



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"EXPRESIÓN Y RECUPERACIÓN DE UNA PROTEÍNA
RECOMBINANTE INSERTADA EN *E. coli* BL21 (DE3)"**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ALEJANDRA MEDINA VALLE

DIRIGIDA POR

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2008.

BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.

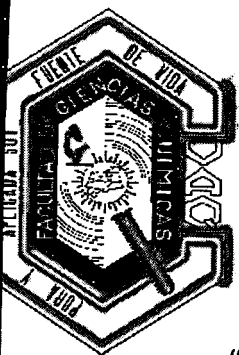
No. Adq. 472045

No. Título _____

Clas. TS

579.3

u491e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPRESIÓN Y RECUPERACIÓN DE UNA PROTEÍNA
RECOMBINANTE INSERTADA EN *E. coli* BL21 (DE3)”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

ALEJANDRA MEDINA VALLE

DIRIGIDA POR

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

SINODALES

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ
DIRECTOR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
SINODAL

Dr. SERGIO ROMERO GÓMEZ
SINODAL

Q. en A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Blanca García por su valiosa tutoría y guía no sólo durante la realización de éste trabajo de tesis, sino durante la licenciatura.

Al Dr. Carlos Regalado por su apoyo y confianza al permitirme formar parte del laboratorio de Biotecnología de Alimentos.

Al Prof. Rafael Pérez por sus enseñanzas y buena fe durante la licenciatura.

Al Dr. Sergio Romero por optimismo y sus valiosas aportaciones para realizar mejoras a este trabajo.

A mis compañeros de licenciatura Lucy, Lalo, Angel, Pom, Pablo, Bere, Aida, Peco, Daniel, Aby y David por su invaluable amistad y momentos inolvidables.

A mis amigos Paloma, Ale, Mota, Luz y Efraín por ser excelentes personas, brindarme su amistad, apoyo y dejarme formar parte de sus vidas.

A Fernando, por creer en mí.

A mis padres, por brindarme su amor, confianza, comprensión y apoyo incondicional durante toda mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Nisina	3
II.1.1 Características generales	3
II.1.2 Estructura	4
II.1.3 Biosíntesis	4
II.1.4 Modo de acción	8
II.2 Expresión de genes en <i>Escherichia coli</i>	11
II.2.1 Control de la transcripción	13
II.2.2 Regulación de la transcripción en vectores de expresión	14
II.2.3 Sistema de vectores pET	14
II.2.4 Expresión de genes inducidos por IPTG	17
II.2.5 Efecto de la temperatura en la expresión de genes en <i>E. coli</i>	19
II.2.6 PCR como técnica de amplificación de genes.	19
II.3 Proteínas de fusión	20
II.3.1 Etiquetas	21
II.3.2 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)	22
II.4 Caracterización de proteínas por electroforesis en gel de acrilamida	23
II.5 Proceso de clonación y expresión del gen <i>nisA</i> usando el vector pET-28	26
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVOS	29
IV.1 General	29

IV.2 Específicos	29
V. METODOLOGÍA	30
V.1 Materiales	30
V.2 Métodos	30
V.2.1 Verificación del sistema de expresión de las células transformadas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) con el vector <i>nisA/pET</i>	30
V.2.2 Electroforesis SDS-PAGE en sistema tris-tricina	31
V.2.3 Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)	33
V.2.4 Calidad, integridad y cuantificación de DNA plasmídico	34
V.2.5 Verificación de la presencia del DNA inserto	35
V.2.6 Conservación de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada	37
V.2.7 Inducción de los niveles de <i>nisA</i> a diferentes temperaturas	39
V.2.8 Purificación de la proteína recombinante mediante IMAC	40
V.2.9 Detección de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE	41
VI. RESULTADOS	42
VI.1 Cultivo y lisis de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) conteniendo <i>nisA/pET</i>	42
VI.2 Calidad y concentración de DNA	44
VI.3 Conserva de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) en chaquiras de vidrio y membrana	44
VI.4 Inducción y estudio de los niveles de <i>nisA</i>	45
VI.4.1 Cinética a 14°C	45
VI.4.2 Cinética a 25°C	47
VI.4.3 Cinética a 37°C	49
VI.5 Purificación de la proteína recombinante	52
VII. DISCUSIÓN	54
VIII. CONCLUSIÓN	58
IX. BIBLIOGRAFÍA	60
X. ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la nisina	5
2	Modificaciones post-traduccionales de la nisina	7
3	Biosíntesis y regulación de la producción de nisina	9
4	Mecanismo de acción de nisina mediante unión a lípido II	10
5	Mapa del vector pET 28a(+)	16
6	Esquema del proceso de expresión por inducción con IPTG	18
7	Diagrama del proceso de clonación y expresión de nisA utilizando el vector pET 28	27
8	Diseño de oligos iniciadores para <i>nisA</i>	36
9	Electroforesis en gel de acrilamida de lisado y células de <i>E.coli</i> BL21 (DE3)	42
10	Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR usando DNA plasmídico	43
11	Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR directo de colonia	45
12	Cinética del cultivo a 14 °C	46
13	Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de cultivo a 14 °C	47
14	Cinética del cultivo a 25 °C	48
15	Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de cultivo a 25 °C	49
16	Cinética del cultivo a 37 °C	50
17	Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de cultivo a 37 °C	51
18	Electroforesis en gel de acrilamida de muestras purificadas por IMAC	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Preparación de gel separador y gel concentrador para electroforesis usando el sistema tris-tricina	32
2	Condiciones para PCR de DNA plasmídico	37
3	Condiciones para PCR directo de colonia	38
4	Mediciones de absorbancia de DNA plasmídico	44
5	Absorbancia de muestras tomadas durante cinética a 14 °C	46
6	Absorbancia de muestras tomadas durante cinética a 25° C	48
7	Absorbancia de muestras tomadas durante cinética a 37° C	50
8	Comparación de las cinéticas a diferentes temperaturas	51
9	Absorbancia a 280 nm de fracciones colectadas durante la elución de la muestra en cromatografía IMAC	52

RESUMEN

La nisina es un polipéptido que posee propiedades antimicrobianas principalmente sobre bacterias Gram positivas incluyendo aquellas formadoras de esporas. Inhibe el crecimiento de algunos microorganismos patógenos para el hombre tales como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* entre otros. Además posee actividad esporocida. Es por esto que la nisina es utilizada como conservador en alimentos. Es producida de manera natural por la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* sp. *lactis*.

En estudios anteriores el gen estructural *nisA* que codifica para dicho antibiótico, fue clonado y expresado de manera heteróloga en *Escherichia coli*. En el presente trabajo de tesis se realizó la expresión heteróloga del gen *nisA* en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) y se estudió el efecto de las temperaturas 14, 25 y 37 °C sobre los niveles de este gen. Asimismo, se recuperó y purificó parcialmente la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC).

I. INTRODUCCIÓN

A través de la evolución los microorganismos han desarrollado distintas estrategias para competir por nutrientes en su medio ambiente. Las sustancias antagónicas que los microorganismos producen para dominar en su hábitat pueden ser de naturaleza muy diversa, por ejemplo los antibióticos y productos del metabolismo como ácidos orgánicos y bacteriocinas.

Las bacteriocinas son proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. En la naturaleza existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias. Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha; además, una misma especie puede producir diferentes tipos de bacteriocinas.

Una clase de bacteriocinas, los lantibióticos son agentes antimicrobianos derivados de péptidos, los cuales son sintetizados en el ribosoma y posteriormente modificados para obtener su forma activa. El nombre de lantibióticos fue introducido en 1988, como una abreviación para péptidos antibióticos que contienen el aminoácido lantionina.

El lantibiótico más conocido, la nisina, es producida por varias cepas de *Lactococcus lactis*, una bacteria ácido láctica Gram positiva. La nisina ha sido usada como conservador en la industria alimentaria desde hace más de 50 años en más de 80 países.

Los esfuerzos para entender la base molecular de su acción la han convertido en el lantibiótico más ampliamente estudiado y a la fecha no se ha desarrollado resistencia bacteriana significativa contra ella.

Las principales dificultades del uso de la nisina a nivel industrial son la baja concentración de ésta en las preparaciones comerciales, (2.5%) y el bajo nivel de

producción por parte de la cepa productora *L. lactis*. Los lantibióticos son moléculas muy interesantes, algunos por su estabilidad, espectro de inhibición. De manera reciente se ha estudiado el proceso de su biosíntesis, es decir saber cuáles son los genes involucrados con el objetivo de entender mejor el mecanismo de producción y regulación.

Debido al amplio conocimiento de su genética, bioquímica y biología molecular, *Escherichia coli* es el sistema de elección para la expresión de muchas proteínas heterólogas. Los cultivos de *E. coli* son sencillos y baratos y muchas proteínas foráneas son bien toleradas y pueden ser expresadas en altos niveles.

Para propósitos de purificación es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes cantidades de cultivo antes de iniciar la purificación. La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Las condiciones de incubación, como son la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, influyen fuertemente en la producción de bacteriocinas activas. Las condiciones óptimas de producción deben ser determinadas para cada organismo productor. La producción de proteínas recombinantes de fusión por *Escherichia coli*, facilitan su purificación y puede lograrse en una sola etapa, y así llevar a cabo su caracterización posterior.

II. ANTECEDENTES

II.1 Nisina

II.1.1 Características generales

Descubierta por Rogers y Whittier en 1928, la nisina A es considerada no tóxica para los mamíferos incluyendo el hombre. La toxicidad de la nisina administrada vía oral en ratas es muy baja (LD_{50} 7 g/kg de peso), similar a la de sal común (O'Sullivan y col., 2002; Koponen, 2004).

Esta bacteriocina está aprobada por la FDA (Food and Drugs Administration) y el organismo productor, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tiene el grado GRAS (generalmente reconocido como seguro). Es utilizada como conservador principalmente en quesos procesados, productos lácteos y alimentos enlatados (número aditivo alimentario E234). En estos casos, la bacteriocina es incorporada al producto como un concentrado en polvo preparado a partir de leche descremada fermentada llamado Nisaplin (O'Sullivan y col., 2002).

La nisina A es soluble y estable en soluciones acuosas a pH ácido, pero a pH básico o neutro pierde su actividad. Por ejemplo, es 228 veces más soluble a pH 2 que a pH 8 (Cleveland y col., 2001).

La nisina es activa a bajas concentraciones (concentración mínima inhibitoria en el rango nanomolar) contra varias cepas de bacterias Gram positivas incluyendo cepas resistentes a antibióticos [*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA)] y patógenos como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, entre otros (Xie y col., 2002; Li y col., 2006).

II.1.2 Estructura

La nisina es un antibiótico perteneciente a la clase I ya que contiene el aminoácido lantionina el cual consiste en dos residuos de alanina unidos mediante un enlace tioéter que conecta sus carbonos β .

Consta de 34 aminoácidos y tiene carga positiva (+4). Contiene 3 aminoácidos deshidratados y 5 anillos tioéter. El péptido líder está constituido por 23 aminoácidos (Muñoz-Rojas, 2002; Chatterjee y col., 2005) (Figura 1).

Su peso molecular es de 3353 Da, sin embargo también puede existir como dímero (6700 Da) o tetrámero (13400 Da), lo que sugiere que puede haber interacción entre los dehidroaminoácidos y los grupos amino de 2 o cuatro moléculas de nisina (Koponen, 2004).

Las dos formas más comunes de nisina son la nisina A y Z las cuales difieren por un solo aminoácido en posición 27, que es histidina (His) en la nisina A y asparagina (Asn) en la nisina Z. La nisina Q difiere en cuatro posiciones (Val15, Leu21, Asn27 y Val30) de la nisina A (Ala15, Met21, His27 e Ile30) (Chatterjee y col., 2005).

II.1.3 Biosíntesis.

El péptido precursor (prepéptido) NisA consta de una región estructural C-terminal que sufre modificaciones postraduccionales y una secuencia líder N-terminal relativamente larga que contiene 23 residuos de aminoácidos que permanece intacta durante la biosíntesis (Engelke y col., 1992; Chatterjee y col., 2005) (Figura 2).

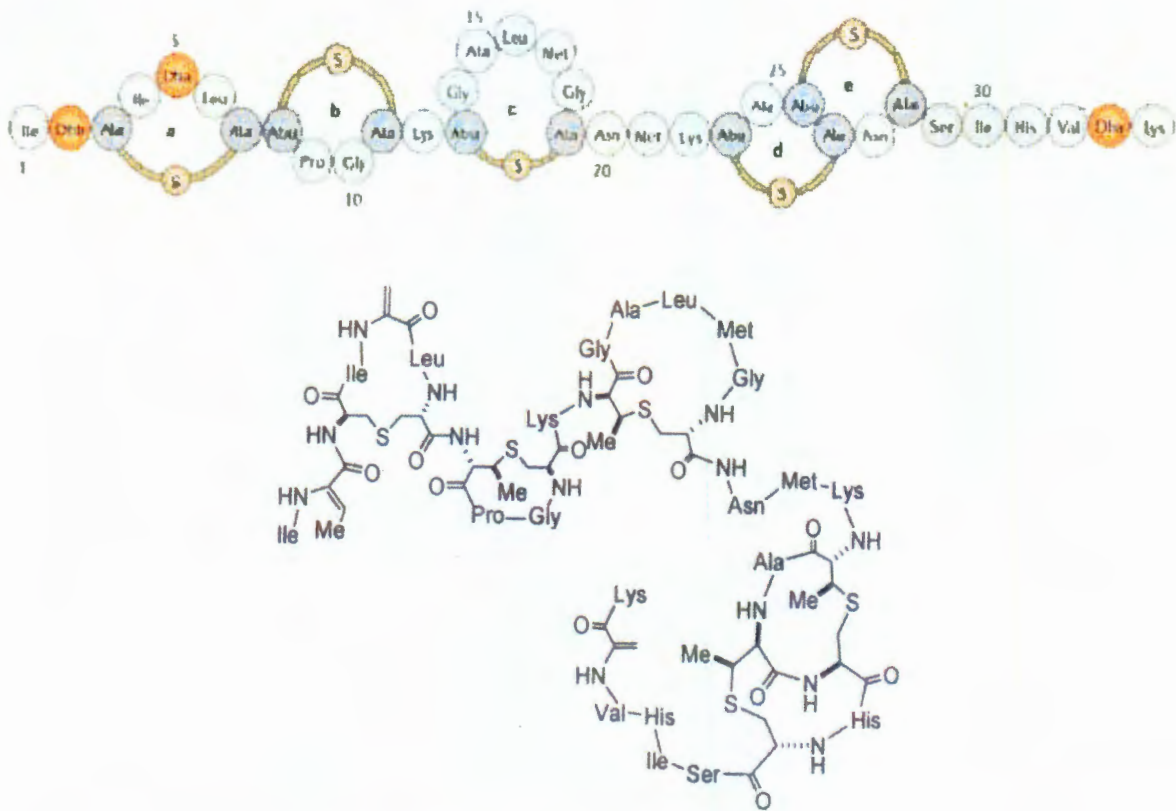


Figura 1. Estructura de la nisina (Breukink y Kruijff, 2006; Chatterjee y col., 2005)

La maquinaria biosintética que lleva a cabo las modificaciones postraduccionales consiste en la enzima deshidratasa NisB y la enzima ciclasa NisC. El prepéptido NisA es sintetizado en el ribosoma, posteriormente NisB cataliza la deshidratación de los residuos de serina y treonina los cuales se transforman en dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb) respectivamente (Koponen y col., 2002; Zhou y van der Donk, 2002).

