



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

"Caracterización cinética y estructural de una mutante
carboxilo-terminal de la nitrilasa de *Rhodococcus
pyridinovorans*"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

QUINTANA ROJAS JULIO CÉSAR

DIRECTOR DE TESIS: DRA. GEORGINA GARZA-RAMOS MARTÍNEZ
ASESOR DE TESIS: DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ



FES
ZARAGOZA

MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

VOCAL: DRA. GEORGINA GARZA-RAMOS MARTÍNEZ

SECRETARIO: DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

1er. SUPLENTE: M en C. ROSA ELBA GALVÁN DUARTE

2do. SUPLENTE: QFB. CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDÓN

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Edificio de Investigación, 2° piso. Facultad de Medicina. UNAM. Bajo la dirección de la Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez

Este Trabajo contó con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (Proyecto IN216413-2), así como el apoyo por parte la Secretaría de Educación Pública (SEP) en su modalidad de beca (Titulación-2014).

Con amor a mi familia. Gracias por darme el apoyo y la guía para alcanzar mis objetivos.

*"Do you see the way that tree bends?
Does it inspire?
Leaning out to catch the sun's rays
A lesson to be applied
Are you getting something out of this all-encompassing trip?"*

Present Tense- Pearl Jam

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Georgina Garza-Ramos, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por ser una guía valiosa en mi formación, además de motivarme a ser cada vez mejor, espero poder convertirme en alguien del que siempre se sienta orgullosa. Gracias por todo el apoyo y la confianza.

Al honorable jurado, por su tiempo y dedicación para enriquecer mi trabajo; además de su siempre amable atención.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que le debo mi formación universitaria. Siempre estaré orgulloso de ser un egresado de esta casa de estudios.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una identidad universitaria, además de una responsabilidad por dejar siempre en alto a la UNAM en cualquier lugar.

A mis padres y hermanos, por su invaluable ayuda, por el esfuerzo en sacar adelante nuestra familia, por su guía y por enseñarme el valor de conseguir lo que quiero trabajando para ello. Les debo todo a ustedes y para ustedes irá lo mejor de mí.

A mis amigos que quiero tanto y que por suerte son muchos; sé que cuento con ellos en cada momento de la vida. A Norberto y Sandra, esa familia que encuentras sin necesidad de tener lazos sanguíneos, los adoro mucho. A Fabián, Luis, Fili, Isaac, Leo, Betillo, Jesús, Moni, Miri, Carolina, Esme, por ser un gran apoyo siempre, por los buenos momentos compartidos y sobre todo darme una razón para sonreír cuando los recuerdo, por ser mis grandes amigos. Diana, Miriam, Abby, Carito, Lore, por también formar parte de mis personas favoritas en el mundo, por estar siempre al pendiente y brindar felicidad a mi vida. Betza, que a pesar de que nos distanciamos por momentos siempre regresas y te haces querer, gracias por jamás olvidarme. Tobal, Gustavo, Angie, Jesús, Eder, Beavis, Joch, Lili, Alma y mi clon el Gabo, mi banda guerrera que ha brindado risas y momentos inolvidables... Probablemente me falten muchos por mencionar, es difícil abarcar a todos cuando te rodean tantas personas maravillosas.

A mi banda nitrilasa, por aportar enseñanzas y ser siempre buenos amigos. Dana, Robert, Tania, Reni, Ganzo, Aaron, Sergio R², Mariana, Jorge, Sebastián, Alex, Agustín, porque son grandes amigos, por enseñarme que no debes conocer por mucho tiempo a las personas para tener un cariño especial por ellos. A Haven y Héctor Ceceña por tener los más sabios consejos y tener en ellos un apoyo incondicional. A mi banda querida del almacén, gracias por hacer felices y llenos de diversión mis días. A Alejandra, Felipe, Elena, Artemisa y

Marisol por los buenos momentos compartidos... Como somos muchos agradeceré a mi comuna del LFOIP por hacerme sentir como en casa, gracias por su valiosa compañía.

A Areli, por ser mi más grande apoyo, mi ejemplo a seguir, mi felicidad y mi amor. Gracias por estar en mi vida pequeñita, no hay día en el que no esté agradecido de tu amorosa compañía.

A Jaciel, Noemí y Gaby, por ser las hermanas que no tuve y a mi tía Teresa, por ser como una segunda madre para mí.

A Julio, por ser una de las personas que más admiro y de la cual he tenido muchos consejos, gracias por la gran ayuda a lo largo del tiempo. Al maestro Manuel y a su esposa, por ser como mi familia y por ayudar en mi formación.

A mis profesores que han marcado mi camino en base a sus enseñanzas y su extraordinaria calidad humana, especialmente a Jorge Rivas, Paty Vidal, Mónica, Jannett, Gerardo, Jorge, Adriana, gran parte de lo que soy se lo debo a ustedes.

Y sobre todo a los que ya no están, pero siguen formando parte de mi recuerdo. Mamá Teresa, Diego, no hay día en que no piense en ustedes.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. Introducción	15
2.- Marco teórico	16
2.1 Nitrilos.....	16
2.2 Nitrilasas.....	17
2.3 Cianuro dihidratadas.....	23
2.4 Uso de microorganismos del género <i>Rhodococcus</i> en la biorremediación.....	26
3.- Planteamiento del problema	28
4.- Objetivos	29
4.1 General.....	29
4.2 Específicos.....	29
5.- Hipótesis	30
6.- Materiales y Métodos	31
6.1 Transformación de células quimio-competentes.....	31
6.1.1 Material.....	31
6.1.2 Transformación.....	31
6.2 Preparación de medios de cultivo.....	32
6.3 Cultivo de toda la noche.....	32
6.4 Crecimiento de bacterias en medios de cultivo.....	33
6.5 Purificación de la Nitrilasa.....	34
6.5.1 Lisis celular.....	34
6.5.2 precipitación con sulfato de amonio.....	35
6.5.3 Diálisis.....	36
6.5.4 Cromatografía líquida de exclusión molecular e <i>intercambio</i> iónico.....	36
6.5.5 Electroforesis.....	38
6.6 Determinación de concentración de proteína por el método de BCA.....	39
6.7 Determinación de actividad enzimática.....	40
6.8 Medición por dispersión dinámica de luz (DLS).....	41
6.9 Análisis oligomérico en FPLC por columna analítica.....	42
7.- Resultados	43
A) Nitrilasa NitR340-1	43
7.1 Inducción y purificación de la nitrilasa truncada en el extremo C- terminal.....	43
7.2 Caracterización cinética.....	50
7.2.1 Ensayos cinéticos en condiciones de preincubación.....	52
7.3 Caracterización estructural.....	54

7.3.1 Dispersión Dinámica de Luz.....	54
7.3.2 Experimentos de Filtración Molecular para determinar el Estado Oligomérico de las enzimas.....	56
7.3.3 Experimentos de preincubación para el análisis estructural de la enzima mutante.....	59
B) Nitrilasa NitR340-2.....	61
7.4.- Una nueva mutante truncada	61
7.5 Inducción y purificación de la mutante NitR340-2.....	62
7.6 Análisis estructural.....	64
7.6.1 Dispersión dinámica de luz.....	64
7.6.2 Experimentos de Filtración Molecular para determinar el Estado Oligomérico de la mutante NitR40-2.....	65
7.6.3 Caracterización cinética de la enzima recombinante NitR40-2.....	66
7.7 Microscopía electrónica.....	68
8.- Análisis de resultados.....	71
9.- Conclusiones.....	75
10.- Perspectivas.....	76
11.- Referencias.....	77
APÉNDICE.....	81
A) Alineamiento de secuencias (Nitrilasa de <i>R. pyridinovorans</i> vs Cianuro dihidratasa de <i>B. pumilus</i>).....	81
B) Preparación de disoluciones.....	82

ABREVIATURAS

- Nit R340-1: Enzima mutante Nit Δ C340/D293G
- Nit R340-2: Enzima mutante Nit Δ C340
- CynD: Cianuro dihidratasa
- DTT: Ditioneitol
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- A.I. : Antes de Inducir
- D.I. : Después de Inducir
- E.T. : Extracto Total
- S.N. : Sobrenadante
- SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
- HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
- PODS de amonio: Peroxo disulfato de amonio
- TEMED: N, N'-dimetiletildiamina
- BCA: Ácido bicinónico
- UMBB: (University of Minnesota Biocatalysis/BiodegradationDatabase)

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Mecanismo de reacción catalizado por nitrilasas.....	17
2. Relación evolutiva entre enzimas metabolizadoras de nitrilos y cianuro pertenecientes a la superfamilia de las nitrilasas.....	18
3. Alineamiento de secuencias de algunos miembros de la superfamilia de las nitrilasas.....	19
4. Modelo en caricatura realizado a partir de la estructura cristalográfica de <i>P.abysyi</i>	20
5. Representación del sitio activo putativo Nit.....	20
6. Reconstrucción tridimensional de la CynD de <i>B.pumilus</i> a una resolución de 3,2nm.	24
7. Micrografía electrónica de tinción negativa de CynD de <i>B.pumilus</i>	25
8. Reacción de Berthelot para la determinación espectrofotométrica de indofenol a partir de amonio.	40
9. Perfil electroforético SDS-PAGE de la enzima recombinante NitR340-1.....	43
10. Cromatogramas de purificación por HPLC de la enzima mutante NitR340-1.....	45
11. Perfil electroforético SDS-PAGE al 12% de la cinética de inducción de la nitrilasa NitR340-1.	46
12. Perfil electroforético SDS-PAGE de la purificación de la enzima mutante NitR340-1.....	47
13. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de la sobreexpresión de la nitrilasa recombinante NitR340-1 y de la fracción recuperada por saturación en sulfato de amonio.	48
14. Cromatogramas de purificación por HPLC de la Nitrilasa recombinante NitR340-1 con el método de sobreexpresión y purificación modificado.....	49
15. Perfil electroforético SDS-PAGE de la purificación de la Nitrilasa recombinante NitR340-1 con el método de sobreexpresión y purificación modificado.	49
16. Ensayo de actividad enzimática determinado por el método de formación de indofenol a partir de amonio.	51
17. Gráficos de dependencia de la actividad específica con respecto a la concentración de la nitrilasa silvestre y NitR340-1	52
18. Gráficos de dependencia de la actividad específica con respecto a la concentración de la nitrilasa silvestre y NitR340-1 en condiciones de	

preincubación.....	53
19. Comparativo de gráficos de radio hidrodinámico medidos por DLS de la Nitrilasa silvestre y la nitrilasa NitR340-1.....	55
20. Cromatograma de filtración molecular analítica de los marcadores de peso molecular.....	56
21. Regresión lineal de los datos obtenidos de los estándares de peso molecular por filtración molecular analítica.	57
22. Cromatograma de filtración molecular analítica de la nitrilasa silvestre.....	57
23. Cromatograma de filtración molecular analítica de la nitrilasa NitR340-1.....	58
24. Cromatograma de filtración molecular analítica de cuatro diluciones de la nitrilasa mutante NitR340-1 en condiciones de preincubación.....	59
25. Cromatograma de secuenciación de la mutante NitR340-2.....	61
26. Perfil electroforético SDS-PAGE de la sobreexpresión y recuperación por saturación de sulfato de amonio de la nitrilasa recombinante NitR340-2.....	62
27. Cromatogramas de purificación de la nitrilasa recombinante NitR340-2.....	63
28. Perfil electroforético SDS-PAGE de purificación de la enzima recombinante NitR340-2 proveniente de dos saturaciones distintas de sulfato de amonio.....	63
29. Gráfico de radio hidrodinámico medido por DLS de la mutante NitR340-2.....	64
30. Cromatograma de filtración molecular analítica de la nitrilasa recombinante NitR340-2.....	65
31. Cinéticas enzimáticas de la mutante NitR340-2 con benzonitrilo y valeronitrilo como sustratos.....	67
32. Micrografía electrónica de tinción negativa a 20,000 aumentos de la mutante NitR340-2 de la nitrilasa recombinante de <i>R. pyridinovorans</i> utilizando PTA como solución de contraste.....	69
33. Micrografía electrónica de tinción negativa a 30,000 aumentos de la mutante NitR340-2 utilizando PTA como solución de contraste.....	70
34. Alineamiento de las secuencias de la nitrilasa de <i>R. pyridinovorans</i> y la cianuro dihidratasa de <i>B. pumilus</i> GMA1.....	82
35. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Actividad enzimática específica comparativa entre la nitrilasa silvestre y la nitrilasa recombinante NitR340-1.....	50
2. Comparativo de radio hidrodinámico entre la nitrilasa silvestre y la mutante NitR340-1 obtenidos por DLS.....	55
3. Relación peso molecular contra tiempo de elución de los marcadores de peso molecular.....	56
4. Relación peso molecular experimental contra tiempo de elución de la mutante NitR340-1.....	58
5. Relación peso molecular contra actividad enzimática de muestras de nitrilasa NitR340-1 en condiciones de preincubación.....	60
6. Comparativo de Radio hidrodinámico de la mutante NitR340-2.....	65
7. Parámetros obtenidos del ajuste de los datos cinéticos a la ecuación de Hill.	67

RESUMEN

Las nitrilasas catalizan la transformación directa de nitrilos orgánicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos y amonio. Las nitrilasas están formadas por monómeros de 30-40 kDa que se asocian para formar oligómeros activos de 4 a 22 subunidades. Se ha observado que la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1 y la cianuro dihidratasa (CynD) de *Bacillus pumilus* se ensamblan en hélices regulares de longitud variable. Nuestro modelo de estudio es la nitrilasa de *R. pyridinivorans*. Una propiedad importante de esta enzima es que presenta especificidad alta por nitrilos aromáticos y alifáticos, propiedad que la hace un enzima con gran potencial biocatalítico. A partir de la nitrilasa recombinante de *R. pyridinivorans*, se han generado algunas mutantes truncadas en el extremo C-terminal que generan estructuras regulares en forma de filamentos helicoidales de gran tamaño.

La nitrilasa de *R. pyridinivorans* tiene un extremo C-terminal extendido comparado con la CynD de *B.pumilus* GMA1, hecho que llevó a la generación de una mutante truncada en 26 aminoácidos del extremo C-terminal, homóloga en tamaño a la CynD. Los estudios estructurales de una primera mutante truncada, Nit Δ C340, mostraron que la enzima presenta una heterogeneidad oligomérica, es inestable y tiende a agregar. La actividad enzimática está disminuida 10 veces con respecto a la enzima silvestre. Se encontró que la inestabilidad fue consecuencia de una mutación adicional en la posición D293G. Se produjo una segunda mutante truncada Nit Δ C340-2, la cual fue purificada y caracterizada cinética y estructuralmente. Los estudios estructurales muestran que la mutante forma fibras

helicoidales regulares de aproximadamente 50 nm de largo. Las fibras presentan un aumento en la actividad catalítica 4 veces, con respecto a la nitrilasa silvestre. La generación de hélices largas proporciona un ensamble catalítico con las propiedades óptimas para explorar su potencial biotecnológico.

1.- Introducción

La Química Verde es una herramienta importante para lograr la sustentabilidad. Este enfoque, proporciona una guía para los científicos que quieren llevar a cabo prácticas sostenibles en las actividades químicas de investigación, desarrollo y fabricación. [1]

Pronto, la química verde no será considerada como una rama separada de la ciencia, sino que será más bien filosofía que guíe todas las actividades de investigación y fabricación científica se lleven a cabo y sean evaluadas. Para poner esto en práctica, se requieren nuevas metodologías para ayudar a identificar las áreas donde metodologías sintéticas tradicionales están fallando.

El uso de enzimas y microorganismos es una opción ideal para promover el "enverdecimiento" de las reacciones químicas. Algunas características ventajosas han contribuido al desarrollo de los procesos de biocatálisis. La primera es la alta selectividad (químico, regio, y estereoselectividad) mostrado por enzimas que permite la producción novedosa de compuestos enantiopuros, al mismo tiempo minimiza la formación de subproductos.

Otra ventaja es la posibilidad de trabajar en condiciones de reacción suaves que son suficientes para llevar a cabo la reacción catalizada por la enzima, reduciendo los requerimientos de energía.

Una ventaja adicional es que las enzimas no son tóxicas, pueden ser reutilizadas, y son biodegradables. Estas características contribuyen a crear procesos

respetuosos con el medio ambiente que son totalmente coherentes con el concepto de química verde.

2.- Marco teórico

2.1 Nitrilos

Los nitrilos son un grupo importante de compuestos orgánicos que poseen un triple enlace carbono-nitrógeno y pueden encontrarse en forma natural o por síntesis industrial. En la naturaleza están representados por los cianoglucósidos y cianolípidos en las plantas, los aminonitrilos y cianhidrinas en los hongos y los mandelonitrilos en los artrópodos, así como por una variedad de nitrilos que se encuentran en microorganismos [2]. La industria química hace uso de varios nitrilos para fabricar una gran variedad de polímeros y otros productos químicos. Son importantes intermediarios en la síntesis orgánica de aminas, amidas, ácidos carboxílicos y ésteres principalmente. Algunos de estos productos se usan como disolventes, conservadores e intermediarios en la síntesis de fármacos. Sin embargo, la mayoría de los nitrilos son compuestos potencialmente tóxicos; su molécula contiene el grupo funcional ciano y no suelen ser fácilmente biodegradables. A pesar de que un grupo restringido de microorganismos utiliza nitrilos como fuente de carbono y nitrógeno, la degradación microbiológica se ha considerado como una alternativa eficiente para eliminarlos del ambiente.

2.2 Nitrilasas

Las nitrilasas son un grupo de enzimas que catalizan la transformación directa de nitrilos orgánicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, liberando amonio en el proceso [3,4,5]. La hidrólisis del cianuro (HCN), el nitrilo más sencillo, es catalizada por otro grupo de enzimas específicas, las cianuro dihidratasas y las cianuro hidratasas; las primeras hidrolizan el cianuro a ácido fórmico y amonio mientras que las segundas lo convierten en formamida. Este grupo de proteínas están cercanamente relacionadas ya que presentan similitudes a nivel de secuencia de aminoácidos y estructura funcional. Se agrupan en una sola familia conocida como Nitrilasa/Cianuro Hidratasa, la cual también incluye a las amidasas alifáticas. Esta familia pertenece a su vez a la superfamilia Nitrilasa, que agrupa en trece ramas distintas a las hidrolasas carbono-nitrógeno, cuyos miembros catalizan una variedad de reacciones hidrolíticas de enlaces no peptídicos carbono-nitrógeno. [5,6]

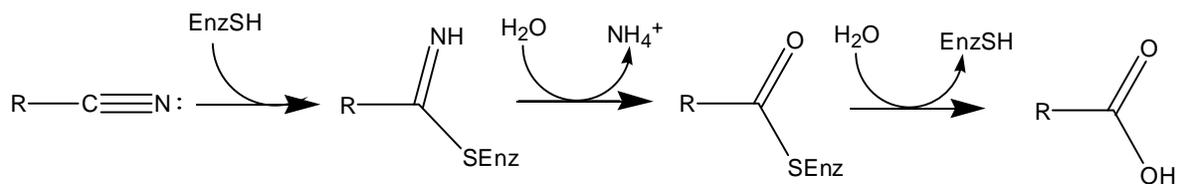
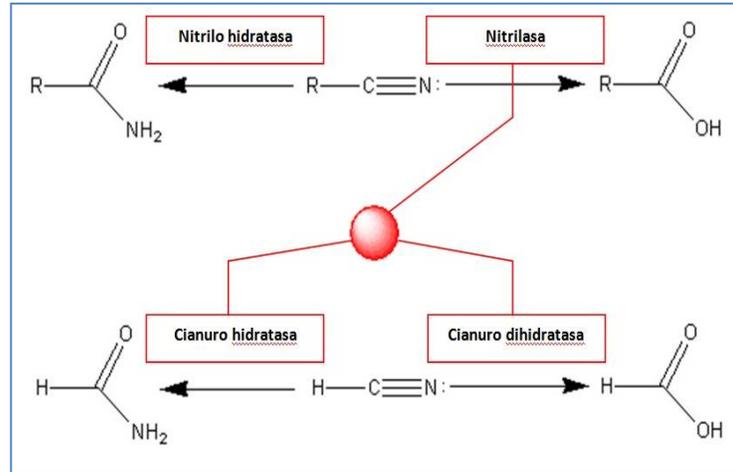


Figura 1.- Mecanismo de reacción catalizado por las nitrilasas que conlleva la formación de un ácido carboxílico con la liberación de amonio a partir de un nitrilo.

