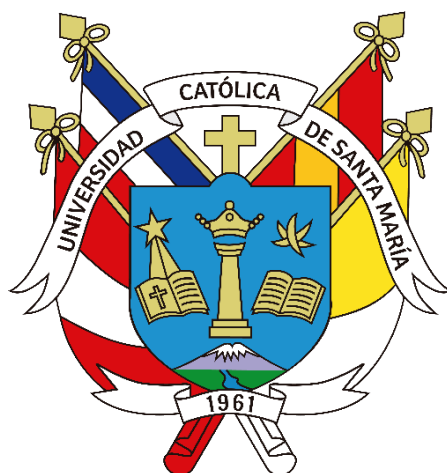


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS PÉPTIDOS: N-GLICOSIDASA F DE *Flavobacterium meningosepticum* Y MANNOSIL-GLICOPROTEINA ENDO-BETA- N ACETILGLUCOSAMINIDASA (ENDOGLICOSIDASA H) DE *Streptomyces plicatus*, A PARTIR DE *Escherichia coli* EMPLEANDO EL VECTOR pBLUESCRIPT KS

Tesis presentada por la Bachiller:

Díaz Delgado, Gabriela Elvira

Para optar el Título Profesional de:

Química Farmacéutica

Asesor:

Dr. Carpio Carpio, José Miguel

Arequipa – Perú

2023

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 05 de Octubre del 2023

Dictamen: 010797-C-EPFyB-2023

Visto el borrador del expediente 010797, presentado por:

2016801952 - DIAZ DELGADO GABRIELA ELVIRA

Titulado:

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS PÉPTIDOS: N-GLICOSIDASA F DE FLAVOBACTERIUM MENINGOSEPTICUM Y MANNOSIL-GLICOPROTEINA ENDO-BETA- N ACETILGLUCOSAMINIDASA (ENDOGLICOSIDASA H) DE STREPTOMYCES PLICATUS, A PARTIR DE ESCHERICHIA COLI EMPLEANDO EL VECTOR PBLUESCRIPT KS

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**00476696 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR
DICTAMINADOR**



**44327250 - MEDINA PEREZ JEANETH MARISOL
DICTAMINADOR**



**70541954 - CANDIA PUMA MAYRON ANTONIO
DICTAMINADOR**



AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS PÉPTIDOS: NGLICOSIDASA F DE *Flavobacterium meningosepticum* Y MANNOSILGLICOPROTEINA ENDO-BETA-N ACETILGLUCOSAMINIDASA (ENDOGLICOSIDASA H) DE *Streptomyces p*

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

0%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

rdu.unc.edu.ar

Fuente de Internet

3%

2

docplayer.es

Fuente de Internet

2%

3

ambientech.org

Fuente de Internet

1%

4

view.genial.ly

Fuente de Internet

1%

5

Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Trabajo del estudiante

1%

6

www.unirepository.svkri.uniri.hr

Fuente de Internet

1%

7

idoc.pub

Fuente de Internet

1%

DEDICATORIA

A Dios, mis padres, mis abuelos y hermano



AGRADECIMIENTO

A Dios, mis padres, abuelos y hermano

A la universidad de Lübeck por el apoyo y por permitirme usar sus instalaciones.

A la Dr. Hera Fatima por su asesoría y consejo.

Al Dr. José Miguel Carpio Carpio por su contante asesoría, apoyo y guía.



RESUMEN

La expresión heteróloga de proteínas ha permitido la producción de las mismas a gran escala, sin necesidad de hacer grandes extracciones o procesos sumamente largos y complicados, además que en la mayoría de los casos difícilmente se puede conseguir grandes cantidades desde sus fuentes naturales.

Este trabajo de tesis tiene como objetivo contribuir en el campo de la farmacia y la biotecnología en proteínas recombinantes con dos enzimas en particular, el Péptido: N-glicosidasa F más conocido como PNGase y mannosil-glicoproteína endo- β -N-acetilglucosaminidasa (endoglicosidasa H) más conocido como Endo H.

El trabajo constituye de 3 fases, la primera, la correcta identificación y transformación del ADN que sintetiza ambas proteínas; la segunda, la correcta expresión de ellas en medio bacterial, y la tercera, en su purificación de acuerdo a las propiedades, en este caso particular ambas con residuos de histidina en su extremo C.

Se estudió estas enzimas, por su alta demanda en trabajo de laboratorio, por un lado, el Péptido: N-glycosidasa F (PNGase F) es el método enzimático más eficaz para eliminar casi todos los oligosacáridos unidos a N de las glicoproteínas. La PNGase F es una amidasa, que se escinde entre los residuos más internos de GlcNAc y asparagina de oligosacáridos con alto contenido de manosa, híbridos y complejos. Y por otro lado la endoglicosidasa H es una glucosidasa recombinante que se escinde dentro del núcleo de quitobiosa de manosa alta y algunos oligosacáridos híbridos de glicoproteínas N-ligadas.

Para la expresión y purificación de ambas proteínas recombinantes se utilizó el mismo método, así como para la comparación y verificación de estas, obteniendo 6,7 mg/mL y 5,4 mg/mL de PNGase y Endo H correspondientemente, asimismo se realizó geles SDS de poliacrilamida al 15 % para verificar las proteínas según su peso molecular, las cuales indicaron los respectivos

de 29kDa y 36kDa, además se comprobó nuevamente con un Western Blot anti His, demostrando que los métodos de aislamiento, expresión y purificación fueron precisos y específicos para el desarrollo de las proteínas anteriormente mencionadas

Palabras claves: Expresión protéica, purificación, PNGase, Endo H, identificación, transformación y aislamiento



ABSTRACT

The heterologous expression of proteins has allowed their production on a large scale, without the need for large extractions or extremely long and complicated processes, in addition to the fact that in most cases it is difficult to obtain large quantities from their natural sources.

This thesis work aims to contribute to the field of pharmacy and biotechnology in recombinant proteins with two enzymes in particular, Peptide: N-glycosidase F better known as PNGase and mannosyl-glycoprotein endo- β -N-acetylglucosaminidase (endoglycosidase H) better known as Endo H.

The work consists of 3 phases, the first, the correct identification and transformation of the DNA that synthesizes both proteins; the second, the correct expression of them in a bacterial medium, and the third, in their purification according to the properties, in this particular case both with histidine residues at their C-terminus.

These enzymes were studied due to their high demand in laboratory work; on the one hand, Peptide: N-glycosidase F (PNGase F) is the most effective enzymatic method to eliminate almost all N-linked oligosaccharides from glycoproteins. PNGase F is an amidase, which cleaves between the innermost GlcNAc and asparagine residues of high-mannose, hybrid and complex oligosaccharides. On the other hand, endoglycosidase H is a recombinant glucosidase that cleaves within the high-mannose chitobiose core and some hybrid oligosaccharides of N-linked glycoproteins.

For the expression and purification of both recombinant proteins, the same method was used, as well as for the comparison and verification of these, obtaining 6.7 mg/ml and 5.4 mg/ of PNGase and Endo H correspondingly, SDS gels of 15% polyacrylamide to verify the proteins according to their molecular weight, which indicated the respective 29kDa and 36kDa, it was also verified again with an anti-His Western Blot, demonstrating that the isolation, expression

and purification methods were precise and specific for the development of the previously mentioned proteins.

