



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**Facultad de Química**

---

---

“Implementación de un nuevo método  
para la expresión y plegamiento  
reportado de la toxina Ts16”

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**QUÍMICO**

P R E S E N T A :

**Jacob Alejandro Hernández Tapia**

**Asesora**

Dra. Patricia Cano Sánchez



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:

PRESIDENTA: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

VOCAL: María Elena Rodríguez Alegría

SECRETARIA: Patricia Cano Sánchez

1° SUPLENTE: Edgar Axel Donjuán Guerrero

2° SUPLENTE: José Federico del Rio Portilla

## SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 1 y Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Química, UNAM

## ASESORA DEL TEMA:

---

Dra. Patricia Cano Sánchez

## SUPERVISOR TÉCNICO:

---

Dr. José Federico del Rio Portilla

## SUSTENTANTE:

---

Jacob Alejandro Hernández Tapia

---

*A Ana y Ever,  
padres incondicionales*

---

## Agradecimientos

---

**L**os círculos sociales en los que, orgullosamente, soy integrante son dinámicos. Personas han llegado y personas han desertado, algunas de forma temporal y otras definitivamente. Familia, amigos, colegas, compañeros, profesores, alumnos, visitantes, conocidos y desconocidos, a todos les debo mi más eterno agradecimiento; sin embargo, emitir mi gratitud hacia cada una de ellas y de ellos representa una tarea interminable. Su contribución ha sido en tan diversas maneras, albergando todos los ámbitos que impactan en la vida de un ser humano, por sobre el área académica. Nada ha sido en vano o depositado en "*saco roto*", por más minúscula que haya sido su contribución; la persona que soy hoy no es más que el resultado de todas estas interacciones, hayan sido diminutas o monumentales. No obstante, no todos pueden permanecer en el anonimato de la generalización; así, doy paso a la particularización.

En primera instancia, por ser los revisores de este documento de carácter académico, a mis sinodales. A la Dra. Patty, quien también fungió como mi asesora de tesis, gracias por todos los consejos de carácter experimental y de redacción, sin lugar a dudas eres la mejor científica en Biología Molecular que conozco. A la Dra. Adriana, quien también fue mi profesora, gracias por el conocimiento y los comentarios emitidos. A la M. C. María Elena, revisora de tesis, profesora y ahora colega, gracias por mostrarme la Biotecnología; de no ser por ti, no sé a qué me dedicaría en la actualidad.

Continúan los contribuidores primarios, mi grupo de trabajo en el Instituto de Química. A David, Marlen, Gustavo, Yanis, Fátima, Estefanía, Monse e Ilean, quienes me acogieron en el grupo, me enseñaron las técnicas y me aconsejaron cuando no veía la salida. A Alland, Pedro y Daniel, quienes nos apoyamos mutuamente para llegar al éxito en nuestros proyectos respectivos. A Meche y Luis, quienes tiene un largo camino por delante. Al Dr. Federico, asesor técnico, profesor y mentor, gracias por mostrarme ambos lados de la vida académica, el dulce y el amargo. Fede, no tengo más que una palabra para demostrar mi gratitud hacia todo lo que has hecho por mí: gracias.

Una carrera no solo incluye el tiempo invertido en el trabajo de tesis, sino también considera el tiempo de clases y a las personas que tuve el placer y honor de conocer durante mi estancia en la incomparable Facultad de Química. A mis

---

colegas de carrera, con quienes compartí clases. A mis profesores, quienes me mostraron la Química. A mis amigos, con quienes participé en el placer y la angustia de la vida universitaria. A mis amigos de Universum, de Prepa 6, de Iztacala, del IPN, a todos, muchas gracias. Sin embargo, debo un especial agradecimiento a los *Jacob's*; amigos incondicionales desde primer semestre y para toda la vida. Patty, Diego, Emm, Karen, Marianita, Nai, Mario, Dana, a todos, gracias por cada uno de los entrañables momentos y por los venideros.

A mi familia, de quienes recibí apoyo incondicional. A todos mis abuelos, tíos y primos, quienes me aconsejaron y recibí palabras de aliento para "*que no me arrugará*" y "*le echará lo kilos*". A mis hermanos, Julio, con quien siempre discuto sobre todo, a Jessica, tan compasiva con todos, y a Jorge, quien me saca una sonrisa bajo cualquier situación con su jovialidad; gracias a los tres por ser mis hermanos, nunca los cambiaría. A mis padres, Ana y Ever, a quienes les debo la vida en todos los ámbitos, no solo biológica; gracias por su vital apoyo ante cualquier situación, aun cuando todo pintaba para el fracaso. No podría haber elegido mejor familia que la que tengo, los amo a todos y cada uno de ustedes.

A la UNAM y al pueblo de México, por el acceso a educación superior de calidad sin mayor inversión que el esfuerzo de uno mismo. A la DGAPA por el apoyo al proyecto PAPIIT con clave IN207016 y al proyecto CONACYT con clave 166472 que permitieron el financiamiento de este proyecto y brindaron todas las facilidades para la adquisición de reactivos y determinaciones experimentales que fueron realizadas a lo largo de la estancia en el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 1 y el laboratorio de Biología Molecular.

Esta tesis es la culminación del trabajo individual y colectivo acumulado de los últimos años y de un formidable número de personas; representa la suma del esfuerzo y desinterés, constancia y olvido, éxito y frustración, recompensa y demanda. Esta tesis es el dulce fruto cosechado por todos nosotros; es recompensa tanto mía como tuya, gózala.

Finalmente, a ti lector, quien se tomó el tiempo para leer estas humildes palabras y para quien fue escrita esta tesis.

**¡Gracias a todos!**

<b><u>AGRADECIMIENTOS</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b><u>CONTENIDO</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b>	<b><u>9</u></b>
<b><u>COMPENDIO DE ABREVIATURAS</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b>	<b><u>12</u></b>
1.1. ALACRANES Y VENENO .....	12
1.2. SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA .....	13
1.2.1. ADN RECOMBINANTE.....	13
1.2.2. SISTEMA DE EXPRESIÓN PET .....	14
1.3. PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS.....	16
1.3.1. ENLACE COVALENTE TIPO PUENTE DISULFURO .....	16
1.3.2. PERIPLASMA.....	17
1.3.3. FAMILIA DE PROTEÍNAS DsBS .....	18
1.3.4. EXPORTACIÓN DE PROTEÍNAS HACIA EL PERIPLASMA.....	20
1.4. ESTUDIO DE TOXINAS.....	21
1.5. TOXINA Ts16 .....	22
<b><u>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u></b>	<b><u>25</u></b>
<b><u>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	<b><u>26</u></b>
3.1. HIPÓTESIS.....	26
3.2. OBJETIVO GENERAL .....	26
3.3. OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
<b><u>4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</u></b>	<b><u>28</u></b>
5.1. SUBCLONACIÓN DEL GEN Ts16 DE PET32(A)-Ts16 EN PET40(B) .....	28

5.2.	EXPRESIÓN DE DSBC-Ts16 Y PURIFICACIÓN DE GS-Ts16	28
5.2.1.	DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN DE DSBC-Ts16	28
5.2.1.1.	Cepa	28
5.2.1.2.	Temperatura y tiempo	30
5.2.1.3.	Concentración de IPTG	30
5.2.2.	EXTRACCIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS DE PERIPLASMA..	30
5.2.3.	COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	31
5.2.4.	OBTENCIÓN DE LA GS-Ts16.	32
5.2.4.1.	Purificación de la proteína de fusión con HiTrap	32
5.2.4.2.	Corte enzimático con trombina.	32
5.2.5.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXPRESIÓN	33
<b>6.</b>	<b><u>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</u></b>	<b>35</b>
6.1.	SUBCLONACIÓN DEL GEN Ts16 DE PET32(A)-Ts16 EN PET40(B)	35
6.2.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GS-Ts16.	37
6.2.1.	CALCULO TEÓRICO DE LA MASA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN	37
6.2.2.	DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPRESIÓN DE DSBC-Ts16	38
6.2.3.	EXTRACCIÓN SELECTIVA DE PROTEÍNAS DE PERIPLASMA..	41
6.2.4.	COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	44
6.2.5.	PURIFICACIÓN DE GS-Ts16.	46
6.2.5.1.	Purificación de la proteína de fusión con columna HiTrap.	46
6.2.5.2.	Corte enzimático con trombina.	47
6.2.6.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXPRESIÓN	48
6.2.6.1.	Adición de urea	48
6.2.6.2.	Presencia de GS-Ts16.	50
6.2.6.3.	Rendimiento.	54
<b>7.</b>	<b><u>CONCLUSIÓN</u></b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b><u>PERSPECTIVAS</u></b>	<b>57</b>
<b>9.</b>	<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b>58</b>



---

## ANEXO A: PROTOCOLOS 62

---

1.	MEDIOS DE CULTIVO .....	62
	MEDIO LURIA BERTANI (LB) .....	62
	MEDIO LURIA BERTANI MODIFICADO (LB-MOD) .....	62
	MEDIO LURIA BERTANI (LB) SÓLIDO.....	62
	CONCENTRACIONES FINALES DE ANTIBIÓTICO: .....	63
2.	PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES POR MÉTODO QUÍMICO	63
3.	TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE CÉLULAS COMPETENTES.....	63
4.	CONSERVACIÓN DE CÉLULAS A -70°C.....	64
5.	PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO CON <i>QIAPREP MINIPREP KIT</i> (QIAGEN) .....	64
6.	RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA .....	65
7.	ELECTROFORESIS DE GELES DE AGAROSA .....	65
8.	AISLAMIENTO DE ADN DE GEL DE AGAROSA CON <i>QIQUICK GEL</i> <i>EXTRACTION KIT</i> (QIAGEN) .....	66
9.	REACCIÓN DE LIGACIÓN CON T4 AND LIGASA.....	66
10.	EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	67
11.	LISADO TOTAL POR SONICACIÓN .....	68
12.	LISADO SELECTIVO A PERIPLASMA .....	69
13.	PURIFICACIÓN POR CAMQ CON COLUMNA HI TRAP (GE HEALTHCARE) .....	69
14.	CORTE ENZIMÁTICO CON TROMBINA (SIGMA ALDRICH).....	70
15.	DESALADO Y PRECONCENTRACIÓN CON COLUMNA STRATA C-18T (PHENOMENEX) .....	70
16.	PREPARACIÓN DE GELES SDS-PAGE 12% .....	71
17.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS, CARGA Y MIGRACIÓN DE GELES SDS- PAGE .....	72
18.	PREPARACIÓN DE GELES TRICINA-SDS-PAGE 16% .....	73
19.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS, CARGA Y MIGRACIÓN DE GELES TRICINA- SDS-PAGE 16% .....	73
20.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI -TOF PARA PÉPTIDOS MENORES DE 10 KDA.....	73
21.	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA CON COLUMNA DE FASE REVERSA (HPLC-RP) .....	74

---

## Índice de figuras

---

FIGURA 1. SISTEMA DE EXPRESIÓN PET.....	15
FIGURA 2. PERIPLASMA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	17
FIGURA 3. PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS EN PERIPLASMA EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	19
FIGURA 4. MECANISMO DE EXPORTACIÓN PROTEICA AL PERIPLASMA .....	20
FIGURA 5. TOXINA Ts16 .....	23
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE PET32A-Ts16 Y PET40B-Ts16 .....	29
FIGURA 7. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA SOBRE PET40B-Ts16 .....	36
FIGURA 8. FRAGMENTO DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE PET40B-Ts16 .....	37
FIGURA 9. ESTUDIO DE CEPAS .....	39
FIGURA 10. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO TOTAL DE EXPRESIÓN.....	40
FIGURA 11. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE INDUCTOR (IPTG) .....	41
FIGURA 12. EFECTO DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO CON LI SOZIMA EN LA LISIS PARA LA OBTENCIÓN DE PERIPLASMA .....	43
FIGURA 13. VARIACIONES AL MEDIO DE CULTIVO .....	45
FIGURA 14. ELUCIÓN DE DsBC-Ts16 DE LA COLUMNA Hi TRAP EN GRADIENTE DE IMIDAZOL .....	47
FIGURA 15. PROTEÓLISIS CON TROMBINA SOBRE LA PROTEÍNA DsBC-Ts16 .....	48
FIGURA 16. PRESENCIA DE GS-Ts16 .....	51
FIGURA 17. CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS DE LAS FRACCIONES COLECTADAS.....	53
FIGURA 18. RENDIMIENTO FINAL.....	55

---

## Compendio de abreviaturas

---

$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\kappa$ -KTx	Familia de toxinas bloqueadoras de canales de potasio $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ y $\kappa$
APS	Persulfato de amonio
BamHI	Enzima de restricción
BL21 (DE3)	Cepa mutante de <i>Escherichia coli</i>
BL21 (DE3) pLysS	Cepa mutante de <i>Escherichia coli</i>
BSA	Albumina de suero bovino
C41	Cepa mutante de <i>Escherichia coli</i>
CAMQ	Cromatografía de Afinidad metal-quelato
Cbp	cuanto baste para
CS $\alpha$ / $\alpha$	Motivo estructural hélice-asa-hélice estabilizado por enlaces disulfuro
CS $\alpha$ / $\beta$	Motivo estructural hélice-asa-hoja estabilizado por enlaces disulfuro
DH5 $\alpha$	Cepa mutante de <i>Escherichia coli</i>
DsbABCD	Proteínas formadoras de enlaces disulfuro A, B, C y D
DsbC-Ts16	Proteína de fusión sin péptido señal expresada por pET40b-Ts16
Dsbs	Familia de proteínas formadoras de enlaces disulfuro
EcoRV	Enzima de restricción
GS-Ts16	Proteína resultante de la proteólisis con trombina de las proteínas de fusión.
HisTag	Etiqueta de histidinas
HiTrap	Columna de cromatografía de afinidad metal-quelato
HPLC-RP	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a una columna de fase reversa
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

---

KpnI	Enzima de restricción
LB	Medio Luria-Bertani
LB-mod	Medio Luria-Bertani modificado
MALDI -TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
OD 600 nm	Densidad óptica a 600 nm
ONPG	orto-nitrofenil-D-galactopiranosido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pET	Plasmid Expression T7
pET32a-Ts16,	Plásmido de expresión
pET40b,	Plásmido de expresión
pET40b-Ts16	Plásmido de expresión
RPBI	Residuos Peligro Biológico Infeccioso
rpm	Revoluciones por minuto
Rosetta	Cepa mutante de <i>Escherichia coli</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio.
SecY	Complejo proteico para el transporte de proteínas al periplasma
SmaI	Enzima de restricción
sp-DsbC-Ts16	Proteína de fusión con péptido señal expresada por pET40b-Ts16
Strata C-18T	Columna para extracción en fase solida empacada con matriz C-18
T7, terminador T7	Promotor y terminador de la expresión, respectivamente
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
Tio-Ts16	Proteína de fusión expresada por pET32a-Ts16
Tricina-SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio asistida con tricina

## 1.1. Alacranes y veneno

El veneno del alacrán es una mezcla compleja compuesta principalmente por mucosa, sales, péptidos, proteínas de gran masa molecular, proteasas, nucleótidos, lípidos y aminoácidos (Carmo *et al.* 2014). Ensayos proteómicos han demostrado que el veneno de un alacrán puede llegar a poseer más de 100 componentes de tipo proteico; de los cuales, destacan los péptidos bloqueadores de canales iónicos. Éstos son llamados cotidianamente toxinas y actúan específicamente sobre canales para potasio, sodio y calcio (Possani, Rodriguez, and Vega 2006; Zhu *et al.* 2011)

De forma general, los péptidos bloqueadores de canales de potasio (KTx) se componen de una abundante cantidad de residuos de aminoácidos básicos y de cisteínas; estos últimos encargados de estabilizar la estructura terciaria a través de enlaces disulfuro (Possani *et al.* 2006; Saucedo *et al.* 2012). La diversidad de KTx aislados y estudiados en los últimos años ha propiciado la demanda de una clasificación que no se base en el nombre del organismo de donde se aisló la toxina, sino en su secuencia primaria y estructura terciaria (Miller 1995). Como resultado, se han propuesto cuatro familias:  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx,  $\gamma$ -KTx y  $\kappa$ -KTx

Desde un punto más particular, las familias  $\alpha$ -KTx,  $\beta$ -KTx y  $\gamma$ -KTx se caracteriza por estar estabilizado por tres o cuatro enlaces disulfuro y presentar un motivo estructural CS $\alpha/\beta$  (Cystine-stabilized  $\alpha/\beta$  scaffold), siendo la única diferencia entre ellas la extensión de la cadena de aminoácidos; mientras que los péptidos que presentan un motivo estructural tipo CS  $\alpha/\alpha$ , hélice-asa-hélice, y se estabilizan por dos o tres enlaces disulfuro componen la familia  $\kappa$ -KTx. (Saucedo *et al.* 2012; Zhu *et al.* 2011).

Los canales iónicos son fundamentales en tejidos contraíbles y sensibles a estímulos electroquímicos, como son los tejidos muscular y nervioso. Si bien, la primera línea de investigación sobre los componentes de los venenos de alacrán es la formulación de antídotos para intoxicaciones por picadura de alacrán, hay un amplio y creciente interés en la sorprendente selectividad de algunas toxinas por sus canales iónicos blanco (Guo *et al.* 2013). Las toxinas han contribuido

---

en la comprensión de la función y el mecanismo de éstos, aunque también han sido objeto de estudio para el desarrollo de nuevos medicamentos (Saucedo *et al.* 2012).

Estudios recientes combinan técnicas de proteómica, de genómica y de transcriptómica para el estudio del veneno. Estos estudios son denominados como estudios de Venómica (Abdel-rahman, Harrison, and Strong 2015) y han demostrado que los péptidos presentes en el veneno son resultado de mecanismos post-traduccionales (Abdel-rahman *et al.* 2015; Abdel-rahman, Quintero-hernandez, and Possani 2013). Es importante mencionar que la cantidad de toxina producida por el organismo es ínfima, dado que se necesitan pequeñas cantidades para ocasionar el efecto deseado; así, la biosíntesis eficiente de los péptidos aislados del veneno de alacranes constituye el factor limitante para el estudio adecuado de los mismos.

## 1.2. Sistemas de expresión heteróloga

Por mucho tiempo, los compuestos proteicos de interés se obtenían del aislamiento de una fuente natural. La mayor desventaja de este método radica en los minúsculos rendimientos de aislamiento, producto de la utilización de grandes cantidades de tejido animal, vegetal o de fluidos para la obtención de algunos escasos microgramos de la proteína deseada (Rosano and Ceccarelli 2014). No obstante, con el desarrollo de las tecnologías de la ingeniería genética como es la del ADN recombinante, el aislamiento de estos compuestos proteicos se ha visto beneficiado. El abanico de beneficios incluye desde el aumento en los rendimientos con su respectivo afecto económico, hasta la posibilidad de mutar la proteína para aumentar su selectividad y resistencia química.

### 1.2.1. ADN recombinante

La recombinación genética es el proceso mediante el cual los elementos genéticos contenidos en dos genomas separados se unen en una sola unidad; como consecuencia, el organismo adquiere la capacidad de realizar nuevas funciones que, por ejemplo, le permitan sortear las adversidades del medio en el que se encuentra (Brock, Smith, and Madigan 1984). El término ADN recombinante es generalmente empleado para referirse a las moléculas que contienen fragmentos de ADN no emparentados, producto de la clonación de

---

genes y cuyo objetivo primordial es la expresión de un gen específico (Brock et al. 1984). En un nivel simple, los pasos para la obtención de proteínas recombinantes son el aislamiento del gen de interés, la clonación del gen en un vector de expresión, la transformación del vector en un organismo huésped, la inducción de la expresión del gen y la purificación de la proteína expresada (Rosano and Ceccarelli 2014).

Existe una creciente y variada cantidad de sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes. *Escherichia coli* fue la plataforma más utilizada cuando el sector biofarmacéutico emergió a principios de la década de los ochentas, le siguió la implementación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, continuo la manipulación de células de insecto, especialmente utilizadas en el desarrollo de vacunas, y recientemente las líneas de células de mamífero, usadas en la producción de glicoproteínas (Garcia et al. 2016). Por las ventajas que presenta la expresión de proteínas en *Escherichia coli* en comparación con los otros sistemas, como los tiempos reducidos de crecimiento de biomasa, la facilidad de manipulación y la considerable cantidad de protocolos estandarizados y productos comerciales disponibles, esta bacteria es el sistema de expresión más utilizado (Malik 2016). En una revisión a la base de datos de proteínas PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/histogram.do?>, 2017), se encontró que de las 120,570 proteínas registradas a la fecha de actualización, 90,215 fueron expresadas en *Escherichia coli*.