Figura 2.- Relación evolutiva entre enzimas pertenecientes a la superfamilia de las nitrilasas.

De forma simple se representa la relación evolutiva entre las nitrilasas y las cianuro dihidratasas que son muy similares en secuencia y estructura funcional.



1 - Nitrilase	f P E a f	h R K I p T	I . C W E n . p
2 - Aliphatic Amidase	F P E Y S	Y R K i P W c	i I C d D G n y P
3 - N-terminal Amidase	F P E . .	Y r K . F L .	. I C M D . . P Y
4 - Biotinidase	f P E d .	Y r K . h L y	F t C F D i l f y
5 - Beta-ureidopropionase	. Q E A W	. R K N H I P	N I C Y G R H H P
6 - Carbamylase	F p E L A	Y R K i H L P	f I C N D R R W P
7 - Pro. NAD+ Synthetase	f P E L .	. . K . . L P	. I C E D . w . p
8 - Euk. NAD+ Synthetase	G P E L E	R p K m . I a	E i C E E L w . p
9 - ALP N-acyltransferase	w p E . a	. . K . . I v	. i C y E . . f .
10 - Nit and NitFhit	L P E . f	y r K . H I F	. i C Y D . R F p
11 - NB11	. q E I f	Y R K . H I P	. i C w D q w f p
12 - NB12	F P E i F	Q y K I H i T	q I C Y D i E F P
13 - Non-fused Outliers	I P E . .	y r K . h L f	. i C y d . r F p

Figura 3.- Alineamiento de secuencias de miembros de la superfamilia de las nitrilasas.

En este alineamiento de secuencias se aprecia la triada catalítica (Glu-Lys-Cys) [6]

En la naturaleza existe una gran diversidad de nitrilasas en las que se presentan variaciones de secuencia, con extremos amino y carboxilo divergentes, sin embargo de ninguna de ellas se conoce la estructura tridimensional [7]. Las estructuras cristalográficas de once homólogos distantes de las nitrilasas (con menos de 20 % de identidad) sugieren que este grupo de enzimas poseen una triada catalítica particular Glu-Lys-Cys la cual fue comprobada mediante mutaciones en estos residuos de aminoácido generando la pérdida total de actividad enzimática [8], y una conformación multimérica que presenta en su plegamiento un motivo estructural único formado por cuatro capas α - β - β - α (ABBA sándwich).

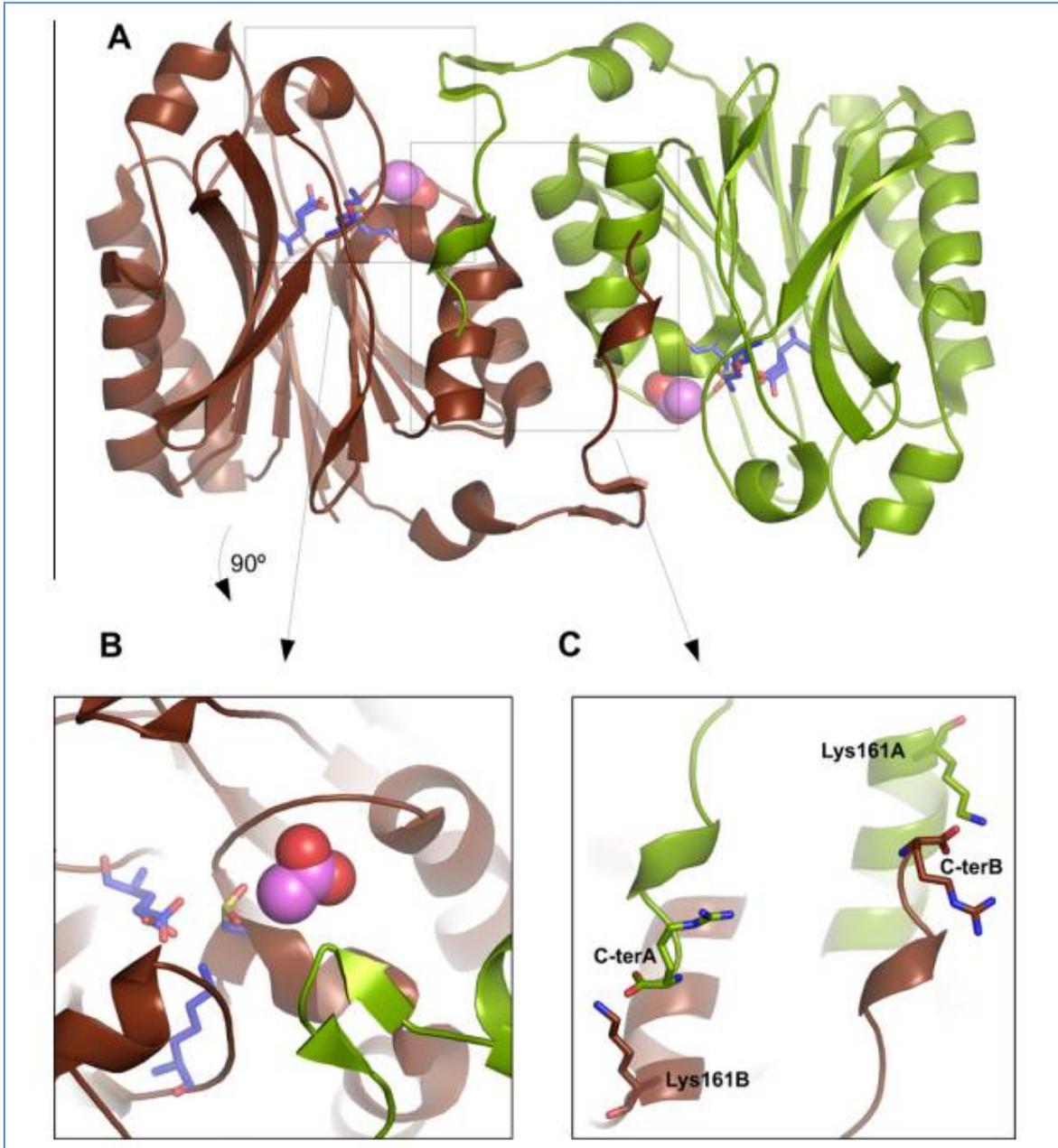


Figura 4- Estructura diseñada a partir del cristal de la nitrilasa de *P. abyssi*. **(A)** Se muestra un dímero de Nitrilasa en un modelo de caricatura, vista a lo largo del eje binario no cristalográfico. El ión acetato unido se muestra como esferas, mientras que los residuos catalíticos (**Cys146, Glu42, Lys113**) como palos. **(B)** Una vista de primer plano de la zona de unión, la escena se gira 90 a la baja en comparación con A. **(C)** Una vista detallada del extremo C-terminal, los residuos que interactúan se muestran como palos. ^[9]

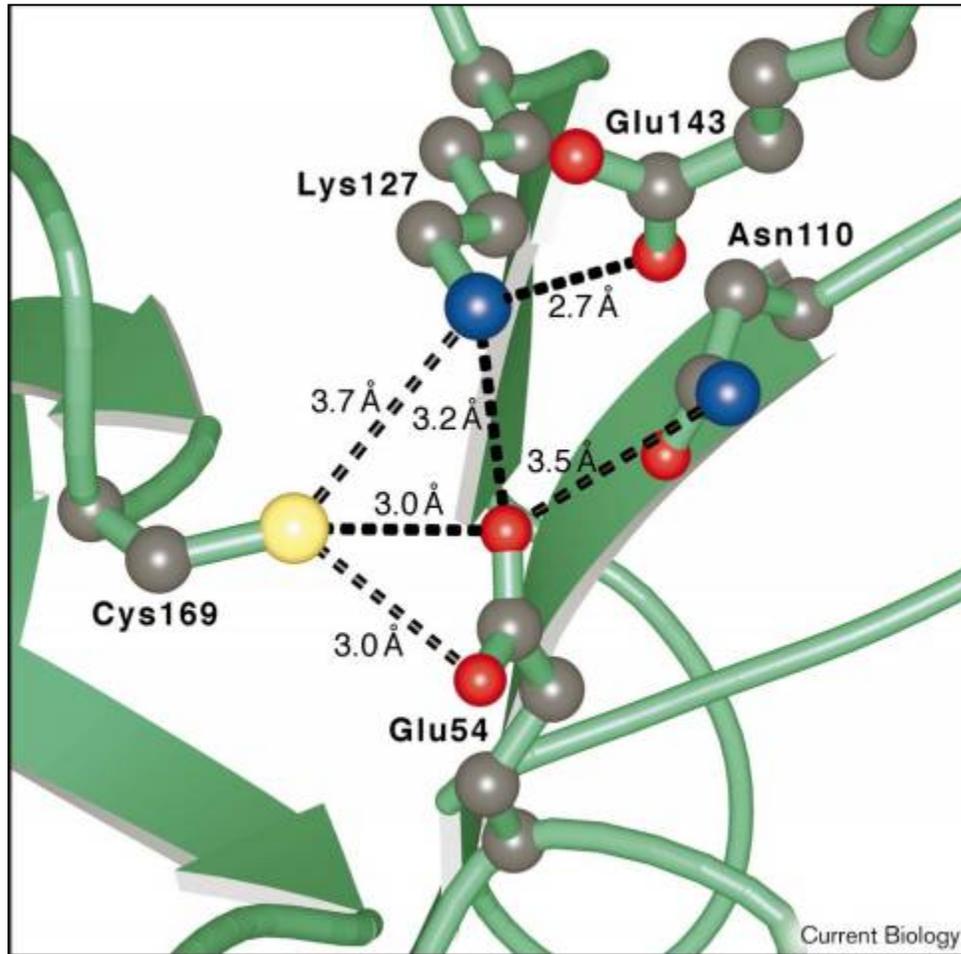


Figura 5.- Representación del sitio activo putativo Nit. La región alrededor de la Cys169, un residuo conservado en nitrilasas, se conserva en proteínas Nit. La alineación de residuos con Cys169, Glu54 y Lys127 se predice para formar una tríada catalítica en la superfamilia de la nitrilasa ^[10]

La nitrilasa fue descrita hace más de 40 años, como la primera enzima capaz de metabolizar nitrilos. La enzima, obtenida inicialmente de hojas de cebada, cataliza la conversión del 3-indol acetonitrilo a ácido 3-indolacético (una auxina). Esta reacción se observó en extractos enzimáticos obtenidos de diferentes plantas. Posteriormente se observó actividad de nitrilasa en extractos enzimáticos obtenidos de bacterias del suelo (*Pseudomonas*) seleccionadas para crecer en un medio que contiene el nitrilo natural ricina (N-metil-3-ciano-4-metoxi-2-piridona)

como única fuente de carbono ^[11]. La nitrilasa (NIT4) purificada a partir de *Arabidopsis* y *Nicotiana*. NIT4 constituye una sub-rama distinta de las nitrilasas que hidrolizan β -ciano-L-alanina en asparagina y ácido aspártico ^[17]

A la fecha se han caracterizado nitrilasas provenientes de diferentes microorganismos, en su mayoría bacterias y una de plantas (*Arabidopsis thaliana*), ^[12]. Las diferencias más significativas son la especificidad por sus sustratos, propiedades de agregación y sus valores de pH óptimos ^[11]. Basados en la especificidad por el sustrato las nitrilasas de bacterias se clasifican en tres categorías: aquéllas que hidrolizan nitrilos aromáticos o heterocíclicos, las que degradan preferentemente nitrilos alifáticos o arilacetónitrilos y por último las que tienen capacidad de hidrolizar tanto nitrilos aromáticos como alifáticos ^[13].

Pese al gran interés que existe en este grupo de enzimas y en los organismos que las producen, poco se ha progresado en el estudio desde el punto de vista de su estructura y mecanismo catalítico. Se han purificado a homogeneidad las nitrilasas de algunas especies bacterianas: Dos cepas de *R. rhodochrous* (K22 y J1) ^[14, 15], *Alcaligenes faecalis* JM3 ^[13] y *Pseudomonas fluorescens*, ^[16] y a la fecha se ha logrado cristalizar dos nitrilasas pertenecientes a *Pyrococcus abyssi* ^[9] y a *Syechocystis* sp. PCC6803^[32].

Las nitrilasas presentan un gran interés biotecnológico. La hidrólisis enantioselectiva de nitrilos evita la racemización de importantes reactivos quirales, por lo que se han usado en la preparación de enantiómeros biológicamente activos como el ácido (R)-3-hidroxi-4-ciano-butírico, intermediario en la síntesis de

varios fármacos como la Atorvastatina (Lipitor®). *Pseudomonas putida*, *Microbacterium paraoxydans*, y *Microbacterium liquefaciens*, se utilizan con alta eficiencia, para la síntesis enantioselectiva del ácido (-)-(R)-mandélico a partir de mandelonitrilo; la molécula obtenida es un intermediario en la síntesis de varios fármacos [18].

La nitrilasa regioselectiva-alifática de *Acidovorax facilis* 72W se purificó y se caracterizó, y el gen correspondiente fue clonado y secuenciado [17,18]. Este gen de nitrilasa se sobre-expresa en *Escherichia coli*, generando de manera eficiente y regioselectiva la conversión de dinitrilos alifáticos a ácidos cianocarboxílicos. Los altos rendimientos obtenidos, las condiciones suaves de reacción utilizados, y robustez hacen de este biocatalizador adecuado para aplicaciones industriales [17, 19].

La nitrilo hidratasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1, se emplea actualmente, en la producción de acrilamida y nicotinamida. La mitad de la acrilamida producida a nivel mundial es realizada a través de este tipo de bioprocesos[20].

2.3 Cianuro dihidratasas

Las enzimas degradadoras de cianuro pueden ser de dos tipos, que dependen del producto final de la catálisis. El primer tipo corresponde a las cianuro dihidratasas, comprenden un grupo de enzimas bacterianas que incluyen las de *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3, *Bacillus pumilus* C1, y *Pseudomonas stutzeri* AK61 [21, 22, 23]. Todas estas enzimas se comportan como verdaderas nitrilasas, ya que catalizan la conversión de cianuro directamente a formiato y amoníaco [21, 22, 23]. Las enzimas en el otro grupo corresponde a las cianuro hidratasas, que hidrolizan el cianuro para producir formamida, todas estas son de origen fúngico. Estas enzimas están más estrechamente relacionadas con las nitrilasas que con las nitrilo hidratasas que contienen metales [6]. Las cianuro hidratasas mejor caracterizadas son las de *Gloeocercospora sorghi* y *Fusarium lateritium* [24, 25].

La degradación del cianuro mediada por las cianuro dihidratasas (CynD) es una ruta muy frecuente en bacterias, y que muchos hongos fitopatógenos han desarrollado para combatir la toxicidad del cianuro producido por plantas que infectan.

Las cianuro dihidratasas son enzimas formadas por subunidades de aproximadamente 37 KDa que se asocian en homooligómeros de diferentes tamaños, entre 10 y 22 subunidades, de las cuales se ha descrito que las CynD de *Bacillus pumilus* C1, *Pseudomonas stutzeri* y algunos hongos se asocian en forma de espirales cortos (figura 6).

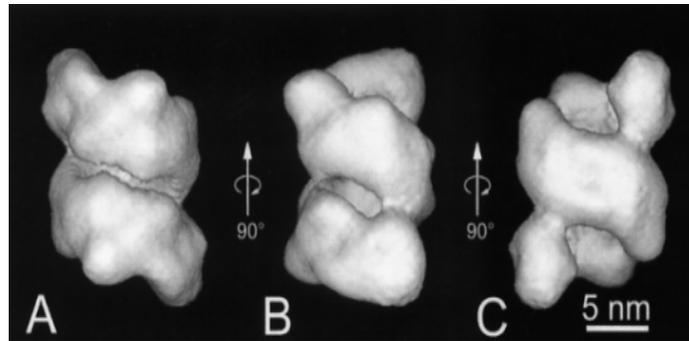


Figura 6.- Reconstrucción tridimensional de micrografías electrónicas con tinción negativa de la cianuro dihidratasa de *B. pumilus* a una resolución de 3,2 n.m. Se muestran las vistas del doble eje (A y C) y una vista perpendicular al doble eje (B). La estructura es una espiral de dos vueltas de extremo a extremo, con 18 unidades. [26]

Una diferencia notable entre las secuencias de las CynD con respecto a otros miembros de la superfamilia de las nitrilasas se produce en el extremo carboxilo-terminal. Las nitrilasas microbianas de *B. pumilus*, *P. stutzeri*, las nitrilasas fúngicas de *Neurospora crassa*, *Gloeocercospora sorghi*, y las amidasas de *Helicobacter pylori*, *Geobacillus pallidus*, y *Pseudomonas aeruginosa* tienen una extensión de su extremo C-terminal en relación con las cianuro dihidratasas. Esta extensión varía en longitud como en secuencia, sin similitudes preservadas incluso entre enzimas estrechamente relacionadas, así como ninguna estructura secundaria conservada. [31]

CynD de *B. pumilus* C1 es la cianuro dihidratasa mejor caracterizada hasta el momento. Es un homooligómero de 18 subunidades a pH neutro. Se ha demostrado la formación de estructuras helicoidales largas de la CynD de *B.*

pumilus C1 inducida por el cambio a pH cercano a 5.4, esto se debe principalmente a interacciones electrostáticas producidas por el cambio de carga en las Histidinas que se encuentran en el extremo C-terminal (ver figura 7).^[26]

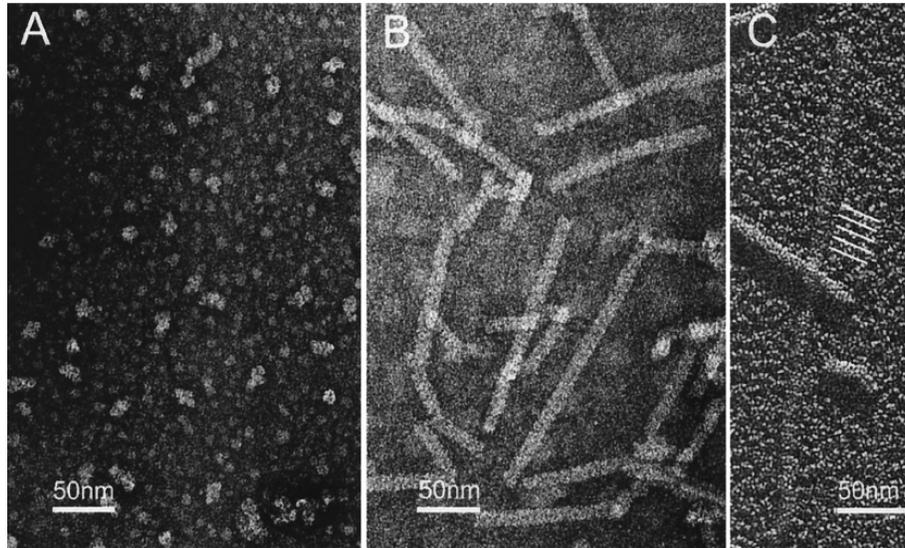


Figura 7.- Micrografías electrónicas de tinción negativa de la cianuro dihidratasa aislada de *B. pumilus* a pH 8,0 (A) y 5,4 (B) ilustra la transición de partículas discretas a fibras extendidas. (C) sombreado Platino-carbono de las fibras de cianuro dihidratasa. Se pueden observar estrías regulares a lo largo de la longitud de la fibra que se extienden en paralelo a la dirección de sombreado. El ángulo de las estrías implica que la disposición helicoidal de las subunidades es izquierdo. La ubicación de cinco de las estrías se destaca por líneas blancas. ^[26]

2.4 Uso de microorganismos del género *Rhodococcus* en la biorremediación

El proceso de biorremediación consiste en el uso de agentes biológicos, tales como microorganismos, en la descontaminación y la detoxificación de agentes químicos contaminantes del medio ambiente. Los principales agentes biológicos utilizados son las enzimas producidas por los microorganismos, pero en el campo pueden también ser utilizadas asociaciones de bacterias con plantas ^[20].

