



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)

**“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA
RECOMBINANTE DE NABO (*Brassica napus*) EN UN SISTEMA
BACTERIANO”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

M. en C. Norma Azucena Rodríguez Cabrera

QUERÉTARO, QRO. SEPTIEMBRE 2011



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**“EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA RECOMBINANTE
DE NABO (*Brassica napus*) EN UN SISTEMA BACTERIANO”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

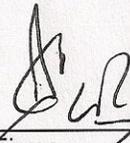
M. en C. Norma Azucena Rodríguez Cabrera

Dirigido por:

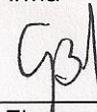
Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

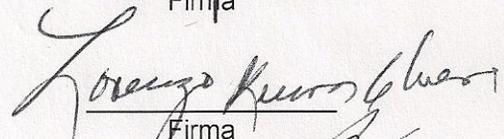
Dr. Carlos Regalado González
Presidente


Firma

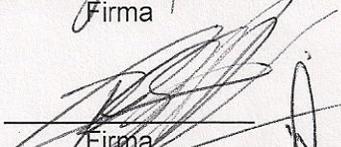
Dra. Blanca E. García Almendárez
Secretario


Firma

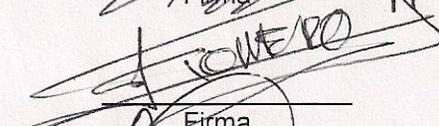
Dr. Lorenzo Guevara Olvera
Vocal

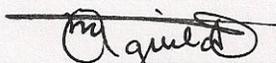

Firma

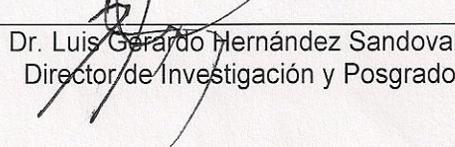
Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente


Firma

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez
Suplente


Firma


Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Directora de la Facultad


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre de 2011
México

RESUMEN

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de diversas moléculas donadoras de hidrógeno en presencia de H_2O_2 . La peroxidasa de rábano picante (HRPC) ha sido el ejemplo típico de una peroxidasa de plantas clase III, debido en parte a su uso en todo el mundo en inmunodiagnósticos y en ensayos como enzima reportera. Existe una demanda de nuevas peroxidasas más estables y con mejores propiedades catalíticas. Una fuente alternativa de peroxidasas es el nabo (*Brassica napus*), ya que algunas isoformas son capaces de polimerizar compuestos fenólicos de aguas residuales con alta eficiencia o pueden ser usadas en reacciones de diagnóstico; sin embargo, el proceso de extracción y purificación es complejo y se obtienen bajos rendimientos de proteína activa. Nuestro grupo de investigación ha clonado un cDNA de peroxidasa de nabo (*B. napus* L. var. purple top white globe, *BnPA*) con anterioridad, lo que ha abierto la posibilidad de producir la proteína recombinante en *E. coli*. El objetivo de este proyecto es clonar el gen de una peroxidasa de nabo en un vector de expresión bacteriano, expresar y purificar a la proteína recombinante. El gen de la peroxidasa se fusionó con un hexámero de histidinas para facilitar su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). El rendimiento de peroxidasa recombinante pura fue de 29 mg/l de cultivo, acumulada como cuerpos de inclusión. Después de un paso de replegamiento bajo condiciones oxidantes, la enzima presentó una actividad específica de 981 unidades de ABTS/mg en condiciones óptimas (45°C, pH 6.0). El valor de K_m para ABTS fue de 0.33 mM y la eficiencia catalítica (K_{cat} / K_m) fue de $5.2 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$. El porcentaje de estructura secundaria evaluada por dicroísmo circular fue: 20% de α -hélice, 32% de β -plegada y 48% de aleatoria. El alto rendimiento y buenas propiedades cinéticas de la *BnPA* recombinante son piezas claves y marcan el inicio para futuros estudios de estructura-función, ingeniería de proteínas y aplicaciones biotecnológicas.

(Palabras clave: peroxidasa de nabo recombinante, sobreexpresión, actividad enzimática, caracterización bioquímica)

SUMMARY

Peroxidases are enzymes that catalyze oxidoreduction between H₂O₂ and various reductants. Horseradish peroxidase (HRPC) has been the archetypal example of a class III higher plant peroxidase, due to its worldwide use in immunodiagnostic kits and assays as reporter enzyme. However, there is a demand for more stable new peroxidases and with better catalytic properties. A good alternative source of peroxidases is turnip (*Brassica napus*) roots, because some isoforms are able to polymerize phenolic compounds from wastewaters with a high efficiency or may be used in diagnostic kits. However this process becomes difficult and tedious and the production yields of active protein usually are low. We have previously isolated and cloned a peroxidase cDNA from turnip (*B. napus* L. var. purple top white globe) roots and we are trying to produce the recombinant protein in an expression system. Nowadays, researchers are trying to obtain genomic DNA or cDNA encoding peroxidase to elucidate its physiological role, mechanism of action and the 3-D structure of the different isoenzymes. The aim of this work was to clone the peroxidase *BnPA* gen in a prokaryotic vector and to express and purify the recombinant protein. BnPA purification will be by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC). The yield of pure BnPA was 29 mg/l culture and was accumulated as inclusion bodies. After a refolding step under oxidative conditions the activity peroxidase was recovered. Maximum value of pH was 6 while optimum temperature was 45°C. The ABTS K_m was 0.33 mM and the catalytic efficiency was 5.2x10⁶ M⁻¹ s⁻¹. The secondary structure evaluated by circular dichroism comprised 20% α-helix, 32% β-sheet and 48% random structure. The high yield and good kinetic properties of the recombinant BnPA are key steps for future structure-function studies and biotechnological applications.

(Keywords: recombinant BnPA peroxidase, over-expression, enzyme activity, biochemical characterization)

A Emílio Ramírez Rodríguez por significar todo en mi vida y ser el impulso para seguir día a día. Gracias por hacerme reír, enojar y feliz.

A Álvaro Ramírez Juárez por todo el apoyo, paciencia, amor y cuidado que ha tenido hacia mí. Gracias por creer en mí, compartir mis tristezas y alegrías y estar a mi lado... por hacerme feliz.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCyTEQ) por su apoyo otorgado para la participación en diversos congresos.

Al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC) por haberme dado la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado.

Al Dr. Carlos Regalado por recibirme en su laboratorio, creer en mí y apoyarme en todo lo que necesité. A la Dra. Blanca García por todo su apoyo y consejos en la realización de este proyecto.

Al Dr. Sergio Romero por los valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo; por su apoyo incondicional, amistad y charlas amenas.

Al Dr. Gerardo Guevara por sus aportes y sugerencias para este trabajo.

Al Dr. Lorenzo Guevara por recibirme en su laboratorio y brindarme las facilidades para la realización de este trabajo.

A mis padres y hermanos por apoyarme y entregarme su cariño incondicional y formar juntos una linda familia.

A Benjamín, el terapeuta del posgrado, por sus comentarios y ánimos en tiempos difíciles. Agradezco también a Marianita y Lupillo por brindarme siempre una sonrisa.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Ale, Elda, Imer, Lolis, Fer, Juan Carlos, Violeta, Adriana, Tere, Raquel, Rodrigo, Marta, Luis, Aldo, por los buenos momentos y apoyo recibido.

A mis niñas de servicio Monse, Bere, Stacy por toda su ayuda, gratos momentos en el laboratorio y amistad.

A mis compañeros del propac, amigas de generación que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo del trabajo, por sus palabras y ánimos para seguir.

A Marigel, Laura, Carmen, Marlene, por llevarme de la mano en cada trámite administrativo.

A los Doctores del Propac por su apoyo y facilidades recibidas para la realización de los experimentos.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Nabo (<i>Brassica napus</i> L. var. <i>purple top white globe</i>)	3
2.2 Peroxidasas.....	3
2.3 Clasificación de las peroxidasas	5
2.4 Peroxidasas clase III	6
2.4.1 Estructura tridimensional y grupo prostético de las peroxidasas clase III.....	7
2.4.2 Mecanismo de reacción de la peroxidasa	9
2.4.3 Papel de los residuos de aminoácidos del grupo hemo en la catálisis	11
2.5 Papel fisiológico.	13
2.5.1 Germinación	14
2.5.2 Crecimiento celular y ablandamiento de la pared celular.....	15
2.5.3 Entrecruzamiento de la pared celular y senescencia.....	16
2.5.4 Lignificación, suberización y uniones diferólicas.....	18
2.5.5 Estrés biótico y abiótico y respuesta a daños celulares.....	19
2.5.6 Defensa contra infección por patógenos.....	20
2.6 Aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas	20
2.6.1 Decoloración de colorantes sintéticos.....	21

2.6.2 Síntesis orgánica de polímeros.....	21
2.6.3 Biorremediación de compuestos fenólicos.....	22
2.6. 4 Biosensores	23
2.6.5 Análisis clínico y diagnóstico	25
2.6.6 Inmunoensayos enzimáticos.....	26
2.7 Sistema de expresión de proteínas recombinantes: <i>Escherichia coli</i>	27
2.7.1 Herramientas para la expresión de proteínas recombinantes.....	28
2.7.1.1 Vector pGEM-T.....	28
2.7.1.2 Sistema de expresión pET	29
2.7.2 Expresión de proteínas de origen eucariótico en <i>E. coli</i>	33
2.7.2.1 Codones raros en <i>E. coli</i>	33
2.7.2.2 Vector pRARE y cepa Rosetta	36
2.7.2.3 Genotipo Rosetta.....	38
2.7.2.4 Genotipo Rosetta-gami 2.....	39
2.7.3 Expresión de peroxidasas en <i>E. coli</i>	39
2.7.4 Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)	42
2.7.5 Cromatografía de filtración en gel	44
2.7.6 Caracterización de proteínas.....	44
2.7.6.1 Parámetros cinéticos	44
2.7.6.1.1 Reacciones bisustrato	45
2.7.6.2 Dicroísmo circular (DC).....	46
2.7.6.3 Ensayo tipo “western”	48
2.7.6.4 Parámetros termodinámicos de desnaturalización	49
III. JUSTIFICACIÓN	52
IV. HIPÓTESIS.....	53

V. OBJETIVOS.....	53
5.1 Objetivo general	53
5.2 Objetivos específicos.....	53
VI. METODOLOGÍA	54
6.1 Reactivos.....	54
6.2 Estrategia experimental.....	55
6.3 Diseño de oligonucleótidos.....	55
6.4 Extracción del DNA plasmídico	58
6.5 Subclonación del gen <i>BnPA</i> en el vector pGEM-T.	59
6.6 Conservación de microorganismos	61
6.7 Almacenamiento de cepas recombinantes	62
6.8 Clonación del gen <i>BnPA</i> en el vector de expresión pET-28a(+).	62
6.9 Preparación de células competentes	64
6. 10 Transformación de células competentes	65
6.11 Inducción de la peroxidasa recombinante <i>BnPA</i> en <i>E. coli</i>	65
6.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	66
6.13 Expresión y análisis de solubilidad de la peroxidasa recombinante <i>BnPA</i>	67
6.14 Solubilización de cuerpos de inclusión.....	67
6.15 Purificación de la peroxidasa recombinante <i>BnPA</i> por IMAC.....	68
6.16 Recambio de amortiguador por cromatografía de filtración en gel	68
6.17 Plegamiento de la <i>BnPA</i> recombinante	69
6.18 Espectro de absorción UV-vis de la peroxidasa recombinante	69
6.19 Medición de actividad de peroxidasa.....	70
6.20 Caracterización bioquímica de la peroxidasa recombinante.	71
6.20.1 pH óptimo	71
6.20.2 Temperatura óptima.....	71
6.20.3 Estudios cinéticos	72
6.20.4 Efecto de iones metálicos y sales.....	73

6.21 Dicroísmo circular (DC)	73
6.22 Identificación de la BnPA recombinante mediante transferencia tipo “western”	74
6.23 Determinación de los parámetros termodinámicos de desnaturalización	76
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
7.1 Subclonación del gen <i>BnPA</i> en el vector pGEM-T.	78
7.2 Preparación de células competentes de las cepas de <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) y Rosetta-gami 2 (DE3).....	82
7.3 Clonación del gen <i>BnPA</i> en el vector de expresión pET-28a(+).	84
7.4 Inducción de la peroxidasa recombinante BnPA en la cepa Rosetta 2 (DE3).	86
7.5 Análisis de solubilidad de la proteína BnPA recombinante.....	91
7.6 Expresión de la proteína BnPA en la cepa Rosetta-gami 2 (DE3)	94
7.7 Purificación de la proteína BnPA a partir de la cepa Rosetta 2 (DE3).....	98
7.8 Recambio de amortiguador: cromatografía de filtración en gel	102
7.9 Replegamiento de la BnPA recombinante.....	105
7.10 Espectro de absorción UV-vis de la peroxidasa recombinante	108
7.11 Caracterización bioquímica de la peroxidasa recombinante.	109
7.11.1 Determinación del pH óptimo de actividad.....	109
7.11.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad.....	110
7.11.3 Determinación de parámetros cinéticos	112
7.11.4 Efecto de iones metálicos y sales	116
7.12 Estructura secundaria de la BnPA recombinante	117
7.13 Identificación de la BnPA recombinante mediante transferencia tipo “western”	120
VIII. CONCLUSIONES	123
IX. BIBLIOGRAFÍA	125
X. ANEXOS.....	138

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de peroxidasas según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.	4
2	Uso de codones para Arg, Gly, Ile, Leu y Pro en <i>E. coli</i> .	35
3	Cepas Rosetta.	38
4	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>BnPA</i>	58
5	Componentes de la reacción de ligación del gen <i>BnPA</i> en el vector pET-28a(+)	63
6	Codones raros encontrados en la secuencia que codifica para la BnPA recombinante	87
7	Purificación de la peroxidasa BnPA recombinante	105
8	Efecto de la concentración de urea y glutatión oxidado en el replegamiento de la BnPA recombinante	106
9	Relación de actividades específicas obtenidas a diferentes temperaturas	112
10	Parámetros cinéticos de la peroxidasa nativa y la BnPA recombinante	115
11	Efecto de iones metálicos y sales en la actividad de la BnPA recombinante	116
12	Estructura secundaria de la peroxidasa nativa de nabo y de la BnPA recombinante	118
13	Parámetros termodinámicos de desnaturalización de la peroxidasa nativa y la BnPA recombinante	119
14	Soluciones y antibióticos utilizados en la clonación y	139

	expresión de la BnPA	
15	Concentraciones y absorbancias utilizadas para la preparación de la curva estándar de proteína	144
16	Valores de elipticidad (miligrados) y su conversión a elipticidad molar $[\theta]$.	147
17	Valores de f_u , T(K), K_{eq} y ΔG de desnaturalización	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Anillo pirrólico de la protoporfirina XI.	8
2	Representación de la estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano picante HRP-C (1H5A) determinada mediante cristalografía de rayos X.	9
3	Residuos de aminoácidos en la cavidad del grupo hemo de una peroxidasa típica de planta (cacahuete).	12
4	Ciclos peroxidativo e hidroxílico de la peroxidasa.	16
5	Mapa del vector pGEM-T.	30
6	Mapa del vector pET-28a(+).	34
7	Mapa del plásmido pRARE.	37
8	Interacción entre residuos cercanos en una proteína con una cola de histidinas y la matriz Ni-NTA.	43
9	Espectro de dicroísmo circular (DC) en el lejano ultravioleta (UV) asociado con varios tipos de estructura secundaria en proteínas.	47
10	Ilustración de la curva sigmoideal de una propiedad observable (F) con respecto a la variable (x) para una transición de dos estados.	51
11	Estrategia experimental general para la expresión y caracterización de la peroxidasa de nabo BnPA.	56
12	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de BnPA.	57
13	Amplificación del gen <i>BnPA</i> a 55°C.	78
14	Placa con colonias conteniendo medio Luria Bertani (LB)/Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)/ 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactósido (X-Gal)/ampicilina (AMP) transformadas con la construcción pGEMT:: <i>BnPA</i> .	79

15	Digestión del DNA de la clona TOPO:: <i>BnPA</i> y pGEMT:: <i>BnPA</i> .	80
16	Amplificación del gen <i>BnPA</i> de la clona pGEMT:: <i>BnPA</i> .	81
17	Placa conteniendo células competentes de <i>E. coli</i> Rosetta 2 previamente preparadas con CaCl ₂ y transformadas con 10 ng de DNA plasmídico circular.	83
18	Placa conteniendo células competentes de <i>E. coli</i> Rosetta-gami 2 previamente preparadas con CaCl ₂ y transformadas con 10 ng de DNA plasmídico circular.	84
19	Análisis de restricción del DNA de las clonas transformadas con la construcción pET-28a(+>:: <i>BnPA</i> .	85
20	Análisis de PCR del DNA de las clonas transformadas con la construcción pET-28a(+>:: <i>BnPA</i> .	86
21	Inducción de la proteína BnPA recombinante con 40 y 100 μM de IPTG.	89
22	Inducción de la proteína BnPA recombinante con 200, 500 y 1000 μM de IPTG.	90
23	Análisis de solubilidad de la proteína BnPA inducida con 40, 100 y 300 μM de IPTG.	92
24	Análisis de solubilidad de la proteína BnPA inducida con 300, 500 y 1000 μM de IPTG.	93
25	Expresión de la proteína BnPA recombinante en la cepa Rosetta-gami 2 a bajas temperaturas.	95
26	Análisis de solubilidad de la proteína BnPA a 25°C.	98
27	Purificación de la proteína BnPA recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.	99
28	Perfil de elución de la proteína BnPA de la columna de afinidad a níquel.	101
29	Gráfica de la elución de la proteína BnPA de la columna de afinidad a níquel	102

30	Gráfica de la elución de la proteína BnPA de la columna de filtración en gel	103
31	Peroxidasa recombinante BnPA obtenida de la cromatografía de filtración en gel	104
32	Espectro de absorción UV-vis de la peroxidasa BnPA recombinante purificada y replegada	108
33	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la peroxidasa BnPA recombinante usando ABTS como donador de H	110
34	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la peroxidasa BnPA recombinante	111
35	Gráfica de velocidad inicial de la catálisis realizada por BnPA (0.5 mg/ml) contra la concentración de sustrato ABTS en función de la concentración de H ₂ O ₂ .	113
36	Gráfica de los dobles recíprocos de la cinética de la peroxidasa recombinante BnPA (0.5 mg/ml)	114
37	Gráfica de ordenadas al origen de las rectas de la Fig 36 contra 1/H ₂ O ₂	114
38	Espectro de dicroísmo circular en la región del lejano UV de la peroxidasa nativa de nabo y la BnPA recombinante	117
39	Transición térmica de la desnaturalización de la peroxidasa nativa de nabo y la BnPA recombinante	119
40	Transferencia tipo "western" con anticuerpos anti-His de la BnPA recombinante purificada de células de <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3).	121
41	Curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA)	145
42	Curva de transición térmica de la desnaturalización de la BnPA recombinante	148
43	Gráfica de la Energía libre de Gibbs en función de la temperatura	151

I. INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas (E.C.1.11.1.7) son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos. Catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (donadores de hidrógeno) utilizando como uno de sus sustratos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las peroxidasas de plantas clase III, son glicoproteínas que contienen al grupo prostético hemo, un complejo formado entre un ión de hierro y una molécula de protoporfirina IX. Estas enzimas participan en la biosíntesis de la pared celular por la polimerización del alcohol cinamílico a lignina y el entrecruzamiento de proteínas estructurales (Hiraga *et al.*, 2001). Estudios de manipulación genética de otras peroxidasas en diversos organismos como tabaco (Kwon *et al.*, 2002), sugieren que las peroxidasas de plantas participan en respuesta a estrés (Yoshimura *et al.*, 2000).

Aunado a su función biológica, las peroxidasas tienen un tremendo valor comercial, lo que las hace aún más atractivas. Actualmente, las peroxidasas comercializadas se extraen del rábano picante (*A Armoracia rusticana*). De todas las peroxidasas de rábano picante, la isoenzima C (HRP-C) es la más abundante y se usa ampliamente como reactivo en síntesis orgánica, diagnóstico clínico, inmunoensayos enzimáticos y en destoxificación de compuestos fenólicos de aguas residuales (Veitch, 2004). Se han realizado diversos estudios encaminados a encontrar otras fuentes de peroxidasas disponibles con alta estabilidad térmica, especificidad por sustrato y bajos costos de extracción, sin embargo estas investigaciones no han sido exitosas (McEldoon y Dordick, 1996).

Una fuente alterna para la obtención de peroxidasas es el nabo (*Brassica napus*), el cual es un vegetal disponible en la región. Debido a que el nabo pertenece a la familia *Brassicaceae* al igual que *A. rusticana* se podría pensar en propiedades catalíticas similares a las del rábano picante. Se han purificado y caracterizado algunas isoenzimas de peroxidasa en *B. napus* (Agostini *et al.*, 1997, 2002; Duarte-Vázquez *et al.*, 2000, 2001, 2003a). Se ha sugerido que

algunas de estas peroxidases son capaces de oxidar compuestos fenólicos de aguas residuales con alta eficiencia (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003b; Quintanilla *et al.*, 2008) o pueden ser usadas en pruebas de diagnóstico (Agostini *et al.*, 2002). Sin embargo, la extracción de la enzima resulta ser un proceso tedioso del cual no se obtienen cantidades suficientes para su caracterización además de que resulta muy difícil aislar una isoenzima específica. Afortunadamente, existen técnicas alternativas como la clonación molecular que podrían ayudar en la producción de isoenzimas específicas que puedan ser utilizadas en aplicaciones particulares.

Hasta la fecha, sólo se ha reportado el aislamiento y caracterización de un gen de peroxidasa de *B. napus* (var. *huyou No. 1*), el cual resultó ser similar al de la HRP-C, sin embargo no se realizó la expresión de la peroxidasa recombinante (Wu *et al.*, 2006).

En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), recientemente se identificó y clonó el cDNA de una peroxidasa de nabo (*B. napus* L. var. *purple top white globe*), el cual es un vegetal disponible en la región. Con lo anterior se tiene la posibilidad de expresar la peroxidasa recombinante en un sistema heterólogo adecuado que permita producirla en cantidades suficientes para su caracterización y posterior uso en aplicaciones como remoción de compuestos fenólicos en aguas residuales.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Nabo (*Brassica napus* L. var. *purple top white globe*)

El nabo es un vegetal de la familia de las Crucíferas [*Brassicaceae*] y del género *Brassica*. Este género contiene cerca de 37 especies que incluyen raíces importantes de interés comercial como la rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*) y vegetales comestibles como la coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*), col de Bruselas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), repollo (*B. oleracea* var. *capitata*), col rizada (*Brassica napus* var. *acephala*), colirrábano (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*), col común (*Brassica oleracea* var. *viridis*), rábano (*Brassica rapa* var. *rapa*), y el brócoli (*B. oleracea* var. *Italica*). Este vegetal se cultiva comúnmente como hortaliza en los climas templados de todo el mundo por su suculenta raíz bulbosa. Las variedades tiernas se utilizan para el consumo humano, mientras que las mayores son utilizadas como forraje para el ganado. El nabo presenta hojas verdes y vellosas, una corona no diferenciada y una raíz relativamente pequeña. El nabo tiene un sabor acre, parecido al del repollo crudo o el rábano que se suaviza al cocinarlo. Los nabos llegan a pesar más de un kg, sin embargo se pueden cosechar cuando son más pequeños. Existen dos grupos de nabos: de pulpa color blanca y de pulpa color amarilla. El grupo de pulpa blanca es el más ampliamente cultivado. Dentro de este grupo se encuentra el nabo de la variedad purple top white globe.

2.2 Peroxidasas

El término peroxidasa se refiere a una enzima que cataliza la oxidoreducción entre peróxido de hidrógeno y una gran variedad de donadores de hidrógeno como fenoles, aminas aromáticas y otros ($H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A^\bullet$). Estas enzimas utilizan varios peróxidos (ROOH) como aceptores de electrones para catalizar dicha reacción de oxidación. Estas enzimas de óxido-reducción se

pueden encontrar bajo la misma clasificación E.C.1.11.1.x, oxidoreductasa donador:peróxido de hidrógeno (Fleischmann *et al* 2004). Actualmente, 15 diferentes clasificaciones del código enzimático (EC) catalogado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular se han incorporado a las reacciones catalizadas por peroxidasas: de EC 1.11.1.1 a 1.11.1.16 (la clasificación EC 1.11.1.4 se ha removido) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de peroxidasas según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Passardi *et al.*, 2007a).

Número EC	Nombre recomendado	Abreviación
EC 1.11.1.1	Peroxidasa NADH	NadPrx
EC 1.11.1.2	Peroxidasa NADPH	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.3	Peroxidasa de ácidos grasos	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.11 (antes EC 1.11.1.4)	Triptófano 2,3-dioxigenasa	Ya no se considera como una peroxidasa
EC 1.11.1.5	Citocromo-c Peroxidasa	CcP, DiHCcP
EC 1.11.1.6	Catalasa	CAT
EC 1.11.1.7	Peroxidasa	Hemo peroxidasas
EC 1.11.1.8	Yoduro peroxidasa	TPO
EC 1.11.1.9	Glutación peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.10	Cloruro peroxidasa	HalPrx, HalNPrx, HalVPrx
EC 1.11.1.11	L-Ascorbato peroxidasa	APx
EC 1.11.1.12	Glutación hidroperóxido fosfolipídico peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.13	Manganeso peroxidasa	MnP
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidasa	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxiredoxina	1CysPrx, 2CysPrx, PrxII/V/ PrxGrx, PrxQ/BCP
EC 1.11.1.16	Peroxidasa versátil	VP

2.3 Clasificación de las peroxidasas

Los genes que codifican para las peroxidasas se encuentran en casi todos los seres vivos. Se agrupan en dos superfamilias primordiales: una encontrada principalmente en bacterias, hongos y plantas (Passardi *et al.*, 2007b) y una segunda en animales, hongos y bacterias (Daiyasu y Toh, 2000; Furtmuller *et al.*, 2006). Los miembros de la superfamilia de las peroxidasas de plantas/hongos/bacterias, se han identificado en la mayoría de los organismos vivos excepto en animales. Solo los miembros del reino Animalia o metazoos y ciertos parásitos eucariotes no contienen ninguna secuencia que codifique para peroxidasas de esta familia. Tres clases independientes de peroxidasa se pueden identificar en base a diferencias en su estructura primaria (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001; Welinder 1992). La clase I incluye a las peroxidasas intracelulares como la citocromo-c peroxidasa (CcP), la ascorbato peroxidasa (APx) y la catalasa-peroxidasa (CP). La clase II incluye a las peroxidasas extracelulares de hongos tales como la lignina peroxidasa (Lip), manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (VP). Todas ellas son glicoproteínas monoméricas que contienen cuatro enlaces disulfuro conservados y dos sitios de unión a calcio. Presentan una secuencia que codifica para un péptido señal en el extremo amino terminal, para su secreción. Finalmente, las de la clase III son frecuentemente nombradas como peroxidasas “clásicas” de plantas, y son secretadas de la célula o transportadas a la vacuola. Todas las peroxidasas de plantas presentan la misma estructura general, que consiste de una molécula de ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y 10 α -hélices. Las peroxidasas de la clase III presentan además 3 α -hélices extra, aminoácidos altamente conservados y 4 enlaces disulfuro (Welinder 1992). Algunos ejemplos son las peroxidasas de cacahuate, rábano picante, soya y cebada.

La segunda superfamilia descrita como las peroxidasas de animales, comprende un grupo de proteínas encontradas principalmente en animales entre las que se encuentran la mieloperoxidasa (MPO), eosinófilo peroxidasa (EPO),

lactoperoxidasa (LPO), prostaglandina H sintasa (PGHS), peroxidasa (Pxd) y peroxinectina (Pxt) (Passardi *et al.*, 2007a).

2.4 Peroxidasas clase III

Los genes que codifican para las peroxidasas clase III forman una gran familia de multigenes (Tognolli *et al.* 2002; Duroux y Welinder 2003; Passardi *et al.* 2004b) presentes en todas las plantas de la tierra pero ausentes en las algas verdes unicelulares (Passardi *et al.* 2004b). Desde la aparición de la primera peroxidasa clase III, el número de copias de estos genes se ha ido incrementando en gran manera (Duroux y Welinder 2003; Passardi *et al.* 2004b), pudiéndose asociar con la adaptación de las plantas a la vida en la Tierra en presencia de concentraciones elevadas de oxígeno. La evolución de una familia de multigenes parece estar correlacionada con la complejidad de la arquitectura de la planta y la diversificación de sus biotipos y patógenos. En algunas plantas, una alta velocidad de duplicación ha llevado al origen de grandes familias de multigenes, como los sugieren la presencia de 138 genes que codifican para peroxidasas en arroz (*Oryza sativa*; Passardi *et al.*, 2004a) mientras que *Arabidopsis thaliana* codifica para 73 peroxidasas (Tognolli *et al.*, 2002). La idea de la subfuncionalización puede explicar la conservación de genes duplicados y la presencia de tales familias de multigenes en la cuales cada parólogo se ha llegado a especializar en una determinada tarea (Zhang, 2003).

La molécula de protoporfirina IX y los dos residuos de aminoácidos distales (Arg e His) son esenciales para la actividad catalítica de las peroxidasas de clase III, involucrando transferencia de electrones y protones. En el ciclo peroxidativo estándar, las peroxidasas catalizan la reducción de H_2O_2 mediante la donación de electrones de varias moléculas tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina, y metabolitos secundarios de auxina (Hiraga *et al.*, 2001). Sin embargo, poco se sabe de su función biológica en la planta.

El ejemplo más familiar de peroxidasas clásicas es la isoenzima C de rábano picante (HRP-C), la cual ha sido la más estudiada debido a su abundancia en esta hortaliza y a su disponibilidad. La HRP-C ocupa un papel importante en la historia de la enzimología, debido a su estabilidad, disponibilidad y a que la enzima purificada es frecuentemente usada como un modelo de la familia de las peroxidasas. La elucidación del modo de acción de la HRP-C junto con el conocimiento de su estructura molecular ha servido para ilustrar la estructura y el papel que desempeñan las peroxidasas de otros vegetales. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene el entendimiento completo de la función que desempeña esta enzima en el rábano picante (Robinson, 1991).

2.4.1 Estructura tridimensional y grupo prostético de las peroxidasas clase

III

Las peroxidasas de plantas están constituidas por una cadena polipeptídica sencilla de alrededor de 300 aminoácidos, protoporfirina IX (usualmente referida como grupo hemo, Fig 1) y dos átomos de calcio. Cuatro de los seis enlaces de coordinación del hierro interactúan con los nitrógenos del anillo pirrólico (Whitaker, 1994). En el caso de la HRP-C, la quinta posición del hierro está coordinada con el grupo imidazol del residuo proximal de His-170 y una molécula de agua en la sexta posición.

Las peroxidasas de la clase III se caracterizan por contar con sitios de glicosilación identificados por la secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido, excepto Pro) localizados en superficies expuestas o en vueltas que conectan estructuras de α -hélices, quedando así los glicanos expuestos al medio acuoso. La mayoría de las peroxidasas de plantas tienen N-glicanos y el contenido total de carbohidratos puede llegar hasta el 25% en peso. La glicosilación en una proteína tiene diversas funciones, tales como mantener la conformación, estabilidad y plegamiento, protección de proteólisis no controlada, señalización y organización intracelular (Lerouge *et al.*, 1998).

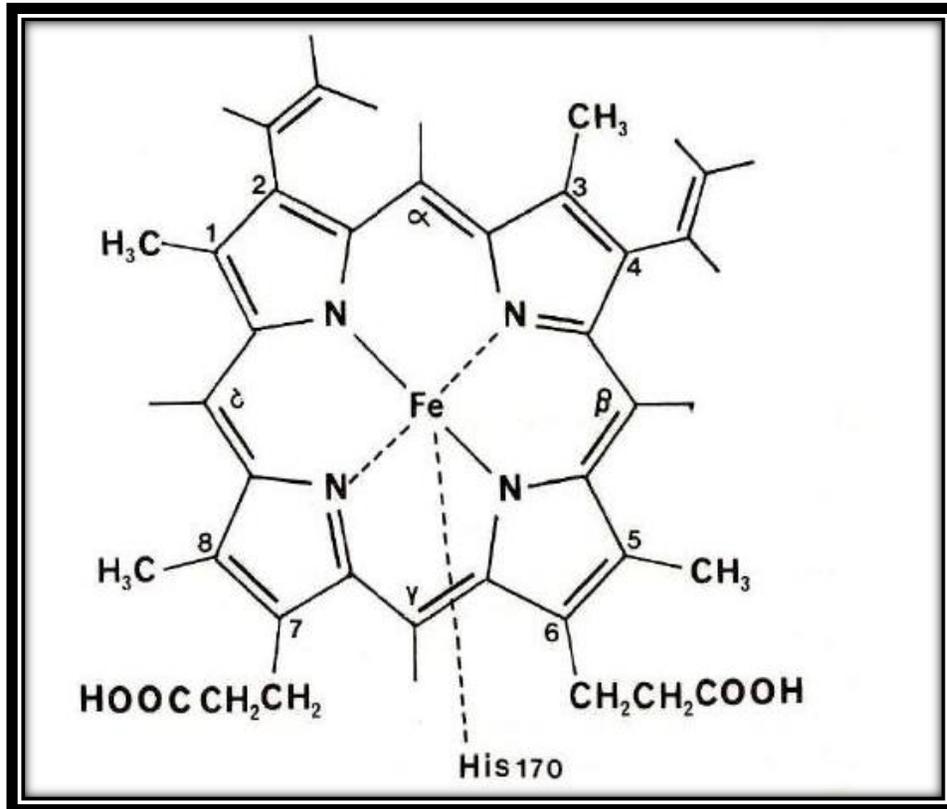


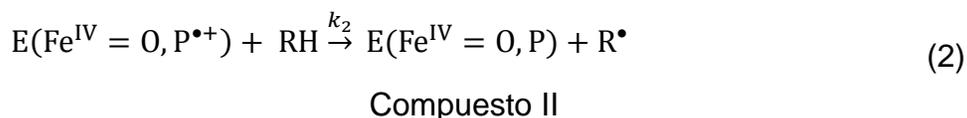
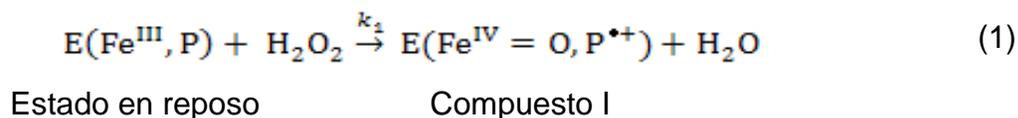
Figura 1. Anillo pirrólico de la protoporfirina IX. El ión férrico se coordina a los 4 nitrógenos del anillo pirrólico. Presenta una quinta coordinación con la His-170 del dominio proximal. Contiene una sexta posición que se coordina con una molécula de agua (no mostrada) (Wong, 1995).

El calcio es un constituyente endógeno de la peroxidasa (Fig 2, esferas azules). HRP-C contiene dos Ca^{+2} por molécula, unidos mediante interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals y juegan un papel importante en la estabilidad estructural. La remoción de Ca^{+2} de HRP-C provoca una disminución moderada en la actividad específica y drástica en la estabilidad térmica (Shiro *et al.*, 1986). Los sitios de unión a calcio se encuentran en los residuos invariables Asp-99 y Arg-123 (para HRP-C). Otros elementos estructurales de importancia son los cuatro enlaces disulfuro basados en los residuos Cys invariantes: 11-91, 44-49, 97-310 y 177-209 (para HRP-C).

De acuerdo con la estructura de la peroxidasa (Figura 2), el grupo hemo se sitúa entre los dominios distal y proximal. La estructura es básicamente α -hélices (10 hélices de la A a la J) que ocupan posiciones similares, topológicamente correspondientes a las hélices de estructuras determinadas para otros miembros de la superfamilia de las peroxidases de plantas.

2.4.2 Mecanismo de reacción de la peroxidasa

La relación entre los diferentes componentes de las peroxidases de plantas y la función de este grupo de enzimas se puede estudiar en dos niveles, la reacción con peróxido y la interacción con sustratos reductores. El mecanismo catalítico de la enzima peroxidasa se puede expresar mediante las siguientes ecuaciones:



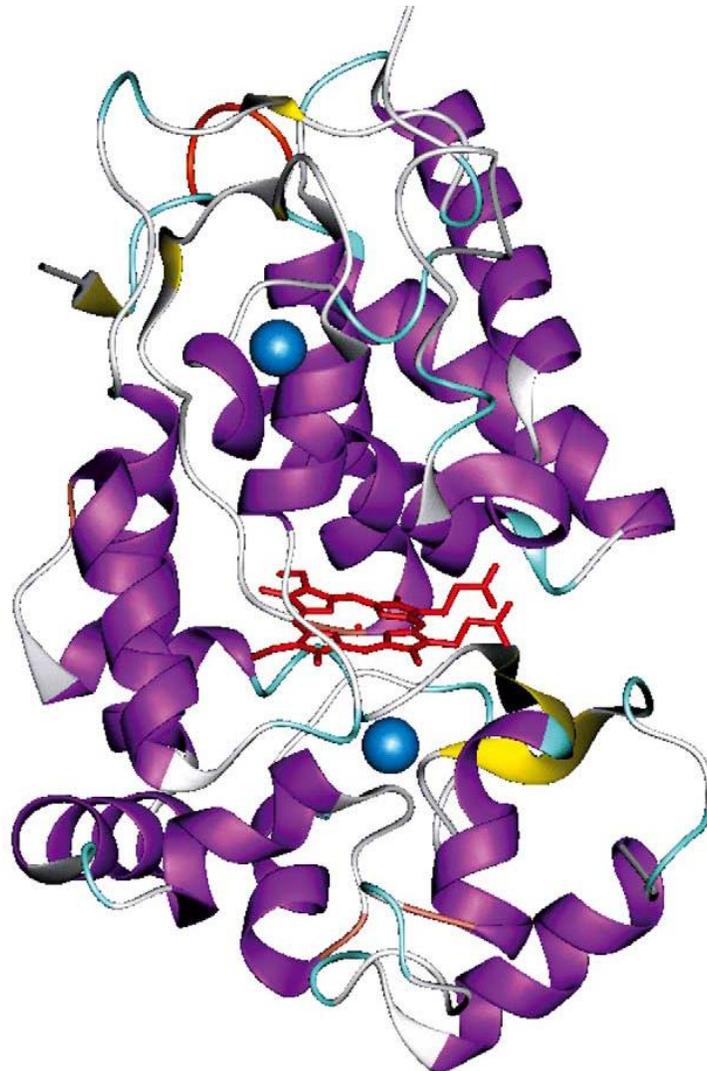
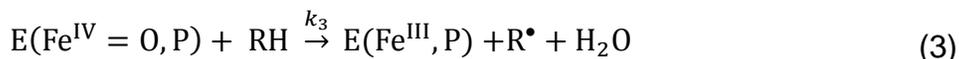


Figura 2. Representación de la estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano picante HRP-C (1H5A) determinada mediante cristalografía de rayos X. El grupo hemo (rojo) ocupa la posición central entre los dominios distal (arriba del grupo hemo) y proximal (debajo del grupo hemo) de la molécula. Ambos dominios contienen un átomo de calcio (esferas azules). Las regiones de α -hélices y β -plegadas de la enzima se muestran en morado y amarillo, respectivamente. Las α -hélices F' y F'' son una característica única de las peroxidosas de la clase III y aparecen en la parte inferior derecha de la molécula (Veitch, 2004a).



Estado en reposo

En estas ecuaciones, E representa una peroxidasa de clase III para la cual el estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo y el estado de la porfirina (P) se indican en paréntesis. RH y R[•] representan un sustrato reductor y su radical oxidado, respectivamente. Las constantes k_1 , k_2 y k_3 son las tasas de formación del compuesto I, reducción del compuesto I y reducción del compuesto II, respectivamente. El primer paso en este ciclo, la reacción entre el estado en reposo de la enzima y el peróxido de hidrógeno, se representa por la ecuación (1). Esto genera el intermediario de alto estado de oxidación conocido como el compuesto I, el cual se considera como dos equivalentes de oxidación arriba del estado de reposo del Fe(III) de la enzima. Este intermediario está formado por un centro oxoferril Fe(IV) y un radical catiónico de la porfirina. En el primero de dos pasos subsecuentes de reducción por un electrón, el compuesto I se reduce al compuesto II y el sustrato RH se oxida a su producto radical R[•]. El compuesto II, una segunda especie de oxoferril Fe(IV), está un equivalente de oxidación arriba del estado de reposo de la enzima. El ciclo se completa mediante un segundo paso de reducción por un electrón esquematizado por la ecuación (3), en el cual otra molécula de sustrato reductor se oxida a su correspondiente producto radical. El mecanismo de cada una de estas tres reacciones se ha investigado en gran detalle, y se puede considerar en dos partes, la formación del compuesto I y la reducción de los compuestos I y II (Passardi *et al.* 2004b).

2.4.3 Papel de los residuos de aminoácidos del grupo hemo en la catálisis

La relación estructural entre los residuos en la cavidad del grupo hemo involucrados en la catálisis de la peroxidasa se ilustra en la Figura 3. Estos residuos son invariantes o altamente conservados en todas las peroxidosas de plantas de clase III. Usando el ejemplo de la peroxidasa de cacahuate, se puede

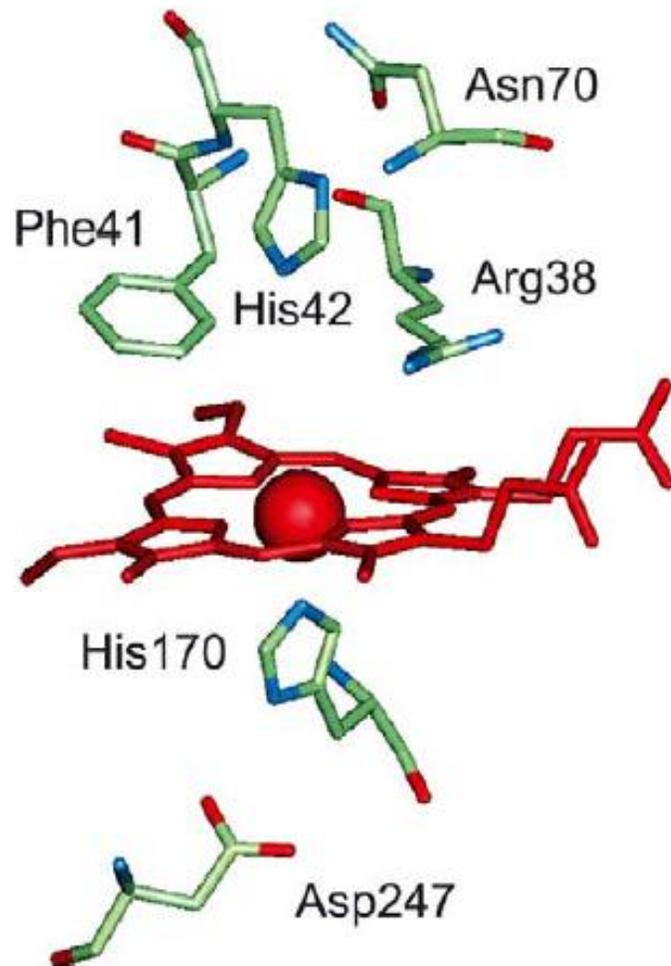


Figura 3. Residuos de aminoácidos en la cavidad del grupo hemo de una peroxidasa típica de planta (cacahuete). El átomo de Fe(III) se muestra como una esfera de van der Waals y se coordina con el residuo de His proximal (His170 en HRP-C). El sexto sitio de coordinación en el extremo distal del plano hemo está libre (Veitch, 2004b).

observar en el sitio proximal del plano hemo, que la His169 se coordina directamente con el átomo de hierro del grupo hemo. Además, la cadena de carboxilato de Asp238 forma un puente de hidrógeno con el protón del nitrógeno 1 de la His169 proximal. En el sitio distal del plano del grupo hemo, los residuos de mayor importancia son Arg38, His42 y Asn70. Una interacción de importancia es el puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno carbonilo de la Asn70 y el nitrógeno 1 de la His42. La presencia de pares de residuos His-Asn e His-Asp en ambos dominios, es una evidencia que sugiere que las peroxidasas de plantas evolucionaron mediante duplicación de genes (Welinder y Gajhede, 1993).

