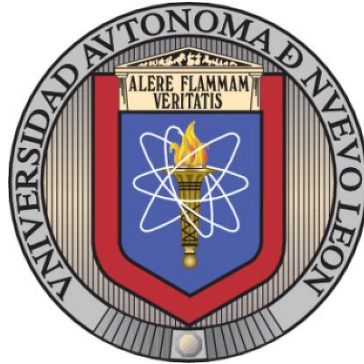


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y
BIOFÁRMACOS EN *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO LA PROTEÍNA SMBP
COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN**

Por

TERESA VARGAS CORTEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con Orientación en Farmacia.**

Agosto, 2014

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS EN
ESCHERICHIA COLI UTILIZANDO LA PROTEÍNA SMBP COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN**

Aprobación de la tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

PRESIDENTE

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

SECRETARIA

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

VOCAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez

SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS EN
ESCHERICHIA COLI UTILIZANDO LA PROTEÍNA SMBP COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN**

Revisión de la tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

ASESOR

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Benito David Mata Cárdenas

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

COMITÉ TUTORIAL

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas esas personas e instituciones que en mayor o menor medida me ayudaron a construir este proyecto, no solo profesional si no de vida.

A CONACyT por las becas y soporte económico recibido. A la escuela de graduados en Ciencias de la Facultad de Ciencias Químicas por todo el apoyo brindado de instalaciones así como económico.

Le doy gracias a mi asesor de tesis el Dr. Xristo Zárate de quien he aprendido muchas cosas y sé que aun puedo seguir aprendiendo, gracias por su paciencia, por guiarme y por todo el soporte que me brindó.

A mi comité tutorial: Dra. María Elena Cantú, Dra. Mónica Azucena Ramírez y el Dr. Benito David Mata por todos sus consejos, correcciones, recomendaciones, tiempo y ayuda durante estos dos años.

A la coordinadora del posgrado en Farmacia, la Dra. Lucia Cantú por todo su apoyo, su espléndido trabajo y atención a mí y a los alumnos de Farmacia.

A nuestro coordinador ante CONACyT, el Dr. Jacobo Ruiz, muchas gracias por su profesionalismo y siempre estar al pendiente de todo lo referente con CONACyT, sobre todo la ayuda que me presto para la beca mixta.

Muchas gracias también a la Dra. Ma. Teresa Garza González por su apoyo y consejos en todos los aspectos y siempre tener un tiempo para nosotros los alumnos de posgrado. También por ayudarme a creérmela, poquito a poco.

A mi querido amigo y jefe del INGEN, el Dr. Isaías Balderas, gracias por su ayuda, consejos y aguantarme cuando lo necesitaba y también por tener a alguien con quien platicar de otras cosas que no fueran de la escuela.

A la Dra. Ivonne Camacho, por siempre creer en mí, por sus hermosas palabras de aliento y siempre haber estado allí para mí desde la licenciatura.

A todos mis maestros de la licenciatura, por haberme hecho amar mi carrera, por tenerme paciencia, por enseñarme y guiarme siempre. A mis maestros de posgrado por guiarme en lo que fue una nueva etapa de mi vida y mostrarme que siempre se puede aprender más.

También a mis queridas maestras de la preparatoria, QFB. Rosario Zamora, QFB. Salome. Siempre las tendré en mi corazón, por apoyarme siempre, les prometí que sería una excelente QFB, y así será mientras Dios me preste vida.

A la Dra. Megan McEvoy por aceptarme en su laboratorio y a las chicas del mismo que nos apoyaron bastante durante la estancia en la Universidad de Arizona.

A Karina Navarro, por siempre recibirme con una sonrisa, tener paciencia para explicarme con lujo de detalle y siempre estar al corriente con cualquier cosa que se necesitase, gracias por tu excelente trabajo.

A mis amigos de la licenciatura, que siempre han estado conmigo, se convirtieron en mis hermanos, me abrieron las puertas de su casa, corazón y familia, y desde entonces se convirtieron en mis hermanos.

A mis queridos amigos del posgrado, a todos ustedes que quizás tengo poquito de conocerlos, pero sé que esta amistad perdurará mucho, mucho tiempo más. Carlos (tu y yo estábamos destinados a conocernos), Julio (por siempre escucharme y alegrarme), Zutroy (por ser Zutroy), Celene (por siempre tener una sonrisa para mi), Cesar (por compartirme tu alegría), Viri (por tu ayuda sincera), Gera (yo soy 89), Dany (por tu sinceridad y hacerme reír), e Iris (por que se cuento contigo).

A mis amiguitas de QPN, Adri Hdz (por siempre escucharme y apoyarme en todo momento), Adri Romo (por todos tus consejos y apoyo), Jessica y Karen (confió en ustedes).

A mis queridos amigos del INGEN, Enrique Cantú (por enseñarme, encaminarme y tener paciencia conmigo, por siempre escucharme y cuidarme), Jessica Gómez (por siempre estar al pendiente de mí y apoyarme siempre en el lab), Eder Arredondo (por tu guía, consejos y cuidarnos), Isaac Díaz (por siempre animarme), Gonzi Fonzi (te extrañamos), Aldo Clemente (por tus sabios consejos en todo momento). A mis niños de servicio, Silvia, Marisol, Memo y Oscar, por todo su apoyo y esos momentos alegres que me hicieron pasar.

A mi hermosa familia por siempre apoyarme y siempre brindarme un lugar al que regresar, a mi papa por su sabiduría y cuidarme, a mi madre por enseñarme como debe luchar una mujer, a nunca depender de nadie y siempre dar lo mejor de mí. A mi hermano mayor Esteban por siempre cuidarme y estar al pendiente de mí y a su querida esposa Janeth. A mis queridos hermanos menores por siempre estar conmigo, Enrique por mostrarme que a veces la serenidad es el mejor camino, a Adrianita por enseñarme que siempre habrá una solución.

Por último y más importante, le agradezco a Dios, gracias por tu amor eterno.

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto a todas las personas que siempre estuvieron a mi lado en todo momento, a todas esas personas importantes para mí y que siempre han creído en mí y me han ayudado a levantarme cuando todo lo veo perdido.

Dedico mi trabajo a mi querida familia, el tesoro más grande que la vida y Dios me han dado. A mis padres Esteban Vargas Medrano y Leticia Cortez Bravo y mis hermanos, Adriana, Enrique, Esteban y su hermosa esposa Janeth.

A mis amigos, que me han acompañado durante las etapas de mi vida y se han quedado en mi corazón por siempre.

A todos mis maestros que de alguna manera siempre me alentaron a superarme día con día.

TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo	Página
CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO 2	21
2. ANTECEDENTES	21
2.1. SmbP como proteína de fusión	21
2.2. Purificación de proteínas	27
2.3. Cromatografía de afinidad	28
2.3.1. Uso de proteínas de fusión en la cromatografía de afinidad	29
2.3.2. Purificación por medio de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)	29
2.3.3. Purificación por medio de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)	33
CAPÍTULO 3	35
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	35
3.1. Objetivo general	35
3.2. Objetivos específicos	35
3.3. Hipótesis	36
CAPÍTULO 4	37
4. METODOLOGÍA	37
4.1. Estrategia general experimental	37
4.2. Crecimiento de <i>Nitrosomonas europaea</i>	38
4.3. Recolección de células de <i>N. europaea</i>	40
4.4. Extracción de ADN genómico	40
4.5. Amplificación de SmbPp y SmbPc	41
4.6. Construcción de plásmidos	42
4.6.1. Construcción de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc	42
4.6.1.1. Digestión de plásmidos y genes de SmbPp y SmbPc	42

4.6.1.2.	Ligación de pET28b más SmbPp y SmbPc _____	43
4.6.1.3.	Transformación de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc _____	43
4.6.1.4.	Extracción de ADN plasmídico de clonas seleccionadas _____	44
4.6.1.5.	Cribado de colonias transformantes _____	44
4.6.2.	Construcción de pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-SmbPc-GFP _____	45
4.6.2.1.	Digestión de GFP y plásmidos pET28b-SmbPp _____	45
4.6.2.2.	Ligación de pET28b-SmbPp y pET28b-GST con GFP _____	46
4.6.2.3.	Transformación de pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-SmbPc-GFP _____	46
4.6.2.4.	Extracción de ADN plasmídico de clonas seleccionadas _____	46
4.6.2.5.	Cribado de colonias transformantes _____	46
4.6.3.	Construcción de pET30a-SmbPc-GFP y pET30a-SmbPp-GFP _____	47
4.6.3.1.	Amplificación de SmbPp-GFP y SmbPc-GFP _____	47
4.6.3.3.	Ligación de pET30a más SmbPp-GFP y SmbPc-GFP _____	48
4.6.3.4.	Transformación de pET30a más SmbPp-GFP y SmbPc-GFP _____	49
4.6.3.5.	Extracción de ADN plasmídico _____	49
4.6.3.6.	Cribado de colonias transformantes _____	49
4.6.4.	Construcción de pET30a-SmbPc-RFP, pET30a-SmbPp-RFP y pET28b-GST-RFP _____	49
4.6.4.1.	Amplificación de RFP _____	50
4.6.4.2.	Digestión de inserto RFP y de plásmidos pET30a-SmbPp-GFP, pET30a-SmbPc-GFP y pET28b-GST-GFP _____	51
4.6.4.3.	Ligación de pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET30a-GST más RFP _____	51
4.6.4.4.	Transformación de pET30a-SmbPp-RFP, pET30a-SmbPc-RFP y pET28b-GST-RFP _____	52
4.6.4.5.	Extracción de ADN plasmídico de las colonias obtenidas _____	52
4.6.4.6.	Cribado de colonias transformantes _____	52
4.6.5.	Construcción de plásmidos pET30a-SmbPp-X, pET30a-SmbPc-X y pET28b-GST-X _____	53
4.6.5.1.	Amplificación de insertos _____	53
4.6.5.2.	Digestión de plásmidos pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET28b-GST e insertos de interés _____	54
4.6.5.3.	Ligación de pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET28b-GST con insertos de interés _____	55
4.6.5.4.	Transformación de la ligación pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET28b-GST con insertos de interés _____	55
4.6.5.5.	Extracción de ADN plasmídico _____	55
4.6.5.6.	Cribado de colonias transformantes _____	55
4.6.6.	Construcción de plásmido pET30a-SmbPcE-GFP _{Ent} _____	57
4.6.6.1.	Amplificación de SmbPcE y GFP _{Ent} _____	57
4.6.6.2.	Digestión de los insertos SmbPcE y del plásmido pET30a _____	58
4.6.6.3.	Ligación de pET30a más SmbPcE _____	59
4.6.6.4.	Transformación de pET30a-SmbPcE _____	59
4.6.6.5.	Extracción de ADN plasmídico _____	59
4.6.6.6.	Cribado de las colonias transformantes _____	59
4.6.6.7.	Digestión de pET30a-SmbPcE y GFP _{Ent} _____	60
4.6.6.8.	Ligación de pET30a-SmbPcE más GFP _{Ent} _____	61
4.6.6.9.	Transformación de pET30a-SmbPcE-GFP _{Ent} _____	61
4.6.6.10.	Extracción de ADN plasmídico _____	61
4.6.6.11.	Cribado de colonias transformantes _____	61
4.7.	Expresión de proteínas _____	62

4.7.1.	Transformación de la cepa de <i>E. coli</i> BL21(DE3)	62
4.7.2.	Expresión piloto de proteínas	63
4.7.2.1.	Obtención de la fracción soluble e insoluble	63
4.7.2.2.	Visualización de la expresión	64
4.7.3.	Escalamiento de la expresión	64
4.8.	Purificación de proteínas	65
4.8.1.	Purificación de SmbPc-GFP	65
4.8.1.1.	Lisis celular de sedimento celular de expresión	65
4.8.1.2.	Purificación de SmbPc-GFP mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC) con resina	65
4.8.1.3.	Purificación de SmbPc-GFP con iones de cobre y níquel en resina IMAC	66
4.8.1.4.	Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus	67
4.8.1.5.	Dialísis para remoción de NaCl	67
4.8.1.6.	Cromatografía de intercambio aniónico con el sistema ÄKTA prime plus	68
4.8.2.	Purificación de SmbPcE-GFP _{ENT}	69
4.8.2.1.	Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus	69
4.8.3.	Purificación de SmbPp-RFP	69
4.8.3.1.	Choque osmótico para la obtención de la fracción periplásmica	69
4.8.3.2.	Purificación de SmbPp-RFP por medio de cromatografía de afinidad de iones metálicos (IMAC) con resina cargada con Cu (II)	70
4.8.3.3.	Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus	70
4.9.	Remoción de la proteína de fusión	71

CAPÍTULO 5 **72**

5.	RESULTADOS	72
5.1.	Crecimiento de <i>Nitrosomonas europaea</i>	72
5.2.	Extracción de ADN genómico de <i>N. europaea</i>	73
5.3.	Amplificación de SmbPc y SmbPp	74
5.4.	Construcción de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc	75
5.5.	Construcción de pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-GST-GFP	75
5.6.	Construcción de pET30a-SmbPp-GFP y pET30a-SmbPc-GFP	76
5.7.	Construcción de pET30a-SmbPc-RFP, pET30a-SmbPp-RFP y pET28b-GST-RFP	77
5.8.	Construcciones de pET30a-SmbPc, pET30a-SmbPp y pET28b-GST con insertos de interés	78
5.8.1.	Amplificación de insertos	78
5.8.2.	Tamizaje de ADN plasmídico positivo a los insertos de interés	79
5.9.	Construcción de pET30a-SmbPcE-GFP _{ENT}	83
5.9.1.	Amplificación de SmbPcE y GFP _{ENT}	84
5.9.2.	Construcción de pET30a-SmbPcE	84
5.9.3.	Construcción de pET30a-SmbPcE-GFP _{ENT}	85
5.10.	Construcciones obtenidas	86
5.11.	Expresión de proteínas	86
5.11.1.	Expresión piloto de SmbPp y SmbPp-GFP	86
5.11.2.	Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-GFP, SmbPp-GFP, GST-GFP y MBP-GFP	87
5.11.3.	Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-RFP, SmbPp-RFP, GST-RFP y MBP-RFP	88

5.11.4.	Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-SHY2, SmbPp-SHY2 y GST-SHY2	89
5.11.5.	Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-LovR, SmbPp-LovR y GST-LovR	91
5.11.6.	Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-NDPK2 y GST-NDPK2	93
5.12.	Purificación de proteínas	94
5.12.1.	Purificación de SmbPc-GFP por cromatografía de afinidad con iones metálicos IMAC con resina cargada con Cu(II) y Ni(II)	94
5.12.2.	Purificación de SmbPc-GFP mediante el sistema de FPLC ÄKTA prime plus	98
5.12.2.1.	Cromatografía IMAC con columna de HisTrap HP	98
5.12.2.2.	Cromatografía de intercambio aniónico con columna HiTrap Q HP	99
5.12.3.	Purificación de SmbPcE-GFP _{ENT} mediante el sistema de FPLC ÄKTA prime plus	101
5.12.4.	Purificación de SmbPp-RFP mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC) con resina	102
5.12.5.	Purificación de SmbPp-RFP mediante el sistema de FPLC ÄKTA prime plus	103
5.13.	Remoción de la proteína de fusión	104
CAPÍTULO 6		106
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	106
CAPÍTULO 7		119
7.	CONCLUSIONES	119
CAPÍTULO 8		121
8.	PERSPECTIVAS	121
CAPÍTULO 9		122
9.	SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS	122

LISTA DE TABLAS

<i>TABLA 1. Medio 1 empleado para el crecimiento de N. europaea, modificado de Brett, M.B., Rusell, L., Wilson, A.F. (2004)</i>	38
<i>TABLA 2. Medio 2 empleado para el crecimiento de N. europaea, Cabello, F. (2007)</i>	38
<i>TABLA 3. Medio 3 empleado para el crecimiento de N. europaea (ATCC Medium: 2265 Nitrosomonas europaea medium)</i>	39
<i>TABLA 4. Condiciones empleadas en los diferentes medios empleados</i>	40
<i>TABLA 5. Iniciadores usados para la amplificación de SmbPp y SmbPc</i>	41
<i>TABLA 6. Iniciadores empleados para la amplificación de RFP</i>	50
<i>TABLA 7. Iniciadores empleados para la amplificación de SmbPcE y GFPENT</i>	58
<i>TABLA 8. Construcciones obtenidas con diferentes plásmidos</i>	86
<i>TABLA 9. Disposición de los residuos generados</i>	122

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estrategia general experimental</i>	37
<i>Figura 2. Cultivo de N. europaea a los tres días.</i>	73
<i>Figura 3. Cultivo de N. europaea a la semana.</i>	73
<i>Figura 4. Sedimento celular de N. europaea.</i>	73
<i>Figura 5. Extracción de ADN genómico de N. europaea.</i>	74
<i>Figura 6. Amplificación de SmbPp y Smbpc.</i>	74
<i>Figura 7. Análisis de restricción para la construcción pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc.</i>	75
<i>Figura 8. Análisis de restricción de las construcciones pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-GST-GFP.</i>	76
<i>Figura 9. Análisis de restricción con enzimas XhoI y NdeI de las construcciones pET30a-SmbPp-GFP y pET30a-SmbPc-GFP.</i>	76
<i>Figura 10. Análisis de restricción realizado con las enzimas XhoI y NdeI para las construcciones de pET30a-SmbPp-RFP y pET30a-SmbPc-RFP.</i>	77
<i>Figura 11. Amplificación con iniciador delantero de los genes de interés e iniciador T7 reverso para la confirmación de insertos en construcciones en pET28b usando GST como proteína de fusión.</i>	78
<i>Figura 12. Amplificaciones para SHY2, PixE y LovR.</i>	79
<i>Figura 13. Amplificación de NDPK2.</i>	79
<i>Figura 14. Análisis de restricción de pET30a-SmbPc-LovR y pET30a-SmbPp-LovR realizado con las enzimas NdeI y XhoI.</i>	80
<i>Figura 15. Amplificación de SmbPc-SHY2, SmbPc-NDPK2 y SmbPc-PixE.</i>	80
<i>Figura 16. Amplificación del inserto SHY2 a partir de la construcción pET30a-SmbPp-SHY2 con los iniciadores propios del gen.</i>	81
<i>Figura 17. Amplificación de NDPK2 a partir de la construcción de pET30a-SmbPp-NDPK2 realizada con los iniciadores propios del gen.</i>	82
<i>Figura 18. Amplificación de los genes de LovR y SHY2 con sus respectivos iniciadores a partir de las construcciones de pET28b-GST-LovR y pET28b-GST-SHY2</i>	83
<i>Figura 19. Amplificación de SmbPcE (2), SmbPpE (3) y GFPENT (4) con los iniciadores propios de los genes.</i>	84
<i>Figura 20. Amplificación de SmbPcE (carriles 7 a 10) con su iniciador delantero y un iniciador reverso de T7 a partir del ADN plasmídico de las construcciones de pET30a-SmbPcE.</i>	85
<i>Figura 21. Análisis de restricción de la construcción pET30a-SmbPcE-GFPENT realizado con las enzimas NcoI y XhoI.</i>	86
<i>Figura 22. Expresión piloto de SmbPp y SmbPp-GFP.</i>	87
<i>Figura 23. Comparación de expresión de GFP con las proteínas de fusión SmbPc, SmbPp, GST y MBP.</i>	88
<i>Figura 24. Comparación de expresión de RFP con las proteínas de fusión SmbPc, SmbPp, GST y MBP.</i>	89

<i>Figura 25. Expresión piloto de SmbPc-SHY2, SmbPp-SHY2 y GST-SHY2, esto correspondiendo a sus fracciones solubles.</i>	90
<i>Figura 26. Expresión piloto de SmbPc-SHY2, SmbPp-SHY2 y GST-SHY2 correspondientes a la fracción insoluble.</i>	91
<i>Figura 27. Expresión piloto de GST-LovR, SmbPc-LovR y SmbPp-LovR en sus fracciones solubles.</i>	92
<i>Figura 28. Expresión piloto de GST-LovR, SmbPc-LovR y SmbPp-LovR en sus fracciones insolubles.</i>	92
<i>Figura 29. Expresión piloto de SmbPc-NDPK2 y GST-NDPK2 en sus fracciones solubles e insolubles.</i>	93
<i>Figura 30. Cromatografía de afinidad Cu(II) en condiciones suaves (baja concentración de NaCl, sin imidazol en los lavados y baja concentración del mismo para la elución) para la purificación de SmbPc-GFP.</i>	94
<i>Figura 31. Cromatografía de afinidad con Ni(II) en condiciones suaves (baja concentración de NaCl, sin imidazol en los lavados y baja concentración del mismo para la elución) para la purificación de SmbPc-GFP.</i>	95
<i>Figura 32. Cromatografía de afinidad Cu(II) en condiciones fuertes (alta concentración de NaCl e imidazol para lavado y elución) para la purificación de SmbPc-GFP.</i>	96
<i>Figura 33. Cromatografía de afinidad Ni(II) en condiciones fuertes (alta concentración de NaCl y de imidazol para el lavado y elución) para la purificación de SmbPc-GFP.</i>	97
<i>Figura 34. Visualización en luz UV de la fluorescencia de las fracciones obtenidas de la cromatografía con iones de Cu(II) y Ni(II).</i>	97
<i>Figura 35. Cromatografía de afinidad con columna HisTrap HP cargada con iones de Ni(II).</i>	98
<i>Figura 36. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para SmbPc-GFP</i>	99
<i>Figura 37. Cromatografía de intercambio aniónico con la columna HiTrap Q HP, se muestran dentro del recuadro las bandas correspondientes a SmbPc-GFP.</i>	100
<i>Figura 38. Cromatograma de intercambio aniónico para SmbPc-GFP</i>	100
<i>Figura 39. Cromatografía de afinidad con columna HisTrap HP cargada con iones de Ni(II) para SmbPcE-GFP_{ENT}</i>	101
<i>Figura 40. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbPcE-GFP_{ENT}</i>	102
<i>Figura 41. Cromatografía de afinidad con resina de IMAC cargada con Cu(II) de SmbPp-RFP.</i>	103
<i>Figura 42. Cromatografía de afinidad con columna HisTrap HP cargada con iones de Ni(II) para SmbPp-RFP</i>	103
<i>Figura 43. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbPp-RFP</i>	104
<i>Figura 44. Corte de enteroquinasa para remover SmbPcE de GFP_{ENT}.</i>	105
<i>Figura 45. De derecha a izquierda, expresión de SmbPc-RFP, SmbPc-LovR y SmbPp-RFP.</i>	109
<i>Figura 46. De izquierda a derecha, control negative de BL21(DE3), GST-RFP, MBP-RFP y SmbPc-RFP.</i>	109
<i>Figura 47. Columna de HisTrap HP al momento de cargar la muestra, se puede apreciar claramente el color de SmbPc-GFP.</i>	115

NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> , para expresión de proteínas
bp	Pares de bases
CRY1	Criptocromo 1
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> , para producción y mantenimiento de ADN recombinante
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramos
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutación-S-Transferasa
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
Kbp	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LovR	Two-component receiver domain protein
M	Molar
mAu	Miliunidades de absorbancia
MBP	Proteína de unión a maltosa
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NDPK2	Nucleósido difosfato quinasa II
nM	Nanomolar
nm	Nanometros

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PixE	Proteína de subfamilia PatA
pmoles	Picomoles
RFP	Proteína roja fluorescente
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SHY2	Hipocótilo corto 2
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales (Small metal binding Protein)
SmbPc	SmbP citoplásmica
SmbPp	SmbP periplásmica
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
U.V.	Luz ultravioleta

RESUMEN

Teresa Vargas Cortez

Fecha de graduación: Agosto, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS EN *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO LA PROTEÍNA SMBP COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN

Número de páginas: 127

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
con orientación en Farmacia

Área de estudio: Ingeniería Genética

Propósito y Método del Estudio. La producción de proteínas recombinantes se ha facilitado gracias a la implementación de las proteínas de fusión, éstas tienen como fin conferir ciertas características a la proteína de interés que permitan la purificación por medio de cromatografía de afinidad. Además, las proteínas de fusión incrementan considerablemente la solubilidad de las proteínas de interés, facilitando su obtención.

SmbP (Small metal binding protein) es una proteína pequeña, de tan sólo 9.9 kDa aislada de *Nitrosomas europaea*, que posee la propiedad de unir diversos iones divalentes, como Ni(II), Cu(II), Mg(II), Mn(II) y Zn(II) e incluso trivalentes como el Fe(III). Debido a esto se propone su uso como proteína de fusión aprovechando su propiedad de unión a Cu(II) y Ni(II) y de esta manera purificar por medio de cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).

La metodología consistió en: 1) Amplificación del ADN codificante para la proteína de interés, 2) Construcción de plásmidos, 3) Transformación de *Escherichia coli* DH5 α , 4) Extracción de ADN plasmídico, 5) Tamizaje de transformantes, 6) Transformación de *E. coli* BL21(DE3), 7) Expresión de proteínas, 8) Purificación con cromatografía de afinidad unida a iones metálicos.

Contribuciones y conclusiones. Se obtuvieron diversas construcciones de plásmidos con genes de interés, entre ellos con GFP (Green Fluorescent Protein) y RFP (Red Fluorescent Protein) usadas como proteínas reporteras de expresión que permitieron visualizar su purificación. Se expresaron diversas proteínas de interés unidas a SmbP y a GST (Glutathion-S-Transferasa) y MBP (Proteína de Unión a Maltosa) usando estas dos últimas para fines comparativos.

En las pruebas de expresión comparativas se observaron rendimientos considerables por parte de SmbP, equiparables y en algunos casos mayores a los presentados con MBP y GST. Asimismo, la solubilidad que presentaron las proteínas unidas a SmbP fue mayor que la presentada por las unidas a

GST y similar a la que mostraban con MBP. Mostrando que SmbP mejora el rendimiento de expresión y genera menos cuerpos de inclusión.

