ideales para una recuperación cuantitativa de ella en un material biológico.

### Summary

#### Some improvements in serum protein fractioning on DEAE-cellulose

A new gradient a system is described based on phosphate buffer solutions, by means of which the pH is continuously changed from 8.52 to 4.40 and the ionic concentration from  $M/100$  to  $M/10$ , using an easily system of mixing.

A study has been made by means of

this system of the protein fraction of the serum of different mammals (man, cow, sheep, goat, pig, horse and rat) on columns of DEAE-cellulose, and great uniformity has been obtained in the fraction in all cases, with variations practically only of a quantitative order.

The only evident qualitative difference lies in albumin, which in some species is completely homogenous and in others appears divided into two majority fractions.

In every case the gamma-globulin fraction appears perfectly homogeneous in the zone of most rapid elution, and confined to a very limited number of tubes. These conditions are ideal for a quantitative recovery of this fraction in a biological material.

### Bibliografía

- (1) Baisden, L. A., and Tromba, F. G.: *J. Parasitol.*, **49**, 375, 1963.
- (2) Cartier, P. et Picard, J.: *Ann. Biol. Clin.*, **7**, 1, 1957.
- (3) Duane, W.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 2238, 1961.
- (4) Fahey, J. J., Mc Coy, P. F., and Goulian, M.: *J. Clin. Invest.*, **37**, 272, 1958.
- (5) Forti, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 200, 1961.
- (6) James, K., and Stanworth, D. R.: *J. Chromatog.*, **15**, 324, 1964.
- (7) James, K., and Stanwoth, D. R.: *J. Chromatog.*, **15**, 336, 1964.
- (8) Jencks, W. P., Jetton, M R., and Durrum, E. L.: *Biochem. J.*, **60**, 205, 1955.
- (9) Lowry, O. H., and Rosebrough, N. J.: *J. Biol. Chem.*, **197**, 265, 1951.
- (10) Mandeles, S.: *J. Chromatog.*, **3**, 256, 1960.
- (11) Monteoliva, M.: *Ars Pharm.*, (en prensa).
- (12) Peterson, E. A., and Sober, H. A.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 751, 1956.
- (13) Rouser, G., Galli, C., and Lieber, R.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **41**, 836, 1964.
- (14) Smith, L. P.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **82**, 231, 1964.
- (15) Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckoff, M. M., and Peterson, E. A.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 756, 1956.