



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la funcionalidad de la etiqueta de afinidad
Strep-tag II en *Streptomyces lividans* usando como
modelo la nucleasa Sco5330 de *Streptomyces
coelicolor*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Dení Grisel Cruz García.

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Luis Servín González.

Ciudad Universitaria, CDMX.
Octubre 2022.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi padre por su labor excepcional, su amor y paciencia en hacer siempre todo lo posible por mi bienestar y el de mi hermana.

A mi madre por darme la vida.

A mi hermana Salma Yamil y a mis amigas: Flor Garfias, Ana Nájera y Briseida Merino por hacer mi vida mejor y estar presentes en ella; a Rusty Ramírez por ser mi compañero de vida durante prácticamente toda la carrera y el tiempo que falta.

A mi tía, la Dra. Lourdes Esther Cruz Martínez† por ser un modelo e inspiración para mi.

Al Dr. Luis Servín González por todas sus enseñanzas, guía y el trabajo realizado en el desarrollo de mi proyecto de tesis como mi asesor.

A la M. en Ciencias Gabriela González Cerón por su apoyo técnico, enseñanzas, comentarios y sugerencias brindados para la realización de este trabajo.

Al programa “Producción de Biomoléculas de Interés Biomédico en Microorganismos”, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular.

A los miembros que conforman mi jurado: la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky, el Dr. Luis David Alcaraz Peraza, la Dra. Gloria Soberón Chávez y la M. en C. Gabriela González Cerón por sus comentarios, sugerencias, correcciones y preguntas para mejorar este trabajo y para enriquecer mi conocimiento.

A mi amigo y compañero de laboratorio Yersaín Keller por su invaluable apoyo, enseñanzas, guía, comentarios y paciencia brindados para hacer posible este trabajo.

A mi gran amiga y compañera de laboratorio Arantxa Sol Toledo por su cálida compañía y por hacer de mi estancia en el laboratorio lo más agradable y divertida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme un espacio en sus aulas con su personal docente de gran calidad, quienes me dieron la mejor educación.

A mis compañeras y jefas del trabajo por darme ánimos y motivarme para terminar este proyecto.

Índice

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Etiquetas de afinidad de proteínas y péptidos.....	5
La etiqueta Strep-tag II.....	6
Características del género <i>Streptomyces</i>	10
<i>Streptomyces lividans</i>	11
Antecedentes.....	12
Justificación.....	13
Objetivos.....	14
Hipótesis.....	15
Materiales y métodos.....	15
Cepas.....	15
Plásmidos.....	16
Medios y condiciones de cultivo.....	17
Amplificación y clonación del gen <i>Sco5330</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i>	18
Pruebas de fenotipo por medio de conjugaciones de <i>E. coli</i> con <i>Streptomyces</i>	27
Resultados y Discusión.....	29
Expresión y detección de la proteína <i>Sco5330</i> etiquetada con Strep-tag II.....	29
Demostración de la funcionalidad de <i>Sco5330TagN</i> y <i>Sco5330TagC</i> por incompatibilidad con la metilasa SphM.....	32
Conclusiones.....	37
Perspectivas.....	38
Literatura citada.....	38
Anexos.....	41
Purificación de fragmentos de DNA mediante agarosa de bajo punto de fusión (LMP).....	41
Reacción de ligación.....	41
Precipitación de ligación.....	42
Western blot.....	49
Bloqueo de membrana.....	49
Revelado de placa fotográfica por quimioluminiscencia en cuarto oscuro.....	50

Índice de figuras

Figura 1. Esquema que muestra la unión de un anticuerpo a una proteína	6
Figura 2. Principio del ensayo de selección de colonias para péptidos con actividad de unión a estreptavidina	8
Figura 3. Esquema que muestra un ensayo de tipo sándwich (o ensayo de selección de colonias) para péptidos con actividad de unión a estreptavidina	8
Figura 4. Esquema que muestra la unión de Strep-tag a estreptavidina	9
Figura 5. Secuencia del producto de PCR del gen sco5330 con los oligos TagN UP y DOWN con la etiqueta Strep-tag II.	19
Figura 6. Secuencia del producto de PCR con los oligonucleótidos TagC UP y DOWN con la etiqueta Strep-tag II	20
Figura 7. Marcador de peso molecular λ PstI.....	21
Figura 8. Amplificación del gen sco5330	22
Figura 9. Gel de agarosa con el producto de PCR sco5330 y el vector de clonación.	23
Figura 10. Mapa del plásmido pBlueScript IISK.	23
Figura 11. Sitios de restricción del plásmido pIJ6902	24
Figura 12. Diagrama que resume el procedimiento realizado en este trabajo	29
Figura 13. Expresión de la proteína Sco5330TagN en <i>S. lividans</i>	30
Figura 14. Presencia de la proteína Sco5330 en <i>S. lividans</i>	31
Figura 15. Expresión de la proteína Sco5330 Tag C en <i>S. lividans</i>	32
Figura 16. No hay presencia de la proteína Sco5330 (marcadas en el carboxilo) en <i>S. lividans</i>	32
Figura 17. Procedimiento general para demostrar la funcionalidad de la nucleasa Sco5330 etiquetada con Strep-tag II	33
Figura 18. Conjugaciones con la cepa silvestre de <i>S. coelicolor</i> M145	34
Figura 19. Conjugaciones con la cepa silvestre de <i>S. lividans</i> 1326.....	34
Figura 20. Conjugaciones con <i>S. lividans</i> +pIJ6902sco5330TagN	35
Figura 21. Conjugaciones con <i>S. lividans</i> +pIJ6902sco5330TagC	35

Resumen.

En este trabajo, se evaluó el uso de la etiqueta de afinidad conocida como Strep-tag II en una proteína expresada en *Streptomyces*, siendo esta una nucleasa citoplásmica de *Streptomyces coelicolor*, la cual está codificada en el gen *sco5330*. Para esto se realizaron construcciones que contenían al gen *sco5330* al que se le adicionaron los codones que codifican la etiqueta de afinidad de 8 aminoácidos Strep-tag II. La etiqueta fue colocada mediante amplificación del gen, por medio de PCR, utilizando dos pares de oligonucleótidos. Uno de ellos permitió colocar la etiqueta en el extremo amino-terminal de la proteína, y el otro par permitió colocar la etiqueta en el extremo carboxilo-terminal de la misma, para tener las dos versiones de la proteína. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector integrativo pIJ6902, y transferidos por conjugación a *Streptomyces lividans*, la cual fue utilizada como modelo para la expresión de la proteína *sco5330* etiquetada. Para determinar que la proteína era expresada y funcional con la etiqueta en cualquiera de los dos extremos se realizaron experimentos de expresión y detección de la proteína mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con azul de Coomassie y se detectó la proteína mediante Western blot, empleando anticuerpos comerciales anti-Strep-tag II. Además, se determinó si la nucleasa codificada en el gen *sco5330* conservaba su funcionalidad al ser etiquetada mediante experimentos de incompatibilidad con la metilasa SphM. Se demostró que *S. lividans* sí fue capaz de expresar al gen foráneo *sco5330* al ser clonado etiquetado junto con la Strep-tag II en el extremo amino terminal (N) y la proteína conservó su funcionalidad. No obstante, dicha conclusión no se cumple en la construcción de Strep-tag II en el extremo carboxilo terminal (C), donde no se observó la funcionalidad de la proteína, es decir, aparentemente hubo interferencia de la etiqueta en la función de la proteína.

Introducción.

Los sistemas de expresión procariotas pueden ser más rápidos y sencillos para aislar y caracterizar proteínas con una estructura simple y sin modificaciones secundarias que otros sistemas de expresión más elaborados (Rosenberg, 1996). En este trabajo se utilizó el gen *sco5330* que codifica para una proteína de *Streptomyces coelicolor* el cual fue clonado y expresado en *Streptomyces lividans*.

El método más eficaz y comúnmente utilizado para la purificación de proteínas es la purificación por cromatografía de afinidad, en el cual la proteína de interés se modifica agregando una etiqueta de afinidad adecuada y se enriquece en virtud de las propiedades de unión específicas de la etiqueta a un ligando inmovilizado (Lichty *et al.*, 2005).

Etiquetas de afinidad de proteínas y péptidos.

Las etiquetas de afinidad de proteínas y péptidos se han convertido en herramientas muy populares para purificar proteínas recombinantes y complejos de proteínas nativas por su eficiencia y rapidez (Terpe, 2003). Así pues, esta estrategia permite una purificación de cientos (o incluso miles) de veces a partir de extractos crudos, sin pasos previos para eliminar ácidos nucleicos u otros materiales celulares. Adicionalmente, las condiciones de elución suaves empleadas hacen que las etiquetas de afinidad sean útiles para purificar tanto proteínas individuales como complejos de proteínas. Es importante destacar que las etiquetas de afinidad permiten que se purifiquen diversas proteínas utilizando protocolos generales, en contraste con los procedimientos altamente individualizados asociados con la cromatografía convencional, una consideración convincente para las empresas de proteómica o genómica estructural (Lichty *et al.*, 2005).

Se han desarrollado varios péptidos y proteínas para sobreproducir proteínas recombinantes. Estos sistemas de etiquetas de afinidad comparten las siguientes características: (a) purificación de adsorción en un solo paso; (b) un efecto mínimo sobre la estructura terciaria y la actividad biológica; (c) eliminación fácil y específica para producir la proteína nativa; (d) ensayo simple y preciso de la proteína recombinante durante la purificación; (e) aplicabilidad a varias proteínas diferentes (Terpe, 2003).

La etiqueta Strep-tag II.

Las etiquetas cortas normalmente no interfieren con la función biológica de la proteína a la que se adicionan y por lo tanto no necesitan ser removidas por proteólisis. Una opción para permitir la detección de las proteínas es mediante el uso de anticuerpos, pero cuando estos no están disponibles, es posible agregar una etiqueta al gen de interés y después detectarla mediante el anticuerpo dirigido contra dicha etiqueta (Figura 1) (Schmidt y Skerra, 1993). Las primeras etiquetas utilizadas tuvieron poca aplicación y sus propiedades de afinidad para la purificación fueron restringidas pues estaban basadas solamente en la unión fuerte a un anticuerpo.

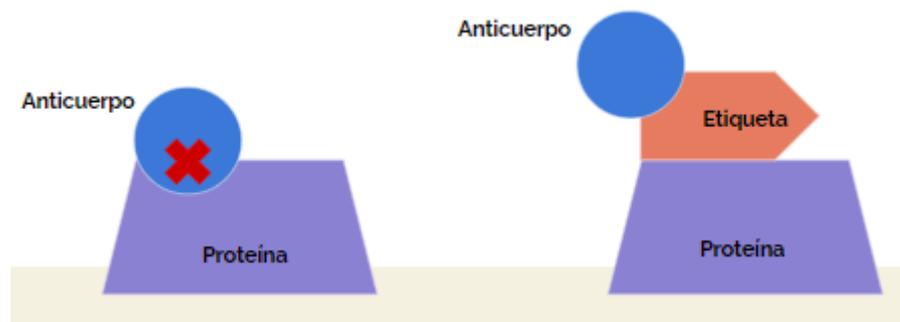


Figura 1. Esquema que muestra la unión de un anticuerpo a una proteína (izquierda). Sin embargo, cuando no hay disponibilidad de tal anticuerpo, es posible agregar una etiqueta de afinidad a la proteína de interés y unir esta etiqueta a un anticuerpo dirigido especialmente a ella (derecha). Actualmente existen anticuerpos disponibles comercialmente con alta afinidad y especificidad contra diferentes etiquetas. Elaboración propia.

Cuando se quiere realizar una purificación de la proteína de interés, pero esta proteína es unida a una columna de afinidad a través de un anticuerpo inmovilizado, se utilizan condiciones muy severas para la elución que pueden desnaturalizar a las proteínas. Es deseable evitar esto durante la purificación de una proteína recombinante producida en su forma funcional. En pocas de las etiquetas conocidas se mostró que era posible la fusión de la proteína y el péptido usando agentes no tan fuertes (Schmidt y Skerra, 1993). Además, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las etiquetas peptídicas pueden ser costosos y difíciles de obtener. Por tal motivo, Schmidt y Skerra (1993) consideraron importante generar una secuencia de péptidos corta que pudiera unirse a una proteína recombinante sin interferir su función, que permitiera la detección con un reactivo ya disponible y con un comportamiento de unión fácilmente controlado. Así que realizaron un estudio para generar péptidos de afinidad con propiedades de unión específica hacia la estreptavidina con el uso de una biblioteca aleatoria y su caracterización con respecto a las necesidades mencionadas anteriormente. Usaron estreptavidina porque es una proteína que se usa como parte de una variedad de conjugados y otros reactivos de afinidad, es un buen compañero de enlace de

elección tanto para propósitos de detección como para purificación (Schmidt y Skerra, 1993). Además, existen péptidos que se pueden unir reversiblemente a la estreptavidina bajo ciertas condiciones, esta proteína tiene una fuerte afinidad de unión por el ligando biotina, disponible como una parte de una variedad de reactivos incluyendo conjugados con diferentes enzimas reporteras e incluso inmovilizado a un transportador sólido (Schmidt y Skerra, 1993). También posee una alta estabilidad intrínseca y baja interacción no específica; como proteína soluble, en forma inmovilizada, conjugada con enzimas o incluso como versiones modificadas por ingeniería genética, y se usa ampliamente como un potente reactivo para la detección y separación de varias macromoléculas biotiniladas u otros compuestos de interés (Schmidt y Skerra, 1994).

Schmidt y Skerra (1993) generaron dicha biblioteca aleatoria de péptidos a través de PCR, para obtener una etiqueta de afinidad con propiedades de unión específica hacia la estreptavidina. La etiqueta de afinidad con estreptavidina se diseñó en el extremo C-terminal del dominio VH como parte del fragmento Fv del anticuerpo monoclonal D1.3 (dirigido contra lisozima) que se expresó funcionalmente en *Escherichia coli*.

Realizaron un ensayo de filtro tipo sándwich con cultivos de *E. coli* en cajas Petri y discos de nitrocelulosa. La primera membrana se utilizó como soporte para el crecimiento de las colonias de *E. coli* albergaban la biblioteca de plásmidos que codificaban para los péptidos de secuencia aleatoria fusionados al extremo C-terminal del fragmento variable del anticuerpo D1.3. Esta membrana impedía el paso de las bacterias, pero permitía la difusión hacia la segunda membrana, que fue colocada debajo de la primera, y que estaba cubierta con lisozima (que es el antígeno del anticuerpo D1.3) para capturar al anticuerpo unido a la colección de péptidos. Posterior al crecimiento de las colonias, la membrana inferior del sándwich se retiró y se reveló con estreptavidina unida a fosfatasa alcalina. Esto permitió observar cuáles péptidos tenían propiedades de unión a estreptavidina.

Aproximadamente 145,000 colonias independientes de varias transformaciones a pequeña escala se seleccionaron para determinar la actividad de unión a estreptavidina utilizando el ensayo de sándwich de filtro descrito anteriormente. De esta biblioteca nueve colonias dieron lugar a una señal de tinción detectable, es decir, reaccionaron con estreptavidina.