Es posible purificar proteínas unidas a SmbP mediante cromatografía de afinidad unida a iones metálicos (IMAC). Se purificó GFP y RFP unidas a SmbP y se probaron dos iones, Ni(II) y Cu(II), con la primera se obtuvo un buen grado de pureza aunque con poco rendimiento, por su parte con Cu(II) el rendimiento fue mayor aunque la pureza fue menor a comparación con Ni(II). Se probaron diversas condiciones con el fin de mejorar con Cu(II) la pureza y con Ni(II) el rendimiento, donde las condiciones fuertes de purificación (alta concentración de sal e imidazol en lavado y elución) fueron las que presentaron mejores resultados.

Se purificaron GFP y RFP unidas a SmbP mediante un equipo de FPLC, ÄKTA prime plus, empleando columnas comerciales de sefarosa unida iones Ni(II) mejorando el rendimiento y la pureza de las proteínas. Además, GFP unida a SmbP se sometió a una segunda purificación por medio de intercambio aniónico usando también columnas comerciales, logrando una pureza final de

Para finalizar, SmbP es capaz de exportarse al periplasma, por lo que se crearon construcciones conservando el péptido señal. Se logró purificar la proteína RFP de la fracción periplásmica de *E. coli* mediante choque osmótico, facilitando el método de purificación (por la presencia de menos proteínas) aunque sacrificando la cantidad de proteína obtenida a comparación de expresión citoplásmica.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Los fármacos conocidos y usados hoy en día son obtenidos por numerosas vías, ya sea de manera natural o sintética. Es indudable el hecho de que por varias décadas el desarrollo de fármacos se enfocaba primordialmente a la creación y manufactura de pequeñas moléculas de origen sintético, sin embargo, esta tendencia comienza a desviarse por otro rumbo: el desarrollo de biofármacos.

El uso de proteínas terapéuticas o biofármacos para el tratamiento de diversas enfermedades se ha venido implementando cada vez más en los últimos 30 años, además se sabe que aproximadamente uno de cada cuatro nuevos fármacos que se lanzan al mercado es un biofármaco.^{1, 2} Un biofármaco es una molécula biológica con fines terapéuticos obtenido a partir de un organismo vivo, ya sea a partir de bacterias, hongos, células animales, levaduras entre otros.²

El término “biofarmacéutico” fue empleado por primera vez en 1980 y se usó para describir una clase de proteínas terapéuticas producidas por técnicas

biotecnológicas modernas, específicamente por vía de la ingeniería genética. Este término también puede acompañar a otras macromoléculas, por ejemplo, productos basados en ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o incluso a la célula completa.¹

Desde el año de 1950, se han ido investigando las proteínas producidas naturalmente en el cuerpo humano y sus obvias aplicaciones terapéuticas, algunos ejemplos pueden ser: interferones e interleucinas, factores de crecimiento, eritropoyetina, factores neurotróficos, etc.¹ Después de todo, las proteínas son los principales componentes de la función celular. La información almacenada en el ADN dirige la maquinaria sintetizadora de proteínas de la célula para producir proteínas específicas requeridas para la estructura, regulación y función de la misma.³

Aunque el potencial farmacéutico de estas moléculas reguladoras fue generalmente apreciado, el uso con fines terapéuticos resultaba impráctico debido a las pequeñas cantidades que se obtenían por medios naturales. La llegada de la tecnología del ADN recombinante supero muchas de las limitantes que se tenían y marco el comienzo de una nueva era de ciencias farmacéuticas.¹ A pesar de esto y de su incremento en la demanda, el uso de proteínas terapéuticas aún se encuentra en su etapa inicial.

Los biofármacos han claramente revolucionado la medicina actual. Sin embargo, el traer un producto de esta índole al mercado toma una gran cantidad de tiempo de investigación y recursos con muchas trabas en su desarrollo. Uno de los más grandes

retos de la industria de biofármacos es el hecho de que una gran cantidad de esta clase de medicamentos no llega a ver la luz en el mercado.⁴

No solo se encuentran dificultades en relación a la seguridad y eficiencia durante el desarrollo de biofármacos, sino también se presentan dificultades relacionadas a la producción de los mismos. El diseño y producción de biofármacos van de la mano ya que las características de dicho biofármaco deben ser definidas a la brevedad, dado que de estas dependerá en gran medida la ruta de producción y el desarrollo del método de obtención a mayores escalas.⁴

La tecnología del ADN recombinante ha tenido un gran impacto positivo en la producción de proteínas farmacéuticamente importantes. Algunas de las dificultades que ha superado son: el problema de la disponibilidad de fuentes, problemas en la seguridad del producto, provee una alternativa a la extracción directa de fuentes inapropiadas/peligrosas (fluidos humanos y animales) y facilita la generación de proteínas recombinantes terapéuticas que presentan ventajas sobre las nativas.¹

Son diversas las ventajas que ofrece la tecnología del ADN recombinante, no solo permite la producción de proteínas a gran escala usando la misma metodología, sino también permite realizar modificaciones genéticas a las mismas que provee de claras ventajas sobre las modificaciones químicas. Las proteínas generadas por ingeniería genética son biocompatibles y biodegradables, los cambios se dan en el 100% de la producción de proteínas. Las preparaciones finales no poseen contaminantes que pudiesen ser nocivos para el paciente.⁵

El desarrollo racional de mejores proteínas terapéuticas con una eficiencia incrementada, mayor seguridad, inmunogenicidad reducida y mejorada distribución proviene de una convergencia entre la comunidad científica, clínicos, tecnólogos y productores que han identificado las necesidades y han desarrollado estrategias para sobrellevarlas.⁶

La comunidad científica busca resolver los retos que la expresión de proteínas ha implicado. Ya que, a pesar del inspirador desarrollo y avances en la decodificación de los genomas, la expresión de los productos de los genes en proteínas funcionales, en especial con altos rendimientos, permanece como un reto complejo. La expresión de proteínas requiere de dos decisiones críticas iniciales: la selección de la estrategia de clonación y la selección del tipo de célula que se usará para la expresión. Así mismo, la búsqueda de un alto rendimiento agrega otros requerimientos, como la necesidad de métodos fáciles y factibles para una rápida clonación y aislamiento de proteínas.⁷

El enfoque de las tecnologías desarrolladas con un mayor impacto sobre las proteínas terapéuticas actuales comprende versiones modificadas de las proteínas nativas (obtenidas por ingeniería genética), proteínas de fusión, conjugación a polímeros, entre otras.⁶ Es obvio que la ingeniería de proteínas ha revolucionado la terapéutica basada en este tipo de biomoléculas proveyendo de herramientas para mejorar las proteínas ya existentes o crear nuevas proteínas para aplicaciones clínicas específicas.⁶

Desde 1982, más de 100 proteínas y péptidos terapéuticos han sido autorizados para su producción usando células bacterianas, fúngicas y de mamíferos. La ingeniería genética ha proporcionado las herramientas moleculares necesarias para la producción de proteínas heterólogas en un gran rango de microorganismos, incluyendo bacterias y levaduras, expandiendo así las capacidades de manufactura.³

Esta expresión-producción de proteínas en sistemas heterólogos engloba la clonación de un gen específico que codifica para la proteína de interés en un vector de expresión bajo el control de un promotor inducible.⁸ El sistema de producción depende de la naturaleza de la proteína de interés.⁹ Con la biotecnología, cualquier biofármaco puede ser modificado genéticamente usando la fusión celular o la tecnología del ADN recombinante.

Entre los retos principales de la industria de los biofármacos que se han discutido para la obtención de proteínas terapéuticas por tecnología del ADN recombinante se encuentra la producción de las mismas de forma altamente pura y bien caracterizada. Se han desarrollado diferentes estrategias para producir proteínas recombinantes a gran escala, una de ellas es el uso de proteínas de fusión que posteriormente deben ser removidas en la purificación de la proteína de interés.¹⁰

Este avance significativo en el desarrollo de proteínas terapéuticas llegó con la introducción de proteínas de fusión obtenidas por la unión de dos genes que codifican para dos o más proteínas. Las proteínas de fusión combinan sus propiedades en una sola proteína. El ejemplo clínico y comercial más exitoso desarrollado con esta

tecnología son las inmunoglobulinas. Las proteínas de fusión pueden proporcionar varios beneficios, como lo son el alargamiento del tiempo de vida media (como en el caso de las inmunoglobulinas), facilitan la expresión de la proteína de interés y su purificación por medio de cromatografía afinidad así mismo mejoran la solubilidad y estabilidad incrementando la potencia de la misma.⁶

En general, es difícil decidir cuál será el mejor sistema de fusión para una proteína de interés específica. Esto dependerá de la proteína diana, el sistema de expresión a usar y la aplicación de la proteína purificada.¹⁰ Cabe mencionar que la localización de la proteína afecta el aislamiento y purificación del producto, por ejemplo podría secretarlo al medio de crecimiento, transportarlo al periplasma o mantenerse en el citoplasma.¹¹ Los sistemas de proteínas de fusión comparten ciertas características: purificación de un paso, efecto mínimo en la estructura terciaria y en la actividad biológica, remoción fácil y específica para producir la proteína nativa, ensayos simples y exactos de la proteína durante la purificación y ser aplicables a diferentes tipos de proteínas.¹⁰

El sistema de expresión influirá altamente sobre las condiciones de cultivo que optimizarán la expresión de la proteína recombinante, dado que distintos hospederos y vectores de expresión presentan distintos niveles de producción de una misma proteína recombinante bajo condiciones de cultivo idénticas. Los sistemas de expresión bacterianos han sido usados y siguen siendo usados ampliamente en la industria, esto debido a sus ventajas intrínsecas, como rápido crecimiento, altas producciones y facilidad de manejo.¹²

Los sistemas de expresión bacterianos son los más usados, específicamente *Escherichia coli* (*E. coli*), el cual es por lo regular la primera opción al momento de elegir el sistema, es incluso el más usado a escala industrial, produce de hecho la mitad de las proteínas comercializadas actualmente.¹³ *E. coli* es por mucho el mejor hospedero caracterizado con muchos sistemas de expresión disponibles.¹⁴

E. coli es también uno de los modelos más simples para la producción de proteínas recombinantes lo cual facilita el escalamiento. Sin embargo, también impone limitaciones como la selección de la proteína que se producirá, ya que las bacterias carecen de capacidad para realizar la mayor parte de las modificaciones postraduccionales de la proteína.² De la misma manera la producción de proteínas que dependen de puentes disulfuro para su estabilidad ha sido considerada difícil en *E. coli*.¹⁵

La adecuada expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* depende de su capacidad para evitar interacciones indeseadas con otros polipéptidos, que pueden derivar a la agregación de intermediarios plegados en vez de a las proteínas deseadas.¹⁵ Algunos factores que afectan el nivel de expresión incluyen pequeñas y sutiles características de la secuencia del gen, la estabilidad y eficiencia del ARNm, el plegado correcto y eficiente de las proteínas, el uso de codones, degradación de la proteína recombinante por proteasas dependientes de ATP y la toxicidad de la proteína.⁸

Un vector de expresión para *E. coli* debe contener, además del gen de interés, un origen de replicación, un gen que confiera resistencia a antibióticos (o cualquier

otro marcador de selección), un promotor y un terminador transcripcional. El origen de replicación determina el número de copias del vector, el cual influye en la estabilidad del plásmido.¹⁶

El método más intuitivo para aprovechar en *E. coli* las proteínas recombinantes es direccionar los polipéptidos hacia el periplasma bacteriano. Las razones para esto son que en el periplasma al contrario del citoplasma, es un compartimiento oxidante que almacena las enzimas encargadas de la formación del puente disulfuro y de su isomerización así como chaperonas y enzimas de plegamiento.¹⁵ Otras ventajas que se describen para la expresión en el periplasma incluyen que el tamaño del péptido a insertarse no es relevante, existe poca actividad proteolítica, tiene un alto nivel de expresión, contiene únicamente el 4% de las proteínas totales de la célula, se puede purificar fácilmente por choque osmótico y permite la acumulación de proteínas que serían tóxicas en el citoplasma.^{2, 17}

La expresión de proteínas recombinantes en la superficie bacteriana posee muchas aplicaciones potenciales en la biotecnología y requiere de un mayor conocimiento de la composición molecular de la molécula de transporte usada como proteína de fusión.⁸ La mayoría de las proteínas de fusión usadas son pequeñas y por tanto su expresión en *E. coli* deberá ser substancial. Cualquier proteína novel usada para fusión deberá tener tales características.¹⁸

Para lograr esto se ha planteado fusionar diversas proteínas de interés con un péptido líder adecuado para la expresión deseada. Debido a esto se propone usar la

proteína SmbP (Small Metal Binding Protein) como proteína de fusión. SmbP ha sido aislada del periplasma de *Nitrosomonas europaea* (*N. europaea*).¹⁹ Con el fin de mostrar la eficiencia de SmbP como proteína de fusión se plantea usar diferentes proteínas de origen procariótico y eucariótico para mostrar su expresión y posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1. SmbP como proteína de fusión

N. europaea es una bacteria gram negativa que ha sido estudiada durante varias décadas por jugar un papel importante en el ciclo global del nitrógeno al empezarlo mediante la oxidación del amonio (NH_3) a nitrito (NO_2^-) y CO_2 . Se sabe que obtiene su energía de esta manera y además la demanda de carbono se completa mediante la fijación del CO_2 . Minerales adicionales completan las necesidades nutricionales de la célula. Debido a que no se ha comprobado su crecimiento en otras fuentes de carbón o de energía ha sido clasificada como quimiolitioautótrofa obligada.^{20, 21}

N. europaea puede utilizar cantidades limitadas de ciertos compuestos orgánicos, como aminoácidos, piruvato y acetato así como otros compuesto inorgánicos. Se ha encontrado que agregar algunos aminoácidos al cultivo de *N. europaea* incrementa la producción de NO_2^- y la producción de proteínas (las cuales se

correlacionan con el crecimiento). Por tanto es importante cuidar la composición del medio de cultivo para que atienda a las necesidades especiales de *N. europaea*.²¹

N. europaea y otras bacterias oxidantes de amonio participan en la conversión biogeoquímica del nitrógeno reducido en forma de amonio o amoniaco a la forma de nitrógeno oxidado como nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) o en forma gaseosa (NO , N_2O). Los organismos nitrificadores que fijan el nitrógeno a nitrito o nitrato incrementan las fuentes de nitrógeno para las plantas. *N. europaea* logra esto mediante la acción sucesiva de la amonio monooxigenasa (AMO) y la hidroxilamina reductasa (HOR).²¹

N. europaea es un miembro de Proteobacteria, un numeroso grupo de eubacterias, que se presume poseen un ancestro fotosintético en común. Todas las bacterias oxidantes de amonio que se han identificado pertenecen a la subdivisión beta de las proteobacterias, incluyendo además del género nitrosomonas y nitrospira, *N. europaea* es la bacteria oxidante de amonio mejor estudiada a nivel molecular.²⁰ Su genoma consiste en un solo cromosoma circular de 2812094 bp; el nucleótido 1 fue asignado al origen de replicación predicho. El genoma está dividido en dos centros de replicación cuyo tamaño varía entre ellos (1/3:2/3). Los genes que participan en la oxidación del amonio junto con una región duplicada (7.5 kb) se encuentran en el centro de replicación más grande.²⁰

En general, el genoma de *N. europaea* está compuesto de 50.7% de G+C. Los genes están distribuidos de manera equitativa en la circunferencia del genoma. Se encontraron 2560 genes codificadores de proteínas. Los marcos de lectura abierta

(ORF) dieron un total de 2487261 nucleótidos. Las secuencias codificantes para proteína se buscaron en bases de datos, dando como resultado que 285 de estas secuencias codificaban para proteínas de función desconocida aún. A aproximadamente el 75% de éstas se les podría asignar una función determinada.²⁰

Una bacteria gram negativa como *E. coli* posee una cubierta tri-membranal: una membrana plasmática interna, una externa y el espacio periplásmico entre ellas. El espacio periplásmico está compuesto de una estructura de peptidoglicano ocupado por una solución acuosa de mono y oligosacáridos, proteínas y otros solutos. Se cree que este espacio, debido a las proteínas presentes, realiza distintas funciones biológicas, incluyendo la protección contra el deterioro por factores externos (como antibióticos); consumo, almacenamiento y quimiotaxis de varios nutrientes, sales y aminoácidos y otros roles que no entrarían dentro de estos dos.¹⁹ Para hacer frente a condiciones dañinas en el espacio periplásmico, *N. europaea* posee una abundante cantidad de chaperonas en especie y cantidad, para permitir el plegamiento de las proteínas y evitar la agregación en dicho lugar. En un estudio reciente se ha encontrado que las proteínas periplasmáticas en *E. coli* difícilmente se agregan en condiciones desnaturizantes.²²

El cobre es un elemento esencial en las células vivas y es un cofactor en una gran cantidad de enzimas. Es tóxico en concentraciones elevadas y se han caracterizado varios sistemas que regulan la concentración de cobre. Existe una variedad de proteínas que transportan o facilitan el flujo de cobre, éstas incluyen los sistemas homólogos CopABCD y PcoABCD de *Pseudomonas syringae* y *E. coli* respectivamente,

estos sistemas confieren resistencia al cobre a bacterias gram negativas secuestrando el cobre al periplasma y a la membrana externa. También existen una variedad de chaperonas de cobre y transportadores de cobre como ATPasas de cobre. Las metalotioneínas son proteínas bien caracterizadas que actúan como “esponjas metálicas” y contienen un alto número de cisteínas. Otra clase de proteínas que quizás tengan un rol en la regulación y secuestro de cobre en las plantas son las metalohistinas, una nueva clase de pequeñas proteínas ricas en histidina caracterizadas recientemente, que son capaces de unir múltiples iones metálicos.¹⁹ SmbP (nombre por sus siglas en inglés Small Metal Binding Protein) pertenece a esta familia y fue aislada de *N. europaea* y caracterizada recientemente.

SmbP posee un peso de 9.9 kDa, posee una estructura monomérica caracterizada por diez repeticiones de siete aminoácidos caracterizados por el residuo de histidina conservado en la cuarta posición y residuos conservados en cada una de las otras seis posiciones. Está formada principalmente de histidinas (17%), alanina (16%), glutamato (14%), glicina (11%) y lisina (9%), siendo estas el 67% de la composición total de aminoácidos. Además es de naturaleza y diseño simple, y las predicciones de la segunda estructura sugieren que es un complejo de cuatro hélices alfa.¹⁹

El péptido maduro tiene una longitud de 93 aminoácidos con una masa molecular (determinada por MS MALDI-TOF) de 9866 Da. Extensivas búsquedas en bases de datos no han identificado alguna otra proteína con una homología significativa. SmbP posee aproximadamente un átomo de cobre unido por molécula de proteína aunque es capaz de unirse con hasta 6 átomos de Cu^{+2} .¹⁹ Algunos estudios han

demostrado que además es capaz de unirse a múltiples metales atómicos, incluyendo Mn^{+2} , Ni^{+2} , Mg^{+2} , y Zn^{+2} así como Fe^{+3} .¹⁹ SmbP maduro contiene un gran número de histidinas y residuos ácidos (tres aspartatos y dieciséis glutamatos) que pudieran servir como ligantes para los múltiples iones de cobre. SmbP difiere de otras proteínas ligantes de cobre que utilizan cisteína y metionina para ligar.¹⁹

Como se mencionó anteriormente, las proteínas de fusión (o proteínas tag) son un enfoque empleado en el desarrollo y producción de sistemas de expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico.²³ Las proteínas de fusión se han convertido en la piedra angular de la investigación biológica moderna por su gran variedad de aplicaciones. Proteínas sin ninguna relación se fusionaron en un principio para facilitar la detección y/o purificación de una de ellas, sin embargo, se descubrió que el rendimiento de la proteína recombinante se incrementaba.²³

Se han reportado diversas aplicaciones de las proteínas de fusión en la biotecnología, estas incluyen la facilitación de la purificación de la proteína de interés, permitir la expresión de proteínas sobre la superficie celular, reducir la pérdida de la proteína de interés debido a la proteólisis, la construcción de moléculas reporteras para el monitoreo de la expresión de genes y la localización de proteínas así como para incrementar la circulación y la vida media de las proteínas con fines terapéuticos.²⁴

Por tanto, aunque en un principio, las proteínas de fusión fueron generadas para facilitar la purificación de proteínas, su inmovilización y para acoplarse a la actividad de ciertas enzimas, rápidamente se volvió aparente que algunas de ellas

incrementaban ampliamente la solubilidad de las proteínas de interés, que de otra manera se acumularían en cuerpos de inclusión dentro del citoplasma de la célula.²⁵ Esto último ponía solución al problema de la generación de cuerpos de inclusión, el cual había sido uno de los grandes obstáculos en la producción de proteínas biológicamente activas en sistemas heterólogos.²³

Algunos ejemplos de proteínas de fusión que se han usado para promover la solubilización de las proteínas incluyen: tioredoxina (trx), glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), proteína a, ubiquitina y DsbA (proteína de enlace disulfuro A).²³

En realidad, aun no se conoce del todo como es que este efecto solubilizador ocurre. De hecho, no es posible saber a ciencia cierta si la solubilidad de diversos polipéptidos podrá ser mejorada al fusionarla con una proteína altamente soluble, o que clase de proteína de fusión podrá ser la mejor opción para llevar a cabo la función.²³ La razón más probable del incremento del plegado de las proteínas (y por ende de la solubilidad y disminución de la degradación) es que la proteína de fusión llega rápida y eficazmente a su conformación nativa mientras emerge del ribosoma y promueve la adquisición de la estructura correcta favoreciendo una cadena de reacciones de isomerización en cadena.²⁵

2.2. Purificación de proteínas

Las proteínas se han convertido en un objeto de estudio ampliamente común en diversas áreas de la ciencia con numerosos objetivos, incluyendo aplicación en el ámbito de la biotecnología, investigación y medicina entre otras. Por tanto, la purificación de proteínas se ha convertido en una amplia área de investigación, donde a lo largo de los años se han analizado y propuesto diversas formas de hacer esto posible.

La purificación de proteínas lleva una historia ya de aproximadamente 200 años, donde los primeros intentos fueron de aislar sustancias de plantas con propiedades similares a las de la “albumina de huevo” por Fourcroy en 1789, 100 años después Hofmeister en 1889 logra obtener ovoalbúmina cristalizada, siendo la primera proteína obtenida en forma cristalina. El fraccionamiento de Cohn aparece en 1946 como un método para purificación de proteínas de suero sanguíneo, siendo el primer método de purificación de proteínas aplicado a gran escala y para usos comerciales.²⁶

Gracias al desarrollo de la biología molecular, el proceso de obtención de una proteína específica se ha facilitado enormemente, además la instrumentación y equipos para dicho fin también ha experimentado un rápido crecimiento. Anteriormente las fuentes de obtención de proteínas eran poco prácticas, era difícil la purificación y el rendimiento era muy bajo.²⁶

Existen diversos métodos de uso común en los laboratorios para el aislamiento y purificación de proteínas, sin embargo, el uso de uno o de otro método dependerá de diversos factores, por ejemplo, de las propiedades biológicas y fisicoquímicas de la

proteína, el uso que se le dará a la proteína obtenida, actividad biológica esperada, el grado de pureza que se requiere e incluso los recursos con los que se cuenta para dicho fin.^{26, 27}

Es importante la recolección de información de la proteína de interés, con el fin de usar el método más conveniente para la purificación. Se deben conocer parámetros que afecten la estructura, como lo son la temperatura, el pH, solventes orgánicos, presencia de oxígeno, metales pesados entre otros^{27, 28}

En un método de purificación, el promedio de pasos a seguir es de aproximadamente cuatro, es difícil obtener una proteína en pocos pasos, incluso aunque la separación se base en una propiedad bioespecífica.²⁸ Los métodos pueden variar desde simples procedimientos de precipitación hasta altamente sofisticadas técnicas de cromatografía, que incluso hoy día siguen en desarrollo y mejora continua.²⁹ Dichos métodos se pueden clasificar en cuatro distintos grupos interrelacionados dependiendo de las propiedades de la proteína: características de la membrana, forma y tamaño, carga neta y biopropiedades.²⁹ Este último es característico de las técnicas de cromatografía de afinidad.

