



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO BIOSINTÉTICO
MICROBIANO DE LA TOXINA DE ALACRÁN TAMAPINA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA
Ana Laura Casillas Barajas



Ciudad de México

2019



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: Profesor: Méndez Stivalet José Manuel

VOCAL: Profesor: Del Río Portilla José Federico

SECRETARIO: Profesor: Ávila Zarraga José Gustavo

1er. SUPLENTE: Profesor: Morales Flores Félix

2° SUPLENTE: Profesor: Rivera Cárdenas Claudia Inés

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto de Química de la UNAM, en el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 1 y Laboratorio de Biología Molecular.

Asesor del tema:

Dr. José Federico del Río Portilla

Supervisor técnico:

M. en C. Marlen Mayorga Flores

Sustentante:

Casillas Barajas Ana Laura

Agradecimientos

Agradezco a la UNAM por brindarme la llave que abre muchas puertas, por inculcarme el amor a mi raza y a mí patria, por cambiar el rumbo de mi vida. A la Facultad de Química por mi educación superior, ya que me ayudo a comprender el mundo que me rodea y así, poder cuidarlo y valorarlo.

Al Dr. Federico del Rio, por darme la oportunidad de desarrollarme y aprender dentro de su grupo de investigación.

A la Dra. Patricia Cano, por su asesoría y paciencia, durante todo este proyecto. Por ser un modelo a seguir académicamente.

Al Laboratorio de Biología Molecular y al Laboratorio Universitario de RMN del Instituto de Química, por los experimentos realizados.

Finalmente, al apoyo otorgado a el proyecto PAPIIT IN210319 de la DGAPA.

Dedicatorias

A mi madre, gracias por hacer de mí una buena mujer, por ser la inspiración de cada meta y por el amor infinito que me has dado.

A mi padre, gracias por darme carácter para enfrentar la vida y las adversidades, siempre has sido mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos, gracias por acompañarme en mi camino, por estar en mis días llenos de estrés y rescatarme de ellos. Sandra, infinitas gracias por toda esta vida a tu lado, gracias por ser la mejor amiga, tornaste los días grises a rosa. Juanito, gracias por ser el hermano más lindo y puro del universo.

A mis mejores amigas, Karen Garduño y Fer Pardines. Karen, gracias por acompañarme durante toda la licenciatura, contigo crecí como persona y profesionalmente, nos acompañamos durante tantas alegrías y desvelos, derramamos lágrimas juntas pero siempre estuviste ahí aunque el barco se estuviera hundiendo; gracias por ser el mejor ser humano que ha tocado a mi puerta, todos deberían de tener a alguien como tú en su vida. Fer, gracias por tu amistad que me levanto a seguir y no rendirme, gracias por ser tan extraña como yo.

A mis mejores amigos. Alberto García, gracias por siempre estar conmigo y por ser un increíble mejor amigo. Edgar Jardines, gracias por siempre regalarme risas y alegrías, por hacer que las cosas funcionen y por enseñarme a ser una mejor persona. Martín Rivera, gracias por tu amistad incondicional y sincera. Julián Ramírez, gracias por ayudarme a creer en mí. Óscar Guzmán y Carlos Hernández, gracias por ser tan buen ejemplo de que es ser un Químico, aprendí mucho de ambos.

Y, a mis compañeritos de laboratorio por ser tan divertidos.

Índice General

Lista de abreviaturas	8
Lista de figuras	10
1. RESUMEN	13
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVO GENERAL	14
4. OBJETIVOS PARTICULARES	14
5. MARCO TEÓRICO	15
5.1 Toxinas de veneno de alacrán	15
5.1.1 Tamapina	15
5.1.2 Relación canales iónicos-toxinas	16
5.2 Aminoácidos	17
5.1.1 Proteínas	18
5.1.2 Organización de proteínas	18
5.3 Ácido desoxirribonucleico	21
5.1.1 Dogma central de biología molecular	21
5.4 Tecnología de ADN recombinante	22
5.4.1 ADN recombinante	22
5.4.2 Vectores de clonación	24
5.4.2.1 Diseño de vector pET3a-Tam	24
5.5 Proteínas recombinantes	25
5.5.1 Diseño de proteína de fusión	25
5.6 Regulación de expresión de proteína	26
5.7 Plegamiento de una proteína	27
5.8 Transformación	29
5.9 Corte con CNBr	29
5.10 Purificación de proteínas recombinantes	30
5.10.1 Ondas sonoras de alta frecuencia	30
5.10.2 Cromatografía de afinidad metal-quelato	30
5.10.3 Desalación por diálisis	31

5.10.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	31
5.11 Experimentos de caracterización	33
5.11.1 Resonancia magnética nuclear	33
5.11.1.1 Desplazamiento químico	35
5.11.2 Dicroísmo circular	37
5.11.2.1 Aplicación de Dicroísmo circular a la estructura de proteínas	38
6. Diseño Experimental	39
6.1 Construcción de vector pET3a-TAM	39
6.2 Optimización de expresión de proteína recombinante	40
6.3 Purificación de proteína recombinante	42
6.3.1 Expresión	42
6.3.2 Lisis desnaturalizante	43
6.3.3 Cromatografía de afinidad metal-quelato	44
6.3.4 Desalación por diálisis	44
6.3.5 Purificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa	44
6.3.6 Corte con bromuro de cianógeno	44
7. Resultados y Discusión	46
7.1 Construcción de pET3a-Tam	46
7.2 Optimización de expresión de proteína recombinante	48
7.3 Cinética de expresión	49
7.4 Concentración de IPTG	49
7.5 Purificación de proteína recombinante	53
7.6 Caracterización	57
7.6.1 Resonancia magnética nuclear	57
7.6.2 Dicroísmo circular	59
8. Conclusiones	61

9. Bibliografía	62
10. Lista de anexos	65
10.1 ANEXO I. Comparación de rendimientos obtenidos de diferentes proteínas recombinantes.	65
10.2 ANEXO II. Abreviaturas de los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza.	66
10.3 ANEXO III. Código genético.	66
10.4 ANEXO IV. Composición de medio LB para un litro.	67
10.5 ANEXO V. Protocolo QIAquick de equipo de extracción de gel.	67
10.6 ANEXO VI. Protocolo de purificación de equipo DNA miniprep.	69
10.7 ANEXO VII. Protocolo: Purificación de ADN plasmídico usando equipo QIAprep spin miniprep y una microcentrifuga.	70
10.8 ANEXO VIII. Protocolo para transformación de células competentes por método de choque termino.	72
10.9 ANEXO IX. Protocolo para uso de columna C18 Strata.	72

Lista de abreviaturas

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico	ARN
Bromuro de cianógeno	CNBr
Campo magnético	B_0
Canales de potasio activados por calcio	KCa2
Cantidad de movimiento	p
Coeficiente de extinción molar	ϵ
Constante de apantallamiento	σ
Constante de Planck	h
Constante de proporcionalidad	γ
Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	HPLC
Desplazamiento químico	Δ
Dicroísmo Circular	DC
Diferencia de absorción	$\Delta\epsilon$
Diferencia de energía	ΔE
Elipticidad	Θ
Energía potencial	E
Escherichia coli	E. Coli
Frecuencia	ν

Hélice alfa	Hélice α
Histidina	His, H
Hojas beta	Hojas β
Índice de refracción	n
Intensidad de campo aplicado	B_{apli}
Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido	IPTG
Luria-Bertani	LB
Magnitud del campo resultante	B_0
Momento angular	μ
Protón	^1H
Resonancia magnética nuclear	RMN
Sodium Dodecyl Sulfate – PoliAcrylamide Gel Electrophoresis	SDS-PAGE
Toxinas bloqueadoras de canales de potasio	KTx

Índice de figuras

Imagen 1. Secuencia de aminoácidos de la tamapina.

Imagen 2. Estructura tridimensional de tamapina.

Imagen 3. Fórmula general de un α -aminoácido de configuración L.

Imagen 4. Formación de enlace peptídico entre Glicina y Alanina.

Imagen 5. Conformación regular del esqueleto poli peptídico en la hélice α y la hoja β .

Imagen 6. Doble hélice del ADN.

Imagen 7. Plásmido pET3a-Tam

Imagen 8. Proteína de fusión obtenida de pET32-Tam.

Imagen 9. Proteína de fusión de la expresión en pET3a-Tam.

Imagen 10. Representación esquemática de inducción con IPTG de ARN polimerasa T7

Imagen 11. Conversión de la estructura desplegada de una proteína a la estructura nativa.

Imagen 12. Mecanismo de reacción propuesto de Bromuro de cianógeno con Metionina.

Imagen 13. Columna de afinidad de iones metálicos inmovilizados.

Imagen 14. Representación esquemática de proceso de separación de una mezcla en solución en una columna de cromatografía.

Imagen 15. Momentos magnéticos y niveles de energía para un núcleo con número cuántico de espín de $\frac{1}{2}$.

Imagen 16. Representación esquemática de construcción de pET3a-Tam.

Imagen 17. Gel de agarosa 1.5%. Ensayo de restricción con BglI en pET3a y pET3a-Tam.

Imagen 20. Gel de agarosa 1.5%. Plásmidos P001, P002 y P003, purificados con equipo QIAquick.

Imagen 21. Secuenciación de P001 por método de Sanger.

Imagen 22. Gel de poliacrilamida, 16%. Selección de cepa de expresión para tamapina.

Imagen 23. Cinética de expresión de proteína en cepa rosetta DE3.

Imagen 24. Gel de poliacrilamida 16%. Ensayo de selección de concentración de IPTG.

Imagen 25. Imagen 24. Amortiguadores a selección

Imagen 26. Gel de poliacrilamida 16%. Pruebas de solubilización de proteína con amortiguador 1, 2, 3 y 4.

Imagen 27. Gel de poliacrilamida 16%. Pruebas de solubilización de proteína con amortiguador 5, 6 y 6.1.

Imagen 28. Gel de poliacrilamida al 16%. Seguimiento de purificación de proteína de fusión.

Imagen 29. Cromatograma correspondiente a la purificación de proteína de fusión por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Imagen 30. Cromatograma correspondiente a la purificación de r-tamapina sin cola de histidinas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Imagen 31. Espectro de RMN-¹H de proteína de fusión que contiene a tamapina. Se muestran los principales intervalos de desplazamiento químico para los diferentes tipos de protón.

Imagen 32. Espectro de RMN de ¹H de r-tamapina obtenida de sistema de expresión pET32a-Tam/rosetta TM.

Imagen 33. Graficas de DC. Comparación en el plegamiento de la r-tamapina de ambos sistemas de expresión.

1. Resumen

El particular interés en optimizar el rendimiento biosintético de la expresión de la tamapina es debido a que, al ser una toxina que interactúa como agente bloqueador en canales de potasio activados por calcio, posibilita su uso como fármaco.^{1,3}

La tamapina es una toxina con estructura tridimensional conocida gracias experimentos de RMN, la cual cuenta con tres puentes disulfuro entre sus seis histidinas, de los cuales dos unen una hélice alfa con dos hojas beta. El sistema de expresión para la purificación de la r-tamapina utilizado anteriormente dentro del grupo de investigación se divide en dos pasos: 1. Corte con trombina y 2. Corte con CNBr, la obtención de la proteína se realiza de dicha forma ya que la proteína de fusión obtenida de pET32a-Tam, cuenta con la secuencia de la proteína de tiorredoxina antes de la tamapina imposibilitando un único corte con CNBr en metionina.³

Para optimizar el rendimiento biosintético de la r-tamapina, se planteó diseñar un nuevo vector de expresión que además de disminuir los pasos de purificación, ayudará a demostrar que la r-tamapina es estable por sí misma, es decir, que adquiere una conformación estable sin necesidad de una proteína chaperona como la tiorredoxina. El nuevo sistema de expresión de la r-tamapina en el vector pET3a cumple con las características para responder los problemas planteados, por lo cual se optimizó su expresión en una cepa de *E. coli*.

Finalmente se compararon los dos sistemas para la expresión de la r-tamapina en rendimiento y plegamiento, observando las ventajas y desventajas de cada método.

2. Hipótesis

- La tamapina en el vector pET3a se obtendrá de forma plegada sin necesidad de ninguna proteína chaperona.

3. Objetivo general

- Comparación de dos sistemas de expresión bacterianos en rendimiento, plegamiento y requerimientos de producción de la proteína r-tamapina.

4. Objetivos particulares

1. Construcción de vector de clonación pET3a con inserto del gen de la r-tamapina.
2. Optimización del procedimiento de expresión de la tamapina.
3. Caracterización fisicoquímica de la proteína obtenida.
4. Comparación de pET3a-Tam con el sistema de expresión bacteriano en el plásmido pET32a-Tam.

5. Marco teórico

5.1 Toxinas del veneno de alacrán

El veneno de alacrán está compuesto por una mezcla compleja de sales inorgánicas, aminoácidos libres, componentes heterocíclicos, péptidos y proteínas, las cuales son usadas por los alacranes para defenderse y alimentarse. Los componentes más estudiados del veneno son los péptidos que modifican la permeabilidad de canales iónicos de células excitables y no excitables en sus presas.

La clasificación general de toxinas se basa en cuatro diferentes criterios: 1. El canal-iónico involucrado (sodio, potasio, calcio y cloro), 2. El receptor específico al cual la toxina se une, 3. La estructura tridimensional de la toxina y 4. El tipo de respuesta inducida (activación o inactivación del receptor).¹

5.1.1. Tamapina

La tamapina pertenece a la familia de toxinas KTx ya que es específica a canales de potasio activados por calcio (KCa₂); a su vez pertenece a la subfamilia α KTx debido a que está compuesta por 31 aminoácidos. Cuenta con tres puentes disulfuro entre sus seis cisteínas (C2-C5, C3-C6 y C1-C4) y tiene un motivo estructural CS- α/β , que consiste en una hélice α unida a dos hojas β antiparalelas y tres puentes disulfuro; de los cuales, dos puentes disulfuro unen la hélice α con las hebras β .³ Ver imagen 1. Su tipo de interacción con este tipo de canales es del modo intermedio, ya que los residuos básicos de la toxina hacen contacto con una carga negativa extracelular del canal de potasio que estabiliza la unión toxina-canal.²

Debido a que la tamapina es utilizada en la caracterización funcional y estructural de los canales KCa₂, se busca desarrollar un nuevo procedimiento para su biosíntesis para aumentar el rendimiento de producción.^{1,2}

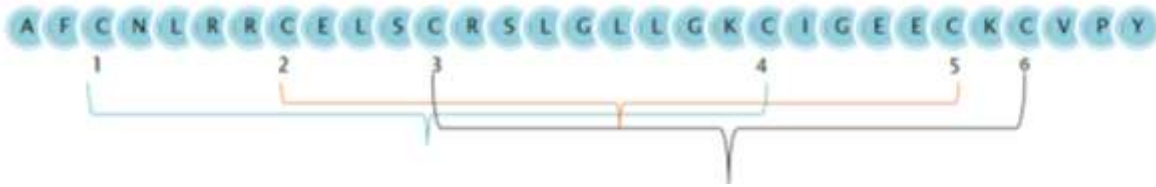


Imagen 1. Secuencia de aminoácidos de la tamapina, señalando sus tres puentes de disulfuro formados por sus seis cisteínas.