NisC cataliza la adición conjugada de residuos de cisteína de manera estereoespecífica a cinco de los residuos de Dha y Dhb para generar 5 tioésteres cíclicos: una lantionina a partir de Dha y cuatro metilantioninas a partir de Dhb (Okeley y col., 2003).

Una vez que la deshidratación/ciclización se completa, la enzima NisT transporta la nisina ya madura hacia el exterior de la célula, posteriormente el péptido líder es removido por la proteasa NisP que está ubicada en la membrana celular externa (Xie y col., 2002; Patton y van der Donk, 2005) (Figuras 2 y 3).

La producción de péptidos antimicrobianos en bacterias Gram positivas está regulada por la temperatura de crecimiento y la densidad del cultivo. La producción de bacteriocinas generalmente inicia a la mitad o al final de la fase logarítmica y alcanza su máximo al final de la fase estacionaria (Onda y col., 2003; Koponen, 2004; Todorov y Dicks, 2004).

Este modo de regulación involucra péptidos secretados los cuales actúan como moléculas de comunicación entre células (feromonas peptídicas). Estas feromonas se acumulan en el medio durante el crecimiento del cultivo y cuando alcanzan cierta concentración comienza la producción de bacteriocina, regulada por la interacción de la feromona con su receptor (proteína sensora histidín quinasa). Esto produce una señal de transducción a través de la membrana la cual activa la producción de bacteriocina (Kleerebezem, 2004; Wu y col., 2006).

Se ha demostrado que la nisina A actúa como una feromona proteica en la regulación de su propia expresión, mediante el proceso denominado percepción de quorum ("quorum sensing"). Los genes involucrados son *nisR* (el regulador de respuesta) y *nisK* (la quinasa sensora) (Kleerebezem, 2004; Koponen, 2004).

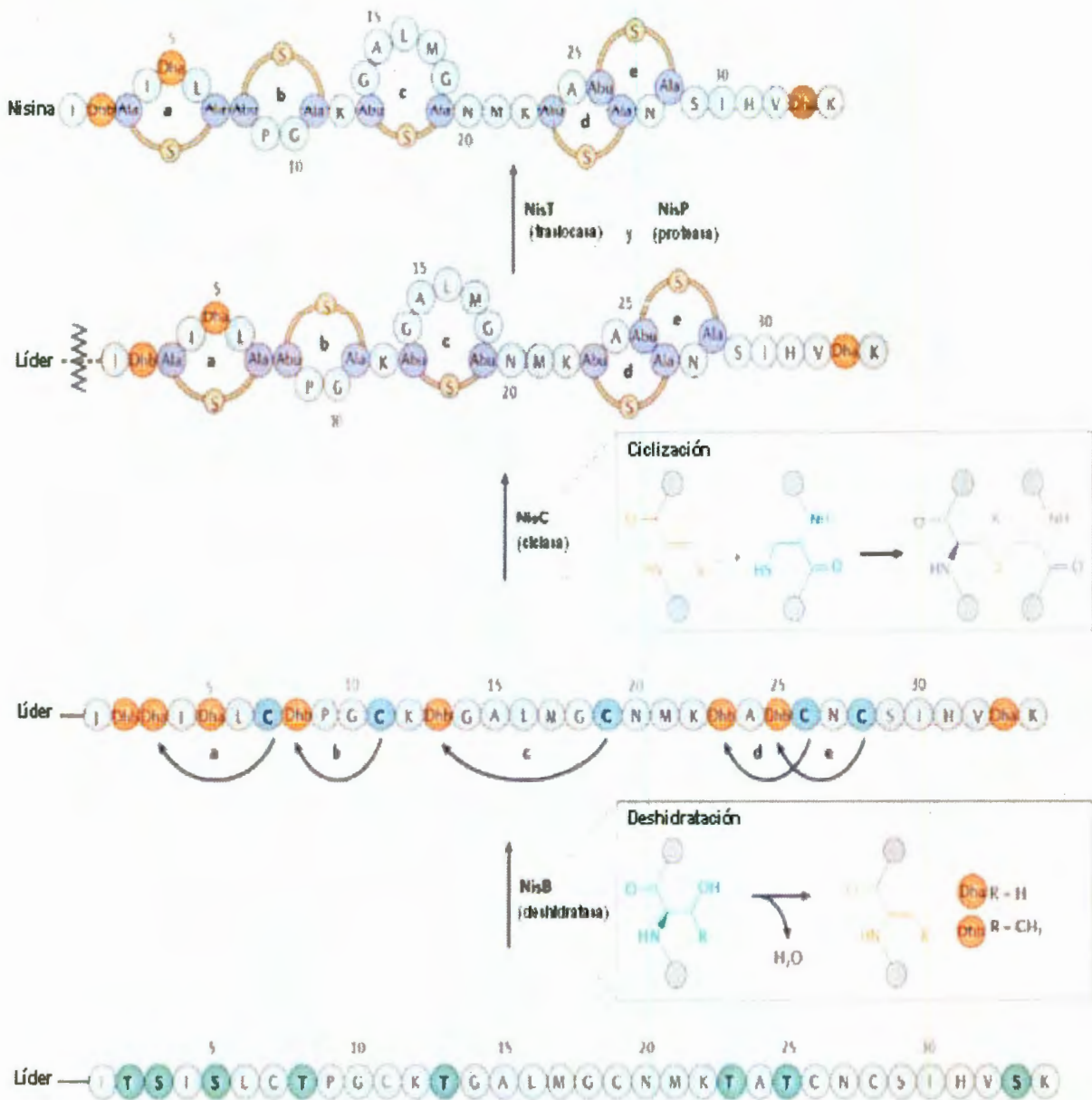


Figura 2. Modificaciones postraduccionales de la nisina (Breukink y Kruijff, 2006).

Los cambios extracelulares en la concentración de nisina provocan la autofosforilación de NisK y la transferencia de un grupo fosforil de NisK a un residuo aspartato de NisR. Esto induce la transcripción de los operones *nisABTCIP* y *nisFEG*. El operón *nisK* está bajo el control de un promotor independiente *nisR*. NisA el prepéptido es modificado postraduccionalmente. NisT (dependiente de ATP) transporta el prepéptido fuera de la célula y la secuencia líder es removida por la proteasa NisP para generar el agente antimicrobiano activo. NisI secuestra moléculas de nisina para reducir su concentración mientras que NisFEG ayuda en el transporte de nisina desde la membrana hasta el espacio extracelular (Patton y van der Donk, 2005) (Figura 3).

II.1.4 Modo de acción.

La nisina permeabiliza la membrana de las bacterias Gram positivas mediante un mecanismo de formación de poros dependiente de la unión al lípido II. El lípido II es un importante componente de la membrana celular de las bacterias y es esencial en la síntesis de la pared celular de éstas ya que se encarga de transportar las subunidades de peptidoglicano a través de la membrana citoplasmática (Cotter y col., 2005; Hasper y col., 2006).

El proceso de permeabilización de la membrana mediante unión al lípido II es muy eficiente y consta de los siguientes pasos: reconocimiento y unión a Lípido II, seguido de ensamblaje y formación del poro (Breukink y Kruijff, 2006).

La unidad monomérica de peptidoglicano, el bloque básico de construcción de la pared celular, consiste en dos aminoazúcares, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), y un pentapéptido (comúnmente L-Ala-D- γ -Glu-L-Lys-D-Ala) el cual está unido al grupo carboxil del grupo MurNAc. Estas subunidades son ensambladas en el citosol por medio de un acarreador unido a la membrana, formando así el lípido II (Hsu y col., 2004).

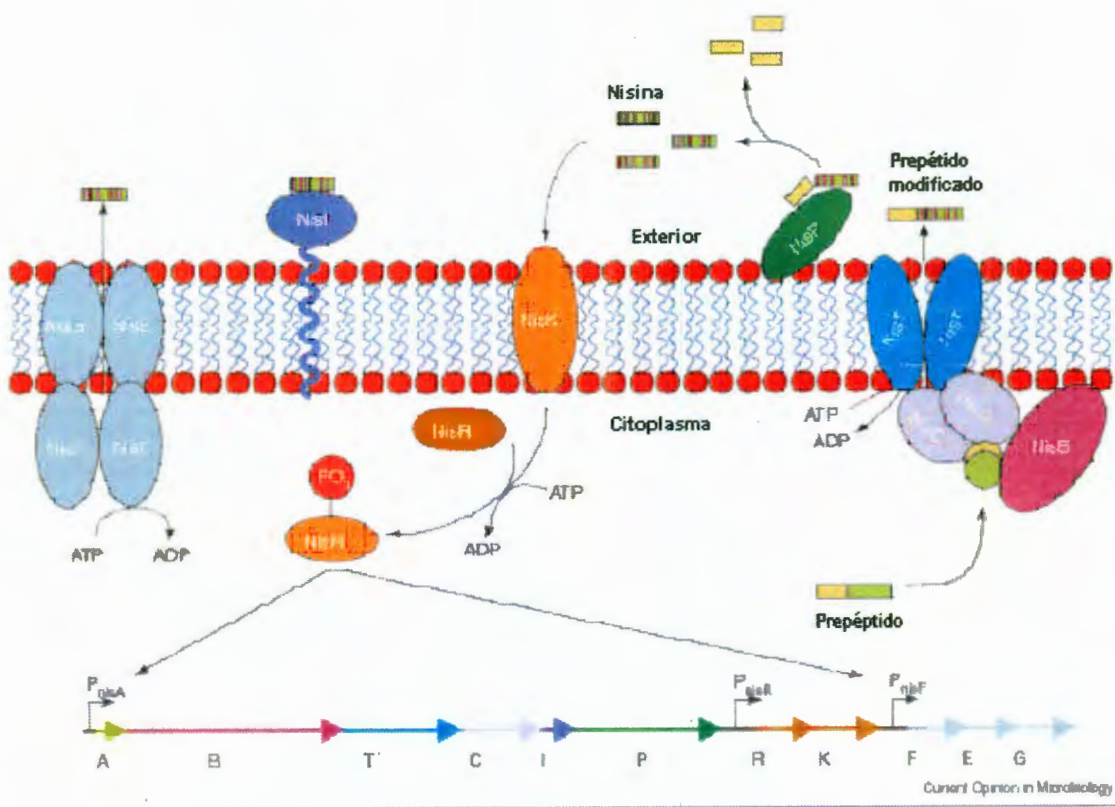
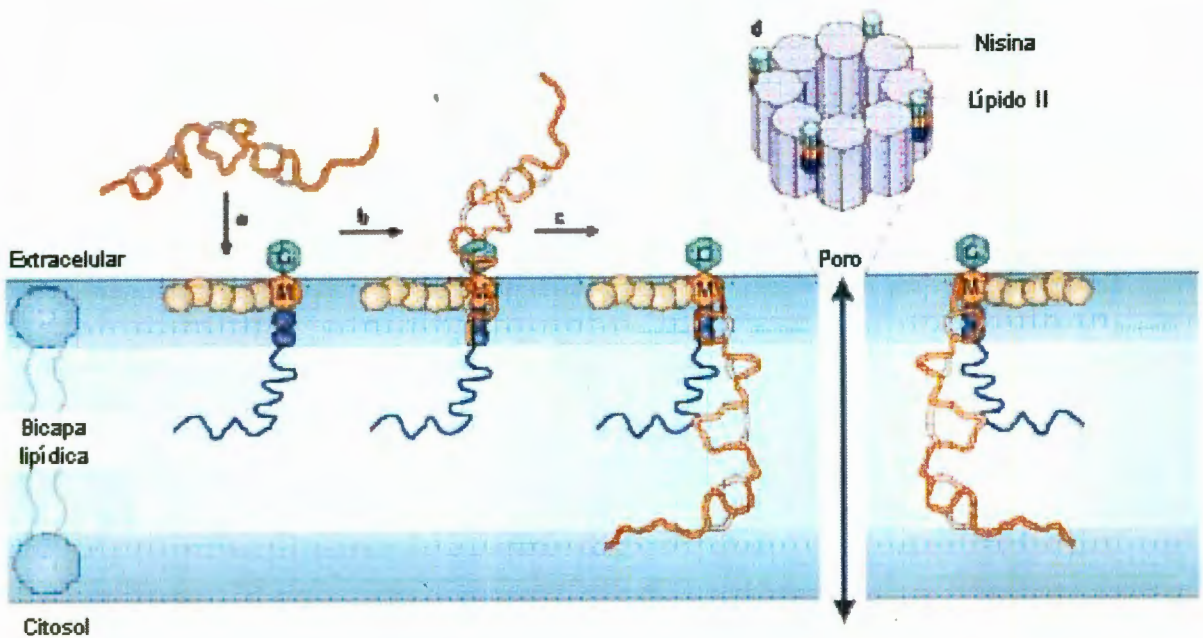


Figura 3. Biosíntesis y regulación de la producción de nisina (Patton y van der Donk, 2005).

Posteriormente, el lípido II es transportado a través de la membrana plasmática, donde libera su carga en un complejo multienzimático para polimerización e inserción a la pared celular preexistente (Hasper y col., 2006)

La nisina llega a la membrana plasmática de la bacteria donde se une al lípido II mediante dos de sus anillos en el extremo amino-terminal. Posteriormente se forma un poro donde la nisina se encuentra en una orientación estable transmembrana. Durante o después de la formación de cuatro complejos 1:1 (nisina:lípido II) son necesarias cuatro moléculas adicionales de nisina para formar

el poro constituido por ocho moléculas de nisina y cuatro moléculas de lípido II (Figura 4) (Breukink y Kruijff, 2006).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 4. Mecanismo de acción de nisina mediante unión a lípido II (Breukink y Kruijff, 2006).