2.5 Papel fisiológico.

Las peroxidasas catalizan la reducción de H_2O_2 mediante la oxidación de varias moléculas donadoras como compuestos fenólicos, precursores de lignina y metabolitos secundarios de auxina. Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en las hojas, tallos y raíces de la planta, encontrándose la mayor actividad en las raíces. El contenido de peroxidasas no solo varía con la localización sino con la madurez y estación. Sin embargo, poco se conoce a cerca de su localización celular, microambiente o participación específica de la enzima en vías fisiológicas.

Las peroxidasas son miembros de una larga familia multigénica. Probablemente debido a este alto número de isoformas y a la regulación heterogénea de su expresión, las peroxidasas de plantas están involucradas en un amplio rango de procesos fisiológicos a lo largo del ciclo de vida de la planta. Debido a sus dos ciclos catalíticos, el peroxidativo e hidroxílico (Fig. 4), las peroxidasas pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) ($\bullet OH$, $HOO\bullet$), polimerizar compuestos de la pared celular y regular los niveles de H_2O_2 . Estas enzimas multifuncionales pueden construir una pared rígida o producir ROS para hacerla más flexible; pueden prevenir ataques biológicos y químicos al formar barreras físicas o contraatacando con la formación de grandes cantidades de

ROS; o bien, pueden participar en una simbiosis más amigable. Finalmente, las peroxidasas están presentes desde las primeras horas de la vida de la planta hasta sus últimos momentos. Aunque algunas funciones parecen paradójicas, como lo son mecanismos asociados con procesos de elongación celular pero también con reacciones que restringen el crecimiento, el proceso entero es probablemente regulado por una fina sintonización que no ha sido elucidada (Passardi *et al.*, 2004b).

2.5.1 Germinación

Se ha reportado la liberación de peroxidasas y ROS durante la germinación en el medio que rodea la semilla en rábano (*Raphanus sativus*), ya que pueden generar H_2O_2 y subsecuentemente radicales $\bullet OH$ mediante el ciclo hidroxílico. Las ROS liberadas durante este ciclo pueden jugar un papel de defensa de las semillas contra patógenos, aunque también son secretadas en ausencia de organismos patógenos (Scialabba *et al.*, 2002).

La actividad de peroxidasa en las semillas no es causada por una simple enzima, ya que más bien varias actividades se traslapan. Antes de la germinación, la baja actividad de las peroxidasas se debe a isoenzimas de 84 kDa localizadas en el tegumento y en los cotiledones y de 48.5 kDa localizadas en los ejes del embrión. Después de la germinación, además de éstas enzimas aparecen siete isoenzimas más, indicando que las peroxidasas están poco representadas en la semilla antes de la germinación pero juegan un papel significativo durante el desarrollo de la plántula (Bellani *et al.*, 2002). Se ha reportado que una peroxidasa es fuertemente inducida en semillas de rábano germinadas artificialmente, de tal modo que las semillas son protegidas contra la peroxidación lipídica (Scialabba *et al.*, 2002). La producción de radicales $\bullet OH$ por las peroxidasas podría contribuir al rompimiento de la capa externa de la semilla y a la subsecuente elongación celular. Las peroxidasas pueden también participar en la lignificación de elementos nuevos del xilema.

2.5.2 Crecimiento celular y ablandamiento de la pared celular

El crecimiento y la elongación están relacionados con la extensibilidad celular, lo cual ocurre con un ablandamiento del grado de entrecruzamiento de los componentes de la pared celular.

El nivel de H_2O_2 se puede relacionar al proceso de elongación. Por ejemplo, en las dicotiledóneas como la soya, el nivel de H_2O_2 apoplástico (espacio extracelular periférico a la membrana celular de las células vegetales por el que fluyen agua y otras sustancias) es bajo en la zona de elongación del hipocotilo (Schopfer, 1994). En *A. thaliana*, la elongación durante la curvatura de la raíz es también regulada por una variación en la concentración de H_2O_2 (Joo *et al.*, 2001).

Otros compuestos tales como los radicales hidroxilo ($\bullet OH$) podrían estar implicados en los procesos de elongación y expansión. Este radical altamente reactivo producido mediante la reacción de Fenton (reacción en la que el H_2O_2 oxida al Fe^{2+} a Fe^{3+} y se generan radicales $\bullet OH$), es capaz de romper polisacáridos de la pared celular tales como pectina y xiloglucano. Los radicales hidroxilo se pueden producir a nivel celular a partir del radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y H_2O_2 por la peroxidasa (Schweikert *et al.*, 2000) El análisis de estos resultados sugiere que las peroxidases pueden regular la elongación en diferentes maneras debido a sus dos ciclos y al variado número de isoformas.

Pueden ser controladas por ascorbato y pueden entonces inducir el proceso de elongación mediante la generación de $\bullet OH$ (ciclo hidroxílico, Fig. 4) o mediante la regulación de la concentración local de H_2O_2 (debido a ambos ciclos).

Sin embargo, las peroxidases no juegan solo el papel de la elongación, sino que pueden incluso inhibir físicamente el proceso de elongación mediante la creación de entrecruzamientos en la pared celular (ciclo peroxidativo) (Passardi *et al.*, 2004b).

2.5.3 Entrecruzamiento de la pared celular y senescencia

Las peroxidadas pueden controlar la disponibilidad de H_2O_2 en la pared celular, lo cual es un pre-requisito para el entrecruzamiento de grupos fenólicos a fin de inhibir la elongación celular. Las peroxidadas catalizan este proceso en respuesta a varios factores externos tales como daño mecánico, patógenos y

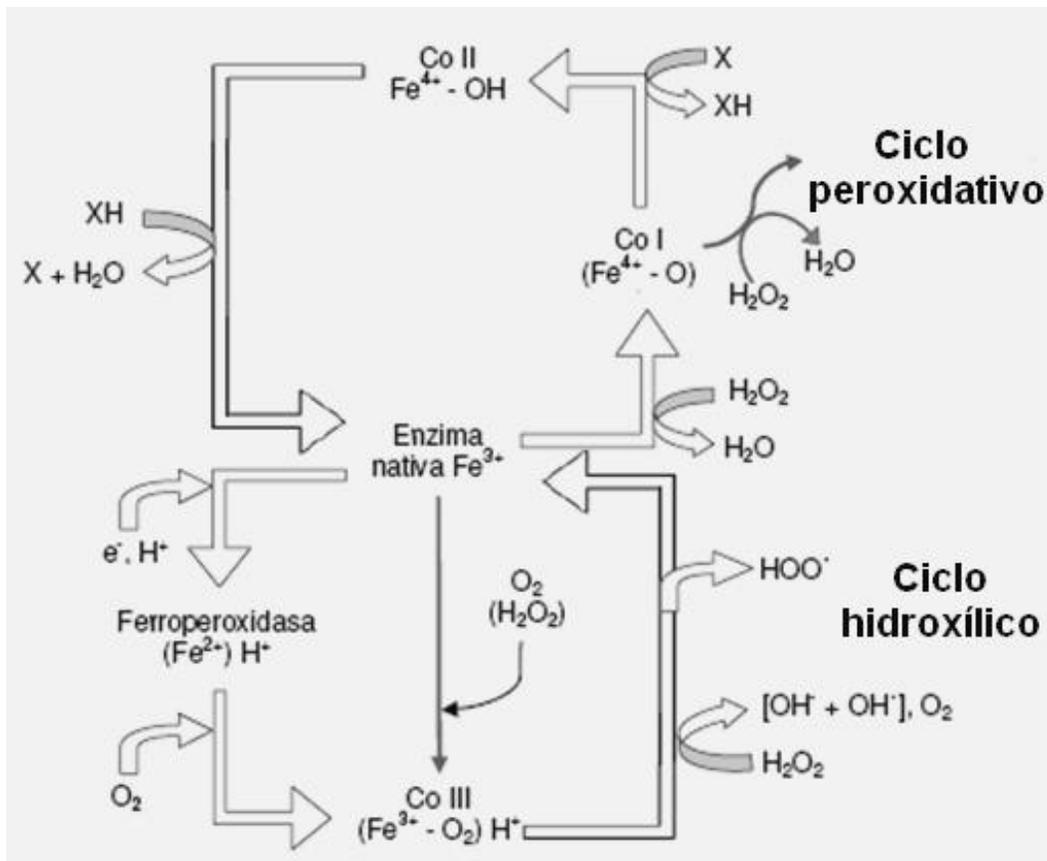


Figura 4. Ciclos peroxidativo e hidroxílico de la peroxidasa (Passardi *et al.*, 2005).

Co I, compuesto I; Co II, compuesto II; Co III, compuesto III.

estrés ambiental, o solo como parte del desarrollo de la pared celular durante el crecimiento, diferenciación y senescencia. La deshidratación e invasión de patógenos puede ser limitada por la formación de una barrera física de lignina o suberina, en donde la rigidez de la pared celular dependerá del entrecruzamiento, mediado por peroxidasa, de diferentes compuestos. Los ferulatos unidos a polisacáridos (unidos a lignina o no), las extensinas (no unidas a lignina) y los monómeros de lignina, forman una red compleja que solidifica la pared celular de la planta. La implicación bioquímica de las peroxidasas en tales procesos mecánicos está relacionada con el ciclo peroxidativo.

La senescencia es el estado final antes de la muerte del tejido, es dependiente de varias hormonas de plantas, como las citocininas que previenen el inicio de la senescencia, en contraste, el ácido salicílico induce la senescencia *in vivo* (Morris *et al.*, 2000). Se han reportado cambios en la expresión de genes durante la senescencia, una disminución de genes asociados con la fotosíntesis y un incremento en genes asociados con la senescencia.

Especies de ROS tales como $O_2^{\bullet-}$, están implicadas en la inducción y desarrollo del estado de senescencia. El radical $O_2^{\bullet-}$ puede ser generado por la actividad de peroxidasas extracelulares después del tratamiento con ácido salicílico de cultivos en suspensión de células de tabaco y así puede inducirse la vía metabólica de la senescencia (Kawano *et al.*, 1998). Además, la actividad total de peroxidasa aumentó durante la extensión de la hoja de arabidopsis y en tejidos envejecidos, con un fuerte incremento al final de la extensión de la hoja (Abarca *et al.*, 2001). En conclusión, se ha sugerido que las peroxidasas están involucradas en la senescencia de plantas vía su implicación en el control de la pared celular, primero mediante la generación de ROS como posibles moléculas de señalización y segundo, mediante el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular secundaria (Passardi *et al.*, 2004b).

2.5.4 Lignificación, suberización y uniones diferólicas

El entrecruzamiento de monómeros fenólicos en la formación de suberina y el acoplamiento oxidativo de subunidades de lignina como parte de la biosíntesis de lignina están relacionados con la formación de la pared celular secundaria (Blee *et al.*, 2003), y asociados con la reducción de extensibilidad y el crecimiento. Las peroxidasas (Lewis y Yamamoto, 1990) y lacasas (Kiefer *et al.* 1996) son candidatas para la oxidación de monolignoles, lo cual antecede el paso final de la síntesis de lignina. Usando H₂O₂ como agente oxidante, las peroxidasas pueden generar radicales fenoxi que se acoplan espontáneamente a los polímeros de lignina. Por ejemplo, la expresión de la peroxidasa TP60 de tabaco es coordinada con enzimas específicas de la ruta de la lignina tales como ferulato-5-hidroxilasa, cinamoil CoA reductasa y cinamil alcohol deshidrogenasa. El silenciamiento del gen de la TP60 conduce a una reducción del contenido de lignina asociado con una disminución de monolignoles guaicil y siringil (Blee *et al.*, 2003). Se ha demostrado que algunas peroxidasas como la HRP A2 de rábano picante, la AtPrx53 (ATPA2) de arabidopsis y varias peroxidasas catiónicas de tomate (TPX1) están implicadas en procesos de lignificación (Ostergaard *et al.*, 2000; Quiroga *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001).

El proceso de lignificación no está limitado al ensamblamiento de unidades fenólicas. La red de la pared celular es más rígida por la asociación de monolignoles a polisacáridos y por el entrecruzamiento interno de polisacáridos (principalmente celulosa y pectina) a través de la formación de enlaces diferulato (Iiyama *et al.*, 1994). La relación entre la formación de diferulatos y peroxidasas es bien conocido *in vitro*, ya que diferentes fracciones de peroxidasas de *Pinus elliotti* (soluble, iónica y covalentemente unida) fueron aisladas de citoplasma y pared de células de callo y sólo la fracción de la pared celular del callo exhibió actividad de oxidación de ácido ferúlico (Whitmore, 1976).

Las peroxidasas también juegan un papel en la construcción de una red densa de extensinas destinada a proveer de rigidez a la pared celular, y se han aislado de una gran variedad de plantas (Schnabelrauch *et al.*, 1996; Magliano y

Casal, 1998); son conocidas por actuar en la región fenólica de Tyr y puede ser incluso en Lys, por lo tanto creando enlaces Tyr–Tyr o Tyr–Lys (Schnabelrauch *et al.*, 1996).

2.5.5 Estrés biótico y abiótico y respuesta a daños celulares

Las plantas expuestas a estrés agudo son conocidas por inducir la expresión de peroxidasas. Esta reacción sucede igualmente con varios factores abióticos y bióticos tanto químicos (metal pesado, contaminación industrial), biológicos (patógenos) o físicos (heridas). La expresión de peroxidasas resulta en la defensa de la planta en forma pasiva (construcción de paredes fuertes) o activamente (producción de ROS contra organismos invasores).

El daño causado por varios factores bióticos y abióticos origina estrés a las plantas el cual puede originar pérdida de órganos y la fácil penetración de patógenos. Las plantas responden al daño mediante la activación de sistemas de autodefensa para remediar el daño a tejidos o la defensa contra el ataque de patógenos y herbívoros. Entre el gran número de proteínas inducidas, se ha mostrado un incremento en la actividad de peroxidasas o en sus niveles de mRNA después de daño mecánico en varias plantas, incluyendo tomate, arroz y rábano picante (Chittoor *et al.*, 1997; Kawaoka *et al.*, 2003).

La suberina se deposita en los tejidos dañados ya que es una macromolécula altamente hidrofóbica compuesta de ácido hidroxicinámico, sus derivados contienen conjugados alifáticos, y la deposición de suberina alrededor del tejido dañado podría ayudar a sanar la herida (Kolattukudy, 1980). No solo la suberina es sustrato de la peroxidasa, si no que patrones de expresión espacial y a diferentes tiempos de peroxidasas aniónicas inducidas por daño, mostraron estar altamente relacionados con la deposición de suberina, sugiriendo así la participación de la enzima peroxidasa en la suberización (Bernards *et al.*, 1999).

2.5.6 Defensa contra infección por patógenos

Después de una infección por patógenos, las plantas sintetizan un conjunto de proteínas relacionadas con defensa (proteínas PR) las cuales se inducen en situaciones patológicas (van Loon *et al.*, 1994). Se ha reportado la inducción de peroxidasas por infección con hongos (Thordal *et al.*, 1992), bacterias (Reimers *et al.*, 1992) y virus (Hiraga *et al.*, 2000). De este modo, las peroxidasas inducidas por ataques de patógenos se han clasificado dentro de la familia de las proteínas PR (PR-9; van Loon *et al.*, 1994).

Muchos estudios han indicado la importancia de las peroxidasas en defensa contra patógenos. En tabaco, se encontró una correlación positiva entre la actividad de peroxidasa y la resistencia a enfermedades en tabaco. Una isoenzima catiónica se indujo más rápidamente y a alto nivel cuando plantas de arroz fueron infectadas con una cepa incompatible de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Reimers *et al.*, 1992). Los papeles de las peroxidasas en defensa son los siguientes: (1) reforzamiento de las barreras físicas de la pared celular como lignina, suberina y glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (Bowles, 1990); (2) producción enriquecida de ROS como mediadores y agentes antimicrobianos (Kawano y Muto, 2000); y (3) producción de fitoalexina (Kristensen *et al.*, 1999).

2.6 Aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas

La reducción de peróxidos a expensas de sustratos donadores de electrones, hacen útiles a las peroxidasas en un gran número de aplicaciones industriales y analíticas. Debido a la naturaleza oxidativa de las peroxidasas, existe una diversidad de áreas donde éstas podrían remplazar a las técnicas de oxidación química utilizadas actualmente. Los principales procesos de interés biotecnológico de las peroxidasas se describen a continuación.

2.6.1 Decoloración de colorantes sintéticos

Algunos autores han mostrado que la destrucción oxidativa de compuestos teñidos es estimulada por enzimas oxidativas y puede ser de interés práctico para la decoloración de colorantes sintéticos (Bhunia *et al.*, 2002). Enzimas como lignina (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) se han asociado con la degradación de lignina y se han usado en la decoloración de colorantes sintéticos como Naranja II y otros (Thurston, 1994; Chivukula *et al.*, 1995).

La peroxidasa de rábano picante (HRP) es conocida por degradar ciertos compuestos orgánicos recalcitrantes como fenol y sus derivados vía un mecanismo de polimerización de radicales libres (Tatsumi *et al.*, 1996). Bhunia *et al.* (2002), mostraron que la HRP puede ser efectiva degradando y precipitando importantes colorantes industriales tales como azul de Remazol. Este colorante industrial contiene al menos un grupo aromático en su estructura, haciéndolo un posible sustrato de la HRP.

2.6.2 Síntesis orgánica de polímeros

Los radicales libres producidos por las peroxidases, pueden participar en diferentes reacciones post-enzimáticas. La polimerización oxidativa de compuestos aromáticos catalizada por oxidoreductasas se ha estudiado para crear nuevos polímeros funcionales y sintetizar resinas fenólicas con una buena conversión quimioselectiva. Esto se puede hacer sin utilizar formaldehído tóxico, el cual se usa en la polimerización química (Hutterman *et al.*, 2001).

La HRP se ha usado para polimerizar compuestos fenólicos y aromáticos mientras que nuevos tipos de polímeros aromáticos se han sintetizado en solventes a base de agua y solventes orgánicos solubles en agua (Oguchi *et al.*, 1999).

El cardanol es un derivado del fenol y contiene una cadena alifática de 15C insaturados con 3 dobles enlaces en la posición *meta* (Ikeda *et al.*, 2000). Este compuesto se ha utilizado como materia prima para producir resinas. En

2003, Kim y colaboradores reportaron que una peroxidasa de soya catalizó la polimerización oxidativa de cardanol, usando metanol, etanol, 2-propanol, alcohol *t*-butílico o 1-4-dioxano. Se obtuvo un alto rendimiento (62 %) usando 2-propanol como solvente. Sin embargo, el uso de HRP resultó en una ineficiente polimerización de cardanol.

La producción de polímeros conductores tiene un fuerte interés debido a su amplio rango de aplicaciones, incluyendo la protección anticorrosiva, exposición óptica, diodos para exposición de luz, etc (Raitman *et al.*, 2002). La polianilina es uno de los polímeros conductores más extensamente estudiado debido a su alta estabilidad ambiental y buenas propiedades electrónicas. La polianilina se sintetiza mediante la oxidación de monómeros de anilina bajo condiciones de acidez extrema y baja temperatura usando persulfato de amonio como iniciador de la polimerización radical (Rannou *et al.*, 1998). Sin embargo los métodos químicos pueden llegar a ser agresivos con el medio ambiente debido a las condiciones extremas de acidez por lo que la polimerización enzimática de la anilina es un método alternativo atractivo para la síntesis de polianilina. La HRP se ha utilizado en la síntesis de polianilina (Lui *et al.*, 1999). Sin embargo, la HRP muestra baja actividad hacia anilina y poca estabilidad a pH menor a 4.5 (Chottopadhyay, 2000), por lo que la búsqueda de nuevas peroxidases con buena estabilidad a pH bajo continúa siendo de interés en el área de síntesis de polímeros.

2.6.3 Biorremediación de compuestos fenólicos

Los compuestos aromáticos como fenoles y sus derivados, representan una buena parte de los contaminantes en aguas residuales derivados de un gran número de industrias químicas y de alimentos. Se sabe que los fenoles son sustancias tóxicas y carcinogénicas que se pueden acumular en la cadena alimenticia. Debido a su toxicidad, los fenoles están fuertemente regulados en muchos países, debiendo ser removidos de las aguas residuales antes de que sean descargadas al medio ambiente (Karam, 1997).

Un método para la remoción de fenol incluye la polimerización usando enzimas redox. Como se mencionó anteriormente, en presencia de peróxido de hidrógeno (aceptor de electrones), la peroxidasa puede catalizar la polimerización oxidativa de fenoles, anilinas y otros compuestos aromáticos para formar polímeros insolubles (Dunford y Stillman, 1976). El material insoluble puede ser removido usando un sistema de sedimentación o filtración.

La mayoría de los reportes de destoxificación de aguas residuales contaminadas con fenoles, cresoles y fenoles clorados, han usado HRP. Sin embargo, recientemente se ha sugerido a las peroxidases de otras fuentes como de soya (Kennedy *et al.*, 2002) y nabo (Quintanilla *et al.*, 2008a, 2008b) como alternativas a la de rábano picante.

Quintanilla y colaboradores (2008a) reportaron el aislamiento, modificación química e inmovilización en alginato de una peroxidasa de nabo (TP). TP fue exitosa en la polimerización oxidativa de soluciones sintéticas de compuestos fenólicos obteniéndose una remoción de fenoles de más del 65% en un total de 17 ciclos efectivos de contacto. En otro estudio, la peroxidasa de nabo (TP) se inmovilizó a esferas de alginato y de manera covalente a una matriz de agarosa. TP fue capaz de remover más del 90% de los compuestos fenólicos de un efluente industrial durante los primeros 10 ciclos de reacción (Quintanilla *et al.*, 2008b).

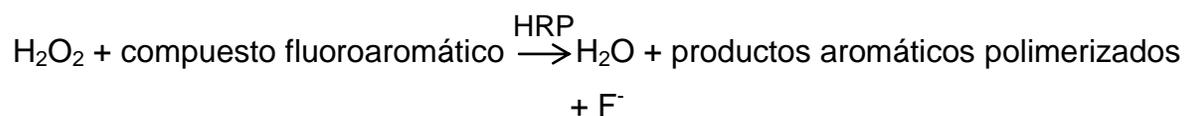
2.6. 4 Biosensores

Un campo que ofrece gran potencial para la aplicación de peroxidases son los biosensores electroquímicos. Recientemente, se han usado ampliamente los electrodos basados en peroxidases en sistemas analíticos para la determinación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos (Jia *et al.*, 2002). Algunas peroxidases de plantas (tabaco, cacahuete, camote y la HRP) se han caracterizado cinéticamente en grafito con el objetivo de encontrar candidatos para aplicaciones como biosensores y entender la naturaleza de la transferencia

de electrones directa para el caso de las peroxidasas de plantas. Las peroxidasas aniónicas (de camote y tabaco) demostraron un porcentaje mayor de moléculas en contacto en la transferencia directa de electrones que las catiónicas (HRP y de cacahuate). Las peroxidasas con alto grado de glicosilación demostraron un bajo porcentaje de moléculas en la transferencia directa de electrones. Del estudio se concluyó que la glicosilación de las peroxidasas dificulta la transferencia directa de electrones y que una carga negativa neta en la peroxidasa (bajo valor de punto isoeléctrico) es benéfico para la transferencia directa de electrones (Lindgren *et al.*, 2000).

La enzima HRP nativa y recombinante (producida en *E. coli*) fue utilizada para preparar electrodos de oro para la detección de peróxido de hidrógeno. Todas las formas de HRP formaron una monocapa de la enzima en la superficie del metal, sin embargo solo los electrodos con la enzima HRP recombinante exhibieron una respuesta alta y estable hacia H₂O₂ debido a su reducción bioelectrocatalítica basada en la transferencia directa de electrones entre el oro y la HRP (Ferafontova *et al.*, 2001).

Aunque la medición habitual de H₂O₂ se basa en el método espectrofotométrico, el uso de procedimientos potenciométricos alternativos para el ensayo enzimático es atractivo debido a su simplicidad y rapidez. En este contexto, se han desarrollado electrodos selectivos para iones fluoruro para el ensayo de la HRP, glucosa y colesterol. Este método potenciométrico se basa en la reacción bi-sustrato en la cual la hemo-proteína cataliza la oxidación de compuestos aromáticos halogenados donadores de H (por ejemplo, el 4-fluorofenol) y la liberación de iones fluoruro:



Sin embargo, de acuerdo a este mecanismo los radicales libres producidos pueden iniciar una variedad de reacciones no enzimáticas incluyendo la degradación y muchos procesos de polimerización. Desde el punto de vista del

impacto de esta reacción indicadora y su potencial aplicación, se ha mejorado el desarrollo de esta reacción potenciométrica de oxidación catalizada por la enzima HRP mediante un análisis combinado de una variable a un tiempo, diseño factorial completo y metodología de superficie de respuesta. El método optimizado fue exitosamente validado por el ensayo de H_2O_2 en muestra de productos comerciales y comparado con los valores correspondientes obtenidos respecto al método espectrofotométrico (Deyhimi y Nami, 2011).

2.6.5 Análisis clínico y diagnóstico

La HRP es la enzima más comúnmente utilizada para aplicaciones analíticas. Sin embargo, las peroxidasa de otras fuentes podrían ser una buena alternativa como sustitutos. Sharma *et al.*, (2002), desarrollaron una biotira, que es una tecnología simple y económica para la estimación de lactosa mediante la inmovilización de β -galactosidasa, galactosa oxidasa y HRP en un soporte polimérico, y se pudo estimar lactosa en leche en un rango de 20-100 g/l. Debido a la habilidad de la enzima peroxidasa para generar productos cromogénicos a bajas concentraciones y su relativamente buena estabilidad, es adecuada para la preparación de conjugados enzima-anticuerpos y en kits de diagnóstico (Krell, 1991). Agostini *et al.*, (2002), purificaron varias peroxidasa de cultivo de raíces de nabo (*Brassica napus*) *in vitro* y desarrollaron un kit de diagnóstico para la determinación de ácido úrico. Se compararon las constantes cinéticas de la peroxidasa básica HR2 con aquellas de la HRP-C la cual se usa comúnmente en diagnóstico. Los resultados para HR2 indicaron que es más resistente a la inactivación por H_2O_2 que la HRP-C. El análisis del ácido úrico de diez diferentes pacientes mostró los mismos resultados usando el kit que contenía a la peroxidasa de nabo o el disponible comercialmente. Esto confirma que la peroxidasa básica obtenida de raíces sumergidas de nabo se podría usar como un reactivo para diagnóstico clínico o como parte de un kit donde se genere H_2O_2 .

2.6.6 Inmunoensayos enzimáticos

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) también conocido como EIA, es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color. Para esto, es necesario de un anticuerpo específico para un antígeno ligado a una enzima así como un sustrato cromogénico, el cual en presencia de la enzima cambia de color. La cantidad de color desarrollado es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

La HRP es probablemente la mejor enzima para la preparación de conjugados enzima-anticuerpos los cuales se utilizan en ensayos tipo ELISA, debido a su habilidad para generar productos cromogénicos a bajas concentraciones (Krell, 1991). Acopladas con otras enzimas en sistemas polienzimáticos, las peroxidasas se usan en la determinación de analitos, tales como glucosa en sangre, ácido úrico.

Grigorenko y col. (2001) describen por primera vez la producción de una fusión recombinante de una proteína analito con la HRP en *E. coli*. El analito es la proteína de unión a ácidos grasos de corazón humano (H-FABP), utilizada recientemente como un sensible marcador para infarto al miocardio agudo. El inmunoensayo competitivo que se desarrolló con el conjugado recombinante requirió de menos pasos de incubación que el tradicional sándwich ELISA y permitió la detección de H-FABP directamente de plasma sanguíneo en el rango clínico de 10-1500 ng/ml.

Otras Fuentes de peroxidasa se han utilizado para la producción de conjugados. Sakharov y col (2006) optimizaron la producción de conjugados de peroxidasa de soya (SbP) y anticuerpos (Ab) anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón. Se desarrolló exitosamente un sándwich tipo ELISA para la determinación de IgG de ratón utilizando SbP y Ab anti-IgG de ratón y la oxidación de luminol catalizada por la SbP se llevó a cabo en ausencia de algún catalizador. Con la aplicación de la peroxidasa de soya se permitió el desarrollo del inmunoensayo con una mejora en la sensibilidad y un amplio rango de linealidad.

2.7 Sistema de expresión de proteínas recombinantes: *Escherichia coli*

La elección de un sistema para la producción de proteínas recombinantes depende de muchos factores. Estos incluyen características de crecimiento celular, niveles de expresión, expresión intracelular y extracelular, modificaciones postraduccionales, actividad biológica de la proteína de interés así como cuestiones regulatorias en la producción de proteínas terapéuticas.

Todos los métodos de expresión tienen ventajas y desventajas que se pueden considerar a la hora de elegir cuál usar. *E. coli* es el sistema más popular ya que las técnicas necesarias para expresar proteínas son relativamente simples y el tiempo necesario para generar una cepa productora de proteínas es relativamente corto. *E. coli* tiene otras ventajas que la han hecho ampliamente usada para la expresión de proteínas importantes desde el punto de vista comercial: su crecimiento es barato además del amplio conocimiento de su genética y fisiología que han permitido la manipulación de cepas productoras del 30% de proteína de interés.

Las gran cantidad de ventajas de *E. coli* han permitido que se mantenga como un buen organismo para la producción de alto nivel de proteínas recombinantes (Gold, 1990). Sin embargo, a pesar del extenso conocimiento de la genética y biología molecular de *E. coli*, no cualquier gen puede expresarse eficientemente en este organismo. Esto puede ser debido a las únicas y sutiles características estructurales de la secuencia del gen, la estabilidad y eficiencia de traducción del mRNA, el fácil replegamiento de la proteína, la degradación de la proteína por proteasas, diferencias entre el uso de codones por *E. coli* y los usados en el gen foráneo, así como la toxicidad potencial de la proteína al huésped. La principal desventaja de *E. coli* como un sistema de expresión es la incapacidad para realizar muchas de las modificaciones postraduccionales encontradas en proteínas eucarióticas entre ellas la formación de puentes disulfuro; y en especial la falta de un mecanismo de secreción de la proteína de interés al medio de cultivo. Para este trabajo se tomó en cuenta que muchas proteínas eucarióticas retienen su actividad biológica aún cuando no están

glicosiladas y por lo tanto pueden ser producidas en *E. coli*, tal es el caso de una peroxidasa neutra (TP) purificada de nabo (*Brassica napus* L. var. *purple top white globe*), la cual al ser parcialmente desglicosilada retuvo el 85% de su actividad enzimática (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003c).

2.7.1 Herramientas para la expresión de proteínas recombinantes

La expresión de proteínas se refiere a la síntesis dirigida de grandes cantidades de proteínas. En todos los métodos de expresión de proteínas, el gen cuyo producto será expresado, se introduce en un plásmido o vector de expresión y este vector se introduce en células vivas. Típicamente, los vectores de expresión contienen promotores que dirigen la síntesis de grandes cantidades de mRNA del gen correspondiente e incluyen secuencias que permiten su replicación autónoma en el organismo hospedador, que codifican para antibióticos de selección e incrementan la eficiencia con la cual el mRNA es traducido.

2.7.1.1 Vector pGEM-T

El vector pGEM®-T Easy es un sistema diseñado para la clonación de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El vector cuenta con un residuo de timina (T) en el extremo 3' en ambas cadenas; estos residuos permiten la hibridación de los productos de PCR generados por polimerasas termoestables con la de *Thermus aquaticus* que agregan adeninas en el extremo 3' de ambas cadenas del DNA y vitan la recirculación del vector vacío. El vector pGEM®-T Easy de alto número de copias contiene los promotores de la RNA polimerasa T7 y SP6 flanqueando el sitio múltiple de clonación incluyendo la región que codifica para el α -péptido de la enzima β -galactosidasa. La inactivación por inserción del α -péptido permite a las clonas recombinantes ser directamente identificadas por cambio de color.

El vector contiene un sitio múltiple de clonación que está flanqueado por el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI*, *BstZI* y *NotI*; de esta manera el inserto se puede liberar mediante tres digestiones simples con estas enzimas (Fig 5).

2.7.1.2 Sistema de expresión pET

El sistema pET es el sistema de expresión más poderoso desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes de interés se clonan en plásmidos pET bajo el control de señales fuertes de transcripción y traducción del bacteriófago T7; la expresión es inducida al proveer una fuente de RNA polimerasa T7 en la célula huésped. La RNA polimerasa T7 es selectiva y activa tanto que cuando es completamente inducida, casi todos los recursos celulares son convertidos a la proteína de interés. El producto de interés puede representar más del 50% del total de proteína producida en unas cuantas horas de inducción. Aunque este sistema es extremadamente poderoso, es posible atenuar los niveles de expresión simplemente disminuyendo la concentración del inductor. Al disminuir el nivel de expresión se puede mejorar la solubilidad de algunas proteínas. Otro beneficio importante de este sistema es su habilidad para mantener genes transcripcionalmente silenciados en el estado no inducido. Los genes de interés son inicialmente clonados en huéspedes que no contienen el gen de la RNA polimerasa T7, de esta manera se elimina el riesgo de inestabilidad del plásmido debido a la producción de proteínas potencialmente tóxicas a la célula huésped. Una vez establecido en una célula usada únicamente para clonación, la expresión de la proteína de interés se puede iniciar transfiriendo el plásmido a una célula de expresión la cual contenga una copia cromosomal del gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control de *lacUV5* (el cual es el único promotor conocido para dirigir la la transcripción del gen de la RNA polimerasa T7). La expresión es inducida mediante la adición de IPTG al medio bacteriano

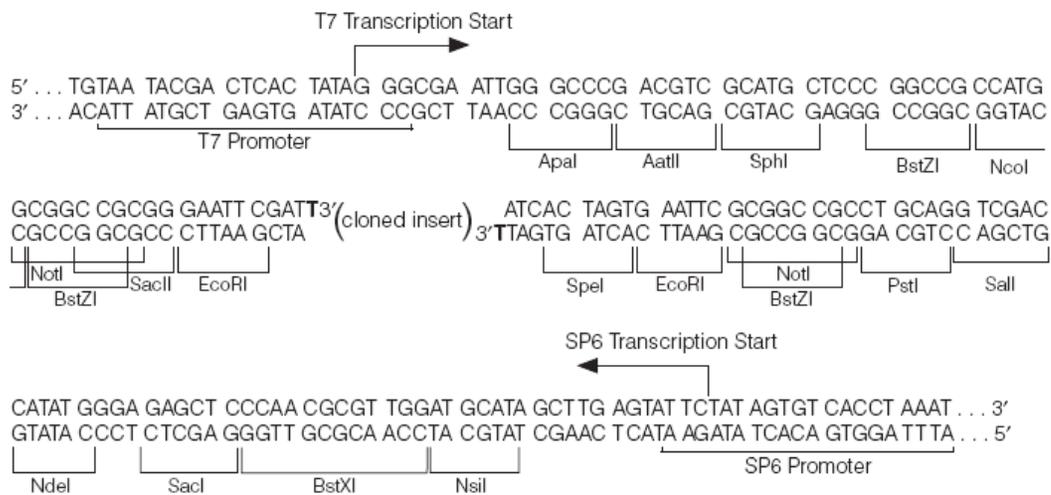
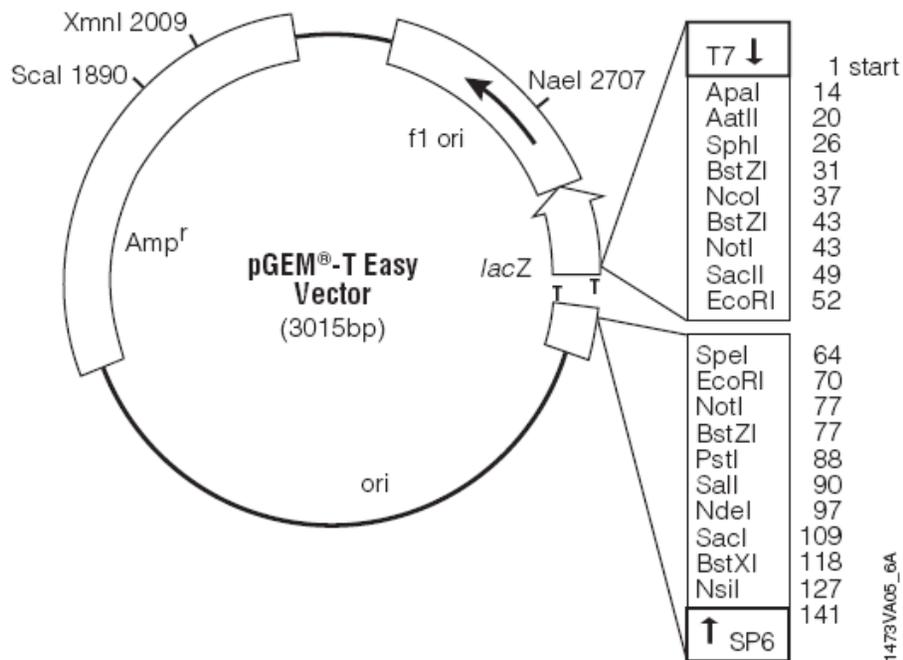


Figura 5. Mapa del vector pGEM-T Easy (Promega, 2006)

2.7.1.2.1 Vectores pET

Los vectores pET fueron originalmente contruidos por Studier y colaboradores (Studier y Moffatt,1986; Rosenberg *et al.*, 1987). Los nuevos vectores pET desarrollados en Novagen ofrecen características mejoradas para permitir la fácil clonación, detección y purificación de proteínas de interés. Existen dos categorías de vectores disponibles: vectores de transcripción y vectores de traducción. Los vectores de transcripción están diseñados para la expresión de genes de interés que contienen su propio sitio de unión a ribosoma y el codón de inicio AUG. Sólo hay tres vectores de transcripción: pET-21(+), pET-24(+) y pET-23(+). Los vectores de traducción contienen el sitio de unión a ribosoma altamente eficiente de la proteína de la cápside del fago T7 y son usados para la expresión de genes de interés que no poseen su propio sitio de unión a ribosoma.

Los nombres de los vectores de traducción se distinguen de los de transcripción por la adición de una letra en seguida del nombre por ejemplo pET-21a(+), lo cual denota el marco de lectura relativo a la secuencia del sitio de clonación *BamH* I, GGATCC. Todos los vectores con sufijo “a” expresan desde el triplete GGA, los vectores con sufijo “b” expresan desde el triplete GAT y los vectores con sufijo “c” expresan desde el triplete ATC de la secuencia de reconocimiento para *BamH* I.

2.7.1.2.2 Elección del vector pET

La elección del vector pET para expresión usualmente involucra una combinación de varios factores: a) La aplicación de la proteína expresada, b) la información específica conocida acerca de la proteína expresada y c) la estrategia de clonación.

Una gran variedad de vectores está disponible para la expresión de cantidades analíticas de proteína para diferentes aplicaciones, sin embargo solo una combinación de vector, cepa de expresión y condiciones de cultivo puede trabajar mejor a gran escala de purificación.

La estrategia de clonación puede afectar la elección del vector debido a la necesidad de sitios de restricción y compatibilidad de marco de lectura. Debido a que muchos de los vectores pET muestran sitios múltiples de clonación comunes, es posible clonar un gen de interés en varios vectores con una misma preparación del inserto.

En muchos casos la proteína de interés se acumula en agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión. Estos agregados pueden representar una ventaja para la purificación ya que pueden ser fácilmente aislados mediante centrifugación y resultar en una proteína altamente concentrada y relativamente más pura, además de que la formación de cuerpos de inclusión protege a la proteína de posible ataque proteolítico. En adición, las proteínas tóxicas no inhiben el crecimiento celular cuando están presentes en forma inactiva como cuerpos de inclusión.

Algunas estrategias de purificación optimizan la producción de cuerpos de inclusión en el citoplasma. Los cuerpos de inclusión son extraídos y solubilizados; después la proteína de interés se repliega *in vitro*. Este procedimiento usualmente produce los más altos rendimientos de la proteína inicial. Sin embargo, la eficiencia de replegamiento en forma de proteína activa varía significativamente con cada proteína y puede ser muy bajo.

2.7.1.2.3 Vector pET-28a(+)

Los vectores pET-28a-c(+) contienen una configuración N-terminal Cola•His/secuencia reconocida por trombina/secuencia del promotor T7 más una secuencia opcional en el extremo C-terminal Cola•His. Los sitios únicos se muestran en el mapa circular (Fig 6). Debajo del mapa circular se muestra la región de clonación de la secuencia que será transcrita por la RNA polimerasa T7.

2.7.2 Expresión de proteínas de origen eucariótico en *E. coli*

La mayoría de los aminoácidos están codificados por más de un codón y cada organismo tiene su propia tendencia en el uso de los 61 codones disponibles. En cada célula, la población de tRNA rigurosamente refleja el uso de codones de la población de mRNA. Cuando el mRNA de un gen heterólogo es sobre-expresado en *E. coli*, las diferencias en el uso de los codones pueden impedir la traducción debido a la demanda de uno o más tRNAs que pueden ser escasos o no encontrarse en la población. Insuficientes tRNA puede provocar estancamiento de la traducción, prematura terminación de la traducción, cambio en el marco de lectura e incorporación errónea de aminoácidos.

En la práctica con el sistema pET y con otros sistemas de expresión, la presencia de un número pequeño de codones raros o escasos frecuentemente no detiene la síntesis de la proteína de interés. Sin embargo, la expresión puede llegar a ser poca cuando se trata de muchos de estos codones.

2.7.2.1 Codones raros en *E. coli*

La examinación del uso de codones en los 4,290 genes de *E. coli* revela que hay varios codones que están escasamente expresados (Cuadro 2). En particular los codones para Arg (AGA, AGG y CGA), Ile (AUA) y Leu (CUA) representan menos del 8% de la población de codones correspondiente. El uso de codones de genes expresados abundantemente (Clase II, Cuadro 2), demuestra un notorio sesgo en el que los codones de bajo uso se evitan y los que codifican para Gly (GGA), Arg (CGG) y Pro (CCC) disminuyen hasta menos del 2% de sus respectivas poblaciones. Teóricamente, la modificación de las condiciones del cul-

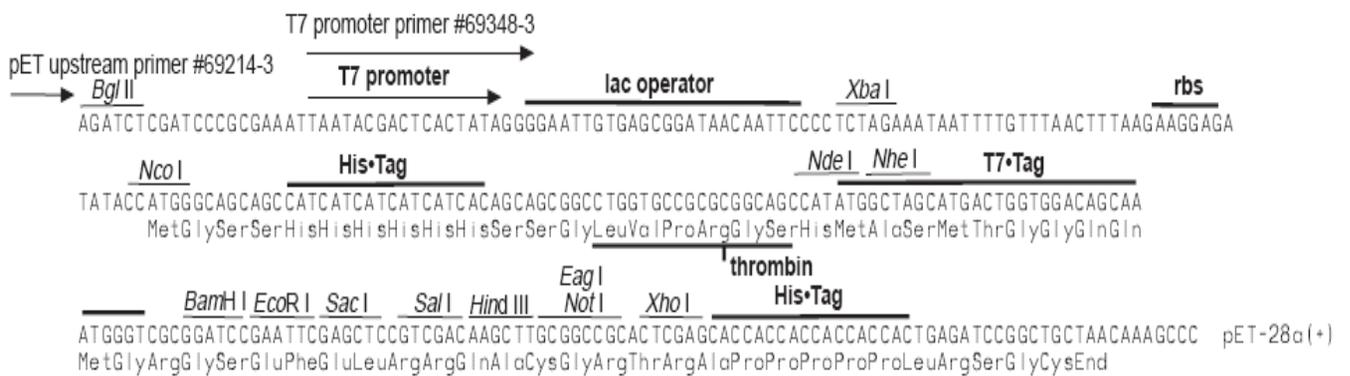
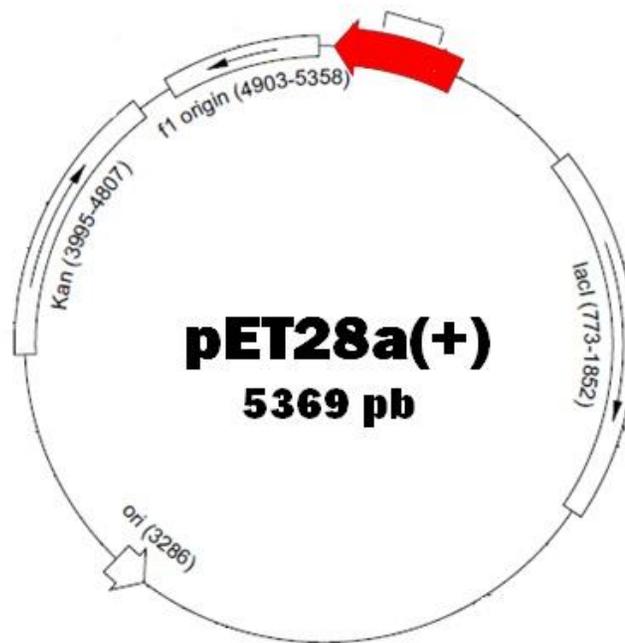


Figura 6. Mapa del vector pET-28a(+) (Novagen, 2005).