La diversidad metabólica que presentan los microorganismos del género *Rhodococcus* los hace ser candidatos ideales para su utilización en bioprocesos, con un gran potencial tanto en aplicaciones industriales como ambientales ^[27], se han recopilado información acerca de 400 enzimas catabólicas microbianas y las posibles rutas a seguir dentro de la biotransformación o biodegradación de compuestos orgánicos en una base de datos sobre Biocatálisis y biodegradación de compuestos orgánicos por microorganismos de la *UMBB*: (*University of Minnesota Biocatalysis/BiodegradationDatabase*)^[28].

3.- Planteamiento del problema

Se ha reportado que la nitrilasa de *R. rhodochrous* forma fibras helicoidales como resultado de un proceso autoproteolítico, en el que se eliminan 39 residuos del extremo C-terminal. Los modelos estructurales generados sugieren que la región del C-terminal está involucrada en las interacciones de las interfases entre subunidades que participan en la formación de las formas helicoidales. Por otro lado, las cianuro dihidratasa bacterianas formadas por subunidades de aproximadamente 37 kDa, se asocian en espirales oligoméricas con un tamaño definido de entre 14 y 18 subunidades. Estas estructuras forman filamentos helicoidales regulares de mayor tamaño, en un proceso dependiente de pH.

En el laboratorio de FQIP, se han clonado y sobreexpresado con éxito a la nitrilasa de *R. pyridinivorans*, silvestre y dos mutantes truncadas en el extremos C-terminal, mediante distintas estrategias de ingeniería genética. La purificación de las enzimas se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas convencionales, sin embargo, el rendimiento no ha sido el esperado.

Las proteínas truncadas C-terminal se diseñaron para inducir la formación de filamentos helicoidales por asociación entre los monómeros de la nitrilasa. La enzima silvestre es un oligómero que consta de 12 subunidades. La reducción en 26 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de cada monómero, puede llevar a la formación de estructuras filamentosas semejantes a las formadas por la cianuro dihidratasa, ya que de esta manera se genera una secuencia en tamaño, similar a las cianuro dihidratasa. Su caracterización cinética y estructural requiere

de contar con cantidades de proteína del orden de 5-10 mg, por lo que es necesario llevar a cabo la purificación de la mutante Nit Δ C340 a gran escala.

Los filamentos catalíticos de las nitrilasas además de constituir un modelo de estudio de autoensamblaje de proteínas, tienen un gran potencial biotecnológico. El ensamble de estos filamentos le confiere a la nitrilasa una gran estabilidad, lo que permitiría obtener estructuras activas en un amplio rango de condiciones para su uso en la síntesis enantioselectiva de ácidos carboxílicos. Es necesario determinar si la formación de estos filamentos altera la especificidad por sus sustratos así como la exploración de la enantioselectividad en sistemas en los que la fase dispersante es un disolvente no polar dada la baja solubilidad de los sustratos

4.- Objetivos

4.1 General:

Generar filamentos helicoidales con actividad catalítica a partir de una mutante

Nit Δ C340 de *R. pyridinovorans*

4.2 Específicos:

- Sobreexpresar las mutante Nit Δ C340 de *R. pyridinovorans*.
- Purificar la mutante Nit Δ C340 de *R. pyridinovorans*.
- Caracterizar la actividad enzimática de la mutante
- Determinar el tamaño de las mutantes tanto en estado monomérico, así como en su estado oligomérico por Dispersión Dinámica de Luz
- Encontrar las condiciones de pH y temperatura para la formación de filamentos helicoidales

5.- Hipótesis

Las mutaciones en el extremo C-Terminal de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* favorecen las interacciones entre las intercaras de los monómeros y promueven la formación de filamentos helicoidales. Generar una mutante de la nitrilasa de *R. pyridinovorans*, en la cual el extremo C-terminal se acorte en 26 aminoácidos puede llevar a la formación de filamentos helicoidales similares a las formadas por las cianuro dihidratasa

6.- Materiales y Métodos

6.1 Transformación de células quimio-competentes

6.1.1 Material

- Un tubo con 50µL de células (*E.coli* BL21 DE3), procurar descongelar lentamente las células en hielo
- 3µL de DNA (120ng/µL), el cual debe estar en todo momento en hielo
- Tubos estériles con tapa (SIMPORT *CultubeSterile Culture tubes*. Tubewith CAD, polypropylene, 25/TRA; 12mm x 75mm)

6.1.2 Transformación

Colocar 3µL de DNA en el fondo del tubo, posteriormente agregar 50µL de células; cuidando de hacerlo lo más cuidadosamente debido a la fragilidad de dichas células. Dejar incubar en hielo el tubo con el DNA por un periodo de 20 minutos

Después incubar exactamente 1 minuto a 42°C en baño María e inmediatamente pasar en hielo durante 2 minutos. Enseguida agregar 1mL de medio *Luria-Bertani* (LB) e incubar de 1-1.5 horas a 37°C con agitación constante.

Pasado este tiempo pasar a la campana de flujo laminar y sembrar 150µL y 300µL de las células transformadas en placas LB suplementado con kanamicina (25µg mL⁻¹).

Dejar incubar a 37°C durante 12-16 horas para su crecimiento, y verificar posteriormente si hay crecimiento y las características de las colonias, ver que no sean muy grandes o muy pequeñas.

6.2 Preparación de medios de cultivo

Se prepararán medios de cultivos LB líquidos y posteriormente se esterilizarán

- Dos matraces de 2L con un litro de medio LB para sobre expresar (24g por litro de medio LB)
 - 1 matraz de 125mL con 50mL de medio LB para el cultivo de toda la noche
 - Se esterilizarán en autoclave (120°C durante 20 minutos)
-

6.3 Cultivo de toda la noche

- En 50mL de medio de cultivo líquido LB complementado con Kanamicina (25µg mL⁻¹) se inocularán con una colonia fresca del cultivo en medio sólido
 - Mantener toda la noche a 37°C con agitación constante.
-

6.4 Crecimiento de bacterias en medios de cultivo para sobreexpresión

Se centrifuga el cultivo para separar las células a 5000 rpm (Sorval RC-5B *Refrigerated Superspeed Centrifuge*) y resuspender posteriormente las células con 1mL de medio LB.

Inocular el cultivo en los dos matraces con 1000mL de medio de cultivo líquido LB con 1mL de kanamicina ($25\mu\text{g mL}^{-1}$).

Medir turbidez (absorbancia) del cultivo para observar el momento en el que se alcanza la fase exponencial ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0.5$)

Para la sobreexpresión de la proteína se promueve con la adición del inductor IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* 0.4mM/ 0.098g por cada litro)

Mantener el cultivo por 4 horas a 37°C con agitación constante. Centrifugar los cultivos a 5000rpm durante 15 minutos. Desechar el sobrenadante y conservar el pellet celular en refrigeración.

6.5 Purificación de la Nitrilasa

- Las células de un litro de cultivo se resuspenden en 40mL de líquido para sonicar
 - Se prepara el líquido de sonicación mezclando 100mL de buffer de sonicación y 15.4mg de DTT (*Ditiotreitol*) y se agrega 40μL de la mezcla de DMSO + PMSF (100μL +8.71mg respectivamente). Se agita hasta homogenizar la disolución.

6.5.1 Lisis celular

Sonicación

- Las células de un litro de cultivo se lisan por sonicación. 1 minuto de 7 a 10 veces a una amplitud del 40%, con intervalos de descanso de 2 minutos en un vaso de precipitados de vidrio de 50mL en bastante hielo.

Prensa de French

- Las células de un litro de cultivo se resuspenden en 40mL de líquido para sonicar.
- Enjuagar y preparar la celda de presión
- Las células resuspendidas se vierten en la celda de presión de la prensa de French e inmediatamente después se coloca la tapa con la llave abierta para así purgar el sistema y dejarlo sin aire; posteriormente se cierra la llave de paso.

- Colocar la celda en la prensa y verificar que la llave de paso, la manivela de presión se encuentren en estado basal, (manómetro con *0psi* de presión, llave de paso cerrada)
 - Verificar que la celda se encuentra en posición ideal para maniobrar adecuadamente y que se encuentre asegurada con los pernos de seguridad.
 - Una vez verificados todos los controles de seguridad, iniciar abriendo la llave de paso y girar la manivela aumentando gradualmente la presión, hasta alcanzar una presión final de *1500 psi*. Ir abriendo gradualmente y cerrando en repetidas ocasiones la llave de paso de la celda de presión y a su vez ir colectando el lisado primario.
 - Una vez terminada la lisis ir liberando la presión y al final cerrar la llave de paso.
 - Repetir el lisado otra vez si es necesario (ver que la consistencia de la lisis sea bastante viscosa) de no ser necesario apagar el equipo
 - Lavar la celda de presión perfectamente con agua y metanol.
-

6.5.2 Precipitación con sulfato de amonio

Centrifugar el extracto lisado a 15,000 RPM durante 20 minutos.

Tomar el sobrenadante y precipitar con sulfato de amonio al 20% (114g/L de volumen medido), mezclar y dejar reposar toda la noche en refrigeración.

Al día siguiente centrifugar a 15,000 RPM durante 20 minutos.

Se colecta el sobrenadante y se mide el volumen, posteriormente se precipita con sulfato de amonio hasta llevar a una saturación del 45% (155g/L de volumen medido) y se deja reposar en refrigeración toda una noche. Centrifugar a 15,000 RPM durante 20 minutos.

6.5.3 Diálisis

- Se comienza centrifugando la muestra al 45% de saturación de sulfato de amonio (SORVAL RC6+ *Centrifuge*) a 15,000 RPM durante 20 minutos.
 - Posteriormente resuspender el *pellet* en un volumen de 5mL de solución amortiguadora de fosfatos A (Ver anexo de preparación de disoluciones)
 - Dializar la muestra contra 100 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos A
-

6.5.4 Cromatografía líquida de exclusión molecular e intercambio iónico

La purificación de la nitrilasa se hace mediante HPLC utilizando dos columnas, el primer paso se hace mediante la utilización de una columna de exclusión molecular y posteriormente se hace pasar por una columna de intercambio iónico. Se comienza iniciando sesión en el equipo de cómputo que contiene el programa

Empower controlador del equipo para HPLC. Inmediatamente después se encienden las bombas y el desgasificador. Una vez hecho esto lavar las bombas con agua destilada filtrada. Es importante ver que las mangueras de las bombas se encuentren sumergidas todo el tiempo para evitar que entre aire en el sistema.

Una vez lavadas las bombas se pasa a cargar la bomba A con amortiguador de fosfatos A, a un flujo de 1mL/minuto durante 15 minutos. Utilizar una jeringa de 20mL para purgar las bombas 3 veces

- La columna *Sephacryl S-300* tarda aproximadamente 8 horas en equilibrarse a un flujo de 0.5mL/minuto. Conectar la columna con un flujo lento para evitar la entrada de aire al sistema.

Se procede a filtrar el concentrado de proteínas y posteriormente se pasa a cargar en una jeringa previamente enroscada dicho filtrado. Se inyecta la muestra y cuidar que el nivel no baje por completo para evitar que entre aire sistema. Esperar a coleccionar los tubos y seguir lavando 1 hora más con la solución amortiguadora de fosfatos A, detener flujo y desconectar la columna (conectar las bombas en su posición original).

Se rotulan los tubos de ensayo, y se guardan en refrigeración para determinar por electroforesis las fracciones que contienen a la nitrilasa, y continuar con la purificación.

- La columna *Source15Q* es una columna de intercambio iónico de tipo aniónico que se equilibra a un flujo de 1mL/minuto por 1.5 horas con solución amortiguadora A de fosfatos a pH 7.

Las fracciones enriquecidas en nitrilasa se pasaron por la columna de intercambio iónico a pH 7.0 y después nuevamente con la misma columna pero a pH 8; utilizando un gradiente de sal proporcionado por la solución amortiguadora de fosfatos B que contiene 1M de NaCl para poder despegar a la enzima de la columna.

6.5.5 Electroforesis

Se preparan las muestras de proteína en condiciones desnaturalizantes mezclando volumen a volumen de proteína con la disolución digestora 2X para posteriormente hervirlas por 5 minutos.

Al mismo tiempo que se lleva a cabo este procedimiento se monta el gel de poliacrilamida al 10% y se afora con solución de corrida (ver anexo de preparación de disoluciones)

Se cargan aproximadamente 15µl de muestra en cada pozo del gel y se corre a 150mV. El gel se corre hasta que salga el Azul de Bromofenol en el frente de elución.

El gel se desmonta de la cámara y se tiñe y fija con la solución teñidora. Después del tiempo requerido para la fijación y tinción, el gel se sumergió en la disolución desteñidora. Con cambios frecuentes de esta disolución se eliminó el exceso de colorante.

6.6 Determinación de concentración de proteína por el método de BCA

- La muestra se lleva a un volumen de 50µl con agua.
 - Generar una curva estándar con Albúmina sérica bovina
 - Se añade 1 mL de reactivo C que es la mezcla del reactivo A+B, en una proporción de 50 de reactivo A (ácido bicinconínico) por 1 de reactivo B (sulfato de cobre), es decir por cada mililitro se mezclan 980µl del reactivo A + 20µl del reactivo B
 - Incubar a 30°C por 30 minutos.
 - Después se leer la absorbancia a 562nm.
-

6.7 Determinación de actividad enzimática

Este método se realiza con un reactivo comercial para determinación de amonio en el cual una mezcla alcalina de un derivado fenólico e hipoclorito reacciona con el amonio de la muestra usando nitroprusiato de sodio como catalizador y desarrollando una coloración azul/verde (correspondiente al indofenol formado por la reacción química) que es directamente proporcional a la cantidad de amonio presente en solución.

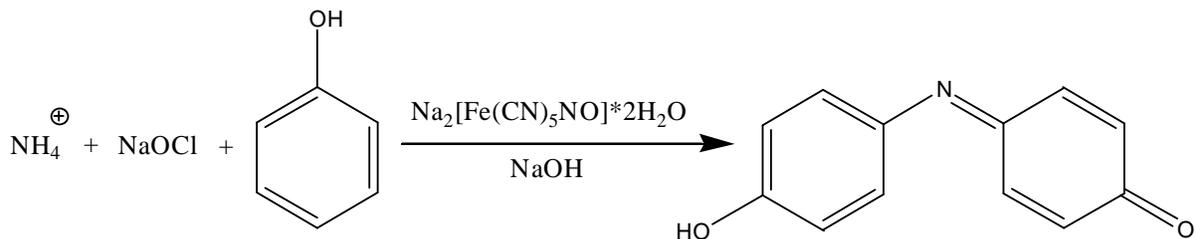


Figura 8.- Reacción de Berthelot para la determinación espectrofotométrica de Indofenol, a partir del amonio producido por la hidrólisis del nitrilo por la nitrilasa

Se utilizan cantidades en el orden de 5 μg de proteína frente a concentraciones de sustrato en el orden de 1mM con valeronitrilo y benzonitrilo en solución amortiguadora de actividad de fosfatos pH7.8 aforado a un volumen de 1000 μL . Así como la preparación de blancos con amortiguadora de actividad de fosfatos pH7.8 y otros dos blancos únicamente con sustrato y amortiguadora de actividad de fosfatos pH7.8.

Posteriormente incubar a 30°C durante 30 minutos. Después del tiempo de incubación, se lleva cada tubo a un volumen final de 5mL con agua destilada, después añadir 600 μL del reactivo R1, mezclar y después agregar una

microcuchara azul rasa, agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente e incubar por 5 minutos.

Enseguida añadir 4 gotas del reactivo 3 y mezclar, dejar 5 minutos en reposo o hasta que deje de haber variaciones en las lecturas, se lee a 690nm en el espectrofotómetro (tomar 1mL de los 5 mL para medir absorbancia).

*Preparar nuevamente cada determinación Benzonitrilo (Sigma-Aldrich, 99.9% de pureza, grado HPLC, MW=103.12g/mol, d=1g/mL) 2.5mM (50mL); este se preparó utilizando 13µL de benzonitrilo y ajustando a 50mL con buffer de actividad de fosfatos pH7.8(HPO_4^- / $H_2PO_4^{2-}$) y valeronitrilo(Sigma-Aldrich, 99.5% de pureza, MW=83.13g/mol, d=0.799g/mL) 25mM (10mL); este se preparó utilizando 26µL de benzonitrilo y ajustando a 10mL con buffer de actividad de fosfatos pH7.8(HPO_4^- / $H_2PO_4^{2-}$)

6.8 Medición por dispersión dinámica de luz (DLS)

Se inicia encendiendo el equipo de cómputo y posteriormente el dispersor DLS ("*Dynamic light Scattering*") (*ZETASIZER* de *MALVERN*), iniciar el programa *zetasizer* para que vaya calibrando todos los parámetros y calentando la lámpara.

Antes de medir la muestra por el dispersor es necesario filtrar la muestra con filtros *MILLEX-GV* de un tamaño de 0.22µm y colocarlo en la celda que previamente fue lavada y secada con precaución. Se coloca la muestra (preferentemente a una concentración mayor a 0.1mg/mL) en la celda de medición y se cierra la tapa del

dispersor, arrancar el programa y pedirle que lea en repetidas ocasiones. Lavar perfectamente la celda y apagar el dispersor y sistema de cómputo.

6.9 Análisis oligomérico en FPLC por columna analítica

El peso molecular de los oligómeros se determina por cromatografía en una columna analítica Superdex™ 200 acoplada a un sistema de detección FPLC. Preparar una muestra de estándares de peso molecular *BioRad*: Tiroglobulina, Gammaglobulina, Ovoalbúmina, Mioglobina y Vitamina B-12 (1mg/mL disolviendo el vial en 0.5mL de agua)

- Equilibrar la columna con amortiguador:
 - Inyectar 100µL de marcador de peso molecular
 - Correr programas de lavado y corrida de columna
 - Lavar nuevamente el loop
 - Inyectar la enzima previamente filtrada con filtros de 0.22µm
 - Correr programas de lavado y corrida de columna
 - Lavar loop
-

7.- Resultados

A) Nitrilasa NitR340-1

7.1 Inducción y purificación de la nitrilasa truncada en el extremo C-terminal

La inducción y la purificación de la mutante truncada en el extremo C-terminal en un principio se llevó a cabo utilizando las condiciones de trabajo determinadas para la enzima silvestre. Las cuales consideraban desde un principio transformar una bacteria *E.coli* BL21 DE3 dándole así la capacidad de producir la enzima de interés; con un tiempo y temperatura de inducción de 4 horas con IPTG (0.4 mM) a 37°C (125 RPM), a partir de esto se obtuvieron perfiles electroforéticos SDS-PAGE al 12% (figura 9) que mostraban que en estas condiciones había sobreexpresión de la proteína, que estaba presente después de lisar las células por sonicación, pero no después de centrifugar el extracto total; recuperándose solo una pequeña parte soluble en el sobrenadante del centrifugado.

