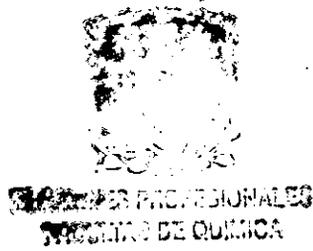


96



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



“Expresión en bacteria de la proteína de 24kDa de espinaca que se une a RNA de cloroplasto (24RNP), producción de anticuerpos y su caracterización”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA-BIOLOGA
P R E S E N T A :
SANDRA GUADALUPE ROBLES HERNANDEZ



MEXICO, D. F.

695082

2000



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 Profa. HERMINIA DE JESUS LOZA TAVERA.
Vocal: Prof. EDUARDO BONILLA ESPINOSA.
Secretario Profa. ROSANA PELAYO CAMACHO.
1er. Suplente Prof. ELPIDIO GARCIA RAMIREZ
2º. Suplente Prof. HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA.

Sitio donde se desarrolló el tema.

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. UNAM. Laboratorio 105, Edificio
"E".

JURADO ASIGNADO

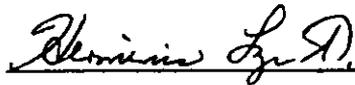
Presidente Profa. HERMINIA DE JESUS LOZA TAVERA.
Vocal: Prof. EDUARDO BONILLA ESPINOSA.
Secretario Profa. ROSANA PELAYO CAMACHO.
1er. Suplente Prof. ELPIDIO GARCIA RAMIREZ
2º. Suplente Prof. HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA

Sitio donde se desarrolló el tema.

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. UNAM. Laboratorio 105, Edificio
"E".

Asesor

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera.



Supervisor técnico

M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez.



Sustentante

Sandra Guadalupe Robles Hernández



AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y personas.

Al CONACYT (Proyecto 25119N) y a la Dirección de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, proyecto IN205697) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por todo el apoyo, comprensión y enseñanza que me brindó durante la dirección de este trabajo.

Al Dr. Edmundo Chávez Cossio, al Dr. Rafael Moreno y a todos los miembros del departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Por su apoyo para la conclusión de este trabajo.

Al M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez por su apoyo, amistad y valiosas contribuciones durante la realización de este trabajo.

Muy especialmente a mis compañeros y amigos del laboratorio: Edith, César y Omar por apoyarme en todo momento.

A Andrea, Alejandra y Gabriel por su cariño, amistad, confianza y comprensión en los momentos más difíciles.

A mis amigos de la Facultad: Adriana, Carmen, Denniz, Heriberto, Cesia, Eduardo, Yu-Mei, Liliana, por su apoyo y compañía.

A las personas más importantes que existen en mí vida, mi mamá Oliveria Hernández, mi papá Ismael Robles y mis hermanos Eduardo, Erik, Oscar y Ricardo por todo su amor y comprensión.

A mi abuelita Rosa García, a mis tíos César, Martha, Rosa y Camelia por todo su apoyo y buenos consejos.

A los integrantes del jurado por contribuir en la revisión de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera hayan participado en la realización de este trabajo.

CONTENIDO:

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
1. El sistema inmune.	3
2. Las proteínas de unión a RNA (RNPs).	4
3. La 24RNP de espinaca.	6
4. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.	7
4.1 Expresión de proteínas en sistemas procarióticos.	7
4.2 Expresión de proteínas en sistemas eucarióticos.	8
5. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.	9
5.1 Expresión y purificación de proteínas con etiqueta de histidinas.	9
6. Métodos de purificación de inmunoglobulinas (anticuerpos).	10
6.1 Métodos generales.	10
6.1.1 Precipitación.	10
6.1.1.1 Precipitación selectiva de anticuerpos.	10
6.1.1.2 Precipitación selectiva de contaminantes.	10
6.1.2 Cromatografía de exclusión molecular.	11
6.1.3 Cromatografía de intercambio iónico.	11
6.1.4 Cromatografía de afinidad por un metal inmovilizado.	11
6.1.5 Cromatografía de afinidad con proteína A.	12
6.2 Métodos específicos.	12
6.2.1 Purificación por inmunofinidad con una columna de antígeno.	12
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	13
V. OBJETIVOS	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Material biológico.	15
2. Inducción de la síntesis y purificación de la proteína 24RNP recombinante de espinaca.	15
3. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).	18

4. Esquema de inmunización.	20
5. Realización de las sangrías.	21
6. Inmunodifusión (Ouchterlony).	22
7. Purificación de inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.	23
8. Determinación del título del anticuerpo.	24
9. Western blot.	25
10. Purificación del anticuerpo empleando antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa.	26
11. Extracción de proteínas de tejidos vegetales.	27
12. Medición de concentración de proteínas.	28
VII. RESULTADOS	29
1. Obtención de la proteína 24RNP recombinante.	29
a) Análisis en pequeña escala.	29
b) Análisis a gran escala y purificación de la proteína 24RNP recombinante.	31
2. Producción de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante.	32
3. Determinación del título de los anticuerpos crudos 1 y 2.	33
4. Purificación de anticuerpos crudos 1 y 2.	34
a) Purificación de Inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.	34
b) Determinación del título de los anticuerpos 1 y 2 precipitados.	37
c) Purificación del anticuerpo 2 empleando antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa.	38
1) Optimización del método.	38
2) Purificación del anticuerpo 2.	39
3) Degradación y formación de complejos.	40
5. Reconocimiento de la 24RNP en diferentes extractos protéicos.	43
VIII. DISCUSIÓN	45
1. Expresión de la 24RNP en un sistema bacteriano.	45
2. Purificación de la 24RNP con una columna de níquel.	46
3. Producción de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante.	46

4. Purificación de anticuerpos.	47
a. Purificación de inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.	47
b. Purificación del anticuerpo 2 por medio de antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa.	48
c. Degradación y formación de complejos.	48
5. Reconocimiento de la 24RNP en diferentes extractos protéicos.	49
IX. CONCLUSIONES	50
X. APÉNDICE I	51
XI. BIBLIOGRAFÍA	58

I. RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo fue producir y caracterizar anticuerpos específicos contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca para su posterior utilización en experimentos de inmunodetección e inmunolocalización.

Para la obtención de la proteína recombinante se partió de una colonia de *Escherichia coli* cepa M15 con el plásmido pQE-24RNP capaz de ser inducida para sobre-expresar a la proteína. Esta clona fue generada previamente subclonando en fase el gen de la 24RNP de espinaca en el vector pQE-30 (Toledo, 1998). Dicho vector produce un alto nivel de la expresión de la proteína en *Escherichia coli* y además permite el etiquetado de la misma por medio de seis histidinas en el extremo amino terminal lo que facilita su purificación utilizando una resina de níquel. Con dicha construcción se transformó una cepa de *Escherichia coli* (M15) la cual tiene varias copias del plásmido represor pREP4 que porta el gen *lacI* y que codifica el represor *lac*. Los niveles altos del represor aseguran una regulación controlada de la expresión de la proteína recombinante. Para la inducción de la expresión de la proteína 24RNP se utiliza como inductor una molécula similar a la lactosa (IPTG).

Se indujo la sobre-expresión de la proteína 24RNP y, una vez que se obtuvo la proteína recombinante pura, se empleó para inyectar dos conejas por un tiempo aproximado de mes y medio (inyecciones semanales de 500 µg a cada una). Se realizó una sangría de prueba para determinar la presencia de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca. Confirmado esto se llevó a cabo la sangría de cosecha y la determinación del título de los anticuerpos obtenidos. Los anticuerpos (IgGs) se purificaron con una precipitación con sulfato de amonio realizando nuevamente la determinación del título. Se realizó una segunda purificación empleando un método basado en la utilización de antígenos unidos a nitrocelulosa. Fue posible obtener un ensayo específico para una banda aumentando la dilución del anticuerpo empleado en la inmunodetección. Empleando este anticuerpo se demostró su capacidad de reconocer a la proteína 24RNP en extractos crudos de hojas de espinaca. Por último, se realizó un ensayo para comparar la cantidad de proteína 24RNP presente en diferentes extractos protéicos purificados de cloroplastos de espinaca.

II. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo del cloroplasto es uno de los procesos críticos durante el crecimiento y la diferenciación de las plantas que involucra cambios moleculares significativos (Deng y Gruissem, 1987). La expresión de los genes de cloroplasto está regulada por una variedad de mecanismos, uno de los cuales es la modulación de la estabilidad de los RNAs durante su desarrollo (Lisitsky *et al.*, 1995). El control del decaimiento del mRNA en el cloroplasto se logra por la interacción específica de secuencias y estructuras de RNA con factores como ribonucleasas y proteínas de unión a RNA (RNPs) (Hsu-Ching y Stern, 1991). Por ejemplo, las interacciones RNA-proteína regulan la estabilidad de los mRNAs de la histona (Harris *et al.*, 1991; Mowry y Steitz, 1987) y de protooncogenes (Brewer, 1991).

El papel de las RNPs en el procesamiento y estabilidad del extremo 3' del mRNA de cloroplasto no ha sido bien definido. Se ha propuesto que la proteína 28RNP podría interaccionar a través de su dominio ácido terminal, con una nucleasa específica dirigiendo de esta manera el procesamiento correcto de los extremos 3' (Schuster y Gruissem, 1991; Hayes *et al.*, 1996).

La 24RNP es otra pequeña proteína de unión a RNAs de cloroplastos. Sin embargo, se sabe mucho menos acerca de la función de esta proteína que de la 28RNP (Toledo, 1998; Schuster y Gruissem, 1991). Un enfoque para analizar la función de esta proteína *in vivo*, es eliminarla o modificarla a través de mutaciones, sobre expresión de genes y regulación por RNA anti-sentido. En modelos *in vitro*, la inmunosustracción podría ser una herramienta útil para el propósito mencionado (Rees *et al.*, 1992).

Como un primer paso en la contribución a la aplicación de este enfoque al estudio de la función de la 24RNP, en este trabajo se llevó a cabo la producción de anticuerpos policlonales anti-24RNP generados a partir de la 24RNP de espinaca, producida por técnicas recombinantes en *Escherichia coli*. Estos anticuerpos purificados fueron capaces de reconocer específicamente a la proteína 24RNP en extractos crudos de hoja de espinaca.

III. ANTECEDENTES.

1. El sistema inmune.

La principal función del sistema inmune es proteger a los animales de organismos patógenos y de productos tóxicos. El sistema inmune está compuesto de un sin número de mecanismos para localizar, neutralizar y eliminar del cuerpo, células, virus y macromoléculas invasoras. Este sistema de defensa está compuesto principalmente de proteínas y células que circulan por todo el cuerpo.

La inmunidad se clasifica principalmente en inmunidad innata e inmunidad adquirida. La primera está mediada por células que responden inespecíficamente en contra de moléculas extrañas y está compuesta principalmente por: a) el sistema de fagocitosis llevado a cabo por los macrófagos, b) la secreción de lisozima llevada a cabo por las células lagrimales y c) por el sistema de lisis celular que se lleva a cabo por las células asesinas naturales. Este tipo de inmunidad no responde a exposiciones repetidas de una misma molécula extraña. La inmunidad adquirida a diferencia de la innata responde a moléculas específicas, se presenta cuando existen exposiciones repetidas de una misma molécula y está mediada principalmente por células conocidas como linfocitos, los cuales sintetizan en su superficie celular receptores específicos o secretan proteínas que se unen específicamente a la molécula extraña. Estas proteínas secretadas son conocidas como anticuerpos y la molécula que se une al anticuerpo se conoce como antígeno, el cual puede tener dentro de su estructura, uno o más epítopes (parte del antígeno que desencadena la respuesta inmune y que además es la parte reconocida por el anticuerpo). Cuando una molécula es usada para inducir una respuesta inmune se le denomina inmunógeno (Harlow y Lane, 1988).

Los anticuerpos son grandes familias de glicoproteínas. Funcionalmente se caracterizan por su habilidad de unión a antígenos, a células especializadas o a proteínas del mismo sistema inmune.

Estructuralmente los anticuerpos están compuestos de una o más copias de una unidad característica que se visualiza en forma de Y. Cada Y contiene cuatro polipéptidos: dos copias idénticas de polipéptidos conocidas como cadenas pesadas y dos copias idénticas de polipéptidos conocidas como cadenas ligeras, las cuales se unen entre sí por

puentes disulfuro. A la zona de unión entre dos cadenas pesadas se le conoce como fracción cristalizable (Fc) y la unión entre una cadena pesada y una cadena ligera se le conoce como fracción variable (Fv). Los anticuerpos se clasifican en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD basándose en el número de unidades Y (Y-like) y en el tipo de cadena pesada que contengan (William, 1989).

La primera clase de Ig generada por los linfocitos B productores de anticuerpos es la IgM, una molécula que tiene una alta afinidad por los epítopes del antígeno. La respuesta de IgM disminuye con el tiempo (tiempo de vida media de 8 a 10 días) y es reemplazada por una segunda clase de Igs, las IgGs, las cuales tienen un tiempo de vida media mucho mayor (de 25 a 30 días) y su producción aumenta después de exposiciones repetidas de un mismo antígeno, siendo de esta manera la más abundante en el suero (75%). Otras Igs aparecen tiempo después cuando las IgGs ya no son tan abundantes (Coligan *et al.*, 1989; William, 1989).

2. Las Proteínas de unión a RNA (RNPs).

Las RNPs son proteínas que se han encontrado en muchos organismos, tales como: algas, plantas superiores, ratón y humano. Se caracterizan por que se unen al RNA, ya sea para conferirle estabilidad, procesarlo o degradarlo.

En plantas se han logrado identificar una gran variedad de estas proteínas, muchas de las cuales aún no se sabe su función. Las RNPs de plantas se caracterizan por poseer dos dominios de unión a RNA y algunos motivos auxiliares entre los que destacan un dominio ácido hacia la región amino terminal y otros dominios ricos en ciertos aminoácidos (Kenan *et al.*, 1991; Fukami *et al.*, 1993; Albá y Pagés, 1998).

En la Tabla 1 se presentan algunas de las funciones de las RNPs que se han identificado en cloroplastos de plantas superiores.

Tabla 1. RNP's identificadas en cloroplastos de plantas superiores (Sugita y Sugiura, 1996).