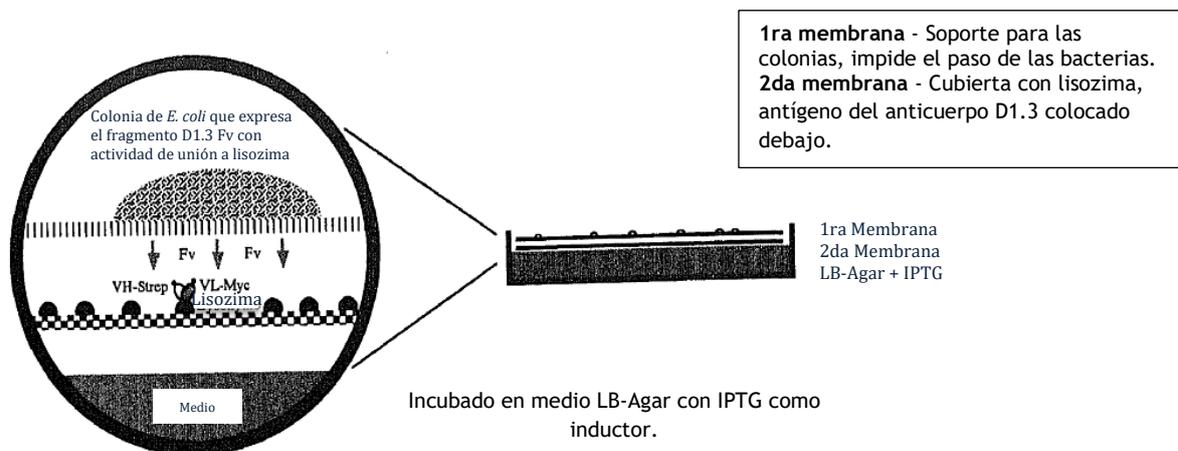


Figura 2.- Principio del ensayo de selección de colonias para péptidos con actividad de unión a estreptavidina. Las colonias de *E. coli* que albergan una biblioteca de plásmidos que codifican las fusiones de péptidos aleatorios del fragmento Fv se asientan sobre una primera membrana de filtro que sirve como soporte para las colonias pero no permite la penetración de las bacterias. Debajo se coloca una segunda membrana de filtro que se recubrió previamente con lisozima, el antígeno del anticuerpo D 1.3. La matriz sándwich resultante se incubó en una placa de agar con medio de cultivo e IPTG como inductor. Durante esta etapa, los fragmentos Fv funcionales se ensamblan en el periplasma de las células de *E. coli*, portando un péptido particular para cada colonia de *E. coli* en el extremo C-terminal del dominio VH. La expresión de la proteína inmunoglobulina recombinante conduce a una permeabilización parcial de la membrana externa de las células de *E. coli*, que aún permanecen viables en gran medida, lo que permite la difusión de los fragmentos Fv en el medio de cultivo (Pluckthun y Skerra, 1989; citado por Schmidt y Skerra, 1993). En consecuencia, los fragmentos Fv híbridos penetran a través de la primera membrana filtrante y, al acercarse a la segunda membrana, se unen a las moléculas de lisozima inmobilizadas a través de sus sitios de unión al antígeno. Por lo tanto, estas proteínas se inmovilizan selectivamente, formando una réplica exacta de las colonias de las que se originan en la primera membrana y se orientan de tal manera que sus colas peptídicas aleatorias son accesibles al reactivo de estreptavidina. Modificado de Schmidt y Skerra (1993).

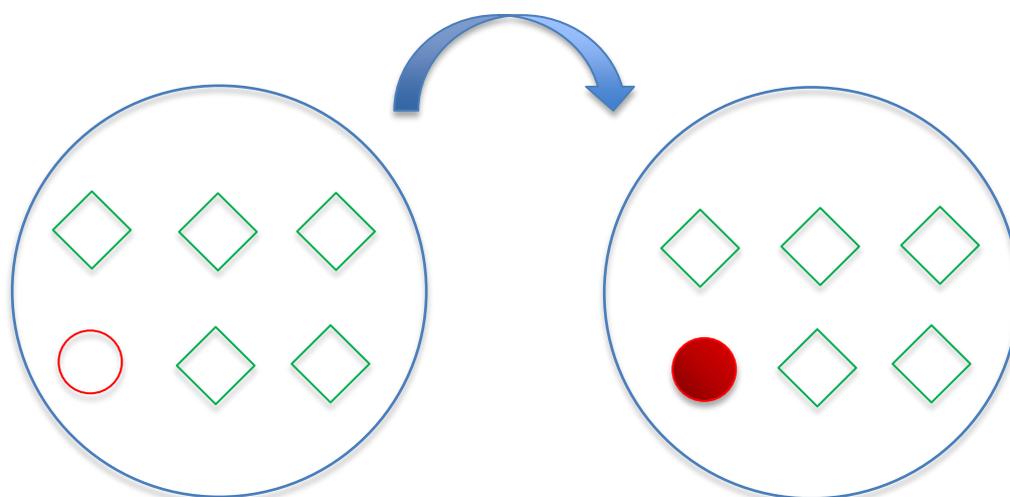


Figura 3.- Esquema que muestra un ensayo de tipo sándwich (o ensayo de selección de colonias) para péptidos con actividad de unión a estreptavidina: Se colocan dos discos de nitrocelulosa sobre el medio, *E. coli* se replica sobre la membrana más exterior. Se coloca lisozima sobre uno de los filtros (la segunda membrana, la que está en contacto con el medio), quedando solo las proteínas. Se coloca estreptavidina y se aíslan únicamente las cepas

cuyas proteínas fueron reconocidas por la lisozima. Las colonias seleccionadas secretan el anticuerpo buscado y tienen reacciones más fuertes con la estreptavidina (círculo rojo de la caja de Petri de la derecha). Elaboración propia.

Entre las secuencias de los péptidos con afinidad a estreptavidina, la secuencia No. 111 exhibió el desempeño óptimo como extensión del C-terminal para la purificación del fragmento Fv. A la versión optimizada de este péptido de afinidad se le denominó 'Strep-tag' (Schmidt y Skerra, 1993).

La etiqueta de afinidad a estreptavidina presentada en dicho estudio como resultado de tres experimentos de muestreo aleatorios representó un péptido C-terminal con extensión de 9 aminoácidos, mostró ser adecuada para la detección en Western blots o ELISAs, y para la purificación por afinidad de un sólo paso del fragmento Fv recombinante expresado en *E. coli*. El péptido obtenido respondía adecuadamente a las características buscadas en etiquetas de afinidad: puede unirse a una proteína recombinante sin interferir su función, permite la detección con un reactivo ya disponible y demuestra un comportamiento de unión fácilmente controlado (Schmidt y Skerra, 1993).

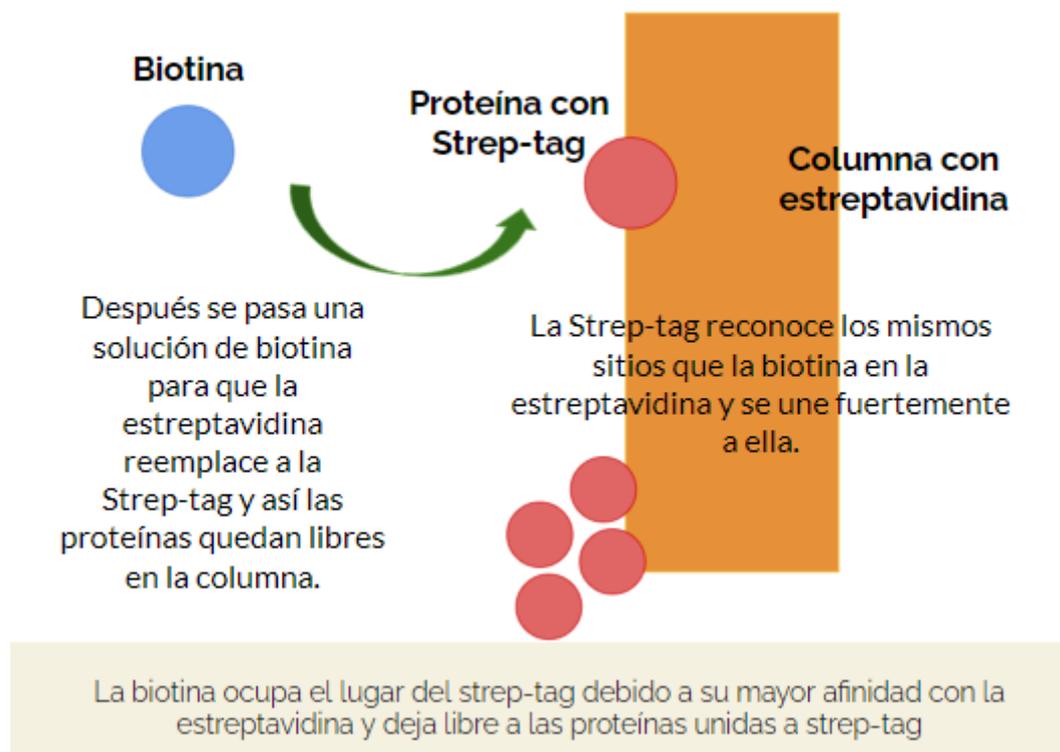


Figura 4. Esquema que muestra la unión de Strep-tag a estreptavidina y posteriormente su separación debido a biotina en una columna de purificación por cromatografía de afinidad.

Después de algunos años, la etiqueta Strep-tag fue optimizada y renombrada Strep-tag II. La nueva Strep-tag II de ocho residuos se une con gran afinidad al bolsillo de unión a biotina de una estreptavidina modificada llamada strep-tactin y la unión puede revertirse con destiobiotina, un análogo de biotina (Schmidt y Skerra, 2007), lo que permite la elusión de proteínas etiquetadas de columnas de afinidad (Figura 4). Puede fusionarse con proteínas recombinantes en varios acomodos. Se puede insertar tanto en el extremo N-terminal como C-terminal.

Los autores señalan que su presencia no influye sobre la conformación y la funcionalidad de la proteína por lo que no es necesario eliminar la etiqueta una vez purificada. Es una herramienta versátil tanto para el rápido aislamiento de un producto génico funcional como para su detección o análisis de interacción molecular (Schmidt y Skerra, 2007). La secuencia del Strep-tag II consiste de los siguientes ocho aminoácidos: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys.

Características del género *Streptomyces*.

Streptomyces es un género de bacterias Gram positivas con alto porcentaje de guanina y citosina en su DNA. Se trata de un género de gran importancia científica y económica, el más extenso de las actinobacterias. Son organismos importantes como productores de antibióticos a nivel comercial. Está caracterizado por tener un crecimiento multicelular, formando colonias de micelio compuesto de hifas que crecen por extensión apical. En estas colonias miceliales se presenta una marcada diferenciación morfológica, pues al agotarse los nutrientes desarrollan hifas portadoras de esporas. Su material genético, a diferencia de la mayoría de los procariotas, se encuentra como un cromosoma lineal (Rédei, 2008). El genoma secuenciado de la especie mejor estudiada del género a nivel molecular, *Streptomyces coelicolor* A3 (2), es de 8,667,507 pb, que contiene un estimado de 7825 genes (Bentley et al., 2002).

S. coelicolor posee un sistema de restricción de DNA metilado, compuesto por muchas nucleasas codificadas en el genoma en genes adquiridos por transferencia horizontal (González-Cerón et al., 2009). Entre ellas se encuentra la nucleasa codificada por el gen *sco5330* (Cadena, 2014), el cual es un gen cromosómico que codifica una nucleasa que corta secuencias de DNA con adeninas metiladas. Además, forma parte de un elemento genético móvil (Palacios-Adalid, 2016).

Streptomyces lividans.

Streptomyces lividans es una especie ampliamente utilizada para la producción de proteínas heterólogas, ya que ofrece varias ventajas sobre *S. coelicolor*, incluido un sistema limitado de restricción-modificación que evita el requisito de usar DNA no metilado para la transformación o la conjugación, y la actividad de proteasas extracelulares (Butler *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 2005). Una comparación reciente de 31 genomas de *Streptomyces* conocidos encontró que *S. coelicolor* es el más similar a *S. lividans* (Wang *et al.*, 2017). Entre los estreptomicetos, *S. lividans* es un hospedador preferido para la producción de proteínas porque puede transformarse de manera eficiente, debido a que posee un sistema de restricción de DNA exógeno relajado, que facilita el uso de plásmidos funcionales y la propagación de secuencias de DNA heterólogas (Anne y Van Mellaert, 1993; Wang *et al.*, 2017).

S. lividans puede utilizar eficientemente una alta proporción de promotores micobacterianos y podría ser un hospedero valioso en la producción de agentes diagnósticos y terapéuticos (Tremblay, 2002).

Se ha reportado la producción de dos antígenos principales de *Mycobacterium tuberculosis* en *S. lividans* como proteínas extracelulares secretadas (Tremblay *et al.*, 2002). Además, como muchas otras actinobacterias, *S. lividans* tiene la capacidad de glicosilar sus propias proteínas, así como proteínas heterólogas (Lara *et al.*, 2004). La capacidad de glicosilar productos génicos clonados mejora la utilidad de *Streptomyces* como hospedador para la producción de polipéptidos heterólogos, y este sistema es una herramienta potente para estudiar los procesos de glicosilación en bacterias. La existencia de vectores para la expresión de proteínas inducibles en *S. lividans* permite la producción de grandes cantidades de proteínas adecuadas para la caracterización inmunológica y bioquímica de glicoproteínas (Lara *et al.*, 2004).

Las proteínas secretadas en estreptomicetos son producidas como moléculas precursoras que contienen un péptido señal en el extremo amino terminal (-NH₂) que es más largo que en otras bacterias y se elimina al salir de la célula (von Heijne y Abrahamsen, 1989).

Antecedentes.

La etiqueta Strep-tag II es una secuencia peptídica pequeña de solo ocho residuos (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) que exhibe afinidad intrínseca hacia estreptavidina y puede fusionarse con proteínas recombinantes en varias maneras (Schmidt y Skerra, 2007).

Cadena (2014) estudió la relación del sistema de restricción de DNA metilado con el gen *sco5330* en *E. coli*. Clonó el gen *sco5330* de *S. coelicolor* en *E. coli*, usando una construcción con la etiqueta His6, la cual sí resultó efectiva para purificar *sco5330*, pero solamente como proteína insoluble e inactiva.

Litchy y colaboradores (2005) realizaron un estudio en el que comparaban diferentes etiquetas de afinidad para la purificación de proteínas, entre ellas Strep-tag II, dados sus resultados, ellos sugieren que esta etiqueta puede proporcionar un desempeño aceptable de excelente purificación con buenos rendimientos a un costo moderado. Ellos seleccionaron la dihidrofolato reductasa de *E. coli* (DHFR) como la proteína diana a purificar.