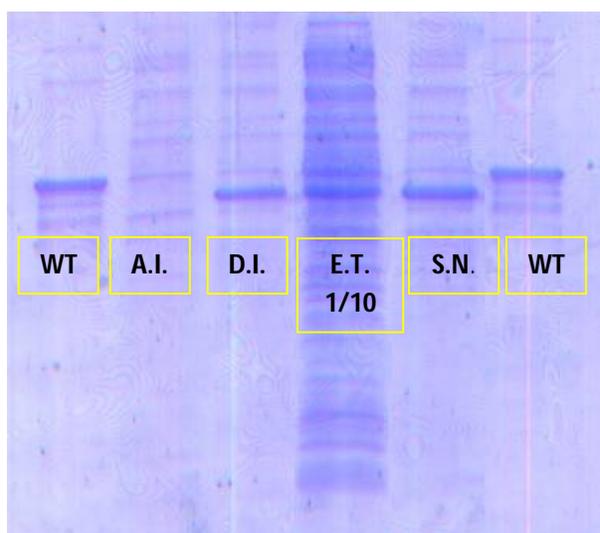


Figura 9.- Perfil electroforético SDS-PAGE al 12% de la enzima mutante NitR340-1. De izquierda a derecha se muestra el marcador de peso correspondiente a la enzima silvestre de *R. pyridinovorans* (38KDa), muestras antes de inducir (A.I.), muestra una vez puesto el inductor IPTG (D.I.), muestra lisada por sonicación y diluida 1:10 veces (E.T.), en el penúltimo pozo se observa la enzima recuperada soluble por centrifugación (nótese que no hubo dilución) y nuevamente la enzima silvestre.

Los cuerpos de inclusión fueron tratados en condiciones desnaturalizantes en cloruro de guanidinio 6M y posteriormente dializada en buffer de fosfatos 100mM/pH 7.8 para intentar replegarla nuevamente, lo cual fue imposible ya que nuevamente se formaron agregados insolubles.

La enzima soluble recuperada era llevada a una saturación del 20% de sulfato de amonio para eliminar algunos contaminantes y posteriormente a una saturación del 45% de sulfato de amonio con el fin de precipitar la enzima recombinante. Una vez dializada la enzima, es purificada mediante el uso del HPLC en diferentes columnas (ver figura 10), comenzando con una columna de filtración molecular, posteriormente una columna de intercambio iónico y para finalizar la enzima obtenida era dializada a pH8 para ser nuevamente purificada en la columna de intercambio iónico obteniendo finalmente poca enzima con la presencia de varios contaminantes proteicos. El rendimiento aproximado de la purificación en un principio era de 0.75mg de enzima por litro de cultivo y con una pureza baja.

Debido a que el rendimiento y la pureza eran muy pobres, y que sumado a esto la estabilidad de la enzima era limitada se optó por hacer diversos cambios al protocolo total de obtención de la nitrilasa mutante.

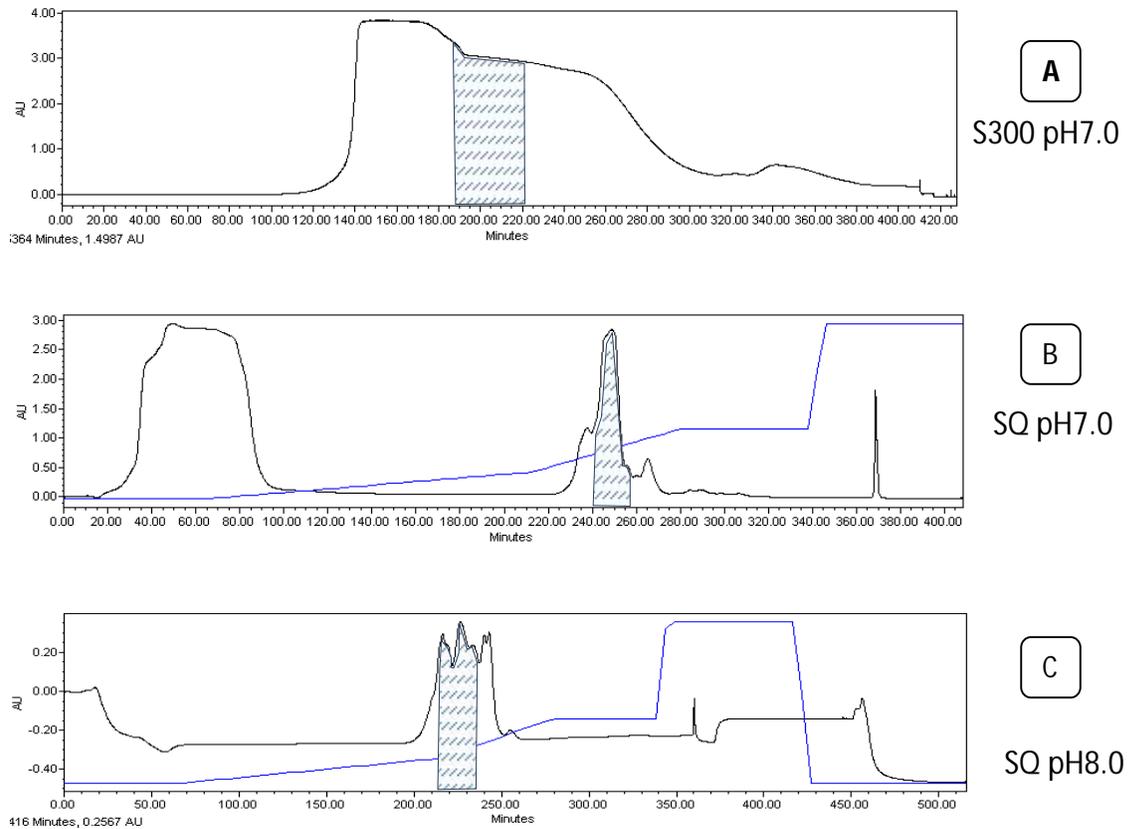


Figura 10 Cromatogramas de purificación por HPLC de la mutante NitR340-1. **A)** se puede observar en azul el tiempo de elusión de la enzima truncada por la columna de filtración molecular. **B)** Tiempo de elusión y el gradiente de sal (440-456mM de NaCl) necesario para que la enzima se desprege de la resina de la columna de intercambio aniónico. **C)** Se observa la purificación nuevamente por la columna de intercambio aniónico una vez dializada la enzima a un pH de 8. Esto fue corroborado con un perfil electroforético SDS-PAGE al 12%.

Dichas mejoras estaban encaminadas para aumentar la inducción y la cantidad de enzima soluble en sobrenadante, así como mejorar gradualmente el rendimiento y pureza de la purificación.

Los cambios esencialmente consistieron en probar con una cepa diferente de bacteria, de *E.coli* BL21 (DE3) a una cepa *E.coli* BL21 (DE3) pLysS y seguir manteniendo el método de lisis celular utilizando la prensa de French.

Una vez transformada la bacteria con el plásmido que contiene el gen de la Nitrilasa R340 se llevó a cabo una cinética de inducción y sobreexpresión a diferentes temperaturas (27°C, 30°C y 37°C) y tiempos (2, 4, 6 y 8 horas) con la misma concentración de inductor IPTG (0.4 mM) determinando que la condición ideal de sobreexpresión es a 27°C durante 8 horas (figura 11).

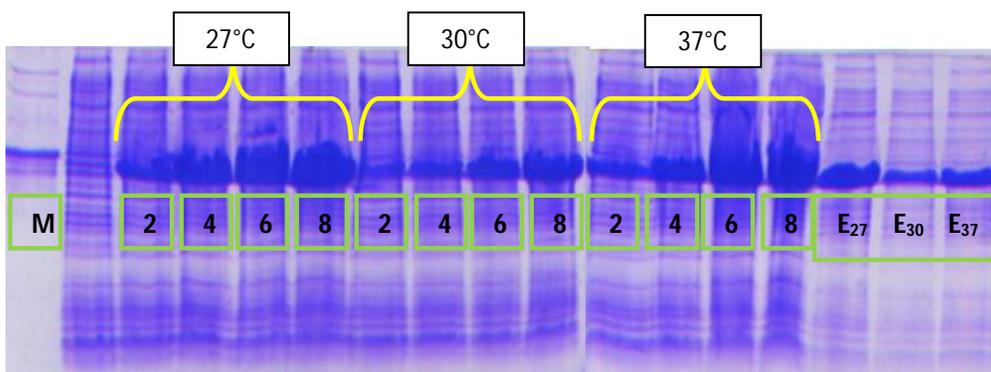


Figura 11.- Perfil electroforético SDS-PAGE al 12% de la cinética de inducción realizada para conocer el mejor tiempo (horas) y temperatura de inducción de la enzima truncada en el extremo C-terminal.

El proceso de inducción a 27°C durante 8 horas permitió que más Nitrilasa mutante fuera recuperada en la fracción soluble la cual fue purificada con el método descrito anteriormente, obteniéndose así una enzima en un orden de concentración mayor, pero con contaminantes proteicos que no fueron posibles de eliminar a pesar de ser purificada en diferentes columnas, es notable la concentración de un contaminante proteico casi en la misma proporción que la nitrilasa, según caracterizaciones pasadas es muy posible que el contaminante se trate de la β -Galactosidasa, que podría ser producida intrínsecamente al mismo tiempo que la enzima recombinante al inducir con IPTG que es homóloga a la Galactosa (figura 12).

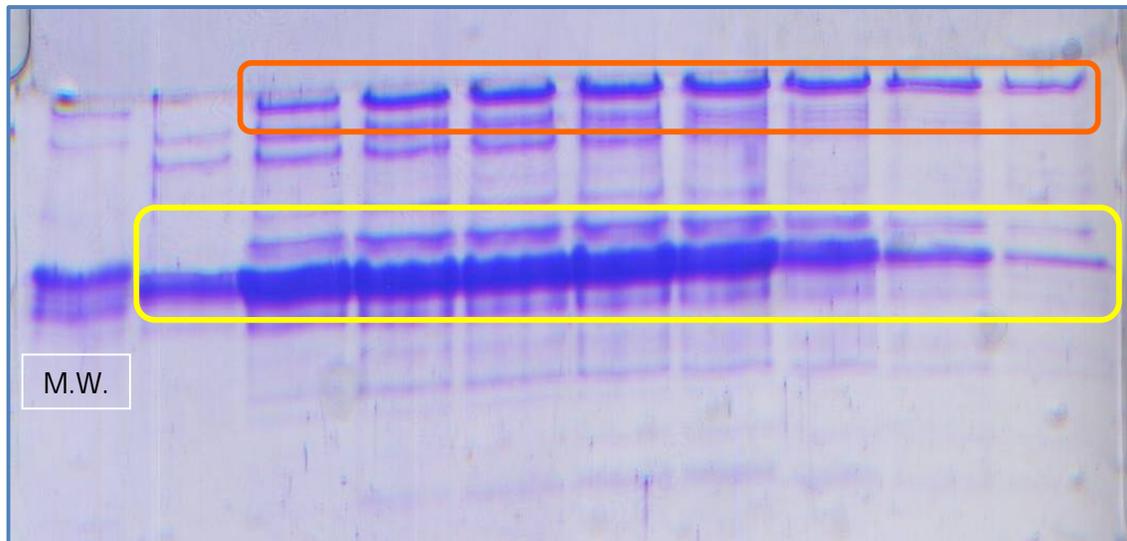


Figura 12.- Perfil electroforético SDS-PAGE al 12% de la purificación de la enzima mutante NitR340-1 obtenida por modificaciones en el protocolo de transformación, inducción y sobreexpresión. En el recuadro naranja se observa el contaminante proteico mayoritario correspondiente posiblemente a la β -Galactosidasa. En el recuadro amarillo se observa la enzima trucada en el extremo C-terminal.

Al haber mejorado las condiciones de sobreexpresión, el siguiente paso era mejorar la resolución del método cromatográfico (HPLC), por lo que además fue necesario llevar a una saturación intermedia de sulfato de amonio (ver figura 13), con el fin de obtener una fracción proteica menos contaminada. Se logró aumentar la resolución modificando el orden de las columnas utilizadas, prefiriendo primero hacer una cromatografía de intercambio aniónico a pH7, posteriormente concentrar las fracciones detectadas mediante electroforesis en SDS-PAGE y purificar a través de una columna de exclusión molecular, ya que esta columna diluye bastante la muestra. Y por último se hizo una diálisis para cambiar el pH del buffer de fosfatos A de pH7 a pH8 para ser inyectada a través de la columna de

intercambio aniónico (figura 14); el cambio de pH se realizó con el propósito de modificar las cargas de algunos grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos de la enzima y así modificar la interacción con la resina de la columna (ver figura 15). Obteniendo una enzima más pura y con mayor de concentración (10mg/L de cultivo).

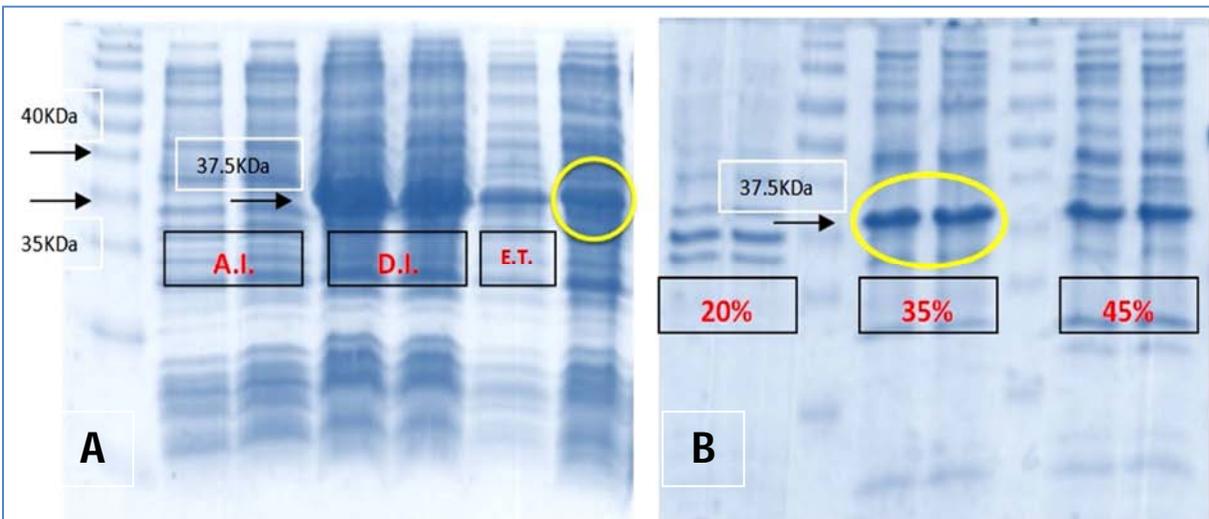


Figura 13.- Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE al 12 % de la nitrilasa NitR340-1. **A)** Correspondiente a la inducción y la enzima recuperada en la fracción soluble (en amarillo), además de que es notable el peso molecular de 37.5KDa por monómero de enzima. **B)** Fracciones recuperadas luego llevar a diferentes saturaciones de sulfato de amonio, se seleccionó purificar la fracción precipitada al 35% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ debido a que presentaba menos contaminantes.

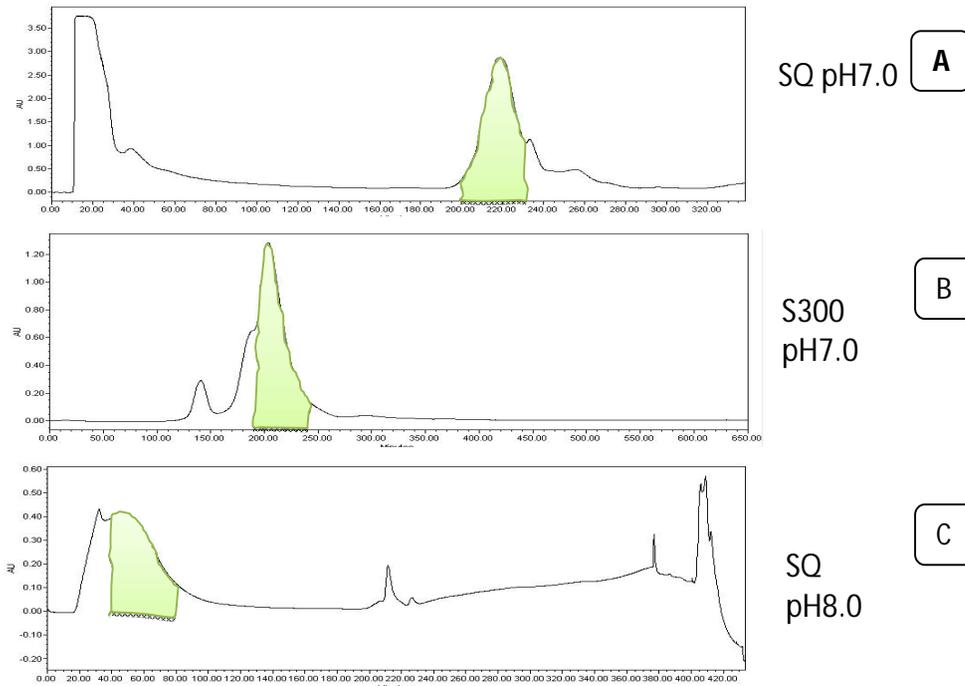


Figura 14.- Cromatogramas de purificación por HPLC utilizando el método modificado de inducción y sobreexpresión. **A)** En azul se observa el tiempo de elusión de la enzima truncada en el extremo C-terminal por la columna de filtración molecular. **B)** Correspondiente al tiempo de elusión y el gradiente de sal (440-456mM de NaCl) necesario para que la enzima se despegue de la resina de la columna de intercambio aniónico. **C)** Se observa la purificación nuevamente por la columna de intercambio aniónico una vez dializada la enzima a un pH de 8. Esto fue corroborado con un perfil electroforético en geles SDS-PAGE al 12%.

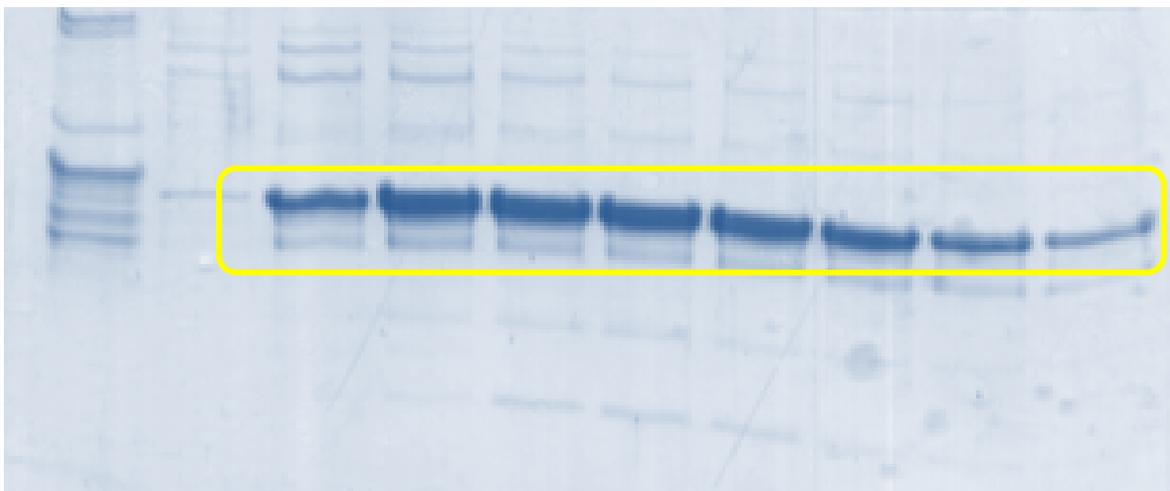


Figura 15.- Perfil electroforético SDS-PAGE de la purificación de la Nitrilasa recombinante NitR340-1 con el método de sobreexpresión y purificación modificado.

