

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Expresión heteróloga y caracterización de una
superóxido dismutasa proveniente del arqueón
Thermoplasma acidophilum”**

Tesis que presenta

Joshua Eduardo Esparza de Lara

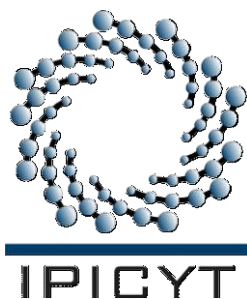
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2012



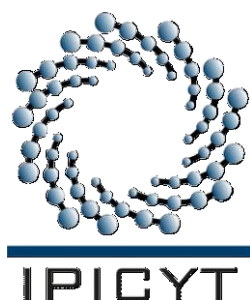
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión heteróloga y caracterización de una superóxido dismutasa proveniente del arqueón *Thermoplasma acidophilum***” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Joshua Eduardo Esparza de Lara** y aprobada el **dd de julio de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Director de tesis)

Dr. Antonio de León Rodríguez
(Miembro del Comité Tutorial)

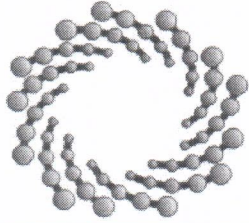
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 250293) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 100 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Presidente	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Secretario	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Joshua Eduardo Esparza de Lara

sobre la Tesis intitulada:

*Expresión heteróloga y caracterización de una superóxido dismutasa proveniente del arqueón **Thermoplasma acidophilum***

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2012.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A mi abuelita Paulita (†)
A mi mamá y a mi familia
A Abraham y Lupita

**“El dinero hace hombres ricos, el conocimiento hombres
sabios, la humildad hace hombres grandes”**

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Leticia Santos Martínez por permitirme desarrollar este proyecto y trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por su asesoría y observaciones.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por sus consejos, aportaciones y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Gerardo Argüello Astorga por enseñarme a perseguir una visión científica integral y humana.

A todos los profesores de la División de Biología Molecular que contribuyeron en mi formación.

Al M. B. Leandro Gabriel Ordoñez Acevedo por el apoyo técnico brindado y la camaradería que creamos en el laboratorio.

Al LANBAMA, en especial a la I.Q. Ma del Carmen Rocha Medina y a la L.P. Verónica Zárate Chávez por la asesoría y facilitación de los equipos.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Molecular y de la generación 2010-2012.

A María Guadalupe Serna Domínguez, Egina Criseida Villalobos Hernández y Marizel Georgina Astello García por su increíble amistad, compañerismo y confianza brindada.

A Abraham Martínez Hernández, gracias por el constante apoyo e incondicionalidad

A mi mamá, mis tías, mis hermanos Israel y Alejandra, y mi prima Natalia, cada logro mío también es suyo. Gracias por apoyarme siempre y ser mi hermosa familia.

A mis amigos de toda la vida, en especial a Paty y Anibal.

Al IPICYT y CONACYT

CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	4
2.2 AMPLIFICACIÓN	
2.2.1 Crecimiento de <i>T. acidophilum</i> DSM-1728.....	4
2.2.2 Almacenamiento de células.....	4
2.2.3 Extracción de ADN genómico.....	4
2.2.4 Amplificación del ORF del gen <i>Ta0013</i>	5

2.3 CLONACIÓN

2.3.1 Plásmidos.....	6
2.3.2 Clonación en el vector pCR [®] 4-TOPO [®]	7
2.3.3 Clonación en el vector de expresión pET-28a(+)......	7

2.4 TRANSFORMACIÓN

2.4.1 Transformación de <i>E.coli</i> BL21(DE3)-pLySs.....	8
2.4.2 Minipreparaciones.....	8

2.5 EXPRESIÓN

2.5.1 Expresión de la proteína recombinante.....	9
--	---

2.6 PURIFICACIÓN

2.6.1 Preparación del extracto crudo	9
2.6.2 Purificación por cromatografía de afinidad	9
2.6.3 Ultra-diálisis.....	10

2.7 ANÁLISIS DE LA SOD PURIFICADA

2.7.1 Cuantificación de proteína.....	10
2.7.2 Determinación del peso molecular.....	10
2.7.3 Análisis de Western Blot.....	10
2.7.4 Determinación del estado de oligomerización.....	11
2.7.5 Determinación de la especificidad metálica	
2.7.5.1 Zimograma.....	11
2.7.5.2 Cuantificación de metales.....	12

2.8 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD	
2.8.1 Determinación de la actividad SOD.....	12
2.8.2 Efecto de la temperatura.....	12
2.8.3 Efecto del pH.....	13
2.8.4 Termoestabilidad.....	13
2.8.5 Efecto de metales y agentes químicos.....	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	26
5. REFERENCIAS.....	27
6. ANEXOS.....	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos	5
Tabla 2. Plásmidos	6
Tabla 3. Características tipo tetramero Fe-SOD observadas en la secuencia blanco (TaSOD)	15
Tabla 4. Porcentajes de la predicción bioinformática	16
Tabla 5. Contenido de metales de la TaSOD	19
Tabla 6. Actividades enzimáticas específicas de Fe/Mn-SODs de distintos Organismos	21
Tabla 7. Influencia de iones metálicos y agentes químicos en la actividad SOD	25

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Programas de amplificación	6
Fig. 2A.	Amplificación del ORF <i>Ta0013</i>	16
Fig. 2B.	Vector de expresión	16
Fig. 3A.	Sobreexpresión y purificación de la TaSOD	17
Fig. 3B.	Detección de la TaSOD por Western Blot	17
Fig. 4.	Análisis de electroforesis nativa	19
Fig. 5.	Zimograma en presencia de varios inhibidores	19
Fig. 6.	Efecto de la temperatura en la actividad SOD	21
Fig. 7.	Efecto del pH en la actividad SOD	22
Fig. 8.	Cinética de termoestabilidad de la TaSOD	25

ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo para <i>T. acidophilum</i>	31
Anexo 2. Soluciones para extracción de ADN genómico de <i>T. acidophilum</i>	32
Anexo 3. Protocolo de purificación de los productos de PCR	32
Anexo 4. Protocolo de purificación de ADN a partir de banda	33
Anexo 5. Preparación de células calciocompetentes	33
Anexo 6. Antibióticos	34
Anexo 7. Soluciones para la inducción de la expresión y purificación de la proteína recombinante	35
Anexo 8. Soluciones para cuantificación de proteínas por el método de Lowry	37
Anexo 9. Soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y condiciones nativas	38
Anexo 10. Tinción de Coomassie coloidal	40
Anexo 11. Western Blot	42
Anexo 12. Zimograma	45
Anexo 13. Reactivos del ensayo espectrofotométrico para la determinación de la actividad SOD	46

RESUMEN

Expresión heteróloga y caracterización de una superóxido dismutasa proveniente del arqueón *Thermoplasma acidophilum*

Las superóxido dismutasas (SODs) de arqueas termoacidófilas tienen relevancia industrial debido a sus propiedades bioquímicas únicas en comparación a sus homólogas bacterianas. El objetivo de este trabajo fue clonar y expresar el ORF de la SOD (*Ta0013*) del arqueón termoacidófilo *Thermoplasma acidophilum* y caracterizar su producto estructural y funcionalmente. La producción de la enzima recombinante fue de 43.51 mg/L y se le identificó como una Fe-SOD con un contenido de 2.18 moles de metal/mol de proteína. El análisis electroforético desnaturizante mostró una banda de 25 kDa que corresponde al peso monomérico calculado. Por otro lado, el análisis de electroforesis nativa evidenció que su estado conformacional es homotetramérico. La proteína fue activa en un amplio intervalo de temperatura (15-60°C) y pH (2-10, valor óptimo 6), su actividad específica fue de 118.5 U/mg a 23°C, fue termorresistente a temperaturas $\leq 60^\circ\text{C}$, tuvo un $t_{1/2}$ ~35 min a 70°C y su actividad se vio afectada únicamente por FeCl₂ 10 mM y SDS 10 mM. Este trabajo constituye la primera caracterización en detalle que se hace de una SOD recombinante expresada en *E. coli* proveniente de un organismo del orden *Thermoplasmatales*. Los resultados obtenidos podrían ser útiles para la producción de la enzima recombinante así como para el desarrollo de cosméticos para la reducción del daño fotooxidante, suplementos para la salud, preservación de alimentos, tratamiento de enfermedades humanas y animales, así como cualquier otra aplicación potencial asociada con la disminución del daño inducido por O₂^{•-} dentro de los intervalos de temperatura y pH descritos.

PALABRAS CLAVE: Fe-SOD, termoacidoestabilidad, *Thermoplasma acidophilum*, *Archaea*, clonación, expresión, caracterización.

ABSTRACT

Heterologous expression and characterization of a superoxide dismutase from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*

Superoxide dismutases (SODs) from thermoacidophilic *Archaea* have industrial relevance due to their unique biochemical properties when compared against their bacterial homologs. The aim of this work was to clone and express the SOD ORF *Ta0013* from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum* and to characterize its product structurally and functionally. The yield of the recombinant enzyme was 43.51 mg/L and it was identified as an iron-containing protein (Fe-SOD) with a metal content of 2.18 moles/mole of protein. SDS-PAGE analysis showed a band of 25 kDa which corresponds to the theoretic monomeric weight. In addition to this, the native form of the enzyme was determined as a homotetramer by native PAGE. The protein was active in a wide range of temperature (15-60°C) and pH (2-10, optimum 6), it had a specific activity of 118.5 U/mg at 23°C, showed thermal stability ($\leq 60^\circ\text{C}$), had a $t_{1/2}$ ~35 min at 70°C, and its activity was only affected by 10 mM FeCl_2 and 10 mM SDS. This work represents the first detailed characterization of a recombinant SOD from a member of the order *Thermoplasmatales* expressed in *E. coli*. These results could be useful for the production of the recombinant enzyme and it could be applied for the development of cosmetics for the reduction of photo-oxidant damage, health promoting supplements, food preservation, treatment of human and animal diseases and any other potential application related with the reduction of superoxide-induced damage inside the described temperature and pH ranges.

