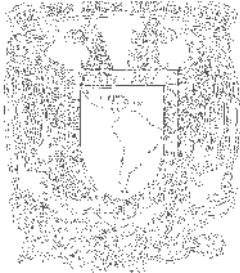


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Construcción de una proteína de fusión  
utilizando la proteína verde fluorescente y un  
tallo de histidinas.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Químico en Alimentos**

P R E S E N T A

**Ricardo Javier Pérez Gómez**



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Amanda Gálvez Mariscal
Vocal	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Prof. Romina Ma de la Paz Rodríguez Sanoja
1er. Suplente	Prof. Francisco Ruiz Terán
2do. Suplente	Prof. Jorge Aburto Anell

El trabajo de este tema fue realizado en el laboratorio de Microbiología Industrial del departamento de Biología Molecular y Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

---

Dra. Romina Rodríguez Sanoja

**Asesora**

---

Ricardo Javier Pérez Gómez

**Sustentante**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres María de la Luz Gómez y Juan Javier Pérez que me han apoyado constantemente, enseñándome a salir siempre adelante y sin su ayuda no hubiera llegado hasta aquí.

A mi tía Silvia Pérez, a mi tío Alejandro Pérez y a mi tía Gisela Gómez por sus consejos.

Francisco Rodrigo, Oscar Alejandro y Leo por ser los mejores hermanos y estar conmigo.

A mi sobrino favorito Axel Eduardo Pérez por ser tan travieso.

A mi prima Silvia Lilián Bello y a mi primo Emmanuel Pérez por compartir una etapa de mi vida.

A Rosalba Esmeralda Cedillo por su compañía, apoyo, cariño y por esa magia que existe entre nosotros.

A mi amiga Nidia M. Mariano por brindarme su amistad incondicional y aguantarme durante casi toda la carrera.

A mi amiga Paola Aguilera por su valiosa ayuda en este proyecto y lo más importante: por su amistad al hacer la vida mas amena y divertida en el lab.

A mis amigos del Laboratorio: Alba Romero, Daniel Gillén, Nayarit, Oliver Ramírez, Tania Gil y Yolanda García. MUCHAS GRACIAS POR SU AMISTAD !!!

A mis amigos de la Facultad: Aída Castañeda, Bárbara Moreno, Demetrio Morales, Fabiola Yamilé, Norma Molina, Susana Zamora y Víctor Marcelo por los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de clases.

A la M. en B. Beatriz Ruiz y la M. en C. Laura Escalante por su interés y asistencia técnica.

A la Dra. Romina Rodríguez a quien agradezco por su confianza, su paciencia, sus enseñanzas y los consejos que acertadamente fue depositando en mí.

Al Dr. Sergio Sánchez por su atención y amabilidad durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Alfonso González Noriega por su ayuda en la realización de los ensayos de fluorescencia

A CONACYT por la beca recibida del proyecto J41222-Z.

## ÍNDICE:

	Página:
Resumen	6
Lista de abreviaciones	7
Introducción	8
Justificación	9
Antecedentes	10
Genes reporteros	10
Proteína verde fluorescente	10
Tallos de purificación	11
Objetivo	13
Materiales y Métodos	15
Resultados	20
Discusión	28
Conclusiones	30
Referencias	31
Apéndices	32

## RESUMEN:

La proteína verde fluorescente utilizada en este proyecto fue la hrGFP que proviene de *Renilla reniformis*, la cual es un monómero con un peso aproximado de 30 kDa, posee un coeficiente de extinción 2.5 mayor que EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) de *Aequorea victoria*, también tiene mayor resistencia a cambios estructurales inducidos por el pH y es más resistente a solventes orgánicos, detergentes y proteasas. Adicionalmente hay datos que indican que hrGFP es menos tóxica que EGFP en algunas líneas celulares. La hrGFP posee un pico de excitación de 500 nm y un pico de emisión de 506 nm, los cuales pueden detectarse con longitudes de onda igual a los utilizados con la EGFP (Información Stratagene).

La hrGFP es una herramienta versátil en los campos de biología celular y molecular para monitorear la expresión y localización de proteínas en células eucariotas, sin embargo no existen vectores comerciales para su utilización en procariotas por lo que en este trabajo se clonó el gen de la *gfp* de *Renilla reniformis* en un vector de expresión procariota y se establecieron las condiciones de expresión y purificación de la hrGFP en *Escherichia coli* cepa XL10- Gold.

**Lista de abreviaciones utilizadas:**

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

GFP: Proteína verde fluorescente.

IPTG: Isopropil tiogalactósido.



## INTRODUCCIÓN:

En los últimos años ha tenido gran auge el uso de proteínas fluorescentes derivadas de organismos bioluminiscentes como marcadores celulares. Sin embargo el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés: Green Fluorescent Protein) de la medusa *Aequorea victoria* del Pacífico Norte y su expresión en diversos organismos (bacterias, hongos plantas y células animales), marcó un hito, ya que permitió estudiar la expresión de diversos genes, la localización de diversas proteínas, monitorear bioprocesos, realizar estudios *in situ*, etc., debido a que la GFP no requiere factores especiales de la medusa u otros sustratos para tomar su estructura terciaria fluorescente [1].

La GFP es un monómero de 27 kDa, está constituido por 238 aminoácidos que forman su estructura terciaria de barril- $\beta$  cuyo diámetro es de 24 Å con una longitud de 42 Å, este barril está formado por once láminas beta antiparalelas, en la que cada lámina está integrada por aproximadamente de 9 a 13 aminoácidos que envuelven a una  $\alpha$ -hélice, que contiene el grupo cromóforo formado por tres aminoácidos [1].

Sin embargo la *gfp* de *Aequorea victoria* se ha observado que es más tóxica que la *gfp* de *Renilla reniformis*. Esta última *gfp* ha mostrado ser más resistente a pH, temperatura, etc. (Información Stratagene). Hasta el momento no existen vectores comerciales con la *gfp* de *Renilla reniformis*, por lo que no se sabía si es posible expresarla en un organismo procarita como *E. coli*. Así se decidió probar si podía servir como reportero en dicha bacteria.

## **JUSTIFICACIÓN:**

Este trabajo proporcionó las herramientas moleculares para la utilización de la proteína verde fluorescente en el desarrollo de los proyectos del laboratorio, así mismo permitió sentar las bases metodológicas para la expresión y purificación de proteínas con tallo de histidinas dentro del mismo.

## **ANTECEDENTES:**

### **Genes reporteros**

El análisis directo de la transcripción de genes se puede realizar por diversas técnicas como por ejemplo RT-PCR o por arreglos de ADN. Estas técnicas proporcionan información confiable acerca de la transcripción *in vivo* de genes. Adicional a estas técnicas se puede analizar directamente las proteínas que codifican para el gen de interés ya sea cuantificando su actividad o por métodos inmunológicos. Sin embargo estas técnicas son demasiado tediosas para aplicarse a un gran número de muestras. Esta dificultad se resuelve utilizando genes reporteros, los cuales son fácilmente detectables [5].

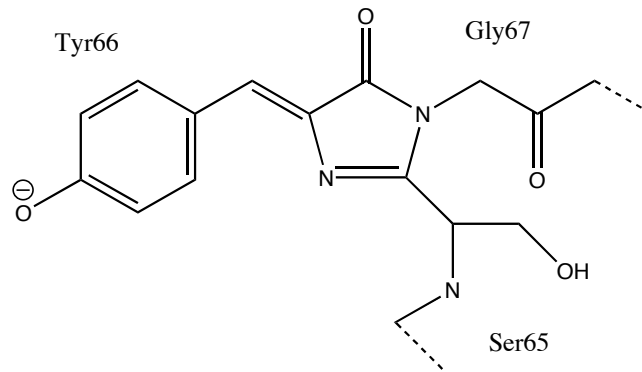
Entre los genes reporteros utilizados ampliamente se encuentran: el gen bacteriano *cat* que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa, el gen *lacZ* que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, el gen *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente, entre muchos otros [5].

### **Proteína Verde Fluorescente (GFP)**

La GFP es una herramienta versátil en los campos de biología celular y molecular para monitorear la expresión y localización de proteínas. Se han identificado varias GFP's provenientes de diversos organismos marinos, sin embargo, sólo se han caracterizado bioquímicamente las GFP's provenientes de la medusa *Aequorea victoria* y de la pluma de mar *Renilla reniformis*, que aparentemente poseen el centro del cromóforo idéntico (figura 1)[1].

La proteína verde fluorescente utilizada en este proyecto fue la hrGFP que proviene de *Renilla reniformis*, la cual es un monómero con un peso aproximado de 30 kDa, posee un coeficiente de extinción 2.5 mayor que EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) de *Aequorea victoria*, también tiene mayor resistencia a cambios estructurales inducidos por el pH y es más resistente a solventes orgánicos, detergentes y proteasas. Adicionalmente hay datos que indican que hrGFP es menos tóxica que EGFP en algunas líneas celulares. La hrGFP posee un pico de excitación de 500 nm y un pico de

emisión de 506 nm, los cuales pueden detectarse con longitudes de onda igual a los utilizados con la EGFP (Información Stratagene).



**Figura 1:** Cromóforo de la GFP, en donde intervienen los aminoácidos Ser65, Tyr 66 y Gly67.

El cromóforo de la GFP de *Aequorea victoria*, es una 4(-p-hidroxibencilideno)-imidazolil-5-ona formado por la autocatálisis de los aminoácidos 65 – 67 los cuales corresponden a la serina, tirosina y glicina, respectivamente. La demanda de O<sub>2</sub> para deshidrogenar el enlace  $\alpha$ - $\beta$  del residuo 66, implica que la proteína no puede volverse fluorescente en anaerobios obligados, lo cual limita el rango de sistemas en los que se puede expresar esta proteína. Una vez que se ha completado la maduración el O<sub>2</sub> ya no es necesario [1].

### **Tallos de purificación:**

En los últimos años la aplicación de los tallos de purificación han llegado a ser una importante herramienta para resolver numerosos problemas ligados a la producción de proteínas recombinantes. Los tallos de afinidad pueden ser definidos como secuencias de ADN que codifica para una proteína o péptido con una alta afinidad hacia un ligando específico ya sea biológico o químico, con el cual se debería purificar idealmente la proteína blanco del extracto celular en un solo paso de manera sencilla. Las características que deben tener los tallos de purificación son las siguientes:

- Tener un mínimo efecto en la estructura terciaria y en la actividad biológica de la proteína.
- Su eliminación debe ser fácil y específica para producir la proteína nativa.
- Los ensayos deben ser simples y exactos durante la purificación de la proteína recombinante.
- Aplicable a gran número de proteínas [3].