7.2 Caracterización cinética

La determinación de actividad depende de un método espectrofotométrico en el cual se mide la liberación de amonio a través de la formación de un compuesto colorido a partir de la reacción con diversos reactivos proporcionados en una prueba comercial (figura 16).

Para poder determinar el efecto de la delección sobre la actividad enzimática en sustratos tipo como el benzonitrilo y valeronitrilo para la nitrilasa recombinante se hizo un comparativo en muestras catalizadas por la nitrilasa silvestre, en el cual después de diversos experimentos se determinó que el poder catalítico en la mutante truncada en el extremo C-terminal se redujo en un orden de 10-12 veces aproximadamente para ambos sustratos comparada con la enzima silvestre.

Nitrilasa	Actividad específica ($\mu\text{mol NH}_4^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	
	Benzonitrilo	Valeronitrilo
Silvestre	1805 \pm 308	240
NitR340-1	125.61 \pm 21.4	22.5

Tabla 1.- Actividad enzimática específica comparativa entre la nitrilasa silvestre la nitrilasa recombinante NitR340-1. La actividad enzimática se determinó midiendo el amonio generado en la mezcla de reacción. Utilizando 5 μg de cada enzima incubando durante 30 min a 30°C en 1 ml de buffer de actividad de fosfatos pH 7.8 y sustratos 1 mM.

Además de que en los ensayos se observó que la actividad catalítica para la mutante está estrechamente ligada a la concentración de enzima utilizada por ensayo, es obvia una inhibición generada por la cantidad de nitrilasa utilizada por ensayo de actividad, por lo que fue planeado un experimento para ver que ocurría en condiciones de preincubación a muestras preparadas a diferentes concentraciones de enzima silvestre y nitrilasa mutante.

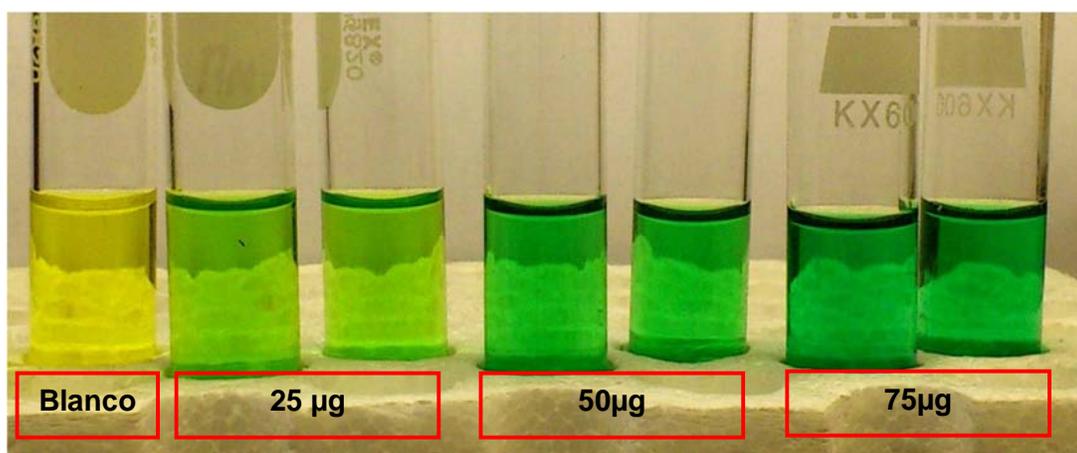


Figura 16.- Ensayo de actividad enzimática determinada por el método de formación de Indofenol a partir de amonio. El ensayo se realizó utilizando diferentes concentraciones de nitrilasa truncada (25, 50 y 75 µg de enzima) se incubó durante 30 min a 30°C en 1 ml de buffer de actividad de fosfatos pH 7.8 y benzonitrilo 1 mM .

7.2.1 Ensayos cinéticos en condiciones de preincubación

En este experimento se prepararon distintas diluciones de Nitrilasa silvestre (WT) y mutante NitR340-1 a concentraciones de 5µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL y 100µg/mL. Posteriormente se determinó la dependencia de la actividad enzimática específica con respecto a la concentración de enzima bajo dos condiciones distintas; utilizando enzima que se encontraba en condiciones normales de almacenaje (figura 17) y enzima que fue preincubada previamente durante toda una noche a 30°C (figura 18); utilizando benzonitrilo como sustrato a una concentración de 1mM.

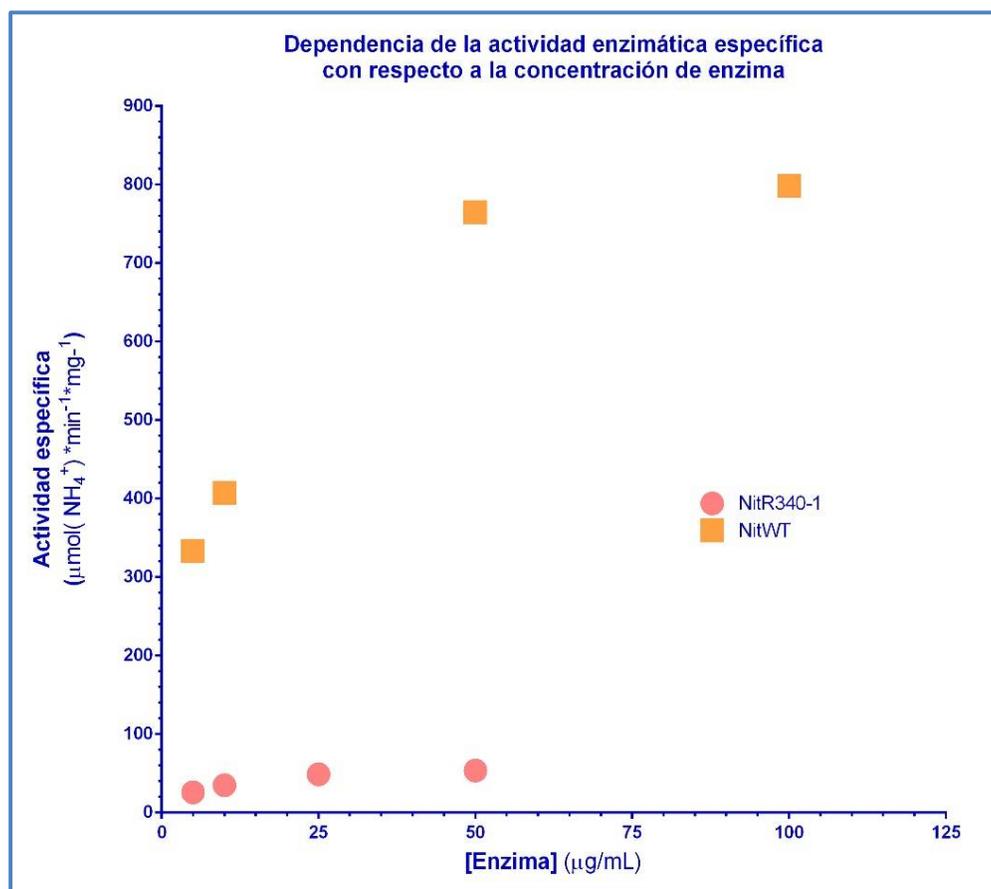


Figura 17.- Gráfico de dependencia de la actividad enzimática específica con respecto a la concentración de nitrilasa silvestre y mutante NitR340-1.

Este experimento se hizo con la finalidad de determinar la estabilidad y el efecto de la dilución en la actividad enzimática en muestras preincubadas y sin preincubación. El resultado mostró una inactivación total en los ensayos de actividad bajo condiciones de preincubación. Y confirma tanto para la enzima silvestre como para la mutante una activación dependiente de concentración de proteína. Sin embargo la mutante NitR340-1 mantiene una diferencia de 12 veces menos en la actividad con respecto a la silvestre.

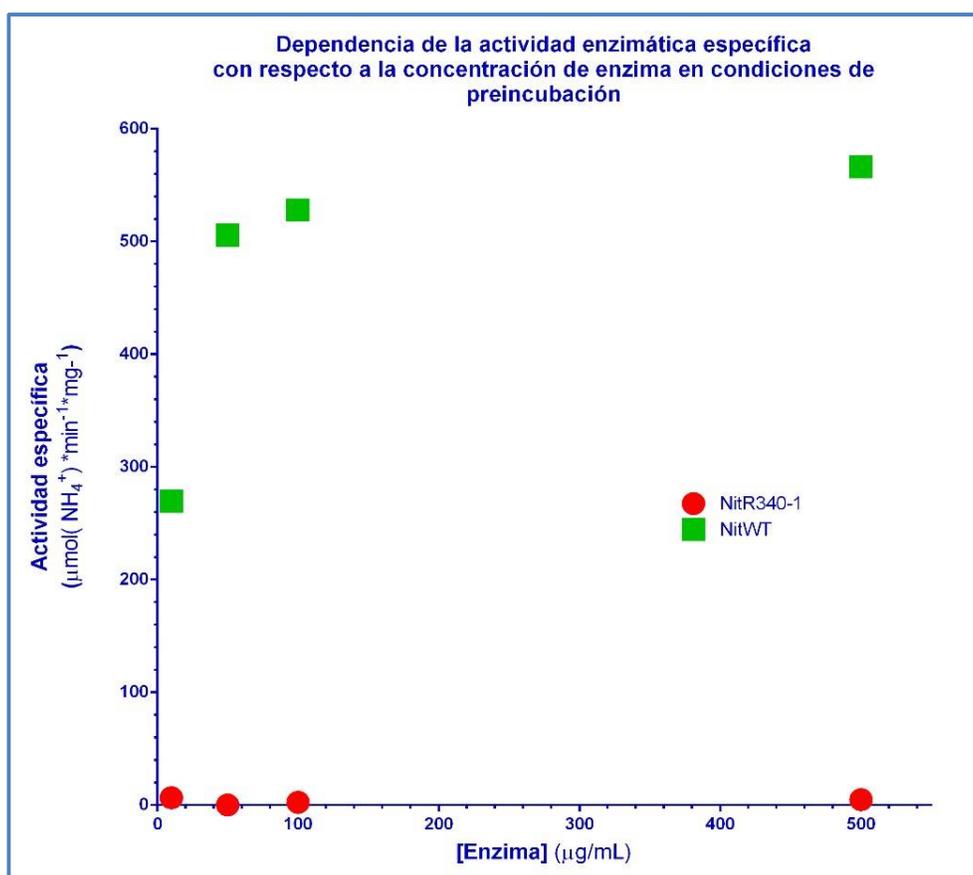


Figura 18.- Gráfico de dependencia de la actividad enzimática específica con respecto a la concentración de nitrilasa bajo condiciones de preincubación proveniente de ensayos de actividad de muestras de nitrilasa silvestre y mutante NitR340-1.

7.3 Caracterización estructural

Dentro de la caracterización estructural se hicieron diferentes experimentos para conocer el estado oligomérico de la enzima recombinante, así como su tamaño y el peso molecular de la misma, además de hacer un comparativo con la enzima silvestre para determinar los cambios producidos por la mutación en el extremo C-Terminal.

7.3.1 Dispersión Dinámica de Luz

Para comenzar se prepararon diluciones de enzima mutante y silvestre a concentraciones oscilantes entre los 0.1 a 0.9 mg/mL para hacer diversas mediciones y así conocer el tamaño estimado por DLS; este método representa una gran herramienta analítica para determinar el tamaño de moléculas y nanopartículas a través de la medición de la dispersión de un haz de luz monocromático correlacionada al ángulo formado a través de un medio acuoso. Al hacer el análisis se pudo observar que en general las muestras de enzima recombinante NitR340 Δ tenían tamaños que iban de los 10nm a los 12 nm, con una media en $11.6 \text{ nm} \pm 0.4$ y con un peso molecular calculado por el dispersor de aproximadamente 236KDa (6 s.u), comparada con las mediciones hechas a la enzima silvestre que mostraron un tamaño aparentemente del doble, con mediciones entre los 19nm y 22nm con una media en 19.6 ± 2.7 y un peso molecular calculado por el DLS de 480KDa (12 s.u.) (figura 19).

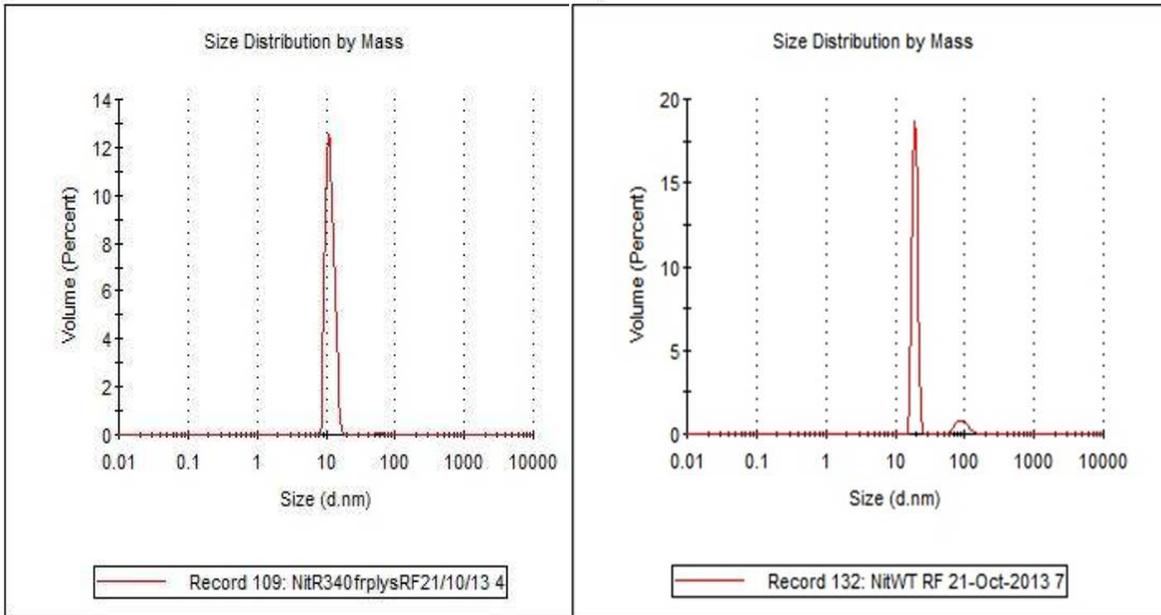


Figura 19.- Comparativo de gráficos de radio hidrodinámico medidos por DLS de la nitrilasa NitR340-1 (izquierda) y la Nitrilasa silvestre (derecha) con porcentajes superiores al 90% en masa que sugiere el tamaño predominante en la muestra; es notable además de esto un pico pequeño en el gráfico correspondiente a la enzima mutante con un tamaño aproximado a los 100nm que probablemente se trate de algún agregado de proteína.

Nitrilasa	Diámetro (nm)	%Pd	% Masa	% Intensidad
Silvestre	19.6 ± 2.7	8.4 ± 1.8	91.7% ±2.01	9.9% ±2.7
R340Δ	11.6 ± 0.4	14.8 ± 3.4	99.2%	42.8% ±6.1

Tabla 2.- Comparativo de radio hidrodinámico entre la nitrilasa silvestre y la mutante NitR340-1, obtenidos de las mediciones en el DLS, siendo la nitrilasa silvestre la de mayor tamaño. Además del porcentaje en masa se muestra el porcentaje de polidispersidad (Pd) que sirve como referencia para saber si una muestra es monodispersa o polidispersa; un Pd menor al 20% representa que la muestra es monodispersa, además de que es un criterio importante para determinar si una muestra puede ser cristalizable.

7.3.2 Experimentos de Filtración Molecular para determinar el Estado Oligomérico de las enzimas.

Las muestras de enzima además de ser medidas por DLS fueron analizadas utilizando una columna de filtración molecular analítica para determinar el estado oligomérico que presenta.

El experimento consistió en inyectar una mezcla de estándares de peso molecular conocidos que contiene Vitamina B₁₂, Mioglobina, Ovoalbúmina, IgG y Tiroglobulina; como curva estándar para poder calcular por regresión lineal (ver figura 20) el peso molecular aproximado del oligómero, considerando el peso molecular característico del monómero de enzima (38KDa para la enzima silvestre y 37.5KDa para la mutante truncada en el C-Terminal).

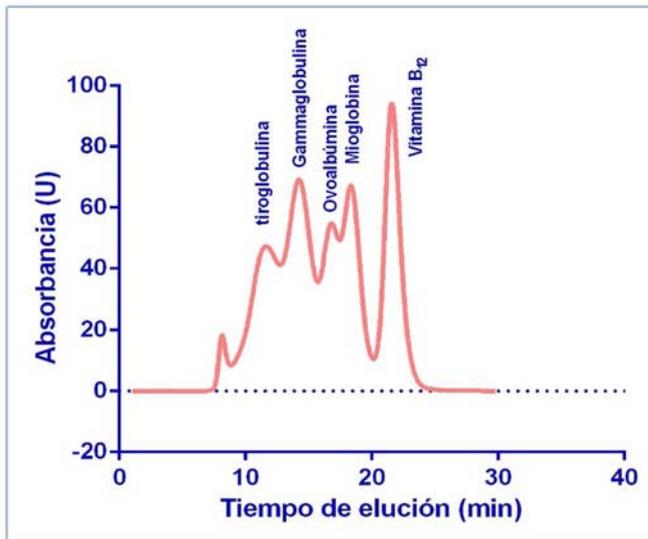


Figura 20.- Cromatograma de filtración molecular analítica de los estándares de peso molecular.

Proteína	Peso molecular (Da)	Tiempo de elución std1
Vitamina B12	1,360	21.63
Mioglobina	17,000	18.42
Ovoalbúmina	44,000	16.84
Gammaglobulina	158,000	14.24
Tiroglobulina	669,885	11.82

Tabla 3.- Relación peso molecular contra tiempo de elución de los marcadores de peso molecular

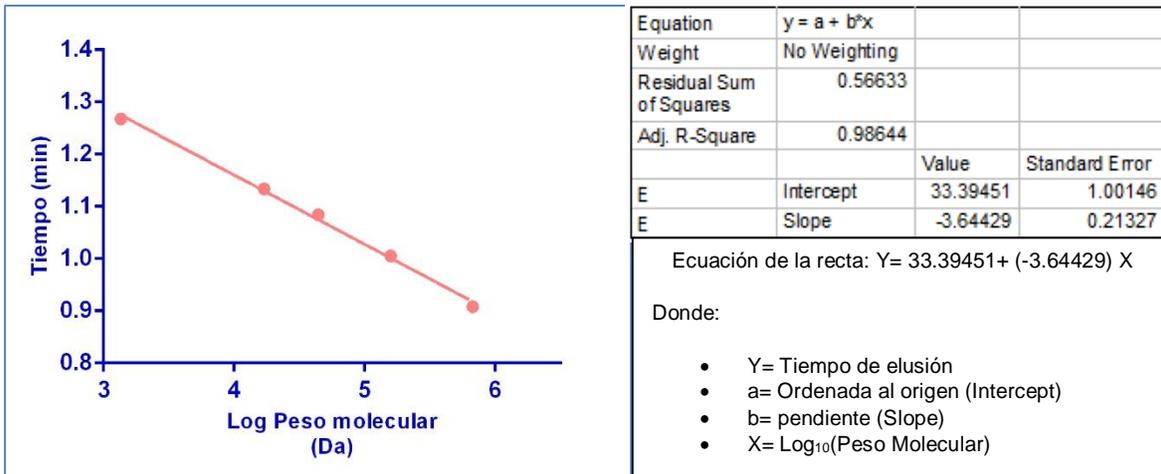


Figura 21.- Regresión lineal de los datos obtenidos de los estándares de peso molecular por filtración molecular analítica.