Cuadro 2. Uso de codones para Arg, Gly, Ile, Leu y Pro en *E. coli*. Los codones en color rojo corresponden a los escasamente expresados en *E. coli* representando menos del 2% de su población correspondiente de codones.

Aminoácido	Codón	Fracción en todos los genes	Fracción en la Clase II
Arg	AGG	0.022	0.003
Arg	AGA	0.039	0.006
Arg	CGG	0.098	0.008
Arg	CGA	0.065	0.011
Arg	CGU	0.378	0.643
Arg	CGC	0.398	0.330
Gly	GGG	0.151	0.044
Gly	GGA	0.109	0.020
Gly	GGU	0.337	0.508
Gly	GGC	0.403	0.428
Ile	AUA	0.073	0.006
Ile	AUU	0.507	0.335
Ile	AUC	0.420	0.659
Leu	UUG	0.129	0.034
Leu	UUA	0.131	0.055
Leu	CUG	0.496	0.767
Leu	CUA	0.037	0.008
Leu	CUU	0.104	0.056
Leu	CUC	0.104	0.080
Pro	CCG	0.525	0.719
Pro	CCA	0.191	0.153
Pro	CCU	0.159	0.112
Pro	CCC	0.124	0.016

El uso de codones se expresa como la fracción de todos los codones posibles para un aminoácido dado. Todos los genes corresponden a la fracción representada en las 4290 secuencias codificantes en el genoma de *E. coli*. La Clase II corresponde a la fracción representada en genes alta y continuamente expresados durante la fase exponencial de crecimiento.

tivo (por ejemplo bajar la temperatura, cambiar la composición del medio, etc) podrían cambiar la tendencia en el uso de codones suficiente para mitigar algunos de los problemas de expresión. Sin embargo, se ha reportado que los niveles de la mayoría de los tRNA's correspondientes a los codones raros permanecen sin cambiar a diferentes velocidades de crecimiento (Dong *et al.*, 1996).

Como se muestra en el Cuadro 2, un conjunto de los codones para Arg, Ile, Gly, Leu y Pro son usados muy raramente en los genes de alta expresión en *E. coli*. Varios laboratorios han mostrado que los rendimientos de expresión de proteínas cuyos genes contienen codones raros se pueden incrementar de manera significativa cuando el tRNA correspondiente se incrementa en la cepa productora (Rosenberg *et al.*, 1993). Los niveles de tRNA's se pueden elevar al incrementar el número de copias de los genes respectivos. Esto se lleva a cabo mediante la inserción del gen del tRNA nativo en un plásmido de copia múltiple. El gen del tRNA se inserta en el mismo vector de expresión o en un plásmido compatible.

2.7.2.2 Vector pRARE y cepa Rosetta

La compañía Novagen ha resuelto el problema de la expresión de genes que contienen codones raros de *E. coli*, mediante la creación del vector pRARE (Fig. 7), el cual codifica para los genes de los tRNA's de todos los codones raros que codifican para Arg, Ile, Gly, Leu y Pro, excepto para Arg (CGA/CGG).

El cassette completo fué incluso añadido a los plásmidos pLysS y pLacI para crear los plásmidos pLysSRARE y pLacIRARE, respectivamente, indicándose esto en la Figura 7. Los plásmidos se usaron para transformar diferentes cepas, creándose así la cepa de expresión Rosetta (Cuadro 3). Estos plásmidos son compatibles con los vectores de expresión pET, pETBlue y pTriEx de Novagen y con los vectores bajo el control de otros promotores presentes en *E. coli*.

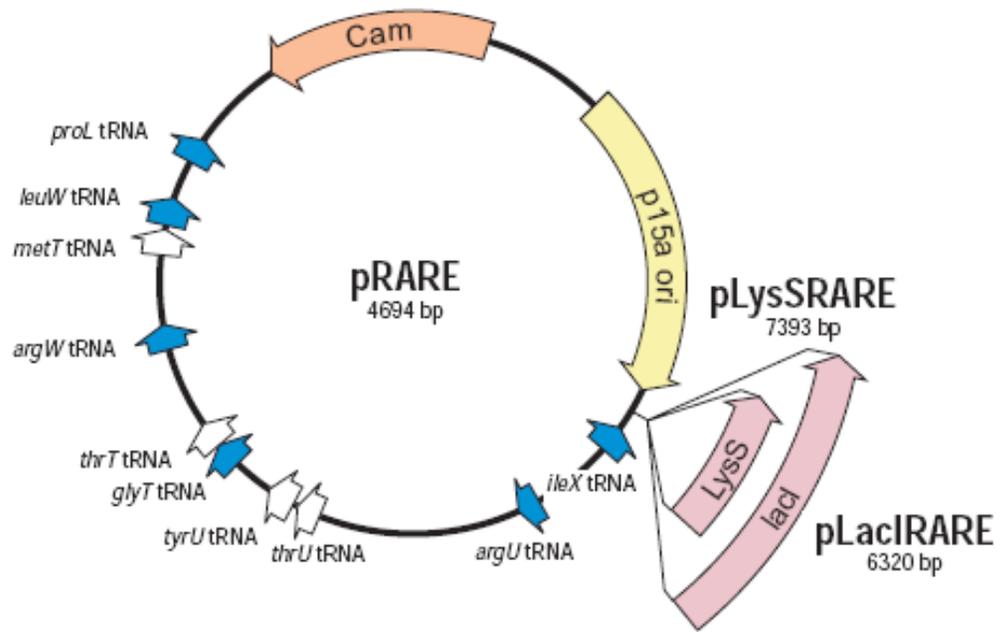


Figura 7. Mapa del plásmido pRARE. Los cassettes pLysSRARE y pLacIRARE contienen los genes que codifican para la lisozima T7 (*LysS*) y el represor lac (*lacI*), respectivamente. También se indican los genes para la resistencia a cloranfenicol (*Cam*), el origen de replicación (*p15a ori*) y en azul los tRNA's correspondientes a los codones raros en *E. coli*.

Cuadro 3. Cepas Rosetta (Novagen, 2005)

Cepa	Característica particular	Resistencia a antibióticos
Rosetta	Supresión del gen <i>lacYZ</i> ,	Cam
Rosetta (DE3)	ausencia de los genes de	Cam
Rosetta(DE3)pLysS	proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i>	Cam
Rosetta(DE3)pLacI		Cam
RosettaBlue	<i>RecA</i> , <i>endA</i> , <i>lacI</i> . Alta	Tet + Cam
RosettaBlue(DE3)	eficiencia de transformación	Tet + Cam
RosettaBlue(DE3)pLysS		Tet + Cam
RosettaBlue(DE3)pLacI		Tet + Cam
Rosetta-gami	Mutantes en el gen <i>trxBlgor</i>	Kan + Tet + Cam
Rosetta-gami(DE3)	que facilita la formación de	Kan + Tet + Cam
Rosetta-gami(DE3)pLysS	enlaces disulfuro en el	Kan + Tet + Cam
Rosetta-gami(DE3)pLacI	citoplasma	Kan + Tet + Cam

Cam = cloranfenicol, Tet = tetraciclina, Kan = kanamicina

2.7.2.3 Genotipo Rosetta

Las cepas Rosetta y Rosetta 2 son derivados de BL21 diseñadas para mejorar la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones de bajo uso en *E. coli*. La cepa Rosetta original suplementa tRNAs para los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC y GGA en el plásmido con resistencia a cloranfenicol, pRARE. La cepa Rosetta 2 suplementa un séptimo codón raro (CGG), adicional a los seis encontrados en las cepas originales de Rosetta. Mediante esta suplementación de codones raros, las cepas Rosetta proveen de una “traducción universal” en casos donde la traducción podría estar limitada por el uso de codones en *E. coli* (Novagen, 2005).

2.7.2.4 Genotipo Rosetta-gami 2

Las cepas Rosetta-gami 2 combinan características de Origami 2 y Rosetta 2, permitiendo el mejoramiento de la formación de puentes de disulfuro y la expresión de proteínas de origen procariótico que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Estas cepas se derivan de Origami 2, una cepa sensible a kanamicina que contiene las mutaciones *trxB* y *gor* para la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma. Las células cuentan con el plásmido de resistencia a cloranfenicol pRARE2, el cual suplementa los tRNAs para los 7 codones raros, AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA y CGG bajo el control de su propio promotor nativo. La mutación *gor* es inducible en tetraciclina (Novagen, 2005).

2.7.3 Expresión de peroxidasas en *E. coli*

El estudio de la expresión de peroxidasas en *E. coli* comenzó del interés por establecer las características estructurales de peroxidasas que las distinguen de otras hemo-proteínas y proveer las bases de sus propiedades distintivas. Las peroxidasas que principalmente recibieron atención fueron la citocromo-*c* peroxidasa, HRP y las peroxidasas de hongos de pudrición blanca. La citocromo-*c* peroxidasa se purificó de levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y fue la primer peroxidasa cuya estructura se obtuvo mediante cristalografía de rayos x (Finzel *et al.*, 1984). El interés siguió con la HRP, para probar su funcionalidad mediante cambio de aminoácidos en la cercanía del grupo hemo y posible cristalización. Se logró además la clonación en *E. coli* de un gen sintético que codifica para la HRP (Smith *et al.*, 1990). La proteína se expresó, se solubilizaron los cuerpos de inclusión y se encontró que el replegamiento era fuertemente dependiente de la concentración de urea, Ca^{2+} , hemo y de la presencia de glutatión oxidado, concluyéndose que las glicosilaciones no son esenciales para el correcto plegamiento y actividad de la enzima

Después se expresó tanto la HRP nativa como la mutante Phe41His y Phe143 Glu en *E. coli* y se reactivaron los cuerpos de inclusión con un rendimiento

del 25%. Los datos de la cinética de la peroxidasa mostraron que las mutantes de la HRP recombinante producidas en *E. coli* afectan la estructura completa del centro activo de la enzima y causan cambios significativos en el replegamiento de la enzima, estabilidad y actividad catalítica (Gazaryan *et al.*, 1994). Posteriormente, la HRP recombinante expresada en *E. coli* fue cristalizada por Gajhede *et al.*, (1997). Se hicieron intentos por cristalizar la enzima extraída de la planta sin embargo no fueron exitosos debido a la presencia de las glicosilaciones. El grupo de investigación identificó el aminoácido involucrado en las interacciones directas con la molécula aromática. La Phe68 situada por encima del hueco distal, la Phe42 a la izquierda y la Phe197 a la derecha del canal de acceso del sustrato, guardan la entrada a la cavidad expuesta del grupo hemo.

Con el fin de mejorar la estabilidad térmica, Ryan *et al.*, (2008), aplicaron mutagénesis sitio dirigida a la HRP recombinante y generaron 5 mutantes con mutación simple. Sin embargo, el estudio no fue exitoso ya que las mutaciones tuvieron mejores efectos en la cinética de estado estacionario que sobre la estabilidad térmica. Solo 2 mutantes, Thr102Ala y Thr110Val excedieron la estabilidad térmica de la enzima nativa. Finalmente los autores concluyen que su trabajo no rindió una HRP recombinante más termoestable pero que la mutante Thr110Val mostró mayor resistencia a la inactivación por exceso de peróxido de hidrógeno.

Otras peroxidases se han intentado expresar en *E. coli*, Hushpulian *et al.*, (2003) expresaron una peroxidasa aniónica de tabaco en *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus ya que el gen contenía un total de 11 codones para Arg poco comunes en procariotes. El rendimiento de reactivación de la peroxidasa replegada fue del 7% con una actividad específica de 1100 a 1200 unidades (U) de ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolín-6 sulfónico (ABTS)/mg.

La relación estructura-función de las peroxidases no se conoce del todo debido a la dificultad de obtener grandes cantidades de una isoenzima en particular a partir de la fuente natural. De aquí que se tenga el interés en la clonación del gen que codifica para alguna isoenzima en particular y expresarla en

un sistema heterólogo. Actualmente, el rábano picante es la fuente tradicional para la producción comercial de peroxidasa, debido a que posee una elevada actividad y gran disponibilidad. No obstante, existe una demanda de nuevas peroxidasas que sean más estables o específicas para aplicaciones especializadas. Una fuente alternativa de peroxidasas es el nabo (*B. napus*), ya que algunas de sus isoformas son capaces de remover compuestos fenólicos de aguas residuales con alta eficiencia (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003b, Quintanilla *et al.*, 2008), o se pueden utilizar en pruebas de diagnóstico (Agostini *et al.*, 2002). Además de que se trata de un vegetal que se produce bien en México.

En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la UAQ, se han purificado y caracterizado algunas isoenzimas de peroxidasa a partir de *B. napus*. Se logró purificar y caracterizar una isoenzima neutra (TNP; pl 7.2) de nabo (*B. napus* L. var. *purple top white globe*). TNP recobró aproximadamente el 70% de su actividad después de 11 min de calentamiento a 65°C y la energía de activación para su inactivación fue de 132 kJ/mol, valor más alto comparado con el de otras peroxidasas, lo cual indica su buena termoestabilidad. Su valor de K_m para ABTS fue más bajo que para el de la HRP ácida comercial. También presentó una alta actividad específica, de 1930 U ABTS/mg. Estas propiedades hacen a TNP una enzima con un gran potencial como fuente alternativa de la HRP en varias aplicaciones (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001).

También se logró el aislamiento y la caracterización térmica de otra peroxidasa ácida de nabo (TAP). TAP presentó una alta actividad específica a valores de pH 6, la cual se incrementó 4 veces en el pH óptimo a 7250 U ABTS/mg, siendo este un valor más alto que para el de la mayoría de las peroxidasas. TAP presentó estabilidad al calor; en el calentamiento a 60°C por 25 min retuvo el 90% de la actividad inicial, mientras que se retuvo un 20% después de 25 min de calentamiento a 80°C. La alta actividad específica y estabilidad térmica hacen a TAP una enzima con un alto potencial para aplicaciones en donde la estabilidad térmica sea crucial, tales como la remoción de fenoles y aminos

aromáticas de aguas residuales y síntesis de resinas fenólicas (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003a).

Con el objetivo de obtener mayor cantidad de peroxidasa para su caracterización y simplificar el proceso de purificación, en el laboratorio, se identificó y aisló la secuencia del cDNA que codifica para una peroxidasa de nabo (*B. napus* L. var *purple top white globe*) (Romero-Gómez *et al.*, 2008). El cDNA contiene un marco de lectura abierto de 1077 pb y codifica para una peroxidasa de 358 aminoácidos. El tamaño molecular calculado de la enzima (PodC) es de 37 kDa y el punto isoelectrico de 4.6. El alineamiento de la secuencia primaria mostró que sólo tres proteínas tienen identidad significativa con PodC; AtP29a (84 %), AtPA2 (81 %) ambas de *Arabidopsis thaliana* y HRP2 (82 %) de rábano picante (*Armoracia rusticana*).

Con la clonación del cDNA que codifica para una isoperoxidasa, se tiene la posibilidad de producir la enzima en un sistema de expresión heterólogo adecuado, que permita obtener suficiente cantidad para su caracterización y realizar mutaciones sitio dirigidas para incrementar su resistencia a altas concentraciones de compuestos fenólicos en efluentes de aguas residuales (Quintanilla *et al.*, 2008a y b).

2.7.4 Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)

La expresión y purificación de proteínas recombinantes facilita la producción y caracterización detallada de casi cualquier proteína. Aunque se han desarrollado una gran variedad de sistemas de expresión heterólogos y se usan actualmente para la producción de proteínas recombinantes, la purificación de proteínas obtenidas puede resultar todavía problemático. Se pueden emplear los procedimientos clásicos de purificación, pero en la mayoría de los casos las técnicas del DNA recombinante permiten la construcción de proteínas de fusión a las cuales se les añade una secuencia de afinidad que simplifica su purificación

mediante el empleo de cromatografía de afinidad, el cual se basa en la marcada selectividad y afinidad de un metal inmovilizado, usualmente níquel unido al ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), cuando a la proteína de fusión se le ha agregado seis residuos consecutivos de His (cola 6xHis). El NTA es un adsorbente quelante tetradentado (desarrollado en Hoffmann-La Roche) que ocupa cuatro de los seis sitios de unión a ligando en la esfera de coordinación del ión níquel, dejando así dos sitios libres para interactuar con las colas de His (Fig. 8).

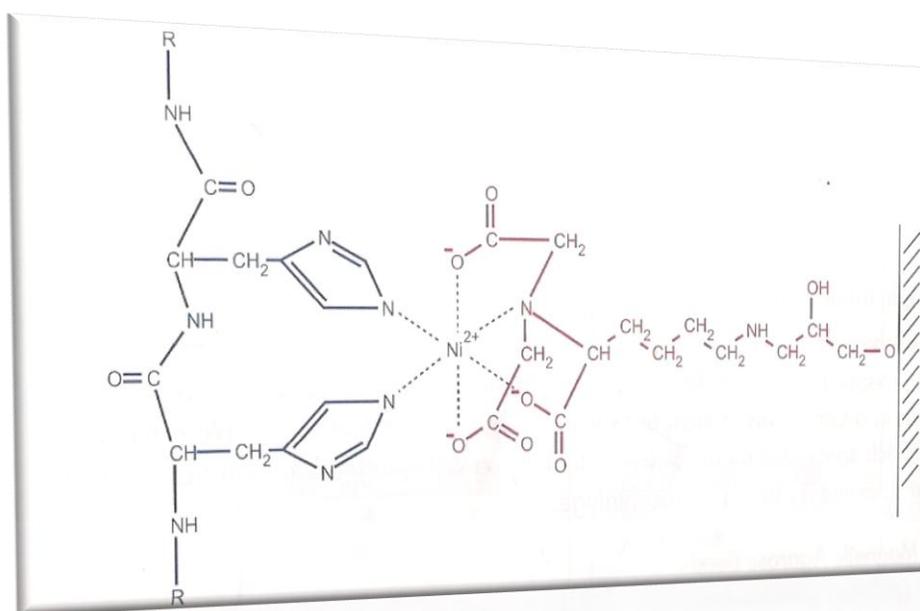


Figura 8. Interacción entre residuos cercanos en una proteína con una cola de histidinas y la matriz Ni-NTA (Qiagen, 2003).

El NTA se une al ión metálico más establemente que otras resinas disponibles y retiene a los iones bajo una variedad de condiciones, especialmente bajo condiciones de lavado riguroso. Las matrices NTA permiten la purificación de proteínas en concentración no menor al 1% de la proteína total de la muestra hasta más de un 95% de pureza en un solo paso (Janknecht *et al.*, 1991).

La Ni-NTA es una matriz que está acoplada por enlace covalente a Sefarosa CL-6B la cual ofrece alta capacidad de unión específica y un mínimo de inespecífica. Este material tiene excelentes propiedades de manejo para procesos por lote, columna o cromatografía de líquidos de rápida resolución para proteínas (FPLC). La alta concentración superficial del ligando NTA es suficiente para la unión de aproximadamente 5-10 mg de proteína con cola 6xHis por ml de resina.

2.7.5 Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel o de exclusión molecular es una técnica que separa biomoléculas en base a su tamaño conforme pasan a través de un medio a base de gel empacado en una columna.

Esta técnica es la más simple y suave de todas las cromatografías y se puede aplicar en distintas maneras, una de ellas es la separación por grupo, en donde los componentes de una muestra se pueden separar en dos grupos principales de acuerdo al tamaño. Se puede usar para remover contaminantes de alto o bajo peso molecular o para remover sales y efectuar recambios de amortiguador. También puede usarse en la separación de alta resolución de biomoléculas, en donde los componentes de la muestra se separan de acuerdo a diferencias en su tamaño molecular. Esta separación se puede usar para separar uno o más componentes, monómeros de agregados, para determinar peso molecular o para realizar un análisis de distribución de peso molecular.

La filtración en gel también se puede utilizar para facilitar el replegamiento de proteína desnaturalizada mediante el control cuidadoso del cambio de amortiguador (Scopes, 1994)

2.7.6 Caracterización de proteínas

2.7.6.1 Parámetros cinéticos

La cinética química es el estudio de las velocidades a las cuales las reacciones químicas ocurren. Una de las principales razones de este estudio es obtener conocimiento de un mecanismo de reacción, esto es, una descripción detallada de los diversos pasos en una reacción y la secuencia en la que ellos ocurren. El estudio de la cinética enzimática tiene una gran importancia en bioquímica, ya que la determinación de la velocidad de una reacción enzimática en función de las condiciones de reacción y mediante estudios químicos y estructurales, se puede elucidar el mecanismo catalítico de la enzima.

Las dos magnitudes que caracterizan a una enzima que obedezca la cinética de Michaelis-Menten en estado estacionario son K_M y V_{max} . La constante K_M se suele asociar con la afinidad de la enzima por el sustrato, siempre y cuando la constante de velocidad de disociación (k_{-1}) del complejo enzima-sustrato (ES) sea mucho mayor que la constante de velocidad para la formación del producto (k_2) (Eq. 4). K_M puede también definirse como la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima (Voet, 2004),



V_{max} está relacionada con el número de recambio de una enzima, el cual es igual a la constante catalítica k_2 , que también se denomina k_{cat} . El número de recambio son los moles de sustrato que reaccionan para formar producto por mol de enzima por unidad de tiempo, en condiciones óptimas (enzima saturada). La constante k_{cat} (s^{-1}) constituye una medida directa de la eficiencia de la catálisis enzimática (Voet, 2004).

2.7.6.1.1 Reacciones bisustrato

Las reacciones enzimáticas que involucran dos sustratos y generan dos productos, representan cerca del 60% de las reacciones bioquímicas conocidas (Eq. 5)



La mayoría de las reacciones bisustrato son reacciones de transferasas en las que la enzima cataliza la transferencia de un grupo funcional específico de uno de los sustratos al otro o bien reacciones de óxido-reducción en las que equivalentes de reducción son transferidos entre los dos sustratos. Aunque estas reacciones pueden ocurrir a través de una gran variedad de mecanismos, sólo unos pocos tipos se observan comúnmente.

En el mecanismo secuencial todos los sustratos se combinan con la enzima antes de la que reacción ocurra y los productos sean liberados. Las reacciones secuenciales se pueden subclasificar en aquellas con un marcado orden de adición de sustrato a la enzima, las cuales se dice que tienen un mecanismo ordenado y en aquellas que no tienen preferencia para el orden de la adición de sustrato, es decir un mecanismo aleatorio. En el mecanismo de Ping Pong uno o más productos se liberan antes de que todos los sustratos sean añadidos. Muchas enzimas como la quimotripsina, transaminasa y peroxidasa siguen este mecanismo.

2.7.6.2 Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que se puede usar para determinar el contenido de estructura secundaria de proteínas. Esto es porque las transiciones electrónicas de los enlaces peptídicos de un polipéptido en diferentes conformaciones producen un espectro de absorción diferencial para la luz circularmente polarizada en el rango de longitudes del lejano y cercano UV, las cuales son distintas y linealmente independientes. Los residuos aromáticos (especialmente triptófano) y los enlaces disulfuro pueden contribuir al espectro de DC en esta región. Por lo anterior, los datos se pueden usar para calcular los tipos de estructura secundaria presente en el espectro medido para una proteína.

Las diferentes formas de estructura secundaria regular encontradas en péptidos y proteínas exhiben distintos espectros de DC en el lejano UV (Fig. 9). La información contenida en un espectro de DC se puede considerar como la suma de las características espectrales derivadas de cada tipo de estructura secundaria presente en una proteína. Típicamente, los métodos de análisis empíricos utilizan bases de datos como referencia de espectros de proteínas cuyas estructuras cristalinas (y por lo tanto su estructura secundaria) son conocidas. El principio básico involucrado en el análisis de DC de una proteína es que el espectro de DC (C_λ) se puede expresar como una combinación lineal de componentes de estructura secundaria ($B_{k\lambda}$): $C_\lambda = \sum f_k B_{k\lambda}$, donde f_k es la fracción de la estructura secundaria k (Whitmore y Wallace, 2004).

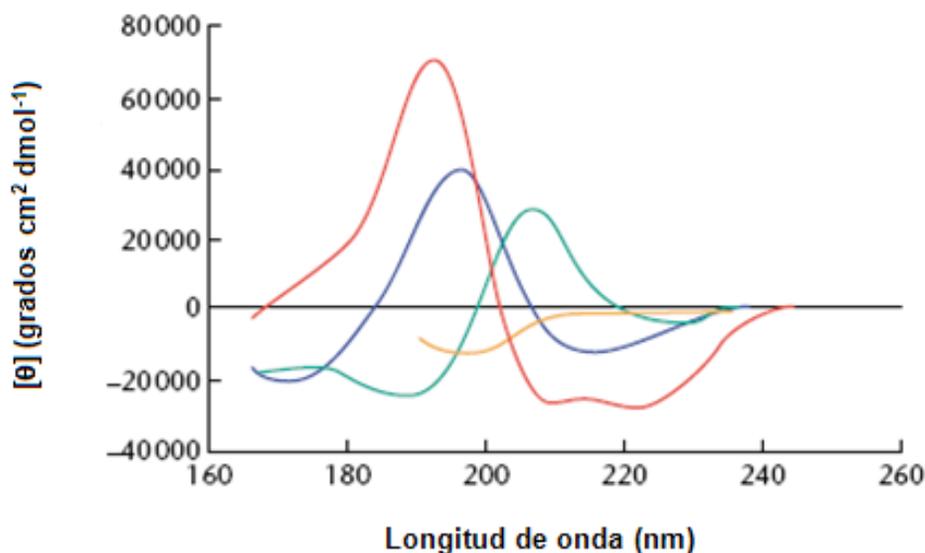


Figura 9. Espectro de DC en el lejano UV asociado con varios tipos de estructura secundaria en proteínas. Rojo, α -hélice; azul, β -plegada antiparalela; verde, giro β tipo I; anaranjado, estructura irregular.

2.7.6.3 Ensayo tipo “western”

Los procedimientos inmunoquímicos son ensayos enzimáticos de alta sensibilidad y selectividad. Estos métodos utilizan anticuerpos, que son proteínas producidas por el sistema inmune de animales (en respuesta a la introducción de una proteína extraña) los cuales se unen de manera específica a la proteína extraña.

El ensayo tipo “western” es una técnica usada para identificar y localizar proteínas en base a su habilidad para unirse a anticuerpos específicos. En este ensayo se puede detectar una proteína de interés de una mezcla de proteínas. También se puede determinar el peso molecular aproximado de la proteína (en comparación con una proteína de peso molecular conocido en kDa) o analizar su expresión (en comparación con una muestra control no tratada u otro tipo de célula o tejido) (Sambrook y Russell, 2001).

Si se dispone de un anticuerpo contra la proteína de interés (antígeno), es posible detectar específicamente a esta proteína en un gel en presencia de muchas otras proteínas mediante una transferencia tipo “western”. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas de acuerdo a su peso molecular y se transfieren a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno, PVDF). Después de que los sitios de unión sin reaccionar de la membrana se bloquean para evitar la adsorción inespecífica de anticuerpos, las proteínas inmovilizadas reaccionan con un anticuerpo policlonal o monoclonal específico. Finalmente, los complejos antígeno-anticuerpo se localizan mediante reacciones radiográficas, cromogénicas o quimioluminiscentes. Puede detectarse hasta 1 ng de una proteína (antígeno) además, debido a que la separación electroforética de proteínas casi siempre se desarrolla bajo condiciones de desnaturalización, cualquier problema de solubilización, agregación y co-precipitación de la proteína de interés con otras proteínas se elimina (Sambrook y Russell, 2001).

2.7.6.4 Parámetros termodinámicos de desnaturalización

Los estudios de desnaturalización de proteínas muestran información acerca de la fuerza que dirige el replegamiento espontáneo de una proteína hacia su estructura tridimensional (Pappalardo *et al.*, 2008). La transformación de una proteína entre varios estados conformacionales ocurre por cambios en temperatura, presión, pH, concentración de ligandos, desnaturalizantes químicos o cambios de solvente. Para cada una de estas variables empíricas deben estar asociados parámetros termodinámicos y es axiomático (Principio de Le Chatelier) que una transformación puede solo ocurrir si los dos estados tienen diferentes valores de estos parámetros. Por ejemplo, la desnaturalización de una proteína inducida por temperatura (en equilibrio) surge de diferencias en la entalpía (ΔH) entre los estados nativo y desnaturalizado; la desnaturalización por presión puede ocurrir solo si los estados nativo y desnaturalizado tienen diferente volumen parcial molar (el estado desnaturalizado es normalmente de volumen menor). En cada uno de los casos, es necesario saber cómo medir e interpretar estos parámetros termodinámicos (Cooper, 1999).

Una observación importante es que la transición de nativo a desnaturalizado es altamente cooperativa, al menos para proteínas globulares pequeñas, comportándose frecuentemente como un proceso casi perfecto de dos estados parecido a un cambio de fase macroscópico.

Muchos métodos experimentales para estimar los parámetros termodinámicos de proteínas asumen un comportamiento de dos estados. El modelo de dos estados asume que el proceso de interés (o parte de este) se puede representar como un equilibrio termodinámico entre dos estados distinguibles experimentalmente con población no significativa de estados intermedios (Eq. 6):



En el caso de proteínas, A y B deben ser los estados nativo (N) y desplegado (U), respectivamente y la transición debe ser debida a cambios en

temperatura, pH o concentración de agentes desnaturizantes. El estado U no necesariamente tiene que ser giros al azar o estructura completamente desnaturizada durante la transición de dos estados y además debe continuar desnaturizándose conforme el agente desnaturizante se añade o se alcanzan altas temperaturas.

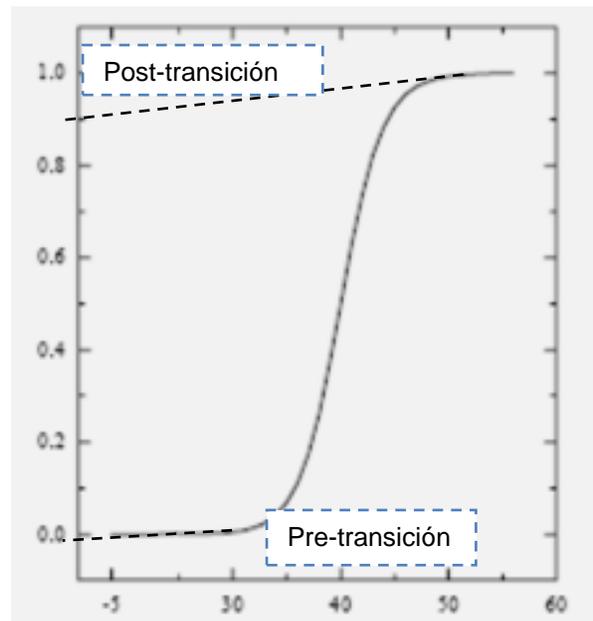
El criterio experimental importante es que debe haber algún cambio perceptible en alguna propiedad observable del sistema que se pueda tomar como medida de la extensión de la transición. Para una proteína, esta propiedad puede ser la fluorescencia, absorbancia UV (reflejando cambios en el microambiente de los grupos aromáticos), dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear, calorimetría, etc. En cualquier caso, se mide experimentalmente alguna de las propiedades anteriores (F) mientras que se varía algún parámetro (x), el cual puede ser temperatura, presión, concentración de agente desnaturizante, etc. Como resultado, se obtiene una variación sigmoideal típica de una transición de dos estados (Fig. 10).

Las pendientes de la línea base de la pre y post transición reflejan que las propiedades de A y B varían con respecto a X. Mediante una extrapolación lineal, se puede estimar la constante de equilibrio (k_u) como una función de x, asumiendo sistema de dos estados (Eq. 7) (Cooper, 1999).

$$k_u = \frac{(u)_e}{(N)_e} = \frac{f_u}{f_N} \quad (7)$$

donde f_u es la fracción desnaturizada y f_N la fracción nativa. Si la variable experimental es la temperatura (T), entonces estos datos, que arrojan la K_u en función de T, se pueden usar para estimar el cambio en la entalpía de van't Hoff (ΔH) para la transición (Cooper, 1999).

Propiedad observable (F)



Variable (x)

Figura 10. Ilustración de la curva sigmoide de una propiedad observable (F) con respecto a la variable (x) para una transición de dos estados. En la figura se incluye la línea base de la pre- y post- transición (líneas punteadas) (Cooper, 1999).

III. JUSTIFICACIÓN

La enzima peroxidasa se ha utilizado desde hace tiempo en una gran variedad de aplicaciones, incluyendo la industria de alimentos, diagnóstico clínico, y en el tratamiento de aguas residuales. Cerca de un 90% de los kits para análisis inmunoenzimáticos utilizan peroxidasa.

En la actualidad las peroxidasas usadas comercialmente se extraen del rábano picante (*Armoracia rusticana*). En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado (DIPA) de la UAQ, se ha trabajado en el estudio de fuentes alternativas para su obtención a partir de vegetales disponibles en la región. El nabo representa una buena opción ya que es el que tiene el mayor contenido de la enzima de entre los vegetales disponibles en la región y podría ser una fuente más barata que la enzima comercial. Los estudios de caracterización de peroxidasas purificadas de *B. napus*, han mostrado que estas isoenzimas pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones como son la remoción de compuestos fenólicos de aguas residuales o la elaboración de pruebas de diagnóstico clínico. Sin embargo, el proceso de purificación de peroxidasa del vegetal es tedioso y no se obtienen cantidades suficientes para los estudios de caracterización.

Recientemente, el grupo de investigación aisló el cDNA que codifica para una peroxidasa de nabo (*B. napus* L. var. *purple top white globe*). Con la clonación de este gen, se tiene la posibilidad de expresar la peroxidasa en un sistema adecuado donde se obtengan cantidades suficientes para su caracterización y posterior uso en diversas aplicaciones biotecnológicas. Por otro lado, con el desarrollo de este proyecto se planea contribuir en el avance del conocimiento en relación a la metodología de expresión de proteínas recombinantes utilizando un sistema bacteriano. Con este estudio se realizó investigación original que consistió en la expresión y caracterización de una isoperoxidasa de nabo recombinante.

IV. HIPÓTESIS

La peroxidasa de nabo BnPA puede expresarse en forma recombinante en un sistema bacteriano y es posible replegarla *in vitro* para obtener una proteína biológicamente activa.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Expresar el gen *BnPA* que codifica para una peroxidasa de nabo (*Brassica napus*), en un sistema de expresión bacteriano y caracterizar la peroxidasa recombinante.

5.2 Objetivos específicos

- Subclonar el gen *BnPA* de la peroxidasa de nabo en el vector de clonación pGEM-T.
- Clonar el gen *BnPA* en el vector de expresión pET28a(+).
- Transformar la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3).
- Expresar, purificar y replegar a la peroxidasa recombinante.
- Caracterizar bioquímica y termodinámicamente la peroxidasa recombinante.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Reactivos

Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) sal disódica dihidratada 99%, agarosa grado electroforético, isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y tetrametiletildiamina (TEMED) fueron adquiridos de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Bromuro de etidio 10 mg/ml, dodecil sulfato de sodio (SDS) grado electroforético, ditioneitol (DTT), acrilamida 99.9%, bis N,N-metilen-bis-acrilamida grado electroforético y persulfato de amonio fueron adquiridos de Bio-rad (Hercules, CA).

Tris (hidroximetil)-aminometano 99.9%, ácido acético glacial 99.8%, metanol 99.9%, isopropanol 99.9% grado reactivo, HCl 37.3% grado reactivo, peróxido de hidrógeno 3%, acetato de sodio anhidro 100%, acetato de potasio cristal grado analítico, glicerol, NaOH en perlas, NaCl cristal y fosfato de potasio monobásico cristal 99.7% fueron adquiridos de Baker (Phillipsburg, NJ).

Fosfato de potasio dibásico trihidratado 99%, sulfato de amonio granular, 99%, cloruro de potasio 100%, azul de bromofenol grado electroforético, cloruro de magnesio hexahidratado 99.5%, ampicilina trihidratada, glutatión oxidado y ácido 2'2 azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) fueron adquiridos de Sigma. Polimerasa *Thermus aquaticus* (*Taq*) y las enzimas de restricción *EcoRI* (10 U/ μ l), *HindIII* (10 U/ μ l) y *BamHI* (10 U/ μ l) se adquirieron de Fermentas (Ontario, Canada). *Taq* platinum y ligasa T4 (1 U/ μ l) de Invitrogen.

Los marcadores de peso molecular de 1 kb para DNA fueron adquiridos de Promega (Madison, WI), mientras que el marcador de bajo peso molecular para proteínas fue de GE (Uppsala, Sweden). Bromocloro-indolil-galactopiranosido (X-Gal) de Sigma, sulfato de kanamicina (sigma, St Louis, Missouri) y cloruro de hematina de MP Biomedicals (Solon, OH).

Los medios de cultivo fueron Bacto triptona y Bacto extracto de levadura de Difco y agar bacteriológico de BD Difco (Franklin Lakes, NJ). Los anticuerpos monoclonales anti-His (número de catálogo 05-949) y anti-ratón conjugado a HRP (Número de catálogo 12-349) fueron adquiridos de Millipore (Billerica, MA).

6.2 Estrategia experimental

La estrategia experimental general se esquematiza en la Figura 11.

6.3 Diseño de oligonucleótidos

Aunque no existe una guía general para el diseño de oligonucleótidos, los expertos en biología molecular apuntan ciertas recomendaciones para obtener la amplificación específica del gen de interés. Los oligonucleótidos (oligos) no deben formar estructuras secundarias especialmente en el extremo 3' o ser parcialmente complementarios, la longitud debe estar en el rango de 20 a 34 nucleótidos para reducir al mínimo la posibilidad de hibridación en sitios inespecíficos del vector o inserto. Se deben evitar 3 o más G's o C's consecutivas, procurar que el contenido de C+G sea entre el 40 y 60% y que la diferencia en la temperatura de fusión (T_m) de ambos oligos no sea mayor de 2°C. Para calcular la T_m se han desarrollado muchas fórmulas útiles y prácticas para experimentos de PCR e hibridaciones *in situ*. Los principales factores que afectan este valor son la concentración de sales, concentración de DNA, presencia de agentes desnaturalizantes, secuencia, longitud y condiciones de hibridación (Sambrook y Russell, 2001).

En base a la secuencia reportada del cDNA de la peroxidasa ácida de nabo, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *BnPA* sin los primeros 31 aminoácidos en el extremo N-terminal que corresponden a una secuencia señal y los últimos 22 aminoácidos en el extremo C-terminal correspondientes a una posible señal vacuolar (Fig. 12). El oligonucleótido directo (sentido) contiene el sitio de restricción de la enzima *Bam*HI (rojo) y el reverso el de *Hind*III (azul), secuencias presentes en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pET28a(+) y en las cuales se subclonó el DNA del gen *BnPA* amplificado mediante PCR (Cuadro 4). Una vez diseñados, los oligonucleótidos se evaluaron con los siguientes programas: Amplify 1.4.4 (Jullien, 2004), SerialCloner

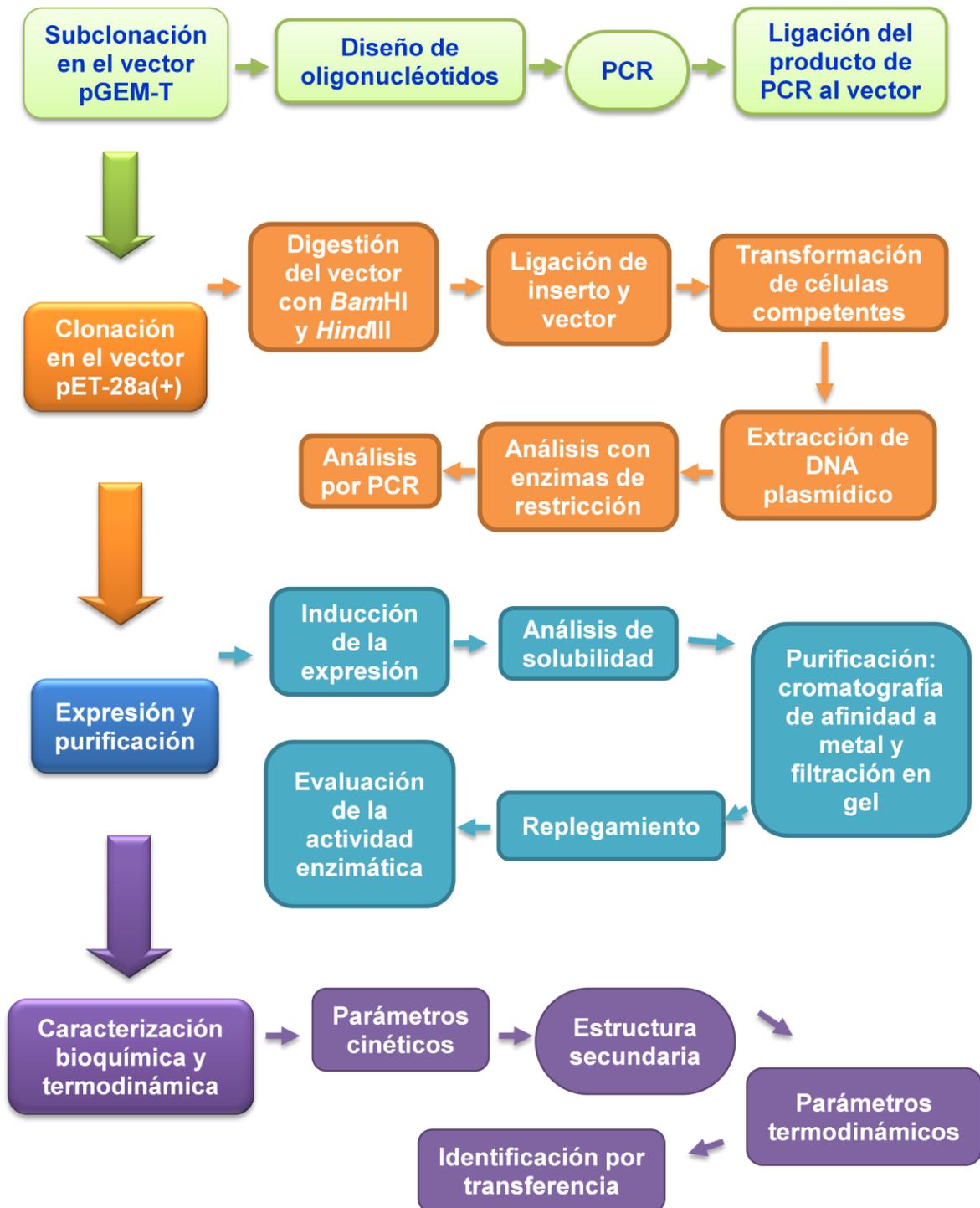


Figura 11. Estrategia experimental general para la expresión y caracterización de la peroxidasa de nabo BnPA.

atggctgtagcaaactcgtctgctacttgccatggtttgtgcatcatcagctttcttgtg
M A V A N S S A T C H G L C I I S F L V
atcgtttctgcggttggggacatcatctgcg **cagttaaaccacaacgttttactcc**ggc
I V S A L F G T S S A Q L N P T F Y S G
acttgcctaacgtctctgccaatcgttcgcagcactattgaacaagctcctcagtcggac
T C P N V S A I V R S T I E Q A P Q S D
ccgagaatcggagccagccttatccgtcttccattccacgactgctttgttaagggttgc
P R I G A S L I R L H F H D C F V K G C
gacggctcgtcttggctagacgacagcgcaaacatccagagcgagaagaacgctgtaccc
D G S L L L D D S A N I Q S E K N A V P
aacgcaaactcaacaagaggattcaatggttggatgatataaaaactgccctcgagaat
N A N S T R G F N V V D D I K T A L E N
gcttgtcccggcatcgtctcttggctctgacattctagctcttgcctctgaggcctccgtg
A C P G I V S C S D I L A L A S E A S V
tctttggcaggagggccaacatgggctgtggtactaggacgaagagatgggtctcaccgcg
S L A G G P T W A V L L G R R D G L T A
aacctgtctggggcgaacacgggccttccatctccttttgaaggcatcaccaacatcaca
N L S G A N T G L P S P F E G I T N I T
gctaaatttacagctgtcgggctgaatacaaccgatgtagtagtcttatctggagcgc
A K F T A V G L N T T D V V V L S G A H
acgtttggacgtgcagcttgcgcaaccttaacaatagactattcaacttcaatgggaca
T F G R A A C A T F N N R L F N F N G T
ggaagtccagacccgactctaaactcaacacttctcagcagcttcaacagctatgtcct
G S P D P T L N S T L L S S L Q Q L C P
caaacggcagcgcacatcagtagtcaccaatcttgatctgagcacacctgatgctttcgat
Q N G S A S V V T N L D L S T P D A F D
aacaattacttcaccaaccttcagagcaacaatgggtcttcttcagtcagaccaagaactg
N N Y F T N L Q S N N G L L Q S D Q E L
ttatctgacaccgggttctcccaccatccctattggttacttctttgcaagtaaccaact
L S D T G S P T I P I V T S F A S N Q T
cagtttttcgaggcggttggctctgctccatgatcaaaatggggaacattagtcggttgact
Q F F E A F A L S M I K M G N I S P L T
gggagtagtggagagattagacaag **actgtaaggtgggttaatggacaa**tccaccactcag
G S S G E I R Q D C K V V N G Q S T T Q
gcaattgagttaaggtctggctctgctgagaaaacagtggaatttagaagaaatgtga
A I E L R S G S A E K T V N L E E M -

Figura 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de BnPA. La flecha vertical verde indica el primer aminoácido de la proteína madura y los nucleótidos resaltados (amarillo) indican la secuencia de los oligonucleótidos BNF y BNR respectivamente.

