



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Inmovilización del fragmento C de la
Toxina del Tétanos a gránulos de almidón**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Paola Aguilera Ruiz



MÉXICO, D. F.

2012



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. Marco Antonio Ortiz Jiménez.
Vocal	Prof. Alejandro Camacho Cruz.
Secretario	Prof. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja.
1er. Suplente	Prof. Beatriz Ruiz Villafán.
2do. Suplente	Prof. Verónica Domínguez Valdez.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología.
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Tutor

Paola Aguilera Ruiz
Sustentante

Agradecimientos

A mis padres y mi hermana, que han estado siempre presentes para aconsejarme y apoyarme en ocasiones donde no habían buenas noticias, para recordarme el buen camino cuando por alguna razón me perdía y por los tantos momentos buenos. Sin ellos mi vida no sería lo que es.
Gracias por todo.

A la Dra. Romina Rodríguez, por su apoyo, condescendencia y por la asesoría brindada en el desarrollo del proyecto.

A Ricardo Pérez, gran amigo y respaldo moral en todo lo vivido durante el proyecto. Gracias, aunque terminaste mucho antes, siempre estuviste presente.

Agradezco de manera especial a la Biol. Laura Escalante, siempre me brindo ayuda, apoyo y asistencia técnica. Muchas gracias Laura.

A mi amiga Alba Romero. Curiosamente el destino nos ha llevado siempre cerca, lo cual agradezco mucho. Por tu sincera amistad incondicional, muchas gracias.

A Daniel Guillén y Silvia Moreno, por sus consejos y apoyo.

Muchas gracias a mis amigos de las Donas y anexos de la facultad. Las experiencias vividas no las cambiaría por nada, las recordaré por siempre. La Facultad no habría sido lo mismo sin ustedes.

Al apoyo otorgado por DGAPA, tanto la beca recibida como el financiamiento al proyecto IN209410.

Índice

1. Lista de abreviaturas	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	
3.1. Almidón y Amilasas	4
3.1.1. Estructura del almidón.....	4
3.1.2. Amilasas y Módulos de Unión a Carbohidratos (MUC)	6
3.1.3. α -Amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i>	11
3.2. Tallos de Purificación.....	15
3.3. Fragmento C de la Toxina del Tétanos	17
4. Objetivos	
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos Particulares	20
5. Metodología	
5.1. Estrategia General	21
5.2. Material Biológico	22
5.3. Ensayos a nivel DNA	
5.3.1. Obtención del Fragmento C de la Toxina del Tétanos.....	23
5.3.2. Amplificación y Ligación en pGEM-T easy	24
5.3.3. Construcción del plásmido pQTTC-DFAd	26
5.3.4. Construcción del plásmido pQTTC	27
5.4. Ensayos a nivel Proteína	
5.4.1. Expresión de la proteína de fusión TTC-DFAd	27
5.4.2. Purificación de la proteína TTC-DFAd...	28
5.4.2.1. Purificación con tallo de Histidinas.....	28
5.4.2.2. Purificación con columna de β -ciclodextrina.....	28

5.4.3. Interacción de la proteína TTC-DFAd con Almidón	29
6. Resultados y Discusión	30
7. Conclusiones	45
8. Bibliografía	46
9. Apéndices	50
A. Medios de Cultivo	50
B. Técnicas Utilizadas.	51
B.1 Extracción de DNA plasmídico	51
B.2 Purificación de DNA	52
B.3 Electroforesis Horizontal en geles de agarosa	53
B.4 Preparación y Electrotransformación de células competentes	53
B.5 Preparación de geles de acrilamida para Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	54
B.6 Análisis inmunológico, Western Blot	55
B.7 Técnicas de purificación de proteína	56
B.8 Adsorción en almidón	58
C. Secuencias de DNA.....	60
D. Cálculo del punto isoelectrico	62

1. Lista de Abreviaturas

GH-H	Glucósido hidrolasas Clan H
GH-13	Glucósido hidrolasas Familia 13
DFA	Dominio de Fijación al Almidón
DFA _d	Dominio de Fijación al Almidón modificado
MUC	Módulo de Unión a Carbohidrato
UR	Unidad Repetida
5UR	Cinco Unidades Repetidas
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<i>TetC</i>	Gen que codifica para el fragmento C de la Toxina del Tétanos.
TTC	Fragmento C de la Toxina del Tétanos
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
PCR	Siglas en inglés para la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
CAZy	Siglas en inglés para Base de Datos de enzimas con actividad sobre carbohidratos (Carbohydrate-Active enzymes Database)
c.b.p.	Cuanto baste para
ALA	Ácido Lácticas Amilolíticas
aa	Aminoácido
mg	Miligramo
ng	Nanogramo
μ g	Microgramo
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
Ref.	Referencia

2. Introducción.

Varias amilasas de la familia 13 de las glucosidohidrolasas (aproximadamente el 10%) son capaces de hidrolizar al almidón insoluble debido a que poseen un dominio de fijación al almidón (DFA), una secuencia que codifica para un dominio de la proteína con la capacidad de unirse al almidón. En el caso de especies de lactobacilos como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus manihotivorans* y *Lactobacillus amylovorus* este dominio se encuentra en el extremo carboxilo terminal y está conformado por secuencias de aminoácidos que se repiten, es decir, por módulos repetidos en tándem (24).

Específicamente para *Lactobacillus amylovorus* este DFA se encuentra constituido por cinco módulos de 91 aminoácidos cada uno. La importancia de este dominio se estableció estudiando dos construcciones de la proteína: la amilasa entera de *L. amylovorus* y la misma amilasa deletada del DFA. Este estudio demostró que la amilasa sin el DFA no fue capaz de hidrolizar el almidón insoluble y tampoco fijarse al mismo, lo que confirmó la utilidad del DFA y su independencia del dominio catalítico (17). Continuación de dicho análisis fue una investigación acerca de cómo actúan las unidades repetidas, lo cual concluyó en que cada una de las unidades repetidas puede unirse al almidón y, además, pueden actuar en conjunto para optimizar la adsorción (23,24).

Si se realizara la fusión de este DFA a una proteína que no tenga la capacidad de unirse al almidón podría inducirse la fijación de dicha proteína al polímero. Este efecto puede tener aplicaciones industriales importantes tales como la inmovilización de proteínas, lo cual sería redituable, pues la matriz sería almidón, un compuesto de bajo costo y con efecto nulo al ambiente. Así mismo, esta fijación al almidón puede utilizarse como método de purificación, de manera que el DFA funcione como tallo de afinidad.

Con la finalidad de probar lo anterior, este trabajo tiene como principal meta lograr la fusión de una proteína prototipo al DFA y estudiar si es posible la adsorción e incluso purificación de la proteína fusionada utilizando al almidón como matriz.

Se decidió utilizar al Fragmento C de la toxina del tétanos para construir la fusión pues es una proteína ampliamente utilizada en ensayos de transporte de biomoléculas, su secuencia es conocida, y tiene un tamaño relativamente grande, que nos permitirá inferir un poco acerca de la capacidad de adsorción del DFA.

3. Antecedentes.

3.1 Almidón y α -amilasas.

El almidón es una biomolécula que funciona como almacén energético en plantas y es sintetizado en órganos celulares específicos como una estructura semicristalina, a diferencia del glucógeno que permanece como una estructura amorfa para su uso inmediato. Es un polisacárido que usualmente encontramos como gránulos insolubles en cereales y otros vegetales. Su estructura y susceptibilidad al ataque enzimático varía en función de su origen ⁽¹⁾.

Dada su abundancia en la naturaleza ha sido ampliamente utilizado desde tiempos ancestrales, y en la actualidad tiene gran importancia a nivel industrial, no solo como producto alimenticio, sino también en industrias farmacéuticas, cosméticas, papeleras y de adhesivos ⁽²⁾.

3.1.1 Estructura del Almidón

Estructuralmente, el almidón se compone principalmente de dos α -glucósidos: amilosa y amilopectina, cuyas proporciones varían según la fuente de obtención, pero componen entre el 98% y 99% del peso seco del almidón. Otros compuestos pueden estar presentes en los gránulos de almidón, provenientes de la membrana de los amiloplastos o de fuentes ajenas a la síntesis del almidón; estos pueden ser triglicéridos, glicolípidos, fosfolípidos, ácidos grasos libres e incluso proteínas. Sin embargo, en algunos cereales los ácidos grasos libres y lípidos en forma de lisofosfolípidos se encuentran asociados a la fracción de amilosa, representando aproximadamente un 2% del gránulo ⁽¹⁾.

La amilosa es un polímero esencialmente lineal formado por unidades de glucosa unidas en su mayoría por enlaces $\alpha(1-4)$, aproximadamente en un 99%, y algunos enlaces $\alpha(1-6)$. La amilopectina es un polímero ramificado más grande y más ramificado que la amilosa, formado por enlaces $\alpha(1-6)$ por cada ramificación, y $\alpha(1-4)$ a lo largo de las cadenas lineales (Figura 3.1)⁽³⁾.

En la mayoría de las especies puede encontrarse almidón con una proporción promedio de 30% amilosa y 70% amilopectina⁽⁴⁾, lo cual está relacionado de manera importante con la cristalinidad del almidón. El modelo más aceptado consiste en un clúster armado con una cadena única, la cadena C, que contiene el extremo reductor; cadenas B, clasificadas de B₁ a B₄ por el número de ramificaciones posibles en cada cadena (formadas por 20 a 24, 42 a 48, 69 a 75 y 101 a 119 unidades de glucosa respectivamente); y las cadenas A que no tienen ramificaciones. Las cadenas A y B forman dobles hélices, en las que cada vuelta de la hélice está formada por seis moléculas de glucosa (Figura 3.2). Esta conformación constituye la parte

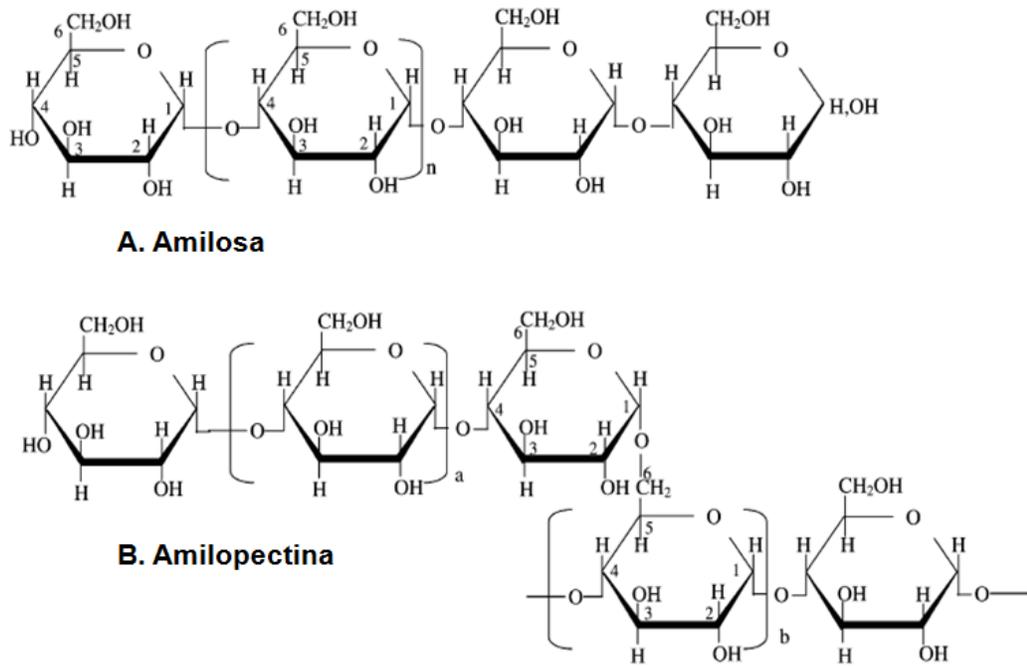


Figura 3.1. **A.** Estructura de la amilosa, polímero de glucosa donde los enlaces son $\alpha(1-4)$ con ocasionales enlaces $\alpha(1-6)$ en cadenas moderadamente largas. **B.** Estructura de la amilopectina, cadenas con enlaces $\alpha(1-4)$ con ramificaciones formadas por enlaces $\alpha(1-6)$, donde a y b varían en número según la fuente de obtención (Modificado de Ref. 3).

cristalina del gránulo. Los cristales, siendo polimorfos de amilosa, pueden ser clasificados por el ángulo de difracción resultado de análisis de rayos X. Los cristales tipo A son monocíclicos escalonados, mas compactos y con poco contenido de agua. Los cristales tipo B son hexagonales, con moléculas de amilopectina más relajadas y el centro se encuentra siempre hidratado. Los cristales de tipo C son una mezcla de los tipos A y B ⁽³⁾.

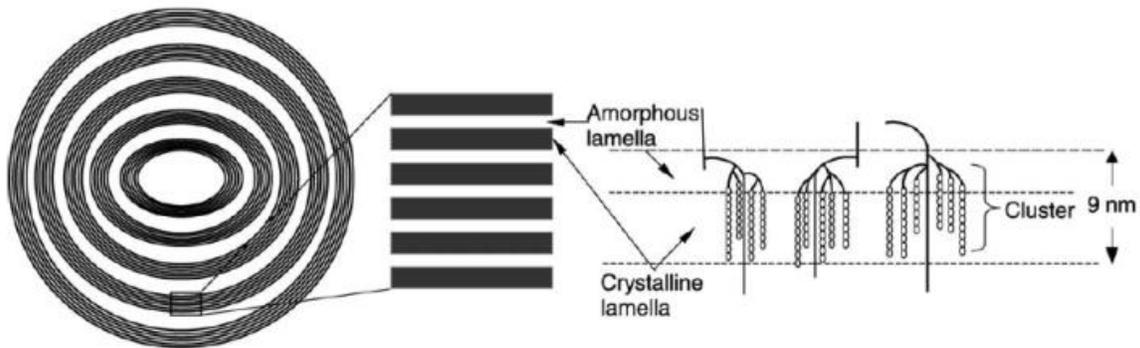


Figura 3.2. Modelo de cluster para la estructura del almidón. Las regiones cristalinas están conformadas por dobles hélices formadas por la amilosa (Tomado de Ref. 3).

3.1.2 Amilasas y Módulos de Unión a Carbohidratos (MUC)

Las amilasas son enzimas con gran importancia en la industria por su gran variedad de usos, desde la conversión de almidón a jarabes azucarados hasta la producción de β -ciclodextrinas para la industria farmacéutica, por ello, se calcula que abarca aproximadamente el 30% de la producción mundial de enzimas ⁽⁴⁾. El uso del almidón en la industria dependió durante mucho tiempo de la gelatinización del almidón, un tratamiento con calor que vuelve al almidón más digerible y utilizable para procesos industriales. Sin embargo, la hidrólisis del almidón ocurre todo el tiempo en plantas y en algunos microorganismos sin necesidad de un paso previo de gelatinización, por lo tanto, era de gran interés llegar al entendimiento de este mecanismo y, siendo un proceso enzimático, cómo se incorpora al modelo de la cristalinidad del almidón que una proteína pudiera tener acceso a las cadenas de amilosa y amilopectina ⁽²⁾.

De acuerdo a la manera en que estas enzimas actúan pueden clasificarse en endoamilasas, exoamilasas e isoamilasas:

Las endoamilasas se encuentran presentes en todos los reinos y pueden ser muy diferentes entre sí, pero tienen en común dos características: que hidrolizan enlaces $\alpha(1-4)$ formando productos con una configuración α en el carbono anomérico del extremo reductor y que reaccionan con glucosas que se encuentran en las cadenas internas que forman el almidón.

Las exoamilasas reaccionan con el extremo no reductor de la parte final de las cadenas de almidón o de polímeros derivados del almidón y todas producen un cambio de configuración en el centro anomérico de los productos. Pueden clasificarse en general en dos tipos, las β -amilasas que producen β -maltosa y las glucoamilasas que producen β -D-glucosa.

Las isoamilasas son enzimas que hidrolizan los enlaces $\alpha(1-6)$ de las ramificaciones en el almidón. Actúan rompiendo los enlaces internos de la amilopectina, dando como productos maltodextrinas lineales que mantienen la configuración α .

Estas enzimas también pueden agruparse por su estructura tridimensional dentro del clan H de las glucósido hidrolasas (GH-H), en el cual específicamente la familia 13 (GH-13) incluye a las α -amilasas, así clasificadas por su estructura primaria ^(5,4).

A pesar de la diversidad de enzimas que integran al clan GH-H, el mecanismo de acción es común a todas ellas y su estructura también, ya que el dominio catalítico posee una estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ (barril TIM, por las siglas de la primer enzima en la que fue encontrada esta estructura: Triosafosfato Isomerasa) con cuatro regiones altamente conservadas en su secuencia, tanto aminoácidos que forman el sitio catalítico como algunos que son esenciales para la estabilidad del barril (Figura 3.3).

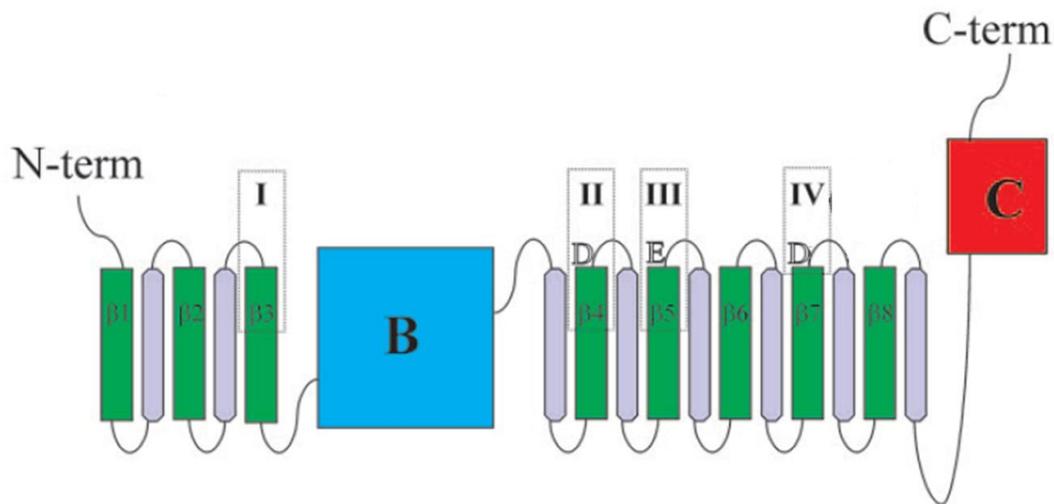


Figura 3.3. Esquema topológico para las α -amilasas de la familia 13. Muestra la estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ del dominio catalítico que empieza con la lámina $\beta 1$ y termina con la hélice $\alpha 8$. El dominio B (indicado con la letra B) se localiza entre la lamina $\beta 3$ y la hélice $\alpha 3$. Se observan numeradas las regiones conservadas (I-IV). Los sitios aproximados donde se encuentran los residuos relacionados con la catálisis se indican con las letras D, E y D. C: Dominio C (Tomado de Ref. 36).

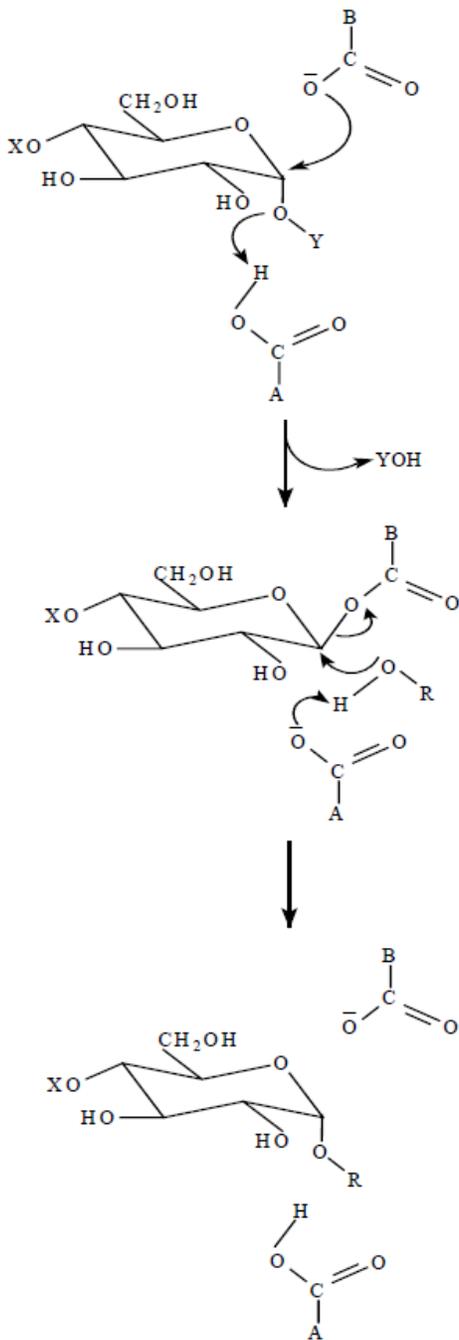


Figura 3.5. Mecanismo de acción para las enzimas del clan GH-H, el cual consiste en un doble desplazamiento. X puede ser un hidrógeno o la continuación de la cadena glucosídica. Y puede ser fructosa, glucosa o una cadena de residuos de glucosa. R puede ser hidrógeno, fosfato, fructosa o la continuación de la cadena glucosídica. A y B representan los remanentes de las estructuras de ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente. (Tomado de Ref. 39).

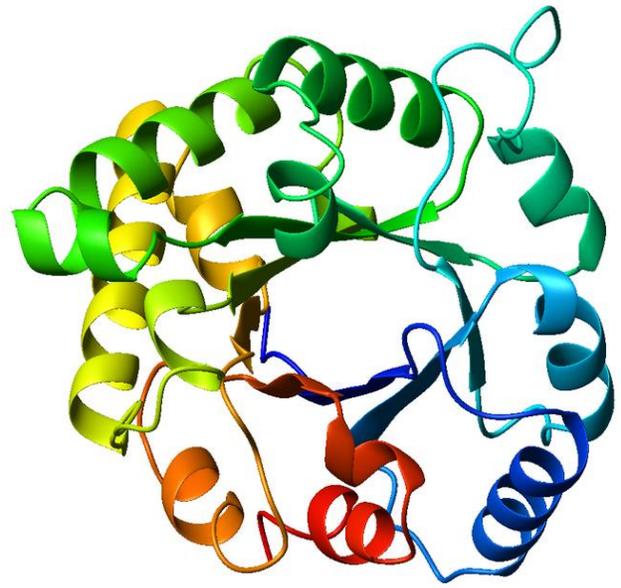


Figura 3.4. Estructura tridimensional de barril $(\alpha/\beta)_8$.

