



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la
República (PROPAC)
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Clonación y expresión de una isoperoxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe) en un sistema bacteriano.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Alejandra Medina Valle

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2009
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Clonación y expresión de una isoperoxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe) en un sistema bacteriano.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Q. en A. Alejandra Medina Valle

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

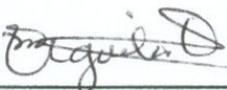
Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dra. Blanca García Almendárez
Secretario

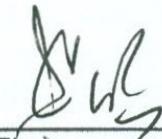
Dr. Sergio Romero Gómez
Vocal

Dr. Ramón Guevara González
Suplente

Dr. Andrés Cruz Hernández
Suplente



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



Firma



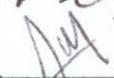
Firma



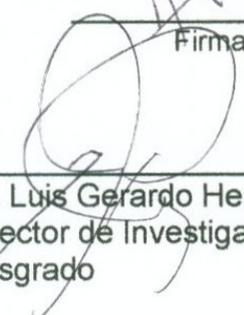
Firma



Firma



Firma



Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y
Posgrado

RESUMEN

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, utilizando peróxido de hidrógeno. Las peroxidasas de plantas (clase III), contienen un grupo hemo, dos átomos de calcio, glicosilaciones y puentes de cisteína en posiciones conservadas. Están involucradas en los procesos de lignificación, defensa contra ataques de patógenos, respuesta a heridas en los tejidos y en el crecimiento. Comercialmente, se utilizan en inmunoensayos, kits de análisis y degradación de compuestos fenólicos. La mayor parte de la producción mundial de peroxidasa se obtiene del rábano picante (*Armoracia rusticana*), el cual tiene baja disponibilidad en México por lo que una fuente alternativa es el nabo (*Brassica napus*). El objetivo de este trabajo fue clonar y expresar el gen de una peroxidasa de nabo en *Escherichia coli* y determinar algunas características bioquímicas de la proteína recombinante. Se extrajo RNA total de nabo de 5 semanas de edad, se sintetizó el cDNA y se amplificó en gen de peroxidasa (*BnPA*). La secuencia que codifica para la proteína madura se subclonó en el vector pGEM-T utilizando oligonucleótidos con sitios de restricción, y se obtuvo la secuencia nucleotídica. La secuencia de aminoácidos presentó tres diferencias con la secuencia reportada en NCBI con número de acceso AY423440. Posteriormente se clonó en el vector pET28a(+) y se expresó en *E. coli* (BL21) DE3. Las células se sometieron a tratamiento ultrasónico y la proteína recombinante (pl 4.6) fue purificada a partir de cuerpos de inclusión y solubilizándola después en urea 6 M. El rendimiento de peroxidasa recombinante fue de 0.44 mg BnPA/mg de proteína (10 mg/L). Finalmente fue plegada *in vitro* en medio con calcio, glutatión oxidado y hematina a pH 8. Su actividad enzimática se midió monitoreando la oxidación del ABTS y fue de 522 U/mg de proteína. La peroxidasa recombinante puede ser de importancia para la detoxificación de agua conteniendo compuestos fenólicos.

(Palabras clave: peroxidasa, expresión heteróloga, nabo.)

SUMMARY

Peroxidases catalyze the oxidation of a wide variety of substrates using hydrogen peroxide. Class III peroxidases, better known as plant peroxidases, have a prosthetic hemo group, two calcium atoms, glycosylation moiety and cystein bridges in conserved positions. They are involved in lignification process, defense against pathogen attack, wound response and plant growth. Peroxidases are commercially used in immunoassays, analysis and diagnostic kits, and degradation of phenolic compounds. Most of the peroxidase world production comes from horseradish (*Armoracia rusticana*) but it does not grow well in Mexico. Therefore, an alternative source is turnip (*Brassica napus*). To obtain larger amounts of peroxidase for its characterization and some other applications, it is necessary to express it in a host that yields high production of the recombinant enzyme. The aim of this study was the cloning and expression of a peroxidase gene from turnip in *Escherichia coli* and to determine some biochemical characteristics of the recombinant protein. In this study, we isolated total RNA from 5 weeks old turnip, and synthesized peroxidase cDNA and peroxidase gene *BnPA* was amplified. The mature protein sequence was subcloned in pGEM-T vector using primers with restriction sites and the nucleotide sequence was obtained. The amino acid sequence had three differences with the one reported in NCBI with accession number AY423440. *BnPA* was cloned into pET28a(+) vector and further expressed in *E. coli* (BL21) DE3. Cells were disrupted by sonication and the recombinant protein (pI 4.6) was purified from inclusion bodies and further solubilization in 6 M urea, yielding 0.44 mg of BnPA/mg of protein (10mg/L). It was folded *in vitro* with calcium, oxidized glutathione and hemin, at pH 8. The enzyme activity was 522 U/mg, which was measured using ABTS as substrate. Recombinant peroxidase may be important in the detoxification of water polluted with phenolic compounds.

(Key words: peroxidase, heterologous expression, turnip.)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico proporcionado durante el curso de la maestría.

Al Dr. Carlos Regalado por brindarme la confianza para formar parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Blanca García por su tutoría y guía para hacer posible este trabajo de tesis.

Al Dr. Sergio Romero por su apoyo, múltiples aportaciones y valiosa asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Andrés Cruz por su optimismo durante el curso de Biología Molecular y su asesoría para hacer mejoras este proyecto.

Al Dr. Ramón Guevara por su asesoría y contribuciones a este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología de Alimentos, Elda, Immer, Lolis, Norma, Selene, Juan Carlos, Fernando, Poncho, Martha por hacer las horas de trabajo menos tediosas.

A mis amigos Mota, Pablo, Ale Nivón, Angel, Luz, Lalo, George, Peco, Aida y Lily por su invaluable amistad y confianza en mí, que es un incentivo para seguir a seguir adelante.

A Fernando por su amor y apoyo.

A mis padres por haberme brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Indice	iv
Indice de cuadros	vii
Indice de figuras	viii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LA LITERATURA	3
2.1 Generalidades de las peroxidasas	3
2.2 Clasificación de las peroxidasas	3
2.2.1 Peroxidasas clase III	4
2.3 Estructura de las peroxidasas clase III	5
2.4 Ciclo catalítico de las peroxidasas clase III	10
2.5 Papel fisiológico de las peroxidasas	10
2.5.1 Biosíntesis de lignina y suberina	12
2.5.2 Catabolismo de ácido indolacético	12
2.5.3 Respuesta al estrés en plantas	14
2.5.4 Estrés por radiación UV en plantas	15
2.6 Fuentes y procesos de purificación de peroxidasas	15
2.6.1 Métodos convencionales de purificación de peroxidasas	16
2.7 Aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas	17
2.7.1 Degradación de colorantes industriales	17
2.7.2 Síntesis orgánica y polimérica	18
2.7.3 Remoción de compuestos fenólicos	18
2.7.4 Análisis y diagnóstico molecular	19
2.7.5 Terapia contra el cáncer	19
2.7.6 Otras aplicaciones	20

2.8 Herramientas para expresión de proteínas	21
2.8.1 Vector pGEM-T	21
2.8.2 Vector pET	22
2.8.3 Huésped de expresión <i>E. coli</i> (BL21) DE3	25
2.8.4 Expresión de genes inducidos por IPTG	25
2.9 Peroxidasas recombinantes	26
2.10 Sistemas de purificación de proteínas recombinantes	29
3. JUSTIFICACION	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos particulares	31
5. METODOLOGIA	32
5.1 Reactivos	32
5.2 Material biológico	33
5.3 Estrategia general	33
5.4 Obtención de la secuencia del cDNA de peroxidasa de nabo	34
5.4.1 Extracción de RNA total	34
5.4.2 Calidad e integridad de RNA total	35
5.4.3 Obtención del ORF de peroxidasa	35
5.4.4 Amplificación del cDNA	36
5.4.5 Construcción TOPO:: <i>BnPA</i>	37
5.4.6 Transformación de células competentes	38
5.4.7 Extracción de DNA plasmídico (miniprep)	38
5.5 Diseño de oligonucleótidos	39
5.6 Subclonación en el vector pGEM-T	40
5.7 Clonación en vector de expresión	42
5.7.1 Construcción pET:: <i>BnPA</i>	42
5.8 Expresión de <i>BnPA</i>	43
5.8.1 Solubilización de BnPA a partir de cuerpos de inclusión	44

5.9 Plegamiento de BnPA recombinante	45
5.10 Medición de actividad de peroxidasa	45
5.11 Estrategia para clonación de <i>BnPA</i> en vector de secreción	47
6 RESULTADOS Y DISCUSION	49
7. CONCLUSIONES	61
8. LITERATURA CITADA	62
ANEXOS	67

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Mezclas para la reacción de RT-PCR	36
2	Mezcla para reacción de ligación de <i>BnPA</i> con pGEM-T	41
3	Mezclas de gel separador y gel concentrador para SDS-PAGE	45
4	Características de RNA total	49
5	Homología de <i>BnPA</i> con otras peroxidasas	48

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura tridimensional de la isoperoxidasa C de rábano picante	8
2	Grupos funcionales de la isoperoxidasa C de rábano picante	9
3	Ciclos peroxidativo e hidrolítico de la peroxidasa	11
4	Monolignoles precursores de lignina	13
5	Reacción de formación de fenoxi-radicales a partir de alcohol coniferílico	13
6	Mapa del vector pGEM-T	22
7	Mapa del vector pET-28a(+)	24
8	Esquema del proceso de expresión por inducción con IPTG	26
9	Esquema de estrategia general	33
10	Electroforesis en gel de agarosa de RNA total de nabo de 5 semanas	49
11	Productos de la reacción de RT-PCR de RNA de nabo	50
12	Liberación del inserto de TOPO::BnPA	50
13	Secuencia de BnPA en TOPO	51
14	Análisis de transformantes positivas de pGEMT::BnPA	52
15	Producto de PCR de pGEMT::BnPA	53
16	Alineamiento de aminoácidos de BnPA con otras peroxidasas de plantas	54
17	Análisis de transformantes positivas de pET::BnPA	55

18	SDS-PAGE de la fracción soluble e insoluble de BnPA	56
19	SDS-PAGE de BnPA solubilizada en urea	56
20	Amplificación de <i>BnPA</i> a partir de TOPO:: <i>BnPA</i> con oligos pET22F y pET22R	60
21	Análisis de transformantes con TOPO2:: <i>BnPA</i>	60
22	Digestión de TOPO2:: <i>BnPA</i> con <i>EcoRI</i>	61

1. INTRODUCCIÓN

Las peroxidasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; han sido identificadas en microorganismos, animales y plantas. En las plantas, las peroxidasas participan en el proceso de lignificación y en los mecanismos de defensa de tejidos físicamente dañados o infectados. En la industria alimentaria, las peroxidasas ha sido muy usadas como un indicador de la eficacia del escaldado de vegetales, debido a están ampliamente distribuidas y presentan una estabilidad térmica relativamente alta.

Estas enzimas catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, utilizando peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. Esta cualidad hace a las peroxidasas enzimas útiles en un gran número de aplicaciones industriales y analíticas tales como degradación de tintes sintéticos, síntesis polimérica, remoción de compuestos fenólicos en aguas contaminadas, inmunoensayos (ELISA), biosensores y kits de análisis y diagnóstico (Regalado *et al.* 2004).

Las peroxidasas de plantas se dividen en varios grupos de acuerdo a su estructura y propiedades catalíticas; de estas, las designadas como peroxidasas de clase III, son glicoproteínas que tienen un grupo hemo y cuya actividad fue descrita por primera vez en 1855. Generalmente son codificadas por un gran número de genes parálogos; se han reportado 73 en *Arabidopsis thaliana* y 138 en arroz (Passardi *et al.*, 2004).

Alrededor del 90% de la producción mundial de peroxidasa se obtiene del rábano picante (*Armoracia rusticana L.*), sin embargo este vegetal no es producido en forma extensiva en nuestro país, por lo que varios investigadores se han dado a la tarea de buscar fuentes vegetales alternativas de peroxidasas. El nabo (*Brassica napus*) es un vegetal accesible en México y sus isoperoxidasas presentan características de termoestabilidad y actividad que las hacen atractivas

como reemplazo de la peroxidasa de rábano picante para varias aplicaciones (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001).

Desde principios de la década de los 90's se han desarrollado numerosos sistemas de expresión para la producción de peroxidasas recombinantes con el fin de elucidar la función específica de los grupos prostéticos, los residuos de aminoácidos y las glicosilaciones presentes en la enzima nativa (Veitch, 2004).

En el presente proyecto se pretende obtener la secuencia del cDNA de una isoperoxidasa de nabo, clonarla, expresarla en *E. coli*, llevar a cabo el plegamiento de la proteína in vitro y medir su actividad enzimática.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Generalidades de las peroxidasas

Las peroxidasas de plantas son proteínas que se encuentran en una gran variedad de frutas y vegetales; contribuyen a los cambios en sabor, textura, color y valor nutricional en alimentos tanto crudos como procesados. Las peroxidasas de plantas (EC 1.11.1.7) juegan un papel importante en mecanismos de protección en tejidos dañados o infectados, en la degradación de ácido indolacético durante la maduración y senescencia de frutas y vegetales, y en la síntesis de lignina. En la industria alimentaria, las peroxidasas de plantas son consideradas las enzimas más termoestables, y bajo un tratamiento térmico suave, pueden readquirir actividad durante el almacenamiento (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001).

Los puntos isoeléctricos de las peroxidasas difieren ampliamente aún cuando provengan de la misma fuente (Duarte-Vázquez *et al.*, 2007). En frutas y vegetales existe un amplio rango de isoperoxidasas con puntos isoeléctricos (pI) que van desde 3.5 hasta 10.0. En nabo, se han caracterizado peroxidasas básicas (pI 8.5), neutras (pI 7.2) y ácidas (pI ~2.5); todas ellas presentan actividades específicas mayores a aquellas reportadas en rábano picante (Duarte-Vázquez *et al.*, 2000, 2001, 2003).

La mayoría de las peroxidasas son hemo proteínas y contienen hierro (III) protoporfirina IX (ferriprotoporfirina IX), como grupo prostético. Tienen un peso molecular entre 30 y 150 KDa (Regalado *et al.*, 2004).

2.2 Clasificación de las peroxidasas

Las peroxidasas se han dividido en 3 grandes familias con base en la estructura y propiedades catalíticas: la primera consiste en peroxidasas

encontradas en animales, como la mieloperoxidasa, lactoperoxidasa, peroxidasa tiroidea, incluyendo una región parcial de la prostaglandina endoperoxidasa sintasa. La segunda familia consiste en peroxidasa-catalasas, quienes como su nombre lo indica, tienen actividad tanto catalasa como peroxidasa. La tercera familia, también conocida como peroxidasas de plantas, comprende las peroxidasas que contienen un grupo hemo. Las peroxidasas de esta familia se encuentran en plantas, hongos, bacterias y levaduras y se subdividen en tres clases de acuerdo con la secuencia de aminoácidos. La clase I comprende peroxidasas intracelulares que han sido encontradas en plantas, hongos y procariotas como la citocromo c peroxidasa de levaduras y la ascorbato peroxidasa. La clase II comprende las peroxidasas fúngicas extracelulares tales como manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa, las cuales están glicosiladas, tienen iones calcio, péptidos señal y puentes disulfuro. Finalmente la clase III consiste en peroxidasas extracelulares de plantas de las cuales, la más estudiada es la isoperoxidasa C de rábano picante, abreviada como HRPC (Passardi *et al.*, 2007).

2.2.1 Peroxidasas de clase III

Actualmente se sabe que el genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene al menos 73 genes que codifican para peroxidasas clase III; de éstos, 71 codifican para enzimas similares a la HRP (Wellinder *et al.*, 2002). Debido a esto, *A. thaliana* fue utilizada por Wellinder (2003) como base para analizar la relación entre las diferentes peroxidasas clase III y su evolución. La conclusión de este estudio fue que dichas peroxidasas surgieron cuando las plantas colonizaron la tierra ya que no se encontraron peroxidasas en algas (Duroux y Wellinder, 2003).

Las peroxidasas clase III se caracterizan por tener dos iones calcio (Ca^{2+}), cuatro puentes disulfuro en posiciones conservadas, un péptido señal N-terminal para su excreción y α -hélices extra las cuales están involucradas en el acceso al grupo hemo. La posición y la identidad de los residuos de aminoácidos claves junto con el tamaño de las proteínas está altamente conservados entre los diferentes genes ortólogos y parálogos reportados (Regalado *et al.*, 2004; Passardi *et al.*,

2007). Además, se ha reportado que contienen de 1 a 8 cadenas de oligosacáridos, lo que puede representar del 2-25% de su peso. Los sitios de glicosilación se encuentran en secuencias consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Sin embargo, los sitios de glicosilación potencial no están altamente conservados entre las peroxidasas de plantas. Se ha demostrado que la glicosilación contribuye a la alta estabilidad de éstas ya que impiden que la enzima sea degradada antes de ser secretada. La peroxidasa catiónica de cacahuete (cPrx) fue la primera peroxidasa de planta cuya estructura tridimensional se elucidó con los sitios de glicosilación intactos. (Welinder y Mazza, 1976; van Huystee *et al.*, 2002).

2.3 Estructura de las peroxidasas clase III

En general, las peroxidasas de plantas consisten de alrededor de 300 aminoácidos y contienen ferriprotoporfirina IX (protohemina) como grupo prostético. Cuatro de los seis enlaces de coordinación del hierro interactúan con los nitrógenos del anillo pirrólico.

La comparación de la HRP con otras peroxidasas de plantas muestra una homología del 49% con nabo, 50% con tabaco y 36% con papa (Wong, 1995). La estructura cristalina de la HRPC fue predicha inicialmente a partir de su comparación con la peroxidasa citocromo c, pero fue en 1997 cuando se obtuvo su estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos X (Figura 1). Este estudio reveló que la enzima consiste en 10 α -hélices (A-J) y se pliega en dos dominios entre los cuales se localiza el grupo hemo. El dominio I o proximal, está formado por hélices A, B, C y D (residuos 1-144) y un "brazo" C-terminal, mientras que el dominio II o distal, lo forman las hélices F, G, H, I e J (residuos 158-289) además de dos hojas β antiparalelas. Los ocho sitios de glicosilación se localizan en los giros cerca de la superficie de la molécula (Dunford, 1999; Veitch, 2004).

Las peroxididasas clase III se caracterizan por tener un inserto largo de residuos de aminoácidos entre las hélices F y G. Esta región forma parte importante del canal por el que accede el sustrato al sitio activo. En la HRPC el inserto es de 34 residuos pero en la peroxidasa de cacahuate es de 27, lo que indica que existe variabilidad en la estructura de esta región aún cuando se trata de peroxididasas pertenecientes a la misma clase. Además, los residuos 194-206 son lineales en HRPC, pero helicoidales en la peroxidasa de nabo. No obstante, la estructura cristalina de la HRPC se ha tomado como modelo para otras peroxididasas de plantas (Gajhede *et al.*, 1997).