Proteínas	Especie	Características y función propuesta
Proteínas con dos dominios consenso de unión a RNA.		
cp28, cp29A, cp29B, cp31, cp33	<i>Nicotiana sylvestris</i>	unión preferencial a poli-G, poli-U, proteínas de unión generalizada a RNAs presentes como complejos de 20-30S
CP-RNP30, CP-RNP31	<i>N. plumbaginifolia</i>	corresponden a las cp29A y cp29B
cp29, cp31, cp33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	homólogas a las de <i>N. sylvestris</i>
RNP-T	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
ATRBP31, 33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
cRBP	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	
28RNP	<i>Spinacea oleracea</i>	procesamiento de los extremos 3'UTR de mRNAs
24RNP	<i>Spinacea oleracea</i>	desconocida
NBP	<i>Zea mays</i>	aislada como una proteína de unión a DNA
RNP1 de frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	proteína de unión a AG-1; unión a secuencias de DNA de cadena sencilla ricas en T
Otras sin dominios consenso de unión a RNA		
100RNP	<i>S. oleracea</i>	homóloga a la polinucleótido fosforilasa de <i>E. coli</i>
33RNP	<i>S. oleracea</i>	se une a la 3' IR de <i>petD</i> asociada con 100RNP

3. La 24RNP de espinaca.

La proteína 24RNP está codificada en el núcleo y es sintetizada en el citoplasma, posee un péptido de tránsito en el extremo amino terminal que la dirige al cloroplasto; contiene dos dominios consenso de unión a RNA (RNP- CS) y un dominio amino terminal ácido, característico de las RNPs de cloroplastos (Figura 1) (Schuster y Gruissem, 1991).

La comparación de las secuencias de la 28 y la 24RNP indica que la secuencia de aminoácidos presenta una divergencia considerable en el extremo amino terminal (13% de identidad) en el que ambas proteínas son ácidas (30% y 27% de aminoácidos ácidos para la 24RNP y la 28RNP respectivamente). A nivel de aminoácidos totales, presentan 57% de identidad (Toledo, 1998).

El cDNA de la 24RNP fue aislado originalmente de una biblioteca de cDNA de hoja de espinaca (Abrahamson no publicado, 1995). El gen de la proteína 24RNP madura de espinaca fue subclonado en fase en el vector pQE-30, con esta construcción se transformó una cepa de *Escherichia coli* (M15) para sobre-expresar a la proteína (Toledo, 1998).

Se ha visto que ésta proteína es más abundante en extractos de hoja joven de espinaca y decrece en hojas maduras (Abrahamson no publicado, 1995).

Dominio ácido					
28RNP	VAQTSEWEQ	EGSTNAVLEG	ESDPEGVSW	GSETQVSDEG	VEGGQGFSEP
24RNP		E SISSSFVRHV	RISSE...F	EQEEDVMGDD	AGRQPNFS..
Primer dominio de unión a RNA					
PEEAK	LFVGNL	PYDVDSEKLAG	IFDAAGVVE	AE VIYNRETRSR	GFGFVTM
.PDLK	IFVGNL	PFNDVSAELAG	LFGAGTVEM	VE VIYDKLTGRSR	GFGFVTM
Región interdominios					
STVEEAEKAV	ELLNGYDMG	RQLTVNKAAP	RG...SPERA	PRGDF	
SSVEEVEAAA	QQFNNEYLDG	RTLRVTEDSH	KDMLPRVES	ECDSF	
Segundo dominio de unión a RNA					
EPSCR	VYVGNL	PEDVDTSRLEQ	FSEHGKVV SAR.	VVSDREGRSR	GFGFVTM
GSSNR	VHVGNL	SWKVDDDALK.	FSETDGVVEAKV	IYDRDTGRSR	GFGFVTY
	SSEVNVNDA	IAALDGQTL	DGRAVRVNVA	EERPRRAF	
	NSANEVNTA	IESLDGVDL	NGRSIRVTAA	ERQRRG..	

Figura 1. Comparación de las secuencias maduras de aminoácidos de la 24 y 28 RNPs.

4. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

El rápido desarrollo de las técnicas de DNA recombinante ha dado como resultado el aislamiento e identificación de muchos genes importantes, así como también ha contribuido al descubrimiento de algunas de las funciones de estos genes.

La expresión de genes en otros sistemas celulares es importante ya que con ello se puede obtener material para estudios de estructura-función, así como la obtención de reactivos para diagnóstico (anticuerpos monoclonales y policlonales) y para pruebas de actividad *in vivo* (Rees *et al.*, 1992).

Existen diversos sistemas para la expresión de genes foráneos entre los que se encuentran células de mamíferos, insectos, hongos, bacterias y tanto animales como plantas transgénicos. La selección del sistema de expresión dependerá de las propiedades para decodificar la proteína, así como también del manejo, el costo y el tiempo para generar la proteína recombinante requerida (Rees *et al.*, 1992).

4.1 Expresión de proteínas en sistemas procarióticos.

El sistema procariótico más empleado para la expresión de proteínas recombinantes en la actualidad es el que emplea a *Escherichia coli*.

Escherichia coli es el procarionte más utilizado, debido a que proporciona múltiples ventajas tales como: fácil manipulación genética, un fácil acceso a reactivos que incluyen a los vectores de expresión de genes, la gran cantidad de proteína que se puede producir (en el orden de g por litro de cultivo), la gran capacidad de adaptación al medio y su velocidad de crecimiento (Sambrook *et al.*, 1989)

La expresión de un gen foráneo en *Escherichia coli* requiere de la inserción de una copia del cDNA del gen en un vector de expresión. Este último deberá ser un plásmido con un origen de replicación, un marcador para seleccionar (generalmente se utiliza la resistencia a antibióticos), un promotor y un terminador transcripcional separados por un sitio de multiclonación y por último una secuencia de DNA que codifique un sitio de unión al ribosoma (Sambrook *et al.*, 1989).

Una de las desventajas principales que tiene este sistema de expresión es su incapacidad para llevar a cabo modificaciones post-traduccionales típicas de las células eucarióticas. La segunda desventaja, es que muchas de las proteínas producidas

generalmente se encuentran en forma insoluble en cuerpos de inclusión cuando son expresadas de manera intracelular (Sambrook *et al.*, 1989).

Actualmente es muy frecuente el uso de vectores que permitan obtener proteínas etiquetadas o fusionadas con alguna otra proteína, ya sea para facilitar la purificación de la proteína recombinante o para conferir a la proteína de interés características específicas que permitan identificarla mejor (Ausubel *et al.*, 1987).

4.2 Expresión de proteínas en sistemas eucarióticos.

Debido a que no todas las proteínas se pueden producir en un sistema procariótico, como el caso del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, se han buscado otros sistemas de expresión (Sambrook *et al.*, 1989).

Dentro de los sistemas de expresión eucarióticos más utilizados se encuentran los que emplean levaduras y células de mamíferos.

Los sistemas de expresión eucarióticos utilizan principalmente levaduras, en especial a *Saccharomyces cerevisiae* que es un eucariote unicelular, no patógeno fácil de cultivar. La principal ventaja que este sistema de expresión brinda es la capacidad de producir proteínas libres en forma activa (Lundblad, 1996).

Muy pocas proteínas eucarióticas se han podido expresar de manera eficiente en hospederos procarióticos. Muchas proteínas eucarióticas sintetizadas en bacteria muestran un plegamiento incorrecto o ineficiente y en consecuencia exhiben una baja actividad específica. Adicionalmente la producción de proteínas eucarióticas auténticas y biológicamente activas desde un DNA clonado, requiere frecuentemente de modificaciones post-traduccionales tales como puentes disulfuro, glicosilaciones, fosforilaciones, oligomerizaciones y un sitio proteolítico específico; procesos que no son llevados a cabo por células bacterianas. Estos problemas son evitados generalmente utilizando células de mamíferos (Sambrook *et al.*, 1989).

5 Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

La expresión y purificación de proteínas recombinantes facilita la producción y caracterización detallada de algunas proteínas. Se han desarrollado una gran variedad de sistemas de expresión heterólogos que son frecuentemente utilizados para la producción de proteínas recombinantes, cabe mencionar que la purificación de éstas, a veces es un poco complicada utilizando los métodos convencionales. Las técnicas de DNA recombinante permiten la construcción de proteínas de fusión en las cuales, una etiqueta con afinidad específica es adicionada a la secuencia de la proteína de interés; el uso de la afinidad de la etiqueta simplifica la purificación de las proteínas fusionadas mediante el uso de métodos cromatográficos de afinidad.

Los principales métodos de expresión y purificación de proteínas recombinantes más utilizados en la actualidad son los que expresan proteínas: con etiquetas de histidinas (sistema empleado en este trabajo), unidas a la proteína a la proteína de unión a maltosa (Guan *et al.*, 1987; Bedouelle y Duplay, 1988; Maina *et al.*, 1988; Ammann y Brosius, 1985; Riggs, 1994), unidas a tioredoxina (Stormo *et al.*, 1982; Mitraki y King, 1989; McCoy y LaVallie, 1994), unidas a glutation-S-transferasa (Smith y Jonson, 1988; Smith *et al.*, 1986; Smith y Corcoran, 1994).

5.1 Expresión y purificación de proteínas con etiqueta de histidinas.

El sistema QIAexpressionist (QIAGEN, Chatsworth, CA) es una forma rápida y fácil para expresar y purificar proteínas recombinantes. Los vectores de expresión pQE dan un alto nivel de expresión en *Escherichia coli* de proteínas que poseen una etiqueta de seis histidinas que puede colocarse en el extremo amino (construcciones de tipo IV) o carboxilo terminal (construcciones de tipo III). La purificación de la proteína recombinante se basa en la utilización de la resina Ni-NTA que posee una alta afinidad por la etiqueta de seis histidinas con las que se marca la proteína a purificar. Las proteínas son recuperadas mediante la adición de imidazol, compuesto que va a competir por el níquel debido a su carga positiva (QIAGEN).

6. Métodos de purificación de Inmunoglobulinas (anticuerpos).

Fundamentalmente existen dos aproximaciones diferentes para la purificación de Igs: la general y la específica.

La general se basa en una característica fisicoquímica particular (solubilidad, afinidad, densidad, etc.) de la Ig para poder separarla de la solución. La específica se basa en la reacción serológica específica que existe entre el antígeno y el anticuerpo (William, 1989).

6.1 Métodos generales.

6.1.1 Precipitación.

La precipitación es uno de los procedimientos más utilizados para la purificación y concentración de anticuerpos para su posterior análisis. Generalmente la precipitación se utiliza como un primer paso en la purificación de anticuerpos (Harris y Angal, 1989).

6.1.1.1 Precipitación selectiva de anticuerpos.

La precipitación selectiva de anticuerpos se lleva a cabo por la alteración de las propiedades de los anticuerpos mediante la adición de un solvente. Incluye la precipitación con sales como el sulfato de amonio; la precipitación con polímeros orgánicos como polietilenglicol y la precipitación por depleción de electrolitos.

❖ Precipitación con sales inorgánicas.

Es una de las más utilizadas y se basa en la formación de puentes de hidrógeno de las proteínas en solución con el agua, por la presencia de grupos polares y grupos iónicos. Cuando se aumenta la concentración de iones, semejantes a los grupos sulfato, éstos últimos compiten con las proteínas por las moléculas de agua. Estas moléculas de agua son removidas desde la superficie de las proteínas, disminuyendo de esta manera su solubilidad y provocando por lo tanto su precipitación. La sal más empleada es el sulfato de amonio y fue la empleada en este trabajo (Gagnon, 1996).

6.1.1.2 Precipitación selectiva de contaminantes.

Precipitación selectiva de contaminantes por complejación con agentes que reducen la solubilidad. Incluye la precipitación con agentes complejantes orgánicos; la precipitación con ácidos orgánicos de cadenas cortas y la precipitación con bases orgánicas.

❖ Precipitación por la adición de ácidos.

Este método se basa en la disminución del pH de la solución por la adición de un ácido, por ejemplo el ácido caprílico y el ácido octanoico. La carga negativa del grupo carboxilo del ácido penetra a las proteínas hidratadas y se une a su superficie impartiendoles un alto grado de hidrofobicidad. Las proteínas ácidas son poco solubles a un pH bajo y por lo tanto precipitan (Gagnon, 1996).

6.1.2 Cromatografía de exclusión molecular

Este método se utiliza principalmente para la purificación tanto de IgMs como de IgGs y se basa en la diferencia de pesos moleculares que existe entre estas moléculas (385 kDa para las primeras y 77 kDa para las segundas) y las otras moléculas presentes en el suero, es decir las moléculas pequeñas van a migrar más rápidamente en el gel separándose de las moléculas más pesadas, permitiendo de esta manera su purificación (Harlow y Lane, 1988).

6.1.3 Cromatografía de intercambio iónico.

Los residuos cargados en la superficie de la proteína incluyen los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos. Estos residuos son anfotéricos y les confieren una carga neta a las proteínas en función del pH. El pH en el cual una proteína con carga positiva está en balance con su carga negativa se le conoce como su punto isoeléctrico (PI). De esta manera una proteína se une a una matriz aniónica si se encuentra cargada positivamente (pH arriba de su PI) y a una catiónica si se encuentra cargada negativamente (pH abajo del PI).

Los soportes sólidos que más se emplean en estas columnas son: el etil amino cuaternario (QAE), el dietilaminoetil (DEAE), el carboximetil (CM) y el sulfopropil (SP) (Gagnon, 1996).

6.1.4 Cromatografía de afinidad por un metal inmovilizado.

Esta cromatografía está influenciada por varios factores, incluyendo grupos quelantes en la columna, metales iónicos inmovilizados, pH, concentración e identidad de sales, selectividad de elución por proteínas unidas.

Se basa en la afinidad de los grupos histidil, los cuales actúan como agentes quelantes del níquel. Se emplea principalmente para la purificación de anticuerpos IgGs, debido a que estas inmunoglobulinas tienen una alta concentración de estos residuos en sus

dominios. Para poder eluir los anticuerpos se utilizan compuestos que compiten por el níquel como el imidazol (Gagnon, 1996).

6.1.5 Cromatografía de afinidad con proteína A.

Se basa en la utilización de la proteína A que es un componente celular de *Staphylococcus aureus*. Esta proteína es un polipéptido en forma de espiral que contiene cinco regiones de unión por la fracción cristalizable (Fc) de las IgGs en el extremo carboxilo terminal y un grupo sulfhidrilo en el extremo amino terminal que le permite unirse a un soporte sólido (Harlow y Lane, 1988).

6.2 Métodos específicos.

Los métodos específicos para la purificación de anticuerpos se basan en la reacción específica que existe entre un anticuerpo con su antígeno.

6.2.1 Purificación por inmovinoafinidad con una columna de antígeno.

Es uno de los métodos más utilizados para purificar anticuerpos específicos contra un antígeno a partir de una preparación de anticuerpos policlonales. En este procedimiento un antígeno puro es unido covalentemente a un soporte sólido. Se pasa la solución con los anticuerpos y los anticuerpos no específicos son removidos por medio de lavados. Después los anticuerpos unidos a la columna de antígeno son eluidos (Harlow y Lane, 1988).

Este fue el método empleado en este trabajo y el soporte sólido empleado fue la membrana de nitrocelulosa.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Para lograr la producción de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca para su posterior utilización en experimentos de inmunodetección e inmunolocalización, se diseñó la siguiente estrategia de trabajo.