Esta estructura de barril TIM consiste en ocho láminas- β y ocho hélices- α que se alternan a lo largo de la cadena peptídica. Las láminas- β están prácticamente paralelas formando una especie de cilindro con las hélices- α rodeándolo. Los extremos C-terminal de las láminas- β están unidos a los extremos N-terminal de las hélices- α por asas irregulares, y también los extremos C-terminal de las hélices- α están unidos así a los N-terminales de las láminas- β adyacentes (Figura 3.4).

Se piensa entonces que las enzimas del clan GH-H realizan la catálisis por un mecanismo común que incluye un residuo de aspartato en el C-terminal de la lámina β_4 actuando como nucleófilo y un residuo de ácido glutámico al final de la lámina β_5 que presenta un comportamiento ácido-base. En esta catálisis parece requerirse un

tercer residuo ácido, un ácido aspártico situado cerca del C-terminal de la lámina β 7. Este residuo parece importante para mantener el correcto estado de ionización permitiendo la formación de un puente de hidrógeno con el residuo de glucosa del sustrato.

El mecanismo de hidrólisis más aceptado para la familia de α -amilasas es el de doble desplazamiento, en el que el residuo de ácido glutámico en la lámina β 5 dona un protón al oxígeno del residuo glucosídico resultando en un enlace. El segmento hidrolizado deja el sitio activo y la glucosa se estabiliza con un hidrógeno proveniente del ácido aspártico localizado después de la lámina β 7, viéndose posiblemente involucrados también los grupos hidroxilo del C3 y del C2 de la glucosa (Figura 3.5).

Tras la estabilización lograda con la formación del enlace covalente entre el C1 de la glucosa y el aspartato (nucleófilo) de la lámina β 4, la enzima facilita la aproximación de un segundo sustrato (proceso no bien especificado) y procede el segundo desplazamiento, que puede entenderse como que la reacción es llevada a cabo en reversa. El intermediario formado por el enlace covalente entre C1 y el nucleófilo se rompe, el glutamato en la lámina β 5 se vuelve a protonar por la remoción de un hidrógeno del segundo sustrato y un nuevo enlace α es formado entre la glucosa y el segundo sustrato. Al final la configuración permanece como α .

Por tanto, las enzimas del clan GH-H comparten una estructura tridimensional del dominio catalítico, un mecanismo de acción para la hidrólisis y todas requieren de un sustrato con un residuo de glucosa en configuración α . Sin embargo, la familia 13 tiene características peculiares. El módulo catalítico es, en efecto, un barril $(\alpha/\beta)_8$ seguido por un dominio formado por laminas β y asas irregulares, pero el asa 3 que conecta a la lámina- β 3 con la hélice- α 3 del barril suele ser más larga y por su estructura tridimensional podría considerarse como una unidad independiente, es decir, el dominio B. Además, en el extremo C-terminal del barril se encuentra el dominio C, conformado por láminas β antiparalelas, que forman una estructura de sándwich que posiblemente estabilice al dominio catalítico al proteger los residuos hidrofóbicos de este ⁽⁷⁾.

Algunas de estas enzimas presentan, además de los dominios A, B y C, un dominio N-terminal (Dominio N), como en las isoamilasas, o dominios adicionales como láminas β después del Dominio C (Dominios D y E), como en las CGTasas (Figura 3.6), en las que el

dominio D es característico y está conformado por siete u ocho láminas β antiparalelas que forman una estructura de barril y, aunque la función de este se desconoce, se especula que puede intervenir en la unión a carbohidratos⁽⁸⁾.

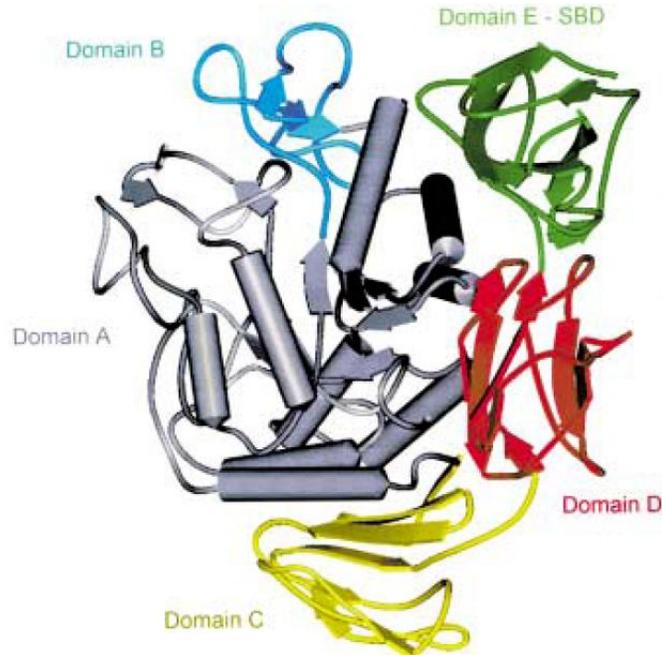


Figura 3.6. Estructura tridimensional de una ciclodextringlucosil transferasa, que contiene los dominios A, B, C, D y E.

El dominio E es un módulo no catalítico que está presente en tan solo un 10% de las enzimas amilolíticas, usualmente en α -amilasas de la familia 13, en ciertas β amilasas de la familia 14 y en la mayoría de las glucoamilasas de la familia 15. La estructura de este dominio consiste en varias láminas β que forman un barril abierto β -distorsionado, que le proporciona a la enzima la capacidad de unirse al almidón insoluble⁽⁸⁾ facilitando su degradación y se ha denominado dominio de fijación al almidón (DFA)⁽⁹⁾.

Los DFA han sido clasificados de acuerdo a su estructura primaria en la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active enzymes Database)⁽³³⁾ y se encuentran distribuidos en siete diferentes familias de Módulos de Unión a Carbohidratos (MUC): MUC20, MUC21, MUC26, MUC34, MUC41, MUC45 y MUC53. Los MUC son secuencias de aminoácidos contenidas en una enzima (la cual presenta actividad catalítica sobre carbohidratos), con un enrollamiento discreto y con capacidad de unión a carbohidratos. Los MUC eran clasificados como módulos de unión a celulosa debido al descubrimiento inicial de muchos módulos de este tipo, pero

posteriormente, el término MUC involucró a diversas proteínas que se unen específicamente a diferentes carbohidratos como quitina, xilano, mananos, almidón, pululano, etc., y se clasificaron entonces con respecto a sus secuencias primarias en 64 familias. Los MUC también pueden estar presentes como módulos sencillos, dobles o triples, de 30 a 200 aminoácidos cada uno, en los extremos amino o carboxilo terminales ^(33, 10).

Específicamente, el DFA es un dominio independiente del sitio activo de la enzima, casi siempre ubicado en el extremo C-terminal, aunque hay excepciones como en la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* y en la α -amilasa de *Thermoactinomyces vulgaricus*, en las que se encuentra en el extremo N-terminal ⁽¹⁰⁾. Los DFA confieren a la enzima tres funciones principales: 1) Permiten la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima en solución, 2) llevan el sustrato al sitio activo en el dominio catalítico y 3) en algunos casos pueden desestabilizar la superficie de los gránulos de almidón ⁽²¹⁾.

3.1.3 α -Amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

Las bacterias ácido lácticas son muy utilizadas en procesos industriales por muchas razones. Entre ellas están que su crecimiento puede llevarse a cabo con a pH bajo, debido al ácido láctico que producen, lo cual es en sí un efecto deseable, pues inhibe el crecimiento de otros microorganismos incluyendo los patógenos comunes. La producción industrial de ácido láctico es uno de los procesos más importantes en la actualidad, pues sus usos en la industria alimenticia y farmacéutica son variados, desde potenciador de sabor hasta como conservador o incluso como materia prima para la fabricación de plásticos sintéticos biodegradables, siendo una gran ventaja el uso de material de desecho de la agricultura como sustrato para los microorganismos. Para la producción del ácido láctico a partir de materiales como el almidón crudo se requiere que estos sean gelatinizados, hidrolizados a glucosa y posteriormente fermentados a ácido láctico. Evidentemente, si una bacteria puede realizar todo el proceso en un menor número de pasos significaría una ganancia económica importante, y es posible que este proceso pueda ser llevado a cabo por una bacteria ácido láctica ⁽¹²⁾.

Algunos de los géneros que conforman al grupo de bacterias ácido lácticas son: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Entre estos

Lactobacillus es el género más grande e incluye alrededor de 80 especies reconocidas. En general, las bacterias ácido lácticas varían en taxonomía, pero típicamente son Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, desprovistos de citocromo, anaeróbicos pero aerotolerantes, ácido tolerantes y productores de ácido láctico como mayor producto de la fermentación del azúcar. Sin embargo, en ciertas condiciones, pueden no presentar todas estas características. Además, por la producción de ácido láctico, pueden ser clasificadas como homofermentativas (producen más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa) y heterofermentativas (producen alrededor de 50% de ácido láctico a partir de glucosa). ⁽¹²⁾.

Dentro del grupo de bacterias ácido lácticas podemos encontrar a los lactobacilos ácido láctico amiloíticos, los cuales están relacionados con la fermentación de cereales y han sido aislados de éstas. Incluso, en algunos casos, se ha realizado la producción de ácido láctico en un sólo paso a partir de dichas fermentaciones. Algunas bacterias encontradas de esta forma son *Lactobacillus plantarum*, que fue aislado de fermentaciones de manioca en África o de pescado fermentado y arroz en Filipinas ^(13,14); varias cepas de *Lactobacillus manihotivorans* aisladas también de fermentaciones de almidón de manioca en Colombia ⁽¹⁵⁾. Otro caso es el de *Lactobacillus fermentum* aislado de maíz en Benin, Africa ⁽¹⁶⁾; y *Lactobacillus amylovorus* y *Lactobacillus amylophilus* aislados de desperdicios de fermentaciones de maíz en USA ⁽¹⁷⁾.

En estudios posteriores se observó que las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans* hidrolizan el almidón crudo y, al analizar las secuencias de las enzimas, se encontró que tienen un 98% de identidad entre ellas ⁽¹⁸⁾. Estas α -amilasas, inusualmente grandes (alrededor de 100 KDa y 900 aa), presentan una estructura organizada en dos dominios funcionales: un dominio catalítico y un DFA. Al transferir los primeros 410 aminoácidos de la α -amilasa de *L. amylovorus* a una cepa no amilolítica de *L. plantarum* se transfirió también la capacidad de hidrólisis del almidón soluble, por lo cual se comprobó que la parte N-terminal de la enzima corresponde al dominio catalítico ⁽¹⁹⁾. Sin embargo, la enzima perdió la capacidad de hidrolizar el almidón insoluble debido a que ya no puede fijarse al gránulo. Se concluyó entonces que la mitad C-terminal corresponde al dominio responsable de la adsorción al almidón ⁽¹⁸⁾.

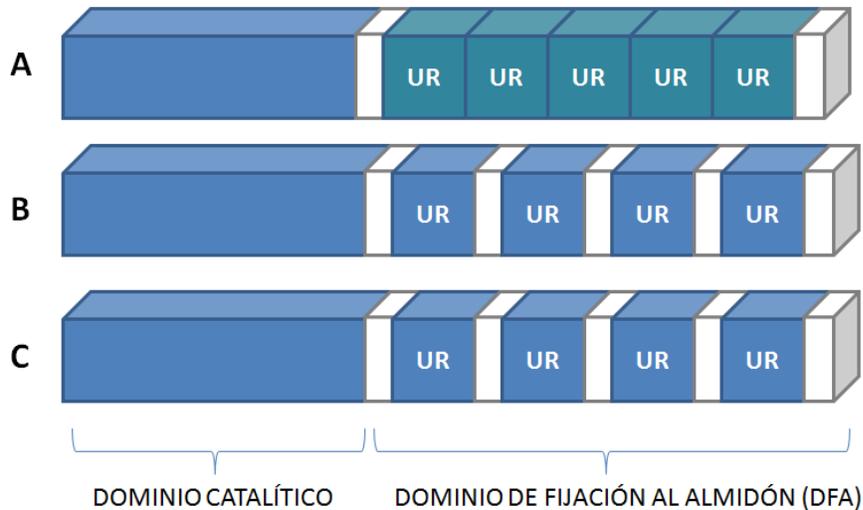


Figura 3.7. Esquema comparativo de las α -amilasas de A: *L. amylovorus*, B: *L. plantarum* y C: *L. manihotivorans*. Podemos observar en azul las URs y en blanco regiones ricas en serinas y treoninas. Para *L. amylovorus* el DFA está conformado por cinco URs unidas de manera directa.

El extremo C-terminal está constituido por unidades repetidas (UR), las cuales son idénticas y organizadas en tándem de 91 aminoácidos cada una. Para el DFA de *L. manihotivorans* y de *L. plantarum* el dominio está constituido por cuatro UR, rodeadas de dos regiones ricas en serinas y treoninas que se repiten entre cada UR. Sin embargo, para *L. amylovorus* el DFA se compone de cinco UR y las regiones ricas en serinas y treoninas solo se encuentran al inicio y al final del dominio (Figura 3.7) ^(19,20).

Por otro lado, para entender si las 5URs actuaban en conjunto o como unidades separadas se clonaron los fragmentos del gen que codifican para 1, 2, 3, 4, y 5URs. Se comprobó que una UR es capaz de adsorberse al almidón ⁽²⁴⁾ y que la adsorción se incrementa con el número de URs presentes ⁽²⁵⁾.

Como se mencionó anteriormente, por su secuencia de aminoácidos los DFA de las α -amilasas de los lactobacilos mencionados se clasifican en la familia CBM26 de los MUC. El mecanismo propuesto para la adsorción se basa en el único estudio estructural realizado en esta familia, con la α -amilasa formadora de maltohexosa de *Bacillus halodurans*. Se observó que a diferencia de la mayoría de DFAs, que poseen dos sitios de unión al sustrato ⁽²³⁾ el MUC26 posee únicamente un sitio de unión al almidón ⁽²²⁾, formado básicamente por un triptófano (W36) y una tirosina (Y25) que establecen interacciones hidrofóbicas con los anillos de piranosa del almidón, mientras que los residuos de triptófano (W23), glutamina (Q71), glicina

(G76) y glutamato (E77) contribuyen a estabilizar el complejo con puentes de hidrógeno (Figura 3.8) ⁽²¹⁾.

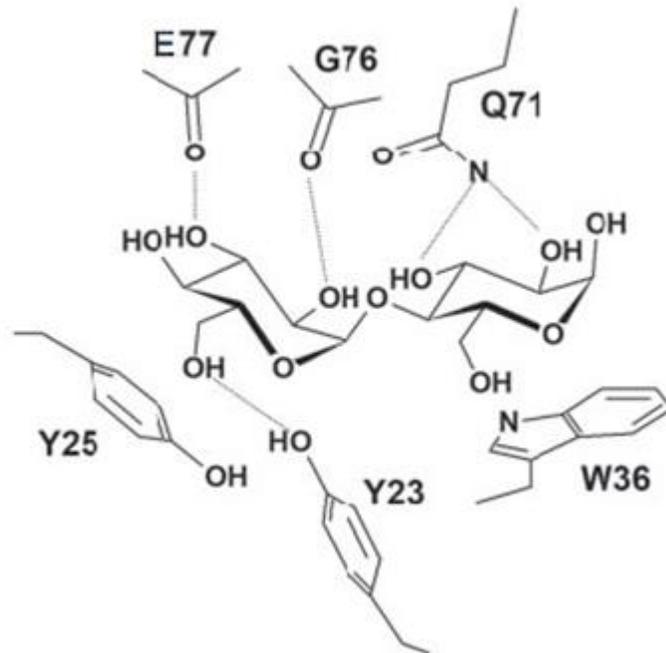


Figura 3.8. Esquema de las interacciones del MUC26 de la α -amilasa formadora de maltohexosa de *Bacillus halodurans* con maltosa (Tomado de Ref. 22).

Para comprender la absorción del DFA de *L. amylovorus* al almidón, se han realizado diferentes estudios. En uno de ellos se demostró que, al eliminar las 5UR de la α -amilasa, la enzima perdió la capacidad de hidrolizar el almidón insoluble debido a que ya no puede fijarse al gránulo. Se concluyó entonces que las 5URs forman al dominio responsable de la adsorción al almidón ⁽¹⁷⁾. Por otro lado para entender si las 5URs actuaban en conjunto o como unidades separadas se clonaron los fragmentos del gen que codifican para 1, 2, 3, 4 y 5UR. Se comprobó que una UR es capaz de adsorberse al almidón ⁽²³⁾ y que la adsorción se incrementa con el número de UR presentes ⁽²⁴⁾. Estos datos sugerían que el dominio de fijación al almidón puede ser usado como un tallo para inmovilizar proteínas al almidón o a polisacáridos semejantes.

3.2 Tallos de purificación.

Un tallo de purificación es una secuencia peptídica con afinidad por un ligando, que puede ser aprovechada para facilitar la purificación de cualquier proteína fusionada a dicho tallo. Así mismo, la secuencia fusionada a la proteína puede proporcionar una o varias de las siguientes características: Aumento de la solubilidad, permitir la detección de la proteína o movilizarla a algún compartimiento celular o promover la expresión. Idealmente un tallo de purificación debe cumplir con las siguientes características ⁽²⁶⁾:

1. Mínimo efecto en la estructura terciaria y en la actividad de la proteína de interés.
2. De eliminación fácil y sencilla para la obtención de la proteína nativa.
3. La metodología a seguir en la purificación debe ser simple y específica.
4. Debe tener aplicación con diversas proteínas.

La mayoría de los tallos de purificación han sido desarrollados en los últimos años y pueden dividirse en tres clases diferentes. La primera clase incluye los tallos en los que el péptido o proteína de fusión se une a una molécula pequeña unida a un soporte sólido, como un metal inmovilizado en sefarosa. La segunda clase se constituye por los tallos en los que la secuencia peptídica se une a su ligando específico inmovilizado en una resina. Y la tercera puede considerarse como una unión del tipo de la segunda clase, pero el ligando inmovilizado en resina debe ser un anticuerpo que reconoce la secuencia peptídica del tallo específicamente ⁽²⁷⁾.

Sin embargo, a pesar del diseño o especificidad de un tallo, no es posible saber cual funcionará mejor para un experimento específico, pues depende de diversos factores como la estabilidad o hidrofobicidad de la proteína de interés, incluso de características del tallo como el costo de la matriz o si es necesaria la remoción del tallo tras la purificación, la escalabilidad y la expresión del péptido o proteína de fusión; por ello, es posible que deban probarse varios tipos de tallos. Sin embargo, incluso los tallos de purificación más utilizados o los más eficientes muestran ciertas desventajas. Una muy común entre todos ellos es el costo de la matriz de purificación o el del eluyente. En la Tabla 3.1 comparamos los costos de las matrices de algunos tallos de purificación, unos muy frecuentemente usados en la purificación de proteínas y otros más usados en la identificación. Dichos costos solamente representan el valor de la

matriz con la cual tienen afinidad, para obtener un costo total de los sistemas debiera considerarse también el costo del eluyente, aunque cabe mencionar que algunos eluyentes además de costosos presentan cierta toxicidad, lo cual es importante al seleccionar un tallo de purificación.

Tallo de Purificación	Casa productora	Matríz	Costo
MBP	Biolabs	Amilosa	\$863.00/100 mL
His	Qiagen	Ni-NTA	\$853.00/100 mL
GST	Amersham	Glutati3n-Sefarosa	\$1935.00/100 mL
CBP	Stratagene	Resina de afinidad a Calmodulina	\$2717.00/100 mL
HPC	Roche	Proteína C	\$747.00/1 mL
c-myc	Roche	Anti C-myc	\$1293.00/1 mL
DFA	-----	Almid3n	\$3.00/100 mL sol. 10%

Tabla 3.1. Relaci3n de costos de las matrices utilizadas en los sistemas m3s comunes de purificaci3n por medio de tallos de afinidad. En la 3ltima fila podemos observar el costo del almid3n, el cual podr3a ser utilizado como matriz de afinidad para el DFA. Los costos est3n dados en d3lares haciendo referencia a su casa productora en el 2011.

A la fecha, existen dos referencias en las cuales DFAs han sido utilizados como tallos de purificaci3n para prote3nas recombinantes. Tal es el caso de la β -galactosidasa con el DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus* ⁽³⁷⁾ y la fusi3n entre el DFA de la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* con la prote3na verde fluorescente (eGFP) ⁽³⁸⁾. En ambos casos, la recuperaci3n de la prote3na de fusi3n es posible, ocurre una uni3n fuerte y espec3fica de las prote3nas de fusi3n utilizando almid3n crudo como matriz de adsorci3n, lo que establece que el almid3n puede ser una herramienta muy favorable por su bajo costo (Tabla 3.1), porque es un pol3mero muy estable, no t3xico y es de f3cil recuperaci3n por centrifugaci3n o sedimentaci3n a partir de extractos crudos de c3lulas ⁽³⁷⁾.

Estas cualidades del almid3n pueden ser igualmente funcionales en la purificaci3n de la prote3na de fusi3n que se generar3 en este proyecto. La prote3na ser3 producida en *Escherichia coli* y, a partir del extracto celular crudo, puede ser posible la adsorci3n de la misma al almid3n de manera selectiva por medio del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* y elu3rla posteriormente por competencia. Esto significar3a un m3todo econ3mico

de purificación y muy eficiente para la obtención de proteínas que pudieran tener usos para consumo humano o como proceso industrial a gran escala, pues el costo y la inocuidad del almidón son factores que representan una gran ventaja sobre otros métodos de purificación mencionados.

3.3 Fragmento C de la Toxina del Tétanos.

El tétanos es una toxi-infección causada por la bacteria *Clostridium tetani*, un bacilo largo y Gram positivo que tiene la capacidad de formar esporas terminales y deformantes, factor importante en la diseminación de la enfermedad. Generalmente es posible encontrar al bacilo o sus esporas en el ambiente y la infección es causada tras la contaminación de heridas o por un traumatismo severo en el cual existen condiciones anaerobias, las esporas germinan y el bacilo produce la toxina. El tétanos es una enfermedad grave, que causa la muerte en la mayoría de los casos si no existe inmunización previa.