Keywords: Protein expression, purification, PNGase, Endo H, identification, transformation and isolation.



Índice

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vii
CAPITULO I	1
1. INTRODUCCION	1
1.1. Enunciado del problema	2
1.2. Objetivo	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Antecedentes.....	3
CAPITULO II	5
2. MARCO TEORICO	5
2.1 Proteínas	5
2.1.1. Proteínas Recombinantes	5
2.1.2. ADN recombinante	6
2.1.3. Expresión genética	7
2.2. Endo H.....	8
2.2.1. Definición de la unidad	9
2.2.2. Peso Molecular.....	9
2.2.3. Aplicaciones	9
2.2.4. Estructura	10
.....	10
2.3. PNGase	10
2.3.1 Definición de la unidad.....	11
2.3.2 Peso Molecular	11

2.3.3. Aplicaciones	11
2.3.4. Estructura	12
2.4. Vector pBLUESCRIPT KS	12
2.5. Células competentes	14
2.4.1. E. Coli DH5alfa.....	14
2.4.2. BD21	15
2.5. Transformación.....	16
2.6. Incubación y crecimiento celular.....	17
2.7. Minipreparados	18
2.8. Cultivos celulares.....	19
2.9. IPTG.....	19
2.9.2. Inducción con IPTG	20
2.10. Lisis Celular.....	22
2.11. Ultrasonificación.....	22
2.12. Purificación	23
2.12.2. Purificación His Taq.....	23
2.12.2.2. Cromatografía de exclusión de tamaño	26
2.13. SDS-Page	26
2.14. Western Blot	27
2.15. Hipótesis	28

CAPITULO III.....	29
3. METODOLOGIA	29
3.1. Campo de Verificación.....	29
3.1.1. Ubicación Temporal.....	29
3.2. Materiales	29
3.2.1 Vectores y Material genético.....	29
3.2.4 Buffers.....	31
3.3 Metodología	31
3.3.1 Transformación del plásmido a células competentes E. Coli DH5alfa.....	31
3.3.2 Recolectar colonias y preparar cultivos previos.....	33
3.3.3 Preparar Minipreps de plásmido (Plasmid isolation kits, NucleoSpin® Plasmid).....	33
3.3.4 Secuenciación de Endo H y PNGase por el método de Sanger	35
.....	36
3.3.5 Transformación el plasmado en células competentes BD21DE3	36
3.3.6 Preparación del cultivo primario	38
3.3.7 Cultivo secundario a 1,5L.....	38
3.3.8 Inducción con IPTG.....	38
3.3.9 Reconstitución del pellet y lisis	38
3.3.10 Purificación His Taq.....	41
3.3.11 Purificación de exclusión de tamaño.....	42
CAPITULO IV.....	43
4. RESULTADOS Y DISCUSION	43
4.1. Resultados.....	43
4.2. Discusión	55
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	69
ANEXO 1:	70
GELES	70
ANEXO 2:	71
PROGRAMA DE PURIFICACIÓN EN EL AKTA PURE EN HIS TRAPFASES DEL MÉTODO: FASES DEL MÉTODO CROMATOGRFÍA HIS TRAP	71
ANEXO 3: PROGRAMA DE PURIFICACIÓN EN EL AKTA PURE EN FILTRACIÓN DE GEL	77
CONFIGURACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN DE GEL O SEC	77
ANEXO 4: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL MONTAJE DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: ADN Recombinantes	7
Figura 2: Expresión genética.....	8
Figura 3: Glicosilación de proteínas con endoglicosidasa H.....	9
Figura 4: Estructura de Endo H.....	10
Figura 5: Glicosilación de proteínas con PNGase	11
Figura 6: Estructura de PNGase F.....	12
Figura 7: Fases del crecimiento celular	18
Figura 8: Inducción con IPTG.....	21
Figura 9: Purificación His Taq.....	26
Figura 10 Ubicación del trabajo de investigación	28
Figura 11: Colonias de la transformación a células DH5alfa.....	32
Figura 12 : Incubación con una colonia por tubo para la preparación de Minipreps	33
Figura 13: Diagrama de plásmido a comparar Endo H.....	35
Figura 14: Diagrama de plásmido a comparar PNGase F.....	36
Figura 15: Colonias de la transformación a células BD21DE3.....	37
Figura 16: Cultivos vaciados en los frascos para centrifugar	39
Figura 17: Pellet obtenido de la centrifugación.....	39
Figura 18: Reconstitución del pellet con buffer lisis.....	40
Figura 19: Mezcla agitando en el cuarto frio con magneto	40
Figura 20: Mezcla siendo ultrasónica para mejorar la lisis	41
Figura 21: Alineación Del Plásmido Base Pngase Con Los Resultados Obtenidos En La Secuenciación.....	43

Figura 22: Resultado de la PNGase en formato FASTA	44
Figura 23: Alineación del plásmido base Endo H con los resultados obtenidos en la secuenciación	45
Figura 24: Resultado de la Endo H en formato FASTA	46
Figura 25: Purificación Endo H en His Taq	47
Figura 26: Lisado Endo H en gel de poliacrilamida en detector de imágenes.....	47
Figura 27: Gel purificación Endo H en His Taq.....	49
Figura 28: Cromatografía de exclusión de tamaño para Endo H	49
Figura 29: Purificación PNGase en His Taq	50
Figura 30: Lisado PNGase en gel de poliacrilamida en detector de imágenes.....	51
Figura 31: Gel purificación PNGaseF en His Taq.....	52
Figura 32: Purificación PNGase en His Taq	52
Figura 33: PNGase y Endo H después de la cromatografía de exclusión de tamaño.....	53
Figura 34: Western Blot PNGase y Endo H.....	54
Figura 35: Purificación His Taq con PNGase sin coctel del inhibidor de proteasas	57

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

En los últimos años, el uso de proteínas recombinantes se ha expandido rápidamente, lo que hace que las enzimas sean importantes en este trabajo. Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna tecnología de expresión que reúna las características de un sistema de expresión eficiente, económico y seguro y que permita expresar todo tipo de proteínas. La mayoría de las proteínas se producen actualmente en células procarióticas (principalmente *Escherichia coli*) y en un pequeño número de líneas celulares de mamíferos bien caracterizadas, como las células de ovario de hámster chino (CHO). También se utilizan otros sistemas, pero son menos comunes, tales como sistemas "*in vitro*" libres de células, algas, otras bacterias, levaduras, células de insectos en cultivo, células de plantas en cultivo, otras células de mamíferos en cultivo, plantas y animales transgénicos (1).

A pesar de la disponibilidad de diversos métodos y sistemas de expresión, cada uno de ellos tiene sus propias ventajas y limitaciones. *E. coli* es ampliamente usado porque es un sistema bien caracterizado, con tiempos de producción muy cortos, escalable, simple, barato y con aprobación regulatoria (2).