KEYWORDS: Fe-SOD, thermal and acid stability, *Thermoplasma acidophilum*, *Archaea*, cloning, expression, characterization.

1. INTRODUCCIÓN

El dominio *Archaea*

Las arqueas son un grupo de procariotes fisiológicamente diverso que habita en una enorme gama de ecosistemas. Clasificadas inicialmente como parte de las bacterias, fueron reconocidas como una unidad evolutiva separada hasta la década de los 70, generando un enorme interés en el estudio de su ecología, diversidad, evolución y biología molecular (Takacs *et al.*, 2001). Las arqueas presentan características exclusivas del dominio que van desde el nivel molecular (presencia de lípidos éter-ligados, ARN polimerasas similares a las de eucariotes, ausencia de peptidoglicano en la pared celular, etc.) hasta sus diversas morfologías y hábitats (Cavicchioli, 2007).

Una característica que sobresale sobre las demás es su nivel de adaptación a los ambientes extremos (organismos extremófilos), pudiendo prosperar en condiciones físicas o geoquímicas adversas como altas o bajas temperaturas, radiación, presión, desecación, salinidad, acidez, alcalinidad, entre otras (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Arqueas termoacidófilas y sus enzimas

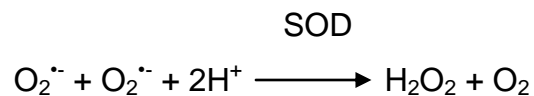
Las arqueas termoacidófilas constituyen un grupo de interés particular, ya que como su nombre lo indica tienen que lidiar a la vez con temperaturas elevadas ($\geq 50^{\circ}\text{C}$) y valores bajos de pH (≤ 4). Dadas las circunstancias tan rigurosas bajo las que sobreviven, estos organismos representan fuentes atractivas para la obtención de enzimas termoestables que puedan ser explotadas en procesos y aplicaciones biotecnológicos. Existen muchas ventajas derivadas del empleo de este tipo de enzimas: i) al expresarlas de manera heteróloga en organismos mesófilos se puede facilitar su purificación por tratamiento con calor (Vieille y Zeikus, 2001), ii) dada su gran estabilidad el costo derivado de la adición continua

de enzima en los procesos se reduce, y iii) establecer procesos a temperaturas elevadas y pHs bajos para la manufactura de productos permite la reducción de la viscosidad, disminuye el riesgo de contaminación microbiana y aumenta la solubilidad (Egorova y Antranikian, 2005).

Entre las enzimas termoacidoestables que ya se han obtenido destacan las ADN polimerasas, ligasas, amilasas, glucoamilasas, pululanasas, xilosa isomerasas, xilanasas, quitinasas, glicosil hidrolasas y superóxido dismutasas (Bertoldo *et al.*, 2004; Vieille y Zeikus, 2001; Bafana *et al.*, 2011).

Superóxido dismutasas

La superóxido dismutasa (SOD, EC.1.15.1.1) es una metaloproteína multimérica responsable de la eliminación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) al convertirlo en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2):



Esta enzima constituye la primera línea de defensa contra el estrés oxidante (EO) (Krinsky, 1992) y se ha identificado en los tres dominios de vida. Hasta ahora se conocen cuatro tipos de SODs de acuerdo a su especificidad metálica: Cu/Zn-SODs, Fe-SODs, Mn-SODs y Ni-SODs. Debido a su alta efectividad antioxidante, la SOD ha sido empleada en una gran cantidad de aplicaciones, entre ellas como suplemento alimenticio, cosmético anti-envejecimiento, agente preservante para órganos a trasplantar y espermatozoides, conservador de alimentos, y para el tratamiento de varias enfermedades relacionadas con el EO como la lesión por isquemia-reperfusión, disfunciones del sistema nervioso, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Bafana *et al.*, 2011).

SODs de fuentes extremófilas

Las SODs de arqueas termoacidófilas tienen una gran demanda comercial debido a sus propiedades bioquímicas únicas, como alta estabilidad térmica, actividad a intervalos amplios de pH y tolerancia a sales y metales. Estas características les permiten resistir a la desnaturalización y están ausentes en la mayoría de sus contrapartes bacterianas.

Al día de hoy se han reportado SODs con propiedades bioquímicas inusuales procedentes de varios tipos de arqueas, incluyendo especies de los ordenes *Desulfurococcales* (Yamano, *et al.* 1999), *Sulfolobales* (Kardinahl *et al.*, 2000, Yamano y Maruyama, 1999), *Thermoproteales* (Amo *et al.*, 2003), entre otras; sin embargo sólo se han estudiado pobremente las provenientes de las *Thermoplasmatales* (Searcy y Searcy, 1981).

Thermoplasma acidophilum

Thermoplasma acidophilum es un arqueón termoacidófilo miembro de este orden. Fue aislado inicialmente de solfataras y desechos de la extracción carbónica. Crece entre los 45-62°C (óptimo 59°C) y pH 0.8-4.0 (óptimo 1-2). Debido a la ausencia de pared celular se le considera un micoplasma. Su genoma ha sido secuenciado (Ruepp *et al.*, 2000), presenta un solo cromosoma circular con un tamaño de 1.5 Mpb y se han identificado 1509 marcos de lectura abierta (ORFs), de los cuales sólo el 55% tiene una función conocida (DeLong, 2003). Mediante un análisis bioinformático se identificó el gen de la SOD (*Ta0013*, NCBI *reference sequence*: NP_393491.1) que codifica una proteína de 205 residuos de aminoácidos. En este trabajo presentamos una caracterización funcional completa de la SOD recombinante de *T. acidophilum* producida en *E. coli*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

A partir de la secuencia de nucleótidos del ORF *Ta0013* se dedujo la secuencia de aminoácidos de la proteína y se realizó un análisis bioinformático mediante la herramienta SODa (<http://babylone.ulb.ac.be/soda/>) para predecir su estado de oligomerización y especificidad metálica.

2.2 AMPLIFICACIÓN

2.2.1 Crecimiento de *T. acidophilum* DSM-1728

Se resuspendió una muestra congelada de células en 25 mL de medio para *T. acidophilum* previamente equilibrado a 59°C en un baño con aceite mineral (Anexo 1). El cultivo se dejó crecer durante tres días a 150 rpm hasta alcanzar una OD_{540nm} de 0.5.

2.2.2 Almacenamiento de células

Para preparar un stock de células de *T. acidophilum* se empleó un cultivo aerobio con 24 h de inóculo y una densidad celular baja (OD_{540nm} 0.05), este se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le ajustó el pH a 3.0 con NaOH 7%. Posteriormente se añadieron 0.15 g de sacarosa por mL de cultivo y se mezcló ligeramente hasta disolverse por completo. Finalmente se dividió el cultivo en alícuotas de 1 mL y se congeló a -80°C.

2.2.3 Extracción de ADN genómico

Se tomó un cultivo de 250 mL de células de *T. acidophilum* a una OD_{540nm} de 0.5 aproximadamente y se centrifugó a 6000 g por 15 min a temperatura ambiente. La

pastilla resultante se resuspendió en 8 mL de solución TNE (Anexo 2), se le añadieron 0.125 mL de SDS 10% y se mezcló perfectamente. Una vez mezclado se añadieron 0.5 mL de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL y se incubó durante 3 h a 50°C. Se tomó el lisado y se mezcló con 11 mL de fenol saturado con solución TE (Anexo 2). Para separar las fases orgánica y acuosa se centrifugó a 5400 g por 10 min a 20°C, se transfirió la última a un nuevo tubo y se repitió el lavado con fenol. Tras recuperar la fase acuosa se le añadieron 11 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 vol/vol) y se mezcló por 10 min. Para separar las fases se centrifugó a 5400 g durante 10 min a 20°C, se tomó la fase acuosa y se dividió en alícuotas de 3 mL aproximadamente. Se añadieron 8 mL de etanol al 95% a cada alícuota y se incubó por 1 h a 20°C. Para obtener la pastilla de ADN se centrifugó a 2000 rpm por 15 min a 4°C. Una vez obtenida se resuspendió en 3 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min a 20°C. Se repitió el lavado con etanol y se volvió a centrifugar. Para secar la pastilla se dejó el tubo abierto durante 15 min a temperatura ambiente, tras lo cual se resuspendió en 2 mL de solución TE. Posteriormente se le añadieron 3 µL de ARNasa libre de ADNasas a una concentración de 10 mg/mL y se incubó con agitación durante 1 h a 37°C. Finalmente se almacenó en el congelador a -80°C.

2.2.4 Amplificación del ORF del gen *Ta0013*

Tabla 1. Oligonucleótidos		
Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Sitios de restricción
TaSOD-F1	ATGGCAGAGACATGGGAAATAAAG	-
TaSOD-R1	GGATTTGAAAGCTTCGTATGCCTT	-
TaSOD-F3	CATG <u>TCATGA</u> ATTATGGCAGAGACATGGGAAATAAAG	<u>BspHI</u>
TaSOD-R2	AAGGAAAAA <u>GCGGCCGC</u> GATTTGAAAGCTTCGTATGCCTT	<u>NotI</u>

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR el ORF del gen *Ta0013* de *T. acidophilum*. También se diseñó un segundo par de oligonucleótidos para añadir dos sitios de restricción a la secuencia para las enzimas *BspHI* y *NotI* en los sitios 5' y 3' de manera respectiva y poder clonarlo en el vector de expresión pET-28a(+). Para cada reacción de PCR se emplearon 100 ng de ADN

genómico de *T. acidophilum*, 0.2 μ M de cada oligonucleótido, 5 μ L de buffer de PCR 10X, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada uno de los DNTP's y 1U de Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen final de 50 μ L. Los programas de amplificación en el termociclador se describen en la figura 1. Los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa 1%.