El bacilo es capaz de producir dos toxinas: tetanolisina y tetanospasmina, esta última es también llamada simplemente toxina del tétanos y es la causante de los síntomas característicos de la enfermedad como espasmos o contracciones musculares incontroladas que pueden ocasionar fracturas de huesos largos y los signos representativos de la enfermedad, los opistótonos y la risa sardónica. Es de las sustancias más letales que existen en el mundo, con un valor de dosis letal estimado de 2.5 ng/kg, por tanto son suficientes 175ng para causar la muerte a un adulto de 70kg ⁽³⁶⁾.

La toxina actúa a nivel de la unión neuromuscular evitando la secreción regular de neurotransmisores y, de esa forma, inhibe la transmisión de señales, específicamente las de relajación muscular. Estructuralmente la toxina es una proteína de aproximadamente 150kDa formada por una cadena ligera y una cadena pesada unidas por un puente disulfuro (Figura 3.9). La cadena ligera de 50kDa actúa como una endopeptidasa dependiente de zinc. La cadena pesada contiene dos dominios funcionales, cada uno de aproximadamente 50kDa. El dominio en el extremo amino terminal está relacionado con la translocación de la toxina en el interior de las motoneuronas y el extremo carboxilo terminal es el responsable de la unión a

gangliósidos, lo cual es de gran importancia para la unión con la célula blanco y la internalización (28).

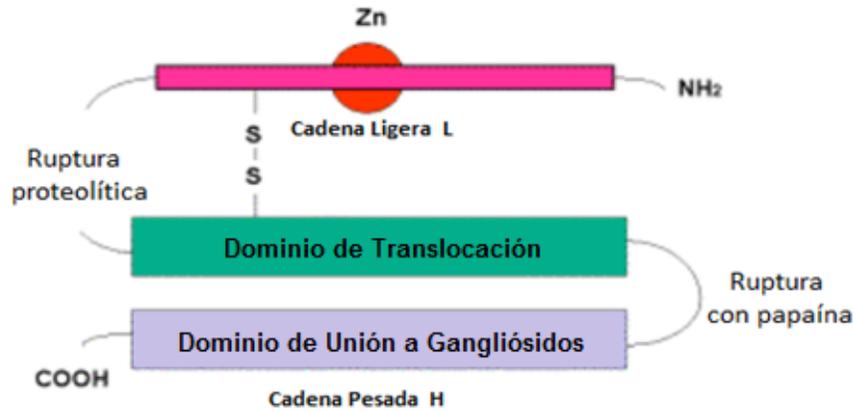


Figura 3.9. Esquema que representa la estructura de la toxina del tétanos. En rosa se observa la cadena ligera, una endopeptidasa dependiente de Zinc unida por un puente disulfuro a la cadena ligera, en verde y azul, formada por los dominios de translocación y el de unión a gangliósidos.

La toxina es liberada al medio durante la autólisis de la bacteria y, por hidrólisis por proteasas, resulta en la cadena pesada y la cadena ligera unidas por un puente disulfuro. Pero si la proteína es tratada con papaína se liberan dos fragmentos de aproximadamente 50 kDa cada uno: el fragmento B, el cual está compuesto por parte de la cadena ligera y la parte amino terminal de la cadena pesada, y el fragmento C, que representa la región carboxilo terminal de la cadena pesada, que a su vez está compuesto por dos subdominios prácticamente del mismo tamaño, H_{CN} y H_{CC} (Figura 3.10). H_{CC} es el responsable de la unión neuroespecífica y la

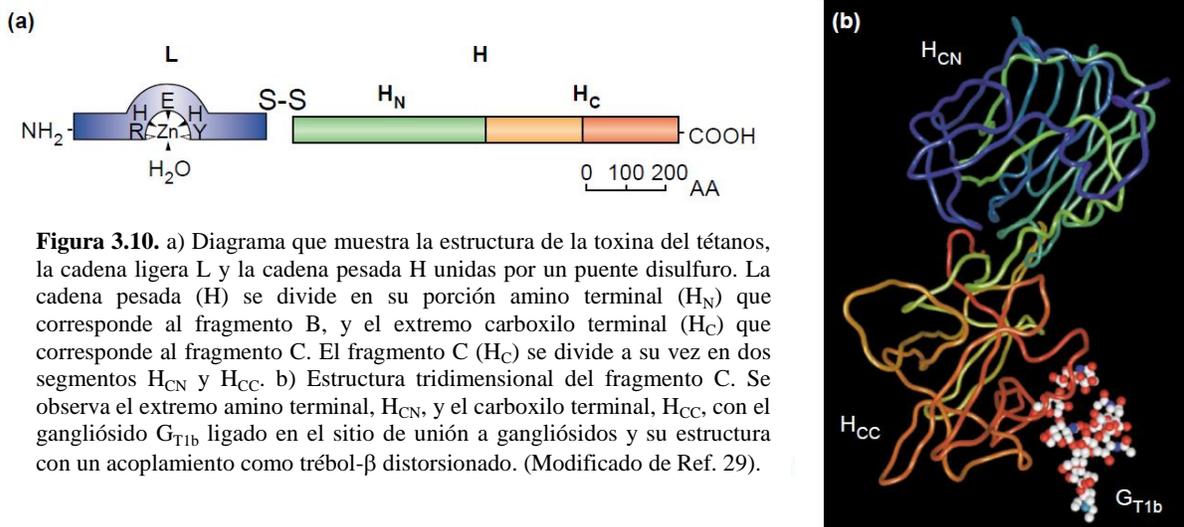


Figura 3.10. a) Diagrama que muestra la estructura de la toxina del tétanos, la cadena ligera L y la cadena pesada H unidas por un puente disulfuro. La cadena pesada (H) se divide en su porción amino terminal (H_N) que corresponde al fragmento B, y el extremo carboxilo terminal (H_C) que corresponde al fragmento C. El fragmento C (H_C) se divide a su vez en dos segmentos H_{CN} y H_{CC} . b) Estructura tridimensional del fragmento C. Se observa el extremo amino terminal, H_{CN} , y el carboxilo terminal, H_{CC} , con el gangliósido G_{T1b} ligado en el sitio de unión a gangliósidos y su estructura con un acoplamiento como trébol- β distorsionado. (Modificado de Ref. 29).

internalización de la toxina y posiblemente H_{CN} tenga influencia en el transporte retrógrado, mecanismo por el cual la toxina viaja a través de la neurona ⁽²⁹⁾.

El fragmento C, debido a sus funciones en la actividad de la toxina, ha sido utilizado para transportar ADN y enzimas dentro de las neuronas con objetivos terapéuticos⁽⁴⁰⁾. Además se ha comprobado que es inmunogénico pero atóxico⁽⁴¹⁾, por lo cual también existen trabajos en los que se pretende generar vacunas contra el tétanos que no requieran de la toxina completa inactivada^(42,43), es decir, sustituir al toxoide del tétanos que, aquí en México, se administra en la vacuna difteria-pertusis-tétanos (DPT)⁽⁴³⁾. Dichos estudios han tenido mucho éxito y se ha comprobado que el fragmento C es capaz de proporcionar protección en contra de la enfermedad ⁽⁴⁸⁾.

Además de lo anterior, el fragmento C es un polipéptido modelo debido a que su estructura es conocida, es una proteína inmunológicamente detectable, su estructura es estable y con un peso adecuado para hacer diversos ensayos, de hecho, al igual que con el toxoide, el fragmento C ha sido utilizado para probar acarreadores como nanopartículas, nanotubos, esporas o bacterias atenuadas con el objetivo de evaluar otras vías de administración de vacunas u otras biomoléculas, como las vías oral y nasal. Ejemplos de estos nano y biosistemas son: los liposomas⁽⁴⁴⁾, las cápsulas de quitosan⁽⁴⁵⁾, células vegetales⁽⁴⁶⁾, bacterias como *Lactobacillus plantarum*⁽⁴⁷⁾ y *Salmonella* ⁽⁴⁹⁾ y esporas de *Bacillus subtilis*⁽⁴⁸⁾.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo General.

Estudiar la capacidad de un dominio de fijación al almidón para ser utilizado como dominio de purificación de proteínas recombinantes sobre almidón.

4.2 Objetivos Particulares.

Fusionar el Fragmento C de la toxina del tétanos, una proteína modelo, a un DFA derivado de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*.

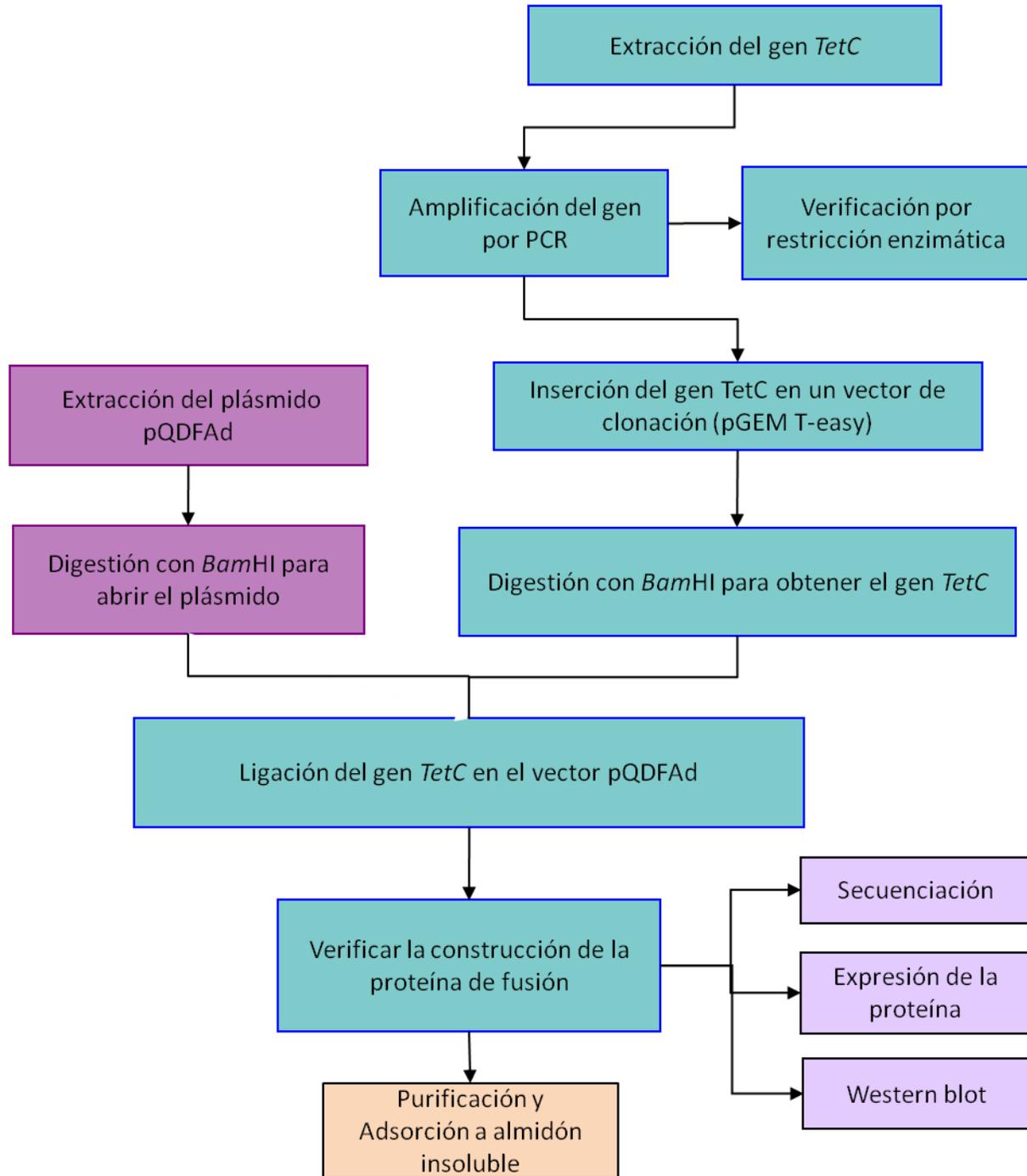
Evaluar la capacidad de unión del DFAd fusionado al fragmento C de la toxina del tétanos.

Evaluar la eficiencia de purificación del sistema sobre gránulos de almidón.

5. Metodología.

5.1 Estrategia general.

En el siguiente diagrama de flujo se describe la estrategia general para la realización del proyecto:



5.2 Material Biológico.

Durante el desarrollo de este proyecto utilizamos diferentes microorganismos y plásmidos para la amplificación y clonación del gen correspondiente al fragmento C de la toxina del tétanos, así como para la expresión de la proteína de fusión construida. En la siguiente tabla presentamos dichas herramientas y sus principales características:

	Nombre	Descripción
Microorganismo	<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa comercial que permite distinguir cepas con inserto y sin inserto debido a la actividad de β -galactosidasa por complementación. Genotipo: F' <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(<i>r_k⁻ m_k⁺</i>), λ⁻</i>
	<i>E. coli</i> XL-1 Blue	Cepa comercial que funciona bien para la transformación de plásmidos. Permite la diferenciación de colonias debido a la actividad de β -galactosidasa por complementación. Ideales para la recuperación de plásmido por miniprep por ser deficiente en endonucleasa. Genotipo: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)].
	<i>E. coli</i> XL10-Gold	Cepa comercial, creada para la transformación con gran eficiencia de moléculas grandes de DNA. Permite la discriminación de colonias debido a la actividad de β -galactosidasa por complementación y la extracción eficiente de DNA con miniprep. Genotipo: Tet ^r Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]ª
Vector	pBR327-TTC	Plásmido otorgado al laboratorio que contiene el gen <i>TetC</i> completo y una parte del Fragmento B sin alteraciones (Figura 5.1.D).
	pGEM-T easy	Vector comercial marca Promega de alto número de copias, especial para la clonación de productos de PCR (Figura 5.2).
	pQE31	Vector comercial marca QIAGEN, útil en la expresión de proteínas. Permite la fusión a un tallo de seis histidinas (6xHis) y aporta resistencia a ampicilina (Figura 5.3).
	pQDFAd	Vector pQE-31 al cual le fue insertado el DFAd en el sitio de clonación múltiple, desde <i>Bam</i> HI hasta <i>Hind</i> III. Este vector permite la ligación de un inserto con el DFAd en marco de lectura utilizando el sitio <i>Bam</i> HI y conserva características del vector pQE-31 como la resistencia a ampicilina (Figura 5.4).
	pGTTC	Plásmido resultante de la ligación de <i>TetC</i> al vector pGEM-T easy, por lo cual posee las mismas características que dicho vector, salvo que el gen que codifica para la β -galactosidasa se encuentra interrumpido (Figura 6.4)
	pQTTC	Plásmido resultante de la ligación de <i>TetC</i> al vector pQE-31, codifica para la proteína control (Figura 6.6).
	pQTTC-DFAd	Vector resultante de la ligación de <i>TetC</i> con el vector pQ-DFAd. Este vector es el que codifica para la proteína de fusión completa, conserva las características del vector pQE-31 (Figura 6.6)
Oligonucleótido	TetB _r -Bam	Oligonucleótido <i>forward</i> sintetizado según la parte final de la secuencia del Fragmento B de la toxina del tétanos y el inicio del Fragmento C. La siguiente es su secuencia con el sitio <i>Bam</i> HI insertado subrayado: 5' TCAACACCAATGGATCCATTTTCT 3'
	TTCr-BamII	Oligonucleótido <i>reverse</i> sintetizado según la parte final de la secuencia del Fragmento C de la toxina del tétanos. La siguiente es su secuencia con el sitio <i>Bam</i> HI insertado subrayado: 5' GATGAAGGATGGGATCCGATTAA 3'
	pQEIII/IV	Oligonucleótido <i>forward</i> , marca Qiagen utilizado para secuenciar el inserto en el vector pQTTC-DFAd, derivado del vector pQE31. Secuencia: 5' CGGATAACAATTCACACAG 3'
	Seq9	Oligonucleótido <i>reverse</i> marca Qiagen utilizado para secuenciar el inserto en el vector pQTTC-DFAd, derivado del vector pQE31. Secuencia: 5' GCCGATACCAGCAGTTCATC 3'

Tabla 5.1. Relación de materiales biológicos utilizados en este proyecto. Se muestran primero las cepas de *E. coli* utilizadas, seguidas por los plásmidos que fueron otorgados, adquiridos comercialmente o construidos en el laboratorio. Además también se enlistan los oligonucleótidos utilizados, tanto los diseñados en el laboratorio como los comerciales para subsecuentes secuenciaciones.

5.3 Ensayos a Nivel DNA

En la primera parte del proyecto se utilizaron técnicas dirigidas a la construcción de la proteína de fusión TTC-DFAd. Como primer paso se realizó la obtención del gen *TetC*, después su amplificación por PCR, posteriormente, *TetC* se ligó a un vector de clonación y, como parte final, subclonamos el fragmento a un vector de expresión que contenía el DFAd. A continuación describiremos como fue llevado a cabo el proceso.

5.3.1 Obtención del Fragmento C de la Toxina del Tétanos.

Se realizó un análisis de restricción de cuatro plásmidos que contenían diferentes fragmentos de la toxina tetánica y que fueron gentilmente otorgados al laboratorio por María Elena Munguía (Ozuna, J. 1989) (Figura 5.1).

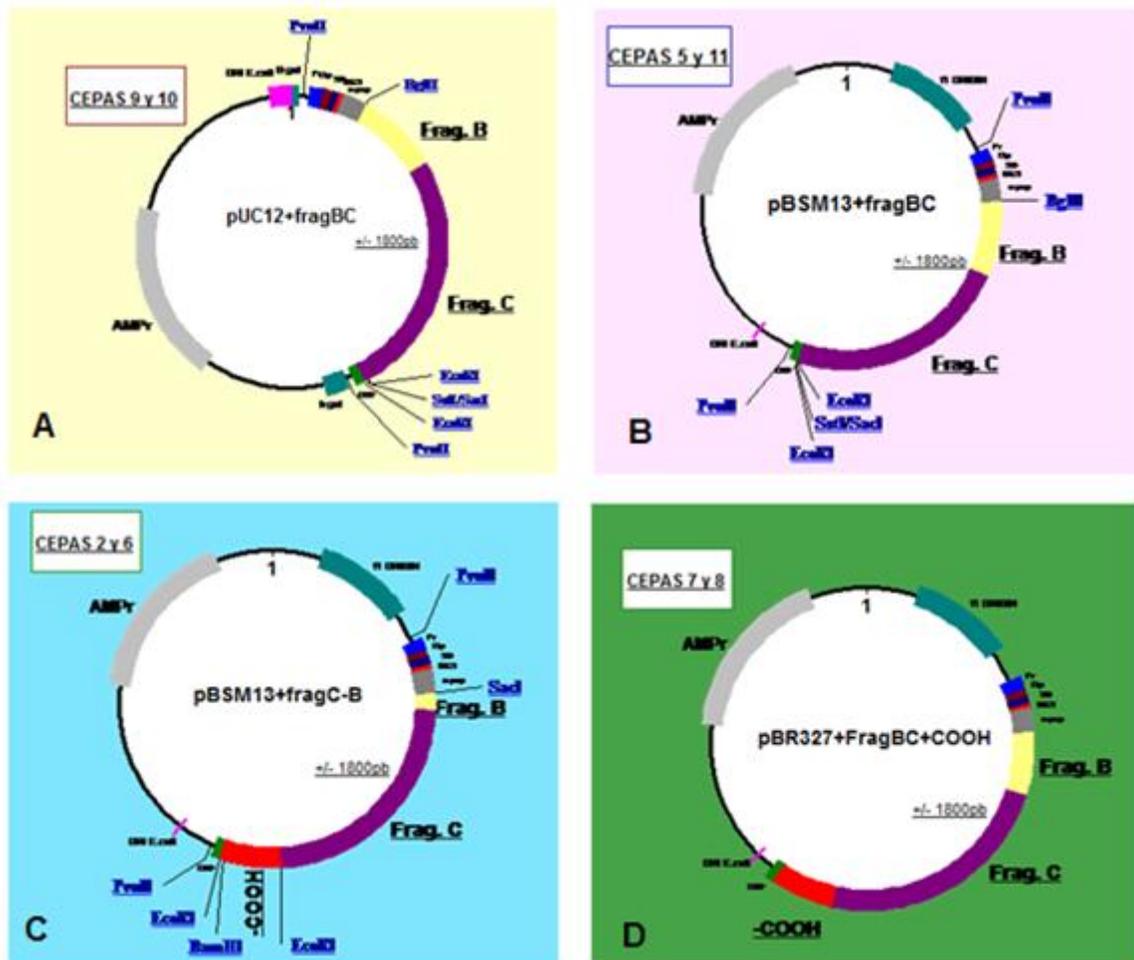


Figura 5.1. Mapas de restricción para los plásmidos otorgados al laboratorio para la realización de este proyecto. A y B. Vector pUC12+fragBC y Vector pBSM13+fragBC, respectivamente, contienen las secuencias codificantes del fragmento B incompleto y el fragmento C sin extremo carboxilo terminal. C. Vector pBSM13+fragC-B, contiene las regiones de DNA que codifican para una sección del fragmento B y el fragmento C incompleto. D. Vector pBR327+FragBC+COOH, contiene las secuencias codificantes para una porción del fragmento B y el fragmento C completo.

Se extrajo DNA plasmídico de cultivos de *E. coli* en medio LB (Apéndice A) utilizando el método de extracción por lisis alcalina descrito en el Apéndice B.1 y realizamos las digestiones necesarias con enzimas de restricción (utilizando la metodología del proveedor en cada caso), de manera que el patrón de bandeo observado en geles de agarosa (Apéndice B.2) coincidiera con los tamaños de DNA esperados.

5.3.2 Amplificación y Ligación en pGEM-T easy.

A partir de la secuencia de la toxina del tétanos reportada en el Genbank ⁽³⁵⁾ se diseñaron oligonucleótidos que, además de amplificar el gen *TetC* completo, insertaran sitios de restricción de la enzima *Bam*HI al inicio y al final del gen, de manera que más adelante fuera posible ligar el inserto en pQ-DFA. En la Tabla 3.1 podemos ver la secuencia de los oligonucleótidos diseñados: TetB_r-Bam y TTCr-BamII.

