

# Desarrollo de Material de referencia Certificado (CRM) de Albúmina de Suero Bovino (BSA)

Amedei Hugo Alejandro<sup>1</sup>, Juan Pablo Cedrés<sup>1</sup>, Toyé Laura<sup>1</sup>, Nigro Fabián<sup>1</sup>, Gatti Patricia<sup>2</sup>, Cappa María de los Ángeles<sup>3</sup>.  
INTI-Biotecnología Industrial<sup>1</sup>, Gerencia de Metrología, Calidad y Ambiente<sup>2</sup>, Gerencia de Innovación Desarrollo<sup>3</sup>.  
Amedei@inti.gov.ar

## Objetivos

Desarrollar, producir y caracterizar un Material de Referencia Certificado de Albúmina de Suero Bovino, conteniendo 140mg de la proteína de alta pureza. Establecer trazabilidad en las determinaciones analíticas sobre productos proteicos de las industrias Biotecnológicas, laboratorios clínicos e investigación y países en la región Latino-Americana y de Caribe.

Generar un equipo de trabajo con otros institutos nacionales de Metrología de la región para el desarrollo conjunto de estos materiales entre los que se encuentra Argentina (INTI), México (CENAM) y Brasil (INMETRO), beneficiará sinérgicamente el avance en el campo proteómico dando la sustentabilidad a las Mediciones en la región.

## Objetivo Específico

Diseñar una propuesta de proyecto que permita la producción conjunta a nivel nacional de MRC de BSA, incluyendo las necesidades de materiales y gastos para la producción de lotes de 550 viales de MRC de BSA.

## Introducción

La biometrología es la ciencia de las mediciones aplicadas al campo de la biología. Los materiales de referencia certificados (MRC) sustentan el establecimiento de la trazabilidad metrológica de las mediciones elementales que realizan los laboratorios analíticos. Es necesario contar con MRC y con métodos validados que permitan alcanzar resultados confiables, ya que éstos se usan con fines regulatorios, legales o simplemente generan avances firmes y confiables en los campos de aplicación (1).

En particular Latinoamérica carece circunstancialmente de producción de MRC de BSA de alta pureza.

Dentro de los materiales de referencia de uso en biología se pueden citar al suero humano congelado del CENAM y células somáticas INTI.

En el mundo hay dos institutos metrológicos que producen este MRC, uno es el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) de Estados Unidos (2) quien produce una solución proteica de BSA al 7% y el otro es el Instituto

Nacional de Metrología de China NIM (3) quien produce un liofilizado proteico de BSA.

Este proyecto se presentó a una convocatoria del SIM (Sistema interamericano de metrología) bajo la temática de fortalecimiento metrológico Regional, en la cual Participaron 19 proyectos. El proyecto persigue desarrollar el material de referencia por medio de una colaboración regional. Contempla el desarrollo del material a cargo de INTI y la certificación a cargo de los otros integrantes del proyecto, con una duración de dos años a partir de julio de 2017.

El Centro de Investigación y desarrollo del Biotecnología Industrial del INTI, Argentina, dispone de una planta piloto para producción de proteínas de alta pureza, con tecnología de punta en el campo. Y es de interés para el país mejorar la calidad y trazabilidad de las mediciones en biometrología, siendo responsabilidad del INTI establecer trazabilidad metrológica de las mediciones en el territorio nacional.

La purificación proteica es un paso clave para la obtención de un material de referencia candidato a ser caracterizado y certificado. Al mismo tiempo contiene parámetros específicos que hacen que el proceso pueda llevarse a cabo tanto física como económicamente. Por lo tanto, la realización de ensayos previos a baja escala es clave, para definir y caracterizar la preparación del MRC.

En este artículo se muestra el inicio del desarrollo del Primer material de referencia proteico latinoamericano, cuyo alcance se limita a establecer la cantidad de material de partida y resina para producir 1 lote de 550 viales, y estimar la capacidad productiva máxima por lote del MRC.

## Descripción

Se realiza la preparación del material, realizando una purificación por columna de intercambio aniónico fuerte, a mini-escala, en el equipo "Akta Purifier", cromatógrafo de flujo rápido para purificación proteica. Las distintas fracciones de purificación obtenidas se muestran en la figura 1, dichas fracciones fueron caracterizadas cuantificando proteínas totales por método DOC-TCA Lowry (Ver tabla 1) y explorando perfiles proteicos de purificación por Electroforesis SDS-PAGE

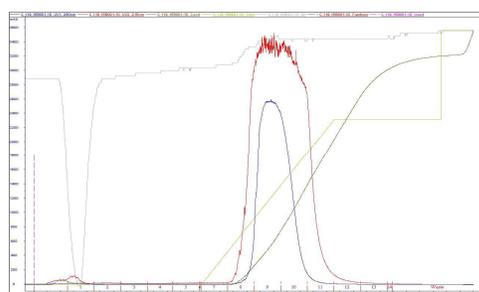
tinción coomassie Coloidal (figura 2) y las impurezas se estudiaron por Electroforesis SDS-PAGE tinción plata (figura 3).