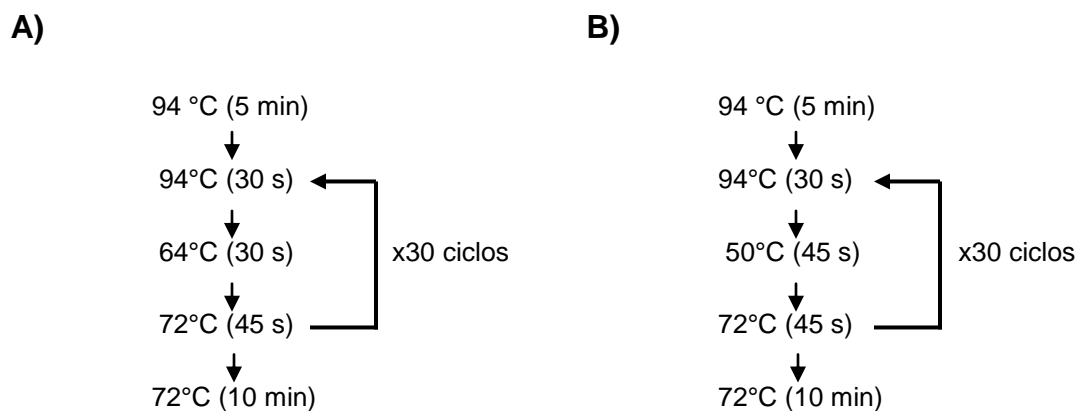


Fig. 1. Programas de amplificación. A) PCR con el par de oligonucleótidos TaSOD-F1 y TaSOD-R1. B) PCR con el par de oligonucleótidos TaSOD-F3 y TaSOD-R2.

2.3 CLONACIÓN

2.3.1 Plásmidos

Se emplearon los vectores pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) para la clonación del ORF del gen *Ta0013* y pET-28a(+) (Novagen) para la expresión.

Tabla 2. Plásmidos	
Nombre	Características relevantes
pCR [®] 4-TOPO [®]	Clonación directa de productos amplificados por la Taq polimerasa Ampicilina y kanamicina como marcadores de selección.
pET-28a(+)	Promotor T7 Secuencia codificante de una cola de histidinas C-terminal (His ₆ -tag) para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. Kanamicina como marcador de selección Sitio múltiple de clonación

2.3.2 Clonación en el vector pCR[®]4-TOPO[®]

El ORF del gen *Ta0013* se clonó de manera directa en el vector pCR[®]4-TOPO[®] utilizando el kit *TOPO TA cloning[®] Kit for Sequencing* (Invitrogen). Se emplearon 150 ng del producto de PCR purificado por columna (Anexo 3), 1 µL de solución salina y 0.5 µL del vector. Se ajustó la reacción a un volumen final de 6 µL con agua destilada estéril y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente.

2.3.3 Clonación en el vector de expresión pET-28a(+)

Para liberar el inserto deseado del vector pCR[®]4-TOPO[®] se llevó a cabo una doble digestión utilizando 0.5 µL de la enzima *BspHI* (NEB), 0.5 µL de *NotI* (Invitrogen), 2 µL de 1XNEBuffer 3, 2 µL de BSA 0.1%, 2 µL de Tritón X-100 0.1%, 500 ng del vector y se ajustó el volumen a 20 µL con agua destilada estéril. La reacción se incubó a 37°C por 3 h. También se realizó una doble digestión del vector pET-28a(+) bajo las mismas condiciones pero empleando las enzimas *NcoI* (Invitrogen) y *NotI* (Invitrogen), se sustituyó el buffer por el React 3 Invitrogen y se tomaron 480 ng del vector. El patrón de corte se analizó en un gel de agarosa 1% y se purificaron las bandas deseadas mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) (Anexo 4).

La ligación del vector y el inserto se efectuó mediante el kit *LigaFast[™] Rapid DNA Ligation System* (Promega) utilizando 100 ng del vector pET28a(+) digerido, 22 ng del inserto, 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer, 3U de T4 DNA Ligase y se ajustó la reacción a un volumen final de 10 µL con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se utilizó inmediatamente para transformar una alícuota de células calcio-competentes de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)-pLySs (Anexo 5).

2.4 TRANSFORMACIÓN

2.4.1 Transformación de *E. coli* BL21(DE3)-pLySs

Se tomó una alícuota de 80 μ L de células calcio-competentes de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)-pLySs y se mezcló con el volumen total de la reacción de ligación. Se incubó la mezcla en hielo por 30 min y se sometió a choque térmico a 42°C por 2 min. Se incubó en hielo por 1 min adicional y se le añadieron 420 μ L de medio LB líquido. Se dejó incubando por 1 h a 37°C y se plaquearon las células en cajas con agar LB suplementadas con kanamicina 50 μ g/mL y cloranfenicol 34 μ g/mL como marcadores de selección (Anexo 6). Se incubaron las cajas por 12 h a 37°C y tras la aparición de las primeras colonias se les realizó una PCR de colonia para comprobar la presencia del inserto.

2.4.2 Minipreparaciones

Para la purificación de ADN plasmídico se empleó el kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN). Se tomó una de las colonias con la construcción pET-28a(+)-*Ta0013* y se inoculó en 10 mL de medio LB adicionado con kanamicina 50 μ g/mL y cloranfenicol 34 μ g/mL, se dejó incubando por 12 h a 37°C y se centrifugó. Una vez obtenido el paquete celular se resuspendió con 250 μ L de Buffer P1. Posteriormente se añadieron 250 μ L de Buffer P2, se mezcló y se agregaron 350 μ L de Buffer N3. Se mezcló nuevamente y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se vació en una columna QIAprep Spin, se centrifugó por 1 min y se descartó el flujo. Se añadieron 0.75 mL de Buffer PE para lavar la columna y se centrifugó por 1 min. Se descartó el flujo y se centrifugó por 1 min adicional para remover el buffer de lavado residual. Finalmente se realizó la elución con 100 μ L de agua libre de nucleasas y se hizo un análisis de restricción de la clona así como secuenciación de ADN para verificar la fidelidad de la secuencia.

2.5 EXPRESIÓN

2.5.1 Expresión de la proteína recombinante

Para llevar a cabo la expresión de la enzima recombinante (TaSOD) se agregó un preinóculo de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)-pLySs/pET-28a(+)-*Ta0013* en 20 mL de medio LB adicionado con kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL, y se dejó incubando a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 16.6 mL del cultivo para inocular 1L de medio LB fresco 1:60, se dividió el contenido en dos botellas y se incubó a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.5. Se adicionó IPTG para tener un concentración final 1mM y se incubó 10 h a 37°C y 150 rpm. Para recuperar las células se centrifugó el total del cultivo a 20,000 g por 20 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se procesó el paquete celular para la purificación de la proteína.

2.6 PURIFICACIÓN

2.6.1 Preparación del extracto crudo

La pastilla total de células de *E. coli* se resuspendió en 30 mL de buffer nativo de unión (Anexo 7), se incubó en hielo y se sonicó en un Ultrasonic processor GE 505, con 10 pulsos de 10 s a 30% de amplitud e intervalos de 10 s. Se centrifugó la muestra a 20,000 g durante 20 min a 4°C, y se tomó todo el extracto crudo (fracción soluble) para el proceso de purificación.

2.6.2 Purificación por cromatografía de afinidad

Se tomaron 1.5 mL de agarosa Ni-NTA por cada 10 mL de la fracción soluble. Se transfirieron a una columna y se lavaron con 6 mL de agua destilada estéril. Se dejó fluir el sobrenadante y la agarosa se resuspendió con 6 mL de buffer nativo de unión. Se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso.

Posteriormente se añadieron 30 mL del extracto crudo a la columna de purificación previamente equilibrada y se dejó unir la proteína durante 3 h a 4°C con agitación constante. Se removió el sobrenadante y se lavó con 8 mL de buffer nativo de lavado, este paso se repitió cinco veces más. Finalmente, para recuperar la proteína se utilizaron 8 mL de buffer nativo de elución y se guardó la fracción eluída a 4°C.

2.6.3 Ultra-diálisis

La fracción eluída se dializó dos veces contra buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7 durante 24 h a 4°C empleando el kit *Mini Dialysis* (GE Healthcare).

2.7 ANÁLISIS DE LA SOD PURIFICADA

2.7.1 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry y usando albúmina de suero bovino (ASB) como estándar (Anexo 8).

2.7.2 Determinación del peso molecular

Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida de gradiente 4-20% en condiciones desnaturizantes (Anexo 9) y el gel se tiñó mediante la tinción de Coomassie coloidal (Anexo 10).

2.7.3 Análisis de Western Blot

La proteína purificada se corrió en un gel de poliacrilamida de gradiente 4-20% en condiciones desnaturizantes y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Bioscience) usando una cámara Semi-Dry Transblot (BioRad) (Anexo 11). La identidad de la proteína se confirmó empleando el

anticuerpo primario Anti-Superoxide dismutase (MnSOD) (Sigma) y un anticuerpo secundario IgG contra conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). También se corroboró con el empleo del anticuerpo primario Anti-Histidine Tag producido en ratón (AbD Serotec) y un anticuerpo secundario IgG contra ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). La detección de las bandas se realizó mediante el método colorimétrico basado en la hidrólisis de BCIP y la reducción de NBT.

2.7.4 Determinación del estado de oligomerización

Para la determinación del estado de oligomerización se corrió un gel nativo de gradiente 4-20% en condiciones nativas por 24 h a 4°C (Anexo 9) y se empleó el método de tinción anteriormente mencionado.