Sin embargo, la mayor limitación es la incapacidad de producir proteínas glicosiladas. Para estas proteínas, se han logrado avances significativos en los sistemas de expresión en células de mamíferos cultivadas, lo que permite altos niveles de producción y alta calidad del producto, además de la aprobación regulatoria. La selección del sistema de expresión adecuado depende de la productividad, bioactividad, propósito y características fisicoquímicas de la proteína de interés. En el campo de la biotecnología farmacéutica, realizando la obtención de proteínas recombinantes, los investigadores están constantemente desafiados a mejorar y optimizar los sistemas de expresión existentes, y también a desarrollar enfoques novedosos para hacer frente a las demandas de producir proteínas complejas (3).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar e implementar un protocolo para aislamiento purificación y expresión de Péptido: N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* y mannosil-glicoproteína endo- β -N- acetylglucosaminidasa (endoglycosidasa H) de *Streptomyces plicatus*, empleando el vector pBluescript KS. Para así, posteriormente, estos desarrollos podrían ser transferidos a la industria y/o instituciones académicas, ya sea proporcionando las proteínas de interés o los procesos y técnicas de producción.

1.1. Enunciado del problema

Aislamiento, purificación y expresión de Péptido: N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* y mannosil-glicoproteína endo- β -N- acetylglucosaminidasa (endoglycosidasa H) de *Streptomyces plicatus* a partir de *Escherichia coli*, empleando el vector pBluescript KS.

1.2. Objetivo

1.2.1. Objetivo general

Aislar purificar y expresar los péptidos: N- glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* y mannosil-glicoproteína endo- β -N-acetylglucosaminidasa (endoglycosidasa H) a partir de *Streptomyces plicatus*, empleando el vector pBluescript KS en el laboratorio del Instituto de Bioquímica en la Universidad de Lübeck.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Transformar el ADN plasmídico a diferentes líneas celulares.
2. Realizar satisfactoriamente la expresión en cultivo bacterial de Endo H y PNGase en ambas muestras.
3. Elaborar una correcta y específica purificación de las proteínas recombinantes.
4. Analizar los resultados y compararlos

1.3. Antecedentes

- Utilizando E. coli como organismo huésped, los principales aspectos metodológicos que deben considerarse para asegurar niveles suficientes de expresión de proteínas recombinantes biológicamente activas. De manera similar, la manipulación del ADN recombinante basada en los últimos conocimientos en genómica, proteómica y bioinformática ha aumentado exponencialmente el número de proteínas producidas por vías recombinantes. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en Escherichia coli. Andrés González y María F. Fillat. Instituto de Investigación Sanitaria Aragón. España 2018 (23).
- Nuevas tecnologías que superen las dificultades asociadas a los sistemas de expresión procarióticos y permitan distinguir entre la gama de bacterias más utilizadas y aquellas que representan bacterias alternativas prometedoras para la producción de la proteína de interés. Innovación estratégica. Esta revisión de la literatura proporcionó una descripción técnica muy completa de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas que existen en torno al uso de bacterias y que impactan las industrias farmacéutica y biotecnológica. Las bacterias como sistema de expresión de proteínas heterólogas terapéuticas: una revisión bibliográfica. Universidad de Antioquia. Medellín- Colombia. 2014 (24).

- La expresión de proteínas recombinantes es una herramienta necesaria para la investigación de proteínas en la era posgenómica. Aunque existen muchos sistemas para expresar proteínas recombinantes de los dominios eucariotas y eubacterianos en organismos, hay pocos o ningún sistema disponible para arqueas. Se desarrolló un sistema de expresión de proteínas recombinantes utilizando la arqueona metanogénica *Methanosarcina acetivorans*. Este sistema utiliza el promotor CDH altamente regulado, permite la expresión de proteínas recombinantes con una fusión de proteínas 6xHis opcional y permite una purificación rápida. Se desarrolló un protocolo para el cultivo a granel de alta densidad de *M. acetivorans* en un biorreactor de acero inoxidable configurado como pHauxostato. Expresión of recombinant proteins in the Methane-producing Archaeon *Methanosarcina Acetivorans* Sheridan Rose Macauley. The University of Maryland 2005 (25).

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1 Proteínas

Las proteínas son moléculas grandes y complejas que realizan muchas funciones importantes en el cuerpo. Realizan la mayor parte de su trabajo dentro de las células y son necesarios para la estructura, función y regulación de los tejidos y órganos del cuerpo. Las proteínas están formadas por cientos o miles de pequeñas unidades llamadas aminoácidos unidos entre sí en largas cadenas. Hay 20 aminoácidos diferentes que se pueden combinar para formar proteínas. La secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional única de cada proteína y su función específica (4).

2.1.1. Proteínas Recombinantes

Una proteína recombinante es un tipo de proteína modificada cuyo código está codificado por un ADN recombinante. Básicamente, un ADN recombinante se compone de dos segmentos de ADN unidos en un plásmido (que generalmente se encuentran en las bacterias). Cuando el ADN recombinante se inserta en el plásmido bacteriano, traducirán este ADN en proteínas que llevarán los nuevos conjuntos de características. La tecnología del ADN recombinante es posible debido a la gran similitud que existe en casi todo el material genético de los organismos vivos (es decir, estructura química similar).

Sin embargo, no significa que cuando se inserta un ADN recombinante en un huésped, necesariamente se expresará y se producirá la proteína. Para hacer esto, el ADN del organismo de origen necesita encontrar un vector y ese vector será el que impulsará la replicación del ADN en el huésped (11).

2.1.2. ADN recombinante

El ADN recombinante es una molécula de ADN que ha sido modificada para contener genes de múltiples fuentes mediante recombinación genética o técnicas de laboratorio. En el laboratorio, las bacterias pueden transformarse con ADN recombinante. La recombinación genética ocurre durante la meiosis en un proceso llamado cruce. En primer lugar, el gen de interés se puede replicar fácilmente insertándolo en un plásmido bacteriano y permitiendo que la bacteria se reproduzca normalmente. Un plásmido es un pequeño anillo de ADN. Una vez que los científicos conocen la secuencia exacta del plásmido, pueden abrir el anillo utilizando proteínas especiales llamadas enzimas de restricción. Una vez abierto el plásmido, puede insertar el gen de su elección. Si todas las secuencias correctas están presentes, las bacterias que hayan absorbido el plásmido producirán la proteína codificada por el ADN recombinante. Además, cuando las bacterias se reproducen, sus genes también se reproducen. Las bacterias pueden duplicar su número en una hora, lo que da como resultado grandes poblaciones bacterianas que pueden producir grandes cantidades de productos con fines científicos, médicos o industriales (26).

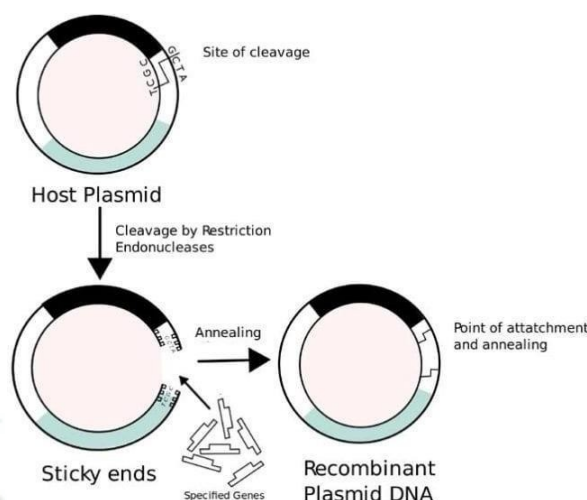


Figura 1:
ADN Recombinantes

Nota: BioExplorer. (11).