La masa experimental reportada de la r-tamapina usando el sistema de expresión heteróloga *rosetta gami/pET32a* es de 3,460.5 Da, con un rendimiento de 1.5 mg/L.²

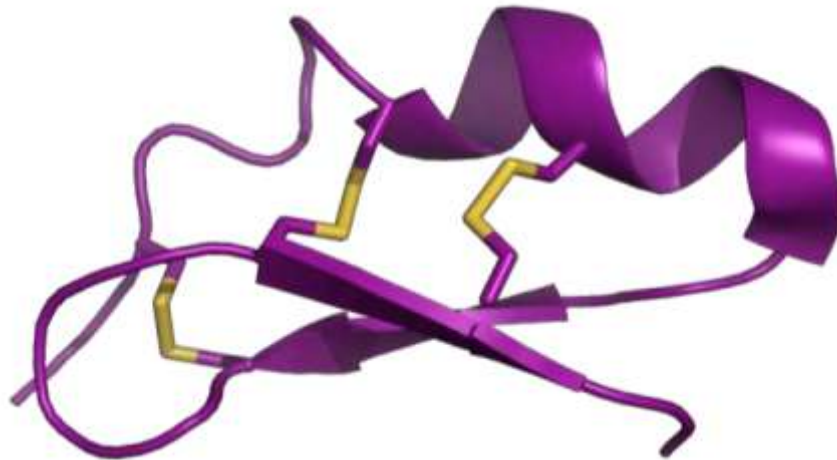


Imagen 2. Estructura tridimensional de r-tamapina. Tomada y modificada de referencia 3

5.1.2 Relación canales iónicos-toxinas

Los canales iónicos son proteínas que funcionan como poros, a través de los cuales los iones pueden atravesar la membrana plasmática impulsada por sus gradientes electroquímicos. Los canales iónicos permiten el paso de algunos iones como Na^+ , K^+ , Ca^+ y Cl^- a través de la membrana plasmática. Los poros formados por estos canales no siempre se encuentran abiertos, más bien pueden ser abiertos o cerrados selectivamente en respuesta a señales extracelulares,

permitiendo a la célula controlar el movimiento de iones a través de la membrana. Algunas toxinas al interactuar una con la otra, pueden modificar la permeabilidad de los canales iónicos de las células excitables y no excitables.^{5,7.}

Los canales de potasio se encuentran en la membrana celular y controlan el transporte de K^+ dentro y fuera de las células. Los canales de potasio de baja conductancia activados por calcio (KCa2) regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular. La principal interacción entre los canales KCa2 y la r-tamapina es entre el canal y la hélice alfa del péptido.³

5.2 Aminoácidos

Los aminoácidos son los constituyentes de las proteínas. Los aminoácidos poseen un grupo amino en el átomo de carbono en α con respecto al ácido carboxilo.

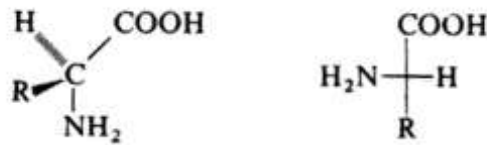


Imagen 3. Formula general de un α -aminoácido de configuración L.

El grupo R de la formula general de un aminoácido puede ser un hidrógeno, un grupo alifático de cadena lineal o ramificada, un anillo aromático o un anillo heterocíclico. Los aminoácidos procedentes de las proteínas poseen todos la configuración L.⁴

5.2.1 Proteínas

Las proteínas son polímeros naturales formados principalmente por la combinación de varios α -aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El primer paso para el estudio de una proteína es la determinación de la secuencia de aminoácidos, que constituyen la estructura primaria.⁴

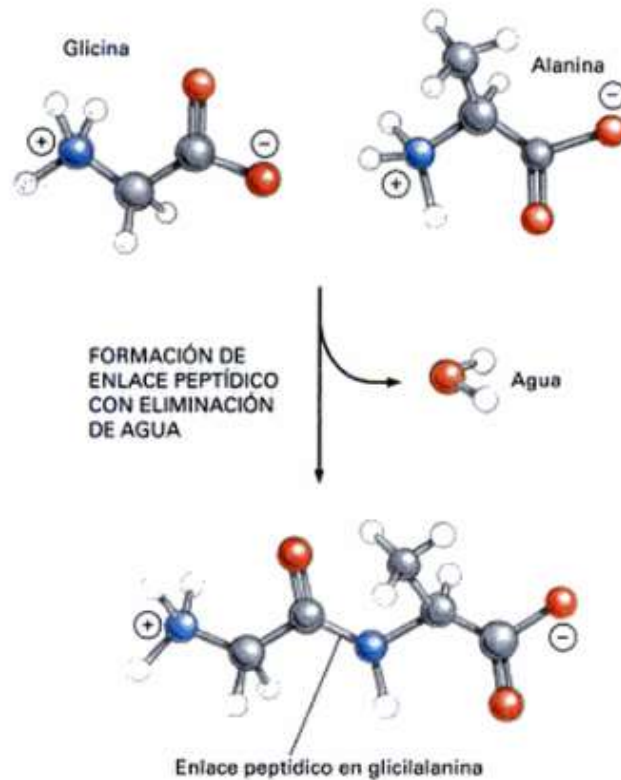


Imagen 4. Formación de enlace peptídico entre Glicina y Alanina. En la formación del enlace peptídico se observa la liberación de una molécula de agua. La cadena lateral de cada aminoácido se orienta dependiendo su polaridad, lo cual permite la formación de enlaces no covalentes ayudando a mantener la estructura de la proteína. Imagen modificada de referencia 6.

5.2.2. Organización de las proteínas

La secuencia de aminoácidos enlazados de una proteína se conoce como estructura primaria. La estructura secundaria incluye los patrones de plegamiento comunes en proteínas, los cuales son las hélices α y hojas β . Una hélice α está formada por un enlace de hidrógeno entre un grupo amino de un enlace peptídico y un ácido carboxílico que se encuentre a cuatro enlaces de distancia de la misma cadena, mientras que la hoja β consiste en la unión de diferentes cadenas polipeptídicas unidas mediante enlaces de hidrógeno, permitiendo la orientación de las cadenas laterales de cada aminoácido dependiendo de su polaridad. La estructura tridimensional de las proteínas está conformada por las hélices α , hojas

β , enlaces covalentes transversales como lo son los enlaces disulfuro y pliegues al azar que se formen entre el N-terminal y el C-terminal, cabe destacar que la función de la proteína es dependiente de la estructura tridimensional. Finalmente, la estructura cuaternaria es un complejo de más de una cadena polipeptídica.⁶

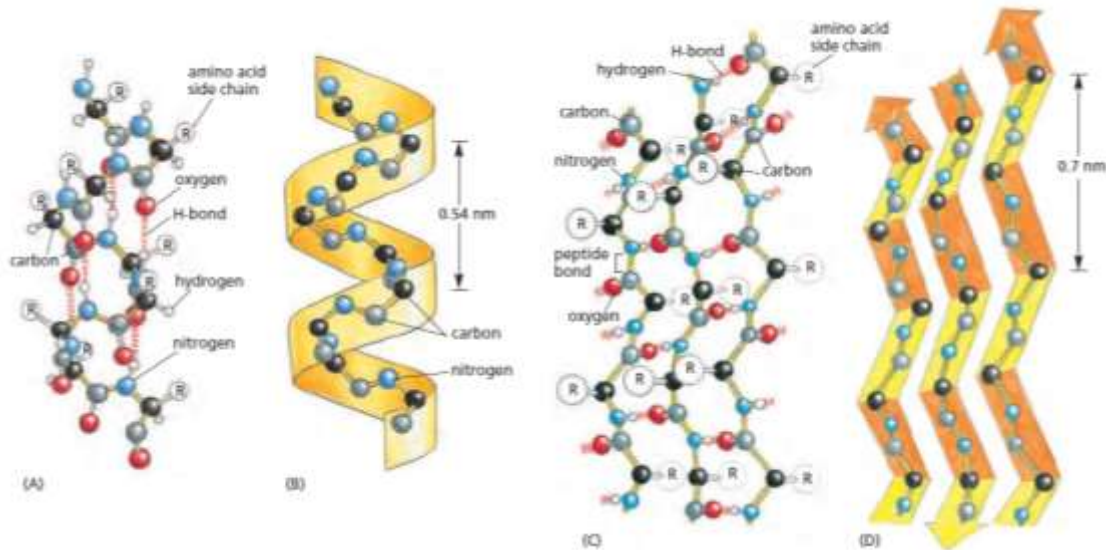


Imagen 5. Conformación regular del esqueleto poli péptido en la hélice α y la hoja β . (A y B) muestran que el N-H de cada enlace péptido está unido por el hidrogeno al C=O de un enlace péptido a cuatro enlaces péptidos de la misma cadena. La lamina β se muestra en C y D, en este caso las cadenas poli péptídicas se mantienen unidas mediante enlaces hidrogeno entre las uniones peptídicas en las diferentes cadenas, y las cadenas laterales de los aminoácidos en la cadena se proyectan alternativamente por arriba y por debajo el plano de la lámina. Imagen recopilada de referencia 6.

5.3 Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Los nucleótidos son moléculas compuestas por un grupo fosfato unido a un azúcar de desoxirribosa y una base nitrogenada que puede ser adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T). La estructura esquelética del ácido desoxirribonucleico (ADN) es la unión de varios nucleótidos por un enlace covalente entre los azúcares y fosfatos. Cada azúcar está unido a dos grupos fosfato mediante enlaces diferentes, haciendo posible que cada hebra de ADN tenga extremos diferentes entre sí. La polimerización de una cadena de ADN permite que las secuencias de nucleótidos se unan a una nueva cadena de ADN mediante

puentes de hidrogeno. El emparejamiento de hebras se realiza por medio de las bases nitrogenadas, ya que A de una hebra se empareja con T de otra hebra, mientras que el emparejamiento de G es con C, lo cual da como resultado una doble hélice de hebras complementarias anti -paralelas.

Para llevar a cabo la síntesis a partir de tecnología de ADN recombinante de una proteína es necesario conocer su secuencia de ADN, ya que este es el que almacena su información genética.

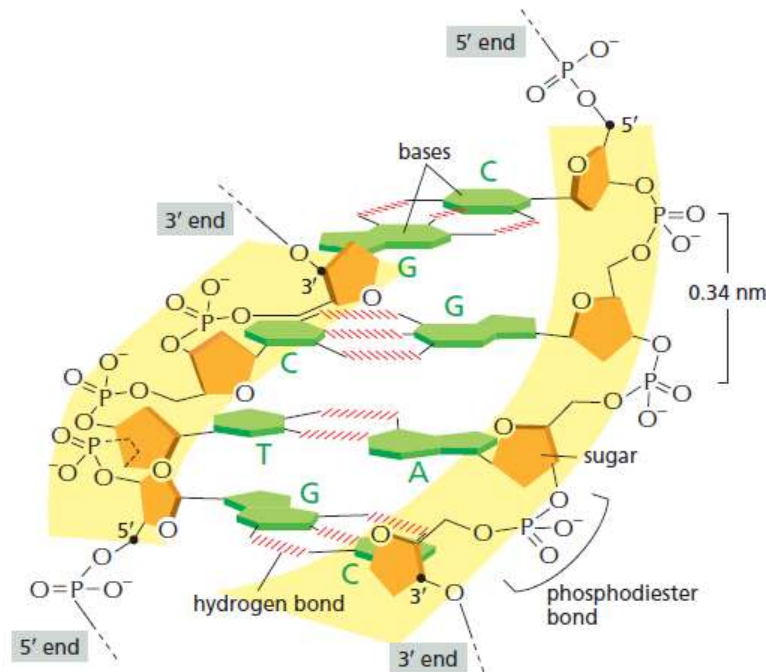


Imagen 6. Doble hélice del ADN. Fragmento corto de la doble hélice, mostrando cuatro pares de bases. Los nucleótidos están unidos covalentemente entre sí mediante enlaces fosfodiéster que se unen al grupo 3' hidroxilo (-OH) de un azúcar al grupo 5' hidroxilo del siguiente azúcar. Así, cada hebra de polinucleótido tienen una polaridad química, es decir, sus dos extremos son químicamente diferentes. Imagen recopilada de referencia 6.

5.3.1 Dogma central de biología molecular

El dogma central de biología molecular es el encargado de describir el mecanismo por el cual se sintetiza una proteína dentro de una célula, iniciando con la transcripción de ADN celular a ARN, y la traducción de ARN a proteína.

La transcripción es el proceso por el cual el ADN es copiado a una secuencia de nucleótidos de ácido ribonucleico (ARN). El ARN es un polímero lineal constituido por cuatro tipos de subunidades de nucleótidos unidos mediante un enlace fosfodiéster, las diferencias entre ARN y ADN es el tipo de nucleótido. El ARN contiene azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y, la base de T es sustituida por uracilo (U), conservándose G, C y T. El proceso de inicia con un fragmento de doble hélice de ADN como molde, el cual se abre y desenrolla para permitir el apareamiento de ribonucleicos a bases complementarias del ADN, proceso conocido como elongación. El ARN está formado por una cadena simple, esto se debe a que en la transcripción el ARN no se mantiene unida a la cadena molde de ADN, en su lugar el fragmento de ADN que ya ha sido transcrito vuelve a formar la hélice, concluyendo con el proceso de terminación que consiste en el desplazamiento del ARN de la cadena de ADN. El ARN es mucho más corto que el ADN debido a que únicamente transporta la información para la síntesis de una sola proteína.

Finalmente, la traducción es la conversión de información de ARN a proteína. Cada grupo de 3 nucleótidos consecutivos en el ARN se denomina codón y cada codón es específico a un aminoácido. El proceso de traducción se realiza gracias al ARN de transferencia y el ARN ribosomático. El primero se encarga de seleccionar los aminoácidos y retenerlos en el sitio adecuado en el ribosoma para su incorporación a la proteína, mientras el segundo forma el centro de los ribosomas, sobre los cuales es traducido el ARN mensajero en proteína.

5.4 Tecnología de ADN recombinante

La clonación de pequeños fragmentos de ADN que son insertados en cromosomas bacterianos, virales o plásmidos para después ser replicados en un huésped bacteriano se conoce como tecnología de ADN recombinante.

El procedimiento para llevar a cabo la clonación de un fragmento de ADN de cualquier organismo se divide en 4 pasos: 1. Aislamiento de fragmento de ADN de interés con sitios específicos, proceso realizado con endonucleasas de restricción,

2. Selección de una pequeña molécula de ADN capaz de replicarse de forma autónoma al cromosoma bacteriano y pueda transportar la información deseada para la clonación. La unión del fragmento a clonar y el transporte para clonación de forma covalente se realiza con ADN ligasa. 3. Traslado *in vitro* de ADN recombinante a célula huésped que proporcionan la maquinaria necesaria para la replicación de ADN, y, 4. Selección de las células huésped del ADN recombinante.⁵

Escherichia coli, fue el primer organismo utilizado por la tecnología de ADN recombinante, debido a esto, se conoce bien el metabolismo de su ADN. El uso de bacteriógrafos y plásmidos asociados de manera natural con *E. coli* como transportes de información genética están bien caracterizados y se conocen técnicas efectivas para el traspaso de ADN de una bacteria a otra.⁷

5.4.1 ADN recombinante

Las moléculas de ADN compuestas por segmento de ADN de interés y una molécula que es capaz de replicarse de manera autónoma en una célula huésped se denominan ADN recombinante. Las endonucleasas de restricción y el ADN ligasa son los encargados de producir ADN recombinante. Existen tres tipos de endonucleasas de restricción, designados como I, II y III. Las **endonucleasas de restricción de tipo II** cortan las secuencias de ADN en sitios específicos permitiendo que un pequeño fragmento de ADN que debe ser clonado pueda unirse a un vector de clonación mediante ADN ligasa. Las endonucleasas del tipo I cortan el ADN al azar, en lugares que pueden estar a 1 000 pares de bases o más de la secuencia de reconocimiento y el tipo III cortan el ADN a unos 25 pares de la secuencia de reconocimiento.

Las secuencias reconocidas por algunas endonucleasas de restricción tipo II tienen normalmente de cuatro a seis pares de bases y son palíndromas.

Tabla 1. Secuencias de reconocimiento para dos endonucleasas de restricción tipo II. Las flechas indican los enlaces fosfodiéster hidrolizados por cada endonucleasa de restricción.

Enzima	Secuencia de reconocimiento	Extremo generado
BamHI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \dots \text{GGATCC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CCTAGG} \dots 5' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesivo
KpnI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \dots \text{GGTACC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CCATGG} \dots 5' \\ \uparrow \end{array}$	Cohesivo
SmaI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \dots \text{CCCGGG} \dots 3' \\ 3' \dots \text{GGGCCC} \dots 3' \\ \uparrow \end{array}$	Romo

Las endonucleasas al reconocer y cortar secuencias específicas generan extremos cohesivos o extremos romos. Los fragmentos de ADN complementarios pueden ligarse para restaurar una cadena de ADN doble, mientras que los extremos no complementarios no suelen ligarse. ⁶

5.4.2. Vectores de clonación

Los vectores de clonación tienen como función propagar y replicar un gen de interés. Los plásmidos son secuencias de ADN circulares y de doble cadena que se separan del cromosoma bacteriano principal. Los plásmidos actúan como vectores de clonación, ya que permiten la replicación de un gen de interés en una célula huésped. Las principales características de los plásmidos son: 1. Origen de replicación: el cual permite la replicación de forma independiente al cromosoma de la célula huésped, 2. Secuencias únicas de reconocimiento para endonucleasas de restricción, permitiendo cortar el ADN plasmídico para insertar la secuencia del ADN foráneo, uniéndose mediante enlaces hidrogeno por sus extremos

adherentes en presencia de ADN ligasa y, 3. Gen de selección, el cual confiere resistencia a algún antibiótico permitiendo la identificación de células que contengan el plásmido.⁸

5.4.2.1 Diseño de vector pET3a-Tam

El plásmido contiene la secuencia promotora T7 RNA polimerasa, que dirige la transcripción del ADN insertado y un gen que confiere resistencia bacteriana a ampicilina, el cual es un marcador molecular para seleccionar las células que contienen el plásmido.⁹

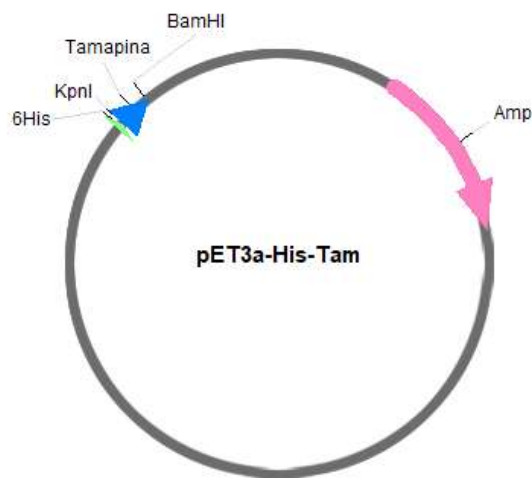


Imagen 7. Plásmido pET3a-Tam. La secuencia de r-tamapina se encuentra entre los sitios de corte enzimático KpnI y BamHI.