2.7.5 Determinación de la especificidad metálica

2.7.5.1 Zimograma

Se preparó un gel nativo de poliacrilamida en gradiente 4-20% (Anexo 9), se cargó 1 µg de la TaSOD por carril y se corrió a 80V durante 18 h a 4°C. El gel se cortó en cuatro tiras (una por carril) y se incubaron por separado en presencia de buffer de fosfatos 1X, NaN₃ 20 mM, KCN 3 mM o H₂O₂ 10 mM durante 30 min a temperatura ambiente. Las tiras se enjuagaron dos veces con agua destilada. Los pasos subsecuentes se realizaron en oscuridad. Cada carril se incubó durante 25 min con NBT 2.5 mM disuelto en PBS, se enjuagó tres veces con agua destilada y se incubó durante 15 min con 1.1 mM de riboflavina y 1.4 mM de TEMED. Las tiras se lavaron tres veces más y se expusieron a una fuente de luz uniforme (lámpara LED) durante 1 h (Anexo 12).

2.7.5.2 Cuantificación de metales

La TaSOD purificada se envió al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, San Luis Potosí, México), donde se le determinó el contenido de metales mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

2.8 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD

2.8.1 Determinación de la actividad SOD

La actividad SOD se determinó midiendo la capacidad de la proteína recombinante para inhibir la reducción fotoquímica del NBT como se describe por Lai *et al.* (2008). La mezcla de reacción contenía 2.9 mL de buffer de fosfatos 67 mM (pH 7.8), 0.2 mL de EDTA 0.1 M, 0.1 mL de NBT 1.5 mM, 5 μ L de riboflavina 1.2 mM y la dilución apropiada de la TaSOD (15 μ g) en buffer de fosfatos para llevar la reacción a un volumen final de 3.305 mL. Se añadió la riboflavina hasta el final y se expuso a una fuente de luz uniforme (lámpara LED) durante 4 min. La inhibición de la reducción de NBT se monitoreó durante este tiempo a 560_{nm} en un espectrofotómetro Cary BIO-50 (Varian, Palo Alto, CA) equipado con un controlador de temperatura tipo peltier y en celda de cuarzo (Anexo 13).

Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad requerida de enzima que causa el 50% de inhibición de la reducción del NBT mediada por riboflavina.

2.8.2 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura se analizó en presencia de buffer de fosfatos 67 mM (pH 7.8) en un intervalo de temperatura de 15-90°C.

2.8.3 Efecto del pH

La influencia del pH en la actividad SOD se determinó incubando durante 2 h la enzima pura en los siguientes buffers: KCl/HCl 50 mM (pH 2), Glicina/HCl 50 mM (pH 3), CH₃COOH/CH₃COONa 50mM (pH 4-5), KH₂PO₄/NaOH 50 mM (pH 6-8) y Glicina/NaOH 50 mM (pH 9-10). Tras el periodo de incubación se ajustó el pH a 7.8 y se determinó la actividad residual bajo condiciones estándar a 23°C.

2.8.4 Termoestabilidad

La estabilidad térmica de la TaSOD se examinó en el intervalo de 50-80°C. Se incubó la enzima en buffer de fosfatos 67 mM (pH 7.8) y las muestras se removieron a intervalos fijos de tiempo, se dejaron enfriar en hielo y se determinó su actividad residual bajo condiciones estándar. El control se definió como la muestra sin tratamiento por calor.

2.8.5 Efecto de metales y agentes químicos

La enzima se incubó durante 1 h a 23°C en buffer de fosfatos 67 mM (pH 7.8) con diferentes compuestos a concentraciones 0.1 y 10 mM. Los metales y agentes químicos que se probaron fueron: CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, FeCl₂, KCl, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, SDS, urea, β-mercaptoetanol, acetona, cloroformo, DMSO, etanol y DTT. El control se definió como la mezcla de la reacción en ausencia de los compuestos anteriores.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis bioinformático

Con el objeto de predecir la especificidad metálica y el estado de oligomerización de la TaSOD se analizó su secuencia de aminoácidos en el programa SODa. De acuerdo a los patrones conservados (Tabla 3) el programa predijo una Fe-SOD tetramérica (Tabla 4). Dicha predicción se validó posteriormente por el análisis de ICP-OES y electroforesis nativa.

Clonación en el vector de expresión pET-28a(+)

Se confirmó la amplificación del ORF del gen *Ta0013* en un gel de agarosa al 1% (Fig. 2A) y se subclonó en el vector de expresión pET-28a(+), de modo que se obtuvo la construcción pET-28a(+)-*Ta0013* (Fig. 2B).

Expresión, purificación y confirmación de la identidad de la TaSOD

Se determinó que las condiciones óptimas para la sobreexpresión de la TaSOD en *E. coli* fueron a una temperatura de 37°C y un crecimiento por 10 h después de la inducción con IPTG 1mM (datos no mostrados). La producción de la proteína fue de 43.51 mg/L.

En la Fig. 3A, después de la purificación, se observa una banda mayoritaria de 25 kDa en el gel desnaturizante, esta corresponde al peso teórico calculado de la TaSOD.

La identidad de la proteína se confirmó mediante Western Blot tanto por un anticuerpo Anti-SOD como por uno dirigido a la etiqueta de histidinas C-terminal, observándose reacción cruzada en ambos casos (Fig. 3B).

Tabla 3. Características tipo tetrámero Fe-SOD observadas en la secuencia blanco (TaSOD)*					
Patrones	Residuo(s)	Posición(es)	Patrones	Residuo(s)	Posición(es)
SOD (necesaria)	H	26	SOD (típica)	G-D	121-156
SOD (necesaria)	H	73	SOD (típica)	W-D	122-156
SOD (necesaria)	D	156	SOD (típica)	W-A	122-161
SOD (necesaria)	E	159	SOD (típica)	D-A	156-161
SOD (necesaria)	H	160	SOD (típica)	D-Y	156-173
SOD (necesaria)	H-H	26-73	SOD (típica)	E-Y	159-162
SOD (necesaria)	H-D	26-156	SOD (típica)	E-Y	159-163
SOD (necesaria)	H-H	26-160	SOD (típica)	H-A	160-161
SOD (necesaria)	H-D	73-156	SOD (típica)	H-Y	160-163
SOD (necesaria)	H-H	73-160	SOD (típica)	Y-Y	162-163
SOD (necesaria)	D-H	156-160	Tetrámero Fe	L	72
SOD (necesaria)	E-H	159-160	Tetrámero Fe	H	141
SOD (típica)	H	30	Tetrámero Fe	Y-H	34-141
SOD (típica)	Y	34	Tetrámero Fe	G-L	69-72
SOD (típica)	N	39	Tetrámero Fe	G-H	69-141
SOD (típica)	G	101	Tetrámero Fe	L-H	72-73
SOD (típica)	G	121	Tetrámero Fe	L-W	72-122
SOD (típica)	W	122	Tetrámero Fe	L-H	72-141
SOD (típica)	L	125	Tetrámero Fe	L-D	72-156
SOD (típica)	L	133	Tetrámero Fe	H-H	73-141
SOD (típica)	A	161	Tetrámero Fe	G-H	121-141
SOD (típica)	Y	162	Tetrámero Fe	W-H	122-141
SOD (típica)	Y	163	Tetrámero Fe	H-D	141-156
SOD (típica)	Y	173	Tetrámero Fe	H-Y	141-158
SOD (típica)	W	183	No dímero Fe	G	69
SOD (típica)	H-H	26-30	No dímero Fe	Y-G	34-69
SOD (típica)	H-A	26-161	No dímero Fe	G-H	69-73
SOD (típica)	H-Y	30-34	No dímero Fe	G-W	69-122
SOD (típica)	H-H	30-73	No dímero Fe	G-Y	69-158
SOD (típica)	H-E	30-159	No dímero Mn	-	59
SOD (típica)	H-H	30-160	Fe	D	165
SOD (típica)	H-Y	30-163	Fe	S-D	19-165
SOD (típica)	Y-H	34-73	Tetrámero	F	65
SOD (típica)	Y-H	34-160	Tetrámero	Y-F	34-65
SOD (típica)	H-W	73-122	Tetrámero	F-G	65-69
SOD (típica)	G-W	121-122			

*La posición de los residuos corresponde a una Fe-SOD dimérica representativa con el alineamiento arrojado por el programa. Necesaria: observada en todas las SODs. Típica: observada en el 80% de las SODs.

Tabla 4. Porcentajes de la predicción bioinformática	
Patrones	Porcentajes en la TaSOD
Conservados en el 100% de las SODs	100%
Conservados en el 80% de las SODs	56.1%
Fe-SOD tetraméricas	70.62%

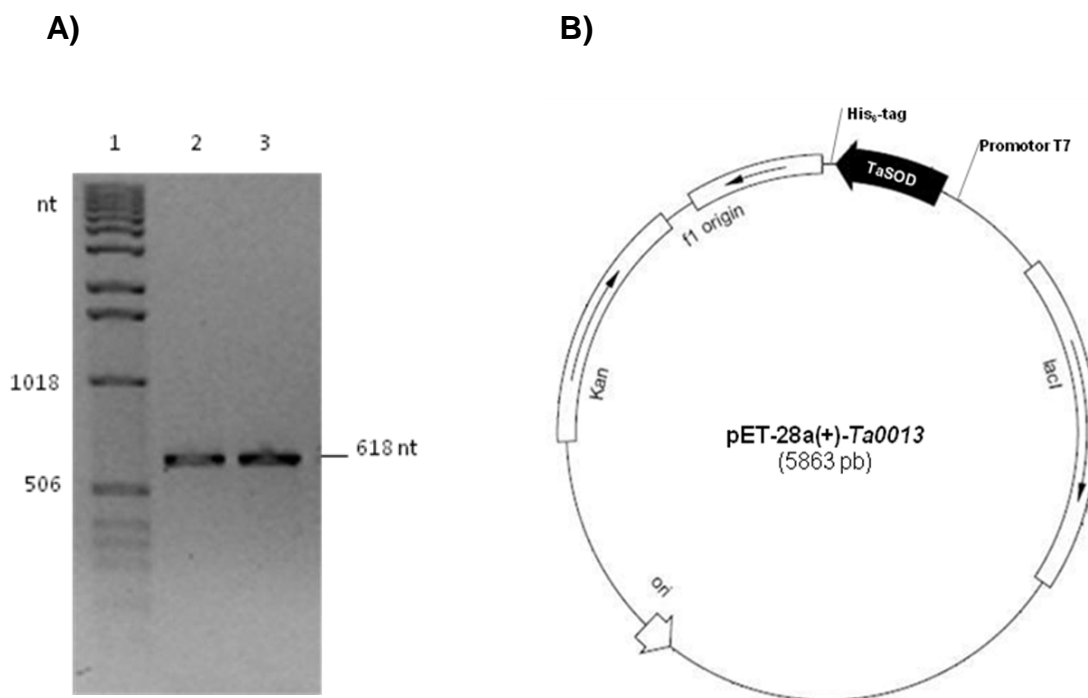


Fig. 2. A) Amplificación del ORF del gen *Ta0013*. Carril 1) Marcador de peso molecular, carriles 2 y 3) ORF del gen *Ta0013*. B) Mapa del vector pET-28a(+)-*Ta0013*