### 1.2.2. Sistema de expresión pET

Del amplio catálogo de sistemas de expresión en *Escherichia coli*, el más utilizado es el sistema pET (Figura 1), desarrollado por Novagen, actualmente filial de Merck Co. Este sistema de expresión utiliza la maquinaria provista por el bacteriófago T7. Los requisitos son una cepa hospedera que contenga en su genoma el fragmento del fago DE3 que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor inducible con IPTG *lacUV5*; y un vector de expresión que cuente con el promotor T7 para la expresión de la proteína de interés, cuya expresión puede estar regulada por el operón de la lactosa (T7/lac) (Sørensen and Mortensen 2005).

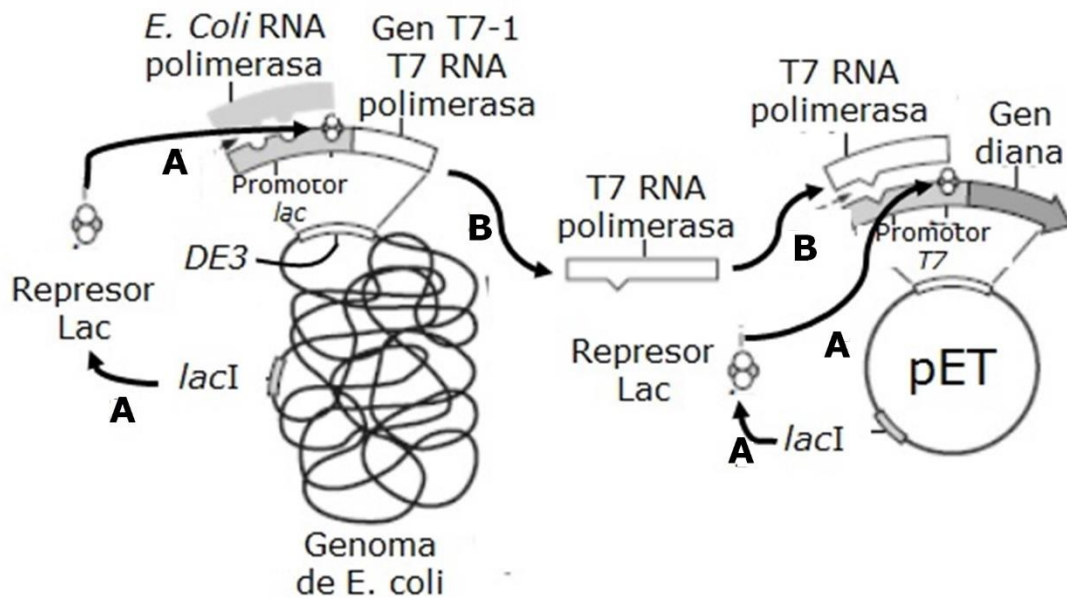


Figura 1. Sistema de expresión pET. A) *Previo a la inducción*. La proteína represora del operón de la lactosa, LacI, es expresada tanto del gen propio del genoma de *Escherichia coli* como del plásmido pET; el homotetrámero formado por la misma se une en el operón *lac*, posterior al promotor *lac* en el lisógeno *DE3* y el promotor T7 del plásmido pET. B) *Inducción con IPTG*. El IPTG se use al complejo de LacI, provocando que se despegue del operón; como consecuencia se expresa en abundancia la T7 RNA polimerasa, contenida en el lisógeno *DE3*, quien desencadenará la expresión del gen de interés en el plásmido pET. Imagen tomada y adaptada del Manual pET (Novagen 2011)

La proteína represora de la transcripción propia del operón de la lactosa, LacI, es expresada tanto del genoma propio de la célula como del vector de expresión; como consecuencia, no hay expresión de la T7 RNA polimerasa y de la proteína de interés (Figura 1A) La adición de un análogo no hidrolizable de la lactosa en el medio de cultivo, como es el IPTG, permite la expresión de estas dos proteínas como consecuencia de su unión con el tetrámero de LacI y su subsecuente desplazamiento del material genético (Figura 1B) (Sørensen and Mortensen 2005).

El promotor T7 es una secuencia de 20 nucleótidos que no es reconocida por la RNA polimerasa propia de *Escherichia coli*. La T7 RNA polimerasa transcribe como máximo 230 nucleótidos por segundo y es hasta cinco veces más rápida que la proteína homóloga de *Escherichia coli* (50 nucleótidos por segundo) (Sørensen and Mortensen 2005).

Además, el promotor *lacUV5* es menos sensible a la regulación por la proteína receptora de cAMP (cAMP-CRP) que el promotor *lac*.



---

Cabe mencionar que el cAMP es producido como respuesta a los bajos niveles de glucosa en el medio (Sørensen and Mortensen 2005).

Los plásmidos pET de mayor relevancia para este trabajo son el pET-32a y el pET-40b. El pET-32a genera una proteína de fusión con tiorredoxina, una proteína constitutiva del citoplasma de *Escherichia coli*; este producto permanece en el citoplasma. Por otro lado, el pET-40b genera una proteína de fusión con DsbC, una enzima propia del periplasma del mismo hospedero; la particularidad de esta fusión es que es exportada al periplasma mediante el péptido señal propio de la DsbC (Novagen 2011).

### 1.3. Plegamiento de proteínas

El plegamiento de proteínas se define como aquel proceso por el cual la secuencia primaria adquiere su estructura tridimensional y funcional. El ambiente químico del medio circundante a la proteína promueve una competencia entre las interacciones intermoleculares contra las interacciones intramoleculares. La generación de agregados insolubles radica en una cuestión cinética de competencia entre los estados plegado y desplegado. La sobreexpresión de genes en un organismo frecuentemente resulta en la formación de agregados de proteínas, que representa una limitante en la producción de proteínas recombinantes (Yon Jeannine M. 2007).

#### 1.3.1. Enlace covalente tipo puente disulfuro

Los enlaces tipo puente disulfuro son vitales para el adecuado plegamiento de muchas proteínas secretadas; no obstante, las conectividades entre cisteínas también contribuyen. Un plegamiento inadecuado de la proteína, debido a conectividades inapropiadas, puede causar agregados moleculares o que esta sea degradada por proteasas (Messens and Collet 2006). La reacción de formación de enlaces disulfuro es básicamente una reacción de oxidación, donde se transfieren electrones desde los grupos tioles hasta un aceptor, que puede ser desde el oxígeno molecular presente en el medio hasta una enzima (Hatahet, Boyd, and Beckwith 2014).

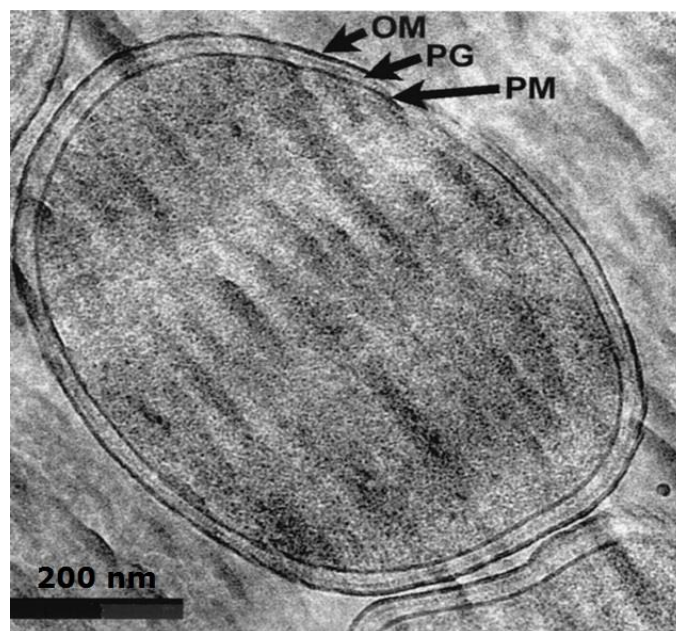
El citoplasma de muchas células no es adecuado para la producción de proteínas con enlaces disulfuro. Aunque los enlaces disulfuro pueden formarse pasajeramente, son rápidamente reducidos por el gran número de reductasas y las pequeñas moléculas reductoras

---

como el NADH y el NADPH presentes en el citoplasma (Berkmen 2012). Varias de estas proteínas son producidas para incorporarse a la membrana externa o para contenerse en compartimientos no-citoplasmáticos, donde adquirirán su forma activa. Puede ser fatal para la célula que dichas proteínas se encuentren en su forma activa en el citoplasma (Neidhardt *et al.* 1996). Se conocen dos compartimientos no-citoplasmáticos con carácter oxidativo: el periplasma para las células procariontes de tipo Gram negativa, y el retículo endoplasmático para las células eucariontes (Berkmen 2012). Aquí únicamente se tratará el compartimiento no-citoplasmático de procariontes Gram negativos: el periplasma.

### 1.3.2. Periplasma

El periplasma es el espacio comprendido entre las membranas interna y externa de una bacteria Gram negativa (Figura 2). Las proteínas que residen en el periplasma cumplen funciones importantes en la detección y procesamiento de nutrientes esenciales, así como en su transporte hacia la célula. El contenido del periplasma provee de un micro-ambiente de pequeñas y medianas moléculas que amortiguan la célula de los cambios que ocurren en sus alrededores. En el cumplimiento de estas funciones, el periplasma no es estático sino



---

Figura 2. Periplasma de *Escherichia coli*. Microscopía electrónica de crio-transmisión de la cepa K-12 de *Escherichia coli*. OM) Membrana externa, PG) peptidoglicano, PM) membrana interna. Es evidente la diferencia volumétrica entre el citoplasma y el periplasma. Imagen tomada de (Matias *et al.* 2003)

---

dinámico, capaz de contrarrestar los cambios entre los ambientes internos y externos que lo rodean (Neidhardt *et al.* 1996). De entre la diversidad de proteínas contenidas en el periplasma, destaca una familia de proteínas que catalizan la formación de los enlaces disulfuro en las proteínas recién exportadas a dicho compartimiento celular. Esta **familia de proteínas es la "Dsbs" (Disulfide Bond)** (Messens and Collet 2006).

### 1.3.3. Familia de proteínas Dsbs

La familia Dsbs se compone de cuatro integrantes principales que presentan un plegamiento similar al de la tiorredoxina; además de un sitio activo de tipo CXXC. Las proteínas Dsbs están involucradas en dos tipos de procesos: de oxidación (DsbA y DsbB) y de isomerización (DsbC y DsbD) (Messens and Collet 2006).

La DsbA y DsbB, son responsables de la formación de los enlaces disulfuro (Berkmen 2012; Hatahet *et al.* 2014; Messens and Collet 2006). Este proceso es prácticamente una transferencia de electrones desde el grupo tiol de cada uno de los residuos de cisteína que formaran el enlace covalente en la proteína sustrato hacia un segundo par de residuos de cisteína presentes en el sitio activo de la DsbA, (Figura 3-2) (Hatahet *et al.* 2014). El sitio activo de la DsbA se encuentra inicialmente oxidado (Grauschopf *et al.* 1995); entonces, se puede afirmar que hay una transferencia del enlace disulfuro desde la DsbA oxidada hacia la proteína sustrato (Berkmen 2012). La proteína DsbA reducida debe de reoxidarse antes de participar en un nuevo ciclo de transferencia de enlace; la enzima DsbB acepta los electrones de la DsbA reducida (Figura 3-3) (Grauschopf *et al.* 1995; Sone, Akiyama, and Ito 1997).

La DsbC y DsbD se encargan del reordenamiento de los enlaces disulfuro formados por la DsbA para generar los enlaces termodinámicamente más estables (Berkmen 2012; Gleiter and Bardwell 2008; Hatahet *et al.* 2014; Messens and Collet 2006). La DsbC presenta una estructura homodimérica que adquiere una forma **de "V"**, (Figura 3-4), en donde el sitio activo de cada una de las subunidades se encuentra dispuesto hacia el interior de la abertura. Adicionalmente, el sitio activo se encuentra en su forma reducida (Bessette *et al.* 1999). El residuo de cisteína más reactivo de la DsbC (Cys98) ataca nucleofílicamente el enlace disulfuro formado en la

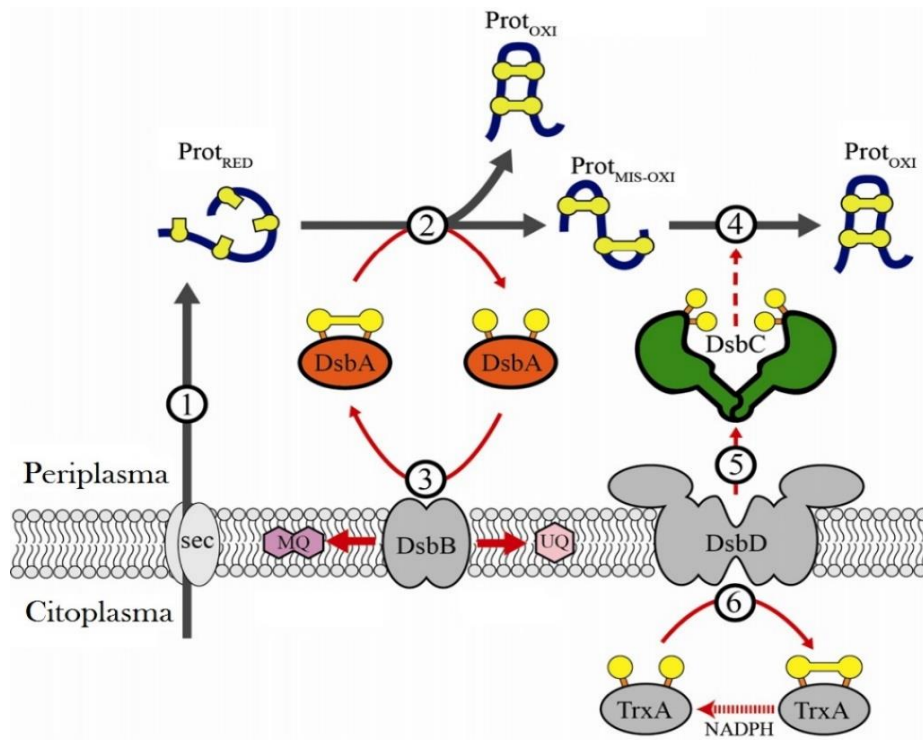


Figura 3. Plegamiento de proteínas en periplasma en *Escherichia coli*. 1) Las proteínas destinadas a adquirir un plegamiento soportado por enlaces disulfuro son exportadas al periplasma mediante el translocón SecY, la proteína es exportada en su forma reducida ( $Prot_{red}$ ). 2) La DsbA se reduce y transfiere el enlace disulfuro a la proteína recién exportada, generando la forma oxidada de dicha proteína ( $Prot_{oxi}$ ). 3) La DsbA es regenerada a su forma activa mediante la proteína integral de membrana DsbB, misma que dona los electrones recibidos mediante la ubiquinona (UQ), en condiciones aerobias, o por la mannaquinona (MQ) en condiciones anaerobias. 4) En caso de un plegamiento inadecuado en la proteína blanca ( $Prot_{mis-oxi}$ ), la DsbC se encarga de reducir la proteína para que la DsbA tenga una nueva oportunidad para producir el plegamiento adecuado. 5) La DsbC recupera su forma reducida por transferencia directa de la DsbD, otra proteína integral de membrana. 6) La DsbD recibe los electrones de la tiorredoxina del citoplasma. Imagen tomada y adaptada de Berkman (2014)

proteína sustrato, generándose un complejo activado entre la proteína sustrato y la DsbC (Hatahet et al. 2014). El trabajo de Rietsch y colaboradores, reportado por Gleiter y Bardwell (2008), ha comprobado que el mecanismo que más se adecua a los resultados experimentales es un mecanismo de reducción; otros autores han apoyado esta propuesta (Hatahet et al. 2014; Messens and Collet 2006). En el mecanismo de reducción, el segundo tiol del sitio activo de la DsbC dirige el ataque nucleofílico sobre el enlace disulfuro generado entre la DsbC y la proteína sustrato, liberándose la DsbC en su forma oxidada y la proteína parcialmente reducida. Este mecanismo

de acción se repite para todos los enlaces disulfuro de la proteína sustrato, participando un equivalente de DsbC por cada enlace reducido. Al final se libera la proteína en su forma totalmente reducida, lista para ser nuevamente oxidada por la DsbA (Berkmen 2012; Hatahet et al. 2014). Finalmente, la DsbC oxidada debe de regenerarse para adquirir nuevamente su actividad enzimática mediante la acción de la DsbD, (Figura 3-5) (Berkmen 2012; Gleiter and Bardwell 2008; Hatahet et al. 2014; Messens and Collet 2006).

#### 1.3.4. Exportación de proteínas hacia el periplasma

El translocón SecY se encarga de la secreción de proteínas al periplasma, así como de la integración de proteínas en la membrana celular (Corey *et al.* 2016). El complejo proteico se compone de las subunidades SecY, SecE y SecE; la conjunción de estas subunidades genera un canal que se encuentra bloqueado por una pequeña hélice, cuya función es actuar como una compuerta para cuando el translocón está en espera (Figura 4) (Ge *et al.* 2014). Las proteínas que son secretadas al periplasma o a la membrana celular requieren de un péptido señal, que es una secuencia polipeptídica reconocida por el translocón SecY y es la primera parte de la proteína en ser transcrita

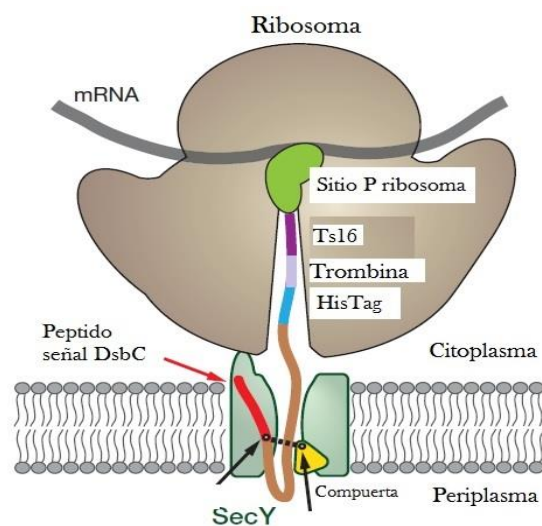


Figura 4. Mecanismo de exportación proteica al periplasma. El translocón SecY reconoce la secuencia aminoacídica naciente del ribosoma que corresponde a la secuencia del péptido señal. El péptido señal entra y es retenido dentro del canal; mientras que el resto de la proteína empuja la compuerta del canal. El péptido señal es escindido de la proteína exportada, permitiendo el tránsito de la proteína hacia el periplasma. Imagen tomada y adaptada de Park *et al.*, (2014).

---

(Figura 4). El carácter hidrofóbico del péptido señal provoca que este permanezca en la pared del canal del translocón hasta el momento en que es eliminado de la cadena polipeptídica; entonces, se libera hacia el citoplasma (Park *et al.* 2014). Adicionalmente al péptido señal, la unión del ribosoma sobre el translocón SecY provocan que la compuerta del canal se desplace, permitiendo el paso de la proteína hacia el periplasma o a la membrana celular, según sea el caso (Park *et al.* 2014). No obstante, la apertura del canal se ve afectada por la temperatura; la conformación cerrada de la compuerta es favorecida a temperaturas bajas, por debajo de 25°C (Ge *et al.* 2014).

## 1.4. Estudio de toxinas

Las toxinas biosintetizadas en sistemas de expresión heteróloga son utilizadas en diversos experimentos, entre los que destacan la determinación de su estructura tridimensional por Resonancia Magnética Nuclear, la medición de su actividad como bloqueadores de canales iónicos por electrofisiología y la actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares y/o parásitos. Todos los experimentos antes mencionados requieren de cantidades de toxina superiores a un miligramo. Por ejemplo, los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear bidimensionales (COSY, TOCSY y NOESY) requieren de una concentración de proteína entre 1 y 10 mM, con el objetivo de generar espectros óptimos para la asignación de señales; usar una concentración menor a 1 mM genera espectros de difícil asignación de señales.