2.3. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad consiste en un tipo de cromatografía líquida, caracterizada por la amplia versatilidad que dicha técnica ofrece.³¹ Esta técnica explota

diversas propiedades, por lo regular bioespecíficas de la proteína que se pretende purificar. Los métodos de afinidad dependen de las interacciones de la proteína de interés con un ligando específico, el cual es conocido como “ligando de afinidad” (substratos análogos, antígenos y/o anticuerpos, substratos de enzimas, por citar algunos ejemplos).^{27, 31}

Algunos ejemplos de cromatografía de afinidad incluyen: inmunoafinidad, afinidad a lectina, afinidad biomimética, afinidad a ADN (usado para purificación de ADN usando nucleótidos complementarios), afinidad a colorante, o afinidad a iones inmovilizados, este último de interés para el presente proyecto.³¹ El uso de cromatografía de afinidad no es de uso exclusivo para purificar proteínas, ya que también es posible purificar ADN, ARN, azúcares, aminoácidos, etc.³¹

2.3.1. Uso de proteínas de fusión en la cromatografía de afinidad

Una de las principales ventajas de una proteína de fusión es que al fusionarse con una proteína de interés permite su purificación por técnicas relativamente simples y prácticas de cromatografía de afinidad. Por lo regular dichas proteínas se encuentran integradas ya a un vector de expresión, donde el mismo posee el gen de dicha proteína de fusión, estos pueden ser pequeños péptidos o dominios proteicos completos.³¹

2.3.2. Purificación por medio de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Hasta la fecha han sido descritos un amplio número de sistemas de fusión que varían de tamaño desde seis aminoácidos (His-tag) hasta proteínas completas capaces de interactuar con ligandos inmovilizados en una matriz cromatográfica.²⁴ La afinidad de ciertas proteínas de fusión a ligandos inmovilizados puede facilitar la purificación de la proteína de interés, sin embargo, usualmente esto ocurre con una baja afinidad.²⁵ En dichos sistemas ocurren diversos tipos de interacción, entre ellos enzima-substrato, receptor bacteriano-proteína sérica, polihistidinas-iones metálicos, antígeno-anticuerpo.²⁴

Las condiciones de purificación difieren de sistema a sistema y del ambiente que es tolerado por la proteína de interés. Otros factores que influyen para la elección del sistema de fusión incluyen la localización de la proteína, el costo, la afinidad por la matriz, soluciones amortiguadoras a usar y las posibilidades de remover la proteína de fusión. En algunos casos, la proteína de fusión se puede mantener en la proteína de interés, esto cuando la actividad de la proteína de interés no se ve afectada o en la generación de anticuerpos por mencionar algunos ejemplos.²⁴

Estudios previos han mostrado que es posible la purificación de SmbP a través de cromatografía de afinidad con iones de níquel y la han descrito como una proteína monomérica periplasmática.¹⁹ Como ya se ha mencionado anteriormente, SmbP puede unir diversos iones metálicos divalentes así como trivalentes y se sabe que es capaz de unir hasta seis iones metálicos de Cu(II). Basados en dicha evidencia, se pretende establecer un sistema de fusión que permita la expresión y purificación de diversos tipos de proteínas usando SmbP como proteína de fusión.

La cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados, conocida como IMAC (por sus siglas en inglés: Immobilized Metal-Ions Chromatography) fue descrita por primera vez por Porath y col., en 1975, dicha cromatografía de afinidad se basaba en la diferencia de afinidad de las proteínas con iones metálicos unidos a un ligando quelante inmovilizado sobre un soporte cromatográfico.²⁸

A partir de los estudios de Porath se evaluó la purificación de diferentes proteínas empleando el sistema de IMAC. El desarrollo de la técnica se aceleró gracias a la biología molecular moderna y las nuevas técnicas de ADN recombinante. De esta manera se desarrollaron proteínas recombinantes modificadas genéticamente las cuales poseyeran una extensión de oligohistidinas extra (péptido de fusión conocido como His-tag), dicha modificación facilitó enormemente la purificación por IMAC con iones de Ni(II) ya que la interacción de la proteína con los iones metálicos depende mucho de la presencia de residuos de histidina.³⁰

Algunas de las características especiales que presenta el sistema IMAC son las siguientes:

- Se requiere de la exposición de ciertos aminoácidos (histidina, cisteína y triptófano) sobre la superficie de las proteínas para permitir la adsorción de la proteína.²⁸
- El acomodo estérico de la cadena polipeptídica juega un papel importante, proteínas con diferencias en su estructura secundaria y terciaria pueden ser separadas.²⁸

- La unión es afectada por el pH.^{28, 30}
- Se pueden usar diferentes técnicas de elución.²⁸
- Se ha demostrado la eliminación de virus en cierto número de casos.²⁸

IMAC se basa en las interacciones entre metales de transición con ciertos aminoácidos (histidina, cisteína y triptófano, también conocidos como la triada de Porath), dichos metales se encuentran inmovilizados a través de enlaces de coordinación con un agente quelante de metales, el cual se encuentra unido covalentemente a una matriz insoluble.^{30, 31} Los metales más usados son los que se encuentran en el límite de los metales de transición (Cu(II), Zn(II), Ni(II) y Co(II)).³¹ Dichos metales son considerados como aceptores de pares de electrones, mientras que los aminoácidos tienen propiedades de donadores de átomos gracias a los heteroátomos en su estructura (N, O y S).^{31, 32} Los grupos alfa-amino pueden estar involucrados también en dicho proceso. La afinidad de la proteína a la matriz depende mucho del ion metálico usado, por lo regular la afinidad sigue el siguiente orden: Cu(II)>Ni(II)>Zn(II)>Co(II).^{28, 30, 31, 32}

Varios estudios han demostrado que la histidina es el principal aminoácido que participa en las uniones de las proteínas con el metal de transición a un pH neutro (o cercano) y a altas concentraciones iónicas.³¹ Algunos elementos importantes que determinan la retención de una proteína al metal son: el número de residuos de histidina, su disponibilidad en la superficie y su microentorno.³¹ De hecho, la ausencia de histidinas se correlaciona directamente con la falta de retención de dicha proteína,

esto justifica aún más el uso de proteínas de fusión consistentes en varios residuos de histidinas o pequeñas proteínas con alto número de residuos de dicho aminoácido.³²

2.3.3. Purificación por medio de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

El Sistema de FPLC (conocido así por sus siglas en inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) fue introducido por primera vez en 1982 por GE Healthcare Life Sciences pensado como un sistema de cromatografía dedicado exclusivamente a la separación y purificación de proteínas.²⁸

El sistema de FPLC es una variante de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) que permite una alta resolución gracias al pequeño diámetro de las fases estacionarias.³³ La principal diferencia entre el FPLC y el HPLC radica en la diferencia de presión a la que se somete cada sistema, mientras que el HPLC utiliza altas presiones (arriba de 400 bar)²⁷, las columnas especiales para FPLC se remiten a presiones bajas, permitiendo recolectar una alta cantidad de proteínas.^{27, 33}

El FPLC está diseñado para permitir la separación de proteínas conservando su configuración nativa activa, a diferencia del HPLC donde regularmente ocurre cierta desnaturalización en las fases de absorción y elusión. El HPLC por su parte es más apropiado para la separación de proteínas con un peso molecular por debajo de los 30 KDa.²⁹ El sistema de FPLC permite una usar una amplia variedad de técnicas cromatográficas, como intercambio iónico, quimioenfoque, filtración por gel, fase reversa, interacciones hidrofóbicas, entre otras.²⁷

A partir de la aparición del FPLC han aparecido sucesores a lo largo de los años, en 1998, la misma compañía GE Healthcare Life Sciences presentó el ÄKTAexplorer™, un sistema que permitió un rápido desarrollo y optimización de una diversa variedad de métodos de purificación, incluyendo el software UNICORN™.²⁸

CAPÍTULO 3

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Desarrollar una metodología para la producción de proteínas recombinantes utilizando SmbP como proteína de fusión y *E. coli* como organismo hospedero.

3.2. Objetivos específicos

- Construir plásmidos con diferentes genes, incluyendo SmbP, MBP y GST para estudios comparativos.
- Purificar las proteínas recombinantes por medio de cromatografía de afinidad utilizando una resina funcionalizada con iones metálicos (Cu^{+2} y Ni^{+2}).

- Establecer métodos eficaces para la expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a SmbP, así como la remoción de ésta para obtener la proteína de interés completamente libre y pura.

3.3.Hipótesis

La proteína SmbP es una buena opción como proteína de fusión para la expresión y purificación por medio de cromatografía de afinidad de proteínas recombinantes en *E. coli*; en comparación con proteínas de fusión existentes en el mercado como MBP y GST.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

4.1. Estrategia general experimental

Se utilizarán métodos clásicos de clonación para la construcción de plásmidos con el gen de SmbP periplásmico y SmbP citoplásmico adicionando diversos genes de proteínas de interés a estudiar para su posterior expresión y purificación.



Figura 1. Estrategia general experimental

4.2. Crecimiento de *Nitrosomonas europaea*

La cepa de *Nitrosomonas europaea* (ATCC 25978) empleada en el presente proyecto se obtuvo directamente de ATCC. Se probaron tres diferentes medios en base a literatura consultada. La composición de los tres medios utilizados es la siguiente:

TABLA 1.

Medio 1 empleado para el crecimiento de *N. europaea*, modificado de Brett, M.B., Rusell, L., Wilson, A.F. (2004)

	Concentración
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM
K ₂ HPO ₄	48 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Na ₂ CO ₃	5 mM
CaCl ₂	200 μM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	913 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	667 nM
Fe-EDTA	16 μM
Indicador: Azul de bromofenol	
pH 7 – 8	
Esterilizar por filtración	

TABLA 2.

Medio 2 empleado para el crecimiento de *N. europaea*, Cabello, F. (2007)

	Concentración
(NH ₄) ₂ SO ₄	22.7 mM
K ₂ HPO ₄	2.9 mM
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2 mM
CaCl ₂	36 μM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	202.8 μM
Fe-EDTA	16 μM
Ajustar a pH 8.2 con Na ₂ CO ₃ al 50%.	
Esterilizar por filtración	

TABLA 3.

Medio 3 empleado para el crecimiento de *N. europaea* (ATCC Medium: 2265 *Nitrosomonas europaea* medium)

	Concentración
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	23.1 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.8 mM
KH_2PO_4	40 mM
Na_2CO_3	3.5 mM
CaCl_2	222.5 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	676.2 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	494.4 nM
FeSO_4	30 mM
Ajustar pH 7 – 8 con Na_2CO_3	
Esterilizar por filtración	
*En solución con EDTA 50mM	

Se emplearon diferentes condiciones de crecimiento en referencia a las sugerencias obtenidas de diversas fuentes, incluyendo las mismas de donde se obtuvieron las composiciones de los diferentes medios usados para el crecimiento de *N. europaea*. El medio empleado y sus condiciones se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 4.

Condiciones empleadas en los diferentes medios empleados

Medio	Condiciones
Medio 1	30 °C a 200 rpm Protegido de la luz
Medio 2	30 °C a 200 rpm Protegido de la luz
Medio 3	26 °C a 150 rpm Protegido de la luz

4.3. Recolección de células de *N. europaea*

La recolección de células de *N. europaea* se realizó una vez que el crecimiento alcanzó un D.O.₆₀₀ de 1.91. A partir de dicho D.O.₆₀₀ se recolectaron alícuotas de 6 mL y 8 mL de cultivo en una microcentrifuga (marca Thermo Scientific modelo MicroCL 17). La recolección se realizó a 14000 rpm por dos minutos.

4.4. Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico se empleó el kit DNEASY BLOOD & TISSUE de QIAGEN usando las células recolectadas de 6 mL y 8 mL de cultivo respectivamente. Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como amortiguador para la observación del ADN genómico extraído.

4.5. Amplificación de SmbPp y SmbPc

Se emplearon dos iniciadores delanteros diferentes, uno para la amplificación de SmbPp y otro para SmbPc, correspondiendo el primero a la secuencia más el péptido señal para direccionar a periplasma y el segundo a la proteína sin dicha secuencia (por ende citoplásmico). El iniciador reverso fue el mismo para ambas amplificaciones.

TABLA 5.

Iniciadores usados para la amplificación de SmbPp y SmbPc

Iniciador	Secuencia
SmbPp iniciador delantero	5'– ATGCATGCACATATGAAAACAACCCTGATAAAAGTG – 3'
SmbPc iniciador delantero	5'– ATGCATGCAACATATGAGCGGACATACTGCTCACGT – 3'
SmbP iniciador reverso	5'– ATGCATGGATCCGTGCGATTTATGTTCCGGATGC – 3'

Cabe mencionar que los iniciadores delanteros fueron diseñados incluyendo el sitio de corte para la enzima de restricción NdeI, mientras que para el reverso se incluyó la secuencia del sitio de corte de la enzima de restricción BamHI.

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL en microtubos para PCR de 200 µL. La reacción 1x se conformó de 8 µL del ADN genómico extraído, 5 µL de solución amortiguadora de reacción, 3 µL de iniciador delantero, 3 µL de iniciador reverso, 1 µL de dNTP's, 1 µL Vent polimerasa y completando la reacción con 29 µL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Corbett Research (modelo CG1-96) con la siguiente programación: un primer paso de 2 minutos a 95 °C seguido de un segundo paso consistente en 35 ciclos de desnaturalización (un minuto a

95 °C), alineamiento (un minuto a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y un tercer paso de 10 minutos a 72 °C. Mediante una electroforesis con gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora se confirmó la amplificación del inserto y se purificó empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.6. Construcción de plásmidos

4.6.1. Construcción de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc

Se emplearon técnicas clásicas de clonación (digestión, ligación y transformación) para la construcción de este primer plásmido.

4.6.1.1. Digestión de plásmidos y genes de SmbPp y SmbPc

Se realizaron dos digestiones simultáneas con los dos genes a insertar y el plásmido que se usará como vector, en este caso siendo pET28b. La digestión se realizó con las enzimas NdeI (New England Biolabs, NEB) y BamHI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET28b, la reacción 1x a volumen final de 20 µL consistió en 4 µL del plásmido pET28b, 2 µL de solución amortiguadora 3 10x (New England Biolabs, NEB), 2 µL de BSA (New England Biolabs, NEB) y 9 µL de agua mQ. La digestión se realizó secuencialmente, primero se agregó 1 µL de BamHI incubando 2 horas a 37 °C, posteriormente se agregó 1 µL de NdeI dejando incubar una hora a 37 °C y finalmente agregando 1 µL de SAP (Fermentas) e incubando una hora más a 37 °C, las digestiones se realizaron en una incubadora marca LabTech modelo LSI-3016A.

Cumplido el tiempo, la digestión se purificó mediante el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

La digestión de los insertos (SmbPp y SmbPc) se realizó a un volumen final de 40 μ L. La reacción 1x consistió en 30 μ L del inserto obtenido a partir de la amplificación y posteriormente purificado, 4 μ L de la solución amortiguadora 3 10x (NEB), 4 μ L de BSA 10x (NEB), 1 μ L de NdeI (NEB) y 1 μ L de BamHI (NEB). La reacción se incubó durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente se purificó mediante el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.6.1.2. Ligación de pET28b más SmbPp y SmbPc

La reacción de ligación 1x consistió en 1 μ L de 10x solución amortiguadora de ligasa (New England Biolabs, NEB), 1 μ L T4 DNA ligase (New England Biolabs, NEB), 4 μ L de pET28b digerido y variando entre cantidades de 0, 2 y 4 μ L del inserto (SmbPp y SmbPc) completando con agua para obtener un volumen final de 10 μ L por reacción. La reacción con 0 de inserto y 4 μ L de agua mQ se usó como control negativo. La reacción se incubó 90 minutos a temperatura ambiente y se guardó toda la noche a – 20 °C.

4.6.1.3. Transformación de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc

La transformación se realizó en la cepa de *E. coli* DH5 α especial para la proliferación de ADN plasmídico. Se requirió primero de la desactivación de la ligasa a 65 °C durante 10 minutos como recomendación del instructivo del fabricante de la T4 DNA ligase (New England Biolabs, NEB). Se empleó todo el producto de la reacción de ligación y se mezcló con 50 μ L de células de *E. coli* DH5 α rubidio-competentes en un microtubo de 1.5 mL en hielo donde se incubó por 20 a 30 minutos. Posteriormente se

procedió al choque térmico de 45 segundos a 44 °C y pasando la mezcla de inmediato nuevamente al hielo, pasados dos minutos se agregaron 800 µL de caldo LB. Una vez agregado, se mezcla suavemente y se incuba 30 minutos a 37 °C en agitación a 220 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugan los tubos a 14000 rpm durante 2 minutos, se retira el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100 µL de caldo LB. Se resuspenden las células en dicho volumen y se transfieren a placas de agar LB más Kanamicina (30 mg/mL) y se esparce por la placa por extensión con varilla. Se incuban las placas durante 16 horas a 37 °C.

4.6.1.4. Extracción de ADN plasmídico de clonas seleccionadas

En base a las colonias obtenidas en las placas con reacción de ligación y en el control negativo se seleccionaron varias clonas. Dichas colonias se inocularon en 6 mL de caldo LB y se cultivaron durante 16 horas a 37 °C en agitación a 220 rpm. Se recolectó el sedimento celular de los 6 mL de cultivo mediante centrifugación durante 2 minutos a 10000 rpm, una vez obtenidas las células se extrajo el ADN plasmídico, lo cual se realizó con el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.1.5. Cribado de colonias transformantes

A partir del ADN plasmídico obtenido de las clonas seleccionadas se realizó un análisis de restricción para confirmar la presencia del plásmido. Para dicho análisis se empleó una reacción de digestión a un volumen total de 20 µL, la reacción 1x consistió en 12 µL del ADN plasmídico obtenido, 2 µL de solución amortiguadora 3 (NEBuffer 3) 10x, 2 µL de solución BSA 10x, 1 µL de NdeI (NEB), 1 µL de BamHI (NEB) y 2 µL de agua mQ. La reacción se incubó durante 3 horas a 37 °C. Para el análisis se realizó una

electroforesis en un gel de agarosa al 1% empleando TAE como solución amortiguadora, usando bromuro de etidio como revelador sobre luz UV.

4.6.2. Construcción de pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-SmbPc-GFP

Se comenzó con la construcción de plásmidos de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc agregando el gen de GFP (Green Fluorescent Protein, con un peso de 714 bp) que se empleará como proteína reportera.

4.6.2.1. Digestión de GFP y plásmidos pET28b-SmbPp

Se tomó el ADN plasmídico de las clonas positivas seleccionadas para SmbPp y SmbPc y se sometió a una segunda digestión para la inserción del gen de GFP. La digestión de plásmidos se realizó a un volumen final de 22 μL con una digestión secuencial. La reacción 1x consistió en 15 μL de plásmido pET28b-SmbPp y pET28b-GST (construcción con la que se contaba previamente), más 2 μL de solución amortiguadora 4 10x, 2 μL de solución BSA 10x, finalmente se agregaron las enzimas de restricción por orden secuencial, primero 1 μL de XhoI (NEB) dejando incubar 2 horas a 37 °C, seguido de 1 μL de NotI (NEB) incubando durante una hora a 37 °C y por último 1 μL de SAP (Fermentas) durante una hora a 37 °C. Se digirió el inserto de interés, en este caso GFP (amplificación con la que se contaba previamente) a un volumen final de 40 μL , empleando 30 μL siendo el volumen total de amplificación, 4 μL de solución amortiguadora 4 10x, 4 μL de solución BSA 10x, 1 μL de XhoI (NEB) y por último 1 μL de NotI (NEB). Ambas digestiones fueron purificadas por medio del kit QIAQUICK GEL EXTRACTION para su posterior uso.

4.6.2.2. Ligación de pET28b-SmbPp y pET28b-GST con GFP

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L, donde la reacción 1x consistió en 1 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x, 1 μ L de T4 DNA ligase, 4 μ L de pET28b-SmbPp y pET28b-GST previamente digeridos y purificados, agregando volúmenes del inserto digerido, en este caso de GFP variando de 0, 2 y 4 μ L completando el volumen con agua mQ. La ligación con volumen de inserto igual a 0 fue usado como control negativo de la reacción.

4.6.2.3. Transformación de pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-SmbPc-GFP

Antes de la transformación de las reacciones de ligación, se desactivó la T4 DNA ligase durante 10 minutos a 65 °C. El protocolo de transformación se realizó como en el punto 4.7.1.3.

4.6.2.4. Extracción de ADN plasmídico de clonas seleccionadas

El procedimiento para la extracción de plásmidos se realizó como en el punto 4.7.1.4., empleando el mismo kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.2.5. Cribado de colonias transformantes

Para la selección de clonas positivas al inserto GFP se sometió el ADN plasmídico obtenido durante la extracción a un análisis de restricción. Dicho análisis se realizó por medio de una digestión a un volumen final de 20 μ L, donde la reacción consistió en 14 μ L de ADN plasmídico, 2 μ L de solución amortiguadora 4 10x, 2 μ L de solución BSA, 1 μ L de XhoI (NEB) y 1 μ L de NdeI (NEB). La reacción se incubó durante 3 horas a 37 °C. Para el análisis se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%

empleando TAE como solución amortiguadora, usando bromuro de etidio como revelador sobre luz UV.

4.6.3. Construcción de pET30a-SmbPc-GFP y pET30a-SmbPp-GFP

Se cambió el plásmido pET28b por el pET30a, con el objetivo de mejorar la expresión de GFP. A continuación se presenta la metodología de construcción.

4.6.3.1. Amplificación de SmbPp-GFP y SmbPc-GFP

A partir de la construcción de pET28b-SmbPp-GFP se realizaron dos amplificaciones, una con el iniciador delantero para SmbPp y usando el iniciador reverso para GFP y la segunda con el iniciador delantero para SmbPc y el iniciador reverso para GFP. Esto con el fin de obtener un inserto con ambos genes incluidos. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 μL en tubos de 200 μL para PCR. La composición de la reacción 1x consistió en 1 μL de enzima Vent polimerasa (NEB), 1 μL de dNTPs, 3 μL del iniciador delantero (concentración final de 60 pmoles), 3 μL del iniciador reverso (concentración final de 60 pmoles), 5 μL de solución amortiguadora 10x de polimerasa, 5 μL de ADN plasmídico patrón y completando con 32 μL de agua mQ. El programa de PCR para el termociclador consistió en un primer paso de un minuto de incubación a 95 °C, un segundo paso consistente en 30 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 95 °C), alineamiento (45 segundos a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y un tercer paso de incubación de 5 minutos a 72 °C. La amplificación se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora. La purificación de la amplificación se realizó a partir del gel empleado para la visualización usando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.6.3.2. Digestión de insertos SmbPp-GFP y SmbPc-GFP y plásmido pET30a

La digestión de los insertos se realizó a partir de los productos obtenidos de la amplificación una vez purificados. La reacción se realizó en un volumen total de 40 μL , donde la reacción 1x consistió en 30 μL del producto de PCR, 4 μL de solución amortiguadora *Fast digest* (Thermo Scientific), 1 μL de NdeI (Thermo Scientific) y 1 μL de XhoI (Thermo Scientific). La reacción se incubó durante 3 horas a 37 °C. La digestión del plásmido pET30a se realizó a un volumen final de 15 μL , donde se digirió un total de 10 μL de ADN plasmídico con 2 μL de solución amortiguadora *Fast digest* y 1 μL de XhoI (Thermo Scientific) incubando una hora a 37 °C, en digestión secuencial se agregó 1 μL de NdeI (Thermo Scientific) incubando una hora a 37 °C y por último agregando 1 μL de SAP (Thermo Scientific) e incubando a 37 °C. Las tres digestiones se purificaron por medio del kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.6.3.3. Ligación de pET30a más SmbPp-GFP y SmbPc-GFP

La reacción de ligación para esta construcción se realizó en un volumen final de 10 μL , donde se empleó 1 μL de solución amortiguadora de ligasa 10x (NEB), 1 μL de T4 DNA ligase (NEB), 4 μL de pET30a previamente digerido (con XhoI y NdeI) y 4 μL de inserto (SmbPp-GFP y SmbPc-GFP). Usando como control negativo una reacción sin los 4 μL de inserto y sustituyéndolo por agua mQ. La reacción se dejó a temperatura ambiente incubando durante toda la noche.

4.6.3.4. Transformación de pET30a más SmbPp-GFP y SmbPc-GFP

Previo a la transformación de las reacciones de ligación, se desactivó la T4 DNA ligase durante 10 minutos a 65 °C. El protocolo de transformación se realizó como en el punto 4.7.1.3., exceptuando la cantidad de células rubidio-competentes usadas para cada transformación, donde en la presente se emplearon 100 µL por cada una.

4.6.3.5. Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de plásmidos se realizó como en el punto 4.7.1.4., empleando el mismo kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.3.6. Cribado de colonias transformantes

Para la detección de colonias transformantes con el inserto ligado, se realizó un análisis de restricción. La digestión se llevó a un volumen final de 20 µL, donde fueron digeridos 6 µL de ADN plasmídico extraído previamente, 2 µL de solución amortiguadora *Fast digest* (Thermo Scientific) 10x, 1 µL de NdeI (Thermo Scientific), 1 µL de XhoI (Thermo Scientific) y completando a 20 µL con 10 µL de agua mQ. La visualización del inserto se realizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% usando TAE como solución amortiguadora y bromuro de etidio como revelador para su visualización por luz UV.

4.6.4. Construcción de pET30a-SmbPc-RFP, pET30a-SmbPp-RFP y pET28b-GST-RFP

Para el estudio del efecto de la expresión de SmbP a nivel periplásmico se decidió crear dicha construcción empleando RFP (Red Fluorescent Protein con un peso de 675 bp) como proteína reportera.

4.6.4.1. Amplificación de RFP

La amplificación del inserto RFP se realizó a partir de un vector comercial que incluía el gen para dicho inserto. La reacción para la amplificación se realizó a un volumen final de 50 μL en tubos especiales para PCR con capacidad de 200 μL . Dicha reacción 1x consistió en 1 μL de plásmido comercial patrón, 1 μL de Vent polimerasa (NEB), 1 μL de dNTP's, 1 μL MgSO_4 (NEB), 5 μL de solución amortiguadora de Vent polimerasa, 3 μL del iniciador delantero (concentración final de 60 pmoles), 3 μL del iniciador reverso (concentración final de 60 pmoles) y completando el volumen final con 35 μL de agua mQ, la secuencia de iniciadores se muestra en la tabla 6. El programa de PCR fue el siguiente: un primer paso de dos minutos a 95 °C seguido de un segundo paso que consistió en 30 ciclos de desnaturalización (un minuto a 95 °C), alineamiento (un minuto a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y un tercer paso final de 10 minutos a 72 °C. La amplificación se visualizó mediante un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora. La purificación de la amplificación se realizó por medio del gel empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

TABLA 6.

