

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS  
VASOINHIBINA Y SU QUIMERA VASOINHIBINA-VASOSTATINA”**

Tesis que presenta

**Arlette Bohórquez Hernández**

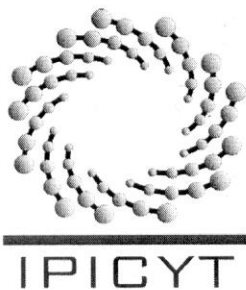
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Antonio de León Rodríguez**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2011



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS VASOINHIBINA Y SU QUIMERA VASOINHIBINA-VASOSTATINA**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Arlette Bohórquez Hernández** y aprobada el **04 de 07 de 2011** 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.

Dr. Antonio de León Rodríguez

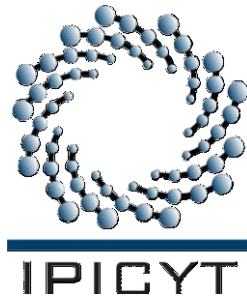
Director de la tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

Miembro del Comité Tutorial

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

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 del Dr. Antonio de León Rodríguez

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 230945 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto CONACyT- Básicas No. 82010.



# 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 085 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 15 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Arlette Bohórquez Hernández**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización de la producción de las proteínas vasoinhibina y su quimera vasoinhibina-vasostatina*

que se desarrolló bajo la dirección de


**Dr. Antonio De León Rodríguez**

El Jurado, después de deliberar, determinó

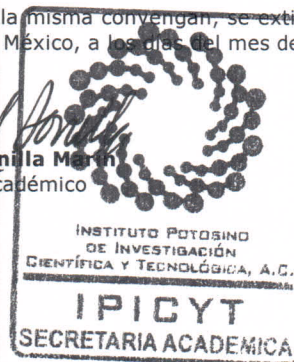
**APROBARLA**

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 de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los días del mes de de .

  
**Dr. Marcial Bonilla Martín**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



# Dedicatorias

A mis padres Noel y Mary

A mis hermanos Noel y Ricardo

## **Agradecimientos**

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por el apoyo y guía brindado para la realización de esta tesis, así como por permitirme formar parte de su equipo.

Al financiamiento del proyecto CONACyT-Básicas 82210. Al CONACyT por la beca 230945 otorgada a Arlette Bohórquez Hernández y al apoyo técnico de Leandro G. Ordoñez y Gabriela Vázquez Rodríguez.

Al laboratorio 4 por sus consejos y ayuda

A mis amigos por todos los momentos compartidos

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	5
2.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo	5
2.2 Ensayos de expresión en matraz y biorreactor	5
2.2.1 Ensayos en matraz	5
2.2.2 Ensayos en biorreactor	6
2.3 Métodos analíticos	7
3. Resultados y discusión	9
3.1 Elección de la cepa	9

3.2 Influencia de temperatura de inducción	12
3.3 Efecto de las condiciones de TOD	13
3.4 Efecto combinado de la temperatura de inducción y las condiciones de TOD	15
4. Conclusiones	23
5. Perspectivas	25
6. Referencias	26
Anexos	31



## Lista de tablas

1. Producción de las proteínas VI-VS y VI ( $\mu\text{g/mL}$ ) en diferentes condiciones de cultivo en matraz.	11
2. Producción de la proteína VI_VS en diferentes condiciones de cultivo a TOD constante.	16
3. Producción de la proteína VI_VS en diferentes temperaturas a TOD oscilante.	18

## Lista de figuras

1. Expresión de la proteína quimérica VI\_VS en TOD oscilante. 14
2. Efecto de la temperatura de inducción en la producción de VI\_VS en la fracción soluble. 19
3. Cinética de crecimiento en condiciones de TOD estables y TOD oscilante. 21

## Anexos

Anexo 1. Cepas	31
Anexo 2. Plásmidos	31
2.1 Plásmido pGVRVI	31
2.2 Plásmido pGVRVIVS	32
Anexo 3. Medio BSG	32
Anexo 4. Medio LBON	33
Anexo 5. Método de Lowry	33
Anexo. 6 Geles de SDS-PAGE en gradiente	34
6.1 Soluciones para geles de gradiente	35
6.2 Soluciones gel concentrador	35
6.3 Amortiguador Tris 1.5M pH 8.8 100mL	35
6.4 Amortiguador Tris 0.5M pH 6.8 100mL	36
6.6 Solución de NaCl 3M 100mL	36
6.7 Buffer de carga de la muestra	36
6.8 Buffer de corrida Tris-glicina	37
Anexo 7 Tinción azul de Coomasie	37
7.1 Solución de tinción azul de Coomasie	37
7.2 Solución de desteñido	38
Anexo 8. Western blot	38
8.1 Buffer de transferencia Towbin	40

8.2 Buffer de fosfatos PBS 1X	40
8.3 Solución de bloqueo	40
8.4 Buffer para la enzima alcalino fosfatasa	40

## Abreviaturas

<b>CEs.</b>	Células endoteliales
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>LB</b>	Caldo Luria Bertani
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>ON</b>	Toda la noche
<b>TOD</b>	Tensión de oxígeno disuelto
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VI</b>	Vasoinhibina
<b>VS</b>	Vasostatina

## Resumen

“CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS VASOINHIBINA Y SU QUIMERA VASOINHIBINA-VASOSTATINA” La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. El desequilibrio en los factores pro y antiangiogénicos conlleva a diversas patologías como: cáncer, retinopatía diabética, entre otras. Existen numerosos inhibidores endógenos de la angiogénesis como la vasoinhíbina (VI) y la vasostatina (VS), los cuales se derivan del procesamiento proteolítico de la prolactina humana (hPRL) y de la calreticulina respectivamente. Ambas inhiben la proliferación endotelial inducida por VEGF. En este trabajo estudiamos la producción de VI y la proteína quimérica VI\_VS usando las cepas de *Escherichia coli* Rosetta gami y BL21SI para la expresión de estas proteínas. Los resultados indican que la combinación de una temperatura de inducción por debajo de 30°C y condiciones de TOD oscilantes aumenta la solubilidad de las proteínas.

PALABRAS CLAVE. Tensión de oxígeno disuelto, Rosetta gami, vasostatina, vasoinhíbina, proteína quimérica.

## Abstract

“PRODUCTION CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN VI AND THE CHIMERA VI\_VS”  
Angiogenesis is the formation of new blood vessels from preexistent vasculature. Alterations in the pro- and anti-angiogenic factors lead to pathologies such as cancer, diabetic retinopathy, among others. There are a number of endogenous inhibitors of angiogenesis, including vasoinhibin (VI) and vasostatin (VS), which are derived of proteolytic cleavage of human prolactin (hPRL) and calreticulin, respectively. Both of them inhibit the proliferation of endothelial cells induced by VEGF. In this work, we studied the expression of VI and the chimeric protein VI\_VS using *Escherichia coli* Rosetta gami and BL21SI as host strains. The results indicate that both induction temperature below 30°C and oscillating DOT conditions improve the solubility of the recombinant proteins.