II.2 Expresión de genes en *Escherichia coli*.

La efectividad de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas puede ser limitada por factores tales como un estrecho espectro de actividad, pérdida espontánea de bacteriogenicidad o baja adaptación del hospedador natural en alimentos. El estudio de su biosíntesis y la expresión heteróloga de sus genes puede ofrecer un mejor entendimiento del proceso de producción y regulación.

Los sistemas de expresión heteróloga generalmente son empleados para tres propósitos: 1) ayudar a elucidar la estructura de proteínas recombinantes y péptidos; 2) facilitar el control transcripcional/traducciona de expresión de genes recombinantes; y 3) alcanzar niveles más altos de producción que aquellos de fuentes nativas (Rodríguez y col., 2003).

Usualmente, la sobreproducción de proteínas heterólogas implica un estrés metabólico, el cual puede causar que la tasa de crecimiento celular y la producción de la proteína de interés disminuyan. Por esto, es importante reducir la carga metabólica debida a la sobreexpresión de proteínas foráneas para de esta manera obtener una buena producción de proteína (Kim y col., 2003).

El diseño de un sistema de expresión eficiente para producción de proteínas recombinantes o péptidos depende de varios factores, incluyendo las características del crecimiento celular, niveles de expresión, localización del producto recombinante final o modificaciones postraduccionales. Además, la elección de cada componente es crítica para la expresión exitosa del gen de interés debido a que los sistemas de expresión cuentan con células hospedadoras y elementos genéticos tales como señales de transcripción y traducción, factores regulatorios, genes y plásmidos (Rodríguez y col., 2003).

Si sólo se desea obtener grandes cantidades de DNA clonado, las características ideales de un hospedador son el crecimiento rápido, la capacidad para crecer en un medio de cultivo económico, la ausencia de potencial nocivo o patógeno, la

capacidad para absorber el DNA y la estabilidad en el cultivo. Además, el hospedador debe disponer de las enzimas necesarias para permitir la replicación del vector.

El hospedador procariótico por excelencia es *Escherichia coli*, sin embargo existen algunos inconvenientes para utilizarlo ya que esta bacteria presenta ciertos peligros en la producción a gran escala de productos derivados del DNA clonado debido a que su hábitat natural es el tracto intestinal humano. Retiene proteínas extracelulares en el espacio periplásmico, lo que dificulta potencialmente las labores de aislamiento y purificación del producto. Se han desarrollado cepas de *E. coli* en las que se han eliminado la mayor parte de estos problemas, como es el caso de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Madigan y col., 2004).

Sin embargo, también deben tomarse en cuenta los siguientes factores para elegir un sistema de expresión adecuado:

- Tamaño de la proteína. Proteínas citosólicas y polipéptidos (<100 residuos de longitud) son mejor expresados en *E. coli* como proteínas de fusión que contienen secuencias acarreadoras (etiquetas), las cuales se unen a la proteína blanco mediante un enlace peptídico. Con frecuencia la etiqueta estabiliza la proteína de interés contra degradación intracelular y provee un sitio de unión que puede usarse en la purificación cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC).
- Cantidad de proteína requerida. Si se requieren cantidades pequeñas de proteína, no es necesario tratar de optimizar su producción.
- Si el propósito de expresar la proteína es simplemente obtener material para producir anticuerpos sin importar la actividad biológica o desnaturalización, se puede usar cualquier sistema de expresión que facilite su purificación (Sambrook y Russell, 2001).

Las células bacterianas aisladas de la naturaleza contienen frecuentemente pequeños elementos de DNA que no son esenciales para las operaciones básicas

de la célula. Estos componentes se denominan plásmidos, y son moléculas circulares pequeñas separadas del cromosoma bacteriano principal y no son capaces de sobrevivir fuera de la célula. Contienen genes que son de gran utilidad para la célula huésped, por ejemplo, promueven la fusión celular, confieren resistencia a antibióticos o producen toxinas. Los plásmidos que contienen insertos de gran tamaño tienden a perderlos espontáneamente; por ello, los plásmidos no son útiles para clonar fragmentos de DNA mayores de 20 Kb (Griffiths y col., 2002). Para la producción de proteínas, se transfiere un plásmido recombinante a una cepa de *E. coli* que contenga una copia cromosomal del gen que codifica para la T7 RNA polimerasa (Novagen, 2006).

Los promotores procedentes de eucariotas y de otros procariotas funcionan de forma débil o no funcionan en absoluto en *E. coli*. El vector de expresión debe contener un promotor que funcione de forma eficaz en el hospedador y otro que se encuentre correctamente colocado, de forma que permita la transcripción del gen clonado (Sambrook y Russell, 2001).

II.2.1 Control de la transcripción.

En algunos casos, el sistema de control utilizado puede no ser una parte habitual del hospedador. Tal es el caso de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 como sistema regulador de un vector de expresión. Cuando T7 infecta *E. coli*, codifica su propia RNA polimerasa, que reconoce únicamente promotores de T7 y, por lo tanto, bloquea la transcripción del huésped.

En los vectores de expresión es posible poner la expresión de los genes clonados bajo el control de un promotor de T7. Sin embargo, cuando esto se lleva a cabo, es necesario introducir también en el plásmido el gen de la T7 RNA polimerasa; esta última se coloca bajo el control de un promotor que se regula fácilmente, como el fago lambda o el *lac*. Como sólo reconoce promotores T7, la T7 RNA polimerasa transcribe únicamente los genes clonados.

Dado que este sistema es tremendamente potente y específico, la inducción del sistema formado por el promotor y la T7 RNA polimerasa, detienen el crecimiento del huésped (Madigan y col., 2004).

II.2.2 Regulación de la transcripción en vectores de expresión.

Es importante regular la expresión del gen clonado; es decir, aunque normalmente es necesario producir niveles muy altos de RNA mensajero, así como traducirlos, no siempre es deseable diseñar un vector que permita que el gen se transcriba en altos niveles. Efectivamente, algunas proteínas que tienen interés comercial significativo resultan tóxicas para el hospedador, por lo que puede ser importante que el gen no se transcriba en absoluto en las primeras etapas de crecimiento del cultivo.

La situación ideal consiste en hacer crecer el cultivo que contiene el vector de expresión, es decir, un vector de clonación que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y la traducción de genes clonados; hasta obtener una gran cantidad de células, cada una de las cuales contenga un gran número de copias del vector para, a continuación, modificar la expresión en todas las copias al mismo tiempo mediante la manipulación del interruptor regulador. Por lo tanto, la transcripción necesita regularse de forma muy estrecha (Novagen, 2006).

II.2.3 Sistema de vectores pET

La serie de vectores pET permite una expresión regulada de genes foráneos por el bacteriófago T7 RNA polimerasa. Estos vectores confieren resistencia a ampicilina y/o canamicina (Sambrook y Russell, 2001).

El sistema pET es el sistema más poderoso desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes de interés son clonados en plásmidos pET bajo el fuerte control de transcripción del bacteriófago T7 (Figura 5) (Novagen, 2006).

Los vectores pET fueron originalmente contruidos por Studier y colaboradores (1990). Los vectores pET más recientes ofrecen características mejoradas que facilitan la clonación, detección y purificación de proteínas blanco. Existen dos categorías generales de vectores:

- Vectores de transcripción. Son designados para expresión de genes blanco que contienen su propio sitio de unión ribosomal y el codón de inicio AUG.
- Vectores de traducción. Contienen un sitio de unión ribosomal altamente eficiente de la proteína principal de la cubierta del fago T7 y son utilizados para la expresión de genes que no contienen su propio sitio de unión en el ribosoma.

En la elección de un vector pET deben tomarse en cuenta los siguientes factores:

- La aplicación para la que se utilizará la proteína expresada. Pueden requerirse cantidades analíticas de la proteína blanco para estudios de actividad, caracterización de mutantes y preparación de antígenos o pueden requerirse grandes cantidades de proteína activa para estudios estructurales, como reactivo o preparación de una matriz de afinidad.
- Información específica sobre la proteína expresada.

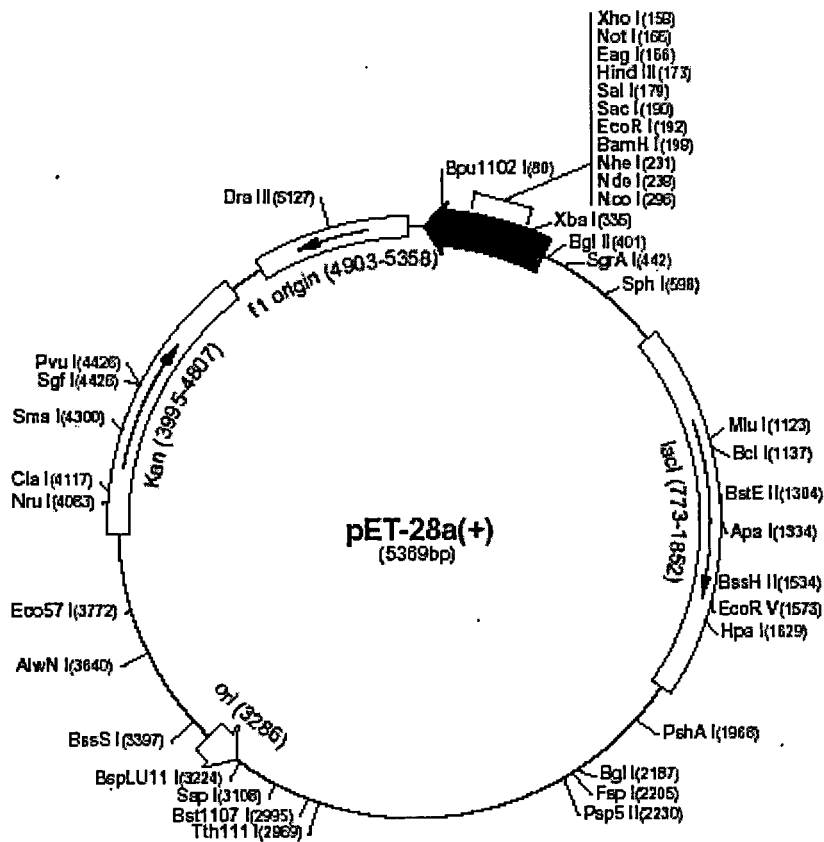


Figura 5. Mapa del vector pET 28a(+) (Novagen, 2006)

- Estrategia de clonación. Debe haber compatibilidad con el sitio de restricción y el marco de lectura. Dado que muchos vectores pET tienen sitios de restricción en común, es posible clonar un gen en varios vectores con una sola preparación del inserto.

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 de interés.

En muchos casos, la proteína recombinante expresada en *E. coli* forma agregados insolubles inactivos conocidos como cuerpos de inclusión. Éstos 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).

Aún cuando se han formado cuerpos de inclusión, una proporción de la proteína usualmente se encuentra en su forma soluble dentro de la célula. Con los altos niveles de expresión del sistema pET, puede haber una cantidad significativa de material soluble aún cuando la mayoría de la masa de la proteína se encuentra agregada. 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 en su forma soluble (Novagen, 2006).

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).

II.2.4 Expresión de genes inducidos por IPTG.

El isopropil- β -D-1-tiogalactosido (IPTG) es una sustancia que actúa como inductor de la transcripción de la T7 RNA polimerasa. Posteriormente, esta polimerasa transcribirá el gen de interés que se encuentra insertado en el vector (Novagen, 2006) (Figura 6).

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).

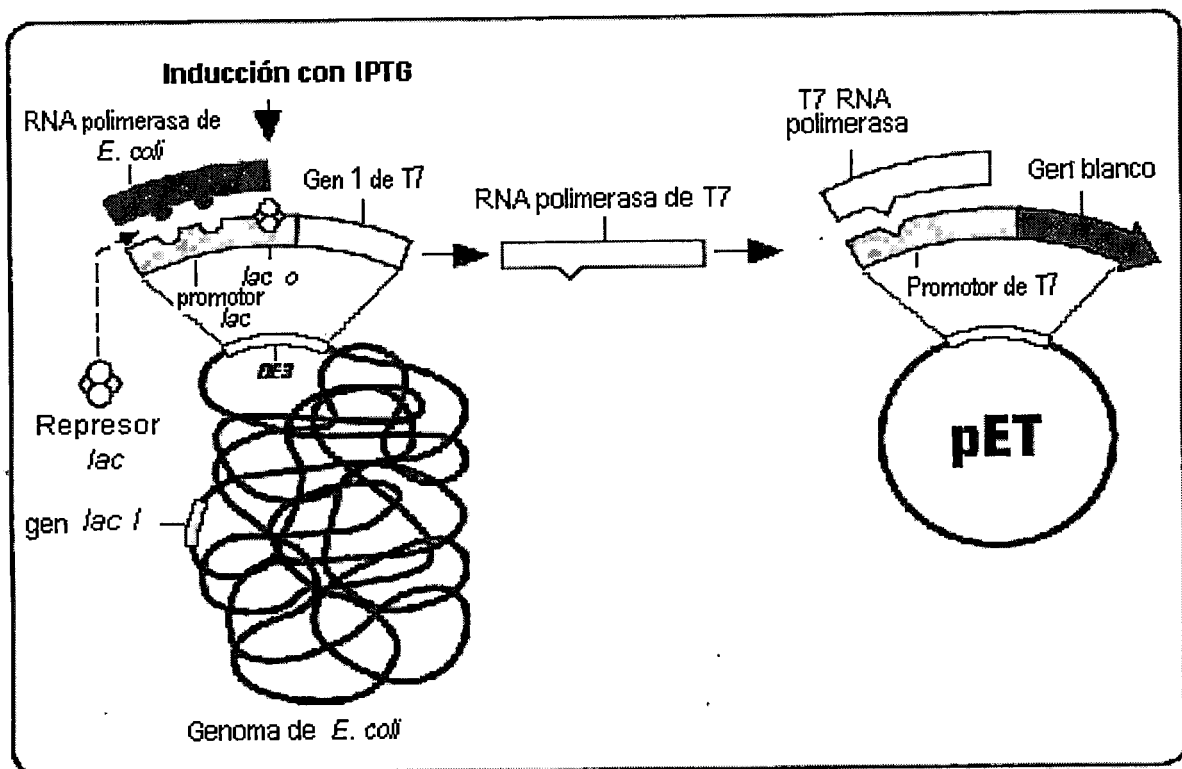


Figura 6. Esquema del proceso de expresión por inducción con IPTG (Novagen, 2006).

II.2.5 Efecto de la temperatura en la expresión de genes en *E. coli*.