Uno de los dos átomos de calcio se encuentra en el sitio de unión de alta afinidad y es responsable de mantener la estructura de la proteína alrededor del grupo hemo. Estudios sobre la enzima recombinante sugieren que Ca^{2+} es esencial para el correcto plegamiento y actividad, ya que la remoción de éste ión provoca cambios en la estructura hemo distal y proximal, lo cual afecta la constante del proceso de reducción del compuesto II para regenerar la enzima nativa ($\text{HRP-II} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{AH}'$), cambio que resulta en un decremento en la actividad enzimática (Morawski *et al.*, 2000).

El calcio es importante para la estabilidad de la peroxidasa ácida de nabo ya que ésta, después de ser desnaturalizada por calor es capaz de recuperar completamente su actividad cuando se adiciona un exceso de Ca^{2+} . Además, los dominios de unión a Ca^{2+} son de suma importancia durante la reactivación de la enzima desnaturalizada por calor (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003).

El calcio de algunas peroxididasas como la de cacahuate, puede perderse cuando se disuelven en medio acuoso, lo que lleva a una alteración en el sitio activo y la interacción enzima-sustrato se vuelve difícil o hasta imposible. Por esto, se recomienda que las soluciones de peroxidasa contengan una concentración de calcio de por lo menos 3 mM (van Huystee *et al.*, 2002).

Algunos residuos de aminoácidos poseen importantes funciones estructurales y/o están involucrados en el proceso catalítico, como es el caso del residuo proximal de histidina que interactúa con el grupo hemo (His170 en HRP), así como la arginina adyacente y el hidrógeno del ácido aspártico unido a la histidina proximal. La His distal junto con un residuo de Arg participan en el rompimiento de H_2O_2 durante el ciclo catalítico. Ambos residuos, distal y proximal de His están presentes en todas las secuencias de peroxidasas con grupo hemo que se conocen, incluyendo las proteínas globulares hemoglobina y mioglobina.

Debido a que sólo se han obtenido dos secuencias de las peroxidasas de plantas que contienen His en la estructura del sitio activo, dichas secuencias fueron comparadas con las pertenecientes a las proteínas globulares. La primera de éstas secuencias tiene cuatro residuos conservados en común con la secuencia proximal de las proteínas globulares -Leu-X-X-Leu-Ser-X-X-His-. La segunda secuencia consta de un patrón hidrofóbico y dos residuos similares a la secuencia distal de proteínas globulares -Leu-X-X-His-. Estos patrones muestran residuos idénticos espaciados por tres o cuatro residuos resultando en estructuras helicoidales similares a la cadena peptídica que se une al grupo hemo tanto en las peroxidasas de plantas, como en las globulares (Welinder, 1985). Algunas peroxidasas tienen un pre-peptido en el extremo C-terminal que puede dirigirlas hacia las vacuolas (Dunford, 1999; Costa et al., 2007).

En el rábano picante se ha reportado la existencia de 42 isoperoxidasas, de las cuales la isoperoxidasa C (HRPC) es la más estudiada; tiene un pI de 8.9, consta de 308 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 34,520 Da. Contiene un grupo prostético férrico hemo el cual se encuentra coordinado con grupo imidazol del residuo His170 mediante la quinta posición del hierro (III), y con una molécula de agua en la sexta posición (Figura 2) (Campa, 1991). Contiene además dos átomos de calcio por molécula, cuatro puentes disulfuro altamente conservados (Cys11-Cys91, Cys44-Cys49, Cys97-Cys301 y Cys177-Cys209) y nueve sitios de glicosilación, de los cuales ocho se encuentran ocupados, lo que

representa aproximadamente el 21% de su peso. Los carbohidratos consisten principalmente en N-acetilglucosamina, manosa, fucosa y xilosa. Las glicosilaciones varían entre las isoperoxidasas de nabo, ya que de acuerdo a la reacción fenol-ácido sulfúrico, una peroxidasa neutra contiene 9.1% de carbohidratos y una ácida contiene 18% (Duarte-Vázquez *et al.*, 2001; 2003). La glicosilación afecta la estabilidad cinética pero no así la estabilidad termodinámica (Wong, 1995; Veitch, 2004).

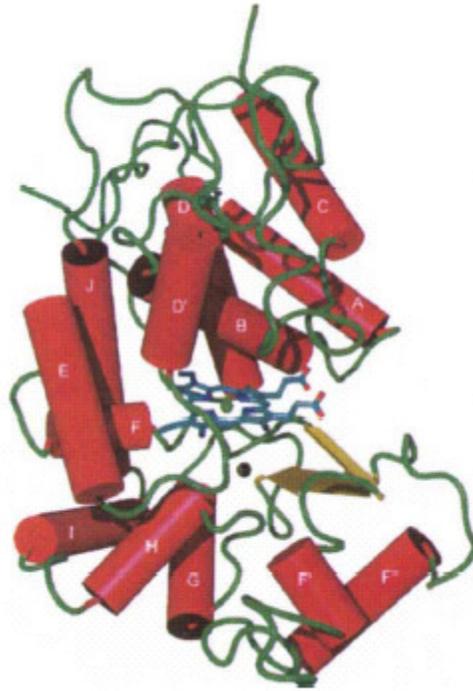
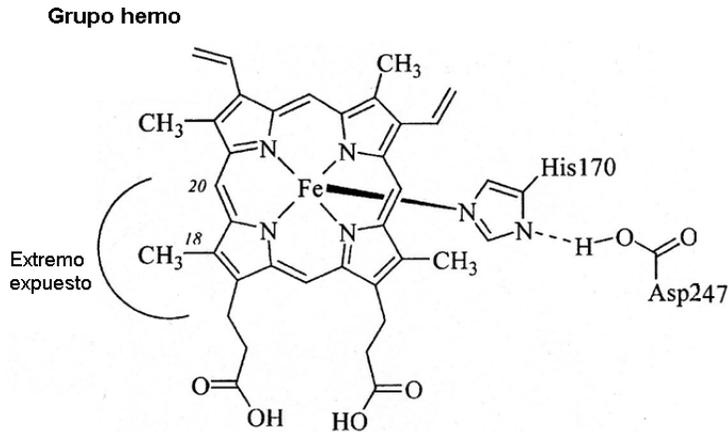


Figura 1. Estructura tridimensional de la isoperoxidasa C de rábano picante. Los cilindros A-J representan α -hélices, las flechas amarillas representan hojas β (Gajhede *et al.*, 1997).

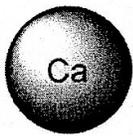


- His 170 forma un enlace coordinado con el átomo Fe.
- La cadena carboxilada de Asp247 ayuda a mantener el carácter imidazol del anillo de His170
- Los sustratos aromáticos son oxidados en el extremo expuesto pero no se unen al Fe.

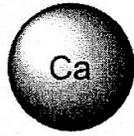
Calcio

Donadores de O-distal

Donadores de O-proximal



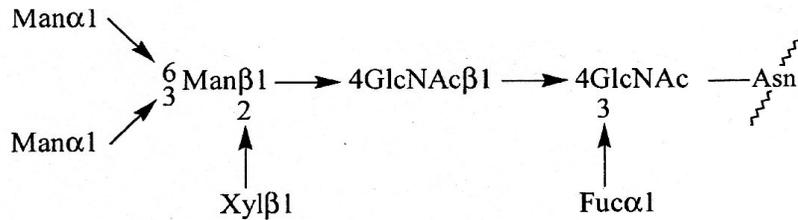
Asp43, Asp50, Ser 52
(cadena lateral)
Asp43, Val46, Gly48
(carbonilo)



Thr171, Asp222,
Thr225, Asp 230
(cadena lateral)
Thr171, Thr225,
Ile228 (carbonilo)

En la enzima
sin calcio, la
actividad
decrece 40%

Carbohidratos



Los sitios de glicosilación localizan en regiones curvas de la estructura, en Asn13, Asn57, Asn158, Asn186, Asn198, Asn214, Asn255 y Asn268.

Aminoácidos	Función
Arg38	Esencial en la formación y estabilización de Col, unión y estabilización de ligandos y sustratos aromáticos.
Phe41	Evita que el sustrato accese al oxígeno del grupo hemo de Col.
His42	Esencial en la formación de Col (acepta protón de H ₂ O ₂), estabilización de ligandos y sustratos aromáticos.
Asn70	Mantiene basicidad de la cadena lateral de His42 mediante la unión Asn70-His42.
Pro139	Forma parte del motivo estructural conservado: Pro-X-Pro.

Figura 2. Características de la isoperoxidasa C de rábano picante.

2.4 Ciclo catalítico de las peroxidasas clase III.

Las peroxidasas clase III catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, utilizando H_2O_2 u otros peróxidos como aceptores de electrones. El ciclo catalítico de la peroxidasa involucra distintas formas de enzimas intermediarias. En el paso inicial la enzima férrica nativa es oxidada por el peróxido de hidrógeno para formar un intermediario inestable llamado compuesto I (Co I), el cual tiene una estructura hemo de $Fe^{IV}=O$ -radical π -catiónico de porfirina, y la consecuente reducción del peróxido a agua. Co I entonces oxida al sustrato donador de electrones para producir el compuesto II (Co II) (misma estructura oxiferril, pero protonada), liberando un radical libre. Co II es posteriormente reducido por una segunda molécula de sustrato regenerando así el hierro (III) de la enzima nativa y produciendo otro radical libre (Regalado *et al.*, 2004) (Figura 3).

Mientras las reacciones mencionadas dominan el proceso, un número de reacciones laterales pueden llevarse a cabo. Una proporción significativa de Co II pueden ser oxidado por H_2O_2 para formar un compuesto III (Co III) en el ciclo hidrolítico (Figura 4). Co I puede también reaccionar con H_2O_2 y producir una forma inactiva llamada verdohemoproteína (P-670). Estas dos reacciones se observan usualmente a altas concentraciones de H_2O_2 . Cabe mencionar que algunas peroxidasas, como las aisladas de la palma, muestran gran estabilidad en presencia de peróxido de hidrógeno (Duarte-Vázquez *et al.*, 2007).

2.5 Papel fisiológico de las peroxidasas

Las peroxidasas se encuentran en la pared celular y vacuolas y están implicadas en muchos procesos fisiológicos de las plantas. Juegan un papel importante en la biosíntesis de la pared celular secundaria mediante la polimerización de alcohol cinamílico para formar lignina y formando entrecruzamientos rígidos entre celulosa, pectina, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y lignina. Las peroxidasas son importantes en la cicatrización del

tejido vegetal donde forman una barrera impermeable alrededor de la herida mediante la deposición de compuestos alifáticos y aromáticos. (Passardi *et al.*, 2005).

Las peroxidadas también están involucradas en el catabolismo de auxinas (hormonas reguladoras del crecimiento de la planta), en la defensa contra ataque de patógenos, indolacético y en la respuesta a diferentes condiciones de estrés (Lagrimini *et al.*, 1987; Duarte-Vázquez *et al.*, 2007). La mayoría de las plantas superiores poseen numerosas isoenzimas de peroxidasa cuyo patrón de expresión es específico del tejido, regulado a través del desarrollo e influenciado por factores ambientales (Lagrimini *et al.*, 1987).

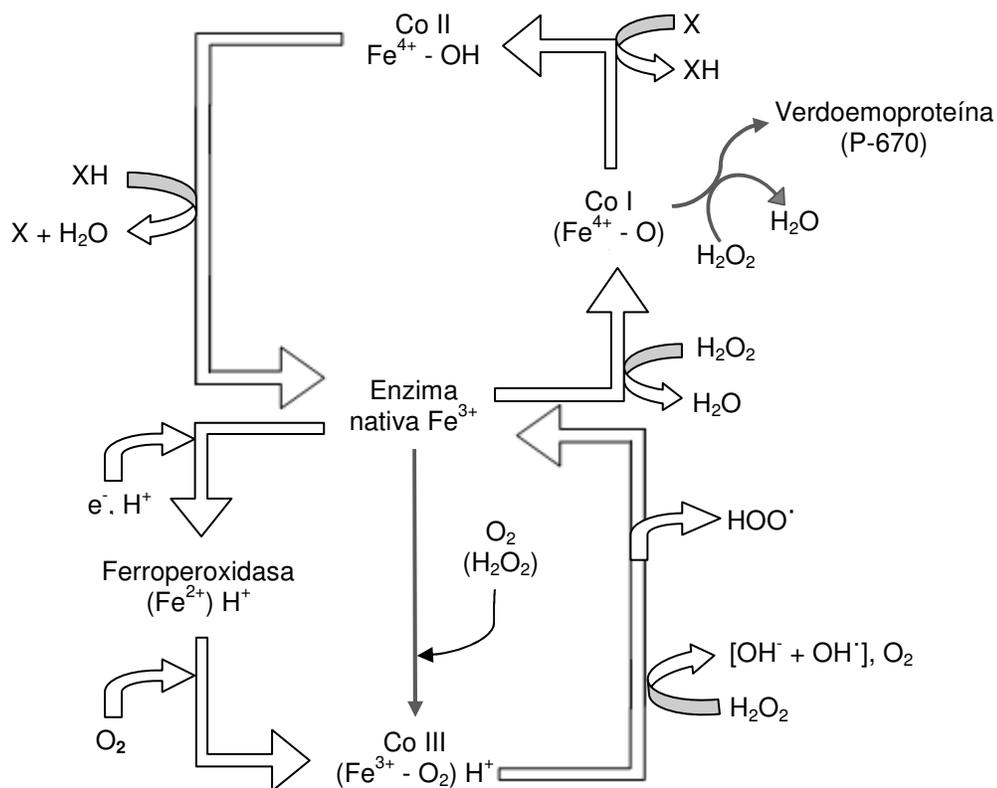


Figura 3. Ciclos peroxidativo e hidrolítico de la peroxidasa (Campa, 1991).

2.5.1 Biosíntesis de lignina y suberina

La rigidez de la pared celular es el resultado del entrecruzamiento de varios compuestos, proceso mediado por peroxidadas. Éstas tienen la habilidad de llevar a cabo procesos de enlazamiento intermolecular uniendo varios componentes de la pared celular como celulosa, xilanos y pectinas. La suberina es sintetizada en la parte endodérmica y exodérmica de la raíz, donde refuerza la pared celular y contribuye al control del movimiento de agua y se forma por el entrecruzamiento de monómeros fenólicos. La lignina por su parte es un heteropolímero tridimensional y amorfo sintetizado en las células como parte del sistema de transporte (Østergaard *et al.*, 2000; Veitch, 2004).

Las peroxidadas juegan un papel importante en la biosíntesis de la pared celular, ya que promueven la peroxidación de monolignoles: alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 4), los cuales se condensan para formar dilignoles y finalmente lignina (Figura 5). Estas reacciones son catalizadas principalmente por isoperoxidasas aniónicas localizadas en la pared celular, ya que éstas tienen gran afinidad por los precursores de lignina. El peróxido necesario para el proceso de lignificación proviene de la reducción del O_2 hasta H_2O_2 a expensas de NADH, reacción catalizada también por peroxidadas. (Campa, 1991).

Utilizando H_2O_2 como oxidante, la peroxidasa puede generar radicales fenoxi-monolignol que forman polímeros de lignina espontáneamente (Duarte-Vázquez *et al.*, 2007).

2.5.2 Catabolismo de ácido indolacético

Se considera que la peroxidasa es la principal enzima involucrada en el catabolismo del ácido indol-3-acético (AIA), hormona que se encarga de regular el crecimiento y desarrollo de la planta. Se sabe que la peroxidasa de rábano es capaz de oxidar el AIA, reacción que inicia con la producción del catión radical de indol-3-acetato.

Las plantas de tabaco mutadas que contienen el gen silenciado de peroxidasa crecen más altas y florecen antes que aquellas no transformadas, mientras que plantas mutadas que sobreproducen peroxidasa tienden a crecer más lentamente y florecer más tardíamente que el control. Sin embargo, no existe un consenso sobre el mecanismo de reacción debido a que se trata de numerosas y complicadas reacciones de radicales (Lagrimini *et al.*, 1997).

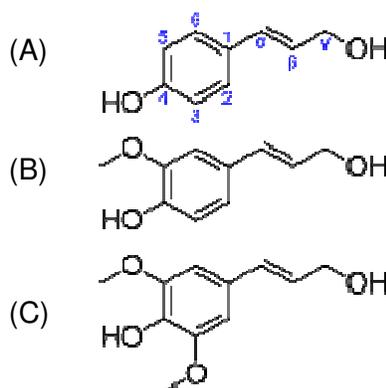


Figura 4. Monolignoles precursores de lignina. A) alcohol p-cumarílico, B) alcohol coniferílico, C) alcohol sinapílico.

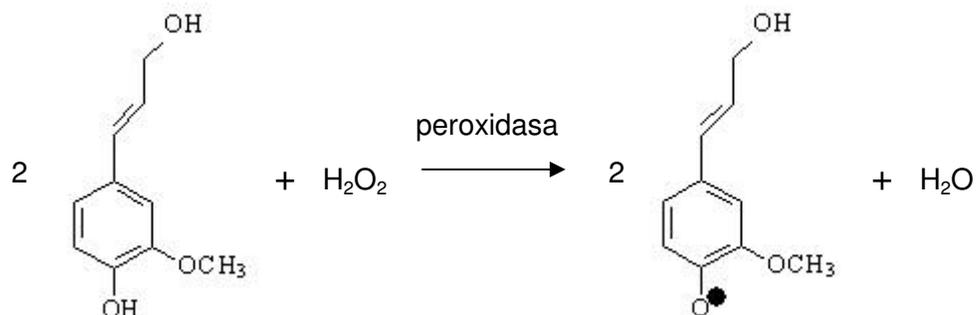


Figura 5. Reacción de formación de fenoxi-radicales a partir de alcohol coniferílico (Campa, 1991).

2.5.3 Respuesta al estrés en plantas

En la mayoría de las plantas, los niveles de expresión de peroxidasas se incrementan como respuesta a condiciones de estrés tales como ozono, radiación, heridas, infecciones, salinidad y senescencia (Campa, 1991).

La composición de la pared celular puede ser alterada por estímulos ambientales, o sólo como parte del desarrollo normal de la pared celular durante el crecimiento, diferenciación y senescencia. Las peroxidasas responden rápidamente a varios agentes productores de estrés y se unen al proceso de lignificación, controlando de esta manera la disponibilidad de H₂O₂ en la pared celular, lo cual es un pre-requisito para el entrecruzamiento de grupos fenólicos.

Las peroxidasas participan en los mecanismos de defensa de las plantas de la siguiente manera: 1) Reforzamiento de las barreras físicas de la pared celular, como la lignina, suberina, entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular y dimerización de ésteres de ferulato; 2) Aumento de la producción de especies de oxígeno reactivo que actúan como señal reguladora y agentes antimicrobianos; 3) Aumento en la producción de fitoalexinas (que presentan actividad antimicrobiana).