Utilizamos la técnica de PCR en gradiente de temperatura para la amplificación del gen *TetC*, técnica en la cual se prueban diferentes temperaturas de alineamiento en un mismo ensayo con el objetivo de optimizar la amplificación del gen de interés. Las condiciones utilizadas se muestran en la Figura 5.2 y la mezcla de reacción fue preparada como se indica en la Tabla 3.2:

Componentes y concentración final	
Cocktail Enzimático	Buffer enzima Taq polimerasa 1X, MgCl ₂ 1mM, Primers 0.5pmol/μL, Agua a volumen de reacción.
ADN	5ng/μL por reacción.
Enzima y dNTP	Agregar una mezcla de dNTP a 0.2mM y enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) a 0.1U/μL

Tabla 5.2. Mezcla de reacción preparada para realizar la PCR.

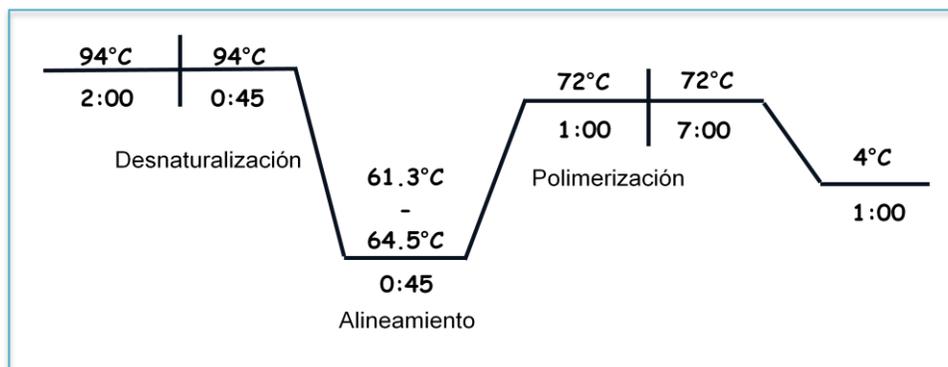


Figura 5.2. Esquema que muestra las condiciones utilizadas en la PCR en gradiente de temperatura.

El producto de PCR utilizado para inserción en un vector de clonación se obtuvo cortando la banda correspondiente al gen amplificado de un gel de agarosa (Apéndice B.3) y purificándolo con el kit de purificación de DNA de gel (Qiagene). Se decidió utilizar al plásmido pGEM-T easy (Figura 5.3) para la clonación del gen amplificado debido a que este plásmido permite ligar insertos a sus timinas terminales, debido a que el amplicón (producto de PCR) tiene adeninas añadidas por la enzima Taq polimerasa utilizada en ambos extremos. Otra ventaja es que cuando un gen es insertado en el plásmido, el gen *lacZ* (que codifica para la β -galactosidasa) se interrumpe, de tal manera que, al agregar un análogo de la lactosa (IPTG) y el sustrato sintético X-gal, no observamos coloración azul en las colonias y, cuando no hay inserto ligado, se observan colonias azules debido a la acción de la enzima β -galactosidasa sobre el X-gal.

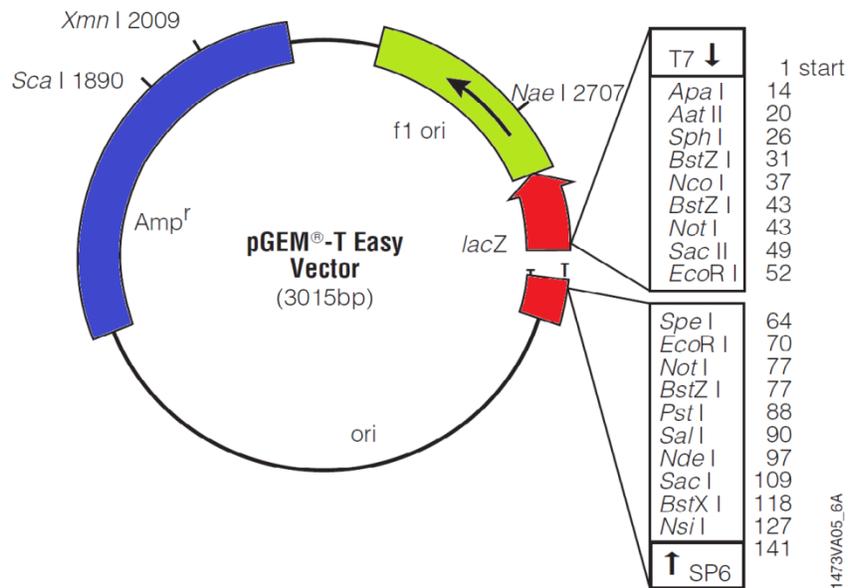


Figura 5.3. Diagrama que describe al plásmido pGEM-T easy. Observamos el sitio de ligación para el inserto, así como el sitio de clonación múltiple y los genes *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa y el gen de resistencia a ampicilina *Amp^r*.

Para realizar la ligación del gen *TetC* en el vector se utilizó la técnica descrita por el proveedor, la cual consiste en preparar la mezcla de reacción con el amplicón, buffer y enzima ligasa a las concentraciones indicadas e incubar toda la noche a 4°C.

El vector resultante de la ligación fue transformado en células competentes de *E. coli* *XL10 Gold* por medio de electroporación (Apéndice B.4) y el cultivo resultante se sembró en

placas de medio LB con ampicilina, X-gal e IPTG. Tras 24h de incubación a 37°C se picaron las colonias resultantes que no presentaran coloración azul y se inocularon en tubos con medio LB líquido con ampicilina. Al cultivo resultante se le extrajo plásmido (Apéndice B.1), el cual se purificó y se sometió a digestión con la enzima de restricción *Bam*HI, para encontrar clonas que tuvieran el plásmido con el inserto ligado. Al plásmido con el inserto ligado le llamaremos pGTTC.

5.3.3. Construcción del plásmido pQTTC-DFAAd.

Una vez ligado el gen *TetC* al vector pGEM-T easy se utilizaron los sitios de corte *Bam*HI insertados en su secuencia (Apéndice C) para obtener sitios cohesivos a los extremos del inserto. Se realizó la extracción del DNA plasmídico de un cultivo de 100 mL (Apéndice B.1b) de la cepa de *E. coli* XL10 Gold que contenía al vector pGTTC y también de un cultivo de la cepa *E. coli* DH5 α que contenía al vector pQDFAd. Se digirieron con la enzima *Bam*HI, linealizando los vectores y dejando sitios compatibles entre el vector pQDFAd y el inserto (Figura 5.4). Se corrieron ambas digestiones en geles de agarosa y se recuperaron las bandas de interés. Se purificaron ambos fragmentos y se midió la concentración de DNA en cada caso.

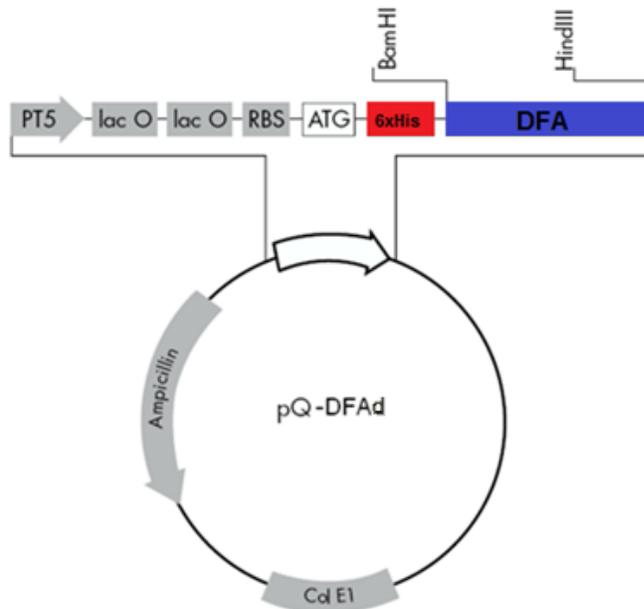


Figura 5.4. Diagrama que describe al vector pQDFAd. Observamos el sitio de restricción *Bam*HI donde se ligará el inserto, entre el tallo de histidinas y el DFA, así como el promotor del gen derivado del fago T5 (PT5), dos operadores del operón *lac* (*lacO*), el sitio de unión a ribosoma (RBS) y el codón de inicio (ATG). También se observan en el mapa la secuencia origen (*ColE1*) y la posición del gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin).

Se calculó la cantidad de DNA necesaria para realizar la ligación del inserto en el vector pQDFAd y se preparó la reacción como se menciona en la técnica indicada por el proveedor dejando incubar toda la noche a 4°C. Una vez terminada la incubación se electroporaron células de *E. coli* XL-10 Gold, se sembró el cultivo electroporado en placas y se hizo una selección de las colonias resultantes que se inocularon en tubos de medio LB con ampicilina. Se extrajo plásmido de estos cultivos y se analizó en geles de agarosa, en los cuales se esperaba observar ciertos patrones de bandas tras la digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Al vector con el inserto en marco de lectura se le denominó pQTTC-DFAd.

Se realizó la secuenciación del DNA de algunas clonas obtenidas utilizando los primers pQEIII y Seq9 (Tabla 3.1) para realizar un análisis con las secuencias teóricas y comprobar que no había errores en el marco de lectura de la proteína de fusión construida ni mutaciones que alteraran su estructura.

5.3.4. Construcción del plásmido pQTTC.

Con la finalidad de contar con la proteína TTC sola, como un control, se realizó la ligación del gen *TetC* al vector pQE-31. Para ello se digirió el vector pGTTC con la enzima *Bam*HI y se recuperó la banda correspondiente al gen *TetC* de un gel de agarosa. Se purificó el DNA obtenido y se realizó la ligación con el vector pQE-31 previamente digerido con la enzima *Bam*HI. Al vector resultante le llamamos pQTTC y, una vez electroporado en células de *E. coli* XL-10 Gold, se comprobó la ligación del fragmento por restricción enzimática y secuenciación.

5.4 Ensayos a nivel proteína

5.4.1 Expresión de la proteína de fusión TTC-DFAd.

Se preparó un preinóculo con la cepa *E. coli* XL10-Gold conteniendo el plásmido con la construcción pQTTC-DFAd en 5 mL de medio LB con ampicilina (Apéndice A.1) incubado a 29°C durante 12 h. A partir de este cultivo se inocularon tubos con 5 mL del mismo medio y se incubaron a 29°C. A las 12 h de incubación se realizó la inducción agregando IPTG a dos diferentes condiciones: 0.4 y 0.8 mM. Se tomaron muestras de cada tubo (500 µL de medio a las 0, 2, 4 y 8h), se centrifugaron y congelaron los pellets obtenidos.

Las muestras obtenidas se analizaron en geles de acrilamida al 10% (Apéndice B.5) y por Western Blot (Apéndice B.6).

5.4.2. Purificación de la proteína TTC-DFAd.

Tras la incubación de un preinóculo de la cepa *E. coli* XL10-Gold que contiene el plásmido pQTTC-DFAd en medio LB con ampicilina, se inocularon volúmenes mayores del mismo medio considerando las condiciones óptimas para la expresión de la proteína. Se cosecharon las células centrifugando por 15 min a 9000 rpm y se lavó el pellet celular con el buffer adecuado según la metodología de purificación por realizar.

5.4.2.1. Purificación con tallo de histidinas.

La purificación por medio de un tallo de histidinas se basa en la afinidad que tiene una cadena de cierto número de histidinas en una proteína a los átomos de níquel (Ni^{2+}), o algunos otros metales divalentes, fijados en una matriz de sefarosa. El plásmido utilizado para las construcciones en este trabajo integra un tallo de seis histidinas en el inicio de las proteínas, por lo cual fue posible la realización de una técnica de purificación utilizando un cromatógrafo de líquidos (FPLC, Äkta Prime) y una columna de sefarosa niquelada que nos permitiría separar la proteína de interés por afinidad.

Para esto utilizamos 1L de cultivo tratado como se describe en el apéndice D.1, tanto para la proteína TTC-DFAd como para la proteína TTC.

5.4.2.2. Purificación con columna de β -ciclodextrina.

Se preparó una columna con β -ciclodextrina inmovilizada con la finalidad de que, siendo un análogo del almidón, permitiera la interacción del DFAd con sus unidades de glucosa. La β -ciclodextrina está formada por siete unidades de glucosa que se arreglan en ciclo. Esta conformación asemeja las hélices que forma la amilosa en la parte cristalina del gránulo de almidón, que dan una vuelta de hélice cada seis unidades de glucosa.

Lo anterior justifica la posibilidad de separar por afinidad a la proteína de fusión, pues el DFAd reconocerá a la β -ciclodextrina inmovilizada. Seguimos la metodología indicada en el Apéndice B.7.b utilizando el cromatógrafo de líquidos FPLC ÄktaPrime.

5.4.3. Interacción de la proteína TTC-DFAd con Almidón.

Utilizando la capacidad del DFAd de unirse al almidón insoluble se diseñó un método por medio del cual se lograra concluir si es posible la adsorción y la purificación de la proteína fusionada utilizando una matriz de almidón.

Siguiendo la metodología utilizada para la purificación con columna de β -ciclodextrina se obtuvo un lisado celular con la proteína TTC-DFAd. Este lisado, en diferentes volúmenes, se puso en contacto con diferentes cantidades de almidón insoluble de papa (Sigma). Asumiendo que la proteína de fusión se adsorbió a los gránulos de almidón, se separaron éstos del resto de lisado celular mediante centrifugación. El sobrenadante, que incluiría a la proteína no adsorbida, se analizó junto con la elución de la proteína del gránulo de almidón, la cual se realizó con β -ciclodextrina tras realizar lavados para retirar proteínas con adsorción inespecífica débil (Apéndice B.8).

6. Resultados y Discusión.

Los análisis con enzimas de restricción de los plásmidos otorgados al laboratorio permitieron comprobar que el plásmido pBR327+FragBC+COOH (contenido en las cepas 7 y 8, Figura 6.1) contiene al gen *TetC* completo y sin alteraciones, por lo que se decidió continuar trabajando con este plásmido.

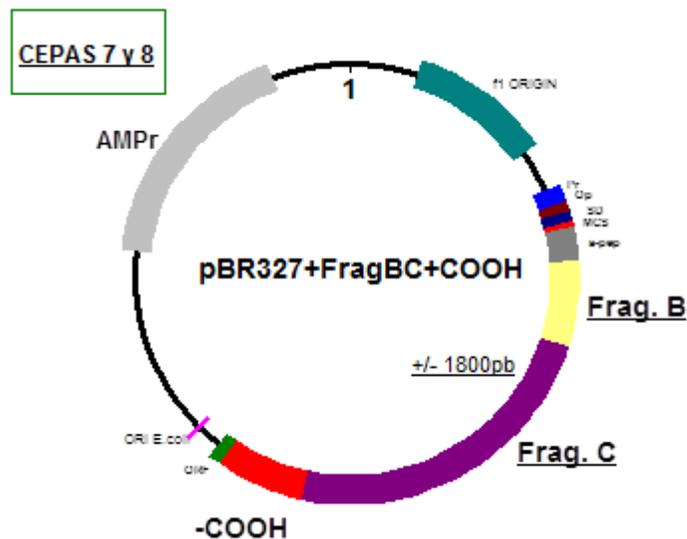
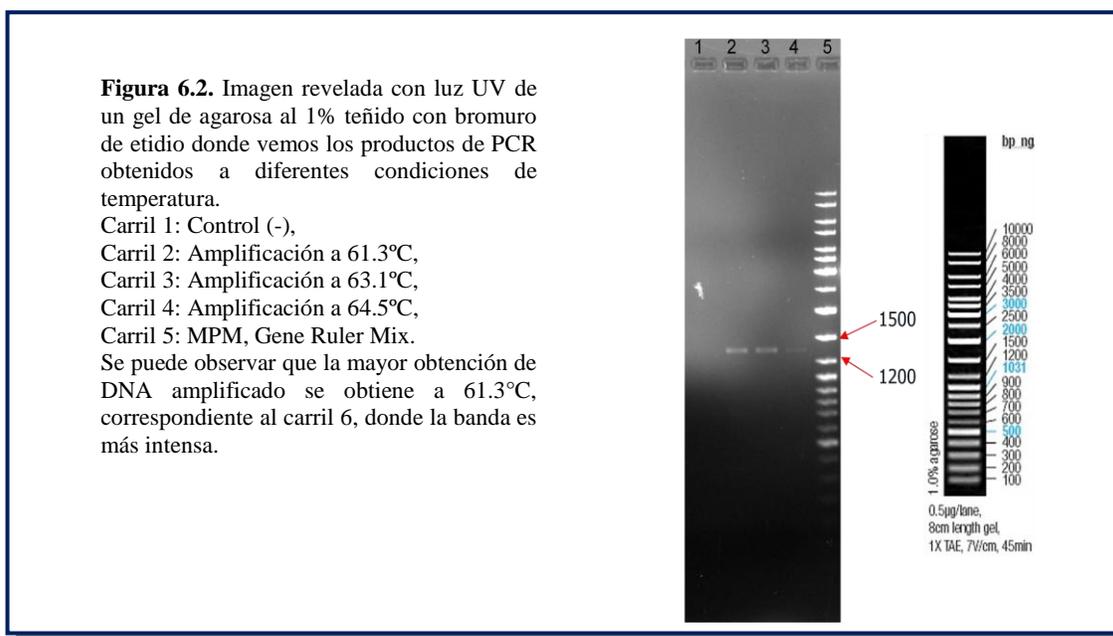
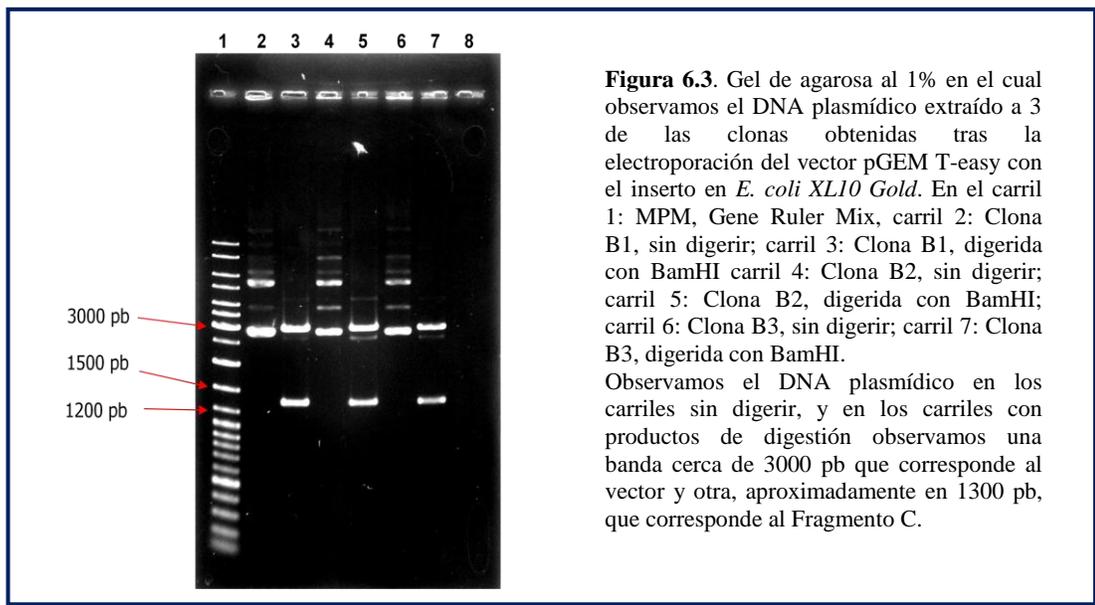


Figura 6.1. Diagrama que describe al vector pBR327+FragBC+COOH, el cual contiene al gen *TetC* completo y parte del gen del Fragmento B.



Se amplificó el gen *TetC* utilizando los primers TetB_f-Bam y TTCr-BamII (Tabla 3.1) haciendo una PCR de gradiente de temperatura. La mejor amplificación se logró a la temperatura de 61.3°C, lo cual se observa en el carril 6 del gel como la banda más intensa, con un peso aproximado de 1300 pb (Figura 6.2).

Se realizó una reacción de PCR a las condiciones óptimas de amplificación y a partir de ese amplificado se realizó la ligación en el plásmido pGEM-T easy. Tras la ligación y electroporación, se seleccionaron colonias que no presentaban coloración azul y se cultivaron. Se extrajo plásmido de dichos cultivos y se realizó la digestión con la enzima *Bam*HI. Se obtuvieron patrones de bandas en los que se observó la liberación de un fragmento de aproximadamente 1300 pb (Figura 6.3), el cual corresponde con el tamaño del gen *TetC*. Para confirmar la presencia de nuestro inserto en el plásmido se secuenciaron 3 diferentes clonas, utilizando los primers de la secuencia del vector pGEM-T easy, T7 y sp6. Los resultados confirmaron que, en el sitio de inserción del plásmido, se encuentra el gen *TetC* sin cambios en su secuencia, salvo los insertados con los primers en la reacción de PCR (Apéndice C.2), este vector se nombra pGTTCII (Figura 6.4).



Tras una digestión en mayor volumen y la purificación del inserto con columnas de fibra de vidrio, el fragmento obtenido se ligó al vector pQDFAd y al vector pQE31 (Figura 6.6). Se electroporó la construcción obtenida en las ligaciones y se extrajo de células *E. coli* XL-10 gold. El análisis de restricción del vector pQDFAd tras la ligación reveló que, en mayor proporción, las clonas obtenidas tenían el inserto en el sentido inverso, es decir, no estaba en marco de lectura, o no tenían el inserto.

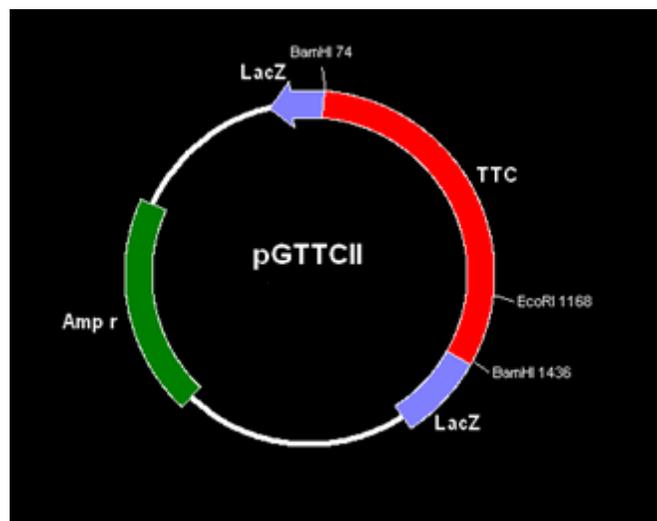


Figura 6.4. Mapa del plásmido resultante de la ligación del fragmento C en el vector pGEM-T easy. Observamos los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, la interrupción del gen *LacZ* por la inserción del fragmento y el gen de resistencia a ampicilina *Amp^r*.