Tal vez la variable más importante para obtener un alto nivel de expresión en *E. coli* es la temperatura a la que una bacteria es incubada antes y durante la inducción. Es crucial llevar a cabo estudios de prueba para determinar la temperatura óptima de expresión de una proteína foránea. El rango de temperatura en el que se ha obtenido expresión es 15-42 °C. La temperatura óptima para la expresión puede encontrarse en un rango muy estrecho (de 2-4 °C) (Sambrook y Russell, 2001).

El crecimiento celular a 37°C causa que algunas proteínas formen cuerpos de inclusión, mientras que la incubación a 30°C puede producir una proteína soluble y activa. El crecimiento e inducción a 25 o 30°C es óptimo si lo que se desea es exportar la proteína utilizando una secuencia señal presente en algunos vectores pET. En algunos casos, la inducción prolongada (de toda la noche) a bajas temperaturas (15-20°C) puede ser óptimo para obtener la proteína soluble (Novagen, 2006).

II.2.6 PCR como técnica de amplificación de genes.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar más de mil millones de veces a una secuencia de DNA obtenido a partir de una región seleccionada de un cDNA, DNA genómico, DNA plasmídico usados como templado.

Mediante métodos químicos se sintetizan dos oligonucleótidos de DNA, seleccionados para flanquear la secuencia de nucleótidos deseada. Estos oligonucleótidos se utilizan como iniciadores para la síntesis de DNA sobre cadenas sencillas generadas al desnaturalizar por efecto de la temperatura. El DNA recién sintetizado es el producto de la reacción *in vitro* de una DNA polimerasa purificada y los iniciadores terminan quedando en los extremos 5' de los fragmentos de DNA sintetizados.

Cada primer debe ser de 20-30 nucleótidos de longitud y contener aproximadamente igual número de las cuatro bases, con una distribución balanceada de residuos de G y C, y baja propensión a formar estructuras secundarias estables.

Cada ciclo duplica la cantidad de DNA sintetizada en el ciclo anterior. Puesto que cada ciclo de reacción requiere un breve calentamiento para desnaturalizar el DNA de doble cadena, la técnica depende de la utilización de una DNA polimerasa especial, aislada de una bacteria termófila, que es mucho más estable a temperaturas elevadas que la polimerasa común, de modo que no se desnaturaliza por calentamientos repetidos. Con cada ciclo de síntesis de DNA, los nuevos fragmentos generados actúan, a su vez, de molde y en pocos ciclos el producto predominante es un único tipo de fragmento de DNA cuya longitud corresponde a la distancia entre los oligos originales.

La amplificación efectiva de DNA requiere en la práctica unos 20-40 ciclos de reacción y cada ciclo requiere de aproximadamente 5 minutos para completarse (Alberts y col., 2002).

II.3 Proteínas de fusión.

Las fusiones de genes se crean uniendo dos o más marcos de lectura abiertos en el orden deseado. La expresión de los marcos de lectura fusionados genera proteínas híbridas en las cuales la proteína de interés está unida al extremo amino o al extremo carboxil de una proteína acarreadora.

Las proteínas de fusión poseen una amplia gama de usos potenciales:

- La unión de proteínas blanco a un dominio de función enzimática conocida puede proveer un método conveniente para marcar y aislar las secuencias de la proteína blanco.

- La adición de etiquetas puede proteger a la proteína contra proteólisis en huéspedes procarióticos.
- La adición de etiquetas puede mejorar la solubilidad de la proteína blanco y prevenir la formación de cuerpos de inclusión insolubles. (Sambrook y Russell, 2001).

II.3.1 Etiquetas

Fusionando el polipéptido de interés a un portador que tenga alta afinidad por un ligando específico, casi cualquier proteína de fusión se puede purificar por cromatografía de afinidad en un solo paso. Más de 20 sistemas de fusión diferentes han sido diseñados o adaptados para purificación por afinidad.

Recientemente se han sustituido parcialmente las etiquetas de identificación derivadas de proteínas ligando bien identificadas, por etiquetas artificiales que no tienen contraparte natural. Los más conocidos son 1) una secuencia de 6 histidinas (His-6) que se une a columnas que contienen Zn^{2+} o Ni^{+2} y 2) FLAG, un heptapéptido que es tanto hidrofílico como inmunoreactivo (Sambrook y Russell, 2001).

Las etiquetas facilitan la detección y purificación de la proteína blanco, y también pueden incrementar la probabilidad de que exista actividad biológica, ya sea afectando su solubilidad en el citoplasma o exportándola hacia el periplasma. Si una secuencia fusión es tolerada por la aplicación utilizada, es útil producir proteínas de fusión que contengan colas de péptidos tales como S, T7, GST, His, HSV o Nus, para su fácil detección en Western blot y su purificación por IMAC.

La cola de histidinas (His tag) es muy utilizada para la purificación de proteínas en general. Es especialmente útil para aquellas proteínas que se expresan inicialmente como cuerpos de inclusión, porque la purificación por afinidad se puede llevar a cabo bajo condiciones totalmente desnaturizantes que solubilizan la proteína (Novagen, 2006).

II.3.2 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC).

La cola de histidinas se une fuertemente a varios complejos de metales de transición coordinados, de tal manera que una proteína que tiene una región expuesta de 6 histidinas (His-6) se unirá a una resina cargada con iones níquel divalentes (Ni^{2+}). Las proteínas contaminantes pueden ser removidas con una elución apropiada, y la proteína de interés puede entonces ser eluída. Cualquier agente quelante puede interferir con la cromatografía IMAC, es por eso que los amortiguadores empleados deben estar libres de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido etilenglicol tetraacético (EGTA). La proteína blanco se eluye mediante un agente competidor quelante como lo es el imidazol a concentraciones de 50-100 mM a pH 7-8 (Sambrook y Russell, 2001; Xie y col., 2004).

Debido a que muy pocas proteínas naturales se unen con afinidad significativa a dichas matrices, las proteínas marcadas con His-6 generadas por técnicas recombinantes pueden ser purificadas en un solo paso. La cromatografía de afinidad a metales se ha vuelto popular porque es efectiva y relativamente insensible al plegamiento proteínico, fuerza iónica y detergentes. Gracias a su alta eficiencia, gran capacidad, poder de concentración y rapidez; esta puede usarse como primer (o único) paso en el protocolo de purificación de proteínas (Sambrook y Russell, 2001).

La cola de histidinas puede ser removida mediante kits existentes en el mercado los cuales emplean exoproteasas: dipeptidil-aminopeptidasa sola o en combinación con glutamina-ciclotransferasa y piroglutamilaminopeptidasa. Estas enzimas remueven progresivamente los péptidos del extremo amino-terminal hasta que alcanzan un punto de paro específico. Una vez que la remoción ha sido completada, las enzimas del kit pueden eliminarse mediante IMAC utilizando matrices de Ni-NTA (níquel - ácido nitrilotriacético). La cola de histidinas tiene la ventaja de ser la

etiqueta más corta, carece de carga a pH fisiológico y permite una purificación eficiente ya sea bajo condiciones nativas o desnaturizantes (Schäfer y col., 2002).

II.4 Caracterización de proteínas por electroforesis en gel de acrilamida.

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo, a una velocidad que depende de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

A escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un criterio de pureza. Es útil además para determinar parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

El método ideal para la separación de péptidos y proteínas de menos de 10-15 kDa es la electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE tris-tricina el cual utiliza una solución amortiguadora para separar el dodecil sulfato de sodio (SDS) y los péptidos, mejorando así la resolución.

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, puede ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (Mathews y col., 2002).

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$. La polimerización se

inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Esta reacción es inhibida por la presencia de oxígeno, por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, etc.

La concentración de acrilamida (%T) representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + bisacrilamida en gramos por 100 ml) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. La concentración de bis-acrilamida (%C) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento (Janson y Rydén, 1980).

$$T = \frac{(a+b) \times 100 (\%)}{V}$$

$$C = \frac{b \times 100 (\%)}{a + b}$$

Dónde:

a = cantidad de acrilamida en gramos.

b = cantidad de N,N'-metilenbisacrilamida en gramos.

V = es el volumen del gel en ml.

Los factores que determinan el tamaño del poro del gel son complicados, pero en general el tamaño del poro disminuye con el incremento del %T. Las proporciones en que ambas se encuentran determinan las propiedades físicas del gel como su densidad, elasticidad, resistencia mecánica y el tamaño del poro. En general se recomiendan valores de T de 5 a 15% y de C de 2 a 4%. Para separar moléculas por tamaño, es necesario tomar en cuenta la relación entre el poro efectivo del medio y el tamaño de la molécula que se pretende separar. Si el poro del medio es

significativamente mayor que la molécula, la separación electroforética será sobre la base de diferencias de carga y el tamizaje molecular será mínimo.

La polimerización se lleva a cabo con la utilización de sistemas catalíticos redox como por ejemplo:

- Persulfato de amonio (agente oxidante) y TEMED como agente reductor.
- Persulfato de amonio y 3-dimetilamino propio-nitrilo (DMAPN).
- Peróxido de hidrógeno, sulfato de hierro y ácido ascórbico.

La polimerización no ocurre a bajo pH, ya que requiere radicales de monómeros libres formados por catálisis básica de radicales oxígeno del persulfato. La estructura del detergente dodecil sulfato de sodio, SDS empleado en la electroforesis SDS-PAGE es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$. El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (Janson y Rydén, 1980).

El complejo SDS-proteína tiene forma de varilla con un diámetro aproximado de 18 Å y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta mercaptoetanol (β ME) o el DTT desnatura las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas.

La migración de los derivados proteína-SDS hacia al ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (log PM). La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la talla de esta deviene en el factor determinante de la separación. El SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas y se compara con un patrón.

Existen dos tipos de sistemas de amortiguamiento. El sistema continuo emplea un mismo amortiguador durante la electroforesis y proporciona una misma temperatura y pH a todo el gel, por lo que es recomendado para separar fragmentos de DNA y proteínas sensibles a temperatura y pH (enzimas). El sistema de amortiguación discontinuo utiliza al menos dos amortiguadores diferentes, dando una buena resolución de las bandas (Mathews y col., 2002).

II.5 Proceso de clonación y expresión del gen *nisA* usando el vector pET-28.

La bacteria ácido láctica productora de nisina fue *Lactococcus lactis*, aislada en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Facultad de Química de la UAQ. La caracterización de la bacteriocina producida y la estrategia de clonación y expresión del gen estructural *nisA* ha sido reportado por García Almendárez y col., 2008.

En este trabajo se utilizó la cepa de transformada de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector *nisA/pET*, cuya construcción se realizó de acuerdo al diagrama presentado en la Figura 7.

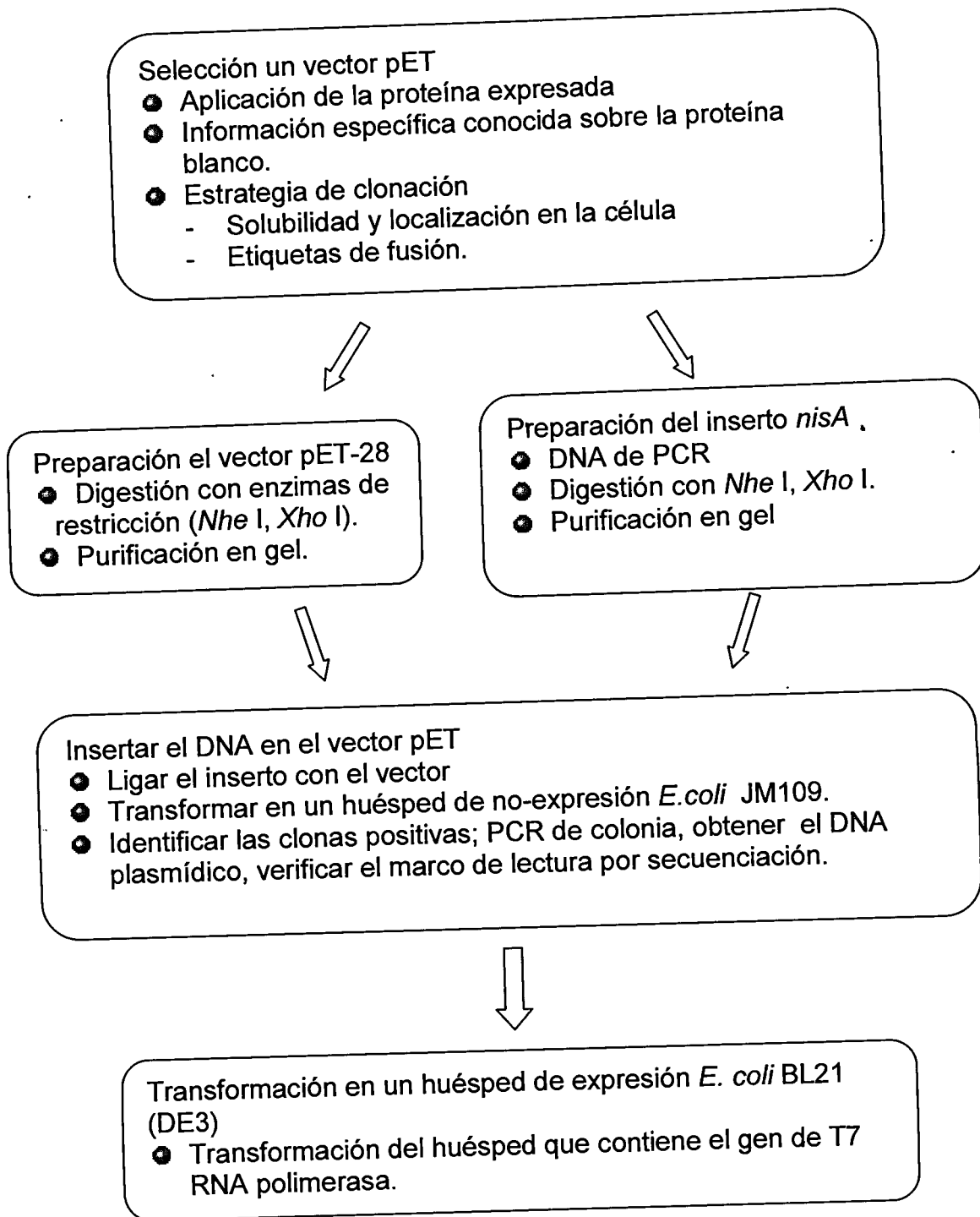


Figura 7. Diagrama del proceso de clonación y expresión de *nisA* utilizando el vector pET (García-Almendárez y col., 2008).