Iniciadores empleados para la amplificación de RFP

Iniciador	Secuencia
RFP iniciador delantero	5'– AGTCAGTCAGCGGCCGCATGGACAACACCGAGGACGTC – 3'
RFP iniciador reverso	5'– AGTCAGTCACTCGAGCTACTGGGAGCCGGAGTGG– 3'

4.6.4.2. Digestión de inserto RFP y de plásmidos pET30a-SmbPp-GFP, pET30a-SmbPc-GFP y pET28b-GST-GFP

La digestión del inserto RFP se realizó a partir del producto de purificación de la amplificación realizada. El volumen de dicha digestión fue de 40 μL , la cual se conformó de 30 μL del producto de amplificación purificado, 3 μL de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 3 μL de solución BSA 10x, 0.5 μL de XhoI (NEB) y 1 μL de NotI (NEB) y completando a 40 μL con agua mQ. La reacción se dejó incubando cinco horas a 37 °C y se purificó mediante gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora y empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION. Para la digestión de los plásmidos pET30-SmbPp-GFP, pET30a-SmbPc-GFP y pET28b-GST-RFP se empleó un volumen de reacción de 20 μL , donde 10 μL correspondían al ADN plasmídico, 2 μL de solución amortiguadora 3.1 10x, 2 μL de solución BSA 10x y 3 μL de agua mQ, las enzimas de restricción se agregaron secuencialmente, siendo la primera 0.5 μL de XhoI (NEB) incubando 2 horas a 37 °C, seguido de 0.5 μL de NotI (NEB) incubando también 2 horas a 37 °C y por último 2 μL de SAP (Fermentas) incubando 3 horas a 37 °C. La purificación de la digestión se realizó mediante un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora, con el fin de apreciar las bandas de digestión y purificar únicamente la banda que correspondía al plásmido digerido sin GFP por medio del kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.6.4.3. Ligación de pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET30a-GST más RFP

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μL , en donde dicha reacción consistió en 2 μL de solución amortiguadora de la ligasa, 1 μL T4 DNA

ligasa, 2 μ L del plásmido (pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc, pET28b-GST) y se varió el volumen de inserto RFP de 0, 2, 4 y 6 μ L, completando el volumen final con agua mQ según se requiriera. La reacción con un volumen de inserto de cero se empleó como control negativo.

4.6.4.4. Transformación de pET30a-SmbPp-RFP, pET30a-SmbPc-RFP y pET28b-GST-RFP

El protocolo de transformación se siguió después de la desactivación de la ligasa durante 10 minutos a 65 °C. El protocolo de transformación se realizó como en el punto 4.7.1.3.

4.6.4.5. Extracción de ADN plasmídico de las colonias obtenidas

El procedimiento para la extracción de plásmidos se realizó como en el punto 4.7.1.4., empleando el mismo kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.4.6. Cribado de colonias transformantes

Con el fin de corroborar que las colonias seleccionadas de las transformaciones (a las cuales se extrajo el ADN plasmídico) realmente contengan el gen de interés se realizó un análisis de restricción. Dicha digestión se realizó a un volumen final de 20 μ L, donde la reacción consistió en 10 μ L de ADN plasmídico, 2 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x, 2 μ L de solución BSA 10x, 5 μ L de agua mQ, 0.5 μ L de XhoI (NEB) y 0.5 μ L de NdeI (NEB). La visualización de la digestión se realizó mediante un gel de agarosa al 1 % usando TAE como solución amortiguadora y bromuro de etidio como agente revelador. En el caso de pET28b-GST-RFP, el análisis se realizó por medio de una

amplificación. Dicha reacción se llevó a un volumen final de 50 μL , en donde ésta consistió en 1 μL de ADN plásmidico a probar (pET28b-GST-RFP), 1 μL de taq polimerasa (GenScript), 1 μL de dNTPS, 3 μL de iniciador delantero T7, 3 μL de iniciador reverso de RFP, 5 μL de solución amortiguadora de polimerasa y completando el volumen con 36 μL de agua mQ.

4.6.5. Construcción de plásmidos pET30a-SmbPp-X, pET30a-SmbPc-X y pET28b-GST-X

Se realizaron además de las construcciones con los genes de proteínas reporteras de expresión, otras donde se incluyeron diferentes genes de interés con diversos orígenes. Los genes de los cuales también se realizaron construcciones fueron: NDPK2 (Nucleoside diphosphate kinase II, 714 bp), SHY2 (Short Hypocotyl 2, 593 bp), LovR (Two-component receiver domain protein, 456 bp), PixE (PatA subfamily protein, 1143 bp) y CRY1 (Cryptochrome 1, 2069 bp). Estas construcciones se realizaron con el fin de probar la expresión de diversos genes y comparar SmbP con GST como proteínas de fusión.

4.6.5.1. Amplificación de insertos

La amplificación de los insertos de interés se realizó a partir de genes puros de dichos insertos con los que se contaba previamente. Las reacciones de amplificación se realizaron a volúmenes finales de 50 μL en tubos especiales para PCR con una capacidad máxima de 200 μL . La reacción de amplificación constó de 1 μL del gen patrón usado, 1 μL de Vent polimerasa (NEB), 1 μL de MgSO_4 , 1 μL de dNTP's, 3 μL del iniciador delantero (concentración final de 60 pmoles), 3 μL del iniciador reverso

(concentración final de 60 pmoles), 5 μL de solución amortiguadora de Vent polimerasa y se completó el volumen a 50 μL con 35 μL de agua mQ. El programa de PCR fue el siguiente: un primer paso de dos minutos a 95 °C seguido de un segundo paso que consistió en 30 ciclos de desnaturalización (un minuto a 95 °C), alineamiento (un minuto a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y un tercer paso final de 10 minutos a 72 °C. El programa de PCR se varió para el caso de la amplificación de PixE y CRY1, donde debido al tamaño del gen, el tiempo de elongación se aumentó a 1 minuto 30 segundos y dos minutos respectivamente. La amplificación se visualizó mediante un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora. La purificación de la amplificación se realizó por medio del gel empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.6.5.2. Digestión de plásmidos pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET28b-GST e insertos de interés

La digestión y purificación de los plásmidos se realizó como en el punto 4.7.4.2., incluyendo para pET28b-GST-GFP, donde fue requerida la visualización de las tres digestiones por medio de un gel de agarosa al 1% usando TAE como solución amortiguadora y de esta manera purificar únicamente el plásmido con el gen de la proteína de fusión con el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION y asegurar la remoción de GFP. La reacción nuevamente se llevó a un volumen final de 20 μL , la cual estaba compuesta de 10 μL de ADN plasmídico, 2 μL de solución amortiguadora 4 10x, 2 μL de solución BSA 10x, 2 μL de agua mQ y las enzimas se agregaron secuencialmente, primero 1 μL de XhoI (NEB) incubando por 2 horas a 37 °C, seguido de 1 μL de NotI (NEB) incubando 1 hora a 37 °C y por último 2 μL de SAP (Fermentas) e incubando

durante dos horas. La digestión de los insertos se realizó también como en el punto 4.7.4.2., partiendo de los productos obtenidos de la amplificación.

4.6.5.3. Ligación de pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET28b-GST con insertos de interés

Las reacciones de ligación para la construcción de plásmidos se llevaron a cabo a un volumen final de 20 μ L. Las reacciones consistieron en 2 μ L de solución amortiguadora de la ligasa, 1 μ L de T4 DNA ligasa, 2 μ L del plásmido y se varió la cantidad de inserto de 0, 2, 4 y hasta 6 μ L, completando el volumen con agua mQ. La reacción con un volumen de inserto igual a 0 fue usado como control negativo de la reacción de ligación.

4.6.5.4. Transformación de la ligación pET30a-SmbPp, pET30a-SmbPc y pET28b-GST con insertos de interés

La transformación se realizó después de la desactivación de la T4 DNA ligasa por medio de una incubación a 65 °C por 10 minutos y se procedió con el mismo protocolo seguido en el punto 4.7.1.3.

4.6.5.5. Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de ADN plasmídico se realizó como en el punto 4.7.1.4., empleando el mismo kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.5.6. Cribado de colonias transformantes

Para la selección del ADN plasmídico obtenido de las clonas de la transformación que efectivamente contenían el inserto se realizó a una amplificación.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ L en microtubos especiales para PCR con capacidad de 200 μ L. Cada reacción consistió en 1 μ L de ADN plasmídico a examinar, 1 μ L de taq polimerasa (GenScript), 1 μ L de dNTP's, 3 μ L de iniciador delantero (concentración final de 60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (concentración final de 60 pmoles), 5 μ L de solución amortiguadora de la taq polimerasa (GenScript) y completando a 50 μ L con 36 μ L de agua mQ. Los iniciadores se variaron en el análisis individual de los insertos. Para pET30a-SmbPp-NDPK2, pET30-SmbPp-SHY2, pET30a-SmbPc-NDPK2, pET28b-GST-LovR y pET28b-GST-SHY2 se usaron los iniciadores delanteros y reversos correspondientes al inserto. En el caso de pET30a-SmbPc-PixE, pET30a-SmbPc-SHY2 se emplearon los iniciadores reversos y delanteros de T7, mientras que para pET28b-GST-NDPK2 se empleó el iniciador delantero T7 y el reverso de NDPK2. El programa de PCR fue el siguiente: un primer paso de dos minutos a 95 °C, un segundo paso de 30 ciclos de desnaturalización (un minuto a 95 °C), alineamiento (un minuto a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y una tercera etapa final de incubación durante 10 minutos a 72 °C. El ADN plasmídico obtenido de otras construcciones pET30a-SmbPp-LovR y pET30a-SmbPc-LovR se analizó mediante un análisis de restricción, la reacción de digestión se llevó a un volumen final de 20 μ L la cual consistió en 10 μ L del ADN plasmídico a probar, 2 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x, 2 μ L de solución BSA 10x, 0.5 μ L de XhoI (NEB) y 0.5 μ L de XhoI (NEB) y completando a 20 μ L con 5 μ L de agua mQ. Tanto la amplificación como el análisis se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% y al 1% respectivamente, se empleó TAE como solución amortiguadora empleando bromuro de

etidio como revelador en luz UV. Se comprobó el tamaño de los fragmentos con ayuda de un marcador de peso molecular de 1 Kbp (250 bp a 10 Kbp).

4.6.6. Construcción de plásmido pET30a-SmbPcE-GFP_{Ent}

Se realizó también una construcción con SmbP citoplásmico en pET30a que incluyera el sitio de reconocimiento de corte para enteroquinasa, el nuevo inserto generado se llamó SmbPcE. Esto se logró cambiando el diseño del iniciador y por ende los sitios también de reconocimiento para las enzimas de restricción con las que se trabajaron.

4.6.6.1. Amplificación de SmbPcE y GFP_{Ent}

Se realizaron dos reacciones de amplificación para los dos nuevos diseños de SmbPc y GFP, esta vez con el fin de dejar libre el sitio de reconocimiento de enteroquinasa propio del plásmido pET30a. Se varió el iniciador reverso para SmbP y se usó el mismo iniciador delantero de SmbPc, para GFP se cambió el diseño del iniciador delantero para el sitio de enteroquinasa y se conservó el reverso. Como en las amplificaciones descritas anteriormente, el volumen de reacción fue de 50 μ L, el cual consistió en 1 μ L de ADN patrón (construcción de pET30a-SmbPp-GFP para ambos casos), 1 μ L de Vent polimerasa (NEB), 2 μ L de MgSO₄, 2 μ L de dNTP's, 3 μ L de iniciador delantero (concentración final de 60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (concentración final de 60 pmoles), 5 μ L de solución amortiguadora de Vent polimerasa y completando con 33 μ L de agua mQ. El programa de PCR fue el siguiente: un primer paso de dos minutos a 95 °C, un segundo paso que consistió en 30 ciclos de desnaturalización (un minuto a 95 °C), alineamiento (un minuto a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y un

tercer paso final de 10 minutos a 72 °C. La amplificación se visualizó mediante un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora. La purificación de la amplificación se realizó por medio del gel empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION en un volumen final de 30 µL.

TABLA 7.

Iniciadores empleados para la amplificación de SmbPcE y GFP_{ENT}

Iniciador	Secuencia
SmbPc iniciador delantero	5'– ATGCATGCAACATATGAGCGGACATACTGCTCACGT – 3'
SmbP Ent. Iniciador reverso	5'– ATGCATGCAGGTACCGTGCGATTATGTTCCGGATGC– 3'
GFP iniciador delantero	5'– ATGCATGCACCATGGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG – 3'
GFP iniciador reverso	5'– NNNNNNCTCGAGTTATTCGTGCCATTTCGATTTTCTGAG –3'

4.6.6.2. Digestión de los insertos SmbPcE y del plásmido pET30a

La digestión para el inserto obtenido de la amplificación de SmbPcE y del plásmido pET30a se realizó a un volumen final de 50 µL, en donde la reacción de digestión para SmbPcE consistió en 30 µL del producto de amplificación purificado, 5 µL del solución amortiguadora 1.1 10x (NEB), 5 µL de solución BSA 10x, 8 µL de agua mQ, 1 µL de KpnI (NEB) y 1 µL de NdeI (NEB), la reacción se incubó por 1 hora a 37 °C. En el caso de la digestión del plásmido pET30a, la reacción consistió en 10 µL de plásmido, 5 µL de solución amortiguadora 1.1 10x (NEB), 5 µL de BSA 10x y 26 µL de agua mQ, las enzimas de restricción se agregaron secuencialmente, primero 1 µL de NdeI (NEB) incubando por 1 hora a 37 °C, seguido de 1 µL de KpnI (NEB) incubando 1 hora a 37 °C y por último 2 µL de SAP (Fermentas) incubando durante 1 hora a 37 °C. Ambas

digestiones fueron purificadas mediante el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION a un volumen final de 30 μL .

4.6.6.3. Ligación de pET30a más SmbPcE

La reacción de ligación se llevó a un volumen final de 20 μL , dicha reacción consistió en 2 μL de solución amortiguadora de la ligasa, 1 μL T4 DNA ligasa, 2 μL de plásmido pET30a digerido, el volumen del inserto SmbPcE se varió de 0, 2, 4 y 6 μL , completando el volumen según se requiriese con agua mQ usando la reacción con volumen de inserto 0 como control negativo.

4.6.6.4. Transformación de pET30a-SmbPcE

La transformación se realizó después de la desactivación de la T4 DNA ligasa por medio de una incubación a 65 °C por 10 minutos y se procedió con el mismo protocolo seguido en el punto 4.7.1.3.

4.6.6.5. Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de ADN plasmídico se realizó como en el punto 4.7.1.4., empleando el mismo kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.6.6. Cribado de las colonias transformantes

Para la selección de ADN plasmídico positivo para la inserción del inserto se verificó por medio de amplificación por PCR. El volumen final de la reacción fue de 50 μL , donde la composición se conformó de 1 μL de ADN plasmídico a probar, 1 μL taq polimerasa (GenScript), 1 μL dNTPs, 5 μL solución amortiguadora de la polimerasa, 3 μL iniciador T7 delantero (concentración final de 60 pmoles), 3 μL iniciador SmbPcE

reverso (concentración final de 60 pmoles) y completando el volumen con 36 μL de agua mQ. El programa de PCR fue el siguiente: un primer paso de dos minutos a 95 °C, un segundo paso que consistió en 30 ciclos de desnaturalización (un minuto a 95 °C), alineamiento (un minuto a 56 °C) y elongación (un minuto a 72 °C) y un tercer paso final de 10 minutos a 72 °C. La amplificación se visualizó mediante un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora.

4.6.6.7. Digestión de pET30a-SmbPcE y GFP_{Ent}

La digestión del inserto GFP_{ENT} se llevó a cabo a partir de la amplificación previamente purificada por gel. Dicha digestión se llevó a un volumen de 50 μL , donde la reacción consistió en 30 μL del producto de amplificación, 3 μL de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 3 μL de solución BSA 10x, 2 μL de agua mQ, 1 μL de la enzima NcoI (NEB) y 1 μL de la enzima XhoI (NEB), se incubó durante 3 horas a 37 °C. La digestión de pET30a-SmbPcE consistió en una reacción de 50 μL también, donde se usaron 10 μL de dicho ADN plasmídico, 2 μL de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 2 μL de solución BSA y 32 μL de agua mQ para completar el volumen, las enzimas se agregaron en orden, primero se agregó 1 μL de NcoI (NEB) y se incubó durante una hora a 37 °C, posteriormente 1 μL de XhoI (NEB) dejando incubar una hora a 37 °C y por ultimo 2 μL de SAP (Fermentas) e incubando durante 1 hora a 37 °C. Terminando el tiempo de incubación, se purificaron ambas digestiones con el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION para su posterior uso.

4.6.6.8. Ligación de pET30a-SmbPcE más GFP_{ENT}

Se realizaron varias reacciones de ligación, cada una de ellas a un volumen final de 20 μ L. Las reacciones consistieron en 2 μ L de solución amortiguadora de la ligasa, 1 μ L de T4 DNA ligasa (NEB), 2 μ L de plásmido digerido, el volumen del inserto varió de 0, 2 y 4 μ L, completando a 20 μ L con agua mQ según fuese necesario. Se dejó incubando una hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 4 °C durante toda la noche.

4.6.6.9. Transformación de pET30a-SmbPcE-GFP_{ENT}

La transformación se realizó después de la desactivación de la T4 DNA ligasa por medio de una incubación a 65 °C por 10 minutos y se procedió con el mismo protocolo seguido en el punto 4.7.1.3.

4.6.6.10. Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de ADN plasmídico se realizó como en el punto 4.7.1.4., empleando el mismo kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.6.6.11. Cribado de colonias transformantes

Para la selección de colonias positivas al inserto de GFP_{ENT} se procedió a un análisis de restricción. Cada reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L, donde cada una consistió en 10 μ L del ADN plasmídico a analizar, 2 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 1 μ L de enzima NcoI (NEB), 1 μ L de enzima XhoI (NEB) y completando con 6 μ L de agua mQ. La visualización del análisis se realizó mediante un gel de agarosa

al 1 % usando TAE como solución amortiguadora y bromuro de etidio como agente revelador.

4.7. Expresión de proteínas

A continuación se describe el protocolo seguido para la purificación de SmbPc-GFP y SmbPp-RFP.

4.7.1. Transformación de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)

Se realizaron varias pruebas de expresión a partir de las construcciones de plásmidos hechas. Para esto se transformó la cepa *E. coli* BL21(DE3), la cual es especial para la expresión de proteínas, con las diferentes construcciones a probar. Para esta transformación se empleó 1 μ L de ADN plasmídico y 30 μ L de células de *E. coli* BL21(DE3) rubidio-competentes. Se mezcló el ADN plasmídico con las células y se incubó la mezcla en hielo por 20 minutos. Después de ese tiempo se hizo a un choque térmico de 45 segundos a 44 °C, terminado el tiempo se colocó otra vez en hielo dejando reposar nuevamente por un mínimo de 2 minutos. Posteriormente se agregaron 850 μ L de caldo LB y se incubó durante una hora mínimo a 37 °C con 220 rpm. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó por 2 minutos a 10000 rpm. Se descartan aproximadamente 800 μ L de medio dejando el sedimento celular intacto, el cual se resuspende con el medio remanente y se transfiere a una placa de agar LB con el antibiótico correspondiente y se incuba por extensión con varilla. Las placas se sellan y se incuban durante 16 horas a 37 °C.

4.7.2. Expresión piloto de proteínas

Se procedió a una expresión de proteínas piloto de las clonas obtenidas mediante la transformación de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* con el fin de corroborar su correcta expresión. Para esto se seleccionan varias colonias y se transfiere una sola clona con ayuda de un aplicador a un tubo con 2 mL de caldo LB. Se incuban a 37 °C a 220 rpm hasta que alcancen una D.O.₆₀₀ de entre 0.4 – 0.6. Una vez llegado a dicho D.O.₆₀₀ se detiene la incubación y una vez atemperados los cultivos se agrega IPTG (Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido) como inductor a una concentración final de 0.1 mM. Se dejan incubando a 25 °C con 220 rpm durante 16 horas. Se recolecta el sedimento celular en una centrifuga de marca Thermo Scientific (Sorvall modelo ST16R) asegurándose de retirar completamente el caldo LB.

4.7.2.1. Obtención de la fracción soluble e insoluble

Se procede a la obtención de la fracción soluble a partir del sedimento celular. Para esto, se resuspende el sedimento en 120 µL de agua mQ, posteriormente se agregan 40 µL de solución amortiguadora de carga para SDS-PAGE 6x y se mezcla suavemente, finalmente se hierve durante 10 minutos y se centrifuga 15 minutos a 13000 rpm. Se separa el sobrenadante como fracción soluble, al sedimento restante se le agregan 120 µL de solución de urea 8 M y se hierve de nuevo durante otros 10 minutos de esta manera los cuerpos de inclusión se solubilizan en la solución de urea, finalmente se centrifuga obteniendo así la fracción insoluble en el sobrenadante el cual es posteriormente visualizado mediante el SDS-PAGE al igual que la fracción soluble.

4.7.2.2. Visualización de la expresión

Obtenidas ambas fracciones se procede a la visualización por medio de SDS-PAGE en fase discontinua, usando un gel de resolución al 10% y uno apilador al 4% de poliacrilamida desgasificada respectivamente. Después de la electroforesis se realiza una tinción con azul de coomassie.

4.7.3. Escalamiento de la expresión

Se realizó una expresión a escala mayor de SmbPc-GFP, SmbPcE-GFP y SmbPp-RFP. Se seleccionaron clonas que presentaran una adecuada expresión. La expresión de SmbPc-GFP se realizó en matraces de 500 mL, se obtuvo un volumen final de cultivo de 4 L. Se inocularon los matraces con un cultivo previo de la clona seleccionada y se incubaron a 37 °C con agitación de 220 rpm hasta que el cultivo alcanzó un D.O.₆₀₀ de 0.4 a 0.6. Una vez llegado a dicho rango se comenzó la inducción agregando IPTG hasta una concentración final de 0.1 mM, la expresión se llevó durante 16 horas a 25 °C con agitación constante de 220 rpm. La expresión de SmbPcE-GFPENT se realizó con las mismas condiciones variando únicamente de medio LB a medio SOC y se emplearon matraces con deflectores. En la expresión de SmbPp-RFP también se emplearon matraces de 500 mL con deflectores con un volumen de cultivo final de de 600 mL. Se colectó el sedimento celular con una centrifuga refrigerada a 4 °C durante 30 minutos a 5 mil rpm y se congeló a -20 °C para su posterior uso.

4.8. Purificación de proteínas

A continuación se describirán los métodos empleados para la purificación de SmbPc-GFP y SmbPp-RFP.

4.8.1. Purificación de SmbPc-GFP

4.8.1.1. Lisis celular de sedimento celular de expresión

Se lisaron las células del sedimento obtenido de la expresión de SmbPc-GFP. El protocolo se realizó con perlas de lisis, usando como solución amortiguadora de lisis Tris 50 mM, NaCl 500 mM a pH 8.0 y una cámara de lisado especial. El lisado obtenido se centrifugo durante 15 minutos a 13000 rpm, se separó y conservó el sobrenadante a -20 °C para posteriormente continuar con la purificación.

4.8.1.2. Purificación de SmbPc-GFP mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC) con resina

Para la purificación del lisado celular obtenido de la expresión de SmbPc-GFP se prepararon dos columnas diferentes usando una resina IMAC (Profinity IMAC de BIORAD). Primero se preparó el empaque de la columna usando 3 mL de resina y preparándola según instrucciones del manual. La resina de una columna se cargó con iones de Cu(II) mientras que la otra se cargó con iones de Ni(II) de la manera que el manual lo indicaba equilibrando al final con la solución amortiguadora de lisis, Tris 50 mM, NaCl 250 mM a pH 8.0.

4.8.1.3. Purificación de SmbPc-GFP con iones de cobre y níquel en resina IMAC

La columna con resina IMAC previamente cargada con los iones metálicos se cargó con la muestra de lisado celular y se dejó incubar una hora a 4 °C con agitación ocasional hasta asegurar la saturación de la columna por completo. Se probaron dos condiciones, una suave y otra fuerte. En la condición suave se probaron concentraciones bajas de NaCl e imidazol, empleando como solución amortiguadora de lavado 50 mM Tris, 300 mM NaCl a pH 8 y como solución amortiguadora de elución 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol a pH 8, ambas soluciones empleadas con ambos iones metálicos. Las soluciones amortiguadoras empleadas en las condiciones fuertes consistieron en una solución amortiguadora de lavado de 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM imidazol a pH 8 y una solución amortiguadora de elución de 50 mM Tris, 500 mM NaCl y 500 mM imidazol a pH 8, ambas soluciones empleadas en ambos iones metálicos. Primero se recolectó la fase no unida, posteriormente se lavó con la solución amortiguadora de lavado seleccionada según la condición. Finalmente se eluyó con la solución amortiguadora correspondiente con una alta concentración de imidazol para permitir la elución de la proteína. Las fracciones de fase no unida y de lavado se prepararon al igual que las de elución para su posterior análisis. El proceso de purificación se visualizó posteriormente por medio de SDS-PAGE en fase discontinua, con un gel de resolución al 10% y uno de apilamiento al 4%, terminada la electroforesis se tiñó con azul de Coomassie para revelar las bandas correspondientes a las proteínas.