El trabajo se inició con la obtención de la proteína 24RNP recombinante de espinaca, partiendo de una colonia bacteriana de la cepa M15 transformada con el plásmido pQE-24RNP capaz de ser inducida con 1mM de IPTG para sobre-expresar a la proteína. Esta clona fue generada previamente subclonando en fase el gen de la proteína madura 24RNP de espinaca en el vector pQE-30 (Toledo, 1998). Una vez obtenida la proteína recombinante pura, después de pasar el extracto bacteriano por una resina de níquel, se utilizó para inyectar dos conejas por un tiempo aproximado de mes y medio (inyecciones semanales de 500 μ g de la proteína 24RNP recombinante a cada una). Se realizó la sangría de prueba después de cinco semanas de inyecciones, para saber si había anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante. Confirmado lo anterior se llevó a cabo la sangría de cosecha en la séptima semana y se determinó el título de los anticuerpos obtenidos por medio de un Western blot. Los anticuerpos (IgGs) se purificaron mediante una precipitación con sulfato de amonio, llevando a cabo tres fraccionamientos: 0-30%, 30-40% y 40-60% de saturación y se determinó el título de la fracción 30-40% de saturación. Se realizó una segunda purificación utilizando la proteína 24RNP recombinante unida a membranas de nitrocelulosa (cromatografía de afinidad). Por último, para corroborar la funcionalidad de estos anticuerpos y probar su aplicabilidad, se realizó un ensayo de comparación de la cantidad de proteína 24RNP presente en diferentes extractos protéicos de espinaca.

V. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Obtener anticuerpos policlonales purificados, específicos contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca y demostrar su funcionalidad.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Inducir la síntesis de la proteína 24RNP de espinaca en *Escherichia coli*.
- 2) Purificar la 24RNP recombinante de espinaca.
- 3) Inducir una buena respuesta inmune en conejo, utilizando como antígeno la 24RNP recombinante de espinaca y determinar el título de los anticuerpos producidos.
- 4) Purificar los anticuerpos obtenidos contra la 24RNP recombinante de espinaca y determinar el título.
- 5) Comparar la cantidad de proteína 24RNP de espinaca en diferentes extractos protéicos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Material biológico.

Para la obtención de proteínas totales, se utilizaron hojas frescas jóvenes de espinaca (*Spinacea oleracea*), de aproximadamente 6 cm de longitud.

Para la producción de anticuerpos se utilizaron dos conejas jóvenes Nueva Zelanda de 3 Kg de peso y se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Química con alimentación *ad libitum*.

Se utilizaron hojas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*, cultivadas bajo condiciones controladas de día corto.

2. Inducción de la síntesis y purificación de la proteína 24RNP recombinante de espinaca.

El sistema QIAexpressionist (QIAGEN, Chatsworth, CA) es una forma rápida y fácil para expresar y purificar proteínas recombinantes. Los vectores de expresión pQE dan un alto nivel de expresión en *Escherichia coli* de proteínas que poseen una etiqueta de seis histidinas que puede colocarse en el extremo amino terminal (construcciones de tipo IV) o carboxilo (construcciones de tipo III). La purificación de la proteína recombinante se basa en la utilización de la resina Ni-NTA que posee una alta afinidad por la etiqueta de seis histidinas con las que se marca la proteína a purificar.

La subclonación de la 24RNP de espinaca en pQE 30 fue de tipo IV y se realizó de la manera siguiente: después de haber clonado la 24RNP en el vector pQE 30 (que es el que da el marco de lectura correcto) y verificado la presencia del plásmido en células JM109, se procedió a transformar células M15 (cepa que posee el plásmido represor pREP4 que mantiene la expresión inhibida hasta que se añade IPTG) que es donde se induce la expresión (Toledo, 1998).

Se realizó primero una expresión en pequeña escala con el propósito de verificar que las bacterias eran capaces de producir la proteína 24RNP utilizando básicamente el protocolo descrito en el manual de QIAexpressionist, salvo que se ajustaron algunos volúmenes y temperaturas.

Procedimiento.

Inducción en pequeña escala.

- 1) Se inocularon 3 mL de medio LB (ver Apéndice I) previa adición de ampicilina y kanamicina (100 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente) con una colonia de M15 pQE-24RNP y se dejó crecer toda la noche a 37 °C con agitación. Con 200 µL del cultivo anterior se inocularon 3 mL de medio LB fresco con la misma concentración de los antibióticos. Como controles se utilizaron bacterias no transformadas y transformadas con el plásmido pQE sin inserto.
- 2) Se dejaron crecer las bacterias con agitación hasta que alcanzaron una absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 600 nm (aproximadamente 3 horas).
- 3) Se realizó la inducción de la expresión adicionando IPTG (ver Apéndice I) a una concentración final de 1 mM y las bacterias se dejaron crecer por 4 horas más a 34 °C.
- 4) Se colectaron las células contenidas en 1.5 mL del cultivo anterior por medio de una centrifugación a 4000 g por 15 minutos.
- 5) Se resuspendió el botón en 200 µL de la solución C (ver Apéndice I) por cada botón de bacterias obtenidas, es decir se considera una relación 1.5 a 1. Se resuspendieron las bacterias por agitación en un vórtex.
- 6) Se congeló el lisado bacteriano con nitrógeno líquido y se guarda a -70 °C para su posterior utilización.
- 7) Se descongeló el lisado bacteriano y se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente.
- 8) Después de la agitación se corrieron 45 µL de las muestras obtenidas en un SDS-PAGE para verificar que se llevó a cabo la inducción.

Inducción a gran escala y purificación de la proteína 24RNP recombinante.

- 1) Se inocularon 50 mL de medio LB (ver Apéndice I) previa adición de ampicilina y kanamicina (100 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente) con una colonia de M15 pQE-24RNP y se dejó crecer toda la noche a 37 °C con agitación. Con ellos se inocularon 2 L de medio LB fresco con la misma concentración de los antibióticos.
- 2) Se dejó crecer las bacterias con agitación hasta alcanzar una absorbancia 0.7 a una longitud de onda de 600 nm (aproximadamente 3 horas).

- 3) Se realizó la inducción de la expresión adicionando IPTG (ver Apéndice I) a una concentración final de 1 mM y se dejaron crecer las bacterias por 4 horas más.
- 4) Se colectaron las células por medio de una centrifugación a 4000 g por 20 minutos.
- 5) Se resuspendió el botón en la solución A (ver Apéndice I) en una relación de 1.5 mL de solución por cada gramo de bacterias. Se resuspendieron las bacterias por agitación en un vórtex.
- 6) Se agregó la cantidad de solución A necesaria para alcanzar 50 mL de volumen.
- 7) Se congeló en nitrógeno líquido y se metió a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por toda la noche.
- 8) Se descongeló el lisado y se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente.
- 9) Se obtuvo el sobrenadante centrifugando a 4000 g por 20 minutos y se dejó con 300 mg de resina Ni-NTA (previamente equilibrada en 1 mL de solución A) por toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 10) Se centrifugó a 4000 g por 10 minutos para obtener la resina. Se transfirió la resina a un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL y se lavó diez veces con 1 mL de solución A.
- 11) Se lavó la resina cinco veces con 1 mL de solución B (ver Apéndice I).
- 12) Se lavó la resina cinco veces con 1 mL de la solución C (ver Apéndice I).
- 13) Por último se eluyó la proteína lavando la resina diez veces con 1 mL de la solución para elución de proteínas.
- 14) Se corrió un gel de acrilamida al 12% (SDS-PAGE) de estas diez últimas fracciones para comprobar que efectivamente la proteína se eluyó, así como también del primer lavado con la solución C y del sobrenadante pasado por la resina. Esto último para ver si se extrajo totalmente la proteína del sobrenadante y de ser necesario repetir la operación para obtener la mayor cantidad de proteína.
- 15) Con base en los marcadores de peso molecular (Low-range, Promega) y considerando que la proteína 24RNP recombinante migra en un peso aproximado de 30 kDa se concentraron los lavados 1 al 9, en donde se encontró la proteína 24RNP utilizando un concentrador Centricon-10 (Amicon, Inc).

3. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).

Se utilizó el método de Laemmli (1970), el cual se basa en el uso de soluciones amortiguadoras con diferente pH, que generan un pH discontinuo y un gradiente de voltaje en el gel, lo que permite la separación de las proteínas dependiendo de sus cargas netas. La utilización de la poliacrilamida en el gel permite la formación de una red o malla que también separa las proteínas por su peso.

Tabla 2. Pesos en kDa que pueden separarse con un porcentaje adecuado de acrilamida.

% de Acrilamida	Intervalo de tamaño (kDa)
5%	36-205
7.5%	24-205
10%	14-205
12.5%	14-66
15%	14-45

Tabla tomada de Smejkal G, and Gallagher S., 1994.

Procedimiento.

Se prepararon geles de Acrilamida con los siguientes componentes (Preparación de soluciones en Apéndice I).

Gel de separación.

Soluciones.	12%	15%
Agua desionizada	1.4 mL	1 mL
Solución de acrilamida-bisacrilamida	1.6 mL	2 mL
Solución separadora	1 mL	1 mL
APS 20%	25 µL	25 µL
TEMED	2,5 µL	2.5 µL

Gel de concentración.

Soluciones.	12% y 15%
Agua desionizada	1 mL
Solución apiladora	444 μ L
Solución de acrilamida-bisacrilamida	300 μ L
APS 20%	20 μ L
TEMED	5 μ L

- 1) En un tubo falcon de 15 mL se mezclaron perfectamente los componentes para el gel de separación y se vaciaron en los sandwiches de vidrio.
- 2) Se mezclaron los componentes del gel de concentración y se vaciaron sobre el gel de separación e inmediatamente después se colocaron los peines para la formación de los pozos para cargar las muestras.
- 3) Después de medir la concentración de proteínas, se prepararon las muestras llevándolas todas a un volumen semejante, incluyendo la solución para cargar (Ver Apéndice I) que debe quedar al final a una concentración 1X. Para ajustar los volúmenes se utilizó la solución para extracción de proteínas.
- 4) Se pusieron las muestras en al baño de agua a ebullición por 10 minutos y se transfirieron a un baño de hielo con agua.
- 5) Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular y se corrió el gel a 100 V en la solución amortiguadora de corrida.
- 6) Se tiñó el gel con la solución de Coomassie (ver Apéndice I) durante 20 minutos y posteriormente se destiñó con la solución fijadora y desteñidora (ver Apéndice I).

4. Esquema de inmunización

Un esquema de inmunización es la inoculación continua (semanal) de un antígeno (proteína, DNA, RNA, etc.) a un ser vivo, con el objeto de obtener una respuesta inmune, es decir obtener anticuerpos contra dicho antígeno. El método utilizado fue el propuesto por Harlow y Lane, 1988. Con algunas modificaciones.

Procedimiento

- 1) Primero se hizo una sangría control en donde se tomaron 5mL de sangre del conejo antes de hacer la inmunización contra la 24RNP recombinante y se centrifugaron a 10,000 g por 20 minutos para obtener el suero.
- 2) En la primera semana se inocularon 500 µg de la proteína recombinante purificada con 0.5 mL de adyuvante de Freund completo (Sigma), vía subcutánea a dos conejas de aproximadamente 3 kg de peso.
- 3) En la segunda semana se les inocularon 500 µg de la proteína recombinante purificada con 0.5 mL de adyuvante de Freund incompleto (Sigma), vía intraperitoneal.
- 4) En la tercera semana se repitió el paso anterior.
- 5) En la cuarta semana se les inocularon 500 µg de la proteína recombinante purificada sin adyuvante de Freund, vía subcutánea.
- 6) En la quinta semana se realizó una sangría de prueba, en la cual a los conejos se les extrajo solamente 3 mL de sangre para obtener el suero correspondiente y se probó mediante la técnica de Ouchterlony y ver de esta manera si hubo producción de anticuerpos contra dicha proteína. Además se les aplicó un refuerzo con 500 µg de la proteína recombinante sin adyuvante de Freund, vía subcutánea.
- 7) En la sexta semana se les aplicó nuevamente un refuerzo con 250 µg de la proteína recombinante sin adyuvante de Freund, vía subcutánea.
- 8) Se realizó la sangría de cosecha a las conejas en la séptima semana.

5. Realización de las sangrías.

Se utilizó básicamente el método descrito por Harlow y Lane, 1988.

Sangría de prueba.

- 1) La sangría de prueba se realizó en la vena marginal.
- 2) Se limpió con un algodón impregnado con alcohol el área y se procedió a realizar la punción poniendo la aguja en un ángulo de 45 °C.
- 3) Se colectaron 5 mL de sangre.
- 4) Se retiró la aguja de la jeringa y se vació lentamente la sangre en un tubo para centrifuga, pegando la punta de la jeringa a la pared del tubo para evitar una hemólisis.
- 5) Se separó el suero del paquete celular, centrifugando a 10,000 g por 20 minutos. Se almacenó a -70 °C.

Sangría de cosecha.

- 1) La sangría de cosecha se realizó por medio de una punción cardiaca.
- 2) Se sujetó el conejo a una mesa de cirugía por las cuatro extremidades.
- 3) Se procedió a llevar a cabo la sangría, para lo cual se necesitó una jeringa de 20 mL que se introdujo a un costado del tórax, después de haber localizado el corazón del conejo con la yema del dedo índice.
- 4) Se sacó la sangre con la jeringa, se quitó la aguja de la jeringa y se vació la sangre a tubos para centrifuga pegando la jeringa a la pared del tubo. Nota: como nosotros necesitábamos mucho más suero se le puso al conejo un equipo de venoclisis por el que se le puso suero glucosado para obtener de esta manera un poco mas de sangre.
- 5) Se separó el suero del paquete celular, centrifugando a 10,000 g por 20 minutos. Se guardó el suero obtenido a -70 °C.

6. Inmunodifusión (Ouchterlony).

Las técnicas de difusión en gel son métodos para detectar anticuerpos específicos y para medir antigenicidad (Ouchterlony y Nilsson, 1986), sin embargo requieren de altas concentraciones de antígeno y de anticuerpo siendo relativamente sensibles.

La doble Inmunodifusión se lleva a cabo por la naturaleza de las interacciones antígeno-anticuerpo que al ser equivalentes producen un precipitado visible a simple vista.

Procedimiento.

- 1) Se preparó una placa de gel de agarosa al 2% (ver Apéndice I) en una placa de 3x5 cm.
- 2) Se hicieron seis orificios(ver la figura 2).
- 3) Se cargaron 20 μL de muestra con las siguientes cantidades de la proteína 24RNP recombinante de espinaca purificada: 3.0 μg , 1.5 μg , 0.5 μg , 0.3 μg , 0.2 μg en los cinco pozos de la periferia que previamente se etiquetaron.
- 4) Se cargaron 50 μL del suero obtenido en la sangría de prueba en el pozo del centro.
- 5) Se dejó toda la noche a 4 °C en una cámara de humedad para permitir la difusión de las muestras.
- 6) Se visualizaron las bandas de precipitación, las cuales indicaron la presencia de anticuerpos contra la proteína.