KEY WORDS: dissolved oxygen tension, Rosetta gami, vasostatin, vasoinhibin, chimeric protein.

## 1. Introducción

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente o angiogénesis ocurre frecuentemente durante el desarrollo embrionario en sitios donde hay crecimiento de tejidos. En la etapa adulta, este proceso está restringido a tejidos del sistema reproductor femenino o en mecanismos de reparación de tejidos, así como en respuestas inflamatorias. La alteración del equilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos conlleva en algunas circunstancias a una hiperproliferación de vasos sanguíneos, este fenómeno es determinante en patologías como, cáncer, retinopatía diabética, artritis y enfermedades cardiovasculares, entre otras [1-7].

Existen una serie de inhibidores endógenos de la angiogénesis, que corresponden a fragmentos de grandes proteínas, por ejemplo, las vasoinhibinas (VI) y la vasostatina (VS). Las vasoinhibinas pertenecen a una familia de péptidos del extremo amino terminal de la prolactina (PRL), correspondientes a los residuos 1-124 (14.1kDa), 1-132 (15 kDa), 1-147 (16.8 kDa) y 1-150 (17.2 kDa), procesados proteolíticamente por enzimas del tipo de la catepsina D y metaloproteasas. Estos péptidos inhiben la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*, bloqueando la migración y proliferación de las células endoteliales (CEs), impiden la proliferación celular inducida por el factor de crecimiento entotelial vascular (VEGF) y ejercen sus efectos directamente sobre el endotelio vascular suprimiendo la vasodilatación y la angiogénesis [1, 6, 8]. La vasostatina (VS), es un fragmento derivado de la calreticulina, se aisló del sobrenadante de células inmortalizadas con el virus Epstein-Barr, comprende los aminoácidos 1-180 del extremo amino terminal, su



actividad antiangiogénica se ha localizado en los aminoácidos 120-180 [7]. La mayor inhibición de la proliferación celular endotelial es conferida por los aminoácidos 135-164 en comparación con otros fragmentos. La vasostatina inhibe al VEGF-A dando como resultado la inhibición de la proliferación de CEs. La vasostatina disminuye la permeabilidad vascular y por tanto el edema e infiltración de leucocitos a los tejidos circundantes al vaso sanguíneo [9].

La unión de dos fragmentos peptídicos en una sola proteína formando una proteína de fusión o proteína quimérica ha sido una estrategia utilizada en la producción de diversas proteínas de uso terapéutico como interferón  $\alpha$ , vasoinhibina, vasostatina, hemoglobina, antígenos entre otras [4,10-12,15]. La fusión de dos fragmentos en una quimera altera sus características, modificando su actividad biológica y en algunos casos sobrepasando la actividad que tienen los péptidos de forma individual en un efecto sinérgico.

Estudios con modelos de tumores humanos han demostrado que la combinación de dos distintos inhibidores de angiogénesis poseen una elevada actividad antitumoral que no puede ser alcanzada mediante el uso de esos inhibidores de forma individual [2, 3, 16]. La proteína quimérica VI\_VS es más activa que las proteínas VS y VI por separado [12].

Debido a las implicaciones clínicas, el estudio y desarrollo de nuevos factores reguladores de la angiogénesis ha despertado un interés considerable [4, 5].

Con el fin de realizar ensayos biológicos y evaluar la actividad de VI y VI\_VS, es necesario identificar las condiciones de cultivo en que estas proteínas se producen

preferentemente en la fracción soluble. Una de las herramientas más utilizadas en la producción de proteínas recombinantes es *Escherichia coli* (*E. coli*), debido a que ya que se conoce su genoma, es relativamente fácil de manipular genéticamente, se cuenta con una variedad de cepas, diversidad de plásmidos de expresión y sus requerimientos nutricionales son simples. Sin embargo, no todas las proteínas pueden ser expresadas de forma eficiente en *E. coli* [17-19]. La producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes funcionales no es un protocolo rutinario debido a que, no existe un método “universal” para la producción de proteínas heterólogas, ya que las condiciones óptimas de producción dependen de la naturaleza de la proteína en cuestión.

Se han implementado diversas estrategias con el fin de incrementar la cantidad de proteína producida en la fracción soluble, dichas estrategias pueden ser divididas en dos: previas a la transformación y posteriores a la transformación. Entre las estrategias previas a la transformación destacan las manipulaciones genéticas y el diseño de vectores de expresión con elementos que favorezcan la expresión de la proteína [17]. En las estrategias posteriores a la transformación está el manejo de las condiciones de cultivo. Dentro de las principales condiciones de cultivo que afectan la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, se encuentran la temperatura a la cual se realiza la inducción y las condiciones de tensión oxígeno disuelto (TOD) [18]. La temperatura influye en la proporción de proteína recombinante que se presenta en la fracción soluble; el uso de temperaturas de inducción por debajo de los 30°C ha demostrado aumentar la proporción de algunas proteínas recombinantes en esta fracción [15, 19]. Las condiciones de

TOD afectan el metabolismo de *E. coli*, lo que influye en la cantidad de proteína recombinante total que se produce, así como en su actividad [20- 22].

El objetivo de este trabajo es identificar las condiciones de temperatura y TOD que favorecen la producción de la proteína VI y su quimera VI\_VS en la fracción soluble.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo

Se utilizaron las cepas de *E. coli* Rosetta gami y BL21-SI/pLysSRARE (Anexo 1) transformadas con el plásmido pGVRVI (Anexo 2.1) que contiene el gen de la proteína VI o bien con el plásmido pGVRVIVS que codifica para la proteína de fusión VI\_VS (Anexo 2.2) [12].

En el caso de Rosetta gami los genes para VI y VI\_VS se encuentran bajo el control del promotor del gen *lacZ*, esto permite la inducción usando isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. La producción se llevo a cabo en medio rico Luria Broth (LB, Invitrogen) o bien en medio mínimo BSG descrito en detalle en el Anexo 3.

En la cepa BL21-SI/pLysSRARE, el plásmido de expresión utiliza el promotor del gen *proU* inducible con NaCl, la inducción se realizó con una concentración final de 0.3 M. La producción se llevó a cabo en medio rico LBON (Anexo 4) o bien en medio mínimo BSG.

### 2.2 Ensayos de expresión en matraz y biorreactor

#### 2.2.1 Ensayos de expresión en matraz

##### *Cepa BL21-SI pLysSRARE*

Se inició con un preinóculo usando la cepa BL21-SI pLysSRARE transformada con el plásmido pGVRVI o bien con el plásmido pGVRVIVS en 20 mL de medio rico

LBON o medio mínimo BSG. El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm, con este cultivo se inoculó en el mismo medio ajustando a una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de 0.2, se incubó a 37°C y 200 rpm hasta que se alcanzó una  $OD_{600}$  de 0.5, se realizó la inducción y se ajustó la temperatura a 20 o 28°C.