Previamente, han sido biosintetizadas algunas toxinas de alacrán usando el sistema de expresión pET, la mayoría en el citoplasma de *Escherichia coli* (Tabla 1). El común denominador en todas las producciones es el bajo rendimiento de purificación de toxina, reportado en mg de toxina por litro de medio de cultivo, en el orden de unidades de miligramo para las purificaciones más exitosas. Así, para realizar los experimentos antes mencionados, se deben procesar varios litros de cultivo celular para producir la cantidad mínima requerida.

Tabla 1. Rendimiento en la purificación de toxinas

Toxina	Sistema de expresión	Rendimiento de purificación (mg/L)	Referencia
GM-Tamapina	pET40b-C41	0.5	(Colorado-cortes, 2016)

Tabla 1. Rendimiento en la purificación de toxinas (continuación)			
Toxina	Sistema de expresión	Rendimiento de purificación (mg/L)	Referencia
rHge36	pET32a-Rosetta	5.3	(Flores-Solís, 2016)
HgeD	pET32a-Rosetta	1.7	(Flores-Solís, 2016)
Tt28	pET32a-Rosetta	0.05	(Flores-Solís, 2016)
r-tamapina	pET32a-Rosetta-gami	1.5	(Ramírez-Cordero, 2015)
r-tam-R6A	pET32a-Rosetta-gami	2	(Ramírez-Cordero, 2015)
r-tam-R7A	pET32a-Rosetta-gami	1.5	(Ramírez-Cordero, 2015)
r-tam-R13A	pET32a-Rosetta-gami	1.8	(Ramírez-Cordero, 2015)
r-Tam-R6A/R7A	pET32a-Rosetta-gami	2.8	(Ramírez-Cordero, 2015)
TsTxK-b	pET32a-C41	0.5	(Gómez-Reynoso, 2014)
GS-Ts16	pET32a-Rosetta	0.56	(Flores-Solís, 2012)
Tx1	pET32a-Tuner	0.7	(Saucedo-Yañez, 2012)
GS-Def1	pET32a-Rosetta	0.04	(Franco-Bodek, 2011)

## 1.5. Toxina Ts16

La Ts16 constituye uno de los componentes proteicos del veneno del alacrán *Tytus serrulatus*, especie endémica de Brasil. La secuencia primaria de la Ts16 se compone de 29 aminoácidos que adquieren una conformación estructural tipo hélice-asa-hélice, propia de la familia de toxinas  $\kappa$ -KTx. Dicha estructura se estabiliza por la formación de tres enlaces disulfuro; cuya conectividad entre los residuos de cisteína es C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. En la Figura 5 se presenta tanto la estructura resuelta por RMN de la Ts16; como la secuencia de aminoácidos (Flores-Solis 2012).

La Ts16 ha sido biosintetizada previamente utilizando el sistema de expresión pET. El gen de la toxina optimizado para la expresión en *Escherichia coli* fue subclonado en el plásmido pET32(a), que genera una proteína de fusión con tiorredoxina, y se expresó en el citoplasma de la cepa Rosetta.

Este mecanismo de expresión probó ser eficiente en la producción de proteína de fusión, obteniéndose un rendimiento de 12 mg por litro de cultivo; no obstante, el rendimiento de purificación disminuye durante las etapas de digestión enzimática con trombina y la separación con cromatografía de líquidos de alta eficiencia hasta en 0.56 mg de toxina por litro de medio de cultivo (Flores-Solis 2012). Con el objetivo de producir suficiente toxina para hacer los experimentos de resonancia magnética nuclear, que dieron cabida a la elucidación de su estructura, se tuvo que purificar la toxina producida en 12 litros de cultivo celular.

Adicionalmente, la Figura 5C muestra el cromatograma de la etapa de purificación después del corte enzimático, donde se aprecia la presencia de dos especies abundantes (indicadas con los números 1 y 2) que eluyen con diferencia de un minuto entre ellas. Lo anterior indica que hay dos especies estructuralmente parecidas de la toxina

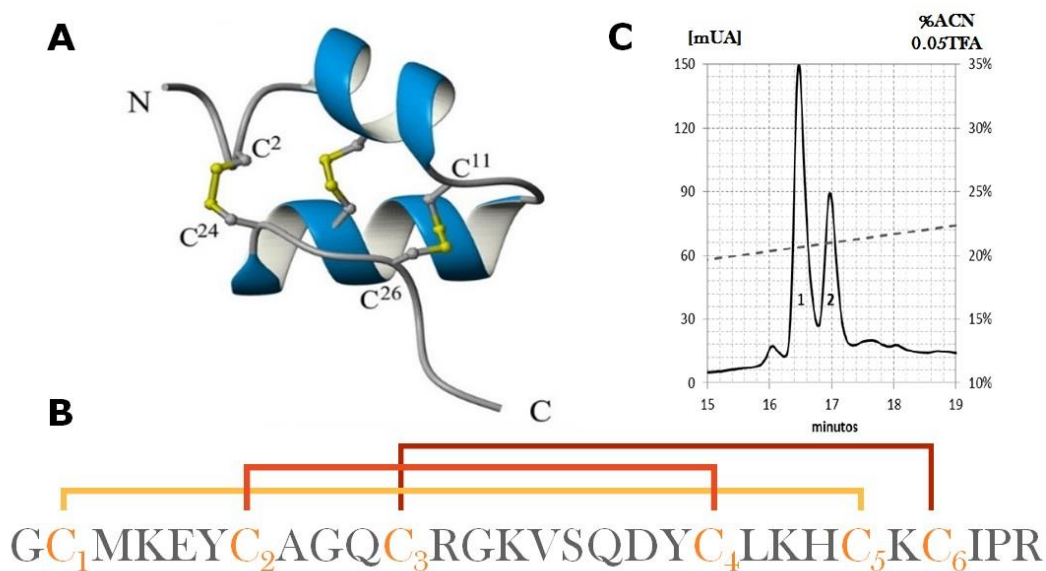


Figura 5. Toxina Ts16. A) Estructura resuelta por RMN. Presenta un motivo estructural tipo hélice-asa-hélice, característico de la familia de toxinas  $\kappa$ -KTx, estabilizado por tres enlaces disulfuro. Imagen tomada de Saucedo *et al.*, (2012). B) Secuencia primaria. Se resaltan los residuos de cisteína en amarillo; así como la conectividad de enlaces disulfuro entre dichos residuos, respetando el orden C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. C) Cromatograma de purificación de la toxina expresada en citoplasma de *Escherichia coli*. Se identifican dos isómeros estructurales de la toxina Ts16 (1 y 2). La línea punteada indica el gradiente de acetonitrilo con 0.05% TFA utilizado y la escala izquierda muestra la absorbancia a 230 nm, presentado en mili unidades de absorbancia [mUA]. Imagen tomada del trabajo de tesis de Maestría de Flores-Solis (2012).



---

que son favorecidas, su única diferencia radica en la conectividad de enlaces disulfuro. La especie 1 es la que corresponde con la toxina con las conectividades esperadas.

Finalmente, debido a que el diseño experimental contempla la proteólisis de la proteína de fusión con la proteasa trombina, que libera la toxina Ts16 con dos residuos de aminoácido adicionales (glicina y serina (GS)), se opta por nombrar a este producto de liberación como GS-Ts16. En consecuencia, la masa molecular de la proteína oxidada y el tiempo de retención en cromatografía de líquidos de alta eficiencia son afectados.

---

## 2. Planteamiento del problema

---

En virtud de que el paso limitante en la expresión de toxinas proteicas radica en el plegamiento, resultado de la adecuada conectividad de los enlaces tipo puente disulfuro; el método para la expresión y purificación de la toxina adquiere relevancia. Como consecuencia, el método empleado tiene que permitir la máxima biosíntesis de la toxina con el plegamiento esperado por la priorización de las conectividades adecuadas entre cisteínas.

Así, se propone implementar un método de biosíntesis que produzca la toxina con el plegamiento esperado. La exportación de la proteína de fusión al periplasma ha probado ser una estrategia conveniente para la producción de proteínas con plegamiento estabilizado por enlaces tipo puente disulfuro, así como el favorecimiento de las conectividades entre cisteínas que generan una estructura de baja energía, en términos termodinámicos (Klint *et al.* 2013).

Con la finalidad de demostrar que el método propuesto no genera productos aberrantes distintos a los esperados, se hace fundamental la comprobación de éste. Por ende, se precisa de una toxina previamente estudiada para utilizar como control, de tal manera que la conclusión final este en función del método propuesto y no de la toxina. La toxina Ts16, estudiada previamente por el Dr. David Flores Solis (2012), prometer ser la mejor candidata para comprobar la eficiencia del método propuesto; debido a que se conocen los diferentes plegamientos favorables en *Escherichia coli*.

---

## 3. Hipótesis y objetivos

---

### 3.1. Hipótesis

Sí la toxina GS-Ts16 es exportada al periplasma de *Escherichia coli*, entonces adquirirá el plegamiento esperado; lo que se reflejará en un notable aumento en el rendimiento de biosíntesis.

### 3.2. Objetivo general

Determinar si la exportación de la toxina GS-Ts16 al periplasma de *Escherichia coli* favorece su plegamiento esperado.

### 3.3. Objetivos particulares

1. Construir el plásmido pET40(b)-Ts16.
2. Definir las condiciones de la expresión de la proteína de fusión DsbC-Ts16.
3. Optimizar la purificación de periplasma de *Escherichia coli*.
4. Determinar el rendimiento de la expresión de GS-Ts16 en el nuevo método de expresión.

---

## 4. Estrategia experimental

---



---

## 5. Desarrollo experimental

---

### 5.1. Subclonación del gen Ts16 de pET32(a)-Ts16 en pEt40(b)

El plásmido pET40b-Ts16 fue construido al ligar el gen que codifica para Ts16, previamente extraído del plásmido pET32a-Ts16 (Figura A5) (Saucedo et al. 2012), usando las enzimas BamHI y KpnI (Anexo A6), con el vector pET40b, digerido con las mismas enzimas, usando la T4 ADN ligasa (Anexo A9). El plásmido y el inserto se purificaron del gel de agarosa al 2.5 % de acuerdo con el protocolo de "QIAquick gel extraction kit" (Anexo A8). La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes DH5 $\alpha$  y se sembraron en placas de LB con Kanamicina (Anexo A3). 12 colonias se sembraron en medio líquido LB con Kanamicina y se incubaron a 37°C con agitación para purificar ADN **plasmídico utilizando el protocolo de "QIAprep miniprep kit" (Anexo A5). Se realizó un ensayo de restricción con las enzimas SmaI y EcoRV para verificar la presencia del inserto (Anexo A6). Cuatro clonas positivas se enviaron a Laragen Inc. para la secuenciación utilizando el terminador T7.**

### 5.2. Expresión de DsbC-Ts16 y purificación de GS-Ts16

#### 5.2.1. Definición de las condiciones de expresión de DsbC-Ts16

Para establecer las condiciones óptimas de expresión de DsbC-Ts16 se hicieron 4 diferentes ensayos en los cuales se probaron 1) diferentes cepas de *Escherichia coli*, 2) temperatura de inducción 3) tiempo de inducción y 4) concentración de IPTG

##### 5.2.1.1. Cepa

El plásmido pET40b-Ts16 fue transformado en 4 cepas de *Escherichia coli*: BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, Rosetta y C41 (Anexo A3). Una colonia aislada de cada transformación se creció durante toda la noche a 37°C en medio LB, con los antibióticos correspondientes. Se realizó una

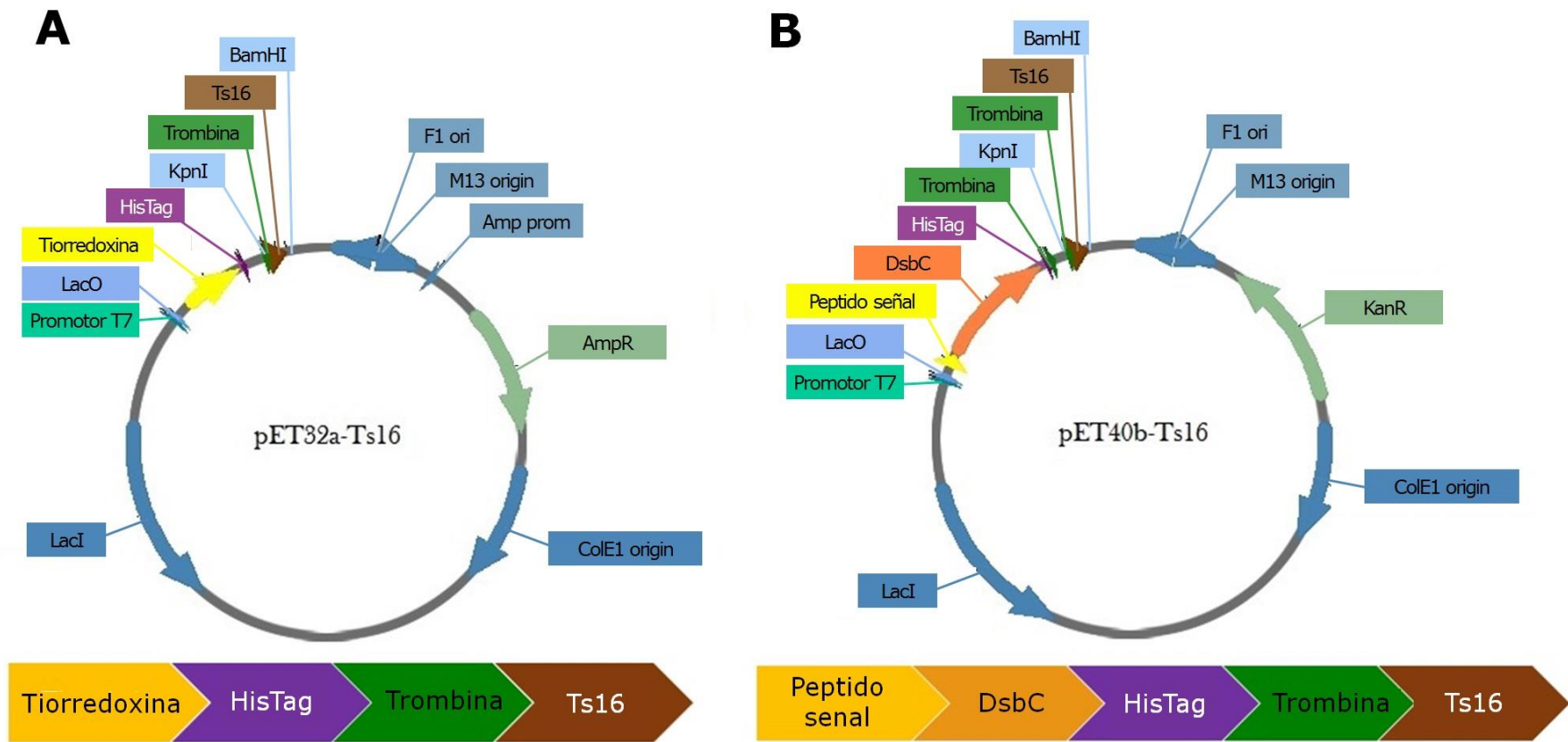


Figura 6. Representación gráfica de pET32a-Ts16 y pET40b-Ts16. A) pET32a-Ts16. Región codificante regulada por el promotor T7: tiorredoxina (amarillo), etiqueta de histidinas HisTag (morado), sitio de reconocimiento de trombina (verde), Ts16 (café); componentes de la proteína de fusión Tio-Ts16. B) pET40b-Ts16. Región codificante regulada por el promotor T7: péptido señal (amarillo), DsbC (naranja), etiqueta de histidinas HisTag (morado), sitio de reconocimiento de trombina (Verde), Ts16 (Café); componentes de la proteína de fusión DsbC-Ts16. Imágenes producidas en Serial Cloner V2.5.

---

dilución 1:20 de éste cultivo en medio nuevo y se dejó crecer bajo las mismas condiciones hasta una OD 600 nm entre 0.7 y 0.8. Se comenzó la inducción de la proteína de fusión DsbC-Ts16 con IPTG a una concentración final de 1.0 mM por 16 horas a 37°C.

#### *5.2.1.2. Temperatura y tiempo*

Una vez que se seleccionó la cepa en donde se observó una mayor producción de la proteína en estudio, se procedió a mejorar la expresión variando la temperatura y el tiempo de inducción. Se siguió el mismo protocolo descrito en la sección anterior y después de agregar el IPTG, las muestras fueron incubadas a 20°C, 30°C y 37°C. La toma de muestra fue cada 3 horas hasta cumplir con 36 horas, el volumen de alícuota fue de 10 mL de cultivo celular.

#### *5.2.1.3. Concentración de IPTG*

Una vez que se determinó la temperatura y tiempo de inducción óptimos se procedió a determinar la concentración de IPTG a la cual se puede obtener una mejor producción de la proteína, se probaron concentraciones finales de IPTG: 0.1, 0.5, 1.0 y 10.0 mM, siguiendo el mismo procedimiento descrito en las secciones anteriores.

Para monitorear cada una de las condiciones anteriormente mencionadas, la biomasa se separó del medio por centrifugación y se lisó en su totalidad por sonicación (Anexo A11). La fracción soluble se separó del lisado por centrifugación y se cargó en un gel de SDS-PAGE 12% (Anexo A16 y 17).

### **5.2.2. Extracción selectiva de proteínas de periplasma**

La purificación de proteínas de periplasma debe de realizarse de manera muy cuidadosa para evitar que esta preparación se contamine con proteínas de citoplasma. De inicio se probó el método descrito en el Manual pET(Novagen 2011), y después de evaluar los resultados, se optó por hacer algunas modificaciones al mismo: 1) se disminuyó el volumen de la disolución hipertónica de 250 mL a 25mL por gramo de biomasa, 2) se eliminó el paso de resuspensión en la disolución hipotónica y 3) se adicionó lisozima, como es descrito por Birdsell and Cota-Robles (1967). Protocolo descrito en anexo A12.

---

El efecto que tiene la lisozima en la preparación de periplasma se evaluó en función del tiempo de tratamiento a temperatura ambiente y a una concentración de enzima constante (0.5 mg/mL). Para monitorear que el efecto de la lisozima no altera la membrana celular se midió **la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa** en tanto la preparación del periplasma como de citoplasma, obtenidas de la misma biomasa, a través de la hidrólisis del orto-nitrofenil-d-galactopiranosido (ONPG) por espectrofotometría a 420 nm.

Se realizó la inducción de la proteína bajo las condiciones establecidas anteriormente. La biomasa se trató con el método de lisis selectiva asistida por lisozima (Anexo A12), tomándose muestras a tres tiempos de tratamiento total (30, 60 y 120 min). La fracción soluble generada por este método se denominó fracción periplasmática y la fracción insoluble obtenida se resuspendió en amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0) y posteriormente se liso por sonicación (Anexo A11) para obtener la fracción citoplasmática de cada tiempo evaluado. Se mezclaron 50  $\mu$ L de la fracción a evaluar con 48  $\mu$ L de reactivo de ONPG (33.86 mM ONPG en amortiguador de fosfatos pH 7, 100 mM) en un volumen final de 1000  $\mu$ L. Se determinó la absorbancia a 420 nm durante los primeros 5 minutos después de iniciada la reacción a intervalos de 10 s. Con los datos de absorbancia a 60 s de iniciada la reacción se construyó una gráfica que muestra la relación entre las fracciones periplasmática y citoplasmática para cada tiempo evaluado (30, 60 y 120 minutos).

### 5.2.3. Composición del medio de cultivo

Después de cuantificar la cantidad de proteína purificada de periplasma, se decidió evaluar la composición del medio de cultivo Luria-Bertani (LB), de acuerdo con los resultados de Sochacki y colaboradores (2011), con la finalidad de enriquecer la fracción periplasmática. Las variables modificadas fueron tres: 1) aumentar la concentración de NaCl desde 10 g/L hasta 30g/L, 2) la adición de  $K_2HPO_4$  para amortiguar al medio a pH 7 (sin la adición de NaCl, pero igualando la osmolaridad del medio preparado con 10 g/L de NaCl,  $O_s = 0.34$  M) y 3) la adición de glicerol (10 g/L); en todos los casos la cantidad de triptona y de extracto de levadura permaneció constante.