DHFR también se utilizó en una de las caracterizaciones originales de la etiqueta de hexahistidina. Dado que la etiqueta de hexahistidina es probablemente la etiqueta de afinidad más popular en uso, expresaron cada etiqueta en conjunto con la etiqueta de hexahistidina para permitir una comparación directa entre la etiqueta de interés con la etiqueta de hexahistidina

Lara y colaboradores (2004) expresaron la glicoproteína de 45/47 kDa de *M. tuberculosis* o proteína APA en *S. lividans*. Aunque el fragmento de DNA que codifica a la proteína APA clonado en el vector pIJ486 que usaron no llevaba el operón completo, se observó expresión. En dicho estudio, la lectura transcripcional del vector fue descartada como la causa de la expresión, ya que el gen se clonó río abajo de un terminador transcripcional fuerte. Por tanto, refirieron que es muy probable que el fragmento clonado en pIJ486, que portaba 1 kb de DNA río arriba del gen, contuviera un promotor interno capaz de dirigir la expresión del gen de la proteína de 45/47 kDa (Apa) de *M. tuberculosis* en *S. lividans*. Este trabajo mostró que *Streptomyces* es capaz de reconocer los promotores de *M. tuberculosis*. Sus observaciones apoyan la hipótesis de que las diferencias en la glicosilación son la causa de las dos formas de la proteína recombinante. Este hallazgo fue respaldado por el análisis MALDI-TOF-MS que mostró que, como en la proteína nativa, los sitios de glicosilación de la proteína 45 / 47

kDa están ubicados en los extremos N y C de la molécula. Esto es relevante para el presente trabajo, ya que la etiqueta Strep-tag II se coloca en los extremos N y C de la proteína.

En el trabajo de López-Portillo (2016) se intentó purificar la proteína FKBP (producto del gen sco1639) utilizando la etiqueta 6xHis en el extremo carboxilo, sin embargo, esta proteína no pudo ser detectada, y por ende purificada, posiblemente debido a una interacción entre la etiqueta y la proteína. En dicho trabajo, se observó que proteínas secretadas glicosiladas, no podían ser detectadas con la etiqueta de 6 histidinas.

Otros trabajos indican que otras glicoproteínas secretadas podrían estar siendo interferidas por la etiqueta His6, tal es el caso de la proteína LpQH (de 19 kDa) y la proteína PstS-1 (38 kDa) (Tremblay et al., 2002).

Justificación.

Una gran variedad de enzimas que se emplean en la industria (farmacéutica, alimenticia, textil, química, etc.) son recombinantes. Muchas de ellas son microbianas, además, resulta más fácil y reproducible su obtención a partir de microorganismos bien conocidos y fácilmente cultivables (ArgenBio, 2007). Como respuesta a las necesidades de estos campos, el uso de proteínas recombinantes ha aumentado considerablemente en los últimos años.

La fácil detección y purificación de una proteína recombinante sin un conocimiento detallado de sus propiedades bioquímicas individuales es una estrategia valiosa para el estudio de las proteínas, por lo que es un enfoque de interés general en la ingeniería de proteínas (Schmidt y Skerra, 1993). Son ampliamente utilizados los híbridos recombinantes que contienen un polipéptido de fusión, denominado etiqueta de afinidad, para facilitar la purificación de los polipéptidos diana (Terpe, 2003). Muchas proteínas, dominios o péptidos diferentes se pueden fusionar con la proteína objetivo. Las ventajas de usar proteínas de fusión para facilitar la purificación y detección de proteínas recombinantes son bien reconocidas.

El desarrollo de técnicas de purificación genéricas para proteínas recombinantes ha ganado interés reciente, particularmente porque las características bioquímicas de un producto génico a menudo se desconocen. A este respecto, el uso de una etiqueta peptídica corta con propiedades de afinidad definidas tiene la ventaja de que no interfiere necesariamente con la función de la proteína y, por lo tanto, su eliminación no es necesaria para aplicaciones *in vitro* (Sassenfeld, 1990; Citado por Schmidt y Skerra, 1994). Por ello, este trabajo ofrece una visión

general de uno de los sistemas más utilizados e interesantes (Terpe, 2003), además, de que esta etiqueta cumple con las características anteriormente mencionadas: La Strep-tag II.

His6 no ha resultado efectiva para caracterizar la proteína Sco5330, ya que en *E. coli* la proteína resultó insoluble y en *Streptomyces* no se detecta la etiqueta de His6, lo cual se ha observado también con otras proteínas (Cadena, 2007). Entre otros estudios se descubrió que en algunas especies de *Streptomyces*, esta es incapaz de expresar el gen heterólogo *sco5330* al ser clonado con un tag de histidinas.

El Strep -tag II, que es descrito como corto, biológicamente inerte, proteolíticamente estable y que no interfiere con la translocación de membrana o el plegamiento de proteínas, podría ofrecer una herramienta versátil tanto para el aislamiento rápido de un producto génico funcional como para su detección o análisis de interacción molecular de acuerdo con sus inventores. La Strep-tag II ha sido usada exitosamente en numerosos ejemplos para la purificación eficiente de todos los tipos de proteínas incluyendo proteínas de membrana, de acuerdo con Schmidt y Skerra (2007), quienes, además, la describen como resistente a las proteasas celulares, puede usarse en presencia de detergentes suaves y al ser bioquímicamente casi inerte es ventajoso su uso frente a otras etiquetas de afinidad como His6, el péptido de unión a Calmodulina y Flag-Tag, cuya función, además, depende de los iones metálicos. Para la mayoría de las aplicaciones no es necesario separar el Strep-tag II de la proteína de interés (Schmidt y Skerra, 2007).

Se espera que al utilizar otra etiqueta (Strep-tag II) en construcción con *sco5330*, pueda purificarse a partir de *Streptomyces lividans*, además esto serviría para conocer más acerca de los mecanismos moleculares que podrían facilitar la manipulación genética de *Streptomyces*.

Objetivos.

Objetivo general.

- Analizar el comportamiento de la etiqueta molecular Strep-tag II para la detección de proteínas en *Streptomyces*, utilizando como modelo una proteína intracelular, la nucleasa Sco5330.

Objetivos particulares.

- Clonar el gen *sco5330* modificado y expresar la endonucleasa metil-específica que codifica etiquetada con Strep-tag II.
- Determinar si la proteína Sco5330 etiquetada con Strep-tag II se encuentra en la fracción soluble o insoluble de la célula, por medio de la técnica de Western-blot con anticuerpos anti-Strep-tag II.
- Realizar pruebas de fenotipo para determinar si la proteína permanece activa.

Hipótesis.

La nucleasa Sco5330 mantendrá su funcionalidad al ser etiquetada con Strep-tag II, ya que la etiqueta no interferirá con dicha función y permitirá su fácil detección.

Materiales y métodos.

Se utilizaron diversas cepas de *E. coli* y de *Streptomyces (lividans y coelicolor)*. En la tabla 1 y 2 se muestran las cepas utilizadas para clonar y expresar los genes a estudiar. Los plásmidos que se utilizaron para clonar los genes en las cepas se muestran en la tabla 3 y los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes en la tabla 4.

Cepas

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli*

Cepa	Características	Fuente
DH5 α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG pur B20</i> ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17(r_K-m_K⁺)</i> , λ^-	Grant <i>et al.</i> , 1990
IBEC58	Cepa derivada de la BW25113 que no metila al DNA.	González-Cerón <i>et al.</i> , 2009
ET12567/pUZ8002	<i>dam-13: Tn9, dcm-6, hsd-M.</i>	MacNeil <i>et al.</i> , 1992

	<i>E. coli</i> deficiente en los sistemas de metilación de DNA. Contiene un plásmido con los elementos necesarios para la conjugación con <i>Streptomyces</i> y resistencia a kanamicina.	
--	---	--

Tabla 2. Cepas de *Streptomyces* sp.

Cepa	Características	Fuente
1326	<i>Streptomyces lividans</i> silvestre	Kieser <i>et al.</i> , 2000
M145	<i>Streptomyces coelicolor</i> silvestre A3 (2)	Hopwood, 1985; Bentley, 2002

Plásmidos.

Tabla 3.- Plásmidos utilizados.

Plásmido	Características	Fuente
pIJ6902	Vector replicativo en <i>E. coli</i> con resistencia a apramicina. Vector de expresión integrativo monocopia con el promotor inducible P_{tipA} por thioestrepton en <i>Streptomyces</i> . Bajo número de copias y se integra en el cromosoma.	Huang <i>et al.</i> , 2005
pBlueScript IISK	Vector de clonación replicativo en <i>E. coli</i> . Resistencia a ampicilina.	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pUC18	Vector de clonación replicativo en <i>E. coli</i> con un sitio múltiple de clonación en la región del gen <i>LacZ</i> , permite la selección positiva con IPTG y X-Gal, confiere resistencia ampicilina.	Norrander <i>et al.</i> , 1983
pMS81	Plásmido replicativo de <i>E. coli</i> e integrativo en	Gregory <i>et al.</i> ,

	<i>Streptomyces</i> con resistencia a higromicina.	2003
pB404	Plásmido pMS81 integrativo en el que se clonó el gen de la metilasa SphM bajo su propio promotor.	Datos no publicados.
pBlueScript-sco5330TagN	Gen de la endonucleasa metil-específica sco5330 de <i>S. coelicolor</i> clonado en el plásmido pBlueScript, con la etiqueta Strep-tag II en el extremo N-terminal.	Este trabajo
pBlueScript-sco5330TagC	Gen de la endonucleasa metil-específica sco5330 de <i>S. coelicolor</i> clonado en el plásmido pBlueScript, con la etiqueta Strep-tag II en el extremo C-terminal.	Este trabajo
pIJ6902-sco5330TagN	Gen de la endonucleasa metil-específica sco5330 de <i>S. coelicolor</i> clonado en el plásmido pIJ6902, con la etiqueta Strep-tag II en el extremo N-terminal.	Este trabajo
pIJ6902-sco5330TagC	Gen de la endonucleasa metil-específica sco5330 de <i>S. coelicolor</i> clonado en el plásmido pIJ6902, con la etiqueta Strep-tag II en el extremo C-terminal	Este trabajo

Medios y condiciones de cultivo.

Para *E. coli* se usaron los siguientes medios (esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos). Los cultivos de *E. coli* fueron incubados a 37°C.

- YT2X: Bacto Triptona 1.6 %, extracto de levadura 1%, NaCl 0.5%, pH= 7.2.
- LB agar (sólido): Bacto Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Select Agar (Gibco BRL) 1.5%, pH= 7.0.

Para *Streptomyces lividans* se usaron los siguientes medios de cultivo (esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 minutos). Los cultivos de *S. lividans* fueron incubados a 30°C.

- LB + sacarosa 25%: Bacto Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, sacarosa 25% pH=7.0.
- MS agar: Manitol 10 g, harina de soya 10 g, 500 mL de agua, dividido en alícuotas de 50 mL. Por otra parte, se realizaron alícuotas separadas de 50 mL de agar 4%.

Después de autoclavear se mezcla una alícuota de harina de soya y manitol con una alícuota de agar antes de verter en las cajas Petri.

Amplificación y clonación del gen *Sco5330* de *Streptomyces coelicolor*.

La secuencia del gen *sco5330* que codifica para una nucleasa metil-específica de *S. coelicolor* M145 se obtuvo de la base de datos de StrepDB (streptomyces.org.uk), y cuenta con 903 pares de bases. Se tomó esta secuencia como referencia para diseñar los siguientes oligonucleótidos:

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia
Sco5330TagN-UP	5' CACGGATCCATATGTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAGATG CCCAAACCGCGCAC 3',
Sco5330TagN-DOWN	5' ACCGAATTCAGTTGGCGATGTGGGTG 3'
Sco5330TagC-UP	5' CGCGGATCCATATGCCCAAACCGCGCAC 3'
Sco5330TagC-DOWN	5' ACCGAATTCACCTTCTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGTTGGCG ATGTGGGTGC 3'

El par *Sco5330TagN-UP/Sco5330TagN-DOWN* permite la amplificación del gen *sco5330* con la etiqueta Strep-tag II en el extremo N-terminal de la proteína (*Sco5330TagN*, Figura 3), mientras que el par *Sco5330TagC-UP/Sco5330TagC-DOWN* permite la amplificación con la etiqueta en el extremo C-terminal (*Sco5330TagC*; Figura 4). Ambos oligonucleótidos contienen sitios para *BamHI* y *NdeI* arriba del gen (en el caso del sitio *NdeI* incluye al codón de inicio) y un sitio para *EcoRI* abajo del gen, con el fin de facilitar clonaciones posteriores.

Las secuencias amplificadas excluyeron la región promotora ya que los oligonucleótidos se diseñaron para después clonar los genes bajo el promotor *tipA* de *S. coelicolor*, el cual es inducible por tiorstreptón (Murakami *et al.*, 1989). Para amplificar el gen *sco5330* se empleó como molde DNA cromosómico de la cepa M145 de *S. coelicolor*.

Las reacciones de PCR para amplificar *sco5330* se llevaron a cabo usando la enzima de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) en un termociclador Techne® con el siguiente programa: desnaturalización 98°C, 30 segundos; 35 ciclos de 10 segundos a 98°C; alineamiento a 68°C 10 segundos, extensión a 72°C 30 segundos, y extensión final 72°C, 10 minutos.

```

1      CACGGATCCCATATGTTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAGAGATGCCCAAACCGCGCACATCT
1      M W S H P Q F E K M P K T A H I Y
61     ACGTACCCAGCCCTTCTCGCGAGAACCTTGAGATCGGGCTCGACCAGGGCTTGTGGGGAT
21     V P S P S R E N L E I G L D Q G L W G W
121    GCGCCCGCAGCGCCCTCGACCGTCCGGGCACTCGTCAGGCAGTCCAGTCCCTTACCGAAG
41     R R S A L D R A G T R Q A V Q S L T E G
181    GCGACTTCCTCGTCTGGGGCACCCGGGGCCCAACAGCCGGTTGCTCCCGCGGATGGG
61     D F L V L G H R G P N S R V A P G G W A
241    CGAATGCGACCCCTGCAGCGTGTATCGTCACCCAGGTCAGCCGGCCCTACTTCACCGACA
81     N A T L Q R V I V T Q V S R P Y F T D S
301    GCACCCCTGTCTGGCCGGGCGACGACTACCCCGAGCGCATCGGCATCGACGTCCTCGAGG
101    T P V W P G D D Y P E R I G I D V L E E
361    AAGAACAGAACGTGCCGGGACCCGCCCTCGGTACCGATGCCATGGAAGTCTGTGCCCTGT
121    E Q N V P G T A L G T D A M E A L R L S
421    CCGCCAAACAGCAGGGGGCCGGTCTCCAGCCTGGTATCGCAGCCGTCGCCAGCTCG
141    A N K Q G A A V L Q P G I A A V A Q L A
481    CCGACGTGCTCCCGCTTGTTCCTGTCCTTCCGGGCGACGCGACCCGTGGACCACGAGGGCA
161    D V L P L V P V L P G D A T V D H E G T
541    CCGACAGCCCGCTCGCCAGGTACTCGTCCGTCGGGAGCAGGTCAGGTCGCGCAAGAACC
181    D S A V A Q V L V R R E Q V K L R K N L
601    TGCTCGGTGGCGCCACTGAGGCGGCCTGTGCCCTTGTGCGGCGGTGTCCTGCCACCCGGT
201    L G G A T E A A C A L C G R V L P T R F
661    TTATCCGCGCCGCCACATCAAGCGGCGCAGCGCGGCCAGCCGCGAGGAGCGGCTGATGA
221    I R A A H I K R R S A A S R Q E R L M M
721    TGGCCACATCATGCCAGCCTGCCTCATCGGCTGCGACGAGCTCTTCGAGCACGGCTACC
241    A N I M P A C L I G C D E L F E H G Y L
781    TGTAAGTCAACGACAACGGCACCATCGCCGTCAGCCCGAAGAGCAACGCCACTCCTGACC
261    Y V T D N G T I A V S P K S N A T P D L
841    TGGCTGTCCGCGCAAGGCTCTCGAAGGCCGTACCGTCCGCGACTACGGCCCCCACCAGG
281    A V A A K A L E G R T V A D Y G P H R A
901    CACCCCTTACATCTGGCACCGCACCCACATCGCCAACTGAAATTCGGT
301    P F Y I W H R T H I A N *

