

34
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION DE UNA TOXINA RECOMBINANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA EN ALIMENTOS PRESENTA NURIA V. ^{Victoria} SANCHEZ PUIG



MEXICO, D. F.



1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

272111



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Presidente | Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo. |
| Vocal | Dra. Marina Gavilanes Ruiz. |
| Secretario | Dra. Laura Escobar Pérez. |
| 1er. Suplente | Dr. José Pedraza Chaverri. |
| 2do. Suplente | Dr. Francisco Ruiz Terán. |

Sitio donde se desarrolló el Tema:

Laboratorio 510, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM
Laboratorio de Bioquímica Genética, Torre de Investigación José Cravioto,
INP.

Asesor del Tema:

Dra. Laura Escobar Pérez



Sustentante:

Nuna V. Sánchez Puig



A mis padres

A mi hermana

A Luis Olguín

A mis amigos

Mi sincero agradecimiento

A la Dra. Laura Escobar y al Dr. Javier Mochca por la asesoría brindada en la elaboración de este trabajo.

Al M en IBB. Serafín Ramírez por su apoyo y orientación.

Al Dr. Francisco Ruiz T. por sus valiosos consejos y apoyo en los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio.

ABREVIATURAS.

| | |
|----------------|--|
| AcOH | Acido acético |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| Amp | Ampicilina |
| RNA | Acido ribonucleico |
| CMC | Carboximetilcelulosa |
| ChTx | Caribdotoxina |
| DEAE-celulosa | Dietilaminoetil celulosa |
| DNA CCC | Acido desoxirribonucleico circular covalentemente cerrado |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EtOH | Etanol |
| HPLC | (High-performance Liquid Chromatography) Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| IPTG | Isopropil-tiogalactósido |
| Medio LB | Medio Luria-Bertani |
| ORF | (Open reading frame) Marco de lectura abierta |
| PCR | (Polimerase chain reaction) Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PMSF | Fluoruro de fenil metil sulfonilo |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |

INDICE GENERAL.

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 La Caribdotoxina | 3 |
| 2.2 Producción de la ChTx por técnicas de DNA recombinante | 4 |
| 2.2.1 El bacteriófago T7 como sistema de expresión | 5 |
| 2.2.2 Transformación de células bacterianas | 9 |
| 2.2.2.1 Células competentes | 9 |
| 2.2.2.2 Genotipo de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas para expresar a la ChTx | 11 |
| 2.2.3 El plásmido pG9-ChTx | 14 |
| 3. OBJETIVOS | 16 |
| 3.1 Objetivo general | 16 |
| 3.2 Objetivos específicos | 16 |
| 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 17 |
| 4.1 Biología molecular | 17 |
| 4.2 Química de proteínas | 18 |
| 5. RESULTADOS | 19 |
| 5.1 Biología molecular | 19 |
| 5.1.1 Propagación del plásmido pG9-ChTx | 19 |
| 5.1.2 Identidad del plásmido pG9-ChTx | 20 |
| 5.1.2.1 Caracterización del plásmido pG9-ChTx con enzimas de restricción | 20 |
| 5.1.2.2 Amplificación del gene de la ChTx por PCR | 22 |
| 5.1.2.3 Secuenciación del gene de la ChTx | 30 |
| 5.1.3 Transformación de las células de <i>E. coli</i> BL21 | 31 |

| | |
|--|----|
| 5.2 Química de proteínas | 34 |
| 5.2.1 Inducción y purificación de la proteína de fusión | 34 |
| 5.2.2 Liberación y purificación de la ChTx | 36 |
| 6. DISCUSION | 42 |
| 6.1 Biología molecular | 42 |
| 6.1.1 Obtención de células competentes de las cepas utilizadas para la obtención de la ChTx recombinante | 42 |
| 6.1.2 Extracción y purificación del plásmido pG9-ChTx | 43 |
| 6.1.3 Identidad del plásmido pG9-ChTx | 44 |
| 6.2 Química de proteínas | 47 |
| 6.2.1 Inducción y purificación de la proteína de fusión | 47 |
| 6.2.2 Liberación y purificación de la ChTx | 48 |
| 7. CONCLUSIONES | 53 |
| 8 BIBLIOGRAFIA | 54 |
| 9. APENDICES | 60 |
| Apéndice 1. Metodologías de Biología molecular | 60 |
| Apéndice 2. Metodologías de Química de proteínas | 65 |
| Apéndice 3. Soluciones de Biología molecular | 72 |
| Apéndice 4. Soluciones de Química de proteínas | 79 |

INDICE DE FIGURAS.

| | PAGINA. |
|---|---------|
| 1. Estructura de la ChTx. | 4 |
| 2. Genoma del bacteriófago T7. | 7 |
| 3. Eventos bioquímicos que ocurren al inducir las células con IPTG. | 8 |
| 4. Esquema del plásmido pG9-ChTx. | 15 |
| 5. Gel de DNA al 1%. Digestión con enzimas de restricción I. | 22 |
| 6. Gel de DNA al 1%. Digestión con enzimas de restricción II. | 22 |
| 7. Esquema propuesto para la amplificación del gene de la ChTx mediante una PCR asimétrica. | 23 |
| 8. Gel de DNA al 1%. Naturaleza del DNA utilizado en la PCR. | 23 |
| 9. Secuencia de la ChTx y su amplificación por PCR. | 24 |
| 10. Gel de DNA al 1.6%. Amplificación del gene de la ChTx por PCR. | 26 |
| 11. Gel de DNA al 1.6%. Importancia de la naturaleza del templado en la PCR. | 27 |
| 12. Gel de DNA al 1.6%. Efecto del gradiente de concentración de magnesio en la PCR. | 39 |
| 13. Gel de proteínas al 12.5%. Inducción de la proteína de fusión. | 34 |
| 14. Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) para separar a la proteína de fusión del resto de las proteínas de <i>E. coli</i> BL21. | 35 |
| 15. Gel de proteínas al 12.5%. Picos representativos de la cromatografía en DEAE-celulosa. | 35 |
| 16. Cromatografía de permeación en gel (Sephadex G-25) para separar a la toxina de los fragmentos de la proteína después de 6 h de digestión. | 37 |
| 17. Cromatografía de intercambio iónico (CMC) para separar a la toxina de los fragmentos de la proteína después de 30 min de digestión. | 38 |

18. Cromatografía de intercambio iónico (CMC) para separar a la toxina de los fragmentos de la proteína después de 1.5 h de digestión. 38
19. Cromatografía de intercambio iónico (CMC) para separar a la toxina de los fragmentos de la proteína después de 3 h de digestión. 39
20. Cromatograma HPLC C₁₈ fase reversa para cada una de las digestiones de la proteína de fusión. 40

INDICE DE TABLAS.

| | PAGINA. |
|--|---------|
| 1. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α , usando el método 1 para obtener células competentes. | 19 |
| 2. Enzimas de restricción usadas para caracterizar el plásmido pG9-ChTx. | 21 |
| 3. Composición de las mezclas de reacción usadas para la amplificación por PCR del gene de la ChTx (I). | 25 |
| 4. Naturaleza del plásmido pG9-ChTx utilizado en la PCR. | 26 |
| 5. Composición de las mezclas de reacción usadas para la amplificación por PCR del gene de la ChTx (II). | 27 |
| 6. Composición de las mezclas de reacción usadas para la amplificación por PCR del gene de la ChTx. Optimización de la concentración de Mg ²⁺ . | 28 |
| 7. Soluciones utilizadas en los diferentes métodos para obtener células competentes. | 31 |
| 8. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de la cepa <i>E. coli</i> BL21, usando el método 1 para obtener células competentes. | 32 |
| 9. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de la cepa <i>E. coli</i> BL21, usando el método 2 para obtener células competentes. | 32 |
| 10. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de la cepa <i>E. coli</i> BL21, usando el método 3 para obtener células competentes. | 33 |

1. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, para la mayoría de los venenos de animales se conocen muchos de sus aspectos biológicos más importantes. Los venenos de animales se han estudiado en forma multidisciplinaria debido a su importancia como un problema de salud pública. En su caracterización se ha encontrado que son fuente de compuestos útiles para la dilucidación de procesos biológicos y en particular, para el estudio de una clase de proteínas conocidas como canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas membranales responsables de generar y coordinar las señales eléctricas que ocurren en el organismo. Además de esta vital función se ha encontrado que mutaciones en los canales iónicos son responsables de diferentes enfermedades ^{16, 17, 18, 19}.

La Caribdotoxina (ChTx) y otras toxinas encontradas en el veneno de diversos alacranes han sido una herramienta muy importante para comprender el papel biológico de los canales iónicos de potasio (K⁺), así como para estudiar algunos de sus aspectos farmacológicos ¹⁶. Por lo anterior, es importante contar con cantidades suficientes de estos compuestos si se quiere realizar este tipo de estudios. Actualmente existen tres formas distintas para la obtención de toxinas y otros péptidos:

- Aislamiento a partir de su fuente natural.
- Síntesis química.
- Sistemas recombinantes.

El aislamiento a partir de la fuente natural resulta ser poco práctico por el bajo rendimiento que se obtiene a un costo elevado, ya que las toxinas de alacrán constituyen un componente minoritario del veneno (aproximadamente entre el 0.01– 0.5% p/v) ¹.

La síntesis química es una metodología cara y que no siempre se tiene disponible fácilmente. Además, dependiendo del péptido en cuestión existen problemas adicionales durante el proceso de síntesis y en su purificación ⁴¹.

Los sistemas recombinantes permiten obtener grandes cantidades de la toxina a un bajo costo. Tienen la ventaja de poder obtener una gran variedad de toxinas recombinantes que lleven mutaciones puntuales que permitan estudiar sus interacciones con los canales de K⁺.

Por las razones anteriormente expuestas los sistemas recombinantes resultan ideales para la obtención de toxinas. En la actualidad la ChTx y otras toxinas ya se han obtenido con esta metodología, y con el avance de la biología molecular y de las técnicas de DNA recombinante se ha logrado optimizar el proceso ³⁵. El rendimiento en la cantidad de ChTx obtenida en forma recombinante se ha logrado mejorar desde 0.1 mg/L de medio de cultivo hasta 10 mg/L medio de cultivo ³⁵. Lo anterior se debe a mejoras en el sistema de expresión, especialmente del vector de clonación, y a la metodología de purificación.

En el presente trabajo se pretenden reproducir las condiciones experimentales reportadas en la literatura para producir la ChTx en forma recombinante, con la finalidad de establecer las bases que en un futuro permitan expresar de manera similar otras toxinas de interés, y más aún, poder diseñar y/o mutar toxinas que bloqueen canales de K⁺ con diferentes afinidades.

2. ANTECEDENTES.

2.1 LA CARIBDOTOXINA.

La ChTx fue la primera toxina bloqueadora de canales de K^+ que se comercializó y en la actualidad es la que ha sido más ampliamente estudiada. Originalmente se purificó a partir del veneno del alacrán *Leiurus quinquestratus* var. *hebraeus* como un bloqueador de alta afinidad del canal de K^+ activado por Ca^{2+} de músculo esquelético de rata y de algunos de los canales de K^+ sensibles a voltaje, en especial los canales Kv1.3 y Kv1.2.^{1,23} Por todo esto, la ChTx ha sido una herramienta muy valiosa para el estudio de las propiedades bioquímicas y farmacológicas de estos canales.

Esta toxina es un péptido altamente básico constituido por 37 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 4.3 KDa. Presenta 8 residuos de aminoácidos cargados positivamente (4 lisinas, 3 argininas y 1 histidina) y 2 grupos con carga negativa (1 glutamato y el grupo carboxilo terminal), lo que le confiere una carga neta de +6 a pH neutro². Además, la molécula contiene 3 puentes disulfuro entre los residuos de cisteína 7-28, 13-33 y 17-35. La estructura de la ChTx fue determinada por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)³. Presenta una estructura globular de 20x20x25 Å conformada por una α -hélice con 3 vueltas y 3 hojas- β antiparalelas (Fig. 1), con dos ejes uno mayor y otro menor de 2.5 y 1.5 nm, respectivamente.

La ChTx bloquea la vía de conducción de los iones de K^+ a través del canal con una Kd cuyo valor varía entre 1pM a 10 nM, dependiendo del tipo de canal. Esta molécula se une al poro externo del canal con una estequiometría de 1:1⁴, al parecer por una fuerte atracción electrostática⁵.

Se han obtenido mutantes de prácticamente toda la molécula de la ChTx (53 mutantes)⁷, dichos resultados han sido de gran utilidad para dilucidar los residuos de aminoácidos que interactúan con la parte externa del canal. Para realizar estos estudios los canales utilizados han sido el maxi-K y el canal *Shaker*.

Los resultados recopilados de investigaciones ^{8,9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 45} realizadas en el canal maxi-K han establecido como cruciales a los siguientes residuos:

- Cargados positivamente: Lys27, Arg25 y Arg34.
- Altamente hidrofóbicos: Trp14, Met29 y Tyr36.
- Con capacidad para formar puentes de hidrógeno: Ser10 y Asn30

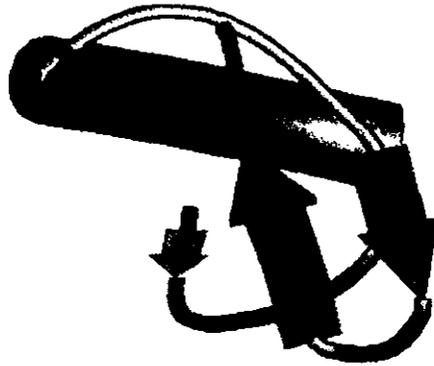


Fig 1 Estructura de la ChTx (PDB code 2crd). En ella se observa su α -hélice (barril) y sus tres hojas β antiparalelas (flechas).

2.2 PRODUCCIÓN DE LA ChTx POR TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE.

Para obtener la ChTx en forma recombinante, es necesario construir el gene que contiene la secuencia de DNA correspondiente a la estructura primaria de la proteína y posteriormente subclonarla en el vector adecuado. El plásmido utilizado para ello debe contener los controles regulatorios adecuados según el tipo de sistema biológico en el cual se va a expresar la toxina.

En nuestro trabajo el plásmido utilizado para expresar a la ChTx es el plásmido pG9, el cual es un derivado del plásmido p-GEMEX1® ⁴³ de Promega, en el que se sustituyó el gene 10 del bacteriófago T7 por el gene 9. En éste plásmido el gene de la ChTx se encuentra unido al gene 9 del bacteriófago T7, de

modo que, cuando ocurre la traducción se expresan juntos como una proteína de fusión. La construcción obtenida al subclonar el gene de la ChTx en el plásmido pG9 se refiere a lo largo del trabajo como el plásmido pG9-ChTx.

Posteriormente el plásmido pG9-ChTx se propaga en una cepa de *E. coli* DH5 α para tener una cantidad considerable de DNA para trabajar con él (~300 μ g/ml). Después, este DNA se introduce en la cepa de *E. coli* BL21, la cual contiene los controles regulatorios necesarios para la producción de la toxina mediante una inducción con IPTG. Las células se colectan mediante una centrifugación y se lisan con lisozima para recuperar a la toxina que se encuentra en forma soluble en el medio intracelular. Las proteínas de *E. coli* se precipitan con sulfato de amonio, y la toxina se purifica parcialmente en una columna de DEAE-celulosa. Posteriormente, la muestra se dializa y se digiere con tripsina para liberar a la ChTx del resto de la proteína de fusión. Finalmente se cicliza el grupo glutamato amino terminal de la ChTx y se purifica mediante una cromatografía HPLC de fase reversa ^{7, 35}.

A continuación se describen en forma detallada algunos de los aspectos importantes para la producción de la ChTx recombinante, lo cual abarca desde el sistema de expresión hasta cuestiones metodológicas.

2.2.1 EL BACTERIÓFAGO T7 COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN.

La RNA polimerasa del bacteriófago T7 es muy selectiva para promotores específicos que rara vez son encontrados en DNA que no esté relacionado con el T7. Esta enzima cataliza la reacción de elongación cinco veces más rápido que la RNA polimerasa de *E. coli*, incluso en algunos casos la transcripción de la polimerasa del huésped es inhibida por completo. Esto se debe a que entre los primeros genes del genoma del bacteriófago T7 se encuentra el de la lisozima, una proteína que tiene dos funciones: cortar los enlaces entrecruzados de peptidoglucano de la pared celular de *E. coli* y unirse a la RNA polimerasa huésped inhibiendo la transcripción de los genes correspondientes ²¹ (Fig. 2).

Para comprender nuestro sistema de expresión, así como la regulación de la expresión genética involucrada, hay que conjuntar diversos aspectos ^{21,22}. La

cepa de expresión utilizada, *E. coli* BL21, es un lisógeno del bacteriófago T7, el cual contiene una copia única del gene de la RNA polimerasa del T7 insertada bajo el control del promotor *lacUV5*. De modo que la adición de IPTG induce a este promotor para producir la RNA polimerasa del T7 (Fig. 3.I), que consecuentemente origina los altos niveles de expresión del gene de interés (ChTx) insertado en el plásmido (Fig. 3.II). Una vez inducidas las células, la proteína de interés puede llegar a acumularse hasta en un 50% del total de la proteína celular. La explicación a este hecho radica en las diferentes velocidades de síntesis proteica entre la RNA polimerasa del T7 y la RNA polimerasa del huésped. La velocidad de síntesis proteica de la RNA polimerasa del T7 es tan grande respecto a la RNA polimerasa del huésped, que esta última simplemente no puede competir por los precursores. De modo que hay una gran acumulación de RNA_m producido por la RNA polimerasa del T7 que satura la maquinaria que sintetiza las proteínas en *E. coli*. Esta saturación nos habla de la eficiencia relativa con la que son traducidos los diferentes RNA_m, lo cual resulta ser un factor muy importante para establecer la cantidad de proteína que puede ser producida. En nuestra estrategia la ChTx es producida como una proteína de fusión a la del gene 9 del bacteriófago T7^{21, 22, 24}. La proteína codificada por este gene es producida en grandes cantidades durante el proceso de infección por el T7, lo cual indica que su eficiencia de traducción es alta y la hace adecuada para este tipo de experimentos.