Dowd y Johnson (2005), investigaron la relación entre una isoperoxidasa catiónica con las respuestas al estrés en plantas de maíz. Se observó el aumento de expresión en plantas nativas e híbridas a las que les fue inducido daño mecánico, estrés por calor o se inocularon con bacterias (*Bacillus subtilis*) u hongos (*Fusarium proliferatum*). Por otro lado, Kumar *et al.*, (2007) observaron que los niveles de peroxidasa en *Catharanthus roseus* aumentaban como resultado de heridas, frío y metil jasmonato (hormona que regula los mecanismos de respuesta a estrés). Sin embargo, en el caso de las heridas y el frío, no se observó un patrón de aumento o decremento de la expresión de la enzima con respecto al tiempo.

2.5.4 Estrés por radiación UV en plantas

La radiación ultravioleta UV-B (280-320 nm) produce estrés oxidativo incrementando las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), anión superóxido (O_2^-), H_2O_2 y radicales hidróxido (OH^\cdot), los cuales difunden a través de la membrana biológica causando daño celular.

Las plantas cuentan con un eficiente sistema enzimático de defensa para contrarrestar el estrés oxidativo, el cual opera en forma secuencial y simultánea con la superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y ascorbato peroxidasa. La superóxido dismutasa cataliza la desproporción de dos radicales O_2 a H_2O_2 y O_2 . H_2O_2 es eliminado mediante enzimas antioxidantes tales como catalasa y peroxidasa. De esta manera, la peroxidasa contribuye a la tolerancia de luz UV removiendo H_2O_2 . El estrés oxidativo generador de ROS produce daño al tejido cuando se exponen plantas a metales pesados (Fe, Cd), compuestos orgánicos y contaminantes del aire como O_3 y SO_2 (Duarte-Vázquez *et al.*, 2007).

2.6 Fuentes y procesos de purificación de peroxidasas

En general, las peroxidasas de plantas presentan varias formas de isoenzimas que difieren en sus propiedades moleculares y catalíticas. Estas características son las responsables de la dificultad de asignar una función *in vivo* para una isoenzima en particular ya que el número de isoenzimas detectables depende de la reacción utilizada para identificarlas (Campa, 1991; Veitch, 2004).

Diferentes isoperoxidasas tienen diferente especificidad por el sustrato, termoestabilidad y localización en la célula y por ende realizan diferentes funciones específicas. En células vegetales, la peroxidasa se localiza principalmente en la pared celular, vacuolas, organelos de transporte y ribosomas ligados a la membrana (Campa, 1991).

Las peroxididasas que se encuentran en plantas pertenecientes a la familia *Cruciferae* se han aislado y caracterizado a partir de diferentes partes de la planta de la planta como frutas, hojas, tubérculo y granos. Plantas como la col de Bruselas, brócoli, raíces de nabo y rábano picante son extensamente producidos en Norte América y México y han sido probados como fuentes de peroxidasa aunque actualmente la mayor fuente de peroxidasa comercialmente disponible es la raíz de rábano picante.

Duarte-Vázquez *et al.* (2001) purificaron y caracterizaron parcialmente una peroxidasa neutra (pI 7.2) de raíces de nabo. Esta enzima mostró alta actividad específica (1930 unidades ABTS/mg) y una alta eficiencia catalítica ($500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), propiedades que hacen a la peroxidasa neutra de nabo una enzima con alto potencial como alternativa a la peroxidasa de rábano picante.

2.6.1 Métodos convencionales de purificación de peroxididasas.

A partir de la raíz de rábano picante se han aislado quince diferentes isoperoxidasas mediante métodos clásicos de purificación de proteínas, pero se han detectado un mayor número de isoperoxidasas utilizando enfoque isoeléctrico (Veitch, 2004).

Una limitación importante del uso de peroxididasas es su alto costo de producción. Se estima que el proceso de bioseparación representa el 50-80% del costo total de producción. Se han probado métodos más económicos tales como, precipitación con sulfato de amonio, extracción líquido-líquido, extracción por micelas inversas, extracción acuosa de dos fases y cromatografía de afinidad a membrana, en la que se emplea concanavalina unida covalentemente a una membrana de celulosa. Se han utilizado variantes de los últimos cuatro métodos de manera que puedan ser empleados en la purificación de peroxididasas a gran escala (Duarte-Vázquez *et al.*, 2007).

Singh y Singh (2003) utilizaron la partición de tres fases como método de purificación a gran escala de una peroxidasa catiónica de nabo (pI 7.2) la cual mostró una buena actividad (512 U/mg de peroxidasa, considerando que 1U = cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μmol de H_2O_2 en un minuto, 27°C) Este método combina la precipitación con sales $[(\text{NH}_2)_3\text{SO}_4]$, precipitación con solventes (butanol) y cromatografía de afinidad a metales (Cu^{2+}).

2.7 Aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas

Gracias a su capacidad oxidativa, las peroxidasas pueden ser utilizadas como sustitutos de los químicos oxidantes utilizados actualmente en muchas áreas de la industria.

2.7.1 Degradación de colorantes industriales

Los tintes son utilizados para la imprenta de papel, fotografías a color, coloración de telas y como aditivos en productos derivados del petróleo. Se estima que hay más de 10,000 tintes disponibles en el mercado con una producción de más de 7×10^5 toneladas anuales. Sin embargo, alrededor del 10-15% de los tintes sintéticos son desechados a los efluentes industriales causando problemas ambientales. Los métodos disponibles actualmente como oxidación química, osmosis inversa y adsorción son altamente eficientes pero presentan desventajas como alto costo, aplicación limitada, alto requerimiento de energía y producción de subproductos tóxicos. Es por esto que surge un creciente interés en el uso de degradación microbiana de tintes ya que es un proceso menos costoso y menos peligroso. Enzimas tales como lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa se han utilizado para la decoloración de compuestos azo como el anaranjado II. Se sabe que la peroxidasa de rábano degrada compuestos orgánicos de tipo fenólico (Regalado *et al.*, 2004).

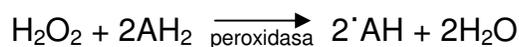
2.7.2 Síntesis orgánica y polimérica

Los radicales libres producidos por la catálisis de la peroxidasa pueden participar en diferentes reacciones post-enzimáticas. Se ha estudiado la polimerización oxidativa de compuestos aromáticos mediada por oxidoreductasas para crear nuevos polímeros funcionales. La peroxidasa de rábano picante se ha utilizado para polimerizar compuestos fenólicos y aminas aromáticas. La producción de polímeros conductores es de especial interés debido a su amplio campo de aplicación, incluyendo protección contra la corrosión, pantalla óptica, diodos emisores de luz, etc. (Regalado *et al.*, 2004).

2.7.3 Remoción de compuestos fenólicos

Los compuestos aromáticos como los fenoles y sus derivados son una clase importante de contaminantes en agua de desecho de un gran número de industrias alimentarias y químicas. Los fenoles son conocidos por ser tóxicos e incluso carcinógenos que pueden acumularse en la cadena alimenticia, razón por la cual deben ser removidos de las aguas residuales (Miland *et al.*, 1996).

En presencia de peróxido de hidrógeno, quien actúa como aceptor de electrones, la peroxidasa puede catalizar la polimerización oxidativa de fenoles, anilinas y otros compuestos aromáticos para producir oligómeros insolubles los cuales pueden ser entonces removidos mediante sedimentación o filtración. Una molécula de peroxidasa es capaz de remover aproximadamente 10^3 moléculas de fenol (Miland *et al.*, 1996). La reacción de polimerización puede escribirse como sigue:



La mayoría de los reportes sobre destoxificación de aguas residuales contaminadas con fenoles, cresoles y fenoles clorados, han utilizado peroxidasa de rábano picante nativa y modificada, aunque también se han usado peroxidasa de soya y de nabo como alternativas.

Duarte-Vázquez *et al.* (2003), estudiaron la eficiencia de peroxidasa extraída de raíces de nabo para remover diferentes compuestos fenólicos: fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol, *o*-cresol, *m*-cresol, 2,4-diclorofenol y bisfenol. Al menos 85% de éstos compuestos fueron removidos en un rango de pH de 4 a 8 con óptimo entre 5 y 7.

2.7.4 Análisis y diagnóstico molecular

Gracias a la habilidad de la peroxidasa para producir productos coloreados a bajas concentraciones y su buena estabilidad, es ideal para preparaciones de anticuerpos conjugados con enzimas su aplicación en kits de diagnóstico, por ejemplo, la determinación de colesterol. Para este fin, se desarrolló un método preciso, selectivo y rápido, en el cual el éster de colesterol es hidrolizado a ácidos grasos libres y colesterol, quien a su vez es oxidado a colesteno y H₂O₂. H₂O₂ es determinado usando peroxidasa de rábano picante (Regalado *et al.*, 2004). HRP es la enzima más comúnmente utilizada en aplicaciones analíticas; pero también las peroxidases de otras fuentes parecen ser una buena alternativa.

2.7.5 Terapia contra el cáncer

Dos alcaloides, vinblastina y vincristina son utilizados como medicamentos en quimioterapia. Estos compuestos se producen en los tejidos de las hojas de las plantas mediante una ruta biosintética que emplea más de 20 enzimas. Una de las etapas de esta ruta es la unión entre catarantina y vindolina para producir a-3',4'-anidrovinblastina, reacción que es catalizada tanto por HRPC como por una peroxidasa de *Catharanthus roseus*. Se ha reportado además que la ruta biosintética es inducida mediante estrés en la planta (Kumar *et al.*, 2007, Costa *et al.*, 2008).

El uso del ácido indolacético (IAA) y HRPC en conjunto tiene potencial aplicación en la terapia contra el cáncer. Se ha observado que el IAA es citotóxico

en células de mamífero, incluyendo células tumorales, en presencia de HRPC. El mecanismo primario de reacción involucra al 3-metilen-2-oxindol, un conocido producto de la reacción entre HRPC y IAA que muestra gran reactividad con nucleófilos celulares tales como el glutatión y los grupos tiol de las proteínas (Veitch, 2004).

2.7.6 Otras aplicaciones

Los hongos de putrefacción blanca pueden atacar la lignina y simultáneamente degradar componentes de la madera hasta mineralizarlos en dióxido de carbono y agua. Esta capacidad se aprovecha en la técnica de biopulpeo, que es un proceso empleado en la industria del papel en el que las enzimas extracelulares (hidrolíticas y oxidativas) producidas por un hongo de pudrición blanca permanece adsorbido en la madera degradando lignina. Después del proceso de pulpeo, aproximadamente el 10% de la lignina aparece como lignina modificada quien es responsable del color café característico. Esta lignina modificada puede ser degradada enzimáticamente por peroxidasas como manganeso peroxidasa, lacasa y lignina peroxidasa de *Phlebia* sp., *Phanerochaete chrisosporium*, *Polyporus* sp. y *Rhizopus* sp (Regalado *et al.*, 2004).

Los electrodos a base de peroxidasa, comúnmente llamados biosensores, son ampliamente utilizados en sistemas analíticos para determinación de H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos, en donde el electrodo actúa como donador de electrones. Para estas determinaciones es necesario que la peroxidasa esté en contacto directo con el electrodo, sin embargo, las glicosilaciones de la enzima pueden interferir, por lo que lo ideal es contar con una peroxidasa con bajo o nulo nivel de glicosilación. En general, los biosensores utilizan la HRPC pero también se han desarrollado electrodos base de peroxidasa de tabaco inmovilizada mediante adsorción en grafito. Éste biosensor mostró mayor estabilidad a cambios de pH y estabilidad al H₂O₂ (Gazaryan *et al.*, 2004).

En el ámbito de los inmunoensayos, la prueba de ELISA (análisis por inmuno-adsorbente unido a enzima) es muy utilizada y está diseñada para detectar antígenos o anticuerpos mediante la producción de una enzima que produce un color. La cantidad de color producido es proporcional a la cantidad de antígeno presente. La enzima reportera es comúnmente peroxidasa de rábano. La prueba de ELISA tiene las ventajas de ser simple, económica y confiable (Regalado *et al.*, 2004).

Las teaflavinas y tearubiginas son los pigmentos mayoritarios en el te negro y son producidos por la oxidación y polimerización de catequinas, proceso mediado por peroxidasas durante el proceso de fermentación del te (Sang *et al.*, 2004).

Uno de los síntomas de la senescencia es la pérdida del color verde causada por la degradación de clorofila. La peroxidasa está involucrada en dicho proceso, donde oxida los compuestos fenólicos con peróxido de hidrógeno y forma un radical fenoxi el cual oxida la clorofila produciendo compuestos incoloros de bajo peso molecular mediante la formación de C13²-hidroxiclorofila *a*, un catabolito fluorescente de la clorofila. La degradación de clorofila ocurre en los cloroplastos y/o en la vacuola (Yamauchi *et al.*, 2004.)

2.8 Herramientas para expresión de proteínas

Para el análisis de expresión de proteínas es necesario contar con requisitos como vectores de expresión, células competentes adecuadas, un sistema de inducción y el gen o genes a expresar.

2.8.1 Vector pGEM-T

El vector pGEM-T es un sistema conveniente para clonación de productos de PCR ya que mejora la eficiencia de la ligación evitando la recircularización del vector y cuenta con un sitio de ligación compatible con productos de la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) generados por polimerasas termoestables ya que éstas adicionan una sola adenina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados.

pGEM-T contiene los promotores T7 y SP6 en los extremos de una región de clonación múltiple dentro de la región que codifica para la enzima β -galactosidasa. La interrupción de la secuencia del péptido de la β -galactosidasa permite que las clonas recombinantes sean identificadas mediante su color en placas indicadoras. La región de clonación múltiple está flanqueada por sitios de restricción para las enzimas *EcoR*I, *Bst*ZI y *Not*I (Figura 2.6).

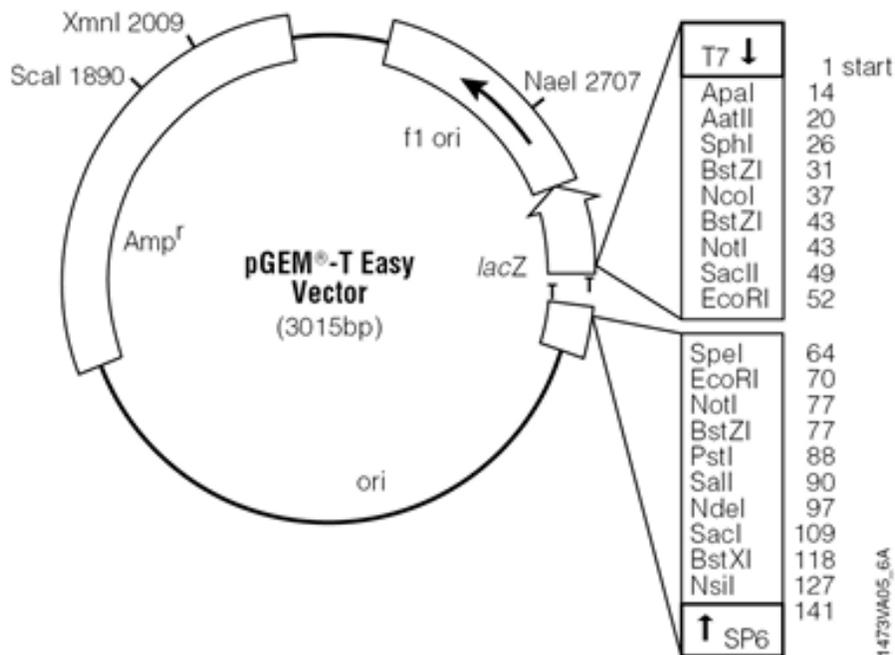


Figura 6. Mapa del vector pGEM-T (Promega, 2006).

2.8.2 Vector pET

La elección del vector y huésped de expresión pueden incrementar significativamente la actividad y la cantidad de la proteína presente en la fracción

soluble. Un vector puede aumentar la solubilidad de dicha proteína en una de tres maneras: 1) proveer un polipéptido que sea altamente soluble, 2) proveer una enzima que catalice la formación del enlace disulfuro, o 3) proveer una secuencia señal para la translocación al espacio periplásmico (Sambrook y Russell, 2001).

Los vectores pET fueron originalmente contruidos por Studier *et al.* (1990), cuentan con genes de resistencia a ampicilina y/o kanamicina y permiten una expresión de genes foráneos regulados por el fuerte promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (Figura 7) (Sambrook y Russell, 2001).

Los vectores más recientes la serie de pET ofrecen características mejoradas que facilitan la clonación, detección y purificación de proteínas. Los genes de interés son clonados en plásmidos pET bajo el control del promotor fuerte T7 (Novagen, 2006). Una vez que se ha considerado la aplicación y la estrategia de clonación, se debe determinar la localización celular y la solubilidad de la proteína. Se sabe que la peroxidasa recombinante expresada en *E. coli* forma agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (Smith *et al.*, 1990; Gazaryan *et al.*, 1994; Hushpalian *et al.*, 2003)

Los cuerpos de inclusión pueden ser una ventaja para la purificación porque 1) son fácilmente aislados por centrifugación para obtener proteína altamente concentrada y relativamente pura, y 2) la formación de cuerpos de inclusión protege a la proteína del ataque proteolítico. Además, las proteínas tóxicas no inhibirían el crecimiento celular ya que se encuentran en su forma inactiva dentro de los cuerpos de inclusión. Sin embargo, en muchas aplicaciones es deseable expresar proteínas en su forma soluble y activa (Sambrook y Russell, 2001).

En general, las condiciones que disminuyen la tasa de síntesis de proteínas, tales como bajas temperaturas de inducción o crecimiento en medios de cultivo mínimos, tienden a incrementar el porcentaje de proteína producida en forma soluble (Novagen, 2006).

2.8.3 Huésped de expresión *E. coli* (BL21) DE3

La designación DE3 de las cepas de *Escherichia coli*, indica que éste huésped es una cepa lisógena del bacteriófago λ DE3 y contiene una copia cromosomal del gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac UV5*.

Estas cepas son ideales para la producción de proteína a partir de vectores pET. La designación pLysS y pLysE indican que el huésped contiene plásmidos compatibles con pET que codifican para lisozima T7, la cual es un inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa. Las células que contienen pLysS producen una pequeña cantidad de lisozima T7 mientras que aquellas conteniendo pLysE la producen en gran cantidad. Estas cepas son utilizadas para suprimir la expresión basal de la T7 RNA polimerasa previo a la inducción (Novagen, 2006).

2.8.4 Expresión de genes inducidos por IPTG

El isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) funciona como un inductor para la transcripción de la T7 RNA polimerasa a partir del DNA genómico. Esta polimerasa posteriormente transcribirá el gen de interés que se encuentra insertado en el vector pET (Figura 2.8).