```

Figura 5.- Secuencia del producto de PCR del gen *sco5330* con los oligos TagN UP y DOWN con la etiqueta Strep-tag II. En la región amino en color amarillo se observa la etiqueta de afinidad Strep-tag II de 8 aminoácidos. En letras rojas se observa el codón de inicio y el codón de paro (se usó la herramienta de alineación de secuencias DNAMan).

```

1      CGCGGATCCATATGCCCAAACCGGGCACATCTACGTACCCAGCCCTTCTCGCGAGAACC
1      M P K T A H I Y V P S P S R E N L
61     TTGAGATCGGGCTCGACCCAGGGGTTGTGGGGATGGCGCCGACGGCCCTCGAACCGTGCCG
21     E I G L D Q G L W G W R R S A L D R A G
121    GCACTCGTCAGGCAGTCCAGTCCCTTACCGAAGGCGACTTCCTCGTCCCTGGGGCACCGGG
41     T R Q A V Q S L T E G D F L V L G H R G
181    GGCCCAACAGCCGGGTTGCTCCCGGGGATGGGGCAATGCGACCCTGCAGCGTGTCTCATCG
61     P N S R V A P G G W A N A T L Q R V I V
241    TCACCCAGGTCAGCCGGCCCTACTTCACCGACAGCACCCCTGTCTGGCCGGGGCAGCACT
81     T Q V S R P Y F T D S T P V W P G D D Y
301    ACCCCGAGCGCATCGGCATCGACGTCCTCGAGGAAGAACAAGTGCCTGGCCACCGCC
101    P E R I G I D V L E E E Q N V P G T A L
361    TCGGTACCGATGCCATGGAAGCTCTGCGCCTGTCCGCCAACAAGCAGGGGGCCCGCGTCC
121    P G D A M E A L R L S A N K Q G A A V L
421    TCCAGCCTGGTATCGCAGCCGTCGCCCAGCTCGCCGACGTGCTCCCGCTTGTTCCTGTCC
141    Q P G I A A V A Q L A D V L P L V P V L
481    TTCGGGGCGACCGGACCGTGGACCACGAGGGCACCGACAGCCCGCTGCCCCAGGTACTCG
161    P G D A T V D H E G T D S A V A Q V L V
541    TCCGTGGGAGCAGGTCAAGCTCCGCAAGAACCTGCTCGGTGGCCGCACTGAGGGCCCT
181    R R E Q V K L R K N L L G G A T E A A C
601    GTGCCTTGTCGGCCGTGTCCTGCCACCCGGTTTATCCGGCCGCCACATCAAGCGGC
201    A L C G R V L P T R F I R A A H I K R R
661    GCAGCCGGCCAGCCGCCAGGAGCGGCTGATGATGGCCAACATCATGCCAGCCTGCCCTCA
221    S A A S R Q E R L M M A N I M P A C L I
721    TCGCTGCGACGAGCTTTCGAGCACGGCTACCTGTACGTACCGCAACGCGCACCATCG
241    G C D E L F E H G Y L Y V T D N G T I A
781    CCGTCAGCCCGAAGAGCAACGCCACTCCTGACCTGGCTGTGCGGGCGAAGGCTCTCGAAG
261    V S P K S N A T P D L A V A A K A L E G
841    GCCGTACCGTCGCGGACTACGGCCCCACCGCGCACCCCTTCTACATCTGGCACCCGACCC
281    R T V A D Y G P H R A P F Y I W H R T H
901    ACATCGCCCACTGGAGCCACCCGCGTTCGAGAAGTGGATTTCGGT
301    I A N W S H P Q F E R *

```

Figura 6. Secuencia del producto de PCR con los oligonucleótidos TagC UP y DOWN con la etiqueta Strep-tag II. En la región carboxilo en color amarillo se observa la etiqueta Strep-tag II de 8 aminoácidos. En letras rojas se observa el codón de inicio y el codón de paro (Se usó la herramienta de alineación de secuencias DNAMAN).

Se utilizó un marcador de peso molecular para comparar el número de bases de cada muestra en los geles de agarosa, dicho marcador empleado fue DNA del fago λ digerido con la enzima *Pst*I (Figura 7).

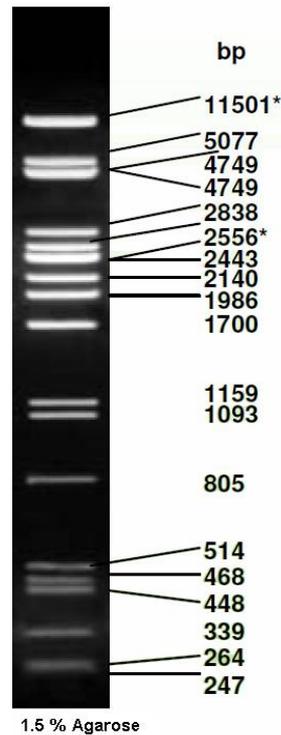


Figura 7.- Marcador de peso molecular λ PstI.

Terminada la reacción de PCR (Figura 8), se digirieron los productos de PCR (*sco5330*TagN y *sco5330*Tag C) con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y el plásmido pBlueScript II con las mismas enzimas. Tanto los plásmidos como los productos de PCR de *sco5330* se purificaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión, o LMP (por sus siglas en inglés “Low Melting Point”) (Figura 7).

Los productos de PCR de *sco5330* fueron ligados al plásmido pBlueScriptIIISK (Figura 10). Después se eligió a la cepa IBEC58 para ser transformada con la ligación de pBlueScriptIIISK con *sco5330*.

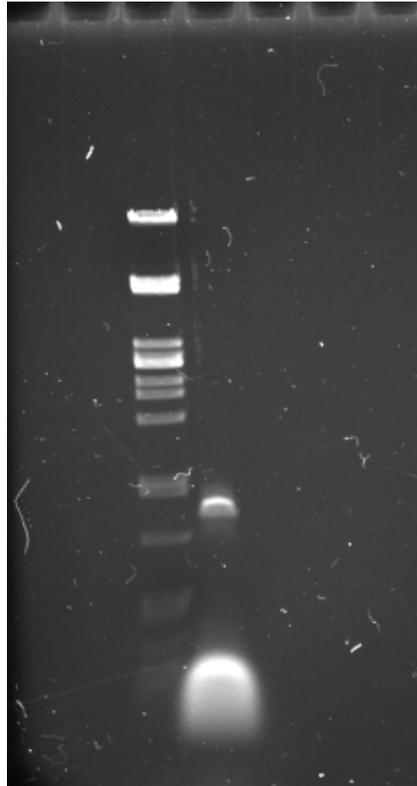


Figura 8.- Amplificación del gen *sco5330*. Gel de agarosa con el producto de PCR obtenido con el par de oligonucleótidos TagN: A la izquierda se observa el marcador de peso molecular (λ PstI) y a la derecha el producto de la amplificación por PCR de 949pb.

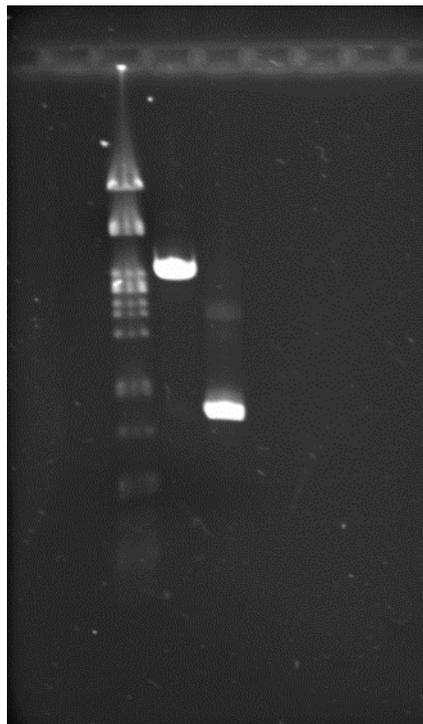


Figura 9.- Gel de agarosa con el producto de PCR sco5330 y el vector de clonación. A la izquierda se observa: Marcador λ PstI, en el segundo carril pBluescript IISK digerido con *EcoRV* (2961 pb) y en el carril derecho el producto de PCR sco5330TagN de 949 pb.

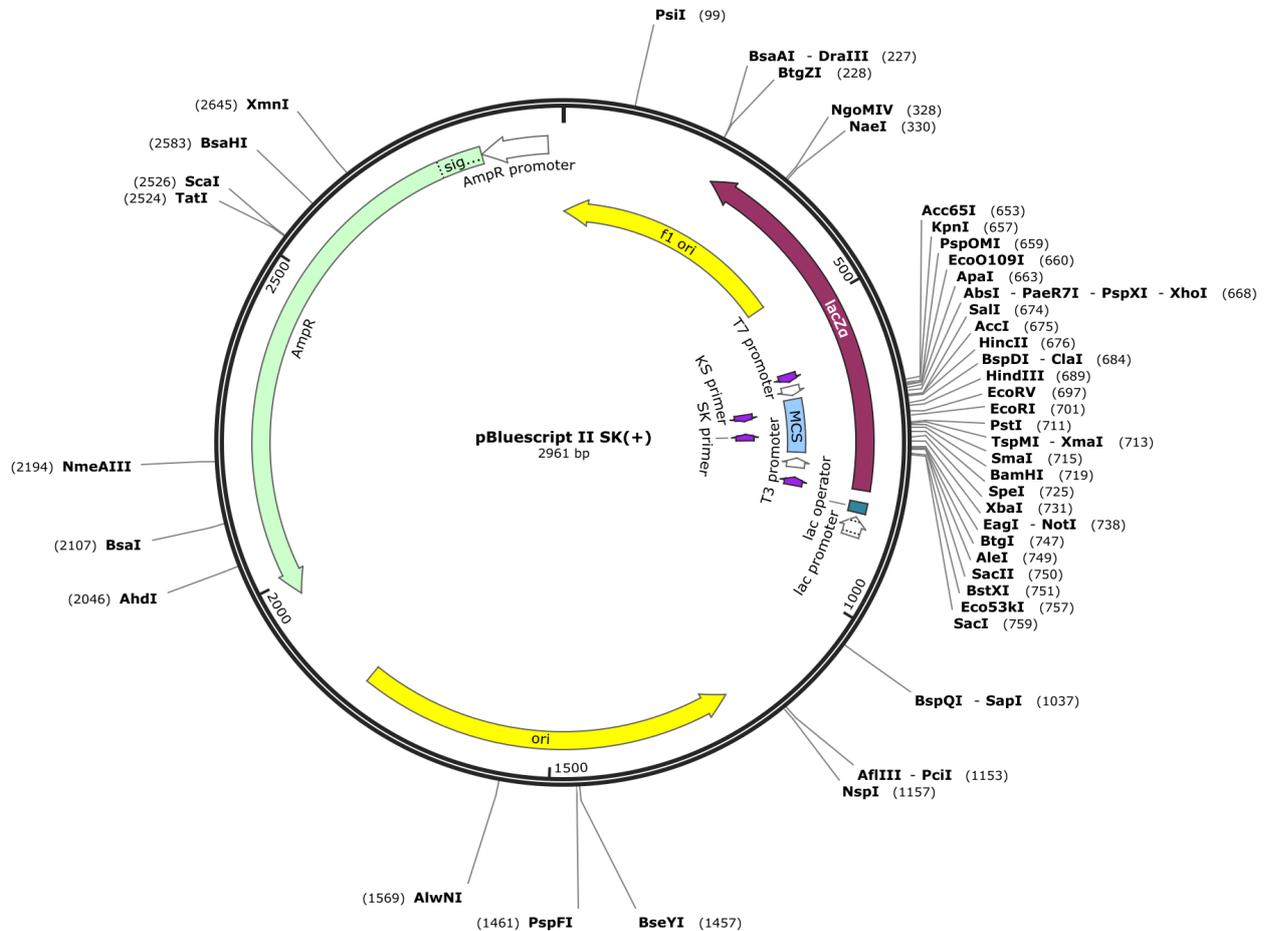


Figura 10.- Mapa del plásmido pBlueScript IISK.

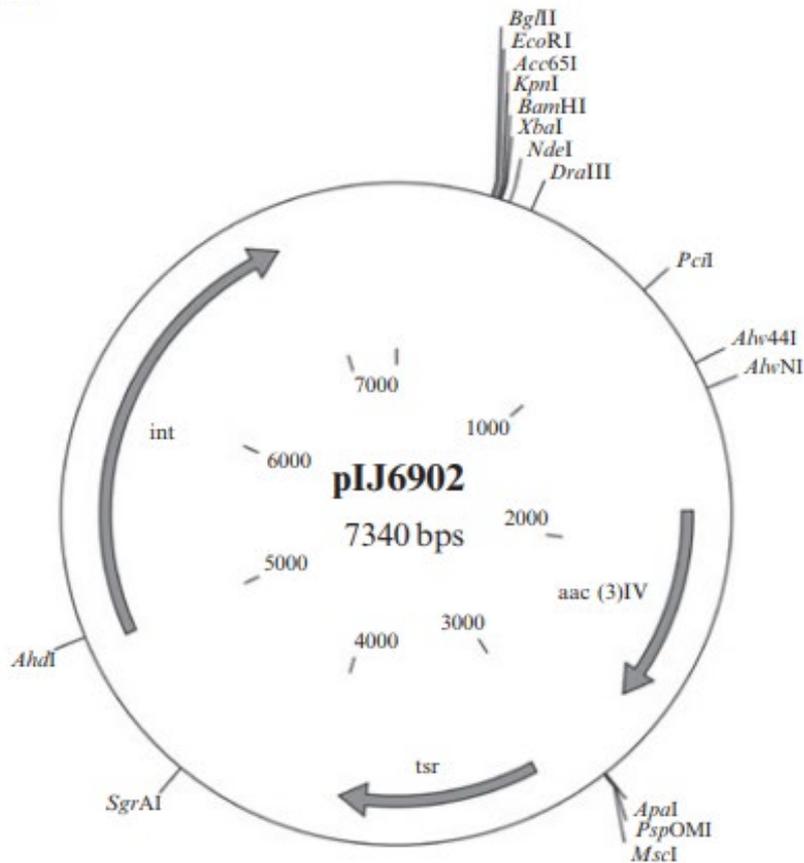


Figura 11.- Sitios de restricción del plásmido pIJ6902.

Ligación y transformación.

Las ligaciones se hicieron con DNA ligasa T4, a una relación molar inserto: vector de 5:1, En el caso del gen *sco5330* se transformó por electroporación la cepa de *E. coli* IBEC58, que es una derivada de la cepa BW25113 que no metila DNA (González-Cerón et al., 2009).