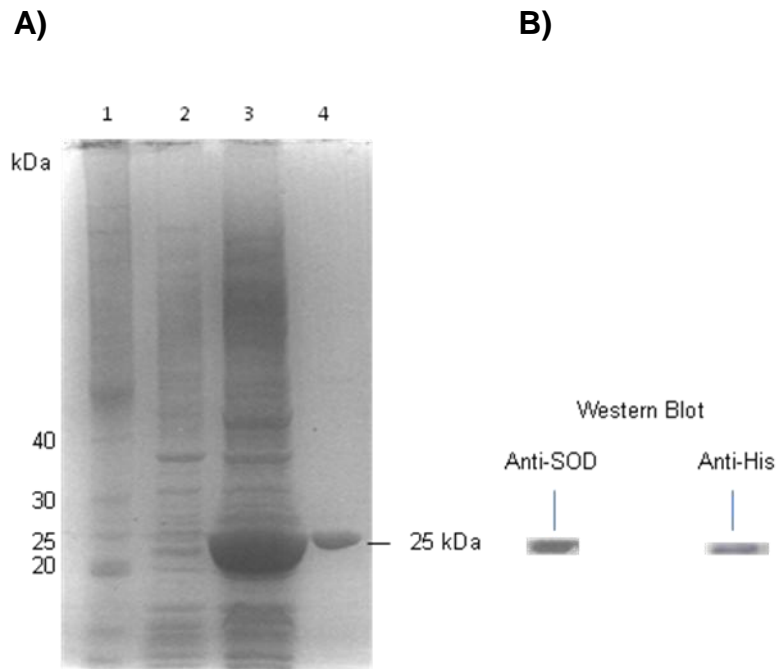


Fig. 3. A) Sobreexpresión y purificación de la TaSOD. Carril 1) Marcador de peso molecular, carril 2) fracción soluble de células de *E. coli* sin inducir, carril 3) fracción soluble de células de *E. coli* inducidas con IPTG, carril 4) Eluído de la columna Ni-NTA agarosa. B) Detección de la TaSOD por Western Blot.

Determinación del estado de oligomerización

La TaSOD se analizó en un gel nativo de gradiente 4-20% y se observó una banda de ~101 kDa (Fig. 4). Esto corrobora la presencia de un estado conformacional tetramérico encontrado en la proteína nativa (Searcy y Searcy, 1981) que se mantiene incluso en la proteína heteróloga expresada en *E. coli*, lo que valida además la predicción bioinformática. Este tipo de oligomerización también se ha encontrado en Fe-SODs de otras arqueas como *Sulfolobus solfataricus* (Ursby *et al.*, 1999) o *Methanobrevibacter arboriphilus* (Brioukhanov *et al.*, 2006), así como en bacterias hipertermófilas como *Aquifex pyrophilus* (Lim *et al.*, 1997). Tales interacciones entre subunidades forman de manera típica homodímeros u homotetrámeros (Bafana, 2011; Wintjens *et al.*, 2004), cuya función está involucrada en la estabilización de las proteínas (Vieille y Zeikus, 2001).

Zimograma

La TaSOD se inhibió solamente en presencia de H₂O₂ 10 mM, pero no con la adición de NaN₃ 20 mM ni con KCN 3 mM (Fig. 5), lo que indica que esta enzima es una Fe-SOD potencial de acuerdo al patrón general de inhibición de las SODs (Scandalios, 1993; Valderas y Hart, 2001). Para confirmar este resultado se realizó un análisis de ICP-OES.

Análisis de ICP-OES

La enzima recombinante presenta 2.18 moles de Fe / mol de proteína, similar a lo reportado para otras Fe-SODs (Fridovich, 1975; McCord, 1979). Esto valida tanto la predicción bioinformática como los resultados obtenidos a partir del zimograma, y cuestiona lo reportado por Searcy y Searcy (1981) quienes en su análisis de la proteína nativa sugirieron una SOD de Fe/Zn con un contenido de 2 moles de Fe y uno de Zn / mol de proteína. Tal composición metálica nunca se ha encontrado en otras SODs y la atribuimos a errores en su determinación.

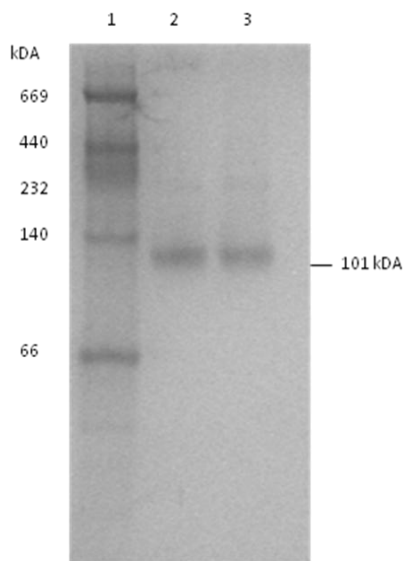


Fig. 4. Análisis de electroforesis nativa. Carril 1) Marcador de peso molecular, carriles 2 y 3) TaSOD purificada.

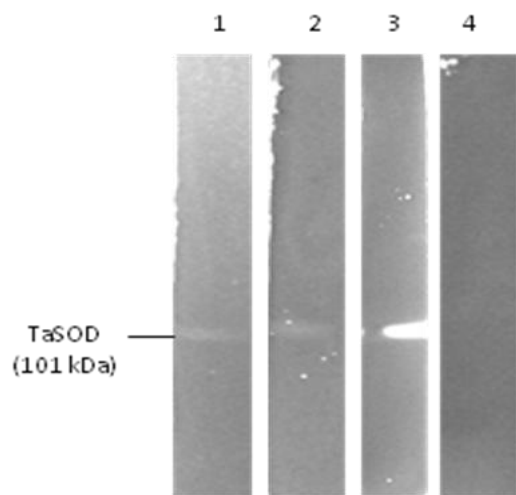


Fig. 5. Zimograma en presencia de varios inhibidores. 1) Ausencia de inhibidores, 2) NaN_3 20 mM, 3) KCN 3 mM, 4) H_2O_2 10 mM

Tabla 5. Contenido de metales de la TaSOD	
Metal	Concentración (moles de metal por mol de proteína)
Hierro	2.18
Cobre	0.18
Manganeso	N.D.*
Zinc	N.D.*
Níquel	N.D.*

*No detectado

Caracterización enzimática

Efecto de la temperatura y el pH

La TaSOD resultó activa en el intervalo de temperatura de 15-60°C (Fig. 6). Generalmente la actividad de las enzimas de organismos termófilos e hipertermófilos se relaciona con su temperatura óptima de crecimiento (Vieille y Zeikus, 2001), sin embargo, la actividad de la TaSOD parece incrementar ligeramente conforme la temperatura baja, esto podría sugerir la existencia de un mecanismo transitorio de defensa en *T. acidophilum* contra el EO inducido por fluctuaciones de temperatura. Cabe señalar que solo se han descrito pocas enzimas que son activas de manera óptima por debajo de la temperatura de crecimiento del organismo hospedero (de 10-20°C menos) (Vieille y Zeikus, 2001), en el caso de la TaSOD incluso ~35°C menos.

La actividad específica calculada correspondió a 118.5 U/mg a 23°C, lo que es comparable a las SODs de *Triticum aestivum* (Tabla 6). Sin embargo, su actividad es marcadamente inferior con respecto a la de SODs provenientes de organismos hipertermófilos como *Aeropyrum pernyx* y *Thermus thermophilus*, lo que podría estar relacionado con las condiciones hostiles en las que habitan estos microorganismos y su estilo de vida exclusivamente aeróbico.

Respecto al efecto del pH, la enzima mostró actividad en un amplio intervalo (2-10) (Fig. 7), pero la actividad catalítica más alta se observó a pH 6. Esto podría estar relacionado con el hecho de que aunque el valor óptimo de crecimiento de *T. acidophilum* oscila entre 1 y 2, su pH citoplásmico oscila entre 5.5 y 6.4 (Searcy, 1976; Baker-Austin y Dopson, 2007).