2.1.3. Expresión genética

La expresión génica es el proceso que permite obtener proteínas a partir de genes. Los genes son secuencias de nucleótidos de ADN que codifican la información necesaria para la síntesis de proteínas. Esta síntesis tiene lugar en dos pasos: transcripción y traducción. La transcripción tiene lugar en el núcleo y en ella una de las dos hebras que conforman la doble cadena de ADN sirve de molde para que una secuencia concreta se copie a una molécula de ARN de cadena sencilla. Posteriormente, este ARN sale fuera del núcleo y lleva el mensaje –la secuencia de nucleótidos– hasta los ribosomas, de ahí el nombre de ARN mensajero (ARNm). La traducción es un proceso citoplasmático en el que la molécula de ARNm se descodifica para generar una cadena específica de aminoácidos, llamada polipéptido (la proteína). La correspondencia existente entre nucleótidos (ARNm) y aminoácidos (proteína) es lo que se denomina código genético (12).

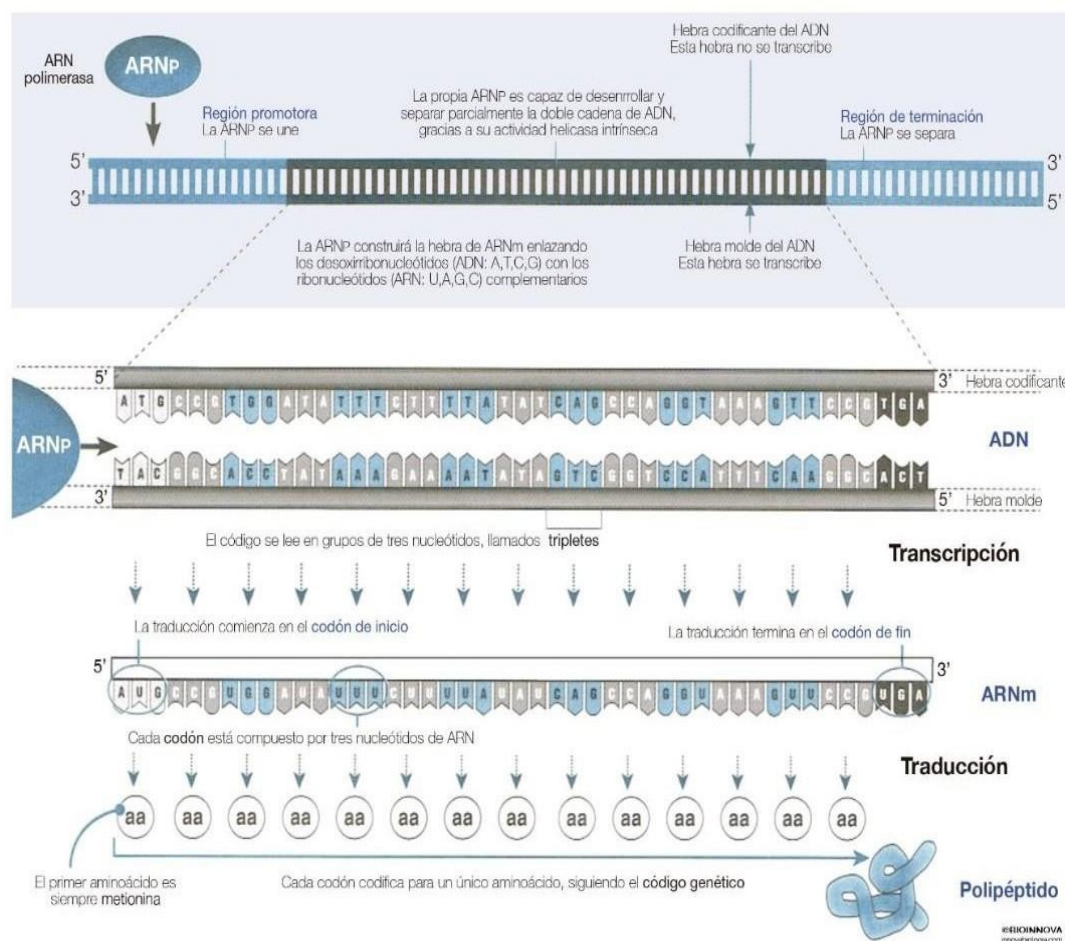


Figura 2:
Expresión genética

Nota: BIOINNOVA, (12).

2.2. Endo H

La Endoglycosidasa H (Endo H) es una glucosidasa recombinante clonada de *Streptomyces plicatus* y sobre expresada en *E. coli*. Endo H escinde el núcleo de quitobiosa de manosa alta y un número limitado de oligosacáridos híbridos de glicoproteínas N-ligadas. No escinde glicanos complejos. La escisión enzimática tiene lugar entre los dos residuos de N-acetilglucosamina en el núcleo de diacetilquitobiosa del oligosacárido, dejando un residuo de N-acetilglucosamina en la asparagina. Esto contrasta con la PNGasa F, que escinde todos los oligosacáridos unidos a asparagina (13).

2.2.1. Definición de la unidad

Una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para eliminar >95 % del carbohidrato de 10 µg de RNasa B desnaturalizada en 1 hora a 37 °C en un volumen de reacción total de 10 µl (13).

2.2.2. Peso Molecular

La Endo H tiene un peso molecular de aproximadamente 29 kDa (13).

2.2.3. Aplicaciones

- Determinación del estado de glicosilación de proteínas.
- Caracterización de la estructura de los glicanos (14).

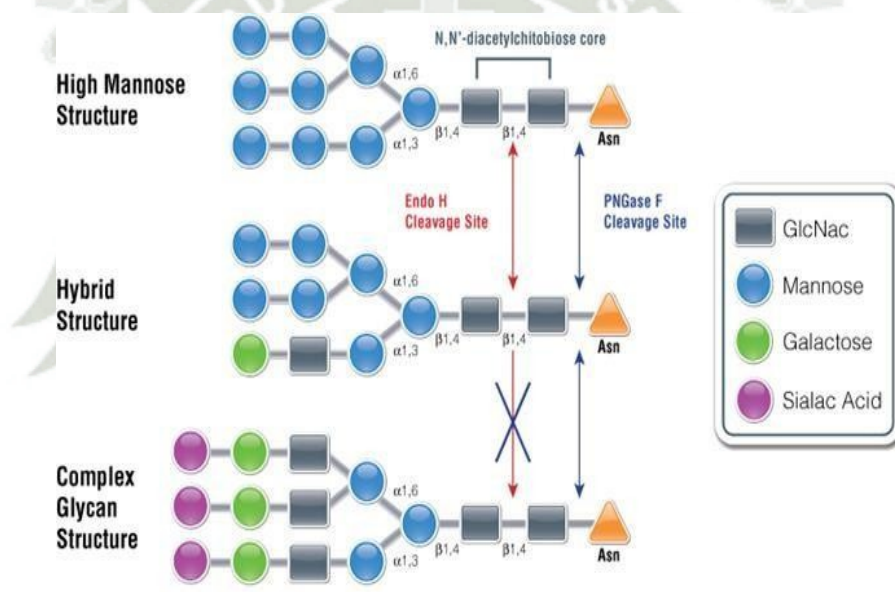


Figura 3:
Glicosilación de proteínas con endoglicosidasa H

Nota: Promega, (14).