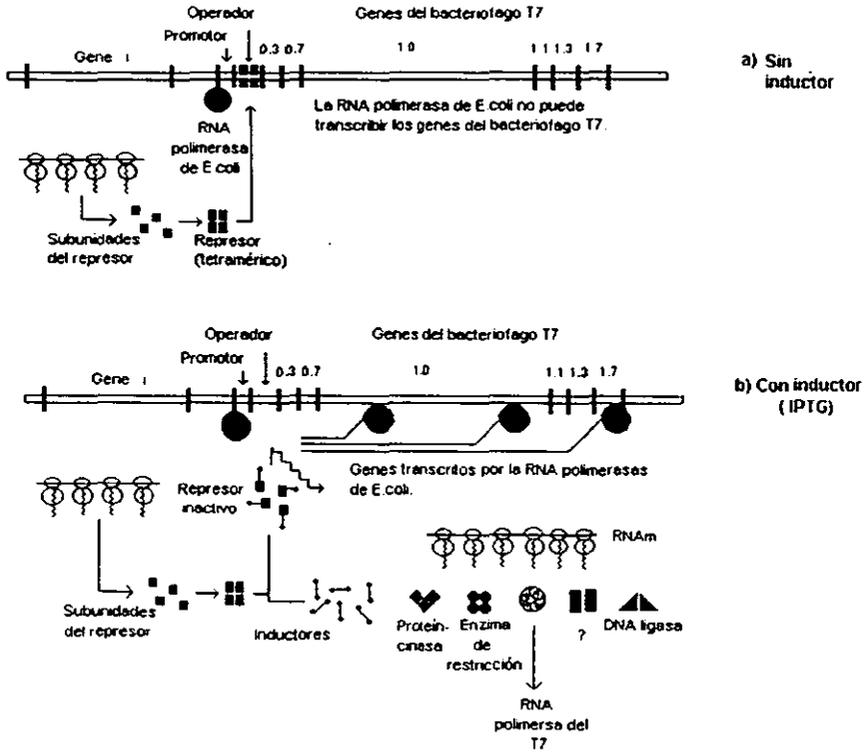
Para producir la ChTx y otros péptidos recombinantes la estrategia más viable ha sido producirlos como una proteína de fusión de mucho mayor tamaño. Los plásmidos con genes que son tóxicos para las células son difíciles de mantener, ya que aún en ausencia del inductor los niveles basales de RNA polimerasa del T7 son capaces de producir dichas proteínas en proporciones entre el 2-5% respecto del total²². En nuestro caso, el gene de la ChTx se encuentra unido al fragmento genómico que codifica para los 260 primeros aminoácidos del gene 9 del bacteriófago T7, produciendo una proteína de fusión soluble.

GENOMA DE BACTERIOFAGO T7 ^{23, 46}

| GENE | PRODUCTO DE LA TRADUCCION (PROTEINAS) | |
|------|---|---|
| 0.3 | Enzima de restricci3n | Genes de transcripci3n temprana, transcritos por la RNA polimerasa del hu3sped. |
| 0.7 | Protein cinasa | |
| 1 | RNA polimerasa | |
| 1.1 | ? | |
| 1.3 | DNA ligasa | |
| 1.7 | ? | |
| 2 | Proteina que inhibe la RNA polimerasa de <i>E. coli</i> | |
| 3 | Endonucleasa | |
| 3.5 | Lisozima | |
| 3.8 | Proteina para sintetizar el RNA | |
| 4 | Helicasa | Genes de transcripci3n tardia, transcritos por la RNA polimerasa del T7 |
| 5 | DNA polimerasa | |
| 6 | Exonucleasa de doble cadena | |
| 7 | Proteina de recubrimiento | |
| 8 | Proteina de recubrimiento de la cabeza | |
| 9 | Proteina de ensamblaje de la cabeza | |
| 10 | Proteina de recubrimiento de la cabeza | |
| 11 | Proteina de uni3n entre la cola y la cabeza | |
| 12 | Proteina de recubrimiento de la cola | |
| 13 | Proteina de recubrimiento de la cabeza | |
| 14 | Proteina de recubrimiento de la cabeza | |
| 15 | Proteina de recubrimiento de la cabeza | |
| 16 | Proteina de recubrimiento de la cabeza | |
| 17 | Proteina de recubrimiento de la cola | |
| 18 | Proteina de maduraci3n y empacado del DNA | |
| 19 | Proteina de maduraci3n y empacado del DNA | |

Fig 2. Genoma del bacteriofago T7. En el se muestran los genes que lo conforman y el producto de la traducci3n de cada uno de ellos.

I. DNA Genómico



II. DNA plasmídico

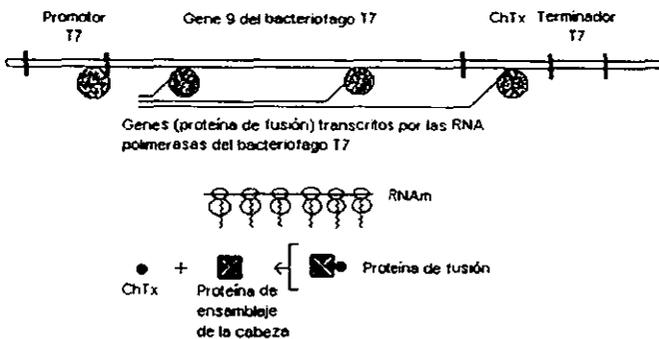


Fig. 3 Eventos bioquímicos que ocurren al inducir las células con IPTG. Esta serie de eventos son los responsables de la producción de la proteína de fusión.

2.2.2 TRANSFORMACION DE CELULAS BACTERIANAS.

La transformación de una célula puede dividirse en dos pasos generales: incorporación del DNA a través de la membrana celular y establecimiento del DNA como un elemento genético estable en la célula. Para que ocurra el primer evento es necesario contar previamente con células competentes, mientras que el segundo es inherente al genotipo de la cepa utilizada.

2.2.2.1 Células competentes ²⁴.

Es sabido que las células de *E. coli* y el DNA interaccionan en un ambiente con iones Ca^{2+} , bajas temperaturas (0-5°C) y un pulso de calor para que ocurra la transformación. Aunque existen otros factores que incrementan la eficiencia en este proceso ²⁴ como son:

- Compuestos específicos
- La glucosa le da estabilidad a las células ante los cambios de temperatura.
- Los iones metálicos incrementan la probabilidad de transformación con eficiencias relativas de $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \sim \text{Sr}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$. Se ha encontrado que los metales alcalinotérreos no son buenos sustitutos de estos iones.

El modo de acción de los iones divalentes tiene que ver con la interacción que éstos establecen con los grupos fosfato del DNA formando compuestos de coordinación muy estables; más que aquellos formados con cationes monovalentes. La interacción del DNA exógeno con la célula puede verse como la formación de dos complejos polianiónicos: el DNA con su esqueleto de fosfato y la célula con su superficie de fosfolípidos y lipopolisacáridos.

- El cloruro de hexamín cobalto (III) es un factor que incrementa la posibilidad de que ocurra la transformación, ya sea actuando como un análogo de la cobalamina o induciendo cambios conformacionales en el DNA.

Las cepas nativas de *E. coli* no son capaces de sintetizar cobalamina, sin embargo existe un sistema de transporte específico para ésta. La cobalamina tiene el mismo tamaño que la sección transversal de una molécula de DNA. Diferentes experimentos han demostrado que la vitamina B_{12} y la coenzima B_{12} son potentes inhibidores para la transformación de células. Todo esto sugiere que el catión

hexamín cobalto (III) actúa como un análogo de la cobalamina activando los componentes de su sistema de transporte.

- Condiciones de crecimiento

Se reporta que no existe diferencia entre los diferentes medios de cultivo enriquecidos, sin embargo cuanto mayor sea la concentración de los componentes que estimulan la tasa de crecimiento en un medio de cultivo, mayor es la eficiencia de la transformación.

La presencia de Mg^{2+} en el medio de cultivo incrementa la transformación de 15-20 veces.

- Densidad celular

En *E. coli* el periodo en que la transformación ocurre con mayor frecuencia respecto al crecimiento se encuentra a la mitad de la fase logarítmica, a una densidad celular de $10^7 - 10^8$ UFC/ ml de medio de cultivo.

- Características del plásmido

El fenómeno de incorporación del DNA a través de la membrana celular no responde a un modelo de difusión pasiva, ya que hay experimentos que muestran que la probabilidad de transformación al incrementar el tamaño del plásmido decae en forma logarítmica. Además se sabe que al transformar una célula con un plásmido superenrollado el resultado es 75% más eficiente que al hacerlo con su homólogo relajado.

Se ha observado que una recombinación deficiente ocurre cuando entre la población de células hay células no viables, esto se puede deber a formas aberrantes de reparación del DNA durante el crecimiento. En una población de células que contienen el alelo *recA* generalmente el 50% de sus células no son viables.

Se piensa que en la membrana celular existen poros a los cuales los plásmidos se asocian. Cada uno de estos sitios tiene la misma probabilidad de interactuar con el DNA para que posteriormente ocurra la transformación, de modo que el proceso limitante en la transformación es el establecimiento del plásmido dentro de la célula. Estos poros son huecos donde la bicapa lipídica exterior y la citoplásmica están fusionadas mediante la red de peptidoglucanos que las conforman. A bajas temperaturas, los fosfolípidos de la membrana celular dejan de comportarse como un fluido, creando un estado transitorio en el cual ésta se comporta como un sólido. Concentraciones milimolares de iones divalentes y temperaturas cercanas a los 0°C producen estados transitorios similares en membranas artificiales. Condiciones experimentales de este tipo pueden producir el mismo efecto y cristalizar ciertas zonas de la membrana celular facilitando el proceso de transformación.

Los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana se encuentran organizados alrededor de zonas de adhesión, que se cree sirven como compuertas que captan macromoléculas y permiten el flujo de contenidos celulares. Altos niveles de cationes divalentes pueden reorganizar a los lipopolisacáridos. Se ha observado que en condiciones normales un tratamiento con 1mM de EDTA remueve el 40% de lipopolisacáridos de la membrana celular mientras que las células crecidas con 10-20 mM de Mg^{2+} o Ca^{2+} , al ser sometidas al mismo tratamiento con EDTA, pueden perder hasta el 70% de sus lipopolisacáridos.

Estos dos fenómenos en forma conjunta se han propuesto para explicar el paso correspondiente del DNA a través de la membrana celular.

2.2.2.2 Genotipo de las cepas de *E. coli* utilizadas para expresar la ChTx.

En nuestro trabajo, el genotipo de una cepa bacteriana se encuentra directamente relacionado con la facilidad con que ésta es capaz de aceptar DNA extraño. Además de contener los controles regulatorios que nos permitan inducir la producción de la toxina.

Los genotipos de las cepas utilizadas para la expresión de la ChTx fueron:

BL21 (DE3)^{21,27} *F⁻ ompT⁻ (lon) (hsd S_B r_B⁻ m_B⁻) recA⁺*. DE3 significa que es un profago que lleva el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7.

Los genes *lon* y *omp T* codifican para ciertas proteasas que podrían degradar a nuestra toxina durante el proceso de purificación.

DH5α²⁵ *F⁻ recA⁻ hsdR⁻ mcrA⁺ mcrB⁺ mcr⁺ gyrA⁻ deoR⁻ lacZΔM15⁺*

En *E. coli* los genes que influyen durante el proceso de transformación se pueden agrupar en dos categorías: genes cuyos productos participan en la reparación y recombinación del DNA y genes que constituyen sistemas de restricción que reconocen el DNA propio del extraño²⁶.

a) Genes de reparación y recombinación génica²⁶.

E. coli tiene tres vías de recombinación génica: *recBCD*, *recE* y *recF*.

Estas tres vías son dependientes del producto del gene *recA*, el cual actúa como un control maestro de la recombinación. Por ello las cepas de *E. coli* *recA⁻* son útiles para propagación de vectores con insertos clonados, ya que ésta mutación ayuda a estabilizar secuencias de DNA contenidas en vectores.

El gene *recBCD* codifica para las tres subunidades que conforman a la exonucleasa V.

b) Sistemas de reconocimiento del DNA.

Existen dos sistemas generales de restricción cuya función es la eliminación del DNA extraño: sistema de restricción-modificación tipo K (*hsdRMS*) y el sistema de restricción dependiente de metilación (MDRS)²⁵.

El gene *hsdRMS* codifica para una endonucleasa tipo *EcoK* I, la cual corta DNA con sitios de restricción *EcoK* (5' AACNNNNNGTGC 3' y su complemento 5' GCACNNNNNGTT), a menos que el primer residuo de adenina se encuentre

metilado por una metilasa *EcoK*. De modo que, cualquier secuencia de DNA extraño que no se encuentre metilada y contenga el sitio de restricción *EcoK* será degradado por esta enzima. La metilasa antes mencionada es codificada por el gene *hsdM*^{*}.

El sistema de restricción dependiente de metilación (MDRS) está constituido por los genes *mcrA*, *mcrBC* y *mrr*, cuyos productos son endonucleasas de restricción, de las cuales las dos primeras cortan secuencias de DNA que contengan citosinas metiladas y la otra, secuencias con adeninas metiladas.

c) Otros marcadores genéticos importantes.

deoR: es un gene que favorece la transformación de células, sobre todo si se quiere introducir plásmidos de gran tamaño. Además fenotípicamente se relaciona con la habilidad de la cepa bacteriana para crecer en medios mínimos cuya única fuente de carbono es inosina.

gyrA: gene compuesto por los genes *gyrA* y *gyrB*, que codifican para las dos subunidades de la DNA girasa. Esta enzima elimina fragmentos genómicos contenidos en secuencias continuas repetidas en la vía *recA*. De modo que los plásmidos con insertos clonados con este tipo de secuencias son estables en cepas de *E. coli gyrA*⁻.

lacZΔM15: corresponde a una deleción parcial del gene *lacZ*. Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante esta propiedad se aprovechó para desarrollar un marcador que permitiera distinguir a las colonias transformadas de las que no lo fueron. De modo que, cuando los fragmentos de DNA se clonan en el sitio de clonación múltiple (MCS), la subunidad α de la β -galactosidasa no se sintetiza por completo y por tanto no se puede ensamblar con la subunidad β para dar una enzima funcional. Cuando las cepas de *E. coli* que contienen DNA clonado en este sitio, se crecen en placas que contienen un compuesto colorido llamado X-gal, aparecen como colonias blancas. Mientras que aquellas con el gene intacto desarrollan un color azul.

2.2.3 EL PLÁSMIDO pG9-ChTx.

Las células bacterianas además de su DNA cromosomal contienen moléculas más pequeñas de DNA circular covalentemente cerrado llamados plásmidos.

Los plásmidos contienen muy pocos genes, de los cuales los más importantes son aquellos que codifican para la resistencia a antibióticos. Dicha resistencia requiere que una gran cantidad de enzima sea excretada al medio para destruir al antibiótico, por lo que la presencia del gene correspondiente en multicopia resulta una estrategia adecuada. Esto constituye una posible explicación de la existencia de los plásmidos.

El conocimiento adquirido a partir del estudio de la naturaleza y los avances de la tecnología del DNA recombinante, ha hecho posible el desarrollo de plásmidos apropiados para la clonación. Los principales elementos de un vector típico de clonación son ²⁸:

- Origen de replicación (*ori*), que permita la eficiente replicación en cientos de copias por célula.
- Secuencia genómica que confiera resistencia a un antibiótico, que funcione como un marcador que permita la selección de las células clonadas que contengan al fragmento.
- Sitio de clonación múltiple, una secuencia genómica con múltiples sitios de restricción para insertar el fragmento de DNA extraño.

El plásmido, pG9-ChTx, utilizado para la producción de la toxina se construyó insertando el gene de la ChTx en el plásmido pG9, el cual es un derivado del plásmido p-GEMEX1® de Promega. Este plásmido contiene, como se ha mencionado antes, los elementos típicos de un vector de clonación y además, contiene elementos regulatorios del bacteriófago T7 que hacen más eficiente y selectivo el sistema (Fig. 4).

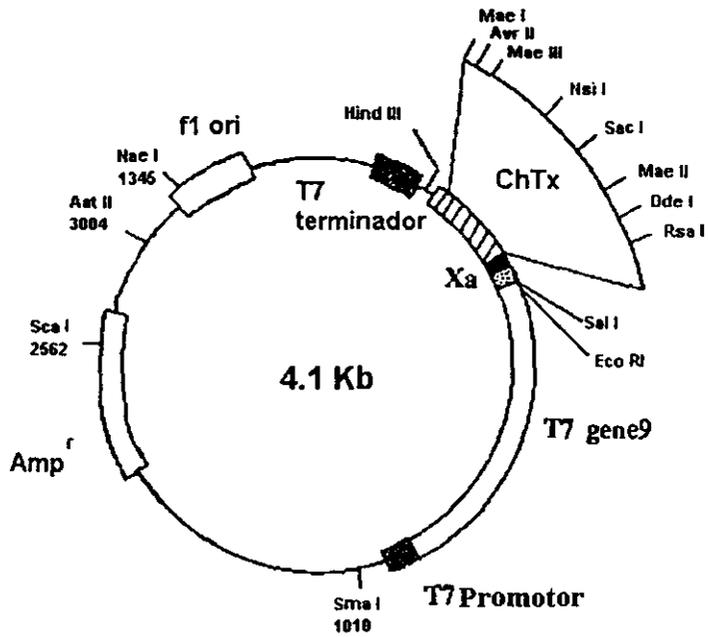


Fig 4 Esquema del plásmido pG9-ChTx^{32, 43}. En él se muestran sus principales elementos regulatorios y el inserto correspondiente al gene de la ChTx.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

- Establecer las condiciones experimentales para producir en forma recombinante la Caribdotoxina.

3.2 Objetivos específicos.

- Propagación del plásmido pG9-ChTx.
- Caracterización del plásmido pG9-ChTx.
- Obtención del sistema donde se expresará la ChTx.
- Inducción y purificación de la proteína de fusión.
- Liberación y purificación de la ChTx.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

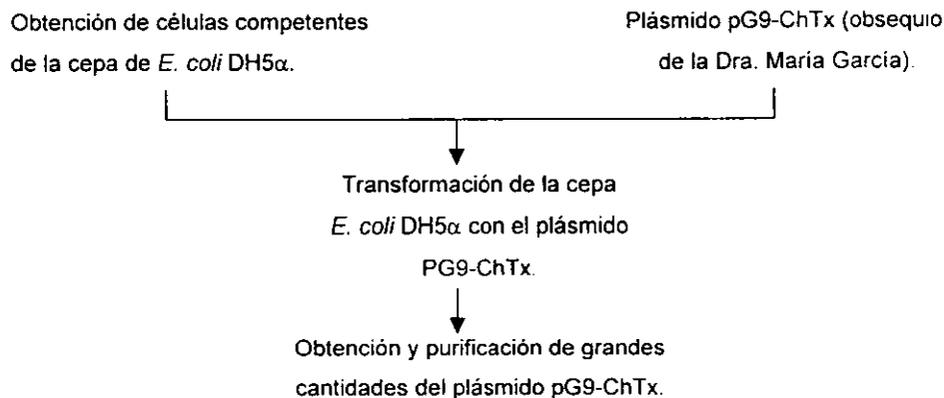
El desarrollo experimental para la obtención de la ChTx recombinante es muy amplio, consta de una sucesión de diversos experimentos individuales. Debido a esto, las metodologías correspondientes a cada experimento se encuentran resumidas en la sección de apéndices.

A continuación se presenta un diagrama de flujo que engloba los diferentes procedimientos involucrados.

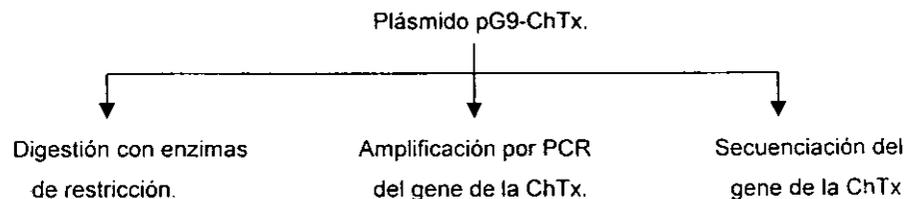
4.1 BIOLOGIA MOLECULAR.