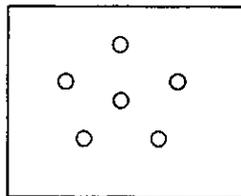


Figura 2

7. Purificación de inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.

Existen diferentes métodos de purificación de inmunoglobulina G (IgG), entre los que se encuentra la Cromatografía de exclusión por tamaño, C. de afinidad a sacarosa, C. de intercambio iónico y la precipitación con sulfato de amonio, siendo esta última uno de los métodos más usados para remover proteínas desde una solución. Este método se basa en la formación de puentes de hidrógeno entre las proteínas y el agua llevándose a cabo un fenómeno de solvatación, cuando las moléculas de agua son desplazadas por los sulfatos se produce una disminución de la solubilidad y por lo tanto se lleva a cabo una precipitación. (Harlow y Lane, 1988).

Procedimiento.

- 1) Se procedió a realizar la precipitación con la solución saturada de sulfato de amonio (ver Apéndice I) de 140 mL del suero obtenido en la sangría de cosecha.
- 2) Se puso la muestra en un vaso de precipitados de 1000 mL en el cuarto frío a 4 °C, se adicionaron 60 mL de solución saturada de sulfato de amonio gota a gota y con agitación para alcanzar un grado de saturación de 30% y se dejó en agitación por 6 horas.
- 3) Se centrifugó la muestra a 3000 g por 30 minutos para obtener el precipitado.
- 4) A los 200 mL de sobrenadante se les adicionó nuevamente 33 mL de solución saturada de sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 40% de igual manera.
- 5) Se centrifugó la muestra a las mismas condiciones.
- 6) A los 233 mL de sobrenadante obtenido se les adicionó 116 mL de solución saturada de sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 60% de igual manera.
- 7) Se dializaron las muestras precipitadas con una membrana (Membrana en tubo de 1.7 mL / cm, mw 6000-8000 Spectrapor 1), para ello las fracciones precipitadas se resuspendieron en la mínima cantidad de PBS en el caso de la fracción de 0-30% de saturación fue de 1 mL, para la fracción del 30-40% de saturación fue de 5 mL y para la de 40-60% de saturación fue de 3 mL.
- 8) Las tres membranas que contenían las muestras se colocaron en 1 L de PBS (ver Apéndice I) en el cuarto frío a 4 °C y con agitación por toda la noche. Se realizó posteriormente un cambio de PBS, se dejó en agitación por 1 hora más a 4 °C.

8. Determinación del título del anticuerpo.

Se utilizó básicamente la técnica de Western blot con algunas modificaciones (Burnette, 1981).

Procedimiento.

- 1) Para la determinación del título de los anticuerpos se preparó un extracto protéico de hoja de espinaca, se midió la concentración de proteína total y se cargaron 20 μg de proteína total en 9 carriles de un gel de SDS PAGE al 12%, así como 5 μL de un marcador de peso molecular (Low-range Promega).
- 2) Se corrió el gel y posteriormente se realizó una transferencia a membrana de nitrocelulosa (Western blot), después se tiñó la membrana con Ponceau S (ver Apéndice I) y se cortó tomando como guía los carriles de proteínas que son muy visibles con dicho colorante.
- 3) Se marcó cada una de las tiras de nitrocelulosa obtenidas y se bloquearon con 10 mL de una solución de leche en polvo al 5% (p/v) en TBS (ver Apéndice I) por 1 hora a temperatura ambiente.
- 4) Posteriormente cada una de estas tiras se incubaron con diferentes diluciones del anticuerpo obtenido contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca durante toda la noche a 4 °C.
- 5) Se lavaron dos veces las tiras de nitrocelulosa con 10 mL de TBS-T (ver Apéndice I) con agitación por 15 minutos a temperatura ambiente y se revelaron a diferentes tiempos (5, 15 y 30 segundos y a 1 minuto).
- 6) Una vez que se obtuvieron las películas del revelado se analizaron y se determinó el título del anticuerpo, considerando que el título es la dilución máxima de anticuerpo a la cual se distingue claramente la banda correspondiente a la proteína de interés.

9. Western blot.

Se utilizó el método de Towbin *et al.* (1979), que es un ensayo rápido y sensible para la detección y caracterización de proteínas, se basa en el reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo y el reconocimiento de este último por un segundo anticuerpo conjugado a una enzima, que al entrar en contacto con sus sustratos desarrolla color o luminiscencia que puede ser medida. El antígeno se separa electroforéticamente y es transferido a un papel de nitrocelulosa (unión irreversible) por medio de un voltaje.

Procedimiento.

- 1) Después que se corrió un SDS-PAGE, se desmontó el equipo y sin teñir se dejó el gel 15 minutos en la solución para transferencia (ver Apéndice I) para pre-equilibrar el gel.
- 2) Se cortó una membrana de nitrocelulosa de 6x8.5 cm y se mojó con la solución para transferencia por 15 minutos.
- 3) Se cortaron seis pedazos de papel 3MM de 6.5x9 cm y al igual que la membrana se humedecieron en la solución para transferencia.
- 4) Se ensambló el Cassette de acuerdo al instructivo anexo y se instaló en el aparato.
- 5) Se corrió la electrotransferencia a 100 V por 1 hora.
- 6) Se desmontó la electrotransferencia y la membrana se tiñó en solución de Ponceau S (ver Apéndice I) por 10 minutos. Se retiró la membrana de la solución y se lavó con agua desionizada hasta que las bandas de las proteínas fueron visibles.
- 7) Se bloqueó la membrana por 1 hora en solución de leche al 5% en TBS (Apéndice I).
- 8) Se incubó la membrana con el anticuerpo producido contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca (las diluciones empleadas del anticuerpo fueron diferentes para cada tipo de experimento) en TBS con leche al 5% por 1 hora a 37 °C.
- 9) Se hicieron dos lavados de 15 minutos con TBS-T (ver Apéndice I) a la membrana.
- 10) Se incubó la membrana con el segundo anticuerpo (el cual esta dirigido contra IgGs de conejo y que esta conjugado a una enzima peroxidasa) en una dilución 1:2000 por 1 hora en TBS con leche al 5% a temperatura ambiente.
- 11) Se lavó la membrana dos veces con TBS-T por 15 minutos.
- 12) Se reveló de acuerdo con el protocolo del ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

10. Purificación del anticuerpo empleando antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa.

Existen diferentes métodos para purificar anticuerpos aquí se emplea la purificación sobre un soporte sólido que en este caso es una membrana de nitrocelulosa. Este método se basa en la unión específica que existe entre el antígeno y el anticuerpo.

La técnica consiste en la fijación del antígeno a un soporte sólido seguida por la unión de los anticuerpos y la posterior elución de los mismos, lográndose con ello la separación de los anticuerpos específicos de aquellos que no lo son (Coligan *et al.* 1989).

Procedimiento.

- 1) Se corrieron en dos geles preparativos 100 μg de la proteína 24RNP recombinante de espinaca purificada en un PAGE-SDS (al 15 % de acrilamida).
- 2) Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Western blot). Se tiñó la membrana por 3 minutos con Ponceau S (ver Apéndice I) y se cortó la banda correspondiente a la proteína recombinante, lo más exacto posible para evitar la presencia de algunas otras proteínas con la ayuda de los marcadores de peso moleculares pre-teñidos.
- 3) Se puso el segmento de membrana con la proteína recombinante en un tubo falcon de 15 mL y se bloqueó con 5 mL de una solución de leche en polvo al 5% (p/v) en TBS (ver Apéndice I) durante 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente.
- 4) Se descartó la solución anterior y se agregaron 5 mL de una solución de leche en polvo al 5% (p/v) en TBS con el anticuerpo a purificar en una dilución 1:500.
- 5) Se incubó la membrana toda la noche a 4°C o 1 hora a 37°C con agitación.
- 6) Se lavó dos veces con agitación por 15 minutos con 5 mL de TBS-T (ver Apéndice I) a temperatura ambiente.
- 7) Se eluyó incubando la membrana con 2 mL de la solución para elución de anticuerpos (ver Apéndice I) por 10 minutos.
- 8) Se tomó la elución y se neutralizó inmediatamente con Tris base 1 M (sin ajustar el pH) (ver Apéndice I). Previamente se determinó cuanta solución de Tris había que agregar para neutralizar 2 mL de la solución para elución de anticuerpos (pH 2.5), con el objeto de emplear la cantidad exacta al momento de eluir los anticuerpos (aproximadamente 335 μL). Esto se hizo poniendo en un tubo 2 mL de la solución para la elución de los

anticuerpos y agregado cantidades conocidas de la solución de Tris y verificando con Trocitos de papel pH (con intervalo estrecho de detección), el momento en el que la solución para elución esta neutralizada es cuando alcanza un pH de 7.

- 9) Se repitió el paso 7 pero se dejó solo 5 minutos en agitación. Esto produjo 4 mL de eluido.
- 10) Se incubó la membrana nuevamente con una solución de anticuerpo nuevo a purificar durante 1 h a 37 °C. Y se repitió el procedimiento de elución del anticuerpo.
- 11) Se juntaron las dos eluciones (8 mL) y se concentraron empleando un Centricon 10 hasta lograr tener 1 mL del eluido. Después de concentrar el anticuerpo se probó en un Western para determinar si hubo purificación.

11. Extracción de proteínas de tejidos vegetales (Phayre, 1998).

Procedimiento.

- 1) Se preparó la solución para extracción (Apéndice I) y se dejó enfriar.
- 2) Se pesaron 0.5 g de hojas jóvenes de espinaca que previamente habían sido lavadas con agua destilada para evitar impurezas.
- 3) Se trasasó el tejido a un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL frío para llevar a cabo la molienda.
- 4) Se introdujo el tubo de microcentrifuga con el material vegetal en un recipiente con nitrógeno líquido, con el fin de congelar la muestra.
- 5) Se procedió a moler el tejido con un embolo hasta obtener un polvo muy fino, evitando en todo momento que el material vegetal se descongelara adicionando pequeñas cantidades del nitrógeno líquido durante toda la molienda.
- 6) Se adicionó la solución para extracción fría al material vegetal molido y se esperó a que se descongelara en un baño de hielo con agua.
- 7) Se centrifugó el extracto a 3000 g por 2 segundos a 4 °C.
- 8) Se recuperó el sobrenadante y se puso tubos limpios previamente etiquetados, los cuales se guardaron a -70 °C para su posterior utilización.
- 9) Se procedió a la medición de proteínas tomando una pequeña alícuota.

12. Medición de concentración de proteínas.

Para la medición de proteínas existen diversos métodos entre los que se encuentran los métodos colorimétricos en los cuales un reactivo químico es agregado a la muestra protéica produciendo como resultado un cambio en el color que será proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Este cambio de color se mide con un espectrofotómetro y comparando con una curva estándar, en la cual se conocen las concentraciones de proteína que están reaccionando con el reactivo químico. La cantidad de proteína en la muestra puede ser interpolada usando la absorbancia y comparando con la curva estándar.

Para la medición de la concentración de proteínas se empleó el reactivo de Bio-Rad: Bio-Rad protein Assay (cat No 500-0006), es un ensayo colorimétrico simple, basado en el procedimiento de enlace del colorante de Bradford (Bradford, 1976) leyendo a una longitud de onda de 595 nm. Para la elaboración de la curva patrón se utilizó albúmina de suero de bovino (BSA).

VIII. RESULTADOS.

1. Obtención de la proteína 24RNP recombinante.

a) Análisis en pequeña escala.

Para la obtención de la proteína recombinante se partió de una colonia de M15 transformada con pQE-24RNP capaz de ser inducida para sobre-expresarse a la proteína. Esta clona se generó previamente subclonando en fase la secuencia de la proteína 24RNP madura de espinaca en el vector pQE-30 (Toledo, 1998). Dicho vector produce un alto nivel de expresión de la proteína en *Escherichia coli* y además permite el etiquetado de la misma por medio de seis histidinas en el extremo amino terminal, lo que facilita su purificación utilizando una resina de níquel. La cepa M15 de *Escherichia coli* posee varias copias del plásmido represor pREP4 que porta el gen *lacI* el cual codifica el represor *lac*. Los niveles altos del represor aseguran una regulación controlada de la expresión de la proteína recombinante. Para la inducción de la expresión de la proteína 24RNP se utiliza como inductor una molécula similar a la lactosa (IPTG) (Toledo, 1998).

Los experimentos de inducción de la expresión de la proteína 24RNP madura se realizaron en pequeña escala para comprobar que la colonia de M15 con pQE-24RNP mostraba buenos niveles de expresión. Además de cultivar las colonias positivas se cultivaron los siguientes controles:

1. M15 sin pQE sin inducir.
2. M15 sin pQE inducida.
3. M15 con pQE sin inducir.
4. M15 con pQE inducida.
5. M15 con pQE-24RNP sin inducir.

Con estos cultivos se realizaron extractos bacterianos totales con solución 8M de Urea y se analizaron por SDS-PAGE de acuerdo a los protocolos descritos en materiales y métodos (Figura 3).

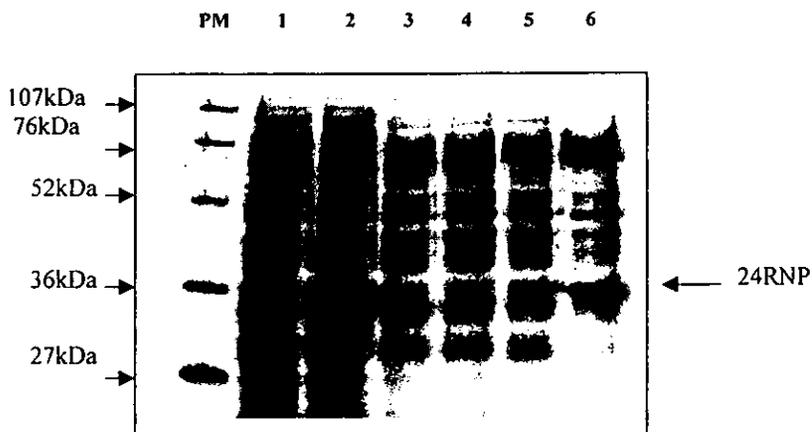


Figura 3. Inducción de la síntesis de la proteína 24RNP en pequeña escala.