### *Cepa Rosetta gami*

Se inició con un preinóculo usando la cepa Rosetta gami transformada con el plásmido pGVRVI o con el plásmido pGVRVIVS en 20 mL de medio rico LB o medio mínimo BSG. El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm, con este cultivo se inoculó en el mismo medio ajustando a una  $OD_{600}$  de 0.2, se incubó a 37°C y 200 rpm hasta que se alcanzó una  $OD_{600}$  de 0.5, se realizó la inducción y se ajustó la temperatura a 20 o 28°C.

Para ambas cepas las cinéticas de crecimiento celular y producción de proteína se siguieron, a lo largo de 12 h, durante este tiempo se tomaron muestras de 4 mL cada 3 h. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min, la pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ L de buffer de fosfatos (PBS) a 0.5X.

### *2.2.2 Ensayos en biorreactor*

Los ensayos en biorreactor se llevaron a cabo en una jarra de 1.3 L (Applikon, Foster City, CA), se utilizó un volumen de 800 mL, el biorreactor fue equipado con dos turbinas tipo Rushton de seis paletas planas. Los valores tanto de TOD como

de pH fueron monitoreados mediante electrodos autoclaveables (Applikon) conectados a una Bioconsola ADI 1035/biocontrolador ADI 1030 (Applikon). Se utilizó el software Bioexpert 1.3 (Applikon) para la adquisición de datos.

Se inició con un preinóculo de la cepa Rosetta gami pGVRVIVS en 200 mL de medio LB, se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm, con este cultivo se inoculó en el mismo medio ajustando la OD<sub>600</sub> a 0.2 en 800 mL de medio LB, se cultivó a una temperatura de 37°C y 200 rpm hasta llegar a una OD<sub>600</sub> de 0.5, en este momento se llevó a cabo la inducción usando IPTG. La temperatura de inducción se ajustó a 20, 28.5°C o 37°C. La cinética de crecimiento celular y la producción de proteína total se monitorearon hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a las 36-40 h dependiendo de la temperatura de inducción, durante el tiempo de cultivo se tomaron muestras de 1 y 5 mL cada 4 h.

Se realizaron ensayos manteniendo condiciones de TOD constante a 2, 11, y 20% y ensayos en TOD oscilante en intervalos de 0-25% con un periodo de oscilación de 15-20 min. Ambas condiciones de TOD se mantuvieron a lo largo de todo el cultivo. Las condiciones y concentración de TOD se mantuvieron introduciendo nitrógeno y oxígeno de forma individual. El pH se controló usando HCl 2N y NaOH 5N. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min, la pastilla se resuspendió en 1 mL y 200 µL de PBS a 0.5X respectivamente.

### 2.3 *Métodos analíticos*

El crecimiento del cultivo fue monitoreado a través de mediciones de OD a una longitud de onda de 600 nm usando un espectrofotómetro CARY 50 Bio UV-Visible

(Varian). La proteína en las muestras de fracción total y soluble se cuantificó usando el método de Lowry (Anexo 5). El patrón electroforético de las proteínas se analizó mediante geles de poliacrilamida en gradiente de 4%-20% (Anexo 6). Se analizaron la fracción total y la fracción soluble por separado, los geles obtenidos fueron teñidos con azul Coomassie (Anexo 7). La identidad de las proteínas VI y VI\_VS se confirmó mediante de ensayos de Western Blot ( Anexo 8). Los geles fueron digitalizados en un fotodocumentador Gel 2000 (Bio-Rad). La cantidad de proteína recombinante producida fue cuantificada por métodos densitométricos usando el software NIH image o bien con el software Quantity-One (Bio-Rad).

### **3. Resultados y discusión**

#### **3.1 Elección de la cepa**

Una de las características más deseables en la producción de proteínas recombinantes es que estas se encuentren en mayor proporción en la fracción soluble ya que son más fáciles de purificar que las proteínas agregadas en cuerpos de inclusión. Se llevaron a cabo ensayos de expresión en matraz con el fin de acotar las condiciones de cultivo para la producción de VI y su quimera VI\_VS. Para esto se probaron diferentes condiciones de cultivo; dos medios, dos cepas: BL21SI pLysSRARE y Rosetta gami, diferentes temperaturas de inducción y condiciones de TOD oscilantes y constantes.

En los ensayos de expresión en matraz usando a la cepa BL21SI pLysSRARE donde se siguió la cinética hasta doce horas postinducción no fue posible detectar la producción de la proteína VI ni de su quimera VI\_VS en ninguna de las condiciones de cultivo probadas: medio de cultivo (LBON, BSG) y temperatura de inducción (20°C, 28°C, 37°C).

En los ensayos realizados usando la cepa Rosetta gami en medio LB se detectaron ambas proteínas recombinantes en la fracción total, la producción de VI (14.39 kDa) fue de 0.12 µg/mL a 20°C, mientras que de la proteína quimérica VI\_VS (18.23kDa) se obtuvo una producción de 0.143 y 459.95 µg/mL a 20°C y 28°C, respectivamente. Los resultados se resumen en la tabla 1.



Las características de la cepa Rosetta gami incluyen las mutaciones en los genes de tioredoxin reductasa (*trxB*). y de glutatión reductasa (*gor522*), estas mutaciones crean un ambiente reductor en el citoplasma el cual es propicio para la formación de puentes disulfuro promoviendo así el correcto plegamiento de las proteínas que se producen y mayor solubilidad para que se presenten en la fracción soluble. Se encontró que en la cepa Rosetta gami se favorece la producción de las proteínas recombinantes VI y su quimera VI\_VS.

Tabla 1. Producción de las proteínas VI-VS y VI ( $\mu\text{g/mL}$ ) en diferentes condiciones de cultivo en matraz

Cepa parenteral	20°C		28°C	
	LB	BSG	LB	BSG
BL21SI pLysSRARE pGVRVi	ND	ND	ND	ND
BL21SI pLysSRARE pGVRViVs	ND	ND	ND	ND
Rosetta gami pGVRVi	0.12	ND	ND	ND
Rosetta gami pGVRViVs	0.14	ND	459.95	ND

ND: no detectable

Resultados similares fueron obtenidos por Imen Rabhi-essafi *et al* 2007 [14] que utilizaron la cepa de *E. coli* trxB<sup>-</sup>/gor<sup>-</sup> (Origami) para producir interferón  $\alpha$  humano y encontró que la producción de esta proteína en la fracción soluble fue del doble de la obtenida con la cepa BL21-SI bajo las mismas condiciones de cultivo.