2.2.4. Estructura

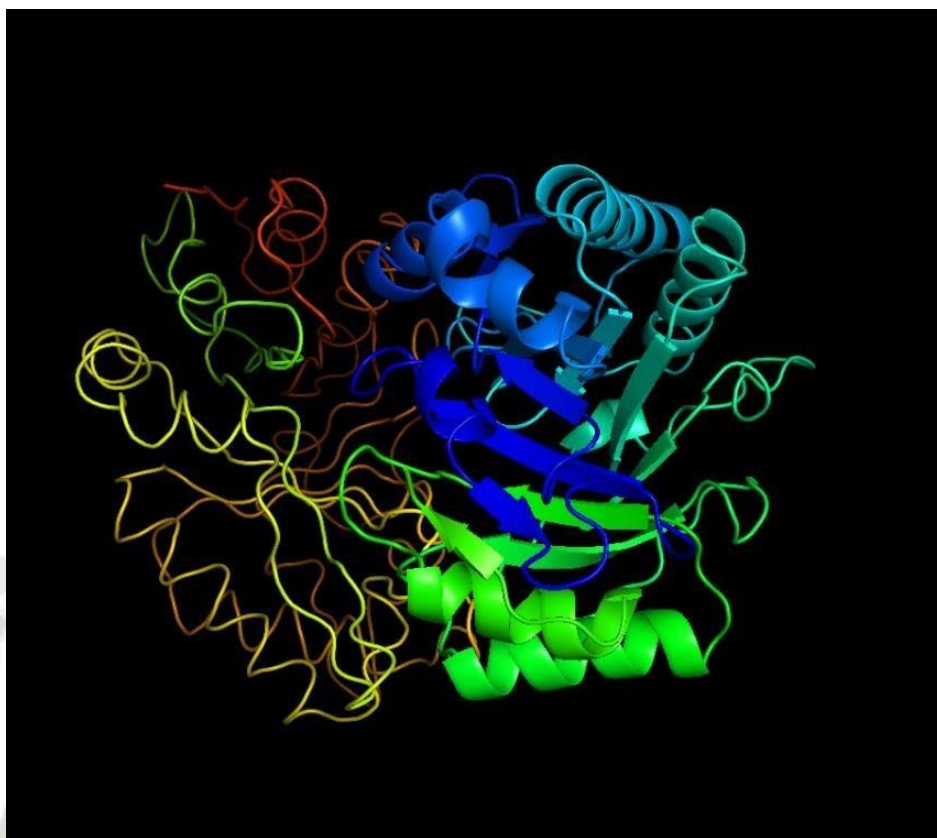


Figura 4:

Estructura de Endo H

Nota: Bank RCSB, (7).

2.3. PNGase

PNGase F es una glucosidasa recombinante clonada de *Elizabethkingia miricola* y sobre expresada en *E. coli*. La PNGase F tiene un peso molecular de 36 kDa. La PNGase F cataliza la escisión de los oligosacáridos unidos por N entre los residuos de GlcNAc y asparagina más internos de los oligosacáridos complejos, híbridos y con alto contenido de manosa de las glicoproteínas unidas por N (ver figura). La PNGase F no eliminará los oligosacáridos que contienen fucosa central ligada a alfa-(1,3) que se encuentra comúnmente en las glicoproteínas vegetales (15).

2.3.1 Definición de la unidad

Una unidad de PNGasa F catalizará la desglicosilación de 1 nanomol de ribonucleasa B desnaturalizada (RNasa B) en un minuto a 37 °C. Una unidad Promega equivale a 1 miliunidad IUB (15).

2.3.2 Peso Molecular

La PNGasa F tiene un peso molecular de aproximadamente 36 kDa. PNGase F se suministra como líquido en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5 a 25 °C), NaCl 50 mM y EDTA 5 mM a una concentración de 10 000 u/ml (15).

2.3.3. Aplicaciones

- Caracterizar si la proteína está glicosilada
- Determinación de la ubicación de la glicosilación en la proteína.
- Caracterización de la estructura de los glicanos
- Tráfico de proteínas (15).

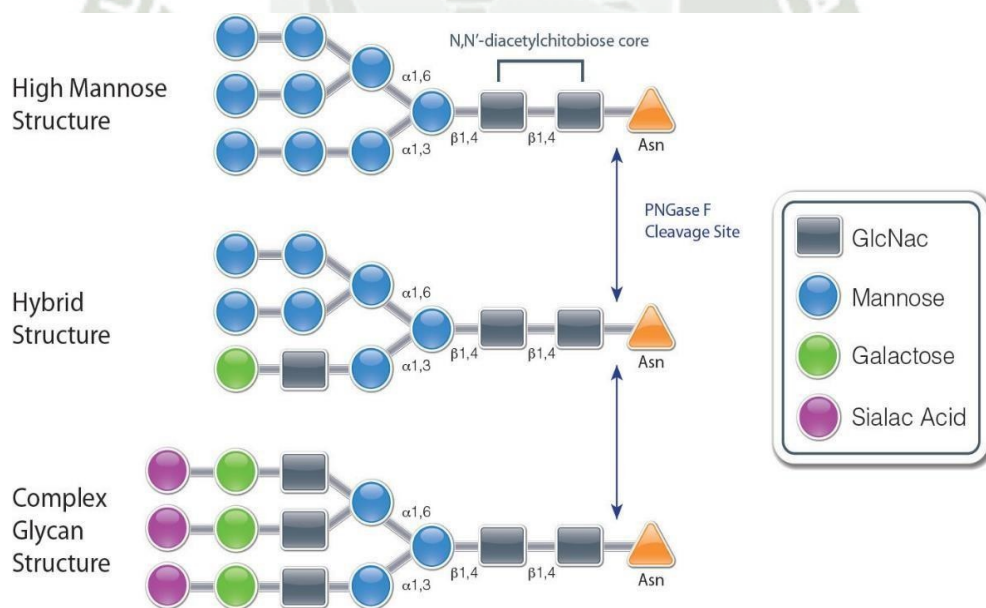


Figura 5:

Glicosilación de proteínas con PNGase

Nota: PNGase, (15).

2.3.4. Estructura



Figura 6:
Estructura de PNGase F

Nota: Bank RPD, (9).