4.8.1.4. Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus

Se empleó una columna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare) la cual está cargada previamente con iones de níquel. Se realizó una purificación con un método manual. Se equilibró la columna con 5 volúmenes de la solución amortiguadora de equilibrio (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) así mismo se equilibró el sistema con la misma solución amortiguadora la cual también se empleó como solución amortiguadora de lisis. El equilibrio de la columna se realizó con un flujo de 0.5 mL/min con una presión máxima de 0.5 MPa. Se cargó la muestra a la columna con un flujo de 0.5 mL/min a una presión máxima de 0.5 MPa (según especificaciones de la columna). Se cargó la muestra hasta una saturación visual (hasta que la columna en su mayoría presentará el color verde característico de GFP). Posteriormente se lavó la columna con una solución amortiguadora de lavado con concentración de 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 2.5 mM imidazol a pH 8, el lavado se llevó a cabo hasta que la señal de U.V. hubiese descendido y se mantuviese constante. Para la elución se empleó un gradiente usando como solución amortiguadora de elución con concentración de 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 100 mM imidazol con pH 8, el gradiente fue de 0% a 50% de la concentración de la solución amortiguadora de elución. El flujo se mantuvo a 0.5 mL/min a una presión de 0.5 MPa. Se colectaron fracciones de 0.5 mL y se conservaron para su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

4.8.1.5. Diálisis para remoción de NaCl

Se seleccionaron las diez primeras fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad con el sistema ÄKTA prime plus, las cuales mostraron una considerable

cantidad de proteína, tanto en SDS-PAGE como visualmente. Dichas fracciones se colectaron en un tubo de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y se dializó para eliminar el exceso de NaCl, para eso se empleó una solución amortiguadora de 50 mM Tris a pH 8.0. Se hicieron 3 diálisis de una hora cada una. La muestra dializada se conservó para su posterior purificación mediante intercambio iónico.

4.8.1.6. Cromatografía de intercambio aniónico con el sistema ÄKTA prime plus

Se empleó la columna HiTrap Q HP de 1 mL (GE Healthcare). Se empleó como solución amortiguadora de equilibrio el mismo usado en la diálisis (50 mM Tris a pH 8.0), se equilibró la columna (con un total de cinco volúmenes a 0.5 mL/min a 0.5 MPa) y el sistema con dicha solución. La muestra se cargó con un flujo de 0.5 mL/min a una presión máxima de 0.5 MPa según las indicaciones de la columna. Una vez saturada la columna (saturación visual) se siguió con el lavado empleando la misma solución amortiguadora de equilibrio hasta que la señal de U.V. descendió a aproximadamente cero y se mantuviese constante. Posteriormente se eluyó con una solución amortiguadora de 50 mM Tris, 250 mM NaCl a pH 8.0 con un gradiente de 0 a 100% de la concentración de la solución amortiguadora de elución, dicho gradiente se corrió en un volumen de 10 mL. Se colectaron y conservaron las fracciones para su posterior análisis mediante SDS-PAGE.

4.8.2. Purificación de SmbPcE-GFP_{ENT}

4.8.2.1. Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus

La purificación de SmbPcE-GFP_{ENT} se realizó como en el punto 4.8.1.4., únicamente se varió la solución amortiguadora de lavado a uno con concentración de 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol con un pH de 8.

4.8.3. Purificación de SmbPp-RFP

4.8.3.1. Choque osmótico para la obtención de la fracción periplásmica

El sedimento celular obtenido de la expresión de SmbPp-RFP se sometió a un choque osmótico con el fin de obtener únicamente la fracción periplásmica. Dicho procedimiento consistió en la resuspensión del sedimento en una solución amortiguadora de 20 mM Tris, 30% sacarosa, 2.5 mM EDTA a pH 8.0 (aproximadamente 5 mL por gramo de sedimento obtenido) y posterior agitación a temperatura ambiente durante una hora. Pasado el tiempo se centrifugó a 4 °C durante una hora a 5000 rpm. Se separó y conservó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió nuevamente en 2 mL de una solución de MgSO₄ 5 mM y se agitó en hielo durante una hora. Pasado el tiempo se centrifugó nuevamente durante una hora a 5000 rpm a 4 °C. Se conservó nuevamente el sobrenadante considerando este como la fracción periplásmica junto con el primer sobrenadante obtenido.

4.8.3.2. Purificación de SmbpP-RFP por medio de cromatografía de afinidad de iones metálicos (IMAC) con resina cargada con Cu (II)

La columna se empacó con la resina de BIORAD de IMAC con iones cobre como se indicó en el punto 4.9.1.2. Para la purificación de SmbPp-RFP se cargó la columna previamente preparada con la fracción de $MgSO_4$ obtenida del choque osmótico, se retiró la fase no unida y se cargó nuevamente, esta vez con la fracción de la solución al 30 % de sacarosa. Una vez saturada la columna se comenzó con el lavado, el cual se realizó con una solución amortiguadora de lavado la cual consistía en 30 mM Tris, 250 mM NaCl, 1 mM imidazol a pH 8.0. Se colectaron y guardaron las fracciones obtenidas para su posterior análisis. Terminado el lavado se eluyó con una solución amortiguadora de elución que consistía en 30 mM Tris, 250 mM NaCl, 250 mM imidazol a pH 8.0. Se colectaron y guardaron las fracciones de elución para su posterior análisis. El proceso de purificación se visualizó posteriormente por medio de SDS-PAGE en fase discontinua, con un gel de separación al 10% y el de apilamiento al 4%, terminada la electroforesis se realizó una tinción de coomassie para la revelación de bandas de proteínas.

4.8.3.3. Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus

SmbPp-RFP se purificó por medio del equipo FPLC ÄKTA como en el punto 4.8.1.4., variando únicamente la concentración de imidazol en la solución amortiguadora de lavado de 2.5 mM a 5 mM.

4.9. Remoción de la proteína de fusión

La remoción de SmbPcE de GFP_{ENT} se realizó mediante la enzima enteroquinasa de cadena ligera (New England Biolabs, NEB). De las fracciones obtenidas de la purificación de SmbPcE-GFP_{ENT} del punto 4.8.2.1., se tomaron tres alícuotas de 20 μ L cada una a las cuales se les agregó 0.5 μ L, 1 μ L y 2 μ L de la enzima respectivamente. Las alícuotas se dejaron incubando a temperatura ambiente por 16 horas. Terminado el tiempo se prepararon con un control de SmbPcE-GFP_{ENT} sin enzima para su visualización por SDS-PAGE empleando un gel de resolución al 12% y uno apilador al 4%. El gel se reveló mediante una tinción de Coomassie.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1. Crecimiento de *Nitrosomonas europaea*

Se probaron tres diferentes medios en condiciones de cultivo similares, sin embargo fue el medio 3 con las condiciones mostradas en la tabla 4 con la que se obtuvo el crecimiento esperado de la cepa. El crecimiento se hizo evidente debido a la presencia de turbidez en el medio (el control negativo permaneció sin cambio conservando la apariencia cristalina e incolora del medio) y primordialmente por la baja en el pH de 8.0 a 7 – 6 aproximadamente (el cual se llevaba nuevamente a pH 8 con una solución de Na_2CO_3), ha sido reportado en literatura que debido a su metabolismo nitrificante presenta metabolitos que descienden el pH del medio. Se mantuvo el crecimiento hasta una semana donde se alcanzó una D.O._{600} de 1.91. En la primera imagen se muestra el crecimiento de *N. europaea* a los tres días, en la segunda se muestra a la semana justo antes de la recolección del sedimento celular, en la última se

muestra una imagen del sedimento mostrando la coloración naranja característica de la bacteria.

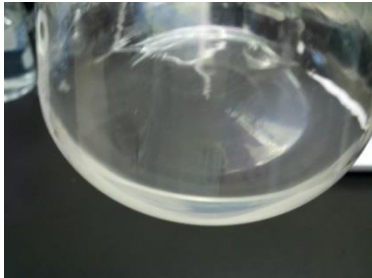


Figura 2. Cultivo de *N. europaea* a los tres días.

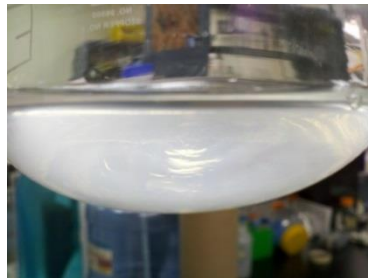


Figura 3. Cultivo de *N. europaea* a la semana.

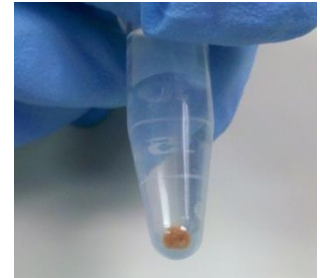


Figura 4. Sedimento celular de *N. europaea*.

5.2. Extracción de ADN genómico de *N. europaea*

La extracción del ADN genómico se realizó con dos sedimentos de *N. europaea*, uno de 6 mL de medio y otro de 8 mL. A continuación en la figura 5 se muestra la electroforesis realizada al ADN extraído, donde el primer carril muestra el marcador de peso molecular (300 bp a 10 kbp), el segundo y tercer carril muestran la primera elución de ADN genómico para 6 mL y 8 mL respectivamente, mientras que el cuarto y quinto representan la segunda elución del ADN extraído para 6 mL y 8 mL respectivamente. Se aprecian claramente las bandas correspondientes al ADN genómico, las cuales se presentan arriba del marcador de 10 Kbp.

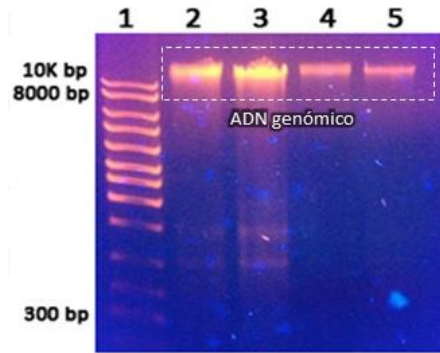


Figura 5. Extracción de ADN genómico de *N. europaea*.

5.3. Amplificación de SmbPc y SmbPp

A continuación se presenta la amplificación del gen de SmbPc y SmbPp a partir del ADN genómico extraído de *N. europaea*. En el primer carril podemos observar el marcador de peso molecular (300 bp a 10 kbp), en el segundo se observa la banda de amplificación para SmbPp y en el tercero la de SmbPc, es posible apreciar la diferencia entre los tamaños de ambos genes, puesto que el correspondiente a SmbPc carece del péptido señal de direccionamiento a periplasma. El cuarto y quinto carril corresponden a controles negativos, el cuarto sin polimerasa y el quinto sin ADN genómico.

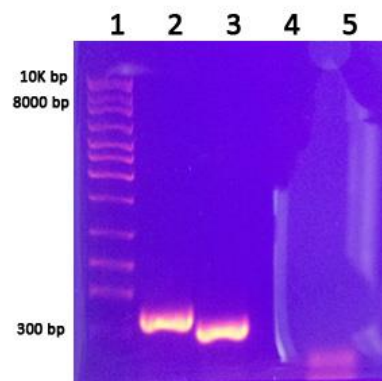


Figura 6. Amplificación de SmbPp y Smbpc.

5.4. Construcción de pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc

En la siguiente imagen (figura 7) se muestra el análisis de restricción realizado con las enzimas NdeI y BamHI para el cribado de las colonias positivas en el inserto. En el primer carril se aprecia el marcador de peso molecular, se pueden apreciar los fragmentos de corte positivos para SmbPp para los carriles 2, 3, 7, 8 y 9, mientras para SmbPc se aprecia el corte positivo en el carril número 5, los carriles 4 y 6 corresponden al análisis de otras dos clonas para SmbPc, sin embargo como se observa no hay presencia de ADN plasmídico, por tanto tampoco de inserto siendo negativas estas dos últimas.

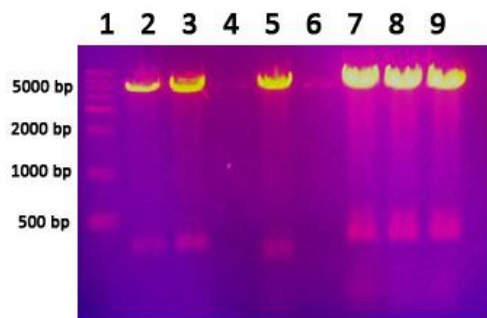


Figura 7. Análisis de restricción para la construcción pET28b-SmbPp y pET28b-SmbPc.

5.5. Construcción de pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-GST-GFP

Se muestra la siguiente imagen (figura 8) con el análisis de restricción realizado sobre el ADN plasmídico obtenido de varias colonias seleccionadas después de la transformación de la ligación. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (250 bp a 10 kbp). Se pueden apreciar claramente en el carril 6 y 7 el

fragmento para GST-GFP y en el carril 11 el fragmento correspondiente a SmbPp-GFP. El análisis se realizó con las enzimas XhoI y NdeI.

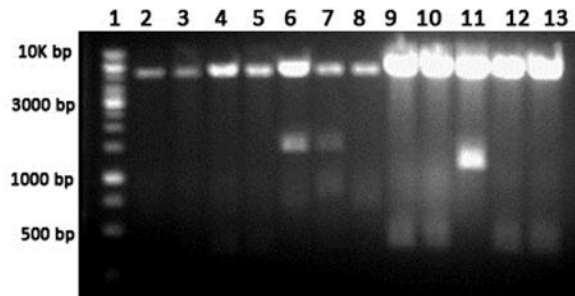


Figura 8. Análisis de restricción de las construcciones pET28b-SmbPp-GFP y pET28b-GST-GFP.

5.6. Construcción de pET30a-SmbPp-GFP y pET30a-SmbPc-GFP

Para el cribado de las clonas transformantes con el inserto positivo para SmbPp-GFP y SmbPc-GFP se realizó un análisis de restricción el cual se presenta en la siguiente imagen (figura 9). El corte se llevó a cabo con las enzimas de restricción XhoI y NdeI para evaluar el tamaño del corte. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (250 bp a 10 kbp), en los carriles número 2 y 3 es posible observar el corte correspondiente a SmbPp-GFP y en el 4 y 5 el correspondiente a SmbPc-GFP variando SmbPp-GFP con un tamaño más grande debido a la péptido señal.

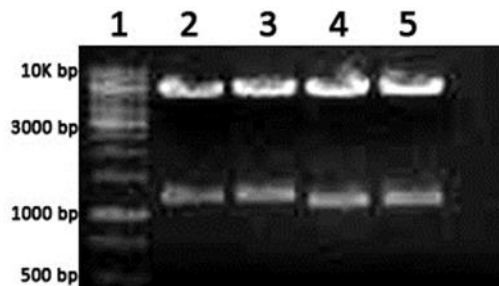


Figura 9. Análisis de restricción con enzimas XhoI y NdeI de las construcciones pET30a-SmbPp-GFP y pET30a-SmbPc-GFP.

5.7. Construcción de pET30a-SmbPc-RFP, pET30a-SmbPp-RFP y pET28b-GST-RFP

Para el análisis de colonias transformantes positivas para el inserto de RFP se realizó un análisis de restricción. A continuación se presenta la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 10) donde en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), en el carril número 2 se muestra el análisis realizado a pET30a-SmbPp-RFP mientras que en el carril 3 al 8 se muestran los análisis realizados a las colonias obtenidas de la transformación de pET30a-SmbPc-RFP. En la figura 11 se muestra la visualización en gel de agarosa de la amplificación realizada sobre varias construcciones con GST como proteína de fusión. En la imagen se puede observar en el carril 1 el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), y en el carril 5 y 6 las amplificaciones para el inserto de GST-RFP, donde la banda en el carril 6 correspondía al peso molecular del inserto GST-RFP.

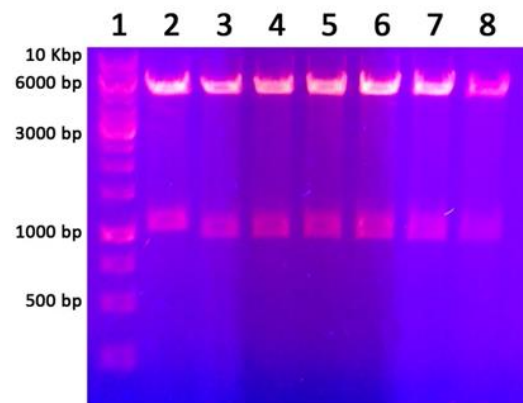


Figura 10. Análisis de restricción realizado con las enzimas XhoI y NdeI para las construcciones de pET30a-SmbPp-RFP y pET30a-SmbPc-RFP.

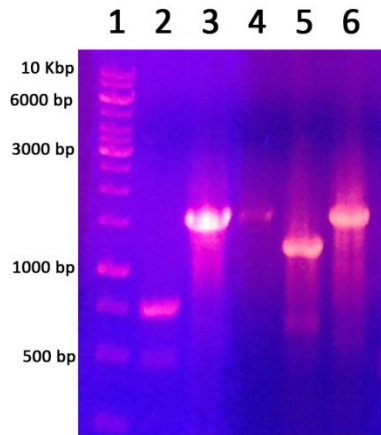


Figura 11. Amplificación con iniciador delantero de los genes de interés e iniciador T7 reverso para la confirmación de insertos en construcciones en pET28b usando GST como proteína de fusión.

5.8. Construcciones de pET30a-SmbPc, pET30a-SmbPp y pET28b-GST con insertos de interés

5.8.1. Amplificación de insertos

En las siguientes imágenes se muestran las amplificaciones realizadas para los genes de interés, en este caso SHY2, PixE, LovR y NDPK2. En la figura 12 se puede observar en el carril 1 el marcador de peso molecular de 10 Kbp, mientras que en el carril 2 se observa la amplificación de SHY2, en el número 3 la amplificación de PixE y en el 4 la correspondiente a LovR. En la figura 13 se observa también en el carril número 1 el marcador de peso molecular y en el segundo carril la banda de amplificación correspondiente a NDPK2, se observa una banda en aproximadamente 1500 bp correspondiente a una inespecificidad de amplificación.

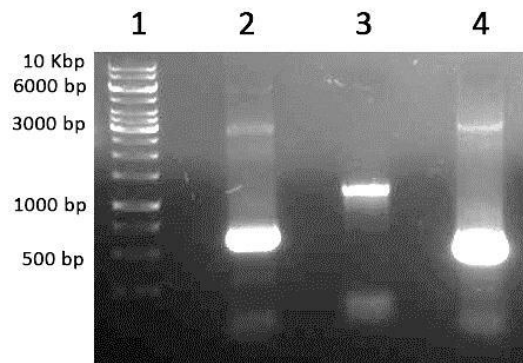


Figura 12. Amplificaciones para SHY2, PixE y LovR.

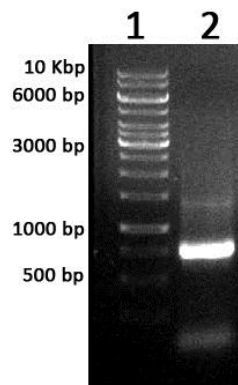


Figura 13. Amplificación de NDPK2.

5.8.2. Tamizaje de ADN plasmídico positivo a los insertos de interés

A continuación se muestran las imágenes del tamizaje realizado a las clonas obtenidas con el fin de corroborar que contuvieran el inserto de interés. En la figura 14 se muestra el análisis de restricción realizado sobre las construcciones de pET30a-SmbPp-LovR y pET30a-SmbPc-LovR, dicho análisis se realizó con las enzimas de restricción NdeI y XhoI. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), en el carril 2 y 3 se muestra el análisis de restricción del inserto SmbPc-LovR y del carril 4 al 7 se muestra el realizado sobre SmbPp-LovR.

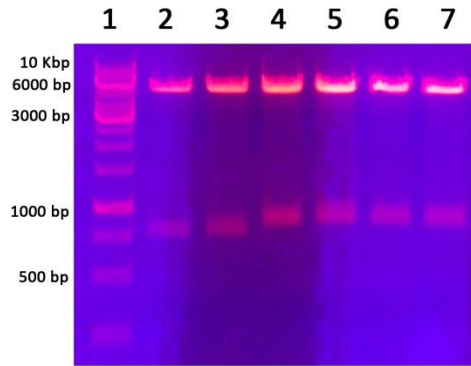


Figura 14. .Análisis de restricción de pET30a-SmbPc-LovR y pET30a-SmbPp-LovR realizado con las enzimas NdeI y XhoI.

En la figura 15 se puede observar la amplificación realizada sobre construcciones de pET30a-SmbPc-SHY2, pET30a-SmbPc-NDPK2 y pET30a-SmbPc-PixE. En dicha imagen se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp). En el carril 2 y 3 se observa la amplificación de SmbPc-SHY2, en el 4 y 5 para SmbPc-NDPK2 y en el 6 y 7 para SmbPc-PixE. Las amplificaciones se realizaron con iniciadores de T7.

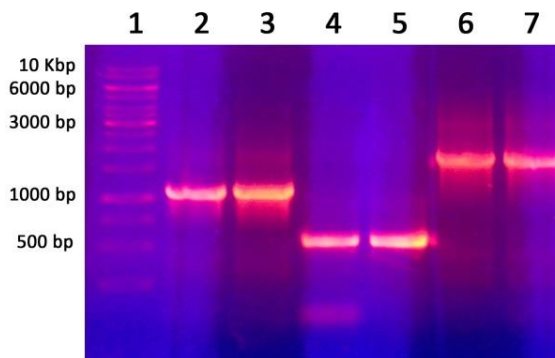


Figura 15. Amplificación de SmbPc-SHY2, SmbPc-NDPK2 y SmbPc-PixE.

En la figura 16 se puede apreciar la amplificación del inserto SHY2 en la construcción pET30a-SmbPp-SHY2. En donde el primer carril corresponde al marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), y en el carril 2 y 3 se puede observar la amplificación de dicho inserto realizado con los iniciadores propios del gen SHY2.

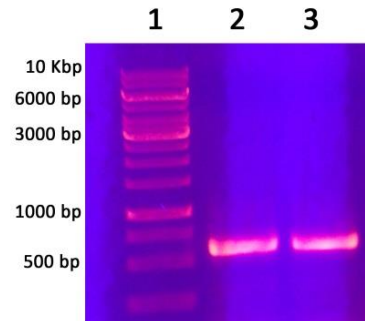


Figura 16. Amplificación del inserto SHY2 a partir de la construcción pET30a-SmbPp-SHY2 con los iniciadores propios del gen.

En la siguiente imagen se puede apreciar la amplificación del inserto de NDPK2 a partir de la construcción de pET30a-SmbPp-NDPK2. En dicha imagen (figura 17) se muestra en el carril número 1 el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp) y en los carriles 2 ,3 y 4 la amplificación de NDPK2 realizada con los iniciadores propios del gen.

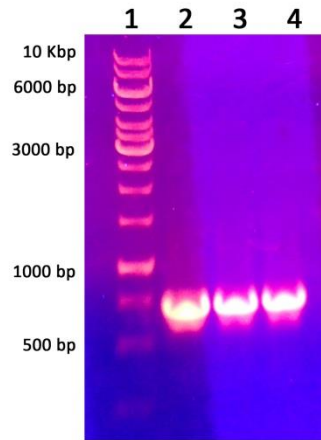


Figura 17. Amplificación de NDPK2 a partir de la construcción de pET30a-SmbPp-NDPK2 realizada con los iniciadores propios del gen.

A continuación se muestran las imágenes correspondientes al tamizaje de las construcciones usando GST como proteína de fusión. En la figura 18 se puede apreciar en el primer carril el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), mientras que en los carriles 5 y 6 se observa la amplificación del inserto LovR realizada con los iniciadores propios del gen a partir de clonas con la construcción de pET28b-GST-LovR y en el carril 7 se observa la amplificación para el gen SHY2 también realizada con los iniciadores propios del gen a partir de clonas con la construcción pET28b-GST-SHY2.

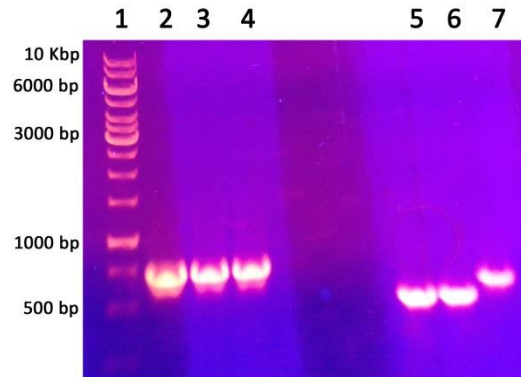


Figura 18. Amplificación de los genes de LovR y SHY2 con sus respectivos iniciadores a partir de las construcciones de pET28b-GST-LovR y pET28b-GST-SHY2

En la figura 11 se pueden observar las amplificaciones realizadas para los genes de PixE y NDPK2 llevadas a cabo con su iniciador delantero propio y empleando el iniciador reverso de T7. En el carril número 1 se observa el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), mientras que en el carril número 2 se encuentra la amplificación para GST-PixE realizada a partir de la construcción pET28b-GST-PixE, y en el carril 3 y 4 se puede apreciar la amplificación para GST-NDPK2 realizada a partir de la construcción de pET28b-GST-NDPK2.

5.9. Construcción de pET30a-SmbPcE-GFP_{ENT}

Se realizó una construcción con el sitio de corte para enteroquinasa (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) para remover la proteína de fusión, en este caso SmbPc.

5.9.1. Amplificación de SmbPcE y GFP_{ENT}

En la siguiente imagen (figura 19) se aprecian las amplificaciones para la obtención de los genes de SmbPc, SmbPp y GFP con diferentes sitios de corte para enzimas de restricción (dichos insertos serán llamados SmbPcE, SmbPpE y GFP_{ENT} para hacer distinción por su sitio de corte), en este caso NdeI y KpnI para SmbP y para GFP NcoI y XhoI, dejando libre el sitio de corte para enteroquinasa dentro del vector. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp). En el carril número 2 se aprecia la amplificación de SmbPcE, mientras que en el 3 se observa la amplificación para SmbPpE en tanto para GFP_{ENT} se puede apreciar la amplificación en el carril número 4.