III. HIPÓTESIS

La temperatura de incubación ejerce un efecto en los niveles de expresión del gen que codifica para la proteína recombinante NisA-His₆ producida por *Escherichia coli* BL21 (DE3).

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Estudiar el efecto de la temperatura en los niveles del gen *nisA* en la cepa transformada *Escherichia coli* BL21 (DE3).

IV.2 Específicos

- Verificar la presencia del gen estructural *nisA* en la cepa transformada *E. coli* BL21(DE3), conteniendo el vector *nisA/pET-28a*.
- Estudiar los niveles del gen estructural *nisA* bajo diferentes temperaturas de incubación: 14, 25 y 37 °C.
- Purificación parcial y detección de la proteína recombinante NisA-His6 por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado y electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales.

Se utilizó una cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pET-28a(+) el cual contiene el gen *nisA* que codifica para el prepéptido de nisina A. La cepa se encontraba almacenada en ultracongelación a -70°C.

Los reactivos y equipos utilizados fueron proporcionados por el laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

V.2 Métodos.

V.2.1 Verificación del sistema de expresión de las células transformadas de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector *nisA/pET*.

La secuencia de nisina A ha sido reportada con número DQ118179 (NCBI).

Se activó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) (1% de peptona de caseína, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl) conteniendo 1 µl/ml de ampicilina (Bio-rad) 100 mg/ml y 0.5 µl/ml de cloramfenicol (Sigma) 50 mg/ml, se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente, se tomaron 500 µl de este cultivo y se inocularon en otro tubo con 5 ml el mismo medio, el cual se incubó en agitador orbital (Environ shaker, Lab-line) a 37°C hasta que se observó turbidez (4 h).

Para comprobar la pureza del cultivo, se sembraron por estría dos cajas con agar LB (1% de peptona de caseína, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, 1.5% de agar) con ampicilina y cloramfenicol, se incubaron a 37 °C por 24 h. El resto del contenido de éste tubo se inoculó en 250 ml de caldo LB con 250 ml de ampicilina 100 mg/ml y 125 ml de cloramfenicol 50 mg/ml, se incubó en agitador orbital a 37°C y 180 rpm y se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (Helios α, UNICAM) hasta que alcanzó un OD₆₀₀ de 0.3-0.4. En este momento se indujo la producción de la proteína recombinante agregando 250 µl de IPTG (Invitrogen) 0.1

M y se continuó con la incubación en las mismas condiciones por 5 h. Pasado este tiempo, se procedió a la centrifugación (modelo 5804R, Eppendorf) a 12,000 *g* y 4°C durante 5 minutos. Se almacenaron 5 ml de sobrenadante en refrigeración y las células se almacenaron a -20°C.

Las células se resuspendieron en 1 ml de amortiguador 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl ajustado a pH 7.0 y se introdujo en un baño sonicador (Branson, modelo 5510) durante 30 minutos. Se procedió a centrifugar a 6,000 *g* y 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante (lisado crudo) fue recuperado y almacenado.

V.2.2 Electroforesis SDS-PAGE en sistema tris-tricina

Se prepararon las soluciones de gel separador y gel concentrador de acuerdo a las cantidades señaladas en el Cuadro 1. Se armó la cámara de electroforesis (Amersham biosciences), se vertió primero 2 ml de solución gel separador y cubrió con 1 ml de solución saturada de isobutanol. Se esperó aproximadamente 15 minutos para que el gel polimerizara. Posteriormente se retiró el isobutanol y se llenó el resto de la cámara con la solución de gel concentrador y se esperó a que polimerizara. Se llenó la cámara superior con amortiguador de cátodo (tris 0.1M, tricina 0.1M, SDS 0.1%) y la cámara inferior con amortiguador de ánodo (tris 0.2M, pH 8.9).

Se mezclaron 20 µl lisado crudo con un volumen igual de amortiguador de muestra 2X [0.1 M tris, 24% de glicerol, 8% (w/v) de SDS, 0.2 M de DTT, y 0.02% (w/v) de azul de Coomassie G-250] y se calentó en baño maría a 40 °C durante 30 minutos. A 2 µl de marcador de peso molecular (Bio-rad) se le agregaron 19 µl de amortiguador de muestra y 19 µl de agua HPLC y se calentó en agua a ebullición durante 5 minutos. Se cargaron 15 µl en cada pozo.

Cuadro 1. Preparación de gel separador y gel concentrador para electroforesis en sistema tris-tricina.

Solución	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida-bisacrilamida 49.5% T, 6% C	6 ml	–
Acrilamida-bisacrilamida 49.5% T, 3% C	–	0.75 ml
Amortiguador gel	6 ml	2.3 ml
Glicerol	1.9 ml	–
Agua desionizada	4.1 ml	6.3 ml
Volumen total	18 ml	9.35 ml
Desgasificar durante 5 minutos		
Persulfato de amonio	50 μ l	37 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se utilizó un recirculador de agua para mantener el sistema a 20°C. Se corrió la electroforesis a 30 V hasta que las muestras alcanzaron el gel separador, momento en el cual se incrementó el voltaje a 150 V hasta que las muestras alcanzaron el extremo inferior del gel.

Una vez terminada la corrida el gel se introdujo en solución fijadora (40% metanol, 10% ác. acético, 50% agua) durante 30 min, seguido de solución de tñido [ác. acético 10%, azul de Coomassie G250 0.025% (w/v) agua 90%] por 1-2 h y finalmente se hicieron lavados con solución de desteñido (ác. acético 40%, agua 90%) cambiando la solución cada 30 minutos.

V.2.3 Extracción de DNA plasmídico (Miniprep)

Se realizó mediante el sistema GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences, USA) según instructivo del fabricante. Este sistema está diseñado para la extracción rápida y la purificación de plásmidos y cósmidos de cultivos de *E. coli* usando volúmenes de 1 a 3 ml.

El método emplea un procedimiento de lisis celular alcalina modificada y una matriz de fibra de vidrio para proporcionar rendimientos altos de DNA para varias aplicaciones. En esta técnica no se utilizan solventes orgánicos; en lugar de ellos se usan sales caotrópicas para desnaturalizar las proteínas contaminantes y promover la unión selectiva del DNA con la matriz de fibra de vidrio. Los contaminantes desnaturalizados son removidos fácilmente mediante lavados subsecuentes de la matriz. El DNA purificado es eluido por amortiguadores de baja fuerza iónica. Si se requieren concentraciones de DNA mayores a 0.5 $\mu\text{l/ml}$, la muestra de DNA puede ser precipitada con etanol.

Las células almacenadas a -20°C se resuspendieron en 600 μl de solución I (solución isotónica con RNasa) y se mezcló en vórtex. La suspensión obtenida se dividió en 2 microtubos y a cada uno se le agregó 300 μl de solución II (tratamiento alcalino) y se mezcló invirtiendo 10 – 15 veces. Posteriormente se agregó 600 μl de solución III (solución de acetato con alta concentración de sal caotrópica) a cada tubo y se mezcló invirtiendo 10 – 20 veces. Los tubos se centrifugaron a velocidad máxima por 5 minutos en microcentrífuga (Beckman Coulter). Se tomó una alícuota de 400 μl del sobrenadante y se depositó en la columna de fibra de vidrio, se incubó durante 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima por 30 segundos. Se desechó el líquido obtenido y prosiguió centrifugando el sobrenadante hasta que se agotó.

Se añadieron 400 μl de amortiguador de lavado (etanol) a la columna, se incubó por 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un microtubo estéril y se eluyó con 80 μl de agua estéril.

V.2.4 Calidad, integridad y cuantificación de DNA plasmídico.

Las bases púricas y pirimídicas de los ácidos nucleicos absorben la luz UV. El espectro de absorción del DNA y RNA es máximo a 260 nm, Para DNA de doble cadena, una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Por muchos años, la relación de la absorbancia a 260 y 280 nm ha sido usada como una medida de la pureza de ácidos nucleicos aislados. Dado que los aminoácidos aromáticos de las proteínas absorben a 280 nm, la relación ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) indica la contaminación por proteínas de una solución de ácidos nucleicos (Sambrook y Russell, 2001).

El DNA obtenido se analizó mediante espectrometría midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de una solución diluida 500 veces (factor de dilución, *fd*). Una relación $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.7 - 2.0$ indica que se tiene un DNA de buena calidad.

Para la cuantificación, una absorbancia de una unidad a 260 nm corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA ($\text{OD}_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$), de modo que la concentración de DNA se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{Concentración de DNA} = \text{OD}_{260} * 50\mu\text{g/ml} * 1 \text{ ml}/10^3\mu\text{l} * 10^3 \text{ ng}/\mu\text{g} * fd$$

La integridad del DNA plasmídico se analizó en electroforesis de gel de agarosa 1%. La agarosa se disolvió en solución amortiguadora TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5). La solución se calentó en horno de microondas hasta que la agarosa se disolvió. Se dejó enfriar y se agregó 0.05 $\mu\text{l/ml}$ de una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$), se llenó la cámara de electroforesis y se dejó solidificar el gel. Las muestras se mezclaron en partes iguales con amortiguador de

carga 2X. Este último se hizo a partir de una solución 6X (azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol FF 0.25%, glicerol 30%). Se llenó la cámara con amortiguador TAE 1X y se cargaron las muestras. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 100 V y el gel se registro en un fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-rad) para su posterior análisis.

V.2.5 Verificación de la presencia del DNA inserto.

Se realizó PCR del DNA plasmídico haciendo la mezcla de acuerdo a las cantidades indicadas en el cuadro 2. Se utilizaron oligos previamente diseñados por García-Almendárez y col., 2008, basados en la secuencia de nisina A reportada por Kaleta, C. y Entian, K.D. en 1989 (Figura 8).

Sentido: 5' cat ATG AGT ACA AAA GAT TTT AAC TTG G 3'

Antisentido: 5' ctc gag TTA TTT GCT TAC GTG AAT ACT ACA ATG 3'

Las letras minúsculas indican los adaptadores para las enzimas de restricción *Nde*1 y *Xho*1 respectivamente. En el caso del primer oligo, el sitio de corte de la enzima de restricción coincide con el de la secuencia del DNA.

Las condiciones se fijaron de acuerdo al Cuadro 2. Se realizaron 25 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 52°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 1 minuto.

Se utilizaron dos polimerasas distintas: *Taq* polimerasa (Invitrogen) y *Pfu* polimerasa (Invitrogen) con el fin de ver con cual de ellas se obtenía una mejor amplificación.

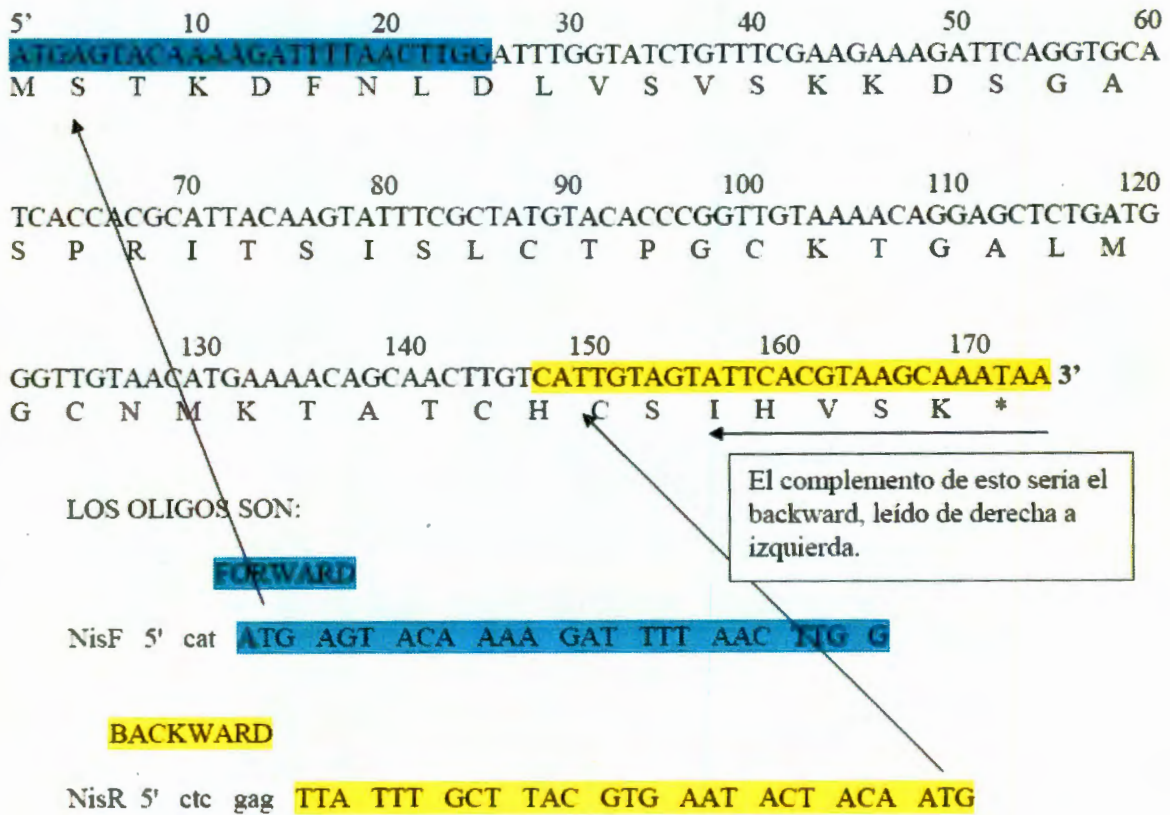


Figura 8. Diseño de oligos iniciadores para *nisA*. Las secuencias en bases en minúsculas indican el punto de corte de las enzimas *Nde1* y *Xho1*.

Cuadro 2. Condiciones para PCR usando DNA plasmídico

Reactivo	1 rxn (μ l)
DNA	5.0
Amortiguador PCR 10X	2.5
MgCl (50mM)	0.75
dNTP's (10 mM)	0.5
Oligos (10pM) sentido y antisentido	1.25 c/u
Polimerasa	0.125
Agua estéril	13.62

94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	4°C
5 min	45 s	30 s	90 s	25 s	∞
	25 ciclos				

V.2.6 Conservación de células de *E. coli* BL21(DE3) transformada.

Una vez que se verificó que la cepa transformada contiene el gen *nisA*, se procedió a la cepa transformada para futuro uso. Se inoculó una chaquiras en caldo LB con antibióticos y se incubó 24 h a 37°C. Se sembró en 2 tubos inclinados y en una placa de agar LB con antibióticos y se incubaron a 37°C durante 24 h.