Los experimentos de filtración molecular mostraron que la enzima silvestre tiene un peso molecular aproximado a los 460KDa que corresponde a un oligómero de 12 subunidades que se muestra constante (ver figura 22), mientras que en las muestras de enzima truncada en el extremo C-terminal no es posible observar picos únicos que indiquen un solo estado oligomérico predominante.

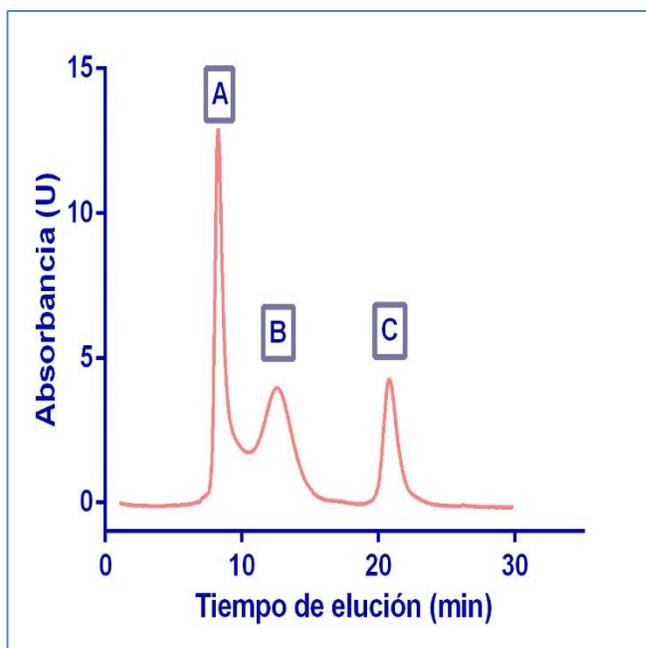


Figura 22.- Cromatograma de exclusión molecular analítica correspondiente a la enzima silvestre, en la cual se pueden observar tres picos. El pico A corresponde a cosas de muy alto peso molecular (presumiblemente agregados), en el pico B se pueden observar proteínas de aproximadamente 460KDa de peso molecular (12 subunidades) muy aproximado al cálculo teórico generado por el DLS (480KDa). El pico C corresponde a un fragmento proteico con un peso poco mayor al de la Vitamina B₁₂.

Mutante	Tiempo de elución (min)	Peso molecular experimental (Da)	Subunidades calculadas
Nit R340-1	*8.35	-----	Agregados
	*10.75	-----	Agregados
	14.07	193,494	~6
	17.26	25,562	~1
	20.92	2,877	Contaminantes pequeños

Tabla 4.- Relación peso molecular experimental contra tiempo de elución de la mutante NitR340-1, donde, para la mutante truncada se destaca la presencia de monómeros y hexámeros que sugieren la presencia de más especies oligoméricas intermedias entre monómeros y hexámeros debido a que no decrece totalmente la meseta antes de mostrar el pico correspondiente al monómero. *Se recolectan en el volumen de exclusión de la columna.

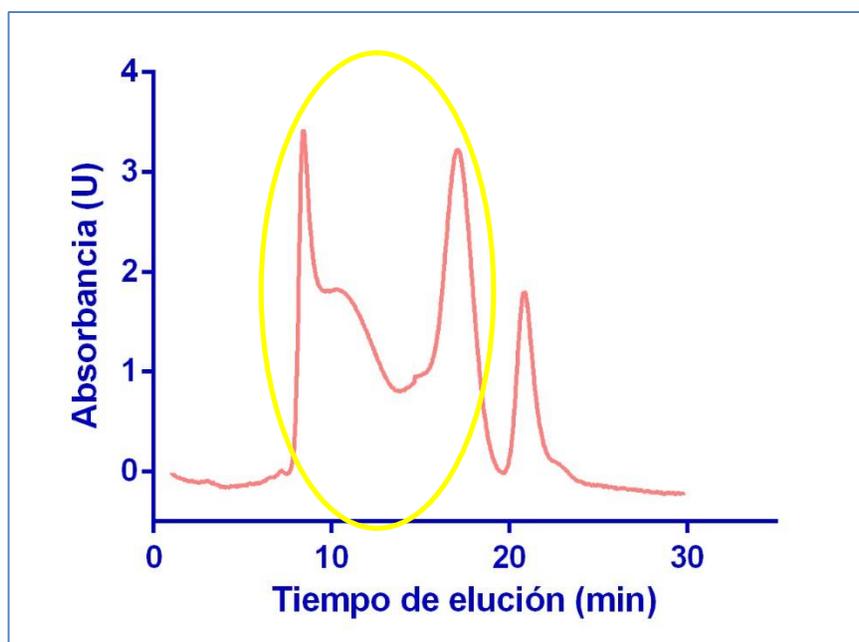


Figura 23.- Cromatograma de filtración molecular analítica de la nitrilasa NitR340-1 a una concentración de 0.48mg/mL. Es observable una presencia de varias especies intermedias entre el hexámero (meseta) y el monómero y dímero en baja proporción (pico a la derecha de la meseta) en proporciones similares a las del hexámero (ambos en el círculo amarillo).

7.3.3 Experimentos de preincubación para el análisis estructural de la enzima mutante.

Estos experimentos consistieron básicamente en hacer nuevamente análisis oligomérico y actividad enzimática a muestras de enzima mutante preincubada durante una noche a 30°C con la finalidad de comprender los cambios estructurales por los cuales la enzima pierde su actividad enzimática bajo estas condiciones. Se preincubaron cuatro muestras de enzima recombinante NitR340-1 a diferentes diluciones (1, 1:1, 1:2 y 1:4) a partir de una muestra de enzima a 0.48mg/mL (figura 24). Además también se hicieron diluciones seriadas a las mismas concentraciones en muestras de enzima refrigerada para poder hacer un comparativo de los cambios sufridos por efecto de la preincubación y dilución (resultados no mostrados).

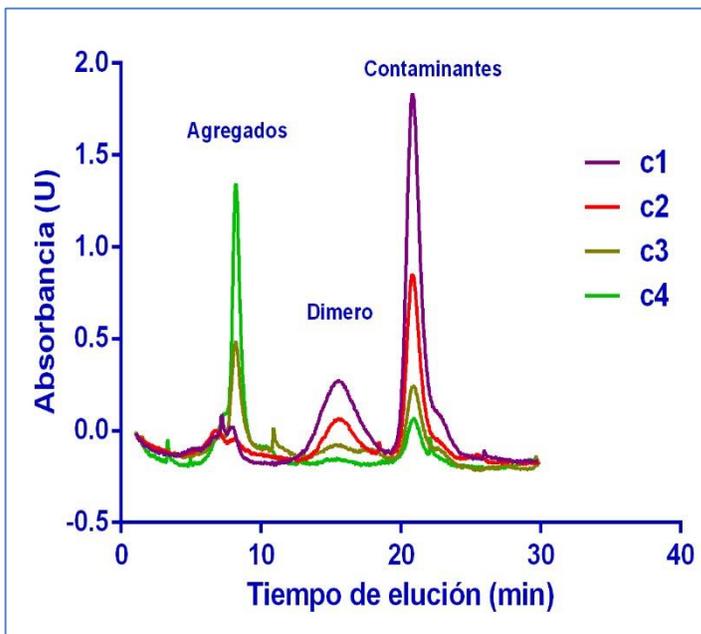


Figura 24.- Cromatograma de filtración molecular analítica de cuatro diluciones de la mutante NitR340-1 previamente pre incubadas a una temperatura de 30°C durante toda la noche,(0.48mg/mL, 0.24mg/mL, 0.12mg/mL y 0.06mg/mL. De c1 a c4 respectivamente).

La gran presencia de agregados se ve favorecido por el efecto de la dilución, con la preincubación a 30°C durante toda la noche.

Muestra Nit R340-1	Tiempo de elución (min)	Peso molecular estimado (Da)	Subunidades calculadas	Actividad Enzimática Abs 690nm (Benzonitrilo 1mM)	Microgramos de enzima por ensayo	Actividad específica por mg de enzima ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}}$)
C1	15.587	72,593	~1.94	0.003	12	0
C2	15.201	76,986	~2.05	-0.004	12	0
C3	8.183	-----	Agregados	-0.003	6	0
	10.877	-----	Agregados			
	15.201	98,250	~2.62			
C4	8.183	-----	Agregados	-0.009	3	0

Tabla 5.- Relación peso molecular contra actividad enzimática de muestras de nitrilasa NitR340-1 en condiciones de preincubación, donde es posible observar que hay gran presencia de agregados y en pequeñas proporciones lo que por peso molecular representa un dímero de la enzima mutante. La actividad enzimática con benzonitrilo fue nula. (* Por arriba de la curva estándar)

En este experimento fue posible observar cambios en el estado oligomérico en los que se alcanzan equilibrios distintos. Entre más diluida se encuentre la enzima la tendencia a la agregación es mayor. A pesar de que pudieron observarse dímeros de nitrilasa la actividad enzimática fue nula.

B) Nitrilasa NitR340-2

7.4.- Una nueva mutante truncada

A pesar de que se logró mejorar en rendimiento y pureza la obtención de la nitrilasa mutante truncada en el extremo C-terminal, aún había algunos problemas con la estabilidad, por lo que se propuso hacer mutaciones sitio-específicas con el fin de mejorar a la enzima recombinante. Al realizar el análisis de las secuencias se detectaron un par de mutaciones en las posiciones 293 y 320 del templatado R340 (Fig. 25), la primera mutación implica un cambio de Ác. Aspártico por Glicina (D293G), mientras que la segunda se trataba de una mutación silenciosa con un cambio de codón CTT por CTC que codifican para Leucina.

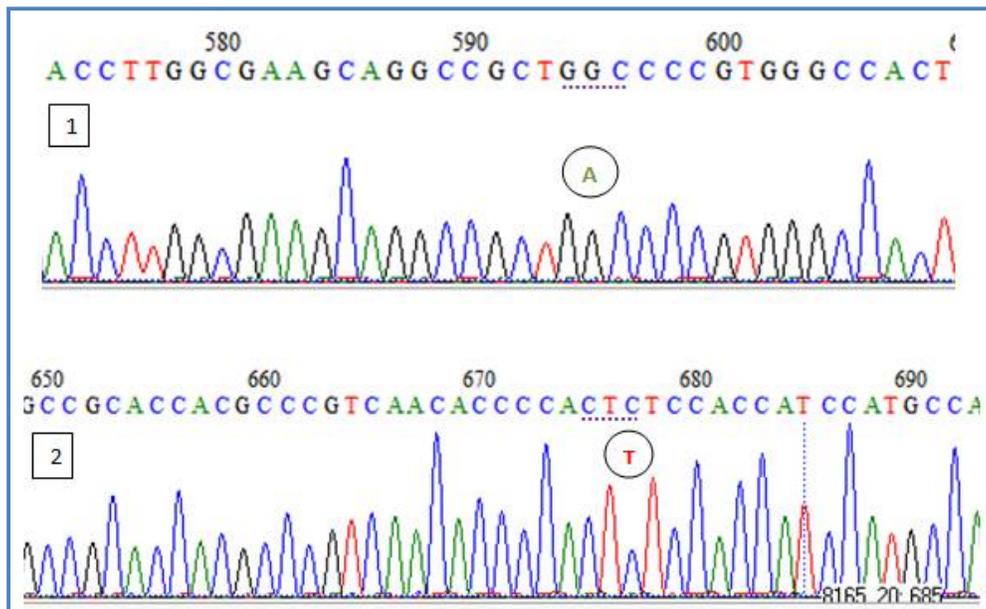


Figura 25.- Cromatograma de secuenciación de la mutante NitR340-2. Mutaciones en la secuencia de DNA R340 utilizada como templatado para las mutaciones sitio específicas. **1**, cambio de GAC (D) por GGC (G); **2**, cambio de CTT (L) por CTC (L).

Se consideró la posibilidad de corregir la mutación D293G con técnicas de PCR, sin embargo esta región del gen es muy abundante en C y G, lo que elevaba en exceso la temperatura de fusión (T_m) del oligo, haciendo poco probable conseguir este objetivo. Se decidió que la opción más viable era rehacer la construcción R340 a partir del gen silvestre *NitA*. (Gómez, A.; Garza, G).

7.5 Inducción y purificación de la mutante NitR340-2

Se volvió a construir la mutante Nit R340 Δ (que para fines prácticos llamaremos NitR340-2) y se secuenció nuevamente para asegurarse que ya no existieran mutaciones no deseadas. Una vez examinada la secuencia se prosiguió a transformar bacterias *E.coli* BL21 pLysS bajo el mismo protocolo utilizado con la mutante anterior, para posteriormente sobre expresar y purificar la enzima bajo las mismas condiciones (figura 26), pero seleccionando las fracciones correspondientes al 20% y 35% de saturación de sulfato de amonio (figura 27), al final de la purificación se pudo obtener una enzima en una mayor concentración y pureza, además de una gran estabilidad (figura 29).

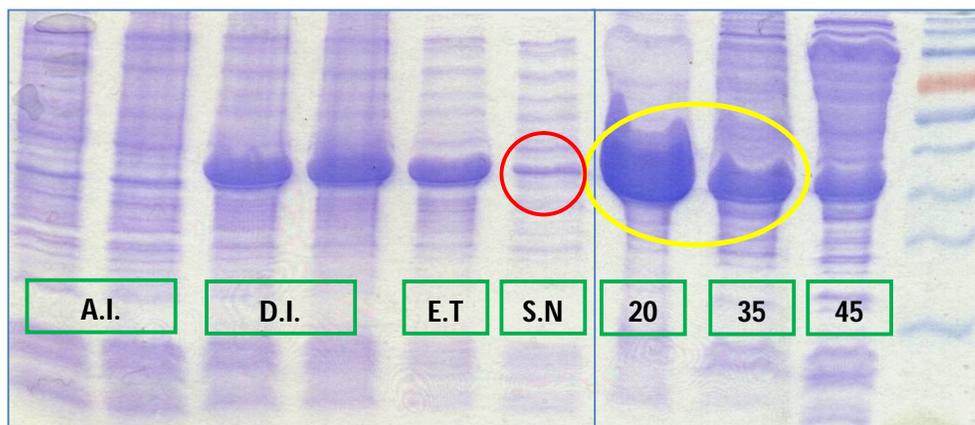


Figura 26.- Perfil electroforético en SDS-PAGE de la sobreexpresión y la enzima recuperada en la fracción soluble (en rojo). En la imagen derecha se observan las fracciones recuperadas luego llevar a diferentes saturaciones de sulfato de amonio; se seleccionó purificar la fracción precipitada al 20% y 35% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (en amarillo).

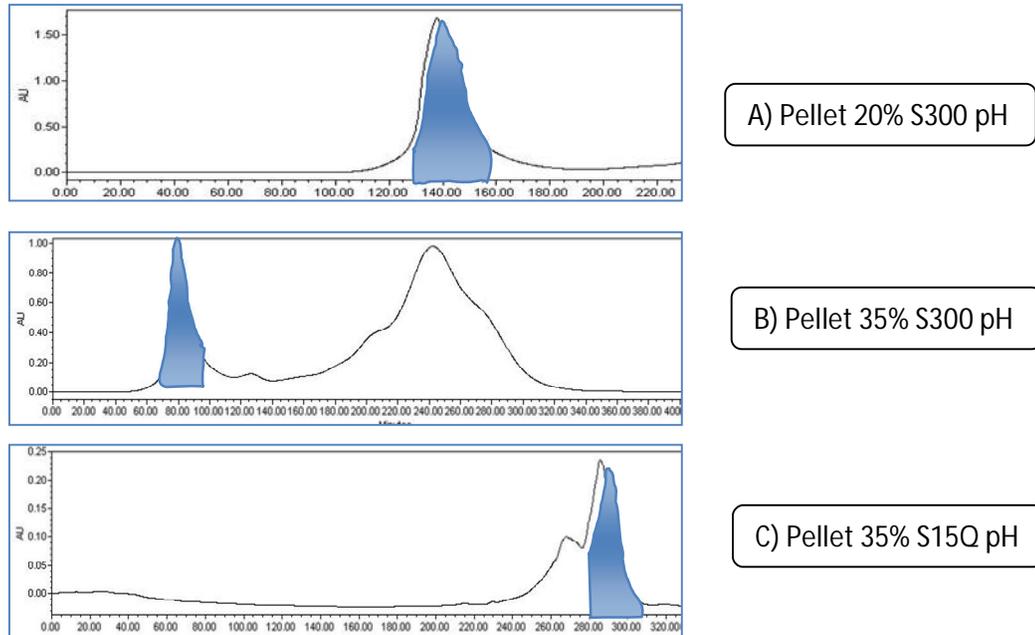


Figura 27.- Cromatogramas de purificación de la nitrilasa recombinante NitR340-2. **A)** En azul se observa el tiempo en el cual eluyó la enzima Nit R340-2 (obtenida a una saturación del 20% de sulfato de amonio) de la columna de filtración molecular. **B)** Corresponde a la muestra de enzima obtenida al 35% de saturación de sulfato de amonio purificada por filtración molecular. **C)** Se observa el tiempo de elución (a un gradiente de sal de 440-456mM de NaCl) a través de la columna de intercambio aniónico.

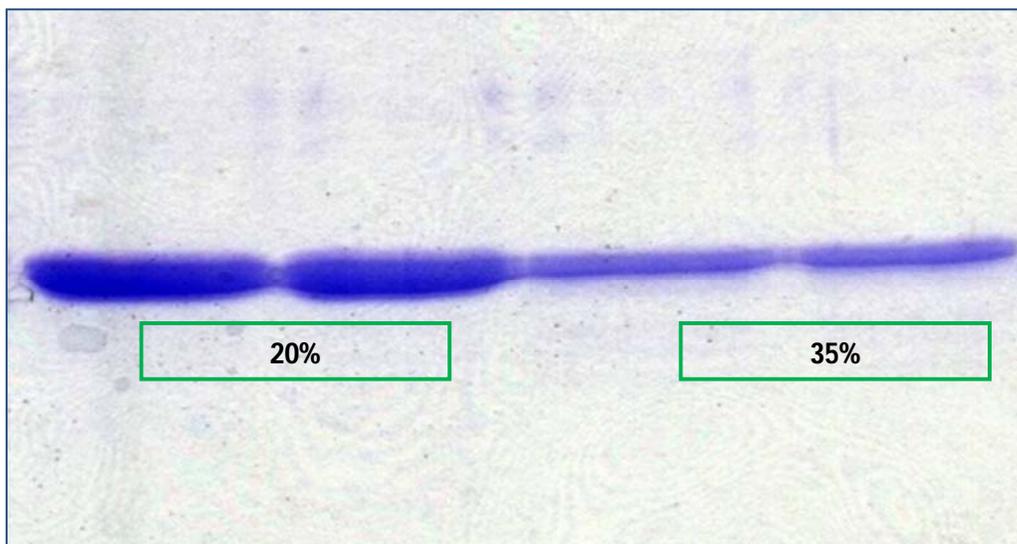


Figura 28.- Perfil electroforético de purificación de la enzima recombinante NitR340-2 proveniente de dos saturaciones distintas de sulfato de amonio. Nótese la gran pureza de la misma.

7.6 Análisis estructural

Se procedió a analizar estructuralmente a la enzima truncada NitR340-2 para conocer el estado oligomérico de la enzima recombinante, así como su tamaño y el peso molecular de la misma, además de determinar los cambios producidos por la mutación en el extremo C-Terminal y compararlo con lo obtenido con la mutante NitR340-1.