La inducción se llevó a cabo con 1 mM de IPTG por 4 horas a 34 °C. Gel de acrilamida al 12% teñido con Coomassie: Se cargaron 45 μ L (200 μ L totales) de extractos bacterianos. PM) Marcador de peso molecular; 1) extractos bacterianos de: M15 sin pQE sin inducir; 2) M15 sin pQE inducida; 3) M15 con pQE sin inducir; 4) M15 con pQE inducida; 5) M15 con pQE-24RNP sin inducir; 6) M15 con pQE-24RNP inducida.

En la Figura 3 carril 6 se ve claramente una banda correspondiente a la proteína 24RNP recombinante, la cual no se observa en las demás muestras control. Esto indica que la proteína se sobre expresaba únicamente en las células transformadas con el vector pQE que contuviera al inserto del gen 24RNP, bajo condiciones de inducción. Cabe mencionar que la proteína 24RNP recombinante migra alrededor de los 30kDa.

b) Análisis a gran escala y purificación de la proteína 24 RNP.

Después de comprobar que sí se llevaba a cabo la inducción en pequeña escala de la proteína 24 RNP recombinante de espinaca, se realizó una inducción a gran escala en las mismas condiciones y guardando proporciones. Para ello se utilizó la técnica descrita en materiales y métodos en la cual el sobrenadante obtenido a partir de células lisadas con solución 8M de urea es incubado con la resina Ni-NTA que posee una alta afinidad por la etiqueta de seis histidinas con la que fue marcada la proteína 24RNP recombinante. Para llevar a cabo una buena purificación de la proteína recombinante, primero se realizó una elución de la proteína utilizando un gradiente de concentración de imidazol para conocer la concentración óptima a la cual eluye la proteína (Figura 4). En el carril 4 de la Figura 4 se puede observar una banda muy intensa correspondiente a la proteína 24RNP recombinante, lo que nos indicó que la proteína eluía preferentemente a una concentración de 200 mM de imidazol. Basándose en el resultado anterior y en experimentos adicionales no mostrados, se decidió llevar a cabo la elución de la proteína utilizando 10 lavados con 250 mM de imidazol. Dichos lavados se analizaron en un gel desnaturalizante al 12% para determinar las fracciones que se tenían que juntar. Se observó que la proteína se encontraba presente en las eluciones 1 a 8 por lo que fueron estas fracciones las que se concentraron. Cabe mencionar que era necesario incubar el sobrenadante del lisado bacteriano nuevamente con la resina de níquel ya que todavía había proteína recombinante sin haberse purificado.

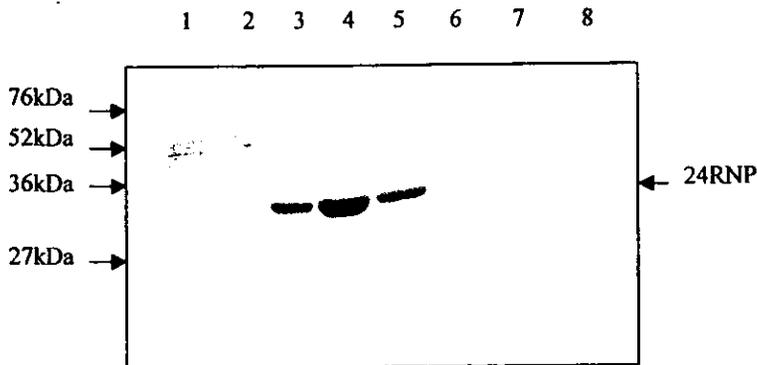


Figura 4. Elución a diferentes concentraciones de imidazol de la proteína 24RNP recombinante de espinaca. Gel de acrilamida al 12% tefido con Coomassie. 1) Primer lavado con solución B; 2) primer lavado con solución C; fracciones eluidas con imidazol 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM (carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente).

2. Producción de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante.

Después de que se realizaron siete inducciones a gran escala, con la posterior purificación de la proteína 24RNP recombinante se obtuvieron 8 mg de proteína los cuales fueron utilizados para inyectar dos conejas Nueva Zelanda de 3Kg de peso cada una, previa obtención de suero pre-inmune (suero control), utilizando el protocolo descrito en materiales y métodos. Transcurridas 4 semanas se realizó una sangría de prueba para verificar la producción de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante y el suero obtenido se probó por medio de una inmuno-difusión doble u Ouchterlony en la que se formaron bandas de precipitación que se visualizaron a trasluz, considerándose de esta manera una reacción positiva para ambos sueros obtenidos. Cabe señalar que el suero de la coneja 2 presentó bandas de precipitación con las muestras de 3.0µg a 0.3µg de proteína 24RNP recombinante cargada, mientras que el suero de la coneja 1 solo presentó bandas de precipitación con las muestras de 3.0µg a 0.5µg de proteína 24RNP recombinante cargada. Con los resultados anteriores se decidió llevar a cabo la sangría de cosecha de ambas conejas para comparar los sueros inmunes obtenidos.

3. Determinación del título de los anticuerpos crudos 1 y 2.

Se determinó el título del anticuerpo crudo obtenido a partir de la coneja 1 (anticuerpo 1) y a partir de la coneja 2 (anticuerpo 2) por medio de un Western blot, para conocer la dilución a la cual el anticuerpo solo reconociera una banda. Para ello se prepararon extractos protéicos de hoja joven de espinaca, por medio de la técnica descrita en materiales y métodos. Se midió la cantidad de proteína total y se cargaron dos geles de acrilamida al 15% con una cantidad constante de proteína (20 µg de proteína total de extracto de hoja joven de espinaca). Se transfirieron a dos membranas de nitrocelulosa y se tñieron con Ponceau S; se cortaron en 14 partes, se bloquearon con 5% de leche en TBS y se incubaron con el anticuerpo a diferentes diluciones (Figuras 5A y 5B).

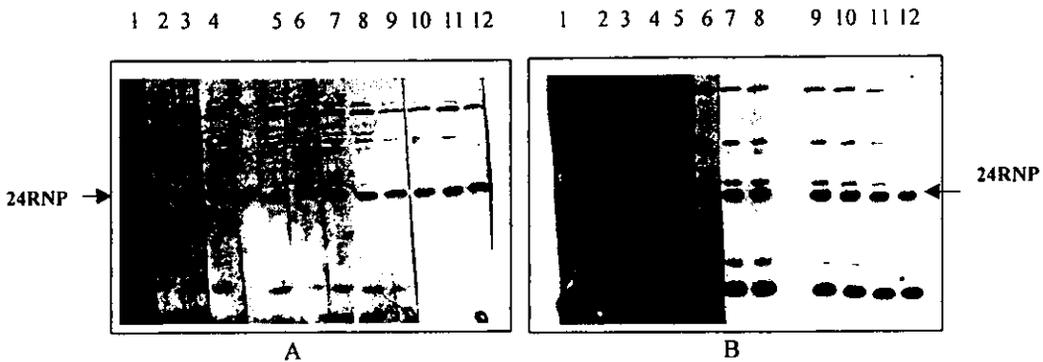


Figura 5. Determinación del título de los anticuerpos crudos 1 y 2. Western blot con anticuerpos 1 y 2 anti-24RNP recombinante de espinaca revelado por ECL. Se cargaron en cada carril 20µg de proteína total de extracto de hoja joven de espinaca. A. Anticuerpo 1, B anticuerpo 2. Se probaron las mismas diluciones para ambos. 1) 1:500; 2) 1:1,000; 3) 1:2,000; 4) 1:3,000; 5) 1:4,000; 6) 1:5,000; 7) 1:6,000; 8) 1:7,000; 9) 1:8,000; 10) 1:9,000; 11) 1:10,000; 12) 1:11,000.

Se probaron diluciones más altas a 1:11,000 para ver si las bandas inespecíficas disminuían pero se notó que la banda de interés también desaparecía por lo que se determinó que el título estaría alrededor de 1:11.000 para ambos anticuerpos crudos. Cabe señalar que en dicho experimento no se puso la proteína 24RNP recombinante porque se había probado en experimentos anteriores que el anticuerpo sí estaba reconociendo a la proteína recombinante.

4. Purificación de anticuerpos crudos 1 y 2.

Debido a que el anticuerpo también se requería para ensayos de inmunosubstracción, se decidió llevar a cabo una purificación de los anticuerpos, para evitar de esta manera el secuestro inespecífico de proteínas diferentes a la 24RNP presentes en los extractos protéicos de cloroplasto de espinaca.

a) Purificación de inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.

La purificación de los anticuerpos se inició con una precipitación con sulfato de amonio. En la sangría de cosecha se obtuvieron de la coneja 1: 100 mL de sangre y 250 mL de sangre mezclada con suero glucosado y de la coneja 2: 90 mL de sangre y 300 mL de sangre mezclada con suero glucosado. Después de realizar una centrifugación a 10,000 g por 20 minutos para separar el suero del paquete celular, se obtuvieron 60 mL de suero y 120 mL de suero mezclado con suero glucosado de la coneja 1 y 50 mL de suero más 140 mL de suero mezclado con suero glucosado de la coneja 2. Las fracciones de suero mezclado con suero glucosado de ambas conejas se precipitaron con el sulfato de amonio en los siguientes intervalos de saturación 0-30%, 30-40%, 40-60%. Se eligieron estos intervalos de saturación porque se sabe que la inmunoglobulina G (IgG) precipita entre 30-40% de saturación con sulfato de amonio (Harlow y Lane, 1988).

Se procedió a probar las fracciones obtenidas en la precipitación con sulfato de amonio de ambas conejas por medio de un Western blot en el cual se pusieron 100 ng de proteína recombinante y 20 µg de proteína total de espinaca para cada una de las fracciones. La comparación de las fracciones obtenidas se presenta en las Figuras 6 y 7. Las diluciones que se probaron de ambos anticuerpos se decidieron con base en las diluciones probadas con los anticuerpos crudos y tomando en cuenta que cuando se lleva a cabo una precipitación con sulfato de amonio se concentra el anticuerpo. Además de utilizar el anticuerpo precipitado, también se probó el anticuerpo crudo y el suero preinmune de ambas conejas para descartar la posibilidad de que la señal que se detectaba estaba presente desde antes de la inmunización (Figuras 6 y 7).

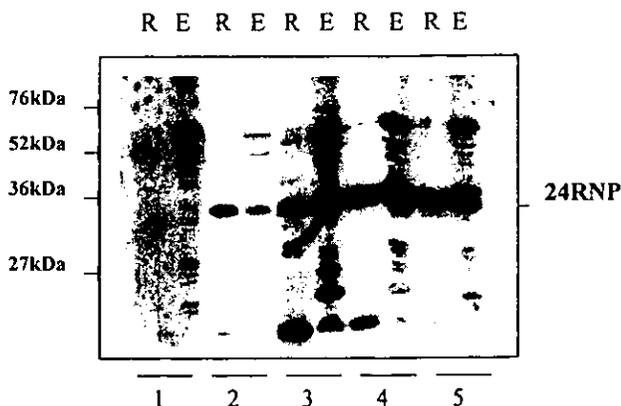


Figura 6. Reconocimiento de la proteína 24RNP por IgGs purificadas a partir del anticuerpo crudo 1 con sulfato de amonio (0-30 %, 30-40 %, 40-60 %). Western blot con anticuerpo 1 anti-24RNP recombinante de espinaca. Revelado por ECL. Se cargaron en el gel 100 ng de proteína recombinante (R) y 20 µg de extracto total de hojas jóvenes de espinaca (E), en el mismo orden y en todos los casos: 1) suero pre-inmune (1:11,000); 2) anticuerpo crudo (1:11,000); 3) anticuerpo precipitado en 0-30% de saturación (1:18,000); 4) suero precipitado en 30-40% de saturación (1:18,000); 5) anticuerpo precipitado en 40-60% de saturación (1:18,000).

En la Figura 6 podemos ver que el suero pre-inmune (1), correspondiente a la coneja 1, efectivamente no detectaba a la proteína 24RNP nativa y recombinante lo que indicó que la señal observada alrededor de 30 kDa se debía a la producción de anticuerpos anti-24RNP; aunque sí existieron señales inespecíficas (señales de fondo). En cuanto a la precipitación del anticuerpo crudo 1, ésta no fue tan específica como se esperaba, ya que se puede ver en la Figura 6 (Carriles 3, 4, 5) que la intensidad de las bandas en todos los intervalos de precipitación fue casi la misma.

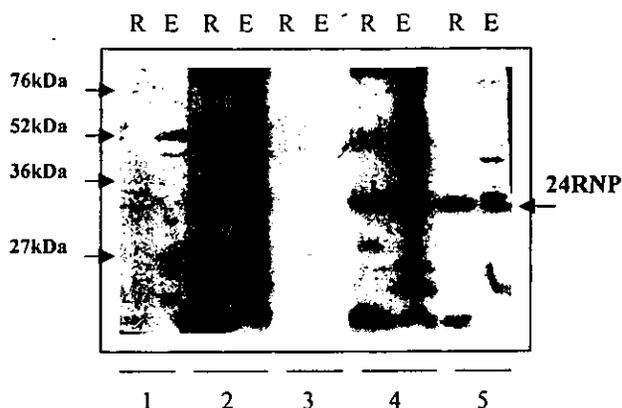


Figura 7. Reconocimiento de la proteína 24RNP por IgGs purificadas a partir del anticuerpo crudo 2 con sulfato de amonio (0-30 %, 30-40 %, 40-60 %). Western blot con anticuerpo 2 anti-24RNP recombinante de espinaca. Revelado por ECL. Se cargaron en el gel 100 ng de proteína recombinante (R) y 20 μ g de extracto total de hojas jóvenes de espinaca (E), en el mismo orden y en todos los casos: 1) suero preinmune (1:11,000); 2) anticuerpo crudo (1:11,000); 3) anticuerpo precipitado en 0-30% de saturación (1:18,000); 4) anticuerpo precipitado en 30-40% de saturación (1:18,000); 5) anticuerpo precipitado en 40-60% de saturación (1:18,000).

El suero preinmune de la coneja 2 al igual que el de la coneja 1 no reaccionó con la proteína 24RNP tanto nativa como recombinante y presentó reacción inespecífica pero con menor intensidad que el de la coneja 1. Hay que señalar que en este caso la precipitación con sulfato de amonio resultó ser más eficiente, ya que como se puede apreciar en la Figura 7, la mayor cantidad de anticuerpo se encontraba en la fracción 30-40% (4) como se esperaba.

b) Determinación del título de los anticuerpos 1 y 2 precipitados.

Con los resultados obtenido anteriormente se decidió llevar a cabo la determinación del título de los anticuerpos 1 y 2 precipitados con 30-40% de saturación con sulfato de amonio por medio de un Western blot (Figura 8).