### **3.2 Influencia de temperatura de inducción**

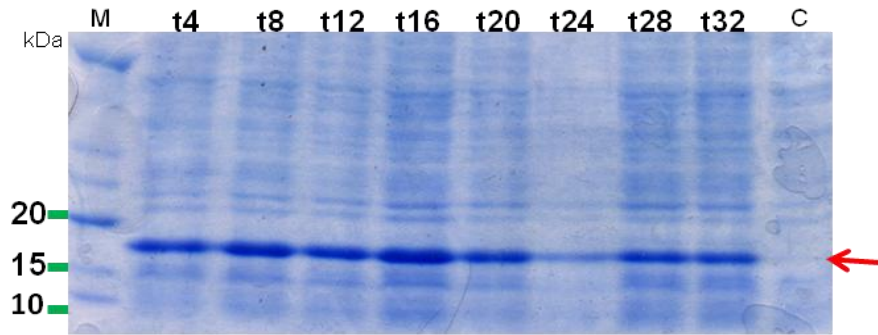
Se ha reportado que la temperatura de inducción afecta la proporción de proteínas que se presentan en la fracción soluble. En este trabajo la temperatura a la que se produjo mayor cantidad de la quimera VI\_VS fue de 28.5°C, esto concuerda con los resultados de Rabhi-Essafi *et al* y Qi-Ming Sun *et al* 2005 [15] ellos utilizaron la cepa Origami y la cepa BL21 (DE3) y compararon temperaturas de inducción de 25°C vs 37°C y 28°C vs 37°C para la producción de interferón  $\alpha$  humano y de la proteína de fusión His-Vas, respectivamente. Concluyeron que la temperatura más favorable para la producción de estas proteínas en la fracción soluble se encuentra por debajo de los 30°C. Los resultados de los ensayos de expresión en biorreactor muestran la misma tendencia que los ensayos en matraz, en ambos a 28 o 28.5°C como temperatura de inducción se aumentó la proporción de proteína recombinante que se presenta en la fracción soluble en comparación con los ensayos realizados a 37°C.

La temperatura también afectó la cantidad de proteína total que se obtuvo, tanto en matraz como en biorreactor. La producción de VI\_VS a 28°C fue menor en

comparación con la producción a 37°C, sin embargo es a 28°C que la producción en fracción soluble de la proteína quimérica VI\_VS se ve favorecida (Tabla 1).

### **3.3 Efecto de las condiciones de TOD**

En los experimentos en TOD oscilante y usando como temperatura de inducción 37°C, se obtuvo una producción de proteína total recombinante de 137.69 mg/l y un 1.7% en la fracción soluble. En la figura 1 se muestra el segundo ensayo en biorreactor donde se utilizó 28.5°C como temperatura de inducción y se obtuvo una producción de proteína total recombinante de 68.17 mg/l, mientras que en fracción soluble se obtuvo el 59.9%.



**Fig. 1. Expresión de la proteína quimérica VI\_VS en TOD oscilante**

Se aprecia que a partir de las 4 horas a las 32 h post inducción en fracción soluble a 28.5°C hay una banda correspondiente a la quimera (18.23 kDa), M: marcador de peso molecular, C: control antes de la inducción, t: tiempo después de la inducción.

Se ha reportado que las condiciones de TOD oscilante afectan la producción de proteínas recombinantes [20, 22-25]. Al realizar el escalamiento de un proceso fermentativo, se presentan diferencias en la TOD dependiendo de la distancia al impulsor, esto es debido a que la agitación no es eficiente en términos del tiempo de mezclado y la transferencia de oxígeno. Se han detectado gradientes de TOD mediante el monitoreo con sensores de TOD colocados a lo largo del tanque de un biorreactor de gran escala (20m<sup>3</sup>) [23]. Dichos gradientes también pueden ser producidos en biorreactores a pequeña escala mediante equipo especial [24]. La forma en que este fenómeno afecta las condiciones de producción de proteínas recombinantes ha sido poco estudiada. En uno de los primeros trabajos se observó que las condiciones de TOD oscilante favorecen la producción de proteínas recombinantes, también se observó que el cambio de condiciones aerobias a anaerobias y viceversa incrementa la tasa de síntesis de proteínas de respuesta a estrés en *E. coli* [26]. También se ha reportado que la producción y actividad de las proteínas producidas en condiciones de TOD oscilante como en el caso de la producción de la penicilino acilasa donde tanto la producción como la actividad de esta enzima aumentó en condiciones de TOD oscilante en *E. coli* JM101/pPA102 [20].

### **3.3 Efecto combinado de la temperatura de inducción y las condiciones de TOD**

Se realizaron tres experimentos con condiciones de TOD constante (Tabla 2), en dos de ellos se usó 37°C como temperatura de inducción.

Tabla 2. Producción de la proteína VI\_VS en diferentes condiciones de cultivo a  
TOD constante

<b>Condiciones de cultivo</b>			<b>Producción de VI_VS</b>	
Temperatura (°C)	TOD (%)	pH (-)	VI_VS total (mg/l)	VI_VS soluble (mg/l)
37	20	6	ND	ND
37	2	6	66.44	1.18
28.5	11	6	130.30	4.52

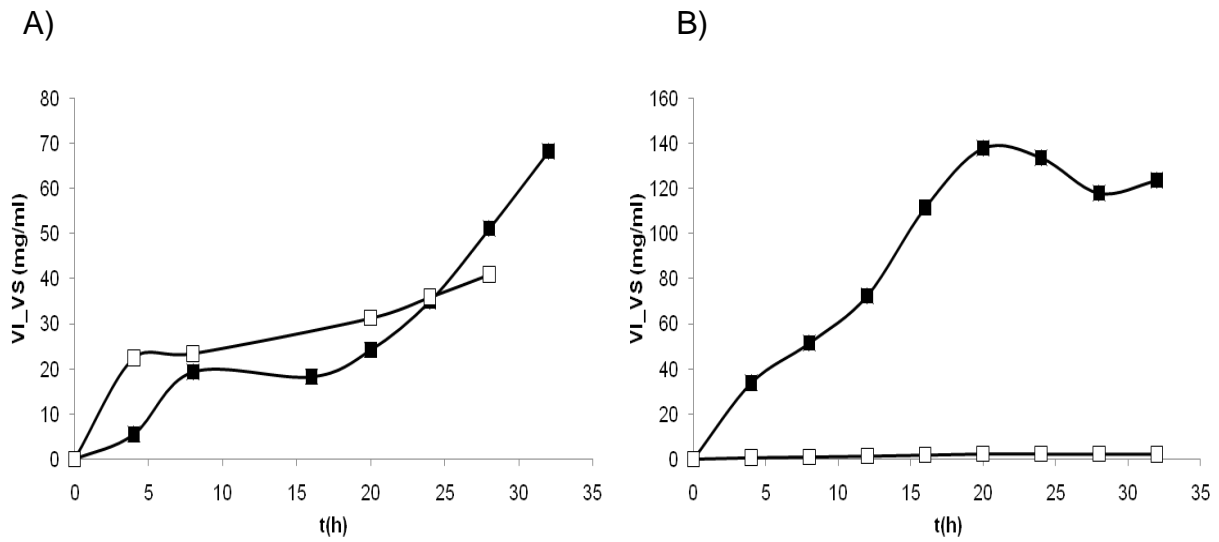
En el experimento con TOD a 20% no se detectó la proteína quimérica, mientras que con TOD a 2% se obtuvieron 66.4 mg/mL de proteína recombinante total; el 1.7% de esta se presentó en la fracción soluble. En el tercer experimento usando 28.5°C como temperatura de inducción y TOD de 11%, se obtuvo una producción de proteína recombinante total de 130.3 mg/mL el 3.5% se presentó en la fracción soluble. En estos ensayos se observó que la concentración de TOD afecta la producción de la proteína quimérica VI\_VS, ya que, en condiciones de TOD de 20% no se pudo identificar la proteína. Mientras que, usando la misma temperatura de inducción (37°C) pero bajando la TOD a 2% si fue posible identificar a esta quimera. En los ensayos realizados combinando una temperatura de inducción de 28°C y un TOD de 11% se logró una producción del doble de lo obtenido cuando se usó 37°C como temperatura de inducción.