Los plásmidos que contienen promotores inducidos por IPTG son capaces de expresar proteínas a niveles de 30% de la masa de la proteína bacteriana. Estos plásmidos son ideales para experimentos de laboratorio a baja escala, pero el alto costo del IPTG impide su uso para la producción a gran escala de proteínas foráneas. Debido a que la expresión de la RNA polimerasa T7 es constitutiva, la utilización de un vector de expresión inducible por IPTG requiere la transformación de una cepa de *E. coli* que sobreexpresa el represor *lac*. Este represor evita la transcripción de genes foráneos en ausencia del inductor (Sambrook y Russell, 2001).

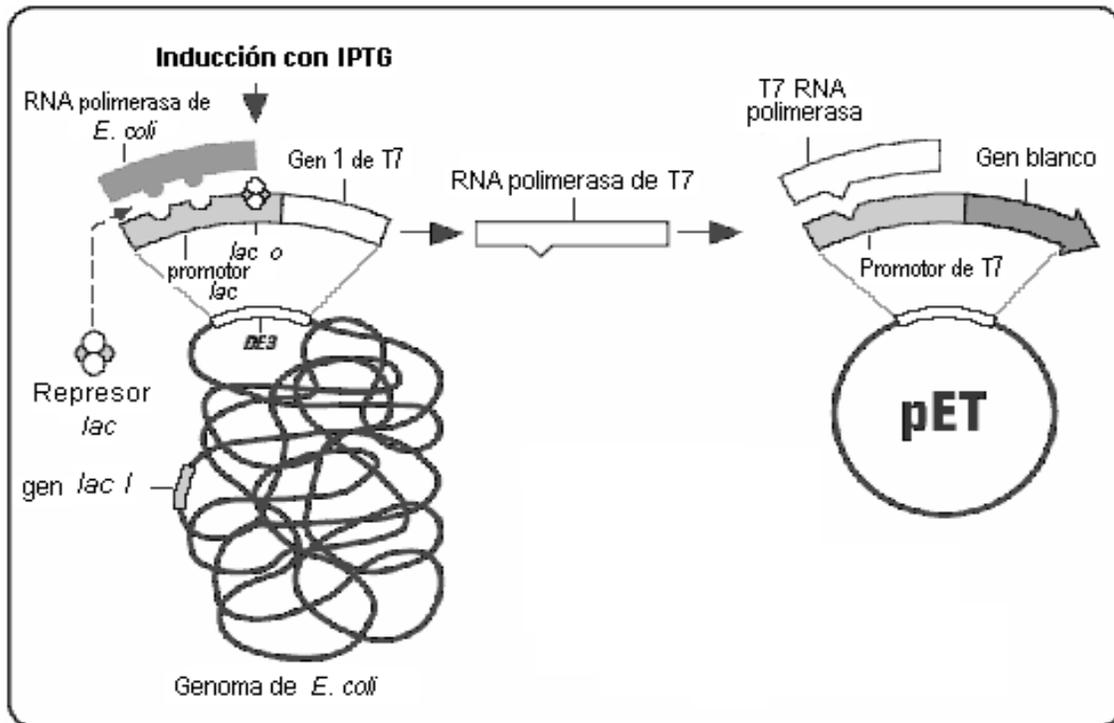


Figura 8. Esquema del proceso de expresión por inducción con IPTG (Novagen, 2006).

2.9 Peroxidasas recombinantes

La síntesis del gen de una enzima y su producción en un huésped de expresión puede ser la mejor manera de aislarla y obtener un alto rendimiento. Una de las dificultades es probar que no existen problemas en el plegamiento y que se está obteniendo una enzima pura, intacta e idéntica a su forma nativa. Después de esto, la mutagénesis dirigida se convierte en un asunto de rutina y es necesario proceder cuidadosamente para identificar si en efecto se introdujeron cambios en las propiedades de la enzima y de ser así, cuáles fueron estos cambios.

La primera peroxidasa en ser clonada fue la citocromo c oxidasa de levadura, debido a que no contiene carbohidratos y a que por muchos años fue la única peroxidasa cuya estructura cristalina era conocida. El gen estructural fue sintetizado y expresado en 1982 y poco después fue expresado en *Saccharomyces cerevisiae*.

(Dunford, 1999). Este sistema de expresión produce una enzima activa sin necesidad de ser plegada *in vitro*, sin embargo, los niveles de expresión son bajos (aproximadamente 50 µg/L) y la enzima secretada está hiperglicosilada (Veitch, 2004).

Posteriormente se descubrió que la expresión y mutagénesis en *E. coli* era más eficiente haciendo más fácil la purificación subsecuente. Sin embargo, esta bacteria es incapaz de realizar glicosilaciones y plegar correctamente la proteína para que ésta obtenga su forma activa. Como resultado, las cadenas polipeptídicas son degradadas o bien, se agregan formando cuerpos de inclusión insolubles. Este es el caso para las proteínas que contienen puentes disulfuro y glicosilaciones en su forma nativa, como lo es la HPRC. El problema del plegamiento representa un obstáculo para la producción de proteínas a gran escala para aplicaciones industriales y farmacéuticas (Lin *et al.*, 1999).

Se ha reportado que el plegamiento depende de manera crítica de las concentraciones de urea, Ca^{2+} , Fe y glutatión oxidado. Este último se requiere para la formación de puentes disulfuro. Por lo tanto, una manera de obtener la forma activa de las proteínas es realizar su plegamiento *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión, de donde las moléculas de proteína deben ser extraídas, plegadas, y activadas mediante la adición Fe^{2+} , procedimiento que resulta laborioso e ineficiente, obteniéndose bajos rendimientos de la enzima activa (2-4 mg/L para HRPC recombinante) (Dunford, 1999).

Por otra parte, el hecho de que la enzima recombinante sea expresada sin glicosilaciones por parte de *E. coli* puede ser una ventaja cuando lo que se quiere es realizar estudios de cristalización así como la elucidación de la estructura tridimensional de la enzima (Veitch, 2004). El papel de las glicosilaciones en las peroxidasas todavía no ha sido elucidado completamente. Cuando HRP mutagenizada en los sitios de glicosilación se expresó en *E. coli*, se perdieron todas la glicosilaciones. La pérdida de azúcares en estas condiciones había sido predicha

en la expresión en esta bacteria en estas condiciones, también se identificaron cadenas de azúcares alteradas ricas en manosa cuando se utilizaron levaduras como huéspedes de expresión (Dunford 1999).

La remoción de los carbohidratos de la peroxidasa de nabo no afecta significativamente la estructura secundaria del polipéptido, pero su presencia mejora la estabilidad conformacional de la proteína así como su estabilidad térmica. La ausencia de carbohidratos provoca una reducción en la actividad enzimática del 50 al 85% (Duarte- Vázquez, *et al.*, 2003).

Morawski *et al.* (2000) utilizaron levaduras como sistemas de expresión con la finalidad de obtener una peroxidasa con mayor nivel de actividad y se obtuvo una peroxidasa mutada con características funcionales y de estabilidad mejoradas. Se comenzó con una mutante expresada en *Saccharomyces cerevisiae* y se identificaron mutantes que fueron activos y estables a la inactivación por H₂O₂. Cuando dichas mutantes se expresaron en *Pichia pastoris* se obtuvieron cantidades suficientes para ser purificadas y caracterizadas: 0.6, 0.9 y 5.2 mg HRP/L para el tipo silvestre y dos mutantes, respectivamente.

La clonación del gen que codifica para las distintas isoperoxidasas (aniónicas, catiónicas y neutras) es un procedimiento que se ha llevado a cabo en numerosas ocasiones a partir de diferentes plantas como maíz, tabaco, rábano y nabo. La oxidación de residuos de metionina puede ser la causa de la pérdida de actividad biológica en muchas proteínas. El reemplazo de los cuatro residuos presentes en la peroxidasa de rábano picante por isoleucina resultó en un incremento significativo en la estabilidad ante peróxido de hidrógeno (Lin *et al.*, 1999).

2.10 Sistemas de purificación de proteínas recombinantes

La técnica de etiquetar una proteína mutada con cola de His y su posterior aislamiento mediante una columna de níquel, fue considerada una herramienta prometedora, principalmente debido a que fue útil en el aislamiento de proteínas de plantas. En efecto, cuando la peroxidasa catiónica de cacahuete expresada en plantas de tabaco fue etiquetada con cola de His y purificada mediante IMAC, la actividad de la enzima permaneció igual a la de la enzima nativa control, además de que estaba glicosilada (van Huystee *et al.*, 2002).

Algunas isoperoxidasas de *B. napus* han sido purificadas y caracterizadas; sin embargo, los métodos bioquímicos convencionales presentan dificultades para el aislamiento y caracterización de una peroxidasa específica ya que las peroxidadas se comportan como múltiples isoenzimas en plantas. Por lo tanto, métodos alternativos tales como clonación molecular pueden ser prometedores en lo que se refiere a la búsqueda de isoperoxidasas específicas (Wu *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Las peroxidasas tienen un potencial muy diverso y variado en cuanto a sus posibles aplicaciones, aunque los procesos comerciales basados en estas enzimas han sido confinados a sistemas de diagnóstico y marcaje de anticuerpos. Existen algunas desventajas que limitan un uso más extenso de las peroxidasas, como son su inactivación por peróxidos mediante oxidación del anillo de porfirina, baja solubilidad de los sustratos de interés y un alto costo de producción y purificación.

El hecho de que existan varias isoperoxidasas en la misma planta, dificulta el proceso de aislamiento y purificación de una peroxidasa específica, sin contar que su expresión depende del estado biológico en el que se encuentre la planta. Para la realización de estudios de cristalización y de caracterización bioquímica, así como para utilizar la peroxidasa en un mayor número de aplicaciones prácticas, es necesario contar con una cantidad importante de esta enzima.

Se requieren métodos de purificación que impliquen menores costos. La expresión como proteína recombinante en un huésped apropiado, permitiría obtener las cantidades suficientes de peroxidasa para diferentes aplicaciones (Regalado *et al.*, 2004). Actualmente, se han obtenido el DNA genómico o el cDNA que codifica para la peroxidasa con el fin de elucidar su papel fisiológico, su mecanismo de acción y la estructura de sus diferentes isoenzimas.

El rábano picante (*Armoracia rusticana* L.), fuente tradicional de peroxidasas, presenta limitaciones en su cultivo en nuestro país. En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro se han estudiado las propiedades catalíticas y fisicoquímicas de algunas isoperoxidasas de raíz de nabo (*Brassica napus*), el cual se encuentra ampliamente distribuido en México. Estos estudios pueden ayudar al entendimiento y función de las peroxidasas, su expresión en sistemas recombinantes facilitará la caracterización y entendimiento de estas enzimas para ampliar sus posibilidades de uso.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Clonar y expresar el gen de una peroxidasa de nabo en *Escherichia coli* y determinar algunas características bioquímicas de la proteína recombinante.

4.2 Objetivos particulares

- Obtener la secuencia completa del DNA complementario (cDNA) de una isoperoxidasa de nabo.
- Expresar gen *BnPA* en *Escherichia coli*.
- Purificar la peroxidasa recombinante.
- Realizar el plegamiento *in vitro* de la enzima recombinante y evaluar su actividad catalítica.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

Trizol, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) sal disódica dihidratada 99%, agarosa grado electroforético, isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) y tetrametiletilendiamina (TEMED) de Invitrogen.

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 de Bio-rad.

Tris (hidroximetil)-aminometano 99.9%, cloroformo 98.9%; 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, fosfato de potasio monobásico cristal 99.7%, de J.T. Baker.

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) de Sigma.

Polimerasa *Thermus aquaticus* (*Taq*) de Fermentas así como *Taq* platinum de Invitrogen. Las enzimas de restricción *EcoRI* (10 U/ μ l) y *HindIII* (10 U/ μ l) fueron de Fermentas y *NdeI* (10 U/ μ l) de Takara. Su utilizó ligasa T4 (1 U/ μ l) de Invitrogen. Los marcadores de peso molecular de 1 kb para DNA fue de Promega, mientras que el marcador de peso proteínas para proteínas dual color de Bio-rad. Bromo-cloro-indolil-galactopiranosido (X-Gal) de Sigma, sulfato de kanamicina de Fluka, cloruro de hematina de MP Biomedicals, etanol 96° de El Crisol y xileno cianol FF de Bio-rad.

Los medios de cultivo fueron Bacto triptona y Bacto extracto de levadura de Difco, agar bacteriológico de BD Difco.

5.2 Material biológico

Se utilizó nabo (*Brassica napus*) de la variedad purple top white globe cosechado en el Rancho La Trinidad ubicado en San Miguel de Allende, Gto. Se pretendía cosechar nabo de 4 semanas de edad que es cuando se reporta mayor expresión de peroxidasa (Cervantes, 2007), sin embargo, por razones de disponibilidad, se cosechó nabo de 5 semanas de edad.

5.3 Estrategia general

La estrategia de trabajo se esquematiza en la Figura 9.

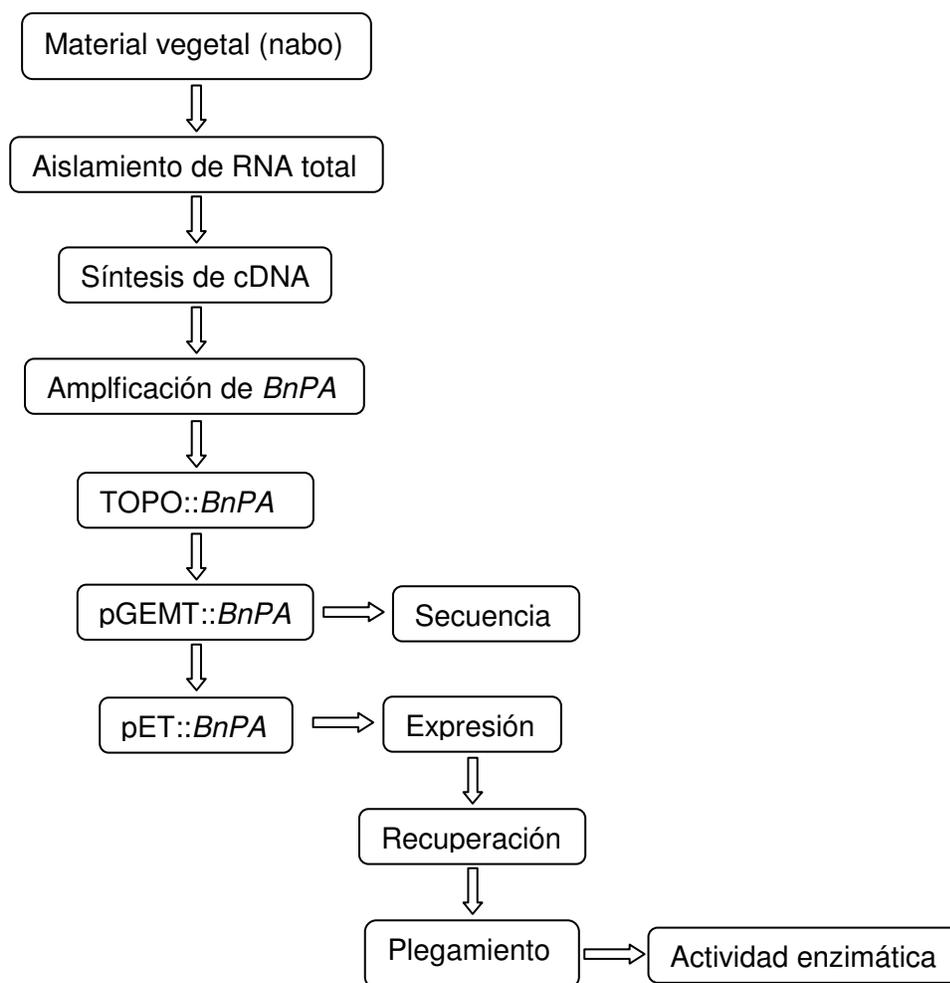


Figura 9. Esquema de la estrategia general.

5.4 Obtención de la secuencia del cDNA de peroxidasa de nabo

El nabo recolectado fue lavado y enjuagado con agua destilada, se cortaron aproximadamente 100 mg de tejido de la raíz, tallo y bulbo con una hoja nueva de bisturí; cada una de las muestras se sumergió en 1 ml de Trizol para su transporte. Una vez en el laboratorio, se combinaron las muestras y se machacaron en un mortero estéril agregando nitrógeno líquido.

5.4.1 Extracción de RNA total

El tejido machacado se dividió en dos muestras y homogeneizó en 1 ml de trizol y se incubó 5 min a temperatura ambiente con el objetivo de permitir la completa disociación de complejos núcleo-proteicos. Después se adicionaron 0.2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s para posteriormente ser incubado a temperatura ambiente durante 3 min. Las muestras se centrifugaron a 12,000 *g* por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, se observó una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior que contiene el RNA. El volumen de la fase acuosa es el 60% del volumen de trizol utilizado inicialmente.

La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y el RNA se precipitó mediante la adición de 0.5 ml de alcohol isopropílico. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugaron a 12,000*g* durante 10 min a 4°C. El precipitado de RNA forma una pastilla gelatinosa en el fondo del tubo. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla de RNA con 1 ml de etanol al 75%. Se mezcló en vórtex y se centrifugó a 7,500 *g* por 5 min a 4°C. La pastilla de RNA se secó brevemente. Es importante no permitir que la pastilla se seque completamente ya que de lo contrario reduciría en gran medida su solubilidad. Finalmente, se disolvió el RNA en agua libre de RNasas haciendo pasar varias veces la solución por una punta de pipeta, y se incubó a 55-60° C durante 10 min (Invitrogen, 2008).

5.4.2 Calidad e integridad de RNA total

El espectro de absorbancia del DNA y RNA es máximo a 260 nm. La concentración de RNA se determina considerando que una unidad de absorbancia medida a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$). Esta relación sólo es válida si la lectura de la absorbancia es tomada en agua (libre de RNasas). Considerando que los aminoácidos aromáticos de las proteínas absorben a 280 nm, la relación (A_{260}/A_{280}) se utiliza para determinar si existe contaminación por proteínas. La pureza del RNA se calcula midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm y la relación A_{260}/A_{280} debe ser entre 1.9 y 2.2. La concentración de RNA se determinó mediante la ecuación (1):

$$RNA \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = A_{260} \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times fd \quad (1)$$

Donde fd es el factor de dilución (Sambrook y Russell, 2001).

Se evaluó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Se disolvió la agarosa en solución amortiguadora TAE (Tris-acetato de sodio 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), la solución se calentó hasta que la agarosa se fundió y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.3 µg/ml. Se mezclaron 5 volúmenes de muestra con 1 volumen de amortiguador de carga 6X [azul de bromofenol 0.25% (p/v), xileno cianol FF 0.25% (p/v), glicerol 30% (p/v)]. Se cargaron las muestras en el gel y se armó la cámara de electroforesis mini sub cell GT de Bio-rad (California, EUA); se corrió a voltaje constante de 100 V con ayuda de una fuente de poder Thermo Scientific EC 300 XL (Iowa, EUA).