2.4. Vector pBLUESCRIPT KS

Todos los fagémidos pBluescript II tienen una longitud de 2961 pb. La estructura de estos fagémidos es muy similar a la de pTZ19R/U excepto por los MCS y los promotores que flanquean al MCS. Los fagémidos pBluescript II están diseñados para la clonación de ADN, la secuenciación dideoxi de ADN, la mutagénesis in vitro y la transcripción in vitro en un solo sistema. Las series de vectores pBluescript II SK y KS representan

dos orientaciones del MCS dentro del gen lacZ que codifica el fragmento N-terminal de beta-galactosidasa (KS representa la orientación del MCS en la que la transcripción lacZ procede de KpnI a SacI, mientras que SK, de SacI a KpnI). Los símbolos (+) y (-) en los fagémidos pBluescript II indican la orientación de la región intergénica (IG) del fago fl clonado que lleva las secuencias requeridas en cis para el inicio y la terminación de la síntesis de ADN del fago fl y para el empaquetado del ADN en partículas de bacteriófago. La síntesis de ADN monocatenario requiere las proteínas de los genes II, X y V codificadas por fagos y se inicia en ori (+). Se procede en la dirección indicada. La conversión de cadenas de ADN monocatenarias en cadenas dobles no requiere que ninguno de los genes del fago funcione. La síntesis de ADN se inicia mediante un cebador de ARN de 30 nucleótidos sintetizado por la ARN polimerasa del huésped y que comienza en ori (-). Los fagémidos pBluescript II contienen: fl (IG): la región intergénica del fago fl; rep (pMB1): el replicón pMB1 responsable de la replicación del fagémido. La región indicada es suficiente para promover la replicación. La replicación del ADN se inicia en la posición 1213 (+/- 1) y avanza en la dirección indicada; bla (ApR): gen que codifica la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina. Los nucleótidos 2833-2765 (cadena complementaria) codifican un péptido señal; lacZ: parte terminal 5' del gen lacZ que codifica el fragmento N-terminal de la beta-galactosidasa. Este fragmento permite la detección azul/blanca de fagémidos recombinantes. El polipéptido LacZ correspondiente a la beta-galactosidasa natural y esencial para la detección azul/blanca termina en la posición nt 460 (cadena complementaria). Otros codones en el mismo marco de lectura provienen del ADN fl (15).

2.5. Células competentes

El ADN recombinante es una molécula de ADN que ha sido modificada para contener genes de múltiples fuentes mediante recombinación genética o técnicas de laboratorio. En el laboratorio, las bacterias pueden transformarse con ADN recombinante. La recombinación genética ocurre durante la meiosis en un proceso llamado cruce. Los científicos pueden utilizar esta característica del ADN para diversos fines. En primer lugar, el gen de interés puede replicarse fácilmente insertándolo en un plásmido bacteriano y permitiendo que la bacteria se reproduzca con éxito. Un plásmido es un pequeño anillo de ADN. Una vez que los científicos conocen la secuencia exacta del plásmido, pueden abrir el anillo utilizando proteínas especiales llamadas enzimas de restricción. Una vez abierto el plásmido, puede insertar el gen de su elección. Si todas las secuencias correctas están presentes, las bacterias que hayan absorbido el plásmido producirán la proteína codificada por el ADN recombinante. Además, cuando las bacterias se reproducen, sus genes también se reproducen. Las bacterias pueden duplicar su número en una hora, lo que da como resultado grandes poblaciones bacterianas que pueden producir grandes cantidades de productos con fines científicos, médicos o industriales (26, 27).

2.4.1. E. Coli DH5alfa

Las células competentes Thermo Scientific DH5 α son células de E. coli químicamente competentes y altamente eficientes que son ideales para crear bancos de genes o generar bibliotecas de ADNc utilizando vectores derivados de plásmidos. El marcador ϕ 80dlacZ Δ M15 proporciona complementación α del gen de la β -galactosidasa de pUC o vectores similares para permitir la detección de colonias de color blanco azulado en placas de agar bacteriano que contienen Bluo-Gal o X-Gal. Las mutaciones RecA1 y endA1 en células DH5 α mejoran

la estabilidad de la inserción y la calidad del ADN plasmídico extraído (28).

a) Aplicaciones

Las células competentes DH5 α son adecuadas para una variedad de aplicaciones que requieren una alta eficiencia de transformación:

- Clonación de ADN eficiente a partir de reacciones de generación de ADNc y PCR
- El marcador recA1 facilita el trabajo con ADN difícil de transformar
- Ideal para generar bibliotecas de ADNc con vectores derivados de plásmidos
- Mutagénesis dirigida al sitio.

Genotipo

F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-mK+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1 (28).

2.4.2. BD21

- Las células competentes BL21 son una cepa multiuso comúnmente utilizada para la expresión de proteínas de alto nivel y una fácil inducción.
- Expresión de proteínas de alto nivel y fácil inducción.
- Se puede utilizar con sistemas de expresión de proteínas de ARN polimerasa distintos de T7.
- Permite el control más estricto de la expresión de proteínas para proteínas extremadamente tóxicas.
- Adecuado para expresar proteínas de todas las especies, incluidos los mamíferos.
- Ideal para la expresión de proteínas difíciles, especialmente cuando el sesgo de codones es un problema

- Aumenta la eficiencia de transformación con el fenotipo Hte.
- Derivado de la línea celular competente BL21-Gold de alto rendimiento de Agilent (28).

2.5. Transformación

La transformación es el proceso por el cual un organismo adquiere ADN exógeno. La transformación puede darse a cabo de dos maneras: transformación natural y transformación artificial. La transformación natural describe la captación e incorporación de ADN desnudo del entorno natural de la célula. La transformación artificial abarca una amplia gama de métodos para inducir la captación de ADN exógeno. En los protocolos de clonación, se utiliza la transformación artificial para introducir ADN recombinante en la bacteria huésped (*E. coli*). El método más común de transformación artificial de bacterias implica el uso de cationes divalentes (por ejemplo, cloruro de calcio) para aumentar la permeabilidad de la membrana de la bacteria, haciéndola químicamente competente, aumentando así la probabilidad de adquisición de ADN. Otro método artificial de transformación es la electroporación, en la que las células reciben una descarga eléctrica para crear agujeros en la membrana bacteriana. Con una membrana celular recientemente comprometida, el ADN en transformación puede pasar libremente al citosol de la bacteria. Independientemente del método de transformación que se utilice, el crecimiento de bacterias después de la transformación permite la reparación de la superficie bacteriana y la selección de células recombinantes si el ADN recién adquirido transmite resistencia a los antibióticos a las células transformadas (29).

2.6. Incubación y crecimiento celular

Respecto al crecimiento de microorganismos, hay que recordar que es sinónimo de multiplicación y hace referencia a un aumento en el número de células. Por lo tanto, el crecimiento microbiano es un aumento en el número de células microbianas dentro de una población.

La tasa de proliferación es el aumento del número de células o de la masa celular por unidad de tiempo. El tiempo de generación es el tiempo que tarda una célula en convertirse en dos células, o el tiempo que tarda una población de microorganismos en duplicarse. Este tiempo varía mucho dependiendo de los microorganismos y de las condiciones ambientales como la temperatura (30).

La curva de crecimiento típica de un organismo unicelular en laboratorio la podemos ver representada en esta gráfica. Las curvas de crecimiento son distintas según el tipo de microorganismo y según variemos las condiciones del cultivo, pero, a pesar de ello, todas ellas tienen en común una serie de fases:

- Fase de latencia: es una fase de adaptación. Se corresponde con la primera parte de la curva, y en ella el número de UFC permanece prácticamente constante.
- Fase logarítmica o exponencial: es la fase en la cual los microorganismos se multiplican con rapidez. Durante cada intervalo de duplicación se producen tantas nuevas células como se habían producido anteriormente de manera acumulada. La fase continúa mientras no existan factores limitantes del crecimiento. En los cultivos discontinuos el factor que hace que cese el crecimiento puede ser el agotamiento de nutrientes, la acumulación de productos metabólicos tóxicos o una

combinación de ambos. Una vez que esto ocurre el cultivo pasa a la

- Fase estacionaria en la cual no varía el número de microorganismos. En los cultivos en laboratorio posteriormente tiene lugar la
- Fase de muerte en la cual el número de microorganismos comienza a disminuir (31).