1.3-11 (Perez, 2004) y ApE-A (Wayne, 2003). Los oligonucleótidos se sintetizaron químicamente (Sigma-Aldrich), se hidrataron con amortiguador TE (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) a una concentración de 10 µM para su uso y se almacenaron a -20°C.

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *BnPA*

Oligonucleótido		Secuencia
Directo	BNF	TAT GGATCC CAGTTAAACCCAACGTTTTACTC
Reverso	BNR	AATA AAGCTT TTTATTGTCCATTAACCACCTTACAG

Las letras en rojo corresponden al sitio de restricción de la enzima *Bam*HI y las azules al sitio de la enzima *Hind*III.

6.4 Extracción del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina. Se partió de la biomasa de un cultivo de 3 ml de *E. coli*, la cual se separó por centrifugación a 16,000g por 1 min. El paquete celular obtenido se resuspendió en 300 µl de amortiguador de resuspensión P1 frío (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se le adicionaron 300 µl de solución de lisis P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) preparada al momento, se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 300 µl de amortiguador de neutralización (3 M acetato de potasio, pH 5.5) frío y se incubó durante 5 min a 4°C. El lisado celular obtenido se centrifugó a 16,000g por 25 min a 4°C. Se descartó la pastilla y al sobrenadante se le adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por vortex y se centrifugó a 16,000g por 30 min a 4°C. El DNA precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70%, la fase líquida se eliminó por decantación y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora para resuspenderla finalmente en 40 µl de TE y se almacenó a -20°C (Sambrook y Russell, 2001).

6.5 Subclonación del gen *BnPA* en el vector pGEM-T.

Para la subclonación del gen *BnPA* en el vector pGEM-T, se amplificó el fragmento por PCR utilizando los oligonucleótidos del Cuadro 1 y como molde el DNA extraído de la clona TOPO::*BnPA*, mediante las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C por 5 min (precalentamiento); 35 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturalización), 55°C por 30 s (alineamiento), 72°C por 1 min (extensión) y 1 ciclo de 72°C por 7 min. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 20 µL con los siguientes componentes: 2 µL de amortiguador de PCR Top Taq 10x (Qiagen, Hamburgo, Alemania); 0.8 µL de MgCl₂ 25 mM; 0.4 µL de mezcla de dNTP's, 10 mM (Promega); 0.5 µL de oligonucleótido BNF, 10 µM; 0.5 µL de oligonucleótido BNR, 10 µM; 0.1 µL de DNA polimerasa Top Taq (Qiagen), 14.9 µL de agua estéril y 0.8 µL de DNA plasmídico TOPO::*BnPA*, 50 ng/µL.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. El producto de PCR se purificó de gel utilizando el kit de purificación de DNA de gel (GE, Uppsala, Sweden) y se ligó al vector pGEM-T en una reacción con los siguientes componentes: 2 µL de amortiguador de ligasa T4 5x (Promega); 1 µL de vector pGEM-T Easy (Promega) 50 ng; 0.3 µL de producto de PCR, 50 ng; 0.5 µL de ligasa DNA T4 (Promega) y 6.2 µL de agua estéril.

La ligación se incubó 1 h a temperatura ambiente y se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 con 2 µL de la mezcla de ligación. Se sembraron por extensión en superficie 100 µL de células en placas con medio Luria-Bertani (LB)/ Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)/ 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido (X-Gal)/ ampicilina (AMP) y se incubaron por 16 h a 37°C.

Para calcular la cantidad apropiada de producto de PCR (inserto) en la reacción de ligación se utilizó la Eq. 8:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb de vector}} \times \frac{\text{relación molar}}{\text{inserto:vector}} = \text{ng de inserto} \quad (8)$$

El vector pGEM-T se encuentra a una concentración de 50 ng/μl y pesa 3 kb y si se desea ensayar una relación molar inserto:vector de 3:1:

$$\frac{50 \text{ ng de vector} \times 1 \text{ kb de inserto}}{3 \text{ kb de vector}} \times \frac{3}{1} = 50 \text{ ng de inserto}$$

Las colonias blancas se crecieron en medio LB líquido con ampicilina y se les extrajo el DNA plasmídico. Para verificar la presencia del inserto, se realizó una digestión del DNA plasmídico con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Ambas enzimas utilizan un amortiguador recomendado diferente por lo que no se puede realizar una digestión doble. Sin embargo, se puede utilizar el doble de cantidad de la enzima *Hind*III ya que su actividad en el amortiguador de *Bam*HI es de 50 al 100%. Estas recomendaciones fueron proporcionadas por el proveedor de las enzimas (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>) y tomadas en consideración con el objetivo evitar la dilución de la muestra de DNA e invertir menos tiempo. La reacción de digestión se realizó con los siguientes componentes: 17 μL de agua estéril, 2 μL de amortiguador de *Bam*HI, 1 μL de DNA (1 μg), 5 U de enzima *Bam*HI y 2 U de enzima *Hind*III. También se comprobó la presencia del inserto mediante PCR utilizando los oligonucleótidos mencionados en el Cuadro 1. La reacción de PCR se realizó con los siguientes componentes: 7.85 μL de agua estéril; 2.5 μL de amortiguador Master Amp 10X (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI); 3 μL de MgCl₂, 25 mM; 7.5 μL del potenciador (Epicentre Biotechnologies); 0.5 μL de mezcla de dNTP's 10 Mm (Invitrogen); 1.2 μL de oligo BNF (10 μM); 1.2 μL de oligo BNR (10 μM); 0.25 μL de *Taq* DNA polimerasa MasterAmp, 5 U/μl (Epicentre Biotechnologies) y 1 μL de DNA (50 ng).

Con el DNA extraído de las clonas positivas se transformaron células competentes, se prepararon reservas en glicerol y chaquiras y se almacenaron a -70°C. Las clonas positivas se secuenciaron. Esta construcción se denominó pGEM-T::*BnPA*.

6.6 Conservación de microorganismos

El método de conservación por ultracongelación ha probado tener alta estabilidad genotípica y fenotípica, así como alta vida media para diversos grupos bacterianos. Sin embargo, no está exento de fallas ya que cortes en el suministro de energía eléctrica o mal funcionamiento del compresor pueden dañar el equipo.

La ultracongelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ involucra el uso de crioprotectores como el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) para prevenir el daño celular durante el proceso de congelación. Estos agentes pasan a través de la membrana celular y otorgan protección intracelular y extracelular contra el proceso de congelación. Otros agentes como el dextrano, polivinilpirrolidona, lactosa, sorbitol y sacarosa tienen su efecto protector solo de manera extracelular (Gherna, 1994).

El glicerol y el DMSO se usan en concentraciones de 10% (v/v) y 5-10% (v/v) respectivamente, en un medio apropiado (las soluciones se esterilizan en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 min). Para mantener el cultivo y evitar procesos de congelación y descongelación, es recomendable usar perlas de vidrio perforadas (chaquiras de vidrio).

La conserva en chaquiras se realizó iniciando con un tratamiento previo de las chaquiras, lavándolas con agua destilada y detergente suave y se enjuagó completamente. Se sumergió en solución de HCl 2% por 2 h. Se enjuagó nuevamente hasta que el pH fue neutro y se secó en el horno. Se colocaron las chaquiras en viales con tapa de rosca y se esterilizaron en aire seco a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Se apretó la rosca al término cuando aún estaban calientes, con el objetivo de prevenir la entrada de aire húmedo a los viales. En condiciones asépticas, se transfirieron de 20 a 40 chaquiras estériles a un vial y se adicionó 1 ml de la suspensión del cultivo con una concentración final de glicerol de 10% (v/v), se agitó suavemente para asegurar que las chaquiras se han cubierto de la suspensión; se removió el exceso de suspensión y se transfirieron las chaquiras a un microtubo estéril. Se almacenaron los cultivos en ultracongelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.7 Almacenamiento de cepas recombinantes

El almacenamiento permanente de cepas y vectores recombinantes se obtiene mejor como conservas en glicerol. Una consideración que se debe tener en cuenta es que a altas concentraciones de glicerol (>10%) se pueden ocasionar la inestabilidad del plásmido (Novagen, 2005).

Para preparar conservas de cultivos de cepas transformadas y vectores recombinantes se siguió la siguiente metodología:

- Se inoculó una colonia en 50 ml de medio LB conteniendo el (los) antibiótico (s) apropiado(s) en un frasco de 250 mL.
- Se incubó con agitación a 200 rpm y 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de entre 0.6 y 0.8.
- Se removieron 0.9 ml, se transfirieron a un microtubo previamente esterilizado y se añadieron 0.1 ml de glicerol al 80%.
- Se mezcló y almacenó a -70°C.

Para inocular un cultivo de una conserva almacenada en glicerol se realizó de la siguiente manera:

Se raspó con cuidado la superficie de un tubo almacenado a -70°C (cuidando de que no se descongele la totalidad del líquido) usando la punta de una pipeta o una asa estéril. Se enjuagó la punta en el medio líquido que se deseaba inocular conteniendo el antibiótico apropiado. Se regresó el microtubo al ultracongelador a -70°C evitando la descongelación (Novagen, 2005).

6.8 Clonación del gen *BnPA* en el vector de expresión pET-28a(+).

Como el gen *BnPA* se encuentra clonado en el vector pGEM-T y contiene los sitio de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, se extrajo el DNA plasmídico de la clona pGEM-T::*BnPA* y se sometió a una doble digestión con estas enzimas. La digestión se realizó en un volumen final de 100 µl con los siguientes componentes: 67 µl de agua estéril; 10 µl de amortiguador de *Bam*HI;

20 μ l de DNA (200 ng); 1 μ l de enzima *Bam*HI y 2 μ l de la enzima *Hind*III; se incubó por 2 h a 37°C. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El inserto liberado se cortó del gel y se purificó con el kit de purificación de DNA de gel (GE).

El plásmido pET-28a(+) también se sometió a una doble digestión con las mismas enzimas pero de manera secuencial con el fin de garantizar el corte de ambas enzimas y evitar la recirculación del vector. La primera digestión con la enzima *Hind*III se realizó mezclando los siguientes componentes: 11 μ l de agua estéril; 3 μ l de amortiguador de *Hind*III; 15 μ l de vector pET-28a(+) (1 μ g) y 1 μ l de enzima *Hind*III. La digestión se incubó por 16 h a 37°C y se cargó en un gel de agarosa. La banda correspondiente al plásmido linearizado se purificó con el kit de purificación de DNA de gel (GE) y se resuspendió en 20 μ l de agua estéril. El DNA se sometió a una digestión con la enzima *Bam*HI mezclando los siguientes componentes: 11 μ l de agua estéril; 3 μ l de amortiguador de *Bam*HI; 15 μ l de vector pET-28a(+) (1 μ g) y 1 μ l de enzima *Bam*HI. La mezcla de digestión se incubó por 16 h a 37°C y se cargó en un gel de agarosa. Para la ligación se ensayaron dos relaciones molares de inserto:vector, 3:1 y 6:1. Los componentes se enlistan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Componentes de la reacción de ligación del gen *BnPA* en el vector pET-28a(+)

Componente	Cantidad (μ l)	
	3:1	6:1
Amortiguador de ligasa 5x	4	4
Vector pET-28a(+)	2	2
Inserto	2.8	5.6
DNA Ligasa T4 (Promega)	0.8	0.8
Agua estéril	10.4	7.6
Total	20	20

Ambas reacciones se incubaron 1 h a 25 °C y se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 con 2 µL de esta mezcla. Se sembraron en placa 100 µl de las células transformadas en placas conteniendo medio LB/kanamicina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las colonias sobrevivientes se crecieron en medio líquido y se les extrajo el DNA plasmídico. Para verificar la presencia del inserto, se realizó PCR y digestión con ambas enzimas, tal y como se menciona en párrafos anteriores (sección 6.5). A las clonas positivas se les extrajo el DNA plasmídico para transformar células competentes de *E. coli*, se prepararon conservas en glicerol y se almacenaron a -70°C. Esta construcción se denominó pET-28a(+):*BnPA*.

6.9 Preparación de células competentes

Para la preparación de células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y Rosetta-gami 2 (DE3) se siguió el Protocolo Básico de introducción de DNA plasmídico en células (Ausubel *et al.*, 2002). Se inocularon 3 ml de medio LB con una colonia aislada de células de *E. coli*. Se creció toda la noche a 37°C y 250 rpm. Se inocularon los 3 ml a un matraz conteniendo 400 ml de medio LB en un matraz de 1 l, se creció a 37°C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica a 590 nm de 0.375. Se distribuyó el cultivo en 8 tubos de polipropileno estériles con 50 ml de medio y se dejaron en incubación en hielo durante 10 min. Se centrifugaron por 7 min a 1600g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y cuidadosamente la pastilla se resuspendió en 10 ml de solución de CaCl₂ fría (60 mM CaCl₂, 15% glicerol, 10 mM PIPES pH 7.0). Se centrifugó por 5 min a 1100 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 ml de la solución de CaCl₂ fría. Se incubó en hielo durante 30 min. Se centrifugó por 5 min a 1100 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de la solución de CaCl₂ fría. Se hicieron alícuotas de 50 µl en tubos de 1.5 ml estériles y se guardó inmediatamente en el ultracongelador a -70°C.

6. 10 Transformación de células competentes

Para transformar células competentes de *E. coli* se siguió el protocolo de transformación utilizando CaCl_2 (Ausuble *et al.*, 2002). Se descongeló una alícuota de células competentes a -70°C y se le agregó 1 μl del DNA de interés (aproximadamente 50 ng) y se dejó en incubación en baño de hielo durante 10 min. A la par se realizó un control negativo en el cual se agregó 1 μl de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA). Se dió un choque térmico a 42°C por 45 s e inmediatamente se colocaron en hielo durante 2 min. Se les agregó 950 μl de medio LB (1% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7.5) y se incubaron 1 h a 37°C a 150 rpm en agitador orbital (Environ shaker, Lab-line, Melrose Park, IL). Se inocularon 50 y 100 μl de cultivo por extensión en superficie en placas de LB con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.11 Inducción de la peroxidasa recombinante BnPA en *E. coli*

A partir de la conserva de glicerol de la cepa Rosetta 2 (DE3) y Rosetta-gami 2 (DE3) transformadas con la construcción pET28-*BnPA*, se inocularon 3 ml de medio LB-kanamicina y se crecieron por 16 h a 37°C . Este cultivo se utilizó para inocular un tubo con 3 ml de medio LB más 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamicina y 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cloranfenicol, y se incubó a 37°C y 200 rpm. Una vez alcanzada una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.8, se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG a una concentración final de 1 mM. Se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo antes de inducir (control de inducción); se continuó el crecimiento por 5 h y una vez terminado el tiempo, se centrifugó 1 ml del cultivo y la pastilla celular se preparó para electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las muestras de proteína se diluyeron 1:1 (v/v) con amortiguador de muestra 2x (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glicerol, 0.08% azul de bromofenol, 10% β -mercaptoetanol) y se sometieron a ebullición en baño maría por 5 min. Una vez enfriadas, las muestras se centrifugaron por 1 min y se cargaron en geles de poliacrilamida. Se utilizaron marcadores de proteínas de bajo peso molecular como referencia (GE).

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se efectuó según Laemmli, (1970). El gel se preparó al 10% de acrilamida en el gel separador y 3.9 % en el concentrador y se corrió en una cámara de electroforesis Mini PROTEAN 3, con fuente de poder PowerPac Basic (BioRad). Se trabajó a corriente constante de 10 mA hasta que las muestras entraron al gel separador, momento en el cual se aumentó la corriente a 15 mA y se dejó correr hasta que el frente (azul de bromofenol) alcanzara el otro extremo del gel separador (aprox. 2.5 h). Para el revelado de las bandas de proteína el gel se sumergió en solución fijadora (50% metanol v/v, 10% ácido acético v/v, 40% de agua destilada) en agitación suave durante 2 h. Se eliminó la solución fijadora y se incubó en la solución de teñido (50% metanol v/v, 0.05% (p/v) azul de Coomassie R-250 (BioRad), 10% (v/v) ácido acético y 40% (v/v) agua destilada) en agitación suave durante 4 h. Se eliminó la solución de teñido y se incubó el gel en la solución de desteñido (7% v/v ácido acético, 5% v/v metanol y 88% v/v de agua destilada) en agitación suave durante 2 h. Se agregó papel "Kimwipe" (Kimberly-Clark, NY, USA) hasta que las bandas azules se observaron y el gel se desteñó por completo. Una vez desteñido, el gel se almacenó en solución de ácido acético al 7%, se fotografió en un fotodocumentador con luz blanca (Alpha Innotech, CA, USA) y se secó en una lámina de papel celofán.

6.13 Expresión y análisis de solubilidad de la peroxidasa recombinante *BnPA*

Una vez que se verificó la inducción de la proteína recombinante, se realizaron ensayos en matraces con 200 ml de medio LB-kanamicina-cloranfenicol. El cultivo se creció a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.8 y se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG a diferentes concentraciones finales (40 a 1000 μ M) con el objetivo de analizar la solubilidad de la proteína en función de la concentración del inductor. También se ensayaron diferentes temperaturas de inducción (16 y 25 °C) con el objetivo de favorecer la solubilidad de la enzima recombinante. Se continuó el cultivo por 5 h (a 37 °C) o 12 h (a 16 y 25 °C) y pasado el tiempo, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4,000g durante 20 min. La pastilla celular se resuspendió en amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 2 M, DTT 10 mM) y se sometió a ultrasonido durante 10 min, bajo el régimen de 10 s de pulso y 15 s de descanso. Se dejó reposar en hielo por 30 min y se sometió a ultrasonido bajo las mismas condiciones. El lisado celular se centrifugó a 10,000g durante 25 min y se separó la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (pastilla). Se tomó una muestra de ambas fracciones y se prepararon para electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.14 Solubilización de cuerpos de inclusión.

La pastilla conteniendo a la fracción insoluble se lavó dos veces con amortiguador Tris-HCl pH 8.0 y se centrifugó a 10,000g durante 15 min. La pastilla lavada se resuspendió (5 ml por g de peso húmedo) en amortiguador de solubilización de cuerpos de inclusión (urea 8 M, DTT 1 mM) evitando la formación de burbujas y se dejó en agitación suave durante 1 h. La suspensión se centrifugó a 10,000g durante 25 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubilizadas (PS) se separó de la pastilla insoluble (PI), se tomó muestra de ambas fracciones y se prepararon para electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.15 Purificación de la peroxidasa recombinante *BnPA* por IMAC

La proteína solubilizada se purificó por cromatografía de afinidad a níquel utilizando columnas pre-empacadas con Sefarosa 6 precargada con Ni (HisTrap FF, GE). Estas columnas son ideales para la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a una cola de histidinas mediante IMAC.

Antes de usar la columna, se eliminó el etanol inyectando 5 volúmenes de columna (vdc) de agua destilada. La columna se equilibró con 5 vdc de amortiguador de unión (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol, pH 7.4). Se inyectó la muestra (1 a 5 ml dependiendo de la concentración de proteína) y se lavó extensivamente la columna con 15 vdc de amortiguador de unión. La proteína se eluyó en un solo paso con 5 vdc de amortiguador de elución (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 7.4). Se recolectaron fracciones de 0.5 ml, se les midió la absorbancia a 280 nm y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Se determinó proteína total por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

6.16 Recambio de amortiguador por cromatografía de filtración en gel

La reducción de la concentración de urea presente en la proteína solubilizada se realizó de manera gradual para evitar la precipitación de la proteína para lo cual se utilizaron columnas de cromatografía 10DG (BioRad). La columna se equilibró con 2 vdc de amortiguador conteniendo 4 M de urea y 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0. Se agregó la muestra (*BnPA* purificada y desnaturalizada) a la columna (3 ml) y después se agregaron 4 ml del mismo amortiguador para recolectar la proteína.

A continuación se equilibró otra columna con 2 vdc con amortiguador conteniendo 2 M de urea y 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0. Se agregó la muestra (*BnPA* parcialmente desalada conteniendo 4 M de urea) a la columna y se agregaron 4 ml del mismo amortiguador para recolectar la proteína. Se

recolectaron fracciones de 1 ml, se les midió la absorbancia a 280 nm y se graficaron contra el volumen para identificar la proteína de interés. Las fracciones también se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Este proceso de dos pasos permitió la reducción gradual de la concentración de urea de 8 a 2 M y permitió el ajuste de las condiciones de replegamiento de la BnPA recombinante.

6.17 Plegamiento de la BnPA recombinante

La proteína (50 µg/ml) en 2 M de urea se agregó gota a gota al medio de replegamiento cuya composición se basó en las condiciones ideales para la HRP establecidas por Gazaryan *et al.* (1994): urea 2 M, DTT 0.1 mM, glutatión oxidado 0.7 mM, CaCl₂ 5 mM, glicerol 5% (v/v) en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Se eligió utilizar pH 8 basándose en experiencia previa con la peroxidasa de nabo. La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche y luego se le agregó hemina a una concentración final de 5 µM a partir de una solución 2 mM de cloruro de hemina (MP Biomedicals) en NaOH 0.1 M, incubándose 2 h a 4°C. Posteriormente se evaluó la actividad de la enzima reconstituída. Con el objetivo de mejorar el plegamiento de la BnPA recombinante, se variaron independientemente las concentraciones de urea y glutatión oxidado. La concentración de urea se varió de 1.5 a 3 M, mientras que la concentración de glutatión oxidado fue de 0.1 a 1.5 mM manteniendo la concentración de los otros componentes del medio constante. La enzima BnPA se concentró mediante ultrafiltración usando membranas de corte de peso molecular de 10 kDa (Millipore)

6.18 Espectro de absorción UV-vis de la peroxidasa recombinante

El espectro de absorción de la peroxidasa BnPA se realizó una vez replegada y añadido el grupo hemo en amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y urea 2 M. El espectro se registró en una celda de cuarzo en el espectrofotómetro

Genesys 10 UV (Thermoscientific, WI, USA) en una longitud de onda de 260 a 750 nm a temperatura ambiente.

6.19 Medición de actividad de peroxidasa

Basado en la cromogénesis y quimioluminiscencia de los productos, se han desarrollado numerosos métodos para determinar la actividad de peroxidasa. Los donadores de hidrógeno comúnmente usados son el guayacol, pirogalol, ABTS, y fenol más aminoantipirina. Entre ellos, el guayacol es fácilmente disponible y simple para operar y se usa frecuentemente, aunque su producto no es estable. El ABTS y fenol más aminoantipirina se usan ampliamente en microanálisis, ensayos ELISA y técnicas de histoquímica. Ambos métodos son sensibles y los productos cromogénicos son relativamente estables. La reacción catalizada por la peroxidasa (HRP) es (Eq. 9):



El ABTS tiene un máximo de absorción a 340 nm (pH 4.4) y un $\epsilon_{414} = 3.97 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este es oxidado por la HRP a un catión radical que tiene una máxima absorción a pH 5.0 con un $\epsilon_{414} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En una celda de poliestireno se hizo una mezcla en el siguiente orden: 1340 μl de amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 6; 50 μl de enzima; 30 μl de ABTS 2.5 mM (en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6) y 80 μl de H_2O_2 5 mM. La formación del radical de ABTS se monitoreó a 414 nm, por los primeros 3 min contra un blanco en el cual la peroxidasa se remplaza por agua destilada. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como los μmoles de radical ABTS producidos por min a pH 6 y 25°C (Childs y Bardsley, 1975).

El cálculo de la actividad enzimática se realizó utilizando la ecuación 10 (Tijssen, 1993):

$$\frac{V}{v} \times \frac{1}{a \cdot b} \times \frac{A}{\text{min}} \times d = 446.774 \times \frac{A}{\text{min}} \times d \left(\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right) \quad (10)$$

donde:

V = volumen total del ensayo (1.5 ml)

v = volumen de enzima (0.05 ml)

a = espesor de la celda (10 mm)

b = coeficiente de extinción molar del ABTS ($3.72 \text{ l mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$)

A/min = pendiente

d = dilución de la muestra de enzima

Dividiendo la actividad volumétrica entre la concentración de la enzima (mg/ml) se obtiene la actividad específica.

6.20 Caracterización bioquímica de la peroxidasa recombinante.

6.20.1 pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de actividad enzimática, se prepararon los siguientes amortiguadores: para el rango de pH 3-7 se usó amortiguador citrato-fosfato 20 mM; para pH 8 amortiguador de fosfatos 20 mM, y para pH 9 amortiguador Tris-HCl 20 mM. Para la reacción se utilizó H_2O_2 (2 mM), ABTS (2.5 mM) y 50 μL de la enzima purificada y replegada (50 $\mu\text{g/ml}$). Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente utilizando el espectrofotómetro Genesys 10 UV.

6.20.2 Temperatura óptima

La actividad de peroxidasa se midió en un rango de temperatura de 25 a 70°C con incrementos de 5°C usando el pH óptimo. La temperatura se controló utilizando una placa de baño seco Labnet (Woodbridge, NJ).

6.20.3 Estudios cinéticos

Las constantes cinéticas de la oxidación de ABTS por la peroxidasa recombinante BnPA se determinaron variando la concentración de H_2O_2 de 0.5 a 5 mM y las de ABTS de 0.05 a 3 mM. El pH, fuerza iónica y temperatura se mantuvieron constantes en esta serie de experimentos. Los valores de K_m y V_{max} para el sustrato ABTS se calcularon usando el método de los recíprocos de Lineweaver-Burk para el mecanismo de ping-pong de dos sustratos seguido por la peroxidasa (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001). Las ecuaciones de velocidad en la forma de dobles recíprocos se escriben abajo en la Eq. 11 (Voet, 2004)

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_a}{V_{max}A_0} + \frac{K_b}{V_{max}B_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (11)$$

Donde, V_{max} = velocidad máxima, (mM/min), $K_a = K_m$ para el sustrato A (peróxido de hidrógeno, mM), $K_b = K_m$ para el sustrato B (ABTS, mM), A_0 = concentración del sustrato A y B_0 = concentración del sustrato B, (mM). Una gráfica de $1/v_o$ contra $1/B_0$ para diferentes valores de A_0 (Eq. 11) da como resultado una serie de líneas paralelas, características de un mecanismo de ping-pong. Cuando A_0 es constante, la ecuación 11 da una pendiente y un intercepto dado por las ecuaciones 12 y 13,

$$pendiente = \frac{K_b}{V_{max}} \quad (12)$$

$$intercepto = \frac{K_a}{V_{max}A_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (13)$$

Una gráfica de los interceptos contra $1/A_0$ da una línea recta con un intercepto y una pendiente dado por las ecuaciones 14 y 15,

$$intercepto = \frac{1}{V_{max}} \quad (14)$$

$$\text{slope} = \frac{K_a}{V_{max}} \quad (15)$$

De esta manera, los parámetros K_b , V_{max} y K_a se pueden determinar de las ecuaciones 12, 14 y 15.

6.20.4 Efecto de iones metálicos y sales.

La peroxidasa recombinante BnPA purificada y replegada (50 μ l) se incubó con 50 μ l de diversas sales (AgNO_3 0.25 mM, 5 mM de MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl , KCl , ZnCl_2 , EDTA, MnSO_4) o agua destilada como control a temperatura ambiente por 30 min. Transcurrido el tiempo, se midió la actividad de peroxidasa. Los resultados se expresan como la actividad relativa calculada como el cociente entre la actividad específica de la enzima purificada con los metales o sales y la del control.

6.21 Dicroísmo circular (DC)

El espectro de DC en la región de UV lejano (190 a 240 nm) fué registrado usando un celda de cuarzo de 0.1 cm de recorrido óptico bajo flujo constante de nitrógeno usando una concentración de proteína de 0.1 mg/ml en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.0. Los datos de DC (miligrados) se convirtieron a elipticidad molar $[\theta]$ (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), asumiendo un peso promedio de cada residuo aminoácido de 110 Da. La elipticidad molar se determinó como $[\theta] = (\theta \times 100) (c l)^{-1}$, donde c es la concentración de proteína (mg/ml), l es la longitud de recorrido óptico (cm) y θ es la elipticidad registrada (miligrados). Los espectros de DC se reportaron como el promedio de 3 mediciones corregidas mediante la sustracción del blanco el cual consistió en amortiguador de fosfatos sin proteína BnPA. Los datos fueron introducidos en un programa para análisis de DC de proteínas (Whitmore y Wallace, 2004) y se calculó el contenido de estructura secundaria y análisis gráfico comparando estructuras calculadas y datos experimentales, disponible en la página web: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>. Las

fracciones de estructura secundaria (α -hélice, β -plegada y estructura aleatoria) se calcularon usando el programa SELCON3 (Sreerama *et al.*, 1999).

6.22 Identificación de la BnPA recombinante mediante transferencia tipo “western”

Para la detección de la proteína BnPA recombinante se corrió un gel de poliacrilamida y en un carril se cargaron los marcadores de proteína y en otro la proteína purificada y desnaturalizada. En la otra mitad del gel, se cargaron las mismas muestras con el objetivo de tener un duplicado. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se cortó y la mitad se tiñó con azul de Coomassie y la otra mitad se utilizó para continuar con la transferencia tipo “western”. Se preparó el amortiguador de transferencia (48 mM Tris-HCl, 39 mM glicina y 20% metanol, sin ajuste de pH) y se equilibró la mitad del gel a transferir en agitación suave durante 30 min. Se cortó una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) del tamaño aproximado del gel y se sumergió lentamente en amortiguador de transferencia durante 10 min en agitación suave. Para la transferencia se utilizó una unidad de transferencia en semi-seco (BioRad). Se removió la cubierta protectora y se preparó el sándwich en orden ascendente: ánodo de platino, papel filtro húmedo, membrana húmeda, gel equilibrado, papel filtro húmedo, cátodo de acero inoxidable

En cada paso, se deslizó un tubo de ensaye sobre la superficie para eliminar burbujas. Con mucho cuidado se colocó el cátodo de acero inoxidable sobre el sándwich y la cubierta protectora sobre la unidad. Se conectó a una fuente de poder y se transfirió a 25 V durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se desconectó la fuente, se recuperó la membrana transferida y se tiñó con una solución de rojo de Ponceau (BioRad) diluída 1:1. Una vez que aparecieron las bandas de las proteínas transferidas, se fotografió la membrana y se destiñó con una solución diluída de NaOH.

Para el tratamiento de la membrana se prepararon las siguientes soluciones, amortiguador de fosfatos salino (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄), amortiguador de fosfatos salino más 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) y amortiguador de bloqueo (PBSTM) (PBST + 5% w/v de leche descremada grado bloqueo, BioRad). La membrana transferida se incubó en 20 ml de PBSTM durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación suave. La membrana bloqueada se lavó dos veces con 20 ml de PBST durante 5 min cada vez con agitación suave.

La membrana lavada se incubó con el anticuerpo (Ab) anti-His primario (Millipore). Se preparó por centrifugación del vial donde se encontraba y se mezclaron los 200 µg del anticuerpo con 200 µL de amortiguador de almacenamiento (PBS, pH 7.4 con azida de sodio 0.05%). Se distribuyó en tubos de microcentrifuga y se almacenó a -20°C. Posteriormente se diluyó 1:1000 en amortiguador PBSTM fresco, se incubó con la membrana por 2 h con agitación suave y terminada la incubación, el exceso de anticuerpo se eliminó lavando cinco veces la membrana con PBST más SDS al 1% durante 10 min (cada lavado) a temperatura ambiente.

Después del lavado, la membrana se incubó con el segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Millipore). Este anticuerpo policlonal de cabra conjugado a la HRP se adquirió liofilizado a partir de un amortiguador de fosfato de potasio 0.02 M, NaCl 0.15, pH 7.2, BSA 10 mg/ml y sulfato de gentamicina 0.01%. Se añadieron 500 µL de agua estéril conteniendo 50% de glicerol para hacer una solución de una concentración final de 1 mg/ml y se almacenó en varias alícuotas a -20°C. Este Ab secundario se diluyó 1:750 en amortiguador PBSTM y se incubó la membrana con este Ab toda la noche en agitación suave en refrigeración. Al siguiente día, la membrana se lavó 5 veces con amortiguador PBST durante 10 min cada uno a temperatura ambiente. La membrana se lavó por última vez solamente con amortiguador PBS. Después del lavado, la membrana se reveló con reactivos de detección para transferencia tipo

“western” (GE) siguiendo las instrucciones del manual. Se mezcló un volumen igual de la solución de detección 1 con la 2 permitiendo la total cobertura de la membrana y se distribuyó sobre la superficie. Se dejó en contacto por 5 min.

Pasado el tiempo, la membrana se envolvió en una bolsa de plástico y se trató de eliminar completamente todas las burbujas. Se introdujo la membrana, con el lado de las proteínas hacia arriba, dentro de un cassette de películas de rayos X (Kodak, NY, USA) y se fijó con cinta adhesiva. Se acudió a un cuarto oscuro provisto de luz roja y se cubrió la membrana con placa fotográfica. Se cerró el cassette y se expuso a diferentes tiempos comenzando con 15 y 30 s después 1, 3, 5 y 10 min. Posteriormente se abrió el cassette y la membrana se sumergió en la solución reveladora (Kodak) por un min, después se enjuagó con agua durante un min y finalmente se sumergió por un min en la solución fijadora (Kodak). Se encendió la luz y se observó la aparición de bandas en la placa fotográfica.

6.23 Determinación de los parámetros termodinámicos de desnaturalización

Los datos de DC (25 a 90°C) de la transición de la BnPA del estado nativo al desnaturalizado se transformaron a elipticidad molar $[\theta]$ (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), tal como se mencionó en el apartado de dicroísmo circular (sección 6.21). Los datos y gráficas generadas se muestran en el Anexo D. Los datos de elipticidad se utilizaron para obtener la fracción de proteína desplegada (f_u) a cada temperatura con la ecuación (16) (Cooper, 1999).

$$f_u = \frac{[\theta]_{\text{obs}} - [\theta]_N}{[\theta]_U - [\theta]_N} \quad (16)$$

Con los valores de la fracción de proteína desplegada se calculó la constante de equilibrio (K_u) a cada temperatura utilizando la ecuación (17):

$$K_u = \frac{f_u}{1-f_u} \quad (17)$$

Con los valores de la constante de equilibrio se calculó la energía libre de Gibbs de desnaturalización (ΔG_u°) a cada temperatura con la ecuación (18):

$$\Delta G_u^\circ = -RT \ln (K_u) \quad (18)$$

Los valores de ΔG_u° se graficaron contra la temperatura absoluta y se determinó el valor de la temperatura de desnaturalización ($T_{1/2}$) asumiendo que cuando $f_u = 0.5$, $T = T_{1/2}$.

Considerando que cuando $\ln K_u = 0$, $\Delta G_u^\circ = 0$ entonces se pueden calcular los parámetros termodinámicos utilizando la ecuación (19):

$$\Delta G_u^\circ = \Delta H_u^\circ - T \Delta S_u^\circ \quad (19)$$

$$\text{Entonces } \Delta H_u^\circ = T \Delta S_u^\circ = T_{1/2} \Delta S_u^\circ$$

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Subclonación del gen *BnPA* en el vector pGEM-T.

Se realizó una PCR con los oligonucleótidos diseñados para la clonación del gen *BnPA* en el vector pET-28a(+) (Cuadro 4) utilizando como molde el DNA de la clona TOPO::*BnPA* (Fig 13).

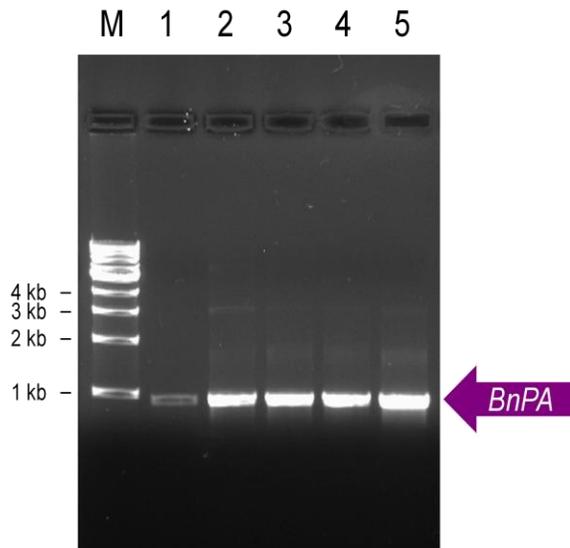


Figura 13. Amplificación del gen *BnPA* a 55°C. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb; carriles 1-5: DNA amplificado utilizando como molde el DNA de la cepa TOPO::*BnPA* a 12.5 ng/μl, 25 ng/μl, 60 ng/μl, 50 ng/μl (1 μl cargado) y 50 ng/μl (2 μl cargados), respectivamente.

Se ensayaron las concentraciones de DNA molde para optimizar la concentración de DNA amplificado y se utilizó una temperatura de alineamiento de 55°C (especificada en la ficha técnica de los oligos). En todos los carriles se observa la amplificación de una sola banda del tamaño esperado (945 pb) lo cual indica la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. En lo sucesivo se utilizó una concentración de 50 ng/μl del DNA molde. La banda se cortó y purificó del gel para posteriormente ligarla en el vector pGEM-T. De la transformación en células

competentes, se obtuvieron 9 colonias, 7 de ellas contenían el inserto (blancas) (Fig 14). Por lo anterior se concluye que se obtuvo una buena eficiencia de ligación del 77%.

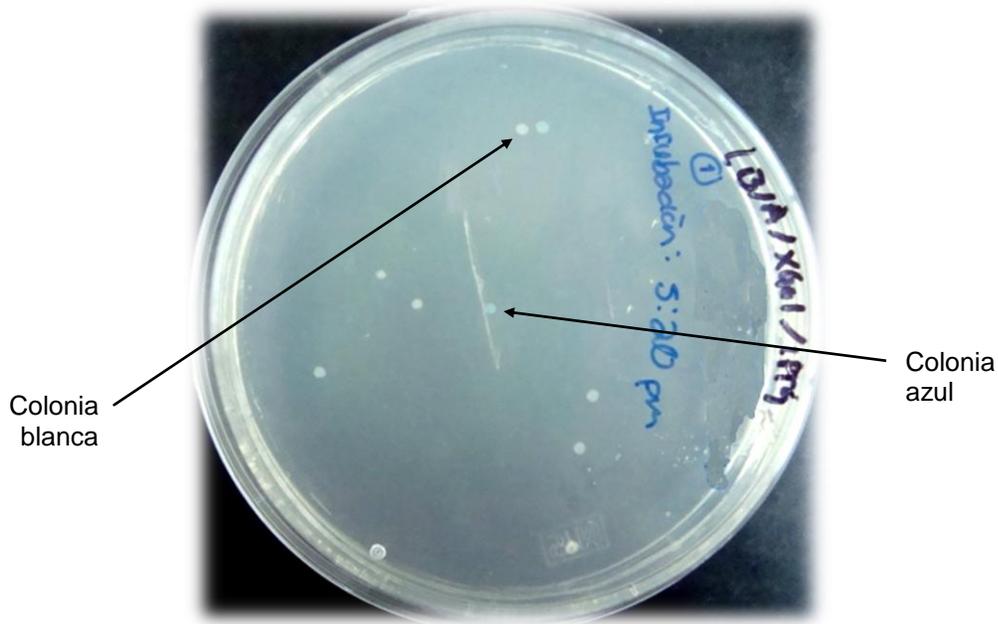


Figura 14. Placa con colonias conteniendo medio LB/IPTG/XGAL/AMP transformadas con la construcción pGEMT::*BnPA*

Las colonias blancas se cultivaron en medio líquido, se les extrajo el DNA plasmídico y se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (Fig 15, carril 3) y con la enzima *Eco*RI (Fig 15, carril 2). Como control de corte de las enzimas, se realizó una digestión de la clona TOPO::*BnPA* con la enzima *Eco*RI ya que el sitio de reconocimiento de esta enzima flanquea el sitio de clonación del vector pGEM-T y de esta manera, libera al producto clonado en el vector (carril 1). Del gel se observa que la liberación del inserto del carril 1 se encuentra más arriba que los dos insertos de los carriles 2 y 3. Lo anterior es debido a que el inserto liberado del vector TOPO (carril 1) corresponde al gen completo *BnPA* mientras que el inserto liberado del vector pGEMT (carriles 2 y 3)

corresponde al fragmento del marco de lectura abierto que codifica para la proteína madura, es decir, sin su secuencia de péptido señal y la posible señal de secreción vacuolar, por lo que es lógico que este fragmento presentara un tamaño ligeramente menor (921 pb) que el correspondiente al gen completo (1077 pb).

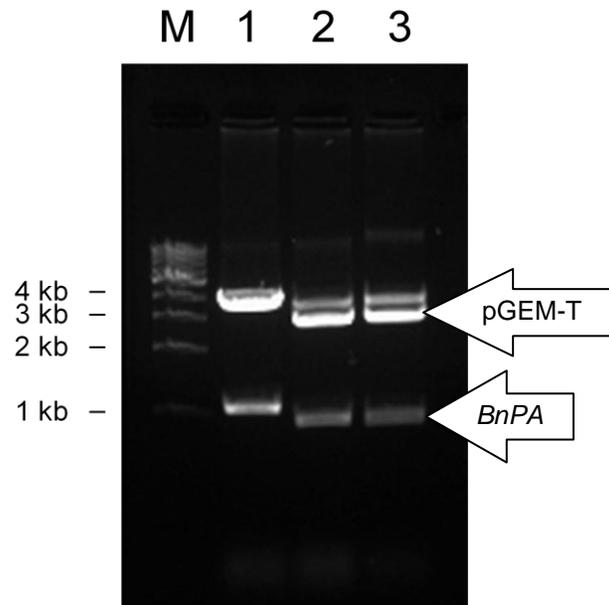


Figura 15. Digestión del DNA de las clonas TOPO::*BnPA* y pGEMT::*BnPA*. Carril M, marcador de peso molecular de 1kb; carril 1, DNA de la clona TOPO::*BnPA/EcoRI*; carril 2, DNA de la clona pGEM-T::*BnPA/EcoRI*; carril 3, DNA de la clona pGEM-T::*BnPA/BamHI/HindIII*

El DNA de la clona pGEM-T::*BnPA* libera un inserto con peso molecular muy cercano a 1 kb, que corresponde con el tamaño del gen *BnPA* sin los primeros 31 aminoácidos en el extremo N-terminal ni los últimos 22 aminoácidos en el extremo C-terminal (carril 3). Al digerir el DNA con la enzima *EcoRI*, que flanquea el sitio múltiple de clonación del vector pGEM-T, se liberó un inserto de casi el mismo tamaño (carril 2).