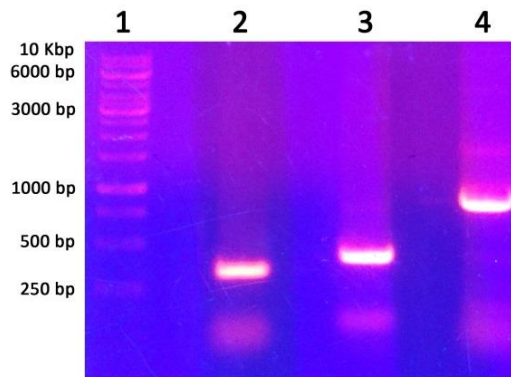


Figura 19. Amplificación de SmbPcE (2), SmbPpE (3) y GFP_{ENT} (4) con los iniciadores propios de los genes.

5.9.2. Construcción de pET30a-SmbPcE

En la siguiente imagen (figura 20) se puede observar la amplificación realizada para el inserto de SmbPcE empleando su propio iniciador delantero y el iniciador reverso de T7. Dichas amplificaciones se realizaron a partir del ADN plasmídico extraído

de las clonas transformadas con la construcción de pET30a-SmbPcE con el fin de corroborar la presencia del inserto de SmbPcE. Se puede observar en el primer carril el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), mientras que en el carril 7 a 10 se puede observar la banda correspondiente a la amplificación de SmbPcE.

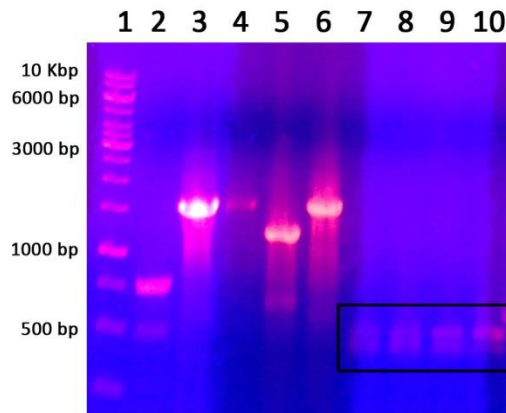


Figura 20. Amplificación de SmbPcE (carriles 7 a 10) con su iniciador delantero y un iniciador reverso de T7 a partir del ADN plasmídico de las construcciones de pET30a-SmbPcE.

5.9.3. Construcción de pET30a-SmbPcE-GFP_{ENT}

En la figura 20 se aprecia el análisis de restricción para corroborar la presencia del inserto GFP_{ENT}. Dicho análisis se realizó con las enzimas NcoI y XhoI. En el carril número 1 se encuentra el marcador de peso molecular (250 bp a 10 Kbp), del carril 5 al 7 se observa la banda correspondiente al inserto de GFP_{ENT} obtenido vía la digestión de las enzimas de restricción antes mencionadas.

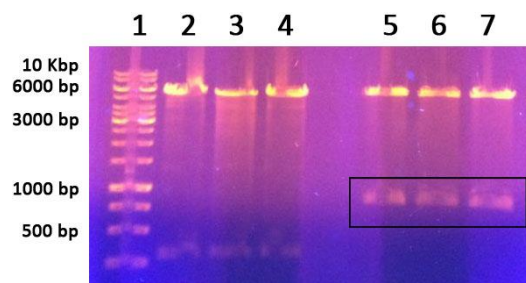


Figura 21. Análisis de restricción de la construcción pET30a-SmbPcE-GFPENT realizado con las enzimas NcoI y XhoI.

5.10. Construcciones obtenidas

Con la metodología clásica de clonación (digestión, ligación y transformación) fue posible obtener varias construcciones, las cuales se resumen en la siguiente tabla:

TABLA 8.

Construcciones obtenidas con diferentes plásmidos

	SmbPc	SmbPp	GST	MBP
GFP	X	X	X	X*
GFP _{ENT}	X			
RFP	X	X	X	X*
SHY2	X	X	X	
LovR	X	X	X	
NDPK2		X	X	
PixE	X			

* Ya se contaba previamente con las construcciones de MBP en el plásmido pIVEX2.3d

5.11. Expresión de proteínas

5.11.1. Expresión piloto de SmbPp y SmbPp-GFP

Durante las expresiones piloto de la fracción periplásmica no se obtuvo el color característico de GFP. La evaluación de la expresión se realizó mediante SDS-PAGE. A

continuación se muestra una imagen (figura 22) de la expresión piloto de SmbPp y SmbPp-GFP, donde se muestra el marcador en el primer carril, en el numero 2 un lisado control de BL21(DE3), en el carril numero 3 la expresión de SmbPp y en el 4 y 5 se pueden apreciar las bandas de expresión para SmbPp-GFP.

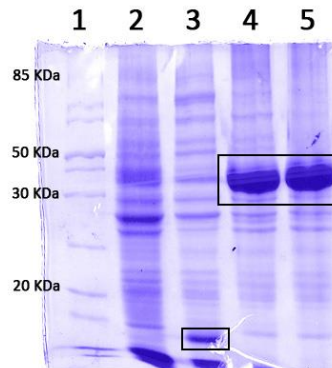


Figura 22. Expresión piloto de SmbPp y SmbPp-GFP.

5.11.2. Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-GFP, SmbPp-GFP, GST-GFP y MBP-GFP

Las expresiones piloto de SmbPc-GFP y SmbPp-GFP se realizaron a partir de las construcciones realizadas con pET30a. En la siguiente imagen (figura 23) se puede observar la comparación de expresión entre las proteínas de fusión comerciales MBP y GST contra SmbPc y SmbPp, las cuatro unidas a GFP. En el primer carril se puede observar el marcador de peso molecular, en el segundo se observa el control negativo correspondiente a un lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido. Se muestran tanto la fracción soluble como en la insoluble de cada expresión, en el carril 3 y 4 se observa la expresión de SmbPc-GFP en su fracción soluble (FS) e insoluble (FI) respectivamente. A continuación se presenta la expresión de SmbPp-GFP mostrando la fracción soluble en

el carril 5 y la insoluble en el carril 6. En el carril 7 y 8 se pueden apreciar las bandas de expresión para GST-GFP, siendo la 7 su fracción soluble y la 8 la insoluble. En los últimos dos carriles se pueden observar las bandas de expresión de MBP-GFP, siendo el carril 9 la fracción soluble y el carril 10 la insoluble.

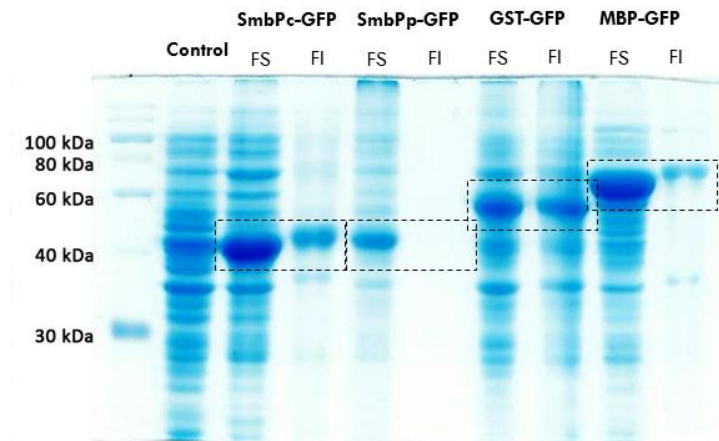


Figura 23. Comparación de expresión de GFP con las proteínas de fusión SmbPc, SmbPp, GST y MBP.

5.11.3. Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-RFP, SmbPp-RFP, GST-RFP y MBP-RFP

En la figura 24 se aprecia la expresión de RFP con diferentes proteínas de fusión, entre ellas las comerciales, GST y MBP así como las propias de la presente investigación, SmbPc y SmbPp. En el carril número 1 se aprecia el marcador de peso molecular, en el carril número 10 se observa el control negativo de BL21(DE3). En los carriles 2 y 3 se pueden observar las bandas de expresión para SmbPc-RFP, siendo en el carril 2 la fracción soluble (FS) y en el 3 la insoluble (FI). En el carril 4 se puede apreciar la banda de expresión para SmbPp-RFP fracción soluble y en la 5 su fracción insoluble.

En los carriles 6 y 7 se observa la expresión de GST-RFP, siendo la fracción soluble el carril 6 y la insoluble el 7. En cuanto a MBP-RFP es posible apreciar sus bandas de expresión en el carril 8 mostrando su fracción soluble y en el 9 su fracción insoluble.

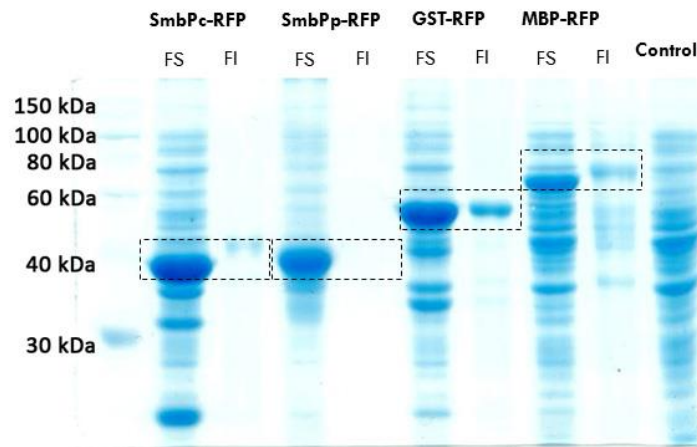


Figura 24. Comparación de expresión de RFP con las proteínas de fusión SmbPc, SmbPp, GST y MBP.

5.11.4. Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-SHY2, SmbPp-SHY2 y GST-SHY2

En la figura 25 se puede apreciar la expresión piloto de SHY2 fusionada a SmbPc, SmbPp y GST mostrando únicamente la fracción soluble correspondiente a cada expresión. Se puede observar en el primer carril el marcador de peso molecular y en carril 2 el control negativo correspondiente a un lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido. Del carril 3 al 5 se observan las bandas de expresión para SHY2 unida a SmbPc, mientras que en los carriles 9 al 11 es posible apreciar las bandas de expresión correspondientes a SHY2 unida a GST. Los carriles 6 al 8 corresponden a la expresión de SHY2 con SmbPp, sin embargo no se observó banda de expresión para dicha proteína.

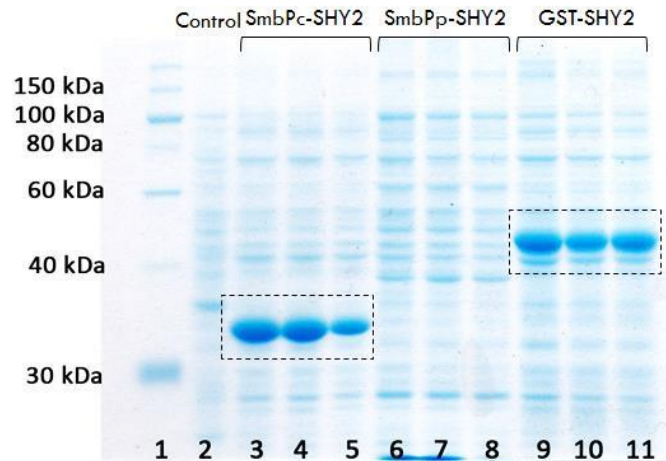


Figura 25. Expresión piloto de SmbPc-SHY2, SmbPp-SHY2 y GST-SHY2, esto correspondiendo a sus fracciones solubles.

En la siguiente imagen (figura 26) se aprecia la expresión de SHY2 con SmbPc, GST y SmbPp, en este caso mostrando las fracciones insolubles de cada una. En el primer carril se puede observar el marcador de peso molecular y en el número 2 el control negativo correspondiente a *E. coli* BL21(DE3). En los carriles del 3 al 5 se puede observar la expresión de SHY2 con GST mientras que en los carriles del 6 al 8 se observar la expresión de SHY2 con SmbPc. Los siguientes carriles del 9 al 11 muestran la expresión de SHY2 con SmbPp aunque no se observó la banda de expresión correspondiente a dicha proteína.

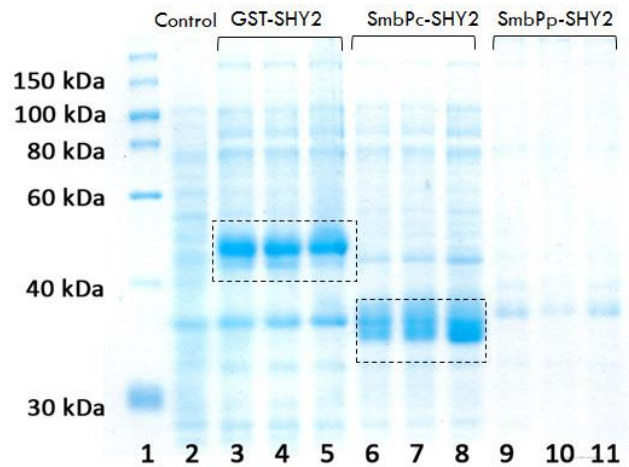


Figura 26. Expresión piloto de SmbPc-SHY2, SmbPp-SHY2 y GST-SHY2 correspondientes a la fracción insoluble.

5.11.5. Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-LovR, SmbPp-LovR y GST-LovR

En la figura 26 se puede observar la expresión piloto realizada para LovR unida a SmbPc, SmbPp y GST mostrando sus fracciones solubles para cada caso. En el primer carril se puede observar el marcador de peso molecular y en el número 2 el control negativo de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido. En los carriles 3 y 4 se pueden apreciar las bandas de expresión para GST-LovR, en los carriles 5 y 6 se observan las bandas de expresión que corresponden a SmbPc-LovR y por último en los carriles 7 y 8 se aprecian las bandas pertenecientes a SmbPp-LovR.

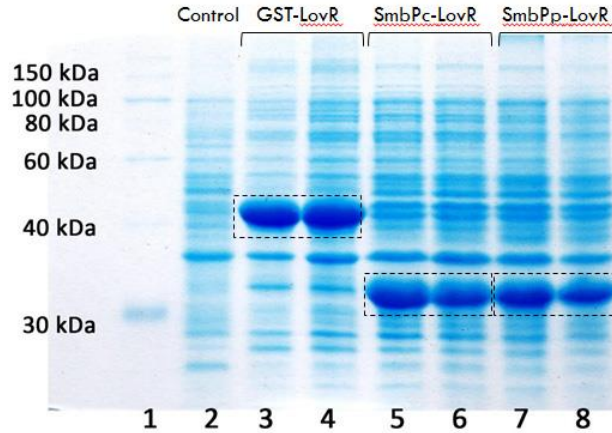


Figura 27. Expresión piloto de GST-LovR, SmbPc-LovR y SmbPp-LovR en sus fracciones solubles.

Además se presenta en la figura 28 las expresiones piloto para LovR unida a SmbPc, SmbPp y GST, en este caso mostrando la fracción insoluble para cada una. En el primer carril se puede apreciar el marcador de peso molecular y en el segundo el control negativo de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido. En los carriles 3 y 4 se aprecia la expresión de GST-LovR, así mismo SmbPc-LovR se puede observar en los carriles 5 y 6 mientras que SmbPp-LovR se muestra en los carriles 7 y 8.

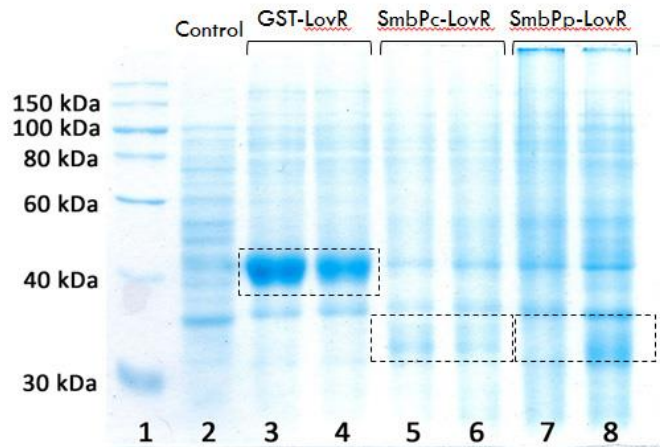


Figura 28. Expresión piloto de GST-LovR, SmbPc-LovR y SmbPp-LovR en sus fracciones insolubles.

5.11.6. Expresión piloto y comparación de expresión de SmbPc-NDPK2 y GST-NDPK2

La expresión piloto de NDPK2 unida a SmbPc y GST se puede observar en la figura 29, donde se muestra en el carril número 1 el marcador de peso molecular mientras que en el número 2 se puede observar el control negativo, correspondiente a un lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido. De igual manera en los carriles 3 y 4 se aprecian las fracciones solubles (FS) correspondientes a la expresión de SmbPc-NDPK2, los carriles 5 y 6 corresponden a las fracciones insolubles (FI) de esa misma expresión. En los carriles 7 y 8 se muestran las fracciones solubles correspondientes a la expresión de GST-NDPK2, en tanto los carriles 9 y 10 corresponden a las fracciones insolubles para dicha expresión.

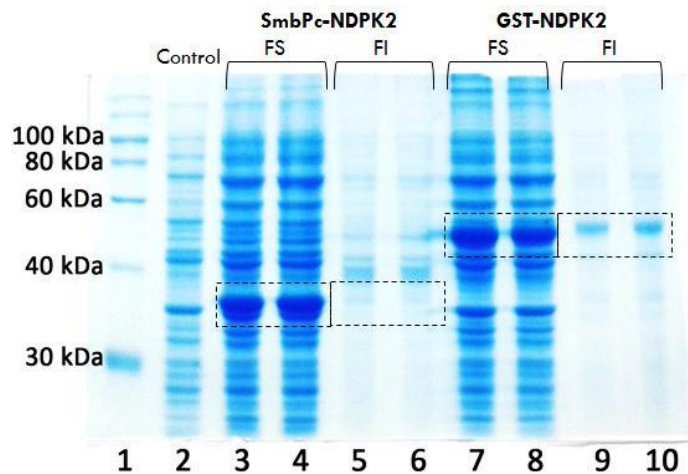


Figura 29. Expresión piloto de SmbPc-NDPK2 y GST-NDPK2 en sus fracciones solubles e insolubles.

5.12. Purificación de proteínas

5.12.1. Purificación de SmbPc-GFP por cromatografía de afinidad con iones metálicos IMAC con resina cargada con Cu(II) y Ni(II)

A continuación se presenta el perfil de cromatografía de afinidad obtenido de la purificación de SmbPc-GFP (figura 30) en condiciones suaves con una resina de afinidad (IMAC) cargada con iones de Cu(II). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el número 2 se observa el lisado del sedimento de expresión previo a la purificación (LC). En el carril número 3 se contempla la fase no unida (FNU), del carril 4 al 6 se muestran las fracciones de lavado y del carril 7 al 10 se muestran las fracciones de elución mostrando la mayor elución de SmbPc-GFP en el carril número 8 donde se puede apreciar claramente la correspondiente banda.

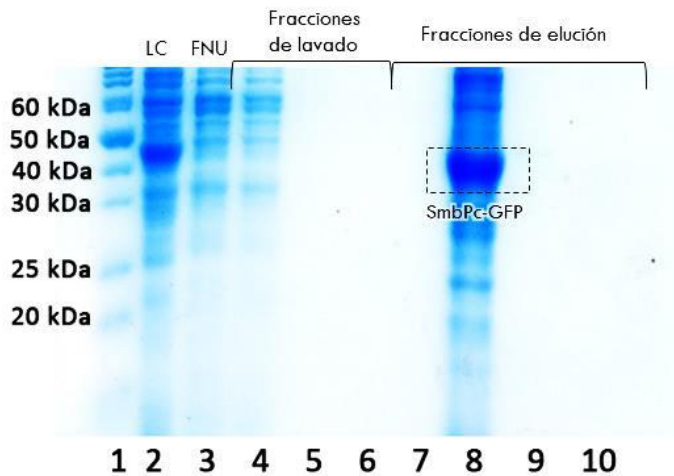


Figura 30. Cromatografía de afinidad Cu(II) en condiciones suaves (baja concentración de NaCl, sin imidazol en los lavados y baja concentración del mismo para la elución) para la purificación de SmbPc-GFP.

En la siguiente imagen (figura 31) se aprecia la cromatografía de SmbPc-GFP mediante purificación con iones de Ni(II) también bajo condiciones suaves. En dicha imagen se puede apreciar en el primer carril el marcador de peso molecular, en el segundo el lisado del sedimento celular de expresión previo a la purificación, en el carril 3 se observa la fase no unida y del carril 4 al 6 se observan las fracciones de lavado mientras que del carril 7 al 10 se muestran las fracciones de elución, mostrándose la banda correspondiente a SmbPc-GFP con mayor intensidad en el carril 7 y en menor cantidad en el carril 8.

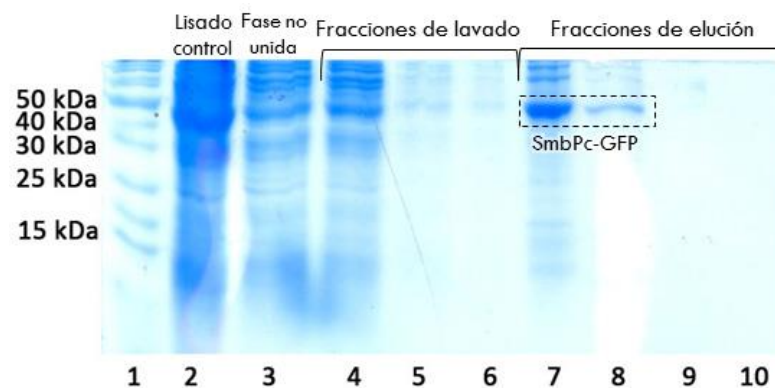


Figura 31. Cromatografía de afinidad con Ni(II) en condiciones suaves (baja concentración de NaCl, sin imidazol en los lavados y baja concentración del mismo para la elución) para la purificación de SmbPc-GFP.

Se muestran también las purificaciones realizadas con condiciones fuertes, es decir, altas concentraciones de NaCl e imidazol para lavado y elución. En primer lugar se muestra la cromatografía de afinidad con iones de Cu(II) en condiciones fuertes (figura 32), donde en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo carril el lisado del sedimento celular de expresión antes de la purificación como control (LC) y en el carril número 3 la fase no unida (FNU). Del carril 4 al 8 se

muestran las fracciones de lavado y del carril 9 al 13 se aprecian las fracciones de elución, en donde la banda de SmbPc-GFP es apreciada con claridad en el carril número 10.

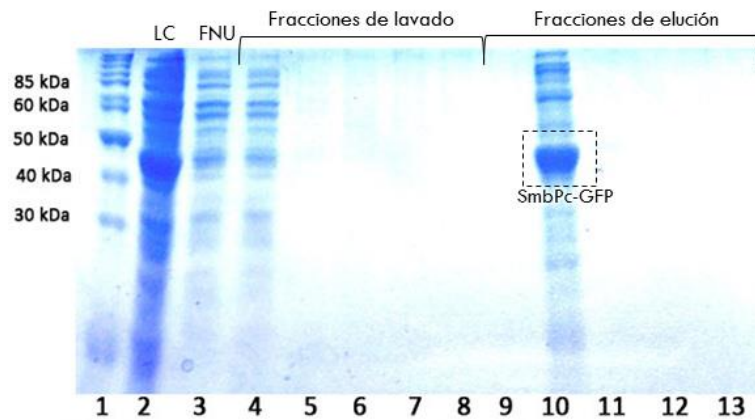


Figura 32. Cromatografía de afinidad Cu(II) en condiciones fuertes (alta concentración de NaCl e imidazol para lavado y elución) para la purificación de SmbPc-GFP.

En la siguiente imagen (figura 33) se aprecia la cromatografía de la purificación realizada con la resina cargada con iones de Ni(II) bajo condiciones fuertes. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, mientras que en el número 2 se aprecia el lisado del sedimento celular de expresión antes de la purificación como control (LC). En el carril número 3 se observa la fracción no unida (FNU) mientras que del carril 4 al 9 se muestran las fracciones obtenidas del lavado y por último del carril 10 al 13 se aprecian las fracciones de elución, donde en el carril número 10 se puede observar claramente la banda correspondiente a SmbPc-GFP (marcada dentro del recuadro).

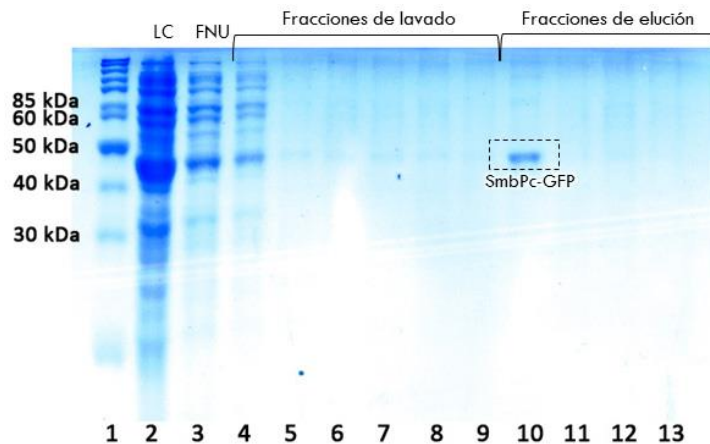


Figura 33. Cromatografía de afinidad Ni(II) en condiciones fuertes (alta concentración de NaCl y de imidazol para el lavado y elución) para la purificación de SmbPc-GFP.

Así mismo, las fracciones se analizaron visualmente mediante luz UV con el fin de observar la fluorescencia de SmbPc-GFP y percatar su presencia en cualquiera de las etapas de purificación. A continuación se presenta una de las imágenes obtenidas de dicho análisis (figura 34) donde es posible apreciar claramente la fluorescencia de SmbPc-GFP, en especial en las fracciones de elución.