5.4.3 Obtención del cDNA de peroxidasa

Se realizó la reacción de transcripción inversa utilizando el kit Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Maryland, EUA). Se hicieron dos mezclas, una utilizando el oligo dT incluido en el kit y otra utilizando el oligo antisentido específico para la peroxidasa de nabo (PNR, ver 5.4.4) de acuerdo a la reacción descrita en el Cuadro 1. La reacción se mezcló y centrifugó 5 s. Se

incubó en baño maría a 70°C por 5 min y posteriormente se enfrió en hielo. Se agregó al tubo de reacción 4 µl de amortiguador de reacción 5X, 1 µl de inhibidor de ribonucleasas y 2 µl de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP's) 10 mM. Se mezcló y centrifugó para bajar las gotas que se hubieran quedado en las paredes del microtubo. La mezcla se incubó a 37°C durante 5 min y se adicionó 1 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl). Se incubó a 42°C durante 60 min. La reacción se detuvo elevando la temperatura a 70°C por 10 min; finalmente se enfrió en hielo.

Cuadro 1. Mezclas para la reacción de RT-PCR

	RNA total	Oligo dT	PNR	Agua libre de nucleasas
Reacción 1	3 µl	2 µl	-	7 µl
Reacción 2	3 µl	-	2 µl	7 µl

5.4.4 Amplificación del cDNA

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el cDNA obtenido. Las recomendaciones para el diseño de oligonucleótidos iniciadores (oligos) son que deben contener secuencias de restricción y con una longitud de 21 a 34 bases, que la última base sea G o C pero no presenten más de dos G o C en el extremo 3', que el contenido de G+C sea de 40-60% y que la diferencia en la temperatura de fusión (T_m) de ambos oligos no sea mayor de 2°C. Esta temperatura se calcula usando la ecuación (2).

$$T_m = 2(T + A) + 4(C + G) \quad (2)$$

Se utilizaron los oligonucleótidos PNF y PNR, diseñados anteriormente con base en la secuencia parcial del gen de peroxidasa reportada el banco de secuencias del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) con número de acceso AY423440.

PNF 5'-AATAAATGGCTGTAGCAAACCTCGTC-3'

PNR 5'-CTAGTCCTCGCATTTCACATTTC-3'

Para la reacción se hizo una mezcla que contenía 2.5 µl de amortiguador 10X [Tris-HCl 200 mM, pH 8.3; KCl 200 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM], 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 0.62 µl de oligos PNF y PNR 10 pM, respectivamente; 0.25 µl de *Taq* polimerasa, y 2.5 µl de DNA. Llevando a un volumen final de 25 µl con agua libre de nucleasas.

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador Techne TC-3000 (Nueva Jersey, EUA). Las condiciones fueron: temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C, 1 min seguido de 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94 °C, 30 s, alineamiento a 57 °C, 70 s, extensión a 72 °C, 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 7 min. Al término de la reacción, se visualizaron los productos de PCR en gel de agarosa 1% (p/v), mezclando 1 volumen del producto de PCR con 5 volúmenes de amortiguador de carga 6X y se corrió a voltaje constante de 90 V durante 40 min.

5.4.5 Construcción TOPO::*BnPA*

Para la ligación de productos de PCR se hizo una mezcla que contenía 2 µl de producto de PCR, 1 µl de solución salina, 2 µl de agua y 1 µl de vector pCRII-TOPO de Invitrogen. Esta mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente (22-23 °C) y de esta manera se obtuvo la construcción TOPO::*BnPA*. Para comprobar la presencia del inserto, se hizo digestión de dicha construcción con la enzima de restricción *EcoRI* la cual libera el inserto, haciendo la mezcla como sigue: 1.5 µl de amortiguador *EcoRI*, 2.5 µl de construcción TOPO::*BnPA*, 0.1 µl *EcoRI* y agua HPLC estéril hasta un volumen final de 15 µl. La mezcla se incubó una hora a 37 °C y posteriormente se analizó en electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, la construcción se mandó a secuenciar a Molecular Cloning Laboratories (MCLAB) en EUA y se comparó con la secuencia reportada en el NCBI.

5.4.6 Transformación de células competentes

TOPO::*BnPA* se utilizó para transformar células competentes *E. coli* DH5 α . Se agregaron 2 μ l de la construcción a 50 μ l de células; al control negativo se le agregaron 2 μ l de solución amortiguadora TE (Tris-Cl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM). Ambas mezclas se incubaron en hielo por 30 min y se transformaron por choque térmico durante 90 s en un baño a 42°C exactamente, sin agitar. Se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 minutos, se les agregaron 250 μ l de caldo Luria Bertani (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). Se inoculó 50 y 100 μ l de cultivo por extensión en superficie placas de LB con 100 μ g/ml de ampicilina, por extensión en superficie; estas placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. La solución de trabajo de ampicilina 500X se preparó a partir de trihidrato de ampicilina y se solubilizó en HCl 1 M para obtener una solución 50 mg/ml la cual fue esterilizada por filtración.

5.4.7 Extracción de DNA plasmídico

Se eligieron 4 transformantes de las placas anteriores y cada una se inoculó en 3 ml de caldo LB el cual se incubó a 37°C con agitación durante 16 h. Se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico de acuerdo al protocolo de Qiagen. Se transfirieron 1.5 ml de cada tubo a cuatro microtubos los cuales se centrifugaron 1 min a 16,000 *g* en una centrífuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 300 μ l de Solución 1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, a 4°C) y se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 μ l de Solución 2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 μ l de Solución 3 fría (acetato de potasio 3 M, pH 5.5), se mezcló por inversión y se centrifugó 25 min. El sobrenadante fue cuidadosamente removido y transferido a tubos limpios a los cuales se les agregó el 70% de volumen de isopropanol. La suspensión se centrifugó a durante 30 min y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol 70% y se centrifugó 1 min. Se desechó el etanol y se secó el etanol remanente al aire durante 10 min.

Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua libre de nucleasas. Se determinó su concentración, se analizó su integridad y se mandó secuenciar a MCLAB.

5.5 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos con secuencias de restricción para las enzimas *NdeI* y *HindIII*, con base en la secuencia consenso de la peroxidasa ácida de nabo y la secuencia del vector de expresión pET 28a(+) de Novagen orientando el gen dentro del marco de lectura y procurando que el inserto pudiera ser liberado mediante una reacción de digestión con las enzimas mencionadas. Los oligos son los siguientes y las secuencias de restricción están subrayadas.

PAF 5' ACATATGCAGTTAAACCCAACGTTTTAGTC 3'
PAR 5' AAAGCTTCTAGGATTGTCCATTAACCACCTTAC 3'

El DNA plasmídico de TOPO::*BnPA* obtenido en 5.4.7 se utilizó como plantilla para una reacción de PCR. De esta manera, el fragmento amplificado incluiría los sitios de restricción correspondientes.

La mezcla de reacción contenía 2.5 µl de amortiguador 10X [Tris-HCl 200 mM, pH 8.3; KCl 200 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM], 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 0.62 µl de oligos PAF y PAR 10 pM, respectivamente; 0.25 µl de *Taq* platinum, y 1 µl de TOPO::*BnPA* (50 ng/µl). Se llevó a un volumen final de 25 µl con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94°C, 1 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 s, alineamiento a 60°C, 30 s, extensión a 72°C, 1 min, seguido de una extensión final a 72°C por 7 min. Al término de la reacción, se visualizaron los productos de PCR en gel de agarosa 1% (p/v).

Los productos de PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa 1% y la banda resultante se cortó y purificó con GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), y se determinó su concentración por espectrofotometría.

5.6 Subclonación en el vector pGEM-T

La subclonación se realizó con la finalidad de resguardar el gen a largo plazo y cuando sea requerido, puede ser liberado mediante digestión con *NdeI* y *HindIII*. Para esto, se utilizó pGEM-T Easy Vector (Promega, Wisconsin, EUA).

Las reacciones de ligación deben diseñarse cuidadosamente para maximizar el rendimiento. La primera etapa de la reacción de ligación requiere altas concentraciones de DNA, mientras que la segunda reacción intramolecular se lleva a cabo más eficientemente cuando la concentración de DNA es baja. Sin embargo, como regla general se emplean cantidades equimolares de plásmido e inserto. No obstante, debe considerarse que además de la construcción deseada, durante la reacción de ligación se producen también homo y heteropolímeros lineales y circulares de tamaños y composiciones variados (Sambrook y Russell, 2001). Para la ligación con este vector se realizaron las mezclas indicadas en el Cuadro 3 y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (Promega, 2007).

Se determinó la concentración del producto de PCR purificado y se calculó la cantidad necesaria para la reacción de ligación utilizando la ecuación (3):

$$\frac{ng \text{ de vector} \times kb \text{ de inserto}}{kb \text{ de vector}} \times \text{relación inserto:vector} = ng \text{ de inserto} \quad (3)$$

Considerando que se requiere una relación inserto:vector de 3:1 o sea, 3/1, se tiene:

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

Las mezclas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

Cuadro 2. Mezcla para reacción de ligación de *BnPA* con pGEM-T

Reactivo	Reacción estándar	Control positivo	Control negativo
Amortiguador para ligación 2X	5 µl	5 µl	5 µl
Vector pGEM-T (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
Producto de PCR	50 ng	1 µl	1 µl
DNA inserto control	-	2 µl	-
Ligasa T4 (1 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Agua desionizada hasta volumen final de:	10 µl	10 µl	10 µl

Se utilizaron células competentes *E. coli* JM109 (Promega) como huésped de no-expresión. Se añadieron 5 µl de la construcción pGEMT::*BnPA* (reacción estándar), así como del control negativo y positivo a 3 microtubos con 50 µl de células competentes. Los microtubos se dejaron reposar en hielo durante 30 min y se hizo la transformación por choque térmico, como se describió en 5.2.6. Posteriormente se sembró por extensión en superficie 100 µl de cada cultivo en placas con agar LB con 100 µg/ml de ampicilina, 100 µl de IPTG 0.1 M y 80 µg/ml de X-Gal y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Se eligieron colonias blancas y una colonia azul como control negativo, las cuales fueron inoculadas en 3 ml de caldo LB y se incubaron a 37°C por 16 h. Se extrajo DNA plasmídico de estos cultivos, seguido de reacción de PCR y digestión

con *NdeI* y *HindIII* para verificar la presencia del inserto. Finalmente se mandó secuenciar una muestra.

5.7. Clonación en vector de expresión.

Para expresar *BnPA* como proteína recombinante se utilizó el vector pET28a(+) de Novagen (Merck, Darmstadt, Alemania). Se recuperó el inserto de la construcción mediante digestión con enzimas de restricción haciendo una mezcla de 1 µg de pGEMT::*BnPA*, 2 µl de amortiguador H 10X, 5 U de *NdeI*, 10 U de *HindIII*, se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas y se incubó 1 h a 37°C. Se hizo electroforesis en gel de agarosa 1% de donde se cortó y purificó la banda correspondiente al inserto.

5.7.1 Construcción pET::*BnPA*

Para linearizar el vector, se hizo una mezcla de 3 µg de éste, 2 µl de amortiguador H 10X, 20 U de *HindIII* y 10 U de *NdeI*; se llevó a un volumen total de 20 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 h y se evaluó la efectividad de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa 1% de donde se cortó la banda correspondiente (~5 kpb) y fue purificada con GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

En este caso, se probaron tres diferentes relaciones vector:inserto, 1:3, 1:6 y 1:10. Se mezclaron el 100 ng de vector, la cantidad correspondiente de inserto y el agua, se calentó a 65°C por 5 min, esto con la finalidad de romper cualquier interacción vector-vector o inserto-inserto que pueden presentarse cuando se trabaja con ligaciones con extremos cohesivos; dichas interacciones pueden alterar la relación inserto:vector y como consecuencia reducir la efectividad de la ligación (Sambrook y Russell, 2001). Posteriormente se agregaron 4 µl de amortiguador 5X y 0.5 µl ligasa T4 (1 U/ µl) y se incubó a 4°C toda la noche.

Se transformaron células competentes *E. coli* JM109 (Promega) y BL21 (DE3) (Novagen) con cada una de las tres ligaciones. Se añadieron 5 µl de reacción de ligación, 5 µl de amortiguador TE al control negativo y 50 ng del vector pET28 sin digerir al control positivo. Se dejaron reposar en hielo por 30 min para después dar el choque térmico en un baño a 42°C por 90 s. Se dejaron reposar 2 min en hielo luego se añadieron 250 µl de caldo LB y se incubaron 1 h a 37°C y 250 rpm. Las células transformantes se inocularon en placas de agar LB-kanamicina 30 µg/ml. La solución de trabajo de kanamicina se preparó 1000X, es decir, 30 mg/ml en agua y se esterilizó por filtración.

Se analizaron tres transformantes de *E. coli* BL21(DE3) y una de *E. coli* JM109, las cuales se inocularon en 3 ml de caldo LB-kanamicina, se crecieron toda la noche a 37°C y se extrajo DNA plasmídico. Mediante reacción de PCR con polimerasa *Taq* se encontró que sólo una transformante de BL21(DE3) y una de JM109 contenían la construcción pET::*BnPA*. Se hizo conserva de cada cepa en glicerol 50% (glicerol-agua 1:1 v/v estéril) mezclando 700 µl de cultivo de no más de 16 h de incubación.

5.8 Expresión de *BnPA*

A partir de la conserva de glicerol se inocularon 3 ml de medio LB-kanamicina y se incubó a 37°C por 16 hrs. Este cultivo se utilizó para inocular 100 ml del mismo medio el cual se creció con agitación hasta que se alcanzó a una $A_{600} = 0.5-0.7$, momento en el cual se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 1 mM. Se continuó la incubación por 4 h más. Una vez pasado este tiempo, se recuperaron las células por centrifugación a 5,000 g, 4°C por 5 min.

5.8.1 Solubilización de BnPA a partir de cuerpos de inclusión

Se sabe que las peroxidasas recombinantes en *E. coli* se expresan en forma insoluble como cuerpos de inclusión (Smith *et al.*, 1990; Gazaryan *et al.*, 1994; Hushpulian *et al.* 2003), se utilizó el protocolo de purificación propuesto por Gazaryan *et al.* en 1994, quienes purificaron HRP a partir de cuerpos de inclusión.

La pastilla celular se resuspendió en 4 ml amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 con NaCl 2 M y DTT 10 mM. Se sometió a tratamiento sónico en Ultrasonic Processor (Sonics, Connecticut, EUA) de 500 W a 20 kHz con sonda de 13 mm en ciclos de pulsaciones de 10 s y descanso de 15 s durante un total de 10 min. Se incubó 90 min a temperatura ambiente y se sonicó de nuevo bajo las mismas condiciones. Se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C. El precipitado se lavó con 20 ml de amortiguador de Tris-HCl 0.05 M pH 8.5 y se centrifugó 15 min a 5,000 g y 4°C y se repitió el lavado. Finalmente el precipitado se resuspendió en 5 ml de urea 6 M, DTT 1 mM y se mantuvo a 4°C hasta la completa disolución de la pastilla (Hushpulian *et al.*, 2003).

La presencia de la proteína fue evaluada mediante electroforesis SDS-PAGE en sistema discontinuo Laemmli (1970) (Cuadro 4) en una cámara Mighty Small II de GE Healthcare Biosciences (Nueva Jersey, EUA), se corrió a 40 mA en una fuente de poder Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 (Nueva Jersey, EUA). El gel se tiñó con azul de coomassie al 0.05% y se fotografió para su análisis.

Se midió proteína total por el método de Bradford descrito por Ausubel *et al.* (2002), utilizando seroalbúmina bovina como estándar y 5 µl de muestra, que en este caso fue BnPA solubilizada en urea 6 M.

Cuadro 3. Mezclas de gel separador y gel concentrador para SDS-PAGE

	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida-bisacrilamida 30%	4 ml	330 μ l
Tris-HCl 0.5 M pH 8.6	-	630 μ l
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
SDS 10% (p/v)	0.1 ml	25 μ l
Agua	3.35 ml	1.5 ml
TEMED	5 μ l	2.5 μ l
Persulfato de amonio 10% (p/v)	50 μ l	12.5 μ l
Volumen total	10 ml	2.5 ml

5.9 Plegamiento de BnPA recombinante

La proteína solubilizada en urea 6 M se agregó gota a gota en 100 ml de medio para plegamiento cuya composición se basó en las condiciones ideales para la HRP establecidas por Gazaryan *et al.* (1994): urea 2 M, DTT 0.1 M, glutatión oxidado 0.7 mM, CaCl_2 5 mM, glicerol 5% (v/v) en amortiguador Tris-HCl 50 mM. 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 hizo la incorporación del grupo hemo a la enzima plegada, agregando hematina a una concentración final de 5 μ M a partir de una solución de cloruro de hematina 2 mM en NaOH 0.1 M. Se incubó 1 h a temperatura ambiente (22°C). Posteriormente se evaluó la actividad de la enzima reconstituida.

5.10 Medición de actividad de peroxidasa

La actividad de peroxidasa fue determinada espectrofotométricamente utilizando 2'2 azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) como donador de

hidrógeno y peróxido de hidrógeno como catalizador. En una celda de plástico de 1.5 ml se hizo una mezcla en el siguiente orden: 1340 μl de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6, 50 μl de enzima, 30 μl de ABTS 50 mM (en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6) y 80 μl de H_2O_2 5 mM y. El cambio de absorbancia debido a la oxidación del ABTS fue monitoreado a 414 nm durante 3 min a 25°C, en un espectrofotómetro Lambda 40 (Perkin Elmer, Connecticut, EUA); considerando un coeficiente de extinción molar del H_2O_2 $\epsilon_{240} = 35 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la los micromoles de ABTS consumidos en 1 min a pH 6 y 25°C. Se utilizó la ecuación (4) (Tijssen, 1993).

$$\frac{V}{v} \times \frac{1}{a \cdot b} \times \frac{A}{\text{min}} \times d \quad (4)$$

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

Resolviendo, se tiene:

$$446.774 \times \frac{A}{\text{min}} \times d = U/\text{mg de proteína} \quad (5)$$

5.11 Estrategia para clonación de *BnPA* en vector de secreción

Paralelamente, se planteó clonar el gen *BnPA* en un vector de expresión con una secuencia de secreción y cola de histidinas al final de la proteína para de esta manera tener la proteína en la fracción soluble y que pueda ser fácilmente purificada mediante cromatografía de unión a metal inmovilizado (IMAC) utilizando columnas con resina de níquel, a la cual la cola de histidinas de la proteína se une por afinidad. Con esta finalidad, se eligió el vector pET 22b(+) (Anexo 2) el cual fue utilizado por Lin *et al.*, (1999) para producir HRP la cual fue encontrada en el sobrenadante.