Para verificar la presencia del inserto en las colonias obtenidas, se tomaron dos colonias aisladas de la placa y se realizó PCR de colonia con las condiciones ilustradas en el Cuadro 3 y posterior electroforesis en gel de agarosa 1%.

A los tubos con agar inclinado se les agregó una solución 1:1 de leche descremada 10% - glicerol 20% (v/v) y se raspó la superficie con un asa de platino con el fin de hacer una suspensión. La mitad del volumen de la suspensión obtenida se pasó a

través de un filtro de poro de 45 μm . Dicho filtro se introdujo en un vial estéril, se liofilizó y se almacenó a temperatura ambiente. La mitad restante de la suspensión se utilizó para impregnar chaquiras de vidrio limpias y secas (previamente tratadas con HCl 2% para eliminar alcalinidad). Cada chaquiras se colocó en un microtubo estéril y se almacenaron en ultracongelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuadro 3. Condiciones para PCR directo de colonia.

Reactivo		1 rxn (μl)
DNA		1 colonia
Amortiguador PCR 10X		2.5
MgCl_2 (50mM)		0.75
dNTP's mix (10 mM)		0.5
Oligos (10pM)		1.25 c/u
sentido y antisentido		
Taq polimerasa		0.125
Agua estéril		18.62

94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	4°C
5 min	45 s	30 s	90 s	25 s	∞
	25 ciclos				

V.2.7 Inducción de los niveles de *nisA* a diferentes temperaturas.

Se determinó el tiempo y temperatura (14, 25 y 37 °C) para la expresión de la proteína recombinante. Se activó la cepa inoculando una chaquirá en un tubo con 5 ml de caldo LB con antibióticos y se incubando a 37 °C durante 24 h. Se tomó una alícuota de 100 µl y se inocularon en dos tubos con el mismo medio de cultivo. Éstos se incubaron con agitación a 25 y 14 °C hasta que se observó turbidez.

Posteriormente se tomaron 400 µl de cada y se inocularon en dos matraces con 50 ml del mismo medio de cultivo, y se incubaron a 25 y 14 °C en agitador orbital y se tomaron muestras cada hora a las cuales se les midió absorbancia a 600 nm. Una vez que se obtuvieron 0.3-0.4 unidades de absorbancia se procedió a inducir el crecimiento agregando 50 µl de IPTG 0.1 M y se continuó tomando muestras cada hora y media durante 7 h para el cultivo de 25°C y cada 3 h durante 15 h en el caso del cultivo a 14°C .

Finalmente los cultivos fueron centrifugados a 12,000 g 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante fue desechado, una fracción de las células se sometió a lisis y la restante se almacenó a -20°C.

Se extrajo DNA plasmídico de cada una de las muestras tomadas durante el cultivo a las diferentes temperaturas con el sistema GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) según instructivo del fabricante. Se comprobó la presencia de DNA plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

El DNA plasmídico extraído se sometió a PCR con las condiciones indicadas en el cuadro 2 y se realizó electroforesis de productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para comprobar la amplificación del DNA inserto.

Se realizó electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado V.2.2 del lisado crudo y de las células almacenadas a –

20°C de los cultivos a 14, 25 y 37°C. El gel se tiñó con azul de coomassie G-250 y se fotografió para su posterior análisis.

V.2.8 Purificación de la proteína recombinante mediante IMAC.

Se empleó una columna His-Trap FF crude (GE Healthcare) de 1 ml la cual se equilibró primero con 10 ml de amortiguador de corrida ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 40 mM, pH 7.4) seguido de 1 ml de muestra. Se lavó con 15 ml del mismo amortiguador y posteriormente se eluyó con amortiguador de elución ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, pH 7.4). Se colectaron 5 fracciones de 1 ml en microtubos. Se midió la absorbancia a 280 nm del contenido de cada tubo para verificar la presencia de proteína.

Se procedió a realizar diálisis, el cual es un método de purificación de proteínas que se utiliza habitualmente para eliminar las pequeñas moléculas contaminantes. Se coloca una solución de una proteína en una bolsa cerrada fabricada con una membrana de poro conocido y se sumerge en un volumen mucho mayor de solución amortiguadora. Tras varias horas, los contaminantes de bajo peso molecular salen de la membrana y el entorno original de las moléculas proteicas se reemplaza por la solución amortiguadora exterior (Mathews y col., 2002)

Las 5 fracciones de cada tratamiento se juntaron dentro de 3 membranas de poro de 3 kDa las cuales se cerraron por ambos lados con pinzas de plástico. Cada membrana se sumergió completamente en un recipiente conteniendo 4 litros de agua grado HPLC. Los recipientes se pusieron en una cámara de refrigeración (14 °C) con agitación y se cambió el agua cada 12 h. Transcurridas 24 h, los recipientes se retiraron de la cámara y el contenido de las membranas se transfirió a microtubos siliconizados estériles de 1.5 ml (Fisher). Estos microtubos se pusieron en un concentrador a vacío (DyNA Vap, Labnet) hasta sequedad con el fin de concentrar las muestras.

V.2.9 Detección de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.

Las muestras en polvo se resuspendieron en agua grado HPLC estéril. Esto se realizó vertiendo 50 μ l de agua en uno de los microtubos y agitando hasta que disolución del concentrado. Después se tomó esta solución y se transfirió al segundo tubo con el concentrado y así sucesivamente con todas las muestras de cada tratamiento.

Se realizó electroforesis SDS-PAGE (tris-tricina) siguiendo la metodología ya descrita, inyectando 15 μ l de muestra y 10 μ l de marcador de peso molecular. El gel se tiñó durante toda la noche con azul de Coomassie G-250 y se fotografió para su posterior análisis.

VI. RESULTADOS

VI.1 Cultivo y lisis de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo *nisA*/pET

El primer objetivo de este proyecto fue la comprobación de la transformación de la cepa *E. coli* BL21 (DE3), mediante su cultivo y lisis. El análisis posterior mediante gel de poliacrilamida de los lisados (a,b,c) y de las células (d,e) muestra una banda muy tenue en los lisados y más ancha en las células, correspondientes al tamaño de la proteína recombinante la cual cercana al valor teórico de 7,963 Da (5962.9 Da del prepéptido, más 2000.2 Da correspondiente a la cola de 6 histidinas).

Cabe mencionar que la lisis de células se realizó mediante un baño sonicador y como se puede observar en la Figura 9, la lisis no fue del todo eficiente resultando una banda mucho más tenue que en el caso de las células completas.

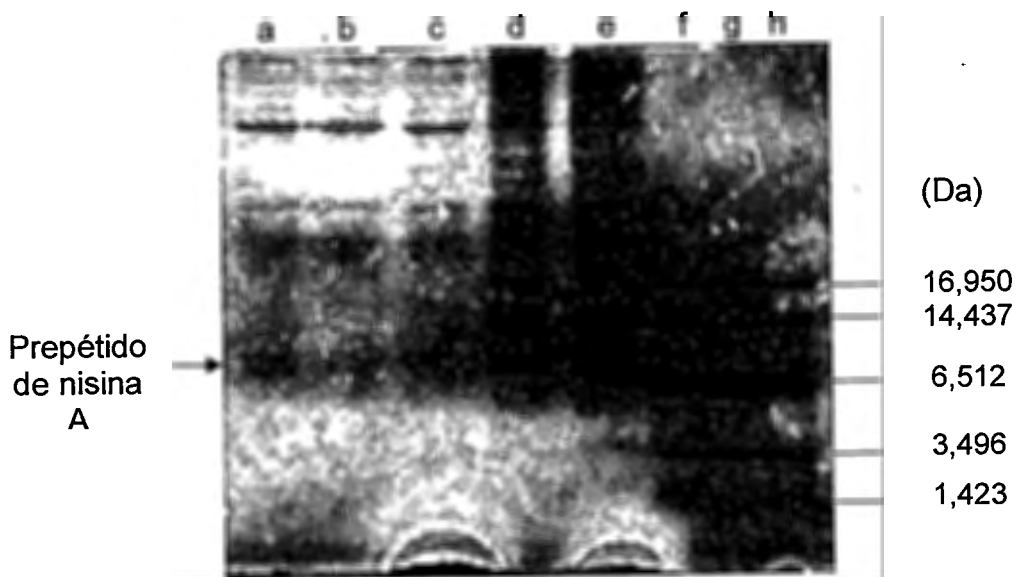


Figura 9. Electroforesis en gel de acrilamida de lisado y células de *E. coli* BL21 (DE3). Tinción con azul de Coomassie G-250. (a,b,c) lisado crudo; (d, e) células; (f,g,h) marcador de peso molecular para péptidos (Bio-rad).

Un método alternativo para realizar la lisis de células es el uso de una prensa francesa, el cual es un dispositivo que puede ser utilizado como una manera efectiva de lisar células de *E. coli* (Sambrook y Russell, 2001).

La Figura 10 muestra la amplificación del gen estructura *nisA* con un tamaño de entre 100 y 200 pares de bases. Los dos tipos de DNA polimerasas empleadas, *Taq* y *Pfu*, muestran un nivel de amplificación similar, sin embargo, considerando que la *Taq* polimerasa es la más comúnmente utilizada, se optó por ésta para posteriores reacciones de PCR.

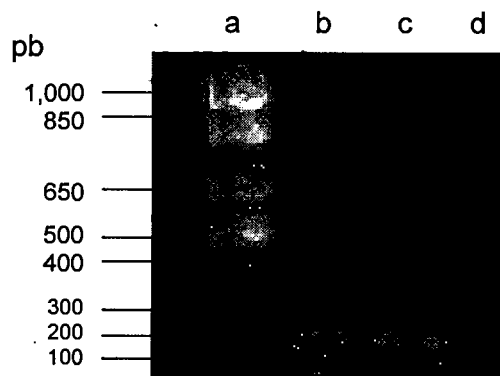


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR de DNA plasmídico. Tinción con bromuro de etidio. (a) Marcador DNA 1 kbp (Gibco BRL); (b) producto de PCR empleando *Taq* polimerasa (Invitrogen); (c) producto de PCR empleando *Pfu* polimerasa (Invitrogen); (d) control sin templado.

No se observó diferencia evidente entre la amplificación realizada por la *Taq* y la *Pfu* polimerasa aún cuando las se utilizaron las mismas condiciones y temperaturas para ambas.

VI.2 Calidad y concentración de DNA.

En el Cuadro 4 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para evaluar la calidad del DNA extraído. El valor 1.753 indica que el DNA es de buena calidad.

Cuadro 4. Mediciones de absorbancia de DNA plasmídico.

	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀
	0.016	0.009
	0.041	0.018
	0.022	0.018
media	0.0263	0.015

$$OD_{260}/OD_{280} = 1.753$$

Concentración de DNA:

$$0.0263 (50 \text{ mg}/\mu\text{l}) (1 \text{ ml}/10^3 \mu\text{l}) (10^3 \text{ ng}/1 \text{ mg}) (500) = 657.5, \text{ ng}/\mu\text{l}$$

VI.3 Conserva de *E. coli* BL21 (DE3) en chaquiras de vidrio y membrana.

Una vez que se ha comprobado la presencia del DNA inserto en la cepa de *E. coli* transformada, es importante conservar la cepa productora de la proteína recombinante para posteriores estudios. Se llevó a cabo la preparación de la conserva en chaquira de vidrio y se comprobó mediante reacción de PCR directo de colonias aisladas y se observó su amplificación (Figura 11).

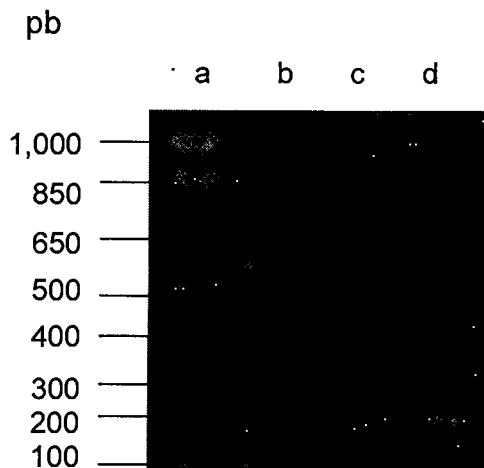


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de productos de PCR de colonia. (a) marcador 1 kb (Gibco BRL); (b) control (sin polimerasa); (c) (d): productos de PCR de colonia.

VI.4 Inducción y estudio de los niveles de *nisA*.

Se indujo el crecimiento celular a tres diferentes temperaturas y posteriormente se analizaron los niveles del gen *nisA* a diferentes tiempos de la cinética.

VI.4.1 Cinética a 14°C.

La inducción y el estudio de la producción de la proteína recombinante se realizó inicialmente a la temperatura más baja: 14°C. La inducción de la producción se realizó cuando se alcanzó una absorbancia a 600 nm (OD_{600}) de cerca de 0.3 (24 h), se observa en el Cuadro 5 y en la Figura 12.

Durante la producción se tomaron muestras de células a las que se les extrajo el DNA plasmídico y se amplificó el DNA inserto mediante PCR. Las bandas obtenidas en cada tiempo se trataron de igual forma y se inyectaron en cada carril. No se observa gran diferencia excepto en la muestra 11 (60 h), en el que la banda es más intensa.

Cuadro 5. Absorbancia de las muestras tomadas durante la cinética a 14 °C

No. de muestra	Tiempo en horas	OD ₆₀₀
1	0	0.138
2	4	0.153
3	8	0.177
4	12	0.193
5	24	0.351
6	28	0.436
7	31	0.523
8	34	0.590
9	36	0.633
10	48	0.918
11	60	0.925

Inducción con IPTG

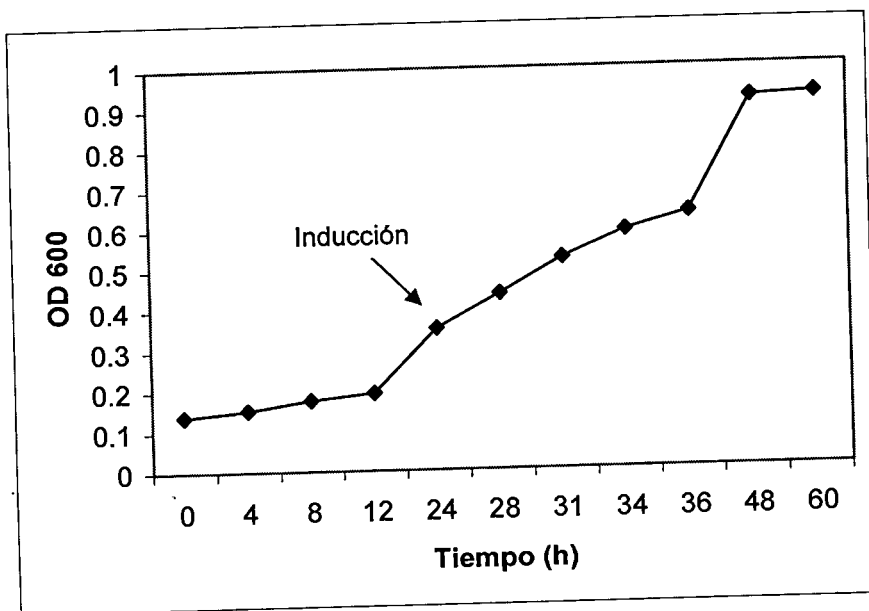


Figura 12. Cinética del cultivo a 14 °C.