Se hizo la selección de colonias en medio LB con ampicilina. Se seleccionaron 20 colonias al azar para cultivar cada una en una cuadrícula, y realizar lisis en gel de las células, con el fin de determinar cuáles tenían el inserto, incluyendo como control en el gel al pBlueScript II. Una colonia fue seleccionada y a partir de ella se realizó una preparación de plásmido que se digirió con enzimas de restricción para confirmar la presencia del gen clonado.

Purificación y secuenciación de plásmidos.

Se obtuvieron preparaciones de los plásmidos con los genes clonados, con alto nivel de pureza (con un valor de $A_{260}/A_{280} = 1.8-1.9$, medido en un espectrofotómetro).

Se enviaron muestras de los plásmidos que tenían clonados los diferentes genes, tanto *sco5330* (con la etiqueta Strep-tag II ya sea en el extremo amino o carboxilo) como los que tenían clonado el gen de Apa, a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, donde se secuenciaron los plásmidos usando los oligonucleótidos universales M13forward y M13reverse.

Clonación en el vector de expresión de *Streptomyces*.

Una vez que se aseguró mediante secuenciación que no había mutaciones en los genes amplificados, se procedió a subclonarlos en vectores de expresión para *Streptomyces*. Se usó al plásmido pIJ6902 (Figura 11). Para esto se digirieron los plásmidos con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*, cuyos sitios se incluyeron en los oligonucleótidos con los que se amplificaron los genes, de manera que estuviera incluido en el sitio de *NdeI* el codón de inicio de la traducción.

Ligación y transformación II.

Se transformó con el plásmido pIJ6902+ *sco5330* (ya sea TagN o TagC) a células de *E. coli* ET12567/pUZ8002, seleccionando la resistencia a apramicina

Posteriormente se utilizó esta cepa para introducir a los plásmidos pIJ6902+*sco5330*TagN y pIJ6902+*sco5330*TagC a *Streptomyces lividans* por medio de conjugación.

Expresión de la proteína y evaluación de la actividad:

Para la expresión de la proteína se empleó el medio LB + sacarosa 25 %. Las esporas que contenían los plásmidos se resuspendieron en 10 mL de medio YT2X e incubadas a 37C durante seis horas para lograr la germinación. Posteriormente las esporas germinadas fueron colectadas por centrifugación y transferidas a 50 mL de medio LB+sacarosa 25% que contenía apramicina 50 µg/mL. Para el caso de TagN después de 12 horas la mitad del cultivo se transfirió a otro matraz al que se añadió tioestreptón 10 µg/mL para inducir la expresión a partir del promotor *tipA* del vector, mientras que lo otra mitad se continuó incubando sin inducir. En el caso de los cultivos que portaban la etiqueta TagC, solo se realizaron con inducción de tioestreptón (a las 12-14 horas). Después de 40 horas totales de incubación se midió la densidad óptica de los cultivos y se colectó el micelio por centrifugación. Posteriormente el micelio se rompió mediante sonicación, y se centrifugo para obtener la

fracción citoplasmática soluble, mientras que la pastilla obtenido correspondió a la fracción insoluble, que contiene los restos de pared celular y las proteínas insolubles que su pudieron haber agregado. Las fracciones se colocaron en microtubos y se etiquetaron según su inducción o no inducción:

- Soluble sin inducir (-S)
- Soluble inducida (S-Tio)
- Pastilla sin inducir (-P)
- Pastilla inducida (P-Tio)

SDS-PAGE.

Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS por duplicado de los diferentes extractos, uno de los cuales se utilizó para analizar las proteínas por medio de tinción de Coomassie y el otro por medio de un Western blot.

Western Blot.

Se hizo la transferencia a membrana de PVDF. Después se colocó una mezcla de leche descremada en polvo sin grasa con TBS 1X bloquear el pegado inespecífico de los anticuerpos y se procedió a la identificación de proteínas con anticuerpo comercial antiStrep-tag II como anticuerpo primario y anti-IgG de ratón unido a peroxidasa como anticuerpo secundario. El revelado se realizó mediante un kit de quimioluminiscencia y se observó en la placa fotográfica la presencia de la proteína con el peso esperado, al comparar con un marcador de peso Precision Plus Protein Standards Dual color de Bio Rad.

Pruebas de fenotipo por medio de conjugaciones de *E. coli* con *Streptomyces*.

Estas pruebas consistieron en ensayos de incompatibilidad entre metiltransferasas y nucleasas de *Streptomyces coelicolor* aprovechando las características de Sco5330 como nucleasa metil-específica estudiada por Cadena (2014). Nuestra hipótesis es que, si la nucleasa reconoce los sitios metilados, entonces las bacterias que por su naturaleza contienen adeninas metiladas cuando se expresa la metilasa SphM, no crecerán al expresar la nucleasa funcional, ya que estaría restringiendo su propio DNA, a esto se le conoce como “incompatibilidad” entre una metilasa y una nucleasa de DNA metilado (Cadena, 2014).

Se realizó un precultivo con 10 μ L de cada cepa de *E. coli* pMS81 y pB404 en dos tubos de vidrio estériles con 4 mL de YT2X cada uno, a los que se les agregó 4 μ L de Higromicina (50 mg/mL), 2 μ L de Kanamicina (100 mg/mL) y 2 μ L de cloranfenicol (50 mg/mL). Se incubó a 37°C por una noche.

Los precultivos fueron centrifugados y lavados dos veces con YT2X en tubos de vidrio estériles con el rotor JA-20 durante 10 minutos a 3500 rpm con temperatura de 4 °C. Fueron decantados y agitados en vortex entre cada lavado y finalmente se resuspendieron en 600 µL de YT2X.

Se vertió 20 mL de medio MS agar sobre 4 cajas de Petri para cultivar las siguientes cepas puras: *S. lividans* silvestre 1326, *S. coelicolor* silvestre M145, *E. coli*+pMS81, *E. coli*+pB404, *S. lividans*+pIJ6902sco5330-TagC y *S. lividans*+pIJ6902sco5330-TagN. Asimismo, se vertió medio MS agar en otras 10 cajas para conjugar las células de *E. coli* precultivadas previamente, las conjugaciones se realizaron de la siguiente manera:

ET12567/pUZ8002 con pMS81 (50 µL células) + *S. coelicolor* M145 (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pMS81 (50 µL células) + *S. lividans* 1326 (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pB404 (50 µL células) + *S. coelicolor* M145 (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pB404 (50 µL células) + *S. lividans* 1326 (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pMS81 (50 µL células) + *S. lividans* con pIJ6902+sco5330TagN (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pMS81 (50 µL células) + *S. lividans* con pIJ6902+sco5330TagC (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pB404 (50 µL células) + *S. lividans* con pIJ6902+sco5330TagN (100 µL de esporas).

ET12567/pUZ8002 con pB404 (50 µL células) + *S. lividans* con pIJ6902+sco5330TagC (100 µL de esporas).

Se incubaron a 30 °C. Un día después se aplicaron los siguientes tratamientos:

- Sin tratamiento de antibiótico a controles silvestres: M145 y 1326;
- ácido nalidíxico e higromicina (NH) a las conjugaciones para introducir pMS81 y pB404 a *S. coelicolor* M145 y *S. lividans* 1326.,
- ácido nalidíxico, higromicina y apramicina (NHA) a las conjugaciones para pMS81 y pB404 a las cepas de *S. lividans* con pIJ6902+sco5330TagN y pIJ6902+sco5330TagC.

Se continuó la incubación a 30°C durante 6 días más y se observaron los resultados.

La figura 12 resume el procedimiento experimental utilizado en este trabajo.



Figura 12.- Diagrama que resume el procedimiento realizado en este trabajo.

Resultados y Discusión.

Expresión y detección de la proteína Sco5330 etiquetada con Strep-tag II.

Con la finalidad de observar si la etiqueta Strep-tag II es funcional para marcar proteínas en *Streptomyces* se realizaron cultivos de *S. lividans* con los plásmidos pIJ6902-sco5330 TagN y pIJ6902-sco5330 TagC. Para esto se inocularon matraces con medio LB + sacarosa 25% + apramicina 50µg/mL con esporas a una densidad óptica a 450 nm de 0.1. A las 16 h cada cultivo se dividió en dos matraces, y a uno de ellos se le añadió tioestreptón para inducir la expresión de la proteína. Se dejaron crecer 24 horas más, y posteriormente se centrifugaron para cosechar el micelio, el cual fue resuspendido en buffer A y congelado a -20°C. Posteriormente el micelio se descongeló y se rompió por sonicación, para posteriormente separar por centrifugación el sobrenadante, correspondiente a la fracción soluble (S) del precipitado, correspondiente a la fracción insoluble (P).

Se corrieron las fracciones en un gel de poliacrilamida, el cual se tiñó con azul de Coomassie con el fin de demostrar la presencia de cantidades equivalentes de proteína para todas las fracciones (figura 13). En el caso de la proteína Sco5330TagN fue posible observar, mediante western-blot, la presencia de la proteína tanto en la fracción insoluble (pastilla) con inducción por tioestreptón (Ptio), como en la fracción soluble inducida (Stio) (figura 14). Es posible observar que una parte en la proteína codificada por sco5330-TagN se encontraba en la fracción insoluble, lo que pudo deberse a que el micelio no fuera lisado completamente y no necesariamente a que las proteínas hayan permanecido en cuerpos de inclusión. De cualquier manera, es evidente que la etiqueta Strep-tag II funcionó correctamente para detectar a la proteína etiquetada en la fracción soluble.

Para el caso de Sco5330TagC se pudo observar la presencia de abundantes proteínas en el gel teñido con azul de Coomassie (figura 15). Sin embargo, al realizar la prueba de western blot, ninguna de las proteínas de las fracciones resultó ser la proteína de interés (figura 14). Lo anterior indica la posible interacción de la etiqueta Strep-tag II en el plegamiento de forma tal que quede oculta y no accesible al anticuerpo empleado o bien que haya sido eliminada de la proteína por alguna proteasa intracelular. Adicionalmente pudiera ser que hubiera poca cantidad para su detección. Lo anterior muestra que la etiqueta no tiene la misma funcionalidad en la proteína al ser colocada en el extremo carboxilo terminal (C).

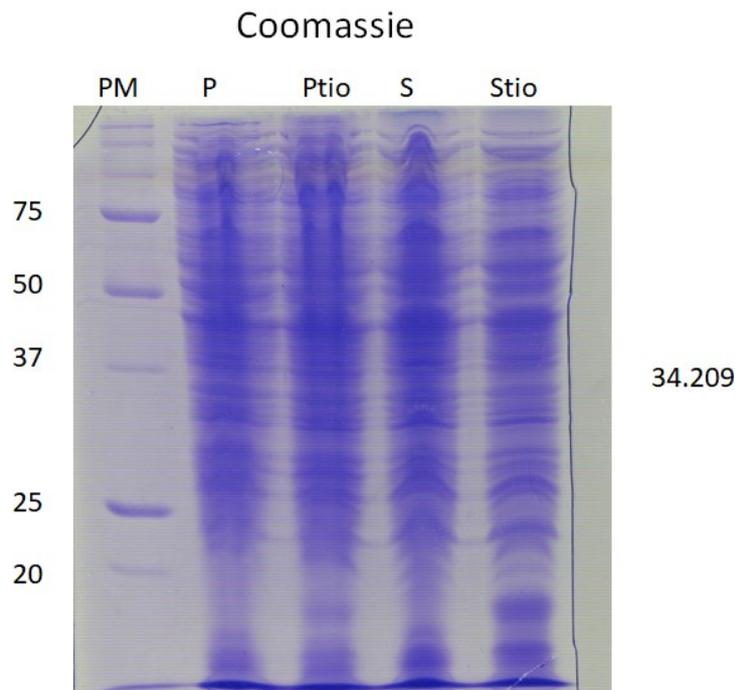


Figura 13.- **Expresión de la proteína Sco5330TagN en *S. lividans*.** Presencia de proteínas totales en la fracción soluble y la insoluble con y sin inducción. Peso: 34.209 kDa. Carriles:(Izquierda a derecha) Marcador de peso molecular (PM), fracción insoluble sin inducir (P), fracción insoluble inducida con tioestreptón (Ptio), fracción soluble sin inducir (S), fracción insoluble inducida con tioestreptón (Stio).

Expresión *S. lividans* 6902 StreptagN-Sco5330

WB Anti StrepTag

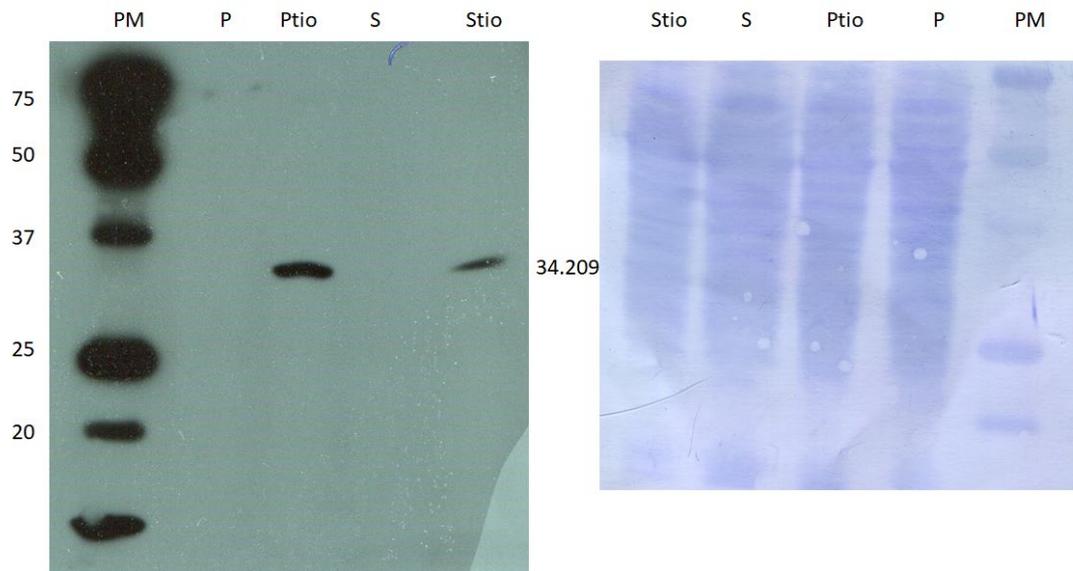


Figura 14.- **Presencia de la proteína Sco5330 en *S. lividans*.** La proteína codificada por sco5330 Tag N se detectó tanto en la porción soluble como en la insoluble al inducir con thioestrepton. Se observa mayor cantidad en la fracción insoluble debido a que se concentró 10 veces más.

Coomassie

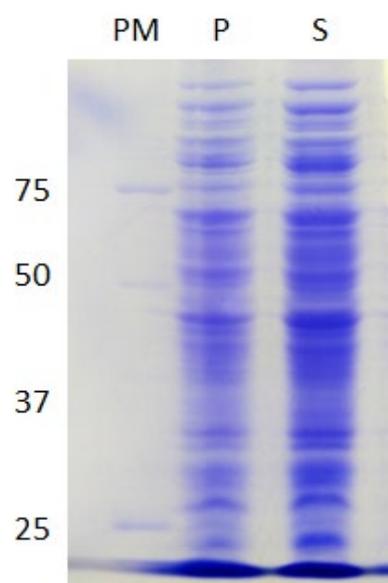


Figura 15: **Expresión de la proteína Sco5330 Tag C en *S. lividans*.** Presencia de proteínas totales en la fracción soluble e insoluble, ambas sin inducción. Carriles: (izquierda a derecha) marcador de peso molecular (PM), fracción insoluble sin inducir (P), fracción soluble sin inducir (S).