La expresión de la proteína DsbC-Ts16 se realizó en 250 ml de medio de acuerdo a las condiciones previamente formuladas, junto con



---

un control preparado con la composición de medio LB usual (Anexo A1). Después de preparar las fracciones periplásmicas (Anexo A12) y citoplásmicas (Anexo A11), la proteína de fusión DsbC-Ts16 se purificó por cromatografía de afinidad metal-quelado con una columna HiTrap (Anexo A13). La fracción eluída de la columna HiTrap con 500 mM imidazol se desaló por extracción en fase sólida con una columna Strata C-18T eluyendo con 5 mL de acetonitrilo con 0.05% TFA (Anexo A15) y finalmente se liofilizó. La cantidad de proteína de fusión se cuantificó gravimétricamente, el rendimiento de expresión se reportó en mg de proteína de fusión por L de cultivo celular.

## 5.2.4. Obtención de la GS-Ts16

### 5.2.4.1. Purificación de la proteína de fusión con HiTrap

Se determinó la concentración de imidazol adecuada para lavar y eluir la proteína de fusión DsbC-Ts16 de la columna de CAMQ HiTrap usando un gradiente creciente escalonado de imidazol desde 0 hasta 500 mM. La proteína de fusión DsbC-Ts16 fue extraída de la lisis total por sonicación de células C41 transformadas con pET40b-Ts16 incubadas a 30°C por 16 horas después de ser inducidas con 0.5 mM IPTG. Se cargó un gel de SDS-PAGE 12% con muestras de las fracciones eluídas con cada concentración de imidazol evaluada.

### 5.2.4.2. Corte enzimático con trombina

Se efectuó un estudio de cinética enzimática de la proteasa trombina, inmovilizada en esferas de agarosa, sobre la DsbC-Ts16. Se evaluó el tiempo de reacción a temperatura ambiente bajo concentración de enzima constante (30  $\mu$ L /mL, de una suspensión 50% m/v), a concentración de proteína de fusión DsbC-Ts16 constante (1 mg/mL) y composición del amortiguador constante (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl). La trombina inmovilizada fue activada mediante tres lavados en amortiguador de activación (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) antes de la adición al medio de reacción. Se tomaron muestras del medio de reacción cada 3 horas hasta completar 12 horas y después cada 4 horas hasta completar 24 horas. Las muestras fueron cargadas en un gel de Tricina-SDS-PAGE 16%.

---

### 5.2.5. Determinación del rendimiento de expresión

Dado el poco rendimiento observado en la purificación de la toxina Ts16 debido principalmente a una reducida retención en la columna de CAMO (HiTrap) y un corte ineficiente de la trombina se propuso agregar 500 mM urea al medio que contiene la proteína de fusión, después de la etapa de lisado selectivo. Para determinar el rendimiento final de expresión y purificación de GS-Ts16, está se obtuvo de ambos mecanismos de producción: Rosetta-pET32a-Ts16 y C41-pET40b-Ts16.

Para Rosetta-pET32a-Ts16 se separó la biomasa producida en 1.5 L de medio LB, se lisó por completo mediante sonicación (Anexo A11), se purificó usando la columna HiTrap eluyendo con 500 mM imidazol (Anexo A13), se digirió con trombina por 16 horas (Anexo A14), después de separar la toxina GS-Ts16 de los residuos de corte con la columna HiTrap, se desaló y se purificó usando la columna Strata-C18T (Anexo A15), eluyendo con 60% acetonitrilo 0.05% TFA y se liofilizó.

Para C41-pET40b-Ts16 se separó la biomasa de 4.5 L de medio LB modificado (Anexo A2), se liso con el método de lisis para obtención de periplasma asistido con lisozima (fracción periplasmática) (Anexo A12), se continuó lisando por sonicación (fracción citoplasmática) (Anexo A11), se agregó a ambas fracciones urea hasta 0.5 M, se purificó usando la columna HiTrap eluyendo con 150 mM imidazol (Anexo A13), se digirió con trombina por 16 horas (Anexo A14), después de separar la toxina GS-Ts16 de los residuos de corte con la columna HiTrap, se desaló y se purificó usando la columna Strata-C18T (Anexo A15), eluyendo con 60% acetonitrilo 0.05% TFA y se liofilizó. La toxina GS-Ts16 se disolvió en agua desionizada grado MilliQ y se puso de manifiesto mediante un gel de Tricina-SDS-PAGE 16%.

Para determinar la masa molecular teórica de la toxina GS-Ts16 se recurrió al programa de acceso libre "*ProtParam tool*" de la base de datos *ExpASY* (Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. 2005).

Finalmente, la Ts16 se purificó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia usando una columna de fase reversa proteo C-12 (Phenomenex) en un cromatógrafo *Varian ProStar* (Anexo A21), implementándose el programa de elución reportado por Flores-Solís (2012). Las fracciones con los mismos tiempos de retención se

---

juntaron para su análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF en un equipo *Bruker Daltonics microflex* (Anexo A20).

Para determinar el rendimiento de la expresión y purificación de la toxina GS-Ts16 de ambos mecanismos de producción se cuantificó la masa total de toxina GS-Ts16 obtenida por gravimetría y se reportó como mg de toxina por litro de medio de cultivo.

---

## 6. Análisis y discusión de resultados

---

### 6.1. Subclonación del gen Ts16 de pET32(a)-Ts16 en pEt40(b)

La construcción del plásmido se comprobó por digestión enzimática y por secuenciación de ADN. La digestión enzimática involucra la selección de una enzima de restricción tal que su sitio de reconocimiento se encuentre dentro de la secuencia codificante de la toxina Ts16, pero que no esté presente en la secuencia de ADN del plásmido original. Por otro lado, la secuenciación de ADN de la región codificante anterior al terminador T7 fue realizada por Laragen Inc.

Se procedió a digerir enzimáticamente tanto al plásmido purificado de 12 colonias positivas a la ligación, como al plásmido original pET40(b). Las enzimas utilizadas para los ensayos fueron las enzimas SmaI y EcoRV, en reacciones por separado. En un estudio *In silico* de los ensayos de restricción se determinó la longitud en pares de bases (pb) de los fragmentos esperados para ambas reacciones y ambos plásmidos, usando el simulador de corte "NEBCutter V2.0" (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) y la secuencia de ADN de ambos plásmidos construidos manualmente en un programa editor de textos (Tabla 2).

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos después de las digestiones con ambas enzimas. En la Figura 7A se muestran los resultados obtenidos con la enzima EcoRV y Figura 7B los resultados de la digestión con la enzima SmaI. Las doce muestras analizadas muestran los patrones de bandas esperados para la construcción pET40b-Ts16; una sola banda para la reacción con SmaI y las bandas correspondientes a los topoisómeros del ADN en la reacción con EcoRV,

Tabla 2. Resultados de los ensayos de restricción *In silico*

Plásmido	pET40(b)		pET40(b)-Ts16	
Enzima de restricción	EcoRV	SmaI	EcoRV	SmaI
Fragmentos generados	1	2	No corta	1
Extensión de fragmento(s) [pb]	6190	4875 1315	6254	6254

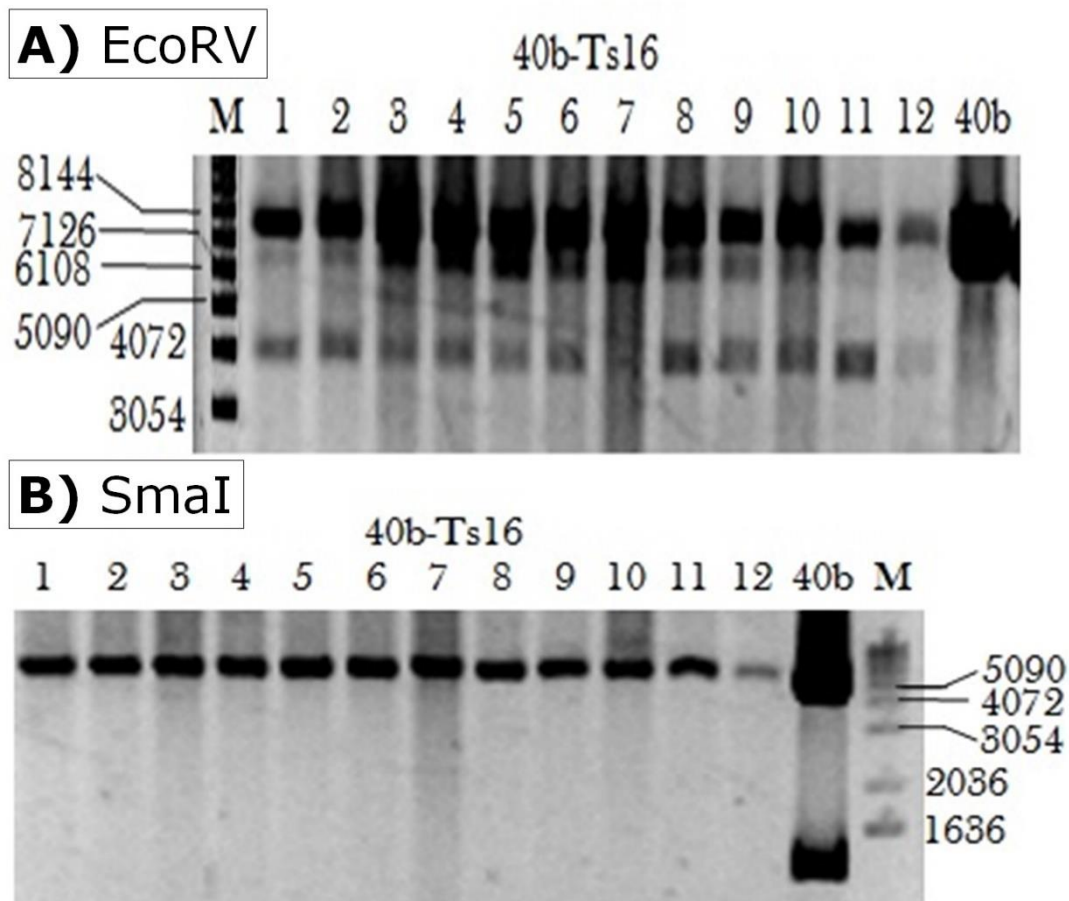


Figura 7. Restricción enzimática sobre pET40b-Ts16. Geles de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio. A) Ensayo con EcoRV. 1-12) mezcla de reacción del plásmido pET40b-Ts16, se observan las bandas correspondientes a los topoisómeros del plásmido sin digerir; 40b) mezcla de reacción del plásmido pET40b, se observa una sola banda en el desplazamiento del peso esperado (6190 pb). B) Ensayo con SmaI. 1-12) mezcla de reacción del plásmido pET40b-Ts16, se observan una sola banda en el desplazamiento del peso esperado (6254 pb); 40b) mezcla de reacción del plásmido pET40b, se observan dos bandas en los desplazamientos de los pesos esperados (4875 pb, 1315 pb).

que resultó ser diferente a los fragmentos observados en el plásmido control pET40b.

Los resultados de la secuenciación, presentados en la Figura 8, muestran que en el gen están contenidas las regiones codificantes de las secciones más importantes de la proteína de fusión, que son la cadena carboxilo terminal de la chaperona DsbC, la etiqueta de histidinas o HisTag, dos sitios de reconocimiento de la proteasa trombina y la Ts16. La secuencia de ADN de los cuatro plásmidos analizados presenta la composición esperada; por lo tanto, cualquiera de los cuatro plásmidos es adecuado para la expresión de la Ts16.

```

                                >DsbC [*]
                                |
CTTGTTCCGGGTTACCAGCCGCCGAAAGAGATGAAAGAATTTCTCGACGAACACCAAAAAATGACCAGCGGTAAAGGATCAA < 82
L V P G Y Q P P K E M K E F L D E H Q K M T S G K G S T

                                >6His
                                |
                                >Trombina
CTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACCATCCGCGGGTCTGGTGCCACGCGGTAGTACTGCAATTGGTATGAAAGAAAC < 164
S G S G H H H H H H S A G L V P R G S T A I G M K E T

                                >S-tag
                                |
                                >Trombina
CGCTGCTGCTAAATTGGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGGTCTGGTGCCACGCGGTCTGGTTGTATG < 246
A A A K F E R Q H M D S P D L G T G L V P R G S G C M

                                >Ts16 [*]
                                |
AAGGAGTACTGTGCAGGTCAATGTCGTGGCAAGGTGAGCCAGGATTATTGCCTGAAGCACTGCAAGTGCATCCCACGTTAA < 327
K E Y C A G Q C R G K V S Q D Y C L K H C K C I P R *

```

Figura 8. Fragmento de la secuencia codificante de pET40b-Ts16. Se observa la secuencia de la región del carboxilo terminal de la DsbC (naranja), la etiqueta de histidinas (morada), el sitio de reconocimiento de trombina (verde), la Ts16 (café).

## 6.2. Expresión y purificación de GS-Ts16

### 6.2.1. Calculo teórico de la masa molecular de la proteína de fusión

En un estudio *In silico*, se calcularon las diversas masas moleculares de la proteína de fusión DsbC-Ts16 que pueden generarse en la expresión. Se utilizó el programa de acceso libre "*Compute pI/Mw tool*" (Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. 2005)([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) junto con la secuencia de ADN que codifica para la proteína de fusión del plásmido pET40b-Ts16. La proteína de fusión es expresada en el citoplasma; cuando se exporta al periplasma, el péptido señal es digerido. Así, la masa molecular de la proteína disminuye. Los resultados son presentados en la tabla 3; cabe resaltar que los datos generados por esta plataforma corresponden al estado totalmente reducido de la proteína.

Tabla 3. Resultados de las masas moleculares de la proteína de fusión DsbC-Ts16 *In silico*.

	Masa molecular calculada (KDa)
sp-DsbC-Ts16	34.4
DsbC-Ts16	32.2

SP: Péptido señal

---

## 6.2.2. Definición de las condiciones de expresión de DsbC-Ts16

Inicialmente se establece el mecanismo de producción más adecuado para el plásmido pET40b-Ts16. Los estudios abarcan la selección de la cepa de *Escherichia coli* que fungirá como hospedera, la temperatura de expresión, el tiempo total de expresión y la concentración final de IPTG para la inducción. Los resultados observados en los geles SDS-PAGE corresponden a la fracción soluble total de proteína de cada mecanismo de producción evaluado; como consecuencia, se espera que un par de bandas sobresalten, mismas que corresponden a ambas formas de la proteína de fusión: con y sin el péptido señal.

En la Figura 9 se compara la expresión soluble total de la proteína de fusión DsbC-Ts16, indicada con las flechas rojas, en las diferentes cepas en estudio. El orden creciente de expresión de la proteína de fusión soluble es BL21 (DE3) pLysS < BL21 (DE3) < Rosetta < C41. Se eligió la cepa C41 como hospedera para los estudios subsecuentes debido a que es la cepa en la que hay la máxima expresión de la proteína de fusión DsbC-Ts16; además, la cepa C41 se caracteriza por soportar expresiones de proteínas tóxicas que otras cepas de *Escherichia coli* no toleran (Wagner *et al.* 2008).

En la Figura 10 se muestran los resultados de expresión obtenidos variando temperatura y tiempo; de igual manera, las flechas rojas indican la banda correspondiente con la proteína de fusión. Este estudio evidencia que la inducción de la expresión de la proteína de fusión alcanza un estado estacionario después de 16 h (37°C), 24h (30°C) y 28 h (20°C); además, la evaluación a 37°C expone que la banda respectiva a la proteína de fusión exportada al periplasma se hace constante en intensidad después de las 16 h, mientras que la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de fusión que permanece en citoplasma disminuye. Se opta por realizar la expresión a 30°C en un periodo de 16 horas. La elección del tiempo de expresión fue hecha en función de las características de la cepa C41 y por el establecimiento de un aparente estado estacionario en la exportación al periplasma de la proteína de fusión; mientras que la elección de la temperatura fue por las características del translocón SecY.

Finalmente, en la Figura 11 se muestra el efecto de la concentración final de IPTG. La máxima expresión de proteína de fusión se nota a partir de 0.5 mM. Para los experimentos venideros se utilizó la concentración final mínima de IPTG para generar la máxima expresión de proteína de fusión con la menor cantidad de inductor, que corresponde a 0.5 mM.

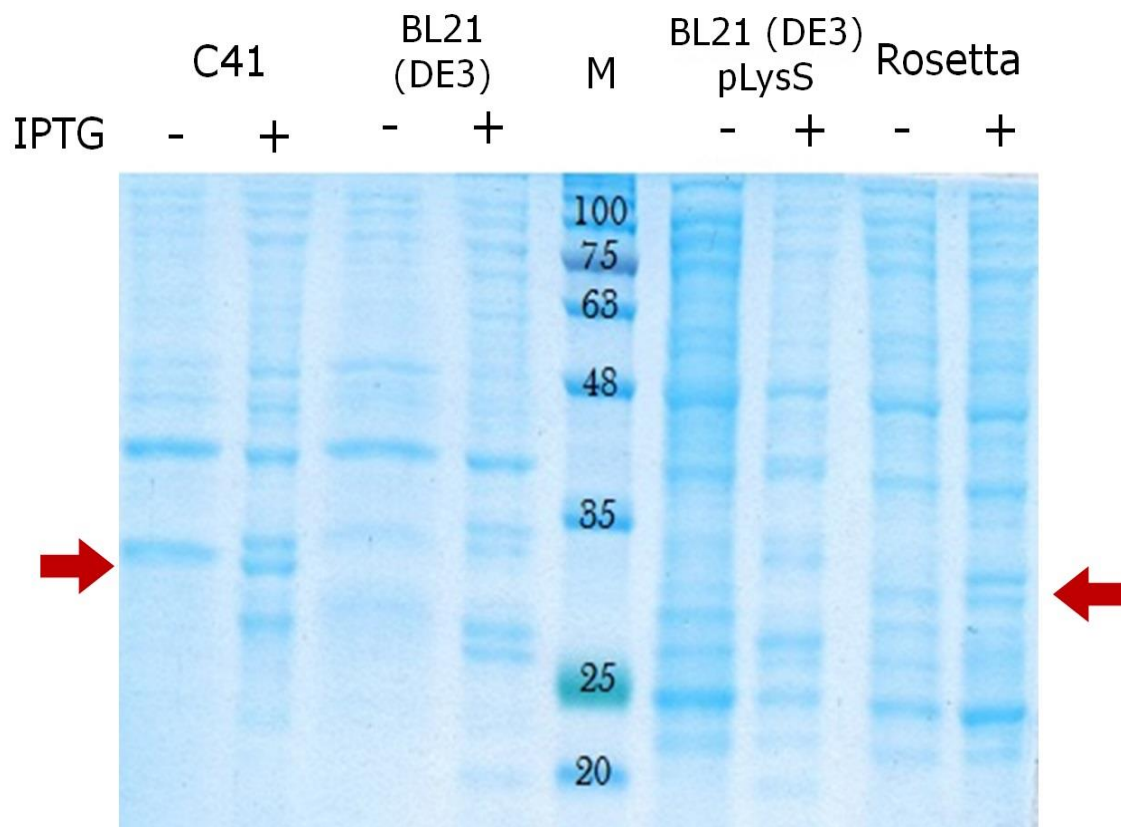


Figura 9. Estudio de cepas. En todos los casos, el primer carril se cargó con muestra previa a la inducción (-); mientras que el segundo carril contiene muestra después de 8 h de la inducción (+). De derecha a izquierda: C41, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, Rosetta. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a la proteína de fusión en sus dos versiones: con y sin péptido señal.