Por otro lado, también se puede ver que a valores de pH entre 2 y 5 la enzima conserva más de un 87% de actividad residual, e incluso un 70% a pH 10. Estos

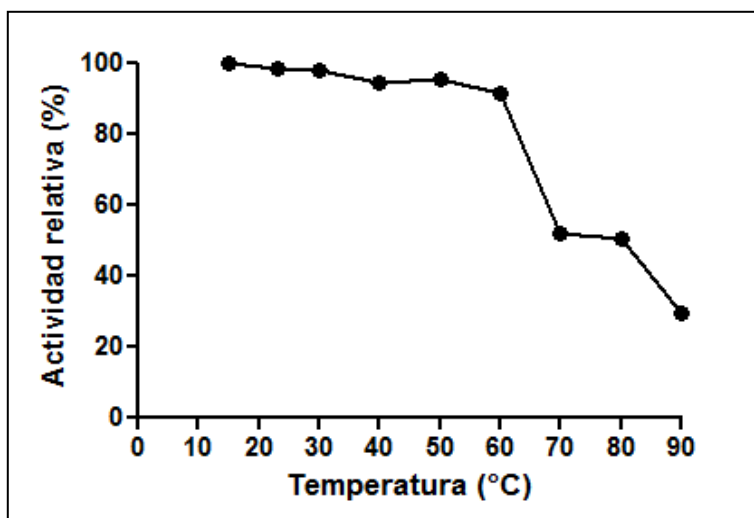


Fig. 6. Efecto de la temperatura en la actividad SOD

Tabla 6. Actividades enzimáticas específicas de Fe/Mn-SODs de distintos organismos				
Organismo	Tipo de SOD	Temperatura (°C)	Actividad específica (U/mg)	Referencia
<i>Aeropyrum pernix</i>	Cambialística	25	906 • 175 ~	Yamano, <i>et al.</i> (1999)
<i>Aquifex pyrophilus</i>	Fe	25	1400	Lim, <i>et al.</i> (1997)
<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	Cambialística	25	1,970 • 434 ~	Amo, <i>et al.</i> (2003)
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Fe	23	118.5	Este trabajo
<i>Thermus thermophilus</i>	Fe	25	1417.5	Liu, <i>et al.</i> (2010)
<i>Triticum aestivum</i>	Fe (SODI)	25	179	Lai, <i>et al.</i> (2008)
	Fe(SODII)	25	114	
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Fe	25	481	Yamano y Maruyama (1999)
Organismo no identificado*	Fe	25	1890	He, <i>et al.</i> (2007)

*SOD obtenida a partir de una biblioteca metagenómica de una muestra de aguas termales.

•Reconstituída con manganeso. ~Reconstituída con hierro

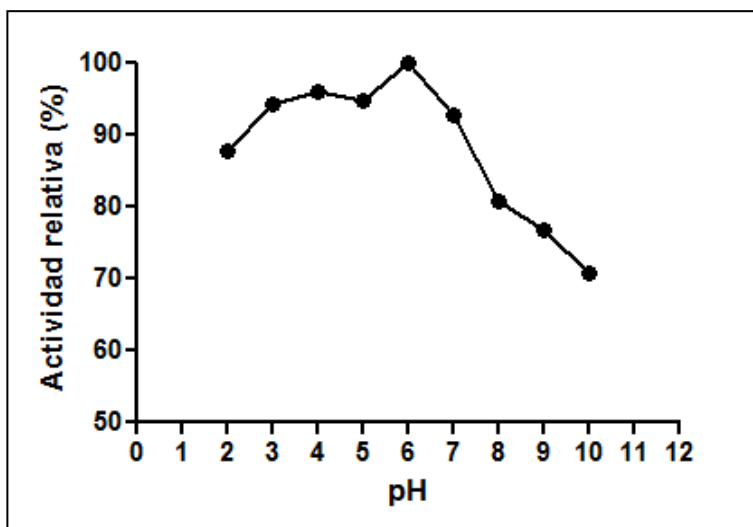


Fig. 7. Efecto del pH en la actividad SOD

resultados podrían constituir un hallazgo interesante, ya que los reportes sobre enzimas activas a pH ácidos son limitados, siendo la mayoría provenientes de organismos termoacidófilos (Bertoldo *et al.*, 2004). Entre algunas de las descritas con esta propiedad están la α -amilasa de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (pH_{opt} 3.0) (Schwermann *et al.*, 1994), una glucoamilasa de *Picrophilus oshimae* (pH_{opt} 2.0) (Serour y Antranikian, 2002) y una de *Sulfolobus solfataricus* (pH_{opt} 5.5-6.0) (Kim *et al.*, 2004), entre otras.

Termoestabilidad

La proteína fue estable a 50 y 60°C (Fig. 8), conservó hasta un 52% de actividad a 70°C durante 30 min y se inactivó totalmente a 80°C por 10 min. Su vida media ($t_{1/2}$) aproximada fue de 35 min a 70°C, lo que es comparable con la de SODs de organismos como *Kluyveromyces marxianus* ($t_{1/2}$ 30 min, 70°C, Nedeva *et al.*, 2009), o SOD-I y SOD-II de *Vigna radiata* ($t_{1/2}$ 27 y 21 min, 70°C, Reddy y Venkaiah, 1984). Además, es más resistente a la inactivación por calor que SODs de fuentes mesófilas como *Thalassiosira weissflogii* ($t_{1/2}$ 23 min, 55°C, Ken *et al.*, 2005) e incluso termotolerantes como *Bacillus* sp. MHS47 ($t_{1/2}$ 40 min, 45°C, Areekit *et al.*, 2011). Esta es una gran ventaja debido a que en la industria cosmética la elaboración de formulaciones con SOD como cremas o protectores solares precisa de su calentamiento a altas temperaturas (Bafana *et al.*, 2011). Dado que hasta nuestro conocimiento no existen reportes sobre evaluación de la estabilidad térmica de otras SODs del orden *Thermoplasmatales* y aparentemente tampoco sobre arqueas exclusivamente termófilas, este constituiría el primero en hacerlo.

Efecto de metales y agentes químicos

El efecto de compuestos sobre la actividad SOD se enlista en la tabla 7. Entre los iones metálicos probados solamente el FeCl₂ 10 mM inhibió fuertemente la actividad, lo que puede deberse a que uno de los productos de la dismutación del

$O_2^{\cdot -}$ es el H_2O_2 y cuando este entra en contacto con $FeCl_2$ se produce HO^{\cdot} a través de la reacción de Fenton. Este es un radical altamente reactivo capaz de dañar las proteínas, disminuyéndose su afinidad por el sustrato y por lo tanto su actividad.

En cuanto a los agentes químicos empleados, solo el SDS 10 mM tuvo influencia inhibitoria en la actividad SOD, al inducir la desnaturalización de la proteína.

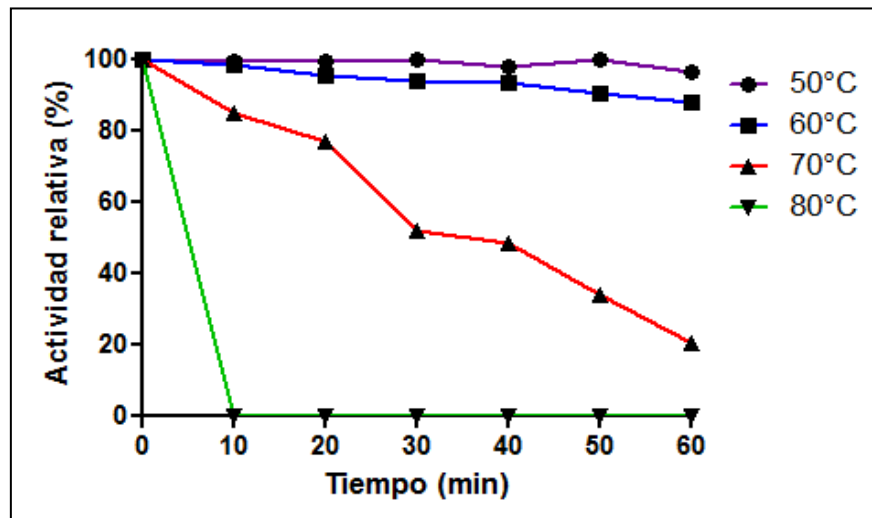


Fig. 8. Cinética de termoestabilidad de la TaSOD

Tabla 7. Influencia de iones metálicos y agentes químicos en la actividad SOD		
Reactivo	Actividad relativa (%)	
	0.1 mM	10 mM
Ninguno	100	100
CuCl ₂	98	100
KCl	99	98
CaCl ₂	98	97
FeCl ₂	97	62
CoCl ₂	95	96
MgCl ₂	92	96
MnCl ₂	97	96
ZnCl ₂	91	93
SDS	99	0
Urea	98	99
2-Mercaptoetanol	98	100
Acetona	98	100
Cloroformo	98	96
DMSO	97	93
Etanol	97	95
DTT	91	96

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Se realizó la construcción pET-28a(+)-*Ta0013* para la expresión de la SOD de *T. acidophilum* en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)-pLySs.
- La producción de la proteína fue de 43.51 mg/L.
- La proteína es una Fe-SOD (2.18 moles de hierro/mol de proteína).
- Su estado de oligomerización es tetramérico canónico tanto en la proteína recombinante como en la nativa.
- La proteína es activa en un amplio intervalo de temperatura (15-60°C) y pH (2-10, óptimo 6).
- Es termoestable a temperaturas $\leq 60^{\circ}\text{C}$ y tiene una $t_{1/2}$ de ~ 35 min a 70°C .
- Su actividad específica fue de 118.5 U/mg a 23°C .
- La actividad solo fue afectada por FeCl_2 10 mM y SDS 10mM.