En el mercado actual hay gran variedad de tallos de purificación, por ejemplo el tallo de polihistidinas, el péptido de unión a calmodulina, el tallo de glutatión-S-transferasa, entre otros. Cada tallo de purificación posee condiciones específicas para la purificación de la proteína recombinante (tabla 1).

La elección del tallo de purificación adecuado depende de varios factores como del tipo de la proteína de interés (estabilidad e hidrofobicidad), del sistema de expresión, del costo de las matrices, de la escalabilidad del proceso, también influye si es necesario remover el tallo de purificación para obtener la proteína nativa [3].

Tallo de afinidad	Matriz	Condiciones de Elusión	Capacidad	Costo de la matriz
Poli-His	Ni <sup>2+</sup> -NTA	Imidazol 20-250 mM a bajos pH	5-10 mg/ml	\$280/ 25 ml
Péptido de unión a Calmodulina	Calmodulina	EGTA o EGTA con 1M de NaCl	2 mg/ml	\$622/ 25 ml
Glutatión-S-transferasa	Glutatión	5 – 10 mM de glutatión reducido	10 mg/ml	\$475/ 25 ml
Tallo Strep-II	Tactin-Strep (Modificación streptavidina)	2.5 mM destiobiotina	1 mg/ml	\$1,255/ 25 ml

**Tabla 1:** Matrices, condiciones de elusión, capacidad y costos diversos los tallos de afinidad (Precios en dólares. Marzo del 2008).

El tallo de purificación más comúnmente utilizado es el de polihistidinas. De acuerdo al proveedor comercial del kit de expresión y purificación los rendimientos de la proteína purificada con este tallo son a menudo mayores del 90% haciéndolo una alternativa económica favorable [4]. La purificación de proteínas por medio de éste tallo se basa en la cromatografía de afinidad por los iones metálicos inmovilizados.

**OBJETIVO GENERAL:**

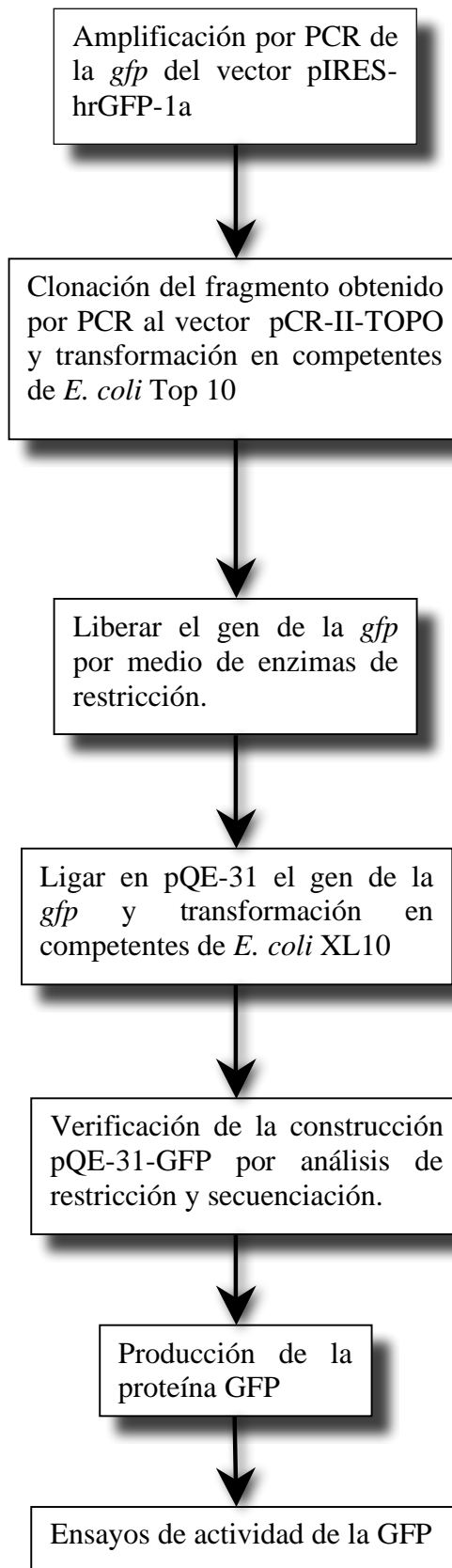
Establecer las condiciones de expresión y purificación de la proteína verde fluorescente en *Escherichia coli*.

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Clonar la proteína verde fluorescente (GFP) con un tallo de histidinas.
- Expresar la proteína verde fluorescente.
- Estandarizar las condiciones de purificación de la proteína clonada.
- Verificar la funcionalidad de la proteína 6xHis-GFP.

## METODOLOGÍA:

### Estrategia general.

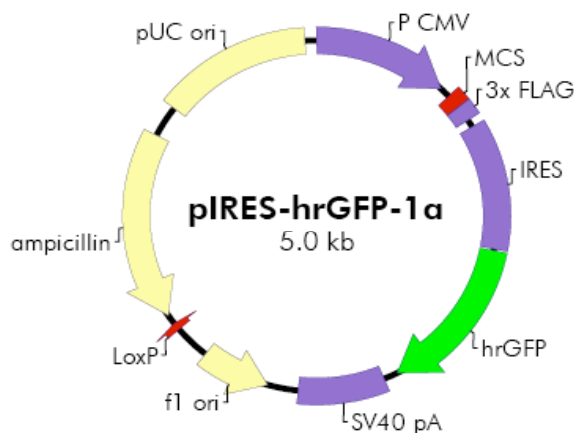


## MATERIALES Y MÉTODOS:

Las características de las cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en este proyecto se muestran en la tabla 2.

Microorganismo / Vector	Característica
<i>E. coli</i> XL10-Gold (Stratagene)	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR$ F'[proAB <i>lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tn10(TetR Amy CmR)]
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen)	F' <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\Phi 80lacZ \Delta$ M15 $\Delta lacX74$ <i>deoR recA1 araD 139</i> $\Delta(araA-leu)7697 galU galK rpsL$ <i>endA1 nupG</i>
Vector pIRES-hrGFP-1 <sup>a</sup>	Vector de expresión para mamífero que contiene la GFP de <i>Renilla reniformis</i> .
Vector pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	Vector linealizado con timina en los extremos 3', lo que permite que se ligue eficientemente fragmentos de ADN amplificados con Taq polimerasa al vector por medio de una Topoisomerasa de tipo I unida covalentemente al vector.
Vector pQE-31	Vector de expresión que contiene dos operadores del operon lac y agrega un tallo de histidinas a la proteína recombinante en el extremo N-terminal para su posterior identificación y purificación.

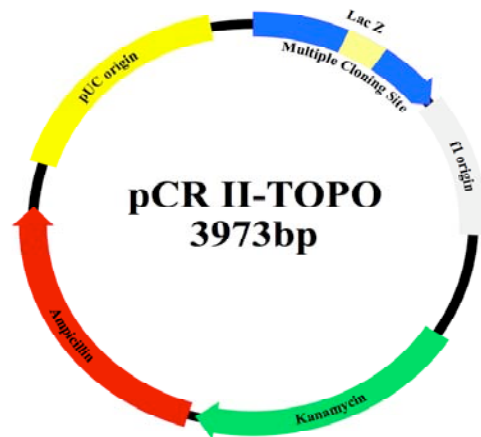
Tabla 2: Característica de microorganismos y plásmidos utilizados.



Característica	Posición de los elementos en bases
Promotor CMV	1-602
Sitio Múltiple de Clonación	651-715
Tag 3xFlag	716-787
Sitio de unión interno a ribosoma (IRES)	823-1397
ORF hrGFP	1407-2123
Origen f1 de replicación de ADN ss	2709-3015
Secuencia LoxP	3178-3211
ORF de resistencia a ampicilina	3256-4113
Origen de replicación pUC	4260-4927

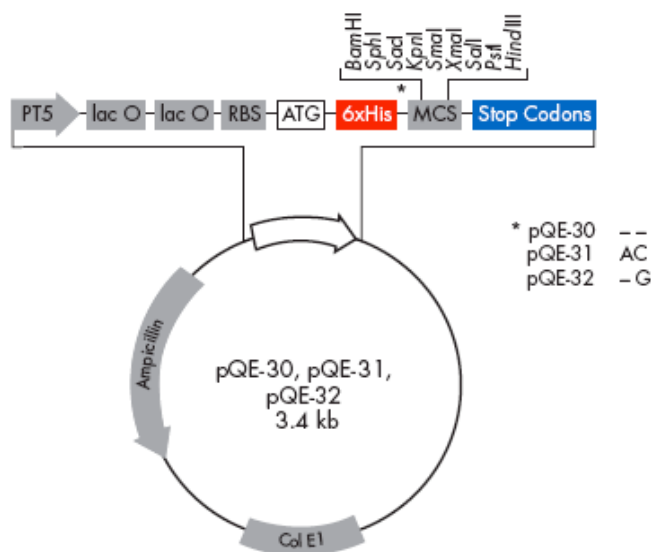
Tabla 3: Características del vector pIRES-hrGFP-1a





Característica	Posición de los elementos en bases
Tamaño del vector (bp)	3973
Gen LacZ $\alpha$ :	1-589
Promotor Sp6	269-383
Promotor T7	406-425
Origen f1	590-1027
ORF de resistencia a kanamicina	1361-2155
ORF de resistencia a ampicilina	2173-3033
Origen pUC	2178-3851

Tabla 4: Características del vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>



Característica	Posición de los elementos en bases
Tamaño del vector (bp)	3463
Promotor T5	7
Elementos del operador lac	87
Secuencia que codifica para el tallo 6xHis	127-144
Sitio múltiple de clonación	147-194
Origen de replicación ColE1	1640
ORF de resistencia a ampicilina	3258-2398

Tabla 5: Características del vector pQE-31<sup>®</sup>

## **Conservación de las cepas**

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron TOP10 (Invitrogen) para la clonación del gen de la proteína verde fluorescente, la cepa XL10-Gold (Stratagene) se utilizó para la clonación y expresión de la proteína verde fluorescente. Todos los microorganismos se conservaron en glicerol al 40% a una temperatura de -70°C.