Utilizamos una cantidad mayor de DNA (48 μ g de vector pGTTClI y 30 μ g de vector pQDFAd) y las digestiones del vector pGTTClI y del vector pQDFAd se realizaron por duplicado resultando en una concentración mayor de DNA en el mismo volumen de reacción de ligación. La misma metodología se llevó a cabo para la ligación del fragmento en pQE31. Las clonas analizadas con ensayos de restricción con la enzima *BamHI* mostraron que un gran número de las colonias obtenidas tenían el inserto, y la digestión con la enzima *EcoRI* permitió la selección de las clonas con el inserto en marco de lectura. En la figura 6.5 (Izq.) podemos ver los resultados de la digestión con *BamHI* de algunas de las clonas obtenidas en la ligación y en la figura 6.5 (Der) la digestión de las mismas clonas con *EcoRI*. En la digestión con *BamHI* nos

interesó la liberación del fragmento C de aproximadamente 1300 pb. En el caso de *EcoRI* los fragmentos esperados son de aproximadamente 3583 pb, 2413 pb y 1153 pb. Las clonas A, G, H, I y K fueron analizadas. Todas presentaron el inserto, sin embargo, la clona K aparentemente contenía el inserto pero en sentido inverso.

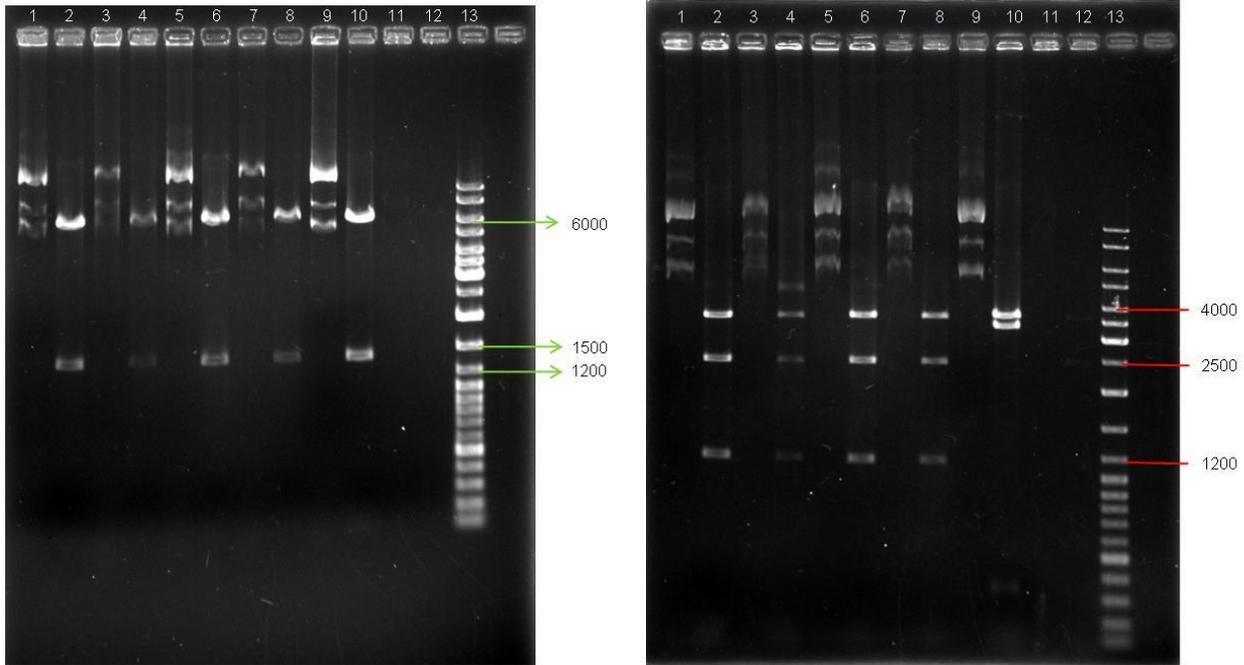


Figura 6.5 (Izq) y (Der). En las fotografías de los geles mostradas arriba podemos observar las digestiones realizadas al plásmido extraído de las clonas A, G, H, I y K. A la derecha observamos la digestión con la enzima *Bam*HI, en los carriles 1 y 2 la clona A, sin digerir y tras la digestión respectivamente, de la misma manera la clona G en los carriles 3 y 4, en los carriles 5 y 6 la clona H, 7 y 8 la clona I, y por último la clona K en los carriles 9 y 10. En la imagen de la izquierda observamos las mismas clonas y su digestión con *Eco*RI. Se obtiene un patrón distinto para la clona K (carril 10) debido a que el inserto se encuentra ligado en sentido inverso, pero para las clonas restantes el inserto se encuentra ligado enmarco de lectura. Para ambos geles el marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000 bp se encuentra en el carril 13.

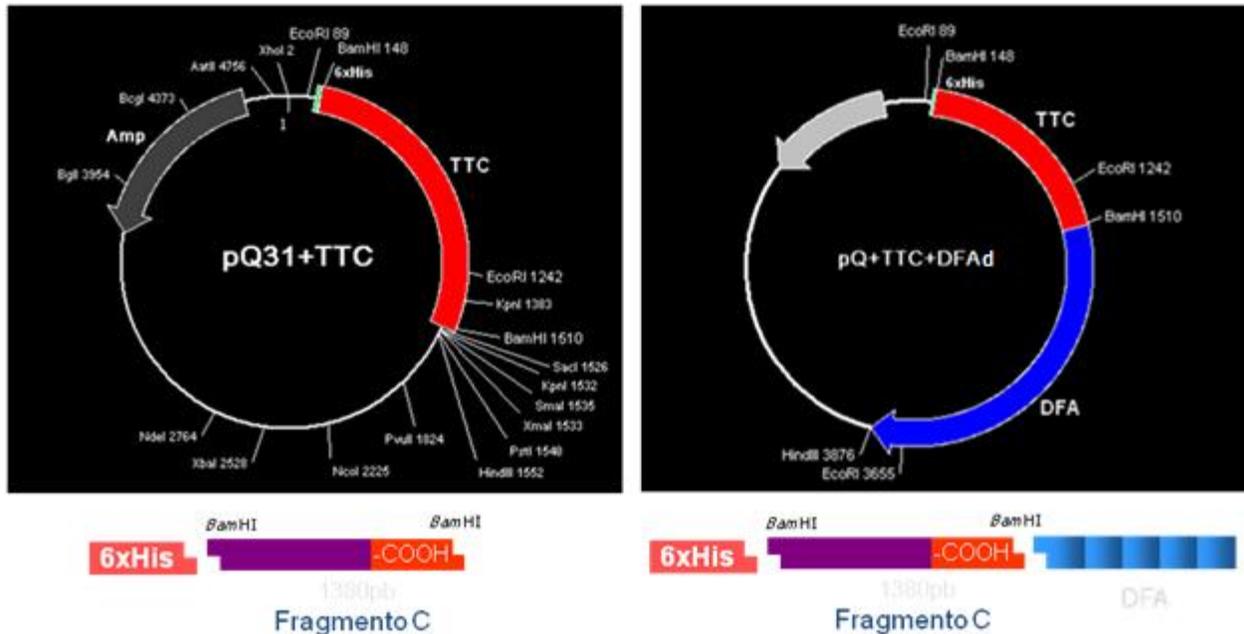


Figura 6.6. Mapas de los plásmidos resultantes de la ligación del fragmento C en los vectores pQE31 (Izq.) y pQDFAd (Der). Bajo cada imagen observamos una esquematización del orden en el que quedan ligados los genes para la producción de la proteína control y la proteína TTC-DFAd.

Se comprobó que la secuencia correspondía a la proteína de fusión deseada secuenciando el plásmido obtenido de las clonas A y G con los primers pQEIII/IV y Seq9 (Tabla 3.1). Tras realizar un análisis *in silico* de las secuencias obtenidas confirmamos que respetaban el marco de lectura y no había mutaciones puntuales en ninguna de las secuencias. Un análisis *blast* en la base de datos del *NCBI* (National Center for Biotechnology Information)⁽³⁴⁾ corroboró que la primera parte de la secuencia correspondía en un 100% a la secuencia del gen *TetC* de la toxina del tétanos y la parte terminal de la secuencia en un 100% al gen del DFA de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (Apéndice E).

Se prosiguió con un ensayo de expresión general que nos permitiría saber si alguna de las clonas obtenidas permitía una mayor producción de proteína. En geles de acrilamida teñidos con Coomassie se observó una mejor expresión para la clona G, por lo cual continuamos trabajando con esta clona.

El análisis de expresión desarrollado a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de inductor (IPTG) mostró que, para la clona G, las mejores condiciones de expresión se dieron a las 8 horas sin diferencia en la cantidad de inductor usada (Figura 6.7).

Sin embargo, en ensayos posteriores fue posible notar que a las 8 horas había una mayor cantidad de proteína, pero también una mayor cantidad de reacciones inespecíficas en el ensayo de western blot debido posiblemente a la ruptura de la proteína de fusión. Dadas estas señales, se decidió continuar la expresión únicamente hasta las 6 horas y con una concentración de inductor de 0.1 mM.

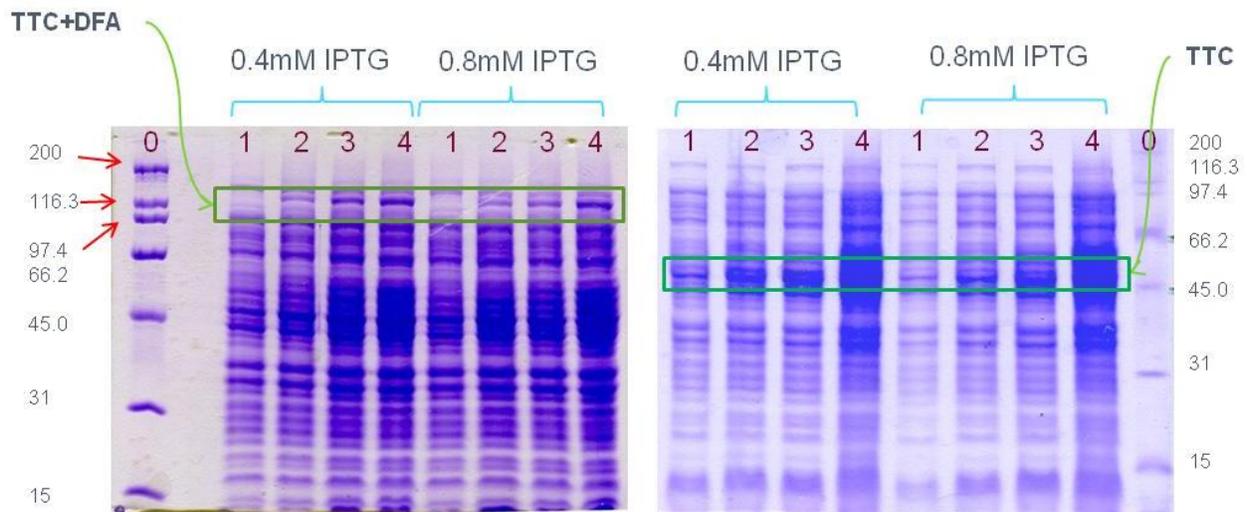


Figura 6.7. Ensayo de expresión para la clona G (Izq) y para la clona control (Der) realizado a diferentes concentraciones de IPTG, 0.4 mM y 0.8 mM, y tomando muestra a diferentes tiempos: 0, 2, 4 y 8 horas. En ambos geles en el carril 0 tenemos el marcador de peso molecular en KDa (SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range, BioRad), en el carril 1 la muestra a 0 h, en el 2 a 2 h, en el 3 a 6 h y en el 4 a 8 h. Señalado con llaves se muestra que carriles corresponden a las diferentes concentraciones de IPTG.

En cuanto a la expresión del fragmento C con el vector pQE31 podemos concluir que para obtener una buena expresión no es necesaria una gran concentración de inductor ni tampoco mucho tiempo de inducción. De hecho en el gel de la Figura 6.7 (Der) podemos observar en los carriles 1 una expresión basal y en los carriles 2 y 3 una expresión importante de la proteína.

Con el ensayo de western blot pudimos confirmar la expresión de la proteína debido a su reconocimiento por un anticuerpo contra el tallo de histidinas insertado en la secuencia de los vectores pQE31 y pQDFAd (Figura 6.8).

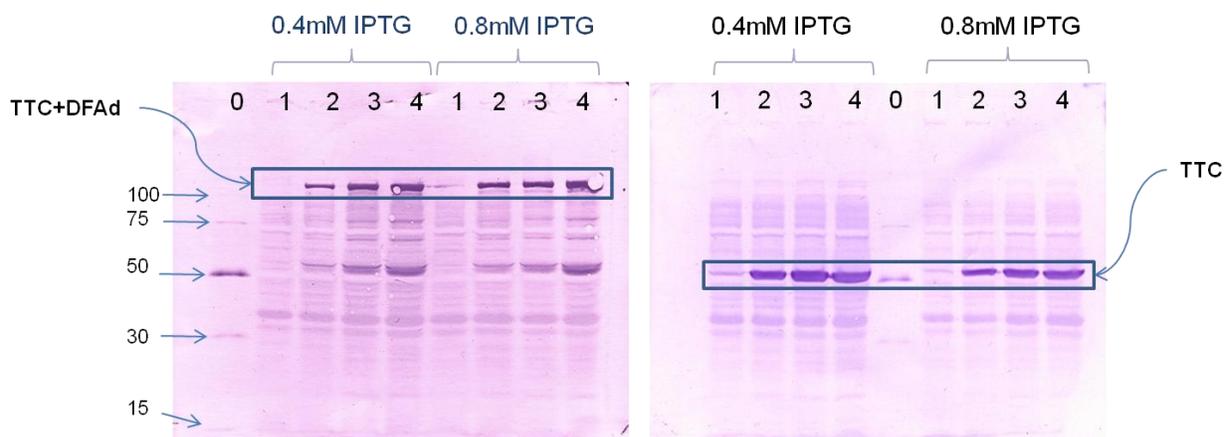


Figura 6.8. Ensayo de western blot para la expresión de la clona G (Izq) y de la clona control (Der). Se cargaron en los geles lisados celulares inducidos a diferentes concentraciones de IPTG, 0.4 mM y 0.8 mM, e incubados a diferentes tiempos: 0, 2, 4 y 8 horas. En ambos geles en el carril 0 tenemos el marcador de peso molecular en kDa (6xHis Protein Lader Qiagen), en el carril 1 la muestra a 0 h, en el 2 a 2 h, en el 3 a 6 h y en el 4 a 8 h. Señalado con llaves se muestra que carriles corresponden a las diferentes concentraciones de IPTG.

Observamos también que había reconocimiento por otras proteínas más pequeñas que aparentemente son productos de la degradación de nuestra proteína de fusión. El tallo de histidinas es reconocido por el anticuerpo anti-his (IgG extraído de ratón) y este a su vez es reconocido por un anti-IgG de ratón (extraído de conejo), el cual está conjugado a la fosfatasa alcalina que, en presencia de su sustrato BCIP (5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato), da lugar a una reacción colorida lo cual permite la localización de proteínas específicas en la membrana, en este caso las que tengan un tallo de histidinas; por lo tanto, si alguna de las proteínas en estudio se degrada, pero alguno de sus fragmentos conserva el tallo de histidinas este producto podría dar señal en el western blot, lo cual observamos en la Figura 6.8. Además, es posible que hayan ocurrido reacciones inespecíficas debidas a la permanencia excesiva tanto del anticuerpo secundario como de los sustratos que dan la reacción colorida. Sin embargo, hay una reacción evidente para las proteínas de interés, por lo cual comprobamos su expresión.

Las proteínas TTC y TTC-DFAd se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando el tallo de histidinas insertado en sus secuencias al ligarse en el vector pQE31 o pQDFAd respectivamente.

Para la proteína TTC la columna de sefarosa niquelada fue muy eficiente. A partir de un litro de cultivo se cosecharon las células y se rompieron para obtener un lisado celular, el cual

se inyectó en el cromatógrafo de líquidos FPLC Äkta Prime en buffer de unión (Buffer fosfatos con 10 mM de imidazol) y después de que el lisado pasó por la columna, previamente equilibrada, se lavó con buffer de unión y se eluyó por gradiente con buffer de elución (Buffer fosfatos con 500 mM de imidazol), todo llevado a cabo con un flujo de 1 mL/min. Se tomaron fracciones al eluir la proteína correspondientes a dos picos diferentes en el cromatograma. En la Figura 6.9, el gel de la izquierda muestra las fracciones tomadas del primer pico de elución y podemos ver muchas proteínas con cierta afinidad que se habían ligado al níquel en la columna que fueron desprendidas en el momento del lavado, sin embargo, las fracciones correspondientes al segundo pico muestran a la proteína purificada de manera completa, con una recuperación favorable, como se observa en el gel de la derecha.

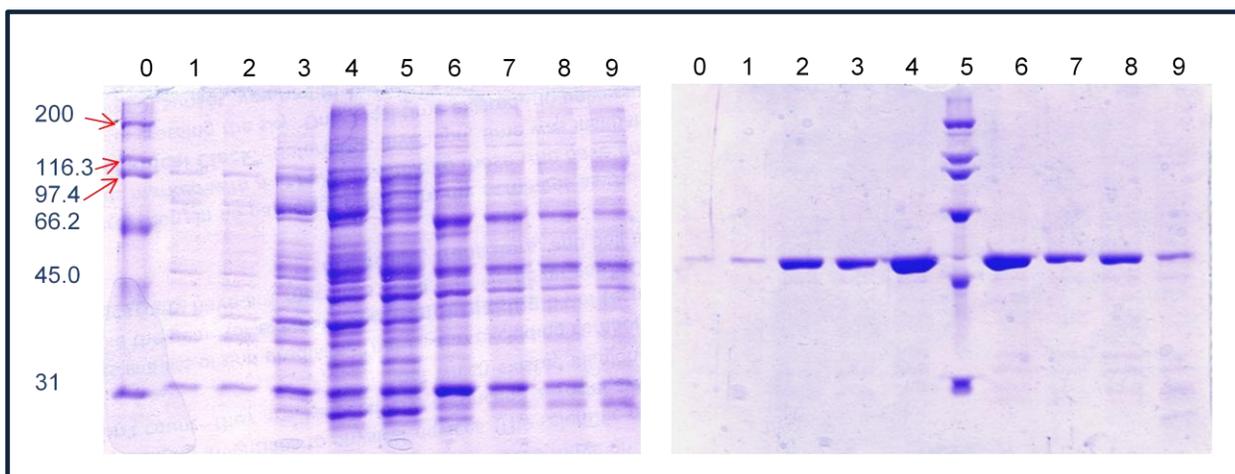


Figura 6.9. Geles de acrilamida al 10% teñidos con Coomassie en los que se cargaron las fracciones eluidas en la purificación de la proteína control TTC. En el gel de la izquierda observamos las fracciones correspondientes a un primer pico y en el gel de la derecha las fracciones correspondientes al segundo pico. Carril 0: Marcador de peso molecular, Carriles 1-9 (izq.): Fracciones eluidas en el primer pico del cromatograma, Carriles 1-9 (der.): Fracciones eluidas en el segundo pico del cromatograma.

Se siguió la misma metodología para la proteína TTC-DFAd. Sin embargo la recuperación no fue favorable y la purificación no fue completa, como puede observarse en los geles de la Figura 6.10. Las fracciones recuperadas de la elución de la proteína se cargaron en los pozos 1 a 9 de ambos geles y la cantidad de proteína en el peso esperado (105 kDa) contenida en las distintas fracciones es muy poca, al contrario de proteínas contaminantes remanentes (especialmente en las fracciones finales que observamos en el gel de la derecha). Es posible que el tamaño de la proteína haya representado una dificultad para ser purificada

por medio del tallo de histidinas. También pudo ser que la distribución espacial de la proteína de fusión construida no haya permitido la interacción del tallo de histidinas con el metal de la columna, es decir, que las histidinas no hayan quedado expuestas para tener contacto con el níquel en la columna.

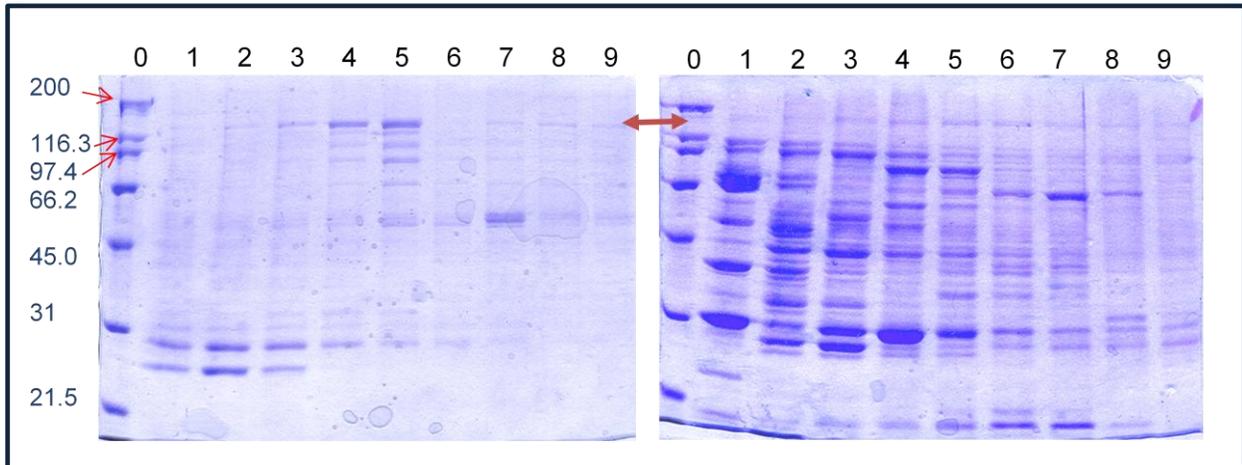


Figura 6.10. Geles de acrilamida al 10% teñidos con Coomassie en los que se cargaron las fracciones eluidas en la purificación de la proteína TTC-DFAd tras el paso por una columna de sefarosa niquelada. La flecha en la parte central indica el peso molecular al que la proteína es esperada.