Ver Apéndice 1 y Apéndice 3.

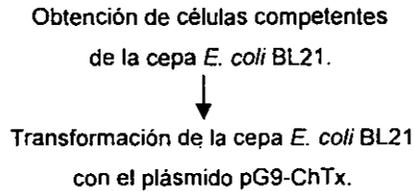
- **Propagación del plásmido pG9-ChTx.**



- **Caracterización del plásmido pG9-ChTx.**



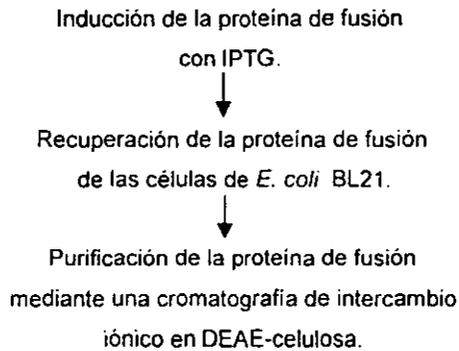
- **Obtención del sistema donde se expresará la ChTx.**



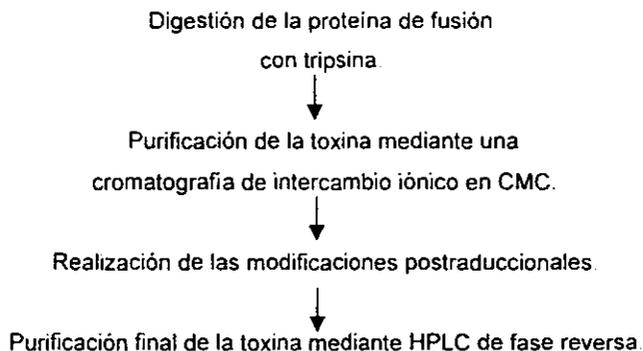
4.2 QUIMICA DE PROTEINAS.

Ver Apéndice 2 y Apéndice 4.

- **Inducción y purificación de la proteína de fusión.**



- **Liberación y purificación de la ChTx.**



5. RESULTADOS.

5.1 BIOLOGIA MOLECULAR.

5.1.1 PROPAGACIÓN DEL PLÁSMIDO pG9-ChTx.

El plásmido pG9-ChTx fue proporcionado por la Dra. María L. García, como una muestra líquida cuya concentración referida era 0.6 µg / µl.

A partir de este DNA se establecieron las condiciones experimentales para la producción de la toxina recombinante.

Se transformó una cepa de *E. coli* DH5α para la propagación del plásmido (Tabla 1). Previamente se prepararon células competentes de esta cepa usando las soluciones del método 1 descrito en la Tabla 7 y el procedimiento experimental mencionado en el apéndice de metodologías correspondiente.

Tabla 1. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de células de *E. coli* DH5α, utilizando el método 1 para obtener células competentes.

| DNA | Cantidad de DNA (ng) | Crecimiento en Medio LB | Crecimiento en Medio LB / amp |
|-------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| pG9 - ChTx | 600 | - | ✓ |
| | 300 | - | ✓ |
| | 150 | - | ✓ |
| | 60 | - | ✓ |
| DNA control | 100 | - | ✓ |
| Sin DNA | - | ✓ | × |

(-) no se realizó el ensayo, (✓) ensayo positivo, (×) ensayo negativo

El número de UFC fue excesivo en cada una de las cajas donde hubo crecimiento, por lo que fue imposible su cuantificación.

Las colonias presentaron las siguientes características:

Borde – redondo

Forma – circular

Elevación – convexa

Color – blanco

A partir de una de las cajas donde hubo crecimiento se realizó una resiembra

por agotamiento con el fin de tener colonias aisladas. A partir de éstas colonias se extrajo su DNA para corroborar que se trataba del material adecuado. La extracción preliminar del DNA se realizó siguiendo el protocolo de "lisis alcalina" (ver sección de apéndices) y posteriormente se corrió un gel de agarosa al 1%. En dicho gel se observó una banda definida con un peso de 4.1 Kb, que es el peso correspondiente al plásmido pG9-ChTx.

Se tomó otra colonia de las anteriormente transformadas y aisladas para extraer nuevamente DNA. Esta vez, la extracción y purificación se realizó mediante una MAXI-PREP (ver metodologías), con la finalidad de obtener una mayor cantidad de DNA. El DNA así obtenido, constituyó el DNA de trabajo para todos los ensayos posteriores. En un gel de agarosa al 1% se corrió el DNA obtenido y se observaron bandas bien definidas con un peso de 4Kb.

Se cuantificó la cantidad de DNA extraído por espectrofotometría a una λ de 260 nm, su concentración final fue de 440 μ g / ml. Además se estimó la pureza del DNA como el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm; se encontró que el DNA estaba puro ($A_{260} / A_{280} = 1.63$).

5.1.2 IDENTIDAD DEL PLASMIDO pG9-ChTx.

Una vez que se tuvo una gran cantidad de DNA para trabajar se realizaron diferentes experimentos para asegurarse que este DNA realmente fuera el vector adecuado para la expresión de la toxina. Para ello el DNA se caracterizó mediante digestiones con enzimas de restricción, amplificación por PCR y secuenciación por el método de la termosecuencia usando di-desoxinucleótidos marcados con ^{33}P .

5.1.2.1 Caracterización del plásmido pG9- ChTx con enzimas de restricción.

Se buscaron en el mapa del vector los sitios de las enzimas de restricción que cortaban en lugares únicos para obtener fragmentos de peso molecular conocido (Fig. 4).

Algunas de las enzimas de restricción que cortan en lugares únicos son:

- ✓ Sca I ✓ Sal I ✓ Hind III ✓ Eco RI
- ✓ Sma I ✓ Aat II ✓ Nae I

Algunas de las enzimas de restricción que no cortan al plásmido son:

- ✓ Mun I ✓ Pst I

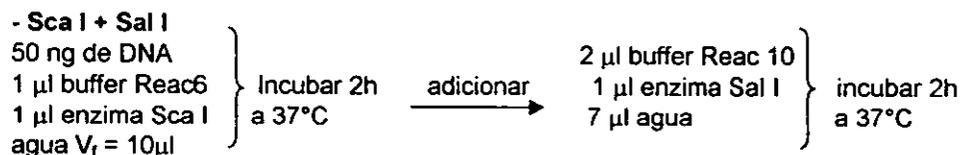
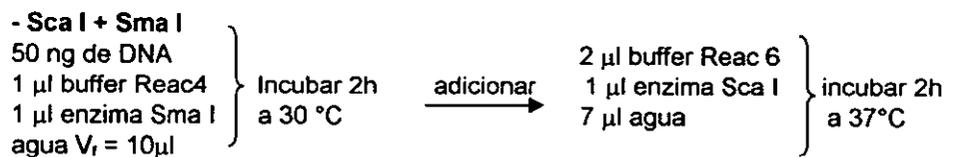
Con diferentes combinaciones de éstas enzimas se diseñó una serie de experimentos de los cuales se esperan fragmentos de peso molecular conocido (Tabla 2).

Tabla 2. Enzimas de restricción utilizadas para caracterizar el plásmido pG9-ChTx.

| Enzima(s) | Fragmento(s) |
|-----------------|--------------------|
| - Sca I + Sma I | 1552 bp 2548 bp |
| - Sca I + Sal I | 2508 bp 1592 bp |
| - Mun I | No corta |
| - Pst I | No corta |
| - Eco RI | Lineal |
| - Hind III | Lineal |

Todas las enzimas utilizadas fueron de la compañía GIBCO.

Con los datos anteriores se elaboraron las digestiones siguientes para caracterizar el plásmido pG9-ChTx (Fig. 5 y 6).



- **Mun I**
 50 ng de DNA
 1 μ l buffer Reac1
 1 μ l enzima Mun I
 agua $V_f = 10\mu$ l

Incubar 2h
 a 37°C

- **Pst I**
 50 ng de DNA
 1 μ l buffer Reac2
 1 μ l enzima Pst I
 agua $V_f = 10\mu$ l

Incubar 2h
 a 37°C

- **Hind III**
 50 ng de DNA
 1 μ l buffer Reac2
 1 μ l enzima Hind III
 agua $V_f = 10\mu$ l

Incubar 2h
 a 37°C

- **Eco RI**
 50 ng de DNA
 1 μ l buffer Reac3
 1 μ l enzima Eco RI
 agua $V_f = 10\mu$ l

Incubar 2h
 a 37°C

NOTA: En los gels de agarosa, solo uno de ellos contiene señalados los pesos de los marcadores como referencia.

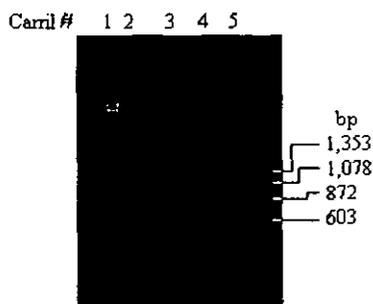


Fig. 5. Gel de DNA al 1%. Digestión con enzimas de restricción I. Carril1, Marcadores PM elevado. Carril 2, digestión con SmaI + Scal. Carril 3, digestión con Scal + Sall. Carril 4, digestión con Hind III. Carril 5, Marcadores PM bajo.

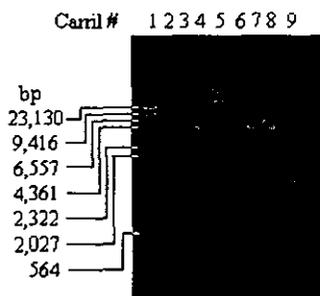


Fig. 6. Gel de DNA al 1% Digestión con enzimas de restricción II. Carril 1, Marcadores PM elevado. Carril 2, digestión con SmaI + Scal. Carril 3, digestión con Scal + Sall. Carril 4, digestión con MunI. Carril 5, digestión con PstI. Carril 6, digestión con Hind III. Carril 7, digestión con EcoRI. Carril 8, digestión con Sal I. Carril 9, Marcadores PM bajo.

5.1.2.2 Amplificación del gene de la ChTx por PCR.

Se realizaron varios ensayos con diferentes condiciones de reacción para amplificar el gene de la ChTx que tiene una longitud de 189 bp (Fig. 9).

Después de múltiples intentos fallidos en los que se evaluaron diferentes protocolos variando la cantidad de templado, el número de ciclos, cantidad de

cebador, etc., se diseñó una serie de experimentos que permitió evaluar la interacción de los diferentes parámetros que condicionan la PCR ^{29,30,31}. Se planteó realizar la PCR con solo un primer en cada reacción, de modo que el DNA amplificado fuera de cadena sencilla. Para ello el DNA se trató con enzimas de restricción tales que eliminaran el sitio de unión del cebador complementario (Fig. 7).

| Digestión con Sma I + Sca I | Digestión con Sal I | Digestión con HindIII |
|--|---|--|
| Dos fragmentos: 1552 bp 2548 bp ⇒ fragmento con el gene de la ChTx y sitios de unión de los cebadores. | Un solo sitio de corte. DNA lineal, eliminándose el sitio de unión del cebador T3. | Un solo sitio de corte. DNA lineal, eliminándose el sitio de unión del cebador SP6. |

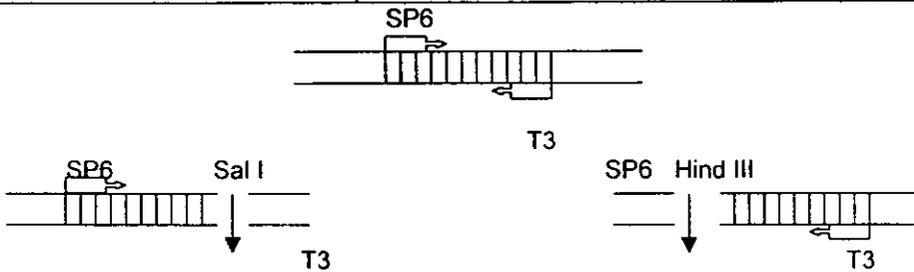


Fig. 7. Esquema propuesto para la amplificación del gene de la ChTx mediante una PCR asimétrica

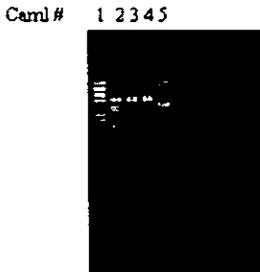


Fig. 8. Gel de DNA al 1%. Naturaleza del DNA utilizado en la PCR. Carril1, Marcadores de PM elevado. Carril 2, digestión con Sma I + Sca I. Carril 3, digestión con Hind III. Carril 4, digestión con Sal I. Carril 5, DNA circular.

El DNA digerido trató de purificarse mediante una extracción con fenol-cloroformo antes de usarse en la PCR. Sin embargo, la cantidad de DNA que se perdía por este método era grande y se decidió no realizar ninguna purificación posterior (Fig. 8).

Los mezclas de reacción para los experimentos por PCR se muestran en la Tabla3.

Tabla 3. Composición de las mezclas de reacción usadas en la amplificación por PCR del gene de la ChTx (I).

| TUBO # | Sma I + Sca I (μl) | | Sal I (μl) | | Hind III (μl) | |
|---------------------------|--------------------|-------|------------|-------|---------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Buffer (10X) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Templado 1(1ng / μl) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Primer T3 (10μM) | 5 | 5 | - | - | 5 | 5 |
| Primer SP6 (10μM) | 5 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| MgCl ₂ (50Mm) | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| dNTP (10mM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tag polimerasa (5U/ml) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Albúmina (250 μl/ml) | 2.5 | - | 2.5 | - | 2.5 | - |
| Tritón (5%) | - | 1 | - | 1 | - | 1 |
| Agua | 19.75 | 21.25 | 24.75 | 26.25 | 24.75 | 26.25 |

La temperatura de alineación calculada para c/u de los cebadores es de:

- primer SP6 = 42 °C

- primer T3 = 42°C

El programa de temperaturas usado fue:

94°C - 1 min

94°C - 30 seg

42°C - 1 min

72°C - 3 min

4°C - infinito

} 30 ciclos

El resultado de esta estrategia de PCR permitió observar el fragmento con el gene de la ChTx (Fig. 10).

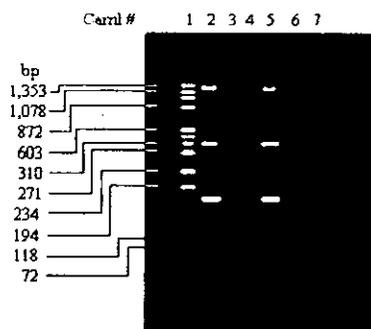


Fig 10 Gel de DNA al 1.6%. Amplificación del gene de la ChTx por PCR. Carril1, Marcadores de PM bajo. Carril 2, tubo#1 Carril 3, tubo#3. Carril 4, tubo#5. Carril 5, tubo#2 Carril 6, tubo#4. Carril 7, tubo#6.

En este gel se observa que el fragmento esperado sólo se obtuvo en los tubos en los cuales al DNA se trató con las enzimas de restricción Sma I + Sca I (sin importar la presencia de albúmina o tritón).

La estrategia primeramente diseñada para obtener fragmentos de cadena sencilla resultó infructuosa.

Una vez que se logró amplificar el fragmento con el gene de la ChTx, surgió la pregunta ¿cuál de las variantes modificadas resulta ser crítica para la amplificación?.

Se diseñó una serie de experimentos donde ahora el DNA utilizado se trató de la manera siguiente (Tabla 4):

Tabla 4. Naturaleza del plásmido pG9-ChTx utilizado en la PCR.

| Digerido con Sma I + Sca I | Digerido con Sca I | DNA circular |
|--|--|--|
| Dos fragmentos: 1552 bp 2548 bp ⇒ fragmento con el gene de la ChTx y los sitios para los cebadores | Un solo sitio de corte alejado del sitio de unión de los cebadores. DNA lineal. | Este DNA no fue tratado con ninguna enzima de restricción. |

Se utilizó el mismo protocolo de temperaturas que en caso anterior.

Las mezclas de reacción preparadas para este nuevo experimento fueron (Tabla 5):

Tabla 5. Composición de las mezclas de reacción usadas en la amplificación por PCR del gene de la ChTx (II).

| TUBO # | Sma I + Sca I (μl) | | | Sca I (μl) | | | DNA circular (μl) | | |
|--------------------------|--------------------|-------|-------|------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Buffer (10X) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Templado (1ng/μl) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Primer T3 (10μM) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Primer SP6(10μM) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| MgCl ₂ (50Mm) | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| dNTP (10mM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tag polimerasa (5U/ml) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Albúmina (250 μl/ml) | 2.5 | - | - | 2.5 | - | - | 2.5 | - | - |
| Tritón (5%) | - | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - |
| Agua | 19.75 | 21.25 | 22.25 | 19.75 | 21.25 | 22.25 | 19.75 | 21.25 | 22.25 |

Como resultado (Fig. 11), podemos ver que los tubos donde se amplificó el fragmento deseado fueron aquellos tubos en los que el DNA fue digerido con Sma I + Sca I. Sin importar la presencia de albúmina o tritón, ya que en el tubo en que no se tenía ninguno de los dos también hubo amplificación.

Lo anterior confirmó que una variable crítica en nuestra PCR fue la naturaleza del templado.

Carril # 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Fig. 11. Gel de DNA al 1.6%. Importancia de la naturaleza del templado en la PCR Carril 1, Marcadores PM bajo Carril 2, tubo#1 Carril 3, tubo#4. Carril 4, tubo#7 Carril 5, tubo#2. Carril 6, tubo#5 Carril 7, tubo#8. Carril 8, tubo#3. Carril 9, tubo #6 Carril 10, tubo#9.

A continuación se decidió optimizar la concentración de Mg^{2+} para mejorar las condiciones de la PCR (Fig. 12). Se diseñaron los siguientes experimentos, considerando que el DNA usado fue aquel digerido con Sma I + Sca I y el protocolo de temperaturas siguió siendo el mismo (Tabla 6):

Tabla 6. Composición de las mezclas de reacción usadas en la amplificación por PCR del gene de la ChTx. Optimización de la concentración de Mg^{2+} .

| Cantidad (μ l) | | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tubo # | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Buffer (10X) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Templado (1ng / μ l) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Primer T3 (10 μ M) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Primer SP6 (10 μ M) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| MgCl ₂ (50Mm) | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 | 3.5 |
| dNTP (10mM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tag polimerasa (5U/ml) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Tritón (5%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Agua | 21.75 | 21.25 | 20.75 | 20.25 | 19.75 | 19.25 |

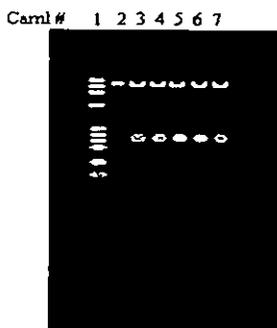


Fig. 12 Gel de DNA. Efecto del gradiente de concentración de magnesio en la PCR. Carril 1, Marcadores PM bajo. Carril 2, tubo#1 Carril 3, tubo#2. Carril 4, tubo#3. Carril 5, tubo#4 Carril 6, tubo#5. Carril 7, tubo#6.