## **Métodos utilizados para la extracción del ADN**

Las células se cultivaron en medio LB (Apéndice A.1) con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y para la obtención del plásmido se realizó la extracción siguiendo el método de lisis alcalina (Apéndice B1 y B2) [6], la visualización de los plásmidos se llevó a cabo en geles de agarosa al 0.8% (Apéndice B5).

## **Amplificación y clonación del gen hrGFP**

Se amplificó por PCR el gen que corresponde a la hrGFP presente en el vector pIRES-hrGFP-1a, los primers utilizados fueron diseñados con sitios de restricción *Bam* HI (Subrayados) y sintetizados en Sigma-Genosy (Texas, USA).

Forward: 5'-CTACGGATCCCATGGTGAGCAAGCAG-3'

Reverse: 5'-GATATGGATCCACCCACTCGTGCAGG-3'

La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 30 segundos, la temperatura de alineamiento de 55°C por 30 segundos y la de polimerización 72°C por un minuto.

El fragmento obtenido del PCR se ligó al vector pCR II-TOPO (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor y posteriormente, se transformó en células competentes de *E. coli* TOP10 por electroporación (Apéndice B.4) [6].

### **Clonación, Transformación y secuenciación**

La construcción obtenida de pCR II-TOPO-GFP se digirió con *Bam* HI, el fragmento liberado, se cortó de un gel de agarosa al 2% y se purificó mediante centrifugación en columnas de vidrio (Apéndice B.3). De manera simultánea, se digirió el vector de expresión pQE31 con *Bam* HI para formar extremos cohesivos con el gen de la *gfp*, se ligaron utilizando T4 ligasa (Promega) a 4°C durante toda la noche: La ligación se electroporó en células competentes de *E. coli* XL10 Gold. Las colonias obtenidas se seleccionaron al azar y se verificó la presencia del inserto mediante una digestión con *Bam* HI. Para determinar que tenía el inserto en sentido correcto se digirió con *Nco* I. Una de las transformantes, que mostró el perfil de restricción adecuado se le extrajo el plásmido y se purificó utilizando el "Plasmid mini kit" (Quiagen) y se envió a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM, para determinar su secuencia junto con los primers:

FORWARD: PQEIII: 5'-CGGATAACAATTTTCACACAG-3'

GFP-REVERSA: 5'- GATATGGATCCACCCACTCGTGCAGG -3'

### **Identificación de la proteína de fusión**

Se cultivó un preinóculo a 30° C durante 12 horas en medio LB más ampicilina (100 µg/ml), se inoculó al 1% en un litro del mismo medio fresco, después de 8 horas a 30° C, se indujo la expresión de la proteína GFP a una concentración 0.4 mM de IPTG, muestrándose a las 8 horas. Para su identificación se aprovechó que el vector adiciona un tallo de histidinas a la proteína, por lo que se realizó un Western-Blot (Apéndice B.7).

### **Purificación de la proteína verde fluorescente**

Se indujo la proteína verde fluorescente con IPTG 0.4 mM durante 8 horas, las células fueron cultivadas en medio LB y cosechadas (8000 rpm durante 10 minutos a 4°C), se lavaron con el buffer de unión de la columna de Ni<sup>2+</sup> (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M de NaCl y 10 mM de Imidazol); el pellet bacteriano fue almacenado a -20°C.

Para la purificación de la proteína de interés, el pellet bacteriano fue resuspendido 1/100 con respecto al volumen original en 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl y 10 mM de Imidazol con inhibidor de proteasa (SIGMA), las células se lisaron por sonicación (Apéndice B.8), se centrifugó para recuperar el sobrenadante y se filtró en una membrana de 0.45µm. El extracto celular se inyectó en el equipo de FPLC AKTA prime (Amersham) utilizando una columna de sefarosa Ni<sup>2+</sup> (HisTrap™ HP) (Apéndice 9).

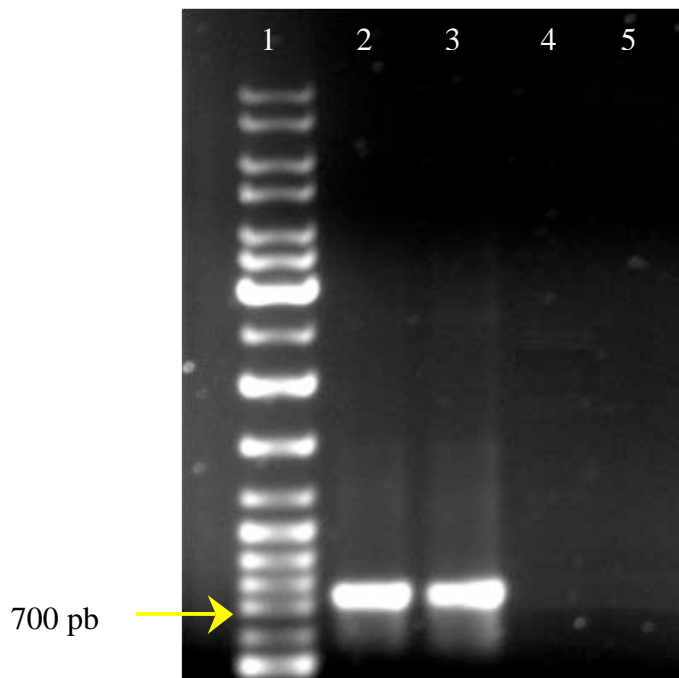
### **Actividad de la fluorescencia en células:**

Se creció un preinóculo a 30°C durante 12 horas en medio LB más ampicilina (100 µg/ml) se inoculó al 1% en el mismo medio fresco, después de 8 horas a 30°C, se indujo la expresión de la proteína verde fluorescente a las condiciones óptimas (los cultivos se protegieron de la luz todo el tiempo). Transcurrido el tiempo óptimo de inducción de la proteína se les eliminó el medio por centrifugación (8000 rpm por 5 min.) y se resuspendió el pellet en medio LB nuevo. Se colocaron 10 µl de la suspensión de células sobre un portaobjetos y se agregó el colorante DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato); sobre la suspensión de células se colocó un cubreobjeto circular, se limpió el exceso de medio y se observó la fluorescencia con ayuda de un microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX-51 utilizando un filtro FITC con una Cámara Olympus DP70 de una resolución de 10 megapíxeles.

## RESULTADOS:

### Amplificación por PCR

El gen *gfp* fue amplificado por la técnica de PCR del plásmido pIRES-hrGFP-1a. El producto de PCR fue detectado en un gel de agarosa con un peso aproximado de 730 pb (figura 2).



**Figura 2:** Gel de agarosa al 1%: Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix; Carril 2 y 3: Producto de PCR; Carril 4: Control negativo (agua); Carril 5: Control negativo: Plásmido pQE31-DFA

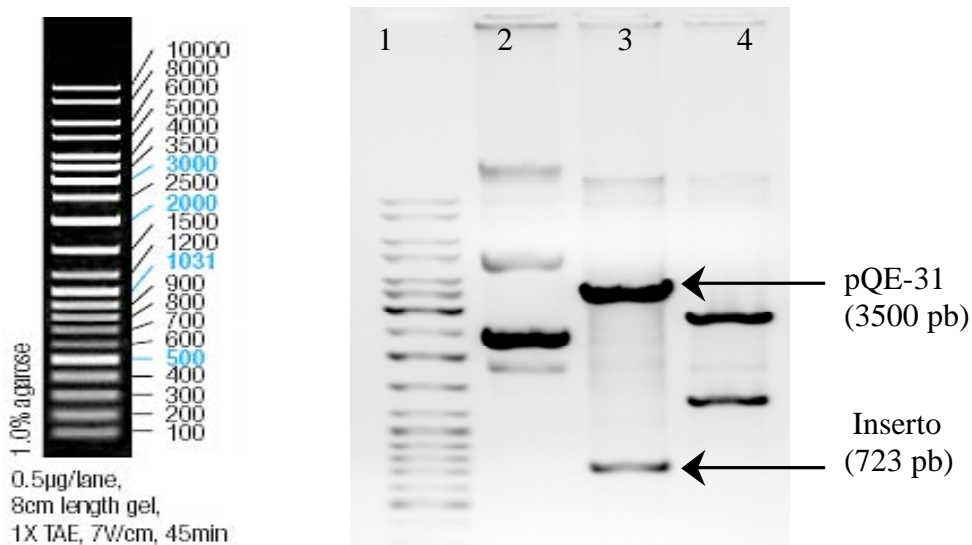
### Construcción de la proteína GFP

Una vez amplificado el gen de la *gfp* se clonó en el vector pCR-II-TOPO, el cuál está diseñado para clonar productos de PCR. Se seleccionaron colonias blancas al azar debido a que la presencia del inserto en el vector interrumpe el gen *lacZ* dando como producto colonias blancas en placas de medio LB con ampicilina, X-gal e IPTG, se eligió una colonia al azar y se le asignó el nombre de pCR-II-TOPO-GFP.

La construcción pCR-TOPO-GFP se digirió con *Bam* HI para separar el fragmento de 723 pb que corresponde a la *gfp* del resto del vector; este fragmento se cortó de gel y se purificó en columnas de fibra de vidrio.

El vector de expresión pQE31 se digirió con *Bam* HI y se ligó con el gen de la *gfp*; la reacción de ligación se electroporó en células competentes de *E. coli* XL10 Gold. Se seleccionaron al azar 4 de 90 colonias obtenidas y se verificó la

presencia del inserto mediante una digestión con *Bam* HI. Para determinar la dirección del inserto se digirió con *Nco* I. Si el inserto se encontraba en el sentido correcto se esperaba obtener fragmentos de 2751, 1337 y 97 pb. En caso de que el fragmento se haya ligado al revés los fragmentos con la digestión *Nco* I serían de 3368, 721 y 97 pb (Figura 3).



**Figura 3:** Gel de agarosa al 0.8%: Clona obtenida de la ligación del vector pQE31 y la GFP. Carril 1: Marcador de Peso Molecular GeneRuler DNA Ladder Mix; Carril 2: Clona 1 sin digerir; Carril 3: Digestión con *Bam* HI de la clona 1; Carril 4: Clona 1 digerida con *Nco* I.