Este trabajo constituye la primera caracterización en detalle que se hace de una SOD recombinante expresada en *E. coli* proveniente de un organismo del orden *Thermoplasmatales*. Los resultados presentados podrían ser útiles para la producción de la enzima recombinante así como para el desarrollo de aplicaciones comerciales o terapéuticas relacionada a la disminución del daño inducido por $\text{O}_2^{\cdot -}$ dentro de los intervalos de temperatura y pH descritos para la proteína.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Amo T, Atomi H, Imanaka T (2003) Biochemical Properties and Regulated Gene Expression of the Superoxide Dismutase from the Facultatively Aerobic Hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. J Bacteriol 185 : 6340-6347
- Areekit S, Kanjanavas P, Khawsak P, Pakpitchareon A, Potivejkul K, Chansiri G, Chansiri K (2011) Cloning, Expression, and Characterization of Thermotolerant Manganese Superoxide Dismutase from *Bacillus* sp. MHS47. Int J Mol Sci 12 : 844-856
- Bafana A, Dutt S, Kumar S, Ahuja PS (2011) Superoxide dismutase: an industrial perspective. Crit Rev Biotech 31 : 65-76
- Baker-Austin C, Dopson M (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends Microbiol 15 : 165-171
- Bertoldo C, Dock C, Antranikian G (2004) Thermoacidophilic Microorganisms and their Novel Biocatalysts. Eng Life Sci 4 : 521-532
- Brioukhanov AL, Nessaty VJ, Netrusov AI (2006) Purification and Characterization of Fe Containing Superoxide Dismutase from *Methanobrevibacter arboriphilus* Strain AZ. Biochemistry (Moscow) 71 : 441-447
- Cavicchioli R (2007) Archaea: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington (DC)
- DeLong EF (2000) Extreme genomes. Genom Biol 1 : 1209.1-1209.3
- Egorova K, Antranikian G (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. Curr Opin Microbiol 8 : 649-655
- Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. Annu Rev Biochem 44: 147-159
- He YZ, Fan KQ, Jia CJ, Wang ZJ, Pan WB, Huang L, Yang KQ, Dong ZY (2007) Characterization of a hyperthermostable Fe-superoxide dismutase from hot spring. Appl Microbiol Biotechnol 75 : 367-376
- Kardinahl S, Anemuller S, Schafer G (2000) The hyper-thermostable Fe-superoxide dismutase from the archaeon *Acidianus ambivalens*:

characterization, recombinant expression, crystallization and effects of metal exchange. *Biol Chem* 381 : 1089–1101

- Ken CF, Hsiung TM, Huang ZX, Juang RH, Lin CT (2005) Characterization of Fe/Mn-Superoxide Dismutase from Diatom *Thalassiosira weissflogii*: Cloning, Expression, and Property. *J Agric Food Chem* 53 : 1470-1474
- Kim MS, Park JT, Kim YW, Lee HS, Nyawira R, Shin HS, Park CS, Yoo SH, Kim YR, Moon TW, Park KH (2004) Properties of a Novel Thermostable Glucoamylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* in Relation to Starch Processing. *Appl Environ Microbiol* 70 : 3933–3940
- Krinsky NI (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200: 248–254
- Lai LS, Chang PC, Chang CT (2008) Isolation and Characterization of Superoxide Dismutase from Wheat Seedlings. *J Agric Food Chem* 56 : 8121–8129
- Lim JH, Yu YG, Choi IG, Ryu JR, Ahn BY, Kim SH, Han YS (1997) Cloning and expression of superoxide dismutase from *Aquifex pyrophilus*, a hyperthermophilic bacterium. *FEBS Lett* 406 : 142-146
- Liu J, Yin M, Zhu H, Lu J, Cui Z (2011) Purification and characterization of a hyperthermostable Mn-superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 15 : 221-226
- McCord JM (1979) Superoxide dismutases: occurrence, structure, function and evolution. *Current Topics in Biological and Medical Research*. Liss, New York
- Nedeva T, Dolashka-Angelova P, Moshtanska V, Voelter W, Petrova V, Kujumdzieva A (2009) Purification and partial characterization of Cu/Zn superoxide dismutase from *Kluyveromyces marxianus* yeast. *J Chromatogr B* 877 : 3529–3536
- Reddy DC, Venkaiah B (1984) Purification and characterization of Cu-Zn superoxide dismutases from mungbean (*Vigna radiata*) seedlings. *J Biosci* 6 : 115-123
- Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409 : 1092-1101

- Ruepp A, Graml W, Santos-Martinez ML, Koretke KK, Volker C, Mewes HW, Frishman D, Stocker S, Lupas AN, Baumeister W (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. Nature 407 : 508-513
- Scandalios J (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. Plant Physiol 1 : 7-12
- Schwermann B, Pfau K, Liliensiek B, Schleyer M, Fischer T, Bakker EP (1994) Purification, Properties and Structural Aspects of a Thermoacidophilic α -Amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* Atcc 27009. Eur J Biochem 226 : 981-991
- Searcy DG (1976) *Thermoplasma acidophilum*: intracellular pH and potassium concentration. Biochim Biophys Acta 451 : 278–286
- Searcy KB, Searcy DG (1981) Superoxide dismutase from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. Biochim Biophys Acta 670 : 39-46
- Serour E, Antranikian G (2002) Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum* , *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. A van Leeuwenhoek 81 : 73-83
- Takacs CD, Reysenbach AL, Boone DR (2000) Archaeal Ecology. Encyclopedia of Life Sciences. Published online at www. els.net
- Ursby T, Adinolfi BS, Al-Karadaghi S, De Vendittis E, Bocchini V (1999) Iron superoxide dismutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: analysis of structure and thermostability. J Mol Biol 286 : 189–205
- Valderas MW, Hart ME (2001) Identification and Characterization of a Second Superoxide Dismutase Gene (sodM) from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 183 : 3399–3407
- Vieille C, Zeikus GJ (2001) Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. Microbiol Mol Biol R 65 : 1-43
- Wintjens R, Noël C, May ACW, Gerbod D, Dufernez F, Capron M, Viscogliosi E, Rooman M (2004) Specificity and Phenetic Relationships of Iron- and Manganese-containing Superoxide Dismutases on the Basis of Structure and Sequence Comparisons. J Biol Chem 279 : 9248–9254

- Yamano S, Sako Y, Nomura N, Maruyama T (1999) A Cambialistic SOD in a Strictly Aerobic Hyperthermophilic Archaeon, *Aeropyrum pernix*. J Biochem 126 : 218-225
- Yamano S, Maruyama T (1999) An Azide-Insensitive Superoxide Dismutase from a Hyperthermophilic Archaeon, *Sulfolobus solfataricus*. J Biochem 126 : 186-193

6. ANEXOS

ANEXO 1

Medio de cultivo para *T. acidophilum*

1 L (pH Final 1.5)

Solución A (Elementos traza)	10 mL
Solución B	100 mL
Extracto de levadura estéril 10% (peso/volumen)	10 mL
Glucosa estéril 10% (peso/volumen)	100 mL
H ₂ SO ₄	2 mL
Agua destilada	c.b.p.

Solución A (Elementos traza)

1 L

FeCl ₃ x 6 H ₂ O	1.93 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0.18 g
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	0.45 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.022 g
CuCl ₂ x H ₂ O	0.005 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.003 g
VoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.0038 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.002 g
Agua destilada	c.b.p.

Solución B

1 L

(NH ₄) ₂ SO ₄	13.2 g
KH ₂ PO ₄	3.72 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2.72 g
CaCl ₂ x H ₂ O	0.74 g
Agua destilada	c.b.p.

ANEXO 2

Soluciones para extracción de ADN genómico de *T. acidophilum*

Solución TNE

50 mL	
Tris HCl 1 M	5 mL
NaCl 1 M	5 mL
EDTA 0.5 M	5 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Solución TE

50 mL	
Tris HCl 1 M	500 µL
EDTA 0.5 M	200 µL
Agua destilada estéril	c.b.p.

ANEXO 3

Protocolo de purificación de los productos de PCR (*QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN*)

1. Añadir cinco volúmenes de buffer PB a un volumen de la muestra de PCR y mezclar (250 µL de buffer PB por cada 50 µL de la muestra).
2. Colocar una columna QIAquick en un tubo de 2 mL.
3. Aplicar la muestra al centro de la columna y centrifugar de 60 s a 17, 900 g.
4. Descartar el fluido. Colocar la columna en el mismo tubo.
5. Lavar la columna con 0.75 mL de buffer PE. Centrifugar 60 s.
6. Descartar el fluido, colocar la columna otra vez y centrifugar durante un minuto adicional.

7. Colocar la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL. Eluir con 50 μ L de agua libre de nucleasas (pH 7.0-8.5). Esperar un minuto y centrifugar por un minuto.

ANEXO 4

Protocolo de purificación de ADN a partir de banda (*QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN*).

1. Cortar el fragmento de ADN del gel con un escalpelo limpio.
2. Pesar el gel en un tubo. Añadir tres volúmenes de buffer QG a un volumen de gel (Ej. 300 μ L de buffer QG por 100 mg de gel).
3. Incubar a 50°C por 10 min o hasta que el gel se disuelva por completo.
4. Revisar que el color de la mezcla sea amarillento.
5. Añadir un volumen de isopropanol igual al peso del gel (Ej. 100 μ L de isopropanol por cada 100 mg de gel).
6. Aplicar la muestra a una columna QIAquick, centrifugar a 17, 900 g por 1 min y descartar el flujo.
7. Añadir 0.5 mL de buffer QG y centrifugar 1 min. Descartar el flujo.
8. Lavara con 0.75 ml de buffer PE. Descartar el flujo al centrifugar y repetir centrifugado por 1 min adicional.
9. Colocar la columna en un tubo nuevo y eluir con 30 μ L de agua libre de nucleasas. Dejar reposar 1 min para incrementar la concentración y centrifugar 1 min.

ANEXO 5

Preparación de células calciocompetentes

1. A partir de un cultivo en placa inocular 20 mL de medio LB e incubar durante toda la noche a 37°C con agitación constante.

2. Añadir 1 mL del preinóculo a 50 mL de medio LB. Muestrear cada hora hasta alcanzar una OD_{600nm} 0.5.
3. Vaciar el cultivo en tubos de centrifuga de 50 mL y enfriar durante 20 min.
4. Al término del lapso de tiempo mencionado centrifugar a 7000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Una vez formada la pastilla eliminar el sobrenadante y resuspenderla en 15 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril. Dejar reposar en hielo durante 30 min y agitar de manera ligera periódicamente.
6. Centrifugar a 7000 rpm por 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en 350 µL de CaCl₂ 0.1 M y agregar 50 µL de glicerol al 80%.
7. Hacer alícuotas de 80 µL por vial y almacenar a -80°C.