5.5 Proteína recombinante

Una proteína obtenida a partir de una expresión de genes clonados se conoce como proteína recombinante. Para llevar a cabo la expresión de un gen en *E. coli*, es necesario que el vector de ADN cuente con secuencias reguladoras bacterianas para su transcripción y traducción.⁶

5.5.1 Diseño de proteína de fusión

La proteína de fusión obtenida de pET32a-Tam, cuenta con una proteína chaperona de tiorredoxina, la cual ayuda a solubilizar a la proteína de fusión y facilita el plegamiento adecuado de las proteínas unidas a ella, una etiqueta de histidinas que facilita la purificación por afinidad, un sitio de corte específico con bromuro de cianógeno y la secuencia de interés de la r-tamapina.¹⁰

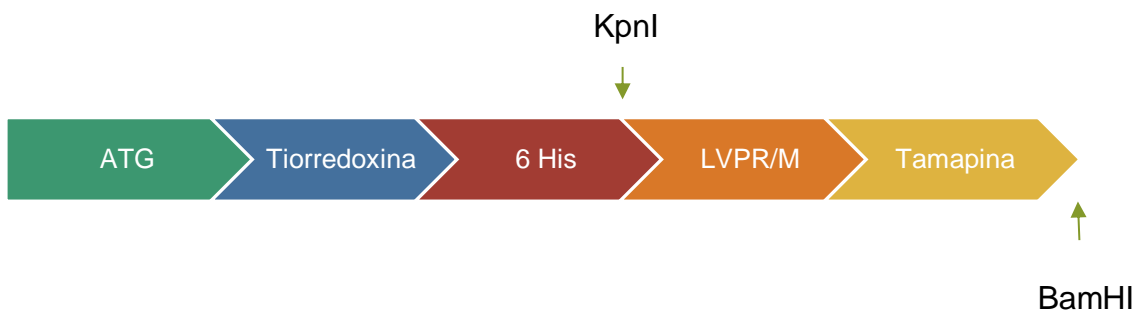


Imagen 8. Proteína de fusión obtenida de pET32-Tam. La secuencia de ADN de la r-tamapina dentro del plásmido se encuentra entre los sitios de corte enzimático KpnI y BamHI, lo que permite que pET32a-Tam sea el ADN donador de la secuencia de r-tamapina para pET3a-Tam.

En el nuevo diseño en pET3a-Tam, la proteína de fusión obtenida no cuenta con una proteína chaperona que ayude a solubilizar y plegar de forma adecuada a la r-tamapina, únicamente cuenta con una etiqueta de seis histidinas, el sitio de corte con CNBr y la secuencia de la r-tamapina.

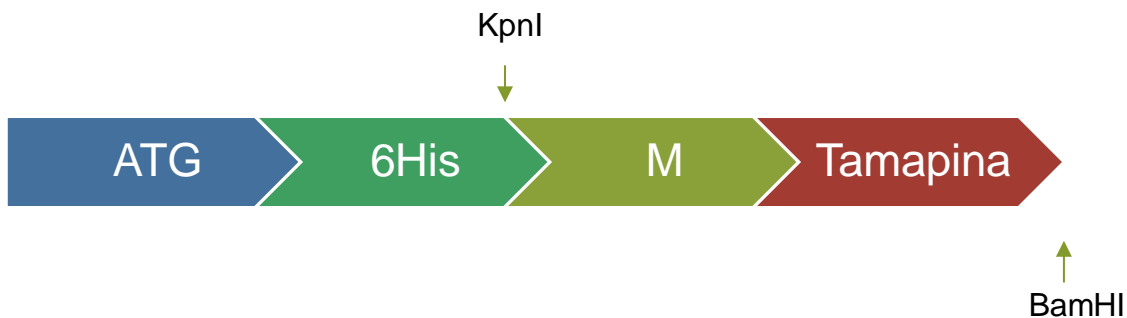


Imagen 9. Proteína de fusión de la expresión en pET3a-Tam.

El peso teórico de la proteína de fusión es de 5401.41 kDa.

5.6 Regulación de expresión de proteína

Para la expresión de una proteína recombinante con el sistema pET3a es necesario que la célula huésped de *E. coli* sea un lisógeno del bacteriógrafo DE3, el cual porta un fragmento de ADN que contiene el gen *lacI*, el promotor *lacUV5* y el gen para la ARN polimerasa. El promotor *lacUV5* es el encargado de dirigir la transcripción del gen de la ARN polimerasa, que es inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Por lo tanto, la adición de IPTG a un cultivo de crecimiento del bacteriano induce la ARN polimerasa T7, que a su vez transcribe el ADN objetivo del plásmido,

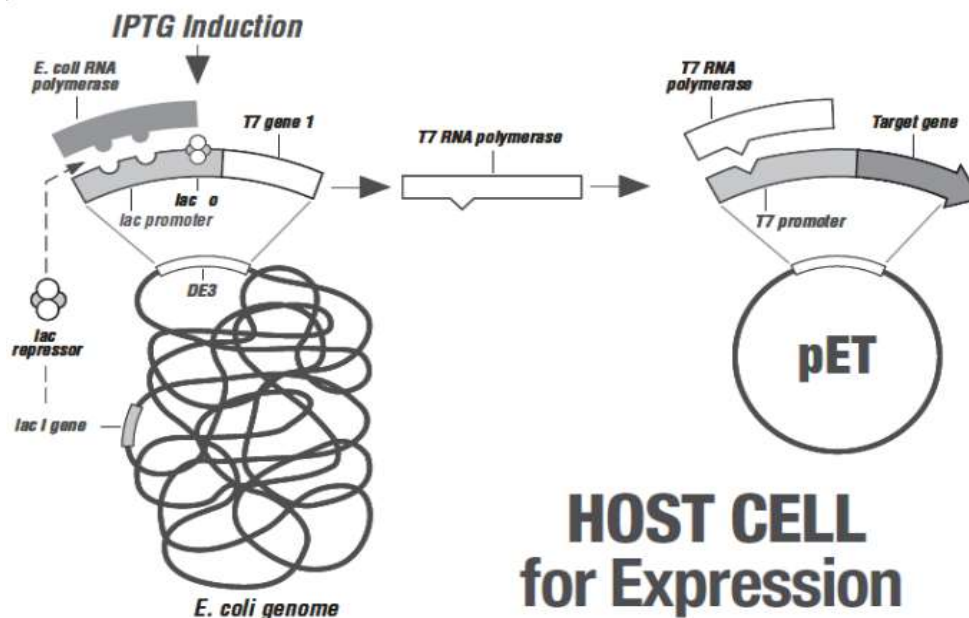


Imagen 10. Representación esquemática de inducción con IPTG de ARN polimerasa T7, la cual es controlada por el represor *lac* en la célula lisógena huésped, que a su vez transcribe al ADN objetivo en el plásmido. Imagen tomada de referencia 11.

5.7 Plegamiento de una proteína.

La formación de elementos estructurales secundarios (hélices α y hojas β) ayuda a dar a la proteína una forma tridimensional definida. De manera ideal esto puede ocurrir de forma espontánea, ya que la secuencia de aminoácidos determina la estructura final; sin embargo, no siempre ocurre así. Existen diferentes estados desplegados de las proteínas que corresponden a amplias distribuciones de diferentes conformaciones.

Cuando una proteína es sometida a una serie de pasos para ser purificada, esta puede desnaturalizarse. La mayoría de proteínas en estado desplegado carecen de regiones significativas de estructuras secundarias o terciarias regulares.

Existen dos modelos que describen cómo se forman interacciones de estructura secundaria y terciaria en una proteína desnaturalizada. El primero de ellos se conoce como **proceso de colisión**, el cual describe que los elementos de la estructura secundaria de la proteína se forman rápidamente, y luego se ensamblan para formar a la proteína nativa. Es importante resaltar que este modelo describe a las proteínas que únicamente cuentan con elementos estructurales secundarios, pero no tienen estructura terciaria compacta final. Por otro lado, las proteínas que cuentan con hélices α y/o hojas β , siguen el modelo de **condensación de nucleación**; el cual describe que varios segmentos distantes de la cadena polipeptídica se unen sin formar una estructura secundaria, se estabilizan en su lugar por interacciones de cadena lateral y, luego se reorganizan localmente para formar la estructura secundaria y terciaria nativa.

El plegamiento de una proteína se logra con la formación de estructuras intermediarias transitoriamente estables, aunque solo de forma transitoria.

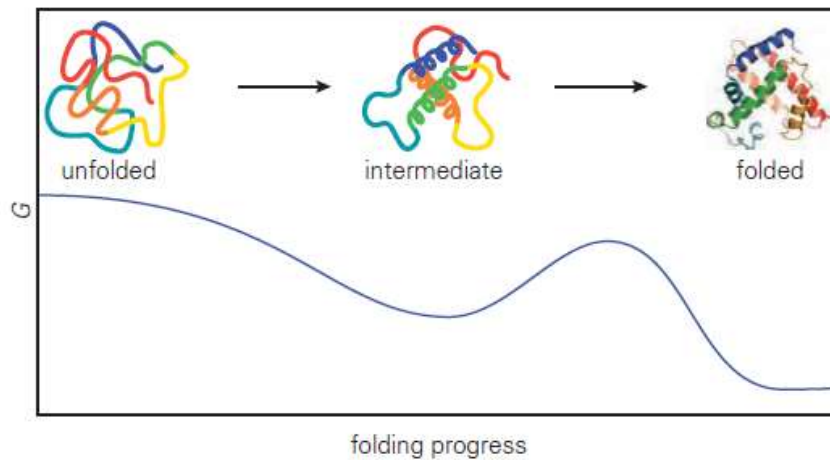


Imagen 11. Conversión de la estructura desplegada de una proteína a la estructura nativa. Se muestra el cambio de energía libre en función de la extensión del plegado. El plegado procede a través de un intermedio que corresponde a un mínimo local de energía libre. Imagen tomada y modificada de referencia 12.

La presencia de dichos intermediarios indica que hay probabilidad de formación de una aglomeración macromolecular provocando que el poli-péptido encuentre otras proteínas antes de lograr plegarse de forma adecuada, ya que existe un mínimo local de energía libre a lo largo del proceso de plegamiento, con una barrera que debe superarse antes de que se complete el plegado.¹²

5.8 Transformación

El proceso de transformación consiste en la transferencia de información genética usando ADN aislado previamente. El ADN es introducido a una cepa receptora de células, las cuales se encargan de transferir dicha información de una célula a otra. Comúnmente se utilizan plásmidos como vectores de clonación los cuales permiten la amplificación de fragmentos de ADN insertados. Las células bacterianas capaces de transformarse reciben el nombre de células competentes.¹²

5.9 Corte de un polipéptido con bromuro de cianógeno (CNBr)

El CNBr ataca selectivamente los residuos de metionina y produce fragmentos de peptidil-homoserina-lactona y aminoacil péptido. Dado que el CNBr reacciona con la metionina en condiciones específicas y que el reactivo es muy adecuado para la escisión no enzimática del enlace péptido metionilo. Este método de digestión química es aplicado con éxito para promover el corte del enlace peptídico en un residuo específico.¹³

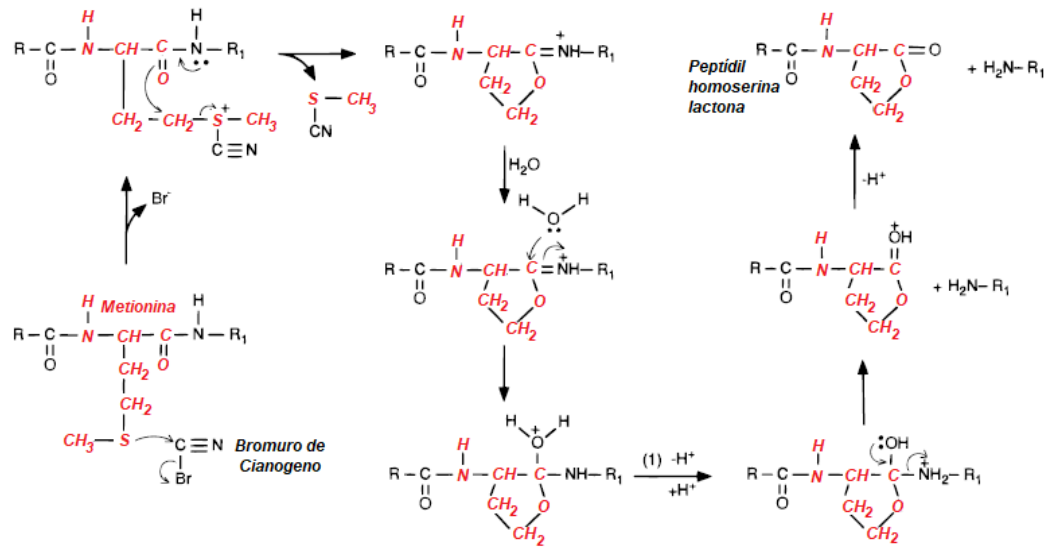


Imagen 12. Mecanismo de reacción propuesto de bromuro de cianógeno con Metionina. El CNBr reacciona específicamente con los residuos de metionina, generando el corte del enlace peptídico en su C-terminal. El residuo C-terminal forma una estructura cíclica conocida como peptidil homoserina lactona.¹³ Imagen tomada y modificada de referencia 14.

5.10 Purificación de proteínas recombinantes

Para el estudio estructural y funcional de una proteína es necesario aislarla en un estado relativamente puro. La purificación de una proteína se realiza comúnmente siguiendo una serie de pasos, los cuales aprovechan las diferentes propiedades de las proteínas que son separadas.¹⁵

5.10.1 Ondas sonoras de alta frecuencia

El rompimiento de células de un modo controlado es la primera etapa en la purificación de proteínas. Es un procedimiento mecánico suave, denominado de homogenización, de modo que las células puedan romperse y liberen su contenido. Se utilizan condiciones desnaturalizantes que solubilizan a la proteína de fusión que permita separar por centrifugación el homogenizado en dos fracciones, soluble e insoluble.⁸

5.10.2 Cromatografía de afinidad metal-quelato.

La cromatografía de afinidad metal-quelato es un tipo de cromatografía de adsorción, en la cual los residuos de poli-histidina en la proteína de fusión a purificar se unen específicamente y reversiblemente por Ni^{2+} inmovilizado en una matriz. Esta técnica involucra la formación de un complejo reversible entre el anillo de imidazol de la histidina y el metal de transición; es decir, la etiqueta proteica interactúa con el Ni^{2+} inmovilizado y permanece unida a él. Posteriormente del lavado del material de la matriz, la desorción de la proteína de fusión se realiza generalmente mediante un método de elución con un gradiente de imidazol libre.^{16-17.}

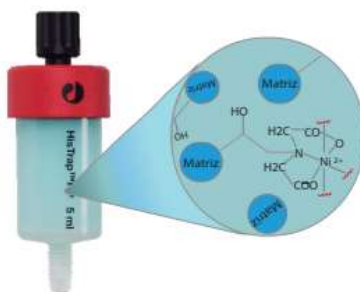


Imagen 13. Columna de afinidad de iones metálicos inmovilizados. Los iones de Ni^{2+} son inmovilizados en una resina quelante, que luego se une a la etiqueta de histidinas, permitiendo la separación de proteínas contaminantes por afinidad.