### Verificación de las construcciones:

De las colonias con el inserto en el sentido correcto se mandó a secuenciar el plásmido que contiene al gen de la *gfp* para comprobar que el marco de lectura fuera el correcto. La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología de la UNAM; los primers utilizados para la secuenciación fueron:

PQEIII: 5'-CGGATAACAATTTACACAG-3' y

GFP-REVERSA: 5'- GATATGGATCCACCCACTCGTGCAGG -3'.

La secuencia de nucleótidos obtenida de la secuenciación (Figura 4) se tradujo a secuencia de aminoácidos *in silico* y se observó que el gen de la proteína GFP está en marco de lectura correcto (figura 5) por lo que al plásmido se le asignó el nombre de pQE31-GFP.

Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos desde el codón de inicio hasta el segundo sitio *Bam* HI fue sometida a un BLAST contra la base nr del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se encontró que este fragmento posee una identidad de 100% con en el gen de la *gfp* de *Renilla reniformis*.

```

ATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACTATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATA
CGGATCCCATGGTGAGCAAGCAGATCCTGAAGAACACCGGCCTGCAGGAGATCATG
AGCTTCAAGGTGAACCTGGAGGGCGTGGTGAACAACCACGTGTTCACCATGGAGGG
CTGCGGCAAGGGCAACATCCTGTTCGGCAACCAGCTGGTGCAGATCCGCGTGACCA
AGGGCGCCCCCTGCCCTTCGCCTTCGACATCCTGAGCCCCGCCTTCCAGTACGGC
AACCGCACCTTCACCAAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTCATCCAGAGCTT
CCCCGCCGGCTTCGTGTACGAGCGCACCCTGCGCTACGAGGACGGCGGCCTGGTGG
AGATCCGCAGCGACATCAACCTGATCGAGGAGATGTTCGTGTACCGCGTGGAGTAC
AAGGGCCGCAACTTCCCCAACGACGGCCCCGTGATGAAGAAGACCATCACCGGCCT
GCAGCCCAGCTTCGAGGTGGTGTACATGAACGACGGCGTGCTGGTGGGCCAGGTGA
TCCTGGTGTACCGCCTGAACAGCGGCAAGTTCTACAGCTGCCACATGCGCACCCTG
ATGAAGAGCAAGGGCGTGGTGAAGGACTTCCCCGAGTACCACTTCATCCAGCACCG
CCTGGAGAAGACCTACGTGGAGGACGGCGGCTTCGTGGAGCAGCACGAGACCGCCA
TCGCCAGCTGACCAGCCTGGGCAAGCCCCTGGGCAGCCTGCACGAGTGGGTGGAT
CCACAAGCAGCAGCAGTACAACACAGAACTAAAAGGTTTATTTTGAAAGCCTTCA
AGTTGGGGTAGTA

```

Figura 4: Secuencia nucleotídica (5' a 3') de la proteína GFP clonadas en *E. coli* cepa XL10. Las bases en negritas indican el codón de inicio; las bases subrayadas indican el tallo de histidinas; las bases con subrayado con líneas discontinuas corresponde a los sitios *Nco* I; las bases con doble subrayado corresponde a los sitios *Bam* HI que indica el principio y fin del gen de la *gfp*.

```

M R G S H H H H H H T D P M V S K Q I L K N T G L Q E I M
S F K V N L E G V V N N H V F T M E G C G K G N I L F G N
Q L V Q I R V T K G A P C P S P S T S W A P P S S T A T A
P F T K Y P E D I X D F F I Q S F P A G F V Y E R T L R Y
E D G G L V E I R S D I N L I E G M F V Y R V E Y K G R N
F P N D G P V M K K T I T G L Q P S F E V V Y M N D G V L
V G Q V I L V Y R L N S G K F Y S C H M R T L M K S K G V
V K D F P Q Y H F I Q H R L E K T Y V E D G G F V E Q H E
T A I A Q L T S L G K P L G S L H E W V

```

Figura 5: Secuencia de aminoácidos teórica de la proteína GFP: La proteína consta de 252 aminoácidos y posee un peso de 28.5 kDa. Los aminoácidos con doble subrayado indican el tallo de histidinas; los aminoácidos en negritas indican la proteína verde fluorescente.

Se identificó la proteína por Western Blot debido a que el vector de expresión fusiona a la proteína de interés un tallo de histidinas, lo que permite su identificación con un anticuerpo anti-histidinas. El complejo proteína/anti-histidinas es reconocido por un segundo anticuerpo, el  $\alpha$ -IgG que está conjugado a la fosfatasa alcalina y en presencia de su sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato "BCIP"), da lugar a una reacción colorida que se observa en la membrana como una banda (Figura 6).

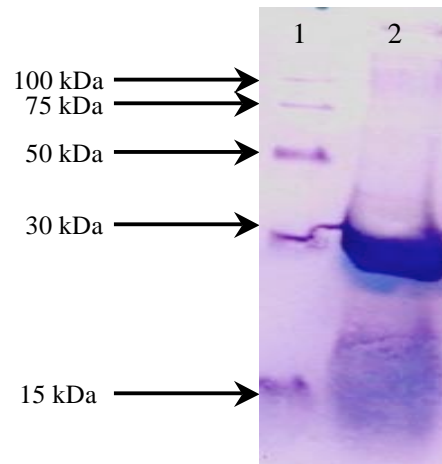


Figura 6: Western Blot: Carril 1: Marcador de Peso Molecular 6xHis Protein Ladder; Carril 2: Proteína GFP.



### Purificación de la proteína:

Para la purificación de la proteína se utilizó el equipo FPLC AKTA prime acoplado a una columna de sefarosa niquelada. En la figura 7 se muestra el cromatograma correspondiente, en la cual se inyectó el lisado de las células inducidas a un flujo de 1 ml/min. Para eluir la proteína se realizó un gradiente de imidazol de 10 mM hasta 500 mM por 60 minutos.

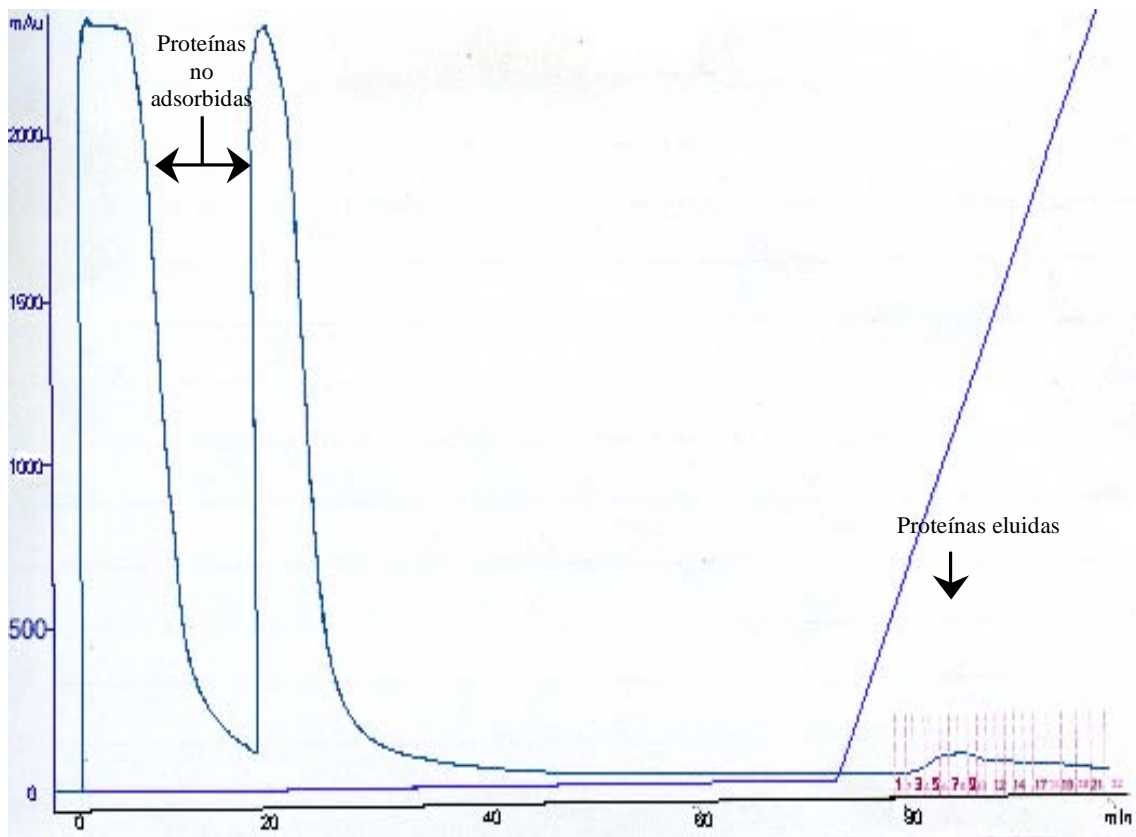


Figura 7: Cromatograma de la purificación de la proteína GFP utilizando una columna de sefarosa-Ni<sup>2+</sup>.

A partir de la fracción 5 se empieza a eluir la proteína GFP.