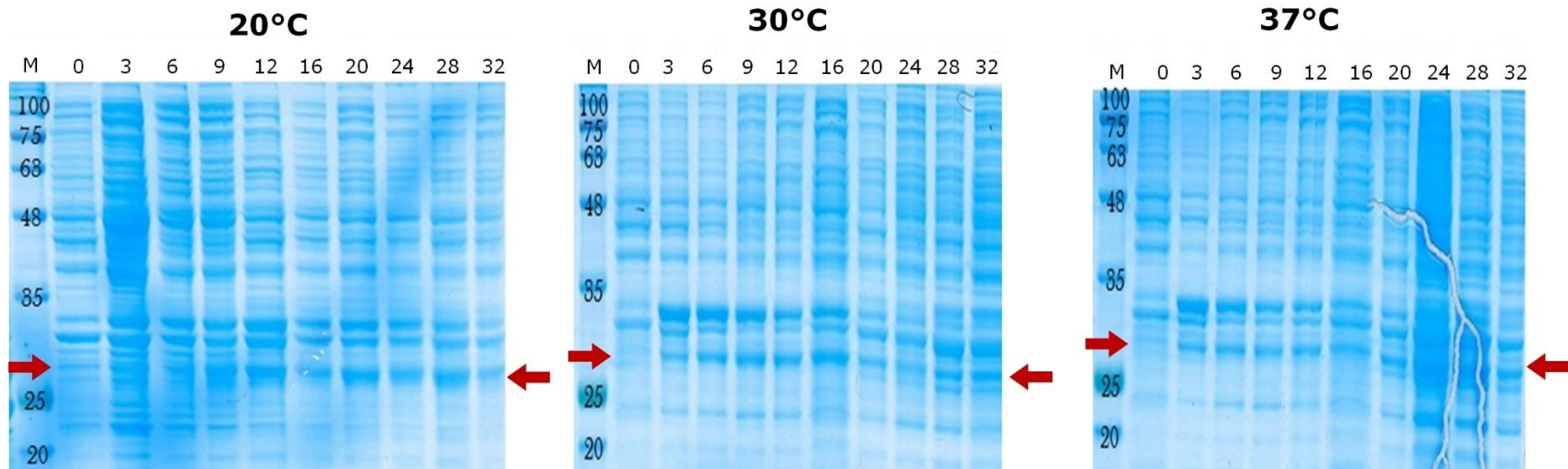


Figura 10. Determinación de la temperatura y el tiempo total de expresión. 0-32) Muestras de expresión en función del tiempo, el número es igual al tiempo de inducción en h. Los geles de izquierda a derecha representan los estudios a 20°C, 30°C y 37°C. Las flechas rojas muestran las bandas que corresponden con la proteína de fusión en sus dos versiones: con y sin péptido señal.

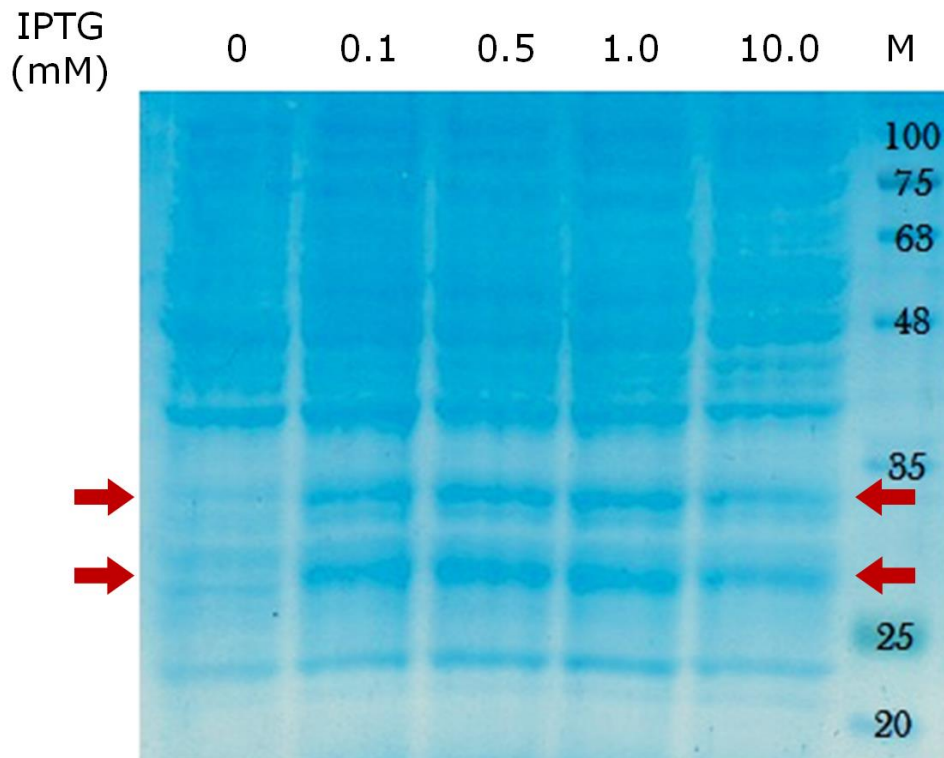


Figura 11. Efecto de la concentración de inductor (IPTG). 0) muestra antes de la inducción, 0.1-10.0) muestras de expresión de DsbC-Ts16 a 30°C después de 16 h de la inducción a diferentes concentraciones de IPTG (mM). Las flechas rojas muestran las bandas correspondientes a la proteína de fusión en sus dos versiones: con y sin péptido señal.

### 6.2.3. Extracción selectiva de proteínas de periplasma

El método más adecuado para la extracción selectiva de proteínas localizadas en periplasma necesariamente debe conjuntar dos cualidades. La primera es que permita el aislamiento de las proteínas de periplasma de la mayor cantidad de células tratadas y la segunda converge en la liberación de proteínas del citoplasma debida a la ruptura total de la mínima cantidad de células tratadas (Sun and Davidson 2002). Como consecuencia, se hace vital el estudio de las variables más influyentes en el método elegido para que las condiciones finales reflejen, lo más certeramente posible, la condición antes expuesta. Así, un desempeño inadecuado del método derivará en una precaria extracción de las proteínas de periplasma, pero con alta pureza; o en una elevada extracción de las proteínas de periplasma a costa de una pobre pureza por contaminación de proteínas del citoplasma.

---

Con el objetivo de contar con un mecanismo para evaluar el método de lisado selectivo, se optó por seguir la recomendación de Sun y Davidson (2002), quienes proponen la selección de una enzima presente en alguno de los compartimentos celulares; así, la actividad de dicha enzima estará en función de su liberación al medio. Mientras que una enzima de periplasma, como la fosfatasa alcalina, se libera casi en su totalidad y su actividad será máxima; la actividad de una enzima de citoplasma, como la NADH deshidrogenasa o la  $\beta$ -galactosidasa, será reducida o nula por su permanencia en el esferoplasto.

En un primer acercamiento a la extracción selectiva de proteínas de periplasma se evaluó el método descrito en el manual pET (Novagen 2011); sin embargo, se optó por modificarlo. La modificación más relevante es la adición de lisozima como auxiliar para la degradación de la pared celular.

La lisozima hidroliza el enlace  $\beta(1-4)$  entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil-D-glucosamina, característico del peptidoglicano. El resultado es la desestabilización de la pared celular hasta su degradación. Por lo tanto, a medida que aumente el tratamiento con lisozima, las células son más proclives a una ruptura completa debido a la fragilidad de su membrana interna, que queda expuesta.

El tiempo de tratamiento total con lisozima se determinó mediante la medición de la actividad la  $\beta$ -galactosidasa. Está es una enzima propia del citoplasma y se midió su actividad usando un método espectrofotométrico por hidrólisis del orto-nitrofenil-d-galactopiranosido (ONPG) (Heppel and Neu 1965). En función del aumento del tratamiento con lisozima, las células adquieren una mayor fragilidad por exposición de su membrana interna, lo que se refleja en el incremento de la liberación de la  $\beta$ -galactosidasa por la ruptura de las células más frágiles, acción que incrementa la velocidad de degradación del ONPG y con ello la intensificación de la absorbancia a 420 nm.

La Figura 12 muestra los datos de absorbancia registrados después de 60 s de iniciada la reacción de hidrólisis **del ONPG por acción de la  $\beta$ -galactosidasa** tanto para ambas fracciones celulares (periplasmática y citoplasmática) como para los tres periodos evaluados de tratamiento con lisozima. En la gráfica presentada en la Figura 12 es apreciable la

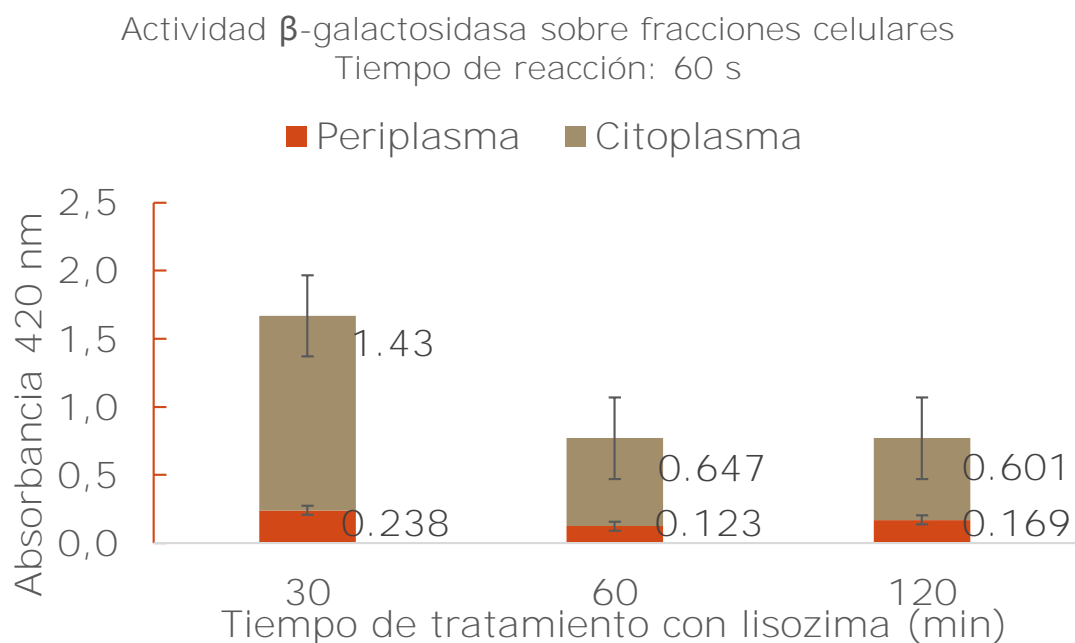


Figura 12. Efecto del tiempo de tratamiento con lisozima en la lisis para la obtención de periplasma. Se muestran los datos correspondientes a la absorbancia registrada a un tiempo de reacción de 60 s para ambas fracciones celulares (periplasmática en naranja y citoplasmática en café) y para los tres periodos evaluados del tratamiento de biomasa con lisozima. Los datos de absorbancia de citoplasma presentan una tendencia decreciente con el aumento en el tiempo de tratamiento con lisozima; mientras que los datos de periplasma aumentan con el tratamiento de lisozima únicamente en los periodos de 60 y 120 minutos.

tendencia decreciente de la absorbancia de la fracción citoplasmática con el aumento en el periodo de tratamiento con lisozima; mientras que la tendencia directamente proporcional de la fracción de periplasma entre la absorbancia y el periodo de tratamiento con lisozima es apreciable únicamente con periodos de 60 y 120 minutos. La liberación de la  $\beta$ -galactosidasa aumenta con el tiempo de tratamiento; lo que indica que el método va perdiendo la capacidad de selectividad en función del tiempo. Como conclusión, se determina que las células a someter a la lisis para extracción de periplasma deben tratarse con lisozima, bajo las condiciones antes expuestas, por no más de una hora a temperatura ambiente.

No obstante, cabe señalar que el método elegido para dar seguimiento al efecto de la lisozima sobre la liberación de proteínas del periplasma no proporciona información absoluta sobre la selectividad del método. El método sugerido por Sun y Davidson (2002) ostenta la desventaja de hallarse limitado por la propia enzima usada para evaluar el método. Si bien la cantidad de enzima se relaciona con la actividad enzimática,

---

ésta no es directamente proporcional; entonces, la enzima que es liberada puede presentar un comportamiento tan variable como lo permitan las condiciones experimentales, sin importar su cantidad exacta. Así, la escasa presencia de una enzima puede, tanto responsabilizarse de una elevada actividad enzimática de la misma, como de una reducida o nula actividad frente a un sustrato dado; derivándose un resultado sesgado para la selectividad del método de lisado.

Por lo tanto, la conclusión más pertinente es que el método provee de abundante, pero no absoluta, selectividad en el aislamiento de proteínas del periplasma

#### 6.2.4. Composición del medio de cultivo

El periplasma de *Escherichia coli* proporciona a la bacteria de la resistencia necesaria para sortear las condiciones adversas en el medio circundante; como resultado, el periplasma es de carácter dinámico y puede ajustar su volumen de acuerdo con las condiciones del medio. Con el objetivo de aumentar la capacidad de exportación de la proteína de fusión al periplasma de la bacteria, se evaluaron diferentes composiciones del medio de cultivo Luria-Bertani (LB). Las modificaciones propuestas fueron modificar la concentración de NaCl, adicionar  $K_2HPO_4$  para amortiguar el medio a pH 7 en sustitución de NaCl (igualando la osmolaridad el medio preparado con la del medio preparado con 10 g/L de NaCl,  $O_s = 0.34$  M) y adicionar glicerol (10 g/L). Cada modificación a la composición del medio se evaluó por separado, con el fin de evitar efectos potenciadores o reductores por la conjunción de varias modificaciones. La proteína de fusión expresada y aislada de cada compartimiento celular (periplasma y citoplasma) se cuantificó por gravimetría. El rendimiento se reportó en mg de proteína de fusión por L de cultivo celular.

La Figura 13 muestra que el incremento en la concentración de NaCl hace que aumente la cantidad de proteína de fusión aislada del periplasma; sin embargo, la cantidad de DsbC-Ts16 que permanece en citoplasma presenta un comportamiento distinto al de periplasma, la proteína aislada presenta valores máximos en los extremos de concentración de NaCl (5 y 30 g/L), aunque la tendencia es creciente desde 10 g/L hasta 30 g/L. El incremento en la cantidad de proteína exportada a periplasma se puede explicar por el aumento de volumen

del periplasma, resultado de los mecanismos que la célula desencadena para sortear las condiciones adversas del medio. Otra consecuencia de los mecanismos que la célula desencadena para sobrellevar las condiciones hipertónicas del medio es la sobreproducción de pequeños solutos para promover la permanencia del líquido dentro de ella; algunos de los solutos sobreproducidos son aminoácidos, como el glutamato y la prolina, lo que se refleja en un aumento en la expresión de la proteína de fusión, en su totalidad, con el incremento de la concentración de NaCl (Wood 2015). Sin embargo, también se observó una tendencia al aumento en el tiempo invertido en el crecimiento de biomasa con el aumento de la concentración de NaCl, donde el medio con 30 g/L presentó hasta el triple de tiempo que el medio preparado con 10 g/L.

La amortiguación del medio también produce un aumento en la expresión y en la exportación de la proteína de fusión; no obstante, debido a la amplificación en el tiempo de crecimiento bacteriano (hasta tres veces más que el control) y la triplicación de la cantidad de  $K_2HPO_4$

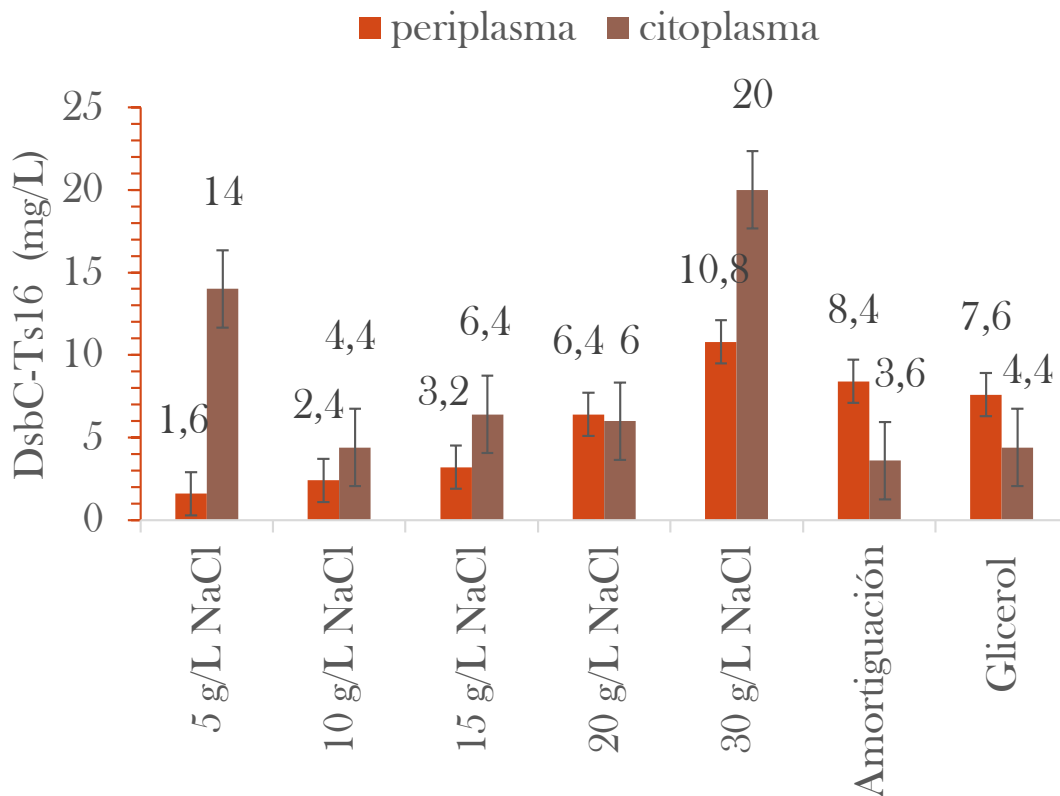


Figura 13. Variaciones al medio de cultivo. Representación gráfica del rendimiento de expresión de la proteína de fusión DsbC-Ts16 aislada de los compartimentos periplasmático (naranja) y citoplasmático (café); datos presentado en mg de proteína por litro de cultivo celular.

---

para igualar la osmolaridad de la concentración de NaCl adecuada ( $O_s=0.34\text{ M}$ ) hacen de esta opción poco viable para ser considerada como modificación al medio LB.

El último efecto analizado fue la adición de glicerol, mismo que mostró un tiempo del crecimiento bacteriano por debajo del control (cerca de tres cuartas partes del control) y un aumento notable en la expresión total de la proteína de fusión.

Bajo la premisa de aumentar el rendimiento de proteína de fusión con los menores efectos negativos, como lo sería el aumento al triple del tiempo de crecimiento de la biomasa de elegirse la máxima concentración de NaCl evaluada, en comparación con el control; se opta por modificar la composición del medio LB con la adición de glicerol (10 g/L) y con el aumento al doble de la concentración de NaCl (20 g/L).

## 6.2.5. Purificación de Gs-Ts16

### 6.2.5.1. *Purificación de la proteína de fusión con columna HiTrap*

La purificación de la proteína de fusión con la columna HiTrap se fundamenta en la retención de la proteína por acción de la quelación de la etiqueta de histidinas con el níquel (II) cargado en la columna. La retención de la proteína está en función de su propia estructura; así, se debe estudiar la interacción entre la proteína de fusión y la columna HiTrap con un gradiente de imidazol. La información proporcionada por este estudio permite definir la concentración de imidazol mínima para eluir la proteína de fusión; de tal manera que se establezca la concentración de imidazol para la etapa de lavado y la etapa de elución.

La Figura 14 muestra una reducida retención de la proteína de fusión DsbC-Ts16 en la columna HiTrap; la elución comienza desde el lavado con 25 mM imidazol y es total a 150 mM imidazol. Se optó por hacer los lavados de la proteína de fusión DsbC-Ts16 con un amortiguador sin imidazol y la elución con 150 mM imidazol.