ANEXO 6

Antibióticos

Preparación stock de cloranfenicol (34 mg/mL)

Cloranfenicol	0.034 g
Etanol o metanol	1 mL

Preparación stock de kanamicina (50 mg/mL)

Kanamicina	0.05 g
Agua destilada estéril	1 mL

Preparación de stock de ampicilina (200 mg/mL)

Ampicilina	0.2 g
Agua destilada estéril	1 mL

Filtrar con un filtro Millipore Millex[®] GV 0.22 µL y almacenar a -20 °C en un tubo eppendorf,

ANEXO 7

Soluciones para la inducción de la expresión y purificación de la proteína recombinante.

IPTG 1M

IPTG	0.2383 g
Agua destilada estéril	1 mL

Filtrar con un filtro Millipore Millex[®] GV 0.22 µL, almacenar a -20 °C en un tubo eppendorf y proteger de la luz.

Buffer nativo de purificación 5X (pH 8.0)

200 mL	
Na ₂ HPO ₄	6.898 g
NaCl	29.22 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Imidazol 3M pH 8

50 mL	
Imidazol	10.3 g
Buffer A 10X	4.385 mL
Buffer B 10X	0.615 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer A 10X

5 mL	
Na ₂ HPO ₄	0.13799 g
NaCl	1.461 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer B 10X

1 mL	
NaHPO ₄	0.02839 g
NaCl	0.2922 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer nativo de purificación 1X (pH 8.0)

Agua destilada estéril	80 mL
Buffer nativo de purificación 5X	20 mL

Buffer nativo de unión (pH 8.0, Imidazol 10 mM)

30 mL	
Buffer nativo de purificación 1X	30 mL
Imidazol 3M	100 µL

Buffer nativo de lavado (pH 8.0, Imidazol 20 mM)

50 mL	
Buffer nativo de purificación 1X	50 mL
Imidazol 3M	335 µL

Buffer nativo de elución (pH 8.0, Imidazol 250 mM)

15 mL	
Buffer nativo de purificación 1X	13.75 mL
Imidazol 3M	1.25 mL

ANEXO 8

Soluciones para cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Solución A

50 mL	
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.25 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Solución B

50 mL	
KNaC ₄ H ₄ O ₆	0.5 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Solución C

500 mL	
Na ₂ CO ₃	10 g
NaOH 0.1 N	c.b.p.

Solución D

Solución A	1 mL
Solución B	1 mL
Solución C	98 mL

Solución de Folin-Ciocalteu (SFC)*

1:2	
Reactivo de Folin-Ciocalteu	10 mL
Agua destilada estéril	10 mL

*Preparar en fresco.

Tubo	Bco	1	2	3	4	5
ASB	0 μ L	25 μ L	50 μ L	75 μ L	100 μ L	125 μ L
Agua destilada	1000 μ L	975 μ L	950 μ L	925 μ L	900 μ L	875 μ L
Reactivo D	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Reposo	10 min					
SFC	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Reposo	30 min					
Medición a 590 nm						

ANEXO 9

Soluciones para electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y condiciones nativas

Acilamida 30% (19:1)

1L

Acilamida	285 g
Bisacilamida	15 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)

100 mL

Tris base	18.15 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

SDS 10%

10 mL

SDS	1 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

PSA 10%

1 mL	
PSA	0.1 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer de corrida 40X (SDS-PAGE)

400 mL	
Tris base	48 g
Glicina	30 g
SDS 10%	160 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer de corrida 1X (NATIVE-PAGE)

1 L	
Tris base	3 g
Glicina	14.4 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer Laemmli (SDS-PAGE)

Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	2.5 mL
Glicerol	2.8 mL
Azul de bromofenol	0.025 g
SDS 2%	2 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer de carga 5X (NATIVE-PAGE)

Tris-HCl 1.5 M (pH 6.8)	15.5 mL
Azul de bromofenol 1%	2.5 mL
Agua destilada estéril	7 mL
Glicerol	25 mL

Gel desnaturalizante (gradiente 4-20%, 1.5 mm de grosor)

	4%	20%	Concentrador
Acrilamida 30% (19:1)	730 µL	3630 µL	330 µL
Tris-HCl 1.5M (pH 8.8)	1380 µL	1380 µL	630 µL
SDS 10%	55 µL	55 µL	25 µL
Agua destilada estéril	3300 µL	410 µL	1500 µL
TEMED	5 µL	3 µL	6 µL
PSA 10%	24 µL	24 µL	15 µL

Gel nativo (gradiente 4-20%, 1.5 mm de grosor)

	4%	20%	Concentrador
Acrilamida 30% (19:1)	666.5 µL	3333 µL	335 µL
Tris-HCl 1.5M (pH 8.8)	1250 µL	1250 µL	500 µL
Agua destilada estéril	3083 µL	417 µL	1150 µL
TEMED	5 µL	2.5 µL	2.5 µL
PSA 10%	25 µL	25 µL	1.5 µL

ANEXO 10

Tinción de Coomassie coloidal

Solución de fijado

500 mL

Metanol

250 mL

Ácido fosfórico

10 mL

Agua destilada estéril

c.b.p.

Solución de hidratación

500 mL

Metanol	165 mL
Sulfato de amonio	85 g
Ácido fosfórico	15 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Disolver el sulfato de amonio con un poco de agua, mezclar con el resto de los componentes y aforar a 0.5 L.

Solución de tinción

100 mL

Solución de hidratación	100 mL
Coomasie G-250	0.06 g

Protocolo de tinción

1. Fijar con la solución de fijado durante 3 h o toda la noche.
2. Dar tres lavados de 10 min cada uno con agua destilada.
3. Hidratar durante 1 h con la solución de hidratación.
4. Teñir con la solución de tinción durante algunas horas.

ANEXO 11

Western Blot

Buffer de transferencia Towbin

1L

Tris base	5.8 g
Glicina	2.9 g
SDS 10%	3.7 mL
Metanol	200 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Rojo de Ponceau

10 mL

Ponceau xilidina	0.05 g
Ácido acético glacial	500 μ L
Agua destilada estéril	c.b.p.

PBS 20X pH 7.5

500 mL

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Solución de bloqueo

30 mL

Gelatina	1.25 g
PBS 1X	30 g

Solución de lavado

PBS 1X 30 mL

Solución anticuerpo primario (dilución 1:1000)

10 mL
PBS 1 X 10 mL
Gelatina 0.1 g
Anticuerpo 10 µL

Solución anticuerpo secundario (dilución 1:10,000)

10 mL
PBS 1 X 10 mL
Gelatina 0.1 g
Anticuerpo 1 µL

Buffer AP

100 mL
Tris base 1.21 g
MgCl₂ x 6 H₂O 1.51 g
NaCl 0.58 g
Agua destilada estéril c.b.p.

Solución de revelado

10 mL
Buffer AP 10 mL
NBT 50 mg/mL 66 µL
BCIP 50 mg/mL 33 µL

Protocolo de Western Blot

1. Realizar geles de poliacrilamida (desnaturalizantes o nativos) por duplicado. Teñir uno de ellos mediante tinción de Coomassie coloidal.
2. Humedecer una membrana de nitrocelulosa, papel filtro y el gel con buffer de transferencia Towbin durante 15 min.
3. Colocar el papel filtro en la placa de la cámara de transferencia, eliminando todas las burbujas que se formen.
4. Colocar la membrana sobre el papel filtro, colocar el gel sobre esta y nuevamente evitar la presencia de burbujas.
5. Colocar el segundo papel filtro sobre el gel. Colocar la tapa de la cámara y conectar. Correr a 10V durante 30 min.
6. Teñir con rojo de Ponceau (si se empleo un marcador preteñido se puede saltar este paso).
7. Lavar la membrana con agua destilada hasta retirar todo el colorante.
8. Efectuar un lavado con PBS 1X.
9. Incubar la membrana con la solución de bloqueo por 8 h o durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación constante.
10. Lavar la membrana cuatro veces durante 5 min cada vez con PBS 1X.
11. Incubar la membrana con la solución del anticuerpo primario durante 8 h a 4°C y con agitación constante.
12. Lavar la membrana 5 veces durante 5 min cada vez con solución de lavado.
13. Incubar la membrana con la solución del anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación constante.
14. Lavar la membrana con PBS 1X por 5 veces durante 5 min por vez.
15. Lavar dos veces con buffer AP.
16. Revelar la reacción con la solución de revelado. El desarrollo de la reacción solo lleva algunos minutos.
17. Detener la reacción con agua destilada y dejar que seque la membrana.

ANEXO 12

Zimograma

Solución de riboflavina

Riboflavina	0.0103 g
PBS 1X	25 mL

Solución de TEMED

TEMED	0.035 mL
PBS 1X	25 mL

Solución de NBT

NBT	0.09198 g
PBS 1X	45 mL

Solución de cianuro de potasio

KCN	0.0048 g
PBS 1X	25 mL

Solución de peróxido de hidrógeno

H ₂ O ₂ 1M	0.25 mL
PBS 1X	24.75 mL

Solución de azida de sodio

NaN ₃	0.0325 g
PBS 1X	25 mL

ANEXO 13

Reactivos del ensayo espectrofotométrico para la determinación de la actividad SOD.

NBT 1.5 mM

50 mL	
NBT	0.06132 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

EDTA 0.1 M

100 mL	
EDTA 0.5 M	20 mL
Agua destilada estéril	c.b.p.

Buffer de fosfatos 67 mM

50 mL	
Fosfato monosódico monohidratado	0.0481 g
Fosfato disódico heptahidratado	0.8044 g
Agua destilada estéril	c.b.p.

Riboflavina 1.2 mM

50 mL	
Riboflavina	0.02225 g
Agua destilada estéril	c.b.p.