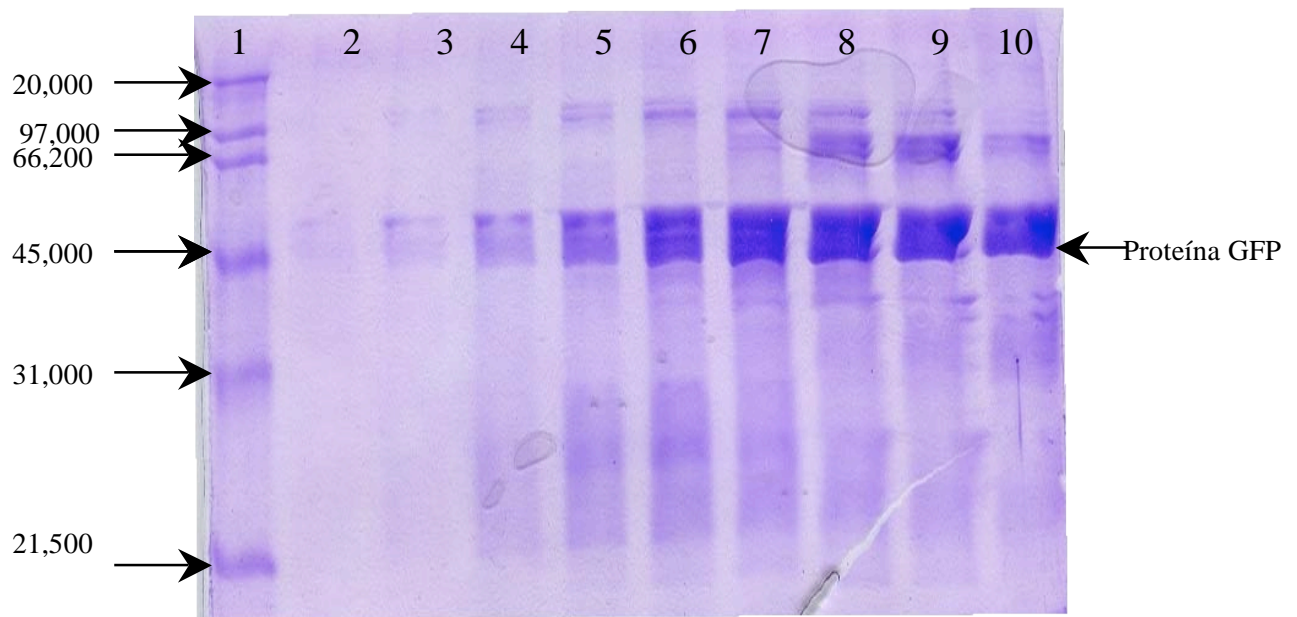


Figura 8: Análisis de la purificación por cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa. Gel SDS-PAGE al 10%. Carril 1: Marcador de Peso Molecular Broad Range; Carril 2: Fracción 1; Carril 3: Fracción 2; Carril 4: Fracción 3; Carril 5: Fracción 4; Carril 6: Fracción 5; Carril 7: Fracción 6; Carril 8: Fracción 7; Carril 9: Fracción 8; Carril 10: Fracción 9.

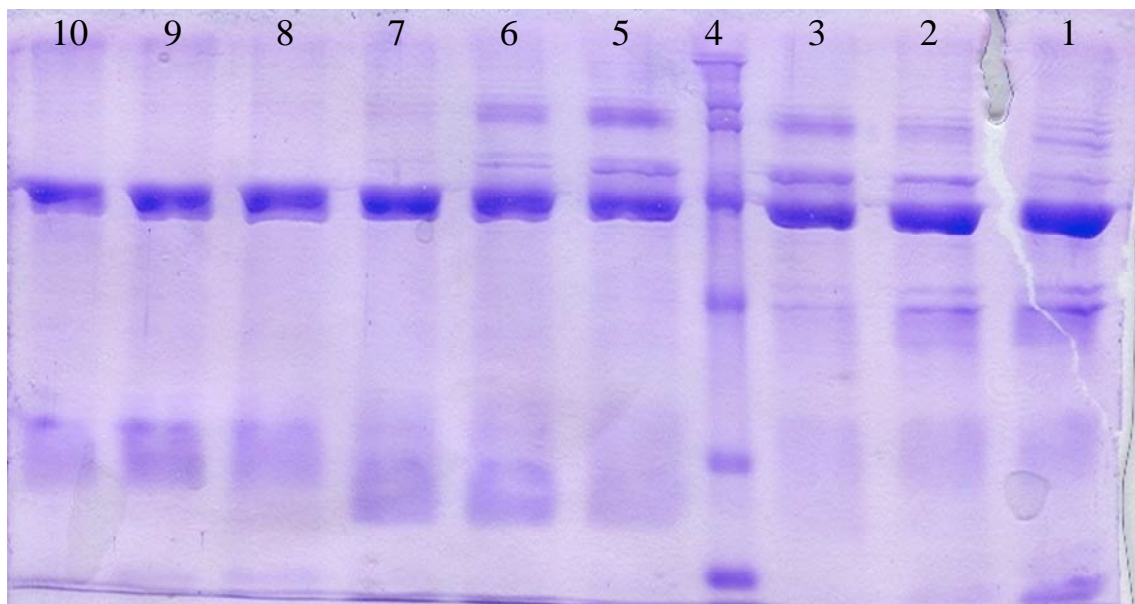


Figura 9: Análisis de la purificación por cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa. Gel SDS-PAGE al 10%. Carril 1: Fracción 10; Carril 2: Fracción 11; Carril 3: Fracción 12; Carril 4: Marcador de Peso Molecular Broad Range; Carril 5: Fracción 13; Carril 6: Fracción 14; Carril 7: Fracción 15; Carril 8: Fracción 16; Carril 9: Fracción 17; Carril 10: Fracción 18.

### Ensayos de fluorescencia:

Para determinar la integridad de la GFP se realizaron pruebas de fluorescencia, que consistieron en agregar el colorante DAPI a las células inducidas para ser localizarlas en el microscopio de fluorescencia con un brillo color azul (Figura 10).

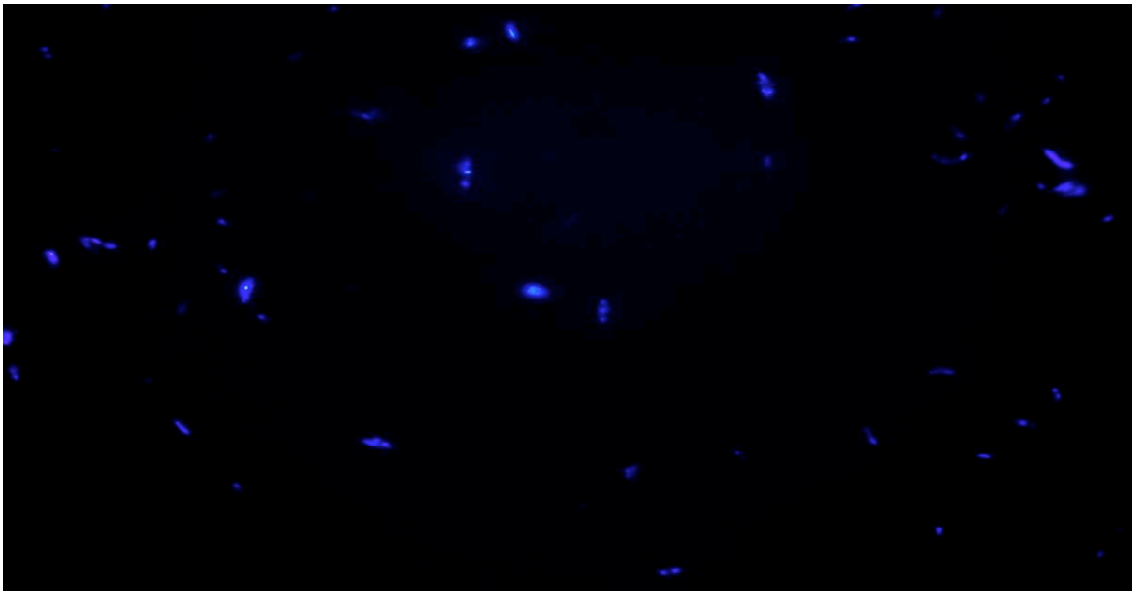


Figura 10: Micrografía de *E. coli* inducida con 0.4 mM de IPTG durante 8 horas utilizando un microscopio de fluorescencia con un filtro DAPI.

Para la visualización de la fluorescencia proveniente de la proteína verde fluorescente se utilizó un filtro FITC (Figura 11).

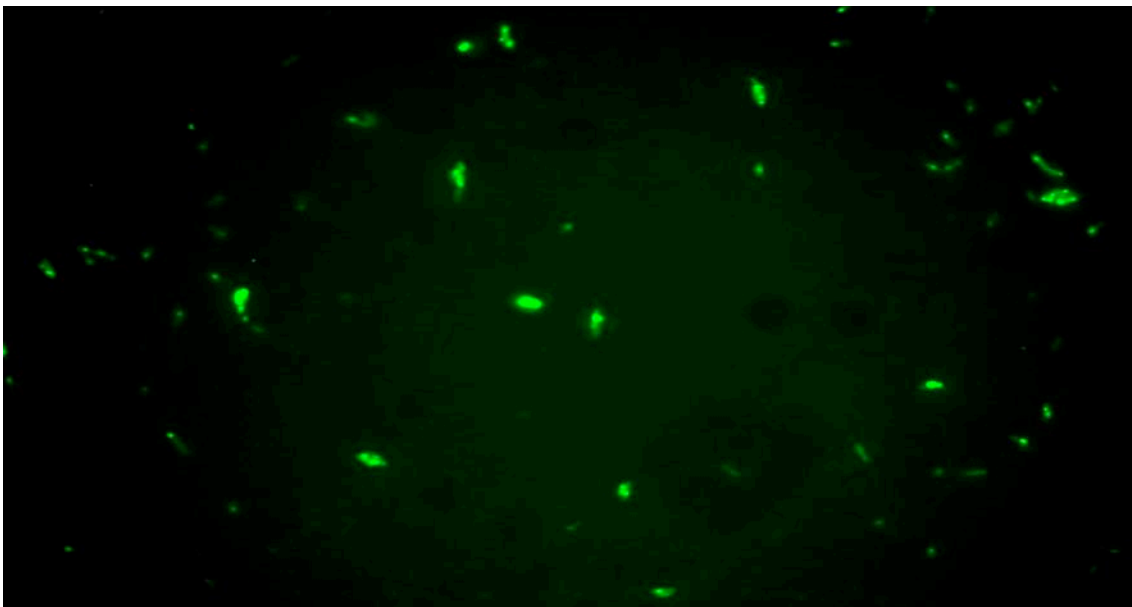


Figura 11: Micrografía de *E. coli* inducida con 0.4 mM de IPTG durante 8 horas utilizando un microscopio de fluorescencia con un filtro FITC.

En la figura 12 se encuentran superpuestas las fotos obtenidas con filtros DAPI y FITC para comprobar que la fluorescencia color verde proviene de las células.