Se realizó PCR de las muestras 4 – 11 ya que fueron las que mostraron una cantidad notable de DNA en electroforesis de agarosa.



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de productos de PCR de cultivo a 14 °C. (M) marcador 1 kpb (Gibco BRL).

VI.4.2 Cinética a 25 °C

Durante la cinética a 25.°C, se alcanzó la OD₆₀₀ de 0.3 en 4.5 horas, tiempo en el que se adicionó el agente inductor IPTG, como se muestra en el Cuadro 6 y las Figuras 14 y 15.

Las muestras obtenidas durante la producción de la proteína recombinante muestra diferentes intensidades excepto en la muestra 4. En ésta apenas se observa la banda amplificada de DNA inserto. Al igual que la temperatura anterior, se observa la mayor intensidad de banda en la última muestra procesada a las 10.5 horas.

Cuadro 6. Absorbancia de muestras tomadas durante la cinética a 25° C.

No. de muestra	Tiempo en horas	OD ₆₀₀
1	0	0.185
2	1.5	0.250
3	3	0.268
4	4.5	0.340
5	6	0.552
6	7.5	0.920
7	9	1.111
8	10.5	1.239

→ Inducción con IPTG

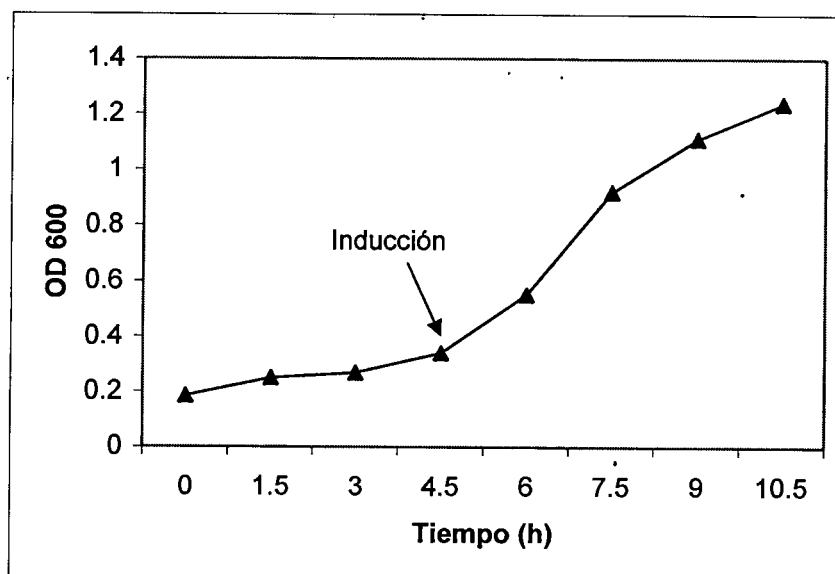


Figura 14. Cinética del cultivo a 25 °C.

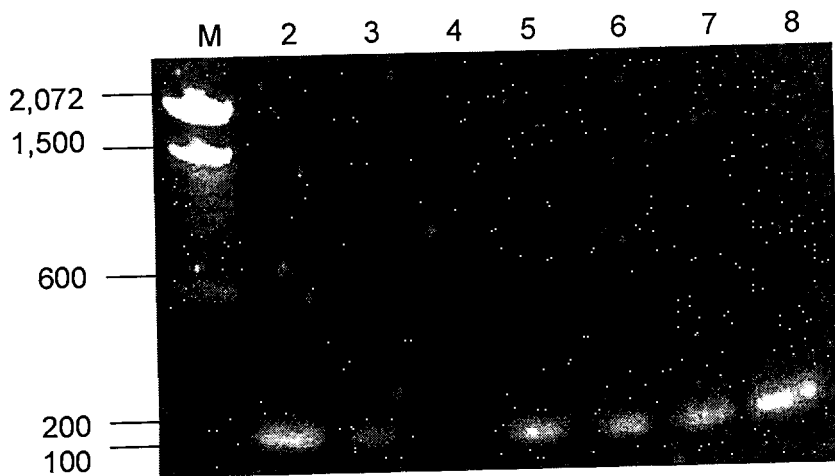


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de productos de PCR de DNA de cultivo a 25 °C. (M) marcador 100 pb (Invitrogen).

VI.4.2 Cinética a 37 °C.

En la cinética de producción a la temperatura más alta, 37°C se alcanzó la OD_{600} de 0.3 en menos de 3 horas, la mayor intensidad de las bandas de los productos de PCR amplificados se observa en la muestra 6 a las 4.5 horas.

En la Figura 16 se puede observar un crecimiento exponencial aún desde antes de la inducción con IPTG.

Cuadro 7. Absorbancia de muestras tomadas durante la cinética a 37° C.

No. de muestra	Tiempo en horas	OD ₆₀₀
1	0	0.0112
2	0.5	0.0157
3	1.0	0.0263
4	1.5	0.2054
5	3.0	0.3766
6	3.5	0.4912
7	4.0	0.6574
8	4.5	0.8953
9	5.0	0.9816

→ Inducción con IPTG

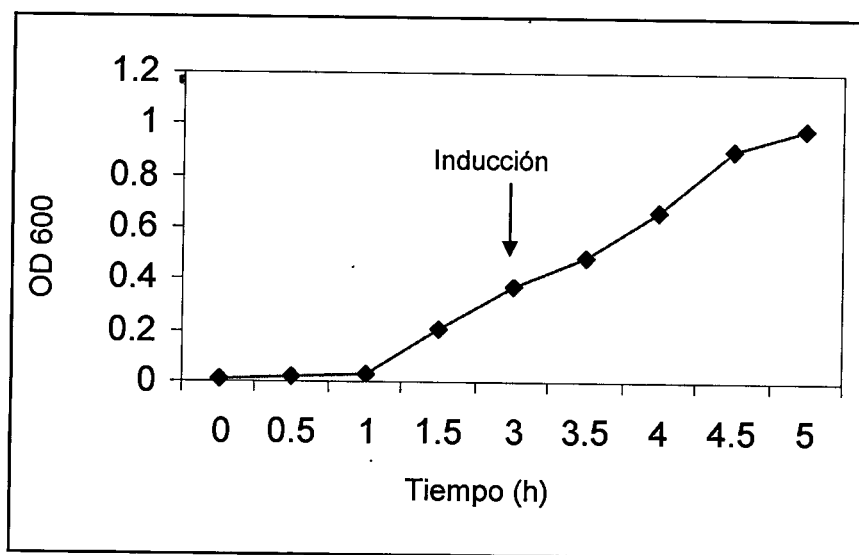


Figura 16. Cinética del cultivo a 37 °C.

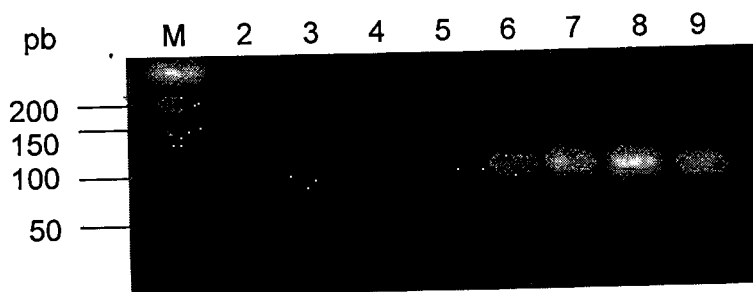


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1.2% de productos de PCR de DNA de cultivo a 37 °C. (M) marcador 100 pb (Invitrogen), (2-9) productos de PCR.

Es evidente que la tasa de crecimiento celular aumenta cuando aumenta la temperatura. A 14°C el crecimiento celular es lento, incrementándose la absorbancia en una tasa promedio de 0.02 UA/h después de la inducción con IPTG (Cuadro 5) y alcanzándose la fase estacionaria después de las 48 horas (Figura 12). A 25 °C el crecimiento es 10 veces más rápido, en promedio 0.2 unidades de absorbancia/h después de la inducción (Cuadro 6) y la fase estacionaria se alcanzó después de 6 horas (Figura 14). El cultivo a 37 °C llegó a la fase estacionaria 4 horas después de la inducción, con una tasa de incremento de 0.3 UA/h (Cuadro 7).

En el Cuadro 8 se muestra una comparación del tiempo en que los cultivos a diferentes temperaturas alcanzaron una densidad óptica necesaria para iniciar la inducción del crecimiento con IPTG, así como el tiempo en que *nisA* llegó a su máximo nivel.

Cuadro 8. Comparación de las cinéticas a diferentes temperaturas.

	14°C	25°C	37°C
Tiempo en alcanzar $OD_{600} = 0.3$	24 h	4.5 h	3 h
Nivel mayor del gen <i>nisA</i>	60 h	10.5 h	4.5 h

VI.5 Purificación de la proteína recombinante.

Las células obtenidas en cada temperatura se lisaron y se purificó la proteína recombinante mediante IMAC. Se analizaron las fracciones obtenidas y se determinó su absorbancia a 280 nm (Cuadro 9). Las fracciones se dializaron y concentraron para posteriormente ser analizadas mediante SDS-PAGE.

Cuadro 9. Absorbancia a 280 nm de fracciones colectadas durante la elución de la muestra en cromatografía IMAC

Fracción (ml)	OD ₂₈₀		
	14 °C	25 °C	37 °C
1	0.182	0.267	0.407
2	0.322	0.438	0.502
2	0.340	0.440	0.425
4	0.349	0.413	0.409
5	0.338	0.412	0.397
media	0.3062	0.394	0.428

Finalmente, se purificó el prepéptido Nis A por medio de la técnica de IMAC y se obtuvo la banda de aproximadamente 7,000 Da aunque muy tenue a pesar de que a las muestras se les removió las sales y se concentraron (Figura 18). Se observan además otras bandas, lo que indica la proteína recombinante no se obtuvo pura.

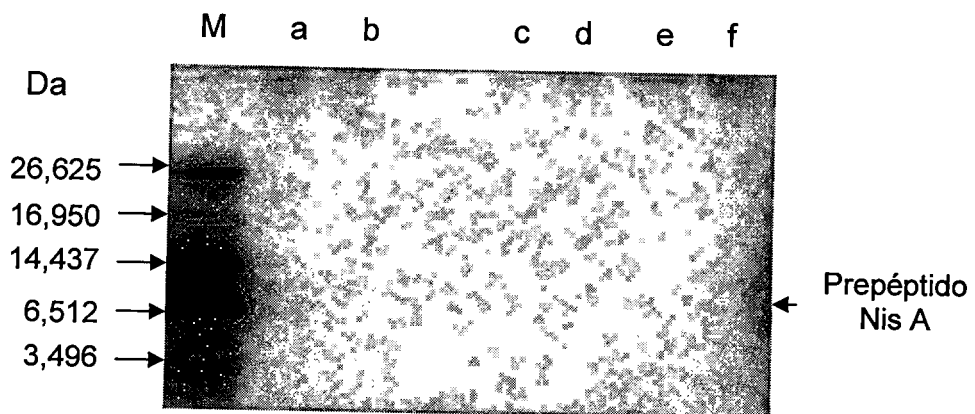


Figura 18. Electroforesis en gel de acrilamida de muestras purificadas por IMAC. (M) marcador de peso molecular (bio-rad), (a,b) 37°C, (c,d) 25°C, (e,f) 14°C.

VII. DISCUSIÓN

Mediante PCR fue posible amplificar el segmento de DNA correspondiente al gen *nisA* de 161 pb de longitud (Figura 10) empleando las polimerasas *Taq* y *Pfu*.

Los plásmidos inducidos por IPTG están presentes en un gran número de copias (30-600) dentro de la célula (Sambrook y Russell, 2001), es por eso que en este estudio, el gen *nisA* fue amplificado mediante PCR por 25 ciclos con el fin de tener una medida indirecta de la expresión de este gen a través del tiempo a diferentes temperaturas. En cada uno de los tres cultivos se observó que la cantidad de *nisA* no aumenta de manera proporcional a la densidad del cultivo ya que no hay un aumento proporcional en la cantidad de productos de PCR conforme va evolucionando la cinética (Figuras 13, 15 y 17) pero al llegar a la fase estacionaria, la cantidad de *nisA* aumenta notablemente. En el caso de la electroforesis de productos de PCR a 25°C la banda de carril 4 perteneciente a la muestra tomada a las 4.5 h se presenta con muy poca intensidad. Esto no es consistente con la cinética, ya que la cantidad de DNA extraído es directamente proporcional a la concentración de células presentes en el cultivo al momento de tomar la muestra, por lo que esta inconsistencia puede deberse a una ineficiente extracción de DNA plasmídico.

Como se mencionó anteriormente la variable más importante para obtener un alto nivel de expresión en *E. coli* es la temperatura a la que una bacteria es incubada antes y durante la inducción del crecimiento. Es crucial llevar a cabo estudios de prueba para determinar la temperatura óptima de expresión de una proteína foránea. La inducción a temperaturas bajas, en este caso a 14°C, resulta en una proteína soluble pero su producción es mucho más lenta que cuando se utilizan temperaturas más altas (25-30°C). Durante la inducción a 37°C, aunque es más rápida, pueden producirse cuerpos de inclusión y por ende, disminuir la solubilidad de la proteína recombinante expresada (Sambrook y Russell, 2001)

Algunos estudios de clonación y expresión en sistemas bacterianos han empleado temperaturas de incubación de 30°C ó 37°C; cuando se indujo el crecimiento de β -mananasa recombinante, la enzima no formó cuerpos de inclusión y resultó soluble (Ethier y col., 1998); sin embargo cuando se produjo una lantionina producida por *B. subtilis*, Spa B recombinante, ésta permaneció en la fracción insoluble, haciendo más difícil el esquema de purificación de la proteína. En cambio, cuando se indujo la producción del prepéptido de Spa B recombinante a 30°C, éste se presentó en la fracción soluble (Xie y col., 2002).