En los ensayos en condiciones de TOD oscilante (Tabla 3) usando 28.5°C como temperatura de inducción se obtuvo una producción de proteína total recombinante de 68.2 mg/l, de esta el 59.9% se presentó en la fracción soluble, con la combinación de condiciones de TOD oscilante y una temperatura de inducción de 28.5°C se aumentó 17 veces la producción de VI\_VS en comparación con los ensayos realizados a una temperatura de inducción de 37°C (fig. 2).



Tabla 3. Producción de la proteína VI\_VS en diferentes temperaturas a TOD oscilante

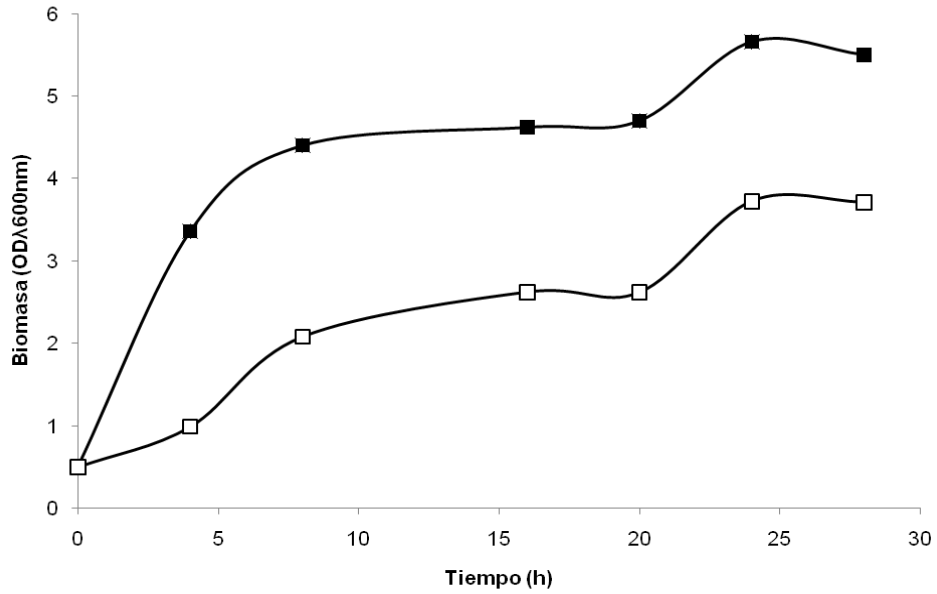
Condiciones de cultivo			Producción de VI_VS	
Temperatura (°C)	TOD (%)	pH (-)	VI_VS total (mg/l)	VI_VS soluble (mg/l)
37	0-25	6	137.69	2.38
28.5	0-25	6	68.17	40.87



**Fig. 2. Efecto de la temperatura de inducción en la producción de VI\_VS en la fracción soluble.** Se observa que la producción de VI\_VS en condiciones de TOD oscilantes se favorece en la fracción soluble una temperatura de inducción de 28.5°C (A) en comparación con 37°C (B). (■) fracción total, (□) fracción soluble, VI\_VS: proteína quimérica

Los mecanismos mediante los cuales las condiciones de TOD oscilante afectan la producción de proteínas recombinantes han sido poco estudiados. Estos mecanismos se han relacionado con la respuesta al estrés al que se somete a las bacterias, en las proteínas que se expresan en estas condiciones y los efectos en la estabilidad del plásmido. Aunque *E. coli* es un organismo facultativo se ha observado que la presencia de oxígeno puede oxidar a los acarreadores de electrones formando peróxido de hidrogeno o anión superóxido ( $\times O_2^-$ ) resultando en estrés oxidativo [27] el cual induce la producción de proteínas de respuesta a estrés oxidativo como SodA [28], HslO [28, 29], GroEL, GroES [30], DnaK. Estas últimas 3 también funcionan como chaperonas de respuesta a *heat shock* y funcionan como moduladoras de plegamiento [31], se ha descrito que estas proteínas chaperonas se ven incrementadas con el cambio de condiciones aerobias a anaerobias y viceversa [28]. Estas chaperonas pudieran favorecer el plegamiento apropiado de la proteína quimérica VI\_VS y así presentarse en la fracción soluble en mayor proporción en comparación con los ensayos en condiciones de TOD estables.

Se ha reportado que en condiciones anaerobias o microaerofilia se favorece la estabilidad de algunos plásmidos, mientras que en condiciones aerobias tanto el contenido de plásmido como su transcripción se ven negativamente afectados [25]. Por lo que es probable que en condiciones de TOD oscilante el plásmido se mantenga estable. Esto puede estar relacionado con el hecho de que el crecimiento en condiciones de TOD oscilante es menor (fig. 3).



**Fig. 3. Cinética de crecimiento en condiciones de TOD estables y TOD oscilante.**

Se puede apreciar la cinética de crecimiento de Rosetta gami VI\_VS en condiciones de TOD constante (■) y en condiciones de TOD oscilante (□) a 28.5°C

En los experimentos a nivel de biorreactor a 28°C se pudo observar un crecimiento final en OD<sub>600</sub> de 3.71 en condiciones de TOD oscilante, el cual es aproximadamente un 33% menor en comparación con el crecimiento en condiciones de TOD constantes. La fase de crecimiento de *E. coli* donde se presenta la tasa más alta de síntesis de proteínas es la fase exponencial [18]. Se ha observado que las condiciones de TOD oscilante alargan la duración de la fase exponencial [22] aumentando la producción de proteína recombinante.