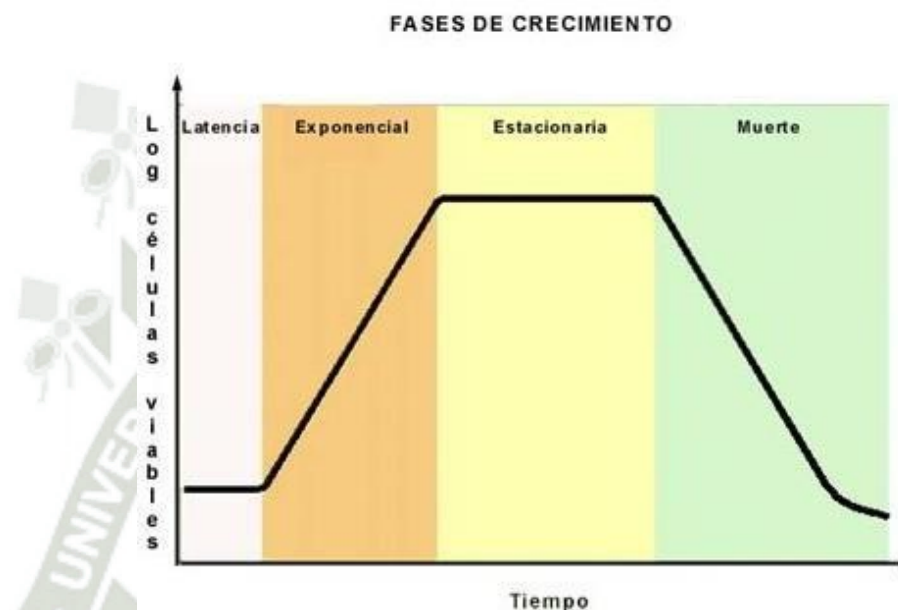


Figura 7:

Fases del crecimiento celular

Nota: ComBase, (30).

2.7. Minipreparados

Una miniprep es una técnica que nos permite aislar ADN plasmídico de cultivos bacterianos. El ADN aislado es de alta pureza y puede usarse para secuenciación, digestión o PCR. Al igual que para la limpieza de PCR y la extracción de gel, la mayoría de los laboratorios utilizan kits para realizar minipreparaciones. Los minipreps suelen ser ideales para la clonación básica, ya que solo requieren pequeños volúmenes de células cultivadas y producen una gran cantidad de ADN de alta calidad para la mayoría de las aplicaciones posteriores. También existen kits Midiprep y Maxiprep que producen mayores volúmenes de ADN purificado, pero requieren cultivos bacterianos mucho más grandes. Durante la minipreparación, lisaremos las bacterias cultivadas en

cultivo del día anterior y purificaremos los plásmidos transformados de ellas. La tarde antes de la minipreparación, use la punta de una pipeta para inocular de 3 a 5 ml de medio LB + antibiótico con una sola colonia de la transformación de su reacción. Incubar el cultivo durante la noche a 37 °C en una incubadora con agitación (normalmente ~250 rpm) (31).

2.8. Cultivos celulares

Las bacterias son componentes importantes de la ecología. Son esenciales para nuestra salud y la salud de nuestro medio ambiente, desempeñan un papel fundamental en la producción de alimentos y brindan a los bioingenieros las herramientas para aplicar sus habilidades y establecer conexiones. Sin embargo, también pueden ser perjudiciales y provocar daños y enfermedades. La capacidad de cultivar microorganismos dañinos es un elemento esencial para aprovechar su poder, identificar las causas más dañinas y mejorar nuestros conocimientos y habilidades. Este artículo describe algunas de las complejidades del cultivo bacteriano y los factores que influyen en las condiciones del cultivo, problemas comunes y muchos ejemplos de aplicaciones (32).

2.9. IPTG

IPTG o isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido es un análogo molecular de la alolactosa que induce la expresión génica eliminando el represor del operón lac. La alolactosa es un isómero de la lactosa que se forma cuando la lactosa ingresa a las células. Actúa como un inductor que inicia la transcripción de los genes del operón lac. El gen del operón lac codifica una proteína importante en la descomposición de la lactosa. El metabolismo de la lactosa ocurre cuando la glucosa está ausente y la lactosa está presente en grandes cantidades. Para reponer las fuentes de energía, las células descomponen la lactosa de forma natural (32).

2.9.1. Lac operón

El El operón Lac es una región del ADN de *E. coli* que contiene tres genes (*lacZ*, *lacY* y *lacA*). En el genoma de *E. coli* se agrupan tres genes que operan bajo un único promotor. Un promotor es el sitio donde la ARN polimerasa comienza la transcripción de un gen. En la deficiencia de lactosa, el represor se une al operador Lac, bloquea la ARN polimerasa e impide la transcripción genética. El operador Lac es un sitio de control negativo dentro del ADN que se superpone con el promotor Lac. En ausencia de glucosa y presencia de lactosa, la alolactosa se une al represor lac y libera alolactosa del operador lac. Al igual que la alolactosa, el IPTG provoca la liberación del represor Lac. Esto hace que la ARN polimerasa se una al promotor y comience la transcripción del gen (32).

2.9.2. Inducción con IPTG

La inducción de IPTG es un método para regular la síntesis de proteínas activando la transcripción del operón lac.

Requiere dos actores clave:

- Células: la cepa de expresión

Durante la inducción de IPTG, las células deben producir la ARN polimerasa T7 necesaria para la transcripción de genes; por ejemplo, puede utilizar la cepa de *E. coli* BL21(DE3). BL21(DE3) tiene el gen lac que codifica el represor lac, LacI. Después de la inducción de IPTG, esta cepa expresa la ARN polimerasa T7 (33).

- Vector

En el paso de clonación, se clona el gen de interés en un vector particular, como el vector pET, y se transforman las células de *E. coli* con el ADN

recombinante (34).

Para expresar su gen de interés, su vector debe tener varios elementos clave:

- Un gen de resistencia a los antibióticos: para seleccionar las células transformadas.
- El gen *lacI*: para sintetizar el represor lac, LacI.
- Sitio LacO: un sitio que contiene una secuencia del operador lac. En ausencia de IPTG, Lac se une a este sitio para impedir la expresión de su gen de interés (33).
- Promotor T7 (u otros promotores reconocidos por la ARN polimerasa T7): para iniciar la transcripción de su gen de interés. Este promotor es adyacente al sitio LacO. Por lo tanto, cuando Lac se une al sitio LacO, evita la unión de la ARN polimerasa T7 al promotor T7.
- ORF (Open Reading Frame): un sitio donde clonas tu gen de interés (34).