La presencia del inserto en el vector pGEMT también se confirmó por PCR. La reacción de PCR se realizó a dos diferentes temperaturas de alineamiento (55 y 56°C) (Fig. 16). El control positivo (carril 2) presenta una banda del tamaño esperado y no se observa la amplificación de bandas en el control negativo (carril 1) por lo que se puede considerar confiable la reacción. En los carriles 3 y 4 se observa la amplificación de una banda casi de la misma intensidad que la del control positivo, por lo que ambas temperaturas amplifican bien el inserto de interés.

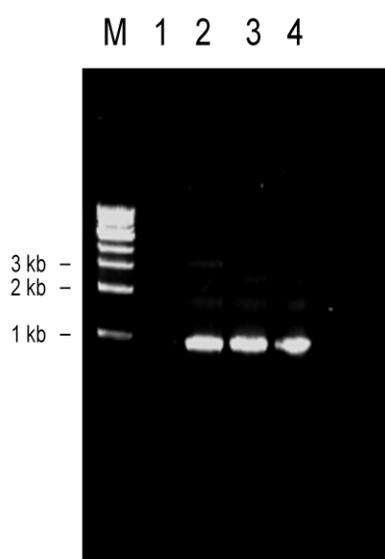


Figura 16. Amplificación del gen *BnPA* de la clona pGEMT::*BnPA*. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb; carril 1, control negativo de amplificación; carril 2, control positivo clona TOPO::*BnPA*; carriles 3 y 4, DNA amplificado a 55° y 56°C, respectivamente.

Con la clonación del gen *BnPA* en el vector pGEMT se cumple con el objetivo de introducir el gen en un vector de clonación y almacenarlo para cuando se requiera su utilización; además, se confirmó la presencia de los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III flanqueando el inserto, lo que permitirá su posterior clonación en el vector pET-28a(+). Esta nueva construcción se denominó

pGEMT::*BnPA* y se utilizó en lo sucesivo para la clonación del gen *BnPA* en el vector de expresión.

7.2 Preparación de células competentes de las cepas de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) y Rosetta-gami 2 (DE3)

Las células competentes se prepararon siguiendo lo reportado por Ausubel *et al.*, (2002) utilizando una solución de CaCl_2 . El rango de eficiencia de transformación siguiendo este protocolo es de 10^6 a 10^8 transformantes/ μg de DNA.

Para verificar la competencia de las células, se transformó un vial conteniendo 50 μl de células con 50 ng de vector pET28a(+). Se inocularon 100 μl de las células transformadas en una placa con medio LB/kanamicina/cloranfenicol. Después de incubar la placa toda la noche a 37°C , se obtuvo un buen crecimiento de colonias transformadas tal y como se muestra en la Fig. 17.

El cálculo de la eficiencia de transformación se realizó siguiendo las recomendaciones del manual del vector pGEM-T (Promega):

Después de que 50 μl de células competentes se transformaron con 50 ng de DNA plasmídico circular, a la reacción de transformación se le agregaron 950 μl de medio LB. Para este volumen, se hizo una dilución 1:20 con medio LB (0.5 ng DNA/ml) y se sembraron en placa 100 μl de la reacción en dos placas. En la placa incubada toda la noche crecieron un total de 150 unidades formadoras de colonia (ufc) (promedio de las dos placas), la eficiencia de transformación se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{150 \text{ ufc}}{0.5 \text{ ng}} = 300 \frac{\text{ufc}}{\text{ng}} = 3 \times 10^5 \frac{\text{ufc}}{\mu\text{g DNA}}$$

La eficiencia de transformación (3×10^5 ufc/ μg DNA) de las células competentes preparadas en el laboratorio se encuentra por debajo del rango

esperado para este protocolo (Ausubel *et al.*, 2002) (de 10^6 a 10^8 transformantes/ μg de DNA) y del nivel reportado para las células competentes comerciales JM109 (de 10^7 hasta 10^9 transformantes/ μg de DNA, Promega).

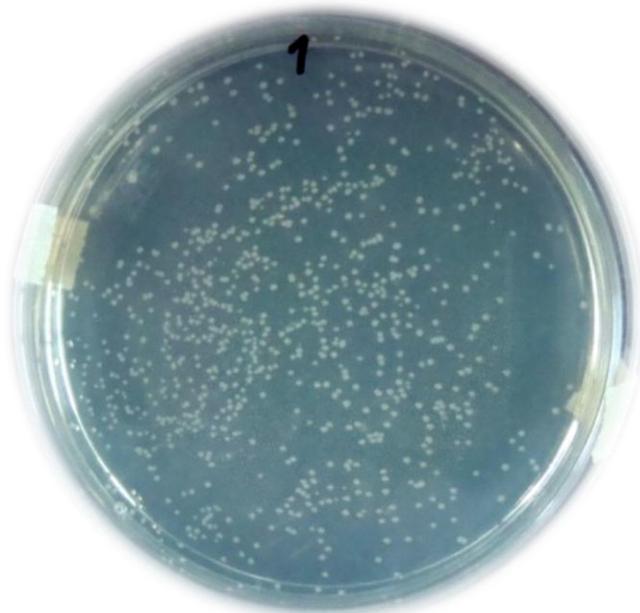
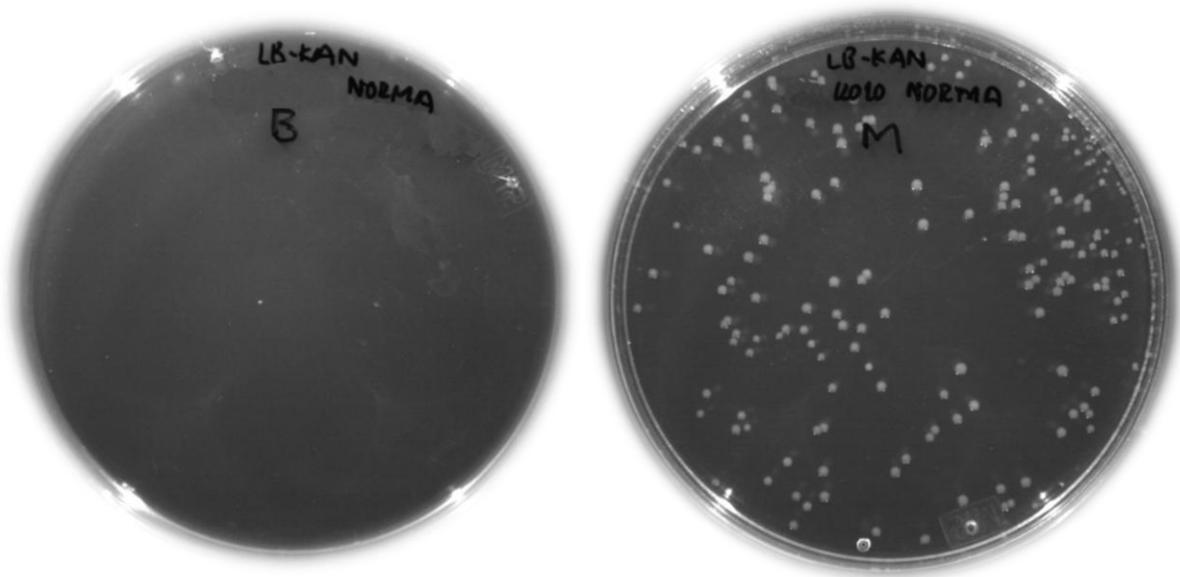


Figura 17. Placa conteniendo células competentes de *E. coli* Rosetta 2 previamente preparadas con CaCl_2 y transformadas con 50 ng de DNA plasmídico circular.

Sin embargo, con este valor de eficiencia se logró transformar las células competentes de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) con la construcción que se tenía hasta el momento denominada pGEMT::*BnPA*. Esta transformación sirvió como control de la transformación ya que no se trata de un vector comercial, si no de una construcción ligada en el laboratorio.

También se realizaron células competentes de la cepa Rosetta-gami 2 (DE3) y se obtuvo un buen crecimiento (Fig 18) obteniéndose una eficiencia de transformación de 6×10^5 ufc/ μg DNA. También se realizó una transformación con

agua y en dicha placa no se observó crecimiento, confirmando que las células competentes preparadas están libres de contaminación (control negativo, Fig. 18).



Control negativo

Figura 18. Placas conteniendo células competentes de *E. coli* Rosetta-gami 2 previamente preparadas con CaCl_2 y transformadas con 50 ng de DNA plasmídico circular.

Las células competentes preparadas se guardaron en el ultracongelador a -70°C para su posterior utilización en los experimentos de clonación y expresión.

7.3 Clonación del gen *BnPA* en el vector de expresión pET-28a(+)

Debido a que el gen *BnPA* se encontraba clonado en el vector pGEM-T que contiene los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III, se realizó una doble digestión de la construcción pGEM-T::*BnPA* para liberar el inserto con los extremos cohesivos e integrarlo en el vector pET-28a(+). Este vector se digirió con

las mismas enzimas para abrirlo y generar los extremos cohesivos complementarios. El inserto y el vector pET-28a(+) digeridos y purificados se ligaron y la construcción resultante se transformó en células competentes de *E. coli*. Se obtuvieron varias colonias transformantes en placa, las cuales se crecieron en medio líquido (LB) y se les extrajo el DNA plasmídico. El DNA extraído se sometió a una doble digestión para liberar el inserto. De las 12 colonias analizadas 5 contenían el inserto de tamaño esperado (Fig 19, carriles 2, 6, 8, 10 y 12).

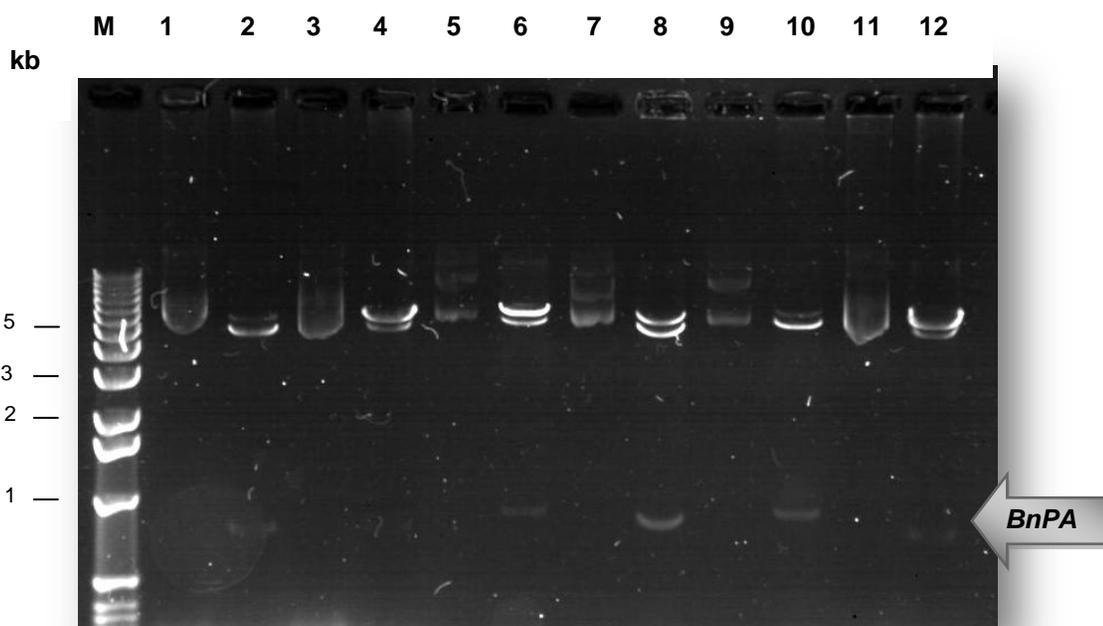


Figura 19. Análisis de restricción del DNA de las clonas transformadas con la construcción pET-28a(+)::*BnPA*. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb; carriles 1 al 12, análisis de restricción del DNA plasmídico con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III.

Con lo anterior, se puede estimar una eficiencia de ligación del 42%. La presencia del inserto se confirmó también por PCR con el DNA de las clonas positivas y se obtuvo la amplificación de una banda del tamaño esperado (Fig 20).

El plásmido pET-28::*BnPA* de una de las clonas positivas se transformó en células competentes de *E. coli* Rosetta para expresar la proteína recombinante. Con la clonación del gen *BnPA* en el vector de expresión pET-28a(+) se obtuvieron todos los elementos para expresar a la proteína BnPA en un sistema bacteriano ya que el vector cuenta con los recursos moleculares para expresarla en *E. coli* y producirla en buenas cantidades.

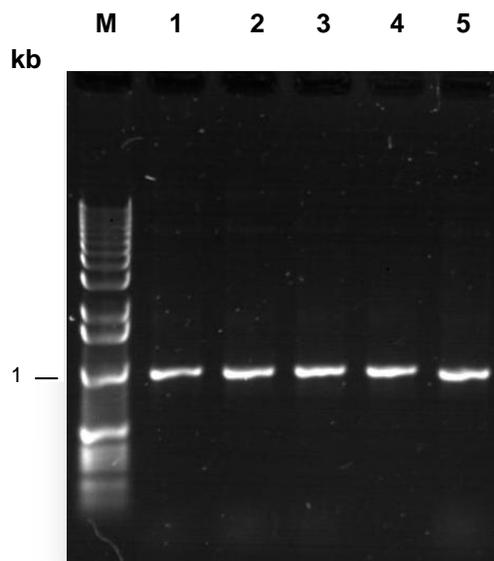


Figura 20. Análisis de PCR del DNA de las clonas transformadas con la construcción pET-28a(+>::*BnPA*. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb; carriles 1 al 5, amplificación por PCR de las clonas positivas.

7.4 Inducción de la peroxidasa recombinante BnPA en la cepa Rosetta 2 (DE3).

Cuando el mRNA de un gen heterólogo es sobreexpresado en *E. coli*, las diferencias en el uso de codones pueden impedir la traducción debido a la demanda de uno o más tRNAs que pueden ser escasos o estar faltando en la población. Insuficientes tRNAs puede provocar estancamiento de la traducción,

prematura terminación de la traducción, cambio en el marco de lectura e incorporación errónea de aminoácidos (Novagen, 2005).

El contenido de codones raros encontrados en la secuencia que codifica para la BnPA se muestra en el Cuadro 6. Un total de 60 aminoácidos codificados por codones raros en la secuencia de 315 residuos de aminoácidos de la enzima BnPA, representan el 19% lo cual aumenta las posibilidades de ocasionar paros en la traducción o cambios en el marco de lectura e incorporación errónea de aminoácidos.

Cuadro 6. Codones raros encontrados en la secuencia que codifica para la peroxidasa recombinante BnPA

Codón	Amino ácido	Cantidad
AUA	Ile	5
AGA y CGG	Arg	23
CUA	Leu	10
CCC	Pro	9
GGA	Gly	13
Total		60

Este problema se puede resolver empleando las cepas Rosetta™ ya que están diseñadas para mejorar la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raramente usados en *E. coli* ya que suplementa los tRNAs para los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC y GGA.

En este trabajo se inició la expresión en la cepa Rosetta 2 (DE3) y consecutivamente en la cepa Rosetta-gami 2 (DE3). La cepa Rosetta 2 cuenta con un séptimo codón raro (CGG) adicional a los que están presentes en la cepa Rosetta original (Novagen, 2005).

Para conocer la concentración de inductor (IPTG) necesaria para la expresión de la peroxidasa, se realizaron experimentos de expresión a diferentes concentraciones de IPTG (40, 100, 200, 500 μ M y 1 mM). Los cultivos se crecieron a 37°C y una vez agregado el IPTG, se incubaron por 4 h adicionales tomando muestra cada 2 h para su análisis electroforético. Según el perfil electroforético de la Fig. 21, en la inducción con 40 μ M de IPTG se observa una banda de expresión diferencial (carril 2) que no se observa en el carril del extracto proteico sin inducir (carril 1). El marco de lectura abierto del gen de la peroxidasa es de 1077 pb (Romero *et al.*, 2008), sin embargo en este trabajo se decidió clonar y expresar a la peroxidasa sin su péptido señal en el extremo amino terminal ni la posible señal vacuolar en el extremo carboxilo terminal. Basados en la secuencia de aminoácidos, el peso aproximado para la peroxidasa BnPA recombinante es 35 kDa más 3.5 kDa que corresponden al vector pET-28a(+) lo que suma un total de 38.5 kDa. Con lo anterior se puede aceptar que la banda de expresión diferencial observada en el gel de la Fig. 21 corresponde a la peroxidasa recombinante BnPA.

De los carriles 2 y 3 se observa que la banda de la peroxidasa BnPA del carril 2 correspondiente a 2 h de inducción con 40 μ M de IPTG es mayor a la de 4 h (carril 3), sin embargo si se observan detenidamente los carriles, se puede concluir que las proteínas del carril 2 están ligeramente más concentradas que las del carril 3, por lo tanto la inducción de la peroxidasa del carril 2 quizá sea de la misma intensidad que la del 3. El volumen de muestra que se cargó en cada pozo fue de 12 μ l. Lo anterior muestra que no hay mayor producción de la proteína recombinante después de 2 h de inducción a 37°C.

Lo mismo sucedió con la inducción con 100 μ M de IPTG (carriles 5 y 6). Las bandas de expresión se observan casi de la misma intensidad a las 2 h (carril 5) y 4 h (carril 6) de inducción. También se hizo una inducción con la cepa Rosetta (DE3) sin construcción (carriles 8 y 9) para comprobar que no expresa la proteína recombinante. No se observa la aparición de una banda de expresión diferencial de alguna proteína o al menos del peso molecular esperado para la BnPA.

La banda correspondiente a la expresión de la proteína BnPA (carril 2, Fig. 21) representa aproximadamente un 34% del total de la proteína producida por *E. coli* de acuerdo a análisis densitométrico.

En la inducción con 200 μM de IPTG se observa la misma situación (Figura 22) ya que no se observa diferencia significativa en la inducción de la proteína después de 2 h (carril 2) que después de 4 h (carril 3) en relación con el carril de proteínas sin inducir (carril 1). En la inducción con 500 μM de IPTG se observó de manera similar a la de 200 μM de IPTG ya que no se observa diferencia de inducción entre las dos temperaturas (carriles 5 y 6) con respecto al carril con proteína sin inducir (carril 4).

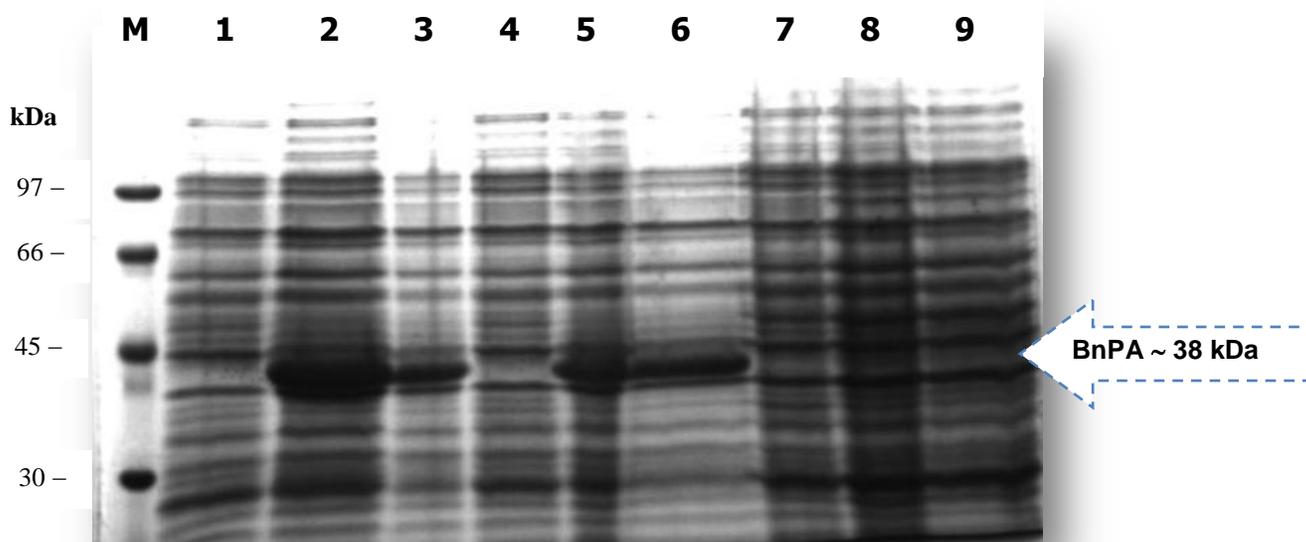


Figura 21. Inducción de la peroxidasa BnPA recombinante con 40 y 100 μM de IPTG. Carril M, Marcador de bajo peso molecular. Extracto proteico total: carriles 1, 4 y 7, sin inducir; carril 2, inducido con 40 μM de IPTG por 2 h; carril 3, inducido con 40 μM de IPTG por 4 h; carril 5, inducido con 100 μM de IPTG por 2 h; carril 6, inducido con 100 μM de IPTG por 4 h; carril 8, cepa Rosetta (DE3) sin vector por 2 h; carril 9, cepa Rosetta (DE3) sin vector por 4 h.

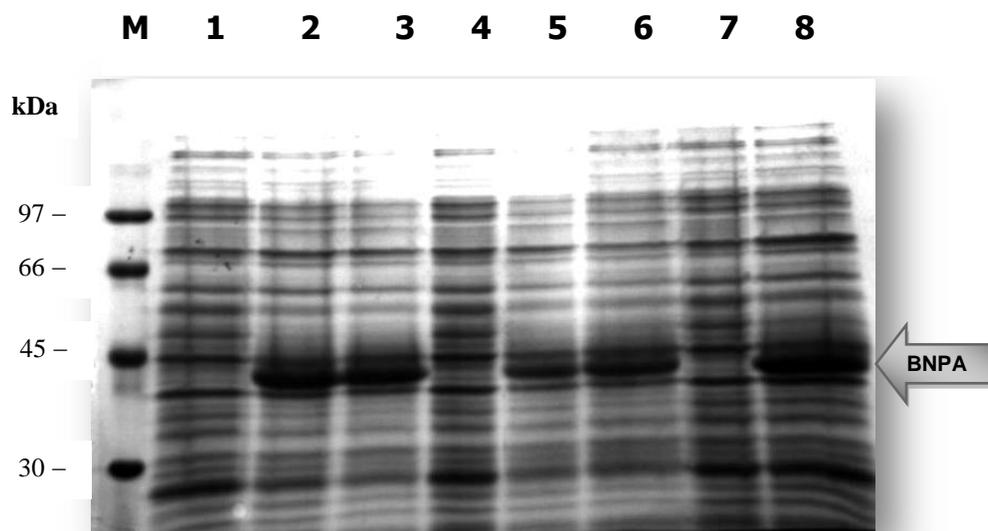


Figura 22. Inducción de la peroxidasa BnPA recombinante con 200, 500 y 1000 μM de IPTG. Carril M, Marcador de bajo peso molecular. Extracto proteico total: carriles 1, 4 y 7, sin inducir; carril 2, inducido con 200 μM de IPTG por 2 h; carril 3, inducido con 200 μM de IPTG por 4 h; carril 5, inducido con 500 μM de IPTG por 2 h; carril 6, inducido con 500 μM de IPTG por 4 h; carril 8, inducido con 1 mM de IPTG a 2 h.

En la inducción con 1 mM de IPTG, se observó una banda de expresión relativamente mayor que la observada con las anteriores concentraciones de inductor a las 2 h de crecimiento (carril 8, Figura 22). En un estudio previo realizado en el laboratorio de Biotecnología de alimentos del DIPA se obtuvieron bajos niveles de expresión de la peroxidasa recombinante de nabo utilizando la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Medina Valle, 2009). Por lo anterior, se puede afirmar que la utilización de la cepa Rosetta 2 (DE) mejoró la expresión de la proteína BnPA recombinante.

Un resultado parecido ya ha sido reportado por Hushpulia *et al.*, (2003) quienes utilizaron la cepa de *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus que resuelve el problema de los codones raros al introducir los genes de los correspondientes tRNAs. La utilización de esta cepa mejoró la expresión de una peroxidasa aniónica de tabaco ya que su secuencia contenía un total de 11 codones raros para arginina (AGA y AGG). El nivel de expresión que se obtuvo en esta cepa de *E. coli* fue aproximadamente del 40% del total de la proteína de la bacteria.

7.5 Análisis de solubilidad de la proteína BnPA recombinante

Una vez verificada la expresión de la proteína recombinante, se realizaron experimentos para determinar si la proteína se encontraba en la fracción soluble o insoluble. Se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de inductor para conocer si a bajas concentraciones del mismo se mejoraba la solubilidad de la proteína.

Del análisis de solubilidad de la proteína inducida con 40, 100 y 300 μ M de la Fig. 23, se observa que no hay proteína en la fracción soluble (carriles 3, 6 y 9, respectivamente), y toda la BnPA producida se encuentra en la fracción insoluble (carriles 4 y 7). Con respecto a la inducción con 500 y 1000 μ M de IPTG la proteína también se acumula en la fracción insoluble (Fig. 24, carriles 5 y 8)

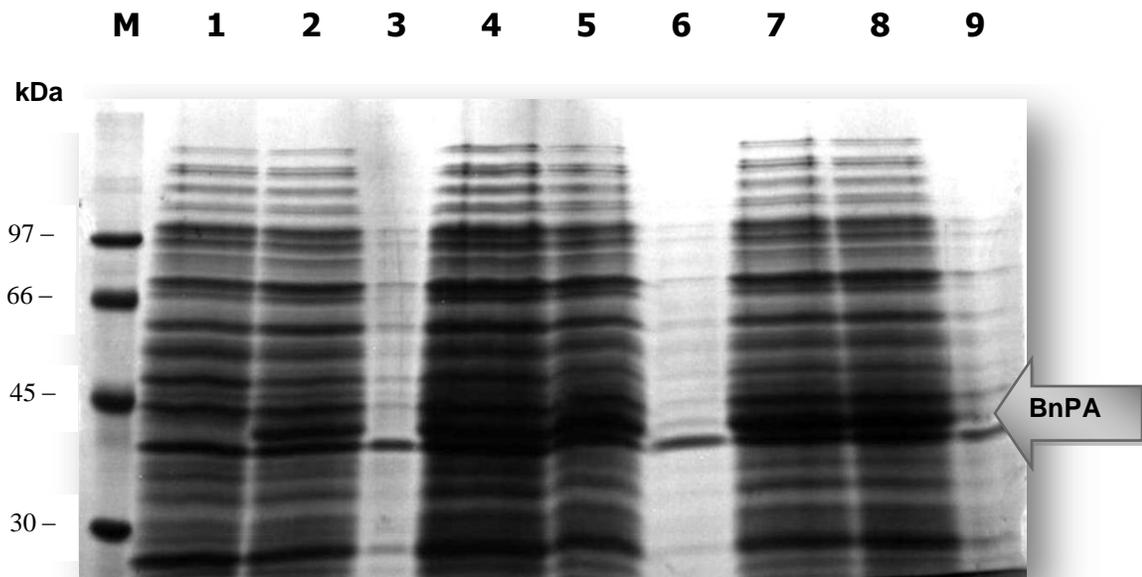


Figura 23. Análisis de solubilidad de la peroxidasa BNPA inducida con 40, 100 y 300 μM de IPTG. Carril M, Marcador de bajo peso molecular. Carril 1, extracto proteico total sin inducir; carriles 2, 5 y 8, inducido con 40, 100 y 300 μM de IPTG respectivamente; carriles 3, 6 y 9, fracción soluble de 2, 5 y 8; carriles 4 y 7, fracción insoluble de 2 y 5.

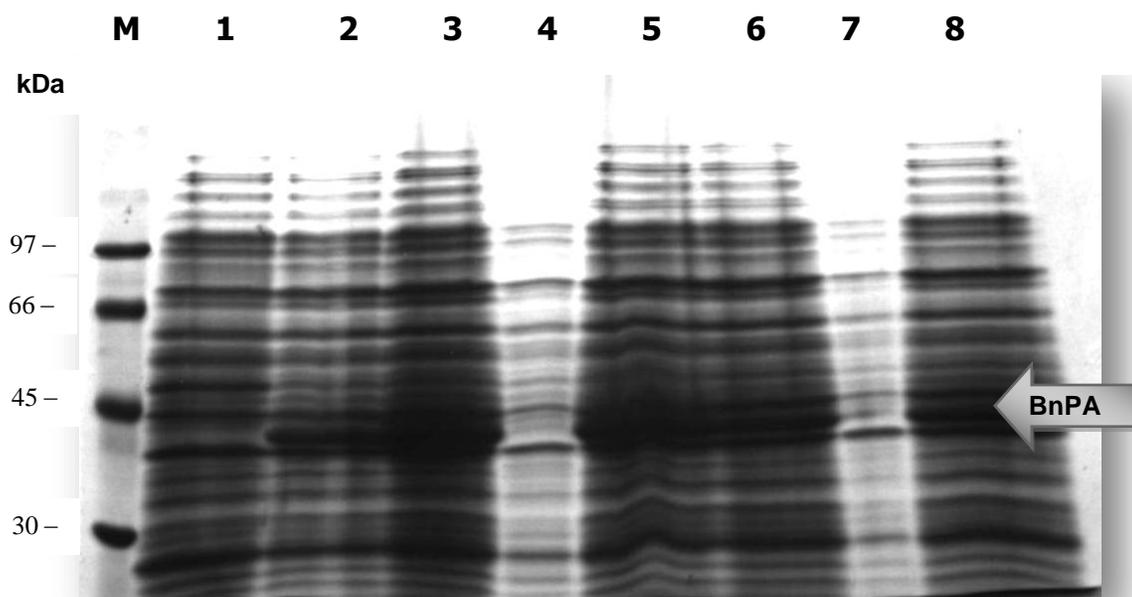


Figura 24. Análisis de solubilidad de la peroxidasa BNPA inducida con 300, 500 y 1000 μM de IPTG. Carril M, Marcador de bajo peso molecular. Carril 1, extracto proteico total sin inducir; carril 2, fracción insoluble del carril 8 de la Fig. 23; carriles 3 y 6, inducido con 500 y 1000 μM de IPTG; carriles 4 y 7, fracción soluble de 3 y 6; carriles 5 y 8, fracción insoluble de 3 y 6.

ya que en los carriles de la fracción soluble no se observa la aparición de la banda de la proteína (carriles 4 y 7).

De los resultados anteriores se pueden afirmar que la proteína se expresa casi en igual manera a partir de 40 μM de IPTG y hasta 1 mM, por lo que se trabajó en lo sucesivo con 100 μM de IPTG que es la concentración más usada en la literatura. La peroxidasa recombinante se acumuló en su totalidad en la fracción insoluble de la célula y debido a que aunque se disminuya la concentración de inductor no se mejora la solubilidad, se decidió trabajar con los cuerpos de inclusión. Tal como otras peroxidases (Smith *et al.*, 1990; Hushpulian *et al.*, 2003), la BnPA recombinante se expresó en cuerpos de inclusión.

7.6 Expresión de la proteína BnPA en la cepa Rosetta-gami 2 (DE3)

Se decidió ensayar la expresión de la proteína BnPA en la cepa Rosetta-gami 2 (DE3) ya que esta cepa combina las características de las cepas Origami 2 y Rosetta 2, permitiendo la formación de enlaces disulfuro y mejorando la solubilización de la proteína además de que suministra los codones raros utilizados en *E. coli*. Las células de esta cepa contienen el plásmido con resistencia a clorafenicol pRARE2, el cual suministra los tRNAs para los siete codones raros, AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA y CGG bajo el control de su propio promotor nativo.

La inducción de esta cepa se realizó a dos temperaturas (16 y 25°C) para fomentar la solubilidad de la proteína y formación de enlaces disulfuro. El perfil electroforético de la inducción (Fig. 25) muestra una pequeña banda correspondiente a la BnPA recombinante tanto a 16 (carril 3) como a 25 °C (carril 2) con respecto al carril del extracto proteico total sin inducir (carril 1).

Lo anterior sugiere que la proteína se expresa en menores cantidades que cuando se expresa a 37°C, lo cual es lógico ya que el metabolismo de la célula disminuye, sin embargo se decidió hacer el ensayo de solubilidad para saber si alguna cantidad de la enzima que se expresa, se encuentra en forma

soluble. El análisis de solubilidad indicó que solo una fracción de la peroxidasa BnPA recombinante se encuentra de manera soluble (Fig. 25, carril 4) y la mayoría se encuentra en forma insoluble (carril 5).

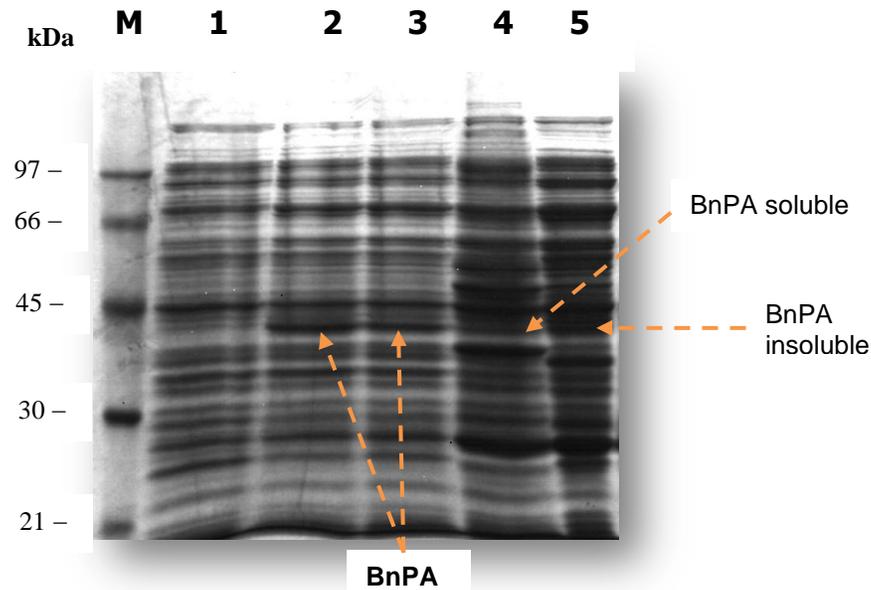


Figura 25. Expresión de la peroxidasa BnPA recombinante en la cepa Rosetta-gami 2 a bajas temperaturas. Carril M, Marcador de bajo peso molecular. Carril 1, extracto proteico total (EPT) sin inducir; carril 2, EPT inducido a 25°C; carril 3, EPT inducido a 16°C; carril 4, fracción soluble; carril 5, fracción insoluble.

Con lo anterior se concluye que la cepa Rosetta-gami 2 (DE3) no mejoró la solubilidad de la BnPA recombinante a bajas temperaturas y la expresión se ve disminuída con relación a la cepa Rosetta 2.

Muchas proteínas requieren la formación de enlaces disulfuro estables para el plegamiento y actividad. Sin la formación de los enlaces disulfuro, estas proteínas pueden ser degradadas o acumuladas como cuerpos de inclusión. Una limitación en la producción de proteínas correctamente plegadas en *E. coli* es el potencial reductor relativamente alto en el citoplasma de la bacteria; los enlaces

disulfuro usualmente se forman solo en el espacio periplásmico. Se ha demostrado que las cepas bacterianas con mutaciones en los genes para la glutatión reductasa (*gor*) y la tioredoxín reductasa (*trxB*) mejoran la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli* (Prinz *et al.*, 1997).

La familia de cepas Origami contienen las mutaciones *trxB* y *gor* para mejorar la formación de enlaces disulfuro. En un estudio se mostró que la expresión en Origami(DE3) resultó en una proteína 10 veces más activa que en otra cepa de expresión, aunque los niveles de expresión fueron similares (Prinz *et al.*, 1997). Si la proteína contiene enlaces disulfuro en su estructura y el gen codifica para codones raros, la cepa Rosetta-gami puede ser adecuada para la expresión. Sin embargo en este trabajo, la utilización de la cepa Rosetta-gami no mejoró la expresión ni la solubilidad de la peroxidasa BnPA recombinante de manera significativa.

Una alternativa para obtener la proteína soluble es usar un vector que promueva la secreción al espacio periplásmico, el cual es un ambiente más favorable para el replegamiento y formación de enlaces disulfuro. Para este propósito existen diversos vectores que contienen secuencias para péptidos señal de secreción como es el vector pET-20b(+), pET-22b(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-39b(+) y el pET-40b(+). Otra alternativa es expresar a la proteína de interés como una proteína de fusión con disulfuro isomerasas. DsbA y DsbC son enzimas que catalizan la formación e isomerización de enlaces disulfuro en el periplasma de *E. coli*. La secuencia que codifica para estas enzimas se encuentra en los vectores pET-39b(+) y pET-40b(+).

Kurokawa *et al.*, (2000) estudiaron la co-expresión de la HRP-C con enzimas Dsb y encontraron que la HRP fue inestable cuando se transportó al periplasma pero se estabilizó después de la sobre-expresión simultánea de un conjunto de disulfuro isomerasas (DsbABCD). Mientras que la producción total de HRP se incrementó varias veces con la sobreexpresión de la DsbC, el máximo transporte de la HRP al periplasma requirió la sobreexpresión de todas la disulfuro oxidasas (DsbABCD) sugiriendo que el exceso de proteínas Dsb ejerce un efecto

sinérgico entre asistir al replegamiento y el transporte de la HRP al espacio periplásmico.

Al observar el carril 5 de la Fig 25, se encuentra que la proteína se solubiliza muy poco en urea por lo que se procedió a resuspender los cuerpos de inclusión en más cantidad de amortiguador de solubilización y se analizó por electroforesis. También se analizó una muestra de la pastilla no solubilizada (CINS).

Cuando la inducción se realizó a 25°C, nuevamente se observó menor cantidad de enzima inducida (carril 2) con respecto al carril sin inducir (carril 1). Del análisis de solubilidad se observa que como se esperaba, no se encuentra proteína en la fracción soluble (carril 3) o es muy poca, y la mayoría se encuentra insoluble (carril 4).

A diferencia de la proteína solubilizada que se muestra en la Fig. 25 (carril 5), al agregar mayor cantidad de amortiguador de solubilización con respecto al peso de la pastilla (5 ml de amortiguador por gramo de peso húmedo de células) que contiene los cuerpos de inclusión no solubilizados (CINS; carril 5, Fig. 26), se obtiene una mayor cantidad de proteína soluble (carril 4) en donde se observa sólo una ligera banda de la proteína que queda por solubilizar (señalado con una flecha). Así mismo la proteína se encuentra más enriquecida en los cuerpos de inclusión (carril 4) con respecto al extracto proteico total inducido (carril 2).

Cabe mencionar que en el carril de los CINS se observan dos bandas de gran intensidad que se formaron a través del proceso de solubilización de la BnPA recombinante, aunque no corresponden a ésta proteína (carril 5).

Debido a que no se logró mejorar la solubilidad de la proteína ni en la cepa Rosetta-gami 2 ni a baja temperatura (25°C) y la expresión de la peroxidasa recombinante BnPA es muy poca, se decidió purificar la BnPA expresada a partir de la cepa Rosetta 2.

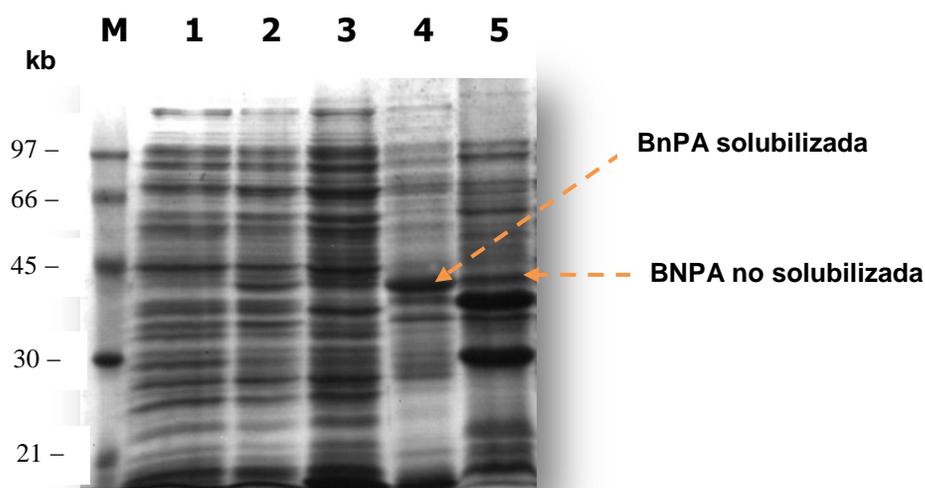


Figura 26. Análisis de solubilidad de la proteína BnPA a 25°C. Carril M, Marcador de bajo peso molecular. Carril 1, EPT sin inducir; carril 2, EPT inducido a 25°C; carril 3, fracción soluble; carril 4, fracción insoluble; carril 5, CINS.

7.7 Purificación de la proteína BnPA a partir de la cepa Rosetta 2 (DE3)

La proteína solubilizada en 8 M de urea se purificó por cromatografía de afinidad a níquel (IMAC). En la Fig. 27 se muestra el perfil electroforético del procesamiento de la proteína hasta su purificación.

Se observa la aparición de una banda de expresión diferencial que corresponde con el peso esperado de la peroxidasa (38 kDa) después de 4 h de inducción a 37°C (carril 2) con respecto al extracto proteico total sin inducir (carril 1). También se observa que muy poca proteína se ha solubilizado en urea ya que se observa solo una banda fina de la proteína (carril 3). En los lavados de la columna con amortiguador de unión se observa la eliminación de otras proteínas contaminantes sin pérdida significativa de la proteína de interés (carriles 4 y 5).

En el carril 6 se muestra la elución de la peroxidasa recombinante con muy pocas proteínas contaminantes. Como se observó que los cuerpos de inclusión no

se solubilizaron por completo, se llevó a cabo una re-solubilización de la pastilla de los CINS y se analizó mediante electroforesis. De la pastilla se obtuvo una gran cantidad de BnPA recombinante solubilizada que estaba de forma insoluble (carril 1, Fig. 28). De lo anterior se puede concluir que aunque el manual del vector pET-28a(+) sugiere un estimado de la cantidad de amortiguador de solubilización que se debe agregar a los cuerpos de inclusión (5 ml por gramo de peso húmedo de células), esta relación depende de cada proteína y tiene que ser estandarizada ya que influyen muchos factores como la secuencia de amino ácidos, peso molecular, cantidad de enlaces disulfuro, etc.