De acuerdo a la secuencia de éste vector, se diseñaron oligos pET22F y pET22R con sitios de restricción para *NcoI* y *NotI* respectivamente que se encuentran subrayados.

pET22F 5' - AAA AAA CCA TGG ATC AGT TAA ACC CAA - 3'

pET22R 5' - GCG GCC GC GGA TTG TCC ATT AAC CAC CTT AC - 3'

El codón GAT del oligo pET22F añade ácido aspártico (Asp) al inicio de la proteína, sin embargo, se considera que este aminoácido extra, aunque tiene carga positiva, no afectará ni el plegamiento ni la actividad debido a que se encuentra fuera del sitio catalítico de la enzima.

Los oligos pET22F y pET22R amplifican un fragmento de 940 pb. Se hizo PCR utilizando las condiciones descritas en 5.5. El producto de PCR se ligó con el vector pCR-II TOPO (Invitrogen) siguiendo la estrategia descrita en 5.4.5. Se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α por choque térmico y se inocularon en placas de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina. Se eligieron colonias aisladas las cuales se crecieron durante toda la noche en caldo LB con ampicilina para posteriormente extraer DNA plasmídico.

A partir de las muestras con mayor concentración y calidad de DNA, se hizo digestión con *EcoRI*, enzima que libera el inserto de la construcción. Se incubó a 37°C durante una hora y se hizo electroforesis en agarosa 1%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recuperaron dos muestras independientes de RNA de nabo cuya calidad y concentración se muestran en el Cuadro 4. La calidad de ambas muestras se encuentra dentro del rango 1.9-2.2 e indica un RNA de buena calidad, lo cual fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 10) en donde se pueden ver los tres tipos diferentes de RNA: las subunidades ribosomales 28s y 18s, el RNA ribosomal 5s junto con el RNA t y un leve barrido que representa los RNAm.

Cuadro 4. Características de RNA total

	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración
Muestra A	0.4664	0.2243	2.079	1.86 mg/ml
Muestra B	0.5891	0.2729	2.1586	2.356 mg/ml

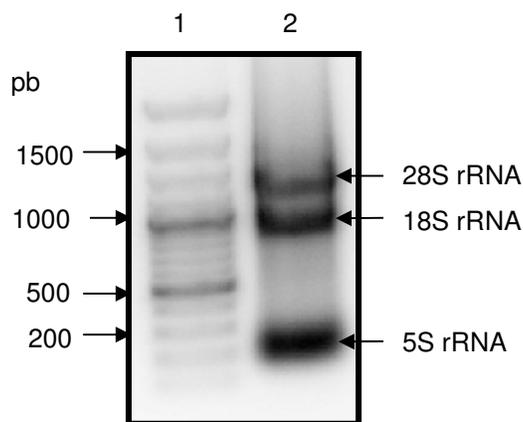


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de RNA total de nabo de 5 semanas. (1) Marcador de peso molecular 1 kb, (2) RNA total de muestra B.

A partir de la muestra B se llevó a cabo el cDNA de nabo vía RT-PCR a partir de la muestra B ya que ésta contenía una mayor concentración de RNA total. El posterior análisis mediante electroforesis de los productos de PCR muestra la banda esperada de 1098 pb la cual es mucho más intensa cuando se usó oligo dT incluido en el kit que cuando se utilizó el oligo antisentido específico PNR (Figura 11).

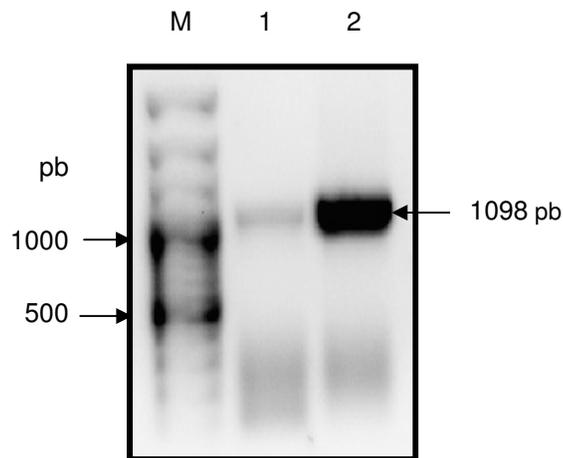


Figura 11. Productos de la reacción de RT-PCR de RNA de nabo. (M) marcador de peso molecular 1 kb, (1) producto de PCR con oligo específico PNR, (2) producto de PCR con oligo dT.

El cDNA de la peroxidasa amplificado en el ensayo de RT-PCR se ligó al vector pCR-II TOPO, se transfirió a *E. coli* para su multiplicación y posterior secuenciación. El análisis de transformantes con la construcción TOPO::*BnPA* se muestra en la Figura 12 donde tres de cuatro transformantes contienen el inserto. Se eligió la muestra 3 para mandar secuenciar.

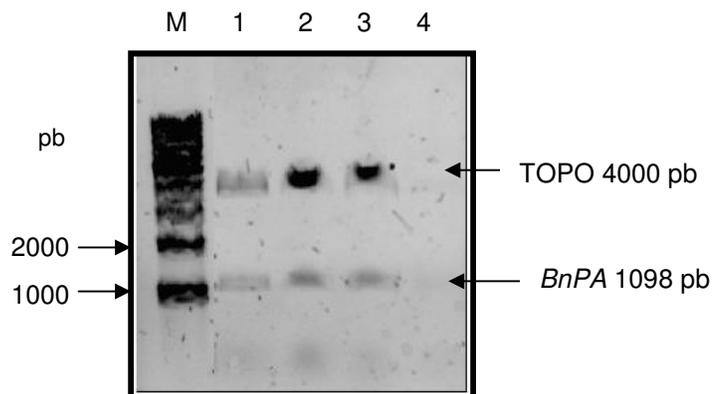


Figura 12. Análisis de restricción de TOPO::*BnPA*, (M) marcador de peso molecular, (1-4) digestión con *EcoRI*.

La secuencia codificante mostrada en la Figura 13, consta de 1077 pb y codifica para 358 aminoácidos. Incluye una secuencia N-terminal de secreción y una C-terminal que se piensa que la dirige a la vacuola (Romero-Gómez *et al.*, 2008). La homología de *BnPA* con otros genes de peroxidasas de plantas es mayor al 80% (Cuadro 5) (Altschul *et al.*, 1997).

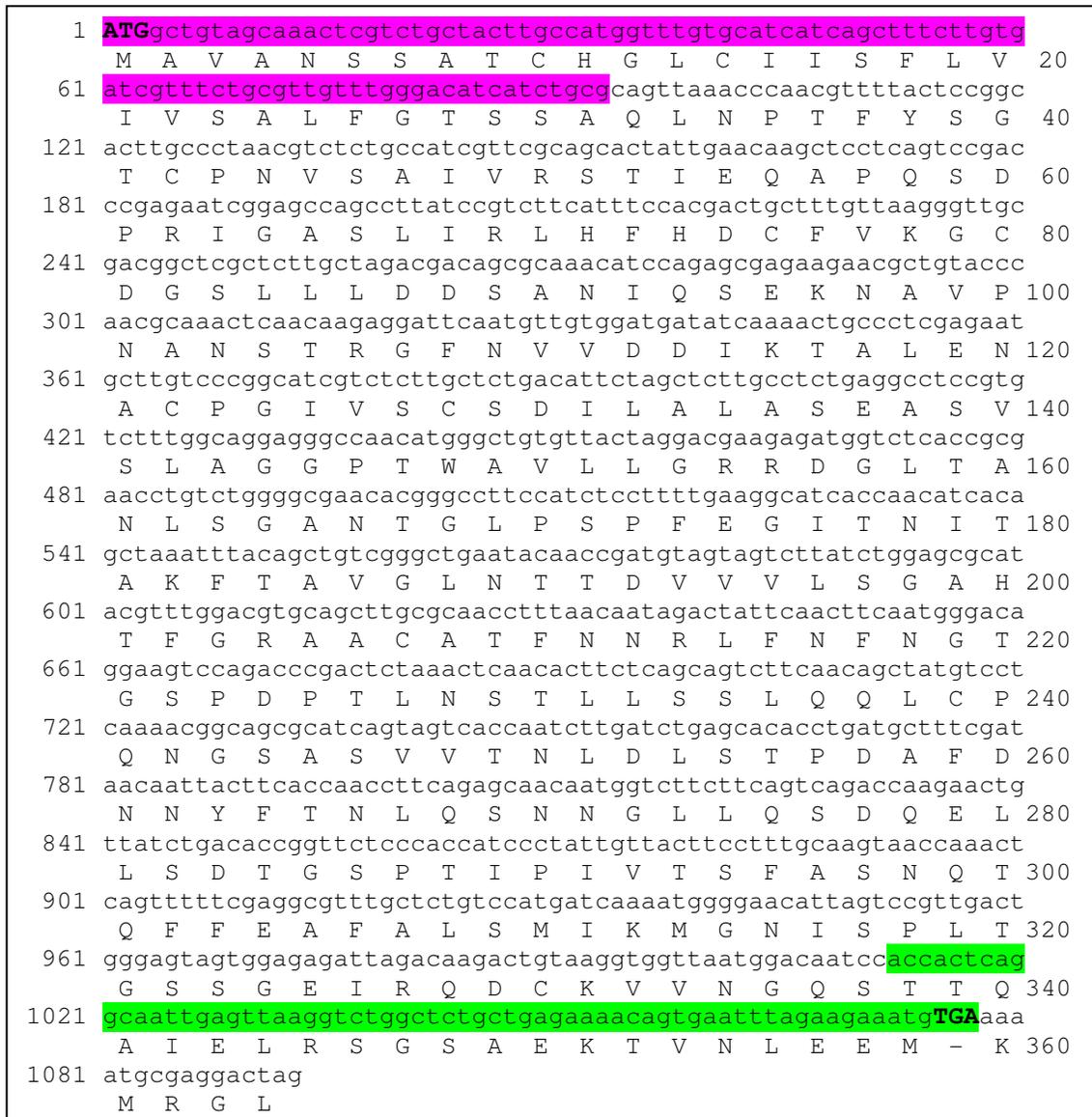


Figura 13. Secuencia de BnPA en TOPO. Los codones de inicio y de paro se señalan en mayúsculas, el péptido N-terminal en rosa y el péptido C-terminal en verde.

Cuadro 5. Homología de *BnPA* con otras peroxidasas.

Gen	Fuente	No. acceso NCBI	Homología
<i>podC</i>	<i>Brassica napus</i>	AY423440	98%
ATP A2	<i>A. thaliana</i>	NM120756	87%
ATP29a	<i>A. thaliana</i>	AY519360	89%
Clona 7360	<i>A. thaliana</i>	AY088509	87%

Una vez teniendo la secuencia se diseñaron los oligos que contenían secuencias de restricción (PAR y PAF), de manera que amplificaran sólo la secuencia que codifica para la proteína madura, es de decir, excluyendo los péptidos N- terminal y C-terminal (Romero-Gómez *et al.*, 2008).

Se comprobó la presencia del inserto en la construcción pGEMT::*BnPA* mediante digestión de las transformantes positivas (Figura 14). Todas las muestras resultaron positivas debido a que contenían el inserto, se eligió la muestra del carril 3 y cuya digestión corresponde al carril 10, para reamplificar y secuenciar el producto.

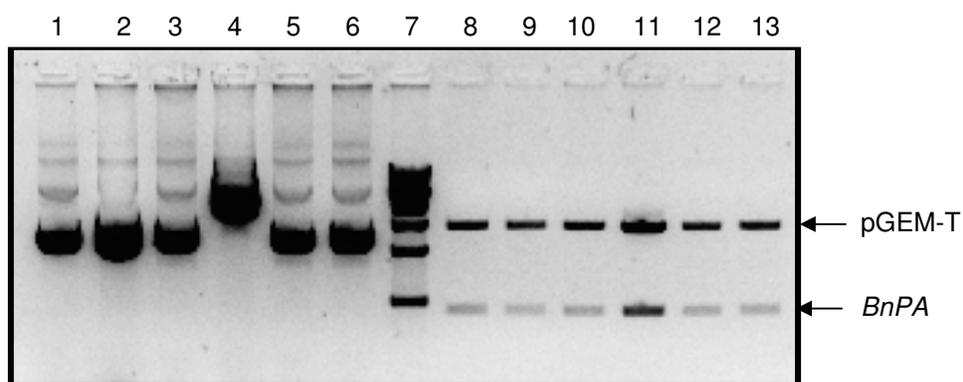


Figura 14. Análisis de transformantes positivas de pGEMT::*BnPA* (1-6); digestión de pGEMT::BnPA con *NdeI* y *HindIII* (8-13) y marcador de peso molecular (7).

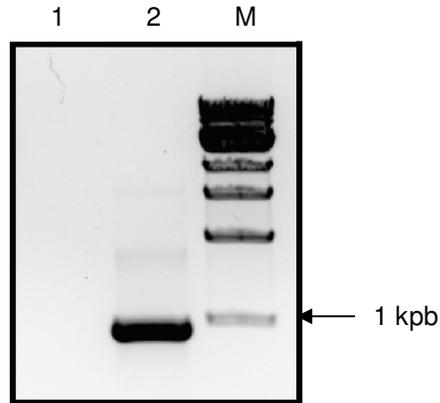


Figura 15. Producto de PCR de pGEMT::*BnPA*. (1) control negativo, (2) gen *BnPA*, (M) marcador de peso molecular 1 kb.

En la Figura 16 se presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína *BnPA* deducida y su alineamiento con otras peroxidasas de plantas utilizando el software BLASTP (Altschul *et al.*, 1997). Las peroxidasas ATP29a (Welinder *et al.*, 2002) y ATP A2 (Østergaard *et al.*, 2000) de *Arabidopsis thaliana*, HRPC1 de rábano picante, *BnPrx* de canola (Wu *et al.*, 2000) y *PodC* de nabo (Romero-Gómez *et al.*, 2008). La secuencia de *BnPA* contiene los aminoácidos necesarios para la actividad catalítica de las peroxidasas clase III: Arg38, Phe41, His42, Asn70, His169. Sin embargo, tiene 3 diferencias con *PodC*: Leu26Pro, Asn47Lys y Leu171Phe. Leucina y prolina son alifáticos, sin embargo el segundo es cíclico. Asparagina y lisina difieren tanto en estructura como en carga, ya que el primero tiene un grupo amida y no tiene carga, mientras que el segundo es un aminoácido cargado positivamente. Además, esta mutación se encuentra una zona conservada y podría afectar el plegamiento y/o la actividad enzimática. En cuanto a la tercera diferencia se puede observar en la Figura 16 que todas la peroxidasas del alineamiento contienen Phe en la posición 171, con excepción de *PodC*, por esto, es probable que la secuencia reportada por dichos autores tenga un error en esta posición.

	1	10	20	30	40	50
BnPA madura	QLNPTFYSGT	CPNVSAIVRS	TIEQAPQSDP	RIGASLI	RLH	FHDC FKVKGCD
PodC Mat	QLNPTFYSGT	CPNVSAIVRS	TIEQALQSDP	RIGASLI	RLH	FHDC CFVNGCD
HRPC1	QLTPTFIDNS	CPNVSNIVRD	TIVNELRSDP	RIAASIL	RLH	FHDC CFVNGCD
ATP29a	QLNATFYSGT	CPNASAIVRS	TIQQALQSDA	RIGGSLI	RLH	FHDC CFVNGCD
BnPrx	QLTPTFYDTS	CPNVTNIVRA	TIVNELRSDP	RIAASIL	RLH	FHDC CFVNGCD
ATPA2	QLNATFYSGT	CPNASAIVRS	TIQQALQSDT	RIGASLI	RLH	FHDC CFVNGCD
BnPA madura	GSLLLDDSA	IQSEKNAVFN	ANSTRGFNVV	DDIKTALENA	CPGI	VSCSDI
PodC Mat	GSLLLDDSA	IQSEKNAVFN	ANSTRGFNVV	DDIKTALENA	CPGI	VSCSDI
HRPC1	ASILLDNITIS	FRTEKDAFCN	ANSARGFPVI	DRMKAAVES	CPRT	VSCADLI
ATP29a	GSLLLDDTSS	IQSEKNAPAN	ANSTRGFNVV	DSIKTALENA	CPGI	VSCSDI
BnPrx	ASILLDNITIS	FRTEKDAVGN	ANSARGFPVI	DTMKAAVER	CPRT	VSCADM
ATPA2	ASILLDDTGS	IQSEKNAGFN	VNSARGFNVM	DNIKTALENA	CPGV	VSCSDV
BnPA madura	LALASEASVS	LAGGPTWAVL	LGRRDGLTAN	LSGANTGLPS	PFEGITNITA	
PodC Mat	LALASEASVS	LAGGPTWAVL	LGRRDGLTAN	LSGANTGLPS	PFEGITNITA	
HRPC1	LTIAAQOSVT	LAGGPSWRVP	LGRRDSLQAF	LDLANANLPA	PFFTLPQLKD	
ATP29a	LALASEASVS	LAGGPSWTVL	LGRRDGLTAN	LSGANSSLPS	PFEGLNNITS	
BnPrx	LTIAAQOSVT	LAGGPSWRVP	LGRRDSLQAF	FSLSDNMLPS	PFFTLPELKA	
ATPA2	LALASEASVS	LAGGPSWTVL	LGRRDSL TAN	LAGANSSIPS	PVESLSNITS	
BnPA madura	KFTAVGLN-T	TDVVVLSGAH	TFGRAACATF	NNRLFNFNGT	GSPDPTLNST	
PodC Mat	KFTAVGLN-T	TDVVVLSGAH	TLGRAACATF	NNRLFNFNGT	GSPDPTLNST	
HRPC1	SFRNVGLNRS	SDLVALSGGH	TFGKNQCRFI	MDRLYNFSNT	GLPDPTLNST	
ATP29a	KFVAVGLK-T	TDVVVLSGAH	TFGRGQCVTF	NNRLFNFNGT	GSPDPTLNST	
BnPrx	SFGKVGLDRP	SDLVALSGGH	TFGKNQCQFI	IGRLYNFSNT	GLPDPTLNST	
ATPA2	KFSVAVGLN-T	NDLVALSGAH	TFGRARCGVF	NNRLFNFSGT	GSPDPTLNST	
BnPA madura	LLSSLQQLCP	QNGSASVVTN	LDLSTPDAFD	NNYFTNLQSN	NGLLQSDQEL	
PodC Mat	LLSSLQQLCP	QNGSASVVTN	LDLSTPDAFD	NNYFTNLQSN	NGLLQSDQEL	
HRPC1	YLQTLRGLCP	LNGNLSALVD	FDLRTPTIFD	NKYVYNLEEQ	KGLIQSDQEL	
ATP29a	LLSSLQQLCP	QNGSNTGITN	LDLSTPDAFD	NNYFTNLQSN	NGLLQSDQEL	
BnPrx	YLQTLRGLCP	LNGNRSALVD	FDLRTPTVFD	NKYVYNLKEQ	KGLIQTDQEL	
ATPA2	LLSTLQQLCP	QNGSASTITN	LDLSTPDAFD	NNYFANLQSN	NGLLQSDQEL	
BnPA madura	LSD-TGSPTI	PIVTSFASNQ	TQFFEAFALS	MIKMGNISPL	TGSSGEIRQD	
PodC Mat	LSD-TGSPTI	PIVTSFASNQ	TQFFEAFALS	MIKMGNISPL	TGSSGEIRQD	
HRPC1	FSSPNATDTI	PLVRSFANST	QTFEAFVVEA	MDRMGNITPL	TGTQGEIRLN	
ATP29a	FSN-TGSATV	PIVNSFASNQ	TLFFEAFVQS	MIKMGNISPL	TGSSGEIRQD	
BnPrx	FSSPNATDTI	PLVREYADGT	QKFFDAFVEA	MNRMGSITPL	TGTQGEIRLN	
ATPA2	FST-TGSSTI	AIVTSFASNQ	TLFFQAFVQS	MINMGNISPL	TGSNGEIRLD	
BnPA madura	CKVVGQS*	-----				
PodC mat	CKVVGQSTT	QAIELRSGSA	EKTMNLEEM			
HRPC1	CRVVNSNSLL	HDMVEVDFV	SSM-----			
ATP29a	CKVVGQSSA	TEAGDIQLQS	DGPVSVADM			
BnPrx	CRVVNSNSLL	QDVVELVDFV	SSI-----			
ATPA2	CKKVNGS	-----				

Figura 16. Alineamiento de aminoácidos de BnPA con otras peroxidases de plantas. Los sitios conservados se encuentran en rectángulos y los aminoácidos clave en negritas.