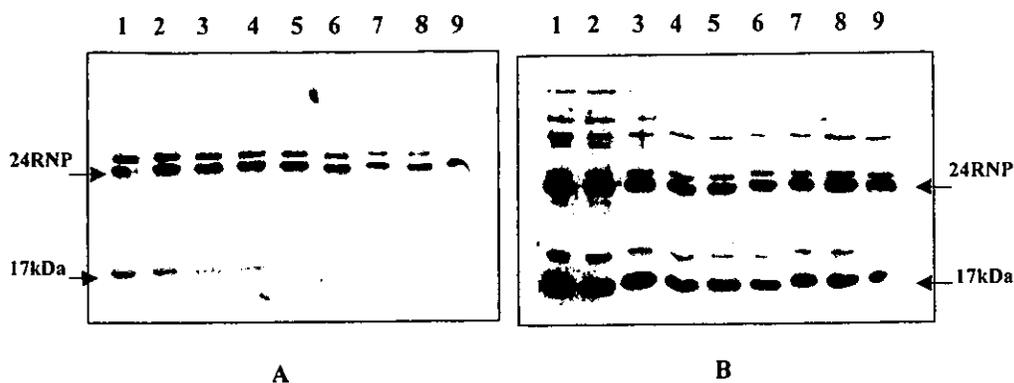


Figura 8. Título de anticuerpos 1 y 2 precipitados con sulfato de amonio (fracción 30-40%). Western blot con anticuerpos anti-24RNP recombinante de espinaca 1 y 2 precipitados con 30-40% de saturación de sulfato de amonio. Se cargaron en cada carril 20 μ g de proteína total de extracto de hoja joven de espinaca. A. Anticuerpo 1. B. Anticuerpo 2. Se probaron las mismas diluciones para ambos. 1) 1:15,000; 2) 1:20,000; 3) 1:30,000; 4) 1:40,000; 5) 1:50,000; 6) 1:60,000; 7) 1:70,000; 8) 1:80,000; 9) 1:90,000.

Con los resultados anteriores se puede decir que el título del anticuerpo 1 (Figura 8A, carril 9) es de 1:90,000, ya que es la máxima dilución a la cual todavía se detecta la banda correspondiente a la proteína 24RNP. El título del anticuerpo 2 no se pudo determinar aun cuando se probaron diluciones mayores de las mostradas en la figura 8B y lo que sí se pudo detectar fue que la banda de la 24RNP desaparecía y que la banda de 17 kDa persistía en todo momento.

c) Purificación del anticuerpo 2 empleando antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa.

1) Optimización del método.

Con los resultados anteriores se pudo observar que muchas de las bandas inespecíficas desaparecieron después de la precipitación con sulfato de amonio pero aún así algunas persistieron, en especial el anticuerpo 2 presentaba una banda alrededor de 17 kDa. Debido a que el anticuerpo era necesario para ensayos de inmunocalización y dado que es recomendable que el anticuerpo a utilizar en dichos ensayos tenga una alta afinidad por el antígeno, se decidió purificar el anticuerpo 2, el cual detectó a la proteína a diluciones más altas de 1:90,000. Para esto se llevó a cabo una segunda purificación utilizando antígenos inmovilizados en membrana de nitrocelulosa.

Para optimizar la técnica de purificación de anticuerpo, se realizaron diferentes experimentos primero para saber: a) cuantas veces se podía utilizar un mismo anticuerpo en la purificación, b) la cantidad de proteína recombinante necesaria para purificar el anticuerpo y c) cuantas veces se podía utilizar la membrana con antígeno para la purificación del anticuerpo.

Para resolver el primer punto se midió la cantidad de proteína presente en el anticuerpo 2 (1:500) antes y después de incubar con la proteína 24RNP recombinante (100 µg) unida a una membrana de nitrocelulosa. Al comparar la cantidad de proteína de ambas fracciones se observó que en la segunda fracción la cantidad de proteína era muy pequeña, lo que indicó que la mayoría del anticuerpo quedó unido al antígeno de la membrana.

Para resolver el punto b) lo que se hizo fue transferir 100 y 200 µg de proteína recombinante a la membrana de nitrocelulosa e incubar por separado con la misma cantidad de anticuerpo (1:200) las fracciones de membrana que la contenían, posteriormente se eluyó el anticuerpo que se unió a las dos fracciones de membranas y se midió la proteína presente en los dos eluidos. No se observaron diferencias entre ambas cantidades de proteína. Por lo que se decidió que la cantidad de proteína recombinante óptima era de 100 µg.

Para resolver el punto c) se midió la cantidad de proteína presente en el anticuerpo 2 antes y después de incubar con la proteína 24RNP unida a la membrana de nitrocelulosa que ya había sido utilizada previamente para la purificación del anticuerpo. El resultado

obtenido fue que la segunda incubación solo depletaba la mitad del anticuerpo respecto de la membrana sin utilizar; es decir que la membrana solo tenía un rendimiento del 50% con respecto al original por lo que se decidió que la membrana solo se podría utilizar dos veces a reserva de que la segunda vez quedara anticuerpo sin unirse al antígeno.

2) Purificación del anticuerpo 2.

Después de la optimización del método se realizó la purificación del anticuerpo 2, se concentró el anticuerpo y se probó por medio de un Western blot para determinar si la purificación estaba funcionando. Se utilizó tanto la proteína recombinante como extractos protéicos totales de espinaca. Debido a la existencia de una proteína homóloga a la 24RNP de espinaca en *Arabidopsis thaliana* (29RNP) se decidió probar los anticuerpos con extractos protéicos de esta planta para ver si reconocían a dicha proteína y de esta manera utilizar los mismos anticuerpos para estudios posteriores en *Arabidopsis thaliana* (Figura 9).

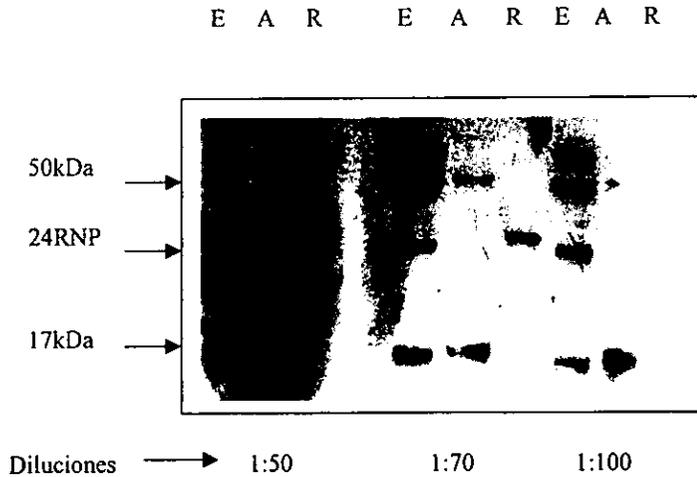


Figura 9. Purificación del anticuerpo 2 empleando la proteína recombinante unida a nitrocelulosa. Western blot con anticuerpo 2 anti-24RNP recombinante de espinaca precipitado con 30-40% de saturación de sulfato de amonio y purificado con la 24RNP unida a membrana de nitrocelulosa. E) extracto de hoja joven de espinaca (20 µg de proteína total); A) extracto de hoja joven de *Arabidopsis thaliana* (30 µg de proteína total); R) proteína recombinante (100 ng). Diluciones probadas de anticuerpo 1:50; 1:70; 1:100.

En la Figura 9 se puede apreciar claramente la presencia de bandas inespecíficas que pueden deberse a que la purificación no es eficiente o a la formación de complejos de alto peso molecular de la proteína para el caso de las dos bandas mayores a 50kDa y a la degradación de la proteína para el caso de la banda de 17kDa. Además se descarta la posibilidad de utilizar el anticuerpo 2 para estudios de la 29RNP de *Arabidopsis thaliana*. Cabe señalar que el corrimiento de la proteína 24RNP recombinante es mucho menor en geles al 15% de acrilamida de ahí que la banda de la proteína recombinante no coincide con la banda de la proteína nativa.

3) Degradación y formación de complejos.

Para descartar que la presencia de bandas de diferentes tamaños se debía a la formación de complejos de alto peso molecular de la proteína 24RNP o a la degradación de la misma, se llevo a cabo un Western blot revelado con el anticuerpo 2 purificado con la membrana con antígenos en el cual se probaron extractos protéicos tratados de diferente manera. Para descartar que las bandas de mas de 50kDa se debían a la formación de complejos, lo que se hizo fue tratar la muestra con el doble de β -mercaptoetanol y SDS. Para descartar que la banda de 17kDa era producto de la degradación de la proteína lo que se hizo fue correr una muestra que estaba congelada, un extracto nuevo con una mezcla de inhibidores de proteasas, un extracto solamente con solución de corrida. Adicionalmente se cargó la proteína recombinante como control y un extracto de cloroplastos intactos de espinaca (Figura 10). Con los resultados obtenidos se sugiere rechazar ambas posibilidades ya que podemos ver un mismo comportamiento del anticuerpo purificado hacia todas las muestras a excepción de la proteína recombinante (carril R, Figura 10). Cabe mencionar que en algunos de los casos (carriles EI, EB, ED de la Figura 10) las señales correspondientes a las proteínas: 24RNP, 17kDa y a la 50kDa se ven mucho más débiles lo que pudo deberse a que la muestra no fue cargada correctamente.

El objetivo de cargar el extracto de cloroplastos intactos de espinaca fue el conocer si el anticuerpo también reconocía bandas inespecíficas y de no ser así el anticuerpo 2 se podría utilizar para los ensayos de inmunoprecipitación de cloroplastos intactos de espinaca, lo que se descartó debido a que sí se presentaron bandas inespecíficas (carril C, Figura 10) por lo que se tuvo que buscar otra forma de purificar el anticuerpo 2.

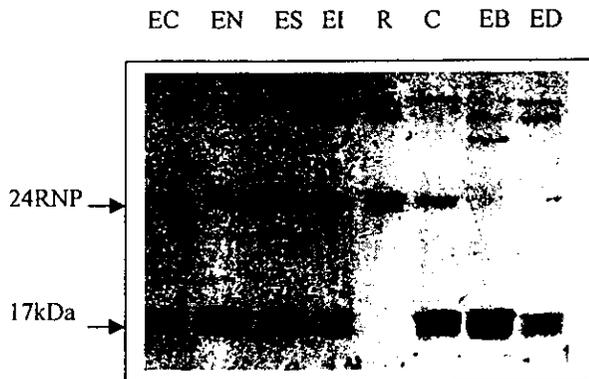


Figura10. Formación de complejos o degradación de la proteína 24RNP. Western blot con anticuerpo 2 anti-24RNP recombinante de espinaca purificado (1:100), revelado por ECL. Se cargaron 20 μ g de proteína total de hoja de espinaca. EC) extracto de espinaca congelado; EN) extracto de espinaca nuevo; ES) extracto de espinaca nuevo en solución de corrida; EI) extracto de espinaca con inhibidores de proteasas; R) proteína recombinante (100 ng); C) extracto de cloroplastos intactos de espinaca (10 μ g de proteína); EB) extracto de espinaca con β -mercaptoetanol, ED) extracto de espinaca con SDS.

En un último intento por purificar el anticuerpo 2 lo que se hizo fue utilizar el mismo método de purificación pero variando el antígeno soportado en la membrana, es decir lo que ahora se transfirió fue un extracto total de hoja joven de espinaca y después de localizar la proteína 24RNP en la membrana, se cortó tanto la banda de interés como la banda de 17kDa y se incubaron todas las fracciones de membrana, intentando con ello que los anticuerpos menos específicos se pegaran a las demás proteínas y los anticuerpos más específicos se pegaran a la 24RNP y a la proteína de 17kDa. Después de eluir y concentrar tanto los anticuerpos de la proteína 24RNP como los de la proteína de 17kDa, se realizó un Western para verificar la purificación de los anticuerpos (Figura 11). En estos resultados se puede apreciar que aún cuando los anticuerpos probados fueron obtenidos a partir de la elución de la banda de 17 kDa estos reconocieron a la proteína 24RNP tanto nativa como recombinante, aunque con menor intensidad (anti-17, figura 11); otra de las cosas que se puede apreciar es que los anticuerpos obtenidos a partir de la elución de la banda de la

proteína 24RNP solo reconocieron dos bandas, una correspondiente a la 24RNP y la otra a la 28RNP en el extracto de hoja joven de espinaca (Figura 11, anti-24RNP; carril E) y una banda correspondiente a la 24RNP recombinante (Figura 11, anti-24RNP; carril R). Estos resultados indican que el método posiblemente funcione mejor que el anterior, pero aún así no se pudo descartar que la ausencia de bandas inespecíficas se debió a una mejor purificación o a que la cantidad de anticuerpo obtenido después de la purificación fue mucho menor que en las veces anteriores; es decir que anticuerpo se encontraba más diluido y por lo tanto no se detectó la presencia de bandas inespecíficas. Esto parece ser lo más factible, ya que la cantidad de proteína nativa que se utilizó para la purificación fue menor (20 μg) que la cantidad de proteína recombinante utilizada (100 μg). Cabe señalar que la banda de la proteína recombinante no concuerda con la banda de la proteína nativa, debido a que el corrimiento de la proteína recombinante en geles del 15% de acrilamida es menor (experimentos mostrados previamente). Por otro lado se disminuyó la cantidad de proteína recombinante en el gel debido a que en otros experimentos se pudo apreciar que los anticuerpos tenían más afinidad por dicha proteína y se daba el caso de que no detectaban la proteína nativa.

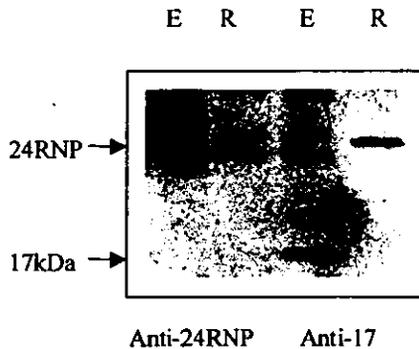


Figura 11. Purificación de anticuerpo 2 con proteína 24RNP de espinaca. Western blot con anticuerpo purificado anti -24RNP de espinaca y anticuerpo anti-17 (Dilución 1:20), revelado por ECL. E) extracto de hoja joven de espinaca (20 μg de proteína total); R) proteína recombinante (30 ng).

5. Reconocimiento de la 24RNP en diferentes extractos protéicos.

Después de varios intentos para purificar el anticuerpo 2 por diferentes métodos se descartó la posibilidad de purificarlo, por lo que se decidió probar el anticuerpo con diferentes extractos protéicos de espinaca y determinar la cantidad de proteína 24RNP presente (Figura 12). En este experimento interesaba analizar un extracto de procesamiento, que es una fracción protéica purificada de cloroplastos intactos de espinaca, con el fin de determinar si el anticuerpo reconocía a la proteína 24RNP y utilizarlo para estudiar la función de la misma.