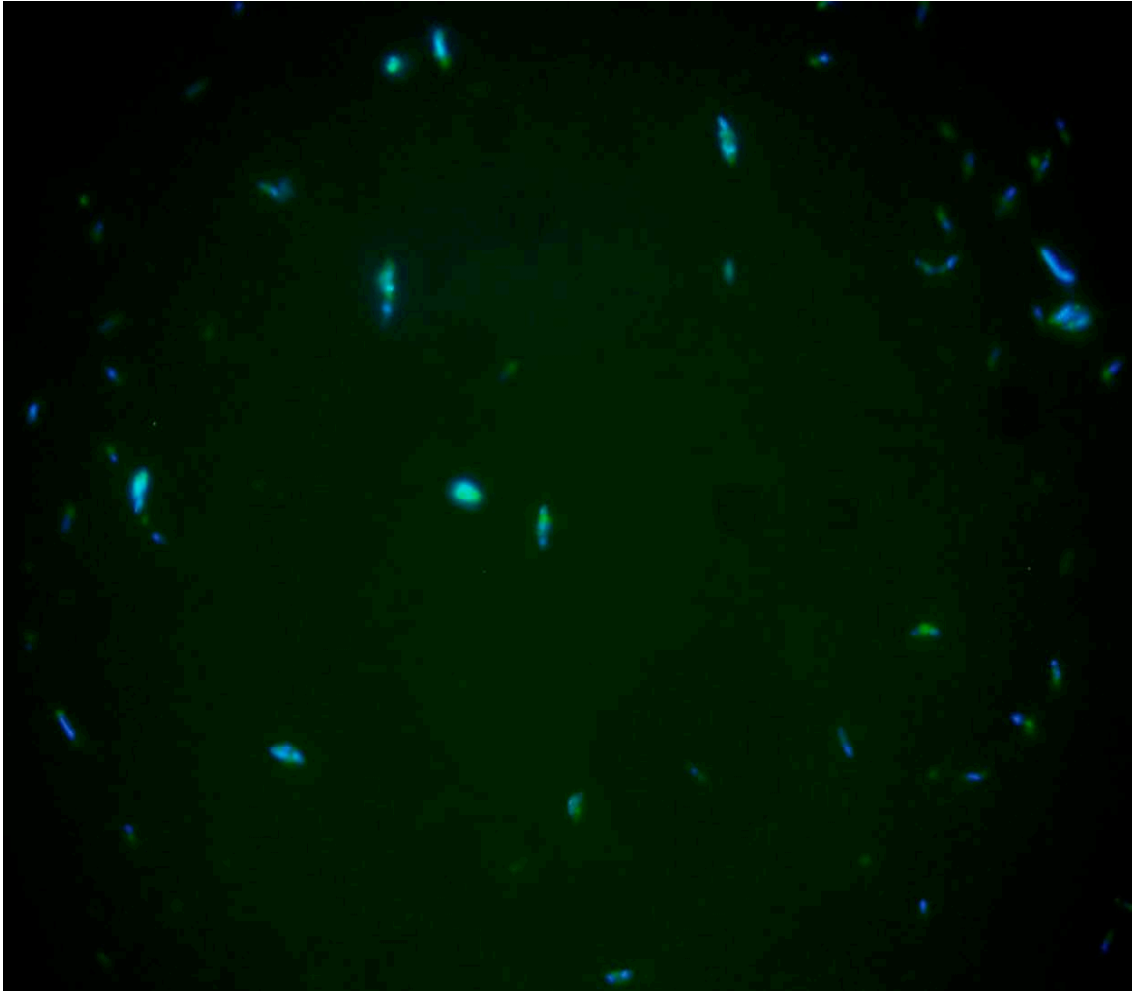


Figura 12: Micrografía resultante del traslape de las micrografías de los filtros DAPI y FITC.

## DISCUSIÓN:

Se clonó y se expresó la proteína GFP de *Renilla reniformis*, y hasta donde se sabe es el primer reporte de expresión de esta proteína en *E. coli*.

*In vivo*, la GFP de *Aequorea victoria* fluoresce debido a que acepta la energía que proviene de una proteína activada por  $\text{Ca}^{2+}$  denominada aequorina, a este fenómeno se le denomina de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET del inglés fluorescence resonance energy transfer), y esta reacción ocurre cuando dos moléculas (fluoróforos) se encuentran a una distancia menor a 100 Å de distancia, en donde una molécula donadora (aequorina) y otra aceptora (GFP), traslapan sus espectros, es decir, cuando la longitud de onda de emisión de una molécula fluorescente coincide con el estado de excitación de la otra [1]. En el caso de la proteína GFP se utilizó un filtro FITC, el cual contiene un filtro de excitación a 480 nm y un filtro de emisión a 515 nm; para comprobar que la fluorescencia detectada proviene de las células inducidas se utilizó el colorante DAPI; el cual es ampliamente utilizado en microscopia de fluorescencia porque pasa intacto por la membrana celular y se une fuertemente al ADN emitiendo una luz azul (461 nm) cuando es excitado con luz UV (358 nm), comprobándose de esta forma que la fluorescencia detectada proviene exclusivamente de las células.

Uno de los sistemas más explotados para la purificación de proteínas es el de cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC), que se basa en la interacción entre ciertos aminoácidos (especialmente histidinas) e iones metálicos dentro de una matriz que atrapa a los metales. El grupo imidazol de la histidina posee una fuerte afinidad hacia los iones divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , etc.). Con la adición de tallos de histidinas, ya sea localizado en el extremo N-terminal o C-terminal, se logra purificar una proteína blanco a partir del lisado en un solo paso [3], sin embargo, en el caso de la proteína GFP, que tiene un tallo de histidinas en el extremo N-terminal, no fue posible purificarla en un solo paso usando este método, debido probablemente a que el tallo de histidinas no estaba lo suficientemente expuesto para interactuar eficientemente con la matriz y al hacer el gradiente de imidazol se eluye junto con otras proteínas que

probablemente contienen regiones ricas en histidinas y cisteínas [3]. Por lo que se sugiere probar otros metales que pudieran dar mejores resultados como el Cobre o el Cobalto, o incluso probar otros tallos de purificación, puesto que se ha visto que no todos los tallos son adecuado para todos los sistemas.

## CONCLUSIONES:

- Se clonó la proteína hrGFP con un tallo de histidinas en el extremo N-terminal.
- Se expresó la proteína hrGFP en *Escherichia coli* cepa XL10-Gold.
- El tallo de histidinas no afecta la fluorescencia de la hrGFP

## REFERENCIAS:

1. Tsien, R. Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* 67:509–44.
2. Margolin, W. (2000). Green Fluorescent Protein as a Reporter for Macromolecular Localization in Bacterial Cells. *Methods* 20: 62-72.
3. Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology Biotechnology* 60:523–533.
4. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G., Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 48: 1–13.
5. Hopwood, D., Bibble, M., Charter, K., Buttner, M. & Kieser, T. (2000). Reporter system. En *Practical Streptomyces genetics*. (Pág 339-354). Norwich, Inglaterra. John Innes Foundation.
6. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.



## APÉNDICE A

### MEDIOS DE CULTIVO

#### A.1. Medio Luria-Bertani (LB) para crecer a *E. coli* (Sambrook, 1989).

Compuesto	Cantidad (g/l)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10

Para medio LB sólido en cajas Petri se agrega agar al 1.5%.  
Para medio LB con ampicilina la concentración final de ésta debe ser de 100 µg/ml.

#### A.2. Medio SOC para electroporación (Sambrook *et al.*, 1989).

Compuesto	Concentración
Triptona	2%
Extracto de Levadura	0.5%
NaCl	10mM
KCl	2.5mM
Mg <sub>2</sub> Cl	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
Glucosa	20mM

## APÉNDICE B

### MÉTODOS

#### B.1 EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA

##### -MINI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDO- (Sambrook *et al.*, 1989)

Reactivos necesarios:

- Solución I

Reactivo	Concentración (mM)
Glucosa	50
Tris · Cl (pH 8.0)	25
EDTA (pH 8.0)	10

La solución I se puede preparar en volúmenes de aproximadamente 100 ml y se esteriliza durante 15 minutos. Se almacena a 4°C.  
Esta solución debe ser abierta en campana para evitar su contaminación.

- Solución II

Solución	Concentración
NaOH	0.2N
SDS	1 %

Esta solución se prepara en el momento.

Se pueden utilizar soluciones stock: NaOH 10N y SDS al 10%.

- Solución III

Solución	Volumen (ml)
Acetato de potasio 5 M	60
Ácido acético glacial	11.5
Agua	28.5

- Etanol absoluto.
- Etanol 70%
- Endoribonucleasa pancreática (RNAasa) 10mg/ml

### Procedimiento:

Se parte de 5ml de medio LB con ampicilina (ver apéndice A.1) inoculado al 1% con la cepa correspondiente e incubado durante toda la noche a 37°C, con agitación constante (180 rpm).

1. Se transfieren 1.5ml de medio a un tubo Eppendorf y se centrifuga a 10 000 rpm por 5 minutos a 4°C, eliminar el medio de cultivo. El botón bacteriano debe encontrarse lo más seco posible para lo cual se utiliza una pipeta Pasteur.
2. Resuspender las células en 100 µL de solución I fría con la ayuda de un vortex.
3. Agregar 200 µL de solución II recién preparada. Mezclar invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurarse de que toda la superficie del tubo tenga contacto con la solución II. No utilizar vortex. Los tubos se mantienen en hielo.
4. Agregar 150 µL de solución III fría. Mezclar invirtiendo el tubo para dispersar la solución III a través del lisado bacteriano viscoso. Mantener en hielo por 5 minutos.
5. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hr aproximadamente a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13 000 rpm por 15 minutos. Retirar el sobrenadante.
8. Lavar el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Centrifugar 15 min a 12 000 rpm, retirar el sobrenadante y secar el botón.
9. Disolver el botón en 10 µL de TE + RNAasa (la concentración final de la RNAasa debe ser 5µg/ml) e incubar 30 minutos a 55°C.

De la solución resultante por este método se cargaron 3 µl en geles de agarosa

## **B.2. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA -MIDI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDO- (Sambrook *et al.*, 1989)**

Se utilizan las mismas soluciones que para la extracción del plásmido por mini-prep más las siguientes:

- Fenol : cloroformo 1:1
- Cloroformo : alcohol isoamílico 24:1
- Acetato de sodio 3M pH 5.2
- Proteinasa K 10 mg/ml

### **Procedimiento:**

Se parte de 100 ml de medio LB con ampicilina (ver apéndice A.1) inoculado al 1% con la cepa correspondiente e incubado durante toda la noche en a 37°C, con agitación constante (180 rpm).