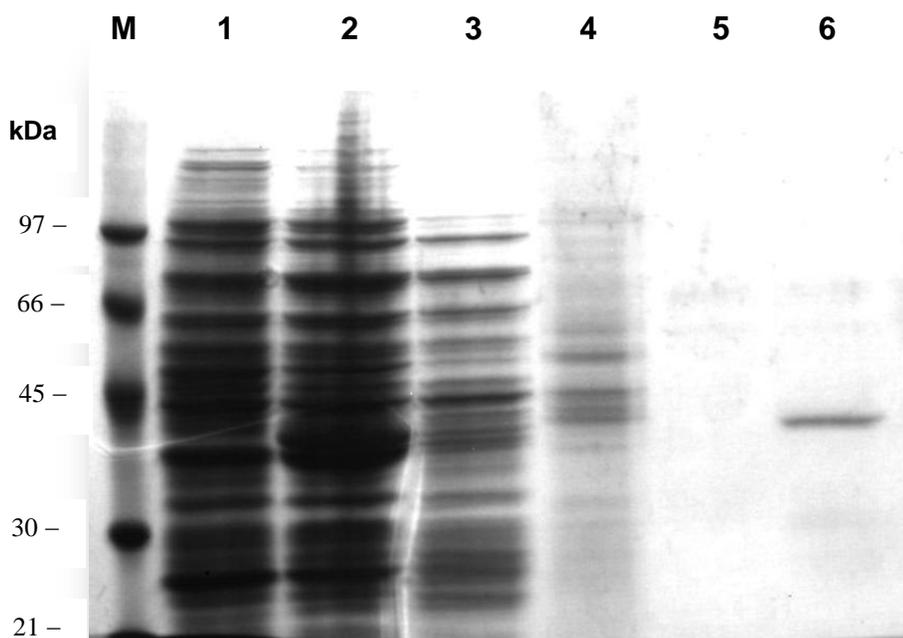


Figura 27. Purificación de la peroxidasa BnPA recombinante por cromatografía de afinidad a níquel. Carril M: Marcador de bajo peso molecular. Carril 1, extracto proteico total sin inducir; carril 2, inducido; carril 3, cuerpos de inclusión solubilizados; carriles 4 y 5, lavados de columna; carriles 6, elución de la peroxidasa BnPA.

A diferencia de este trabajo, Gazaryan *et al.*, (1994) describieron en su protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión la utilización de 10 ml de una

solución conteniendo 6 M de urea por cada 300 ml de medio LB inicial. En otro protocolo descrito por Miki *et al.*, (2009) no especifican la cantidad de urea que utilizaron para solubilizar los cuerpos de inclusión, solo hacen mención que partieron de 15 g de pastilla bacteriana (peso húmedo) y utilizaron una concentración de 8 M de urea. Estos datos confirman la necesidad de estandarizar las cantidades de desnaturizante a utilizar así como el tipo ya que aunque la mayoría de las proteínas se solubilizan en urea, existen algunas a las que es necesario agregarle desnaturizantes más eficientes tal como el cloruro de guanidina. La desventaja de este último es que las proteínas no se pueden analizar directamente en electroforesis ya que las fracciones que contienen cloruro de guanidina forman un precipitado cuando se tratan con SDS. Antes de cargarse en un gel de acrilamida es necesario diluirlas con agua (1:6), dializarlas o separarlas del cloruro de guanidina mediante precipitación con ácido tricloroacético (Qiagen, 2003).

La BnPA recombinante solubilizada en urea (carril 1, Fig 28) presentó una pureza de aproximadamente 50%, de acuerdo a análisis densitométrico. Miki *et al.*, (2009) reportaron una pureza del 80% para una lignina peroxidasa de *Trametes cervina* expresada en *E. coli* acumulada en cuerpos de inclusión.

La proteína solubilizada se inyectó en la columna de IMAC y se lavó exhaustivamente (15 volúmenes de columna) para eliminar los contaminantes y a pesar de que se observa una pequeña banda de la proteína de interés (carril 2, Fig. 28) esta cantidad de proteína corresponde a una porción muy pequeña de la proteína que se inyecta a la columna. La proteína se eluyó y se recolectaron fracciones de 0.5 ml y cada una se cargó en un carril de un gel de acrilamida. La segunda fracción fue la más concentrada (carril 4) sin embargo se observan bandas de contaminación que van disminuyendo un poco en la tercera fracción (carril 5) y casi están ausentes en las demás fracciones (carriles 6-8).

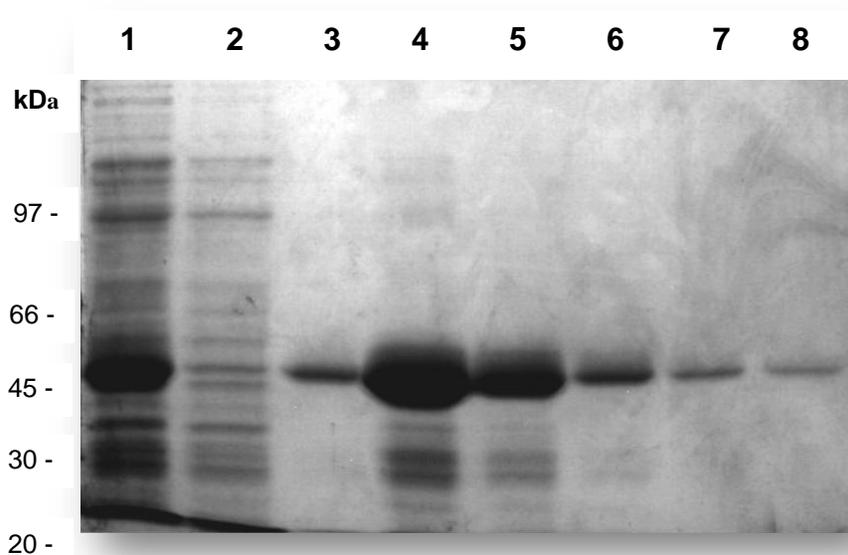


Figura 28. Perfil de elución de la peroxidasa BnPA de la columna de afinidad a níquel. Carril 1, PSU; carril 2, lavados de la columna; carriles 3-8, fracciones de la elución de la BnPA recombinante.

No obstante, la pureza de la proteína de la segunda fracción (carril 4) es de aproximadamente el 94% (según análisis densitométrico) obtenido en un solo paso de purificación.

Al graficar la absorbancia a 280 nm de cada fracción contra el volumen se obtuvo una gráfica tipo campana de Gauss donde se observa que la elución de la proteína empezó desde la fracción 1 hasta la 6, presentándose un pico en la fracción 2 y disminuyendo hasta llegar a la 6 (Fig 29).

Lo anterior se corrobora con la electroforesis donde se observa que la banda más concentrada corresponde a la fracción 2 (carril 4, Fig. 28) que corresponde con el pico en la Fig. 29.

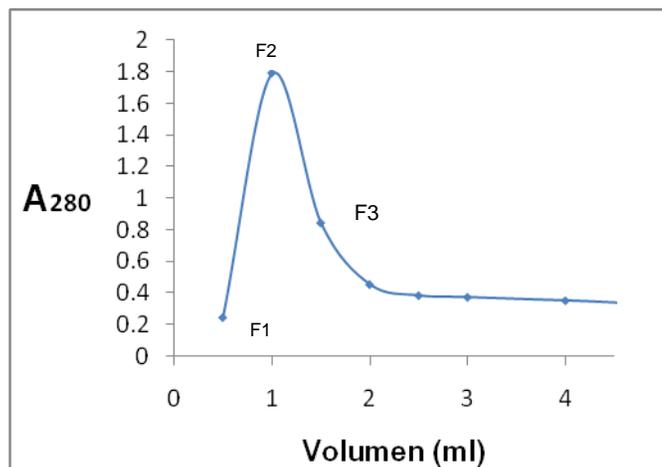


Figura 29. Gráfica de la elución de la peroxidasa BnPA de la columna de afinidad a níquel.

Con el objetivo de eliminar los contaminantes de la peroxidasa BnPA purificada, se pretendía realizar un paso más de purificación por cromatografía de intercambio iónico, sin embargo por razones de tiempo y debido al alto valor de pureza obtenido hasta el momento, se decidió seguir adelante con la caracterización de la peroxidasa.

7.8 Recambio de amortiguador: cromatografía de filtración en gel

Con el objetivo de eliminar la urea, se realizó una filtración en gel utilizando una columna empacada con Bio-Gel P-6DG (BioRad). El objetivo de esta cromatografía es cambiar el amortiguador en el que se encuentra la proteína (20 mM de fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 8 M urea, pH 7.4) por uno conteniendo 50 mM de Tris-HCl pH 8 y 2 M de urea.

Se decidió disminuir la concentración de urea de 8 a 2 M de manera gradual con el objetivo de evitar cambios bruscos en el ambiente de la proteína y

evitar su precipitación por lo que se requirieron dos etapas de cromatografía de filtración en gel.

La proteína eluyó a partir de la fracción 2 hasta la 5, obteniéndose dos fracciones más concentradas formándose un pico en la gráfica de la absorbancia a 280 nm contra el volumen (Fig. 30).

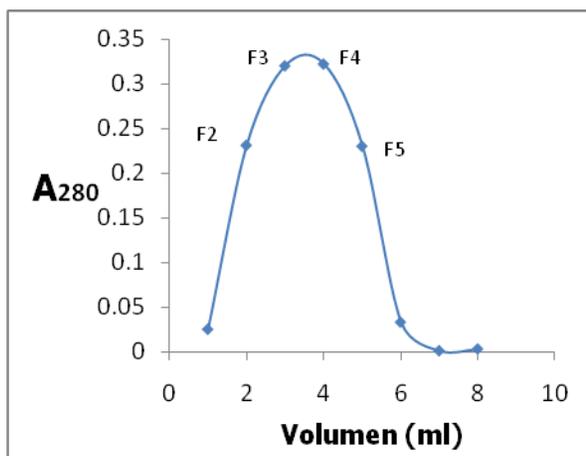


Figura 30. Gráfica de la elución de la peroxidasa BnPA de la columna de filtración en gel. La elución se llevó a cabo en amortiguador conteniendo 2 M de urea y 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0.

Las fracciones más concentradas se cargaron en un gel de electroforesis de acrilamida y se muestran en la Fig 31. La proteína se observa libre de contaminantes con una pureza de aproximadamente 99%. El peso molecular obtenido de la secuenciación, sumando la contribución de la secuencia de aminoácidos que adiciona el vector más la cola de His dan un valor esperado de aproximadamente 38 kDa, lo cual concuerda con el valor que se muestra en el gel. Sin embargo, se necesitan estudios de espectrometría de masas para corroborar el peso molecular de la banda de expresión de la BnPA recombinante.

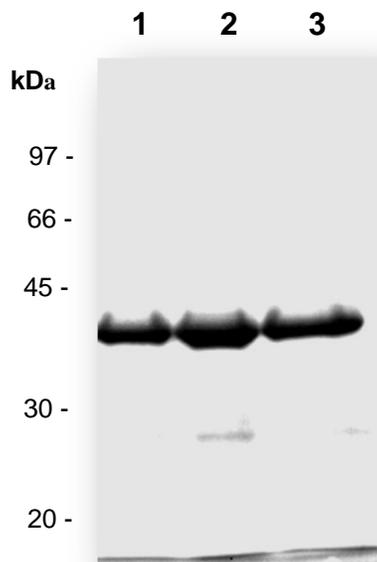


Figura 31. Peroxidasa recombinante BnPA obtenida de la cromatografía de filtración en gel. Carriles 1-3, peroxidasa BnPA purificada obtenida de la filtración en gel en una concentración de urea 2 M.

La concentración de la proteína que se recolectó de la filtración en gel fue de 483.6 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen de 4 ml con lo que se obtiene un rendimiento final de aproximadamente 29 mg/l de cultivo (Cuadro 7). Los valores de rendimiento reportados para la HRP recombinante son de 16.7 mg/l (Gazaryan *et al.*, 1994) y 0.086 mg/l (Ryan *et al.*, 2008) los cuales son aproximadamente 1.7 y 340 veces menores que el reportado en este trabajo, respectivamente.

Usando el mismo sistema, Grigorenko *et al.*, (2001) reportaron la producción de un conjugado de una proteína analito con la HRP en *E. coli* empleando replegamiento de cuerpos de inclusión e incorporación del grupo hemo. El rendimiento del conjugado recombinante fue de 12 mg/l de cultivo de *E. coli* (el cual fue mejor que para el de la peroxidasa recombinante solamente), lo

cual es menos de la mitad que nuestro valor de rendimiento de la BnPA recombinante.

Cuadro 7. Purificación de la peroxidasa BNPA recombinante

Muestra	Proteína (µg/ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)	Rendimiento total (mg/l cultivo)
Lisado celular total ^a	3819.4	76.4	100	381.9
PSU ^b	1710.2	34.2	45	171
IMAC ^c	711.2	6.4	8.4	32
Filtración en gel	483.6	5.8	7.6	29

^aUn total de 3 g de peso húmedo de células de un cultivo de 250 ml se lisaron.

^bProteína solubilizada en urea. ^cCromatografía de afinidad a metal inmovilizado.

Por otra parte, la HRP-C glicosilada se expresó en cultivo de células de insectos con la adición de hemina y el rendimiento de la peroxidasa activa fue de 28 mg/l lo cual es similar al obtenido en este trabajo (Segura *et al.*, 2005). Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes usando cultivo de tejidos es un proceso lento e involucra altos costos (Ikonomou *et al.*, 2003). Usando larvas de insecto como organismo productor, el cual es un sistema más económico que el de cultivo de insectos, Romero *et al.*, (2011) reportaron un rendimiento de la HRP-C de 480 mg/kg después de la optimización de las condiciones de infección.

7.9 Replegamiento de la BnPA recombinante

De los experimentos de mejoramiento del replegamiento de la BnPA recombinante, se observó que la máxima actividad enzimática se obtiene a una concentración de urea de 2 M (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la concentración de urea y glutatión oxidado en el replegamiento de la BnPA recombinante

Urea (M)	Actividad relativa ^a (%)	Glutatión oxidado (mM)	Actividad relativa ^a (%)
1.5	65±2.4	0.5	61±2.3
2.0	100±1.1	0.7	100±1.2
2.4	63±2.1	1.2	92±1.8
3.0	21±0.5	1.5	87±1.4

^aCociente de la actividad actual con respecto a la máxima, expresada como porcentaje. Los datos están expresados como la media ± la desviación estándar de tres réplicas. Las condiciones iniciales fueron 2 M de urea, 0.7 mM de glutatión oxidado, 5 mM de CaCl₂, 0.1 mM de DTT y 5 µM de hemina en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Las concentraciones de urea y glutatión oxidado se variaron independientemente.

La formación de enlaces disulfuro juega un papel importante en el replegamiento de la peroxidasa y en este caso, la BnPA presentó un 61% de actividad relativa al ser expuesta a una concentración de 0.5 mM de glutatión oxidado, alcanzando un máximo en la concentración de 0.7 mM y disminuyendo paulatinamente conforme aumenta la concentración de glutatión oxidado (Cuadro 8).

Estas condiciones de replegamiento fueron similares a aquellas reportadas para la HRP-C (Smith *et al.*, 1990) y lignina peroxidasa (Doyle y Smith, 1996) pero ligeramente diferentes (1.8 M de urea y 0.5 mM de glutatión oxidado) para aquellas reportadas para una peroxidasa aniónica recombinante de tabaco (Hushpulia *et al.*, 2003).

De los resultados anteriores se puede resumir que la BnPA fue exitosamente plegada *in vitro*, confirmando que la porción de carbohidratos así

como las secuencias N y C-terminal no son indispensables para el plegamiento y actividad de la peroxidasa recombinante (Smith *et al.*, 1990; Hushpulian *et al.*, 2003). Un factor importante fue la adición de calcio al medio de replegamiento ya que como se encuentra ampliamente documentado, las peroxidasas requieren dos átomos de calcio por molécula de enzima para la actividad enzimática, como lo indican estudios donde la remoción del calcio reduce su estabilidad térmica y actividad específica, particularmente para una peroxidasa catiónica de cacahuate y la HRPC (O'Donnell *et al.*, 1992; Rodríguez Marañón *et al.*, 1994).

Otro factor que influye en el plegamiento es el momento en que se agrega la hemina, es decir, el grupo hemo. Gazaryan *et al.*, (1994) encontraron que obtenían mayor actividad enzimática de la HRP recombinante cuando se agregaba hemina una vez que la apoenzima ya estaba plegada en su estructura terciaria. En cambio, en el caso de la peroxidasa aniónica de tabaco, es necesario agregar la hemina en el medio de replegamiento desde el momento en que se agrega la enzima ya que la incorporación del grupo hemo a la peroxidasa es más complicada debido a que la hematina cargada negativamente tiene que ser atrapada por el sitio activo de esta peroxidasa, donde hay un residuo de Glu el cual tiene carga negativa, en la posición 141, mientras que las otras peroxidasas, incluyendo BnPA, tienen Phe (Hushpulian *et al.*, 2003).

La actividad específica se determinó utilizando la ecuación (6) multiplicando la pendiente de la recta de la absorbancia a 414 nm contra el tiempo ($\Delta A / \text{min}$) por el factor 446.774 y por la dilución. La pendiente fue de 0.1513 multiplicado por 446.774 y por 1 (dilución) y dividido entre la concentración de la proteína (0.097 mg/ml) se obtuvo una actividad de 696.87 U/mg de proteína. Smith *et al.* (1990) expresaron a la HRPC no glicosilada en *E. coli* y obtuvieron una actividad específica de 630 U/mg de proteína, lo que representa el 55% de la actividad de la HRPC nativa. La peroxidasa aniónica de tabaco expresada también en *E. coli* y posteriormente plegada tuvo una actividad de 1100 U/mg (Hushpulian *et al.*, 2003), valor que es aproximadamente 1.5 veces mayor que el encontrado para la BnPA recombinante.

7.10 Espectro de absorción UV-vis de la peroxidasa recombinante

El espectro de absorción de la peroxidasa BnPA purificada y replegada se muestra en la Fig. 32.

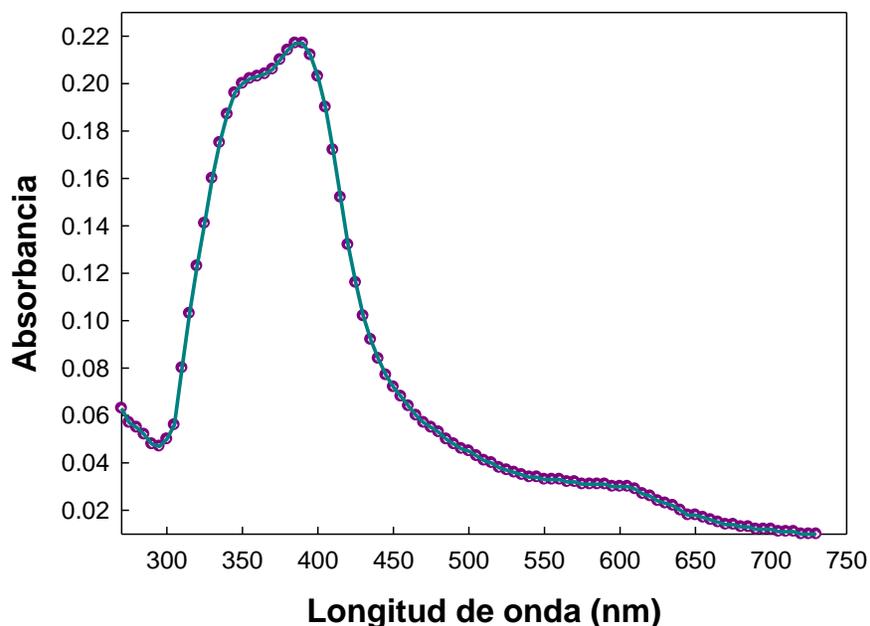


Figura 32. Espectro de absorción UV-vis de la peroxidasa BnPA recombinante purificada y replegada.

El espectro de la peroxidasa BnPA exhibió una banda cercana a 403 nm, típica de peroxidasa de plantas, sin embargo a longitudes de onda cercanas a 350 nm aparece un pico de menor intensidad que presumiblemente podría ser el grupo hemo que no se encuentra bien incorporado estructuralmente a la enzima, lo cual puede significar que la enzima no está completamente plegada.

Aunado a esto, las bandas de absorción del grupo hemo a 502 y 634 nm desaparecieron, lo cual sugiere un cambio en el ambiente del hemo, es decir, cambios estructurales en la vecindad del grupo hemo. Este cambio también ocurre durante la inactivación térmica ya que después de un tratamiento térmico a 80°C durante 25 min, las bandas de absorción del grupo hemo (502 y 634 nm) del

espectro de la peroxidasa de nabo nativa desaparecieron y fueron restablecidas después de incubación a 25°C y la actividad se recobró en casi un 85% (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003a).

No obstante lo anterior, la enzima presenta un alto valor de Reinheitszahl (RZ) ($=A_{403}/A_{280}$) de 3.6, el cual es mayor que el reportado para la HRP-C no glicosilada recombinante (2.11; Smith *et al.*, 1990) y glicosilada recombinante producida en cultivo de células de insectos (3.2; Segura *et al.*, 2005). La peroxidasa acídica purificada de raíces de nabo mostró un RZ de 3.1 (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003a) indicando un microambiente del grupo hemo similar al de la BnPA recombinante.

7.11 Caracterización bioquímica de la peroxidasa recombinante.

7.11.1 Determinación del pH óptimo de actividad

La peroxidasa recombinante mostró cerca del 70% de actividad relativa en un rango amplio de pH (5 a 7) con un máximo a pH 6 (Fig. 33). El valor de pH óptimo fué similar al reportado para una ascorbato peroxidasa de soya (Dalton *et al.*, 1996) y ligeramente mayor a aquellos reportados para dos isoenzimas nativas de nabo (neutra y ácida) cuyo rango de pH se encuentra entre 5.0 y 5.5 (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001; 2000)

Las enzimas siendo proteínas, tienen propiedades que son altamente sensibles al pH. La mayoría de las proteínas, en efecto, son activas sólo en un rango de pH, típicamente de 5 a 9. Esto es un resultado de los efectos del pH sobre una combinación de factores como la unión del sustrato a la enzima, la actividad catalítica de la enzima, la ionización del sustrato y la variación de la estructura de la proteína por influencia de los aminoácidos con carga (usualmente solo a valores de pH extremos) (Voet, 2004).

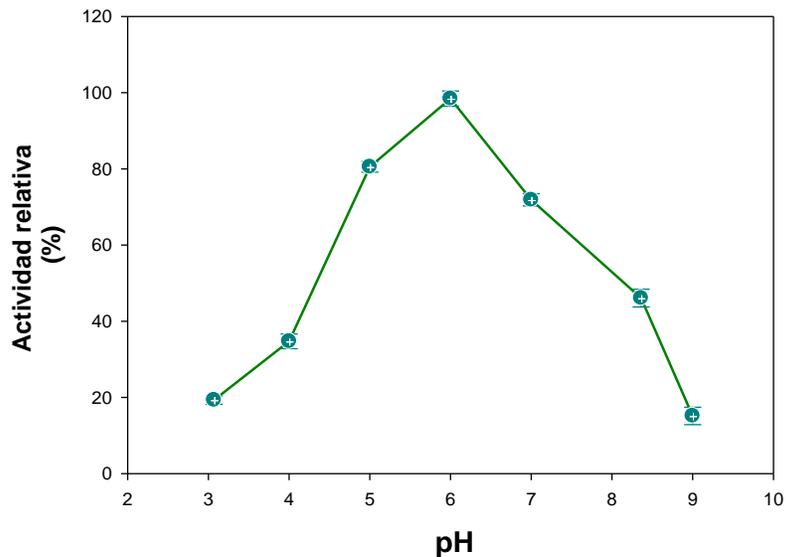


Figura 33. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la peroxidasa BnPA recombinante usando ABTS como donador de H.

7.11.2 Determinación de la temperatura óptima de actividad

La actividad de peroxidasa se midió en un rango de temperatura de 25 a 70°C con incrementos de 5°C usando el pH óptimo (6.0). Los ensayos se realizaron en un baño seco con temperatura controlada; se tomaron muestras cada 30 s y se les midió la absorbancia a 414 nm. Bajo las condiciones ensayadas, la BnPA recombinante mostró una actividad relativa cercana al 70% en un rango amplio de temperaturas alcanzando un máximo a 45°C (Fig 34). A 50°C, la actividad relativa mostró una ligera disminución alcanzando un valor de 70% y siguió disminuyendo gradualmente hasta llegar a un 30% a 70°C. La temperatura óptima encontrada para la BnPA recombinante es similar a aquellas reportadas para tres isoperoxidasas nativas de nabo cuyos valores de temperatura óptimos se encuentran en el rango de 40 a 55°C (Duarte *et al.*, 2000).

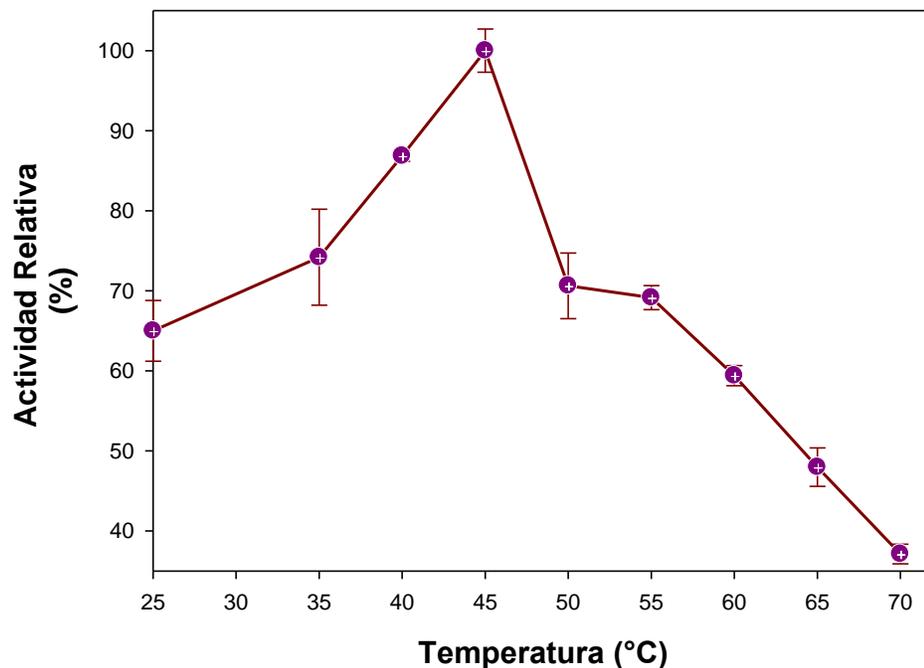


Figura 34. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la peroxidasa BnPA recombinante.

En el Cuadro 9 se muestran los valores de actividad específica para cada temperatura. Cabe resaltar que a 25°C la peroxidasa recombinante presenta el 65% de su actividad lo cual equivale a 696.87 U/mg a pH óptimo. La actividad específica aumenta hasta llegar a un máximo a 45°C equivalente a 981.01 U/mg y luego desciende drásticamente en la temperatura de 50°C (762.15 U/mg) hasta llegar a 366.7 U/mg a 70°C.

Cuadro 9. Relación de actividades específicas de peroxidasa obtenidas a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Actividad específica (U/mg)
25	696.8 ± 27.3
35	753.9 ± 20.7
40	862.1 ± 24.2
45	981.0 ± 26.6
50	762.1 ± 28.7
55	672.2 ± 22.9
60	587.5 ± 23.2
65	467.5 ± 11.6
70	366.7 ± 15.2

El valor resaltado en negritas corresponde a la máxima actividad encontrada a la temperatura óptima de 45°C.

7.11.3 Determinación de los parámetros cinéticos

Las velocidades iniciales v_0 se determinaron como una función de la concentración de ambos sustratos (A_0 para H_2O_2 y B_0 para ATBS). En la Fig 35 se muestran las gráficas de velocidad inicial (v_0) contra la concentración de ABTS para cada concentración de H_2O_2 donde se observa el comportamiento de la peroxidasa BnPA con sus dos sustratos.

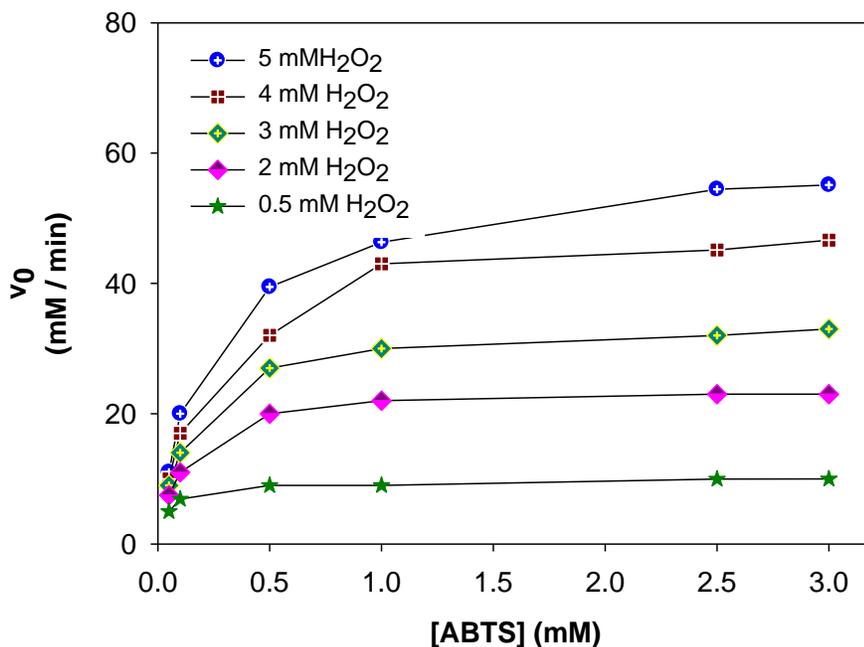


Figura 35. Gráfica de velocidad inicial de la catálisis realizada por BnPA (0.5 mg/ml) contra la concentración de sustrato ABTS en función de la concentración de H₂O₂.

Las gráficas de los dobles recíprocos (de acuerdo a la ecuación 11) de la cinética de la peroxidasa (Fig. 36) mostraron que la BnPA recombinante sigue un mecanismo ping-pong como lo indican las líneas rectas paralelas. Este mecanismo también se ha reportado para la peroxidasa aniónica de tabaco (Huspulia *et al.*, 2003) y para una isoperoxidasa neutra de nabo (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001). Los valores de las ordenadas al origen de la gráfica de la Fig 36 se graficaron contra el inverso la concentración de H₂O₂ resultando en una línea recta (Fig. 37). Utilizando las ecuaciones 12, 14 y 15 se calcularon los parámetros cinéticos los cuales se muestran en el Cuadro 10. Los parámetros cinéticos de la peroxidasa nativa de nabo (Quintanilla *et al.*, 2008a) se enlistan también en el Cuadro 10 con el objetivo de hacer una comparación. El valor de K_M para ABTS fue menor para BnPA recombinante que para el de la peroxidasa nativa y el de la

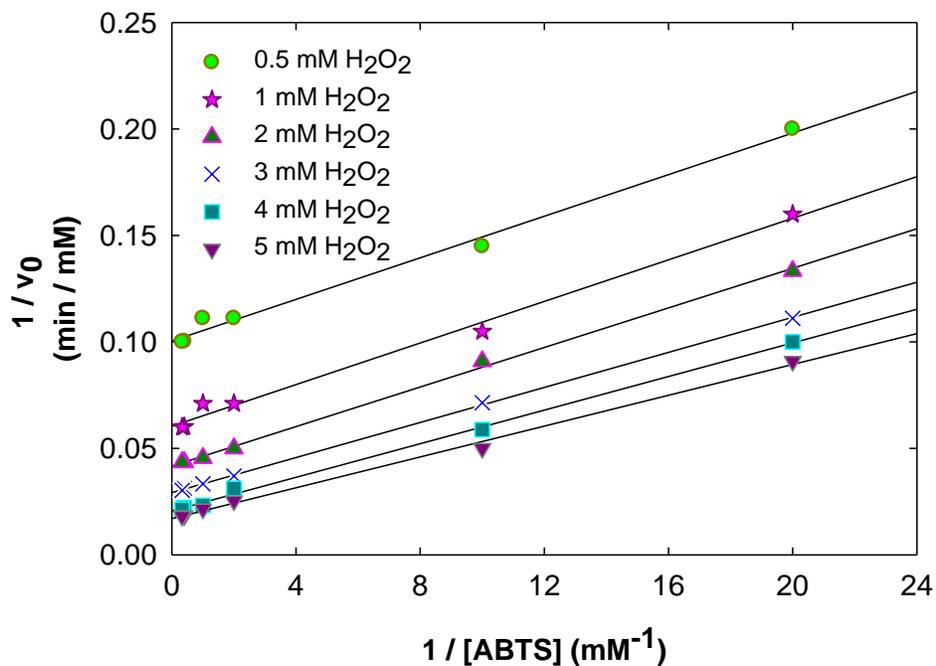


Figura 36. Gráfica de los dobles recíprocos de la cinética de la peroxidasa recombinante BnPA (0.5 mg/ml).

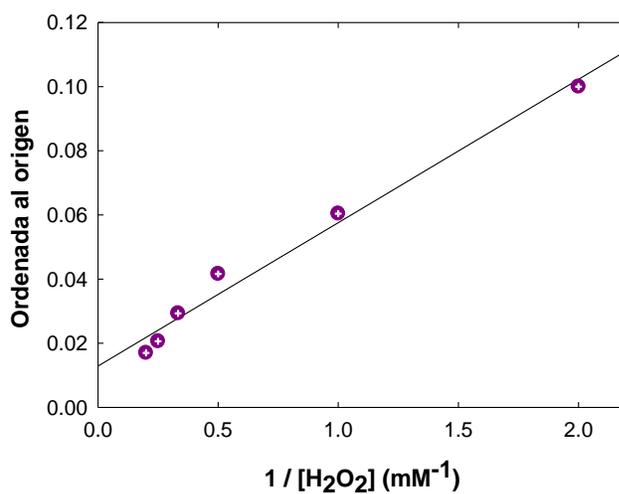


Figura 37. Gráfica de ordenadas al origen de las rectas de la Fig 36 contra $1/H_2O_2$

peroxidasa nativa parcialmente desglicosilada cuyo valor fue de 0.9 mM (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003c).

Cuadro 10. Parámetros cinéticos de la peroxidasa nativa y la BnPA recombinante.

Peroxidasa	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
BnPA recombinante	0.33±0.04	1722±37	5218±85
Nativa de nabo ^b	0.56±0.03	33000±55	59000±1700

Los resultados se reportan como la media de tres réplicas \pm la desviación estándar. ^bLos parámetros cinéticos se tomaron de Quintanilla *et al.* (2008a).

En comparación con los valores de las enzimas recombinantes reportadas, el valor de K_M obtenido en este trabajo fue 3.5 veces mayor que el de la HRP (0.093 mM; Ryan *et al.*, 2008) y aproximadamente el doble que el de la peroxidasa aniónica de tabaco (0.17 mM; Hushpulian *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la peroxidasa recombinante BnPA (no glicosilada) puede permitir mejor accesibilidad del sustrato a su sitio de unión comparado con la enzima nativa, permitiendo así un incremento en la afinidad por sustrato. Sin embargo, se necesitan más experimentos para confirmar esta hipótesis. La BnPA recombinante mostró un valor de k_{cat} similar a lo reportado para una mutante (K232N) de la HRP recombinante (1849 s^{-1} ; Ryan *et al.*, 2008) pero menor al de la peroxidasa nativa de nabo (Cuadro 10). El valor de la eficiencia catalítica (k_{cat} / K_M) fué similar al de la peroxidasa recombinante de tabaco ($6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$; Hushpulian *et al.*, 2003) y ligeramente mayor al de la peroxidasa nativa de brócoli ($3.4 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$; Duarte-Vázquez *et al.*, 2007). Sin embargo, las peroxidases tanto nativa como químicamente modificada de nabo mostraron valores de eficiencia catalítica aproximadamente once veces mayor ($\sim 6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$; Duarte-Vázquez *et al.*, 2008a) que la BnPA recombinante.

7.11.4 Efecto de iones metálicos y sales

Como se muestra en el Cuadro 11, el MgCl_2 y CaCl_2 a una concentración de 5 mM fueron las únicas sales que mejoraron la actividad de la peroxidasa recombinante mientras que el resto de las sales y metales la inhibieron significativamente. Estos resultados concuerdan con los de la peroxidasa nativa de nabo (Singh y Singh, 2003). Los iones Ca^{2+} and Mg^{2+} pueden interactuar a través de fuerzas electrostáticas con las cadenas laterales de aminoácidos específicos de la proteína resultando posiblemente en cambios finos en el ambiente del hemo permitiendo una afinidad mejorada entre la BnPA recombinante y su sustrato.

Cuadro 11. Efecto de iones metálicos y sales en la actividad de la BnPA recombinante

Compuesto	Concentración (mM)	Actividad relativa ^a (%)
Ninguno		100 ± 1.2
MgCl_2	5	111.49 ± 2.3
CaCl_2	5	124.36 ± 1.8
NaCl_2	5	53.6 ± 0.8
KCl	5	59.78 ± 1.1
ZnCl_2	5	45.97 ± 1.5
EDTA	5	60.55 ± 2.1
AgNO_3	0.25	39.11 ± 0.7
MnSO_4	5	41.77 ± 1.3

^aActividad relativa = cociente de la actividad en presencia de la sal con respecto a aquella sin la sal. Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres réplicas.

7.12 Estructura secundaria de la BnPA recombinante

El porcentaje de estructura secundaria de la BnPA recombinante replegada se investigó mediante dicroísmo circular en la región del lejano UV. Una muestra de peroxidasa purificada de nabo fue proporcionada por el Dr. Quintanilla y su espectro mostró una estructura característica de α -hélice, como lo muestran las bandas negativas a 208 y 222 nm (Fig. 38) correspondiendo con lo reportado por Quintanilla-Guerrero *et al.*, (2008a). En contraste, el espectro de dicroísmo de la BnPA recombinante mostró cambios significativos tales como elipticidades negativas menores.

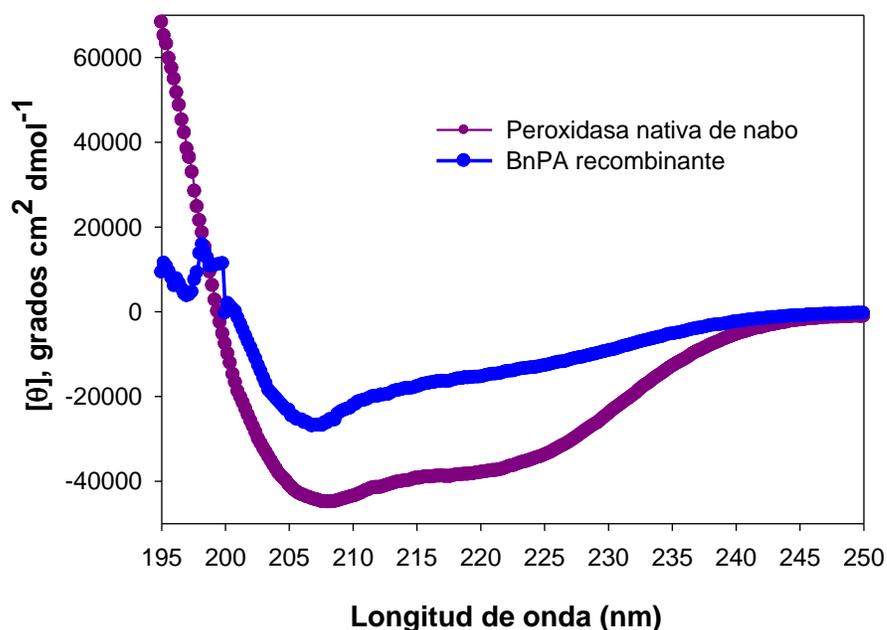


Figura 38. Espectro de dicroísmo circular en la región del lejano UV de la peroxidasa nativa de nabo y la BnPA recombinante. La concentración de proteína fue 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0.

El porcentaje de estructura secundaria para ambas proteínas se muestra en el Cuadro 12. El porcentaje de estructura tipo α -hélice disminuyó de 28 a 20% mientras que la estructura de hoja plegada aumentó de 27 a 32% comparando la peroxidasa nativa de nabo con respecto a la BnPA recombinante.

Cuadro 12. Estructura secundaria de la peroxidasa nativa de nabo y de la BnPA recombinante

Enzima	α -hélice (%)	β -plegada (%)	Aleatoria (%)
BnPA recombinante	20 \pm 0.3	32 \pm 0.4	48 \pm 1.3
Peroxidasa nativa	28 \pm 0.4	27 \pm 0.4	45 \pm 0.9

Calculada de los espectros de dicroísmo circular usando el programa SELCON3 (media de tres réplicas \pm la desviación estándar).

Estudios previamente reportados de una isoperoxidasa purificada de nabo parcialmente deglicosilada, no mostraron cambios significativos en la estructura secundaria de la enzima parcialmente desglucosilada con respecto a la de la isoenzima nativa (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003c).

De lo anterior, se puede concluir que los cambios observados en el espectro de dicroísmo circular de la BnPA se pueden atribuir a un replegamiento parcial de la enzima lo cual puede explicar también la baja actividad específica de la BnPA recombinante (981 U/mg) comparado con la isoperoxidasa purificada de raíces de nabo la cual mostró una actividad específica final de 1810 U/mg (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003a).

Basado en las propiedades estructurales de las proteínas, la desnaturalización térmica de la BnPA se registró siguiendo los cambios en la elipticidad a 222 nm (Fig. 39). En ambos casos (la peroxidasa nativa y la BnPA recombinante), la desnaturalización de la enzima se acompañó de un incremento en la elipticidad, sin la presencia de estados intermedios (o no aparentes a nivel macroscópico, Fig 39), lo cual nos lleva a concluir que la BnPA recombinante se desnaturaliza en un solo paso.

Los datos de la gráfica de transición térmica se utilizaron para calcular los parámetros termodinámicos de desnaturalización tales como cambio de entalpia (ΔH_u), cambio de energía libre de Gibbs (ΔG_u) y cambio de entropía (ΔS_u) de des-

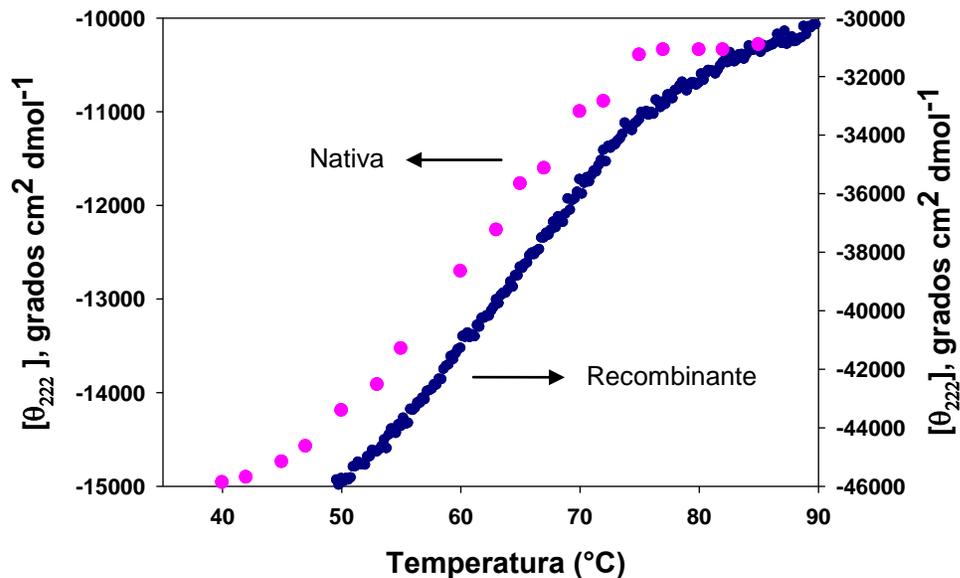


Figura 39. Transición térmica de la desnaturalización de la peroxidasa nativa de nabo y la BnPA recombinante. La concentración de ambas proteínas fue 100 $\mu\text{g/ml}$ en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.0.

Cuadro 13. Parámetros termodinámicos de desnaturalización de la peroxidasa nativa y la BnPA recombinante.

Peroxidasa	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_u^a	ΔG_u^a	$-\Delta S_u^a$
BnPA recombinante	57.4 ± 0.2	91.2 ± 1.9	183 ± 2.1	0.27 ± 0.03
Nativa de nabo ^b	66.4 ± 0.3	128.75 ± 3.2	257.5 ± 2.3	0.38 ± 0.02

Los datos se reportan como la media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

^a ΔH_u , ΔG_u y $-\Delta S_u$ son el cambio de la entalpía, energía libre de Gibbs y entropía de desnaturalización, respectivamente. Los parámetros se calcularon de gráficas de transición térmica obtenidas de registros de elipticidad a 222 nm.

^bLos parámetros termodinámicos se calcularon de datos reportados por Duarte-Vázquez *et al.*, (2003a).

naturalización de la peroxidasa nativa y de la BnPA recombinante (Cuadro 13). Los datos y gráficas generadas se muestran en el Anexo D.