La enzima deshidratasa Nis B fue clonada y expresada también en *E. coli* a 30°C sin que se produjeran problemas por insolubilización de la proteína (Sen y col., 1999).

Nagao y colaboradores (2005) evaluaron dos temperaturas de inducción de una lantionina recombinante, NukM y mediante western blot observaron que la inducción a 20°C por 20 h resultó en la producción de la proteína de interés; no así cuando la inducción se realizó a 37°C durante 3 h. Una vez más, la temperatura más baja resultó ser la más efectiva aunque no se reportó la producción de cuerpos de inclusión a 37°C.

Se desconoce la razón por la que algunas veces existe un efecto de todo o nada a diferentes temperaturas de expresión, pero puede deberse a un gran número de factores o combinación de factores, tales como: la tasa de crecimiento de las células, el plegamiento intracelular de la proteína expresada, desnaturalización de la proteína a causa de la temperatura, sobrecarga de la maquinaria secretora o plegadora de la célula, actividad de proteasas endógenas u otras enzimas líticas, activación de un sistema de respuesta de emergencia propio de la bacteria u otras variables (Sambrook y Russell, 2001).

En *E. coli*, la proteína recombinante, en este caso el prepéptido de nisina A, se secreta al espacio periplásmico pero existe también proteína en el citoplasma. Es

por esto que el rompimiento de la pared y la membrana celular es un proceso importante cuando se lleva a cabo la recuperación de la proteína. La liberación del producto intracelular de las proteínas se logra a través de la ruptura de la pared celular, y el paso de las proteínas al medio circundante se obtiene tanto mediante medios mecánicos como no mecánicos o a través de la lisis química, física o enzimática.

En este estudio se empleó un baño sonicador, el cual resultó ser un método poco efectivo como se observa en la Figura 9 ya que la banda de interés se muestra mucho más tenue en el lisado de células que en las células intactas, lo que indica que las células no fueron lisadas en su totalidad; quedando proteína recombinante contenida en las células que no lisadas las cuales fueron removidas del lisado crudo por centrifugación.

Sin embargo existen métodos más eficientes para el lisado de células como la prensa francesa, la cual es un aparato en el que las células suspendidas en un medio acuoso se fuerzan a alta velocidad a través de un hueco estrecho y ajustable entre una válvula y su asiento a presiones por encima de 50 MPa. La liberación del producto ocurre a través del impacto del chorro de alta velocidad de las células en suspensión sobre las superficies estacionarias, y posiblemente la aceleración del líquido a través del hueco. Se puede usar también un homogenizador ultrasónico, el cual es más eficiente que el baño sónico ya que alcanza frecuencias hasta de 20kHz (Perry, 2003) y se ha utilizado exitosamente en la lisis de células transformadas de *E. coli* BL21 (DE3) ya que en la electroforesis no se observó una reducción significativa en la intensidad de la banda de interés (Xie y col., 2002)

Otra alternativa es la utilización de lisozima para desnaturalizar la pared celular y posteriormente realizar la lisis celular (Koponen y col., 2002).

En el caso de la purificación, el prepérido de nisina A no se obtuvo completamente puro (Figura 18) empleando la técnica de IMAC. Nagao y colaboradores (2005),

purificaron un antibiótico recombinante con cola de histidinas mediante esta misma técnica y en la posterior electroforesis SDS-PAGE detectaron una sola banda correspondiente a la proteína purificada.

La ventaja de IMAC es que se realiza en un solo paso y es relativamente sencillo en comparación con otros sistemas cromatográficos de purificación como lo son la afinidad a quitina, interacción hidrofóbica y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en donde el producto de interés no se obtiene 100% puro, como se muestra en los resultados de algunos estudios (Sen y col., 1999; Xie y col., 2002).

VIII. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se estudiaron los niveles del gen *nisA* en *Escherichia coli*, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directo de colonia, así como usando DNA plasmídico de las células transformadas.

Se indujo la expresión del gen a 14, 25 y 37°C, resultando la última, la temperatura a la cual el cultivo alcanzó la fase estacionaria en un tiempo más corto, sin embargo, la temperatura de 25°C resulta la más conveniente para la producción de NisA-His₆ debido a que, con respecto a los 37°C se requiere de menos energía y es necesaria sólo una hora más en para que el cultivo alcance la fase estacionaria y por ende, la máxima producción de proteína recombinante.

Se logró purificar parcialmente el prepéptido obtenido a estas tres temperaturas mediante la técnica de cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) obteniéndose la banda esperada cerca de 7,000 Da la cual corresponde al peso de la nisina A mas el péptido señal más la cola de 6 histidinas.

Como recomendación se plantea utilizar un método más eficiente para la lisis celular con el fin de obtener un mejor rendimiento de la proteína recombinante durante su purificación mediante IMAC ya que durante este proceso la muestra se diluye considerablemente.

Para obtener la nisina activa es necesario remover la cola de histidinas (mediante tratamiento con trombina o kits especializados), así como llevar a cabo las modificaciones postraduccionales: deshidratación, ciclización y remoción del péptido líder.

Actualmente se está llevando a cabo en el estudio de una de las enzimas (NisB), responsables de la modificación postraducciona de *nisA* mediante sistemas de clonación y expresión y caracterización de la enzima recombinante.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** *Biología Molecular de la Célula*. 2002. 4° Edición. Ediciones Omega, Barcelona, España: 508-509.
- Breukink, E. y Kruijff, B.** 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol. 5: 321-323.
- Chatterjee, Ch., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W.A.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *American Chemical Society*. Vol. 105: 633-683.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 71:1-20.
- Cotter, Paul D., Hill, Colin, Ross, Paul.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews*. Vol. 3: 777-788.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammerlmann, M., Entian, K.D.** 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58: 3730-3743.
- Ethier, N., Talbot, G., Sygusch, J.** 1998. Gene cloning, DNA sequencing and expression of thermostable β -mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 64: 4428-4432.
- García-Almendárez, B.E., Cann, I.K.O., Martin, S.E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado, C.** 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. Vol 19: 670-680.
- Griffiths, Anthony J. F., Gelbart, William M., Miller, Jeffrey H., Lewontin, Richard C.** 2002. *Modern Genetic Analysis*. 2ª edición. McGraw-Hill. New York.
- Hasper, H.E., Kramer, N.E., Smith, J.L., Hillman, J.D., Zachariah, C., Kuipers, O.P., de Kruijff, B., Breukink, E.** 2006. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target Lipid II. *Science*. Vol. 313:1636-1637.
- Hsu, D.S., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A.G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M.J.J., van Nuland, N.A.** 2004. The nisin-lipid II complex reveals a

pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural & Molecular Biology*. Vol. 11:963-967.

- Janson, J.C., Rydén L. 1980.** Protein purification. Principles, high resolution, methods and applications. Editorial VCH, USA: 349-375.
- Kaletta, C., Entian, K.D. 1989.** Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *Journal of Bacteriology*. Vol. 171: 1597-1601.
- Kim, Y.S., Seo, J.H., Cha, H.J. 2003.** Enhancement of heterologous protein expression in *Escherichia coli* by co-expression of nonspecific DNA-binding stress protein, Dps. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 33:460-465.
- Kleerebezem, M. 2004.** Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*. Vol. 25: 1405-1414
- Koponen, O. 2004.** Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. Helsinki. Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology. Tesis Doctoral. 9-20, 50-53.
- Koponen, O., Tolonen M., Qiao, M., Wahlström, G., Helin, J., Saris, P.E.J. 2002.** Nis B is required for the dehydration and NSC for the lantionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology*. Vol. 148:3561-6568.
- Li, B., Yu, J.P.J., Brunzelle, J.S., Moll, G.N., van der Donk, Nair, S.K. 2006.** Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science*. Vol. 311:1464-1467.
- Madigan, M.T, Martinko, J.M., Paraker, J. 2004.** *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Pearson Prentice Hall, Madrid, España: 987-996.
- Mathews, C. K., van Holdé, K. E., Ahern, K. G. 2002.** *Bioquímica*. 3ª edición. Pearson Educación, S. A., Madrid, España: 170.
- Muñoz-Rojas, J. 2002.** www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_03/Capitulo03.pdf
- Nagao, J., Harada, Y., Shioya, K., Aso, Y., Zendo, T., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2005.** Lanthionine introduction into nukacin ISK-1 prepeptide by co-expression with modification enzyme NukM in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 336: 507-513.

NCBI HomePage. National Center for Biotechnology Information.

www.ncbi.nlm.nih.gov

Novagen, pET system manual. 2006. 11^a edición. www.novagen.com.

O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. Vol. 84:593-604.

Okeley, N.M., Paul, M., Stasser, J.I., Blackburn, N., van der Donk, W.A. 2003. SpaC and NisC, the cyclases involved in subtilin and nisin biosynthesis are zinc proteins. *Biochemistry*. Vol. 42:13613-13624.

Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Shinohara, T., Yokotsuka, K. 2003. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. Strain GM005, isolated from *Miso*-paste. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 87:153-159.

Patton, G.C., van der Donk, W.A. 2005. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 8:543-551.

Perry, R. H. 2003. Manual del Ingeniero Químico. 7^a edición, Mc Graw Hill. España: 22-93.

Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 80:101-116.

Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning*. 3^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EUA: 15.1-15.6, 15.14-24, 15.44-15.47.

Schäfer, F., Schäfer, A., Steinert, K. 2002. A highly specific system for efficient enzymatic removal of tags from recombinant proteins. *Journal of Biomolecular Techniques*. Vol. 13:158-171.

Sen, A.K., Narbad, A., Horn N., Dodd, H.M., Parr, A.J., Colquhoun, I., Gasson, M.J. 1999. Post-translational modification of nisin, the involvement of NisB in the dehydration process. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 261: 524-532.

- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. 1990.** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*. 185: 60-89.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M. 2004.** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 44:305-316.
- Wu, Ch. Lin, Ch., Chang, Y., Chung, T. 2006.** Construction and characterization of nisin-controlled expression vectors for use in *Lactobacillus reuteri*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Vol. 70: 757-767.
- Xie, L., Chatterjee, Ch., Balsara, R., Okeley, N.M., van der Donk, W.A. 2002.** Heterologous expression and purification of SpaB involved in subtilin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 295:952-957.
- Xie, L., Miller, M.L., Chatterjee, Ch., Averin, O., Kelleher, N.L., van der Donk, W.A. 2004.** Lacticin 481: *In vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science*. Vol. 303:679-681.
- Zhou, H., van der Donk., W.A. 2002.** Biomimetic stereoselective formation of methylsantonine. *Organic Letters*. Vol. 4:1335-1338.

ANEXO I: Secuencia de nisina A producida por *Lactococcus lactis* utilizada para el diseño de oligos iniciadores.



1: M24527. Reports *Streptococcus lac...*[gi:341189]
 LOCUS STRNISA 223 bp DNA linear BCT 26-AUG-1994
 DEFINITION *Streptococcus lactis* (strain SF3) nisin (nisA) gene, complete cds.
 ACCESSION M24527
 VERSION M24527.1 GI:341189
 KEYWORDS antibiotic; lantibiotic; nisA gene; nisin.
 SOURCE *Lactococcus lactis*
 ORGANISM *Lactococcus lactis*
 Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae;
Lactococcus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 223)
 AUTHORS Kaletta, C. and Entian, K.D.
 TITLE Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisA
 gene and posttranslational processing of its peptide product
 JOURNAL *J. Bacteriol.* 171 (3), 1597-1601 (1989)
 PUBMED 2493449
 COMMENT Original source text: *Streptococcus lactis* (strain SF3) (library:
 of T.Hoerner) DNA.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..223
 /organism="Lactococcus lactis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="SF3"
 /db_xref="taxon:1358"
 /tissue_lib="of T.Hoerner"
 gene 15..201
 /gene="nisA"
 RBS 15..19
 /gene="nisA"
 CDS 28..201
 /gene="nisA"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="nisin"
 /protein_id="AAA26948.1"
 /db_xref="GI:530218"
 /translation="MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPRITSISLCTPGCKTGALMGCNM
 KTATCHCSIHVSK"
 sig_peptide 28..96
 /gene="nisA"
 mat_peptide 97..198
 /gene="nisA"
 /product="nisin"
 ORIGIN
 1 aaaataaatt ataaggaggc actcaaaatg agtacaaaag attttaactt ggatttggtg
 61 tctgtttoga agaaagattc aggtgcatca ccacgcatta caagtatttc gctatgtaca
 121 cccggttgta aaacaggagc tctgatgggt tgtaacatga aaacagcaac ttgtcattgt
 181 agtattcacg taagtaaata accaaatcaa aggatagtat ttt//

ANEXO II. Secuencia de nisina A producida por *Lactococcus Lactis* subsp. *lactis*.



1: DQ118179. Reports *Lactococcus lactis*...[gi:71068058]

LOCUS DQ118179 171 bp DNA linear BCT 30-JUL-2005

DEFINITION *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lantibiotic nisin A precursor, gene, partial cds.

ACCESSION DQ118179

VERSION DQ118179.1 GI:71068058

KEYWORDS .

SOURCE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

ORGANISM *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; *Lactococcus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 171)

AUTHORS Garcia-Almendarez, B.E., Cann, I.K.O., Regalado-Gonzalez, C. and Martin, S.E.

TITLE Cloning and expression of Nis-A gene from *Lactococcus lactis* UQ2

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 171)

AUTHORS Garcia-Almendarez, B.E., Cann, I.K.O., Regalado-Gonzalez, C. and Martin, S.E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-JUL-2005) Depto. Inv. y Posgrado en Alimentos, Universidad Autonoma de Queretaro, C.U., Cerro de las Campanas S/N, Queretaro, Qro. 76010, Mexico

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..171

/organism="Lactococcus lactis subsp. lactis"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="UQ2"

/isolation_source="artisan dairy product"

/sub_species="lactis"

/db_xref="taxon:1360"

/country="Mexico: central region"

CDS

1..>171

/note="Nis-A"

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="lantibiotic nisin A precursor"

/protein_id="AAZ23019.1"

/db_xref="GI:71068059"

/translation="MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPRITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK"

sig_peptide 1..69

ORIGIN

1 atgagtacaa aagatttttaa cttggatttg gtatctgttt cgaagaaaga ttcaggtgca

61 tcaccacgca ttacaagtat ttgcgtatgt acaccgggtt gtaaaacagg agctctgatg

121 ggttgtaaca tgaaaacagc aacttgatcat tgtagtattc acgtaagcaa a