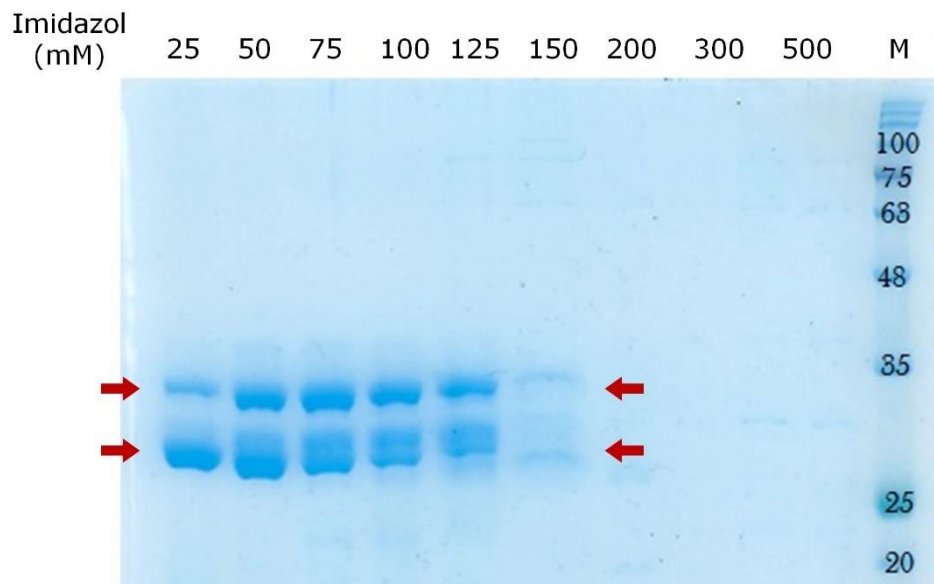


Figura 14. Elución de DsbC-Ts16 de la columna HiTrap en gradiente de imidazol. Muestra del eluato de las distintas concentraciones de imidazol usadas para eluir la proteína DsbC-Ts16 de la columna HiTrap. Los números indican la concentración de imidazol utilizada en mM. Las flechas rojas muestran las bandas correspondientes a la proteína de fusión DsbC-Ts16 en sus dos versiones (con y sin péptido señal), como resultado de la lisis total.

#### 6.2.5.2. Corte enzimático con trombina

El corte enzimático con la proteasa trombina se ve limitada por la accesibilidad del sitio de reconocimiento de la propia enzima en la proteína de fusión. Evaluar la cinética de corte enzimático es fundamental para definir el tiempo de reacción máximo antes de que la enzima produzca cortes inespecíficos en la proteína de fusión, mismos que derivan en la precipitación de la proteína.

La Figura 15 muestra el gel de Tricina-SDS-PAGE cargado con las muestras de la mezcla de reacción en función del tiempo. La escasa resolución del gel impide distinguir las dos bandas correspondientes a la proteína con y sin péptido señal, obtenidas como resultado de la lisis total de la biomasa. Es evidente debido a la ausencia de la banda correspondiente a la toxina GS-Ts16 que la proteólisis no se completa en su totalidad, aún después de las 24 horas de tratamiento; sin embargo, se presentan bandas indicativas de fragmentos producidos por sitios de corte inespecíficos después de las 16 horas. Para el trabajo rutinario se propone hacer la proteólisis por 16 horas.



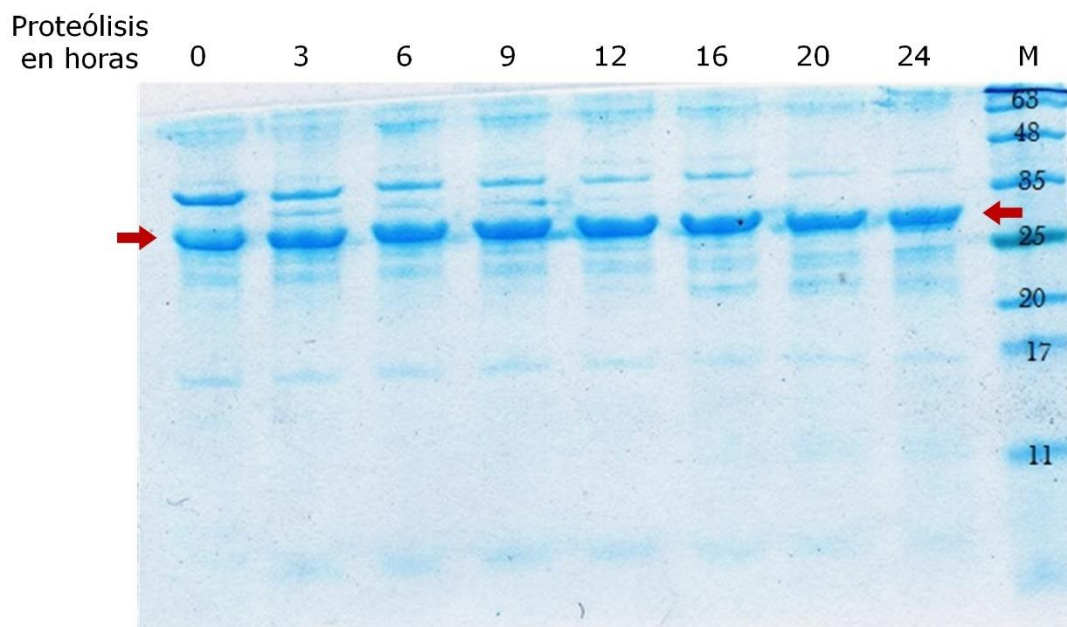


Figura 15. Proteólisis con trombina sobre la proteína DsbC-Ts16. Gel de Tricina-SDS-PAGE con muestras tomadas en función del tiempo de la digestión enzimática, el número indica el tiempo en horas. Las flechas rojas indican la banda correspondiente a la proteína de fusión DsbC-Ts16, debido a la escasa resolución, no se distinguen las dos bandas correspondientes a sus dos versiones (con y sin péptido señal).

## 6.2.6. Determinación del rendimiento de expresión

### 6.2.6.1. Adición de urea

Los experimentos de purificación de la proteína de fusión DsbC-Ts16 en la columna de CAMQ, HiTrap, y del corte enzimático con la proteasa trombina muestran una reducida retención y un corte ineficiente, respectivamente.

Una explicación a este fenómeno se encuentra en la formación del homodimero por parte del dominio de la DsbC. La DsbC nativa tiende a formar un homodimero para formar un conglomerado proteico en forma de V con sitio activo para la reducción de los enlaces disulfuro en la cavidad formada; la unión de ambas subunidades se da en la región amino terminal, mientras que la región carboxilo terminal contiene al dominio catalítico (Kadokura, Katzen, and Beckwith 2003). Así, la etiqueta de histidinas HisTag y el sitio de reconocimiento de la proteasa trombina, que se localizan en la región carboxilo terminal, se encuentran impedidos por la formación del homodimero, lo que se

---

refleja en una reducción notable de la retención de la proteína en la columna HiTrap y en la proteólisis enzimática.

Con el objetivo de eliminar la interacción entre subunidades, estabilizada por enlaces tipo puente de hidrógeno, se propuso adicionar urea al medio de purificación. La urea es un agente caotrópico, lo que indica que posee la capacidad de desestabilizar la estructura secundaria de las proteínas por su interacción con los enlaces tipo puente de hidrogeno de las  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$  (Canchi and García 2013).

La concentración a usar del agente caotrópico debe ser aquella en la que se obtenga la máxima separación de las subunidades, pero la mínima posible para evitar la desnaturalización irreversible de la proteína de fusión, en específico, de la toxina Ts16; además, debe encontrarse dentro de los parámetros permitidos por la columna HiTrap y la trombina inmovilizada, de manera que los rendimientos de retención y de corte no se reduzcan por acción directa de la urea. Así, se decidió trabajar a 500 mM urea.

Los resultados obtenidos para la retención y el corte enzimático de la proteína de fusión DsbC-Ts16 aumentaron con la adición del agente caotrópico, en comparación con los mismos sin la presencia de urea. La retención en la columna HiTrap se observó con el aumento en la cantidad de proteína eluída. Mientras que en la proteólisis se observó una digestión enzimática con mayor dirección; en la Figura 16 se puede apreciar la reducida cantidad de bandas correspondientes a residuos de corte inespecífico, tal y como se observan en la Figura 15, además de la presencia de la banda de la toxina GS-Ts16.

No obstante, la adición de urea para aumentar el rendimiento en la retención y en el corte debe evaluarse con más detenimiento en un experimento que evidencie la acción de la concentración de agente caotrópico con la separación de las subunidades y con la desnaturalización de las mismas; así, se determinará la concentración óptima de urea.

La conclusión que puede derivarse de esta experiencia incluye únicamente que la adición de urea aumenta los rendimientos de retención y de corte enzimático; sin embargo, no se puede afirmar contundentemente que este aumento sea reflejo por la separación de las subunidades, además, no hay evidencia que ampare la formación de un homodimero por parte de la proteína de fusión DsbC-Ts16.

---

### 6.2.6.2. Presencia de GS-Ts16

En un estudio *In silico* se calculó el dato de masa molecular de la toxina GS-Ts16 y del residuo de corte, usándose el programa de acceso libre "*Compute pI/Mw tool*" (Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. 2005) ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Los datos generados por esta plataforma no consideran la formación de enlaces disulfuro; por ende, la masa molecular calculada incluye la masa del protón del grupo tiol de las cisteínas reducidas. Sin embargo, para el caso especial de la toxina producida en pET40b-Ts16, se genera una colección de fragmentos residuales al corte proteolítico debido a la presencia de dos sitios de reconocimiento para la proteasa trombina y por la combinación de proteína de fusión con y sin péptido señal. La conjunción de todas las masas moleculares de todos los posibles fragmentos generados, para la toxina expresada en los dos mecanismos de expresión evaluados, se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Colección de fragmentos producidos por la proteólisis enzimática.

Proteína	Masa Molecular (Da)
pET40b-Ts16	
SP-DsbC-HisTag-Int-Ts16	34 448.67
DsbC-HisTag-Int-Ts16	32 287.02
SP-DsbC-HisTag	27 658.80
DsbC-HisTag-Int	28 851.96
DsbC-HisTag	25 497.15
Int-Ts16	6 807.89
Int	3 372.82
pET32a-Ts16	
Tio-Ts16	20 608.52
Tio	17 173.45
GS-Ts16	
GS-Ts16 reducida	3 453.08
GS-Ts16 oxidada	3 447.08

SP: Péptido señal

Int: Secuencia intermedia entre sitios de reconocimiento de trombina

Tio: Tiorredoxina

La serie de muestras colectadas en cada paso de la purificación posterior al corte enzimático se muestran en la Figura 16: la fracción retenida en la columna HiTrap y las fracciones eluidas de la columna Strata C18T con 0%, 60% y 100% acetonitrilo. Se observa que el corte enzimático con trombina no se completó en su totalidad, como se puede comprobar en los carriles cargados con la fracción retenida y eluida de la columna HiTrap (carril 1), donde se separa el residuo de corte, por la banda de mayor masa molecular presente que corresponde a la proteína de fusión completa (Figura 16, flechas rojas). El carril cargado con la fracción eluida de la columna Strata C18T con 60 % acetonitrilo 0.05 % TFA (carril 3) de Rosetta-pET32a-Ts16 presenta la banda correspondiente a la toxina GS-Ts16 (Figura 16, flecha verde); en el caso de los carriles cargados con la proteína extraída de C41, dividido en los compartimientos periplasmático y citoplasmático, se aprecia una banda por encima de la misma banda del marcador de masa molecular, indicándose que hay presencia del residuo de corte de 6.8 KDa (Figura 16, flechas amarillas).

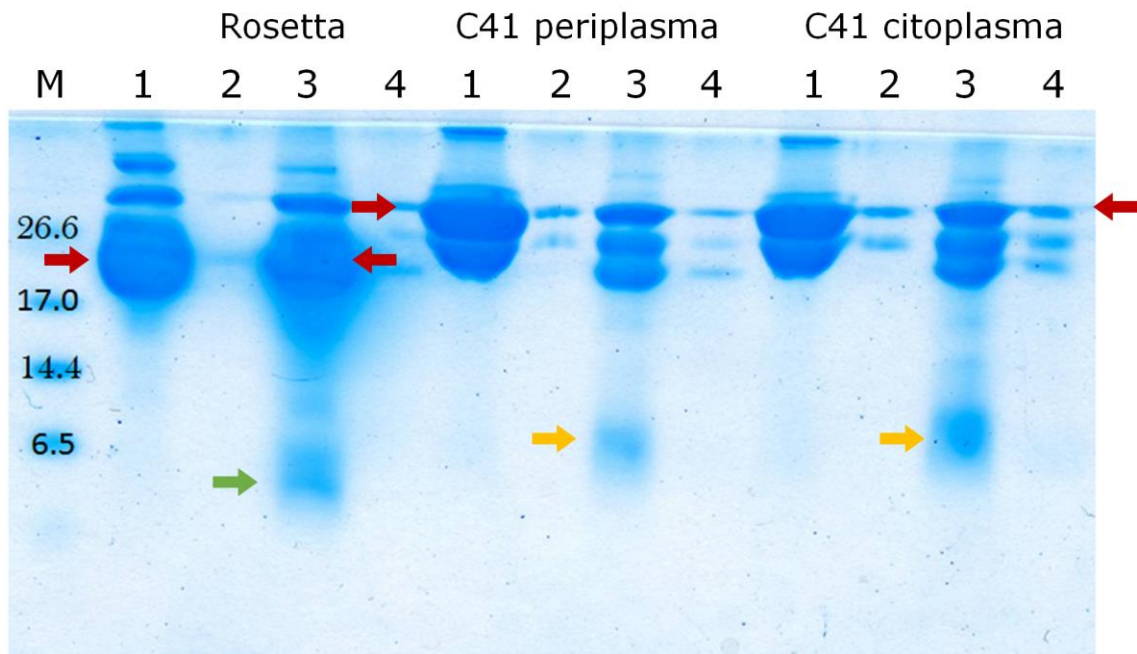


Figura 16. Presencia de GS-Ts16. Gel de Tricina-SDS-PAGE 16 %. 1) fracción retenida en columna HiTrap, después de la digestión enzimática, 2) lavado con H<sub>2</sub>O de la columna Strata-C18T, 3) Fracción eluida con 60% ACN 0.05 % TFA, 4) fracción eluida con 100% ACN 0.05% TFA. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a la proteína de fusión sin digerir, la flecha verde muestra a la toxina GS-Ts16 y las flechas amarillas al fragmento de peso molecular de 6.8 KDa.

---

Los cromatogramas obtenidos para cada mecanismo de producción, delimitados al intervalo donde es eluída la GS-Ts16 de acuerdo con Flores-Solis (2012) se muestran en la Figura 17. En ellos se muestra un patrón de señales similar entre sí, con la única diferencia en el área bajo la curva. La muestra aislada del citoplasma muestra la mayor área bajo la curva; por otro lado, el área bajo la curva de la muestra purificada del periplasma muestra ser menor. La mínima área bajo la curva corresponde a la toxina aislada del citoplasma de las células previamente tratadas en la extracción de periplasma.

Adicionalmente, en la Figura 17 se muestra el resultado de la espectrometría de masas MALDI-TOF de cada fracción colectada. Se observa que las dos fracciones colectadas corresponden a la masa molecular de la toxina GS-Ts16 en su estado oxidado. La ligera variación de la cifra decimal de cada masa molecular medida es de una unidad de masa atómica, que es mayor a la calculada con el programa **de acceso libre "Compute pI/Mw tool"**; este fenómeno es explicado por la transferencia de un protón de la matriz a la muestra como consecuencia del método MALDI.

Resulta evidente que la única diferencia entre ambas toxinas con diferente tiempo de retención radica en la conectividad de los enlaces disulfuro. El plegamiento de una proteína se encuentra dominado por la formación y el rompimiento de intermediarios, que en términos energéticos aumentan en estabilidad, hasta llegar a un plegamiento termodinámico más estable, que puede coincidir con el plegamiento nativo; sin embargo, algunos de los intermediarios presentan una estabilidad termodinámica considerable, tal que resultan en mínimos energéticos con elevadas barreras energéticas, resultando en el favorecimiento de diferentes plegamientos (Yon 2007). Así se establece una explicación para la información proporcionada por los cromatogramas y los espectros de masas de los dos mecanismos de producción, donde la toxina GS-Ts16 muestra dos plegamientos termodinámicamente estables.

Por otro lado, la diferencia del área bajo la curva entre la proteína expresada en citoplasma y la que es exportada al periplasma resulta esperada por la diferencia en el volumen de cada compartimento celular; sin embargo, la explicación es más compleja.

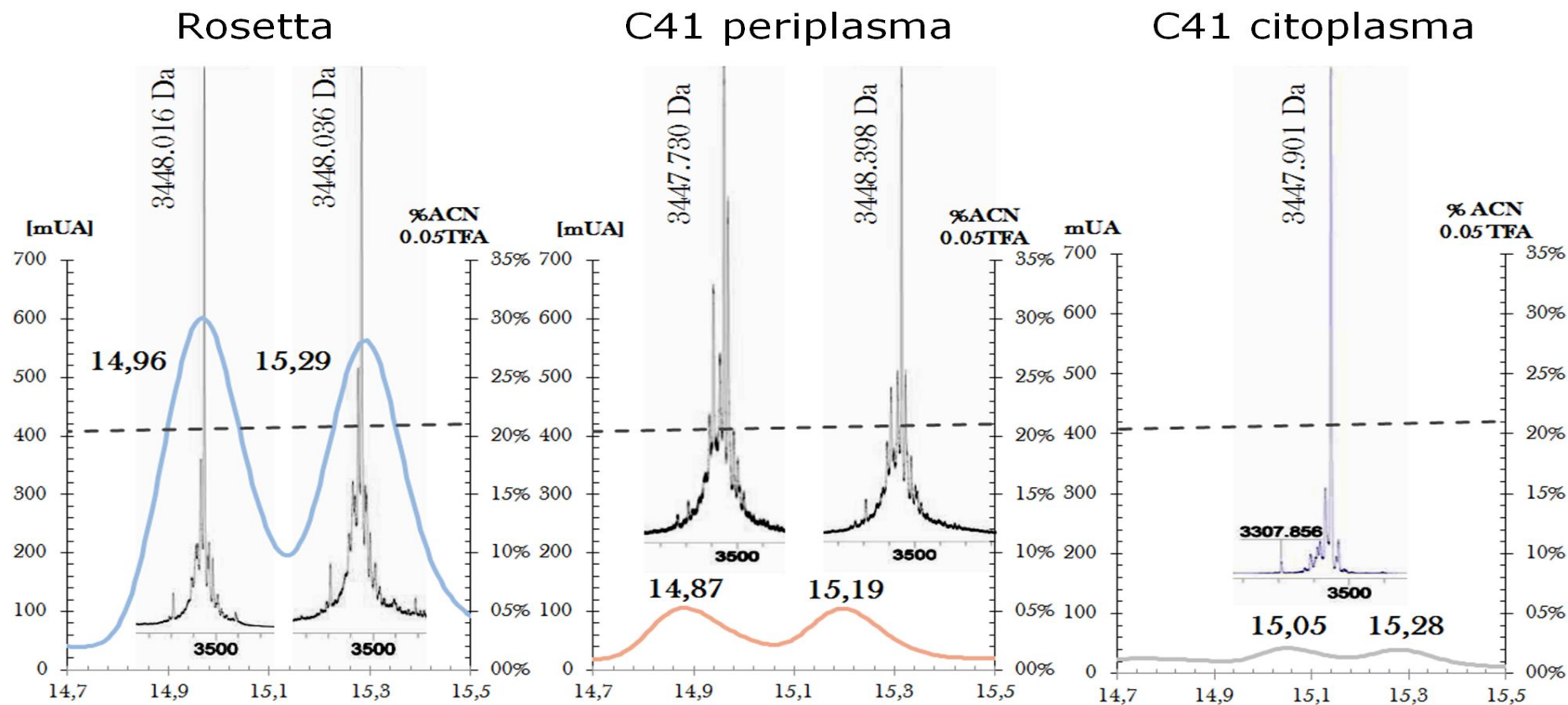


Figura 17. Cromatogramas y espectros de masas de las fracciones colectadas. De izquierda a derecha: GS-Ts16 aislada del sistema Rosetta-pET32a-Ts16; del periplasma de C41-p40b-Ts16 y del citoplasma del mismo sistema. En todos los casos se resalta el tiempo de retención de cada pico a un lado del mismo, así como la masa molecular de cada uno. En línea punteada se muestra el gradiente de elución.

---

Una explicación puede encontrarse en la proteína chaperona incorporada en la proteína de fusión de ambos sistemas evaluados. Mientras que la tiorredoxina es una proteína propia del citoplasma de *Escherichia coli*, la DsbC se localiza de forma nativa en el periplasma; por ende, la actividad de la DsbC en el citoplasma se verá reducida, si no es que anulada, por las condiciones desfavorables para la enzima isomerasa de enlaces disulfuro, además de la falta de su contraparte la DsbD (Berkmen 2012; Raina and Missiakas 1997). Como consecuencia, la expresión en citoplasma por parte del plásmido pET32a produce una cantidad superior de toxina con el plegamiento esperado en comparación con la expresada por el plásmido pET40b, que está limitada por la acción de la DsbC en el periplasma y de la tiorredoxina nativa en el citoplasma.