5.10.3 Desalación por diálisis

La diálisis es un método de filtración molecular, en la que una solución acuosa que contiene macromoléculas y moléculas muy pequeñas se coloca en el interior de una bolsa de colodión, que se encuentra a su vez sumergida en un gran volumen de amortiguador dado. Las moléculas pequeñas del soluto pasan libremente a través de la membrana, hasta alcanzar el equilibrio de las concentraciones en el interior y exterior de la membrana. Dependiendo del tamaño de poro de la membrana puede utilizarse para eliminación de sales en preparaciones para cromatografía.¹⁸

Además, este paso de purificación ayuda a evitar la formación de agregados proteicos de la r-tamapina, previniendo su precipitación.

5.8.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es una técnica analítica de separación. Como en todos los tipos de cromatografía la muestra se disuelve en una fase móvil, la cual se hace pasar por una fase estacionaria inmisible fija en la columna. El tipo de columna de cromatografía utilizada para la purificación de una proteína de interés que se encuentra en una mezcla es de fase reversa, ya que las proteínas son retenidas por una matriz no polar y su elución se lleva a cabo con una fase móvil polar. Con frecuencia se utiliza una mezcla de disolventes formada por agua y un solvente orgánico polar, ya que el factor de retención es fácilmente manipulable variando la concentración de agua. Finalmente, la fase móvil después de pasar por la fase estacionaria pasa por un detector que permite observar el tiempo de retención del analito.¹⁹

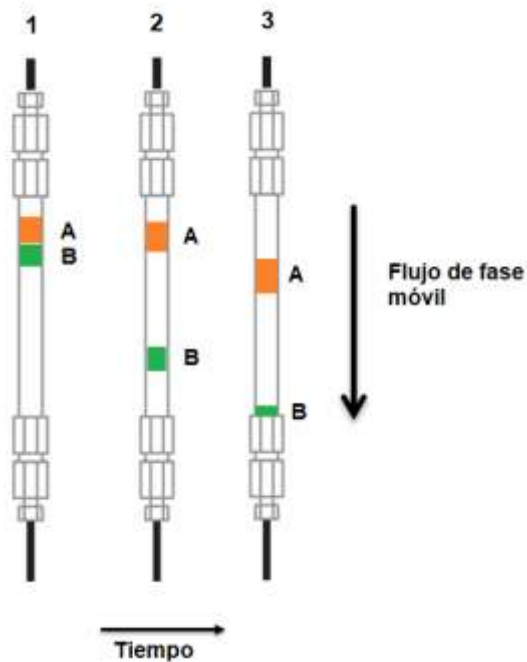


Imagen 14. Representación esquemática de proceso de separación de una mezcla en solución en una columna de cromatografía. Una mezcla de componentes A y B, es colocada en una columna de cromatografía, la cual es bombardeada por el flujo de la fase móvil. De acuerdo a que cada componente de la mezcla tiene una capacidad diferente de unirse a la matriz su tiempo de retención será diferente, provocando una separación eficiente de A y B.

5.11 Experimentos de caracterización

La caracterización de una proteína se realiza comúnmente por dos métodos espectroscópicos: resonancia magnética nuclear (RMN) y dicroísmo circular (DC).

5.11.1 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia de Resonancia magnética nuclear ha sido utilizada para determinar la estructura, movimientos, interacciones y reacciones, de moléculas.

La RMN se basa en medir la absorción de la radiación de radiofrecuencia por parte del espín nuclear en un campo magnético.

La teoría de RMN se fundamenta en un núcleo con la propiedad de espín, el cual tiene una cantidad de movimiento angular o momento angular, p , que es descrito por su número cuántico de espín, I .

Cuando un núcleo cargado gira, crea un campo magnético; generando dos niveles de energía. El momento magnético resultante, μ , se orienta a lo largo del eje del espín y es proporcional a la cantidad de movimiento p . Ecuación [1]:

$$\mu = \gamma p \dots [1]$$

Donde la constante de proporcionalidad γ es la relación giromagnética que es diferente para cada núcleo. El componente máximo observable de esta unidad de movimiento angular está cuantizada y debe ser múltiplo entero o semientero de $h/2\pi$, donde h es la constante de Plank.

Cuando un núcleo con número cuántico de espín diferente de cero se somete a un campo magnético externo B_0 , su momento magnético se orienta en una de las dos componentes en Z posibles respecto al campo, en función a su estado cuántico magnético. La energía potencial E de un núcleo en estas dos componentes en Z ésta definida por la Ecuación [2]:

$$E = -\frac{\gamma m_z h}{2\pi} B_0$$

La menor energía cuando $m = +\frac{1}{2}$ por: Ecuación [4].

$$E = -\frac{\gamma h}{4\pi} B_0$$

Mientras que la mayor energía para estado con $m = -\frac{1}{2}$ por: Ecuación [5]

$$E = \frac{\gamma h}{4\pi} B_0$$

Por consiguiente, la diferencia de energía ΔE , entre estos dos estados es: Ecuación [3]

$$\Delta E = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0$$

El espacio de los dos niveles de energía, ΔE , depende del tamaño del momento magnético nuclear, μ , y del campo magnético, B_0 . Por lo tanto, ΔE puede medirse utilizando radiación electromagnética para inducir transiciones entre los dos niveles de energía.

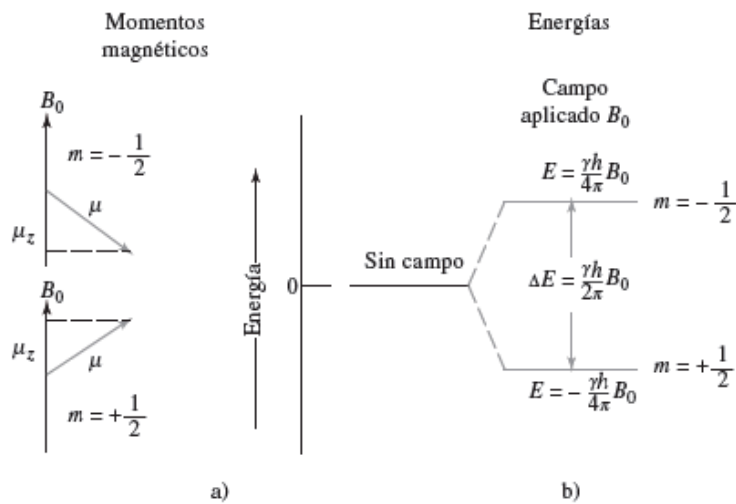


Imagen 15. Momentos magnéticos y niveles de energía para un núcleo con número cuántico de espín de $\frac{1}{2}$. Imagen modificada de referencia: 18

5.11.1.1 Desplazamiento químico

El desplazamiento químico es el campo secundario generado por la densidad electrónica alrededor de los núcleos que son sometidos a un campo magnético. Por lo general, estos campos se oponen al campo aplicado, provocando que los núcleos estén expuestos a un campo magnético efectivo que es casi siempre menor que el campo externo. La densidad electrónica depende de la estructura de cada compuesto.

La magnitud del campo que se genera internamente es directamente proporcional al campo externo aplicado, por lo que se puede describir:

Ecuación [4]:

$$B_0 = B_{apl} = \sigma B_{apl} = B_{apl}(1 - \sigma)$$

Donde B_{apl} es la intensidad de campo aplicado, B_0 es la magnitud del campo resultante, que determinan el comportamiento de resonancia de los núcleos y σ es la constante de apantallamiento del espín nuclear. La σ depende de la estructura del compuesto que contiene el núcleo.

Para obtener ecuación de condición de resonancia en términos de frecuencia se sustituye la ecuación [4] en la ecuación [5] de la frecuencia de la radiación necesaria para producir la transición de espín.

Ecuación [5]:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Ecuación [6]:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0(1 - \sigma)}{2\pi}$$

Para determinar la magnitud de un cambio en la intensidad del campo magnético es conveniente establecer la posición de las resonancias respecto a la resonancia de una sustancia patrón. El patrón interno que se utiliza depende del núcleo que se estudia y el solvente empleado.

A fin de expresar el desplazamiento químico de un núcleo en una muestra respecto a la muestra patrón en términos cuantitativos cuando se hacen mediciones con una intensidad de campo constante B_0 , se aplica la ecuación [6] a la resonancia de la muestra y del patrón:

Ecuación [7] y [8]:

$$\nu_s = k(1 - \sigma_s)$$

$$v_r = k(1 - \sigma_r)$$

Donde k es $\frac{\gamma B_0}{2\pi}$, r y s se refiere a la muestra de referencia y a la muestra del analito, respectivamente.

Si se resta la ecuación [8] de la [7] se obtiene:

Ecuación [9]

$$v_r - v_s = k(\sigma_r - \sigma_s)$$

Si se divide la ecuación [9] entre la ecuación [8] a fin de eliminar k se obtiene:

Ecuación [10]

$$\frac{v_r - v_s}{v_r} = \frac{(\sigma_r - \sigma_s)}{(1 - \sigma_r)}$$

Dado que σ_r es mucho menor que 1, se elimina el término de la ecuación, quedando:

Ecuación [11]:

$$\frac{v_r - v_s}{v_r} = (\sigma_r - \sigma_s)$$

Entonces se define el desplazamiento químico δ como:

Ecuación [12]:

$$\delta = (\sigma_r - \sigma_s) \times 10^6$$

El δ es adimensional y se expresa el desplazamiento relativo en partes por millón. La ventaja de usar estos parámetros es que δ tendrá el mismo valor independientemente de que el instrumento utilizado.^{19-20.}

5.11.2 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica. Ésta mide la absorción diferencial de luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda. La base física de la técnica consiste en observar la interacción de luz polarizada con moléculas ópticamente activas. El dicroísmo circular es sumamente útil en el estudio estructural de proteínas, ácidos nucleicos y nucleoproteínas.

Cuando un rayo de luz interacciona con un objeto, su vector eléctrico interacciona con los electrones que componen dicho objeto. Dicha interacción tiene el efecto de disminuir la velocidad de propagación y la amplitud del vector eléctrico. La disminución de la velocidad de propagación se llama refracción, la cual viene descrita por el índice de refracción, n . La disminución de amplitud del vector eléctrico se denomina absorción, la cual viene descrita por el coeficiente de extinción molar, ϵ . Tanto n como ϵ dependen de la longitud de onda dando información sobre la estructura electrónica y la geometría de las moléculas.

Las moléculas que son ópticamente activas se caracterizan por tener índices distintos de refracción, n_D y n_I , y coeficientes de extinción molar ϵ_D y ϵ_I , para la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda, respectivamente. Una molécula es ópticamente activa cuando su imagen especular no se puede superponer a su imagen especular.

La interacción de una molécula ópticamente activa con una mezcla de luz polarizada da como resultado que los índices de refracción circularmente a la derecha e izquierda sean diferentes, provocando absorción diferencial de la luz polarizada. La diferencia de absorción suele expresarse en términos de coeficiente de extinción para la luz de la derecha y de la izquierda, ϵ_D y ϵ_I ; es decir: $\epsilon_I - \epsilon_D = \Delta\epsilon$

Donde $\Delta\varepsilon$ se llama dicroísmo circular. Experimentalmente, se suele medir $\Delta\varepsilon$, pero por razones históricas se representa gráficamente la elipticidad, θ . θ se relaciona con $\Delta\varepsilon$ por la ecuación: $\theta = 3300\Delta\varepsilon$

5.11.2.1 Aplicación de análisis de Dicroísmo Circular a la estructura de proteínas.

La estructura secundaria de las proteínas se determina empíricamente con curvas de dicroísmo circular para polipéptidos modelo. Después se intenta construir una curva, suma de esas curvas estándares sencillas que coincida al máximo para la muestra.

Para las proteínas, los principales estándares son tres formas de poli-L-lisina: hélice α , forma β y el ovillo estadístico. Si se supone que no existe ninguna otra conformación posible y que las cadenas laterales de los aminoácidos no influyen en los espectros, se puede calcular una curva teórica para una proteína que contenga una mezcla de las tres conformaciones por simple adición gráfica.¹⁸

1. Diseño experimental

Se diseñó y construyó el vector de clonación pET3a-Tam para la expresión de r-tamapina. Posteriormente se optimizaron las condiciones de expresión en *E. coli*, para caracterizar y cuantificar la proteína.

6.1 Construcción de vector pET3a-Tam

El vector pET3a-Tam tiene como vector aceptor a pET3a, el cual es una modificación del vector comercial con una etiqueta de histidina antes del sitio de corte enzimático KpnI; además, cuenta con un sitio de corte posterior para BamHI. Como vector donador se utilizó el vector pET32a-Tam el cual tiene la secuencia del gen de r-tamapina entre los sitios de corte enzimático KpnI y BamHI (New England BioLabs), lo cual permite realizar una digestión con dichas enzimas en ambos vectores para obtener sitios coherentes en el vector pET3a y el fragmento generado de pET32a-TAM. Las bandas de ambas secuencias de ADN se purifican de acuerdo al equipo QIAquick de extracción de gel (**ANEXO V**) para proceder a realizar la respectiva reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (New England BioLabs).

La mezcla de reacción se utiliza para transformar en células DH5 α (**ANEXO VIII**), para poder identificar clonas positivas y realizar purificación de ADN plasmídico con el equipo DNA miniprep (**ANEXO VI**). Se realiza un ensayo enzimático para verificar que el inserto de r-tamapina se encuentre en el vector pET3a se realiza una posterior purificación de plásmido usando equipo “QIAprep spin miniprep” y una micro centrifuga (**ANEXO VII**) y finalmente se realiza un análisis de secuenciación.

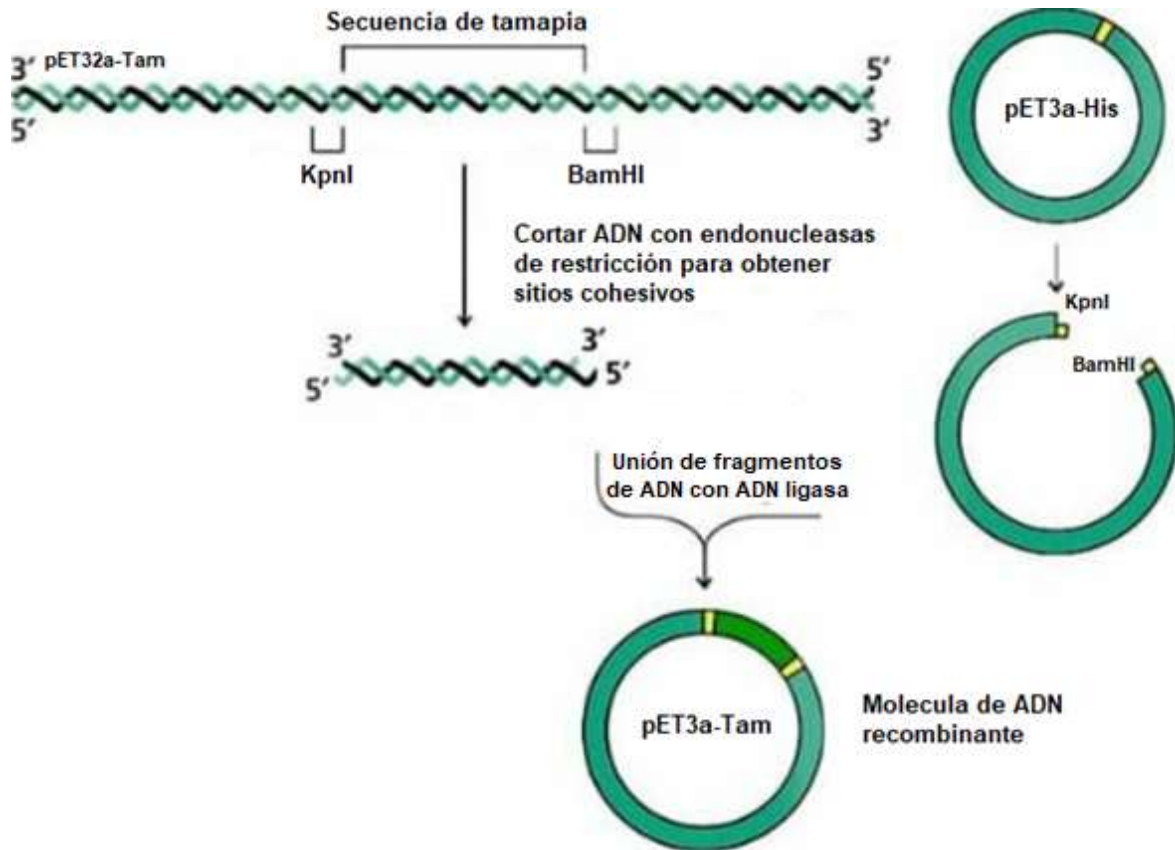


Imagen 16. Representación esquemática de construcción de pET3a-Tam.