#### 4. Conclusiones

Aunque en la actualidad existen una gran variedad de sistemas biológicos para la producción de proteínas recombinantes como animales, plantas transgénicas, células de insectos, levaduras, etc. La mayoría de las proteínas terapéuticas se producen usando células de mamífero como las células de ovario de hámster chino (CHO) o bien en *E. coli*. Esta bacteria gram negativa se presenta como uno de los sistemas más usados en la producción de proteínas recombinantes debido a las ventajas que presenta como: tasas de crecimiento y producción elevadas, herramientas genéticas avanzadas, amplio conocimiento de su fisiología, costo de cultivo relativamente bajo, entre otras, son características que hacen de este organismo uno de los sistemas de expresión más poderosos y versátiles.

En este trabajo se estudió el efecto del tipo de cepa en la producción de VI y su quimera VI\_VS. También se estudiaron las condiciones de cultivo que favorecen que estas proteínas se presenten en mayor proporción en la fracción soluble. Los resultados muestran que la producción de las proteínas VI y su quimera VI\_VS es mejor en términos de cantidad de proteína total producida y cantidad de proteína recombinante en la fracción soluble, usando la cepa Rosetta gami en medio LB. Por otro lado, la combinación de TOD oscilante y una temperatura de inducción de 28.5°C favorecen la producción de la proteína VI\_VS en la fracción la soluble. En estas condiciones de cultivo la producción de biomasa fue menor. Estos resultados muestran que tanto la temperatura de inducción como las condiciones de TOD son factores que influyen de manera importante en la producción de proteínas, definiendo que se presenten en la fracción total o bien en la fracción

soluble. Este trabajo sienta las bases para investigaciones futuras encaminadas a dilucidar el mecanismo por el cual las condiciones de TOD oscilante promueven la solubilidad de la proteína quimérica VI\_VS.

## 5. Perspectivas

Resulta interesante saber si hubo un incremento en la expresión de proteínas chaperonas en Rosetta gami VI\_VS en condiciones de TOD oscilante. Para ello, es necesario realizar ensayos para cuantificar la expresión diferencial de los genes de las proteínas chaperonas como GroEL, GroES, o DnaK usando la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, en este caso haciendo una cuantificación relativa [32,33].

Una vez identificadas las proteínas chaperonas cuya expresión hubiera aumentada en condiciones TOD oscilantes en comparación con la expresión en condiciones de TOD constante, se puede sugerir sobreexpresar estas proteínas en cotransformantes de la cepa Rosetta gami VI\_VS, con el fin de lograr una mayor producción de la quimera VI\_VS en fracción soluble.

Es necesario realizar ensayos de expresión en biorreactor de la proteína VI usando la cepa Rosetta gami en medio LB, de acuerdo a los resultados obtenidos en matraz, así como probar la expresión de VI en condiciones de TOD oscilante.



## 6. Referencias

[1] Sandra E. Pike Ly, Karen D. Jones, Barry Cherney, Ettore Appella, Kazuyasu Sakaguchi, Hira Nakhasi, Julie Teruya-Feldstein, Peter Wirth, Ghanshyam Gupta and Giovanna Tosato. Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188:2349-56.

[2] Sandra E. Pike LY, Joyce Setsuda, Karen D. Jones, Barry Cherney, Ettore Appella, Kazuyasu Sakaguchi, Hira Nakhasi, Chintamani D. Atreya, Julie Teruya-Feldstein, Peter Wirth, Ghanshyam Gupta and Giovanna Tosato. Calreticulin and Calreticulin Fragments Are Endothelial Cell Inhibitors That Suppress Tumor Growth. *Blood*. 1999;94:2461-8.

[3] Lei Yao SEP, Joyce Setsuda, Justin Parekh, Ghanshyam Gupta, Mark Raffeld, Elaine S. Jaffe, and Giovanna Tosato. Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood Journal*. 2010;96:1900-5.

[4] Koichiro Tanaka TM, Lawrence Weissbach, Kesiuke Horiuchi, Katsuhito Takeuchi, Yoshiaki Toyama, Hideo Morioka. Treatment of collagen-induced arthritis with recombinant plasminogen-related protein B: a novel inhibitor of angiogenesis. *The Japanese Orthopedic Association* 2011.

[5] Kerbel NFaRS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438:967-74.

[6] Carmen Clapp JA, Carmen González, Michael C. Jeziorski and Gonzalo Martínez de la Escalera. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis

anda vascular function. TRENDS in Endocrinology and Metabolism. 2006;17:301-7.

[7] Yuanyuan Qiu MM. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. The international Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2008.

[8] Carmen Clapp JA, Carmen González, Michael C. Jeziorski and Gonzalo Martínez de la Escalera. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. TRENDS in Endocrinology and Metabolism. 2006;17:301-7.

[9] Xiaokun Li LJ, Yi Wang, Yechen Xiao, Yadong Huang, Qiongfeng Yao, Yongguang Yang, Xiaoping Wu. Inhibition of angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin. Cancer Letters. 2007:29-32.

[10] Aguilar-Yáñez JM, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, García-Echauri SA, López-Pacheco F, Bulnes-Abundis D, et al. An Influenza A/H1N1/2009 Hemagglutinin Vaccine Produced in *Escherichia coli*. PLoS ONE. 2010;5:e11694.

[11] Natarajan C, Jiang X, Fago A, Weber RE, Moriyama H, Storz JF. Expression and Purification of Recombinant Hemoglobin in *Escherichia coli*. PLoS ONE. 2011;6:e20176.

[12] Rodríguez GV. Produccion de las proteínas antiangiogénicas: vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en *Escherichia coli* y su actividad biológica San Luis Potosi, S.L.P.2009.

[13] Sun Q, Xu Q, Dong X, Cao L, Huang X, Hu Q, et al. A hybrid protein comprising ATF domain of pro-UK and VAS, an angiogenesis inhibitor, is a potent candidate for targeted cancer therapy. Int J Cancer. 2008;123:942-50.

- [14] Imen Rabhi-essafi AS, Nouredine Khalaf and Dahmani M. Fathallah. A strategy fo high level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in E.coli. Protein Engineering, Design & Selection. 2007;20:201-9.
- [15] An Improved Strategy for High-Level Production of Human Vasostatin 120-180. Biotechnol Prog. 2005:1048-52.
- [16] Xiaokun Li LJ, Yi Wang, Yechen Xiao, Yadong Huang, Qiongfeng Yao, Yongguang Yang, Xiaoping Wu. Inhibition of the angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin. Cancer Letters. 2007:29-32.
- [17] S. Jana JKD. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol. 2005:289-98.
- [18] Chou CP. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007:521-32.
- [19] Francois Barneyx MM. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol. 2004;22:1399-408.
- [20] Antonio De León VH, Enrique Galindo, Octavio T. Ramirez. Effects of disolved oxygen tension on the production of recombinant penicilin acylase in *Escherichia coli*. Enzyme and Microbial Technology. 2003:689-97.
- [21] Alvaro R. Lara CV-L, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, Agustín López-Munguía, Octavio T. Ramirez. Engineering *Escherichia coli* to Improve Culture Performance and Reduce Formation of By-Products During Recombinant Protein

Production Under Transient Intermittent Anaerobic Conditions. *Biotechnol Bioeng.* 2006;94:1164-75.