Figura 34. Visualización en luz UV de la fluorescencia de las fracciones obtenidas de la cromatografía con iones de Cu(II) y Ni(II).

5.12.2. Purificación de SmbPc-GFP mediante el sistema de FPLC ÄKTA prime plus

5.12.2.1. Cromatografía IMAC con columna de HisTrap HP

A continuación se muestra la cromatografía obtenida de la purificación de SmbPc-GFP mediante una columna de HisTrap HP cargada con iones Ni(II) usando el equipo ÄKTA prime plus. Las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE y se presenta en la figura 35 (se juntaron dos geles de 10 pocillos para una mejor apreciación de la cromatografía). En donde, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular, el segundo a un lisado control antes de la purificación mientras que los carriles del 3 al 20 muestran las fracciones de elución obtenidas, en las cuales se puede apreciar claramente la banda correspondiente a SmbPc-GFP (marcadas dentro del recuadro).

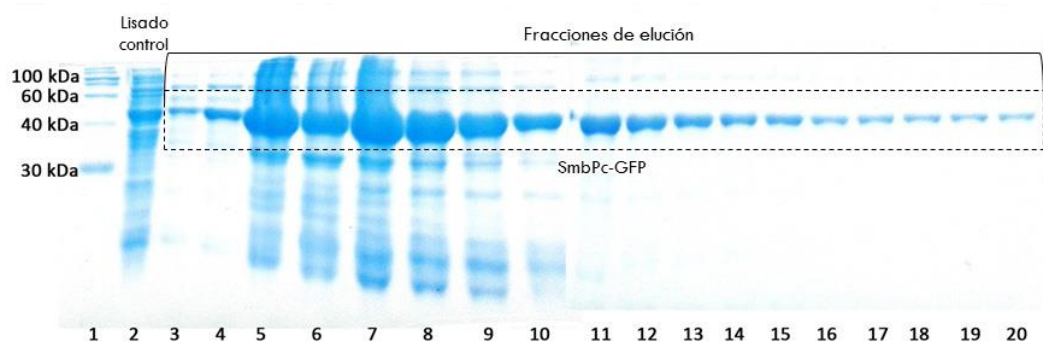


Figura 35. Cromatografía de afinidad con columna HisTrap HP cargada con iones de Ni(II).

En la siguiente gráfica (figura 36) podemos observar el cromatograma de elución obtenido con el equipo de FPLC ÄKTA prime plus. Se puede apreciar claramente el pico de elución para SmbPc-GFP. Cabe mencionar que las fracciones se obtuvieron en volúmenes de 0.5 mL.

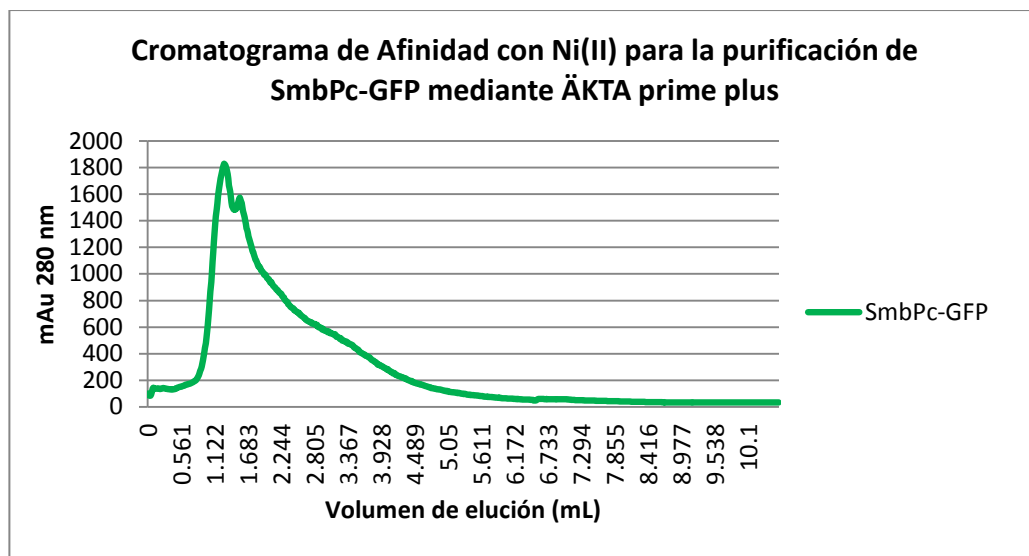


Figura 36. Cromatograma de Afinidad con Ni(II) para SmbPc-GFP

5.12.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico con columna HiTrap Q HP

Se recolectaron y dializaron las fracciones de elución obtenidas de la purificación con la columna HisTrap HP para remover el exceso de NaCl. Después de la diálisis se realizó una segunda purificación con una cromatografía de intercambio aniónico. En la siguiente imagen (figura 37) se muestra el SDS-PAGE de las fracciones de elución obtenidas en la purificación con el ÄKTA prime plus. En el primer carril se aprecia el marcador de peso molecular, en el segundo se observa la muestra antes de la purificación por intercambio aniónico mientras que del carril 3 al 10 se muestran las fracciones de elución (las posteriores fracciones de elución con el gradiente no se muestran debido a que no se observó ninguna banda en el gel de poliacrilamida). Se aprecian claramente en el gel las bandas correspondientes a SmbPc-GFP (marcadas dentro del recuadro).

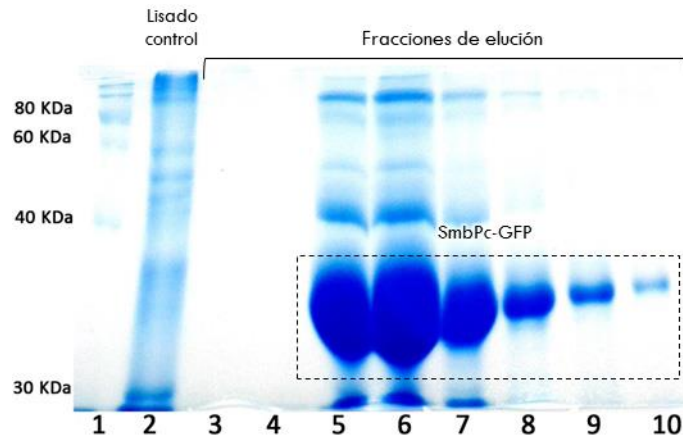


Figura 37. Cromatografía de intercambio aniónico con la columna HiTrap Q HP, se muestran dentro del recuadro las bandas correspondientes a SmbPc-GFP.

En la próxima gráfica (figura 38) se muestra el cromatograma de elución obtenido de dicha purificación mediante intercambio aniónico con el equipo de FPLC ÄKTA prime plus.

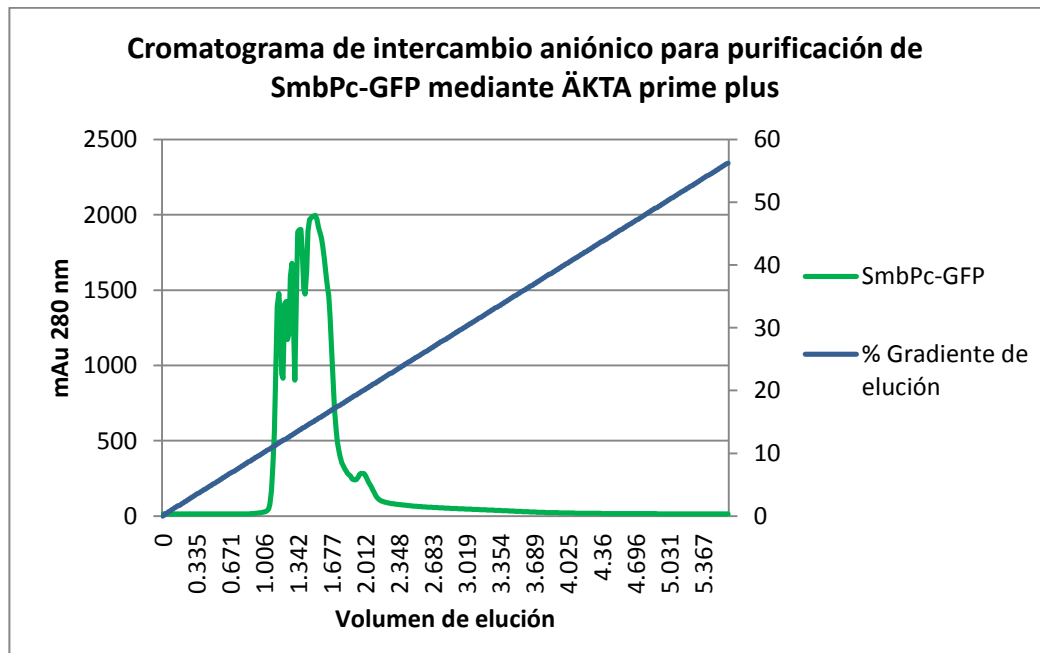


Figura 38. Cromatograma de intercambio aniónico para SmbPc-GFP

5.12.3. Purificación de SmbPcE-GFP_{ENT} mediante el sistema de FPLC ÄKTA prime plus

Las fracciones obtenidas de la purificación de SmbPcE-GFP_{ENT} se visualizaron por SDS-PAGE, el perfil del cromatograma se muestra en la figura 39, en donde el primer carril muestra el marcador de peso molecular, el segundo la fase no unida en la columna de HisTrap HP de iones Ni(II) y del carril 3 al 13 se muestran las fracciones de elución que se obtuvieron, la banda correspondiente a SmbPcE-GFP se señala mediante el recuadro.

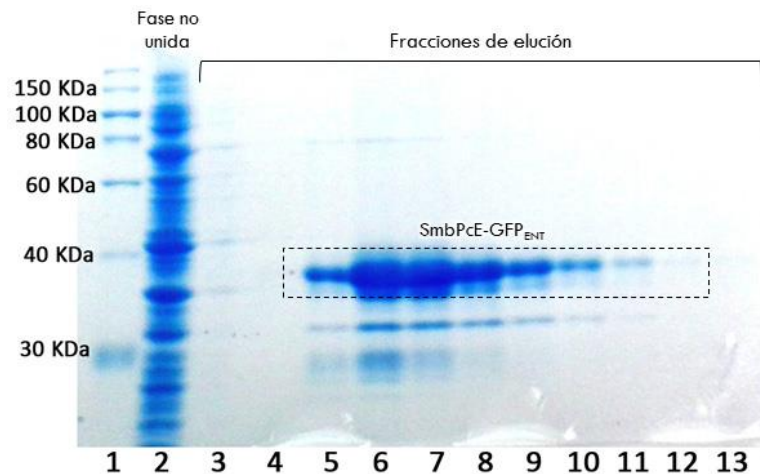


Figura 39. Cromatografía de afinidad con columna HisTrap HP cargada con iones de Ni(II) para SmbPcE-GFP_{ENT}

En la figura 40 se muestra el cromatograma de elución de SmbPcE-GFP_{ENT} donde obtenido de la purificación con el FPLC ÄKTA prime plus mediante IMAC de iones Ni(II) donde también se muestra la fase no unida. Se puede apreciar claramente el pico correspondiente a SmbPcE-GFP_{ENT}.

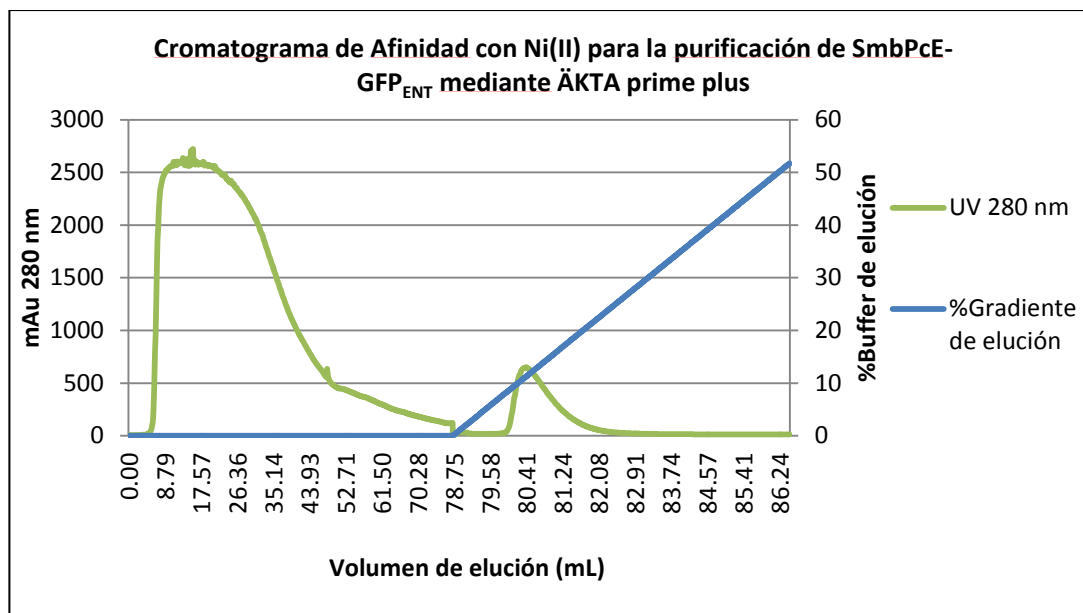


Figura 40. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbPcE-GFP_{ENT}

5.12.4. Purificación de SmbPp-RFP mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC) con resina

Debido al buen rendimiento obtenido con la cromatografía de afinidad con iones de Cu(II) (usando la resina IMAC) se empleó dicha técnica para la purificación de SmbPp-RFP después del choque osmótico. En la siguiente imagen se muestra el gel de SDS-PAGE obtenido mediante dicha cromatografía. En donde el primer carril y el número 11 corresponden a marcadores de peso molecular. En el carril número 2 se presenta la muestra original obtenida del choque osmótico con sacarosa antes de su purificación (F.S.). Del carril 3 al 6 se muestran las fracciones obtenidas de la fase no unida. En los carriles del 7 al 10 y el 12 se muestran las fracciones de lavado y por último del carril 13 al 19 se pueden observar las fracciones de elución obtenidas donde se logra apreciar claramente la banda de SmbPp-RFP marcadas dentro del recuadro.

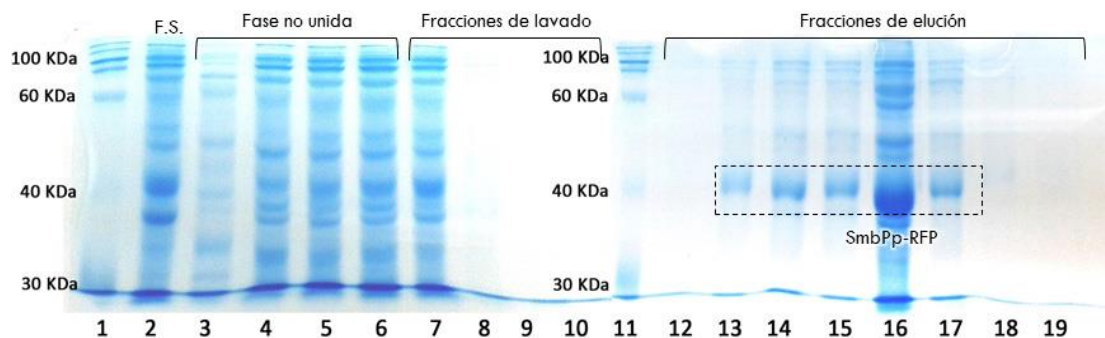


Figura 41. Cromatografía de afinidad con resina de IMAC cargada con Cu(II) de SmbPp-RFP.

5.12.5. Purificación de SmbPp-RFP mediante el sistema de FPLC ÄKTA prime plus

SmbPp-RFP se purificó también mediante el FPLC ÄKTA prime plus, empleando la columna comercial de HisTrap HP para IMAC. En la imagen 42 se muestra el análisis de las fracciones obtenidas de la purificación mediante SDS-PAGE, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo la fase no unida y por ultimo las fracciones de elución del carril 3 al 10, donde se pueden apreciar las bandas correspondientes a SmbPp-RFP marcadas dentro del recuadro.

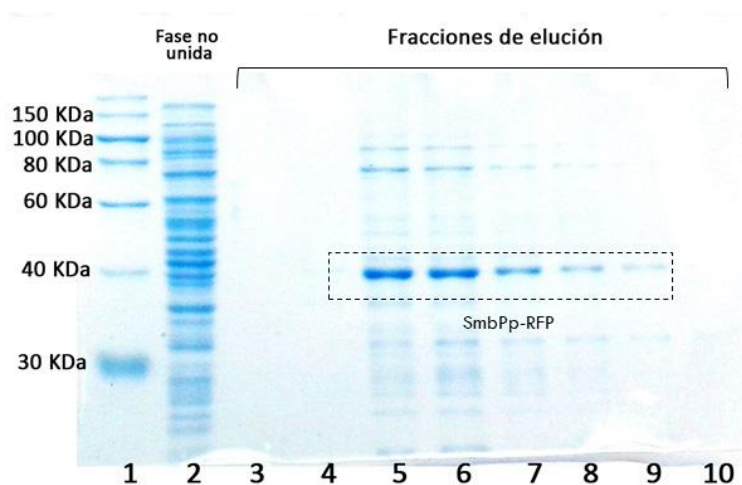


Figura 42. Cromatografía de afinidad con columna HisTrap HP cargada con iones de Ni(II) para SmbPp-RFP

Mientras tanto, en la figura 43 se puede observar el cromatograma obtenido de la purificación de SmbPp-RFP con gradiente de elución.

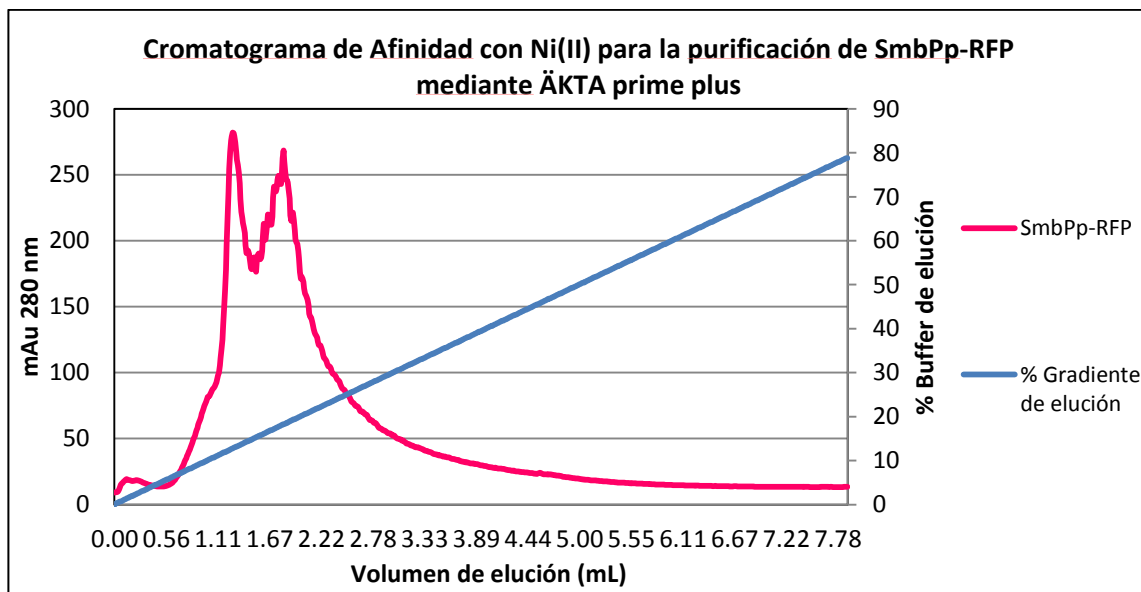


Figura 43. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbPp-RFP

5.13. Remoción de la proteína de fusión

En la siguiente figura se puede observar el SDS-PAGE realizado del corte de la enzima enteroquinasa de cadena ligera sobre tres alícuotas de SmbPcE-GFP_{ENT}, donde se varió la cantidad de enzima conservando la cantidad de muestra de proteína a cortar. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo la muestra el corte con 0.5 μ L de enzima, en el tercero con 1 μ L y en el cuarto con 2 μ L. Finalmente el carril número 5 muestra el control, una muestra de SmbPcE-GFP_{ENT} sin enteroquinasa. Las bandas correspondientes a GFP_{ENT} se señalan dentro del recuadro.

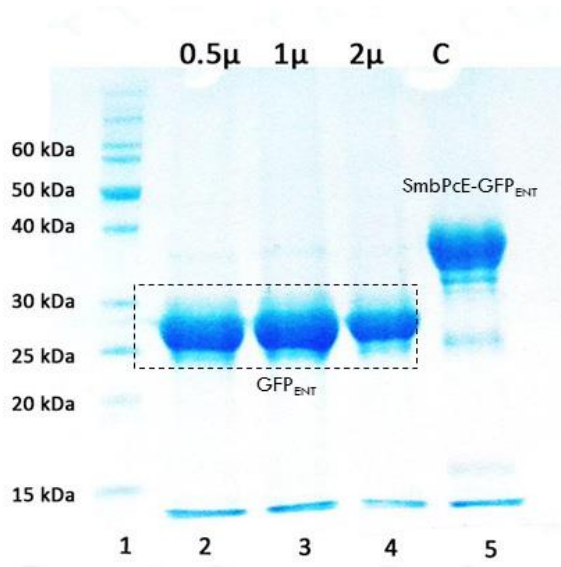


Figura 44. Corte de enteroquinasa para remover SmbPcE de GFP_{ENT}.

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente proyecto se realizaron varias construcciones con diferentes genes de interés con el objetivo de comparar sus expresiones con diferentes proteínas de fusión, incluyendo SmbPc y SmbPp. Los diversos genes empleados variaban entre ellos en tamaño y naturaleza, esto con el fin de evaluar la versatilidad de SmbPc y SmbPp y comparar con otras proteínas de fusión. El estudio más importante se realizó sobre la expresión de GFP y RFP las cuales funcionaron como nuestras proteínas reporteras de expresión y plegamiento ya que dichas proteínas presentan fluorescencia y una evidente coloración verde y roja respectivamente cuando han obtenido un adecuado plegamiento.

La primera manera de evaluación de la expresión de GFP y RFP se realizó de una manera visual. En las primeras expresiones de SmbPp-GFP no se presentó coloración verde alguna, sin embargo al lisar las células y correr un gel de SDS-PAGE (figura 22) se apreciaron claramente las bandas de expresión de SmbPp-GFP, demostrando que la proteína si se expresaba aunque no se plegaba de la manera debida y por ende no era

funcional. Esta observación corresponde a la realizada en el 2000 por Feilmeier y col. donde probaron diversas fusiones con GFP para estudiar la funcionalidad de la misma como reportera de localización de proteínas.³⁴ Recientes investigaciones han comprobado también dicha cualidad de GFP y han trabajado con otras opciones que permitan la visualización en el periplasma, en algunas de estas han usado RFP y sus variantes, mostrando que esta proteína reportera (y sus variantes) no presenta ausencia de actividad cuando es exportada al periplasma.^{35, 36} Debido a estos resultados y la literatura consultada se optó por usar RFP como reportera de expresión y plegamiento para la fracción periplásmica.

Se realizó una secuenciación de la construcción del plásmido pET28b-SmbPp-GFP en la cual se apreció una cantidad extra de pares de bases que darían como resultado varios aminoácidos en el extremo N-terminal, se cree que dichos aminoácidos podrían haber estado afectando al plegamiento adecuado de SmbPp-GFP. Por esta razón se optó por cambiar el vector pET28b por el pET30a ya que poseía los mismos sitios de corte para las enzimas seleccionadas y permitía eliminar en los procesos de digestión los pares de bases extras.

Al realizar las expresiones piloto de SmbPc-GFP y SmbPp-GFP (a partir de las construcciones en pET30a) se observó el color verde característico de GFP en el sedimento celular correspondiente a SmbPc-GFP, en tanto en el sedimento celular correspondiente a SmbPp-GFP no se presentó dicha coloración. Al visualizar la expresión piloto mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se observó la presencia de bandas de expresión tanto para SmbPc-GFP y SmbPp-GFP (figura 23)

confirmando nuevamente el inadecuado plegamiento y por ende falta de actividad de GFP en el espacio periplásmico.^{34, 35, 36}

En la misma figura 23 se pueden apreciar las fracciones insolubles y solubles de las expresiones de SmbPc-GFP (36.8 kDa), SmbPp-GFP (36.8 kDa), GST-GFP (53.8 kDa) y MBP-GFP (68.2 kDa), cada banda correspondiente a su esperado peso molecular. La expresión de SmbPc-GFP es equiparable a la de GST-GFP y MBP-GFP al comparar el ancho de banda de dichas expresiones en el SDS-PAGE. SmbPc-GFP presenta menos cuerpos de inclusión (fracción insoluble) que GST-GFP y en un nivel equiparable con MBP-GFP como se puede apreciar en dicha figura al juzgar por la pequeña banda mostrada en el carril 4. SmbPp-GFP presenta una menor cantidad de cuerpos insolubles a comparación de SmbPc-GFP, GST-GFP y MBP-GFP como se observó en la figura 23 en el carril 6 donde prácticamente no se observa ninguna banda.