1. Se transfiere el medio de cultivo en botes para centrífuga, se centrifuga a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C para recuperar las células y se elimina el medio de cultivo. El botón bacteriano debe encontrarse lo más seco posible para lo cual se utiliza una pipeta Pasteur para remover el medio de cultivo remanente.
2. Resuspender muy bien el botón bacteriano libre de medio en 5ml de solución I fría con la ayuda de un vortex.
3. Agregar 10 ml de solución II recién preparada. Mezclar invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. Asegurándose de que toda la superficie del tubo tenga contacto con la solución II. No usar el vortex. Mantenga las botellas en hielo.
4. Agregar 7.5 ml de solución III fría. Mezclar invirtiendo el tubo para dispersar la solución III. Mantener en hielo por 5 minutos.
5. Centrifugar a 13 000 rpm 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Precipitar el ADN con 1 volumen de isopropanol durante 1 hr aproximadamente a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13 000 rpm 15 minutos. Retirar el sobrenadante.
8. Lavar el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Centrifugar 15 min a 13000 rpm, retirar el sobrenadante y secar el botón.
9. Disolver el botón en 0.5ml de TE + RNAsa e incubar 30 minutos a 55°C.
10. Agregar proteinasa K e incubar 30 min a 55°C.
11. Agregar 0.5ml de fenol:cloroformo y agitar con la ayuda de un vortex.
12. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa (fase superior).
13. Lavar con un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico y agitar con la ayuda de un vortex.
14. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa (fase superior).
15. Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio.

16. Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente y tirar sobrenadante.
17. Lave el botón con 1 volumen de EtOH 70%. Centrifugue 15 min a 12000 rpm, retirar el sobrenadante y se resuspende el botón en 100µl de agua estéril.

De la solución resultante carga 1 µl en geles de agarosa.

### **B.3. ELABORACIÓN DE COLUMNAS DE FIBRA DE VIDRIO PARA PURIFICAR ADN DE GELES DE AGAROSA.**

Materiales:

- Fibra de vidrio
- Tubos Eppendorf 1.5ml
- Tubos Eppendorf 0.5ml

1. Se perfora el fondo del tubo Eppendorf de 0.5ml con una aguja.
2. Se rellena el fondo del mismo tubo con aproximadamente medio centímetro de fibra de vidrio, compactándola lo más posible.
3. Este tubo se introduce en el Eppendorf de 1.5ml.
4. Se esterilizan las columnas.

Purificación:

1. Después de correr un gel de agarosa al 1%, se corta el fragmento de interés y se coloca dentro de la columna de vidrio.
2. Se centrifuga a 6000 rpm durante 1 minuto.
3. Se recupera el filtrado en un tubo Eppendorf limpio.
4. Se centrifuga de nuevo la columna a 6,000 rpm durante 1 minuto.
5. Se recupera el filtrado y se junta con el anterior.
6. Al filtrado total se le lleva a un volumen final de 500 µl y se lava con fenol-cloroformo (1:1).
7. Se recupera la fase acuosa y se precipita con dos volúmenes y medio de etanol absoluto y 10% de acetato de sodio.
8. Se centrifuga a 15,000 rpm por 15 minutos, se decanta el etanol.
9. Se lava el pellet de ADN con etanol al 70%.
10. Se centrifuga a 15,000 rpm por 15 minutos, se decanta el etanol y se resuspende en 10 µl de H<sub>2</sub>O milli-Q estéril.

#### **B.4. ELECTRO-TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* (Zabarovsky et al., 1990).**

En ésta técnica es fundamental mantener las células a baja temperatura para asegurar la eficiencia de éstas.

##### **A. Preparación de las células**

1. Inocular al 1% un litro de medio LB (ver apéndice A.1) con un cultivo fresco crecido durante toda la noche.
2. Crecer las células a 37°C con agitación vigorosa hasta obtener una Abs<sub>600</sub> de 0.5 a 0.7 (se obtienen mejores resultados cuando se crecen las células rápidamente).
3. Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm a 4°C durante 15 min.
4. Remover la mayor cantidad de medio posible y resuspender los botones en un volumen total de 1L de agua milli Q, estéril y fría. Centrifugar igual que en el paso 3.
5. Resuspender el botón en 0.5L de agua milli Q, estéril y fría. Centrifugar igual que en el paso 3.
6. Resuspender el botón en aproximadamente 20 ml de glicerol al 10% frío; esta solución se elabora con agua milli Q. Centrifugar como en el paso 3.
7. Resuspender en un volumen final de 1.5 ml de glicerol al 10%. La concentración de células debe ser alrededor de  $1-3 \times 10^{10}$  células / ml.
8. Esta suspensión se debe guardar en alícuotas de 50  $\mu$ l a -70°C. Las células se conservarán en buen estado por al menos 6 meses en estas condiciones.

##### **B. Electro-transformación**

1. Las células competentes guardadas a -70°C se descongelan en hielo.
2. Se mezcla la suspensión de células de 1 a 2  $\mu$ l de ADN (El ADN debe estar en un buffer de baja fuerza iónica como TE). Esperar de 0.5 a 1 minuto.
3. Establecer la magnitud del impulso eléctrico en el electroporador; que debe ser de 1250 V.
4. Transferir la mezcla de células con el plásmido a una cubeta de 0.1 cm (enfriada previamente) con la ayuda de una micro pipeta y quitarle las burbujas golpeando ligeramente.
5. Se coloca la cubeta en la cámara del equipo y se da el impulso eléctrico.
6. **Inmediatamente** después del pulso se agregan a la cubeta 950  $\mu$ l de medio SOC (ver apéndice A.2) y se resuspenden las células con una micropipeta (la adición rápida del medio SOC después del pulso eléctrico es muy importante para maximizar la recuperación de las células transformadas).
7. Transferir la suspensión de células a un tubo Eppendorf e incubar a 37°C durante 1 hora ( Con agitación a 225 rpm durante la incubación ya que puede ayudar a la recuperación de transformación).
8. Plaquear de 10 a 50  $\mu$ l de la suspensión de células en cajas petri con medio LB mas ampicilina (ver apéndice A.1). Para determinar la

eficiencia, la cual debe ser mayor a  $1 \times 10^7$  transformantes (ufc)/mg ADN cuando se tienen plásmidos íntegros.

### **B.5. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA (0.8%). (Sambrook *et al.*, 1989)**

#### **Reactivos necesarios:**

- Agarosa
- Bromuro de etidio 10mg/ml
- Tampón TAE 50 X

<b>Solución</b>	<b>Cantidad</b>
Tris base	242 g
EDTA 0.5 M pH 8	100 ml
Ác. acético glacial	57.1 ml

El pH se ajusta a 8.3. El tampón se diluye hasta una concentración de 1X.

#### **Procedimiento:**

1. Se disuelven 0.32 g de agarosa en 40 ml de agua destilada calentando hasta ebullición durante algunos segundos. La cantidad de gel que se prepara depende del tamaño de la cámara de electroforesis que se va a utilizar.
2. Se agregan 2  $\mu$ L de bromuro de etidio (0.5 $\mu$ g/ml), se mezcla y se deja solidificar el gel en la cámara con el peine que va a formar los pozos donde se cargarán la muestras.
3. Se sumerge el gel en tampón TAE 1X dentro de la cámara de electroforesis y se cargan las muestras de ADN con tampón de carga 1X.
4. Se corre el gel a 70 volts durante 1.5 hrs aproximadamente (hasta que el frente del colorante llegue a  $\frac{3}{4}$  partes del final del gel).
5. Las bandas de ADN en el gel se observan con luz ultravioleta.

## B.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) (Coligan *et al.*, 1995).

### Reactivos necesarios:

- Acrilamida 30%
- Tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- Tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
- SDS 10%
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina)
- Persulfato de amonio 10% (se prepara en el momento)

#### ➤ Tampón de carga para proteínas 4X

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	4 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1 ml
Glicerol	800 ml
SDS 10%	1.6 ml
2-β-mercaptoetanol	400 ml
Azul de bromofenol 0.5%(p/v)	200 ml

La concentración de este tampón debe ser 1X cuando se preparan las muestras.

#### ➤ Tampón de migración 5X pH 8.3

Reactivo	Cantidad (g/l)
Tris-base 125 Mm	15
Glicina	72
SDS	5

Este tampón se diluye con agua hasta una concentración 1X para correr el gel de poliacrilamida.

#### ➤ Soluciones para revelar los geles.

- Stock I: Azul brillante de coomassie 0.2% + etanol 90%
- Stock II: Acido acético 20%
- Fijación: 40 ml etanol + 10 ml ácido acético glacial + agua destilada 50 ml
- Tinción: 50 ml stock I + 50 ml stock II
- Desteñido I: Solución de fijación
- Desteñido II: 20 ml etanol + 10 ml ácido acético glacial + 70 ml agua

## Procedimiento:

1. Ensamblar el sándwich para preparar los geles (0.75 mm de grueso) en el equipo para electroforesis según las recomendaciones del fabricante.
2. Colóquese el sándwich en el casting y se verifica con agua destilada que no haya fugas.
3. Se prepara el gel de acrilamida, el cual está constituido tanto por un gel de separación (parte inferior) como por un gel de concentración (parte superior) y presentan la siguiente composición:

Reactivo	Gel de concentración	Gel de separación **	
	4%	8 %	12%
Agua destilada	1.21 ml	2.34 ml	1.64 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.50 ml	-	-
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	-	1.25 ml	1.25 ml
Acrilamida 30%	266.5 $\mu$ l	1.3 ml	2.0 ml
SDS 10%	20.0 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Persulfato de amonio 10%	11.0 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	2.2 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Total	2.21 ml *	5.0 ml *	5.0 ml *

\* Cantidades necesarias para hacer un gel.

\*\* La concentración de acrilamida en el gel de separación depende del peso molecular de las proteínas que se desea separar. Generalmente se usa una concentración de 5% para proteínas de 60 a 200 kDa, una de 10% para proteínas con peso molecular de 16 a 70 kDa y una de 15% para proteínas con peso molecular de 12 a 45 kDa

Ambos geles se preparan simultáneamente en recipientes adecuados agregando los componentes en el mismo orden en que se presentan en la tabla. Una vez que se agrega la acrilamida se deben agitar ligeramente, después se agrega SDS quedando pendiente el persulfato de amonio y el TEMED para el momento de vaciar.