[22] Pradyumna K. Namdev MI, B.G. Thompson and Murray R. Gray. Effect of Oxygen fluctuations on Recombinant *Escherichia coli* Fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 1993;41:666-70.

[23] Kossen NMGOaNWF. Dissolved Oxygen Concentration Profiles in a Production-Scale Bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 1984;XXVI:546-50.

[24] Jose R Garcia HJC, Govind Rao, Mark R Marten and William E Bentley. Microbial nar-GFP cell sensors reveal oxygen limitations in highly agitated and aerated laboratory-scale fermentors. *Microb Cell Fact.* 2009;8.

[25] Wen Ryan SJP, Benjamin C. Stark. Expression of  $\beta$ -lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes—effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng.* 1989;34:309-19.

[26] Neidhardt MWSaFC. Proteins Induced by Anaerobiosis in *Echerichia coli*. *Journal of bacteriology.* 1983;154:336-43.

[27] Imlay GSaJA. Oxidative stress. *Current opinion in Microbiology.* 1999;2:188-94.

[28] C.Neidhardt MWSaF. Proteins Induced by Aerobiosis in *Echerichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 1983;154:344-50.

[29] Imlay GSaJA. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology.* 1999:188-94.

[30] Kogoma SBFaT. Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli* and *Salmolenna typhimurium*. *Microbiological reviews.* 1991;55:561-85.

[31] Mujacic FBM. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004;22:1399-408.

[32] Christian A. Heid JS, Kenneth J. Livak and P. Mickey Williams. Real Time Quantitative PCR. Genome Research. 1996:986-94.

[33] Schmittgen KJLaTD. Analysis of relative Gene expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta CT}$  Method. METHODS. 2001:402-8.

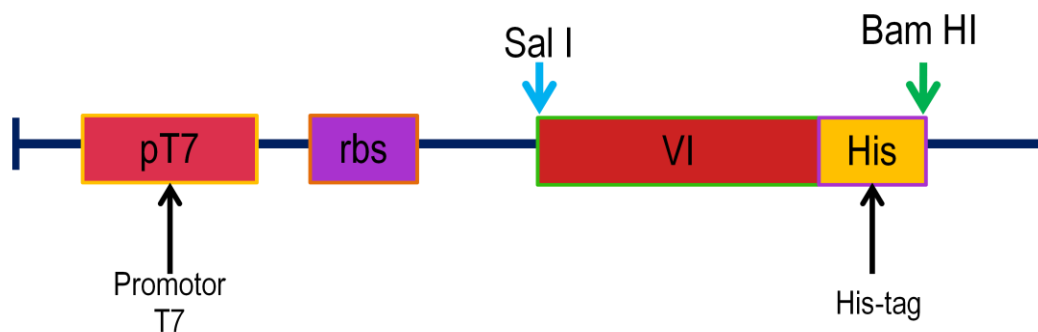
## ANEXOS

### Anexo 1. Cepas

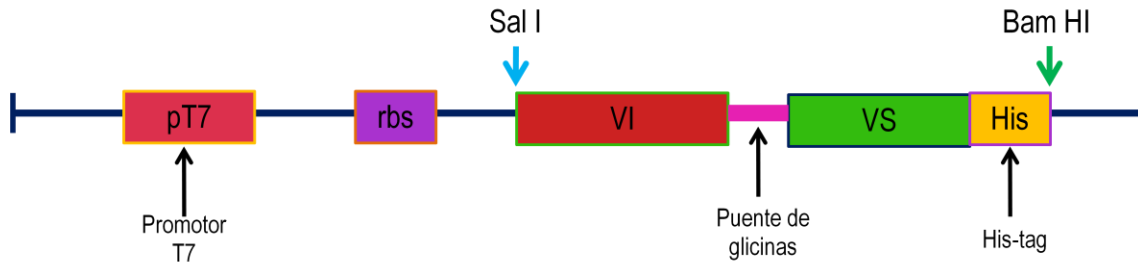
Nombre de la cepa	Genotipo
BL21SlpLysSRARE	F- <i>ompT lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm endA1 proUp::T7 RNAP:: malQ-lacZ Tet<sup>S</sup> pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)</i>
Rosetta-gami(DE3)pLysS	$\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[\text{lac}^+ \text{lacI}^q \text{pro}] \text{gor522}::\text{Tn10 trxB pLysSRARE (Cam}^R, \text{Str}^R, \text{Tet}^R)$

### Anexo 2. Plásmidos

#### 2.1 Plásmido pGVRVI



## 2.2 Plásmido pGVRVIVS



### Anexo 3. Medio BSG

Reactivos	Cantidad
Glucosa	5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5g
Tiamina (40µg/L)	40µL
Ampicilina (100mg/mL)	1mL

1. Disolver la glucosa y el MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O en 100mL de agua destilada (10% del volumen total), esterilizar a 121°C durante 15 minutos
2. Disolver las sales en 900mL de agua destilada (90% del volumen total), esterilizar a 121°C durante 15 minutos
3. Esterilizar la solución de 100mg/mL de ampicilina por filtración, de esta solución adicionar 1µL/mL de medio
4. Esterilizar la solución de 40µg/L de tiamina por filtración, de esta solución adicionar 40µL/L de medio

#### Anexo 4. Medio LBON

Reactivos	Cantidad
Bactotripton	10g
Extracto de levadura	5g

Disolver en 1L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para LBON solido agregar 15g de agar bacteriológico.

#### Anexo 5. Método de Lowry

##### Curva de calibración

Concentración de BSA (mg/mL)	Volumen (µL) de stock BSA 1.32 mg/mL	Volumen (µL) de agua destilada	Absorbancia promedio
0	0	1000	Blanco
0.035	26.5	973.5	0.0472
0.105	79.5	920.5	0.2252
0.14	106	894	0.3044
0.21	159	841	0.4502
0.28	212	788	0.5886

Solución	Reactivos
A	0.25g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 50mL de agua destilada
B	0.5g de tartrato de sodio y potasio en 50mL de agua destilada
C	10g de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ en 500mL de NaOH 0.1N
D	1mL de solución A, 1mL de solución B y 98 mL de la solución C
Folín	1:2 en agua destilada (se prepara al momento de usar)

Curva de calibración:

- Tomar 200 µL de cada uno de los estándares y añadir 1 mL de reactivo D, dejar reposar por 10 minutos.