La BnPA recombinante mostró una baja estabilidad térmica comparado con la enzima nativa, probablemente asociado a la falta de glicosilación. La temperatura de fusión (T_m , temperatura de la transición de estructura hélice a aleatoria) de la BnPA fue menor que la T_m de la peroxidasa nativa. La temperatura inicial (T_0 , donde la pérdida de elipticidad alcanza el 5% de la original) para la BnPA fue de 37 °C mientras que para la nativa fue de 35 °C (Quintanilla *et al.*, 2008a). Estos valores indican que aunque de principio parece ser más estable, la BnPA parcialmente replegada mostró menor estabilidad térmica.

7.13 Identificación de la BnPA recombinante mediante transferencia tipo “western”.

Con el fin de confirmar la expresión de la BnPA recombinante en la cepa de *E. coli* Rosetta 2(DE3), se decidió hacer una transferencia tipo “western”. En un inicio se hicieron experimentos con muestras de los extractos proteicos totales sin inducir e inducidos así como de la fracción insoluble y la proteína solubilizada en urea con el objetivo de seguir la expresión de la BnPA recombinante en la cepa de *E. coli*. Estos experimentos no arrojaron resultados positivos, es decir no hubo señal del anticuerpo, esto debido quizá a la influencia o concentración de otras proteínas ya que las muestras de proteínas no se encontraban purificadas y tal vez la BnPA estaba en concentración menor a la detectable. Lo anterior contrasta con lo resultados obtenidos por Huang *et al.* (2009) en donde expresan una lignina peroxidasa (ACLnP) del hongo *Antrodia cinnamomea* en la cepa M15 de *E. coli*. Al realizar una transferencia tipo “western” de la proteína recombinante, detectan señal en la muestra correspondiente a los cuerpos de inclusión y en la proteína purificada.

Se realizó otra transferencia pero ahora sólo con las muestras de la BnPA purificada conteniendo una concentración de urea de 2 M. En la Fig. 40 se obser-

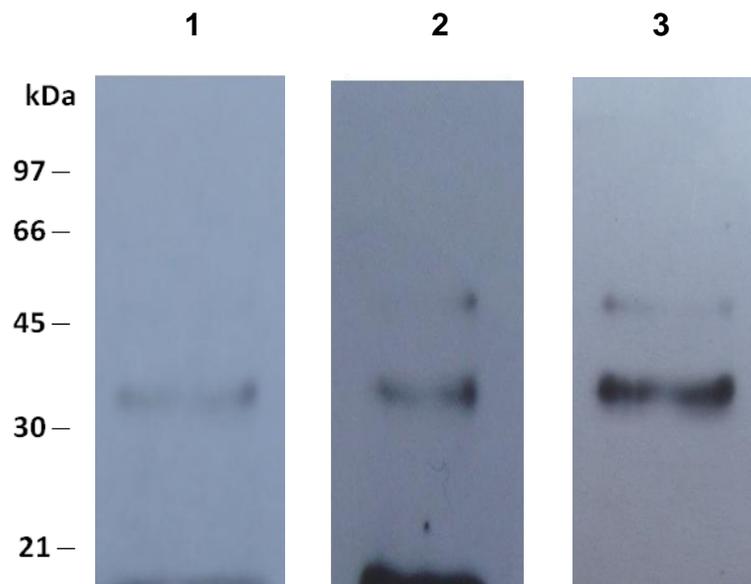


Figura 40. Transferencia tipo “western” con anticuerpos anti-His de la BnPA recombinante purificada de células de *E. coli* Rosetta 2(DE3). Carriles 1-3, diluciones 1:2000, 1:1000 y 1:500, respectivamente.

va los resultados de la transferencia utilizando anticuerpos específicos para la bandera de 6-His y se observa una señal débil detectada para la proteína purificada utilizando una dilución de 1:2000 del anticuerpo anti-His (carril 1). En la dilución 1:1000 se observa una señal de mayor intensidad a la altura del peso molecular esperado (carril 2); sin embargo, se observa la aparición de una banda débil de mayor peso molecular (mayor a 45 kDa).

Al disminuir la dilución a 1:500 se observa una señal de mayor intensidad que la anterior correspondiente a la BnPA recombinante (carril 3) y se sigue observando la banda de mayor peso molecular. De lo anterior se concluye que se detectó exitosamente a la proteína BnPA recombinante purificada con anticuerpos anti-His, sin embargo, como se puede observar en la Fig. 40, la técnica debe estandarizarse ya que influyen muchos factores, entre ellos los componentes de la

muestra a analizar. En el caso específico de la BnPA purificada, la señal sólo se detectó cuando se dializó la muestra para disminuir la concentración de urea a 2 M y eliminar los demás componentes que se utilizaron para desnaturalizar y purificar a la enzima como el imidazol.

Otro factor importante es la concentración del anticuerpo, para el caso de la BnPA la mejor dilución fue 1:500, aunque a 1:1000 también se observa bien la banda de interés. Los pocos artículos de proteínas recombinantes analizadas por transferencia tipo “western” no especifican los detalles del protocolo ya que es diferente para cada proteína. En el trabajo de Huang *et al.* (2009), únicamente especifican la dilución del anticuerpo secundario anti-ratón que fue de 1:2000, mientras que para este trabajo se utilizó un dilución de 1:750 del mismo anticuerpo.

VIII. CONCLUSIONES

Se diseñó un sistema de expresión de la peroxidasa BnPa recombinante correspondiendo al 34% de la proteína total producida por la cepa de *E. coli* Rosetta2 (DE3).

Se verificó la expresión de BnPA mediante amplificación del gen *BnPA*, por digestión del inserto en el DNA plasmídico, por electroforesis de la peroxidasa recombinante purificada y posterior transferencia tipo “western”.

Se purificó la BnPa recombinante con una pureza aproximada del 94% obtenida en un solo paso de purificación (IMAC) y un rendimiento total de 29 mg/l de cultivo bacteriano.

Se plegó *in vitro* a la enzima desnaturalizada y purificada mediante un tratamiento original usando condiciones oxidativas y la adición de hemina.

Se obtuvo una actividad específica de 981 U/mg bajo condiciones óptimas de actividad (pH 6.0 y 45 °C).

La caracterización bioquímica de la peroxidasa BnPA recombinante concuerda con las propiedades de las peroxidases de plantas.

Los estudios cinéticos sugieren que la peroxidasa recombinante no glicosilada puede permitir un mejor acceso del sustrato (ABTS) a su sitio de unión comparado con la enzima nativa, permitiendo así un incremento en la afinidad por sustrato.

El porcentaje de estructura secundaria de la peroxidasa recombinante consistió de 20% de α -hélice, 32% de β -plegada y 48% aleatoria, el cambio en los

valores con respecto a la isoperoxidasa nativa de nabo indica un replegamiento parcial de la enzima recombinante.

Los parámetros termodinámicos de desnaturalización de la BnPA recombinante indicaron que la enzima parcialmente replegada muestra estabilidad térmica ligeramente menor en comparación con la enzima nativa lo cual se puede explicar debido a la falta de carbohidratos de la enzima recombinante.

Se implementó el sistema de expresión, purificación y replegamiento de una peroxidasa de planta recombinante en un sistema bacteriano a nivel laboratorio.

Los resultados de este trabajo establecen las bases para futuros estudios de ingeniería de proteínas para el mejoramiento de las propiedades catalíticas y termodinámicas de la enzima así como estudios de estructura-función.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca D.**, Martín M., Sabater B., (2001). Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiol Plant.* **113**: 409–415.
- Agostini E.**, Medina M.I., Deforchetti S.R.M., Tigier H. (1997). Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L) roots. *J Agric Food Chem.* **45**:596-598.
- Agostini E.**, Hernandez-Ruiz J., Arnao M.B., Milrad S.R., Tigier H.A., Acosta M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol Appl Biochem.* **35**:1-7.
- Ausubel F.M.**, Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (2002). Short protocols in molecular biology. 2a Ed. Wiley, EUA. pp. 1-24 a 1-25.
- Bellani L.M.**, Guarnieri M., Scialabba A. (2002) Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol Plant.* **114**: 102–108.
- Bernards M.A.**, Fleming W.D., Llewellyn D.B., Priefer R., Yang X., Sabatino A., Plourde G.L. (1999). Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.* **121**: 135-146.
- Bhunja A.**, Durani S., Wangikar P. (2002). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnol Bioeng.* **72**: 562–567.
- Blee K.A.**, Blee K.A., Choi J.W., O'Connell A.P., Schuch W., Lewis N.G., Bolwell G.P. (2003) A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochem.* **64**: 163–176.
- Bowles D.J.** (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review Biochem.* **59**: 873-907.
- Campa A.** 1991. Biological roles of plant peroxidases: Known and potential functions. In: Peroxidases in Chemistry and Biology. Everse, J., Everse, K.E., Grisham M.B. CRC Press. Boca Ratón. Volumen II. Cap. 2, 26-49.

- Childs R.E.**, Bardsley W.G. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2 ϕ -azinodi(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J.* **145**: 93-103.
- Chittoor J.M.**, Leach J.E., White F.F. (1997). Differential Induction of a Peroxidase Gene Family During Infection of Rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact.* **10**: 861-871.
- Chottopadhyay K.**, Mazumdar S. (2000) Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochem.* **9**: 125–132.
- Cooper A.** Thermodynamics of protein folding and stability. In: *Protein: A Comprehensive Treatise*, Allen G., Ed.; Jai Press: Stamford, Connecticut, 1999; Vol. **2**, pp 217-220.
- Cornish A.** (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*; Portland Press: London, pp 19-54.
- Daiyasu H.**, Toh H. (2000). Molecular evolution of the myeloperoxidase family. *J Mol Evol.* **51**: 433–445.
- Dalton D.A.**, Díaz del Castillo L., Kahn M.L., Joyner S.L., Chatfield J.M. (1996). Heterologous expression and characterization of soybean cytosolic ascorbate peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* **328**: 1-8.
- Deyhimi F.**, Nami F. (2011). Modeling and optimization of the bi-substrate peroxidase-enzyme catalyzed potentiometric assay of hydrogen peroxide by response surface methodology with a central composite rotatable design. *Journal Mol Catal B: Enzymatic.* **68**: 162–167.
- Dong H.**, Nilsson L., Kurland C. G. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol.* **260**: 649-663.
- Doyle W.A.**, Smith A.T. (1996). Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and haem. *Biochem J.* **315**: 15-19.

- Duarte-Vázquez M.A.**, García-Almendarez B., Regalado C., Whitaker J.R. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L var. *esculenta* DC) peroxidases. *J Agric Food Chem.* **48**:1574-1579.
- Duarte-Vázquez M.A.**, García-Almendarez B.E., Regalado C., Whitaker J.R. (2001). Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica napus* L var. *purple top white globe*) roots. *J Agric Food Chem.* **49**:4450-4456.
- Duarte-Vázquez M.A.**, Whitaker J.R., Rojo-Dominguez A., García-Almendarez B.E., Regalado C. (2003a). Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *J Agric Food Chem.* **51**:5096-5102.
- Duarte-Vázquez M.A.**, Ortega-Tovar M.A., García-Almendarez B.E., Regalado C. (2003b). Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var *purple top white globe*) peroxidase. *J Chem Technol Biotechnol.* **78**:42–47.
- Duarte-Vázquez M.A.**, García-Almendárez B.E., Rojo-Domínguez A., Whitaker J.R., Arroyave-Hernández C., Regalado C. (2003c). Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isozyme. *Phytochem.* **62**: 5–11.
- Duarte-Vázquez M.A.**, García-padilla S., García-Almendarez B.E., Whitaker J.R., Regalado C. (2007). Broccoli processing wastes as a source of peroxidase. *J Agric Food Chem.* **55**: 10396-10404.
- Dunford H.B.**, Stillman J.S. (1976) On the function and mechanism of action of peroxidase. *Coord Chem Rev.* **19**: 187–251.
- Duroux L.**, Welinder K.G. (2003). The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J Mol Evol.* **57**:397–407.
- Ferapontova E.E.**, Grigorenko V.G. Egorov A.M., Börchers T., Ruzgas T., Gorton L. (2001). Mediatorless biosensor for H₂O₂ based on recombinant forms of horseradish peroxidase directly adsorbed on polycrystalline gold. *Biosens Bioelectron.* **16**:147–157.

- Finzel B. C.**, Poulos T. L. Kraut J. (1984). Crystal Structure of Yeast Cytochrome c Peroxidase Refined at 1.7-Å Resolution. *J Biol Chem.* **259**: 13027-13036.
- Fleischmann A.**, Darsow M., Degtyarenko K., Fleischmann W., Boyce S., Axelsen K.B., Bairoch A., Schomburg D., Tipton K.F., Apweiler R. (2004). IntEnz, the integrated relational enzyme database. *Nucleic Acids Res.* **32**: D434–D437.
- Furtmuller P.G.**, Zederbauer M., Jantschko W., Helm J., Bogner M., Jakopitsch C., Obinger C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* **445**: 199–213.
- Gajhede M.**, Schuller D.J., Henriksen A., Smith A.T., Poulos T.L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat struct biol.* **4**:1032-1038.
- Gazaryan I. G.**, Doseeva V. V., Galkin A. G., Tishkov V. I. (1994). Effect of single-point mutations Phe41→His and Phe143→Glu on folding and catalytic properties of recombinant horseradish peroxidase expressed in *E. coli*. *FEBS Letters.* **354**: 248-250.
- Gherna R.L.** (1994). Culture preservation. In: Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. (eds), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 278-292.
- Gold L.** (1990). Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **185**:11–14.
- Grigorenko V.**, Andreeva I., Börchers T., Spener F., Egorov† A. (2001). A genetically engineered fusion protein with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays. *Anal Chem.* **73**: 1134-1139.
- Hiraga S.** Ito H., Yamakawa H., Ohtsubo N., Seo S., Mitsuhara I., Matsui H., Honma M., Ohashi Y. (2000). An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**: 210-216.
- Hiraga S.**, Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**:462-468.

- Huang S.T.**, Tzean S. S., Tsai B. Y., Hsieh H. J. (2009). Cloning and heterologous expression of a novel ligninolytic peroxidase gene from poroid brown-rot fungus *Antrodia cinnamomea*. *Microbiology*. **155**: 424–433.
- Hushpulian D.M.**, Savitski P.A., Rojkova A.M., Chubar T.A., Fechina V.A., Sakharov I.Yu., Lagrimini L.M., Tishkov V.I., Gazaryan I.G. (2003). Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies. *Biochemistry-Moscow*. **68**:1189-1194.
- Huttermann A.**, Mai C., Kharazipour A. (2001). Modification of lignin for the production of new compound materials. *Appl Microb Biotechnol*. **55**: 387–394.
- Iiyama K.**, Lam T., Stone B.A. (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol*. **104**:315–320.
- Ikeda R.**, Tanaka H., Uyama H., Kobayashi S. (2000). A new crosslink-able polyphenol from a renewable resource. *Macromol Rapid Commun*. **21**: 496–499.
- Ikonomou L.**, Schneider Y.J., Agathos S.N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. **62**: 1–20.
- Janknech R.**, Martynoff G.D., Lou J., Hipskind R.A., Nordheim A., Stunnenberg H.G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci*. **88**: 8972-8976.
- Jia J.**, Wong B., Wu A., Cheng G., Li Z., Dong S. (2002). A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel. *Network Anal Chem*. **74**: 2217–2223.
- Kane J.F.** (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech*. **6**: 494-500.
- Karam J.**, Nicell J.A. (1997) Potential application of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biotechnol*. **69**: 141–153.

- Kawano T.**, Sahashi N., Takahashi K., Uozumi N., Muto S. (1998). Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* **39**: 721–730.
- Kawano T.**, Muto S. (2000). Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension cultura. *J Exp Bot.* **51**: 685-693.
- Kawaoka A.**, Matsunaga E., Endo S., Kondo S., Yoshida K., Shinmyo A., Ebinuma H. (2003). Ectopic Expression of a Horseradish Peroxidase Enhances Growth Rate and Increases Oxidative Stress Resistance in Hybrid Aspen. *Plant Physiology.* **132**:1177-1185.
- Kennedy K.**, Alemany K., Warith M. (2002). Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. *Water SA.* **28**:149–158.
- Kiefer M.C.**, Gomord V., O'Connell A., Halpin C., Faye L. (1996). Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. *Gene.* **178**: 205–207.
- Krell H.W.** (1991). Peroxidase: an important enzyme for diagnostic test kits. In: Lobarzewsky J., Greppin H., Penel C., Gaspar T. (Eds) *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University M. Curie, Lublind Poland, and University of Geneva, Geneva Switzerland. pp. 469–478.
- Kristensen B.K.**, Bloch H., Rasmussen S.K. (1999). Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiol.* **120**: 501-512.
- Kolattukudy P.E.** (1980). Biopolyester Membranes of Plants: Cutin and Suberin. *Science.* **208**: 990 – 1000.
- Kwon S.Y.**, Jeong Y.J., Lee H.S., Kim J.S., Cho K.Y., Allen R.D., Kwak S.S. (2002). Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ.* **25**:873-882.

- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lerouge P.**, Cabanes M., Rayon C., Fischette A.C., Gomord V., Faye L. (1998). N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol*. **38**: 31-48.
- Lewis N.G.**, Yamamoto E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **41**: 455–496.
- Lindgren A.**, Ruzgas T., Gorton L., Csöregi E., Bautista G., Sakharov I., Gazaryan I. (2000). Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer. *Biosens Bioelectron*. **15**: 491-497.
- Lui W**, Kumar J., Tripathy S., Senecal K.J., Samuelson L. (1999). Enzymatically synthesized conducting polyaniline. *J Am Chem Soc*. **121**: 71–78.
- Magliano T.M.A.**, Casal J.J. (1998) In vitro cross-linking of extension precursors by mustard extracellular isoforms of peroxidase that respond either to phytochrome or to wounding. *J Exp Bot*. **49**:1491–1499.
- McEldoon J.P.**, Dordick J.S. (1996). Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol Prog*. **12**:555-558.
- Medina Valle A.** (2009). Clonación y expresión de una isoperoxidasa de nabo (*Brassica napus* var. *purple top White globe*) en un sistema bacteriano. Tesis de maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. UAQ.
- Miki Y.**, Morales M., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Wariishi H., Martínez A.T. (2009). *Escherichia coli* expression and *in vitro* activation of a unique ligninolytic peroxidase that has a catalytic tyrosine residue. *Protein Express Purif*. **68**: 208–214.
- Morris K.**, Mackerness S.A., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Buchanan V., (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J*. **23**: 677–685.
- Nielsen K.L.**, Indiani C., Henriksen A., Feis A., Becucci M., Gajhede M., Smulevich G., Welinder K.G. (2001). Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of

- lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochem.* **40**: 11013–11021.
- Normanly J.**, Bartel B. (1999). Redundancy as a way of life-IAA metabolism. *Curr Opin Plant Biol.* **2**:207-213.
- O'Donnell J.P.**, Wan L., van Huystee R.B. (1992). Characterization of two forms of cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Biochem Cell Biol.* **70**:166-169.
- Oguchi T.**, Tawaki S., Uyama H., Kobayashi S. (1999) Soluble polyphenol. *Macromol Rapid Commun.* **20**: 401–403.
- Ostergaard L.**, Teilum K., Mirza O., Mattsson O., Petersen M., Welinder K.G., Mundy J., Gajhede M., Henriksen A. (2000). Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol.* **44**: 231–243.
- Pappalardo M.**, Sciacca M.F.M., Milardi D., Grasso D.M., La Rosa C. (2008). Thermodynamics of azurin folding. The role of copper ion. *J Therm Anal Calorim.* **93**: 575–581.
- Passardi F.**, Longet D., Penel C., C., Dunand. (2004a). The plant peroxidase multigenic family in rice and its evolution in green plants. *Phytochemistry.* **65**: 1879–1893.
- Passardi F.**, Penel C., Dunand C. (2004b). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* **9**:534-540.
- Passardi F.**, Cosio C., Penel C., Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**: 255–265.
- Passardi F.**, Theiler G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier N., Teixeira F., Margis-Pinheiro M., Ioannidis V., Penel C., Falquet L., Dunand C. (2007a). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry.* **68**:1605–1611.
- Passardi F.**, Zamocky M., Favet J., Jakopitsch C., Penel C., Obinger C., Dunand C. (2007b). Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos?. *Gene.* **397**:101–113.

- Prinz W.A.**, Åslund F., Holmgren A., Beckwith J. (1997). The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *J Biol Chem.* **272**: 15661–15667.
- Quintanilla-Guerrero F.**, Duarte-Vázquez M.A., Tinoco R., Gómez-Suárez M., García-Almendárez B.E., Vázquez-Duhalt R., Regalado C. (2008a). Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. *J Agric Food Chem.* **56**: 8058–8065.
- Quintanilla-Guerrero F.**, Duarte-Vázquez M.A., García-Almendárez B.E., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Regalado C. (2008b). Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresource Technol.* **99**: 8605-8611.
- Quiroga M.**, Guerrero C., Botella M.A., Barceló A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., de Forchetti S.M., Tigier H., Valpuesta V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* **122**: 1119–1127.
- Raitman O.A.**, Katz E., Buckmann A.F., Willner I. (2002) Integration of polyaniline/poly(acryl acid) films and redox enzymes on electrode supports: an *in situ* electrochemical/surface Plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems. *J Am Chem Soc.* **124**: 6487–6496.
- Rannou P.**, Gawlicka A., Berner D., Pron A., Nechtsschein M. (1998). Spectroscopic, structural and transport properties of conducting polyaniline processed from fluorinated alcohols. *Macromolecules.* **31**: 1307–1315.
- Reimers P.J.**, Guo A., Leach J.E. (1992). Increased Activity of a Cationic Peroxidase Associated with an Incompatible Interaction Between *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and Rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol.* **99**:1044-1050.

- Robinson S.D.** (1991). Peroxidases and their significance in Fruits and Vegetables. In: Food Enzymology. Fox P.F. (Ed). Elsevier Applied Science. Vol. 1. USA. pp 399-426.
- Rodríguez Marañón M.J., Van Huystee R.B.** (1994). Plant peroxidases: Interaction between their prosthetic groups. *Phytochemistry* **37**: 1217-1225.
- Romero-Gómez S., Duarte-Vázquez M.A., García-Almendárez B.E., Mayorga-Martínez L., Cervantes-Avilés O., Regalado C.** (2008). A novel putative peroxidase cDNA from turnip and analysis of the encoded protein sequence. *Plant Foods Human Nutr.* **63**: 157-162.
- Romero L.V., Targovnik A.M., Wolman F.J., Cascone O., Miranda M.V.** (2011). *Rachiplusia un* larva as a biofactory to achieve high level expression of horseradish peroxidase. *Biotechnol Lett.* **33**:947-56.
- Rosenberg A.H., Lade B.N., Dao-shan C., Lin S., Dunn J.J. Studier F.W.** (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene.* **56**: 125-135.
- Rosenberg A.H., Goldman E., Dunn J.J., Studier F.W., Zubay G.** (1993). Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J Bacteriol.* **175**: 716-722.
- Ruiz-Dueñas F.J., Pérez-Boada M., Martínez M. J., Martínez A. T.** (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem Soc Trans.* **29**:116–122.
- Ruzgas T., Csoregi E., Katakis I., Kenansis G., Gorton L.** (1996). Preliminary investigations of amperometric oligosaccharide dehydrogenase based electrode for the detection of glucose and some other low molecular weight saccharides. *J Mol Recognit.* **9**: 480–484.
- Ryan B.J., O’Fágáin C.** (2008). Effects of mutations in the helix G region of horseradish peroxidase. *Biochimie.* **90**: 1414-1421.
- Sakharov I.Y., Alpeeva I.S., Efremov E.E.** (2006). Use of Soybean Peroxidase in Chemiluminescent Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Agric Food Chem.* **54**: 1584-1587.

- Sambrook J.**, Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning - a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Vol. 2, pp 1.35-1.37; 1.92-1.97; A8.52-A8.55.
- Schnabelrauch L.S.**, Kieliszewski M., Upham B.L., Alizedeh H., Lamport D.T. (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* **9**:477–489.
- Schopfer P.** (1994) Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiol.* **104**:1269–1275.
- Schuller D.J.**, Ban N., Van Huystee R.B., McPherson A., Poulos T.L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure.* **4**:311-321.
- Schweikert C.**, Liskay A., Schopfer P. (2000) Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry.* **53**:565–570.
- Scialabba A.**, Bellani L. M., Dellaquila A. (2002) Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Eur J Histochem.* **46**: 351–358.
- Scopes R.K.** (1994). *Protein purification. Principles and practice*. 3rd ed. Springer. New York, NY. Pp 238-249.
- Segura M.M.**, Levin G., Miranda M.V., Mendive F.M., Targovnik H.M., Cascone O. (2005). High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture. *Process Biochem.* **40**: 795–800.
- Sharma A.K.**, Sehgal N., Kumar A. (2002). A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechnol Lett.* **24**: 1737–1739.
- Shiro Y.**, Kurono M., Morishima J. (1986). Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J Biol Chem.* **261**: 9382-9390.
- Singh N.**, Singh J. (2003). A method for large scale purification of turnip peroxidase and its characterization. *Prep Biochem Biotechnol.* **33**: 125-135.

- Smith A.T.**, Santama N., Dacey S., Edwards M., Bray R.C., Thorneley R.N.F., Burke J.F. (1990). Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. *J Biol Chem.* **265**: 13335-13343.
- Sreerama N.**, Venyaminov S.Y., Woody R. (1999). Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Prot Sci.* **8**: 370–380.
- Studier F. W.**, Moffatt B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189**:113-130.
- Tatsumi K.**, Wada S., Ichikawa H. (1996). Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnol Bioeng.* **51**: 126–130.
- Tijssen, P.** (1993) Practice and theory of enzyme immune assays In Laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology. Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H. Elsevier. London. Vol. 15.187-188.
- Thordal H.**, Brandt J., Cho B.H., Rasmussen S.K., Gregersen P.L., Smedegaard V., Collinge D.B. (1992). cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiol Mol Plant Pathology.* **40**: 395-409.
- Tognolli M.**, Penel C., Greppin H., Simon P. (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**:129–138.
- Veitch N.C.** (2004a). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* **65**:249-259.
- Veitch N.C.** (2004b). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem Rev.* **3**: 3–18.
- Voet D.**, Voet J.G. *Biochemistry*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2004; pp 434 375-377.

- Yoshimura K.**, Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000). Expresión of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* **123**:223-233.
- Welinder K.G.** (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struc Biol.* **2**:388-393.
- Welinder K.G.**, Gajhede M. (1993) Structure and evolution of peroxidases. In: Welinder K.G., Rasmussen S.K., Penel C., Greppin H. (eds) *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. pp. 35–42. University of Geneva, Geneva.
- Whitaker J.R.** (1994). Catalase and peroxidase. In: *Principles of enzymology for the food Sciences*. Marcel Dekker (Ed). 2nd Ed. New York. Cap. 26. pp 565-259.
- Whitmore F.W.** (1976) Binding of ferulic acid to cell-walls by peroxidases of *Pinus-elliottii*. *Phytochemistry.* **15**:375–378
- Whitmore L.**, Wallace B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**: 668–673.
- Wong W.S.D.** (1995). Horseradish peroxidase. In: *Food enzymes structure and mechanism*. Chapman Hall. USA. Cap. 11. pp 321-345.
- Wu W.**, Lu J., Wei Y., Wang J., Lin J. Cao S., Sun X., Tang K. (2006). Isolation and characterization of the first putative peroxidase gene from oilseed rape (*Brassica napus*) wich is highly homologous to HRPC. *Biosci Rep.* **26**:263-280.
- Zhang J.** (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol.* **18**: 292–298

X. ANEXOS

A. Soluciones y antibióticos	139
B. Kit de purificación de productos de PCR y bandas de gel (GE).....	140
C. Curva estándar de seroalbúmina bovina para la determinación de proteína por el método de Bradford.....	143
D. Determinación de los parámetros termodinámicos de desnaturalización.....	146

A. Soluciones y antibióticos

Cuadro 14. Soluciones y antibióticos utilizados en la clonación y expresión de la BnPA

Solución	Preparación
Medio Luria-Bertani (LB)	Por litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH y esterilizar por autoclave.
Ampicilina	25 mg / ml en agua desionizada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C. Usar a una concentración de 50 µg / ml en un tiempo máximo de 1 mes.
Cloranfenicol	34 mg/ml en etanol. Almacenar a -20°C. Usar a una concentración de 34 µg/ml.
Kanamicina	30 mg/ml en agua desionizada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C. Usar a una concentración de 30 µg / ml para células que contienen plásmidos kan y 15 µg / ml para células con un gen cromosomal <i>kan</i> (por ejemplo, las cepas Origami y Rosetta-gami).
Isopropil-D-tiogalactopiranosido: IPTG	100 mM: 2.38 g de IPTG en 100 ml de agua desionizada. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

B. Kit de purificación de productos de PCR y bandas de gel (GE, Healthcare)

Código del producto: 27-9602-01

El kit usa un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión de DNA de doble cadena (de 100 pb a 48 kpb) a una matriz de fibra de vidrio. Una vez que el DNA se une a la matriz, las proteínas y sales contaminantes son lavadas y el DNA purificado se eluye en un amortiguador de baja fuerza iónica (TE, Tris-HCl o agua). Las muestras de DNA se recuperan de una manera concentrada mediante su elución en no menos de 10 µl de amortiguador o agua.

El kit se puede usar para purificar DNA (por ejemplo productos de PCR, fragmentos de restricción) de solución y de bandas de geles de agarosa.

Componentes del kit

Componente	Descripción
Amortiguador de captura	Solución amortiguadora conteniendo acetato y un agente caotrópico
Columnas GFX	Columnas MicroSpin pre-empacadas con matriz de fibra de vidrio
Tubos de colección	Tubos de microcentrífuga de 2 ml sin tapa
Amortiguador de lavado	Amortiguador Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA). Añadir 48 ml de etanol absoluto para una concentración final de 80% antes de usar. Mezclar por inversión. Cuando no se use, almacenar herméticamente a temperatura ambiente.

Purificación de DNA de solución

El máximo volumen de una reacción de PCR que puede ser procesado con el siguiente protocolo son 100 µl.

1. Colocar una columna GFX en un tubo de colección para cada purificación que se lleve a cabo,
2. Añadir 500 µl amortiguador de captura a la columna
3. Transferir la solución de DNA (hasta 100 µl) a la columna GFX
4. Mezclar mediante pipeteo la muestra de 4 a 6 veces.
5. Centrifugar a máxima velocidad por 30 s
6. Decantar el contenido del tubo de colección. Colocar la columna GFX de nuevo en el tubo de colección.
7. Añadir 500 µl de amortiguador de lavado a la columna. Centrifugar a máxima velocidad por 30 s.
8. Desechar el tubo de colección y transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.
9. Aplicar 50 µl de amortiguador de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0, amortiguador TE pH 8.0 o agua destilada estéril) directamente al centro de la matrix de fibra de vidrio en la columna GFX. Para eluir el DNA en una forma más concentrada, reducir el volumen de elución a no menos de 10 µl.
Nota: usando bajos volúmenes de elución para concentrar el DNA se reducirá el rendimiento (ver manual, página 7).
10. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 1 min.
11. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min para recuperar el DNA purificado.
Nota: para eluciones de 50 µl, el volumen actual de muestra recuperada se encontrará en el rango de 40 a 50 µl. Para volúmenes de elución de 10 µl, el volumen de DNA recuperado se encontrará en el rango de 5 a 7 µl.

Purificación de DNA de bandas de geles

El peso máximo de trozo de gel que puede ser procesado con el siguiente protocolo son 300 mg; la columna puede acomodar un volumen máximo de 600 μ l (por ejemplo, 300 mg de gel y 300 μ l de amortiguador de captura).

1. Pesar un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml vacío y registrar su peso.
2. Usando un bisturí limpio, cortar el trozo de agarosa conteniendo la banda de DNA a purificar. Cortar lo más cercano que se pueda a la banda de DNA. Cortar el trozo de agarosa en pequeñas piezas y transferirlo al microtubo previamente pesado.
3. Pesar el tubo conteniendo la agarosa y restar el peso del tubo vacío para determinar el peso del trozo de agarosa.
4. Añadir 10 μ l de amortiguador de captura por cada 10 mg de trozo de agarosa al tubo con gel.
5. Cerrar el tubo y mezclar mediante vortex vigorosamente. Incubar a 60 °C hasta que la agarosa se haya disuelto completamente (5-15 min).
6. Durante el tiempo de incubación, colocar una columna GFX en un tubo de colección por cada purificación que se realizará.
7. Después de que la agarosa se haya disuelto por completo, centrifugar rápidamente para colocar el total de la muestra en el fondo del tubo.
8. Transferir la muestra a una columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
9. Centrifugar a máxima velocidad por 30 s.
10. Desechar el contenido del tubo. Colocar la columna de nuevo en el tubo de colección.
11. Añadir 500 μ l de amortiguador de lavado a la columna. Centrifugar a máxima velocidad por 30 s.
12. Desechar el tubo de colección y transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

13. Aplicar 50 μ l de amortiguador de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0, amortiguador TE pH 8.0 o agua destilada estéril) directamente al centro de la matrix de fibra de vidrio en la columna GFX. Para eluir el DNA en una forma más concentrada, reducir el volumen de elución a no menos de 10 μ l.
Nota: usando bajos volúmenes de elución para concentrar el DNA se reducirá el rendimiento (ver manual, página 7).
14. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 1 min.
15. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min para recuperar el DNA purificado.
Nota: para eluciones de 50 μ l, el volumen actual de muestra recuperada se encontrará en el rango de 40 a 50 μ l. Para volúmenes de elución de 10 μ l, el volumen de DNA recuperado se encontrará en el rango de 5 a 7 μ l.

C. Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) para la determinación proteína por el método de Bradford

El método de Bradford, el cual es más rápido que el de Lowry, es el método de elección para determinar la concentración de proteína. Ciertas sustancias interfieren con estos ensayos como la urea (3 M), glicerol (10%), CHAPS (5%), SDS (0.016%), Tween 20 (0.031%), EDTA (100mM), 2-mercaptoetanol (1 M), Tris (2 M) y sulfato de amonio (1M) (Ausubel *et al.*, 2002).

Este método cuantifica la unión de azul brillante de Coomassie de una proteína (principalmente aminoácidos básicos como lisina, aunque también a la arginina, fenilalanina, triptófano y prolina) de concentración desconocida y compara esta unión con respecto a la de diferentes cantidades de una proteína estándar, usualmente albúmina de suero bovino. Este protocolo cuantifica de 1 a 10 μ g de proteína usando una curva estándar (Ausubel *et al.*, 2002).

Los datos de la curva estándar se presentan en el Cuadro 15 y en la gráfica de la Fig. 41

Cuadro 15. Concentraciones y absorbancias utilizadas para la preparación de la curva estándar de proteína.

Estándar	Concentración de BSA ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	A_{595}
1	0	0.0 ± 0.017
2	12.5	0.106 ± 0.02
3	25	0.177 ± 0.025
4	37.5	0.251 ± 0.023
5	50	0.284 ± 0.007
6	62.5	0.356 ± 0.0095
7	75	0.446 ± 0.012
8	87.5	0.499 ± 0.015
9	100	0.55 ± 0.017

Los datos de absorbancia se reportan como la media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

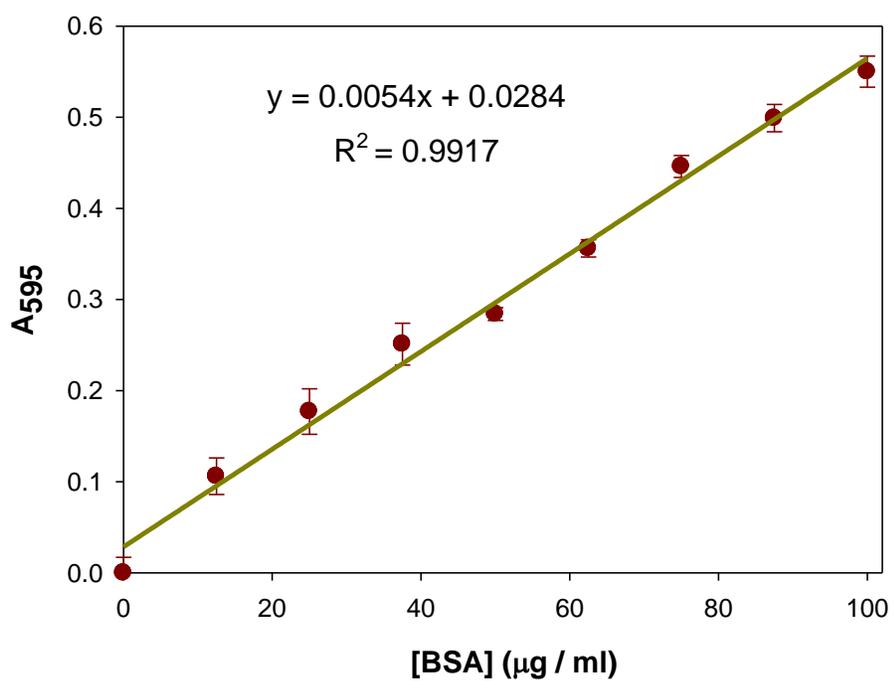


Figura 41. Curva de calibración de seroalbúmina bovina. Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

D. Determinación de los parámetros termodinámicos de desnaturalización

Los datos de DC (25 a 90°C) de la transición de la BnPA del estado nativo al desnaturalizado se graficaron en una hoja de Excel y se transformaron a elipticidad molar $[\theta]$ (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), tal y como se mencionó en el apartado de Dicroísmo Circular de la sección 6.21. Para transformar los datos de dicroísmo circular a elipticidad molar, se cambian las unidades proporcionadas de miligrados a grados, dividiendo el valor dado entre 1000. A continuación se obtiene el valor de elipticidad molar $[\theta]$ (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) empleando la Eq. 20:

$$[\theta] = \frac{\theta(\text{grados}) * 100}{\lambda(\text{cm}) * C} \quad 20$$

donde:

θ = grados de elipticidad

λ = longitud de la celda en cm

$$C (\text{residuos}) = \frac{C \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{110 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}$$

La celda es de 0.1 cm, y la concentración experimental de la muestra es de 0.1 g/L. En el Cuadro 16 se muestran los datos de elipticidad molar calculados

Cuadro 16. Valores de elipticidad (miligrados) y su conversión a elipticidad molar $[\theta]$.

T(°C)	Elipticidad (miligrados)	Elipticidad molar $[\theta]$ (grados cm² dmol⁻¹)
25	-27.8	-15290
25	-27.7	-15235
28	-27.6	-15180
30	-27.5	-15125
33	-27.5	-15125
35	-27.4	-15070
37	-27.4	-15070
40	-27.2	-14960
42	-27.1	-14905
45	-26.8	-14740
47	-26.5	-14575
50	-25.8	-14190
53	-25.3	-13915
55	-24.6	-13530
60	-23.1	-12705
63	-22.3	-12265
65	-21.4	-11770
67	-21.1	-11605
70	-20	-11000
72	-19.8	-10890
75	-18.9	-10395
77	-18.8	-10340
80	-18.8	-10340
82	-18.8	-10340
85	-18.7	-10285

Se grafican los datos de elipticidad molar contra temperatura (transición térmica de la desnaturalización) y se muestran en la Fig 42. Se trazó una línea base hasta la intersección con el eje $[\theta]_{220}$ tanto de la pre y la post transición denominándose elipticidad del estado nativo $[\theta]_N$ y desplegado $[\theta]_U$, respectivamente. Ambos valores son fijos mientras que para cada temperatura (línea punteada anaranjada) se tiene un valor de elipticidad denominado $[\theta]_{obs}$.

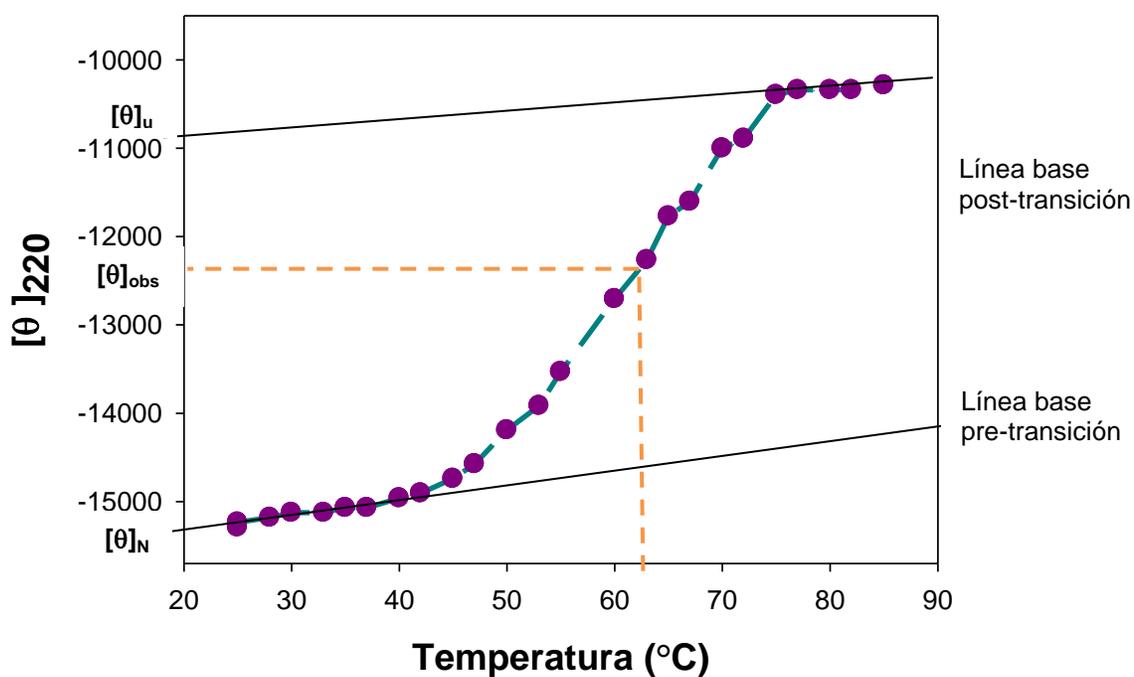


Figura 42. Curva de transición térmica de la desnaturalización de la BnPA recombinante.

De la Fig 42 se obtiene:

$$[\theta]_N = -15\,300$$

$$[\theta]_U = -10\,900$$

Con estos valores se calcula la fracción de proteína desplegada (f_u) a cada temperatura utilizando la Eq. (16):

$$f_u = \frac{[\theta]_{\text{obs}} - [\theta]_N}{[\theta]_u - [\theta]_N} \quad (16)$$

Se escribe un ejemplo correspondiendo a la primer temperatura de 25°C:

$$f_u = \frac{[\theta]_{\text{obs}} - [\theta]_N}{[\theta]_u - [\theta]_N} = \frac{-15290 + 15300}{-10900 + 15300} = 0.0019$$

Con los valores de f_u se determinó la (K_{eq}) utilizando la Eq. (17):

$$K_{\text{eq}} = \frac{f_u}{1-f_u} = \frac{0.0019}{1-0.0019} = 0.00196$$

Para determinar ΔG a diferentes temperaturas se emplean los valores de K_{eq} a diferentes temperaturas se sustituyen en la Eq. (18):

$$\Delta G = -RT(\ln K_{\text{eq}}) = -(1.9872) * (298.15) * \ln(0.00196) = 3693.78 \text{ cal/mol}$$

donde,

$$R = 1.9872 \frac{\text{cal}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$$

T= temperatura en Kelvin

En el Cuadro 17 se muestran los valores obtenidos hasta el momento:

Cuadro 17. Valores de f_u , T(K), K_{eq} y ΔG de desnaturalización.

f_u	T (K)	K_{eq}	ΔG (cal /mol)	ΔG (kJ /mol)
0.00196078	298.15	0.00196464	3692.62374	15.457323
0.0127451	298.15	0.01290963	2577.17457	10.7880528
0.02352941	301.15	0.02409639	2229.62365	9.33320458
0.03431373	303.15	0.03553299	2010.45133	8.41574927
0.03431373	306.15	0.03553299	2030.34694	8.49903229
0.04509804	308.15	0.04722793	1869.38099	7.82522883
0.04509804	310.15	0.04722793	1881.51392	7.87601727
0.06666667	313.15	0.07142857	1642.26342	6.87451467
0.07745098	315.15	0.08395324	1551.57126	6.4948773
0.10980392	318.15	0.12334802	1323.09164	5.53846159
0.14215686	320.15	0.16571429	1143.56697	4.78697133
0.21764706	323.15	0.27819549	821.604258	3.43923542
0.27156863	326.15	0.37281292	639.491304	2.6769106
0.34705882	328.15	0.53153153	412.122275	1.72514384
0.50882353	333.15	1.03592814	-23.3683912	-0.09782009
0.59509804	336.15	1.46973366	-257.233193	-1.07677815
0.69215686	338.15	2.24840764	-544.446408	-2.27905266
0.7245098	340.15	2.62989324	-653.601501	-2.73597588
0.84313725	343.15	5.375	-1146.80409	-4.80052191
0.86470588	345.15	6.39130435	-1272.26899	-5.32571798
0.96176471	348.15	25.1538462	-2231.20335	-9.33981722
0.97254902	350.15	35.4285714	-2482.34394	-10.3910917
0.97254902	353.15	35.4285714	-2503.61206	-10.4801201
0.97254902	355.15	35.4285714	-2517.79081	-10.5394723
0.98333333	358.15	59	-2902.04733	-12.1479701

La determinación de ΔS se realiza por el método gráfico, en el cual se grafican los valores cercanos a $\Delta G = 0$ (en kJ/mol, columna 5) contra la T(K).