En este gel (Fig. 12) se pudo apreciar la influencia de la concentración de Mg^{2+} en la eficiencia de la PCR. Cuando la concentración de magnesio es de 1 mM no hay amplificación y conforme la cantidad de magnesio aumenta también lo hace la intensidad de la banda. Se alcanza un máximo cuando la concentración de Mg^{2+} es igual a 3 mM, lo cual indica que ésta es la concentración óptima del catión para amplificar el gene de la ChTx en las condiciones establecidas.

Haciendo una recapitulación de las condiciones óptimas para amplificar por PCR el gene de la ChTx fueron:

Mezcla de reacción

| | Concentración |
|--------------------------------------|---------------|
| Buffer | 1 x |
| Templado digerido con Sma I + Sca I. | 10 ng |
| Primer T3 | 1 μ M |
| Primer SP6 | 1 μ M |
| MgCl ₂ | 3 mM |
| dNTP | 200 μ M |
| Tag polimerasa | 1.25 U |
| Tritón X-100® | 0.1 % |

Programa de temperaturas

| | |
|----------------|-------------|
| 94°C - 1 min | } 30 ciclos |
| 94°C - 30 seg | |
| 42°C - 1 min | |
| 72°C - 30 seg | |
| 4°C - infinito | |

5.1.2.3 Secuenciación del gene de la ChTx.

Se realizó la secuenciación del plásmido pG9-ChTx con la finalidad de asegurarnos de la naturaleza de nuestro DNA.

La secuenciación se realizó por PCR usando desoxinucleótidos marcados con ³³P. Como resultado de este experimento se pudieron leer con buena fidelidad 126 pares de bases.

La secuencia obtenida fue la siguiente:

```

3'- ACC AAT GTT TCT TGT ACC ACT TCT AAG GAA TGT TGG
   Thr Asn Val Ser Cys Thr Thr Ser Lys Glu Cys Trp
     3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14

   TCC GTT TGT CAA TGC CTG CAT AAC AAC AGC CGC GGT
   Ser Val Cys Gln Cys Leu His Asn Thr Ser Arg Gly
   15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

   AAA TGC ATG AAC AAA AAA TGT CGT TGT TAC TCC TAG
   Lys Cys Met Asn Lys Lys Cys Arg Cys Tyr Ser End
   27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

GAA TTC CAA GCT TGA GTA -5'
  
```

Como se puede observar a continuación, al comparar la secuencia obtenida experimentalmente con la nativa, existe un triplete mutado, el codón 19. Este codón codifica para una cisteína en lugar de la arginina nativa (ver también Fig. 9).

```

3'- ACC AAT GTT TCT TGT ACC ACT TCT AAG GAA TGT TGG
3'- ACC AAT GTT TCT TGT ACC ACT TCT AAG GAA TGT TGG

   TCC GTT TGT CAA TGC CTG CAT AAC AAC AGC CGC GGT
   TCC GTT TGT CAA GCA CTG CAT AAC AAC AGC CGC GGT

   AAA TGC ATG AAC AAA AAA TGT CGT TGT TAC TCC TAG
   AAA TGC ATG AAC AAA AAA TGT CGT TGT TAC TCC TAG

GAA TTC CAA GCT TGA GTA -5' ←----- Secuencia
GAA TTC CAA GCT TGA GTA -5' ←----- Secuencia
                                     nativa
                                     Secuencia
                                     experimental
  
```

5.1.3 TRANSFORMACION DE LAS CELULAS *E. coli* BL21.

A continuación se procedió a transformar las células en las cuales se induciría la toxina (*E. coli* BL21). Lo lógico era hacer la transformación del mismo modo que el utilizado para las células *E. coli* DH5 α . Después de varios intentos fallidos se concluyó que era necesario otro método, pues las células *E. coli* BL21 no eran tan fáciles de transformar. Se probaron tres procedimientos diferentes antes de encontrar la adecuada para poder transformar las células exitosamente.

El procedimiento experimental para cada método es el mismo y esta especificado en el apéndice correspondiente, lo único que varía son las soluciones utilizadas en cada caso y cuya composición se especifica en la Tabla 7.

Tabla 7. Soluciones utilizadas en los diferentes métodos para obtener células competentes.

| Método 1 | Método 2 ³³ | Método 3 |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Medio LB - Triptona 10 g - Extracto de levadura 5 g - NaCl 10 g En 1 L de medio | <ul style="list-style-type: none"> • Medio Psi - Triptona 10 g - Extracto de levadura 5 g - MgSO₄ 5 g En 1L de medio | <ul style="list-style-type: none"> • Medio SOB - Triptona 20 g - Extracto de levadura 5 g - NaCl 0.6 g - KCl 0.5 g - MgCl₂ 0.95 g - MgSO₄ 1.2 g En 1 L de medio |
| <ul style="list-style-type: none"> • Solución A - MOPS 0.01M - RbCl 0.01M pH = 7.0 | <ul style="list-style-type: none"> • Tfb 1 - CH₃COOK 0.06M - RbCl 0.2M - CaCl₂ 0.02M - MnCl₂ 0.16M - Glicerol 12 % pH = 5.8 | <ul style="list-style-type: none"> • TB 1 - CH₃COOK 0.03M - RbCl 0.1M - CaCl₂ 0.01M - MnCl₂ 0.05M - Glicerol 12 % pH = 5.8 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Solución B - MOPS 0.1M - CaCl₂ 0.05M - RbCl 0.01M pH = 6.5 | <ul style="list-style-type: none"> • Tfb 2 - MOPS 0.01M - RbCl 0.1M - CaCl₂ 0.01M - Glicerol 12 % pH = 6.5 | <ul style="list-style-type: none"> • TB 2 - MOPS 0.01M - RbCl 0.01M - CaCl₂ 0.75M - Glicerol 12 % pH = 6.8 |

A continuación se presentan los resultados obtenidos por la obtención de células competentes según el método utilizado (Tabla 8, 9 y 10).

Tabla 8. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de células *E.coli* BL21, utilizando el método 1 para obtener células competentes.

| DNA | Cantidad de DNA (ng) | Crecimiento en Medio LB | Crecimiento en Medio LB / amp | |
|-------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------|
| | | | Ensayo | UFC |
| pG9 - ChTx | 600 | - | × | 0 |
| | 500 | - | × | 0 |
| | 400 | - | × | 0 |
| | 200 | - | × | 0 |
| DNA control | 100 | - | ✓ | Incontables |
| Sin DNA | - | ✓ | × | 0 |

Tabla 9. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de células *E.coli* BL21, utilizando el método 2 para obtener células competentes.

| DNA | Cantidad de DNA (ng) | Crecimiento en Medio LB | Crecimiento en Medio LB / amp | |
|-------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|-----|
| | | | Ensayo | UFC |
| pG9 - ChTx | 600 | - | × | 0 |
| | 500 | - | × | 0 |
| | 400 | - | × | 0 |
| | 200 | - | × | 0 |
| DNA control | 100 | - | ✓ | 10 |
| Sin DNA | - | ✓ | × | 0 |

Tabla 10. Efecto de la cantidad de plásmido pG9-ChTx en la transformación de células *E. coli* BL21, utilizando el método 3 para obtener células competentes.

| DNA | Cantidad de DNA (ng) | Crecimiento en Medio LB | Crecimiento en Medio LB / amp | |
|-------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------|
| | | | Ensayo | UFC |
| pG9 - ChTx | 600 | - | ✓ | 100 |
| | 500 | - | ✓ | 250 |
| | 400 | - | ✓ | Incontables |
| | 200 | - | ✓ | incontables |
| DNA control | 100 | - | ✓ | incontables |
| Sin DNA | - | ✓ | × | 0 |

La simbología utilizada fue: (-) no se realizó el ensayo, (✓) ensayo positivo, (×) ensayo negativo.

Los ensayos positivos presentaron colonias con las siguientes características:

Borde – redondo

Forma – circular

Elevación – convexa

Color – blanco

5.2 QUIMICA DE PROTEINAS.

5.2.1 INDUCCION Y PURIFICACION DE LA PROTEINA DE FUSION ³⁵.

Para la inducción de la proteína de fusión (Fig. 13) fue necesario partir de una cepa de *E. coli* BL21 recientemente transformada con el plásmido pG9-ChTx para asegurar que las células no hubieran perdido el plásmido.

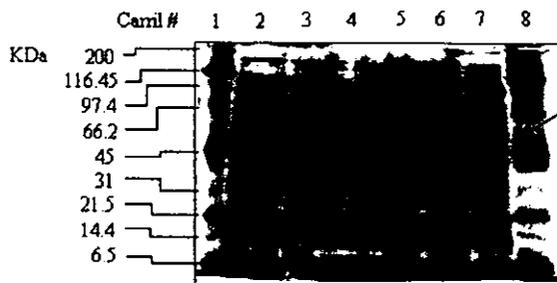


Fig. 13. Gel de proteínas al 12.5%. Inducción de la proteína de fusión. Carril 1 y 8, marcadores de PM de amplio espectro. Carril 2 y 3, células preinducidas. Carril 4 y 5, células postinducidas. Carril 6, muestra después de sonicar. Carril 7, sobrenadante después de la sonicación.

Se purificó la proteína de fusión mediante una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (ver página). Los resultados de dicha cromatografía se observan en la Fig. 14.

Posteriormente se separaron las proteínas en un gel SDS-PAGE con las muestras de los tubos más representativos de ésta cromatografía. En la Fig. 15 se muestran las bandas obtenidas de la cromatografía en DEAE. Las dos últimas bandas, eluidas con fuerza iónica, corresponden a la proteína de fusión. En ellas se observa que la proteína de fusión todavía no se encuentra completamente pura, y está acompañada de proteínas de alto peso molecular.

Separación de las proteínas totales de *E. coli* BL21 (DEAE)

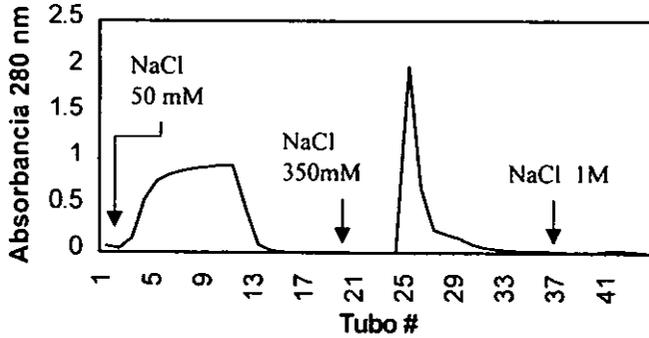


Fig. 14 Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) para separar a la proteína de fusión del resto de las proteínas de *E. coli* BL21. Protocolo de la columna Resina_ DEAE celulosa Diámetro: 1 cm. Altura: 10 cm. Tipo de presión en la corrida: hidrostática Gradiente escalonado

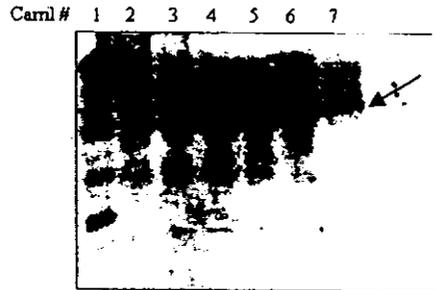


Fig. 15. Gel de proteínas al 12.5% Picos representativos de la cromatografía en DEAE-celulosa. Carril 1, Marcadores PM. Carril 2, DEAE tubo#5. Carril 3, DEAE tubo#8. Carril 4, DEAE tubo#9 Carril 5, DEAE tubo#11. Carril 6, DEAE tubo#25. Carril 7, DEAE tubo#26.

5.2.2 LIBERACION Y PURIFICACION DE LA ChTx³⁵.

Se reunieron los tubos 24-29 obtenidos de la separación en DEAE-celulosa anterior y se dializaron contra 4 L de Buffer de diálisis. Posteriormente se liofilizó la muestra para tenerla en un volumen más pequeño y facilitar la digestión.

Se realizó la digestión de la proteína de fusión, la cual resultó ser más complicada de lo esperado. Primeramente se hizo una digestión de 30 min con tripsina. Para detener la reacción y ciclizar el aminoácido terminal se adicionó AcOH al 5%. Se observó la formación de un precipitado el cual se guardó para análisis posteriores. Con la muestra digerida y ciclizada se corrió un gel de acetato-urea³⁴ y otro SDS-PAGE. En el primer gel no se obtuvo ninguna banda, mientras que en el segundo se observó una banda a la misma altura que aquella obtenida para la proteína de fusión. Todo esto nos sugería que posiblemente la digestión no había ocurrido.

El precipitado anteriormente obtenido se separó en dos partes, cada una de las cuales fue resuspendida en NaOH pH = 10 y SDS 1% respectivamente. Una vez solubilizadas las fracciones se corrieron en un gel SDS-PAGE, en el cual no se encontró ninguna banda. Esto sugería que el precipitado no contenía proteína.

Puesto que los resultados no fueron los esperados se replanteó la metodología experimental. Diferentes muestras de la proteína de fusión purificada en DEAE-celulosa se digirieron con tripsina por 30 min, 1.5, 3 y 6 horas. La muestra digerida por 6 horas se purificó mediante una cromatografía en Sephadex G-25 y las muestras restantes se purificaron en una columna de CMC microgranular (ver página 71).

Para realizar estos ensayos, se indujo de nueva cuenta la proteína de fusión. Los resultados de los experimentos anteriores a la purificación no se muestran, ya que los presentados anteriormente resultan representativos.

Se realizó la digestión con tripsina durante 6 h, se ciclizó el amino terminal y se corrió una cromatografía de permeación en gel usando la resina Sephadex G-25 (Fig. 16).

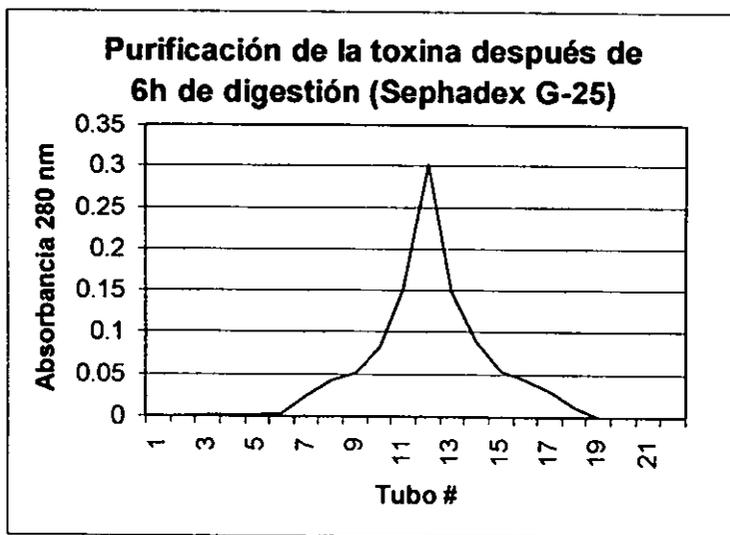


Fig. 16. Cromatografía de permeación en gel (Sephadex G-25) para separar a la toxina de los fragmentos de proteína de fusión después de 6 h de digestión. Condiciones de la corrida: Resina: Sephadex G-25. Diámetro: 5 cm. Altura: 50 cm. Tipo de presión en la corrida: peristáltica. Velocidad de flujo: 1 ml/min.

Se corrió un gel SDS-PAGE (no se muestra) con los tubos # 8, 9 y 10 de esta cromatografía. En este gel no se observó ninguna banda, ni siquiera aquella correspondiente a la proteína de fusión.

A continuación se realizaron las digestiones de 30 min, 1.5 h y 3 horas, (Fig. 17, 18 y 19 respectivamente), inmediatamente después se cargaron dichas muestras en la resina de CMC para su purificación.

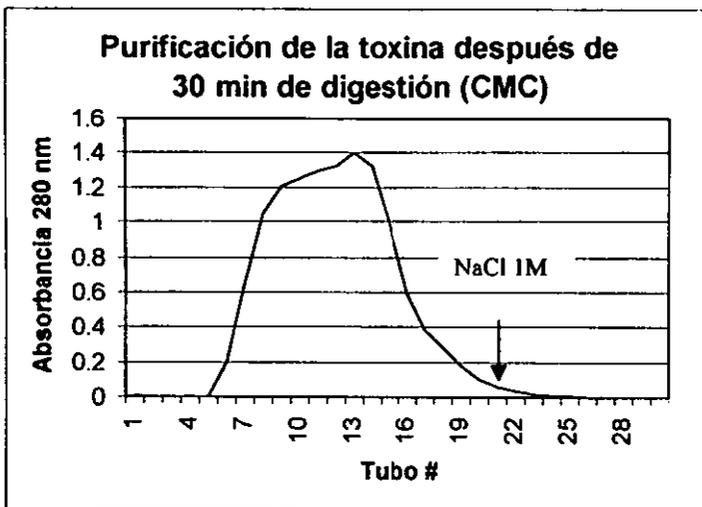


Fig. 17. Cromatografía de intercambio iónico (CMC) para separar a la toxina de los fragmentos de proteína de fusión después de 30 min de digestión. Condiciones de la corrida: Resina: CMC microgranular. Diámetro: 1 cm. Altura: 5 cm. Tipo de presión en la corrida: hidrostática. Gradiente: escalonado.

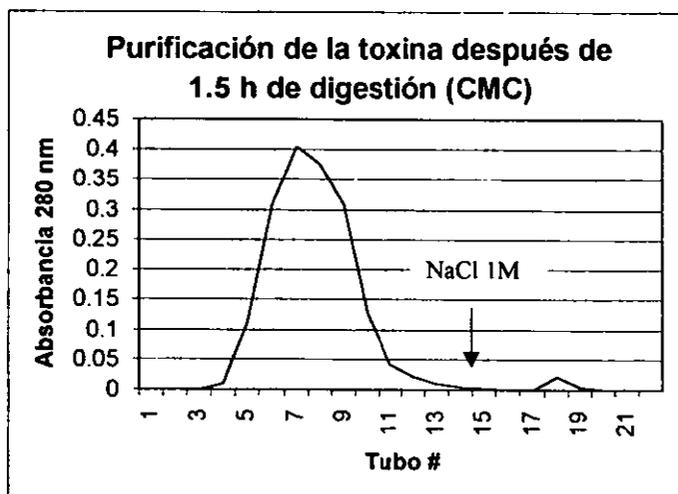


Fig. 18. Cromatografía de intercambio iónico (CMC) para separar a la toxina de los fragmentos de proteína de fusión después de 1.5 h de digestión. Condiciones de la corrida: Resina: CMC microgranular. Diámetro: 1 cm. Altura: 5 cm. Tipo de presión en la corrida: hidrostática. Gradiente: escalonado.