Se agrega el persulfato de amonio y el TEMED al gel de separación, se mezcla ligeramente e inmediatamente después se vacía con la ayuda de una pipeta en el sándwich del punto 1 dejando el espacio necesario para colocar el peine que va a formar los pozos sobre éste gel. Posteriormente se agrega alrededor de 1ml de agua destilada sobre el gel de separación para obtener una superficie lisa. Se deja a temperatura ambiente alrededor de 20 minutos para permitir la polimerización de la acrilamida. Cuando la acrilamida se ha polimerizado se observa muy ligeramente una línea que separa al gel del agua, cuando esto sucede se retira el agua que se agregó sobre el gel separación, se coloca el peine en el sándwich y se prosigue a agregar el TEMED y el persulfato de amonio al gel de concentración, se mezcla ligeramente la solución e inmediatamente después se vacía con la



ayuda de una pipeta en el sándwich sobre el gel de separación rellorando los espacios que deja el peine y evitando la formación de burbujas. Se deja a temperatura ambiente para permitir la polimerización.

4. Se desmonta el sándwich del casting y se coloca en la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante.
5. Se agrega tampón de migración 1X a pH 8.3 en la cámara y se retira el peine cuidadosamente.
6. Se conecta la corriente a la cámara y se pre-corre el gel a 20 mA durante 30 minutos aproximadamente.
7. Para preparar las muestras se diluye una porción de la proteína en solución con el tampón de carga para proteínas 1X. Calentar a 95°C durante 5 minutos y poner en hielo hasta que se cargue el gel. Las muestras se cargan en el gel con la ayuda de una micro pipeta después de la pre-corrida.
8. Se corre el gel a 20 mA hasta que la marca de azul de bromofenol llegue hasta el fondo del gel.
9. Se desmonta el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante para recuperar y revelar el gel.
10. Se agrega solución de fijación a la caja petri que contiene el gel hasta cubrirlo completamente durante 30 minutos con agitación, transcurrido el tiempo se tira la solución de fijación.
11. De la misma manera que el punto anterior, se agrega solución de tinción. Agitar durante 20 minutos y decantar.
12. Agregar solución de fijación una vez más e igual que en los puntos anteriores. Se agita durante 30 segundos y se elimina la solución. A partir de este punto las bandas de proteína son ligeramente visibles en el gel.
13. Se agrega solución de destinción, se agita hasta que el gel pierda su coloración azul y las bandas de proteína sean claramente visibles.

### B.7.WESTERN-BLOT (Coligan *et al.*, 1995)

#### Reactivos y materiales necesarios:

- Tampón de Transferencia 10X

Reactivo	Cantidad (g/l)
Glicina	144
Tris base	30

- PBS 10X pH 7.4

Reactivo	Concentración (M)
NaCl	1.5
Fosfatos	1

- Metanol
- Tween 20
- Leche descremada
- Papel filtro<sup>1</sup>
- Membrana de transferencia<sup>1</sup>
- Fibra Scottch-Bride<sup>1</sup>
- 2 recipientes de tamaño adecuado: para activar la membrana para realizar el sándwich

<sup>1</sup> Deben ser del mismo tamaño que el equipo para transferir.

## Transferencia

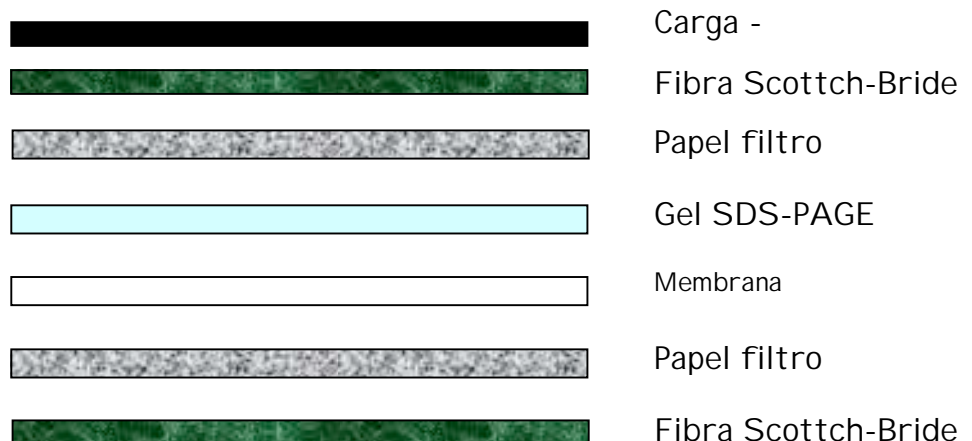
1. Se corren las proteínas que se desean transferir en un gel SDS-PAGE.
2. Una vez que se ha corrido el gel de poliacrilamida se prepara el tampón de transferencia de la siguiente forma:

Tampón de transferencia 10X	100 ml
Metanol	100 ml

Llevar a 1L con agua destilada

3. En un recipiente se agrega una pequeña cantidad del tampón de transferencia, se coloca el equipo para hacer el sándwich con la parte negra (carga -) hacia abajo (adentro del recipiente).

4. Se realiza el sándwich de la siguiente forma:



Antes de realizar el sándwich se activa la membrana sumergiéndola en metanol y los demás componentes se humedecen con tampón de transferencia del punto 2. El sándwich se realiza dentro de un recipiente que contenga tampón de transferencia para evitar que se seque cualquier componente. Se eliminan las burbujas de aire que puedan existir entre el gel SDS-PAGE y la membrana, desplazando suavemente sobre la membrana una pipeta pasteur.

Se cierra el sándwich y se monta en la cámara que contiene la cantidad de tampón de transferencia necesaria para cubrir el sándwich (la parte negra del

sándwich debe coincidir con la parte negra de la cámara). Se siguen las indicaciones del fabricante.

5. Se conecta la cámara y se realiza la transferencia a 90 V durante 1-1.5 h. Se debe evitar que aumente la temperatura, porque la transferencia sería ineficiente. La transferencia se puede realizar en el cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.

6. Se desmonta el equipo, se retira la membrana y se deja secar sobre papel bond. El secado se puede realizar a temperatura ambiente durante 3 hrs. aprox. ó a 37°C durante 1 h.

### **Reconocimiento con anti-his.**

1. Se sumerge la membrana en metanol.

2. Se numeran los pozos con lápiz y en el caso de que no se tenga un marcador de PM con tallo de histidinas, se debe recortar la región donde se encuentre el marcador para ser revelada con azul de bromofenol o técnica similar.

3. Se agrega el anticuerpo monoclonal de ratón que detecta el tallo de histidinas (anti-his<sub>6</sub>, Roche) en una concentración de 0.4 µg/ml en el siguiente tampón:

Tampón PBS	1X
Tween 20	0.05%
Leche descremada	3%

4. La membrana se coloca en un recipiente adecuado al tamaño de la membrana, se agrega una cantidad suficiente del tampón anterior que contienen el anticuerpo de tal forma que cubra muy bien la membrana. Se incuba a temperatura ambiente durante 1h con agitación ligera. Posteriormente se lava la membrana con PBS 1X tres veces.

5. Se agrega el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón ( $\alpha$ -anti-his, Perkin Elmer) en una concentración 1:5000 de la misma forma que el primero y se incuba durante 1 h con las mismas condiciones. Se lava 3 veces con PBS 1X.

### **Revelado**

1. El segundo anticuerpo ( $\alpha$ -anti-his) se encuentra acoplado a una fosfatasa alcalina, lo que permite que se lleve a cabo una reacción colorida cuando se agrega su sustrato, que identifica el complejo de los anticuerpos con el tallo de histidinas. Así, es necesario agregar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) en una concentración de 0.21 g/L con nitroazul de tetrazolio (NBT) en una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/tampón Tris (solución: sustrato BCIP/NBT lista para usar, Perkin Elmer) de tal forma que cubra la membrana por completo para que se lleve a cabo la formación del color.

## **B.8. LISADO DE CÉLULAS POR SONICACIÓN (Coligan *et al.*, 1995).**

Se parte de botones bacterianos obtenidos a partir de 100 ml de medio LB inoculado con las células de interés.

En esta técnica se debe cuidar mucho que las muestras permanezcan a una temperatura de 4°C por lo que es necesario mantenerlas en hielo todo el tiempo, ya que de lo contrario las proteínas pueden degradarse.

1. Resuspender el botón bacteriano en 0.6ml del tampón\* y agregar inhibidor de proteasas en una concentración 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
2. Sonicar dando 3 pulsos con una amplitud de 60 Hertz durante 10 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
3. Centrifugar a 8,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y recuperar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 300 µL de tampón\* y agregar inhibidor de proteasas en una concentración final 1:1000 (Sigma, cóctel para uso general).
5. Sonicar dando 3 pulsos con una amplitud de 60 Hertz durante 20 segundos y reposando la muestra 1 minuto entre cada pulso.
6. Juntar la mezcla del punto anterior con el sobrenadante recuperado en el punto 3.
7. Agregar tritón a una concentración final de 1% e inhibidor de proteasas en una concentración final 1:1000 y ajustar a un volumen de 2 ml con tampón\*.
8. Centrifugar a 8,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
9. Filtrar el sobrenadante por membrana de 0.45 µm.

\* El tampón que se empleó para este estudio fue el tampón de adsorción que se emplea en la técnica de purificación de proteínas recombinantes en columnas de níquel.

## **B.9. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA HisTrap™ HP, 1 ml**

### **Preparación:**

1. Se retiran las protecciones superior e inferior de la columna y en la parte superior se coloca el adaptador apropiado para una jeringa de 10 ml.
2. Se lava la columna con 5 ml de agua destilada estéril.
3. Se cargan 0.5 ml de NiSO<sub>4</sub> 0.1 M.
4. Se lava la columna con 5 ml de agua destilada estéril.
5. Se equilibra con 5 ml de buffer de unión (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl y 10 mM de Imidazol).

### **Regeneración:**

1. Se retiran las protecciones superior e inferior de la columna y en la parte superior se coloca el adaptador apropiado para una jeringa de 10 ml.
2. Se lava la columna con 5 ml del buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl y 0.05 M EDTA).
3. Se lava la columna con 10 ml de agua destilada estéril.
4. Si no se va a utilizar en ese día se cargan 1.5 ml de etanol al 20%, se colocan las protecciones y se guarda a 4°C.