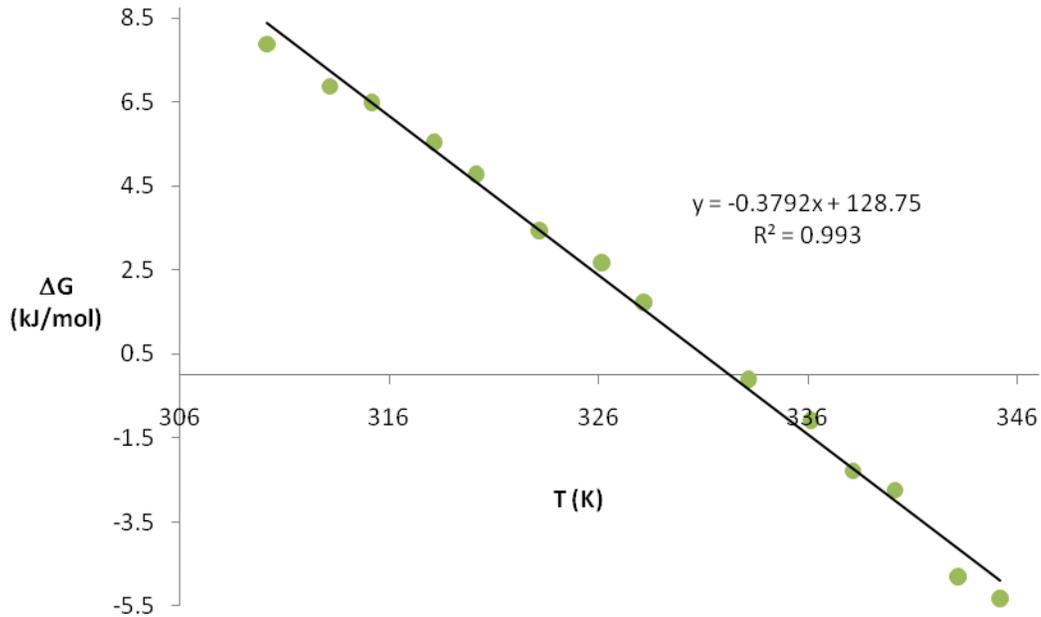


Figura 43. Gráfica de la Energía libre de Gibbs en función de la temperatura. Método gráfico para la determinación de T_m y ΔS .

Usando la Eq. (19),

$$\Delta G_u^\circ = \Delta H_u^\circ - T\Delta S_u^\circ \quad (19)$$

y los datos de la Fig. 43 se tiene una pendiente,

$$m = -\Delta S$$

por lo que,

$$\Delta S = -0.3792 \text{ kJ/mol K}$$

De la ecuación de la gráfica $y = -0.3792x + 128.75$ se despeja el valor de x que corresponde a $T = T_{1/2}$, cuando $\Delta G = 0$:

$$x = T_m = \frac{128.75}{0.3792} = 339.5 \text{ K}$$

bajo esta condición y utilizando la Eq. (19), se calculan los parámetros termodinámicos:

$$\Delta H = T_{1/2} \Delta S = (339.5 \text{ K}) * (0.3792 \text{ kJ/mol K}) = 128.73 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = (128.73 \text{ kJ/mol}) - (339.5 \text{ K}) * (-0.3792 \text{ kJ/mol K}) = 257.46 \text{ kJ/mol}$$

Cloning, Heterologous Expression and Properties of a Recombinant Active Turnip Peroxidase

Norma A. Rodríguez-Cabrera, C. Regalado, and Blanca E. García-Almendárez*

DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas s/n. Col. Las Campanas. Querétaro, 76010 Qro. México.

ABSTRACT: Turnip (*Brassica napus*) roots peroxidase isoforms have been used in diagnostic kits and can also efficiently polymerize phenolic compounds from wastewaters. Heterologous expression of a turnip acidic peroxidase (BnPA) was investigated to increase availability of this widely used enzyme. The mature BnPA was ligated into the pET28a(+) vector and used to transform *Escherichia coli* Rosetta 2. Recombinant BnPA peroxidase was overexpressed and accumulated in inclusion bodies from which it was purified to homogeneity by immobilized metal affinity chromatography under denaturing conditions. Peroxidase activity was observed after a refolding process under oxidative conditions. The yield of pure recombinant BnPA was 29 mg L⁻¹ of culture with a specific activity of 981 ± 20 ABTS units mg⁻¹ at optimal conditions (pH 6, 45 °C). Recombinant BnPA showed similar kinetic properties compared to native turnip peroxidase, and its secondary structure evaluated by circular dichroism comprised 20% α-helix, 32% β-sheet and 48% random structure. Recombinant BnPA showed high yield and good kinetic properties which are key steps for future structure–function studies and biotechnological applications.

KEYWORDS: recombinant turnip peroxidase, overexpression, refolding, kinetic properties

■ INTRODUCTION

Peroxidases are oxidoreductases that catalyze the reaction between H₂O₂ and various reducing compounds and most are heme proteins that contain iron(III) protoporphyrin IX, as prosthetic group. Class III plant peroxidases (EC 1.11.1.7) participate in lignification, the defense mechanism of physically damaged or infected tissues,¹ indole acetic acid degradation and stress response² among other physiological processes.

Since peroxidase is relatively stable at high temperature it is used as blanching indicator of processed vegetable products.³ In addition, its easily measured activity has allowed its use as a model enzyme in the study of protein structure and enzyme reactions and functions.⁴ Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots are the major source of peroxidase, and the most abundant isoenzyme (HRP-C) is widely used in organic synthesis, coupled enzyme analysis,⁵ chemiluminescent assays⁶ and cancer therapy.⁷ However, there is a demand for more stable new peroxidases specific for specialized applications. A good alternative source of peroxidases is turnip (*Brassica napus*) roots, because some isoforms are able to efficiently polymerize phenolic compounds from foodstuffs and industrial effluents^{8,9} or may be used in diagnostic kits.¹⁰

Classical purification methods involve tedious and slow processes with low yields, in addition to the difficult task of isoenzymes separation.¹¹ Alternative methods such as molecular cloning might help to search peroxidases showing good catalytic properties similar to those of HRP-C. Many attempts have been reported for recombinant HRP-C production using a variety of hosts.^{12,13} However, yields from prokaryotic organisms like *Escherichia coli*, are not higher than 16.7 mg L⁻¹.^{14,15}

Expression of recombinant turnip peroxidase has not been previously reported while expression of significant amounts of this enzyme could be promising in the search of more economical, novel peroxidases. However, eukaryotic protein expression in

E. coli is not always an easy task. The genome of certain organisms favors sequences using codons that occur infrequently in *E. coli* hosts. Forced high-level expression of rare codon-containing genes in *E. coli* depletes the endogenous pool of corresponding tRNAs. The deficit of tRNA molecules disrupts translation, leading to truncated proteins or no protein expression. There are however, some strains like Rosetta which supply tRNAs for codons rarely used in *E. coli*.¹⁶ This strategy was used for the expression of a tobacco anionic peroxidase in *E. coli* BL21(DE3).¹⁷

Turnip peroxidase shows about 9% glycosylation,¹⁸ and bacterial expression systems are not able to glycosylate recombinant proteins. However, a neutral turnip peroxidase was partially deglycosylated (88%) and about 40% activity was retained, with no effect on structural conformation.¹⁹ We have previously isolated and cloned a turnip (*B. napus* L. var. purple top white globe) roots acidic isoperoxidase cDNA.²⁰ Thus, the objective of this work was to overexpress and purify from a bacterial system a recombinant turnip isoperoxidase and to investigate its refolding process and biochemical properties.

■ MATERIALS AND METHODS

Materials. NaCl, tris-HCl, imidazol, sodium phosphate, dithiothreitol (DTT), oxidized glutathione (GSSG), hemin, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), bovine serum albumin (BSA), and diammonium salt of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Electrophoresis chemicals [acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, 1,2-bis(dimethylamino)-ethane (TEMED), sodium dodecyl sulfate (SDS), tris(hydroxymethyl)-aminomethane,

Received: February 17, 2011

Accepted: May 18, 2011

Revised: May 11, 2011

Published: May 18, 2011

ammonium persulfate] were purchased from BioRad (Hercules, CA). A vector containing a DNA fragment which codes for turnip roots (*Brassica napus* var. purple top white globe) mature peroxidase (BnPA) was obtained as previously reported.²⁰

Construction of Expression Vector pET28-BnPA. BnPA was amplified by PCR using the plasmid pGEMT-BnPA as DNA template.²⁰ Gene-specific primers (Sigma) used to amplify the BnPA gene, were: 5'-TATGGATCCCAGTTAAACCCAACGTTTACTC-3' and 5'-AATAAGCTTTTATTGTCCATTAA-CCACCTTACAG-3' for sense and antisense, respectively. The primers contained *Bam*HI and *Hind*III restriction sites (bold) to allow directional cloning of amplified DNA. The PCR product was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI) and digested with *Bam*HI and *Hind*III (Fermentas, Ontario, Canada). After electrophoresis and gel band purification (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), BnPA was ligated to the pET28a-(+) vector (Novagen, Madison, WI) previously digested with same restriction enzymes. Cloned genes in this vector are expressed as His₆-tagged fusion proteins. *E. coli* JM109 competent cells were used for cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA), and positive clones were analyzed by PCR and restriction enzymes. The expression vector pET28-BnPA was used to transform *E. coli* Rosetta 2 (DE3) competent cells (Novagen) using heat shock.²¹ Plasmidic DNA was isolated from transformants using the Qiagen DNA mini-prep (Hamburg, Germany) and confirmed by PCR and restriction analysis.

Expression of Recombinant BnPA Peroxidase. Transformed colonies were inoculated into 3 mL of Luria-Bertani (LB) broth containing 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin and 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ chloramphenicol. The cultures were incubated overnight at 37 °C in an orbital shaker (Lab-line, Melrose Park, IL) at 200 rpm and used to inoculate two 1 L flasks, each containing 500 mL LB added with both antibiotics. Cultures were grown at 37 °C at 200 rpm to an OD₆₀₀ of about 0.5, using a Genesys 10 UV spectrophotometer (Thermoscientific, Madison, WI). The recombinant protein was induced by addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM. Bacterial cells from 1 L cultures were grown another 5 h at 37 °C, or 12 h at 16 or 25 °C and harvested by centrifugation (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) at 4000g for 10 min at 4 °C, and were either immediately used or stored at -20 °C.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). The expression level of recombinant BnPA in cell extracts, in the soluble and insoluble fractions and purity of protein samples, were analyzed by SDS-PAGE²¹ on a Mini Protean II unit (Bio-Rad) using a 10% polyacrylamide gel. Low molecular weight markers (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were used as reference and protein bands were stained using Coomassie blue G-250 dye (Bio-Rad).

Solubilization of Inclusion Bodies. The cell pellet was resuspended in lysis buffer (5 mL g⁻¹ wet pellet) containing 2 M NaCl, 10 mM DTT, 10 mM tris-HCl buffer pH 8.0 and lysed by ultrasonic treatment (Vibra-cell, Sonics & Materials, Newtown, CT) at 20 kHz for 10 min, in an ice-bath. The disrupted mixture was incubated for 1.5 h in the ice-bath and sonication procedure was repeated.¹⁵ The lysate was centrifuged at 10000g for 25 min at 4 °C to separate the soluble and insoluble fractions. The pellet containing inclusion bodies was washed twice with 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), centrifuged at 10,000g for 15 min and solubilized in 150 mL of 8 M urea containing 1 mM DTT at room temperature (25 ± 2 °C) following manufacturer instructions (Novagen).

Recombinant BnPA Purification. Solubilized recombinant BnPA protein was purified by immobilized-metal affinity

chromatography (IMAC) using a 1 mL Ni-NTA column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) previously equilibrated with binding buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 30 mM imidazole, 8 M urea, pH 7.4). After sample injection (1 mL) 15 column volumes of binding buffer were used for washing, followed by BnPA elution using five column volumes of elution buffer (binding buffer adjusted to 500 mM imidazole). Fractions of 0.5 mL were collected.

BnPA fractions were desalted by size exclusion chromatography (10DG column, Bio-Rad). Three mL of the purified and denatured BnPA was applied to the 10DG column pre-equilibrated with 50 mM tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 4 M urea. Three mL of the partially desalted BnPA fractions were applied to another 10DG column pre-equilibrated with the same buffer containing 2 M urea. One mL fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE. This two-step process allowed a 4-fold reduction in urea concentration and permitted adjustment of recombinant BnPA refolding conditions.

Refolding of Recombinant BnPA. BnPA (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added dropwise to the refolding buffer (2 M urea, 0.7 mM oxidized glutathione, 5 mM CaCl₂, 0.1 mM DTT, 5% glycerol in 50 mM tris-HCl buffer, pH 8) and incubated overnight at 4 °C, as described by Gazaryan et al.¹⁵ Hemin (5 μM) was then added and the solution was incubated for 2 h at 4 °C, followed by activity determination of the refolded enzyme. Enhancement of recombinant BnPA refolding was attempted by independently varying urea and glutathione concentrations. Urea was varied from 1.5 to 3 M, while glutathione concentration ranged 0.1–1.5 mM, keeping the concentration of all other chemicals constant. Recombinant BnPA was concentrated by ultrafiltration using 10 kDa molecular weight cut off membranes (Millipore, Billerica, MA).

Activity Determination. Peroxidase activity was determined using ABTS as hydrogen donor. The reaction mixture consisted of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 2.5 mM ABTS, 50 μL of purified enzyme and 2 mM H₂O₂, in a total volume of 1.5 mL. The change in absorbance at 414 nm ($\epsilon_{414} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ref 22) was followed using a UV spectrophotometer (Thermoscientific). One unit of activity is defined as the μmoles of ABTS radical produced per min at pH 6.0 and 25 °C. Protein was quantified according to the dye-binding method of Bradford²³ using BSA as standard.

Recombinant BnPA Characterization. *Optimum pH.* The following buffers were used: 0.02 M citrate-phosphate buffer, pH 3–7; 0.02 M phosphate buffer, pH 8; and 0.02 M tris-HCl buffer, pH 9. Two mM H₂O₂, 2.5 mM ABTS, and 50 μL purified recombinant enzyme (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were used.

Optimum Temperature. Peroxidase activity was measured between 25 and 70 °C with 5 °C increments at the optimum pH. Temperature control was achieved using a digital dry bath (Labnet, Woodbridge, NJ).

Kinetic Studies. Rate constants of ABTS oxidation reactions were determined from steady-state data by varying H₂O₂ concentration from 0.5 to 5 mM and ABTS concentration from 0.05 to 3 mM. Ionic strength, pH and temperature were kept constant in these series of experiments. K_m and V_{max} of ABTS were calculated using the Lineweaver-Burk graphic method for the two-substrate ping-pong mechanism followed by peroxidase.¹¹ The rate equations in double reciprocal form are given below²⁴

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_a}{V_{max}A_0} + \frac{K_b}{V_{max}B_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

Where, V_{max} = maximum velocity, $K_a = K_m$ for substrate A

(hydrogen peroxide), $K_b = K_m$ for substrate B (ABTS), $A_0 =$ substrate A concentration and $B_0 =$ substrate B concentration. A plot of $1/v_0$ versus $1/B_0$ for different values of A_0 (eq 1) yields a family of parallel lines, characteristic of a ping-pong mechanism. Using this graph and from a replot of intercepts versus $1/A_0$ the parameters K_a , K_b , and V_{max} can be determined.²⁴

Effect of Metal Ions and Salts. The purified and refolded recombinant peroxidase (50 μ L) was incubated individually with 50 μ L of 0.25 mM $AgNO_3$, 5 mM of $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaCl, KCl, $ZnCl_2$, EDTA, and $MnSO_4$ or deionized water as control at 25 °C for 30 min. The enzyme activity was then measured and results were expressed as relative activity calculated as the ratio of refolded recombinant BnPA activity in the presence of salts to that without salts, expressed as percentage.

Far-UV Circular Dichroism (CD) Spectra. The CD spectrum in the far-UV region (190 to 240 nm) was recorded using a 0.1 cm path length quartz cell under constant nitrogen flush using protein concentration of 0.1 mg mL⁻¹ in 0.01 M phosphate buffer at pH 6.0. CD data were expressed as molar ellipticity $[\theta]$ (degrees cm² dmol⁻¹), based on an assumed mean amino acid residue weight (MRW) of 110 Da. The molar ellipticity was determined as $[\theta] = (\theta \times 100 \text{ MRW}) (c \ l)^{-1}$, where c is protein concentration (mg mL⁻¹), l is light path length (cm), and θ is the measured ellipticity (millidegrees). CD spectra were reported as the average of three scans corrected by subtracting the adequate blank runs on BnPA-free buffer. The fractions of secondary structure (α -helix, β -sheet and random) were calculated using the SELCON3 program.²⁵ Thermodynamic properties for thermal unfolding of recombinant BnPA were calculated from θ_{222} data by heating from 25 to 90 °C at constant rate of 2 °C/min.

RESULTS AND DISCUSSION

Construction of the Expression Vector pET28-BnPA. The full-length BnPA comprises 1077 base pairs (bp) and encodes a predicted protein of 358 amino acids.²⁰ However, only 921 bp were amplified to encode the mature BnPA. BnPA fragment was amplified successfully from the pGEMT-BnPA vector (Figure 1A, lane 2), and ligated to yield the expression plasmid pET28-BnPA which was verified by *Bam*HI and *Hind*III digestion (Figure 1B, lane 2).

Expression of Recombinant BnPA. BnPA contains 5 Ile (ATA), 23 Arg (AGA and CGG), 10 Leu (CTA), 9 Pro (CCC), and 13 Gly (GGA) codons which are rare for prokaryotes. However, this problem was overcome by using *E. coli* Rosetta 2 (DE3) which supplies the genes of the corresponding tRNAs. Attempts to obtain BnPA in the soluble fraction by using lower expression temperatures (16 and 25 °C) were unsuccessful (data not shown).

Cell extracts without IPTG addition (Figure 2, lane 2) did not exhibit a differential expression band characteristic of those after induction which showed a molecular weight of about 37 kDa (Figure 2, lane 3). This band corresponds to the expected size of the His₆-tagged recombinant BnPA, and represents about 20% of the total protein produced by *E. coli*. From SDS-PAGE analysis of soluble and insoluble fractions (Figure 2, lanes 4 and 5, respectively) most induced protein was found as insoluble, suggesting that the His-tagged BnPA was present in inclusion bodies. According to lane 5, recombinant BnPA represents about 50% of the insoluble cellular protein. Thus, like other peroxidases BnPA was expressed within inclusion bodies.^{14,17}

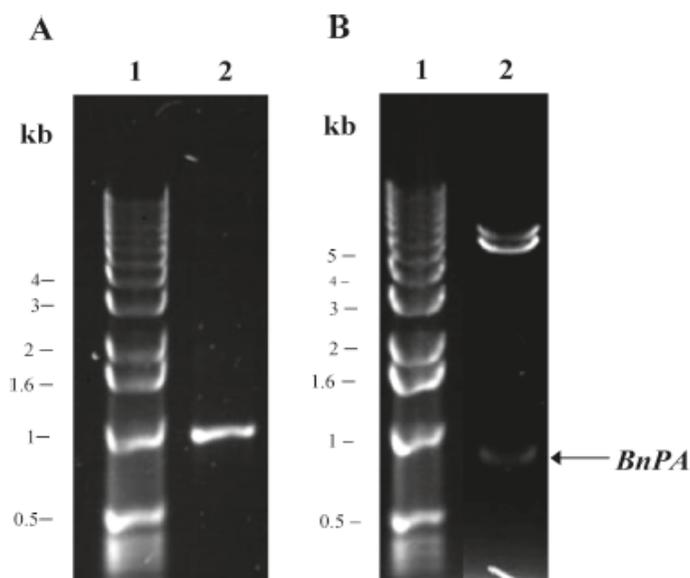


Figure 1. Construction of recombinant vector pET28-BnPA. A) Lane 1, 1 kb DNA ladder; lane 2, PCR product of BnPA. B) Lane 1, 1 kb DNA ladder; lane 2, transformant clone containing the recombinant vector pET28-BnPA digested with *Bam*HI and *Hind*III.

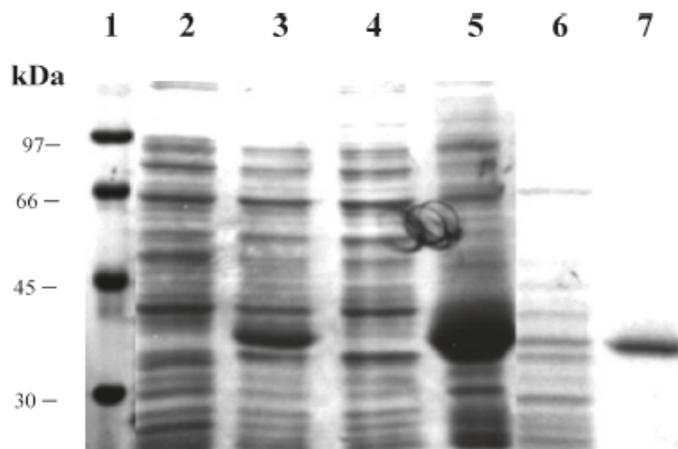


Figure 2. SDS-PAGE analysis of recombinant BnPA. Lane 1, low range molecular weight markers; lane 2, cell extract from *E. coli* Rosetta harboring the pET28a-BnPA construct before induction; lane 3, cell extract after IPTG induction; lane 4, soluble fraction; lane 5, insoluble fraction; lane 6, first washing from Ni-NTA column; lane 7, BnPA elution from Ni-NTA column.

Purification of Recombinant BnPA by IMAC. BnPA was solubilized from inclusion bodies using 8 M urea, and purified by IMAC under denaturing conditions. After extensive washing of nonretained protein (Figure 2, lane 6) BnPA was eluted with 0.5 M imidazole (Figure 2, lane 7). At this point, recombinant BnPA was purified to homogeneity, since no other protein bands were observed.

Protein concentration after two-step desalting by gel filtration was approximately 483.6 μ g mL⁻¹ (Table 1) with a yield of 29 mg of purified BnPA L⁻¹ of cell culture. Recombinant HRP from *E. coli* achieved yields of 16.7 mg L⁻¹,¹⁵ and 0.086 mg L⁻¹,²⁶ which are about 1.7 and 340 times lower than that obtained here, respectively. Using the same system a recombinant HRP-conjugate

Table 1. Purification of Recombinant BnPA (Mean of Three Replicates with Standard Error Within 5% of the Mean)

sample	protein concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	total protein (mg)	protein yield (%)
total cell lysate ^a	3819.4	76.4	100
insoluble fraction ^b	1710.2	34.2	45.0
IMAC	711.2	6.4	8.4
gel-filtration	483.6	5.8	7.6

^aA total of 3 g wet weight of cells from 250 mL culture were lysed.
^bInclusion bodies were solubilized in 8 M urea and loaded into the Ni-NTA column.

Table 2. Effect of Urea and Oxidized Glutathione on Recombinant BnPA Refolding

urea (M)	relative activity ^a (%)	oxidized glutathione (mM)	relative activity ^a (%)
1.5	65 ± 2.4	0.5	61 ± 2.3
2.0	100 ± 1.1	0.7	100 ± 1.2
2.4	63 ± 2.1	1.2	92 ± 1.8
3.0	21 ± 0.5	1.5	87 ± 1.4

^aRatio of actual to maximum activity expressed as percentage. Data are expressed as mean ± standard deviation of three replicates. Initial conditions were 2 M urea, 0.7 mM GSSG, 5 mM CaCl₂, 0.1 mM DTT, 5 μM hemin, in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0. Urea and glutathione concentrations were independently varied.

yield was 12 mg L⁻¹,²⁷ which is less than half our value. On the other hand recombinant glycosylated HRP-C was expressed in insect cells culture with added hemin and the yield of active peroxidase was 28 mg L⁻¹,¹³ which is similar to the one obtained here. However, recombinant protein expression using tissue culture is time-consuming and involves high costs.²⁸ Using insect larva as expression hosts, which is a more cost-effective strategy than tissue culture, the yield of HRP-C was 480 mg kg⁻¹ after optimization of infection conditions.²⁹

Refolding of Recombinant BnPA. From refolding enhancing experiments 2.0 M urea concentration gave the maximum peroxidase activity (Table 2). Disulfide bonds formation plays a significant role in peroxidase refolding and recombinant BnPA showed 61% relative activity at 0.5 mM of oxidized glutathione, reached a maximum at 0.7 mM and steadily decreased with increasing concentrations (Table 2). These conditions were similar to those reported for HRP-C¹⁴ and lignin peroxidase,³⁰ but slightly different (1.8 M urea and 0.5 mM oxidized glutathione) from those found for recombinant tobacco anionic peroxidase.¹⁷

Recombinant BnPA showed a Reinheitszahl (RZ) value of 3.6, which is higher than that found for recombinant nonglycosylated HRP-C (2.11¹⁴) and glycosylated HRP-C produced in insect cell culture (3.2¹³). Purified native acidic turnip peroxidase showed a RZ value of 3.1,¹⁸ indicating similar heme group environment of recombinant BnPA.

Specific activity of the refolded recombinant BnPA was 981 ± 20 U mg⁻¹ under the best conditions which is lower than that shown by recombinant tobacco anionic peroxidase (1100 U mg⁻¹;¹⁷), slightly higher than a HRP-conjugate (920 U mg⁻¹;²⁷) and much higher than that of HRP (0.58 U mg⁻¹;²⁶), all three expressed in *E. coli*. BnPA showed about the same activity as native partially deglycosylated turnip peroxidase,¹⁹ indicating an

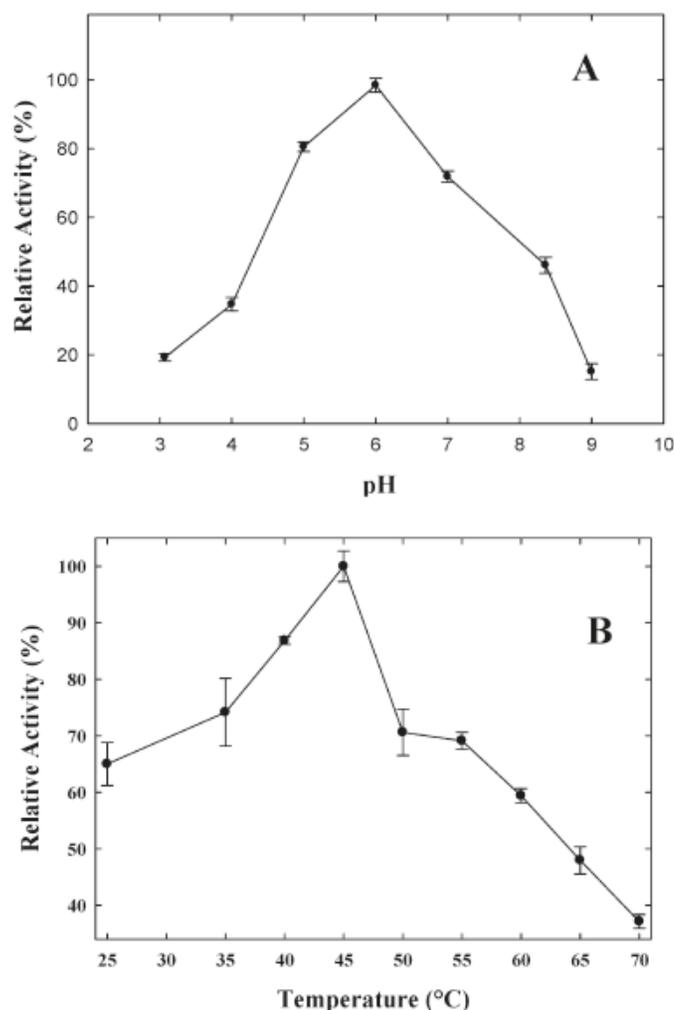


Figure 3. Effect of pH (A) and temperature (B) on recombinant BnPA activity, using ABTS as H donor. The ordinate represents relative activity, that is, the ratio of activity to the maximum activity expressed as percentage. Vertical bars indicate standard deviation.

unclear effect of the carbohydrate moiety on turnip peroxidase activity.

Recombinant BnPA Characterization. Optimum pH. Recombinant BnPA showed above 70% relative activity (i.e., ratio of actual to maximum activity) in a narrow pH range (5–7) with a maximum at pH 6.0 (Figure 3A). The optimum pH was about the same as that reported for a recombinant ascorbate peroxidase from soybean³¹ and slightly higher than those of two native turnip roots isozymes (neutral and acidic) ranging between 5.0 and 5.5.^{11,32}

Optimum Temperature. Under the conditions used here maximum activity of purified recombinant BnPA was observed at 45 °C (Figure 3B). At 50 °C relative peroxidase activity showed a sharp decrease reaching a value of about 70%, and increasingly higher temperatures resulted in a steady decrease of relative peroxidase activity, reaching a value of about 37% at 70 °C. The optimum temperature found here is similar to those of three native turnip peroxidases whose optimum temperatures ranged from 40 to 55 °C.³²

Kinetic Studies. Initial velocities (v_0) were determined as a function of both substrates (A_0 , H₂O₂, and B_0 , ATBS). Double-reciprocal plots according to eq 1 (results not shown) showed

Table 3. Kinetic and Thermodynamic Parameters of Native and Recombinant Turnip Peroxidase.^a

peroxidase	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH_u° (kJ mol ⁻¹)	ΔG_u° (kJ mol ⁻¹)	ΔS_u° (kJ mol ⁻¹)
recombinant BnPA	0.33 ± 0.04	1722 ± 37	5218 ± 85	57.4 ± 0.2	91.2 ± 1.9	183 ± 2.1	0.27 ± 0.03
native turnip ^c	0.56 ± 0.03	33000 ± 55	59000 ± 1700	66.4 ± 0.3	128.75 ± 3.2	257.5 ± 2.3	0.38 ± 0.02

^a Mean of three replicates ± standard deviation. ^b ΔH_u° , ΔG_u° , ΔS_u° are the standard state change of enthalpy, Gibbs free energy and entropy of unfolding, respectively. Parameters calculated by thermal unfolding profile using CD at θ_{222} nm. ^c Kinetic parameters were obtained from ref 8, while thermodynamic data were calculated from ref 18.

that recombinant BnPA kinetics follows a ping-pong mechanism, which has also been reported for tobacco anionic peroxidase¹⁷ and a neutral turnip peroxidase.¹¹

Using graphical analysis²⁴ kinetic parameters were calculated (Table 3). The ABTS K_M value was lower than those reported for native turnip peroxidase and a partially deglycosylated turnip peroxidase (0.9 mM¹⁹). In comparison to reported recombinant enzymes, our K_M value was 3.5 higher than that of HRP (0.093 mM²⁶) and about twice that of tobacco anionic peroxidase (0.17 mM¹⁷). These results suggest that recombinant non-glycosylated peroxidase may offer better substrate accessibility to its binding site as compared to the native enzyme, leading to increased substrate affinity. However, more experiments are needed to confirm this hypothesis. Recombinant BnPA showed a k_{cat} similar to that reported for a single mutant (K232N) recombinant HRP (1849 s⁻¹,²⁶), but significantly lower than that of native turnip peroxidase (Table 3). The recombinant BnPA catalytic efficiency ($k_{cat} K_M^{-1}$) was similar to that of recombinant tobacco peroxidase (6×10^6 M⁻¹ s⁻¹,¹⁷) and slightly higher than native peroxidase from broccoli stems (3.4×10^6 M⁻¹ s⁻¹,³³). However, native or chemically modified peroxidase from turnip ($\sim 6 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹,⁸) showed about 11 times higher catalytic efficiency. These findings suggest that recombinant BnPA may show a similar performance as native or chemically modified turnip peroxidase in environmental applications, but tests under real conditions should be conducted to clarify this assumption.

Effect of Metal Ions and Salts. Salts concentrations of 0.25 mM AgNO₃, 5 mM of NaCl, KCl, ZnCl₂, EDTA, and MnSO₄ resulted in peroxidase activity inhibition, while 5 mM MgCl₂ and CaCl₂ enhanced peroxidase activity (Table 4). These results are in agreement with those reported for native turnip peroxidase.³⁴ Ca²⁺ and Mg²⁺ may interact through electrostatic forces with side chains of specific amino acids of the protein possibly resulting in subtle changes in the heme environment leading to enhanced affinity between recombinant BnPA and its substrate.

Far-UV CD Spectra. The percentage secondary structure of refolded recombinant BnPA was investigated by far-UV CD. A purified turnip peroxidase sample was kindly supplied by Dr. Quintanilla-Guerrero (UAQ, Mexico) and its spectrum showed a characteristic α -helix structure, such as negative bands at 208 and 222 nm (Figure 4) in agreement with Quintanilla-Guerrero et al.⁸ In contrast, CD spectrum of recombinant BnPA showed significant changes such as lower negative ellipticities and is summarized in Table 5. Helical structure decreased from 28% to 20%, while β -sheet increased from 27% to 32% for native turnip peroxidase and BnPA, respectively. From previous studies on native and partially deglycosylated turnip peroxidase, no significant changes in secondary structure were detected.¹⁹ Therefore, it may be concluded that changes observed in the CD spectrum of BnPA may be attributed to a partial refolding process of the enzyme molecule which may also explain the lower specific

Table 4. Effect of Metal Ions and Salts on Recombinant BnPA Activity

chemical	concentration (mM)	relative activity ^a (%)
none		100 ± 1.2
MgCl ₂	5	111.49 ± 2.3
CaCl ₂	5	124.36 ± 1.8
NaCl	5	53.6 ± 0.8
KCl	5	59.78 ± 1.1
ZnCl ₂	5	45.97 ± 1.5
EDTA	5	60.55 ± 2.1
AgNO ₃	0.25	39.11 ± 0.7
MnSO ₄	5	41.77 ± 1.3

^a Relative activity = ratio of activity in presence of salt to that without salt. Data are expressed as mean ± standard deviation of three replicates.

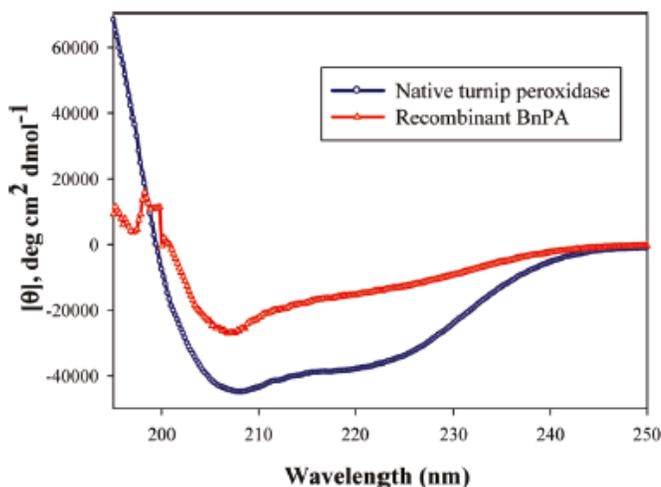


Figure 4. Far-UV CD spectra of native turnip peroxidase and recombinant BnPA. Protein concentration was 100 μ g mL⁻¹ in 10 mM phosphate buffer, pH 6.0.

activity of recombinant BnPA (981 U mg⁻¹) as compared to purified native acidic turnip peroxidase (1810 U mg⁻¹,¹⁸).

Based on protein structural properties thermal denaturation of BnPA was monitored by following ellipticity changes at 222 nm (results not shown). A thermal transition plot was used to calculate the corresponding standard state thermodynamic properties for unfolding (ΔH_u° , ΔG_u° , ΔS_u°). The recombinant BnPA showed a lower thermal stability than native turnip peroxidase, as indicated by their thermodynamic properties (Table 3), probably associated to a lack of carbohydrate moiety.

Melting temperature (T_m , midpoint of the transition from helical to random structure) was lower than the T_m value of native turnip peroxidase (Table 3). Onset temperature (T_o ,

Table 5. Secondary Structure of Native Turnip Peroxidase and Recombinant BnPA^a

enzyme	α -helix (%)	β -sheet (%)	random (%)
recombinant BnPA	20 \pm 0.3	32 \pm 0.4	48 \pm 1.3
native turnip peroxidase	28 \pm 0.4	27 \pm 0.4	45 \pm 0.9

^a Calculated from CD spectra using SELCON3 software (mean of three replicates \pm standard deviation).

where the loss in ellipticity signal reaches 5% of the original) for BnPA was 37 °C, while native turnip peroxidase showed a T_0 of 35 °C.⁸ These values indicate that despite being initially slightly more stable, the partially folded recombinant BnPA showed lower thermal stability.

This investigation resulted in the successful heterologous expression of a plant peroxidase. Enhanced refolding conditions of the purified recombinant BnPA, solubilization from inclusion bodies and overnight incubation with hemin allowed us to obtain an active peroxidase. Structural characteristics and thermal stability of recombinant BnPA were different from those found for native peroxidase, probably associated to partial refolding and lack of carbohydrate moiety.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (442) 192 1307; fax: (442) 1921304; e-mail: blancag@uaq.mx or blancag31@gmail.com.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks are given to CONACYT for PhD grant to N.A.R.C., and to Dr. Andres Arana for helping in the CD studies.

REFERENCES

- Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **2005**, *24*, 255–265.
- Yoshimura, K.; Yabuta, Y.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 223–234.
- Barret, D. M. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Technol.* **1995**, *49* (1), 62–65.
- Hiraga, S.; Sasaki, K.; Ito, H.; Ohashi, Y.; Matsui, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 462–468.
- Deyhimi, F.; Nami, F. Modeling and optimization of the bi-substrate peroxidase-enzyme catalyzed potentiometric assay of hydrogen peroxide by response surface methodology with a central composite rotatable design. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *68*, 162–167.
- Ngo, T. T. Peroxidase in chemical and biochemical analysis. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 1572–1587.
- Folkes, L. K.; Greco, O.; Dachs, G. U.; Stratford, M. R. L.; Wardman, P. 5-Fluorouracil-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 265–272.
- Quintanilla-Guerrero, F.; Duarte-Vázquez, M. A.; Tinoco, R.; Gómez-Suárez, M.; García-Almendárez, B. E.; Vázquez-Duhalt, R.; Regalado, C. Chemical modification of turnip peroxidase with methoxy-polyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8058–8065.
- Quintanilla-Guerrero, F.; Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B. E.; Tinoco, R.; Vázquez-Duhalt, R.; Regalado, C.

Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Biores. Technol.* **2008**, *99*, 8605–8611.

(10) Agostini, E.; Hernandez-Ruiz, J.; Arnao, M. B.; Milrad, S.; Tigier, H. A.; Acosta, M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2002**, *35*, 1–7.

(11) Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B. E.; Regalado, C.; Whitaker, J. R. Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica napus* L. var. purple top white globe) roots. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4450–4456.

(12) Kis, M.; Burbridge, E.; Brock, I. W.; Heggie, L.; Dix, P. J.; Kavanagh, T. A. An N-terminal peptide extension results in efficient expression, but not secretion, of a synthetic horseradish peroxidase gene in transgenic tobacco. *Annals Botany* **2004**, *93*, 303–310.

(13) Segura, M. M.; Levin, G.; Miranda, M. V.; Mendive, F. M.; Targovnik, H. M.; Cascone, O. High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 795–800.

(14) Smith, A. T.; Santama, N.; Dacey, S.; Edwards, M.; Bray, R. C.; Thorneley, R. N. F.; Burke, J. F. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13335–13343.

(15) Gazaryan, I. G.; Doseeva, V. V.; Galkin, A. G.; Tishkov, V. I. Effect of single-point mutations Phe⁴¹→His and Phe¹⁴³→Glu on folding and catalytic properties of recombinant horseradish peroxidase expressed in *E. coli*. *FEBS Lett.* **1994**, *354*, 248–250.

(16) Tegel, H.; Tourle, S.; Ottosson, J.; Persson, A. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta-DE3. *Protein Expression Purif.* **2010**, *69*, 159–167.

(17) Hushpulia, D. M.; Savitski, P. A.; Rojkova, A. M.; Chubar, T. A.; Fechina, V. A.; Sakharov, I. Y.; Lagrimini, L. M.; Tishkov, V. I.; Gazaryan, I. G. Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies. *Biochemistry (Moscow)* **2003**, *68*, 1189–1194.

(18) Duarte-Vázquez, M. A.; Whitaker, J. R.; Rojo-Domínguez, A.; García-Almendárez, B. E.; Regalado, C. Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5096–5102.

(19) Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B. E.; Rojo-Domínguez, A.; Whitaker, J. R.; Arroyave-Hernández, C.; Regalado, C. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isozyme. *Phytochem.* **2003**, *62*, 5–11.

(20) Romero-Gómez, S.; Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendárez, B. E.; Mayorga Martínez, L.; Cervantes-Avilés, O.; Regalado, C. A novel putative peroxidase cDNA from turnip and analysis of the encoded protein sequence. *Plant Foods Human Nutr.* **2008**, *63*, 157–162.

(21) Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*; 3rd ed.; Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor, NY, 2001; Vol. 1, pp 1.116–1.118.

(22) Childs, R. E.; Bardsley, W. G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2-azinodi(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* **1975**, *145*, 93–103.

(23) Bradford, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

(24) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2004; pp 375–377.

(25) Sreerama, N.; Venyaminov, S. Y.; Woody, R. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 370–380.

(26) Ryan, B. J.; O'Fágáin, C. Effects of mutations in the helix G region of horseradish peroxidase. *Biochimie* **2008**, *90*, 1414–1421.

(27) Grigorenko, V.; Andreeva, I.; Börschers, T.; Spener, F.; Egorov, A. A genetically engineered fusion protein with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1134–1139.

(28) Ikononou, L.; Schneider, Y. J.; Agathos, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 1–20.

(29) Romero, L. V.; Targovnik, A. M.; Wolman, F. J.; Cascone, O.; Miranda, M. V. *Rachiplusia un* larva as a biofactory to achieve high level expression of horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* **2011**, DOI: 10.1007/s10529-011-0540-9.

(30) Doyle, W. A.; Smith, A. T. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and haem. *Biochem. J.* **1996**, *315*, 15–19.

(31) Dalton, D. A.; Díaz del Castillo, L.; Kahn, M. L.; Joyner, S. L.; Chatfield, J. M. Heterologous expression and characterization of soybean cytosolic ascorbate peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *328*, 1–8.

(32) Duarte-Vázquez, M. A.; García-Almendarez, B. E.; Regalado, C.; Whitaker, J. R. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L var. *esculenta* DC) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1574–1579.

(33) Duarte-Vázquez, M. A.; García-padilla, S.; García-Almendarez, B. E.; Whitaker, J. R.; Regalado, C. Broccoli processing wastes as a source of peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10396–10404.

(34) Singh, N.; Singh, J. A method for large scale purification of turnip peroxidase and its characterization. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2003**, *33*, 125–135.