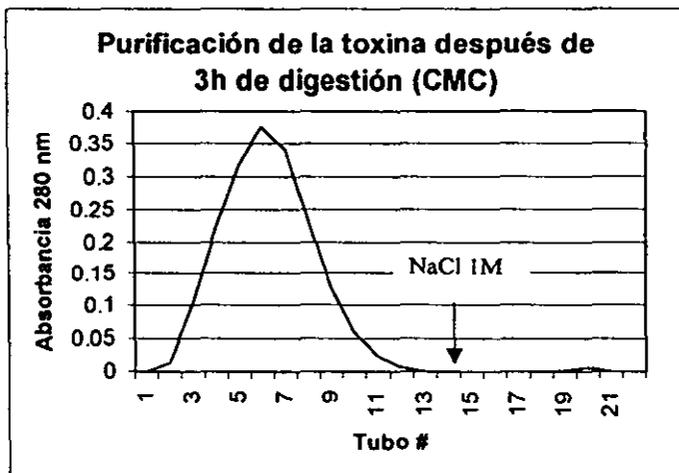


Fig. 19. Cromatografía de intercambio iónico (CMC) para separar a la toxina de los pedazos de proteína de fusión después de 3 h de digestión. Condiciones de la corrida: Resina: CMC microgranular. Diámetro: 1 cm. Altura: 5 cm. Tipo de presión en la corrida: hidrostática. Gradiente: escalonado

En todos los casos se corrieron geles SDS-PAGE de los picos representativos de cada cromatografía (datos no mostrados), en ellos se observó la desaparición de la banda correspondiente a la proteína de fusión.

Como se puede ver en las Fig. 17, 18 y 19 no se puede observar un pico que corresponda a la toxina. En el cromatograma se esperaba un primer pico donde estarían los fragmentos de la proteína del gene 9 del bacteriófago T7 y posteriormente, al eluir con NaCl un segundo pico donde estaría la ChTx. Para saber si se obtuvo la toxina fue necesario aplicar la cromatografía de alta resolución, HPLC. Las muestras se compararon contra un estándar comercial de la toxina nativa purificada a partir del veneno, del cual se inyectó una concentración de $0.3\mu\text{M}$. Las muestras se dializaron contra un Buffer de fosfatos 50 mM pH =7.2, en una membrana de diálisis CellulSep Mw cutoff = 3500 Da, diámetro interno = 12.1 mm.

Los resultados del HPLC se muestran a continuación (Fig.20):

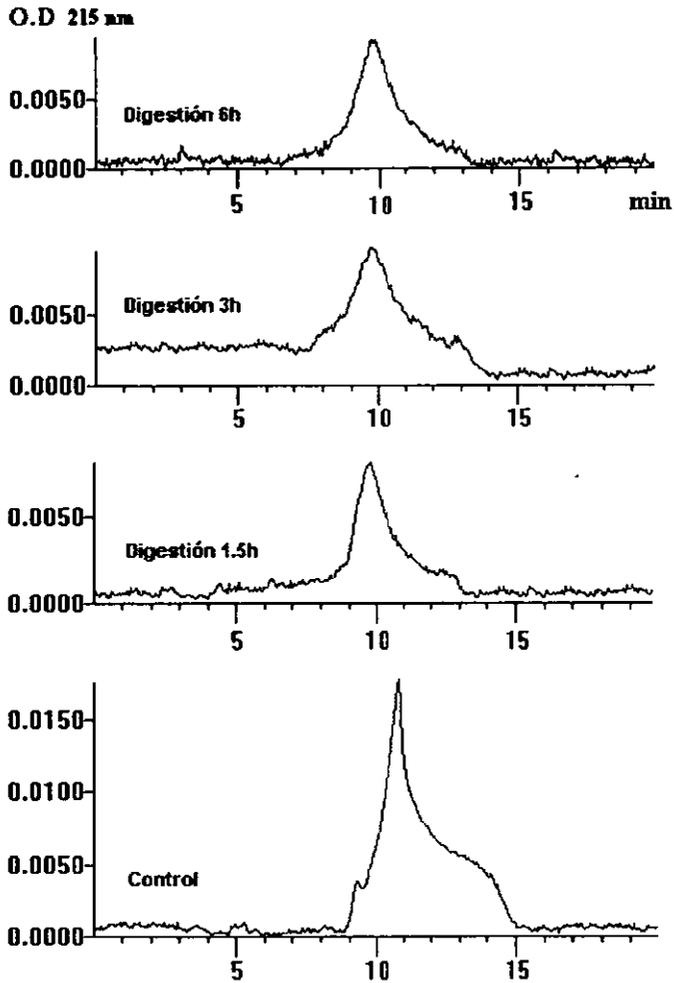


Fig. 20. Cromatograma HPLC C₁₈ fase reversa para cada una de las digestiones de la proteína de fusión. Control obtenido de "Peptide international". Condiciones de la corrida: Columna: Varian C₁₈ 5x300 mm. Flujo: 1 ml/min. Fase móvil: TFA 0.1% con gradiente lineal de acetonitrilo 0-40%. Detector: Espectrofotómetro UV-Vis $\lambda = 215$ nm.

Como resultado de éstos patrones de HPLC se pudo observar que al parecer en nuestras digestiones efectivamente se tiene toxina liberada, aunque no se puede asegurar con certeza pues la calidad de los cromatogramas no lo permiten. Se observa una ligera diferencia en los tiempos de retención del control y nuestras muestras, esto se puede deber a que nuestra toxina contiene una cisteína adicional que se puede encontrar oxidada con β -mercaptoetanol. Además los cromatogramas se corrieron a dos longitudes de onda distintas, 280 nm (dato no mostrado) y 215 nm. En la corrida a 280 nm no se observaba ningún pico en comparación con el obtenido a 215 nm.

6. DISCUSION.

6.1 BIOLOGÍA MOLECULAR.

6.1.1 Obtención de células competentes de las cepas utilizadas para la obtención de la ChTx recombinante.

La transformación de las células de *E. coli* DH5 α nos permitió obtener una cantidad abundante del plásmido pG9-ChTx, después de su correspondiente extracción y purificación.

La cepa *E. coli* DH5 α es ideal para ser transformada con DNA externo ya que genotípicamente carece de los sistemas responsables del reconocimiento y degradación de éste tipo de DNA (ver páginas 12-15), lo cual hace que la permanencia del DNA una vez que ha penetrado la membrana celular sea mucho más fácil. A diferencia de la cepa DH5 α , el genotipo de *E. coli* BL21 se inclina por los controles regulatorios adecuados para la expresión de la toxina y a la ausencia de genes que codifiquen para proteasas que pudieran degradar a nuestra proteína durante el proceso de purificación.

El estado de "competencia" de las células es otro aspecto importante en una transformación. Se encuentra relacionado con la metodología experimental necesaria para ello y como ya se mencionó en los antecedentes existen diferentes compuestos químicos que son capaces de hacer competentes a las células. La eficacia de un método u otro depende nuevamente de la cepa en cuestión. Según el modelo propuesto para la incorporación del DNA a través de la membrana celular, es evidente que su composición juega un papel muy importante. Aún tratándose del mismo tipo de bacteria, la composición de la membrana nunca será la misma para diferentes tipos de cepas. Las razones anteriormente expuestas explican porque fue más fácil obtener células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α que de la cepa *E. coli* BL21.

Una vez establecidos los métodos con que es posible obtener células competentes de cada una de las cepas de *E. coli*, se obtuvo que para la misma

cantidad de DNA el número de UFC en las células BL21 es mucho menor que aquel obtenido para las células DH5 α . Esto nos habla de la toxicidad del plásmido y su producto.

Como ya se había mencionado antes, aún en ausencia del inductor, la RNA polimerasa del T7 se encuentra presente y por lo tanto hay cierta producción de la ChTx. Como la cepa DH5 α no es un lisógeno del bacteriófago T7, no hay RNA polimerasa del T7 que lleve a cabo la síntesis de la ChTx, por lo cual el plásmido pG9-ChTx resulta no ser tan tóxico para esta cepa.

Para la cepa BL21, entre menor fue la cantidad de DNA usado en la transformación, mayor fue el número de UFC obtenido. Si suponemos que la probabilidad de que ocurra la transformación es igual para todas las células presentes en el ensayo, entonces cada célula recibirá el mismo número de moléculas de DNA. Por ello, entre menor sea el número de copias disponibles menos moléculas de DNA recibirá cada célula y viceversa. Así, las células transformadas con menos DNA tendrán niveles basales de ChTx menores y la supervivencia será mayor, repercutiendo esto en el número de UFC observadas en los platos.

6.1.2 Extracción y purificación del plásmido pG9-ChTx ³⁶.

La obtención y purificación del DNA plasmídico implica que éste pueda ser separado del DNA cromosomal y de los macrocomponentes de la célula huésped.

Cuando el DNA cromosomal es expuesto a condiciones alcalinas (pH ~ 12.5) se desnaturaliza y precipita, mientras que el DNA plasmídico permanece en la fracción soluble. Este mismo fenómeno ocurre a pH cercanos a la neutralidad y en presencia de una alta concentración de sales. Es posible que el DNA cromosomal, el RNA y las proteínas, bajo estas condiciones se agreguen debido a su gran peso molecular y formen una red insoluble que los saque de la disolución.

Las metodologías utilizadas en este trabajo aprovechan los aspectos antes mencionados, así como la naturaleza covalentemente cerrada del DNA plasmídico

y el gran peso molecular del DNA cromosomal para lograr la separación (ver Apéndice 3, sección C.3 y D.3 y Apéndice 1, sección C.1 y D.1).

6.1.3 Identidad del plásmido pG9-ChTx.

Tener la certeza del buen ensamblado del plásmido pG9-ChTx, así como corroborar la correcta secuencia del gene de la ChTx es muy importante. Si la construcción del plásmido no es correcta, la toxina no se expresará y se perdería el trabajo de varios meses. Previendo esto, primeramente se caracterizó el plásmido con diferentes enzimas de restricción. Los resultados obtenidos fueron los esperados en todos los casos.

En los geles correspondientes (Fig. 5, 6 y 8) además de los fragmentos de peso molecular conocido, se pueden observar dos aspectos adicionales que caracterizan al DNA plasmídico; uno de ellos es la diferencia de movilidad que éste tiene respecto a la del DNA linealizado (Fig. 8). El DNA circular covalentemente cerrado (DNA CCC) es una molécula más compacta que su homólogo lineal, por lo que es más fácil que se mueva a través de la red formada por la agarosa y aparezca como una banda con una movilidad ligeramente mayor.

El segundo aspecto que caracteriza al DNA plasmídico, son las diferentes formas en que éste DNA puede existir. En la Fig. 6 se puede observar que el carril que contiene la muestra del DNA sin ningún tratamiento con enzimas de restricción presenta más de una banda. Esto se debe a que el DNA plasmídico puede estar presente en forma multimérica, de modo que pueden presentarse bandas cuyos pesos moleculares sean múltiplos del peso de la molécula individual.

A continuación se procedió a amplificar el gene de la ChTx. Este experimento como tal no tiene una relación directa con la producción de la toxina. El objetivo central de este trabajo es establecer las condiciones experimentales para producirla, y posteriormente en el laboratorio producir otras toxinas de interés biológico. Para realizar este experimento era necesario contar con los cebadores adecuados, los cuales ya existían en forma comercial.

La variable crítica en la amplificación del gene de la ChTx fue la naturaleza del DNA utilizado (Fig. 11). Solo se obtuvo amplificación en aquellos tubos en los que el DNA fue previamente digerido con las enzimas SmaI + ScaI. El tratamiento con éstas enzimas de digestión elimina un fragmento grande en el DNA que podría de algún modo dificultar la amplificación mediante un impedimento estérico.

La presencia de Tritón X-100® o albúmina no fue determinante en la amplificación, pues en el tubo en que ninguno de estos dos compuestos se encontraba presente también se observó el fragmento de interés. Sin embargo se aprecia una ligera diferencia en la intensidad de las bandas, siendo mayor en aquella con Tritón X-100® por lo que se decidió usarlo en posteriores ensayos.

El Tritón X-100® y la albúmina son moléculas anfipáticas que se propone podrían estabilizar la interacción entre el DNA y la *Tag* polimerasa^{29, 30, 31}.

A continuación se optimizó la concentración de Mg²⁺ (Fig. 12), ya que un exceso de este ión reduce la fidelidad de la enzima incrementando los niveles de amplificación inespecífica, mientras que en su ausencia la *Tag* polimerasa es inactiva^{29, 30, 31}. Como resultado de este experimento la concentración adecuada de Mg²⁺ para amplificar el gene de la ChTx resultó ser de 3 mM.

En todos los geles, además del fragmento de la ChTx se observan bandas de alto peso molecular en la parte superior. Estas bandas probablemente son el resultado de la agregación de los fragmentos de amplificación inespecífica, o bien de multímeros de los cebadores³⁶. Estos datos nos indican que las condiciones de la PCR aún debían de ser optimizadas^{37, 38}.

La temperatura óptima de alineamiento de los cebadores fue de 42°C. Este valor se debe principalmente al porcentaje de guanina – citosina que contiene el DNA y a las interacciones intermoleculares que establecen.

Por último, se secuenció el fragmento de la ChTx mediante una PCR que utiliza 2', 3'-didesoxinucleótidos marcados con ³³P. De los resultados anteriormente obtenidos todo hacía pensar que el DNA de trabajo era el adecuado. Sin embargo, al realizar la secuenciación encontramos que un nucleótido se encontraba mutado. Esta mutación al ser considerada dentro del

ORF origina un triplete que codifica para una cisteína en lugar de la arginina nativa.

La presencia de esta cisteína adicional puede alterar la estructura tridimensional de la ChTx, y por consiguiente, modificar su actividad biológica mediante la formación de puentes de disulfuro ajenos a la estructura nativa. Como es sabido, en las toxinas de alacrán los puentes de disulfuro son importantes para mantener esta estructura ³⁹.

En la toxina nativa seis residuos de cisteína permiten la formación de distintas combinaciones de puentes de disulfuro, pero solo una de ellas es la adecuada y la que ocurre en la naturaleza. Diversos estudios han demostrado que la correcta formación de los puentes de disulfuro está regido por la energía libre de Gibbs (ΔG), lo cual a la vez determina su actividad biológica. Considerando que la mutación se encuentra en una posición alejada al sitio de interacción de la toxina ^{8, 9, 10} y que experimentos ^{39, 40, 44} con los puentes disulfuro de la ChTx han demostrado que esta cisteína adicional no afecta su adecuado plegamiento, se continuó trabajando con el plásmido pG9-ChTx.

Posteriormente se confirmó con la investigadora que donó el plásmido que por equivocación se envió el plásmido con el gene de una ChTx mutada: la ChTx R19C. Sin embargo este resultado no afectó el objetivo central del trabajo e incluso esta toxina puede aplicarse en estudios bioquímicos posteriores.

Un aspecto que debe considerarse como resultado de esta mutación, es que durante la metodología la presencia de β -mercaptoetanol puede oxidar a esta cisteína adicional formando la especie ChTx -S- mercaptoetanol, especie que probablemente tenga una movilidad diferente al hacer el análisis por HPLC.

6.2 QUÍMICA DE PROTEÍNAS.

6.2.1 Inducción y purificación de la proteína de fusión.

La metodología experimental propuesta para la inducción de la proteína de fusión responde a varios aspectos ²¹:

- El cultivo debe encontrarse en la fase logarítmica de crecimiento al momento de la inducción. Para genes tóxicos como el nuestro, una vez que en el medio se ha alcanzado la saturación las células comienzan a morir.
- Entre mayor sea la cantidad de células, mayor es la cantidad de proteína obtenida.
- La ampicilina debe ser renovada constantemente para evitar que ésta sea inactivada por la β -lactamasa secretada al medio por las células. Si el cultivo alcanza la saturación se corre el riesgo de que la ampicilina se haya agotado y las células que carecen del plásmido comiencen a sobrecrecer el medio. No hay que olvidar que en plásmidos inestables como el nuestro y que tienen el marcador *amp^r*, la presión que lo mantiene en las células es la presencia de la ampicilina.

En el gel correspondiente a la Fig. 13, se muestra la inducción exitosa de la proteína de fusión (banda con un peso de 53 KDa). Para las muestras antes de la inducción también se observa una banda con el mismo peso del de la proteína de fusión. Estas bandas pueden ser la proteína de fusión que se produjo como resultado de la acumulación de la T7 RNA polimerasa en ausencia de inductor, o bien, alguna de las proteínas propias de *E. coli*, ya que las muestras se corrieron sin ningún tratamiento de purificación.

Por su parte, la metodología correspondiente a la purificación de la proteína de fusión se fundamenta en sus propiedades físicas:

- Es una proteína soluble que no es excretada al medio, por lo que es necesario lisar a las células y obtener un extracto celular que la contenga. Después es necesario eliminar el DNA presente, para lo cual se utiliza el sulfato de estreptomina quién lo desnaturaliza ocasionando su

precipitación. La desnaturalización ocurre cuando la estreptomicina rompe los puentes de hidrógeno y las interacciones moleculares que establecen las bases entre sí. Esto a su vez destruye la estructura helicoidal del DNA, lo cual permite la formación de grandes agregados insolubles que terminan precipitándose.

- Es una proteína de naturaleza ácida ^{43, 46}, por lo que una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, nos permite separar las proteínas que al pH de elución se encuentren cargadas negativamente.

El grupo de intercambio iónico de esta resina es $R-OCH_2CH_2N(CH_2CH_3)_2$ ⁴² (ver página 70).

El uso de inhibidores de proteasas como son la leupeptina, la pepstatina y el PMSF tiene como finalidad prevenir la degradación de la proteína de fusión por la acción de proteasas que puedan estar presentes durante el proceso de purificación.

6.2.2 Liberación y purificación de la ChTx.

Originalmente el gene de la proteína de fusión se diseñó para que mediante una digestión con la proteasa conocida como Factor Xa, se pudiera liberar a la toxina. Debido a que el Factor Xa es muy caro y se necesita una cantidad considerable para realizar la digestión, se utilizó otra estrategia. La digestión se llevó a cabo con tripsina, una proteasa que corta inmediatamente después de aquellas posiciones en donde exista un aminoácido básico (ver Fig. 9). La ChTx R19C contiene en su secuencia varios aminoácidos básicos que también podrían ser atacados por la tripsina, pero esto no ocurre tan fácilmente debido a que la toxina tiene una estructura que se puede visualizar como un balón rígido que no siempre puede ser penetrado. Se realizaron ensayos a diferentes tiempos con la finalidad de evaluar el tiempo en el cual la toxina es liberada sin tener pérdidas por degradación.

La purificación de la toxina, al igual que en el caso de la proteína de fusión se basa en sus propiedades físicas. Como todas las toxinas de alacrán, la ChTx

es un péptido soluble, de naturaleza básica y con bajo peso molecular. Para purificar la ChTx liberada de las digestiones de 30 min, 1.5 y 3 horas se utilizó una cromatografía de intercambio iónico en CMC, cuyo grupo funcional es R-OCH₂COOH. Mientras que para la digestión de 6 horas se utilizó la cromatografía de permeación en gel en Sephadex G-25, cuya estructura está formada por unidades de dextrán con enlaces entrecruzados de glicerina ⁴² (ver página 71).