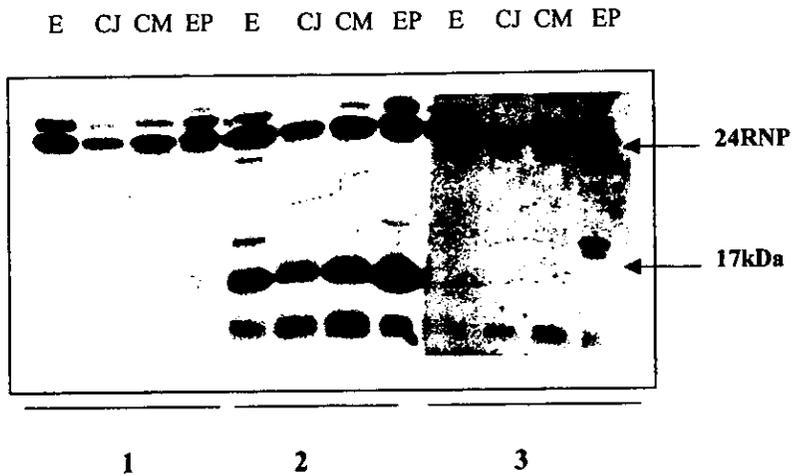


Figura 12. Reconocimiento de proteína 24RNP en diferentes extractos protéicos de espinaca por los anticuerpos 1 y 2. Western blot con anticuerpo 1 y 2 anti-24-RNP recombinante de espinaca. Revelado por ECL. Se cargaron en el gel 30 μ g de extracto total de hojas jóvenes de espinaca (E), de cloroplastos intactos de hoja joven (CJ), de cloroplastos intactos de hoja madura (CM) y de extracto de procesamiento (EP) en el mismo orden y en todos los casos 1) anticuerpo crudo 1 (1:11,000); 2) anticuerpo crudo 2 (1:11,000); 3) anticuerpo 1 precipitado fracción 30-40% de saturación (1: 90,000).

Se puede apreciar en la Figura 12 que aún cuando se utilizó el mismo antígeno para inyectar a las conejas, la respuesta inmune fue muy diferente ya que el anticuerpo crudo 2 (1:11,000) reconoce a una proteína de 17 kDa (carril 2) en todas las muestras probadas,

proteína que no es reconocida por el anticuerpo 1 tanto crudo (1:11,000) como precipitado con 30-40% de saturación con sulfato de amonio (1:90,000) (carriles 1, 3). Con respecto al reconocimiento de la proteína 24RNP en los extractos protéicos por los anticuerpos , se observa claramente que la mayor cantidad de proteína 24RNP se encuentra en el extracto de procesamiento (Figura 12, carril EP). Esto es lógico debido a que en el extracto de procesamiento se espera un enriquecimiento de la 24RNP. Por otro lado se puede observar en orden decreciente de magnitud que la proteína se encuentra en mayor cantidad en el extracto de hoja joven de espinaca, luego en el extracto de cloroplastos intactos de hoja madura y por último en el extracto de cloroplastos intactos de hoja joven.

Para estudios posteriores se sugiere el uso de los anticuerpos crudos 1 y 2 a una dilución 1:11,000 en ensayos de detección de la proteína 24RNP y el uso del anticuerpo 1 precipitado (fracción 30-40%) para ensayos de inmunoprecipitación.

Sería muy interesante estudiar con dichos anticuerpos a la proteína que se presume podría ser la 28RNP, la cual presenta reacción cruzada con los anticuerpos 1 y 2 obtenidos en este trabajo.

VIII. DISCUSIÓN.

1. Expresión de la 24RNP en un sistema bacteriano.

El sistema utilizado para obtener proteína recombinante (pQE), es una de las mejores opciones que existen actualmente debido a que posee un represor muy fuerte que evita la expresión del gen clonado hasta su inducción con IPTG. El tener un buen sistema de control de la expresión es importante cuando se trabaja con proteínas que pueden ser tóxicas y de haber fugas en los vectores de expresión se provocan problemas de muerte celular (Toledo, 1998).

El sistema pQE fue efectivo para la expresión de la 24RNP, más a pesar de obtenerse la proteína de interés en grandes cantidades (1 mg/ L de cultivo) ante la inducción con IPTG, se tuvo el problema de que cuando las bacterias crecían durante la inducción a una temperatura superior a 34°C el rendimiento disminuía considerablemente, lo cual pudo deberse a que se promovía más rápidamente el crecimiento celular y no se daba el tiempo necesario para que la proteína fuera expresada.

El método de expresión a utilizar dependerá del uso que se le quiera dar a la proteína. En este caso se eligió a *Escherichia coli* ya que se ha visto que este sistema brinda un alto rendimiento en la generación de proteínas recombinantes (de 5-20 mg/ L de cultivo) (Wienk y Kruijff, 1999; Lili y Ram, 1999) objetivo que en este trabajo se buscaba.

Por otro lado comparando el sistema de expresión pQE con otros sistemas de expresión como son: células de mamíferos y sistemas eucariotes, este tiene una gran desventaja debido a que las proteínas producidas en él no presentan modificaciones postraduccionales, las cuales son muy importantes para el estudio de las funciones de algunas proteínas, por ello el sistema de expresión a utilizar dependerá del estudio que se vaya a realizar.

Para mejorar el rendimiento de la proteína 24RNP recombinante en experimentos futuros se sugiere primero la realización de curvas de crecimiento en pequeña escala variando diferentes parámetros como son: la temperatura de incubación antes y durante la inducción de la síntesis de la proteína, el tiempo de crecimiento antes y durante la inducción de la síntesis de la proteína, para con ello determinar las condiciones óptimas de síntesis protéica.

2. Purificación de la proteína 24RNP con una columna de níquel.

La etiqueta de histidinas que tiene el vector pQE ayudó a la purificación de la proteína, que se realizó de forma relativamente sencilla. Cabe mencionar que durante la purificación de la proteína 24RNP se observó que existían otras proteínas de distintos pesos moleculares que también presentaron afinidad hacia la resina. Esto pudo deberse a la presencia de aminoácidos con carga positiva que pudieran tener afinidad por el níquel.

Al realizar varias inducciones con el fin de obtener la cantidad de proteína necesaria para inyectar a dos conejas, el principal problema que se encontró fue que después de utilizar tres veces la misma resina de Ni-NTA ya no funcionaba, lo que se puede atribuir principalmente a que la resina era sometida durante la purificación a cambios drásticos de pH que pudieron afectar la carga negativa de la resina o también a que parte de la proteína no se despegaba de la resina y llegaba el momento en que ésta se saturaba.

3. Producción de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante.

La inmunización de conejas con la proteína 24RNP recombinante de espinaca se llevó a cabo durante seis semanas con lo cual se logró obtener un título de anticuerpos de hasta 1:90,000 después de precipitarse con sulfato de amonio. Estos anticuerpos detectaron tanto a la proteína 24RNP recombinante como a proteína silvestre en el orden de nanogramos. Aunque se les inyectó el mismo antígeno y por un mismo período de tiempo a ambas conejas, se observó más respuesta inmune por parte de la coneja 2 (títulos mas altos de 1: 90,000).

Se detectaron anticuerpos inespecíficos en contra de proteínas de espinaca presentes desde el suero pre-inmune en el Western blot, lo que se atribuyó a la alimentación que tuvieron las conejas. Es decir como los conejos fueron alimentados con una mezcla de vegetales, leguminosas y cereales pudieron producir anticuerpos en contra de proteínas vegetales que muy probablemente también se encuentran en los extractos de hoja joven de espinaca. Tal es el caso de la subunidad grande (55kDa) de la proteína Rubisco muy abundante en todos los vegetales.

Se recomienda para la obtención de anticuerpos policlonales más específicos contra algunas otras proteínas vegetales la inmunización de otros organismos como: gallinas,

cobayos, ratones y ratas, los cuales no están tan expuestos a vegetales que puedan despertar una respuesta inmunológica previa.

Por otro lado se ha visto que la obtención de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína 24RNP de espinaca es muy difícil, ya que esta proteína tiene una secuencia muy similar a otra proteína presente en los extractos de espinaca (28RNP) que genera una reacción cruzada con los anticuerpos (Phayre, 1998 comunicación personal; Toledo, 1998). Dicha reacción parecería factible de evitar si se lograran generar anticuerpos monoclonales contra el dominio ácido de la 24RNP, ya que es la región variable entre ambas proteínas. Sin embargo esto sería muy difícil sobre todo por el hecho de que el dominio ácido es muy pequeño.

4. Purificación de anticuerpos.

a. Purificación de Inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.

La purificación de Inmunoglobulina G (IgG) por medio de la precipitación con sulfato de amonio no funcionó como se esperaba, ya que las tres fracciones de 0-30%, 30-40%, 40-60% de saturación con sulfato de amonio del suero de la coneja 1 (anticuerpo 1), contenía grandes cantidades de IgG siendo que en la literatura se ha descrito que esta inmunoglobulina precipita al 40% de saturación con sulfato de amonio (Harlow y Lane, 1988). Al llevar a cabo la precipitación del suero de la coneja 2 (anticuerpo 2) se observó que la precipitación funcionó mejor y esto se puede atribuir a una mejor agitación, a la adición más lenta de la solución saturada de sulfato de amonio y a un tiempo de agitación más prolongado entre cada saturación, lo que permitió que la mayor parte de las IgGs precipitaran en el intervalo correspondiente.

Al determinar el título de las fracciones 30-40% de saturación con sulfato de amonio de ambos anticuerpos se observó que muchas de las bandas inespecíficas encontradas antes de la precipitación habían desaparecido aun cuando el anticuerpo se había concentrado, lo que indicó que la precipitación funcionó para purificar un poco dichos anticuerpos.

El método de purificación de IgG por medio de una precipitación con sulfato de amonio, resultó ser una técnica fácil de llevar a cabo, muy económica y además no fue necesaria la utilización de equipo sofisticado.

b. Purificación del anticuerpo 2 por medio de antígenos unidos a membranas de nitrocelulosa.

El método de purificación de anticuerpos utilizando antígenos unidos a un soporte sólido es uno de los más empleados para la purificación de anticuerpos policlonales (Harlow y Lane, 1988). En este trabajo se emplearon membranas de nitrocelulosa como soportes sólidos y la principal desventaja que se encontró fue que la cantidad de antígeno que se pudo fijar era muy pequeña (100 µg) comparado con otros soportes sólidos como son: el gel AminoLink, el gel CarboLink, el gel SulfiLink que pueden fijar hasta 5mg de antígeno/ mL de gel, de ahí que la cantidad de anticuerpo puro obtenido fue muy pequeña.

Adicionalmente no se pudo descartar completamente que la presencia de bandas inespecíficas después de llevar a cabo la purificación del anticuerpo 2 utilizando el método antes mencionado, se debiera a que el método de purificación no estaba funcionando. Sin embargo se considera poco probable ya que éste se basa en la reacción específica que existe entre antígeno y anticuerpo.

c. Degradación y formación de complejos.

La presencia de bandas inespecíficas de alto peso molecular después de llevar a cabo la purificación del anticuerpo 2, se puede considerar debido a la presencia de una proteína similar a la 24RNP de mayor peso molecular (55 kDa) que a la formación de complejos, ya que la adición de una mayor cantidad de β-mercaptoetanol y SDS a las muestras evita la formación de puentes disulfuro que son los responsables de la formación de complejos protéicos.

Para descartar completamente que la banda de 17 kDa detectada por el anticuerpo 2 después de la purificación es producto de una degradación de la proteína 24RNP lo que se sugiere hacer es purificar esta proteína y mandarla a secuenciar. En base la señal tan intensa que se observa en el Western blot con el anticuerpo anti-24RNP, lo más probable es que esta proteína comparta regiones estructurales semejantes con la 24RNP.

5. Reconocimiento de la 24RNP en diferentes extractos protéicos.

Se ha observado que la expresión de la proteína 24RNP es mucho mayor en hojas jóvenes que en hojas maduras (Abrahamson, 1995, no publicado) de ahí que se esperaba encontrar una mayor cantidad de proteína en el extracto de cloroplastos intactos de hoja joven que en el de hoja madura lo cual no fue así y que se puede atribuir principalmente que no se cargo bien la muestra lo que se refleja en la cantidad de proteína total realmente probada.

Por otro lado se puede observar una mayor cantidad de proteína 24RNP en el extracto de procesamiento que en las demás muestras probadas, cosa que era de esperarse ya que en este caso solo se tienen las proteínas presentes en el cloroplasto a diferencia de los demás extractos en cuales se tienen proteínas totales.

Llama la atención el reconocimiento de la proteína de 17 kDa solo por el anticuerpo 2 ya que si esta proteína fue inyectada junto con la proteína 24RNP a ambas conejas se esperaría que al menos el anticuerpo 1 la reconociera un poco, cosa que no fue así lo cual nos indica que el sistema inmune de cada organismo responde de diferente manera ante la presencia de moléculas extrañas.

IX. CONCLUSIONES.

1. Se logró una buena inducción de la síntesis y purificación de la proteína 24RNP recombinante de espinaca utilizando el sistema QIAexpressionist (QIAGEN).
2. En este trabajo se logró la obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra la 24RNP recombinante de espinaca, útiles para ensayos de inmunodetección

X. APÉNDICE I

Abreviaturas.

APS	Persulfato de amonio.
IPTG.	Isopropil-tio- β -D-galactósido.
LB	Medio Luria-Bertoni.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
RNP	Proteínas de unión a RNA.
Rubisco	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED	N, N', N'', N'''-tetrametil-etilendiamina.
TBS	Solución amortiguadora de Tris.
TBS-T	Solución amortiguadora de Tris con Tween-20.

Soluciones.

1) Extracción de proteínas de tejidos vegetales.

Solución para extracción 2X.

Tris base pH 7.5	200 mM
EDTA	10 mM
Sacarosa	0.6 M
EGTA	10 mM
MgCl ₂	10 mM
β Mercaptoetanol	80 mM
Pefablock	1 mg/mL
Pepstatina	2 μ g/mL
Leuceptina	1 μ g/mL
Bestatina	80 μ g/mL

Se pesan todos los componentes hasta el MgCl₂ y se diluyen en agua deionizada. Se esteriliza la solución. Antes de iniciar la extracción se adiciona el β -mercaptoetanol y los inhibidores de proteasas, los cuales se agregan a partir de soluciones stock preparadas y mantenidas a -20 °C. Esta solución de utiliza 1X.

2) Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).

Acrilamida/ bisacrilamida.

Acrilamida 30 g

Bis-acrilamida 0.8 g

Se pesan los compuestos, se disuelven en 80 mL de agua deionizada en una parrilla con agitación y calor moderado. Se filtra la mezcla en un embudo con un filtro Whatman N° 1 u otro de poro grande, después de que se haya disuelto completamente y se afora a 100 mL con agua deionizada en una probeta. Se almacena a 4 °C.

Solución separadora (25x).

Tris base 1.5 M

SDS al 20% 2 mL

Ajustar a pH 8.8 con HCl 12 N.