Las enzimas de restricción BamHI y KpnI, hacen un corte cada una dentro del plásmido bacteriano pET3a; para extraer el gen de la proteína r-tamapina de pET32a-TAM. Como se utilizan las mismas enzimas de restricción en ambos fragmentos de ADN, se tienen los sitios adherentes requeridos, por lo cual las dos moléculas de ADN en presencia de ADN ligasa se unen en forma covalente.

Imagen recopilada y modificada de referencia: 21

6.2 Optimización de expresión de proteína recombinante

Para la expresión de la proteína es necesario establecer las condiciones óptimas para su biosíntesis bacteriana; dichas condiciones son: selección de cepa de expresión, tiempo de inducción con IPTG y concentración de IPTG.

Se utiliza medio Luria-Bertani (LB) en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, debido a que permite un rápido crecimiento de las bacterias. Este medio contiene peptona de caseína y extracto de levadura, las cuales proporcionan al

medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de los microorganismos; el cloruro de sodio contenido en el medio permite mantener el equilibrio osmótico.

Para llevar a cabo la expresión de una proteína recombinante en el sistema pET3a en medio LB, se debe transformar en una cepa que cuente con el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control de lacUV5, es decir, que es adecuada para la expresión de promotores T7.

El **protocolo general para inocular** a las bacterias inicia picando una colonia aislada transformada en medio LB con el antibiótico correspondiente y se incuba a 37°C, durante 16 h. Bajo una relación 1:20 preinóculo-medio, se inocula el medio LB con el respectivo antibiótico y se monitorea el crecimiento bacteriano hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 ± 0.1 a 600 nm; se induce con una concentración determinada de IPTG y se toman las muestras deseadas después de inducción.

En la selección de cepa de expresión se induce con una concentración de IPTG de 0.50 mM, a 30°C y 12 h después de la inducción; se toman muestras para monitorear la producción de proteína de fusión. El mismo procedimiento se realiza en cada una de las cepas sometidas a estudio.

Para optimizar el tiempo de inducción con IPTG se debe realizar una cinética de expresión. Con la cepa seleccionada, a una concentración de IPTG de 0.50 mM, a 30°C. Para ello se toman muestras con los tiempos de muestreo a 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h y 24 h después de inducción.

Una vez establecida la cepa y el tiempo de inducción, se determina finalmente la concentración de IPTG para la producción de la proteína, lo cual se realiza con las concentraciones de 0.25, 0.50 y 1.0 mM de IPTG.

Debido a que la proteína de fusión se encuentra en los cuerpos de inclusión debe realizarse una lisis desnaturalizante apropiada para solubilizar a la proteína de interés del pellet. Una vez establecidas las condiciones adecuadas de producción

de la proteína, es necesario probar diferentes amortiguadores de lisis y así encontrar las condiciones ideales para dicho fin.

Diagrama 1. Preparación de muestras de fracción soluble para electroforesis SDS-PAGE.

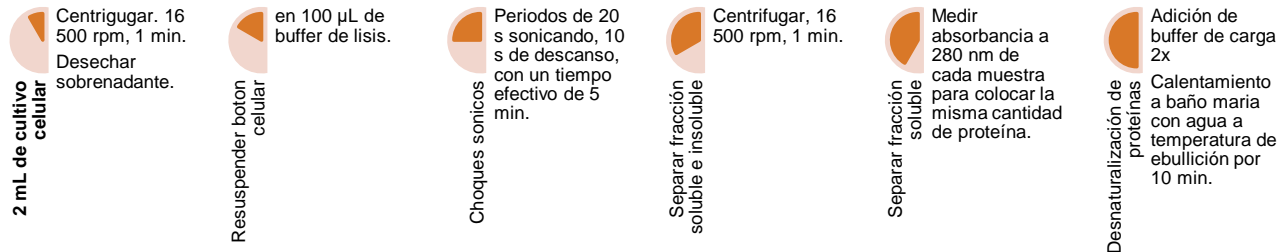
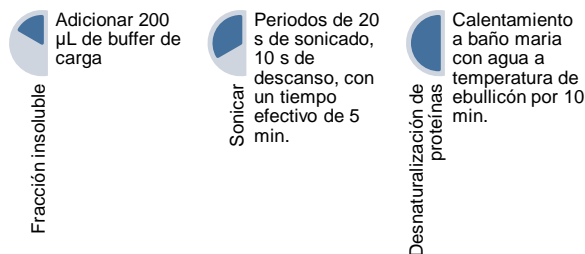


Diagrama 2. Preparación celular de fracción insoluble para electroforesis SDS- PAGE.



6.3 Purificación de proteína recombinante

Una vez establecidas las condiciones de cepa de expresión, tiempo de inducción, concentración de IPTG y buffer de lisis para producción de proteína de fusión se realiza un escalamiento proporcional.

6.3.1 Expresión

Es necesario transformar con pET3a-TAM las células rosetta DE3 para llevar a cabo la expresión de la proteína. Se prepara un preinóculo de medio LB con 100

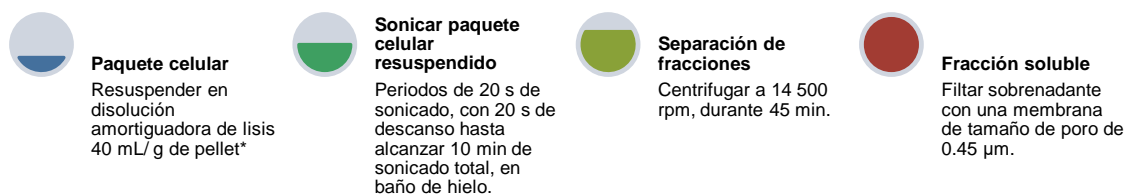
$\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y $36 \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol y se adiciona una colonia aislada transformada. Se deja en incubación durante 16h a 37°C . Se toman 50 mL de preinóculo para inocular 1.0 L de medio LB con los antibióticos correspondientes y se incuba nuevamente a 37°C , hasta alcanzar la densidad óptica de 0.6 ± 0.1 a 600 nm. Una vez alcanzada dicha densidad óptica, se adiciona IPTG para inducir la producción de la proteína (concentración final 0.25 mM); se deja incubando a 30°C durante 8 h. Una vez terminado dicho tiempo, el cultivo celular se centrifuga a $6\ 500 \times G$ durante 5 min con el fin de recuperar el botón pellet.

Si no se realiza una lisis celular de forma inmediata del pellet, es necesario pesarlo, resuspenderlo en amortiguador de lisis con una relación 40mL/1g de pellet y congelarlo.

6.3.2 Lisis desnaturalizante

La lisis desnaturalizante consiste en homogenizar a las células en una solución amortiguada isotónica, lo cual previene la rotura de las vesículas de membrana por osmosis y procede al rompimiento de células por ondas sonoras de alta frecuencia. Finalmente, el fraccionamiento del contenido de una célula se realiza mediante centrifugación. El homogenizado celular se centrifuga a altas velocidades para separar la fracción soluble de la insoluble.

Diagrama 3. Procedimiento para realizar lisis desnaturalizante.



*Si el paquete celular se congela con el amortiguador de lisis, es necesario descongelarlo una hora antes de sonicar en un baño de agua-hielo.

6.3.3 Cromatografía de afinidad metal-quelato

El sobrenadante se hace pasar por una columna de afinidad Hi-Trap previamente cargada con iones Ni^{2+} ; se realiza un lavado con cinco volúmenes de columna con amortiguador de lisis; se eluyen proteínas poco afines a la columna con 50 mM imidazol-amortiguador de lisis; Finalmente, se eluye la proteína de fusión con 5 volúmenes de columna con la solución 300 mM imidazol-amortiguador de lisis.

6.3.4 Desalación por diálisis.

El eluato que contiene proteína de fusión se dializa con una membrana, sumergida en el amortiguador Tris-HCl pH 9, bajo agitación durante 30 min. Después de la desalación, se purifica la proteína de fusión con una columna de extracción en fase sólida y se liofiliza la muestra eluida.

6.3.5 Purificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia de fase reversa

La proteína de fusión liofilizada se disuelve en la solución de 15% acetonitrilo-agua con 0.05% de ácido trifluoroacético, para ser purificada por cromatografía de líquidos en fase reversa, en una columna Phenomenex Júpiter Proteo C12, con un tamaño de partícula de 4 μm y poro de 90 Å. Se utiliza como eluyente un gradiente de acetonitrilo y agua, ambos disolventes con 0.05% v/v de ácido trifluoroacético. Se colecta el pico más grande, se liofiliza y se realiza un espectro de RMN para caracterizarla.

6.4.6 Corte con bromuro de cianógeno

Para obtener la proteína r-tamapina sin la etiqueta de histidinas, se lleva a cabo un corte químico en la proteína de fusión en su N-terminal con bromuro de cianógeno. El corte se realiza disolviendo la proteína de fusión en una mezcla H_2O -TFA 1:1, hasta alcanzar la concentración de proteína de 10 mg/mL. Por cada metionina presente en la proteína se agregan 140 equivalentes de CNBr.

La reacción se lleva a cabo bajo condiciones de atmósfera de nitrógeno; para ello, el oxígeno presente es desplazado antes de llevar a cabo la reacción. Debido a que el CNBr es fotosensible, el segundo cuidado durante la reacción es mantenerla lejos de la luz visible. Una vez adicionado el CNBr a la mezcla de reacción, se deja en agitación durante 48 h. Terminada la reacción de corte, a la mezcla de reacción se le añade agua hasta alcanzar pH 2 con agua destilada, esto con el fin de preparar la mezcla para su purificación con una columna de extracción de fase sólida. Finalmente, las fracciones se liofilizan, se purifican por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, se liofilizan nuevamente y se caracterizan por RMN.

5. Resultados y Discusión

7.1 Construcción de pET3a-Tam

Se realizó una transformación en células DH5 α con la mezcla de reacción de ligación (pET3a y fragmento de tamapina, en presencia de ADN ligasa) y se seleccionaron 10 clonas positivas para la extracción de plásmido de cada una de ellas con el equipo DNA miniprep de (**ANEXO VI**). Se seleccionó la endonucleasa BglI para realizar un ensayo enzimático, ya que realiza 5 y 4 cortes, en pET3a y pET3a-Tam respectivamente.

Tabla 2. Peso inicial de plásmidos pET3a y pET3a-Tam y pesos de fragmentos generados después de digestión enzimática con BglI.

Plásmido	pET3a	pET3a-Tam
Peso inicial (bp)	4796	4751
Fragmentos generados	3	4
Peso de cada fragmento (bp)	2319 2243 234	2319 1436 762 234

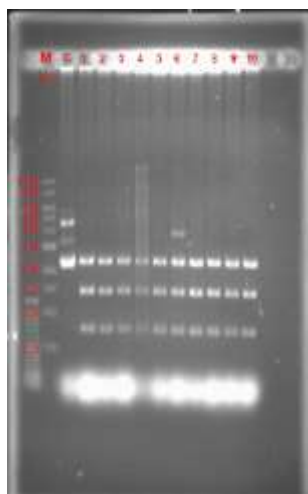


Imagen 17. Gel de agarosa 1.5%. Ensayo de restricción con BglI en pET3a y pET3a-Tam. Los cortes generados en cada plásmido generan 3 y 4 bandas, en el vector pET3a y pET3a-Tam respectivamente.

Como se observa en la imagen 17, en el plásmido control pET3a se observan dos bandas de peso molecular de 2319, y 2243 bp, mientras que en todos los plásmidos purificados de la reacción de ligación se observan 3 bandas de peso molecular 2319, 1436 y 762 bp, a pesar que la banda de menor peso molecular no se observa ya que el método de purificación no elimina en su totalidad el RNA de la célula, es notable que la reacción de ligación fue realizada con éxito.

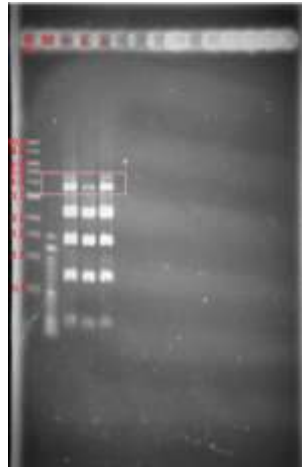


Imagen 18. Gel de agarosa 1.5%. Plásmidos P001, P002 y P003, purificados con equipo QIAquick, digeridos con BglI. Se observan las 4 bandas esperadas con un peso molecular de 2319, 1436, 762 y 234 bp. En el recuadro rosa, se puede observar que no todo el plásmido fue digerido por la enzima.

Los plásmidos P001, P002 y P003, fueron seleccionados para ser secuenciados por el método Sanger (Laragne Inc) con el oligo T7-terminal dirección 3'-5'.

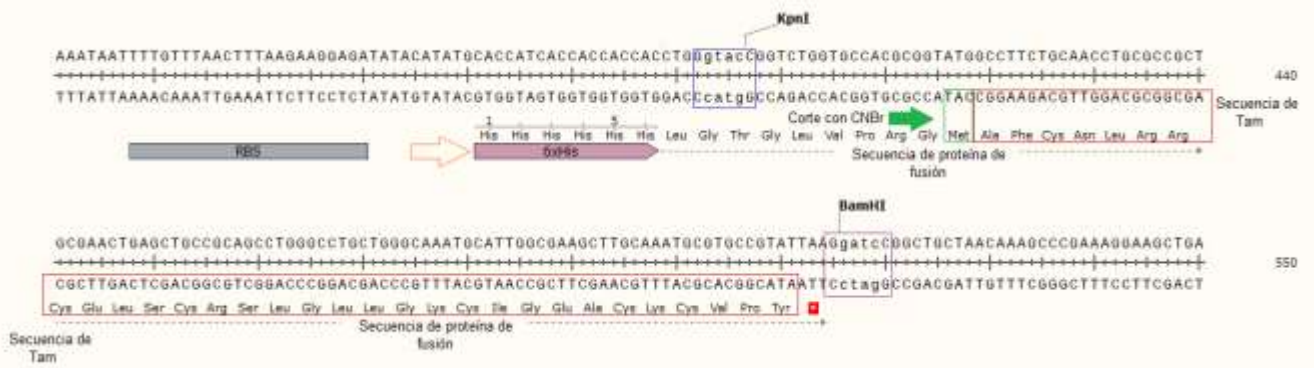


Imagen 19. Secuenciación de P001 por método de Sanger. Se observa que la secuencia de la tamapina se encuentra de manera adecuada dentro de la secuencia de la proteína de fusión, además de la Met para realizar el corte con CNBr.

7.2 Optimización de expresión de proteína recombinante.

Para la optimización de la proteína recombinante, se decidió iniciar con la selección de cepa de expresión. Las cepas sometidas a estudio fueron C41, BL21, BL21-Trx y rosetta DE3. Se realizó la transformación con pET3a-Tam para inocular e inducir con IPTG en cada una de las cepas. La expresión se monitoreo con electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se determinó que la cepa rosetta DE3, es la adecuada para la expresión de la proteína. Ya que las cepas C41, BL21 y BL21-TRX, presentan una expresión baja en comparación a la cepa rosetta DE3.

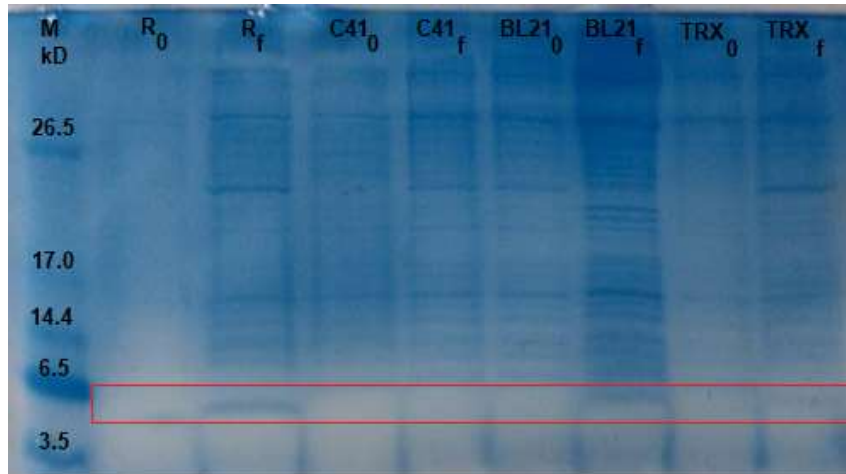


Imagen 20. Gel de poliacrilamida, 16%. Selección de cepa de expresión para proteína de fusión de tamapina. En el gel se observa que en el tiempo final de expresión de rosetta DE3 en un peso de 5401.41 kDa la banda de la proteína, mientras que en las otras cepas la banda es muy tenue. Modo de lectura de gel: N_t ; donde N, corresponde a cepa de expresión y t, 0 antes de inducción y f, 12 h después de inducción.