La detección de la toxina liberada resultó ser bastante complicada, ya que debido a su bajo peso molecular no es de fácil detección en un gel de SDS-PAGE, pues corre a la par que el frente móvil del colorante. Mientras que en un gel de acetato -urea se corre el riesgo de que la ChTx difunda al momento de teñir - destañir, pues el gel tiene una concentración del 6% lo cual constituye una malla muy relajada que puede no retenerla. Por otro lado, después de las digestiones al realizar las cromatografías y buscar la toxina por espectrofotometría, no era posible detectarla.

Los resultados obtenidos de la digestión de 30 min. parecían indicar que la digestión no había ocurrido. Esto se podía deber a dos razones principalmente: 1) la tripsina no estaba activa o su velocidad de digestión era muy lenta por no encontrarse a la temperatura óptima y 2) el sitio de corte entre la toxina y la proteína de fusión era inaccesible.

En las digestiones a tiempos crecientes de 1.5, 3 y 6 horas seguíamos sin poder detectar la toxina, sin embargo la posibilidad de que la proteasa estuviera inactiva fue desechada, porque los geles SDS-PAGE con estas muestras ya no mostraban la banda correspondiente a la proteína de fusión.

Después de analizar diferentes métodos analíticos para detectar y purificar proteínas, se decidió entonces realizar un HPLC con las muestras obtenidas en las digestiones anteriores (Fig. 20). Se utilizó como patrón una muestra comercial de ChTx purificada a partir del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* (Peptides International). Los resultados de esta cromatografía fueron muy reveladores. Para las digestiones anteriores se obtuvieron picos ($\lambda = 215$ nm) cuyos tiempos de retención fueron casi los mismos que el obtenido para la ChTx estándar. Esta diferencia se puede explicar si recordamos que nuestra toxina no

es la ChTx sino la ChTx R19C. Esta cisteína adicional, como ya se discutió antes puede estar oxidada formando un puente de disulfuro con el β -mercaptoetanol y por tanto modificar su movilidad en el HPLC. Para evitar las confusiones que esto pueda originar sería necesario realizar una reducción selectiva de este puente de disulfuro.

Los HPLC se corrieron a dos longitudes de onda distintas: 280 nm y 215 nm. En el cromatograma obtenido a 280 nm no se observó ningún pico, mientras que en el de 215 nm si se pudo distinguir un pico; esto nos indica que la ChTx pese a tener aminoácidos aromáticos no absorbe a dicha longitud de onda.

¿ Por qué si tiene aminoácidos aromáticos, no absorbe a 280 nm?

- La ChTx es un péptido globular cuyos aminoácidos hidrofóbicos se proyectan hacia el interior de su estructura, mientras que los hidrofílicos se encuentran en la parte exterior conformando la superficie de interacción. Es probable que los grupos aromáticos se encuentren inmersos en esta estructura globular y no absorban.
- Si consideramos a una sola molécula de ChTx R19C, la cantidad de grupos aromáticos presentes en la molécula es de tres, mientras que la cantidad de enlaces peptídicos es de treinta y seis. Así que independientemente de la cantidad de toxina utilizada en el análisis, el número de enlaces peptídicos que son los que absorben a 215 nm, siempre será mayor que la cantidad de grupos aromáticos (λ de máxima absorción es a 280 nm). Si la cantidad de toxina inicial fue pequeña, la intensidad de la señal a 280 nm pudo ser imperceptible para el aparato mientras que la señal a 215 nm no.

Sin embargo, dar una explicación en función solamente de la cantidad de soluto puede ser arriesgado, ya que también debe de considerarse el valor del coeficiente de absorción de los diferentes grupos ya que estos podrían compensar el resultado.

Lo anterior puede explicar porque en las cromatografías anteriores (DEAE-celulosa y Sephadex G-25), al buscar a la toxina liberada mediante espectrofotometría a 280 nm no fue posible detectarla.

En las cromatografías con CMC (Fig. 17, 18 y 19) al no detectarse un segundo pico al eluir con fuerza iónica, se asumió que no había toxina presente en esas fracciones y se desecharon. Por lo tanto, la pregunta que salta a la vista es ¿por qué se detecta la toxina en el primer pico?. 1) Para que la toxina se retenga en la columna debe presentar una carga positiva, lo cual depende del pH del medio. El buffer utilizado para equilibrar la columna tenía un pH = 9, valor muy cercano al punto isoeléctrico de la toxina. Pequeñas variaciones en éste pH debido a errores en la preparación podrían hacer que la toxina no se encuentre cargada y por lo tanto no se retenga en la columna. Para evitar éste tipo de errores sería ideal usar un buffer con un pH > 9.5, pero sería arriesgado pues un pH muy alcalino puede hidrolizar a la resina. 2) Los grupos de intercambio iónico en la resina se pudieron haber saturado, esto es poco probable ya que cuando la altura de la columna es calculada, se considera su longitud en función de la capacidad de la resina que se va a utilizar.

Para 6 horas de digestión, la toxina se purificó mediante una cromatografía de permeación en gel, cuyo principio de separación es la diferencia de peso de los componentes de la muestra (Fig. 16). Debido a que solo se observa un pico se puede pensar que los fragmentos generados en la digestión tenían un tamaño similar al de la toxina por lo que eluyeron juntos, o bien eran tan pequeños que era necesario lavar extensivamente la columna para recuperarlos.

Finalmente, será necesario mejorar la calidad de los cromatogramas del HPLC, pues los valores de absorbancia de los picos son muy pequeños y por lo tanto la incertidumbre en la medición es muy grande. Para ello primeramente se debería correr la cromatografía con una mayor cantidad de muestra para que la señal fuera más grande. También se podría disminuir la velocidad del flujo para hacer que el ancho a la base del pico (W_b) sea menor.

Con los cromatogramas obtenidos del HPLC se pudo detectar e identificar a la ChTx R19C; también se estimó la cantidad de toxina obtenida en cada digestión. Aunque no se puede hablar de una determinación analítica por las razones antes mencionadas, las cantidades de toxina estimadas nos muestran

como entre mayor es el tiempo de digestión menor es la cantidad de toxina que se recupera.

| <i>Tiempo de digestión (horas)</i> | <i>Cantidad de ChTx R19C recuperada (mg / l medio de cultivo)</i> |
|------------------------------------|---|
| 1.5 | 6.5 |
| 3.0 | 4.5 |
| 6.0 | 0.42 |

Finalmente, la única forma experimental que quedaría para evaluar si la ChTx R19C recombinante es activa, sería mediante el ensayo biológico en ovocitos de rana *Xenopus laevis* a los que previamente se les haya inyectado el RNA de algún canal de K⁺ que sea bloqueado por la ChTx.

7. CONCLUSIONES.

- Se establecieron las condiciones experimentales necesarias para obtener la toxina ChTx R19C en forma pura.
- La tripsina es una proteasa que puede sustituir en forma eficaz al Factor Xa, en la digestión de la proteína de fusión.
- El tiempo de digestión óptimo para liberar a la ChTx R19C corresponde a un valor por debajo de 1.5 horas.
- Es necesario establecer el tiempo óptimo de digestión para liberar la toxina y evitar pérdida por degradación de la toxina.
- El HPLC resultó ser el método más adecuado para detectar a la toxina una vez que ésta ha sido liberada de la proteína de fusión.
- Se debe mejorar la metodología analítica de purificación de la toxina, con la finalidad de optimizar el rendimiento final. Para lo cual se deben mejorar las condiciones de separación en el HPLC.

8. BIBLIOGRAFIA.

1. Miller C, Moczydłowski E, Latorre R, Phillips M. "Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} - activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle." *Nature*. (1985) 313:316-16.
2. Mackinnon R, Miller C. "Mechanism of Charybdotoxin block of the high-conductance, Ca^{2+} - activated K^+ channel." *J Gen Physiol* (1988) 13:335-49.
3. Gimenez-Gallegos G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. "Purification, sequence, and model structure of Charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channel." *Proc Natl Acad Sci* (1988) 85:3329-33.
4. Bontems F, Roumestand C, Boyot P, Gilquin B, Doljansky Y, Ménéz A, Toma F. "Three-dimensional structure of natural Charybdotoxin in aqueous solution by $^1\text{H-NMR}$." *Eur J Biochem* (1991) 196:19-28.
5. Miller C. "Competition for block of a Ca^{2+} - activated K^+ channel by Charybdotoxin and tetraethylammonium." *Biochemistry* (1989) 28:8087-92.
6. Anderson CS, Mackinnon R, Smith C, Miller C. "Charybdotoxin block of a single Ca^{2+} - activated K^+ channels. Effects of channel gating, voltage and ionic strength." *J Gen Physiol* (1988) 91:317-33.
7. Park SC, Hausdorff FS, Miller C. "Design, synthesis and functional expression of a gene for Charybdotoxin, a peptide blocker of K^+ - channels." *Proc Natl Acad Sci* (1991) 88:2046-50.

8. Stampe P, Kolamkova-Partensky L, Miller C. "Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of Charybdotoxin." *Biochemistry* (1994) 33:443-50.
9. Goldstein NS, Miller C. "A point mutation in *Shaker* K⁺ channel changes its Charybdotoxin binding site from low to high affinity." *Biophys J* (1992) 62:5-7
10. Stampe P, Kolamkova-Partensky L, Miller C. " Mapping hydrophobic residues of the interaction surface of Charybdotoxin." *Biophys J* (1992) 62:8-9.
11. Park SC, Miller C. "Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of Charybdotoxin." *Biochemistry* (1992) 31:7749-55.
12. Bontems F, Roumestand C, Gilquin B, Ménez A, Toma F. "Analysis of side-chain organization on a refined model of Charybdotoxin structural and functional implications." *Biochemistry* (1992) 31:7756-64.
13. Goldstein NS, Pheasant JD, Miller C. "The Charybdotoxin receptor of a *Shaker* K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition." *Neuron* (1994) 12: 1377-88.
14. Miller C. "Annus mirabilis of potassium channels." *Science* (1990) 252:1092-96.
15. Naranjo D and Miller C. "A strongly interacting pair of residues on a contact surface of Charybdotoxin and *Shaker* K⁺ channel." *Neuron* (1996) 16:123-30
16. Ackerman JM and Clapham ED. "Ionic channels. Basic science and clinical disease." *The New England Journal of Medicine* (1997) 336: 1575-86 (1997)

17. Garcia ML, Garcia-Calvo M, Knaus GH, Kaczorowski JG. "High conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels: pharmacology and molecular characterization." *The neurosciences* (1993) 5: 107-15.
18. Pfaffinger, P.J. and Shen, V.N. "Handbook of membrane channels. Molecular and cellular physiology". Ed. Academic Press. EUA. 1994. pp 5-16.
19. Chandy, K.G. and Gutman, G.A. "Handbook of receptors and channels". Ed. CRC Press. EUA. 1995. pp 23-42.
20. Brown MA. "Functional bases for interpreting amino acid sequences of voltage dependent K^+ channels." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (1993) 22: 173-98.
21. Studier FW, Rosenberg HA, Dunn JJ, Dubendorff WJ. "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Meth. Enzym.* (1990) 185: 61- 89.
22. Studier FW and Moffat AB. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J. Mol. Biol.* (1986) 189: 113-130.
23. Birge, E.A. "Bacterial and Bacteriophage Genetics". Ed. Springer-Verlag. EUA. 1988. pp 131-134.
24. Hanahan DJ. "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J.Mol. Biol.* (1983) 166: 557-80.
25. Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ, Graham MW. "Quantitative evaluation of *Escherichia*

coli strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." *Nucleic Acid Res.* (1989) 17: 3469-78.

26. Hanahan D, Jessee J, Bloom RF. "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." *Meth. Enzym.* (1991) 204: 63-113.

27. Grodeberg J. and Dunn JJ. "*Omp T* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification." *J. Bacteriol.* (1988) 170: 1245-53.

28. Watson, J.D. et al. "Recombinant DNA". Ed. Scientific American. EUA. 1992. pp 73-75.

29. www.promega.com/amplification/prodguide/070_02/promega.html

30. www.promega.com/amplification/prodguide/070_04/promega.html

31. www.promega.com/amplification/prodguide/070_10/promega.html

32. [ftp.promega.com/pub/vectors/pgemex1.txt](ftp://promega.com/pub/vectors/pgemex1.txt)

33. www.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html

34. Reisfeld RA. "Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels." *Science* (1962) 21: 281-83.

35. Garcia ML, Hanner M, Kaczorowski GJ. "Scorpion toxins: tools for studying K⁺ channels." *Toxicon* (1998) 36:1641-50.

36. Birnboim, C.H. "A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA". *Recombinant DNA Methodology*. Academic Press Inc. 1989. EUA. pp 175-187.
37. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction." *CSH Symp. Quant. Biol.* (1986) 51: 263-273.
38. Pääbo S, Russell G, Wilson CA. "Ancient DNA and the Polymerase Chain reaction." *J. Biol. Chem.* (1989) 264: 9709-12.
39. Drakopoulou E, Vizzavona J, Neyton J, Aniot V, Bouet F, Virelizier H, Menez A, Vita C. "Consequence of the removal of evolutionary conserved disulfide bridges on the structure and function of Charybdotoxin and evidence that particular cysteine spacings govern specific disulfide bond formation." *Biochemistry.* (1998) 37: 1292-1301.
40. Shimony E, Sun T, Kolmakova-Partensky L, Miller C. "Engineering a uniquely reactive thiol into a cysteine rich peptide." *Protein Engineering.* (1994) 7: 503-507.
41. pdtc.rockefeller.edu/PDTCmain/syn/psynfaq.html
42. Harris C. D. "Análisis Químico Cuantitativo" Ed. Iberoamericana. 1992. México. 3era. Edición. pp. 686-88.
43. García-Calvo M, Leonard JR, Novick J, Stevens PS, Schmalhofer W, Kaczorowsky JG, Gracia ML. "Purification, characterization and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centuroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* (1993) 268:18866-18874.

44. Munujos P, Knaus GH, Kaczorowsky JG, Gracia ML. "Cross-linking of Charybdotoxin to high conductance calcium-activated potassium channels: identification of the covalently modified toxin residues." *Bochemistry* (1995) 34:10771-10776.
45. Miller C. "The Charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides." *Neuron* (1995) 15:5-10.
46. www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?uid=431187&form=6&db=n&Dopt=g

9. APENDICES.

APENDICE 1. METODOLOGIAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.

A.1 GEL DE AGAROSA PARA DNA.

1. Se prepara la mezcla del gel de agarosa para DNA. Fundir dicha mezcla calentado durante 50 seg.
2. Enfriar a 50°C y adicionar la cantidad necesaria de bromuro de etidio. Mezclar y vaciar el gel en la caja. Dejar solidificar.
3. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo totalmente con Buffer TBE 1X.
4. Cargar las muestras de DNA en el gel. Las muestras de DNA previamente se han mezclado con el loading buffer DNA de modo que éste último quede con una concentración 1X.
5. Correr el gel a 70 mv.

B.1 METODO DE LISIS ALCALINA PARA PURIFICAR DNA.¹⁹

1. Inocular una colonia aislada de bacterias recientemente transformadas, en 4ml de medio LB con antibiótico cuya concentración final sea de 125 µg / ml. Incubar toda la noche a 37°C.
2. Centrifugar 3.5 ml del cultivo anterior a 2,500 rpm durante 3 min. El restante guardarlo agregándole 50 µl de glicerol estéril.
3. Resuspender el pellet en 100 µl de la Solución I. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 200 µl de Solución II recientemente preparada. Dejar 10 min en hielo.
5. Agregar 150 µl de la Solución III y dejar 10 min en hielo.
6. Centrifugar a 14,000 rpm a 4°C durante 10 min. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 1/10 del volumen de una solución:
Tris-HCl 1M pH = 8.0
8. Agregar 1 volumen de una solución de fenol-cloroformo 1:1.
9. Vortex durante 15 seg.
10. Centrifugar a 14,000 r.p.m. 4 °C durante 2 min. Recuperar la fase de acuosa (fase superior).
11. Repetir el paso 8.

12. Agregar 2 ½ volúmenes de EtOH 100% frío.
13. Dejar reposar durante 15 min a -80 °C (se puede dejar toda la noche).
14. Centrifugar a 14,000 rpm 4 °C durante 10 min. Decantar.
15. Lavar el precipitado con 500 µl de etanol al 80%. Centrifugar nuevamente a 14,000 rpm 4 °C durante 3 min.
16. Secar lo más posible.
17. Resuspender en 40 µl de H₂O o Buffer TE.

Nota: los pasos 3 y 4 se mezclan por inversión.

C.1 METODO PARA PURIFICAR DNA "MAXIPREP".

Con esta técnica se puede obtener más de 500 µg de plásmido en 100 ml de medio de cultivo cuando se trabaja con plásmidos con un alto número de copias o en 500 ml de medio de cultivo para plásmidos con un bajo número de copias.

Esta metodología corresponde a un kit vendido por "QUIAGEN".

1. Inocular una colonia aislada e incubar a 37°C durante todo el día en medio LB con ampicilina a una concentración final de 125 µg / ml.
2. Diluir el cultivo anterior en 500 ml de medio LB-ampicilina e incubar a 37°C durante toda la noche.
3. Centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 10 min.
4. Resuspender el pellet en 10 ml de Solución P1.
5. Adicionar 10 ml de solución P2. Mezclar e incubar 5 min a temperatura ambiente.
6. Disolver previamente el SDS en la solución amortiguadora P2 y calentar a baño María. Mezclar por inversión.
7. Agregar 10 ml de la solución P3 fría. Mezclar e incubar en hielo durante 20 min.
8. Centrifugar a 16,000 r.p.m. a 4°C durante 30 min. Recuperar el sobrenadante.
9. Centrifugar a 16,000 r.p.m. a 4°C durante 15 min. Recuperar el sobrenadante (este paso es opcional).
10. Equilibrar la columna QUIAGEN-tip 500 con 10 ml de la solución QBT.
11. Pasar el sobrenadante por la columna.
12. Lavar la columna dos veces con 30 ml de la solución QC
13. Eluir el DNA con 15 ml de la solución QF y recuperarlo en un tubo limpio.

14. Precipitar con 0.7 volúmenes de isopropanol. Centrifugar a 16,000 r.p.m. a 4°C durante 30 min.

15. Lavar con 15 ml de etanol al 70%. Secar por completo.

1. Resuspender en 500 µl de Buffer TE.

D.1 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES.

1. Inocular 5 ml de medio SOB (o bien, medio LB o medio Psi según el método) con una colonia bacteriana o con 10 µl del stock de glicerol. Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante.

2. Inocular con 20 ml de medio SOB con 200 µl del cultivo obtenido en el paso anterior.

3. Crecer las células hasta alcanzar una O.D₆₀₀ entre 0.3 – 0.5 (~2 – 3 h).

4. Centrifugar las células 5 min a 4,000 r.p.m. a 4°C en un tubo estéril.

5. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de la solución TB1 (o bien, solución A o solución tfb1 según el método), llevar las células a un volumen final de 10 ml.