#### 6.2.6.3. Rendimiento

El rendimiento de la toxina GS-Ts16 aislada por litro de medio de cultivo demuestra que la expresión en citoplasma es cerca de cuatro veces mayor en comparación con la toxina aislada del periplasma del sistema evaluado, como se muestra en la Figura 18. En virtud de que el volumen periplasmático es mucho menor que el volumen citoplasmático, resulta inevitable que el rendimiento de la toxina aislada del periplasma sea menor en comparación con la aislada del citoplasma.

Pese a que ambas fracciones colectadas en el cromatógrafo corresponden a la toxina GS-Ts16 en su estado oxidado (Figura 17), las masas obtenidas de ambas fracciones no deben considerarse como aditivas a causa de que presentan distintas conectividades de los enlaces disulfuro, lo que es reflejo de plegamientos distintos; así, los datos de rendimiento son referidos a la fracción con menor tiempo de retención, que es el correspondiente a la toxina GS-T16 con el plegamiento reportado por Flores-Solis (2012).

A pesar de que el rendimiento de purificación de toxina GS-Ts16 por litro de cultivo celular está afectado directamente por la capacidad volumétrica de cada compartimiento celular, los pasos del método de purificación también contribuyen en la reducción del rendimiento. La extracción selectiva a periplasma, la retención de la proteína de fusión en la columna HiTrap y el corte enzimático con trombina son factores que contribuyen a la reducción en el rendimiento final.

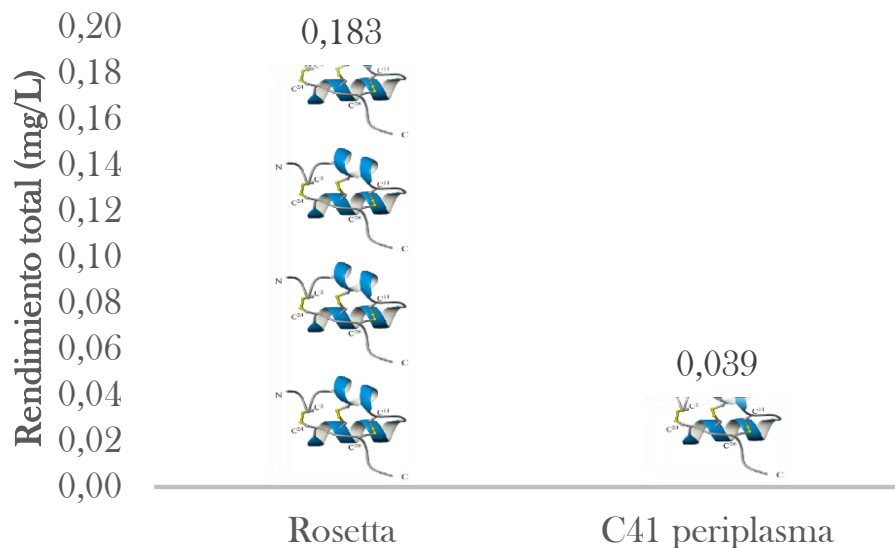


Figura 18. Rendimiento final de la expresión y purificación de GS-Ts16 de los mecanismos de producción Rosetta-pET32a-Ts16 y C41-pET40b-Ts16, presentado en mg de toxina por litro de cultivo celular.

Como ya se mencionó con anterioridad, la extracción de proteína del periplasma es función del tiempo de tratamiento con lisozima. A mayor el tiempo de tratamiento, mayor será la extracción de proteína; sin embargo, la extracción de proteína de citoplasma también aumentará y con ello la presencia de distintos plegamientos. El rendimiento final se reduce a medida que la extracción es más ineficiente por reducción en el tiempo de tratamiento con lisozima.

Además, la retención en la columna HiTrap se limita por la disponibilidad de la etiqueta de histidinas de la proteína de fusión a la quelación con el níquel retenido en la columna. Así, entre menos disponible se encuentre la etiqueta, la retención disminuirá y el rendimiento final también se reducirá. Se puede aumentar la disponibilidad de la etiqueta de histidinas con la relajación de la estructura por la adición controlada de agentes caotrópicos, como la urea.

Un punto de alta relevancia en la purificación de la toxina es el corte enzimático con trombina. El sitio de reconocimiento de la proteasa, sin importar la enzima utilizada, reducirá el rendimiento de la digestión si se encuentra impedido tanto por la formación de estructura cuaternaria, como por la cercanía a la toxina plegada. En ambos casos, la proteína de fusión se verá limitada para difundir en el sitio activo de la proteasa. Algunas alternativas para incrementar el



---

rendimiento de corte incluyen la separación del sitio de reconocimiento de la proteasa de la toxina plegada con algunos aminoácidos, otra alternativa es la relajación de la estructura secundaria por la adición de agentes caotrópicos en el medio de reacción sin poner en riesgo la estabilidad de la proteasa.

Adicionalmente, es relevante mencionar que el escaso rendimiento de la toxina GS-Ts16 purificada del periplasma es afectado por la presencia de dos sitios de reconocimiento para la proteasa trombina, los cuales son producto de las estrategias de clonación. Como consecuencia, la liberación de la toxina GS-Ts16 se limita a la digestión doble y a la dirigida al sitio adyacente a la toxina; a diferencia de la toxina expresada en citoplasma, donde solo hay un sitio único de reconocimiento de trombina.

---

## 7. Conclusión

---

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que con el sistema de expresión y exportación de proteínas al periplasma de *Escherichia coli* utilizado se obtiene una buena proporción de la toxina GS-Ts16 en su plegamiento esperado; no obstante, las condiciones definidas en este trabajo no son idóneas para la producción de esta proteína a gran escala, debido a la reducida cantidad de proteína obtenida.

## 8. Perspectivas

---

1. Continuar estudiando etapas clave del método, como la digestión enzimática, para aumentar el rendimiento final.
2. Probar otros plásmidos que promuevan la exportación de la proteína de fusión al periplasma, como son el pET-39b y el pET-22b.
3. Implementar el nuevo método en una toxina que presenta complicaciones en su expresión en citoplasma.

---

## 9. Referencias

---

- Abdel-rahman, Mohamed A., Patrick L. Harrison, and Peter N. Strong. 2015. "Snapshots of Scorpion Venomics." *Journal of Arid Environments* 112: 170–76.
- Abdel-rahman, Mohamed A., Veronica Quintero-hernandez, and Lourival D. Possani. 2013. "Venom Proteomic and Venomous Glands Transcriptomic Analysis of the Egyptian Scorpion *Scorpio Maurus Palmatus* (*Arachnida*: *Scorpionidae*)." *Toxicon* 74: 193–207.
- Berkmen, Mehmet. 2012. "Production of Disulfide-Bonded Proteins in *Escherichia Coli*." *Protein Expression and Purification* 82(1): 240–51.
- Bessette, Paul H., José J. Cotto, Hiram F. Gilbert, and George Georgieou. 1999. "In Vivo and in Vitro Function of the *Escherichia Coli* Periplasmic Cysteine Oxidoreductase DsbG." *Journal of Biological Chemistry* 274(12): 7784–92.
- Birdsell, D. C. and H. Cota-Robles. 1967. "Production and Ultrastructure of Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate-Lysozyme Spheroplasts of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 93(1): 427–37.
- Brock, Thomas A., David W. Smith, and Michael T. Madigan. 1984. *Microbiología*. cuarta edición. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A.
- Canchi, Deepak R. and Angel E. García. 2013. "Cosolvent Effects on Protein Stability." *Annu. Rev. Phys. Chem.* 64: 273–93.
- Carmo, A. O. et al. 2014. "Molecular and Functional Characterization of Metalloserrulases, New Metalloproteases from the *Tityus Serrulatus* Venom Gland." *Toxicon* 90: 45–55.
- Colorado-Cortes, Sergio Alland. (2016). Producción de la toxina Tamapina en el sistema de expresión pET40b. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México
- Corey, Robin A. et al. 2016. "Unlocking the Bacterial SecY Translocon Article Unlocking the Bacterial SecY Translocon Structure." *Structure* 24: 518–27.
- Flores-Solís, David. (2016). Estudio estructural por RMN de péptidos tipo escorpina y GS-Tt28. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México
- Flores-Solís, David. (2012). Biosíntesis, purificación, caracterización y determinación estructural por RMN de la toxina de alacran Ts16. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
- Franco-Bodek, Daniela. (2011). Diseño, expresión, purificación y replegamiento para la caracterización por resonancia magnética

---

nuclear de la defensiva 1. Tesis de Mestria. Universidad Nacional Autónoma de México

- Garcia, Laura Sanchez et al. 2016. **"Recombinant Pharmaceuticals from Microbial Cells : A 2015 Update."** *Microbial Cell Factories* 1–7.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. **"Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server."** *The Proteomics Protocols Handbook* 571–607.
- Ge, Yan, Albená Draycheva, Thomas Bornemann, Marina V Rodnina, and Wolfgang Wintermeyer. 2014. **"Lateral Opening of the Bacterial Transocon on Ribosome Binding and Signal Peptide Insertion."** *Nature Communications* 5: 1–6.
- Gleiter, Stefan and James C. a Bardwell. 2008. **"Disulfide Bond Isomerization in Prokaryotes."** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1783(4): 530–34.
- Gómez-Reynoso, Claudia Natalli. (2014). Biosíntesis, purificación y caracterización de la toxina de veneno de alacrán TsTxK-b. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México
- Grauschopf, Ulla et al. 1995. **"Why Is DsbA Such an Oxidizing Disulfide Catalyst?"** *Cell* 83: 947–55.
- Guo, Xiaoxiao et al. 2013. **"Biochimie Two Peptides , TsAP-1 and TsAP-2 , from the Venom of the Brazilian Yellow Scorpion, *Tityus Serrulatus*: Evaluation of Their Antimicrobial and Anticancer Activities."** *Biochimie* 95(9): 1784–94.
- Hatahet, Feras, Dana Boyd, and Jon Beckwith. 2014. **"Disulfide Bond Formation in Prokaryotes: History, Diversity and Design."** *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics* 1844(8): 1402–14.
- Heppel, A.Leon and Harold C. Neu. 1965. **"The Release of Enzymes from *Escherichia Coli* by Osmotic Shock and during the Formation of Spheroplasts."** *Journal of Biological Chemistry* 240(9).
- Kadokura, Hiroshi, Federico Katzen, and Jon Beckwith. 2003. **"Protein Disulfide Bond Formation in Prokaryotes."** *Annu. Rev. Biochem.* 72: 111–35.
- Klint, Julie K. et al. 2013. **"Production of Recombinant Disulfide-Rich Venom Peptides for Structural and Functional Analysis via Expression in the Periplasm of *E. Coli*."** 8(5).
- Malik, Ajamaluddin. 2016. **"Protein Fusion Tags for Efficient Expression and Purification of Recombinant Proteins in the Periplasmic Space of *E. Coli*."** *3 Biotech* 6(1): 1–7.
- Matias, R. F., Ashraf Al-amoudi, Jacques Dubochet, and Terry J. Beveridge. 2003. **"Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas***

- 
- Aeruginosa.*" *J. bacteriol.* 185(20):6112–18.
- Messens, Joris and Jean-Francois Collet. 2006. "Pathways of Disulfide Bond Formation in *Escherichia Coli.*" *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38:1050–62.
- Miller, Christopher. 1995. "The Charybdotoxin Family of K<sup>+</sup> Channel-Blocking Peptides." *Neuron* 15:5–10.
- Neidhardt, Frederick C. *et al.*, eds. 1996. *Escherichia Coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, Volume 1*. Second. Washington, D. C.: ASM Press.
- Novagen. 2011. *pET System Manual Novagen*. 11th ed.
- Park, Eunyong *et al.* 2014. "Structure of the SecY Channel during Initiation of Protein Translocation" *nature* 506:102–8.
- Possani, Lourival D., Ricardo C. Rodriguez, and D. E. L. A. Vega. 2006. "Scorpion Venom Peptides." Pp. 339–54 in *Handbook of Biologically Active Peptides*.
- Raina, S. and D. Missiakas. 1997. "Making and Breaking Disulfide Bonds." *Annu. Rev. Microbiol.* 51:179–202.
- Ramírez-Cordero, Belén Ernestina. (2015). Biosíntesis, estudio estructural y citotoxicidad de péptidos tipo toxina de alacrán. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rosano, Germán L. and Eduardo A. Ceccarelli. 2014. "Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*: Advances and Challenges." 5(April):1–17.
- Saucedo, Alma Leticia *et al.* 2012. "New Tricks of an Old Pattern: Structural Versatility of Scorpion Toxins with Common Cysteine Spacing." *Journal of Biological Chemistry* 287(15):12321–30.
- Saucedo-Yáñez, Alma Leticia. (2012). Estudio estructural de toxinas bloqueadoras de canales de potasio. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México
- Schägger, Hermann. 2006. "Tricine–SDS–PAGE." *Nature* 1(1):16–23.
- Sochacki, Kem A., Irina A. Shkel, M.Thomas Record, and James C. Weisshaar. 2011. "Protein Diffusion in the Periplasm of *E. Coli* under Osmotic Stress." *Biophysical Journal* 100(1):22–31.
- Sone, Michio, Yoshinori Akiyama, and Koreaki Ito. 1997. "Differential in Vivo Roles Played by DsbA and DsbC in the Formation of Protein Disulfide Bonds." *The Journal of Biological Chemistry* 272(16):10349–52.
- Sørensen, Hans Peter and Kim Kusk Mortensen. 2005. "Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli.*" 115:113–28.
- Sun, Dapeng and victor L. Davidson. 2002. "Lysozyme-Osmotic Shock

---

**Methods for Localization of Periplasmic Redox Proteins in Bacteria.”**  
*Methods in Enzymology* 353(1974).

Wagner, Samuel *et al.* 2008. **“Tuning *Escherichia Coli* for Membrane Protein Overexpression.”** *PNAS* 105(38):14371–76.

Wood, Janet M. 2015. **“Bacterial Responses to Osmotic Challenges.”** *J. Gen. Physiol* 145(5):381–88.

Yon, J. M. 2007. **“Protein Aggregation Vol. 1.”** in *Proteins: from Analytics to Structural Genomics*, edited by Meyers Robert A. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Yon Jeannine M. 2007. **“Protein Aggregation Vol. 1.”** in *Proteins: from Analytics to Structural Genomics*, edited by M. R. A. Germany .: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA,.

Zhu, Shunyi *et al.* 2011. **“Molecular Diversity and Functional Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins.”** *Molecular & Cellular Proteomics* 10(2):1–11.

### 1. Medios de cultivo

#### Medio Luria Bertani (LB)

- ✓ 10 g/L Triptona
- ✓ 5 g/L Extracto de Levadura
- ✓ 10 g/L NaCl

Disolver en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con adiciones de 5 M NaOH y completar al volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave. Permitir que se enfríe a 50°C o menos. Adicionar antibiótico 1000X hasta la concentración final deseada o conservar sin antibiótico a 4°C por hasta 6 meses.

#### Medio Luria Bertani modificado (LB-mod)

- ✓ 10 g/L Triptona
- ✓ 5 g/L Extracto de Levadura
- ✓ 20 g/L NaCl
- ✓ 10 g/L Glicerol

Disolver en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con adiciones de 5 M NaOH y completar al volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave. Permitir que se enfríe a 50°C o menos. Adicionar antibiótico 1000X hasta la concentración final deseada o conservar sin antibiótico a 4°C por hasta 6 meses.

#### Medio Luria Bertani (LB) sólido

- ✓ 10 g/L Triptona
- ✓ 5 g/L Extracto de Levadura
- ✓ 10 g/L NaCl
- ✓ 10 g/L Agar

Disolver en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con adiciones de 5 M NaOH y completar al volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave. Permitir que se enfríe a 50°C o menos y adicionar antibiótico 1000X hasta la concentración final deseada. Mezclar completamente. Vaciar en cajas petri estériles. Conservar a 4°C por hasta 12 meses.

---

## Concentraciones finales de antibiótico:

- ✓ Ampicilina (amp)                      100 mg/mL en agua
- ✓ Cloranfenicol (cam)                    34 mg/mL en 100% etanol
- ✓ Kanamicina (kan)                      30 mg/mL en agua

## 2. Preparación de células competentes por método químico

1. Seleccionar una colonia aislada de una caja con medio LB o usar una alícuota de células conservadas en glicerol para crecer un preinóculo en 20 mL de medio LB durante una noche a 37°C, con agitación.
2. Inocular 100 mL de medio LB tal que la OD 600 nm sea igual o inferior a 0.01. Incubar a 37°C con agitación vigorosa hasta que la absorbancia a 600 nm alcance un valor de 0.4
3. Enfriar el cultivo celular en hielo por 10 minutos.
4. Transferir el cultivo celular a tubos Falcon de 50 mL estériles y limpios. Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
5. Decantar y desechar el sobrenadante. Dejar el tubo inclinado por 1 minuto sobre una toalla de papel absorbente.
6. Resuspender la biomasa en 5 mL de 0.1 M CaCl<sub>2</sub> estéril y frío. Incubar en hielo por 10 minutos.
7. Centrifugar a 2 500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Decantar y desechar el sobrenadante.
8. Repetir los pasos 5 al 7 dos veces más, para completar 3 incubaciones en CaCl<sub>2</sub>.
9. Resuspender la biomasa en 1 mL de 0.1 M CaCl<sub>2</sub> estéril. Adicionar 250 µL de 50% (m/v) glicerol estéril.
10. Repartir en alícuotas de 100 µL en tubos de 800 µL limpios y estériles.
11. Congelar con nitrógeno líquido y conservar a -70°C en un ultracongelador.

## 3. Transformación química de células competentes

1. Descongelar en hielo un tubo con células competentes conservadas en el ultracongelador a -70°C.
2. Adicionar hasta 5 µL del plásmido a transformar. Mezclar suavemente.



- 
3. Mantener el tubo con células y ADN plasmídico en hielo por 30 minutos.
  4. Colocar el tubo en una placa con control térmico ajustado a 45°C por 45 segundos.
  5. Inmediatamente regresar el tubo al baño de hielo. Incubar por 2 minutos.
  6. Adicionar 200 µL de medio LB sin antibiótico. Incubar a 37°C durante 45 minutos.
  7. Vaciar todo el cultivo bacteriano en una caja petri con medio LB enriquecido con antibiótico. Incubar a 37°C toda una noche.

#### 4. Conservación de células a -70°C

1. Seleccionar una colonia aislada de células recién transformadas y usarla para inocular 20 mL de medio LB enriquecido con el (los) antibiótico(s) adecuado(s). Incubar a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una OD<sub>600 nm</sub> entre 0.7 y 0.8.
2. En un tubo estéril y nuevo de 2 mL, adicionar 200 µL de 50 % glicerol estéril y 800 µL de cultivo celular. Homogeneizar suavemente.
3. Congelar con nitrógeno líquido y conservar a -70°C en un ultracongelador.

#### 5. Purificación de plásmido con *QIAprep miniprep kit* (QIAGEN)

1. Seleccionar una colonia aislada de una caja con medio LB y usarla para inocular 20 mL de medio LB con antibiótico. Incubar a 37°C con agitación durante toda una noche.
2. Tomar hasta 20 mL del medio de cultivo para extraer el ADN plasmídico. Centrifugar a 8 000 rpm durante 5 minutos el volumen seleccionado.
3. Continuar con el protocolo *Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge*, descrito por Qiagen.
4. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL nuevo. Adicionar 50 µL de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) en el centro de la columna. Reposar por un minuto. Eluir el ADN plasmídico por centrifugación a 13 000 rpm durante 1 minuto. Conservar plásmido en congelación a 0°C.

---

## 6. Restricción enzimática

1. Bajo condiciones asépticas, colocar en un tubo nuevo para reacciones de PCR los siguientes reactivos en el orden indicado:

- ✓ Amortiguador de enzima 10x      5  $\mu$ L
- ✓ Plásmido                                      20  $\mu$ L
- ✓ Enzima de restricción                      2  $\mu$ L
- ✓ Agua MilliQ cbp                              50  $\mu$ L

En caso de usar enzimas que requieran BSA, adicionar 0.6  $\mu$ L de BSA 100x. En caso de hacer una doble digestión, adicionar 2  $\mu$ L de la segunda enzima. Corroborar compatibilidad de enzimas en el catálogo del fabricante.