Se pesa el Tris, se disuelve en 80 mL de agua deionizada y se ajusta el pH. Se agrega el SDS y se afora a 100 mL. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución apiladora (25X).

Tris base 0.5 M

SDS al 20% 2 mL

Ajustar a pH 6.8 con HCl 12 N.

Se pesa el Tris y se disuelve en 80 mL de agua deionizada y se ajusta el pH. Se agrega el SDS y se afora con agua deionizada. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución para cargar (5X).

Tris base 1 M

Glicerol 5.0 mL

SDS 0.5 g

Azul de bromofenol 0.2 mL

β -mercaptoetanol (ver abajo).

Se pesan, se miden los componentes y se llevan a 10 mL con agua deionizada. Se almacenan a una temperatura ambiente. Inmediatamente antes de usar se agregan 4 μL de β -mercaptoetanol por 20 μL de solución para cargar.

Solución amortiguadora para corrida (10X).

Tris base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

Se pesa el tris y la glicina, se adicionan 60 mL de agua deionizada y se disuelve en una parrilla con agitación. Se mide el pH que deberá estar entre 8.3 y 8.8, de no ser así se vuelven a pesar los componentes debido a que no se puede ajustar el pH. Se agrega el SDS en polvo, se disuelve y se afora a 100 mL en una probeta. Se almacena a temperatura ambiente. Antes de usarla se deberán tomar 30 mL de esta solución y aforarlos a 300 mL con agua deionizada.

Persulfato de amonio al 20%.

Persulfato de amonio 0.2 g.

Se pesa el reactivo, se disuelve en 5 mL de agua deionizada y se afora a 10 mL. Se hacen alícuotas de 500 μL en tubos para microcentrífuga y se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Colorante Coomassie para teñir geles.

Azul brillante Coomassie	0.0250 g
Metanol grado técnico	45.4 mL
Agua destilada	45.4 mL
Acido acético glacial	9.2 mL

Se pesa el Coomassie y se disuelve en 10 mL de agua destilada, una vez disuelto se adicionan los demás reactivos, se afora a 100 mL y se mezcla perfectamente. Se almacena a temperatura ambiente.

Fijador y desteñidor.

Acido acético glacial	18.75 mL
Metanol grado técnico	50 mL

Se miden los reactivos y se aforan a 250 mL con agua deionizada. Se almacena a temperatura ambiente.

3) Western blot.

Solución para transferencia.

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol reactivo analítico	20% v/v

Se disuelve el Tris, la glicina en 100 mL de agua deionizada. Se adiciona el metanol y se afora con agua deionizada a 1000 mL.

Solución de Ponceau S.

Ponceau S	0.04 g
Ácido acético glacial	2 mL

Se pesa el Ponceau S y se disuelve en 5 mL de agua deionizada, se adiciona el ácido acético glacial y se afora a 40 mL con agua deionizada. Se almacena a temperatura ambiente.

TBS (pH=7.6).

Tris-base	2.4 g
NaCl	8 g

Se pesan los componentes y se disuelven en 600 mL de agua deionizada en una parrilla con agitación. Se ajusta el pH a 7.6 con HCl concentrado. Se afora a 1000 mL con agua deionizada.

TBS-T.

TBS	200 mL
Tween-20	2 μ L

Se adiciona el Tween-20 al TBS y se mezcla perfectamente.

4) Inducción de la síntesis y purificación de la proteína 24 RNP recombinante de espinaca (pequeña y gran escala).

Medio LB para 1 L.

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Se pesan y disuelven los tres componentes en 800 mL de agua en una parrilla con agitación. Se afora a 1000 mL con agua deionizada. Se esteriliza a 15 lb de presión por 15 minutos y almacena a temperatura ambiente ó a 4 °C.

IPTG 1M.

IPTG	0.236 g
------	---------

Se pesa el IPTG y se disuelve en 500 µl de agua deionizada en una parrilla con agitación. Se afora a 1 mL. Se esteriliza por filtración, nunca por calor.

Solución A.

Guanidina hidrociorada	6 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris-HCl	0.01 M

Se pesan los componentes, se disuelven en 50 mL de agua deionizada y se ajusta a un pH 8. Se afora a 100 mL con agua deionizada.

Solución B.

Urea	8 M
Tris	0.01 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M

Se pesan los componentes, se disuelven en 50 mL de agua deionizada y se ajusta a pH 8. Se afora a 100 mL con agua deionizada.

Solución C.

Urea 8 M
NaH₂PO₄ 0.1 M
Tris-HCl 0.01 M

Se pesan los componentes, se disuelven en 50 mL de agua deionizada y se ajusta a pH 6.3 con HCl. Se afora a 100 mL con agua deionizada.

Solución para elución de proteínas.

Imidazol 250 mM

Se disuelve el imidazol en 10 mL de la solución C.

Antibióticos.

Ampicilina solución concentrada 100 mg/mL.

Se pesan 100 mg de ampicilina y se disuelven en 1 mL de agua deionizada, se esteriliza por filtración y se almacena a -20 °C.

Kanamicina solución concentrada 100 mg/mL .

Se pesan 100mg de Kanamicina y se disuelven en 1 mL de agua deionizada, se esteriliza por filtración. Se almacena a -20 °C.

5) Inmunodifusión (Ouchterlony).

PBS.

Na₂HPO₄ 80 mM
NaH₂PO₄ 30 mM
NaCl 100 mM

Se pesan los componentes, se afora a 1 L con agua deionizada.

Gel de agarosa al 2%.

Agarosa 0.5 g
PBS 20 mL

Se disuelve en baño María o en microondas a 45 °C.

6) Purificación de anticuerpos.

Tris-base 1 M .

Tris-base 24.3 g

Se pesa el Tris-base y se disuelve en 100 mL de agua deionizada en una parrilla con agitación. Se afora a 200 mL con agua deionizada. **Nota:** No se ajusta el pH este debe ser aproximadamente 7 (se verifica para comprobar).

Solución para elución de anticuerpos (pH=2.5).

Glicina 1.5 g

NaCl 2.9 g

Tween-20 5 μ L

Se pesa la glicina y el cloruro de sodio, se disuelven en 50 mL de agua deionizada en una parrilla con agitación. Se ajusta el pH a 2.5 con HCl concentrado. Se agrega el Tween-20 y se agita. Se afora a 100 mL con agua deionizada.

7) Purificación de inmunoglobulina G por medio de precipitación con sulfato de amonio.

Solución saturada de sulfato de amonio.

Sulfato de amonio 760 g.

Se pesa el sulfato de amonio y se disuelve en 300 mL de agua deionizada. Se afora a 1000 mL. La saturación de la solución de sulfato de amonio no varía de 4 a 25 °C.

Equipo.

Equipo Mini Protean II de la marca Bio-Rad.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Abrahamson no publicado. 1995.**
2. **Albá M, and Pagés M. 1998.** Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *TIPS* 3 (1): 15-21.
3. **Amann E, and Brosius J. 1985.** ATG vectors for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*. 40:183-190.
4. **Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, and Struhl K. 1987.** Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 2. Ed. John Wiley and Sons, Inc.
5. **Bedouelle H, and Duplay J. 1988.** Production in *Escherichia coli* and one-step bi-functional hybrid proteins which bind maltose. *Eur. J. Biochem.* 171: 541-549.
6. **Bradford M. 1976.** A rapid and sensitive method for de quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
7. **Brewer G. 1991.** An A+U-rich element RNA-binding factor regulates *c-myc* mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 11(5):2460-2466.
8. **Chatel JM, Adel-Patiet K, Creminon C, and Wal JM. 1999.** Expression of a lipocalin in prokaryote and eukaryote cell: quantification and structural characterization of recombinant bovine β -lactoglobulina. *Protein Expression and Purification.* 16:70-75.
9. **Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E, and Strob W. 1989.** Current Protocols in Immunology. Ed. National Institutes of Health. Published by Greene Publishing Associates and Wiley- Interscience.
10. **Cooper H. 1989.** Determination of the specific antibody titer. . *In* Current Protocols in Molecular Biology. Edited by Ausubel, F, Brent, R, Kingston, R, Moore, D, Seidman, J, Smith, J, and Struhl, K. Vol. 2. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Pag. 11.16.6- 11.16.18.
11. **Deng XW, Stern D, Tonkyn J, and Gruissem W. 1987.** Plastid run-on transcription: application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid gene. *J. Biol. Chem.* 262: 9641-9648.

12. **Deng XW and Wruissem W. 1987.** Control of plastid gene expression during development in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J* 7: 3301-3308.
13. **Flentke G, Glinski J, Satyshur K, and Rich DJ. 1999.** Purification and crystallization of *Rhizopus* pepsin: the use of nickel chelation chromatography to select for catalytically active species. *Protein Expression and Purification*. 16: 213-219.
14. **Fukami KK, Tomoda S, and Go M. 1993.** Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins, *FEBS Lett.* 335: 289-293.
15. **Gagnon P. 1996.** Purification Tools for Monoclonal Antibodies. Validated Biosystems.
16. **Guan C, Li P, Riggs PD, and Inouye H. 1987.** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*. 67: 21-30.
17. **Harlow E, and Lane D. 1988.** Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
18. **Harris ELV, and Angal S. 1989.** Protein purification methods: a practical approach. Edited by ELV Harris and S Angal. Oirl Press at Oxford University Press. N.Y. USA.
19. **Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, and Lui HF. 1999.** Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expression and Purification*. 16: 289-307.
20. **Harris ME, Bühni R, Schneiderman MH, Ramamurthy L, Schümperli D, and Marzluff WF. 1991.** Regulation of histone mRNA in the unperturbed cell cycle: evidence suggesting control at two posttranscriptional steps. *Mol. Cell. Biol.* 11(5): 2416-2424.
21. **Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabay L, Maliga P, and Gruissem, W. 1996.** Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* 15 (5) 1132-1141.
22. **Hsu-Ching C, Stern D. 1991.** Specific ribonuclease activities in spinach Chloroplasts Promote mRNA maturation and degradation. *J. Biol. Chem.* 266: 24205-24211.

23. **Kenan DJ, Query CC, and Keene JD. 1991.** RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends. Biochem. Sci.* 16: 214-220.
24. **Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
25. **Li L, and Ram B. 1999.** High-level expression, purification, and characterization of recombinant type a *Botulinum* neurotoxin light chain. *Protein Expression and Purification.* 17: 339-344.
26. **Lisitsky I and Liveanu V. 1994.** RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucl. Acids Res.* 22: 4719-4724.
27. **Lisitsky I, Liveanu V, and Schuster G. 1995.** RNA-binding characteristics of a ribonucleoprotein from spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 107: 933-941.
28. **Lundblad V. 1996.** *Saccharomyces cerevisiae.* . In Current Protocols in Molecular Biology. . Edited by Ausubel, F, Brent, R, Kingston, R, Moore, D, Seidman, J, Smith, J, and Struhl, K. Vol. 2. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Pag. 13.0.3-13.05.
29. **McCoy J, and LaVillie E. 1994.** Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. . In Current Protocols in Molecular Biology. . Edited by Ausubel, F, Brent, R, Kingston, R, Moore, D, Seidman, J, Smith, J, and Struhl, K. Vol. 2. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Pag. 16.8.1-16.14.
30. **Maina CV, Riggs PD, Grandea AG, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, and Guan, C. 1988.** A vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from, maltose binding protein. *Gene* 74: 365-373.
31. **Memon A, Meng B, and Mullet J. 1996.** RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast psbA 3'-end untranslated RNA. *Plant Mol. Biol.* 30:1195-1205.
32. **Mitraki A , and King J. 1989.** Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio-Technol.* 7:690-697.
33. **Monsalve RI, Lu G, and Piao-King T. 1999.** Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of Yellow Jacket (*Vespula vulgaris*) and Paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. *Protein Expression and Purification.* 16: 410-416.

34. **Mowry KL, and Steitz JA. 1987.** Both conserved signals on mammalian histone pre-mRNAs associate with small nuclear ribonucleoproteins during 3' end formation *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 7(5): 1663-1672.
35. **Ouchterlony O, and Nilsson L. 1986.** Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *In Handbook of Experimental Immunology.* Vol. 1.Immunochemistry. Pag. 31.2-32.50.
36. **Palczewska M, Groves P, and Kuenicki J. 1999.** Use of *Pichia pastoris* for the expression, purification, and characterization of rat calretinin "Ef-Hand" domains. *Protein Expression and Purification.* 17: 465-476.
37. **Phayre, D. 1998.** Comunicación personal.
38. **Rapp JC, Baumgartner BJ, and Mullet JE. 1992.** Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. *J. Biol. Chem.* 267: 21404-21411.
39. **Rees AR, Sternberg MJE, and Wetzel R. 1992.** Protein engineering: a practical approach. The practical approach series. U.S.A. Editors D. Rick Wood and B.D. Hames. Pag. 304-338.
40. **Riggs P. 1994.** Expression and purification of maltose-binding protein fusions. *In Current Protocols in Molecular Biology.* Edited by Ausubel, F, Brent, R, Kingston, R, Moore, D, Seidman, J, Smith, J, and Struhl, K. Vol. 2. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Pag. 16.6.1-16.6.14.
41. **Sambrook J, Fritel EF, and Maniatis T. 1989.** Molecular cloning a laboratory manual. 2ª. Edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press. Cap. 16 y 17.
42. **Schuster G, Gruissem W. 1991.** Chloroplast mRNA 3'end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J* 10: 1493-1502.
43. **Smejkal G, and Gallagher S. 1994.** *Biotechniques* 16: 197.
44. **Smith DB, and Corcoran LM. 1994.** Expression and purification of glutathione-s-transferase fusion proteins. *In Current Protocols in Molecular Biology.* . Edited by Ausubel, F, Brent, R, Kingston, R, Moore, D, Seidman, J, Smith, J, and Struhl, K. Vol. 2. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Pag. 16.7.1-16.7.7.

45. **Smith DB, Davern KM, Board PG, Tiu WU, Garcia EG, and Mitchell GF. 1986.** Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutatione-s-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8703-8707.
46. **Smith DB, and Johnson KS. 1988.** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutatione-s-transferase. *Gene.* 67: 31-40.
47. **Storma GD, Schneider TD, and Gold L. 1982.** Characterization of translation initiation sites in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids. Res.* 10: 2971-2996.
48. **Sugita M, and Sugiura M. 1996.** Regulation of gene expression in chloroplast of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 315-326.
49. **Toledo G. 1998.** Estudio de la función de la proteína de 24 kDa que se une a RNA (24RNP) durante el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.
50. **Towbin M, Staehelin T, and Gordon J. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
51. **Wienk HJ, and Kruijff B. 1999.** Expression, isolation, and characterization of a chloroplast targeting peptide. *Protein Expressions and purification.* 17: 345-350.
52. **William P. 1989.** Fundamental Immunology. Raven Press. N.Y. USA.