En la figura 24 se muestra la expresión piloto de SmbPc-RFP (37.02 kDa), SmbPp-RFP (37.02 kDa), GST-RFP (54.3 kDa) y MBP-RFP (68.5 kDa), cada banda de expresión aparece en peso molecular esperado. Se pueden observar claramente las bandas de expresión para dichas proteínas quiméricas. En el caso de SmbPc-RFP se observa un alto rendimiento de expresión, equiparable al de GST-RFP y MBP-RFP, en tanto que la presencia de cuerpos insolubles de SmbPc-RFP es muy baja y comparable a las proteínas de fusión comerciales. Por su parte, SmbPp-RFP presenta también un alto rendimiento y no se observa formación de cuerpos insolubles en comparación con MBP-RFP el cual si presenta formación de dichos cuerpos. Visualmente es posible confirmar la presencia de RFP en las cuatro construcciones. A diferencia de SmbPp-GFP,

SmbPp-RFP se puede observar a simple vista en el sedimento celular de la expresión piloto, confirmando el adecuado plegamiento y funcionalidad de SmbPp-RFP, ya que de otra manera no presentaría la coloración característica de RFP como fue en el caso de SmbPp-GFP. La observación del color característico de GFP y RFP coincide con la observada en diversos estudios donde la visualización de GFP y RFP juegan un papel importante.^{34, 35, 37}



Figura 45. De derecha a izquierda, expresión de SmbPc-RFP, SmbPc-LovR y SmbPp-RFP.



Figura 46. De izquierda a derecha, control negativo de BL21(DE3), GST-RFP, MBP-RFP y SmbPc-RFP.

MBP y GST son ampliamente usadas como proteínas de fusión debido a diversas características que poseen, entre estas dos, se sabe que MBP es la que produce menos cuerpos de inclusión y por tanto la mayor parte de la producción se encuentra en

forma soluble. GST, por su parte, tiene excelentes rendimientos y permite obtener la proteína de interés de manera práctica y con una alta pureza, sin embargo dichas ventajas se ven opacadas por la alta generación de cuerpos de inclusión ya que GST aumenta también la solubilidad de las proteínas aunque en un menor grado. Es decir, una proteína que por lo regular se expresaría de manera insoluble, al unirla a GST aumenta su solubilidad en la expresión, sin embargo al unirla a MBP esta solubilidad se ve mejorada aún más.^{23, 38, 39}

Los resultados obtenidos constatan dichas afirmaciones sobre MBP y GST, ya que la expresión de GFP y RFP con MBP generó menos cuerpos de inclusión que con GST, la alta generación de cuerpos insolubles de GST se repite también en el caso de LovR y en menor medida en SHY2. Considerando los resultados es evidente que SmbP posee un comportamiento muy similar al de MBP al generar una baja cantidad de cuerpos de inclusión, a veces prácticamente nula (SmbPp-RFP, figura 24). MBP puede presentar varias desventajas por su alto tamaño molecular (aproximadamente 42 kDa), por ejemplo, al remover MBP el rendimiento de la proteína de interés disminuye considerablemente también se puede generar la posibilidad al remover MBP que la proteína de interés sea propensa a la agregación, sin mencionar que debido a su tamaño presenta una pesada carga metabólica para la célula hospedera.^{40, 41} Debido al pequeño peso molecular de SmbP se espera que éstas desventajas no se presenten, mostrando una enorme ventaja sobre MBP. En los resultados obtenidos se lograron altos rendimientos con SmbP equiparables y en algunos casos mayores a los de GST, la ventaja de SmbP sobre esta proteína de fusión es clara debido a que SmbP posee la

habilidad de mejorar la solubilidad de la proteína de interés (siendo la alta presencia de cuerpos insolubles la principal desventaja de GST), además aunque GST al pesar 26 kDa no es una proteína tan grande como MBP sigue teniendo un peso molecular mayor al de SmbP, por lo que al remover GST el rendimiento será menor en comparación con SmbP aunque los rendimientos con ambas proteínas de fusión sean idénticos.

Se realizaron también expresiones piloto de SmbPp-SHY2, SmbPc-SHY2 y GST-SHY2. En la figura 25 se puede observar la expresión de SHY2 con las mencionadas proteínas de fusión. Se observa la presencia de expresión en las construcciones de SmbPc-SHY2 y GST-SHY2, donde en la primera se puede observar un alto rendimiento de expresión, así mismo se pueden observar las bandas de expresión para GST-SHY2 con rendimientos equiparables a los de SmbPc-SHY2. En la siguiente figura 26 se pueden observar las fracciones insolubles para ambas expresiones, donde podemos ver que la formación de cuerpos insolubles es baja con ambas proteínas de fusión y prácticamente equiparables.

SHY2 ha sido una proteína altamente estudiada por su participación en la regulación de respuestas y señalización en plantas, debido a ello ha sido producida previamente de manera recombinante y usando proteínas de fusión como MBP y GST. Si bien pudieron obtener la proteína con un rendimiento aceptable, en nuestros estudios, la expresión de SHY2 con SmbPc presenta un mayor rendimiento que con GST, si consideramos lo anteriormente mencionado, una vez removido MBP y GST el rendimiento disminuirá debido al tamaño de ambas proteínas de fusión, por tanto el rendimiento total será mayor cuando se emplea SmbPc como proteína de fusión.⁴²

Se realizó las expresiones piloto de SmbPc-LovR, SmbPp-LovR y GST-LovR y se pueden observar en la figura 27 donde se observan amplias bandas de expresión para las tres proteínas. Así mismo en la siguiente imagen (figura 28) se aprecian las fracciones insolubles de las mismas expresiones. En dicha imagen se observa claramente una cantidad de cuerpos insolubles menor en las fracciones de SmbPc-LovR y SmbPp-LovR en comparación con las de GST-LovR que muestra una mayor presencia de cuerpos de inclusión.

NDPK2 interactúa con otra proteína conocida como fitocromo, jugando un papel importante en la regulación del mismo. Por esta razón se considera una proteína de interés científico.⁴³ Se realizó la expresión piloto de SmbPc-NDPK2 y GST-NDPK2 como se observa en la figura 29. Dicha figura muestra congruencia con las pasadas expresiones, en donde se puede observar que SmbPc-NDPK2 posee un rendimiento de expresión considerable y la formación de cuerpos de inclusión (mostrado en la fracción insoluble) es nula. Por su parte, la expresión de GST-NDPK2 tiene un rendimiento similar al de SmbPc-NDPK2 aunque a diferencia de esta última la expresión sí mostró la presencia de cuerpos de inclusión como se observa en las fracciones insolubles.

En cuanto a la purificación de la proteína quimérica SmbPc-GFP, se procedió primero con una cromatografía de afinidad de metales iónicos inmovilizados (IMAC) y de esta manera evaluar el comportamiento de la proteína quimérica con dos metales, en este caso Cu(II) y Ni(II). Como se mencionó previamente, SmbP es capaz de unir varios cationes metálicos divalentes, entre ellos Cu(II) y Ni(II) presentando una mayor afinidad a Cu(II).¹⁹ Durante las primeras purificaciones con dicha cromatografía se

probaron diferentes condiciones, tanto de unión, lavado y elución. De esta manera se comprobó que SmbP se une con mayor afinidad a Cu(II), como se puede apreciar en las figuras 30, 31, 32 y 33 el rendimiento de SmbPc-GFP con Cu(II) es mayor a comparación con Ni(II) sin embargo la pureza con la cromatografía con Cu(II) fue menor, siendo mayor con la de Ni(II) aunque el rendimiento se vio disminuido (figuras 31 y 33). El bajo rendimiento en Ni(II) se puede atribuir a la menor afinidad de SmbP por este metal a comparación con Cu(II), este fenómeno también se puede hacer evidente en la figura 34 donde se puede confirmar que SmbPc-GFP eluye con mayor rapidez en la cromatografía con Ni(II) a comparación con la de Cu(II) donde generalmente eluye hasta la segunda fracción. Así mismo, en la misma figura 34 es posible observar una pérdida de proteína en los lavados realizados en la cromatografía con Ni(II) mientras que con Cu(II) la pérdida es nula. Cabe mencionar que las columnas cargadas con Cu(II) ocupaban más lisado celular para llegar a la saturación, mientras que las de Ni(II) usaban un volumen menor. Confirmando con estas últimas observaciones la alta afinidad de SmbP por Cu(II).¹⁹

IMAC es un sistema usado ampliamente para purificación de proteínas de manera rápida y práctica en un solo paso, sin embargo, algunas proteínas propias de *E. coli* presentan también afinidad a iones divalentes presentando un problema.⁴⁴ Dicho problema se presentó también en nuestros resultados donde si bien es posible obtener buenos rendimientos la pureza se puede ver opacada como en el caso de la purificación con Cu(II), por lo que es necesario encontrar las condiciones idóneas de expresión y purificación. En algunas investigaciones han trabajado comparando la eficiencia de

purificación con diferentes metales divalentes y han descrito resultados similares a los nuestros. En el caso de IMAC con Ni(II) han podido purificar proteínas de manera eficiente pero con bajo rendimiento y con IMAC con Cu(II) han purificado proteínas con altos rendimientos pero con una pureza moderada.⁴⁵

Se purificó por medio de una columna de HisTrap HP con el sistema de cromatografía FPLC de ÄKTA prime plus. La columna comercial empleada mencionada anteriormente se emplea por lo regular para purificación por IMAC de proteínas con His-tag, por lo que se encuentra previamente cargada con iones de Ni(II), a los cuales se sabe el His-tag es afin.¹² Por tanto, se purificó con condiciones similares a las probadas anteriormente, por lo que se empleó una concentración mayor de imidazol en el lavado. Durante la purificación se logró saturar la columna de HisTrap HP (siendo evidente por el cambio de color). Además, no hubo pérdida alguna de SmbPc-GFP durante el lavado de la columna y se pudo visualizar la presencia de SmbPc-GFP en las fracciones, confirmado posteriormente por los geles de SDS-PAGE (figura 35), donde se puede apreciar una mayor pureza de la proteína (carriles 3 al 20) a comparación con el lisado original (carril 2). Al observar el gel, es evidente que se requiere de condiciones de lavado aún más fuertes para poder obtener mayor pureza, ya que las últimas fracciones obtenidas (carril 11 al 20) poseen una pureza notablemente mayor a las primeras eluciones (incluso siendo la única banda presente), aunque la cantidad de proteína sea menor en dichas fracciones.

Algunas veces, se ha planteado el uso de dos sistemas diferentes de fusión, como His-tag y MBP con el fin de emplear la habilidad de MBP para mejorar la

solubilidad y emplear His-tag para la purificación (o incluso purificar con ambas proteínas).^{40, 42} Dado que SmbP se purifica por medio de IMAC al igual que His-tag y también mejora la solubilidad de la proteína de interés como MBP, SmbP se plantea como una mejor opción para dichos casos donde se busca tener ambas características haciendo más práctica la construcción y purificación. Igualmente, dependiendo de la finalidad de la proteína que se busca obtener y por ende su grado de pureza necesario, un simple paso de purificación con IMAC puede ser más que suficiente, puesto que como se ha visto con GFP no altera la actividad de la misma.⁴⁰



Figura 47. Columna de HisTrap HP al momento de cargar la muestra, se puede apreciar claramente el color de SmbPc-GFP.

Las fracciones obtenidas se recolectaron y se realizó una diálisis para remover el exceso de NaCl, esto con el fin de someter la proteína a una segunda purificación, en este caso con una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP, empleando el equipo de cromatografía FPLC ÄKTA prime plus. Debido a que el punto isoeléctrico de SmbPc-GFP se calcula en aproximadamente 5.98 (parámetro calculado con ExPASy-ProtParam tool) se optó por una cromatografía de intercambio aniónico. La columna se equilibró con una solución amortiguadora de 50 mM Tris con una concentración alta de NaCl (500 mM) y un pH de 8.0, misma en la que se encontraba la proteína. Se empleó un

gradiente de elución hasta una concentración final de 500 mM de NaCl. SmbPc-GFP eluyó en la primera fase del gradiente, incluso antes de llegar al 50% de la concentración de la solución amortiguadora de elución como se puede observar en el cromatograma (figura 38), por lo que es necesario emplear un gradiente más extenso y una concentración más baja de NaCl para obtener una mejor resolución. Conjuntamente fue posible confirmar la presencia de SmbPc-GFP de manera visual desde la tercera fracción obtenida del equipo y se confirmó por medio del gel de SDS-PAGE mostrado en la figura 37, en esa misma figura se aprecia una mayor pureza a comparación de la primera purificación realizada con la columna de HisTrap HP así como una mayor cantidad de proteína, por lo que se logró concentrar SmbPc-GFP en 6 únicas fracciones de 0.5 mL, dando un total de 3 mL de proteína concentrada y con elevada pureza obtenida de esta segunda purificación.

La fracción periplásmica obtenida del choque osmótico realizado sobre el sedimento celular de la expresión de SmbPp-RFP presentaba la coloración característica de RFP (confirmando nuevamente el adecuado plegamiento de RFP en periplasma) aunque en una concentración menor a la observada en los lisados celulares obtenidos de SmbPc-GFP. Finalmente, después de la purificación por medio de IMAC con iones de Cu(II) se pudo observar la coloración de SmbPp-RFP en mayor medida en la cuarta fracción de elución. La presencia de SmbPp-RFP se confirmó también gracias a la electroforesis en geles de poliacrilamida, en la figura 41 se aprecia claramente la banda que corresponde a la proteína quimérica de SmbPp-RFP y es posible apreciar una mejora de la pureza (siendo mayor en las fracciones 2, 3, 4 y 6) así como un

incremento de la concentración de la proteína y un buen rendimiento. La elución de SmbPp-RFP evidente a la vista hasta la quinta fracción de elución se puede atribuir al hecho que se empleó una cantidad de resina mayor a la usada con las previas purificaciones de SmbPc-GFP y a la alta afinidad que tiene SmbP por Cu(II).¹⁹ Con esto es posible confirmar la presencia de SmbPp-RFP en periplasma (con actividad) al ser obtenida por un protocolo de choque osmótico como se ha realizado en otros estudios.^{19, 34} El rendimiento sin embargo es menor en comparación al de la fracción citoplásmica, pudiendo ser debido a que el espacio periplásmico posee un volumen menor al citoplásmico, por lo que será necesario optimizar la producción en periplasma.³⁴ Aunque, a pesar de dicha desventaja, el rendimiento es bastante alto si se compara con otras purificaciones de proteínas obtenidas a nivel periplásmico, como es el caso propio de SmbP, o de otras proteínas con His-tag usando IMAC en otras investigaciones.^{19, 46, 47} Aunque no obstante el espacio periplásmico es menor hay que considerar que la cantidad de proteínas presentes es también menor en comparación con el citoplasma esto último puede facilitar y mejorar la purificación de la proteína de interés.²⁹

Se realizó una segunda expresión y un segundo choque osmótico con el fin de purificar mediante el FPLC ÄKTA prime plus como se realizó con SmbPc-GFP. En la figura 42 se puede visualizar el SDS-PAGE donde observamos que la pureza se aumentó con respecto a la purificación realizada con la resina con cobre aunque el rendimiento es poco. En la figura 43 observamos el cromatograma junto con el gradiente de elución, es claro decir que la proteína eluyó a un volumen muy temprano, por lo que sería

conveniente aumentar el gradiente para aumentar aún más la clara pureza de la proteína.

Por último se logró realizar el corte con la enzima enteroquinasa de cadena ligera para la remoción de SmbPcE. Esto se visualiza en la figura 44 donde es posible apreciar la diferencia entre los pesos moleculares de GFP_{ENT} y SmbPcE-GFP_{ENT} haciendo indudable la remoción de SmbPcE. Estos resultados coinciden con los reportados en cuanto al corte de proteínas con enteroquinasa, donde se observan patrones similares.⁴⁸ Considerando que la cantidad de muestra cargada es la misma en todos los pocillos, se puede observar que el tamaño de banda entre el control y GFP_{ENT} no varía mostrando que debido a su pequeño peso molecular se obtiene finalmente un rendimiento mayor de la proteína de interés. Ya que no ha sido posible visualizar a SmbPcE después del corte (aun en geles de porcentaje alto) sería necesario cortar una mayor cantidad de proteína quimérica con el fin de obtener un volumen mayor de SmbPcE y sea posible observarla y compararla con GFP_{ENT}. Cabe mencionar que la actividad biológica no se ve afectada, debido a que las muestras después del corte aún tenían el color característico de GFP y mostraban fluorescencia bajo efecto de la luz UV, mostrando que la remoción de SmbP no afecta su bioactividad.

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES

- SmbPc y SmbPp presentan altos niveles de expresión en *E.coli* como se observa con GFP y RFP, incluso mayores que con GST y MBP.
- SmbPc y SmbPp incrementan la solubilidad de GFP y RFP y producen bajas cantidades de cuerpos de inclusión (incluso prácticamente nulos como en el caso de SmbPp-RFP).
- Es posible purificar proteínas unidas a SmbP con cromatografía de afinidad (IMAC) con iones de Ni(II) y Cu(II), mostrando una mayor afinidad por Cu(II).
- Se obtiene un mejor rendimiento con la cromatografía (IMAC) con Cu(II), pero una pureza menor que con Ni(II), aunque con esta última el rendimiento disminuye.
- SmbPp es capaz de transportar proteínas al espacio periplásmico cualidad confirmada debido a la falta de actividad de SmbPp-GFP, aunque en otras proteínas no se afecta el plegamiento, como es el caso de SmbPp-RFP.

- Es posible expresar y aislar proteínas unidas a SmbPp del espacio periplásmico mediante choque osmótico con una solución amortiguadora alta en sacarosa.
- Es viable emplear una columna comercial de HisTrap (usada comúnmente para purificación de proteínas con His-tag) cargada previamente con iones de Ni(II) para la purificación de SmbPc-GFP con un sistema de FPLC como el ÄKTA prime plus presentando buenos rendimientos y pureza.
- Se puede emplear una segunda purificación con gradiente aniónico con una columna comercial con un sistema de FPLC como el ÄKTA prime plus para mejorar la pureza de las proteínas purificadas con cromatografía de afinidad con Cu(II) y Ni(II).
- SmbP es una buena opción como proteína de fusión para la expresión y purificación por medio de cromatografía de afinidad de proteínas específicas en *E. coli*; en comparación con proteínas de fusión existentes en el mercado como MBP y GST, concordando así con los objetivos y la hipótesis planteada.
- La remoción de SmbP fue posible con la enzima enteroquinasa, la proteína de interés se separa conservando un excelente rendimiento, haciendo evidente la ventaja de usar una proteína de fusión pequeña como SmbP.
- El plegamiento de la proteína de interés no es afectada al remover SmbP y se conserva la bioactividad como se observó con GFP.

CAPÍTULO 8

8. PERSPECTIVAS

SmbP tiene un enorme potencial de uso como proteína de fusión para expresión y purificación de proteínas con diversos intereses, sobre todo para la investigación y en aplicaciones biofarmacéuticas. Por lo que una de las perspectivas del presente proyecto será el uso de SmbP para la expresión y purificación de proteínas con interés farmacéutico o con fines de investigación. Así mismo evaluar la actividad de las proteínas obtenidas y asegurar su funcionalidad por medio de este sistema de fusión.

En el presente proyecto se proponen diversas técnicas para la purificación de proteínas quiméricas con SmbP, sin embargo, es posible mejorar los rendimientos optimizando la expresión y las técnicas de purificación a fin de poder estandarizar dichos métodos.

CAPÍTULO 9

9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de los residuos generados durante el presente proyecto fueron gestionados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en el programa de Manejo Integral de Residuos.

Dichos residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 9.

Disposición de los residuos generados

Colector	Residuo generado
Colector A (Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas)	<ul style="list-style-type: none">• Buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA)• TFB1 (RbCl, CaCl₂, MnCl₂, KAc, Glicerol)• Reactivo Biuret (KOH, CuSO₄ Tartrato de sodio y tartrato de potasio)<ul style="list-style-type: none">• TBS (Tris Buffer Salino)• TGS (Tris, Glicerol y SDS)
Colector G (Combinaciones orgánicas solidas)	<ul style="list-style-type: none">• Agarosa• Poliacrilamida
Colorantes y lugol	<ul style="list-style-type: none">• Azul de Coomassie

REFERENCIAS

1. Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and applications*. República de Irlanda: Editorial Wiley.
2. Gamboa, R.A., Trujillo-Roldán, M.A. (2009). Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano. *El Residente*. Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 4, 87–91.
3. Roy, N., Agarwal, S. (2003). Therapeutic Protein Production – An Overview. *Technology Proteomes and Proteomics*. 79–82.
4. Jungbauer, A., Graumann, K. (2012). Editorial: Biopharmaceuticals – discovery, development and manufacturing. *Biotechnology Journal*. 12, 1422–1423.
5. Kamionka, M. (2011). Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 11, 268–274.
6. Carter, P. J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*. 317, 1261–1269.
7. Liszweski, K. (2012). High-Throughput Protein-Expression Challenges. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 32(1).
8. Schumann, W., Ferreira, L.C.S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*. 27, 442–453.
9. Sekhon, B.S. (2010). Biopharmaceuticals: an overview. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 34, 1–19.
10. Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*. 60, 523–533.
11. Graumann, K. Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnological Journal*. 1, 164–186.

12. Amersham Biosciences. The Recombinant Handbook: Protein Amplification and Simple Purification. Edition AB. 18, 1142–1175
13. Jayaraj, R. Smooker, P.M. (2009). So you Need a Protein – A guide to the production of recombinant proteins. *The Open Veterinary Science Journal*. 3, 28–34.
14. Choi, J.H., Lee, S.Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied microbiology and Biotechnology*. 64, 625–635.
15. De Marco, Ario. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 8, 1–18.
16. Quiroga, A.L. (2010). Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología.
17. Anderlug, G., Gokce, Isa., Lakey, Jeremy. (2003). Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification*. 28, 173–181.
18. Cornelies, P. (2000). Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 450–454.
19. Brett, M.B., Rusell, L., Wilson, A.F. (2004). Characterization of a Small Metal Binding Protein from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry*. 43, 11206–11213.
20. Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F. (2003). Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*. 185, 2759–2773.
21. Hommes, N.G., Sayavedra, L. A., Arp, D.J. (2003). Chemolithoorganotrophic Growth of *Nitrosomonas europaea* on Fructose. *Journal of Bacteriology*. 185, 6809–6814.
22. Liu, Y., Fu, X. Shen, J., Zhang, H. (2004). Periplasmic proteins of *Escherichia coli* are highly resistant to aggregation: reappraisal for roles of molecular chaperones in periplasm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316, 795–801.

23. Kapust, R.B., Waugh, D.S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*. 8, 1668–1674.
24. Nilsson, J., Stahl, S. (1997). Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification, and Immobilization of Recombinant Proteins. *Protein Expression and Purification*. 11, 1–16.
25. Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in Biotechnology*. 10, 411–421.
26. Scopes, R.K. (2000). Overview of Protein Purification and Characterization. *Current Protocols in Protein Science*. Editorial Wiley
27. Cutler, P. (2004). *Protein Purification Protocols. Methods in Molecular Biology*. USA: Humana Press
28. Jan, C.J. (2011). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. New Jersey: Wiley
29. Ausubel, F.M. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. USA. Wiley
30. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A. (2009). *Methods in Enzymology, Vol. 463*. Germany: Elsevier Inc.
31. Hage, D. S. (2006). *Handbook of Affinity*. Florida. USA: CRC Press
32. Prasanna, R., Vijayalakshmi, A. (2010). Immobilized metal-ion affinity systems for recovery and structure–function studies of proteins at molecular, supramolecular, and cellular levels. *Pure Appl. Chem*. 82,39–55
33. Madadlou, A. (2011). Fast Protein Liquid Chromatography. *Methods in Molecular Biology*. 681, 439–447
34. Feilmeier, B.J. (2000). Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 182, 4068–4076
35. Speck, J., Katja, M.A. (2010). Efficient phage display of intracellularly folded proteins mediated by the TAT pathway. *Protein Engineering, Design & Selection*. 24, 473–484

36. Dinh, T., Bernhardt, T.G. (2011). Using Superfolder Green Fluorescent Protein for Periplasmic Protein Localization Studies. *Journal of Bacteriology*. 193, 4984–4987
37. Wu, Y., Zhou, Y., Song, J. (2007). Using Green and Red Fluorescent Proteins to Teach Protein Expression, Purification, and Crystallization. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 36, 43–54
38. Fox, J.D., Routzahn, K.M., Bucher, M.H. (2003). Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. *Elsevier Science B.V.* 537, 53–57
39. Sreejith, R.K., Waugh, D.S. (2012). The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated. *PLOS ONE*. 7:11
40. Zhao, X., Li, G., Liang, S. (2013). Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2013, 581093
41. Esposito, D., Chatterjee, D.K. (2006). Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*. 17:353-358
42. Tian, Q., Nagpal, P., Reed, J.W. (2003). Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *The Plant Journal*. 36:643-651
43. Bolanos, V.M., Davies, O.R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1760:1304-1313
44. Shen, Y., Kim, J.I. (2005). NDPK2 as a Signal Traducer in the Phytochrome-mediated Light Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 280:5740-57-49
45. Choe, W.S., Clemmitt, R.H. (2002). Comparison of histidine-tag capture chemistries for purification following chemical extraction. *Journal of Chromatography A*. 953:111-121
46. Linder, P. Guth, B. (1992). Purification of Native Proteins from the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and Histidine Tails: A Comparison of Proteins and Protocols. *Methods in Enzymology*. 4:41-56

47. Salema, V., Fernández, L.A. (2013). High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. *Protein Expression and Purification*. 91:42-48
48. Hesam, S., Qu, X. (2009). Enhancing the specificity of enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein Expression and Purification*. 59:314-319

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Teresa Vargas Cortez

Candidato para el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS EN *ESCHERICHIA COLI* UTILIZANDO LA PROTEÍNA SMBP COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN

Edad: 25 años

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Nuevo Laredo, Tamaulipas el 27 de octubre de 1988, hija de Esteban Vargas Medrano y Leticia Cortez Bravo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en el 2011 con mención honorífica, primer lugar de generación.

Experiencia profesional: Responsable de laboratorio de análisis clínicos en el Hospital San Ángel, en Nuevo Laredo, Tamps.