2. Mezclar perfectamente los reactivos por succión y desplazamiento con la micropipeta. Incubar a 37°C durante 3 horas.
3. Congelar las reacciones y conservar a 0°C hasta su utilización o cargar inmediatamente en un gel de agarosa para electroforesis.

## 7. Electroforesis de geles de agarosa

1. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para la concentración del gel que convenga. Para identificar fragmentos de 6 000 pb usar 0.8 % de agarosa, para identificar fragmentos de 100 pb usar 2.5 % de agarosa. 30 mL constituye un volumen adecuado para la preparación del gel.
2. Disolver la agarosa en 30 mL de amortiguador TAE (Tris-HCl, Acetato, EDTA, pH 8.0). Favorecer la solubilización de la agarosa calentando en un horno de microondas por lapsos máximos de 15 segundos a potencia media.
3. Depositar la disolución templada de agarosa en el molde para geles. Usar el molde para pozos más conveniente. Permitir que la agarosa solidifique.
4. Colocar el gel solidificado, sin el molde para los pozos, en la cámara de electroforesis. Cuidar de que el lado del gel con los pozos apunte hacia el cátodo (electrodo negro).
5. Mezclar 5  $\mu$ L de muestra a cargar en el gel con 2  $\mu$ L de amortiguador de carga 2X (13% sacarosa, 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.06 % azul de bromofenol). Depositar la muestra en alguno de los pozos del gel. Cargar en un pozo 3  $\mu$ L de marcador de masa molecular, usar el marcador de masa molecular más conveniente.

- 
6. Comenzar la migración a voltaje constante de 80 V durante 40 minutos o hasta que el frente de migración alcance 1 cm antes del término el gel.
  7. Teñir el gel por inmersión en una disolución de bromuro de etidio durante 1 minuto. Lavar el exceso de bromuro de etidio en un baño de agua por 10 minutos.
  8. Revelar el gel en un transiluminador. Desechar el gel en los residuos tipo RPBI.

## 8. Aislamiento de ADN de gel de agarosa con QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)

1. Preparar un gel de agarosa para cargar en su totalidad las reacciones de restricción enzimáticas sobre el plásmido (0.8 %) y el inserto con el gen de interés (2.5 %).
2. Migrar a voltaje constante de 80 V por 30 min o hasta que el frente de migración alcance 1 cm antes del término del gel.
3. Teñir con bromuro de etidio y revelar en el transiluminador.
4. Extraer del gel de agarosa la banda correspondiente al fragmento de ADN que se desea purificar con una espátula limpia.
5. Colocar el fragmento extraído en un tubo de 2 mL limpio y previamente pesado.
6. Continuar con el protocolo *QIAquick Gel Extraction Kit using a Microcentrifuge*, descrito por Qiagen.
7. Colocar la columna en un tubo de 1.5 mL nuevo. Adicionar 50  $\mu$ L de amortiguador TE en el centro de la columna. Reposar por un minuto. Eluir el ADN plasmídico por centrifugación a 13 000 rpm durante 1 minuto. Conservar el plásmido en congelación a 0°C.

## 9. Reacción de ligación con T4 ADN ligasa

1. Bajo condiciones asépticas, colocar en un tubo nuevo para reacciones de PCR los siguientes reactivos:

✓ Amortiguador T4 ADN ligase 10X	2 $\mu$ L
✓ Plásmido receptor	0.020 pmol
✓ Inserto con gen	0.060 pmol
✓ Agua MilliQ cbp	20 $\mu$ L
✓ T4 ADN ligasa (400 000 U)	1 $\mu$ L

- 
2. En un segundo tubo para reacciones de PCR depositas los mismos reactivos omitiendo la adición del inserto con gen. Esta reacción actuará como un control de no ligación.
  3. Mezclar perfectamente los reactivos por succión y desplazamiento con la micropipeta. Incubar a 25°C durante 10 minutos.
  4. Inactivar la enzima con calor a 65°C durante 10 min.
  5. Congelar las reacciones y conservar a 0°C hasta su utilización o transformar células competentes con tres diferentes volúmenes de reacción. Referirse al protocolo para "Transformación química de células competentes".
  6. Verificar la correcta construcción del plásmido final con al menos una digestión enzimática del plásmido aislado de 10 clonas positivas a la ligación. Usar como control el plásmido original sin digerir y sin ligar, además de utilizar una enzima de restricción distinta a las usadas para la ligación.
  7. Purificar el plásmido de 4 clonas positivas a la ligación, usando el protocolo para "Purificación de plásmido con QIAprep miniprep kit (QIAGEN)", y enviarlo a Laragen Inc. para su secuenciación; asegurarse de que la concentración de ADN de las muestras sea al menos de 40 ng/μL.

Cálculo de la cantidad de inserto con gen a utilizar en función de la cantidad de plásmido receptor a utilizar.

$$M_{ins} = \frac{Ins}{Plás} * M_{plás} * 3$$

- ✓  $M_{ins}$ : Masa de inserto en ng.
- ✓  $Ins$ : Tamaño del inserto en pares de bases.
- ✓  $Plás$ : Tamaño del plásmido receptor en pares de bases.
- ✓  $M_{plás}$ : Masa del plásmido receptor en ng.

Es necesario conocer la concentración en ADN (ng/μL) tanto del plásmido como del inserto, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción.

## 10. Expresión de la proteína recombinante

1. Preparar un preinóculo a partir de una colonia aislada de células recién transformadas o a partir de una preparación de células conservadas en glicerol a -70°C, inocular medio LB enriquecido con el (los) antibiótico(s) necesarios. El volumen no debe exceder el 10

- 
- % del volumen del cultivo final. Incubar a 37°C durante toda una noche con agitación.
  2. Inocular medio LB que presente las características adecuadas para el crecimiento usando el preinóculo y con máximo el 10 % de volumen final del cultivo. Incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD 600 nm entre 0.7 y 0.8
  3. Inducir el cultivo celular adicionando un volumen de 1 M IPTG, tal que la concentración final de IPTG en el cultivo sea de 0.5 mM (o la deseada). Incubar a 30°C por 16 horas (o a la temperatura y por el tiempo deseado).
  4. Separar la biomasa del medio de cultivo por centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
  5. Conservar la biomasa a 0°C hasta su utilización o lisar inmediatamente.

## 11. Lisado total por sonicación

1. Resuspender la biomasa en amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0) en una relación de 10 mL por cada gramo de biomasa. El paquete celular puede ser fresco o conservado a 0°C.
2. Lisar las células con un disruptor celular por ultrasonido. Someter el cultivo celular a pulsos de 15 segundos a una potencia de entre 50 y 60 watts con descansos de 30 segundos hasta completar un tratamiento total de 15 minutos. Mantener frío el cultivo celular a lisar con un baño de hielo-agua.

Nota: en caso de lisar muestras menores a un volumen de 10 mL, utilizar el contenedor especial en forma de copa del disruptor celular, cargarlo con un baño de hielo-agua y someter los tubos con muestra a tres o cuatro pulsos de 50 a 60 watts, cuidando de mantener el tubo en el centro del vórtice que se forma durante el pulso.

3. Centrifugar a 13 000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
4. Separar la fracción soluble del paquete de lisado celular. La proteína de fusión soluble debe purificarse inmediatamente. El botón de lisado celular se puede resuspenderse en amortiguador de lisis con 8M urea.

---

## 12. Lisado selectivo a periplasma

1. Resuspender la biomasa en amortiguador TSE (50 mM Tris-HCl, 20 % (m/v) Sacarosa, 1 mM EDTA, pH 8.0) en una relación de 25 mL de disolución por cada gramo de biomasa. La biomasa debe ser fresca, no utilizar célula que fueron congeladas. No utilizar vortex para la resuspensión.
2. Adicionar lisozima al cultivo celular a lisar, tal que la concentración final sea de 0.5 mg/mL.
3. Incubar a 37°C con agitación durante una hora.
4. Centrifugar a 13 000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
5. Separar la fracción soluble de periplasma de los esferoplastos. La proteína de fusión soluble debe purificarse inmediatamente, los esferoplastos pueden lisarse por sonicación para liberar la fracción soluble de citoplasma.

Preparación de la lisozima: resuspender 10 mg de lisozima liofilizada (100 000 U) en 1 mL de una disolución amortiguada con 50 mM Tris-HCl y 20 mM MgCl<sub>2</sub>.

## 13. Purificación por CAMQ con columna HiTrap (GE Healthcare)

1. Lavar la columna HiTrap con 5 volúmenes de columna de agua destilada.
2. Equilibrar con 5 volúmenes de columna de amortiguador de unión (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 8.0).
3. Pasar la muestra con proteína de fusión a purificar, previamente filtrada con filtro Durapore 0.45 µm.
4. Desplazar las proteínas con escasa afinidad a la columna HiTrap, distintas a la proteína de fusión, con 5 volúmenes de columna de amortiguador de unión.
5. Eluir la proteína de fusión con 5 volúmenes de columna de amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8.0).
6. Reajustar las condiciones de equilibrio con 5 volúmenes de columna de amortiguador de unión. La columna esta lista para una nueva purificación.
7. Terminada la utilización de la columna HiTrap, lavarla con 5 volúmenes de columna de agua destilada.
8. Conservar en 20% etanol.

---

Nota: todas las disoluciones que pasen a través de la columna HiTrap deben filtrarse previamente en filtro de Nylon o Durapore 0.45  $\mu\text{m}$ .

## 14. Corte enzimático con trombina (Sigma Aldrich)

1. Dializar la muestra a cortar con trombina durante toda una noche y a temperatura ambiente para reducir las concentraciones de iones en disolución. Utilizar una membrana con tamaño de poro máximo de 10 KDa.
2. Cuantificar la concentración de proteína total presente en la disolución.
3. Ajustar la concentración de proteína total en la disolución a 1 mg/mL, como límite máximo. Usar amortiguador de corte (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) para la dilución.
4. Adicionar 30 mg de 50 % trombina inmovilizada en esferas de agarosa. Incubar a temperatura ambiente con agitación por inversión durante 6 horas.
5. Centrifugar a 500 g durante 5 minutos.
6. Decantar la fracción soluble con proteína de fusión digerida.
7. Colectar y lavar las esferas de agarosa con trombina usando amortiguador de corte. Conservar las esferas de trombina en amortiguador libre de NaCl (50 mM Tris-HCL, 50 % glicerol, pH 8.0) a 0°C.
8. Recluir la fracción soluble digerida durante 1 hora en columna HiTrap.
9. Conservar la fracción no retenida en la columna para su preparación previa a la inyección al cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.

## 15. Desalado y preconcentración con columna Strata C-18T (Phenomenex)

1. Hinchar la fase estacionaria de la columna STRATA C-18T con acetonitrilo 0.05 % TFA (ácido trifluoroacético).
2. Lavar la columna con 5 mL de acetonitrilo 0.05 % TFA.
3. Pasar la fracción con proteína digerida por la columna. Repetir tres veces para obtener mejores resultados.
4. Desalar la muestra con 5 mL agua MilliQ 0.05 % TFA. Permitir que la columna se equilibre con la fase móvil por al menos un minuto.
5. Eluir la proteína digerida con 5 mL 60 % acetonitrilo 0.05 % TFA.

6. Lavar la columna con 5 mL de 100 % acetonitrilo 0.05 % TFA. La columna esa lista para una nueva purificación.
7. Conserva la columna seca y libre de proteína adsorbida.
8. Liofilizar durante una noche las fracciones eluídas de la columna con agua MilliQ, 60 % acetonitrilo y 100 % acetonitrilo

## 16. Preparación de geles SDS-PAGE 12%

1. Armar el dispositivo para preparar geles SDS-PAGE: Colocar las placas de vidrio, acomodadas de manera que se forme la cavidad que contendrá el gel, dentro de las pinzas de presión; a su vez, colocar las pinzas con las placas de vidrio en el soporte que sellará la base de las placas de vidrio.
2. Comprobar la hermeticidad adicionando agua entre las placas. Dejar reposar 5 minutos antes de desalojar el líquido. Secar con papel filtro.
3. Preparar las disoluciones de los geles separador y concentrador por adición de la tabla 5.

Tabla 5. Volúmenes para preparar 2 geles SDS-PAGE al 12 %

Gel	Separador	Concentrador
AB-3	2.97 mL	449 µL
Tris-HCl	2.48 mL (pH 8.8, 1.5 M)	1.1 mL (pH 6.8, 0.5 M)
Agua destilada	4.91 mL	2.54 mL
SDS 10 %	99 µL	44 µL
TEMED	6.05 µL	3.85 µL
APS 10 %	77 µL	60 µL

Nota: después de adicionar los primeros 3 componentes, se debe degasificar la disolución en cámara de vacío por 10 minutos o hasta que las disoluciones ya no burbujeen. La adición de TEMED y APS inician la polimerización, adicionar justo antes de cargar la disolución entre las placas de vidrio.

4. Inmediatamente después de adicionar TEMED y APS, depositar hasta 4 mL de disolución del gel separador entre las placas de vidrio. Depositar 1 mL de isopropanol en la superficie del gel. Permitir que solidifique.
5. Desplazar por gravedad el isopropanol de la superficie del gel, eliminar el excedente de isopropanol no decantado con papel filtro.
6. Adicionar la disolución de gel concentrador entre las placas de vidrio, justo después de adicionarle TEMED y APS.



- 
7. Colocar el molde de pozos (10 o 15 pozos) en la parte superior de las placas de vidrio, con extremo cuidado de no dejar burbujas. Permitir que solidifique.
  8. Desmontar el dispositivo para preparar geles SDS-PAGE. Primero del soporte, después de las pinzas, cuidar que no se separen las placas de vidrio o el molde de pozos.
  9. Lavar con agua corriente las placas de vidrio. Usar frescos o conservar húmedos en refrigeración a 4°C hasta su utilización. Pueden conservarse hasta por 1 semana.

## 17. Preparación de muestras, carga y migración de geles SDS-PAGE

1. En tubos de 0.6 mL, mezclar 15 µL de muestra con el mismo volumen de amortiguador de carga 2X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 0.025 % azul de bromofenol, 0.05 % β-mercaptoetanol).
2. Calentar los tubos a 92°C durante 10 minutos.
3. Armar la cámara de electroforesis con los geles.
4. Inundar la cámara armada con amortiguador de corrida (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.192 M glicina, 0.1 % SDS).
5. Cargar 15 µL de muestra en cada pozo. Cuidar de no deslocalizar la muestra, o el volumen calculado para geles cuantitativos.
6. Cargar de 1 µL hasta 5 µL de marcador de masa molecular.
7. Comenzar el tratamiento electroforético, 120 V durante 45 min.
8. Desarmar la cámara de electroforesis.
9. Teñir el gel:
  - a. Sumergir el gel en disolución fijadora (10 % ácido acético, 50 % metanol), fijar por 10 min.
  - b. Cambiar a disolución BlueSilver (10 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 % metanol, 0.10 % Coomassie G 250), teñir por 15 min mínimo.
  - c. Eliminar exceso de colorante con disolución desteñidora (10 % ácido acético, 25 % metanol), por 10 min.
  - d. Lavar con agua corriente durante 10 min, mínimo.
10. Observar y analizar el gel SDS-PAGE teñido en un fondo blanco. Empapelar de ser necesario.

---

## 18. Preparación de geles Tricina-SDS-PAGE 16%

1. Seguir el mismo protocolo que para preparar geles de poliacrilamida (antes descrito), con las modificaciones indicadas en la tabla 6.

Tabla 6. Volúmenes para preparar 2 geles Tricina-SDS-PAGE 16 %

Gel	Separador	Medio	Concentrador
AB-6	2 mL	0.6 mL	1 mL
Amortiguador de gel	2 mL	1 mL	3 mL
Glicerol	0.6 g	0.3 g	0 g
Agua destilada cbp	6 mL	3 mL	12 mL
TEMED	4 $\mu$ L	2 $\mu$ L	9 $\mu$ L
APS 10 %	40 $\mu$ L	20 $\mu$ L	90 $\mu$ L

Amortiguador de gel: 3 M Tris-HCl pH 8.45, 0.3% SDS

Protocolo tomado de (Schägger 2006)

## 19. Preparación de muestras, carga y migración de geles Tricina-SDS-PAGE 16%

1. Seguir el mismo protocolo que para preparar muestras, cargar y migrar geles de poliacrilamida (antes descrito), con las siguientes modificaciones:
  - a. Amortiguadores de corrida utilizados:
    - ✓ De cátodo: 100 mM Tris-HCl pH 8.25, 100 mM tricina, 0.1 % SDS
    - ✓ De ánodo: 100 mM Tris-HCl pH 8.9

## 20. Espectrometría de masas MALDI-TOF para péptidos menores de 10 KDa

1. Preparación de la disolución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (matriz):
  - a. Colocar la masa colectada en la punta de una espátula en un tubo de plástico de 1.5 mL
  - b. Adicionar 100  $\mu$ L de una disolución 2:1 Acetonitrilo:agua 0.05% TFA. Mezclar con vortex.

- 
- c. Seguir adicionando disolvente hasta que la fracción insoluble se reduzca al mínimo visible o se sume un volumen total de 1.0 mL.
  - d. Conservar la mezcla a 0°C bajo resguardo de la luz. Desechar después de un mes de su preparación.
2. Preparación de las muestras y patrones de masa molecular:
    - a. En caso de muestras sólidas, resuspender la menor cantidad posible de muestra en agua desionizada. En caso de muestras en disolución, directamente eluídas del cromatógrafo, por ejemplo, usar directamente.
    - b. En tubo limpios para reacciones de PCR, adicionar 9 µL de matriz.
    - c. Adicionar 1 µL de muestra resuspendida en agua o de muestra en disolución. Mezclar
    - d. En caso de muestras que requieran mayor concentración, usar 2 µL de muestra y 10 µL de matriz.
  3. Deposición de muestras en la placa para espectrometría MALDI-TOF:
    - a. Depositar 1 µL de muestra preparada en uno de los puntos de aplicación de la placa para espectrometría MALDI-TOF. Utilizar los puntos de aplicación del centro de la placa.
    - b. Promover la formación de centros de nucleación por raspado entre la punta de la micropipeta utilizada y la placa.
    - c. Repetir para todas las muestras y patrones de masa molecular.
    - d. Depositar 1 µL de matriz sin muestra en un punto de aplicación, como referencia de la matriz utilizada.
  4. Seguir las indicaciones del técnico académico responsable del equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF en cuanto al manejo del equipo.
  5. Lavar la placa con lavados sucesivos de agua desionizada e isopropanol.

## 21. Cromatografía de Líquidos de Alta eficiencia con columna de Fase Reversa (HPLC-RP)

1. Comprobar la presencia de la proteína de interés en la muestra a inyectar en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia a través de los experimentos de espectrometría de masas MALDI-TOF y por electroforesis en gel de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE.

- 
2. Preparación de la muestra (únicamente muestras que contengan la proteína de interés):
    - a. Resuspender la masa proteína liofilizada en agua grado MilliQ.
    - b. Filtrar por membrana Durapore 0.22  $\mu\text{m}$ .
    - c. Degasificar con baño ultrasónico por 10 minutos.
  3. Acondicionamiento del cromatógrafo:
    - a. Purgar las líneas de disolvente durante 1 minuto.
    - b. Permitir que la columna se equilibre a la temperatura de trabajo (30°C).
    - c. Equilibrar la columna con los disolventes que contienen 0.05 % TFA, en una composición 65 % acetonitrilo:agua, durante 10 minutos.
  4. Inyección de muestra:
    - a. Comenzar el método de elución deseado.
    - b. Cargar la muestra en la llave de seis pasos únicamente cuando **el programa indica "waiting for injection", e inmediatamente** bajar el gatillo.
    - c. Colectar el (los) pico(s) deseado(s).
  5. Antes de la inyección de las muestras y después de terminada la inyección de muestras, inyectar fase móvil para obtener información de la limpieza de la columna.
  6. Apagado del cromatógrafo:
    - a. Acondicionar la columna con disolventes sin TFA a una composición de 65% acetonitrilo:agua durante 10 minutos.
    - b. Reducir el flujo de fase móvil hasta 0 mL/min en una rampa de 10 minutos.
    - c. Apagar el equipo.