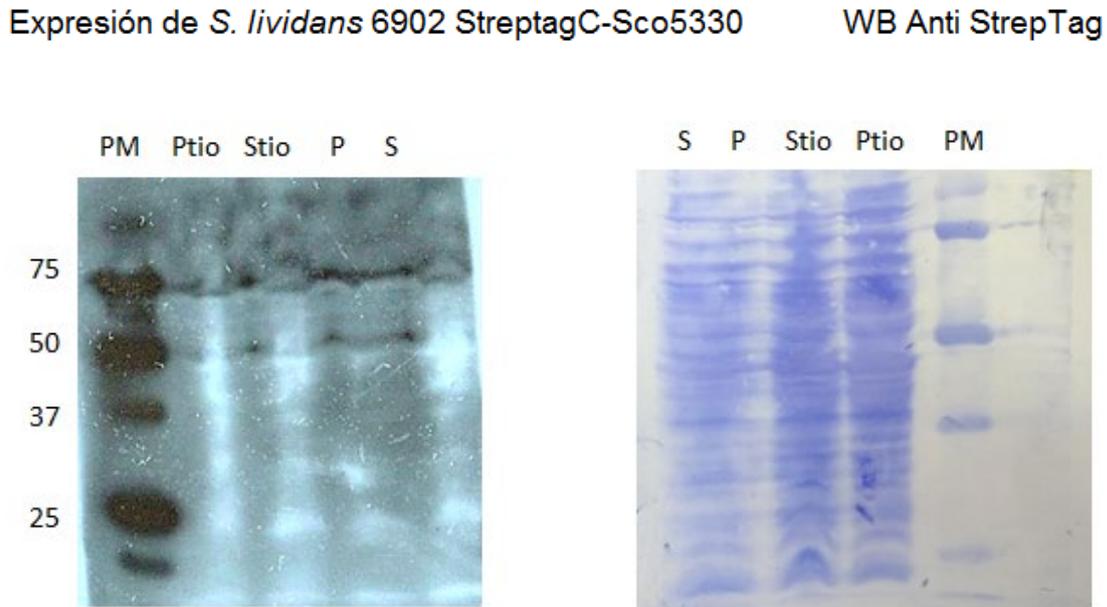


Figura 16: **No hay presencia de la proteína Sco5330 (marcadas en el carboxilo) en *S. lividans*.** La proteína codificada por sco5330 no fue detectada en ninguna de las fracciones. Se observa la presencia de otras proteínas de mayor tamaño, sin embargo, ninguna corresponde a Sco5330.

Demostración de la funcionalidad de Sco5330TagN y Sco5330TagC por incompatibilidad con la metilasa SphM.

S. coelicolor tiene un sistema de restricción de DNA metilado, del cual forma parte la nucleasa Sco5330. Sabemos que esta nucleasa es incompatible con metilasas de adeninas, como la metilasa SphM. Una forma de determinar si la etiqueta no afecta la funcionalidad de la proteína Sco5330 es introducir el plásmido que la codifica en cepas que expresen una metilasa como SphM. La expresión de la metilasa SphM debe ser incompatible con la expresión de la nucleasa Sco5330, por lo que una reducción o falta de exconjugantes es una evidencia de la funcionalidad de la proteína etiquetada.

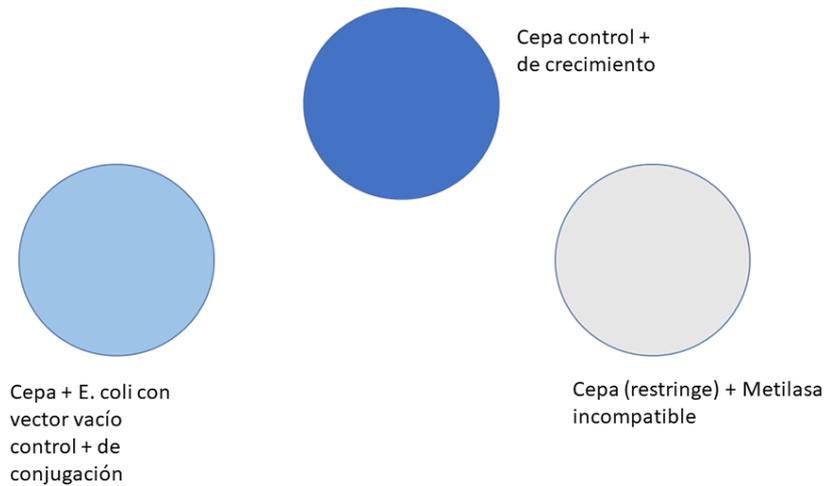


Figura 17. Se muestra el procedimiento general para demostrar la funcionalidad de la nucleasa Sco5330 etiquetada con Strep-tag II, mediante ensayos de conjugación que introduce un plásmido codificante de una nucleasa incompatible. Elaboración propia.

Para realizar estas pruebas, se hicieron tres placas por cepa. La primera es un control de la viabilidad de las esporas y crecimiento de cada cepa. La segunda es una placa de conjugación de *E. coli* con cada cepa, en la que se introdujo el vector pMS81 que da resistencia a higromicina). La tercera es una placa de conjugación de *E. coli* con cada cepa en la que se introdujo el plásmido pB404, que es el mismo pMS81 con el gen de la nucleasa SphM. Se espera que en estos experimentos el número de exconjugantes obtenidas con el plásmido pMS81 sea alto, pues el vector solo no debe ser incompatible con la nucleasa Sco5330. Por el otro lado, se espera que el número de exconjugantes con el plásmido pB404 sea mucho menor, en el caso de que la expresión de la nucleasa Sco5330 etiquetada sea funcional, pues la expresión de ambas enzimas es incompatible (Figura 17).

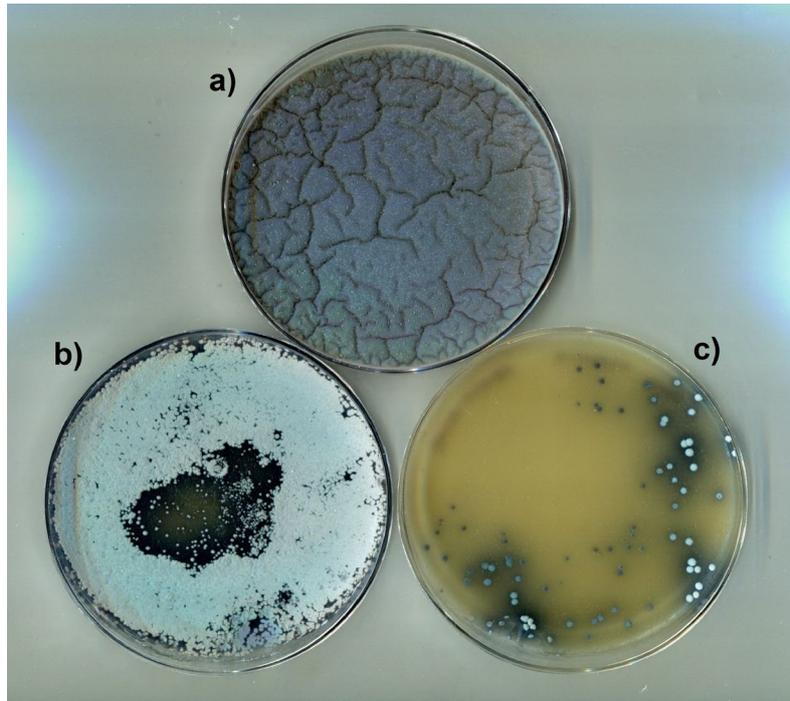


Figura 18. Conjugaciones con la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145. a) Cepa silvestre M145 de *Streptomyces coelicolor*, sin antibiótico, b) Misma cepa conjugada con *E. coli* que contiene al plásmido pMS81. c) Misma cepa conjugada con *E. coli* que contiene al plásmido pB404.

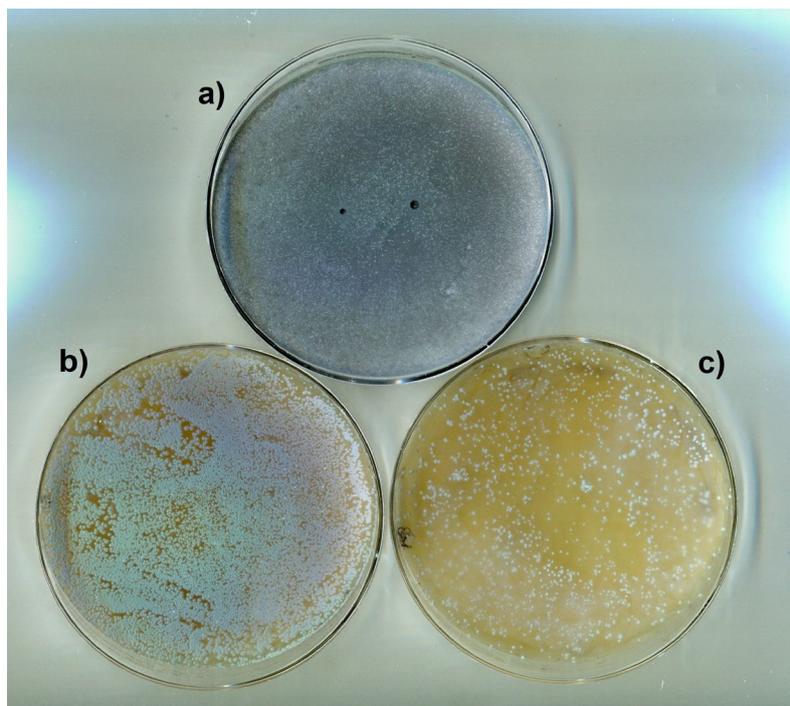


Figura 19.- Conjugaciones con la cepa silvestre de *S. lividans* 1326: a) Cepa silvestre de *S. lividans* 1326, sin antibiótico b) Misma cepa conjugada con *E. coli* pMS81, se usaron los antibióticos higromicina y ácido nalidíxico c) Misma cepa conjugada con *E. coli* pB404.

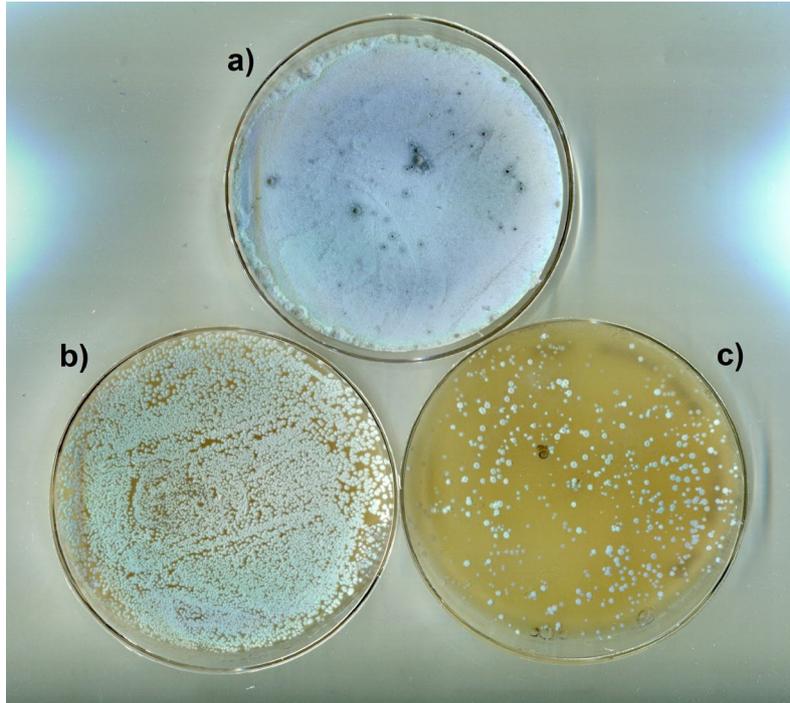


Figura 20.- Conjugaciones con *S. lividans*+pIJ6902sco5330TagN: a) Cepa de *S. lividans* con el pIJ6902+sco5330Tag N, se observa que las células fueron viables. b) Misma cepa conjugada con *E.coli* pMS81, c) Misma cepa conjugada con *E. coli* pB404.

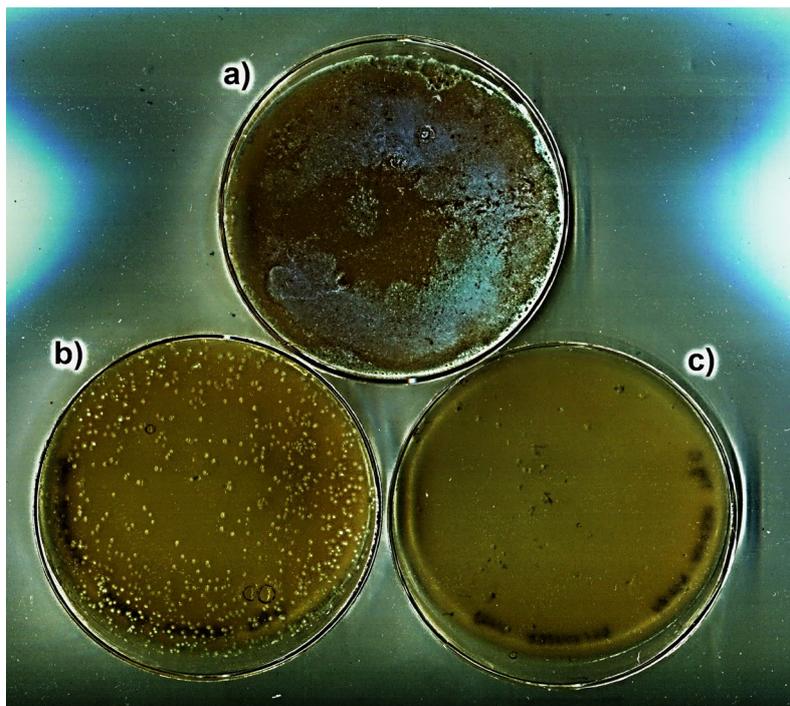


Figura 21.- Conjugaciones con *S. lividans*+pIJ6902sco5330TagC: a) Cepa de *S. lividans* con pIJ6902+sco5330TagC, b) Misma cepa conjugada con *E.coli* pMS81, c) Misma cepa conjugada con *E. coli* pB404.

Se comprobó la viabilidad de las esporas al realizar los controles de los cultivos de las cepas silvestres (Figuras 18a y 19a), ya que se obtuvo crecimiento confluyente. Las pruebas realizadas para 1326 y M145 con pMS81 tuvieron el objetivo de asegurar la introducción por conjugación del vector vacío pMS81, ya que se observó la resistencia al antibiótico higromicina (figuras 18b y 19b), el ácido nalidíxico fue usado para detener el crecimiento de *E. coli*. Las pruebas realizadas para 1326 y M145 con pB404 (SphM) tuvieron el objetivo de asegurar funcionamiento y la introducción por conjugación de la metilasa SphM clonada en el plásmido pB404. Se observó el crecimiento en la cepa 1326 de *S. lividans* (Figura 19c) a diferencia de lo que ocurre con la cepa M145 de *S. coelicolor* que contiene en su cromosoma al gen *sco5330* que es incompatible con la metilasa (Figura 18c). Es posible observar que, aunque hay un alto número de colonias exconjugantes para el plásmido pB404, éste es menor al obtenido con el vector vacío pMS81. Esto pudiera deberse a que la compatibilidad con la metilasa no sea completa, o bien a que el plásmido pB404 se transfiera con menor eficiencia por conjugación de *E. coli* a *Streptomyces*. A pesar de esto es posible observar que el efecto de incompatibilidad con la metilasa SphM clonada en el pB404 es mucho más evidente para el caso de *S. coelicolor*, que tiene el gen *sco5330* en su cromosoma, que para *S. lividans* que no lo tiene (comparar Figuras 18c y 19c).