Fue evidente entonces, que la metodología empleada para la purificación de la proteína TTC-DFAd utilizando el tallo de histidinas no aportó buenos resultados, por lo cual se continuó con la purificación utilizando al DFAd como tallo.

Para esto utilizamos dos diferentes matrices: β -ciclodextrina y almidón, en cuyo caso, comprobaríamos también la capacidad de la proteína TTC-DFAd para adsorberse al almidón.

Primero se realizó la purificación en columna de β -ciclodextrina. Utilizamos 2 L de cultivo, se recuperaron las células y se rompieron por sonicación siguiendo la metodología mencionada en el apéndice B.7.b pero incluyendo en el mismo buffer maltosa 15 mM y 10 mM de β -mercaptoetanol en el buffer de lisis. Se introdujo el lisado al equipo FPLC Äkta Prime a un flujo de 1 mL/min tras haber equilibrado la columna con buffer citrato-fosfato pH 5. En el cromatograma (datos no mostrados) observamos una señal importante que corresponde a la proteína no adsorbida y, después del lavado, al introducir la solución de elución (β -ciclodextrina

9 mg/mL) observamos una señal correspondiente a la proteína eluída, momento en el cual se tomaron fracciones. Al cargar en geles de poliácridamida las fracciones correspondientes a la elución (Figura 6.11) observamos que la proteína se ligó a la columna con β -ciclodextrina acoplada, sin embargo, se observan varias proteínas contaminantes, debidas posiblemente a la degradación de la misma proteína, según lo observado en análisis por western blot (datos no mostrados) y a la unión inespecífica de otras proteínas con la matriz.

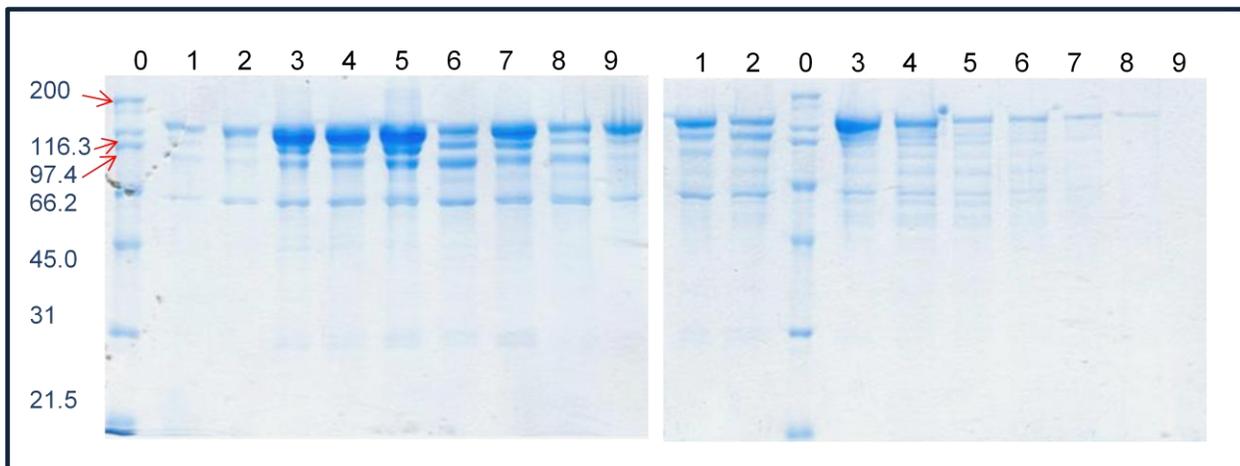


Figura 6.11. Geles de acrilamida al 10% con las fracciones eluídas en la purificación de la proteína TTC-DFAd utilizando una columna con β -ciclodextrina acoplada en sefarosa. Carril 0: Marcador de peso molecular, Carriles 1-9(Izq. y Der.): Se observa a la proteína de interés cerca del peso esperado (105kDa), sin embargo, están presentes otras bandas correspondientes a proteínas contaminantes.

Para mejorar la purificación obtenida con la matriz de β -ciclodextrina se utilizó una estrategia que consiste en lisar las células antes de que el efecto de las proteasas puedan degradar a la proteína de fusión. Esto se hizo cosechando las células en un tiempo menor al usado en la purificación anterior; tras la inducción con IPTG se cosecharon las células a las cuatro horas de incubación. Para impedir que la carga menor de células repercutiera en la cantidad final de proteína recuperada se utilizaron 3L de cultivo y se trató como lo indica la metodología de purificación con β -ciclodextrina en el apéndice B.7.b. En la Figura 6.12 se muestra el resultado de esta purificación. Las fracciones obtenidas cargadas en los carriles 1-9 de ambos geles muestran la proteína de interés prácticamente pura, con

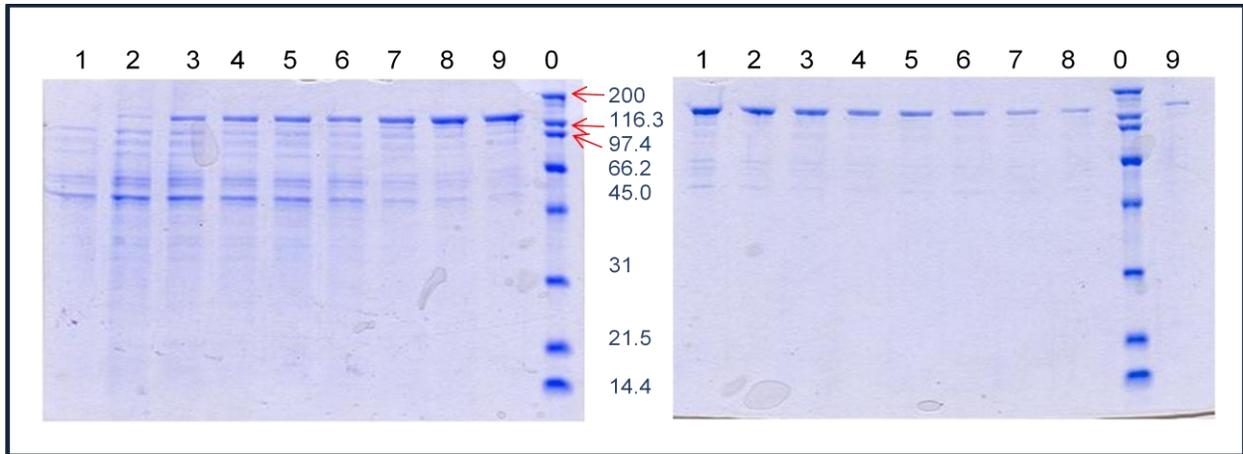


Figura 6.12. Geles de acrilamida al 10% con las fracciones eluidas en la purificación de la proteína TTC-DFA utilizando una columna con β -ciclodextrina acoplada en sefarosa y buffer citrato-fosfatos pH 7. Carril 0: Marcador de peso molecular, Carriles 1-9 (Izq. y Der.): Podemos observar la proteína de interés en el peso molecular esperado y relativamente pura. La recuperación de proteína fue menor al ensayo anterior.

algunas bandas debidas a la degradación de la propia proteína. Sin embargo, la cantidad de proteína obtenida es menor que la que se observó en el primer ensayo, a pesar de que se utilizó un volumen mayor de cultivo en este ensayo. Se pensó entonces que posiblemente la proteína se estaba perdiendo en los procesos de centrifugación o filtración debido a una precipitación de la misma, pues se observó turbidez en el lisado durante esos procesos. Se realizó entonces un análisis *in silico* para calcular el punto isoeléctrico de la proteína (29). El resultado fue un punto isoeléctrico de 5.0, por consiguiente el pH del buffer empleado para la purificación se modificó a 7.0 y se realizó nuevamente la purificación (Apéndice D.1). Podemos ver los resultados obtenidos en la Figura 6.13 en la que se cargaron las fracciones obtenidas en esta última purificación. La proteína de fusión se adsorbió a la β -ciclodextrina y se posiciona en el gel en el tamaño esperado. Se obtuvo con una concentración considerable, tomando en cuenta que se realizó la purificación de 2 L de cultivo. Sin embargo, se observan bandas más pequeñas debidas a la degradación de la proteína durante el proceso a pesar de que el experimento se llevó a cabo con un menor número de horas de incubación (metodología empleada en el ensayo anterior) y que el medio se inoculó no al 1% si no al 0.2% con la finalidad de cosechar las células en un momento en el que la proteína no estuviera degradada por el efecto de proteasas.

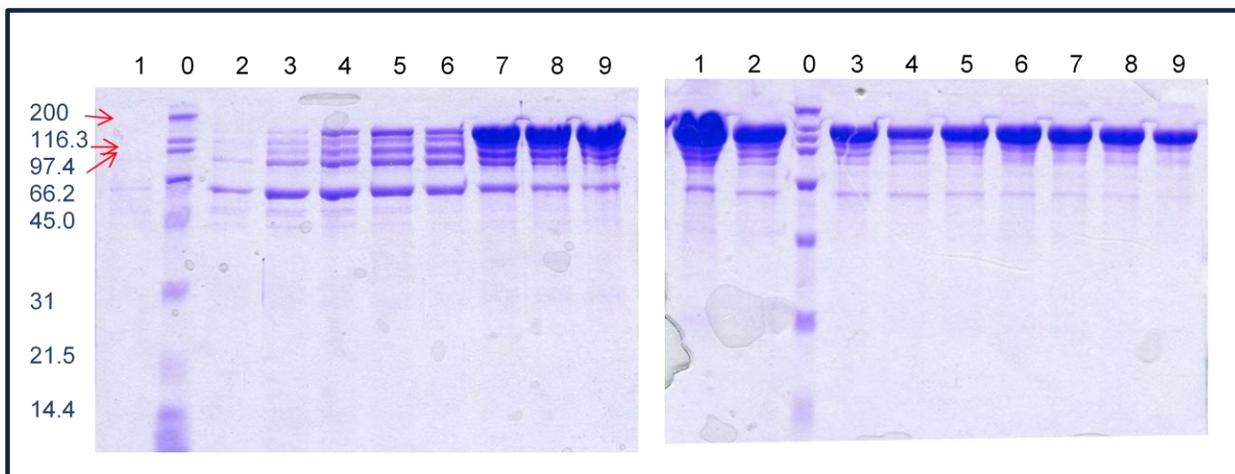


Figura 6.13. Geles de acrilamida al 10% con las fracciones eluidas en la purificación de la proteína TTC-DFA utilizando una columna con β -ciclodextrina acoplada en sefarosa y buffer citrato-fosfatos pH7. Carril 0: Marcador de peso molecular, Carriles 1-9 (Izq. y Der.): Podemos observar la proteína de interés en el peso molecular esperado, con algunas bandas correspondientes posiblemente a proteínas contaminantes o proteínas producto de degradación de la propia proteína de fusión.

La cantidad de proteína obtenida en este ensayo es superior en comparación con los anteriores, por lo cual el cambio del pH del buffer citrato-fosfatos fue muy favorable. Sin embargo tal vez fuera posible mejorar la purificación modificando la concentración de maltosa utilizada en el buffer de lisis, debido a que, por competencia, evitaría la unión inespecífica de proteínas y la maltosa se retira en el momento de lavado. Otras variables que se podrían modificar es el flujo durante la cromatografía y el tiempo de lavado previo a la elución de la proteína.

Se decidió entonces continuar con la purificación sobre una matriz de almidón, pues siendo éste el sustrato natural del DFA, es posible que las condiciones de adsorción ya analizadas resultaran óptimas. Se siguió la metodología descrita en el apéndice B.8 y los resultados podemos observarlos en la Figura 6.14 en la que se cargó en los diferentes carriles, según las condiciones manejadas, una muestra de lisado bacteriano tras la incubación con almidón y en el carril adjunto inmediato la proteína recuperada de los gránulos de almidón con una solución de β -ciclodextrina. La adsorción al almidón fue satisfactoria, podemos ubicar a la proteína TTC-DFA en el tamaño esperado y se observó un aumento de la adsorción al manejar cantidades mayores de lisado y mayores cantidades de almidón, aunque en todas las

condiciones existe proteína residual en el lisado bacteriano lo cual nos puede indicar que la superficie de los gránulos de almidón fue saturada. Otra explicación a la presencia de proteína

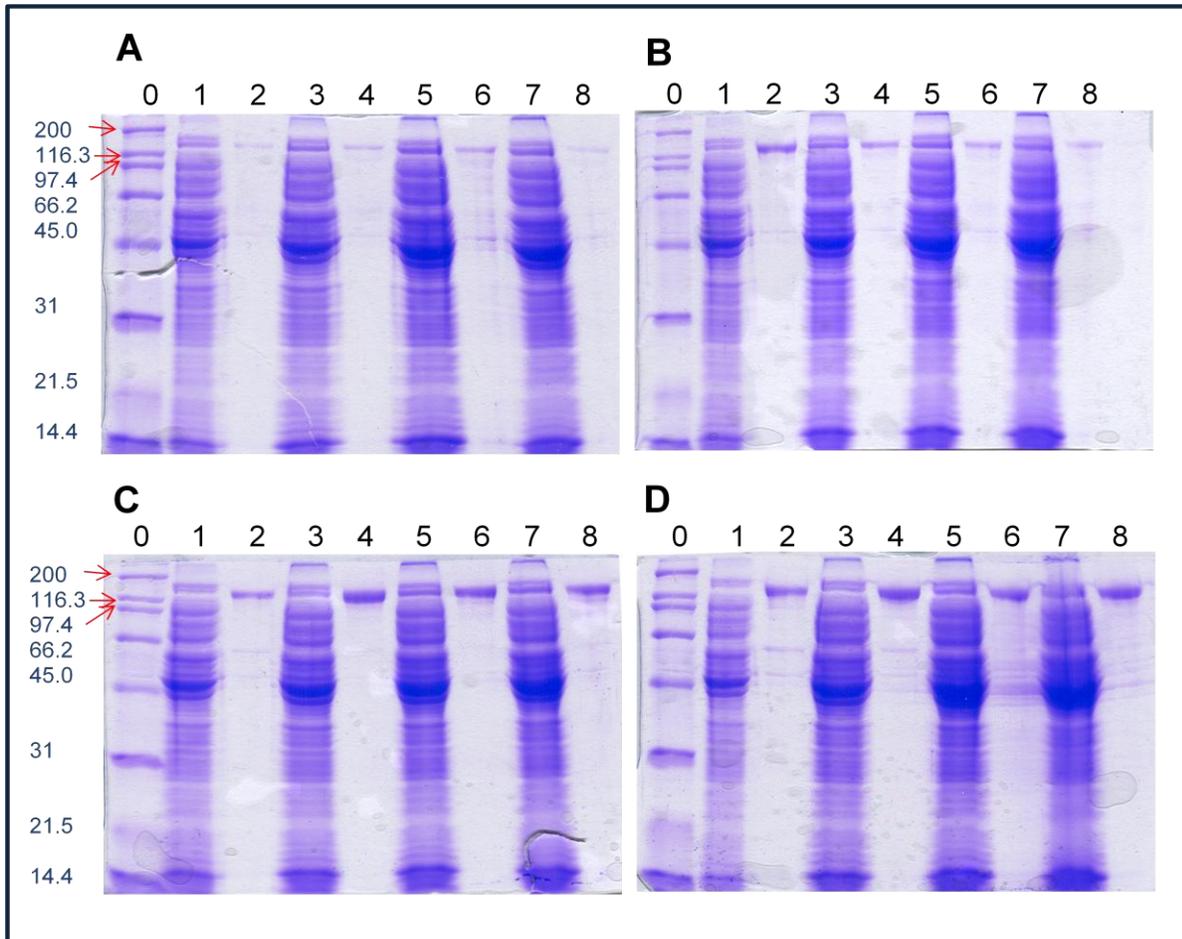


Figura 6.13. Resultados de la adsorción de la proteína en gránulos de almidón. Observamos en los carriles 1, 3, 5 y 7 la proteína no adsorbida, que corresponde al lisado celular después de haber sido incubado con almidón. En los carriles 2, 4, 6 y 8 observamos la proteína adsorbida a los gránulos de almidón tras ser eluída con β -ciclodextrina. En los carriles 0 se observa el marcador de peso molecular. La proteína TTC-DFA se observa en el tamaño esperado y prácticamente pura. Para cada ensayo utilizamos diferentes cantidades de almidón: A. 50 μ g de almidón, B. 100 μ g de almidón, C. 500 μ g de almidón y D. 1000 μ g de almidón. La mejor condición para la purificación en un solo paso de la proteína TTC-DFA fue la que se muestra en el gel C, el carril 4 que corresponde a 50 μ L de lisado con 500 ν g de almidón.

en el lisado bacteriano es que el proceso de fijación sea dinámico, es decir, la proteína TTC-DFA se adsorbe y se disocia del gránulo tendiendo a un equilibrio. En general observamos a la proteína pura en las diferentes condiciones utilizadas, sin embargo hay una mejor recuperación al utilizar 500 μ g de almidón (Figura 6.14, C), ya que al utilizar mayores cantidades de almidón se acarrean algunas proteínas contaminantes (Figura 6.14, D).

Se realizaron análisis de western blot a las muestras obtenidas en este ensayo, resultando en una localización de la proteína en el tamaño esperado y con un reconocimiento específico, es decir, no se revelaron otras proteínas junto con la proteína eluída de los gránulos de almidón.

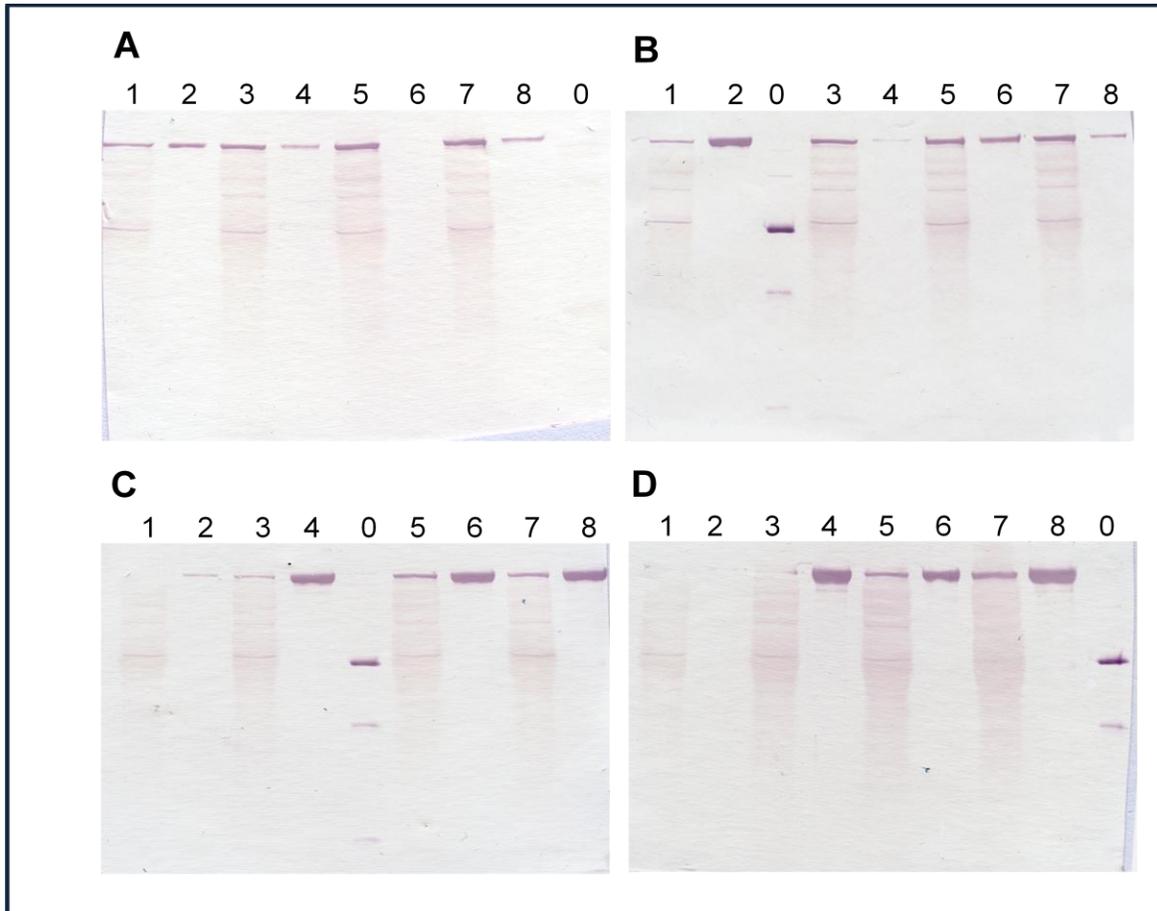


Figura 6.14. Western blot de la adsorción de la proteína en gránulos de almidón. Observamos en los carriles 1, 3, 5 y 7 la proteína no adsorbida, que corresponde al lisado celular después de haber sido incubado con almidón. En los carriles 2, 4, 6 y 8 observamos la proteína adsorbida a los gránulos de almidón tras ser eluída con β -ciclodextrina. En los carriles 0 se observa el marcador de peso molecular. La proteína TTC-DFAd se observa en el tamaño esperado y prácticamente pura, recuperada en diferentes cantidades dependiendo de la cantidad de proteína y la cantidad de almidón colocadas en cada caso: A. 50 μ g de almidón, B. 100 μ g de almidón, C. 500 μ g de almidón y D. 1000 μ g de almidón. La mejor condición aparentemente fue la que se muestra en el gel C, el carril 4 que corresponde a 50 μ L de lisado con 500 μ g de almidón.

En los carriles donde se cargó el lisado celular correspondiente a la proteína no adsorbida podemos ver que cierta cantidad de la proteína de interés permaneció en el sobrenadante sin adsorberse y que hay reconocimiento de otras proteínas presentes en el lisado celular. Esto puede deberse al reconocimiento por parte del anticuerpo a otras proteínas de *E. coli* o a que la proteína TTC-DFAd tuvo cierto grado de degradación y algunos segmentos que conservaron el

tallos de histidinas dieron respuesta en el revelado. En el caso de que se diera esto último cabe destacar que estos residuos de proteína no se ligaron al gránulo de almidón, pues no observamos esas señales en los carriles correspondientes a proteína eluída.