7.3 Cinética de expresión

Para determinar el tiempo óptimo de expresión de la proteína, se realizó una cinética de expresión en la cepa seleccionada rosetta DE3. Se determinó que el tiempo de expresión de la proteína es de 8 h.

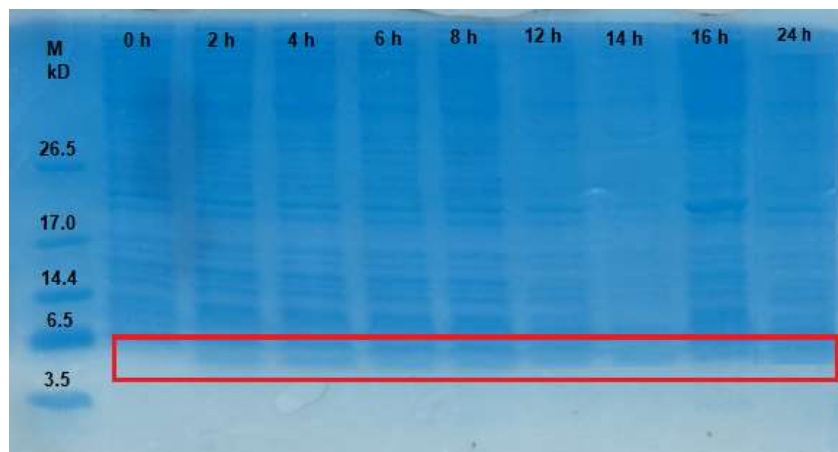


Imagen 21. Cinética de expresión de proteína en cepa rosetta DE3. En tiempo 0 h, antes de inducción no hay proteína ya que la célula aún no se encarga de su expresión.

7.4 Concentración de IPTG

Finalmente, una vez establecida la cepa de expresión y el tiempo después de inducción, se realizó un ensayo para determinar la concentración de IPTG adecuada para la expresión de la proteína.

Como se observa en la imagen 24 La variación de concentración de IPTG no cambia significativamente en la expresión de la proteína, por lo tanto, la concentración seleccionada para la expresión fue la menor, 0.25 mM.

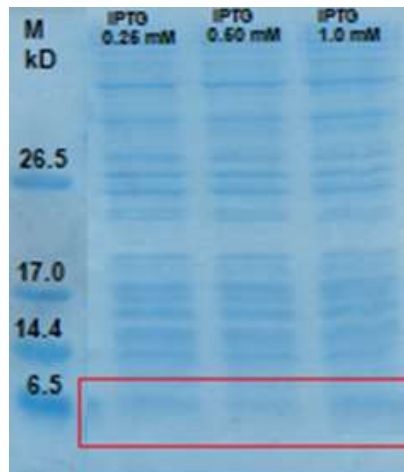
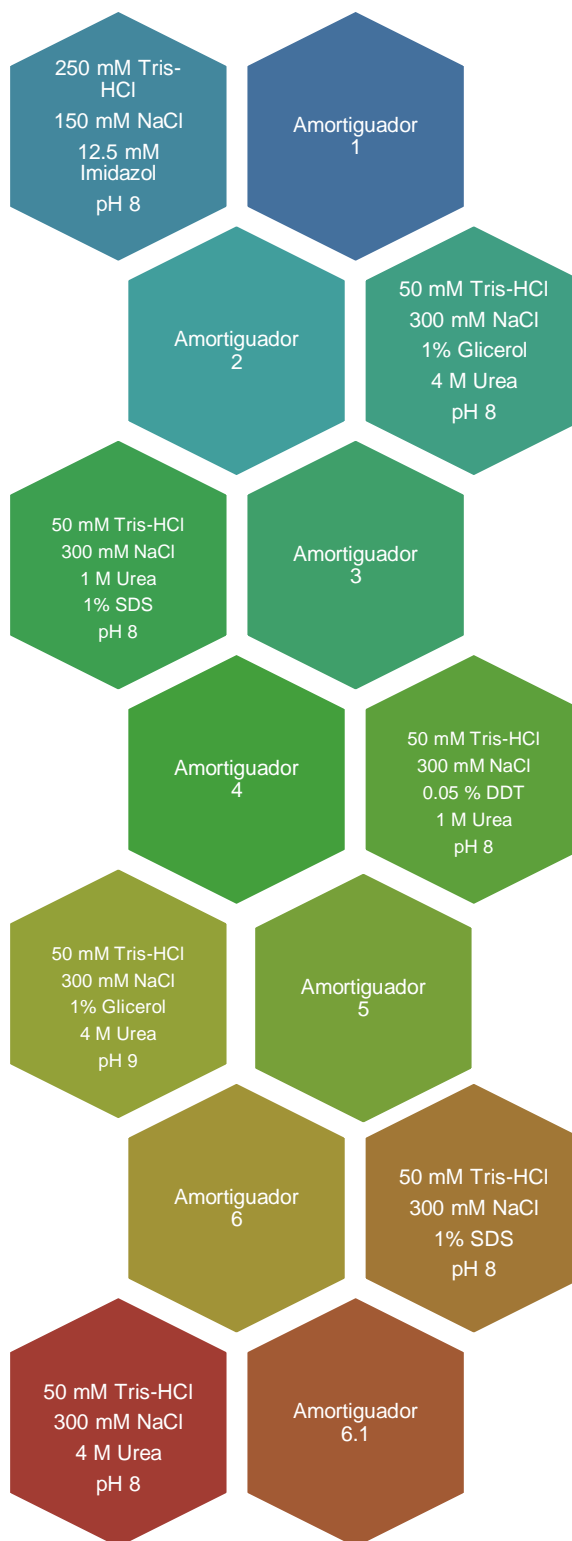


Imagen 22. Gel de poliacrilamida 16%. Ensayo de selección de concentración de IPTG.

Es importante resaltar que todos los geles de poliacrilamida mostrados hasta ahora son de la fracción insoluble. La proteína de fusión, al no contar con una proteína chaperona que ayude a su solubilización, se queda en los cuerpos de inclusión de forma insoluble. Por ello se realizó un ensayo para determinar el amortiguador adecuado para solubilizar la mayor cantidad de proteína.

Ya que el primer paso en el método de purificación de la proteína es por ondas sonoras, se debe de homogenizar a las células en un amortiguador que ayude a solubilizar a la proteína de interés. El amortiguador debe tener un pH diferente al pI de la proteína para ayudar a mantener a la proteína soluble, además de sales que ayuden al rompimiento celular por choque osmótico y agentes que rompan los puentes de hidrogeno e interacciones intra y extramoleculares de los puentes disulfuro, permitiendo desplegar a la proteína y solubilizarla.

Imagen 23. Amortiguadores a selección



Como se observa en las imágenes 24 y 25, el amortiguador que solubiliza la mayor cantidad de proteína es el número 5; por lo tanto, es el seleccionado para llevar a cabo la purificación de la proteína recombinante.

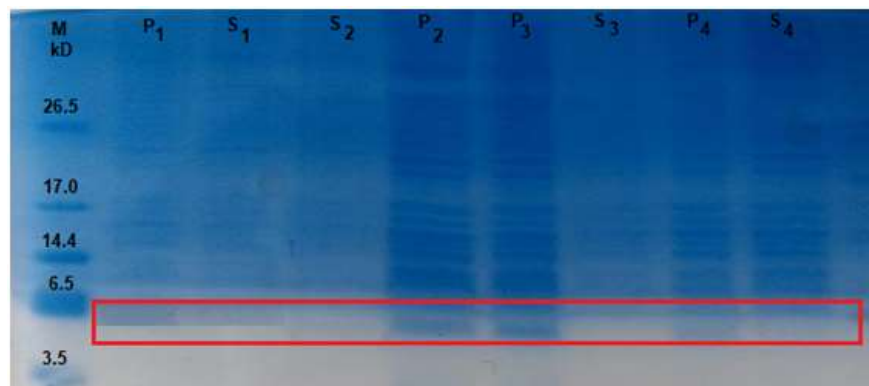


Imagen 24. Gel de poliacrilamida 16%. Pruebas de solubilización de proteína con amortiguador 1, 2, 3 y 4. Mostrando pellet y sobrenadante, después de solubilizar en su respectivo amortiguador y sonicar.

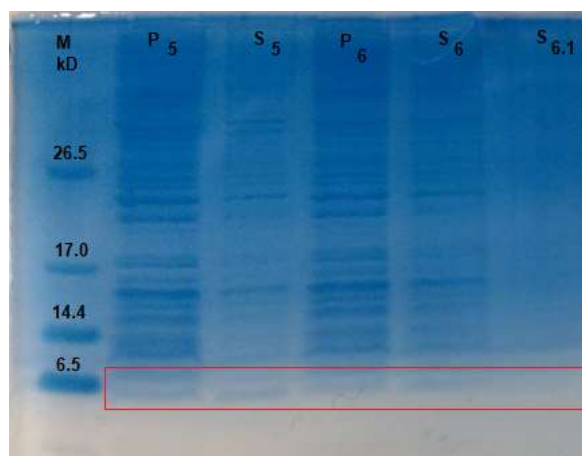


Imagen 25. Gel de poliacrilamida 16%. Pruebas de solubilización de proteína con amortiguador 5, 6 y 6.1. Mostrando pellet y sobrenadante, después de solubilizar en su respectivo amortiguador y sonicar. Nomenclatura de lectura: M, marcador de peso molecular, P_n Pellet después sonicar, S_n, Sobrenadante después de sonicar, n se refiere al número de amortiguador utilizado.

7.5 Purificación de proteína recombinante

Se realizó un escalamiento proporcional de producción de proteína recombinante con las condiciones óptimas de inducción. Se produjo la proteína en seis litros de medio LB, los cuales se dividieron en 4 matraces Fernbach. Se siguió el protocolo general para preinocular bacterias y el de lisis desnaturalizante, descritos en este trabajo. Se filtró el sobrenadante para realizar purificación de proteína de fusión por columna metal-quelato. Se eluyó con amortiguador de elución (Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1% Glicerol, 4 M Urea, 300 mM Imidazol, pH 9).

La fracción eluida con el amortiguador fue dializada para eliminar la mayor cantidad de sales y la exposición de la proteína con urea, ya que esta última provoca que la proteína no se pliegue durante el proceso de purificación. Nuestros resultados indican que la urea impide el plegamiento de la tamapina. Por tanto, la urea debe eliminarse gradualmente para lograr un correcto plegamiento. Debido a que sin la presencia de urea la proteína puede interactuar con el agua de forma hidrofóbica, permitiendo que la cadena polar de la proteína interactúe con las moléculas de agua, contribuyendo a que las moléculas proteicas que se encontraban con un plegamiento inadecuado, se replieguen. Esto último se debe a que la cadena hidrofílica de una proteína plegada se encuentra en el exterior de su estructura permitiendo formar los puentes de hidrogeno con las moléculas de agua en el medio; mientras las cadenas no polares de los aminoácidos quedan en el interior de la estructura para formar centros hidrófobos compactos de átomos que rechazan las moléculas de agua. Dicho proceso permite que segmentos distantes de la cadena polipeptídica se unan provocando que las cisteínas se encuentren en el espacio, donde el paso final para el repliegamiento es el oxígeno presente en el ambiente, ya que reacciona con las cisteínas y forma los enlaces disulfuro. Es decir, las interacciones hidrofílicas permiten la conformación adecuada para que las cisteínas se ubiquen cerca en el espacio, permitiendo a que el oxígeno las oxide, formando una estructura terciaria estable.

Este paso es fundamental en el proceso de purificación de la proteína ya que previene que las proteínas desplegadas se aglomeren y precipiten. Una vez obtenida la proteína soluble y plegada de forma adecuada se purificó con una columna de extracción de fase sólida, se liofilizó y disolvió en una solución 15% ACN-0.05%TFA.

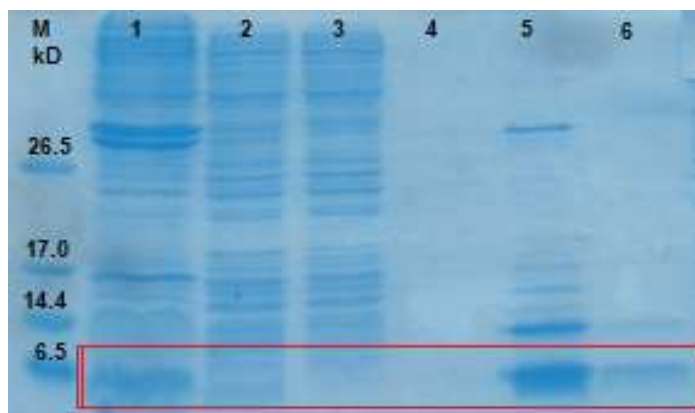


Imagen 26. Gel de poliacrilamida al 16%. Seguimiento de purificación de proteína de fusión. M, marcado de peso molecular, 1. Pellet después de sonicar, 2. Sobrenadante antes de Hi-Trap, 3. Sobrenadante después de Hi-Trap, 4. Sobrenadante después de Strata, 5. Eluato de Strata eluido con 60% de ACN-H₂O-0.05% TFA y 6. Eluato de Strata eluido con 100% ACN-0.05% TFA.

Como se observa en la imagen 26, el pellet aún contiene proteína de fusión retenida. Sin embargo, en el carril 5 se observa que el procedimiento de purificación permite solubilizar una cantidad adecuada de proteína para ser purificada por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa, para su posterior reacción química con CNBr.

Se realizó la purificación de proteína de fusión por HPLC en fase reversa. Como se observa en la imagen 27, el pico con mayor intensidad se encuentra en el minuto 13.80, este fue colectado; se verificó que se trataba de la proteína de fusión por RMN. Una vez realizada la verificación de que se trataba de dicha proteína se pesó para realizar la reacción química con CNBr y obtener únicamente a r-tamapina.

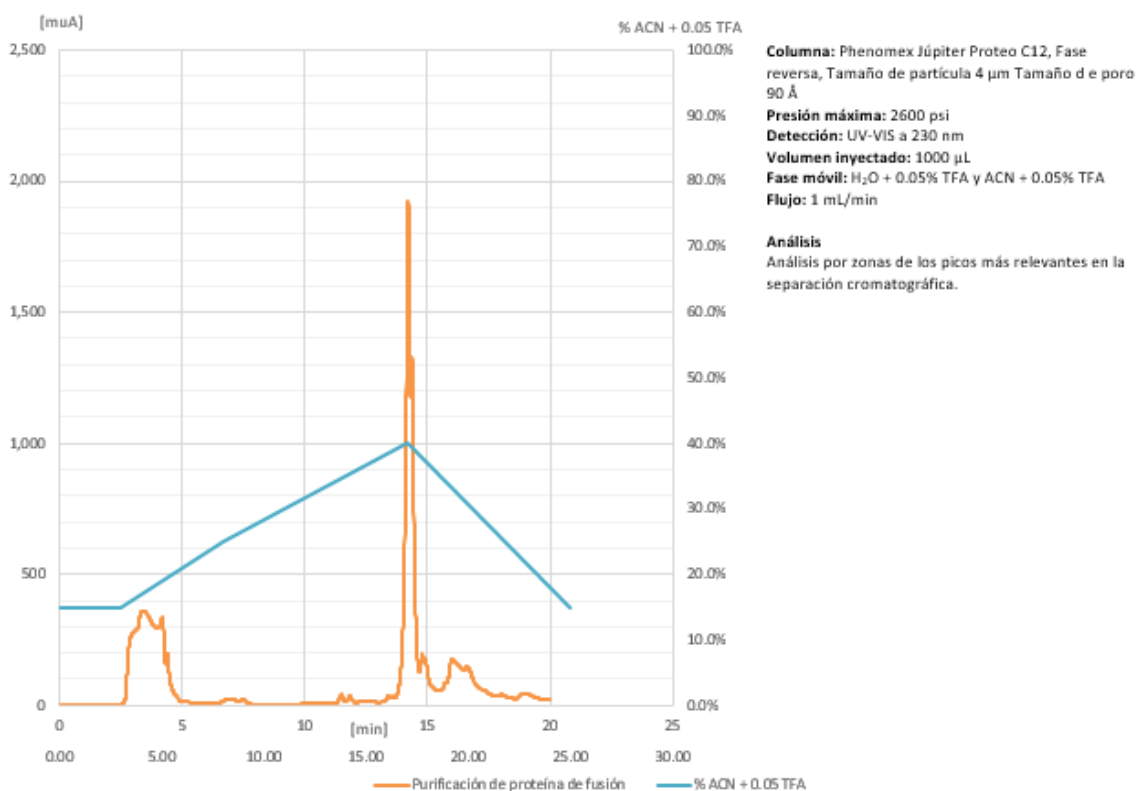


Imagen 27. Cromatograma correspondiente a la purificación de proteína de fusión por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Se realizó la reacción de corte y purificación de mezcla de reacción con columna de extracción en fase sólida de acuerdo al protocolo establecido. Se purificó la r-tamapina por HPLC y en la imagen 28, podemos observar que el pico en el cromatograma de mayor intensidad se encuentra en el minuto 15, el cual fue colectado, liofilizado y caracterizado por RMN para verificar que se trataba de la r-tamapina.