7.6.1 Dispersión dinámica de luz

Una vez purificada la enzima fue necesario determinar su radio hidrodinámico para compararlo con el de la enzima silvestre y la enzima mutante NitR340-1, con el fin de conocer si la sustitución de un aspártico por una glicina propicia cambios importantes en la estructura de la enzima mutante. Se observó en NitR40-2 tamaños que iban de los 28nm a 32nm, con una media de 29nm, aproximadamente tres veces el tamaño observado para la otra mutante NitR340-1. (figura 29)

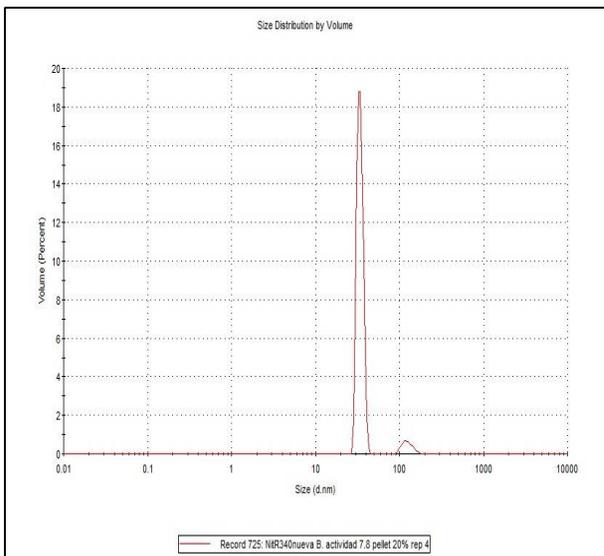


Figura 29.- Gráfico de radio hidrodinámico medido por DLS de la mutante NitR340-2

Nitrilasa	Diámetro (nm)	%Pd	% Masa	% Intensidad
Wild Type	19.6 ± 2.7	8.4 ± 1.8	91.7% ±2.01	9.9% ±2.7
E293K/ R340Δ (NitR340-1)	11.6 ± 0.4	14.8 ± 3.4	99.2%	42.8% ±6.1
R340Δ (NitR340-2)	35.63±5.954	16.4±1.2	98.3%	35.3±1.3%

Tabla 6.- Comparativo de radio hidrodinámico de la mutante NitR340-2 obtenido por DLS contra la nitrilasa silvestre y la mutante NitR340-1. El producto de la delección de 26 aminoácidos produce enzimas en un estado de asociación mayor que impacta claramente en el Rh.

7.6.2 Experimentos de Filtración Molecular para determinar el Estado Oligomérico de la mutante NitR340-2.

Al igual que para la nitrilasa silvestre y la mutante NitR340-1 se utilizó la columna analítica de filtración molecular con el fin de determinar el estado oligomérico y el peso molecular del estado oligomérico de la enzima recombinante NitR340-2. Utilizando como referencia los mismos estándares de peso molecular. Es importante resaltar que la nitrilasa Nit R340-2 presenta un pico único que no pudo ser analizable debido a que sale en el volumen de exclusión de la columna.

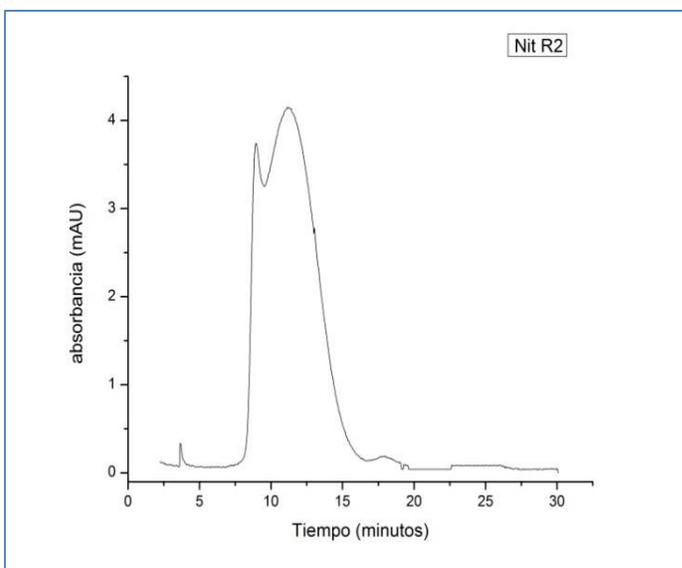


Figura 30.- Cromatograma de filtración molecular analítica de la nitrilasa recombinante NitR340-2

7.6.3 Caracterización cinética de la nitrilasa recombinante NitR340-

2.

En cuanto a la mutante NitR340-2 (Δ C340) se pudo obtener una mejor caracterización cinética debido a su gran estabilidad y a la gran actividad enzimática mostrada. Se trabajó con 5 μ g de enzima por ensayo para benzonitrilo y 15 μ g de enzima para valeronitrilo, con el fin de encontrar la velocidad máxima de catálisis (punto en el que la velocidad enzimática ya no varía debido a que todos los sitios catalíticos se encuentran ocupados).

Para determinar los parámetros cinéticos, fue necesario realizar cinéticas enzimáticas a diferentes concentraciones de sustrato, tomando muestras cada determinado tiempo; de esta forma al graficar las micromolas de amonio producidas contra el tiempo se pudo obtener las pendientes en la zona de comportamiento lineal (velocidades catalíticas); a partir de las velocidades se calculó la actividad enzimática específica para cada concentración (Velocidad/ μ g de enzima) y se graficó contra la concentración de sustrato (figura 31).

Las curvas de progreso de la reacción y sus pendientes, que se utilizaron para calcular la actividad nitrilasa, fueron obtenidas y procesadas con el programa GraphPad Prism ^[30].

En el proceso se observó un comportamiento hiperbólico, ideal para ajustarlos a la ecuación de Hill, para ambos casos el ajuste fue muy bueno con índices de correlación de 0.99, en este se obtuvieron diversos parámetros cinéticos (tabla 9).

Se observa que la nitrilasa recombinante NitR340-2 presentó una actividad enzimática superior en el orden de 4 veces a la de la enzima silvestre para benzonitrilo y de 2 veces más para valeronitrilo.

Resumen de parámetros obtenidos para al mutante Nit R340Δ

Valores	Benzonitrilo	Valeronitrilo
Vmax	7179±168.7	466±23.41
h	5.205±0.8231	0.8678±0.1420
K _d	0.2174±0.006120	0.1510±0.02156

Tabla 7.- Parámetros obtenidos del ajuste de los datos cinéticos a la ecuación de Hill.

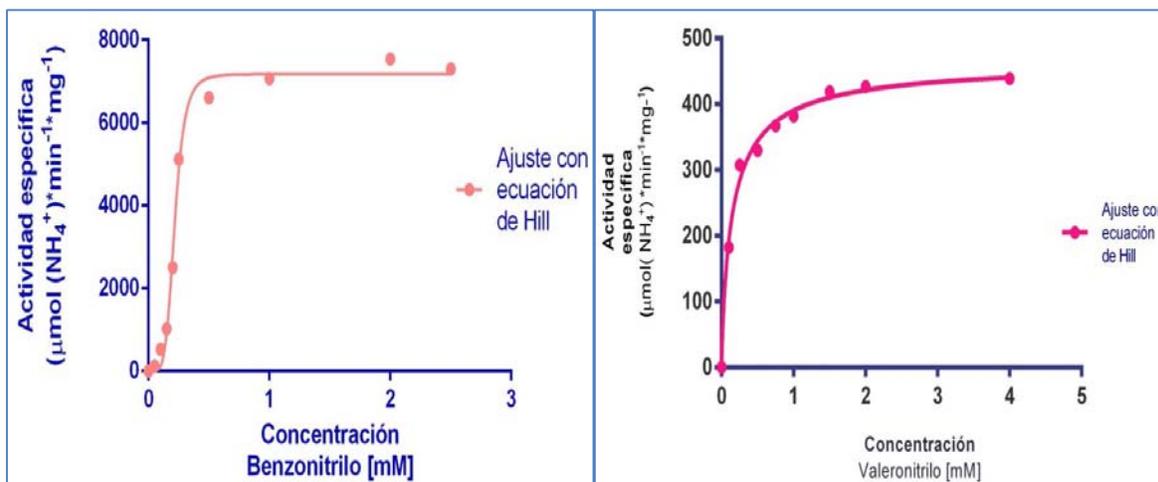


Figura 31.- Cinéticas enzimáticas de la mutante NitR340Δ (NitR340-2) con benzonitrilo (izquierda) y valeronitrilo (derecha) como sustratos; con los ajustes a la ecuación de Hill en naranja y rosa respectivamente.

7.7 Microscopía electrónica

Una vez caracterizada la nitrilasa recombinante Nit R340-2 cinética y estructuralmente por diversos métodos, se tomó la decisión de analizarla por microscopía electrónica de transmisión, esto permitiría determinar definitivamente si la formación de fibras helicoidales es independiente del cambio de pH y que a su vez es producto de la delección de 26 aminoácidos del extremo C-terminal.

Las muestras analizadas que previamente fueron dializadas en solución amortiguadora Tris 100mM fueron preparadas con dos métodos distintos, y utilizando dos agentes contrastantes, ácido fosfotúngstico (PTA por sus siglas en inglés) y acetato de uranilo, ambos al 2% p/v, como agente contrastante en rejillas recubiertas por carbón. El primer método consistía en depositar una pequeña gota de proteína (5 μ L de enzima a una concentración de 0.50mg/mL) la cual se dejaba fijar aproximadamente 5 minutos, posteriormente se agrega 5 μ L de ácido fosfotúngstico y se homogeniza bien con la gota de proteína, se seca inmediatamente con papel filtro para poder analizarla con el microscopio electrónico de transmisión; esta método de preparación de muestra no dio resultados favorables.

Se decidió cambiar el método de preparación; consistió en colocar la rejilla sobre una gota de muestra por un minuto aproximadamente, esto permitiría que gradualmente la proteína se uniera a la rejilla por atracciones electrostáticas, posteriormente se lavó y secó en un par de ocasiones para finalmente contrastar colocando la rejilla recubierta de carbono sobre una gota de PTA e

inmediatamente secar para ser analizada en el microscopio; este método trajo resultados positivos ya que pudo reconocerse estructuras fibrilares (imágenes 32 y 33) similares a las vistas en otra mutante con una deleción de 39 aminoácidos diseñada en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas (Cáliz A, Garza G.).

Por último se hizo la misma preparación pero esta vez utilizando acetato de uranilo como agente contrastante, lo que permitió ver filamentos helicoidales, pero con una menor resolución (resultado no mostrado).

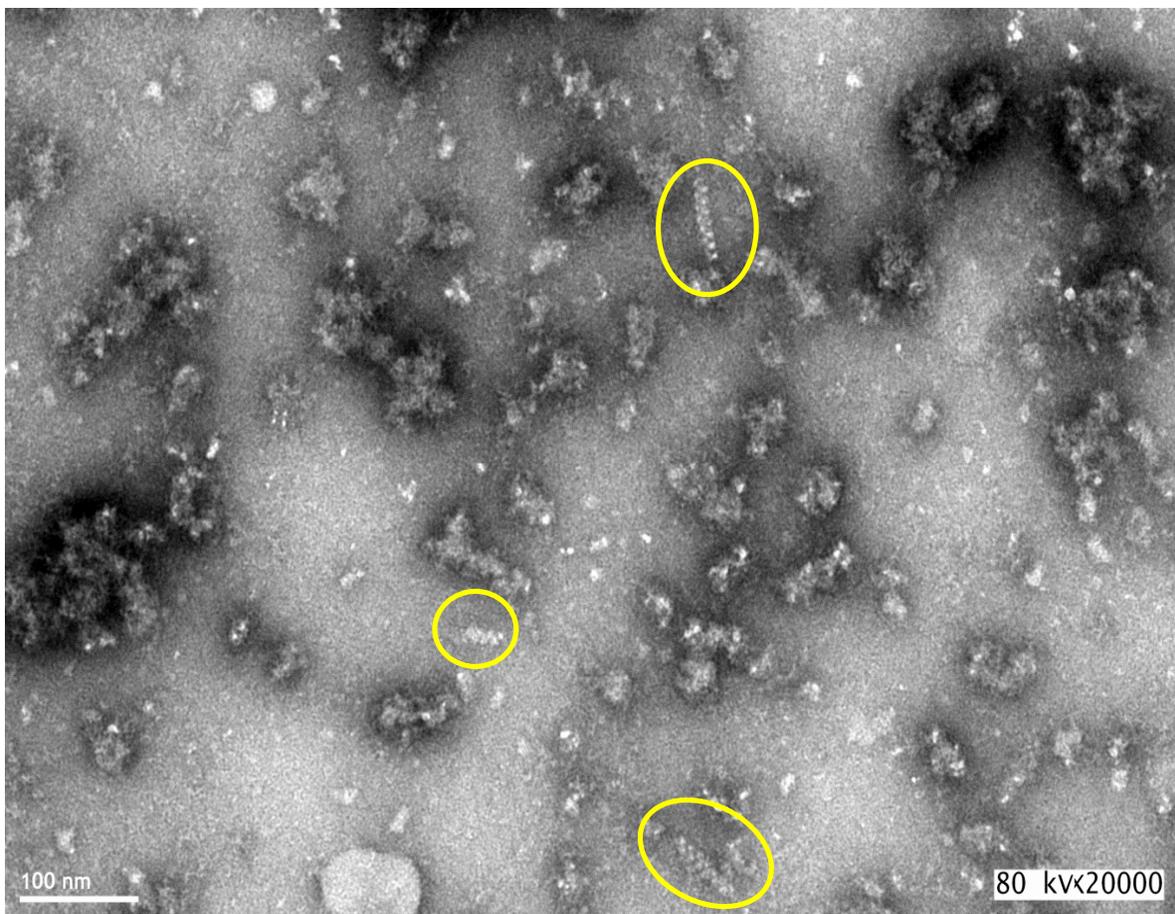


Figura 32.- Micrografía electrónica de tinción negativa a 20,000 aumentos de la mutante NitR340-2 de la nitrilasa recombinante de *R. pyridinovorans* utilizando PTA como solución de contraste. En amarillo se observan diferentes fibras helicoidales de tamaños diversos (entre 40 y 80nm).

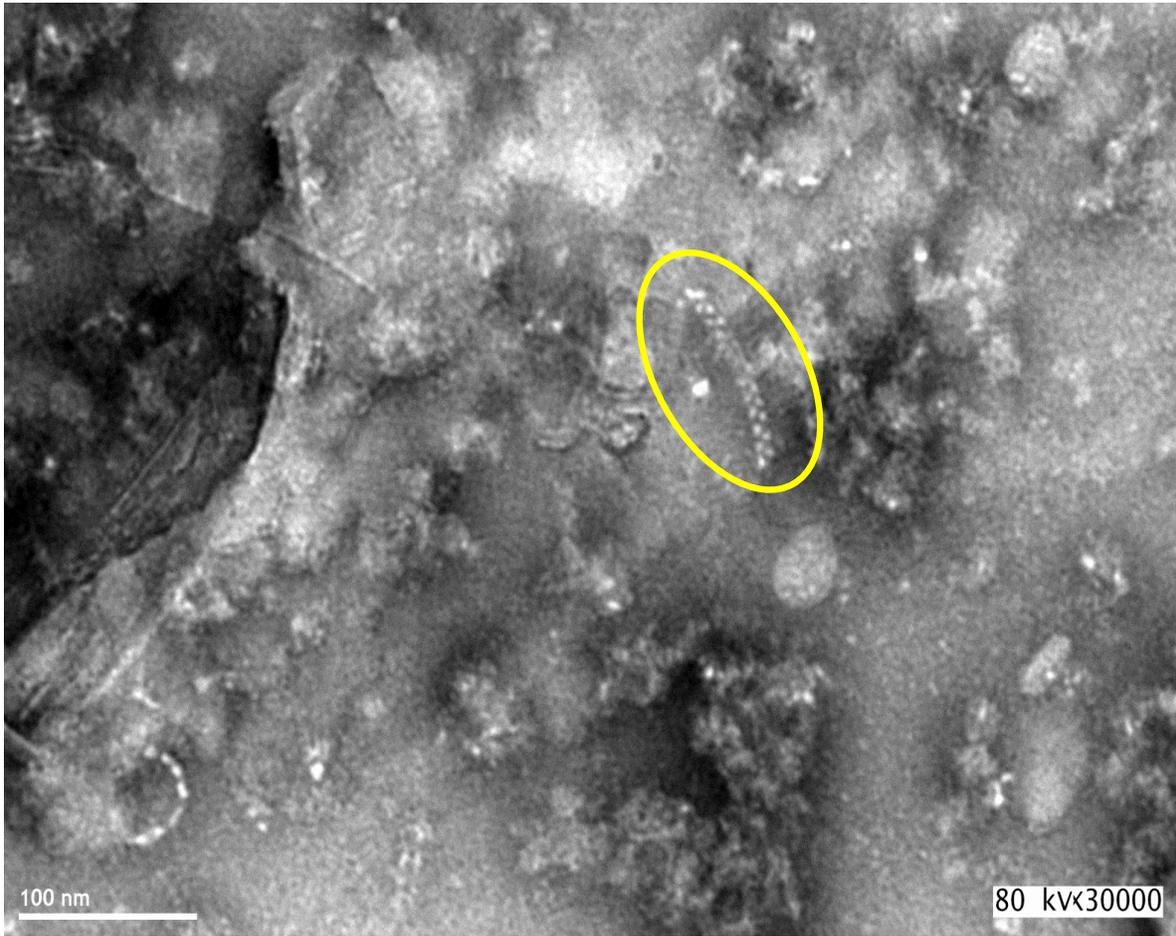


Figura 33.- Micrografía electrónica de tinción negativa a 30,000 aumentos de la mutante NitR340-2 utilizando PTA como solución de contraste. En amarillo se observa una fibra helicoidal correspondiente a un oligómero de la enzima.

8.- Discusión de resultados

El procedimiento experimental mostrado, resultado de varias modificaciones en el proceso de sobreexpresión y purificación fue con el objetivo de tener una enzima de mayor pureza, de mayor estabilidad y que además se aislara en una mayor concentración.

El cambio en de cepa *E.coli* BL21 (DE3) a una cepa *E.coli* BL21 (DE3) pLys ayudó a obtener una mayor sobreexpresión fácilmente inducida (IPTG). La desventaja se asocia a la expresión basal de T7 RNA polimerasa. La T7 RNA Polimerasa es altamente selectiva y activa, cuando se induce fuertemente casi todos los recursos de la célula se dirigen hacia la producción de la proteína recombinante, los productos pueden corresponder hasta en un 50% a la proteína recombinante de interés y otro con otra posibilidad de coexpresar una enzima sin interés experimental. Además de que esta cepa es una mejor candidata para usar en métodos de lisis celular por ruptura mecánica (lisis por presión mediante la prensa de French); lo cual impactó directamente en el rendimiento aumentando aproximadamente 10 veces más con las modificaciones en el protocolo de purificación, además de mejorar considerablemente en la pureza de la enzima.

La disminución de temperatura de inducción también fue un factor importante para lograr obtener gran cantidad de enzima recombinante debido a que al bajar la temperatura se propicia el correcto plegamiento de la enzima a una velocidad menor (por eso el mayor tiempo de inducción).

En cuanto a los ensayos cinéticos con la mutante Nit R340-2 es notorio que la mutación en el extremo C-terminal está relacionada directamente con la actividad enzimática, aumentando hasta 4 veces más para benzonitrilo y al doble para valeronitrilo; al disminuir la secuencia de aminoácidos de la enzima se propicia la mejor interacción entre subunidades, por lo que se generó un excelente modelo de prueba para conocer la importancia del extremo C-terminal en la catálisis enzimática.