## Resultados

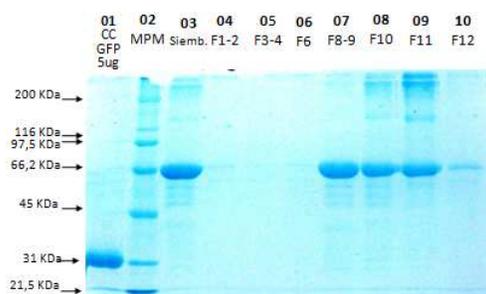
La tabla 1 muestra los resultados obtenidos de la purificación por proteínas totales para las fracciones mas importantes de la purificación, en la figura 1 se muestran los perfiles cromatografico obtenidos, mientras que en la figuras 2 se presentan los perfiles proteicos de cada fracción del proceso.

Nombre de la Fracción	Proteínas totales	Rendimiento
Siembra	55mg	75%
Fracción 8-9	42mg	

**Tabla 1:** La tabla muestra los resultados cuantitativos obtenidos sobre la fracción ingresada (siembra) y Purificada (F-8-9) determinados por el método de cuantificación de proteínas totales DOC-TCA Lowry.

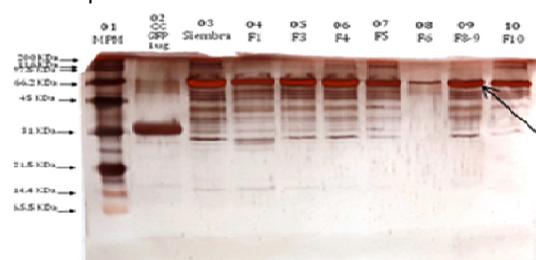


**Figura 1:** Cromatograma de purificación de BSA, a partir de material comercial.



**Figura 2:** Fotografía SDS-PAGE 16%, Tinción coomassie blue coloidal.

Por otro lado se evaluó la pureza de la fracción 8-9 (calle 09 de la figura 3). La misma resultó purificada para proteínas mayores a 66KDa, pero se observan claramente impureza de menor peso molecular.



**Figura 3:** Gel SDS-PAGE, Tinción plata. Muestra las impurezas proteicas aun presentes en la siembra y F 8-9. La flecha muestra la proteína BSA a purificar.

## Conclusiones

A partir de este ensayo se logró establecer un protocolo analítico para verificar el proceso de purificación proteico, el mismo deberá ser perfeccionado.

Además se pudo evaluar que la resina utilizada presenta un buen rendimiento de purificación de la proteína, obteniendo 42 mg de BSA por mililitro de resina, lo cual nos da una pauta de la viabilidad industrial del proceso (Tabla 1).

Para nuestro caso un lote de 550 viales, se espera partir de 930 ml de material de partida (Solución impura de BSA al 7%) y se proyecta utilizar 1,8 litros de resina de Intercambio Iónico. En cuanto a la capacidad productiva máxima, el centro de biotecnología Industrial cuenta con equipos de cromatografía que pueden emplear más de 80 litros de resina, por ende, purificar 3,3 Kgr Material de referencia por lote en 1 semana.

Analizando las impurezas, es evidente que se debería optimizar el proceso de Purificación dado que se detectan impurezas proteicas de peso molecular menor a 66KDa (figura 3), de todos modos, no es objetivo de este primer ensayo.

Este desarrollo será realizado por el centro de Biotecnología Industrial en el marco de la Biometrología hasta certificar el MRC en Junio del 2019.

## Agradecimientos

Héctor Laiz por la lectura e impulso de la propuesta, a Gabriel Sternik por corrección del proyecto en versión Inglesa, Laura Matos por la articulación de actividades y espacios para realizar el ensayo, Carmen Caro, Cancela Ezequiel, Joaquín Molina por intervenciones analíticas, Leandro Navarro soporte Purificaciones, Daniel Kapitonozyk lavado y acondicionamiento de materiales.

A Kirsten Mahon (Universidad de Virginia Tech, Estados Unidos), por la revisión del Inglés técnico en la presentación realizada ante el SIM.

## Bibliografía

1. John Marriott, Gavin O'Connor, Helen Parkes- Final Report Study of Measurement Service and Comparison Needs for an International Measurement Infrastructure for the Biosciences and Biotechnology: Input for the BIPM Work Program. 04-03-2011. Rapport BIPM 2011/02.
2. Certificate of Analysis Standard Reference Material 927d, Bovine Serum Albumin (7% solution) NIST (Certificate Issue Date: 25 March 2014). Expiration of Certification: 30 of Septiembre 2016.
3. Liqing Wu, Bin Yang, Jiaming Bi, King Wang. Development of bovine serum albumin certified reference material. Anal Bianal Chem (21/04/2011) 400:3443-3449.