Se realizaron conjugaciones para introducir el vector pIJ6902 que contenía *sco5330* con la etiqueta Strep-tag II en los extremos amino ó carboxilo (TagN y TagC). Se seleccionaron las colonias exconjugantes con apramicina (resistencia otorgada por el vector pIJ6902) y estas cepas se utilizaron como receptoras para probar la incompatibilidad con la metilasa SphM. Los controles de crecimiento de estas cepas se pueden observar en las Figuras 20a y 21a. Se realizaron conjugaciones para introducir el vector pMS81 vacío a las cepas que contenían pIJ6902-*sco5330*TagN y pIJ6902-*sco5330*TagC seleccionando las colonias exconjugantes con los antibióticos higromicina (resistencia otorgada por el vector pMS81), apramicina (resistencia otorgada por el vector pIJ6902) y ácido nalidíxico para detener el crecimiento de *E. coli* (Figuras 20b y 21b). Es posible observar en ambos casos un número menor de exconjugantes, probablemente debido a que la presencia del gen *sco5330* reduce el crecimiento de *S. lividans* 1326. Sin embargo, es evidente que sí es posible la introducción del pMS81 a ambas cepas.

Para probar la funcionalidad de *Sco5330* con la etiqueta Strep-tag II en el amino ó en el carboxilo (TagN o TagC), se realizaron pruebas de incompatibilidad al introducir por conjugación a estas cepas el plásmido pB404 que lleva la metilasa SphM, esperando que la expresión de *sco5330* TagN ó TagC sea letal al tratar de introducir la metilasa SphM. En la figura 20c, se observó que con *Sco5330* TagN se obtuvo un número de colonias mucho menor

que con el vector pMS81, por lo que sí hay incompatibilidad, lo que permite concluir que la etiqueta Strep-tag II en el extremo amino de la proteína no interfirió con su funcionalidad. Sin embargo, el número de colonias transconjugantes obtenidas fue mayor al esperado, ya que de haber incompatibilidad completa no se habrían obtenido colonias. En el caso de *S. lividans* con el plásmido pIJ6902-sco5330Tag C (Figura 21c) se observó un número de colonias solo ligeramente reducido respecto a la conjugación con el vector vacío. Esto parece indicar que la etiqueta Strep-tag II en el extremo carboxilo de la nucleasa Sco5330 pudiera interferir con su función, reduciendo su incompatibilidad con la metilasa SphM.

En resumen, en este trabajo se tuvo evidencia experimental de que la etiqueta Strep-tag II puede ser funcional en *Streptomyces*, pero no en todas las condiciones. En el caso de la nucleasa Sco5330 la etiqueta colocada en el extremo amino de la proteína permitió la detección de la misma mediante western blot, y la enzima pareció no ser alterada en su función por la etiqueta. Sin embargo, la etiqueta colocada en el extremo carboxilo terminal no permitió la detección de la proteína y pareció interferir con su función. Es importante mencionar que debido a la pandemia de Covid-19 no se pudieron realizar confirmaciones de los experimentos mostrados anteriormente, en particular en lo concerniente a la funcionalidad de la nucleasa Sco5330 etiquetada.

Conclusiones.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal analizar el comportamiento de la etiqueta molecular Strep-tag II para la detección de proteínas en *Streptomyces*, utilizando como modelo la nucleasa intracelular codificada en el gen *sco5330*.

La etiqueta Strep-tag II fusionada a la nucleasa Sco5330 fue proteolíticamente estable y no interfirió con el plegamiento de la proteína, ya que los antígenos eran reactivos con anticuerpos específicos anti-Strep-tag II, pero sólo cuando esta etiqueta se colocó en el extremo amino terminal (N).

Por el contrario, los resultados mostraron que la etiqueta Strep-tag II colocada en el extremo carboxilo terminal de la nucleasa Sco5330 no permitieron su detección mediante Western-blot y aparentemente alteraron la funcionalidad de la enzima etiquetada.

Perspectivas.

Se puede realizar la fusión de la etiqueta en una proteína extracelular para conocer si en este tipo de proteínas hay interacción de la etiqueta Strep-tag II

Determinación de la actividad de la nucleasa Sco5330 con la etiqueta Strep-tag II en ambos extremos de la proteína (TagN y TagC) para observar su actividad directamente y no mediante un ensayo de incompatibilidad, el cual puede tener muchas interferencias.

Literatura citada.

1. Anné J. y Van Mellaert L. (1993). *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. FEMS Microbiol Lett.114(2):121–8
2. Bentley S.D. *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, Vol. 417, 141–147
3. Bieganowski P., Shilinski K., Nk Tsiolis P. y Brenner C. (2004). Cdc123 and Checkpoint Forkhead Associated with RING Proteins Control the Cell Cycle by Controlling eIF2 γ Abundance. Journal of Biological Chemistry. Volume 279, Issue 43, 22: 44656-44666.
4. Butler M. J. *et al.* (1996). Cloning and analysis of a gene from *Streptomyces lividans* 66 encoding a novel secreted protease exhibiting homology to subtilisin BPN'. Appl Microbiol Biotechnol 1996 Mar;45(1-2):141-7.
5. Cadena M. (2014). La expresión de la metiltransferasa Dam de *Escherichia coli* es letal en *Streptomyces coelicolor* y se debe a la presencia de una nucleasa adquirida por transferencia horizontal. Universidad Nacional Autónoma de México - Instituto de Investigaciones Biomédicas.
6. Divjot Kour, Kusam Lata Rana, Sapna Thakur, Sushma Sharma, Neelam Yadav, Ali A. Rastegari, Ajar Nath Yadav y Anil Kumar Saxena (2019). Chapter 3 - Disruption of Protease Genes in Microbes for Production of Heterologous Proteins. Editor(es): Harikesh Bahadur Singh, Vijai Kumar Gupta, Sudisha Jogaiah. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Elsevier, 35-75
7. DNAMan - Bioinformatics Solutions. Ver 8,1. Lynnon Biosoft. 2018

8. González-Cerón G., Miranda-Olivares O. J. y Servín-González L. (2009). Characterization of the methyl specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS Microbiol Lett.* Vol. 301(1): 35-43
9. Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. y Hanahan, F. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4645-4649.
10. Gregory M., Till R. y Smith M. (2003). Integration Site for *Streptomyces* Phage BT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *Journal of bacteriology*, p. 5320–5323.
11. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Ward, J.M., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P. y Schrempf, H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK.
12. Huang J, et al., (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(5): 1276-1287.
13. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ y Tan S (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 41:98–105
14. MacNeil (1992). Vectors for generating nested deletions and facilitating subcloning G+V-rich DNA between *Escherichia coli* and *Streptomyces* sp. *Gene*.
15. MacNeil DJ, Gewain KM, Occi JL, Foor F. (1992). Vectors for generating nested deletions and facilitating subcloning G+C-rich DNA between *Escherichia coli* and *Streptomyces* sp. *Gene.* 119(1):149-50.
16. Murakami T, Holt TG. y Thompson CJ (1989) Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 171: 1459–1466.
17. Nakashima N., Mitani Y. y Tamura T. (2005). Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories* 4:7
18. Norrander J, Kempe T, Messing J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene.* 26(1):101-6.
19. Palacios-Adalid A. (2016). Funcionalidad del elemento integrativo-conjugativo AICE5349 de *streptomyces coelicolor*. Universidad Nacional Autónoma de México.
20. Palacios-Adalid, A. (2016). Funcionalidad del elemento integrativo-conjugativo AICE5349 de *Streptomyces coelicolor*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 68 pp.
21. Pimienta E. y Vallín C. (2005). Utilización de *Streptomyces* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36, No. 2.
22. Rédei, G. P. (2008). *Streptomyces*. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. Springer, Dordrecht.
23. Rosenberg I.M. (1996) *Recombinant Protein Techniques. Protein Analysis and Purification*. Birkhäuser, Boston, MA
24. Sassenfeld, H.M. (1990). *Trends Biotechnol.*, (8) 88.

25. Schmidt T. y Skerra A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Engineering* Vol 6 no 1: 109-122.
26. Schmidt T. y Skerra A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the “Strep tag” and immobilized recombinant core streptavidin. *Journal of Chromatography* 676. 337-345.
27. Schmidt T. y Skerra A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols*. Vol.2 No. 6. 1528-1535.
28. Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 523–533.
29. Tremblay D. *et al.* (2002). High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Can J Microbiol.* 48(1):43-8
30. Wang J, Wang C. Song K. y Wen J. (2017). Metabolic network model guided engineering ethylmalonyl-CoA pathway to improve ascomycin production in *Streptomyces hygroscopicus* var *ascomyceticus*. *Microbial Cell Fact.*16(1):169

Anexos.

Purificación de fragmentos de DNA mediante agarosa de bajo punto de fusión (LMP).

1. Preparar un gel al 0.6% con TBE 1X. Se deja gelificar a 4°C por 30 minutos.
2. El gel se corre a un voltaje constante de 11 V durante toda la noche.
3. Al otro día, se tiñe con bromuro de etidio (10µg/mL). Se corta la banda usando la lámpara UV de baja intensidad y se coloca en un tubo nuevo.
4. Fundir a 70°C por 10 minutos.
5. Agregar 1/10 del volumen de NaCl 5M, se mezcla y se deja otros 5 minutos a 70°C.
6. Se prepara fenol saturado mezclando 100 µL de NaCl 5M, 400 µL de agua y 500 µL de fenol se agita en vórtex y se centrifuga 1 minuto a 13200 rpm. Se retira fase acuosa. El fenol saturado entonces se agrega a la agarosa fundida, 2/3 de su volumen. Se mezcla con ayuda del vórtex y se centrifuga 5 minutos a 14,000 rpm.
7. La fase acuosa se pasa a otro tubo. Posteriormente, se agrega 1 volumen de fenol/cloroformo, se agita y se centrifuga por 3 minutos a 13200 rpm.
8. Se pasa la fase acuosa a otro tubo y se añade 1 volumen de cloroformo. Mezclar y centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
9. La fase acuosa se pasa a otro tubo y se le agrega 1µl de glucógeno y 1 volumen de isopropanol. Se mezcla y se deja precipitar a -20°C por al menos 2 horas.
10. Pasadas las 2 horas se centrifuga 10 minutos a 14,000 rpm, se retira absolutamente todo el sobrenadante.
11. La pastilla se resuspende en 10 µL de TE 10 mM.

Reacción de ligación.

1. En un microtubo se agrega: 1 µL de amortiguador de ligasa T4 10X, vector (dependiendo de la concentración), inserto (dependiendo de la concentración), 1 µL de ligasa T4 HC, la cantidad de agua estéril desionizada necesaria para llevar a 10 µL de volumen final.
2. Se agita un poco y se da un pulso en la centrifuga.
3. Se deja toda la noche a temperatura ambiente.
4. Para transformar en *Streptomyces*, simplemente se utiliza la cantidad necesaria como lo indique el protocolo.

5. Para transformar en *E. coli*, al siguiente día se precipita agregando al mismo tubo de la ligación 1 μL de glucógeno, 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 1 volumen de isopropanol.
6. Se deja a -20°C , 2 horas.
7. Se centrifuga 10 minutos a 14,000 rpm. Se retira el sobrenadante.
8. La pastilla se seca 5 minutos a 50°C en un baño seco y se resuspende en la cantidad necesaria de agua estéril desionizada (5-10 μL).
9. Se transforma como lo indica el protocolo de electroporación en *E. coli*.

Precipitación de ligación.

(Este paso puede hacerse durante los lavados de la preparación de células de *E. coli* transformables).

1. Centrifugar el DNA (Precipitación de ligación) a 14,000 rpm por 10 minutos. Retirar el sobrenadante.
2. Agregar 10 μL de etanol 70% (para retirar sales)
3. Retirar el etanol sin llevarse la pastilla.
4. Dejar secar en baño caliente
5. Agregar 5 μL de agua miliQ destilada estéril y resuspender.

Transformación por medio de electroporación en *Escherichia coli*.

1. Para preparar las células de *E. coli* transformables por electroporación se crece un precultivo de la respectiva cepa en un tubo de ensayo estéril con 3 mL de medio YT2X y, de ser necesario, con los respectivos antibióticos durante toda la noche a 37°C .
2. Al día siguiente, se toman 0.3 mL del precultivo para inocular un matraz Erlenmeyer con 20 mL de medio YT2X y, de ser necesario, con los respectivos antibióticos. Se deja crecer hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.6.
3. Centrifugar en un tubo estéril durante 5 minutos a 7000 rpm a 4°C para recuperar las células.
4. Se descarta el sobrenadante y utilizar el vórtex para deshacer la pastilla, las células se lavan con 10 mL de agua miliQ estéril.
5. Se repiten 2 lavados más, iguales al paso 3 y 4. Se debe decantar rápidamente para evitar la pérdida de células entre cada lavado.
6. En el último lavado la pequeña cantidad de agua restante que se encuentra dentro del tubo se utiliza para resuspender las células. Mantener en hielo.

7. Para transformar se toma una alícuota de 80 μL . El resto se puede almacenar en alícuotas de 50 μL en microtubos con 50 μL de glicerol y se guardan a -70°C hasta su posterior uso.
8. A la alícuota de células se le agrega la cantidad de DNA necesario (precipitación de ligación), se agita y se pasa a una celda para electroporación Biolabs, previamente enfriada en hielo.
9. Se da un pulso con el programa Ec1 previamente establecido en el electroporador Biolabs. Debe observarse la leyenda "PSL" en la pantalla, no "ARC".
10. Después, se agrega 1 mL de medio YT2X a la celda y las células se pasan a un tubo de ensayo estéril para incubar a 37°C durante 1 hora con agitación de 200 rpm.
11. Tras la recuperación de las células, éstas se pasan a un microtubo estéril y se centrifugan a 6000 rpm por 10 minutos.
12. Se descarta el sobrenadante y el botón de células se resuspende en 0.3 mL de medio YT2X.
13. Hacer diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y se plaquean en cajas de LB más los respectivos antibióticos (de resistencia del plásmido).

Protocolo para preparaciones de DNA de plásmido a pequeña escala (Miniprep).

Solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%.

1400 μL de agua destilada

400 μL de NaOH 1N

200 μL de SDS 10%

1. Colocar 1.5 mL de cultivo a cada tubo etiquetado, centrifugar 5 minutos a 5000 rpm, eliminar el sobrenadante y dispersar en vórtex
2. Resuspender en 100 μL de Tris 25 mM, EDTA 25 mM y pH=8
3. Añadir 200 μL de solución fresca NaOH 0.2 N, SDS 1%
4. Mezclar por inversión vigorosa (hasta que se forme una solución transparente, homogénea y viscosa).
5. Reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 150 μL de acetato de potasio 3 M.
7. Mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco.
8. Incubar 15 minutos o más a temperatura ambiente.
9. Añadir al tubo 400 μL de fenol cloroformo, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos.
10. Pasar la fase acuosa a otro microtubo.