Además de que se pudo observar un comportamiento sigmoidal, que fue tratado con un ajuste a la ecuación de Hill, dando como resultado una velocidad máxima para benzonitrilo de $7179 \pm 168.7 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ y un coeficiente de Hill de 5.205 ± 0.05231 , si es cooperatividad positiva termodinámica, el número de Hill indica que al menos hay cinco sitios activos interviniendo en la actividad enzimática ($Hill \leq \text{centros activos}$) (Wyman & Gill 1990); se puede inferir que la catálisis del benzonitrilo genera un efecto de cooperatividad positiva termodinámica, es decir, que a altas concentraciones de sustrato se genera un aumento en la actividad enzimática debido a la activación de un centro catalítico por la unión un ligando, que influye sobre la unión de un molécula subsecuente de sustrato; en conjunto a los ensayos de filtración molecular en los que se observan 2 picos distinguibles de alto peso molecular se podría explicar este comportamiento sigmoidal suponiendo que existen dos poblaciones distintas, una con mayor afinidad que la otra; pero en menor proporción, generando dos curvas de velocidad que se sobreponen a bajas concentraciones donde la primera que es más a fin se satura dando paso a la segunda población de velocidad más lenta. En

cuanto al Valeronitrilo se observó una velocidad máxima de $466 \pm 23.412 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ y un coeficiente de Hill de 0.8678 ± 0.1420 que sugiere cooperatividad negativa, es decir, que la unión de una molécula de ligando afecta negativamente la unión de una molécula subsecuente, generando una baja en la actividad enzimática, esto puede ser debido a la naturaleza del sustituyente alifático, que interactúa de forma pobre con el sitio catalítico.

Mientras que para la enzima recombinante NitR340-1 se observó en ensayos enzimáticos que depende de la concentración de proteína, lo que conlleva a pensar que esta enzima se disocia, lo que genera una pérdida notable en la actividad enzimática.

En cuanto a los ensayos enzimáticos de la mutante NitR340-1 en condiciones de preincubación a 30°C toda una noche se demostró que la enzima es inestable y se agrega, condición que se había observado en muestras a concentraciones mayores a 0.6mg/mL en condiciones de refrigeración; la preincubación acelera la agregación y por consecuencia la pérdida total de la actividad enzimática. Esto fue mejor visto en los análisis estructurales por filtración molecular donde se ve la tendencia a formar agregados de alto peso molecular que aumentan al diluir la concentración de nitrilasa mutante. La nitrilasa silvestre respondió de una manera distinta al mostrarse resistente a estas pruebas y manteniéndose estable.

De los experimentos de dispersión dinámica de luz se observó que el Rh promedio de la nitrilasa NitR340-1 es de 11.6nm correspondiente a un hexámero y con un peso molecular calculado similar al calculado por filtración molecular, la mutante

Nit R340-2 tiene un diámetro de 29nm y un peso molecular mayor a 1000KDa, mientras que la nitrilasa silvestre que es un duodecámero tiene un Rh de 19.6nm.

Los experimentos de filtración molecular para la mutante Nit R340-1 mostraron una gran heterogeneidad de especies oligoméricas entre las que se encuentran hexámeros (también detectados por DLS) y que además la especie predominante son monómeros y dímeros, lo que podría explicar la baja actividad enzimática ya que es posible que se necesite asociaciones de oligómeros de mayor tamaño para que se lleve a cabo la actividad enzimática.

En cuanto a la mutación sufrida por parte de NitR340-1, al examinar a detalle y haciendo un alineamiento con diferentes secuencias de proteínas de la superfamilia de la nitrilasa (Sampieri S, Garza G.), se observó que esta mutación se encuentra en la interfase C (correspondiente a un loop de la proteína) que es importante en el proceso de oligomerización de la enzima, ya que tiene interacciones electrostáticas con la subunidad A (correspondiente al extremo C-terminal y que es responsable de la dimerización), formando hélices a partir de la interacción de dímeros de proteínas [5]; la mutación D293G genera un reacomodo del loop que impide la correcta interacción entre dímero, provocando así una heterogeneidad oligomérica. Mientras que el acortamiento del extremo C-terminal en la mutante NitR340-2 proporcionó una mejor interacción entre las subunidades A y C, generando estructuras muy estables y resistentes. La microscopía electrónica demostró que la estabilidad y el poder catalítico de la enzima se debieron a la formación de filamentos helicoidales.

9.- Conclusiones

En el presente trabajo se mostró el proceso por el cual se consiguió sobre expresar y purificar las enzimas recombinantes NitR340-1 y NitR340-2, así como los experimentos necesarios para caracterizarla cinética y estructuralmente con la finalidad de dilucidar el papel del extremo C-terminal en la generación de fibras helicoidales activas.

Fue posible aislar las mutantes con alto grado de pureza, con un rendimiento en el orden de los 10 mg/L de cultivo para NitR340-1 y 15mg/L para NitR340-2, necesarios para la generación de diversos experimentos de caracterización.

El resultado de la mutación D293G produjo que la actividad catalítica de la mutante NitR340-1 fuera 10 veces menor con respecto a la nitrilasa silvestre. Además de que su actividad específica depende de la concentración de proteína, lo que sugiere que la enzima tiende a disociarse. El acortamiento en 26 aminoácidos para la enzima NitR340-2 produjo un aumento de 4 veces la actividad catalítica para benzonitrilo y duplicó la actividad enzimática para valeronitrilo, comprobando que el acortamiento del extremo C-Terminal de la nitrilasa de *R. pyridinovorans* favorece las interacciones entre las intercaras de los monómeros y promueve la formación de filamentos helicoidales similares a las formadas por las cianuro dihidratasa y algunas nitrilasas.

En cuanto a la caracterización estructural, por DLS se observó un Rh promedio de 11.6 nm para NitR340-1 que corresponde a un hexámero. Por filtración molecular se observa heterogeneidad de especies. El pico principal es un agregado de alto peso molecular. Se observan mezclas de dímero y monómero en baja proporción, mientras que para NitR340-2 se observó un Rh promedio de 29.9 nm correspondiente a formaciones oligoméricas de mayor tamaño, concordante a filamentos helicoidales que fue demostrado por microscopía electrónica de transmisión, por lo que se comprueba que el proceso de formación de estructuras helicoidales es independiente a cambios en el pH.

10.- Perspectivas

Generar biorreactores catalíticos por inmovilización química de los filamentos helicoidales generados por la mutante Nit C340 Δ .

Explorar la quimio, regio y estereoespecificidad de la Nit C340 Δ para buscar nuevas aplicaciones biotecnológicas.

11.- Referencias

- [1] Anastas P, Warner J. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, Nueva York. 1998.
- [2] Moller B. L., Conn E. E., The biosynthesis of cyanogenicglucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (linn) Moench. *J Biol Chem*, 1980; 255: 3049-3056.
- [3] Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC: The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 60:33–44.
- [4] Gong JS, Lu ZM, Li H, Shi JS, Zhou ZM and Xu ZM. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microbial Cell Factories*. 2012, 11:142.
- [5] Thuku RN, Brady D, Benedik MJ, Sewell BT. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. *J Appl Microbiol*. 2009; 106: 703-727.
- [6] Pace HC, Brenner C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol*. 2. 2001:Rev.1.1–Rev.1.8.
- [7] Ellis LB, Hershberger CD, Bryan EM, Wackett L. P. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: emphasizing enzymes. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29: 340-3.
- [8] Gong JS., Li H, Zhu XY, Lu ZM, Wu Y, Shi JS, Xu ZH. Fungal His-tagged nitrilase from *Gibberella intermedia*: gene cloning, heterologous expression and biochemical properties. *PLoS One*. 2012; 7(11): e50622.

- [9] Raczynska JE, Vorgias CE, Antranikian G, Rypniewski W. Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase. *J Struct Biol.* 2011;173(2):294-302
- [10] Pace HC, Hodawadekar SC, Draganescu A, Huang J, Bieganowski P, Pekarsky Y, Croce CM, Brenner C. Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr Biol.* 2000; 10: 907-917.
- [11] O'Reilly C, Turner PD. The nitrilase family of CN hydrolyzing enzymes: a comparative study. *J Appl Microbiol.* 2003; 95: 1161-1174.
- [12] Nagasawa T, Kobayashi M, Yamada H. Optimum culture conditions for the production of benzonitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Arch Microbiol.* 1988; 150: 89-94.
- [13] Nagamune, T, Kurata H, Hirata M, Honda J, Koik H, Ikeuchi M, et al. Purification of inactivated photoresponsive nitrile hydratase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; 168: 437-42.
- [14] Groger H. Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. *Adv Synth Catal.* 2001; 343 (6-7): 547-58.
- [15] Nagasawa T, Wieser M, Nakamura T, Iwahara H, Yoshida T, Gekko K. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Conversion into the active form by subunit association. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 138-44.
- [16] Layh N, Parratt J, Willets A. Characterization and partial purification of an enantioselective arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155. *J Mol Catal B Enzym.* 1998; 5: 467-74.

- [17] Piotrowski M, Schönfelder S, Weiler EW, The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. J Biol Chem. 2001; 276: 2616-21.
- [18] Singh R, Sharma R, Tewari N, Rawat DS. Nitrilase and Its application as a 'green' Catalyst. Chems Biodivers. 2006; 3: 1279-87.
- [19] Chauhan S, Wu S, Blumerman S, Fallon RD, Gavagan JE, DiCosimo R, Payne MS. Purification, cloning, sequencing and over-expression in *Escherichia coli* of a regioselective aliphatic nitrilase from *Acidovorax facilis* 72W. Appl Microbiol Biotechnol. 2003; 61: 118-22.
- [20] Fritsche W. The potential of microorganisms for bioremediation. In: Alberghina L, Frontali L, Sensi P. 6th Proceed Euro Congress Biotechnol. Rome: Elsevier. 1994.
- [21] Ingvorsen K, Højer-Pedersen B, Godtrfredsen S. Novel cyanide- hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. denitrificans. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57: 1783–1789.
- [22] Meyers PR, Rawlings DE, Woods DR, Lindsey GG. Isolation and characterization of a cyanide dihydratase for *Bacillus pumilus* C1. J. Bacteriol. 1993; 175: 6105–6112.
- [23] Watanabe A., Yano K., Ikebukuro K., Karube I. Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. Microbiology. 1998;144: 1677–1682.
- [24] Cluness MM, Turner PD, Clements E, Brown DT, O'Reilly C. Purification and properties of cyanide hydratase from *Fusarium lateritium* and analysis of corresponding chl gene. J. Gen. Microbiol. 1993; 139: 1807–1815.

- [25] Wang, P, Matthews DE, VanEtten HD. Purification and characterization of cyanide hydratase from the phytopathogenic fungus *Gloeocercospora sorghi*. Arch. Biochem. Biophys. 1992; 298: 569–575.
- [26] Sewell T, Willson RC, Benedik MJ, Jandhyala D, Berman M, Meyers PR. B.CynD, the Cyanide Dihydratase from *Bacillus pumilus*: Gene Cloning and Structural Studies. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69(8):4794.
- [27] Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. Int J Syst Bacteriol. 1980; 30: 225-420.
- [28] Gao J, Ellis LBM, Wackett LP. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access" Nucleic Acids Research. 2010; 38: D488-D491. (<http://eawag-bbd.ethz.ch/>)
- [29] Fernández B, Mateo C, Kiziak C, Chmura A, et. al. Nitrile Hydratase Activity of a Recombinant Nitrilase. Adv. Synth. Catal. 2006; 348: 2597 – 2603
- [30] Ajuste de datos de cinética enzimática a la ecuación de Hill usando GraphPad Prism version 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com
- [31] Crum M, Park J, Mulelu A, Sewell B y Benedik M. Probing C-terminal interactions of the *Pseudomonas stutzeri* cyanide-degrading CynD protein. App Microbiol Biotechnol. 2014; DOI 10.1007/s00253-014-6335-x
- [32] Zhang L et al. Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803. J Appl Microbiol. 2014; 188: 93-101

B) Preparación de disoluciones

PREPARACIÓN DE MEDIO LB (LURIA-BACTOTRIPTONA)

Para un litro de medio líquido:	
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Pesar los reactivos y disolver en 1L de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 2L, cubrir la tapa con aluminio y colocar un poco de cinta testigo; posteriormente esterilizar en autoclave durante 20min a 120°C. Es importante retirar los matraces con el mayor cuidado posible al terminar el proceso de esterilización

PREPARACIÓN DE MEDIO LB SÓLIDO (LURIA-BACTOTRIPTONA)

Para un litro de medio para placas:	
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	25g

Pesar los reactivos y disolver en 1L de agua destilada dentro de un matraz Erlenmeyer de 2L, cubrir la tapa con aluminio y colocar un poco de cinta testigo; posteriormente esterilizar en autoclave durante 20min a 120°C. Es importante retirar los matraces con el mayor cuidado posible al terminar el proceso de esterilización, dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C y vaciar aproximadamente 20mL de medio por caja Petri. Dejar solidificar en campana de flujo laminar.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE SONICACIÓN

Buffer de sonicación		Por cada 500mL
Tris	100mM	50mL
KCl	150mM	25mL
EDTA	1mM	2mL

*Aforar con agua y ajustar pH a 7.7

PREPARACIÓN DE 1L DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS A

Reactivo	Concentración	Peso molecular (g/mol)	Cantidad a adicionar
Fosfato de potasio monobásico	10mM	136.09	1.3609g
EDTA	1mM	372.29	0.3720g
Cloruro de sodio	200mM	58.48	11.6800g
2-Mercaptoetanol (D=1.115g/mL; ≥98%)	14.25mM	78.13	1mL

- Disolver en 0.98L de agua destilada y posteriormente con agitación constante, ajustar a pH 7.0 con KOH 10M. Se pasa a una probeta graduada de 1L y se afora con agua destilada
- Filtrar al vacío con equipo de filtración y membrana de filtración 0.22 micras

PREPARACIÓN DE 1L DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS B

Reactivo	Concentración	Peso molecular (g/mol)	Cantidad a adicionar
Fosfato de potasio monobásico	10mM	136.09	1.3609g
EDTA	1mM	372.29	0.3720g
Cloruro de sodio	1M	58.48	58.48g
2-Mercaptoetanol (D=1.115g/mL; ≥98%)	14.25mM	78.13	1mL

- Disolver en 0.98L de agua destilada y posteriormente con agitación constante, ajustar a pH 7.0 con KOH 10M. Se pasa a una probeta graduada de 1L y se afora con agua destilada
- Filtrar al vacío con equipo de filtración y membrana de filtración

SOLUCIÓN DIGESTORA DE PROTEÍNAS

Para preparar 5mL de solución:	
SDS 10%	2mL
β-Mercaptoetanol	200μL
EDTA 250mM	160μL
TrisHCL 1M pH 6.8	1mL
de azul de bromofenol	0.1mg

Pesar el colorante y depositarlo en un tubo falcon de 15mL, añadir gradualmente cada solución y mezclar; por último aforar a 5mL con agua destilada.

SOLUCIÓN DE CORRIDA ELECTROFORÉTICA

Para un litro de Solución:	
Trizma base	3g
Glicina	14.4g
SDS al 10% p/v	10mL

Pesar todos los reactivos e ir incorporando poco a poco en 970mL de agua destilada para evitar la formación de burbujas por el detergente.

PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA AL 12%

Soluciones

- Acrilamida 29.2% - Acrilamida-Bis 0.6% (pesar 29.2g y 0.6g respectivamente y llevar a 100mL con agua destilada. **Precaución:** La acrilamida es altamente neurotóxica y carcinogénica, usar guantes, gafas de seguridad y cubrebocas)
- Tris-HCl 1M pH 8.8 y 6.8
- PODS de amonio 10mg/mL
- TEMED

GEL SEPARADOR		GEL EMPACADOR	
Acrilamida-bis	8.00mL	Acrilamida-bis	875 μ L
Tris-HCl 1M, pH 8.8	8.75mL	Tris-HCl 1M, pH 6.8	325 μ L
SDS10%	0.22mL	SDS10%	25 μ L
PODS	0.30mL	Agua	2.66 mL
TEMED	27 μ L	PODS	90 μ L
-----	-----	TEMED	20 μ L

Para el gel separador: En un vaso de precipitados de 25mL se adiciona la acrilamida-bis, Tris-HCl 1M pH 8.8 (157.12 g/mol; 99.9%) y el SDS (este último al final). Se mezclan suavemente, con el objetivo de evitar que se oxigene mucho la

preparación, ya que el oxígeno interfiere en la polimerización. Posteriormente se le adicionan los catalizadores PODS de amonio y TEMED e inmediatamente se llenan los geles.

Para el gel empacador: En un vaso de precipitados de 10 mL se adiciona la acrilamida, Tris-HCl 1M (157.12 g/mol; 99.9%) pH 6.8, agua y el SDS, se mezclan suavemente como en el caso anterior, se le adiciona el PODS de amonio y el TEMED e inmediatamente se llenan los geles.

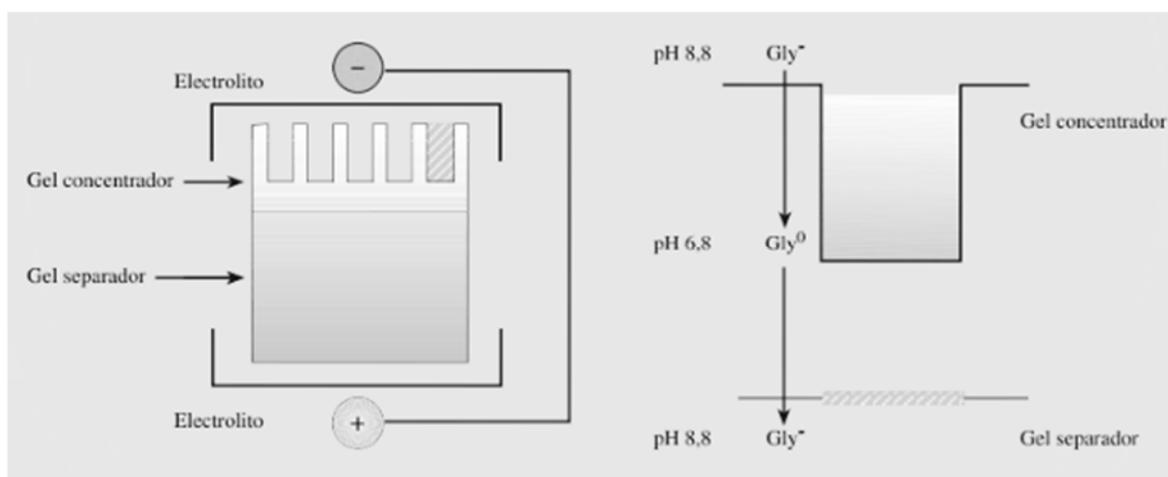


Figura 35.- Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida.

SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BCA

Para el reactivo A:

Para un 100mL de Solución:	
Ácido bicononínico (BCA)	1.00g
NaCO ₃	2.00g
NaHCO ₃	0.95g
NaOH	0.40g
Tartrato de Na-K	0.16g

****Mezclar los reactivos cuidadosamente en agua suficiente. Ajustar pH a 11.25***

Para el reactivo B:

Disolver 2 g de sulfato de cobre II en 50mL de agua destilada (4% p/v)

SOLUCIONES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

A) Solución amortiguadora Tris-HCl 100mM

Pesar 15.71g de Tris-HCl y disolverlo en 980mL de agua destilada, posteriormente ajustar el pH a xx con HCl 1M.

B) Soluciones contrastantes

Ácido fosfotúngstico 2% p/v pesar 0.1g y llevar a 5mL con agua destilada

Acetato de Uranilo 2% p/v pesar 0.1g y llevar a 5mL con agua destilada