7. Conclusiones.

La proteína de fusión construida tiene la propiedad de adsorberse al almidón, por lo cual podemos concluir que la unión del Fragmento C al DFA no ocasionó cambios estructurales radicales.

La purificación utilizando el tallo de histidinas funciona para la proteína control de manera eficiente, pues se logra obtener la proteína pura en un sólo paso. Sin embargo, no es el caso para la proteína de fusión construida pues, además de que se presentan muchas proteínas contaminantes, la recuperación de la proteína de fusión es mínima, probablemente debido a que no se encuentre expuesto el tallo de histidinas y se produzca un impedimento estérico. También es posible que las bandas observadas sean producto de degradación de la proteína TTC-DFAd, sin embargo, podemos concluir que bajo las condiciones utilizadas el tallo de histidinas no nos permitió purificar a la proteína TTC-DFAd.

Utilizando la columna de β -ciclodextrina pudimos comprobar que el DFA es capaz de funcionar como tallo de afinidad pues la proteína logró adsorberse a la matriz. Modificando el pH del buffer a pH 7 la purificación mejoró en el aspecto de cantidad de proteína recuperada, pues de un cultivo menor y cultivado por menos tiempo obtuvimos una cantidad de proteína importante según se aprecia en los geles de poliacrilamida. Las bandas contaminantes en este experimento pueden ser debidas a la degradación de la misma proteína, pero es posible que variando condiciones en el buffer de lisis la proteína pudiera purificarse totalmente.

En cuanto a la purificación utilizando como matriz gránulos de almidón de papa podemos concluir que se llevo a cabo de manera muy eficiente. El DFAd se adsorbe al almidón de manera específica, no se observa una adsorción importante por parte de otras proteínas de la bacteria y el proceso es llevado a cabo en un solo paso. La elución de la proteína se realizó con una solución de β -ciclodextrina, pero se puede inferir que si utilizamos almidón soluble obtendríamos resultados favorables y por lo tanto un proceso de purificación económico. La condición utilizada que resultó más favorable para la purificación de la proteína TTC-DFAd fue la relación 50 μ L de lisado/500 μ g de almidón, sin embargo, dado que realizamos la purificación con el lisado celular directamente no tenemos el valor de concentración de proteína TTC-DFAd de manera específica, el lisado solo puede relacionarse con la concentración de proteína total.

La adsorción eficiente al almidón del DFAd aún con una proteína como el Fragmento C fusionada, da la pauta a la utilización de este dominio para la inmovilización de proteínas para diferentes usos industriales.

8. Bibliografía.

1. Jay-lin Jane; Structure of Starch Granules; *Journal of Applied Glycoscience*, 54, 31-36 (2007).
2. BeMiller, J., Whistler, R.; Starch. Chemistry and Technology; *Academic Press*, Tercera edición (2009).
3. Tester, R., Karkalas, J. and Qi, X.; Starch composition, fine structure and architecture; *Journal of Cereal Science*, 39:151-165 (2004).
4. Wang, T., Bogracheva, T., Hedley, C.; Starch: as simple as A, B, C?; *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, No. 320, 481–502 (1998).
5. Shivaramakrishnan, S. et. al.; α -Amylases from microbial sources; *Food Technology and Biotechnoly*, 44(2): 173-184, (2006).
6. Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities; *Biochemical Journal*, 280: 309-316 (1991).
7. MacGregor, A., Janecek, S., Svensson, B.; Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546: 1-20 (2001).
8. Janecek, S.; α -amylase family: molecular biology and evolution; *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 67: 635-645 (1997).
9. Machovič, M., Janeček, Š.; The evolution of putative starch-binding domain; *FEBS Letters*, 580:6349-6356 (2006).
10. Shoseyov, O., Shani, Z. and Levy, I.; Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications; *Microbiology and Molecular biology*, 70: 283-295 (2006).
11. Janecek, S., Sevcík, J.; The evolution of starch binding domain; *FEBS letters*, 456: 119-125 (1999).
12. Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Vijay Kumar, E.; Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review; *Biotechnology Advances*, 26: 22–34 (2008).
13. Nwankwo, D., Anadu, E., Usoro, R.; Cassava fermenting organisms; *World Journal of Microbiology*, 5:169-179 (1989).
14. Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. and Takano, M.; Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria from a fermented fish and rice food, burong isda, and its amylolytic enzyme; *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80:124-130 (1995).
15. Morlon-Guyot, J., Guyot, J.P., Pot, B., Jacob de Haut, I., Raimbault, M.; *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolyzing lactic acid bacterium isolated from cassava sour starch fermentation; *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:1101-1109 (1998).

16. Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P. and Hounhouigan, D.J.; Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maizedoughs (mawe and ogi) from Benin; *Journal of Applied Microbiology*, 85: 512–520 (1998).
17. Nakamura, L.K.; *Lactobacillus amylovorus*, a new starch hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations; *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31:56–63 (1981).
18. Rodríguez-Sanoja, R.; Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding; *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3350-3356 (2000).
19. Jore, J. P. M., De Parasis, J.; Studies on the α -amylase of *Lactobacillus amylovorus* as a model for heterologous protein secretion by lactobacilli; *FEMS Microbiology Reviews*, 12:26 (1993).
20. Rodríguez-Sanoja, R.; Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus* α -amylases; *Applied And Environmental Microbiology*, 71:297-302 (2005).
21. Giraud, E., G. Cunny; Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin; *Gene*, 198:149–157 (1997).
22. Boraston, A., Healey, M., Klassen, J., Ficko-Blean, E., Van Buereb, A., Law V.; A structural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition; *Journal of biological chemistry*, 281:587-598 (2006).
23. Sorimachi, K.; Le Gal-Coëffet MF., Williamson G., Alcher, D., Williamson, M.; Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin; *Structure*, 5:647-661 (1997).
24. Santiago, M., Functional characteristics of the starch-binding domain of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase; *Biologia, Bratislava*, 60/Suppl. 16: 111-114 (2005).
25. Guillén, D., Alpha-amylase starch binding Domains: Cooperative Effects of Binding to Starch Granules of Multiple Tandemly Arranged Domains; *Applied and Environmental Microbiology*, 73:3833-3837 (2007).
26. Terpe, K.; Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:523–533 (2003).
27. Lichty, J., Malecki, J., Agnew, H., Michelson-Horowitz, D., Song Tan; Comparison of affinity tags for protein purification; *Protein Expression and Purification*, 41: 98-105 (2005).
28. Turton, K., Chaddock, J., Ravy, K.; Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility; *TRENDS in Biochemical Sciences*, 27:552-558 (2002).
29. Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., Schiavo, G.; The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons; *TRENDS in Microbiology*, 11:431-437 (2003).

30. Boquet, P., Munro, P., Fiorentini, C., Just, I.; Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action; *Current Opinion in Microbiology*, 1:66-74 (1998).
31. He H.J., Shi H.J., He Z.Y., Yuan Q.S. and Wu X.F.; Department of Biochemistry, University of Science and Technology, Shanghai, P.R.China (1999)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF154828.1>
32. Calculador del Punto Isoelectrico, Kozlowski L., 2007-2011, <http://isoelectric.ovh.org>
33. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233-238 [PMID: 18838391]. <http://www.cazy.org>
34. Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
35. Atkinson, W., Hamborsky, J., McIntyre, L., Wolfe, S. (eds); Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book); *Public Health Foundation*, 10th ed. ed. (2006).
36. van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G.; Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria; *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 157–176 (2006).
37. Chen, L., Ford, C., Nikolov, Z.; Adsorption to starch of a β -galactosidase fusion protein containing the starch-binding region of *Aspergillus glucoamylase*; *Gene*, 99, 121-126 (1991).
38. Lin, S., Lin, I., Chou, W., Hsieh, C., Liu, S., Huang, R., Sheu, C., Chang, M.; CBM21 starch-binding domain: A new purification tag for recombinant protein engineering; *Protein Expression and Purification*, 65, 261-266 (2009).
39. MacGregor, E; An overview of clan GH-H and distantly-related families; *Biologia, Bratislava*, 60/Suppl. 16:5-12 (2005).
40. Knight, A., Carvajal, J., Schneider, H., Coutelle, C., Chamberlain, S., Fairweather, N.; Non-viral neuronal gene delivery mediated by the Hc fragment of tetanus toxin; *European Journal of Biochemistry*, 259, 752-769 (1999).
41. Helting, TB., NAu HH.; Analysis of the immune response to papain digestion products of tetanus toxin; *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series C: Immunology*, 92(1): 59-63 (1984).
42. Charqueteque, D., Drake, PM., Obregon, P., Prada, A., Fairweather, N., Ma, JK.; Highly immunogenic and protective recombinant vaccine candidate expressed in transgenic plants; *Infection and Immunity*, 73(9):5915-5922 (2005).
43. NORMA Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano.

44. Tafaghodi, M., Jaafari, MR., Sajadi Tabassi SA.; Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(2): 138-145 (2006).
45. Amidi, M., Mastrobattista E., Jiskoot, W., Hennink, W.; Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62:59-82 (2010)
46. Tregoning, J., Maliga, P., Dougan, G., Nixon, PJ.; New advances in the production of edible plant vaccines; Chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC.; *Phytochemistry*, 65(8):989-994 (2004).
47. Reveneau, N., Geoffroy, MC., Loch, C., Chagnaud, P., Mercenier, A.; Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations; *Vaccine*, 20(13-14): 1769-1777 (2002).
48. Duc le, H., Hong, HA., Fairweather, N., Ricca, E., Cultting, SM.; Bacterial spores as vaccine vehicles; *Infection and Immunity*, 71(5):2810-8 (2003).
49. Dunstan, S., Simmons, C., Strugnell, R.; In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium; *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 37, 111-119 (2003).

9. Apéndices

Apéndice A. Medios de cultivo.

Medio Luria-Bertani (LB)

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad (g/L)</i>
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
Agar* (1.5%)	15

*Para la preparación de medio LB sólido.

<i>Antibiótico</i>	<i>Concentración final (µg/mL)</i>
Ampicilina	100
Kanamicina	20

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

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

Buffer TE

<i>Compuesto</i>	<i>Concentración final</i>
EDTA	1 mM
Tris HCl pH 8.0	10 mM

Apéndice B. Técnicas Utilizadas.

B.1 Extracción de DNA plasmídico.

a) Extracción por Lisis Alcalina, Miniprep (Sambrook *et. al.* 1989).

- Para la extracción de plásmido por esta técnica es necesario partir de un cultivo de la cepa de interés en 5 mL de medio LB con ampicilina (apéndice A). Dicho cultivo se inocula al 1% y se incuba durante toda la noche a 37°C y 180 rpm.

También es necesario contar con los reactivos siguientes:

Solución I. Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0). Esterilizar y almacenar a 4°C.

Solución II. NaOH 0.2 N, SDS al 1%. Esta solución se prepara al momento.

Solución III. Acetato de potasio 5 M: Ácido acético glacial: agua, 60:11.5:28.5.

- En un tubo eppendorf colocar 1.5 mL de cultivo y centrifugar a 10000 rpm por 5 min. Eliminar el medio de cultivo aspirando con una pipeta, de manera que el pellet quede lo más seco posible. Resuspender las células en 100 µL de solución I fría (tomar la solución en campana para evitar su contaminación).
- Agregar 200 µL de solución II y mezclar invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces. La solución II debe mezclarse bien, sin embargo, no es recomendable utilizar vortex. Los tubos deben ser mantenidos en hielo. Se observa la formación de un lisado viscoso.
- Agregar 150 µL de solución III fría y mezclar invirtiendo el tubo para dispersar la solución en el lisado bacteriano. Dejar reposar en hielo por 5 min. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h, a temperatura ambiente. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min y retirar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con un volumen de etanol al 70% y centrifugar nuevamente. Retirar el sobrenadante y secar el botón permitiendo la evaporación del etanol o utilizando vacío en un equipo Speed Vac.
- Disolver el botón en 10 µL de buffer TE con RNAsa (5 µg/mL) e incubar 30 min a 55°C.

b) Extracción por Lisis Alcalina, Midiprep (Sambrook *et. al.* 1989).

A diferencia de la miniprep, en la midiprep se extrae una cantidad de DNA mayor, por lo cual partimos de un cultivo de 100 mL de medio LB con ampicilina (apéndice A) tratado con las mismas condiciones que el cultivo de la miniprep. Las soluciones I, II y III también son preparadas de la misma forma que en la extracción por miniprep.

- Centrifugar el cultivo a 10000 rpm por 10 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante de manera que el pellet quede lo más seco posible. Resuspender el pellet en 5 mL de solución I fría utilizando vortex.
- Agregar 10 mL de solución II de reciente preparación y mezclar invirtiendo el tubo rápidamente cinco veces. La solución II debe mezclarse bien; no utilizar vortex en este paso y mantener en hielo. Se observa la formación de un lisado viscoso.
- Agregar 7.5 mL de solución III fría, mezclar invirtiendo el tubo y reposar en hielo por 5 min. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol por 1h a temperatura ambiente. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min y retirar el sobrenadante.
- Lavar el botón con un volumen de etanol al 70% y centrifugar nuevamente. Retirar el sobrenadante y secar el botón permitiendo la evaporación del etanol o utilizando vacío en un equipo Speed Vac.
- Disolver el botón en 0.5 mL de buffer TE con RNAsa e incubar 30 min a 55°C. Después agregar proteinasa K (10 mg/mL) e incubar por otros 30 min.

B.2 Purificación de DNA.

a) Fenol-cloroformo.

- A la solución de DNA obtenida a partir de un miniprep (llevar a 500 µL) o de un midiprep agregar 0.5 mL de fenol:cloroformo (1:1) y agitar con vortex. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min y recuperar la fase acuosa (fase superior).
- Lavar con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y agitar con vortex. Centrifugar nuevamente y recuperar la fase acuosa.
- Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min y retirar el sobrenadante.
- Lavar el botón con etanol al 70% y centrifugar nuevamente. Se retira el sobrenadante y después de que se ha secado el pellet se resuspende en 10 µL (miniprep) o en 100 µL (midiprep) de agua estéril.

b) Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa.

Para purificar un fragmento de DNA a partir de un gel de agarosa primero debe realizarse una electroforesis en un gel de agarosa (Apéndice B.3) y se corta la sección de gel donde se observa el fragmento de interés.

Después, el trozo de gel se coloca en una columna de fibra de vidrio, la cual se prepara como sigue:

- Rellenar un tubo eppendorf de 0.5 mL (al cual se le ha hecho una perforación en la parte inferior con una aguja) con fibra de vidrio, de manera que quede lo más compactada

posible (hasta 1/3 del volumen del tubo). Este tubo se introduce en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se esterilizan en autoclave por 20 min.

Una vez que el fragmento de gel se encuentra en la columna se centrifuga a 6000 rpm durante un minuto. Se recupera el filtrado y se coloca en un tubo limpio. Este proceso se repite una o dos veces más y posteriormente el filtrado total se lleva a un volumen final de 500 mL y se lava por el método de fenol-cloroformo (Apéndice B.2.b).

B.3 Electroforesis Horizontal en geles de agarosa. (Sambrook *et al.*, 1989)

- Disolver 0.32 g de agarosa en 40 mL de buffer TAE 1x calentando hasta ebullición durante algunos segundos (puede calentarse con microondas). El volumen de gel que se prepara depende del tamaño de la cámara de electroforesis que se utilizará.
- En el soporte para gel se coloca el peine que formará los pozos (utilizar el peine adecuado según el número de muestras a cargar) cuidando que quede alineado y que no toque la parte inferior del soporte. Agregar la muestra al soporte y dejar solidificar el gel.
- Sumergir el gel en el buffer de corrida (Buffer TAE 1x) dentro de la cámara de electroforesis.
- Cargar las muestras de DNA con buffer de carga 1X.
- Aplicar una corriente de 70V con la cámara de electroforesis y permitir que corra el DNA el tiempo necesario (aprox. 1.5h).
- Teñir con Bromuro de etidio sumergiendo el gel en una solución diluída a 1 µg/mL (stock 10 mg/mL). Observar el gel utilizando luz ultravioleta.

B.4 Preparación y Electrotransformación de células competentes.

1. Preparación de las células.

- Inocular al 1% un litro de medio LB (Apéndice A.1) con un cultivo fresco crecido durante toda la noche.
- Crecer las células a 37°C con agitación vigorosa hasta obtener una OD₆₀₀ entre 0.5 y 0.7 (se obtienen mejores resultados cuando se crecen las células rápidamente).
- Centrifugar el cultivo a 8000 rpm a 4°C durante 15 min.
- Remover la mayor cantidad de medio posible y resuspender los botones en un volumen total de 1 L de agua Milli Q estéril y fría. Centrifugar igual que en el paso anterior.
- Resuspender el botón en 0.5 L de agua Milli Q estéril y fría. Centrifugar nuevamente.
- Resuspender el botón en aproximadamente 20 mL de glicerol al 10% frío y estéril. Esta solución se elabora con agua Milli Q. Centrifugar nuevamente.
- 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.

- Esta suspensión se debe guardar en alícuotas de 50 μL a -70°C . Las células se conservarán en buen estado por al menos 6 meses en estas condiciones.

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

2. Electrotransformación.

- Las células competentes guardadas a -70°C se descongelan en hielo y se mezclan con la muestra de DNA, esperar de 0.5 a 1 min. (La muestra de DNA debe estar en un buffer de baja fuerza iónica como TE).
- Establecer la magnitud del impulso eléctrico en el electroporador (1250 V, para *E. coli*).
- Transferir la mezcla de células con plásmido a una cubeta de 0.1 cm (enfriada previamente) con la ayuda de una micropipeta y quitarle las burbujas golpeando ligeramente.
- Se coloca la cubeta en la cámara del equipo y se da el impulso eléctrico.
- Inmediatamente después del pulso se agregan a la cubeta 950 μL de medio SOC (Apéndice 2.1) 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).
- Transferir la suspensión de células a un tubo Eppendorf e incubar a 37°C durante una hora, con agitación a 300 rpm ya que ayuda a la recuperación.
- Plaquear de 10 a 50 μL de la suspensión de células en cajas petri con medio LB con ampicilina. Para determinar la eficiencia, la cual debe ser mayor a 1×10^7 transformantes (UFC/mgDNA), plaquear células electroporadas con plásmidos íntegros.

B.5 Preparación de geles de acrilamida para Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Coligan et al. 1995)

- Ensamblar el sándwich para preparar los geles con los cristales de 0.75mm de grosor en el equipo para electroforesis, según las recomendaciones del fabricante.
- Colocar el sándwich en el casting y verificar con agua destilada que el sistema no tenga fugas.
- Preparar el gel separador y el concentrador siguiendo las proporciones de la tabla siguiente. Tomar en cuenta que es un volumen aproximado para 2 geles y que hay que agregar el TEMED al final cuando ya se va a verter la mezcla al sándwich.

	Gel Separador	Gel Concentrador
H ₂ O	2.994 mL	0.907 mL
Buffer Tris-HCl pH 6.8	----	0.375 mL
Buffer Tris-HCl pH 8.8	1.87 mL	----
Acrilamida 30%	2.485 mL	199.5 μL
SDS 10%	74.85 μL	15 μL

Persulfato de Amonio 10%	63.62 μL	11.25 μL
TEMED	11.227 μL	2.25 μL

- Agregar la mezcla de reacción del Gel separador entre los vidrios con ayuda de una pipeta dejando el espacio necesario para colocar posteriormente el peine que formará los pozos. Agregar alrededor de 1 mL de agua destilada para obtener una superficie lisa. Dejar a temperatura ambiente alrededor de 20 min para permitir la total polimerización de la acrilamida.
- Colocar el peine en el sándwich, agregar TEMED al gel concentrador, agitar ligeramente y vaciarlo con ayuda de una pipeta sobre el gel separador, habiendo retirado el agua agregada. Rellenar los espacios que deja el peine evitando la formación de burbujas. Permitir la polimerización a temperatura ambiente.
- Desmontar el sándwich del casting y colocar en la cámara de electroforesis siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Se conecta la corriente a la cámara y se pre-corre el gel a 20 mA durante 30 min.
- Para preparar las muestras se diluye una porción de la proteína en solución con el buffer de carga para proteínas 1X. Calentar a 95°C durante 5 min y poner en hielo hasta que se cargue el gel. Las muestras se cargan en el gel con la ayuda de una micropipeta.
- Se corre el gel a 20 mA hasta que la marca de azul de bromofenol llegue hasta el fondo del mismo.
- Se desmonta el equipo separando el sándwich y se sumerge completamente el gel en solución de fijación durante 30 min.
- Se descarta la solución de fijación y se coloca ahora en solución de tinción durante 20 min.
- Decantar la solución de tinción y agregar solución de fijación nuevamente para retirar el exceso de colorante, únicamente por 30 s.
- Se retira la solución de fijación y se coloca el gel en solución de destinción, y se agita hasta que el gel pierda su coloración azul y las bandas de proteína sean visibles.

B.6 Análisis inmunológico, western blot

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 buffer de transferencia 1X (10X: Glicina 144 g/L, Tris Base 30 g/L), adicionando metanol al 10%.
3. En un recipiente se agrega una pequeña cantidad del buffer de transferencia, se coloca el equipo para hacer el sándwich de manera que el lado color negro del soporte (Carga negativa) quede en la parte inferior (dentro del recipiente).
4. Posteriormente se coloca sobre el soporte una fibra, un papel filtro y el gel SDS-PAGE.
5. Se activa la membrana sumergiéndola en metanol y se coloca sobre el gel, tratando que lo cubra en su totalidad y evitando la formación de burbujas.
6. Se coloca otro papel filtro y otra fibra sobre la membrana previamente humedecidos con buffer de transferencia.

7. Se cierra el sándwich y se monta la cámara. Se realiza la transferencia a 90 V durante 1-1.5 h. Se debe evitar que aumente la temperatura, por lo cual puede realizarse en el cuarto frío o montar el equipo con hielo.
8. Al terminar la transferencia 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 horas aproximadamente o a 37 °C durante 1 h.

B.7 Técnicas de purificación de proteína.

a) Purificación utilizando el tallo de histidinas (6xHis).