11. Añadir 1 mL de etanol absoluto frío para precipitar.
12. Mezclar bien invirtiendo los tubos varias veces y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm, retirar el sobrenadante
14. Dar un pulso para bajar el remanente y retirarlo
15. Disolver bien la pastilla en 50 μ L de TE 10 mM (Tris 10mM, EDTA 0.1 mM, pH=8) en baño caliente y añadir 150 μ L de acetato de sodio 4M, pH=6.
16. Mezclar e incubar 1 hr a -20°C
17. Centrifugar 5 minutos, pasar el sobrenadante a un microtubo limpio y añadir 200 μ L de isopropanol
18. Reposar 10 minutos
19. Centrifugar 10 minutos, eliminar todo el sobrenadante.
20. Disolver en 45 μ L de TE 10 mM y añadir 5 μ L de acetato de sodio 3 M, pH=6 y 125 μ L de etanol absoluto frío.
21. Reposar 10 minutos en hielo
22. Centrifugar 10 minutos, eliminar todo el sobrenadante y secar la pastilla en baño seco a 50 °C.
23. Disolver en 25 μ L de TE 10 mM.

Protocolo para preparaciones de DNA de plásmido a mediana escala (Midiprep).

1. Centrifugar el cultivo. Eliminar el sobrenadante y dispersar bien la pastilla de células en el vórtex. Resuspender en un volumen correspondiente a 1/10 del volumen original del cultivo, en Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH=8 (p. ej. si el cultivo fue de 100 mL resuspender en 10 mL, si fue de 200 mL resuspender en 20 mL, etc.).
2. Añadir el doble de volumen de una solución fresca de NaOH 0.2N, SDS 1%. Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos, hasta que se vea transparente, homogéneo y viscoso (p.ej. si el volumen en el inciso 1 fue de 10 mL, añadir 20 mL, si el volumen en el inciso 1 fue de 20 mL añadir 40 mL, etc.)
3. Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 1.5 volúmenes de acetato de potasio 3M pH=5.0, mezclar bien por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (P. ej. si el volumen del inciso 1 fue de 10 mL añadir 15 mL, si fue de 20 mL añadir 30 mL, etc.).
5. Centrifugar 15 minutos a 10,000 rpm, y pasar el sobrenadante a otra botella o a otro tubo, tratando de llevarse la menor cantidad posible del precipitado blanco.

6. Añadir al sobrenadante fenol/cloroformo (equivalente al mismo volumen del inciso 1), agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo o botella y añadir etanol absoluto frío, correspondiente al volumen original del cultivo (o sea 10 veces el volumen usado en el inciso 1). Mezclar bien invirtiendo los tubos varias veces. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad. Retirar y eliminar todo el sobrenadante. Dar un pulso en la centrífuga para bajar todo el líquido remanente y eliminarlo con una micropipeta cuidando no tocar el pellet.
9. Disolver la pastilla en 1 mL TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH=8). Cerciorarse que la pastilla está perfectamente disuelta, y entonces añadir 3 mL de acetato de sodio 4M pH=6. Mezclar bien e incubar una hora a -20°C (en caso de que la pastilla no se disuelva completamente en 1 mL, se puede aumentar el volumen, en cuyo caso se debe aumentar el volumen de acetato de sodio 4 M en forma proporcional).
10. Centrifugar 5 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 4 mL de isopropanol.
11. Precipitar 10 minutos (en caso de que se haya aumentado el volumen en el inciso 8, aumentar el volumen de isopropanol en forma proporcional).
12. Centrifugar 10 minutos. Eliminar todo el sobrenadante. Disolver en 300 µL de TE, transferir a un microtubo, y añadir 5 µL de RNAsa A pancreática (10 mg/mL). Incubar a 37 °C durante al menos 2 horas (se puede dejar toda la noche).
13. Extraer con 300 µL de fenol/cloroformo, pasar la fase acuosa a un microtubo nuevo, añadir 30 µL de acetato de sodio 3 M, y 300 µL de isopropanol, buscando que se forme una malla de DNA precipitado (si no se forma ver inciso 12). Eliminar todo el líquido que no forme parte de la malla de DNA y posteriormente resuspender el DNA en un volumen pequeño de TE (50 µL). Repetir la precipitación un par de veces más. Centrifugar, eliminar todo el alcohol y secar el pellet. Resuspender en un volumen pequeño de TE (50 µ o 100 µl aprox, según el tamaño de la pastilla).
14. Si en el paso 11 no se forma una malla de DNA, centrifugar, resuspender en un volumen menor de TE y repetir la precipitación como en el paso 11.

Conjugación entre *E. coli* y *Streptomyces*.

Preparación del micelio.

1. Para crecer el micelio vegetativo el volumen adecuado de una preparación densa de esporas se inoculó en 30 mL de LB más sacarosa al 25% suplementado con los antibióticos necesarios.
2. Se creció a 30°C por 16 horas aproximadamente, o hasta observar parte del cultivo al microscopio y verificar la presencia de micelio.
3. Para recuperar el micelio, todo el volumen del cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos, en un rotor JA-20 y se retiró el sobrenadante.
4. Se lavó el micelio con 20 mL de sacarosa 10.3% para retirar el resto de los antibióticos.
5. El botón de micelio se resuspendió en 4 mL de medio YT2X.
6. Para dispersar y fragmentar el micelio, éste fue tratado en un homogenizador (TRI-R STIR-R Modelo K41) a una velocidad baja (nivel 4), procurando que la muestra no se calentara.
7. La muestra homogenizada se pasó a un tubo de vidrio.

Preparación de la cepa donadora.

8. Se creció un precultivo de la cepa donadora de *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contiene el plásmido a conjugar en *Streptomyces* en 3 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios a 37°C y agitación de 200 rpm, durante toda la noche.
9. Se inocularon 30 mL de medio YT2X más los antibióticos necesarios con todo el volumen del precultivo y se dejó creciendo a 37°C y agitación de 200 rpm.
10. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de entre 0.6 y 0.8, se centrifugó todo el cultivo a 6000 rpm/10 minutos/4°C en un rotor JA20 y se retiró el sobrenadante.
11. Se repitieron los pasos de centrifugación dos veces lavando con un mismo volumen de medio YT2X sin antibióticos; al final el paquete de células se resuspendió en 4-12 mL (dependiendo del número de conjugaciones a realizar) de medio YT2X sin antibióticos.

Conjugación.

12. Se agregó el mismo volumen de la cepa donadora de *E. coli* al tubo de vidrio que contiene el micelio preparado y homogenizado (paso 7).
13. Se mezclaron perfectamente y se centrifugaron por 3 minutos a 3500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 500 µL de YT2X.
14. Se hicieron diluciones de 10^{-1} y/o 10^{-2} y se plaquearon en medio MS. Se incubaron las cajas de 16 a 20 horas a 30°C. Posteriormente se agregó a cada caja 1 mL de agua estéril con los antibióticos necesarios para seleccionar las exconjugantes de *Streptomyces* el cual se repartió de manera homogénea en toda la superficie de la caja hasta absorberse completamente.
15. Las cajas se incubaron a 30°C hasta la aparición de las exconjugantes.

Preparación densa de esporas de *Streptomyces*.

1. En cajas Petri suplementadas con extracto de levadura, y con el antibiótico necesario, se inoculan con esporas de manera confluyente y se dejan incubando a 30°C por una semana o hasta ver que han esporulado perfectamente.
2. A cada caja se le agregan 5 mL de agua estéril y con un asa bacteriológica se raspa la superficie para separar las esporas del micelio.
3. Se recupera el agua y se pasa a un filtro de esporas. De ser necesario se agregan otros 5 mL de agua a la caja y se recuperan bien todas las esporas.
4. Para quedarse con lo más posible de esporas y limpiar el filtro, en el último filtrado se agregan 5 mL de agua estéril.
5. El filtrado se raciona en tubos de vidrio y se centrifuga 10 minutos a 3500 rpm.
6. Se elimina el sobrenadante y se agregan 10 mL de agua para dar un lavado. Se repite el centrifugado.
7. Se descarta el sobrenadante y las esporas se resuspenden en el volumen adecuado de glicerol 20% (0.5-1 mL) y se pasa a un pequeño vial etiquetado. El vial se puede guardar a -20°C.

Purificación de proteínas de *Streptomyces coelicolor*.

Para 20 mL de medio LB sacarosa 25% con el antibiótico correspondiente

1. Cosechar esporas usando un filtro en hielo. Centrifugar 10 minutos, 8000 rpm, 12 °C
2. Lavar 200 µL de esporas frescas y muy densas para eliminar el glicerol 20% con agua estéril.
3. Resuspender en 0.5 mL de YT2X y dar un choque térmico a 50-55 °C por 10 minutos.
4. Agregar a un matraz estéril con 10 mL de TY2X para pregerminar 6 hrs a 37 °C (que en el microscopio se vean los tubos germinales).
5. Inocular en matraces - pases de *Streptomyces*
6. Pasar a un matraz con 100 mL de medio LB sacarosa 25% con el antibiótico correspondiente (para que se lise mejor puede colocarse 5 mL de glicina 10%)
7. Ajustar a una DO_{450nm} de 0.2 para medio mínimo y 0.1 para medio rico y crecer a 30 °C.
8. Entre las 12-14 hrs inducir la expresión de la proteína con tiostreptón (5 µg/mL)
9. Parar el cultivo a las 36 hrs (DO_{450nm} de 1.3-1.7) y poner en hielo. Volver a ajustar el volumen ya que se evapora, de no hacerlo, no se empaqueta bien el micelio.
10. Centrifugar a 10,000 rpm, 10 minutos a 4 °C en tubos del rotor JA-20.

11. Dar 3 lavados a la pastilla (micelio) con Tris 20 mM pH=8.0 frío, hacerlo todo en una bandeja con hielo.
12. Congelar mínimo 1 hr a -70 °C o hasta el día siguiente.
13. Preparar buffer de lisis y agregar 5 mL a cada pastilla.

Buffer de lisis (Volumen total de 5 mL)

- 20 µL de MgCl₂ 1 M
- ¼ pastilla inhibidor de proteasas de Roche
- 40 µL de DTT 0.5 M
- 4.94 mL de Tris 20 mM pH=8
- 0.5 µL de RNAsa

14. Guardar a 4 °C
15. Si la proteína se encuentra en citoplasma, sonicar en frío, 3 pulsos, 2 minutos en frío, 3 pulsos, 2 minutos (20 pulsos o más) cuidando que no se forme espuma.
16. Centrifugar 10,000 rpm, quedarse con el sobrenadante en un tubo limpio (extracto total). Agregar 15 µL de las proteínas del extracto total y 5 µL de buffer de carga
17. Hervir 5 minutos y congelar a -70 °C una noche, después correr un gel.

Preparación de gel de Bis-acrilamida 29:1.

Colocar en matraces Erlenmeyer siguiendo el orden de arriba hacia abajo de la tabla siguiente:

	Gel separador 10 %	Gel concentrador
Agua miliQ	4 mL	1.7 mL
Buffer Tris 1.5 M pH=8.8	2.5 mL	-
Buffer Tris 0.5 M pH=6.8	-	2.5 mL
Acrilamida 29:1	3.33 mL	0.65 mL
SDS 10 %	100 ul	50 ul
Persulfato de amonio 10 %	200 ul	100 ul
TEMED	15 ul	7.5 ul

Volumen total	10 mL	5 mL
----------------------	--------------	-------------

Desgasificar con bomba durante 60 segundos antes de colocar el SDS 10%

Armar el soporte para gel SDS-PAGE

Cargar 7 mL de gel separador a la cámara, esperar a que polimerice y agregar 3 mL de etanol 70 % y vaciar el etanol. Agregar 3 mL de gel concentrador y colocar un peine.

Cargar las muestras en el gel y colocar en cámara de proteínas con un voltaje de 60-70 volts.

La mitad del gel puede destinarse a tinción Coomassie y la otra mitad a Western blot.

Western blot.

Transferencia a membrana:

1. Activar una membrana Immobilon® de PVDF del tamaño del gel en metanol.
2. Realizar un ensamblado de esta manera de abajo hacia arriba (las esponjas son remojadas en buffer de transferencia):
 Esponja
 Membrana
 Gel (marcador mirando hacia la membrana)
 Esponja
3. Y se coloca sobre una placa metálica de la cámara semiseca Transfer Cell
4. La cámara se coloca a 25 volts durante 30 minutos.
5. Una vez que las proteínas fueron transferidas del gel a la membrana, esta se sumerge 10 segundos en metanol absoluto y se deja secar 15 minutos a temperatura ambiente.

Bloqueo de membrana.

1. Preparar solución de bloqueo, 10 mL de TBS 1X + Tween 20 al 0.5% al cual se le añadirá 0.5 g de leche Svelty (5%)
2. Colocar la membrana en un recipiente, voltear la membrana dando la cara de las proteínas hacia abajo, tapar el recipiente y poner en la agitadora a 80 durante 1 hr, bloquear a temperatura ambiente.
3. Lavar 10 minutos con TBS 1X, dos veces
4. Lavar 10 minutos con TBS 1X (sin Tween 20)

5. Añadir el anticuerpo primario **Strep-Tag** en solución con TBS 1X (sin Tween-20 con leche) 5 mL (5 μ L en 5 mL, dilución 1:1000)
6. Preparar en un tubo de vidrio una solución de leche (5%)
7. Incubar a 4 °C en agitación 80 toda la noche
8. Lavar la membrana durante 5 minutos con agua destilada en agitación a temperatura ambiente.
9. Lavar 2 veces 10 minutos en agitación con TBS 1X Tween 20 al 0.05% a temperatura ambiente.
10. Lavar por 10 minutos y colocar en agitación con TBS 1X a temperatura ambiente.
11. Agregar el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón unido a peróxidasa) 5 μ L en 5 mL de TBS 1X-Tween 20 al 0.05% con leche sin grasa al 5 %.
12. Incubar en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas.
13. Lavar durante 5 minutos en agitación con agua destilada.
14. Lavar 3 veces con TBS 1X Tween 20 al 0.05% en agitación a temperatura ambiente.

Revelado de placa fotográfica por quimioluminiscencia en cuarto oscuro.

1. Colocar en la mesa una charola con la solución reveladora, otra con agua destilada y la última con solución fijadora (de izquierda a derecha en ese orden).
2. Usando una lámpara de luz roja tenue se corta una bolsa de plástico con la membrana dentro y al menos 5 cm más de cada lado. Si se requiere puede hacerse más pequeña.
3. Sellar esta bolsa y cortar una esquina a través de la cual se agrega la mezcla de la solución A (792 μ L) y B (8 μ L).
4. Sellar la esquina.
5. Cortar el papel fotográfico al tamaño de la membrana y colocar sobre ella durante 5 segundos.
6. Sumergir la placa fotográfica en la solución reveladora por 10 segundos (en oscuridad).
7. Después sumergir en la charola con agua, para lavarla y por último sumergir en la solución fijadora.