El inserto se liberó y se hizo la construcción pET::*BnPA*. El análisis de las transformantes de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* JM109 se muestra en la Figura 17.

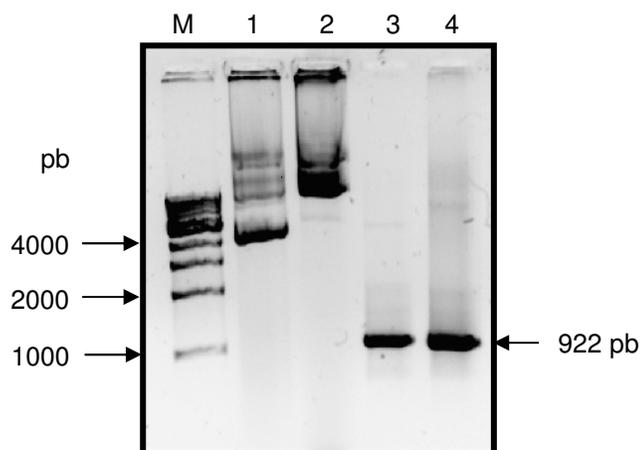


Figura 17. Análisis de transformantes positivas de pET::*BnPA* (M) Marcador de peso molecular 1 kb, (1) y (2) DNA plasmídico de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* JM109 respectivamente, (3) y (4) PCR de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* JM109.

La proteína BnPA, como otras peroxidases recombinantes en *E. coli*, se expresó en forma insoluble como cuerpos de inclusión. Esto se comprobó mediante cromatografía SDS-PAGE de la fracción soluble y de la fracción insoluble tratada y solubilizada en urea 6 M (Figura 18) en donde puede verse que BnPA no está presente en la fracción soluble.

El rendimiento fue de 23.29 mg/L de proteína total en la fracción insoluble medida por Bradford usando seroalbúmina bovina como estándar (Anexo 1) y 5 μ l de muestra, que en este caso fue BnPA solubilizada en urea 6 M.

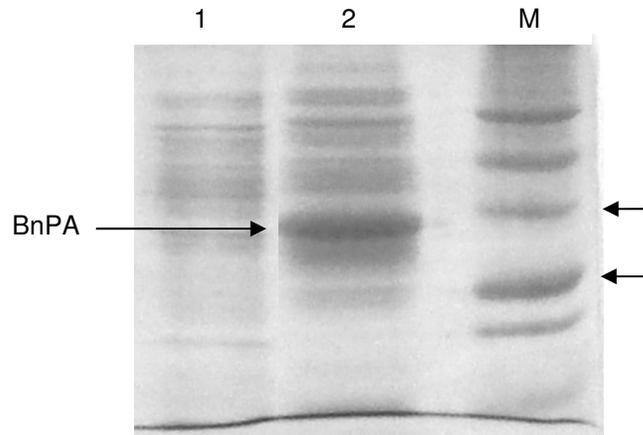


Figura 18. SDS-PAGE de la fracción soluble e insoluble de BnPA (1) sonificado (fracción soluble), (2) BnPA solubilizada en urea (fracción insoluble), (M) marcador de peso.

La fotografía de la Figura 19 se analizó con el software ImageJ (EUA) y la banda correspondiente a la proteína recombinante BnPA de la línea 1 representa el 44% de la proteína total, es decir, un rendimiento de 10.24 mg de BnPA por litro de cultivo. Lin *et al.* (1999) obtuvieron 0.11 mg/L de HRP recombinante producida por *E. coli* y representaba el 20% de la proteína total. Moraski *et al.* (2000), quienes produjeron 5.2 mg/L de una mutante de HRP expresada en *Pichia Pastoris*.

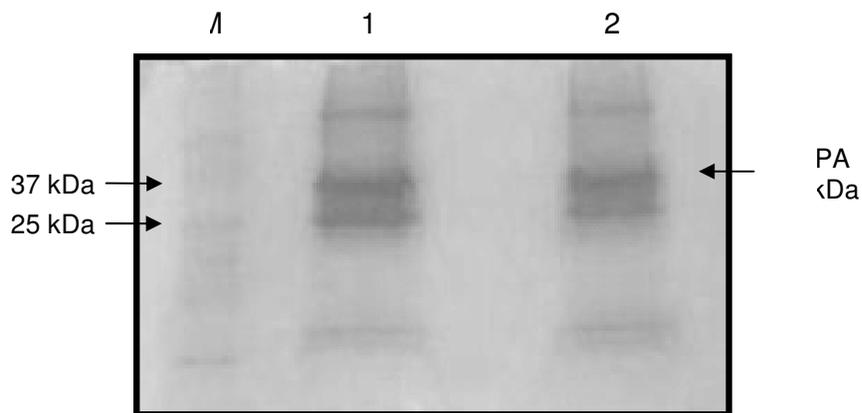


Figura 19. SDS-PAGE de BnPA solubilizada en urea. (M) marcador de peso, (1) BnPA inducida con IPTG 1 mM, (2) BnPA no inducida.

Sin embargo, como puede observarse en la Figura 19, el nivel de expresión de BnPA sigue siendo relativamente bajo aún cuando se agregó IPTG como inductor. Esto puede ser causado por la presencia de los llamados “codones raros” que codifican para Arg, Gly, Ile, Leu y Pro ya que en general, las cepas de *E. coli* utilizadas para expresión heteróloga no tienen los suficientes RNAs de transferencia (tRNA) para estos aminoácidos, causando así el paro de la transcripción, terminación prematura de la traducción, corrimiento del marco de lectura o incorporación deficiente de aminoácidos. Para resolver este problema, existen cepas de *E. coli* como las Rosetta, las cuales incluyen el plásmido pRARE que contiene genes de tRNA para los “codones raros” (Novy *et al.*, 2001). Hushpulia *et al.* (2003) utilizaron *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) CdPlus, encontrando expresión de peroxidasa de tabaco sólo en ésta última. El gen de peroxidasa de tabaco contiene 11 “codones raros” AGA y AGG que codifican para Arg.

Las características de la proteína deducida confirman que el gen *BnPA* clonado codifica para una peroxidasa perteneciente a la clase III. Se trata de una peroxidasa de 306 aminoácidos y su punto isoeléctrico teórico de es 4.6 y su peso molecular es de 32 kDa. Duarte-Vázquez *et al.* (2000) aislaron y purificaron dos peroxidases ácidas (pI ~3) C2 y C3 de nabo de la variedad esculenta, las cuales pesaban 39 y 42 kDa respectivamente; posteriormente, en 2003, los mismos autores identificaron otra peroxidasa (TAP) de pI 2.5 de 49 kDa. Las diferencias en el peso molecular de las isoperoxidasas provenientes de un mismo organismo, se atribuyen a las modificaciones postraduccionales y a la composición y cantidad de los carbohidratos que constituyen las glicosilaciones. De acuerdo con el servidor NETNGLYC 1.0 (www.expasy.ch), BnPA tiene 7 sitios de glicosilación posibles, mientras que la HRPC tiene 8 glicosilaciones.

BnPA fue exitosamente plegada *in vitro*, demostrándose una vez más que los carbohidratos así como las secuencias N y C-terminal no son indispensables para el plegamiento de la enzima (Smith *et al.*, 1990; Hushpulia *et al.*, 2003). Sin embargo, un factor importante es la concentración de calcio. Se sabe que la peroxidasa de

nabo, como muchas otras peroxidases necesita dos átomos de calcio por molécula para que exista actividad enzimática. Esto se demostró removiendo los dos iones calcio de una peroxidasa catiónica de cacahuete (CPRx) y al hacer el análisis por espectroscopía H-NMR se concluyó que la unión del calcio a la enzima causa una reorientación de los residuos de histidina proximal y distal con respecto al sitio activo (Barber *et al.*, 1995).

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

Se midió la actividad enzimática utilizando ABTS como sustrato y H₂O₂ como catalizador. La pendiente ($\Delta A/\text{min}$) fue de 0.01198; entonces, aplicando la ecuación (5), se obtuvo una actividad de 5.35 U de actividad por ml, y dividiendo esta cantidad entre los 10.24 mg/L de proteína (0.01024 mg/ml), se tiene una actividad de 522.46 U/mg de proteína. Smith *et al.* (1990) expresaron una HRPC no glicosilada en *E. coli* y fue capaz de plegarse en una enzima con 630 U/mg de proteína, que representa el 55% de la actividad de la HRPC nativa. PT expresada también en *E. coli* y posteriormente plegada tuvo una actividad de 150 U/mg (Hushpulian *et al.*, 2003).

Debido a que fue expresada en un sistema bacteriano, BnPA no contiene glicosilaciones, sin embargo, ha sido demostrado que los carbohidratos tienen más

influencia en la estabilidad que en la actividad enzimática. Una peroxidasa neutra de nabo, después de ser deglicosilada por diferentes métodos, redujo su actividad enzimática en 50-85%, fue más susceptible a la proteólisis y mostró una ligera disminución en su termoestabilidad (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003). Sin embargo, una HRP deglicosilada no presentó disminución en la termoestabilidad comparada con el control, indicando que las N-glicosilaciones de HRP son necesarias para la estabilidad cinética (Tams y Wlinder, 1998).

Lige *et al.* (2001) analizaron tres mutantes de peroxidasa de cacahuete a las que se les removió una cadena de glicanos en N-60, N-144 y N-185. La ausencia de carbohidratos en N-60 y N-144 redujo la actividad enzimática un 40%, mientras que el carbohidrato en N-185 es vital para la termoestabilidad. Esto concuerda con otro estudio con CPRx en donde fue demostrado que no todos los carbohidratos son necesarios para la actividad enzimática (van Huystee *et al.*, 2004).

Actualmente no se tiene muy claro si las glicosilaciones tienen un efecto en el plegamiento de la peroxidasa pero algunos estudios sugieren que los carbohidratos incrementan la rigidez de la proteína, reduciendo así las fluctuaciones dinámicas de la molécula (Rudd *et al.*, 1994), es por esto que la desnaturalización de HRP deglicosilada es 2-3 veces más lenta que la HRP nativa (Lige *et al.*, 2001).

La Figura 20 muestra los productos de amplificación de *BnPA* con los oligos PET22F y PET22 cuyo amplicón es de 940 pb. Los productos de PCR con los nuevos sitios de restricción se ligaron con el vector pCRII-TOPO y el DNA plasmídico de 5 transformantes de *E. coli* Dh5 α se muestra en la Figura 21.

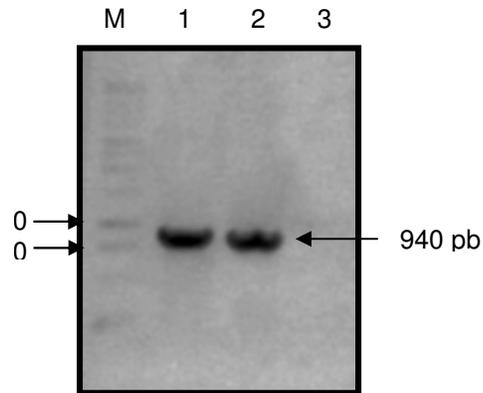


Figura 20. Amplificación de *BnPA* a partir de TOPO::*BnPA* con oligos pET22F y pET22R. (M) marcador de peso, (1) y (2) productos de PCR, (3) control negativo.

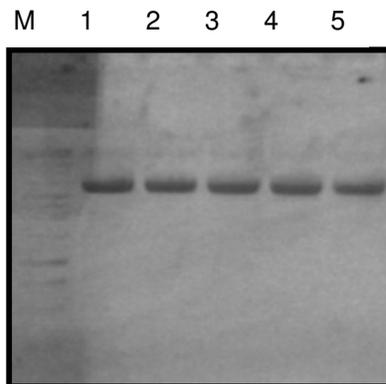


Figura 21. Análisis de transformantes con TOPO2::*BnPA*. (M) marcador de peso molecular, (1-5) DNA plasmídico de 5 colonias.

Para comprobar la presencia del gen *BnPA* se hizo digestión con *EcoRI*, enzima que libera el inserto de la construcción TOPO2::*BnPA* (Figura 22).

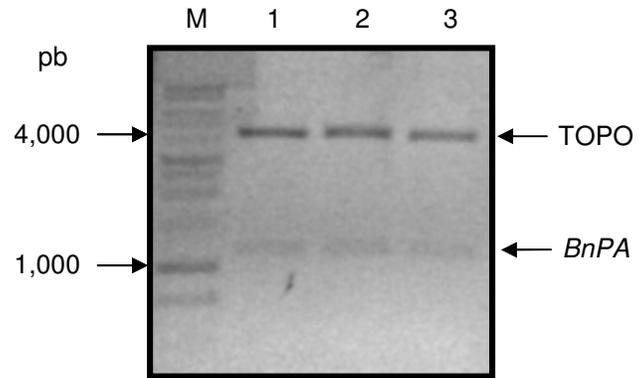


Figura 22. Digestión de TOPO2::*BnPA* con *EcoRI*. (M) marcador de peso, (1) muestra 3, (2) muestra 4 (3) muestra 5.

7. Conclusiones

Se obtuvo la secuencia completa del cDNA que codifica para una isoperoxidasa ácida de nabo y se logró subclonarla e insertarla en un vector de expresión.

Se obtuvo la proteína recombinante de nabo BnPA sin glicosilaciones la cual fue purificada a partir de cuerpos de inclusión y cuyas características concuerdan con aquellas de las peroxidases de plantas.

Se logró implementar en el laboratorio el sistema de clonación de una proteína recombinante.

Se realizó exitosamente el plegamiento *in vitro* de BnPA lo cual fue confirmado midiendo la actividad enzimática utilizando ABTS como sustrato. El rendimiento de la proteína BnPA fue 10 mg de BnPA/L de medio y 522 U actividad/mg de proteína, es decir, 5,220 U/L.

Se recomienda expresar el gen de la proteína madura con una secuencia de secreción, lo que podría representar una mayor eficiencia de recuperación.

8. LITERATURA CITADA

- Altschul, S. F., Madden T.L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 2002. *Short Protocols in Molecular Biology*. 5^a Ed. Wiley, EUA.
- Barber, K. R., Rodríguez Marañón, M. J., Shaw, G. S., and van Huystee, R. B. 1995. Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 232:825-833.
- 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.
- Cervantes Avilés, O. 2007. Determinación de los niveles de expresión de una isoperoxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe) a diferentes tiempos de maduración. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. UAQ.
- Costa, M. M. R, Hilliou, F., Duarte, P., Pereira, L. G. Almeida, I., Leech, M., Memelink, J., Barceló, A. R., Sottomayor, M. 2008. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class iii peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 146: 403-417.
- Dowd, P. F., and Johnson, E. T. 2005. Association of a specific peroxidase isozyme with maize stress and disease resistance responses, genetic identification, and identification of a cDNA coding for the isozyme. *J. Agric. Food Chem.* 53:4464-4470.
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B. E., Regalado, C., and Whitaker, J. R. 2000. Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. esculenta D.C.) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* 48:1574-1579.
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B. E., Regalado, C., and Whitaker, J. R. 2001. Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme 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-Domínguez, A., García-Almendárez, B. E., and Regalado, C. 2003. Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *J. Agric. Food Chem.* 51:5096-5102.

- Duarte-Vázquez, M. A., García-Padilla, S., García-Almendárez, B. E., and Regalado, C. 2007. Purification of natural plant peroxidases and their physiological roles. *Func. Plant Sci. Biotechnol.* 1:18-31.
- Dunford, H. B. 1999. Heme peroxidases. Wiley-Vch. Canadá.
- Duroux, L., and Welinder, K. G. 2003. Peroxidase gene family in plants: A phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* 57:397-407.
- ExPASy Proteomics Server. Swiss Institute of Bioinformatics. www.expasy.ch. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2009.
- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., and Poulos T. L. 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 4: 1032-1038.
- Gazaryan, I. G., Dosseva, V. V., Galkin, A. G., and 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 Lett.* 354:248:250.
- Gazaryan, I. G., Gorton, L., Ruzgas, T., Csoregi, E., Schuhmann, W., Lagrimini, L. M., Khushpul'yan, D. M., and Tishkov, V. I. 2004. Tobacco Peroxidase as a new reagent for amperometric biosensors. *J. Anal. Chem.* 60:558-566.
- Hushpulian, D.M., Savitski, P.A., Rojkova, A.M., Chubar, T.A., Fechina, V. A., Sakharov, I. Y., Lagrimini, L. M., Tishkov, V. I., and Gazaryan, I. G. 2003. Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies. *Biochemistry.* 68: 1480-1487.
- Invitrogen. 2008. Trizol reagent. www.invitrogen.com. Fecha de consulta: 15 de mayo de 2008.
- Kumar, S., Dutta, A., Sinha, A. K., and Sen, J. 2007. Cloning, characterization and localization of a novel basic peroxidase gene from *Catharanthus roseus*. *FEBS J.* 274:1290-1303.
- Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M., and Rothstein, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7542-7546.
- Lige, B., Ma, S., and van Huystee, R. B. 2001. The effects of the site-directed removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function. *Arch. Biochem. Biophys.* 386:17-24.