Comparando los cromatogramas de las imágenes 27 y 28, podemos observar que el pico del cromatograma correspondiente a la purificación de r-tamapina es aproximadamente 3 veces de menor intensidad que el de la purificación de la proteína de fusión. Este resultado es congruente, ya que la r-tamapina al perder la cola de histidinas y demás aminoácidos perdió masa molecular, por ello la relación masa/volumen es menor.

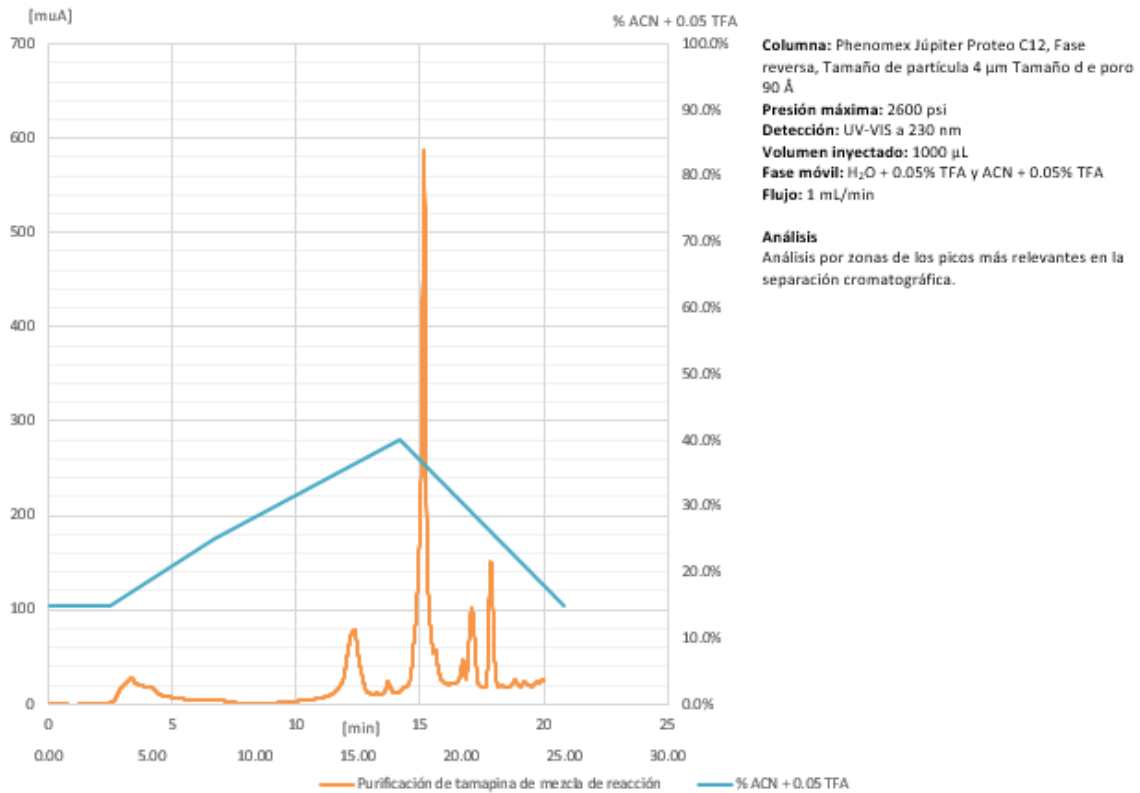


Imagen 28. Cromatograma correspondiente a la purificación de r-tamapina sin cola de histidinas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

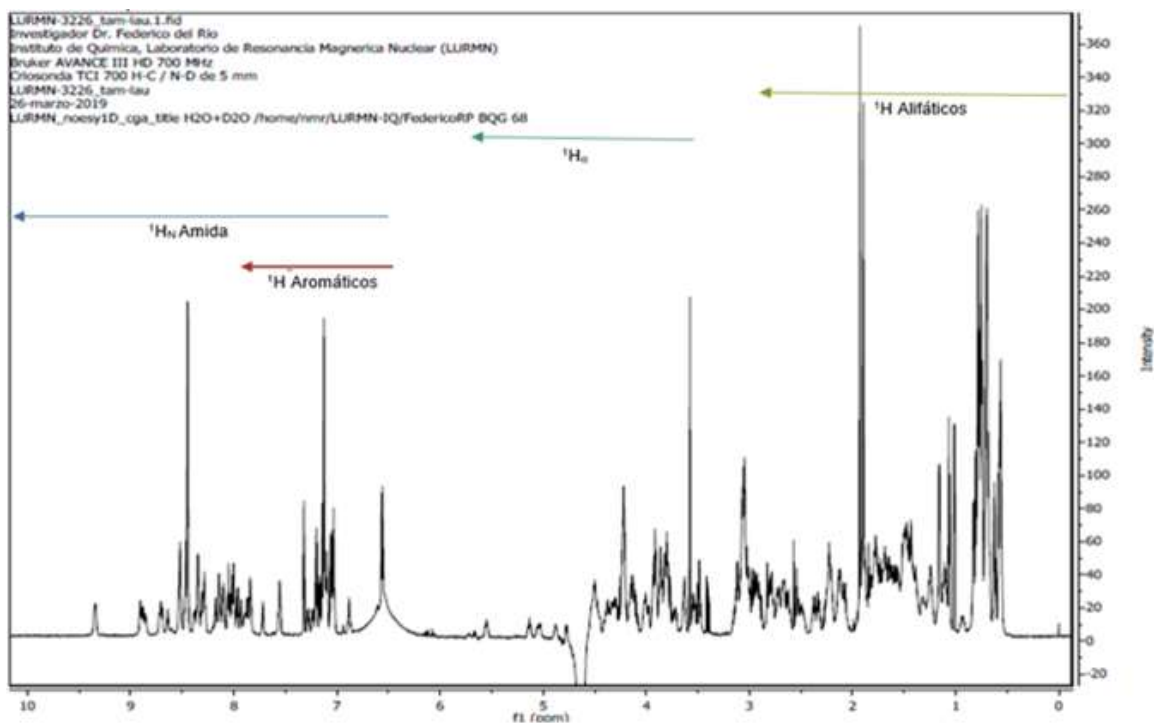
Finalmente, se colectó la muestra del minuto 15, se liofilizó y pesó para determinar que el rendimiento de la r-tamapina.

7.6 Caracterización

Se realizó la caracterización de la proteína de fusión y de la r-tamapina, por RMN de protón y dicroísmo circular.

7.6.1 Resonancia Magnética Nuclear

Fueron comparados los espectros de r-tamapina y de la proteína de fusión de la tamapina, con un espectro de r-tamapina obtenida anteriormente con el sistema de expresión pET32a-Tam/rosetta TM.



La muestra para ^1H -RMN se preparó disolviendo 1 mg de proteína en 300 μL de agua milli-Q con peróxido de hidrogeno al 5% (V/V).

Imagen 29. Espectro de RMN- ^1H de proteína de fusión que contiene a tamapina. Se muestran los principales intervalos de desplazamiento químico para los diferentes tipos de protón.

La dispersión de señales en los protones de amida indica que la proteína de fusión se encuentra con un plegamiento definido. Si se comparan los espectros de la imagen 29 y 30, se pueden apreciar señales de alta intensidad en la zona de aromáticos, esto se debe al anillo aromático presente en las histidinas de la proteína de fusión. Mientras que las señales de alta intensidad en la zona de protón de amida se deben al conjunto de aminoácidos que la proteína de fusión tiene como cola detrás de los pertenecientes a la tamapina.

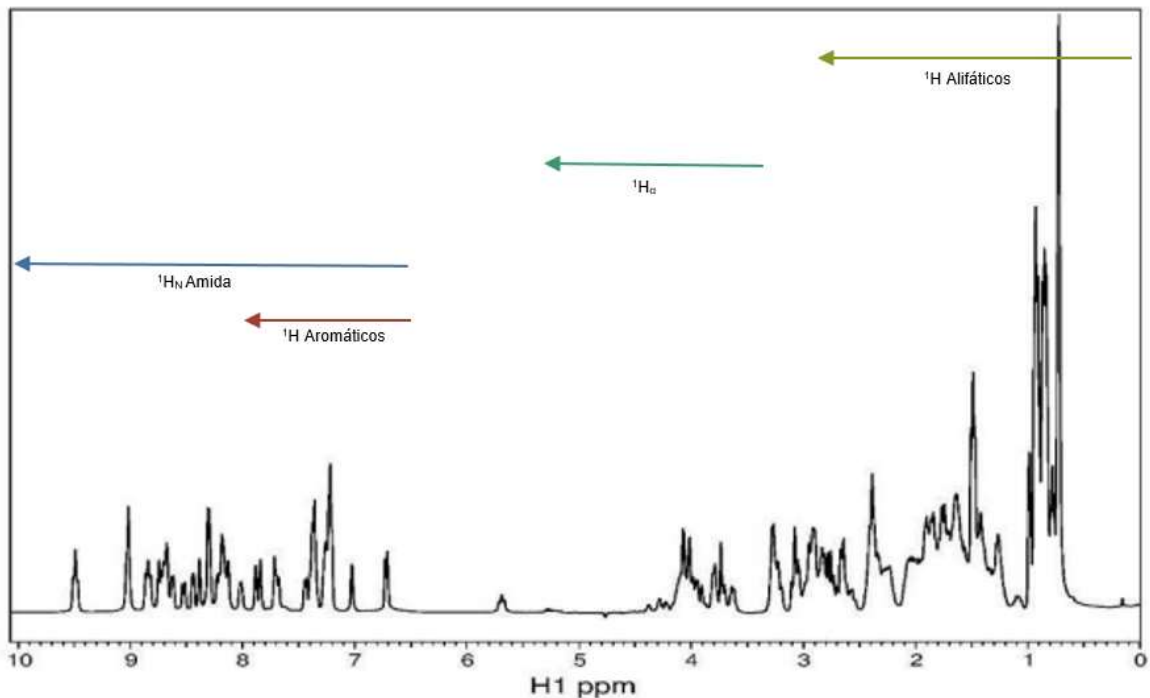


Imagen 30. Espectro de RMN de ^1H de 500 MHz de r-Tamapina obtenida de sistema de expresión pET32aTam/rosetta TM. En la región 6.5-10.0 ppm se observa la dispersión de señales, evidenciando la existencia de que la proteína se encuentra plegada de forma adecuada. Se observan los principales desplazamientos químicos para protón. Espectro tomado y adaptado de referencia 21.

Tabla 3. Desplazamientos químicos más comunes para caracterización de proteínas en RMN de ^1H .

Tipo de Hidrogeno	Desplazamiento químico (ppm)
^1H de amida	6.5-10.0
^1H aromático	6.5-8.0
$^1\text{H}_\alpha$	3.5-5.5
$\text{CH}_3\text{-CH}_2$ de cadena lateral	3.5-10.0

7.6.2 Dicroísmo Circular

Se realizó el experimento de DC a la r-tamapina y fue comparado con el DC de la r-tamapina obtenida del sistema pET32a-Tam/rosetta TM. El experimento de DC en r-tamapina se disolvió en agua milli Q, hasta obtener una concentración final de 2.5 mg/mL, ésta se pasó por un filtro de 0.22 μm .

En la imagen 31, podemos observar que en ambas gráficas se encuentran los mínimos experimentales en el intervalo de 208 a 222 nm y un máximo cerca de 195 nm; los cuales son característicos de las proteínas con estructura α/β . Por lo tanto, se concluye que la r-tamapina obtenida de pET3a-Tam/rosetta DE3 se encuentra plegada.

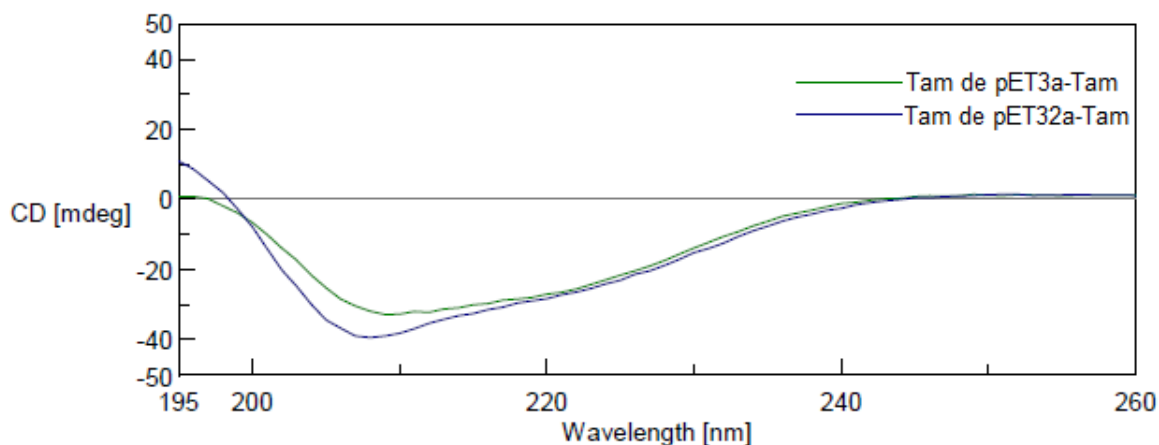


Imagen 31. Gráficas de DC. Comparación en el plegamiento de la r-tamapina de ambos sistemas de expresión.

El rendimiento final de r-tamapina fue de 500 µg/L de cultivo celular, a pesar de que es tres veces menor al sistema de pET32a-Tam tiene una amplia ventaja debido a que en el método de expresión desarrollado en pET3a-Tam se obtiene la proteína en un menor número de pasos de purificación en comparación a dicho sistema. Esto se debe a que en la expresión de la r-tamapina como anteriormente se ha explicado se realizaban dos tipos de corte; uno enzimático con la enzima trombina y uno químico con CNBr, es decir que el sistema pET3a-Tam se produce a la r-tamapina en un menor tiempo y el uso de trombina es eliminado disminuyendo significativamente los costos. Además, que la proteína se obtiene con un plegamiento idóneo, indicando que la r-tamapina no necesita de una proteína chaperona para adquirir una conformación estable e idéntica a la reportada. Por lo tanto, es recomendable el uso de este nuevo método de expresión para la toxina de alacrán r-tamapina.

Conclusiones

- Se construyó el vector pET3a-Tam con el inserto de la tampina para su expresión.
- La r-tampina no necesita de una proteína chaperona que la ayude a plegarse de forma adecuada.
- El sistema de expresión de pET3a-Tam/rosetta DE3, no incrementó el rendimiento biosintético para la producción de la r-tampina, debido a que la proteína de fusión es retenida en los cuerpos de inclusión.

Bibliografía

[1] Quintero-Hernández, V., Jimenez Vargas, J.M., Gurrola, G.B., Valdivia, H.H., y Possani, L.D. (2013). Scorpion venom components that affect ion channels function. *Toxicon*, 76, 328-342.

[2] Ramirez Cordero, B., Toledano, Y., Cano-Sanchez, P., Hernandez-Lopez, R., Flores-Solis, D., Saucedo-Yañez, A.L., Chavez-Uribe, I., Briebe L.G., y Del Río Portilla, F. (2014). Cytotoxicity of Recombinant Tamapin and Related Toxin-Like Peptides on Model Cell Lines. *Chemical Research in Toxicology* (27), 960-967.