6. Centrifugar igual que en el paso 4.

7. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 2 ml de la solución TB2 (o bien, solución B o solución tfb2 según el método).

8. Incubar en hielo por 30 min.

9. Hacer alicuotas de 200 µl en glicerol al 40% estéril, de modo que la concentración final quede al 12% de glicerol. Congelar en hielo seco y guardar a –70°C.

E.1 TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES.

1. Mezclar 200 µl de células competentes con 0.05 – 0.5 µg de ADN.

2. Incubar en hielo 30 min.

3. Incubar a 42°C por 1 ½ min.

4. Adicionar 1 ml de medio LB e Incubar a 32°C por 30 min.

5. Plaquear 200 µl de células en cajas con LB-Amp (0.125 mg / ml)

6. Incubar a 37°C por 12-14 h.

F.1 SECUENCIACION DE DNA.

▪ Elaboración del gel de acrilamida para secuenciar el DNA.

1. Lavar perfectamente bien los vidrios sobre los cuales se va a montar el gel de acrilamida. Para ello se debe seguir el siguiente esquema:

- lavar con etanol al 70%.
- lavar con SDS al 10%.
- lavar con etanol l 70%.
- lavar con cloroformo.

En cada caso hay que eliminar los residuos secando con papel estroza.

2. Preparar el gel de secuenciación, para ello se debe mezclar

- | | |
|---|-------------|
| - Stock de acrilamida – bisacrilamida (40%) | 70 ml |
| - Persulfato de amonio (10%) | 380 μ l |
| - TEMED | 20 μ l |

3. Montar el gel sobre los vidrios deslizando el vidrio pequeño sobre el grande, adicionando el gel de secuenciación con una jeringa de 50 ml. Es importante evitar la formación de burbujas.

4. Introducir el peine en el extremo superior del gel y sujetar los vidrios con pinzas.

5. Dejar polimerizar el gel por 24 h.

NOTA: el gel de secuenciación tiene una concentración final de 6%.

▪ Reacción de PCR para secuenciar.

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción:

- | | | |
|----------------------------------|----------------|------------|
| - Primer T3 | 1 μ M | 1 μ l |
| - DNA digerido con Sma I + Sca I | 50 ng/ μ l | 10 μ l |
| - Buffer de reacción | 10 X | 2 μ l |
| - Termostequecenasas | 4 U/ μ l | 1 μ l |
| - Agua | | 6 μ l |
- $V_i = 20 \mu$ l

2. Prepara la mezcla de terminación para cada uno de los nucleótidos:

- | | |
|--------------------------------|-------------|
| -Termination master mix (GATC) | 2 μ l |
| - Marcador ³³ P | 0.5 μ l |

3. Colocar 2.5 μ l de la mezcla de terminación a cada tubo previamente etiquetado (GATC).

4. Agregar 4.5 μ l de la mezcla de reacción en cada tubo.

5. Mezclar y cubrir con 10 μ l de aceite mineral

6. Colocar en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

| | | |
|------|-----------|-------------|
| 95°C | 50 seg | } 30 ciclos |
| 55°C | 50 seg | |
| 72°C | 1.50 min. | |

7. Agregar 4 μl de la solución de paro para finalizar la reacción.
8. Eliminar el aceite cuidadosamente.
9. Calentar las muestras a 72 °C durante 2 min y después se ponerlas en hielo. Cargar 3.5 μl de las muestras en el gel de secuenciación.
10. Correr el gel durante 3 h a 40 watts.
11. Desmontar el gel de secuenciación de los vidrios adhiriéndolo a un papel filtro grueso. Colocar el papel filtro en el secador de geles y secarlo durante 1 h a 80°C al vacío
12. Exponerlo a una película de Rayos X adicionándole talco para evitar que el gel se adhiera a la película.

G.1 PURIFICACION DE DNA MEDIANTE UNA EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO.

1. Llevar a un volumen final de 100 μl con agua DEPC (20 μl de la digestión+80 μl de agua DEPC).
2. Agregar 50 μl de fenol y 50 μl de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1). Agitar.
3. Centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 4 min a 4°C y recuperar la fase acuosa (fase superior)
4. Agregar 45 μl de acetato de amonio 7.5M y 450 μl de etanol frío 100%.
5. Agitar y dejar reposar a -20°C durante 15 min o toda la noche.
6. Centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 30 min.
7. Desechar el sobrenadante. Lavar el precipitado con EtOH al 70% y centrifugar durante 10 min a 12,000 r.p.m. a una temperatura de 4°C.
8. Eliminar el EtOH y secar el precipitado.
9. Resuspender en 13 μl de buffer TE.

APENDICE 2. METODOLOGIAS DE QUIMICA DE PROTEINAS.

A.2 GEL DE PROTEINAS SDS-PAGE.

- **Gel de acrilamida.**

1. Preparar 6 ml del gel de resolución al 12.5%.

| | |
|--------------------------------------|--------|
| H ₂ O | 2.0 ml |
| Mezcla de acrilamida / bisacrilamida | 2.5 ml |
| Tris-HCl 1.5 M pH=8.8 | 1.5 ml |
| Persulfato de amonio 10% | 20 µl |
| TEMED | 5 µl |

Agitar, una vez adicionado el TEMED la polimerización de la acrilamida / bisacrilamida comienza.

2. Vaciar el gel de resolución en las placas de vidrio, antes se debe haber corroborado que no existen fugas.

3. Colocar sobre el gel de resolución una capa de agua para que el gel de resolución tenga una superficie uniforme.

4. Una vez completada la polimerización ≈ 30 min se debe eliminar el agua. Secar el agua sobrante con papel absorbente.

5. Preparar 3 ml del gel de apilamiento al 4%.

| | |
|--------------------------------------|---------|
| H ₂ O | 1.54 ml |
| Mezcla de acrilamida / bisacrilamida | 330µl |
| Tris-HCl 0.5 M pH=6.8 | 630µl |
| Persulfato de amonio 10% | 12.5 µl |
| TEMED | 2.5 µl |

Agitar, una vez adicionado el TEMED la polimerización de la acrilamida / bisacrilamida comienza.

6. Vaciar el gel de apilamiento en las placas de vidrio sobre las cuales previamente ya se ha polimerizado el gel de resolución.

7. Insertar el peine de teflón sobre el gel de apilamiento evitando la formación de burbujas de aire.

8. Dejar polimerizando el gel a temperatura ambiente en forma vertical.

- **Tratamiento de las muestras.**

1. Mientras el gel de apilamiento polimeriza se preparan las muestras que se van a correr en el gel:

► Células pre- y postinducidas.

- centrifugar 1.5 ml del medio de cultivo a 5,00 r.p.m. durante 2 min.
- decantar el sobrenadante y desecharlo.
- disolver el pellet en 160 µl de Buffer SDS 2X. Adicionar 10 µl de β-mercaptoetanol 4.3M.
- calentar a 95°C durante 5 min.
- enfriar en hielo.
- centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 10 min.
- tomar de la superficie 20 µl de la muestra y correrla en el gel. El resto guardarlo a -20°C.

► Fracciones eluidas.

- mezclar 7.5 µl de cada alicuota con 25 µl del Buffer SDS 1X y 1.5 µl de β-mercaptoetanol 4.3 M.
- calentar a 95°C durante 5 min.
- cargar 30 µl de cada una de las muestras en el gel.

NOTA: el peso de la proteína de fusión es de aproximadamente 45 KDa.

2. Una vez completada la polimerización hay que remover el peine de teflón y lavar con agua para remover lo que no haya polimerizado.

3. Montar las placas de vidrio con el gel en el aparato de electroforesis. Adicionar el Buffer Tris-glicina en los reservorios superior e inferior del aparato (evitar la formación de burbujas de aire).

4. Cargar las muestras y correrlas en el gel a 50 v durante 1 hasta que las muestras penetren en el gel, después incrementar a 100 v y correr por 2 h más o hasta que el colorante alcance el fondo del gel.

5. Sacar las placas de vidrio del aparato de electroforesis y secarlas. Separar las placas con una espátula, marcando la orientación del gel cortando una esquina del gel.

• **Tinción del gel.**

1. Sumergir el gel en la solución teñidora durante 4 h a temperatura ambiente con agitación constante.

2. Desteñir el gel sumergiéndolo en una disolución de Metanol/Agua 1:1 en agitación durante 4-8 h. Cambiar la solución desteñidora cada 2 h.

NOTA: desteñir por 24 h permite detectar hasta 0.1 µg de proteína.

B.2 GEL DE PROTEINAS ACETATO-UREA.

• **Gel de acetato-urea.**

1. Preparar 16 ml del gel de resolución al 7.5%.

| | |
|-------------|--------|
| Solución A | 4.0 ml |
| Solución BA | 8.0 ml |
| Solución C | 4.0 ml |
| Agitar. | |

2. Hacer alicuotas y vaciar el gel de resolución en tubos de vidrio (9x0.7 cm) sellados con parafilm en un extremo.

3. Colocar sobre el gel de resolución una capa de agua para que el gel de resolución tenga una superficie uniforme.

4. Una vez completada la polimerización ≈ 10 min se debe eliminar el agua. Secar el agua sobrante con papel filtro.

5. Preparar 8 ml del gel de apilamiento.

| | |
|-------------|--------|
| Solución D | 4.0 ml |
| Solución EA | 2.0 ml |
| Solución F | 2.0 ml |
| Agitar. | |

6. Vaciar el gel de apilamiento en los tubos de vidrio sobre las cuales previamente se ha polimerizado el gel de resolución.

7. Colocar nuevamente una capa de agua sobre el gel.

8. Dejar polimerizando el gel a temperatura ambiente en forma vertical durante 20 min.

9. Preparar el Buffer de corrida que va en el reservorio inferior para lo cual se debe mezclar:

| | |
|-------------------|--------|
| -alanina | 15.6 g |
| AcOH glacial | 8.0 ml |
| Agua cbp | 1L |
| pH = 4.4 con AcOH | |

10. Para el reservorio superior se utiliza el mismo buffer que para el reservorio inferior adicionándole 0.8 ml de una disolución de pironina al 0.02%.

• **Tratamiento de las muestras.**

1. Preparar el buffer en el cual se va a diluir la muestra antes de cargar en el gel, para ello hay que mezclar:

| | |
|------------------------|---------------------|
| 2 ml de la solución EA | } Buffer de muestra |
| 6 ml de urea 8M | |

2. Mezclar una alicuota de la muestra que contenga entre 50-200 μg de proteína con 0.15 ml del Buffer de muestra.

3. Montar los tubos de vidrio con el gel en el aparato de electroforesis. Adicionar el Buffer de corrida en los reservorios superior e inferior del aparato.

4. Cargar un máximo de 200 μl de la muestra y correrla a 4 mA / gel y correr por 2 h más o hasta que el colorante alcance el fondo del gel.

5. Desmontar los tubos de vidrio del aparato de electroforesis y secarlos. Sacar los geles de los tubos inyectando agua en su interior con una jeringa.

▪ **Tinción del gel.**

1. Sumergir el gel en la solución teñidora durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante.

2. Desteñir el gel sumergiéndolo en una disolución de AcOH 10% en agitación durante 4 h. Cambiar la solución desteñidora cada 2 h.

C.3 OBTENCION Y PURIFICACION DE LA TOXINA.

▪ **Inducción de la proteína de fusión.**

1. Inocular una colonia aislada en 50 ml de medio LB con ampicilina a una concentración de 200 µg/ml.

100µl de una solución stock de ampicilina 100 mg/ml

Incubar a 37°C por 5-6 h, de modo que la absorbancia a 650 nm no sobrepase un valor de 0.8 (óptimo entre 0.2 - 0.6).

2. Vacíe los 50 ml del cultivo anterior en un matraz con 750 ml de medio de cultivo LB precalentado y con una concentración de ampicilina de 100 µg/ml.

800 µl de una solución stock de ampicilina 100 mg/ml

3. Incubar a 37°C hasta que la absorbancia alcance un valor a 650 nm de 0.8 (3 1/2 h, se debe medir la absorbancia cada 25 min).

4. Cuando la absorbancia alcance un valor de 0.8, retire 1.5 ml de medio de cultivo y guárdese en hielo. Esta alícuota se correrá en un gel de proteína correspondiente a las células preinducidas.

5. Inducir las células adicionando IPTG con una concentración final de 0.5 mM.

800 µl de una solución stock 0.5 M de IPTG

Además hay que adicionar nueva ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml.

400 µl de una solución stock de ampicilina 100 mg/ml

6. Incubar por 2 h a 37°C.

7. Cuando la absorbancia alcance un valor de 0.8 retire 1.5 ml de medio de cultivo y guárdese en hielo. Esta alícuota se correrá en un gel de proteína correspondiente a las células postinducidas.

▪ **Purificación de la proteína de fusión.**

1. Centrifugar los 800 ml de medio a 6,000 r.p.m. por 10 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante.

2. Resuspender el pellet en 50 ml de Buffer-lisozima frío.

Centrifugar nuevamente a 6,000 r.p.m. por 10 min y eliminar el sobrenadante.

Hasta este punto las células se pueden congelar y guardar a -80°C.

3. Resuspender las células en 25 ml de Buffer-lisozima y transferirlos a un tubo de acero adecuado para sonicar.
4. Adicionar 2.5 ml de lisozima de una solución cuya concentración sea 2 mg/ml en el Buffer-lisozima e incubar en hielo por 20 min.
5. Adicionar:
 - 10 μ l de 2-mercaptoetanol 4.3M.
 - 10 μ l de leupeptina y pepstatina 0.5 mg/ml de c/u en MeOH, prepararlas momentos antes de la sonicación.
 - 200 μ l de PMSF 0.009 g en 500 ml de MeOH.
6. Sonicar 4 veces por 30 seg. a baja temperatura a la máxima potencia.
7. Tomar una alícuota de 50 μ l que se correrá posteriormente en un gel.
8. Centrifugar a 15,000 r.p.m. por 30 min tomar una alícuota de 50 μ l. Si la sonicación fue exitosa la proteína de fusión se encuentra en el sobrenadante.
9. Transferir el sobrenadante a un vaso frío y adicionarle 0.03 volúmenes de una solución de sulfato de estreptomycin que contenga 0.9 g en 3 ml del Buffer-lisozima (precipitación del DNA).
10. Agitar por 30 min a baja temperatura.
11. Centrifugar la solución a 15,000 r.p.m. por 20 min.
12. Adicionar sulfato de amonio sólido hasta alcanzar un 50% de saturación (31 g/ 100 ml).
13. Agitar toda la noche a baja temperatura. La solución debe verse turbia debido a la precipitación de las proteínas.
14. Centrifugar la solución a 15,000 r.p.m. por 30 min.
15. Eliminar el sobrenadante y lavar las paredes del tubo que contiene el pellet con agua usando una pipeta pastuer para eliminar los restos de sulfato de amonio.
16. Resuspender el pellet en 30 ml de Buffer A DEAE.
17. Equilibrar la columna DE-52 (resina de intercambio iónico).
 - resuspender la resina DE-52 en 40 ml de Buffer A DEAE.
 - llenar la columna con Buffer A DEAE y vaciar la resina. La resina debe alcanzar una altura de 1 cm abajo de la parte superior de la columna.
 - para equilibrarla se deben de correr 100 ml del Buffer A con una velocidad de 1 ml/min.
 - una vez que el nivel del Buffer A DEAE llegue a la parte superior de la columna se comienza a cargar la muestra a una velocidad de 1 ml/min.
 - cuando el nivel de la muestra se encuentre por debajo de la parte superior de la columna lave las paredes 2 o 3 veces con Buffer A DEAE.
 - dejar correr la muestra con Buffer A con una velocidad de 1 ml/min.

- recolectar fracciones de la muestra cada 4 in hasta que la A_{280} sea 0.05
- eluir con un gradiente escalonado de 200 ml del Buffer B DEAE.
- recolectar fracciones cada minuto midiendo la absorbancia a 280 nm.
- guardar las fracciones en refrigeración.

NOTA: - evitar que la columna se seque
 - preparar las soluciones el día anterior y guardarlas en refrigeración.

18. Tomar una alícuota de 7.5 μ l cada 4 o 5 fracciones, de acuerdo con los picos observados a 280 nm para después correrlos en un gel. La proteína de fusión tiene un peso aproximado de 57 KDa

19. Juntar las fracciones en las cuales eluyó la proteína de fusión según lo observado en el gel y colocarlas en una bolsa para diálisis.

20. Dializar 2 veces contra 4 L de Buffer de diálisis toda la noche.

Características de la resina DEAE-celulosa (SIGMA):

Forma fibrosa.

Capacidad: ~ 1.0 meq / g

• **Liberación de la toxina.**

1. Medir con exactitud el volumen de dializado

2. Adicionar CaCl_2 a una concentración final de 5 mM.

3. Estimar la cantidad de proteína de fusión presente para ello hay que considerar que $\epsilon_{280} = 1 \text{ mg/ml}$ de proteína de fusión.

4. Digerir con tripsina con una concentración de 5 $\mu\text{g/mg}$ de proteína de fusión a temperatura ambiente durante 30 min sin agitación.

▪ **Purificación de la toxina.**

1. Equilibrar la columna de Sephadex:

- usar Buffer A y Buffer B Sephadex recién preparados
- llenar la columna con Buffer A Sephadex hasta que el nivel quede 1 cm debajo de la parte superior de la columna.
- vacíe la resina con azida al 0.1% en la columna.
- equilibrar con 100 ml de Buffer A Sephadex.
- correr 100 ml e una solución de NaCl 150 mM + NaOH 10mM.
- reequilibrar la columna con Buffer A Sephadex hasta un pH de 9.0.
- cargar la muestra (previamente diluida en Buffer A Sephadex) a una velocidad de 1 ml/in, lavar las paredes con el mismo buffer una vez que la muestra se ha cargado.
- correr la columna con Buffer A Sephadex hasta que se alcance un valor de absorbancia de 0.09.
- recolectar fracciones cada minuto.
- una vez alcanzado dicho valor correr la columna con Buffer B Sephadex e inmediatamente recolectar fracciones cada minuto.
- medir la absorbancia de cada fracción a 280 nm para identificar en cual eluyó la toxina.
- en las fracciones en donde eluyó la toxina ajustarles el pH a 7.0 con AcOH, ya que eluyen con un pH~12.

NOTA: durante el desarrollo experimental se probó también la purificación con una cromatografía de intercambio iónico en CMC. El procedimiento es el mismo solo que usando los buffer correspondientes.

2. Adicionar AcOH a una concentración final de 5% v/v, para ciclizar el grupo amino terminal.

3. Incubar a 65°C durante 2 h.

4. Dializar contra 2L de buffer de fosfatos

5. Correr la fracción que contiene a la toxina en un HPLC con una columna C-18 de fase reversa.

- mezclar la muestra con 0.5 ml del Buffer HPLC A e inyectarla en el cromatógrafo.
- permitir que se equilibre la columna haciendo pasar la solución de Buffer HPLC A.
- correr la muestra por 30 min con el Buffer HPLC B usando un gradiente 10% -40%.
- una vez terminado el gradiente lavar la columna con Buffer HPLC B al 80%.
- volver a equilibrar con Buffer HPLC A.
- guardar las fracciones que contiene a la toxina.
-

6. Secar la muestra al vacío con una Speedvac durante 45 min - 1h, es importante no utilizar calor.

7. Guardar la toxina purificada a -70°C mientras no se use.

Características de la resina de CMC (SIGMA):

Forma microgranular.