- A partir de un preinóculo incubado 24 h a 37°C de la clona de interés inocular al 1% 1 L de medio LB con Ampicilina (100 µg/mL). Incubar este medio por 12 h a 29°C y entonces inducir la producción de proteína siguiendo las condiciones óptimas de expresión y después cosechar las células por centrifugación (9000 rpm, 20 min).
- Lavar el pellet obtenido con buffer de unión (imidazol 10 mM) y congelar toda una noche.
- Romper las células por sonicación utilizando 3 ciclos de pulsos de 10s con 60s de descanso en buffer de ruptura (procurando resuspender el pellet en el menor volumen posible). Una vez terminados estos ciclos centrifugar a 13000 rpm por 30 min y separar el sobrenadante. Someter el pellet resultante al mismo proceso de sonicación (resuspendiendo el pellet en el menor volumen posible).
- Repetir la centrifugación y una vez más sonicar el pellet siguiendo el mismo proceso. Al final combinar los sobrenadantes con el último sonicado y llevar a 50 mL. Incubar con tritón al 2% por una hora, en hielo. Centrifugar por 30 min a 13000 rpm y filtrar el sobrenadante por membrana de 0.45 µm y por 0.2 µm.
- Una vez lavado el equipo FPLC y con la columna de sefarosa niquelada equilibrada con buffer imidazol 10 mM inyectar el lisado y pasar por la columna a un flujo de 1 mL/min.
- Una vez realizada la unión por afinidad dejar pasar buffer para lavar la proteína unida y después eluir usando un gradiente de buffer de elución (Imidazol 500 mM). Tomar las fracciones correspondientes a la elución de la proteína en el momento en el que observemos el aumento en las unidades de absorbancia. Entre 0.8 y 1.2 mL puede ser el mejor volumen para fraccionar.

b) Purificación utilizando una columna de β-ciclodextrina.

Inmovilización de β-ciclodextrina en columna de Sefarosa.

1. En 25 mL de H₂O destilada colocar 4 g de Sefarosa Epoxy-Activada 6B (GEhealthcare) y agitar por 1 h. No usar agitación magnética en ningún caso.

- Lavar en un Buchner con filtro poroso con apertura de 10-15 μm (10-15 M Pyrex) con 400 mL de agua destilada y después con 25 mL de NaOH 0.1 M y eliminar el exceso de líquido.
- Agregar 12 mL de una solución de NaOH 0.1 M que contenga β -ciclodextrina 30 mM. Dejar en agitación de 16 a 20 h a 45°C.
- Lavar con NaOH 0.1 M y eliminar el exceso de líquido (aprox. 100 mL).
- Bloquear grupos activos restantes transfiriendo el gel a un buffer 1 M de etanolamina-HCl pH 8.0 (Nota: la etanolamina es fotosensible) y dejar incubando con agitación ligera a 45°C, toda la noche. Al final lavar con agua destilada.
- Agregar 200 mL de glucosa al 2.5% y dejar en agitación por lo menos 30 min.
- Lavar 3 veces el gel alternando pH con: A) 100 mL de buffer acetatos pH 4.0, 0.1 M y NaCl 0.5 M, y B) 100 mL de buffer boratos pH 8 0.1 M y NaCl 0.5 M.
- Equilibrar el gel con buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 5.0 y transferirlo a la columna.

Nota: Después de utilizar la columna el gel debe lavarse repitiendo los pasos 7 y 8. Puede conservarse el gel en buffer citrato fosfato con 1 M de NaCl.

Purificación.

- Inocular al 1% 1 L de medio LB con ampicilina (concentración final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un preinóculo incubado 24h a 37°C. Incubar 12 h a 29°C e inducir la producción de proteína con IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Cosechar las células tras 6 horas de inducción mediante centrifugación, 20 min a 9000 rpm. Lavar el pellet con 200 mL de buffer citrato fosfato pH5 y centrifugar nuevamente. Congelar el pellet celular si no se utilizará en el momento.
- Resuspender el pellet celular en 4 mL de buffer de lisis el cual consiste de los siguientes componentes:

Buffer citrato-fosfato pH 5	c.b.p. 25 mL
Lisozima (1 mg/mL)	25 mg
Tritón 20% (2%)	2.5 mL
β -mercaptoetanol (20 mM)	35.2 μL
Inhibidor de proteasas	50 μL
Maltosa (10 mM)*	90 mg

*Agregar antes de filtrar.

- Dividir el pellet resuspendido en 4 tubos de 15 mL de manera que el volumen a sonicar sea menor. Sonicar las muestras con 3 ciclos compuestos de 10 s de sonicación y 60 s de enfriamiento. Recolectar las muestras en un tubo apropiado para centrifugar, enjuagando los tubos falcon con 3 mL de buffer. Agregar este volumen al tubo y centrifugar 20 min a 13000 rpm.
- Separar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 mL del buffer de sonicación. Separar la muestra en los mismos tubos Falcon y sonicar con 3 ciclos de 15 s y 60 s de

enfriamiento. Recolectar la muestra y centrifugar nuevamente 20 min a 13000 rpm agregando un enjuague de otros 3 mL de buffer.

5. Separar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de buffer de sonicación. Repetir el proceso de sonicación, pero cambiado el tiempo a 20 s de sonicación y 60 s de enfriamiento. Juntar el sonicado con los sobrenadantes anteriores y centrifugar 30 min a 13000 rpm. Separar el sobrenadante y agregar la maltosa. Llevar a 25 mL con buffer de sonicación y filtrar el lisado a través de una membrana de 0.8mm y luego por 0.2 mm.
6. Inyectar al FPLC Akta prime mediante la vía A o utilizando un loop adecuado tras haber equilibrado el equipo y la columna con el buffer adecuado.
7. Seguir el paso de la proteína por la columna, lavar la columna por un tiempo prolongado para eliminar ligaciones inespecíficas y posteriormente eluir con una solución de β -ciclodextrina a 9 mg/mL colectando las fracciones correspondientes.

B.8 Adsorción en almidón.

A partir de un preinoculo incubado 24h a 37°C se inoculo 1L de medio LB con ampicilina (concentración final 100 μ g/mL) con 600 μ L de preinoculo (prácticamente al 0.1%). Incubar 12 horas a 29°C e inducir la producción de proteína con IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Cosechar las células tras 6 horas de inducción mediante centrifugación, 20 min a 9000 rpm. Lavar el pellet con 200 mL de buffer citrato fosfato pH7 y centrifugar nuevamente. Congelar el pellet celular si no se utilizará en el momento.

Resuspender el pellet celular en 4 mL de buffer de lisis el cual consiste de los siguientes componentes:

Buffer citrato-fosfato pH7	Cbp 25 mL
Lisozima (1 mg/mL)	25 mg
Tritón 20% (2%)	2.5 mL
β -mercaptoetanol (20 mM)	35.2 μ L
Inhibidor de proteasas	50 μ L
Maltosa (10 mM)*	90 mg

*Agregar antes de filtrar.

Dividir el pellet resuspendido en 4 tubos de 15 mL de manera que el volumen a sonicar sea menor. Sonicar las muestras con 3 ciclos compuestos de 10 s de sonicación y 60 s de enfriamiento. Recolectar las muestras en un tubo apropiado para centrifugar, enjuagando los tubos falcon con 3 mL de buffer. Agregar este volumen al tubo y centrifugar 20 min a 13000 rpm.

Separar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 mL del buffer de sonicación. Separar la muestra en los mismos tubos falcon y sonicar con 3 ciclos de 15 s y 60 s de enfriamiento. Recolectar la muestra y centrifugar nuevamente 20 min a 13000 rpm agregando un enjuague de otros 3 mL de buffer.

Separar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de buffer de sonicación. Repetir el proceso de sonicación, pero cambiado el tiempo a 20 s de sonicación y 60 s de enfriamiento. Juntar el sonificado con los sobrenadantes anteriores y centrifugar 30 min a 13000 rpm. Separar el sobrenadante y agregar la maltosa. Llevar a 25 mL con buffer de sonicación y filtrar el lisado a través de una membrana de 0.8 mm y luego por 0.2 mm.

Para adsorber la proteína al almidón se preparó una solución stock de almidón al 10% (100µg/µL) y una dilución de este stock (10µg/µL) para colocar en tubos eppendorf 4 diferentes cantidades de almidón, como se muestra en la tabla c.1.

Ya agregado el almidón, colocar en los tubos la cantidad de lisado celular indicada en la Tabla C.1. Llevar a un volumen de 250µL.

TUBO	ALMIDÓN (µg)	LISADO (µL)
1	50	25
2		50
3		100
4		200
5	100	25
6		50
7		100
8		200
9	500	25
10		50
11		100
12		200
13	1000	25
14		50
15		100
16		200

Tabla C.1. Cantidades de almidón y proteína utilizados en el ensayo.

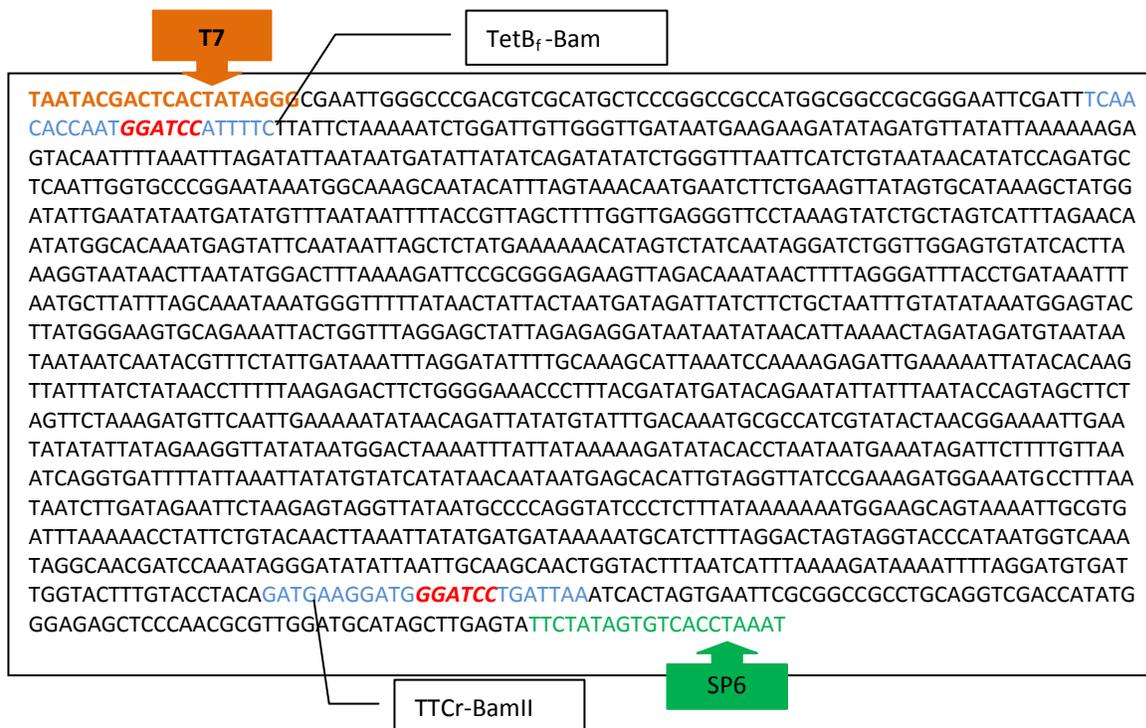
Incubar con agitación moderada toda una noche (12 h) y posteriormente centrifugar por 10 min a 9000 rpm. Separar el sobrenadante (proteína no adsorbida) y lavar el pellet de almidón con 100 µL de buffer citrato-fosfato pH7 centrifugando a 9000 rpm por 10 min. Repetir el proceso 3 veces. Eluir la proteína con 20 µL de una solución de β-ciclodextrina (9 mg/mL). Permitir la elución por 30 min en agitación moderada y centrifugar 10 min a 9000 rpm. Recuperar el sobrenadante y cargar en geles para teñir con Coomassie y para reconocimiento por western blot.

Apéndice C. Secuencias de DNA.

C.1 Secuencia del Fragmento C de la toxina del tétanos

1	aaaaatctgg	attggtgggt	tgataatgaa	gaagatatag	atggttatatt	aaaaaagagt
61	acaatthttaa	atthtagatat	taataatgat	attatatcag	atatatctgg	gtthtaattca
121	tctgtaataa	catatccaga	tgctcaattg	gtgcccggaa	taaatggcaa	agcaatacat
181	ttagtaaaca	atgaatcttc	tgaagttata	gtgcataaag	ctatggatat	tgaatataat
241	gatatgttta	ataatthttac	cgthtagcttt	tggttgaggg	ttcctaaagt	atctgctagt
301	catttagaac	aatatgacac	aatgagtat	tcaataatta	gctctatgaa	aaaatatagt
361	ctatcaatag	gatctggttg	gagtgtatca	cttaaaggta	ataacttaat	atggacttta
421	aaagattccg	cgggagaagt	tagacaaata	actthtaggg	atthtatctga	taaatthtaat
481	gctthatttag	caaataaatg	ggtthttata	actthtacta	atgatagatt	atctthctgct
541	aatthgtata	taaatggagt	actthtggga	agtgcagaaa	thtactggttt	aggagctatt
601	agagaggata	ataatataac	atthaaacta	gatagatgta	ataataataa	tcaatacgtt
661	tctattgata	aatthaggat	atthttgcaa	gcathaaatc	caaagagat	tgaaaaatta
721	tacacaagtt	atthtatctat	aactthttta	agagactthct	ggggaaacc	thtacgatat
781	gatacagaat	atthatttaat	accagtagct	tatagttcta	aagatgttca	atthgaaaaat
841	ataacagatt	atatgtatth	gacaaatgcg	ccatcgata	ctaacggaaa	atthgaatata
901	tattatagaa	ggtthatatag	tggactaaaa	thttattataa	aaagatatac	acctataaat
961	gaaatagatt	ctthttgthtag	atcaggtgat	thttattaaat	tatatgtatc	atataacaat
1021	aatgagcaca	thgttaggtha	tccgaaagat	ggaaatgcct	thtaataatct	tgatagaatt
1081	ctaagagtag	gthtataatgc	cccaggtatc	cctctthtata	aaaaaatgga	agcagtaaaa
1141	thgctgtgatt	taaaaaccta	thctgtacaa	ctthaaattat	atgatgataa	agatgcatct
1201	tthaggattag	taggtaccca	taatggtcaa	ataggcaacg	atccaaatag	ggatatatta
1261	atthgcaagca	actggtactth	taatcatttha	aaagataaaa	ctthtaacatg	tgattggtac
1321	thtgtaccta	cagatgaagg	atggacaaat	gattaa		

C.2 Secuencia que codifica para el Fragmento C ligado en pGEM-T easy (Clona 3).

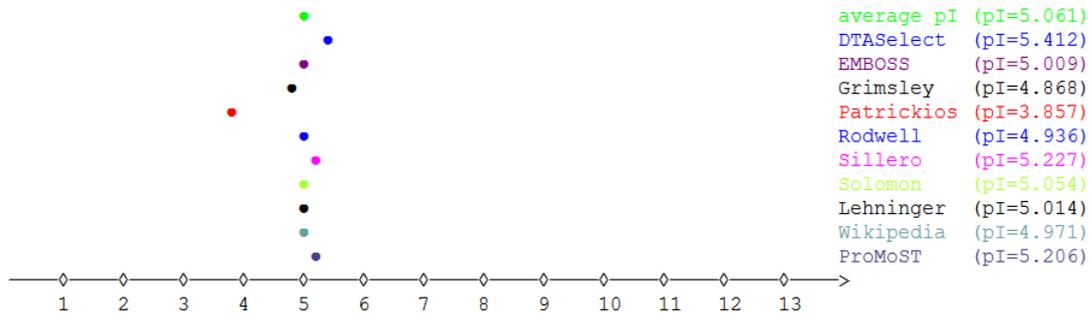


C.3 Secuencia de nucleótidos que codifican para la proteína de fusión TTC-DFAd (Clona G).

```
CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTC
ATTAAGAGGAGAAATTAACATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGgattcctttctattctaaaaatctggatttgggtgataatgaagaa
gatagatggtatattaaaaagagtaacaatttaatttagatattaataatgatattatcagatatactgggttaattcatctgtaataacatataccagatgctcaattgggtccc
ggaataatggcaagcaatacatttagtaaaacaatgaatcttgaagttatagtcataaagctatggatattgaatataatgatatttaataatttaccgttagcttttgggtgag
ggtcctaaagatctgtagtcatctagaacaatagggcacaatagatcaataatagctctatgaaaaacatagctctatcaataggatctgggtggagtgatcactaaaggt
aataacttaataggacttaaaagattccgctgggagaagtagacaaataacttttaggattacctgataaatttaagcttatttagcaataaatgggtttataacttactaa
tgatagattatctctgctaattgtatataaatggagtacttagggaagtcagaaactggtttaggagctatttagagaggataataataacattaaactagatagatgta
aataataatcaatcgtttctattgataaatttaggataatttgcacaagcattaaatccaaaagagattgaaaaattatacacaagttattatctataaccttttaagagactctgggg
aaacctttacgatagatagacaatatttataataccagtagcttctagttcctaaagatgtcaattgaaaaataacagattatgtattgacaatgcccactgataactaacg
gaaaattgaatataattatagaaggtatataatggactaaaattttataaaaaagatacaccaataatgaaaatagattctttgttaaatcagggtgattttataattatgtat
catataacaataatgagcacattgtaggtatccgaaagatggaatgccttataatcttgatagaattcaagagtaggtataatgcccaggatccctcttataaaaaatgga
agcagtaaaatgctgatttaaaaacctattctgtacaactaaattatgatgataaaatgcatcttaggactagtaggtaccataatggcaaataggcaacgatccaaatag
ggatataatgcaagcaactggcttatacatttaaaagataaaaatttaggatgtgattggtactttgtacctacaGATGAAGGATGGatccaacaagcagcagcagta
caacaacagaaaactaaaaaggtttattttgaaaagcctcaagttggggtagtagagtttgcctatgtttataataaaaaatcgaataaaacttaactcagctggcctggcaaaa
aaatgaccgttagtgaacgacaatataatggatctgcacactgatgaagatgactctgattagctgttattaccgatgggcaaaagcaaacaccagcagtaatgagcgtg
gtttaccttaccgctgatgccacttatgatcaaaatgggtcgtaaaaaggtttattttgaaaagcctcaagttgggtagtagagttatgcttatgttataaaaaatcgaata
aagctataactcagctggcctggcaaaaaatgaccgcttaggtaacgacaatataatggatctgcacactgatgaagatgactctgattagctgttattaccgatgggac
aaagcaaacaccagcagtaatgagcgtgtttaccttaccgctgatgccacttatgatcaaaatgggtcgtaaaaaggtttattttgaaaagcctcaagttgggtagtagagtt
tatgcttatgttataaaaaatcgaataaagctataactcagctggcctggcaaaaaatgaccgcttaggtaacgacaatataatggatctgcacactgatgaagatgac
ctgattagctgttattaccgatgggcaaaagcaaacaccagcagtaatgagcgtgtttaccttaccgctgatgccacttatgatcaaaatgggtcgtAAGAACTTCTG
ATCAAGCAGCACATCaAAAAagggtttattttgaaaagcctcaagttgggtagtagagttatgcttatgttataaaaaatcgaataaagctataactcagctggcctg
gcaaaaaatgaccgcttagtgaacgacGaatatgaattggatctgcacactgatgaagatgactctgattagctgttattaccgatgggcaaaagcaaacaccagcagctaat
gaggctgtttaccttaccgctgatgccacttatgatcaaaatgggtcgtaaaaaggtttattttgaaaagcctcaagttgggtagtagagttatgcttatgttataaaaaat
acgaataaagctataactcagctggcctggcaaaaaatgaccgcttagtgaacgacaatataatggatctgcacactgatgaagatgactctgattagctgttattaccg
atgggcaaaagcaaacaccagcagctaatgagcgtgtttaccttaccgctgatgccacttatgatcaaaatgggtcgttaagaactctgattcaagcagcacatcaagcaattcgt
aagccgataccagcagttcatcaagcagctggcgttaactgctacagaaccagaggttaacactagttcctctagttctagcgttagccaacttaaacatcaattggcagttaaat
ttttgtattactgataattatgcttcaaggcaattgctgtgaaacggcactagggtataacctaatggctttttttctgtgctataactaggcattaaaaggttccattagaactgt
ccaaaaggggaactggaaatggctaaaatcggtatgcgctgtgagttccaaggagcaacatttagatcgacagttagcggctttaaaagacgttgataaattttacggataaatt
aagttgggtaactaatcgccagaactgcaaaaaatgctggcctatattctgtagggtgatattgtaatggtcactgaattagatcgcttaggcagaaacaacatgattgacta
agatcatgaactccattcaaaataaggggtccaccctagatgtttaaatttgcctcctatgacaggaatcgctgatccgaactacgtcaactgatgactaatctcatcattgaattga
taagtacaagctgaaagcgaactgaagcggatctctgaggcggccgtaggctattaaaggtaacgaggtaaaatcgattgatgatagactttttgaaattctctatacgcaca
atgcaatttttactgtcttttagctcctgtagctacacagcgtctataacgattttattttatcaactcctcgcctatattagactaggtgttttcaaaatctaggatacaatcca
ttgaaagtattactggaggtgctcaatgaaaaaacaaccagtcaccatcaaatggttgcgctcctgcagaacggtAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCTGTTG
ATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAAATCCAAGCTAG
CTTGCGGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAA
GAACATTTTGGGCAATTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAA
AATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTTCTGCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTCCGATGGCAATGAAAAGACGGTGGAG
CTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCTTTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACGTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGAT
TTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATT
```

Apéndice D. Cálculo del punto isoeléctrico.

D.1. Cálculo del punto isoeléctrico de la proteína TTC-DFAd.



- El promedio de pI no incluye al calculado por el método Patrickios pues es el método más simplificado que suele arrojar datos erróneos.
- La proteína construida pesa 105780.46244 Da y ésta consta de 942 aminoácidos.

Ala = 68	Phe = 38	Val = 55	Cys = 4	Ser = 74	Asp = 86	Lys = 78
Met = 12	Gly = 56	Trp = 18	Asn = 79	Thr = 78	Glu = 38	Arg = 23
Pro = 31	Ile = 51	Leu = 64	Gln = 17	Tyr = 59	Sec = 0	His = 13

*Datos obtenidos con la herramienta del sitio <http://isoelectric.ovh.org> (Kozlowski L. 2007-2011 Isoelectric Point Calculator).