[3] Melchor-Meneses, M., (2018), *Purificación, caracterización estructural por resonancia magnética nuclear y evaluación citotóxica en células cancerosas de las mutantes $\Delta Pp30$, Y31+N y $\Delta P30/Y31+N$ de la tamapina. (Tesis de Maestría) Universidad Nacional Autónoma de México.*

[4]. Allinger, N., Cava, M., De Jongh C., (2001) *Química Organica*. Segunda Edición. Madrid, España. Ed. Reverté, S. A.

[5] Jiménez, L. Felipe, Merchant, Horacio, (2003), *Biología Celular y Molecular*, México, Pearson Educación.]

[6] *Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P., (2004) Essential Cell Biology, USA, Garland Science*

[7] Cooper, M., Hausman R., (2007), *The cell: A molecular Approach*, USA, ASM Pess.

[8] Lehninger, D., Cox, M. M., (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Third Edition. USA. W. H. Freeman and Company.

- [9] https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-3a-d_Map.pdf Consultada el 17 de Marzo de 2019.
- [10] Berndt, C., Horst-Lillig, C., Holmgren, A., (2008) Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. Elsevier. 1783, 641-650.
- [11] Novagen. pET system Manual. 11th Manual. 2005
- [12] Stansfield, W., (1992), Genética. Tercera edición. México. McGraw-Hill.
- [13] Zhang, X., Dillen, L., Vanhoutte, K., Van Dongen, W., Esmans, E., & Claeys, M. (1996). *Characterization of Unstable Intermediates and Oxidized Products Formed during Cyanogen Bromide Cleavage of Peptides and Proteins by Electrospray Mass Spectrometry. Analytical Chemistry, 68(19), 3422–3430*
- [14] Voet, D., Voet, J., Pratt, C., (2006) Fundamentos de Bioquímica, Segunda Edición. Argentina, Editorial Medica Panamericana S.A.
- [15] Karp, G., (2010), Biología celular y molecular: conceptos y experimentos, México, Mc Graw Hill.
- [16] Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., (2003), *Isolation and purification of proteins*. New York, USA, Marcel Dekker, Inc.
- [17] Terpe, K., (2003), *Overview of the tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl microbiol Biotechnol (60) 523-533* hh
- [18] Freifelder, D., (2003). Técnicas de bioquímica y biología molecular. España. Editorial Reverté, S.A.

[19] Skoog, D., Holler-James, F., Crouch, S., (2008) Principios de análisis instrumental, México, Cengage Learning.

[20] Keeler, J., Understanding NMR spectroscopy. Cambridge. John Wiley and Sons, 2005-

[21] Moran L.A., Horotn H.R., Scrimgeor K.G., Perry M.D., (2012) Principles of biochemistry, 5th Edition, Pearson.

[22] Ramírez-Cordero, B., (2015), Biosíntesis, estudio estructural y citotoxicidad de péptidos tipo toxinas de alacrán. (Tesis de doctorado) Universidad Nacional Autónoma de México.

ANEXO I

Comparación de rendimientos obtenidos de diferentes proteínas recombinantes expresadas en el grupo de trabajo en el laboratorio de Bioquímica I, Instituto de Química, UNAM.

PROTEÍNA	SISTEMA DE EXPRESIÓN	CANTIDAD DE MILIGRAMO/LITRO DE MEDIO LB	ESTUDIANTE A CARGO
ESCORPINA	pET32a/rosetta	2.3	Colorado-Corte, 2019
ESCORPINA CON C-TERMINAL	pET32a/rosetta	2.1	Colorado-Corte, 2019
ESCORPINA CON N-TERMINAL	pET32a/rosetta	1.2	Colorado-Corte, 2019
GM-M2D1	pET32a/rosetta	0.6	Escobedo-González, 2018
GM-M2D2	pET32a/rosetta	1	Escobedo-González, 2018
GM-M2D3	pET32a/rosetta	1	Escobedo-González, 2018
TSTXKB	pET3a/C41	-	Luna-Laviada, 2018
TAM ΔP30	pET32a/rosetta	1.5	Melchor-Meneses, 2018
TAM Y31+N	pET32a/rosetta	1.5	Melchor-Meneses, 2018
TAM ΔP30 + Y31+N	pET32a/rosetta	1.5	Melchor-Meneses, 2018
TX1M1	pET32a/rosetta	-	Anzuarez-Sánchez, 2017
TS16	pET32a/rosetta	0.183	Hernández-Tapia, 2017
TS16	pET32a/C41	0.039	Hernández-Tapia, 2017
TCOKIK	pET32a/rosetta TM	0.53	López-Girardo, 2017
GM-TAM	pET40b/C41	0.5	Colorado-Corte, 2016
R-HGE36	pET32a/rosetta	5.3	Flores-Solís, 2016
HGED	pET32a/rosetta	1.7	Flores-Solís, 2016
TT28	pET32a/rosetta	0.05	Flores-Solís, 2016
R-TAM	pET32a/rosetta Gami	1.5	Ramírez-Cordero, 2015
R-TAM-R6A	pET32a/rosetta Gami	2	Ramírez-Cordero, 2015
R-TAM-R13A	pET32a/rosetta Gami	1.8	Ramírez-Cordero, 2015
R-TAM-R6A-R13A	pET32a/rosetta Gami	2.8	Ramírez-Cordero, 2015

ANEXO II

Abreviaturas de los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza. Se presentan las abreviaturas de tres letras y de una letra. Como se muestra hay un número igual de cadenas laterales no polares y polares

Aminoácidos polares

Aminoácido	Tres letras	Una letra	Cadena lateral
Ácido aspártico	Asp	D	Negativo
Ácido glutámico	Glu	E	Negativo
Arginina	Arg	R	Positivo
Lisina	Lys	K	Positivo
Histidina	His	H	Positivo
Asparagina	Asn	N	Polar no cargado
Glutamina	Gln	Q	Polar no cargado
Serina	Ser	S	Polar no cargado
Treonina	Thr	T	Polar no cargado
Tirosina	Try	Y	Polar no cargado

Aminoácidos no polares

Aminoácido	Tres letras	Una letra	Cadena lateral
Alanina	Ala	A	No polar
Glicina	Gly	G	No polar
Valina	Val	V	No polar
Leucina	Leu	L	No polar
Isoleucina	Ile	I	No polar
Prolina	Pro	P	No polar
Fenilalanina	Phe	F	No polar
Metionina	Met	M	No polar
Triptófano	Trp	W	No polar
Cisteína	Cys	C	No polar

ANEXO III

Código genético

		Segunda Letra							
		U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP	A
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	STOP	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
A	AUU	Iso	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Iso	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
	AUA	Iso	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Tomada de referencia: 22

ANEXO IV

Composición de medio LB para un litro

Componente	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

ANEXO V

Protocolo QIAquick de equipo de extracción de gel

Este protocolo está diseñado para extraer y purificar ADN de 70 bp a 10 kb de estándar o bajo punto de fusión de geles de agarosa en TAE o TBE buffer. Hasta 40 mg de agarosa puede ser procesado por spin columna.

Notas:

- El color amarillo de buffer PE QG indica un pH ≤ 7.5
- Adicionar etanol (96-100%) a buffer PE antes de usar (mirar en etiqueta de botella el volumen necesario)
- Isopropanol (100%) y un choque de calor o baño de agua caliente a 50°C son requeridos
- Todos los pasos de centrifugación son llevados a cabo a 13,000 rpm (~17,900 x g) en una micro centrífuga convencional
- Acetato de sodio 3 M, pH 5.0 puede ser necesario

1. Extirpar el fragmento de ADN de el gel de agarosa con limpieza y un bisturí afilado.

Minimizar el tamaño de la fracción de gel para remover agarosa extra.

2. Pesar la rebanada de gel en un tubo transparente. Adicionar 3 volúmenes de buffer QG a un volumen de gel (100 mg ~ 100 µL).

Por ejemplo, agregar 300 µL de buffer QG a cada 100 mg de gel. Para geles de agarosa >2%, agregar 6 volúmenes de buffer QG. La máxima cantidad de gel para una columna QIAquick es 400 mg; para fracciones mayores a 400 mg usar más de una columna QIAquick.

3. Incubar a 50°C por 10 min (o hasta que el gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a disolver el gel, mezclar por vortex el tubo cada 2-3 minutos durante la incubación.

IMPORTANTE: Solubilizar agarosa completamente. Para geles mayores al 2%, incrementar tiempo de incubación.

4. Después de disolver completamente el gel de agarosa, verificar que el color de la mezcla sea amarillo (similar a buffer QG sin disolver la agarosa).

Si el color de la mezcla es naranja o violeta, agregar 10 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.0, y mezclar. El color de la mezcla debe tornarse a amarillo.

La absorción de ADN a la membrana QIAquick es solo eficiente a $\text{pH} \leq 7.5$ y la coloración naranja o violeta indica pH elevado, permitiendo fácilmente la determinación de pH óptimo para unión de ADN.

5. Agregar un volumen de isopropanol a la muestra y mezclar.

Por ejemplo, si el fragmento de gel de agarosa pesa 100 mg, adicionar 100 µL de isopropanol. Este paso incrementa el rendimiento de fragmentos de ADN <500 bp y >5 kb. Para fragmentos entre 500 bp y 4 kb, la adición de isopropanol no afecta en rendimiento. No centrifugar la muestra en este paso.

6. Colocar una spin column QIAquick en un tubo colector de 2 mL.

7. Para unir ADN, aplicar la muestra a la columna QIAquick, y centrifugar por un minuto.

El máximo volumen del depósito de la columna es de 800 µL. Para muestras de mayor volumen cargar y centrifugar nuevamente.

8. Descartar el sobrenadante y colocar la columna QIAquick nuevamente en el mismo tubo colector. Tubos colectores son reutilizados para disminuir residuos plásticos.

9. (Opcional): Adicionar 0.5 mL de buffer QG a columna QIAquick y centrifugar por un minuto.

Este paso ayuda a remover todos los trazos de agarosa. Es solo requerido cuando el ADN será subsecuentemente usado directamente para secuenciar, transcripción in vitro o micro inyección.

10. Para lavar, adicionar 0.75 mL de buffer PE a columna QIAquick y centrifugar por un minuto.

NOTE: si el ADN será usado en aplicaciones sensibles a sal, como ligadura de extremo roto, dejar reposar la columna por 2-5 min después de adicionar buffer PE y después centrifugar.

11. Descarta el sobrenadante y centrifugar la columna QIAquick un minuto adicional a 13,000 rpm.

12. Colocar la columna QIAquick a un tubo limpio de micro centrifuga de 1.5mL

13. Para eluir el ADN, adicionar 50 μ L de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH8.5) o H₂O en el centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna por un minuto. Alternativamente para incrementar concentración de ADN, adicionar 30 μ L de buffer de elución a el centro de la membrana, dejar reposar la columna por 1 min, y después centrifugar por 1 min.

ANEXO VI

Protocolo de purificación de equipo DNA miniprep

Este procedimiento es usado para extraer AND plasmidico de suspensión de células bacterianas y está basado en el procedimiento de lisis alcalina por Birnboim y Doly, (Nucleic Acids Research 7:1513, 1979). El procedimiento toma como ventaja que los plásmidos son relativamente más pequeños que moléculas de ADN y que el ADN cromosomal bacteriano es mucho más largas y menos enrollado.

1. Etiqueta 2 tubos de 1.5 mL y pipetea 1000 μ L de cultivo celular en cada tubo.
2. Cierra las tapas y coloca los tubos en una microcentrifuga y gira a velocidad máxima por 20 s.

3. Retira y descarta el sobrenadante usando una pipeta, se cuidadoso de no resuspender el botón celular.
4. Adicionar 100 μ L de amortiguador 1 (50 mM de Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 μ g/mL RNase A, pH 8.0) a cada tubo y resuspender las células por vortex. Es muy importante que sea homogénea la suspensión de células.
5. Adicionar 200 μ L de amortiguador 2 (1% SDS, 0.2 NaOH) a cada tubo. Cerrar los tubos y mezclar las soluciones agitando los tubos.
6. Colocar los tubos en hielo durante 5 min.
7. Adicionar 150 μ L de amortiguador 3 frío (3.0 M Acetato de potasio, pH 5.5) a cada tubo. Cerrar las tapas y mezclar agitando los tubos.
8. Centrifugar por 10 min, a 14000 rpm.
9. Decantar con sumo cuidado de no verter el precipitado a un tubo limpio de 1.5 mL.
10. Agregar 400 μ L de isopropanol. Mezclar vigorosamente.
11. Dejar a temperatura ambiente por 2 min.
12. Centrifugar a 14 000 rpm, durante 5 min.
13. Desechar sobrenadante.
14. Agregar 200 μ L de etanol y mezclar por inversión.
15. Centrifugar por 5 min, a velocidad máxima.
16. Desechar sobrenadante con cuidado.
17. Colocar tubos en campana extractora para secar trazas de etanol.
18. Agregar 20 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) para disolver el sedimento.

ANEXO VII

Protocolo: Purificación de ADN plasmídico usando equipo QIAprep spin miniprep y una micro centrifuga

1. Pellet 1-5 mL de cultivo bacteriano nocturno por centrifugación a > 8000 rpm (6800 x g) durante 3 min a temperatura ambiente (15-25 ° C)

2. Resuspender células bacterianas sedimentadas en 250 μ L de tampón P1 y transferirlas a un tubo de microcentrífuga
 3. Añadir 250 μ L de tampón P2 y mezclar completamente invirtiendo el tubo 4-6 veces hasta que la solución quede clara. No permita que la reacción de lisis se realice durante más de 5 min. Si se utiliza el reactivo LyseBlue, la solución se tornará azul.
 4. Agregue 350 μ L de tampón N3 y mezcle inmediatamente y completamente invirtiendo el tubo 4-6 veces. Si se utiliza el reactivo LyseBlue, la solución se vuelve incolora.
 5. Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm en una microcentrífuga de mesa.
 6. Aplique el sobrenadante de la etapa 5 a la columna de centrifugado QIAprep mediante decantación o pipeteado. Centrifugar durante 30-60 seg y descartar el flujo o aplicar vacío al colector para dibujar la solución a través de la columna de giro QIAprep y apagar la fuente de vacío.
 7. Recomendado: Lave la columna de giro QIAprep en 500 μ L Buffer PB. Centrifugar durante 30-60 s y descartar el flujo, aunque o aplicar vacío al colector para extraer la solución a través de la columna de giro QIAprep y apagar la fuente de vacío.
- Nota: Este paso sólo se requiere cuando se usan cepas endA u otras cepas bacterianas con alta actividad nucleasa o contenido de carbohidratos.
8. Lavar la columna de giro QIAprep añadiendo 750 μ L de tampón PE. Centrifugar durante 30-60 s y descartar a través de la columna de giro QIAprep y apagar la fuente de vacío. Transferir la columna de giro QIAprep al tubo de colector.
 9. Centrifugar durante 1 min para eliminar el tampón de lavado residual.
 10. Olar la columna QIAprep en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Para eluir ADN, añadir 50 μ L de tampón EB (Tris-Cl 10 mM, pH = 8,5) o agua al centro de la columna de spin QIAprep, dejar reposar durante 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto

ANEXO VIII

Protocolo para transformación de células competentes por método de choque termino

Realizar procedimiento bajo campana de flujo laminar.

1. Tomar tubo de células competentes congeladas y colocarlas directamente en hielo. Proceso de descongelación de 10 min.
2. Añadir 5 µL de plásmido a microtubo que contiene células competentes.
3. Dejar reposar en hielo por 30 min.
4. Dar choque térmico a 42°C durante 45 s.
5. Colocar en hielo nuevamente y adicionar 200 µL de medio LB, dejar reposar por 5 min.
6. Incubar a 37°C, durante 60 min.
7. Expandir las células transformadas en caja Petri con medio LB-Agar y el antibiótico correspondiente.
8. Incubar caja con células transformadas a 37°C, durante 16 h.
9. Conservar la caja a 4°C.

ANEXO IX

Protocolo para uso de columna C18 Strata.

1. Hinchar fase estacionaria de la columna C18 Strata con acetonitrilo-0.05% TFA.
2. Lavar columna con 5 ml de acetronitrilo-0.05% TFA.
3. Pasar la fracción con la proteína digerida por la columna y recircularla 2 veces.
4. Desalar la muestra con 5 ml de H₂O-0.05% TFA.
5. Permitir que la columna se equilibre con la fase móvil por lo menos un minuto.
6. Eluir la proteína con un gradiente de acetonitrilo-0.05% TFA.
7. Lavar columna con 5 ml de acetonitrilo-0.05% TFA.