Capacidad: 1.0 meq / g.

Tamaño de la partícula: 25 - 60 μ .

Características de la resina de Sephadex G-25 (SIGMA):

Forma gruesa.

Separación de proteínas globulares: 1000 – 5000 Da.

APENDICE 3. SOLUCIONES DE BIOLOGIA MOLECULAR.

A.3 GEL DE AGAROSA PARA DNA.

✓ Gel Agarosa al 1%

Para preparar 30 ml:

| | |
|---------------------|-------------|
| - Agarosa | 0.3 g |
| - TBE (1X) | 30 ml |
| - Bromuro de etidio | 1.4 μ l |

✓ Gel Agarosa al 1.6%

Para preparar 30 ml:

| | |
|---------------------|-------------|
| - Agarosa | 0.48 g |
| - TBE (1X) | 30 ml |
| - Bromuro de etidio | 1.4 μ l |

✓ Solución stock del Buffer TBE

Para preparar 1 L:

| Stock | 10X | 5X |
|---------------------|---------|---|
| - Trizma base | 108 g | 54 g |
| - Acido bórico | 55 g | 27.5 g |
| - EDTA 0.5 M pH 8.0 | 40 ml | 20 ml de una solución stock 0.5 M pH = 8.0 |
| - Agua cbp | 1000 ml | 1000 ml |

✓ Loading Buffer DNA.

Para preparar 10 ml:

| | | |
|--------------------|-------|---------|
| Azul de bromofenol | 0.25% | 0.025 g |
| Xileno cianol FF | 0.25% | 0.025 g |
| Glicerol | 30% | 3 ml |
| -Agua cbp | | 10 ml |

Hacer alícuotas de 1 ml cada una y guardar a 4°C.

✓ Agua DEPC 0.1%

1. Agregar 1 ml de DEPC (dietilpirocarbonato) a 1 litro de agua desionizada.
2. Agitar toda la noche a 37°C.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 min.
4. Hacer alícuotas y guardar a 4°C.

B. 3 METODO DE LISIS ALCALINA PARA PURIFICAR DNA.

✓ Solución I

Para preparar 100 ml:

| | | |
|--|-------|--------|
| - Glucosa | 50 mM | 0.9 g |
| - Trizma base | 25 mM | 0.3 g |
| - EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O | 10 mM | 0.37 g |
| - Agua cbp | | 100 ml |

pH = 8.0 ajustar con HCl. Esterilizar filtrando a través de membrana con un tamaño de poro de 0.45 µm. Guardar a 4 °C.

✓ Solución II

Para preparar 2 ml:

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| - NaOH 0.2 M | 40 µl de la solución stock NaOH 10 M |
| - SDS 1% | 200 µl de la solución stock SDS 10% |
| - Agua cbp | 2 ml |

Debe prepararse fresca antes de usarla.

✓ Solución III

Para preparar 100 ml:

| | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| - Acetato de potasio 3 M | 60 ml de una solución stock AcOK 5M |
| - Acido acético glacial 2M | 11.5 ml |
| - Agua cbp | 100 ml |

Guardar a 4°C.

✓ Solución stock de NaOH 10 M

Para preparar 50 ml:

| | |
|-----------------|-------|
| - NaOH lentejas | 20 g |
| - Agua cbp | 50 ml |

✓ Solución stock de acetato de potasio 10%

Para preparar 50 ml:

| | |
|----------------------|--------|
| - Acetato de potasio | 24.5 g |
| - Agua cbp | 50 ml |

C.3 METDODO PARA PURIFICAR DNA "MAXIPREP".

✓ Solución P1 (Buffer de resuspensión)

| | | |
|------------|------------|----------|
| - Tris-HCl | 50 mM | pH = 8.0 |
| - EDTA | 10 mM | |
| - RNAsa | 100 g / ml | |

Una vez adicionada la RNAsa la solución debe guardarse a 4°C.

✓ Solución P2 (Buffer de lisis)

| | |
|--------|--------|
| - NaOH | 200 mM |
| - SDS | 1% |

✓ **Solución P3 (Buffer de neutralización)**

- Acetato de potasio 3 M pH = 5.5

✓ **Solución QC (Buffer de lavado)**

- NaCl 1 M
- MOPS 50 mM pH = 7.0

✓ **Solución QBT (Buffer de equilibración)**

- NaCl 0.75 M
- MOPS 50 mM pH = 7.0
- Isopropanol 15%
- Tritón X-100 0.15%

✓ **Solución QF (Buffer de elución)**

- NaCl 1.25 M
- Tris-HCl 50 mM pH = 8.5
- Isopropanol 15%

✓ **Buffer TE**

- Tris-HCl 10 mM pH = 8.0
- EDTA 1 mM

D.3 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES.

✓ **Medio SOB**

Preparar 100 ml:

- Triptona 2 g
- Extracto de levadura 0.625 g
- NaCl 0.075 g
- KCl 0.0625 g
- MgCl₂ 0.12 g
- MgSO₄ 0.15 g
- Agua cbp 100 ml

pH=7.0 ajustar con HCl. Este medio de cultivo debe de esterilizarse a 121°C durante 15 min.

✓ **TB 1**

Para preparar 100 ml:

- CH₃COOK 0.03 M 0.294 g
- RbCl 0.1 M 1.209 g
- CaCl₂ · 2H₂O 0.01 M 0.1468 g
- MnCl₂ · 4H₂O 0.05 M 0.998 g
- Glicerol 12% v/v 12 ml de la solución comercial
- Agua cbp 100 ml

pH = 5.8 ajustar con ácido acético diluido.

✓ TB 2

Para preparar 100 ml:

| | | |
|---|---------|--------------------------------|
| - MOPS | 0.01 M | 0.209 g |
| - RbCl | 0.01 M | 0.1209 g |
| - CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.075 M | 1.101 g |
| - Glicerol | 12% v/v | 12 ml de la solución comercial |
| - Agua cbp | | 100 ml |

pH= 6.8 ajustar con NaOH diluida.

Ambas soluciones se deben esterilizar filtrándolas en una membrana de 0.22 m.

E.3 SECUENCIACION DE DNA.

✓ Mezcla de acrilamida – bisacrilamida

Para preparar 300 ml:

| | |
|-----------------|--------|
| - Acrilamida | 114 g |
| - Bisacrilamida | 6 g |
| - Agua cbp | 300 ml |

Agitar hasta disolver la acrilamida y la bisacrilamida.

✓ Solución stock de acrilamida – bisacrilamida

Para preparar 70 ml:

| | |
|--|---------|
| - Urea | 33.5 g |
| - Mezcla de acrilamida - bisacrilamida | 10.5 ml |
| - Buffer TBE (10X) | 7 ml |
| - Agua cbp | 70 ml |

APENDICE 4. SOLUCIONES QUIMICA DE PROTEINAS.

A.4 GEL SDS PARA PROTEINAS

✓ Buffer SDS 2X

Para preparar 10 ml:

| | | |
|----------------------|----------|-----------------------------|
| - Tris base | 100 mM | 0.12 g |
| - DTT | 200 mM | 0.3 g |
| - SDS | 4% p/v | 4 ml de la solución stock |
| - Azul de bromofenol | 0.2% p/v | 20 mg |
| - Glicerol | 20% v/v | 2 ml del glicerol comercial |
| - Agua cbp | | 10 ml |

pH= 6.8 ajustar con HCl. La solución se guarda a temperatura ambiente. El DTT debe ser añadido justo antes de utilizar la solución.

✓ Buffer SDS 1X

Para preparar 10 ml:

| | | |
|----------------------|----------|-----------------------------|
| - Tris base | 50 mM | 60 mg |
| - DTT | 100 mM | 0.15 g |
| - SDS | 2% p/v | 2 ml de la solución stock |
| - Azul de bromofenol | 0.1% p/v | 10 mg |
| - Glicerol | 10% v/v | 1 ml del glicerol comercial |
| - Agua cbp | | 10 ml |

pH= 6.8 ajustar con HCl. La solución se guarda a temperatura ambiente. El DTT debe ser añadido justo antes de utilizar la solución.

✓ Mezcla de acrilamida / bisacrilamida

Se prepara una solución stock cuyas proporciones de acrilamida / bisacrilamida son 29% y 1% respectivamente.

Para preparar 100ml:

| | |
|-----------------|--------|
| - Acrilamida | 29 g |
| - Bisacrilamida | 1 g |
| - Agua cbp | 100 ml |

pH = 7.0. ajustar con HCl o NaOH según sea el caso. Esta solución se debe guardar en frascos color ámbar a temperatura ambiente y verificar periódicamente que el pH sea menor o igual a 7.0.

✓ SDS al 10% p/v

Para preparar 10 ml:

| | |
|------------|-------|
| - SDS | 1 g |
| - Agua cbp | 10 ml |

✓ Persulfato de amonio al 10% p/v

Para preparar 1 ml:

| | |
|------------------------|-------|
| - Persulfato de amonio | 0.1 g |
| - Agua cbp | 1 ml |

Esta solución se debe guardar a 4°C y prepararla fresca cada semana.

✓ Buffer Tris-glicina para los reservorios superior e inferior

Para preparar 500 ml:

| | | |
|-------------|----------|---------------------------|
| - Tris base | 25 mM | 1.5 g |
| - Glicina | 190 mM | 7.21 g |
| - SDS | 0.1% p/v | 5 ml de la solución stock |
| - Agua cbp | | 500 ml |

pH = 8.3 ajustar con HCl

✓ Buffer Tris-HCl para el gel de resolución

Para preparar 10 ml:

| | | |
|-------------|------|-----------------------------|
| - Tris base | 1.5M | 1.82 g |
| - SDS | 0.4% | 0.4 ml de la solución stock |
| - Agua cbp | | 10 ml |

pH = 8.8 ajustar con HCl

NOTA: el SDS se debe de adicionar justo antes de usarse.

✓ Buffer Tris-HCl para el gel de apilamiento

Para preparar 10 ml:

| | | |
|-------------|------|-----------------------------|
| - Tris base | 0.5M | 0.606 g |
| - SDS | 0.4% | 0.4 ml de la solución stock |
| - Agua cbp | | 10 ml |

pH = 6.8 ajustar con HCl

NOTA: el SDS se debe de adicionar justo antes de usarse.

✓ Solución desteñidora

Para preparar 1L

| | | |
|-----------------|-----|---------|
| - Metanol | 40% | 400 ml |
| - Acido acético | 7% | 70 ml |
| - Agua cbp | | 1000 ml |

✓ Solución teñidora

Para preparar 100ml:

| | | |
|-------------------------|--------|--------|
| - Azul de Coomassie | 0.025% | 0.25 g |
| - Metanol | 40% | 40 ml |
| - Acido acético glacial | 7% | 7 ml |
| - Agua cbp | | 100 ml |

Esta solución debe ser filtrada a través de papel filtro Whatman no.1.

B.4 Gel de acetato-urea para proteínas.

✓ Urea 8M

Para preparar 500 ml:

| | |
|----------|--------|
| Urea | 240 g |
| Agua cbp | 500 ml |

✓ Solución A

Para preparar 100 ml:

| | |
|------------------------|--------|
| Acrilamida | 21.2 g |
| Metilen bis-acrilamida | 0.56 g |
| Urea 8M cbp | 100 ml |

✓ **Solución BA**

Para preparar 100 ml:

| | |
|--------------|--------|
| KOH | 0.67 g |
| AcOH glacial | 8.6 ml |
| TEMED | 2.0 ml |
| Urea 8M cbp | 100 ml |

pH = 4.8 ajustar con AcOH

✓ **Solución C**

Para preparar 100 ml:

| | |
|----------------------|--------|
| Persulfato de amonio | 0.28 g |
| Urea 8M cbp | 100 ml |

✓ **Solución D**

Para preparar 100 ml:

| | |
|------------------------|--------|
| Acrilamida | 5.0 g |
| Metilen bis-acrilamida | 1.25 g |
| Urea 8M cbp | 100 ml |

✓ **Solución EA**

Para preparar 100 ml:

| | |
|--------------|--------|
| KOH | 0.67 g |
| AcOH glacial | 1.4 ml |
| TEMED | 0.5 ml |
| Urea 8M cbp | 100 ml |

pH = 5.5 ajustar con AcOH

✓ **Solución F**

Para preparar 100 ml:

| | |
|-------------|--------|
| Riboflavina | 2 mg |
| Urea 8M cbp | 100 ml |

✓ **Buffer de corrida**

Para preparar 1L:

| | |
|--------------|--------|
| -alanina | 15.6 g |
| AcOH glacial | 8.0 ml |
| Agua cbp | 1L |

pH = 4.4 ajustar con AcOH

✓ **Solución de pironina al 0.02%**

Para preparar 10 ml:

| | |
|----------|-------|
| Pironina | 2 mg |
| Agua cbp | 10 ml |

C.4 INDUCCION DE LA PROTEINA DE FUSION.

✓ Ampicilina solución stock 100 mg/ml

Para prepara 10 ml:

- Ampicilina 1 g
- Agua 10 ml

Preparar alicuotas y guardar a -20°C .

✓ Medio LB con ampicilina

Para preparar 1L:

- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Ampicilina 125 g/ml 12.5 ml de la solución stock
- Agua cbp 1 L

pH = 7.0 ajustar con NaOH. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

NOTA: la ampicilina se adiciona después de esterilizar el medio de cultivo y una vez que la temperatura de éste ha alcanzado unos 50°C .

✓ IPTG stock 0.5M

Para preparar 1 ml:

- IPTG 0.12 g
- Agua cbp 1 ml

✓ Buffer lisozima

Para prepara 300 ml:

- Tris-HCl 10 mM pH=8.0 3 ml de la solución stock
- NaCl 50 mM 0.87 g
- $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1 mM pH=8.0 0.6 ml de la solución stock
- DTT 1 mM 3 ml de la solución stock
- PMSF 100 M 300 l de la solución stock
- Agua cbp 300 ml

Las soluciones stock requeridas a su vez para preparar este buffer son

10 ml del stock Tris-HCl 1M pH= 8.0

- Tris base 1.2 g
 - Agua cbp 10 ml
- pH=8.0 ajustar con HCl

10 ml del stock de Na_2EDTA 0.5M pH=8.0

- Na_2EDTA $2\text{H}_2\text{O}$ 1.9 g
- Agua cbp 10 ml

Estas soluciones stock deben de filtrarse para esterilizarlas.

✓ β -mercaptoetanol 4.3M

Para preparar 10 ml:

- β -mercaptoetanol 3 ml
- Agua cbp 10 ml

ESTA TEXA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

✓ **PMSF 18 µg/µl**

Para preparar 500 µl:

- PMSF 9 mg
- Metanol 500µl

Esta solución se prepara con metanol para evitar la hidrólisis del PMSF.

✓ **Leupeptina 0.5 mg/ml**

Para preparar 500 µl:

- Leupeptina 0.25 mg
- Agua cbp 500 µl

Es importante que esta solución haya sido preparada reciente antes de usar.

✓ **Pepstatina 0.5 mg/ml**

Para preparar 500 µl:

- Pepstatina 0.25 mg
- Agua cbp 500 µl

Es importante que esta solución haya sido preparada reciente antes de usar.

✓ **Buffer A DEAE**

Para prepara 2L:

- NaCl 50 mM 5.8 g
- Tris base 10 mM 2.4 g
- Na₂-EDTA 1 mM pH=8.0 4 ml de la solución stock
- DTT 1 mM 20 ml de la solución stock
- PMSF 100 µM 2 ml de la solución stock
- Agua cbp 2 L

pH = 8.0 ajustar con HCl

✓ **Buffer B DEAE**

Para preparar 500 ml:

- NaCl 350 mM 10.1 g
- Tris base 10 mM 0.61 g
- Na₂-EDTA 1 mM pH=8.0 1 ml de la solución stock
- DTT 1 mM 5 ml de la solución stock
- PMSF 100 µM 500µl de la solución stock
- Agua cbp 500 ml

pH = 8.0 ajustar con HCl

✓ **Buffer A CMC**

Para preparar 1L:

- H₃BO₃ 20 mM 1.2 g
- Agua cbp 1L

pH = 9.0 ajustar con NaOH

✓ **Buffer B CMC**

Para preparar 1L:

- H₃BO₃ 20 mM 1.2 g
- NaCl 1 M 58 g
- agua cbp 1 L

pH = 9.0 ajustar con NaOH

✓ Buffer de diálisis

Para preparar 2L:

| | | |
|---------------------------|--------|--|
| - Tris base | 20 mM | 4.8 g |
| - β -mercaptoetanol | 0.5 mM | 232.5 μ l de la solución comercial |
| - Agua cbp | | 2 L |

pH = 8.0 ajustar con HCl. El β -mercaptoetanol debe de adicionarse justo antes de usarse la solución y mantenerse en refrigeración. Además es necesario preparar aproximadamente 8 L de disolución.

✓ Buffer A Sephadex

Para preparar 1L:

| | | |
|----------------------------|-------|-------|
| - Na_2CO_3 | 10 mM | 1.1 g |
| - NaCl | 20 mM | 1.2 g |
| - Agua cbp | | 1 L |

pH = 8.5 ajustar con NaOH

✓ Buffer B Sephadex

Para preparar 1L:

| | | |
|--|-------|-------|
| - Na_2CO_3 | 10 mM | 1.1 g |
| - NaCl | 20 mM | 1.2 g |
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 30 mM | 8.1 g |
| - Agua cbp | | 1 L |

pH = 12.0 ajustar con NaOH

✓ Buffer A HPLC

Para preparar 1L:

| | | |
|------------------------|----------|------|
| - TFA | 0.1% v/v | 1 ml |
| - Agua bidestilada cbp | | 1 L |

Esta solución se debe esterilizar filtrándola a través de una membrana Millipore 0.22 μ m.

✓ Buffer B HPLC

- Acetonitrilo grado HPLC

Esta solución se debe esterilizar filtrándola a través de una membrana Millipore 0.40 μ m.

✓ Solución de azida

Para preparar 500 ml:

| | | |
|------------------|-----------|--------|
| - Azida de sodio | 0.2 % p/v | 1 g |
| - Agua cbp | | 500 ml |

Esta solución es utilizada para guardar la resina de Sephadex y evitar su contaminación con μ oo.

✓ Solución stock de PMSF 1 mM

Para preparar 10ml:

| | | |
|-----------|--|--------|
| - PMSF | | 1.7 mg |
| - Metanol | | |

✓ Buffer de fosfatos 50 mM

Para prepara 50 ml:

| | | |
|---|--|--------|
| - Na_2HPO_4 | | 0.35 g |
| - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | | 0.4 g |
| - Agua cbp | | 50 ml |