- Agregar 100  $\mu$ L de reactivo Folín diluido 1:2 en agua destilada. Se deja reposar durante 30 minutos.
- Tomar lectura de las absorbancias a 590 nm, todo lo anterior se realiza por duplicado.

El mismo procedimiento se lleva a cabo en la cuantificación de proteínas totales de las muestras problema, extrapolar los valores de la curva de calibración.

### **Anexo. 6 Geles de SDS-PAGE en gradiente**

- Preparar las soluciones de acrilamida; stack, la de 4% y 20%
- Colocar las soluciones de de 4% y 20% adicionadas previamente con persulfato de amonio (PSA) y TEMED en una cámara de gradiente
- Vaciar la primera capa entre dos vidrios especiales para la obtención de geles de 0.75mm de grosor y cubrir con agua mQ
- Una que vez que la primera capa polimeriza, se retira el exceso de agua, se añade el stack adicionado con PSA y TEMED y se coloca la peineta, esperar hasta que polimerice
- Retirar la peineta y eliminar burbujas con papel filtro
- Correr el gel a 120 volts durante 2 h en buffer tris-glicina 1X

### 6.1 Soluciones para geles de gradiente

<b>Soluciones</b>	<b>Gel 4%</b>	<b>Gel 20%</b>
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)	365µL	1815 µL
Amortiguador Tris-HCl 1.5M, pH 8.8	690 µL	690 µL
SDS al 10%	27.5 µL	27.5 µL
H <sub>2</sub> O <sub>m</sub>	1650 µL	205 µL
TEMED	2.5 µL	1.5 µL
APS al 10%	12 µL	12µL

### 6.2 Soluciones gel concentrador

<b>Soluciones</b>	<b>Gel 4%</b>
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)	132 µL
Amortiguador Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	252 µL
SDS al 10%	10 µL
H <sub>2</sub> O <sub>m</sub>	600 µL
TEMED	2 µL
APS al 10%	7 µL

NOTA: adicionar el TEMED y el APS antes de usar

### 6.3 Amortiguador Tris 1.5M pH 8.8 100mL

<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)</b>
Tris base	18.15
Agua	c.b.p.

#### 6.4 Amortiguador Tris 0.5M pH 6.8 100mL

<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)</b>
Tris base	6
Agua	c.b.p.

#### 6.5 SDS 10% 1mL

<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)</b>
SDS	0.1
Agua	c.b.p.

#### 6.6 Solución de NaCl 3M 100mL

<b>Reactivo</b>	<b>Peso (g)</b>
NaCl	17.5
Agua	c.b.p.

Nota: esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

#### 6.7 Buffer de carga de la muestra

<b>Soluciones</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
Tris-HCl 1M pH 6.8	0.6
Glicerol 50%	5
SDS 10%	2
2-β-mercaptoetanol	0.5
Azul de bromofenol al 1%	1

- \* Agregar 0.9mL de agua destilada

## 6.8 Buffer de corrida Tris-glicina

Reactivos	Cantidad (g)
Tris-base	3
Glicina	14.4
SDS	1

- \* Disolver en 1L de agua destilada. El pH aproximado es de 8.3

## Anexo 7 Tinción azul de Coomasie

### Para teñir el gel

1. Una vez que ha finalizado la corrida electroforética, retirar el gel del cassette y colocarlo en un recipiente hermético de plástico
2. Añadir 50 mL de la solución de tinción
3. Incubar a temperatura ambiente, 12 h, en agitación continua

### Para desteñir el gel

1. Incubar en 50 mL de solución de desteñido durante una hora
2. Repetir el procedimiento dos o tres veces mas hasta que aparezcan las bandas teñidas de azul y el fondo casi transparente

## 7.1 Solución de tinción azul de Coomasie

Reactivo	Cantidad
Coomasie blue R-250	1g
Agua mQ	500mL
Acido acético	100mL
Metanol	400mL

## 7.2 Solución de desteñido

Reactivo	Volumen (mL)
Agua mQ	500
Acido acético	100
Metanol	400

## Anexo 8. Western blot

### Transferencia

- a) Colocar un papel filtro extra grueso o dos gruesos completamente humedecidos con el buffer Towbin en la placa ánodo. Eliminar burbujas utilizando una pipeta como rodillo.
- b) Colocar la membrana de nitrocelulosa (del tamaño del gel) previamente humedecida durante 30 minutos con el buffer Towbin. Eliminar burbujas.
- c) Colocar el minigel equilibrado durante 40 minutos en la solución Towbin sobre la membrana. Eliminar las burbujas.
- d) Colocar un papel extra grueso previamente humedecido con el buffer Towbin. Eliminar burbujas.
- e) Colocar la placa cátodo. Presionar sin causar daño al apilado.
- f) Cerrar la tapa y conectar a la fuente de poder
- g) La transferencia se lleva a cabo usando una cámara semi seca (BIORAD) a 10 volts durante 35 minutos

## Revelado

- a) Bloquear la membrana durante 12 h con una solución de leche descremada Svelty al 5% en PBS 1X. A 4°C con agitación.
- b) Lavar la membrana tres veces con PBS 1X en un recipiente limpio y con agitación. Cada lavado con duración de 15 minutos.
- c) Diluir 1:4000 el anticuerpo primario de ratón Anti-His tag (Millipore) en un volumen de 10 mL de PBS 1X adicionado con BSA al 0.1%. Incubar la membrana toda la noche en un recipiente limpio a 4°C con agitación.
- d) Lavar la membrana tres veces como en el paso b).
- e) Diluir 1:3000 el anticuerpo secundario de ratón Anti-IgG de ratón (Millipore) en un volumen de 10 mL de PBS 1X adicionado con BSA al 0.1%. Incubar la membrana toda la noche en un recipiente limpio a temperatura ambiente durante 2 h.
- f) Lavar la membrana tres veces como en el paso b) y dar un lavado mas con el buffer de la AP.
- g) En 15 mL de buffer AP disolver 66 µL de NBT, adicionar 33 µL de BCIP homogenizar. Incubar la membrana con esta solución hasta que aparezcan las manchas.
- h) Detener la reacción lavando la membrana con agua.

### 8.1 Buffer de transferencia Towbin

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (mM)</b>
Tris-base	25
Glicina	192

- \* Disolver en solución de metanol al 20%

### 8.2 Buffer de fosfatos PBS 1X

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (mM)</b>
NaCl	140
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2.8

- \* Disolver en agua mQ. Ajustar el pH a 7.5

### 8.3 Solución de bloqueo

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Leche descremada Svelty™	3 g

- \* Disolver en 100mL de PBS 1X

### 8.4 Buffer para la enzima alcalino fosfatasa

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Tris -HCl (pH 9.5)	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	50 mM