- Lin, Z., Thorsen, T., and Arnold, F. H. 1999. Functional expression of horseradish peroxidase in *E. coli* by directed evolution. *Biotechnol. Prog.* 15: 467-471.
- Miland, E., Smyth, M. R., and Fágáin, C. O. 1996. Phenol removal by modified peroxidases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 67:227-236.
- Morawski, B., Lin, Z., Cirino, P., Joo, H., Bandara, G., and Arnold, F. H. 2000. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 13:377-384.
- Novagen. 2006. pET system manual. 11^a edición. <http://www.scribd.com/doc/3986983/pET-System-Manual-11th>. Fecha de consulta: 8 de mayo de 2008.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., Mierendorf, R. 2001. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations. Newsletter of Novagen, Inc.* Number 12.
- Østergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattssoni, O., Petersen, M., Welinder, K. G., Mundy, J., Gajhede, M., and Heriksen, A. 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Molec. Biol.* 44:231-243.
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., and Dunand, C. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry.* 65:1879-1893.
- 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., and Dunand, C. 2007. PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry.* 68:1605-1611.
- Promega. 2007. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector. Technical bulletin. <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>. Fecha de consulta: 8 de mayo de 2008.
- Regalado, C., García-Almendárez, B. E., and Duarte-Vázquez, M. A. 2004. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 3:243-256.
- Romero-Gómez, S., Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendarez, B. E., Mayorga-Matinez, L., Cervantes-Avilés, O., and Regalado, C. 2008. A putative peroxidase cDNA from turnip and analysis of the encoded protein sequence. *Plant Foods Hum. Nutr.* 63:157-162.

- Rudd, P. M., Joao, H. C., Coghill, E., Fiten, P., Saunders, M. R., Openakker, G., and Dwek, R. A. 1994. Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. *Biochemistry*. 33:17-22.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning*. 3^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Capítulos 1, 15.
- Sang, S., Yang, C. S., and Ho, C. T. 2004. Peroxidase mediated oxidation of catechins. *Phytochem. Rev.* 3:229-241.
- Singh, N. and Singh, J. 2003. A method for large scale purification or turnip peroxidase and its characterization. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 33:125-135.
- Smith, A. T., Santama, N., Dacevs, S., Edwards, M., Bray, R. C., Thomeleyn, R. N. F. and 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 Ca²⁺ and heme. *J. Biol. Chem.* 265:13335-13343.
- Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185: 60-89.
- Tams, J. W., and Welinder, K. G. 1998. Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. *FEBS Lett.* 421:234-236.
- Tijssen, P. 1993. Practice and theory of enzyme immune assays en *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H. Elsevier. London. Vol. 15.187-188.
- van Huystee, R. B., Sun, Y., and Lige, B. 2002. A retrospective look to the cationic peanut peroxidase structure. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 335-354.
- van Huystee, R. B., Roig, M. G., Shnyrov, V. L., and Sakharov, I. Y. 2004. Peroxidase stability related to its calcium and glycans. *Phytochem. Rev.* 3:19-28.
- Veitch, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 65:249-259.
- Welinder, K. G., and Mazza, G. 1976. Amino acid sequences of heme-linked, histidine containing peptides of five peroxidases from horseradish and turnip. *Eur. J. Biochem.* 73: 353-358.

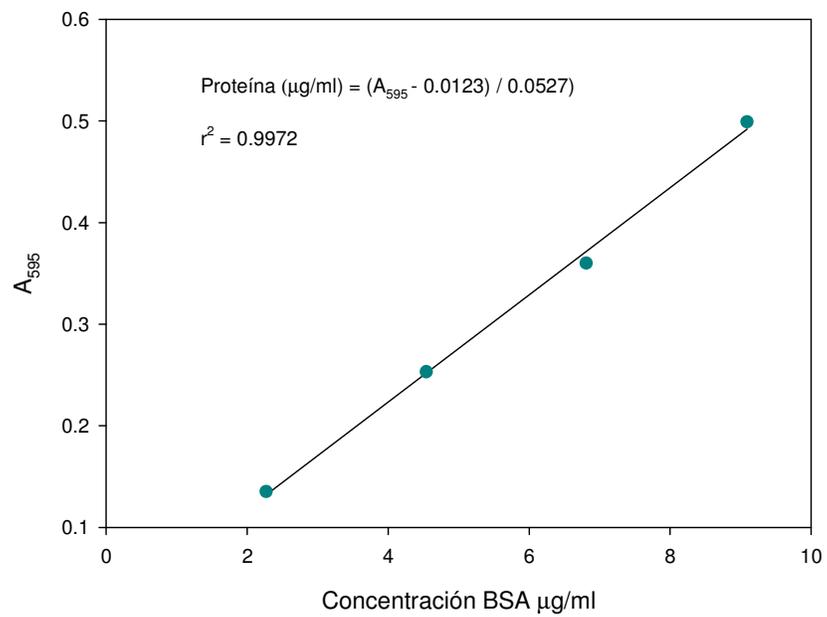
- Welinder, K. G. 1985. Plant peroxidases, their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 151: 497-504.
- Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjærsgard, I. V. H., Jensen, R.B., Rasmussen, S.K., Jespersen H.M., and Duroux, L. 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 269:6063-6081.
- Wong, D. W. S. 1995. Food enzymes, structure and mechanism. Chapman & Hall. Nueva York. Capítulo 11. pp. 321-340.
- Wu, E., Lu, J., Wei, Y., Wang, J., Lin, J., Cao, S., Sun, X., and Tang, K. 2006. Isolation and characterization of the first putative peroxidase gene from oilseed rape (*Brassica napus*) which is highly homologous to HRPC. *Biosci. Rep.* 26:263-280.
- Xie, L, Miller, M.L., Chatterjee, Ch., Averin, O., Kelleher, N.L., and van der Donk, W.A. 2004. Lacticin 481: *In vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science.* 303:679-681.
- Yamauchi, N., Funamoto, Y., and Shigyo, M. 2004. Peroxidase mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. *Phytochem. Rev.* 3:221-228.

Anexo 1

Curva de calibración

Estándar	Concentración	A ₅₉₅
1	2.27 µg/ml	0.13515
2	4.54 µg/ml	0.2530
3	6.81 µg/ml	0.35995
4	9.09 µg/ml	0.49915

Curva de calibración Bradford



Anexo 2



GenBank: AAR15704.3

peroxidase [Brassica napus]

- [Comment](#)
- [Features](#)
- [Sequence](#)

LOCUS AAR15704 306 aa linear PLN 03-JUN-2009

DEFINITION peroxidase [Brassica napus].

ACCESSION AAR15704

VERSION AAR15704.3 GI:238837078

DBSOURCE accession [AY423440.3](#)

KEYWORDS .

SOURCE Brassica napus (rape)

ORGANISM [Brassica napus](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta;
Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core
eudicotyledons;
rosids; eurosids II; Brassicales; Brassicaceae; Brassica.

REFERENCE 1 (residues 1 to 306)

AUTHORS Regalado,C., Medina Valle,A., Romero Gomez,S.,
Garcia-Almendarez,B.E., Cervantes-Aviles,O. and Mayorga-
Martinez,L.

TITLE Cloning a cDNA encoding a turnip peroxidase and structural
analysis
of deduced protein

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (residues 1 to 306)

AUTHORS Regalado,C., Garcia-Almendarez,B.E., Barba-de-la-Rosa,A.P.,
Mayorga-Martinez,L. and Duarte-Vazquez,M.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (23-SEP-2003) Investigacion y Posgrado en Alimentos,
Universidad Autonoma de Queretaro, C.U., Cerro de las Campanas
S/N,
Queretaro, Qro. 76010, Mexico

REFERENCE 3 (residues 1 to 306)

AUTHORS Regalado,C., Medina Valle,A., Romero Gomez,S.,
Garcia-Almendarez,B.E., Cervantes-Aviles,O. and Mayorga-
Martinez,L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (17-OCT-2007) Investigacion y Posgrado en Alimentos,
Universidad Autonoma de Queretaro, C.U., Cerro de las Campanas
S/N,
Queretaro, Qro. 76010, Mexico

REMARK Sequence update by submitter

REFERENCE 4 (residues 1 to 306)

AUTHORS Regalado,C., Medina Valle,A., Romero Gomez,S.,
Garcia-Almendarez,B.E., Cervantes-Aviles,O. and Mayorga-
Martinez,L.

TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (03-JUN-2009) Investigacion y Posgrado en Alimentos, Universidad Autonoma de Queretaro, C.U., Cerro de las Campanas

S/N, Queretaro, Qro. 76010, Mexico

REMARK Sequence update by submitter
 COMMENT On Jun 3, 2009 this sequence version replaced gi:[158380229](#).
 Method: conceptual translation supplied by author.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..306
 /organism="Brassica napus"
 /cultivar="purple top white globe"
 /db_xref="taxon:[3708](#)"
 /tissue_type="root"

[Protein](#) <1..306
 /product="peroxidase"
 /EC_number="[1.11.1.7](#)"
 /function="plays roles in lignification, catabolism of indole-3-acetic acid, disease and pathogen response"
 /name="redox protein"

[Region](#) 1..299
 /region_name="secretory_peroxidase"
 /note="Secretory peroxidases. Horseradish peroxidase

and related secretory peroxidases belong to class III of
 the plant heme-dependent peroxidase superfamily. All
 members of the superfamily share a heme prosthetic group and catalyze a multistep oxidative...; cd00693"
 /db_xref="CDD:[29388](#)"

[Site](#) order (34..35,41,73,139,169,173..175)
 /site_type="other"
 /note="heme binding site"
 /db_xref="CDD:[29388](#)"

[Site](#) order (38,41..42,70,139,169,246)
 /site_type="active"
 /db_xref="CDD:[29388](#)"

[Site](#) order (38,68..69,139..142)
 /site_type="other"
 /note="substrate binding pocket"
 /db_xref="CDD:[29388](#)"

[Site](#) order (43,50,52,170,221,224,229)
 /site_type="other"
 /note="calcium binding sites"
 /db_xref="CDD:[29388](#)"

[CDS](#) 1..306
 /gene="podC"
 /coded_by="AY423440.3:<1..921"
 /note="donor H2O2 oxidoreductase"

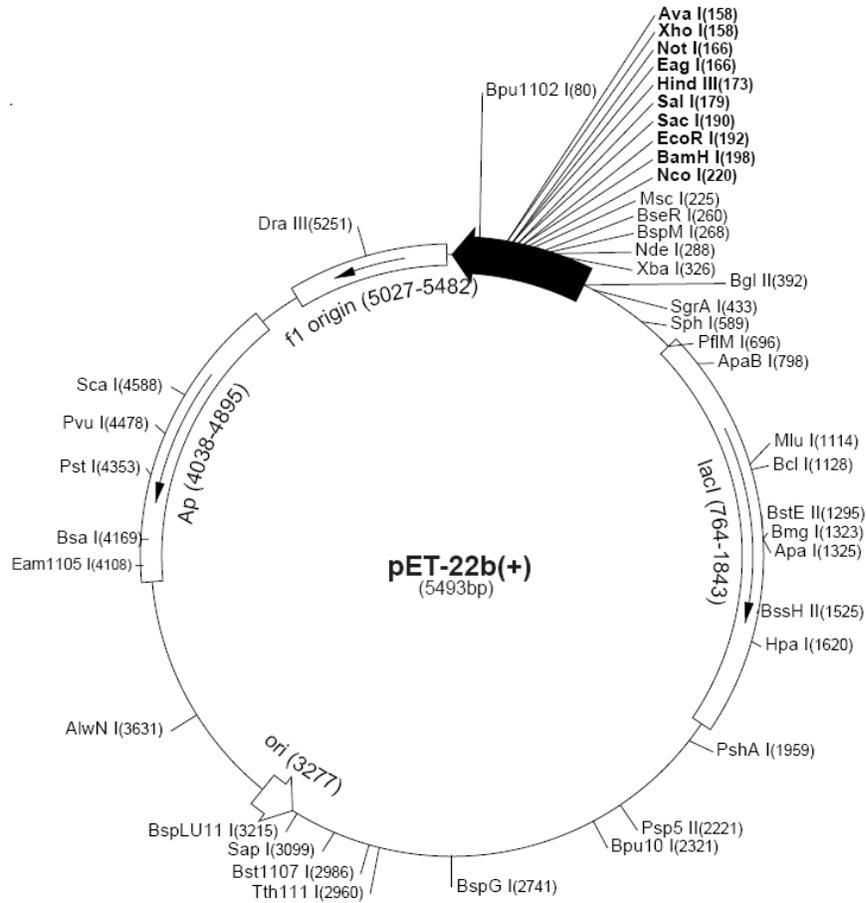
ORIGIN

```

1 qlnptfysgt cpnvsaihrs tieqapqsdp rigaslirlh fhdcfvkgcd gslllddsan
61 iqseknvavn anstrgfnvv ddiktalena cpgivscsdi lalaseasvs laggptwavl
121 lgrrdgltn lsgantglps pfegitnita kftavglntt dvvvlsgaht fgraacatfn
181 nrlfnfngtg spdptlnstl lsslqqlcpq ngsasvvtnl dlstpdafdn nyftnlqsn
241 gllqsdqell sdtgsptipi vtsfasnqtq ffeafalsmi kmgnispltg ssgeirqdck
301 vvnngqs

```

Anexo 4



T7 promoter primer #69348-3

Bgl II T7 promoter lac operator *Xba* I *rbs*

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGACCGGATAACAATTCCCCTCAGAAATAATTTGT⁺TAAC⁺TTAAGAAGGAGA

Nde I *Bsp* M I *pel*R leader *Msc* I *Nco* I *Bam* H I *Eco* R I *Sac* I

TATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTCCTGCTGGTCTGCTGCTCTCGCTGCCAGCCGGATGGC⁺ATGGATATCGGAAATAATTCGGATCCGAATTCGAGC⁺CC

MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaGlyMetAspIleG yIlaAsnSerAspProAsnSerSerSer

Sal I *Hind* III *Eag* I *Ava* I* *His* tag *Bpu* 102 I

Noi I *Xho* I

GTCCACAAAGCTTCCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACTAGATCCGGCTCCTAACAAAGCCCGAAAGCAAGCTCAGTTGCTCTGCTCCACCCTGAGCAAT⁺AAC

ValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisHisEnd

T7 terminator

TAGCATAACCCC⁺TGGGGCCCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTT⁺3

T7 terminator primer #69337-3

pET-22b(+) cloning/expression region

Mapa y secuencia del vector 22b(+) para secreción.

CLONACIÓN DE UNA ISOPEROXIDASA DE NABO (*Brassica napus* var. purple top white globe) en un sistema bacteriano

Alejandra Medina Valle*, Blanca García Almendárez, Sergio Romero Gómez, Carlos Regalado González⁺. Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, CU, Cerro de las Campanas s/n Col. las Campanas. Querétaro 76010 Qro.

*alem48@hotmail.com, ⁺carlosr@uaq.mx

Palabras clave: isoperoxidasa, nabo, expresión.

Introducción. En las plantas, diversos procesos fisiológicos son mediados por enzimas llamadas peroxidadas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos utilizando H_2O_2 como aceptor de electrones. Las peroxidadas son utilizadas en diversas aplicaciones industriales y analíticas (1). La fuente principal de peroxidadas es el rábano picante (*Armoracia rusticana*) que no crece bien en México por lo que se han buscado fuentes alternativa de entre ellas, las isoperoxidasas de nabo (*Brassica napus*) presentan buena actividad enzimática y son termoestables (1). La clonación de peroxidadas de plantas en *Escherichia coli* se ha llevado a cabo con éxito, así como su posterior plegamiento y activación (2). El objetivo de este trabajo es clonar una isoperoxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe), expresarla en *E. coli*. y plegarla *in vitro* para obtenerla en forma activa.

Metodología. Se cosechó nabo de 5 semanas y se extrajo RNA total por el método del trizol. Mediante reacción de RT-PCR se sintetizó el DNA complementario (cDNA) el cual se utilizó como plantilla para amplificar el gen de peroxidasa (*BnPA*) utilizando oligonucleótidos específicos: PA1F 5'-aataaatggctgtagcaaaactcgtc-3' y PA1R 5'-ctagtctcgcattttcacatttc-3'. Se realizó la construcción pGEM-T::BnPA con la que se transformó por choque térmico *E. coli* JM109 y se extrajo DNA plasmídico. Se comprobó la presencia del inserto por PCR y se envió para su secuenciación. Se diseñaron oligonucleótidos para insertar la secuencia en el vector de expresión pET28a usando sitios para *NdeI* y *HindIII*, PA2F: 5'-acatatgcagttaaaccaacgttttactc-3' y PA2R: 5'-aaagcttctaggattgtccattaaccaccttac-3' (las secuencias de restricción se encuentran subrayadas).

Resultados y discusión. Se obtuvo RNA total de concentración 2.35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una relación A_{260}/A_{280} mayor a 2. La reacción de PCR con PA1F y PA2R amplificó un fragmento de 1098 pb correspondiente al gen *BnPA*. La amplificación con PA2F y PA2R produjo una banda de 932 pb correspondiente al tamaño del gen *BnPA* que codifica para la proteína madura. El análisis de la secuencia nucleotídica de BnPA revela una homología del 99% con la peroxidasa de nabo reportada en la base

de datos NCBI con número de acceso AY423440 (3), y 89% con el gen ATP29a de *A. thaliana* (No. de acceso AY519360). La proteína deducida consta de 358 aminoácidos, peso molecular de 37 kDa y pI de 4.65. Las diferencias en homología no se encuentran dentro de los sitios conservados entre las peroxidada de plantas, y se deduce que no afectarán el plegamiento o la actividad enzimática. Se liberó el inserto de pGEM-T::BnPA con *NdeI* y *HindIII* y se hizo la construcción pET28::BnPA y actualmente trabajamos en la expresión de la proteína.

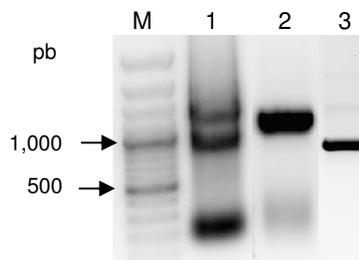


Fig. 1. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas), (1) RNA total, (2) cDNA, 1098 pb, (3) producto de PCR con oligos PA2F y PA2R, 932 pb.

Conclusiones. Se extrajo RNA de buena calidad a partir de nabo y permitió sintetizar un cDNA. Se logró ligar este cDNA en un vector de clonación, y se obtuvo la secuencia que codifica para una peroxidasa ácida de nabo.

Agradecimiento. A la beca otorgada por CONACyT a Medina-Valle A.

Bibliografía.

- Regalado, C., García-Almendárez, B.E., y Duarte-Vázquez, M.A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 3 (1-2): 243-256.
- Smith, A.T., Santama, N., Dacevs, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thomeleyn, R.N.F. y 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 (22): 13335-13343.
- Romero-Gómez, S., Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendárez, B.E., Mayorga-Martínez, L., Cervantes-Avilés, O., y Regalado, C. (2008). A putative peroxidase cDNA from Turnip and Analysis of the encoded protein sequence. *Plant Foods Hum Nutr.* 63 (4): 157-162.