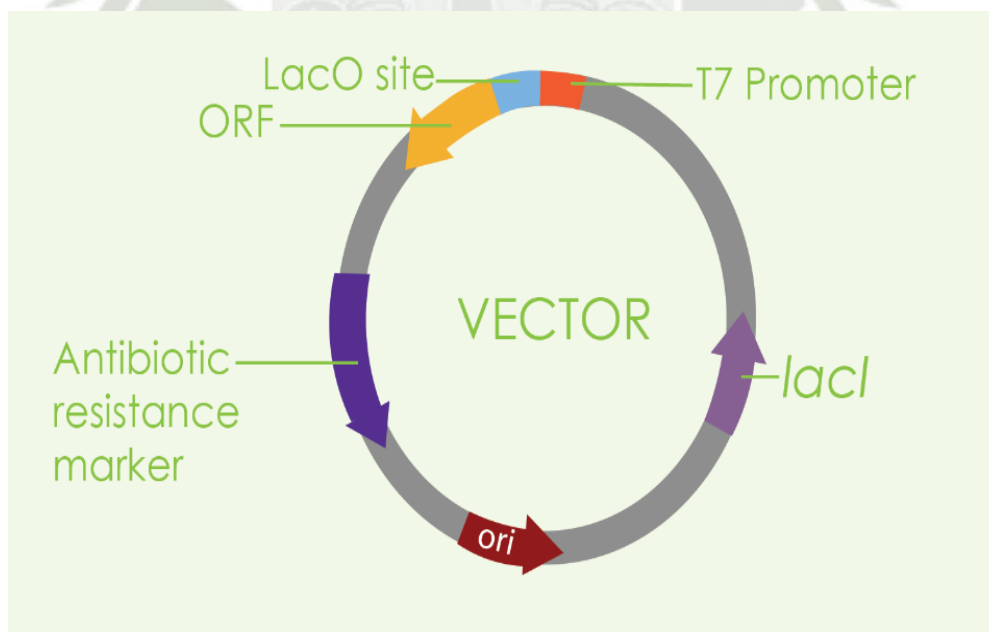


Figura 8:
Inducción con IPTG

Nota: Briand, et al, (34).

2.10. Lisis Celular

La lisis celular es un proceso importante tanto en la extracción de componentes internos de la célula además que desencadena la muerte celular. Consiste en la rotura de la membrana celular de células o bacterias y provoca la salida de orgánulos o material celular. Esta rotura puede ocurrir por medios químicos, físicos o incluso por infección de virus.

En los laboratorios biotecnológicos se practica la desintegración o lisis celular con el fin de romper las membranas o paredes celulares y así liberar moléculas biológicas como orgánulos o proteínas. El material celular lisado (o extraído) se separa para llevar a cabo nuevas aplicaciones o investigaciones.

Los métodos de lisis celular que se usan son diversos. Desde la sonificación (por medio de ondas que rompen la pared celular) o la homogeneización líquida (las membranas se rompen al pasar por espacios muy reducidos) o incluso por medio de detergentes (39).

2.11. Ultrasonificación

Estas fuerzas cortantes pueden romper material fibroso y celulósico en partículas más finas y romper las paredes de las células, lo que libera más material intracelular, como almidón o azúcar, en el medio. Además, el material de la pared celular se fragmenta en pequeñas partículas.

Este efecto se puede utilizar para procesos de fermentación, digestión y otros procesos de transformación de la materia orgánica. Después de moler y pulverizar el material, los ultrasonidos consiguen que un mayor contenido tanto de material intracelular, por ejemplo, almidón, como de restos de la pared celular, se encuentren más disponibles

para las enzimas que convierten el almidón en azúcares. También logran aumentar la superficie expuesta a las enzimas durante la licuefacción o la sacarificación. Esto normalmente incrementa la velocidad y el rendimiento de la fermentación con levadura y otros procesos de conversión para, por ejemplo, multiplicar la producción de etanol a partir de biomasa (40).

2.12. Purificación

2.12.1. Purificación His Tag

Una etiqueta de histidina, o etiqueta de poli histidina, es una cadena de residuos de histidina en el extremo N o C de una proteína recombinante. Puede haber de cuatro a diez residuos en una cadena, aunque comúnmente hay seis residuos de histidina, una etiqueta de hexahistidina. Algunas proteínas recombinantes están diseñadas para tener dos etiquetas de hexahistidina. La purificación con etiqueta His utiliza la técnica de purificación de cromatografía de afinidad de metal inmovilizado o IMAC. En esta técnica, los iones de metales de transición se inmovilizan en una matriz de resina usando un agente quelante como el ácido iminodiacético. El ion más común para la purificación con etiqueta his de una proteína recombinante es Ni^{2+} , aunque también se utilizan Co^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} . El his-tag tiene una alta afinidad por estos iones metálicos y se une fuertemente a la columna IMAC. La mayoría de las otras proteínas en el lisado no se unirán a la resina o se unirán débilmente. El uso de un his-tag e IMAC a menudo puede proporcionar una proteína recombinante relativamente pura directamente a partir de un lisado crudo (17).

El imidazol compite con la etiqueta his para unirse a la resina cargada con metal y, por lo tanto, se usa para la elución de la proteína de una columna IMAC. Por lo general, se agrega una concentración baja de imidazol a los tampones de lavado y de unión para interferir con la unión débil de otras proteínas y para eludir cualquier

proteína que se una débilmente. Luego, la proteína etiquetada con His se eluye con una concentración más alta de imidazol.

Ni^{2+} se usa más comúnmente para la purificación de his-tag, ya que brinda un alto rendimiento. El uso de Co^{2+} puede dar una mayor pureza, pero con un menor rendimiento. Bio-Rad tiene resinas his-tag y kits de purificación his-tag que están precargados con Ni^{2+} para una purificación rápida y fácil de proteínas his-tag. También están disponibles resinas sin carga y kits que se pueden cargar con Co^{2+} u otros iones metálicos divalentes o trivalentes. Los kits sin carga brindan a los usuarios la opción de probar diferentes metales para determinar si uno brinda mayor pureza o rendimiento para una proteína recombinante marcada con His en particular (18).

2.12.1.1. Funciones de purificación His-tag

Para la purificación de his-tag, una his-tag más larga o dos etiquetas de hexahistidina proporcionan una mayor afinidad por la matriz. A medida que aumenta el número de residuos de histidina, el tampón de elución requiere una mayor concentración de imidazol para eliminar las proteínas unidas de la columna. Una unión más fuerte puede ser una ventaja cuando la mezcla de proteína cruda contiene proteínas no deseadas que tienen una alta afinidad por la resina IMAC cargada. La mayoría de las proteínas no recombinantes se unen más débilmente que una cadena larga de histidinas y, por lo tanto, eluyen a una concentración más baja de imidazol.

Una unión más fuerte a una columna IMAC puede ser particularmente útil cuando las proteínas recombinantes marcadas con his provienen de una fuente eucariótica (18).

En general, hay menos proteínas con fuerte afinidad por los metales de transición en lisados de procariotas que de eucariotas. El uso de dos etiquetas

de hexahistidina combinadas con Co^{2+} (o Zn^{2+}) puede reducir la afinidad de unión de muchas de estas proteínas en relación con la proteína etiquetada con his.

Si el imidazol no es adecuado para la elución, se puede reducir el pH de la columna his-tag para eluir la proteína recombinante. Bajar el pH hace que los iones metálicos se protonen y luego se extraigan de la columna. Todas las resinas his-tag de Bio-Rad son estables a un pH de 1 a 14 y se pueden utilizar con cualquier protocolo que implique un cambio de pH.

Cuando se preparan lisados crudos para la purificación de proteínas marcadas con His, a menudo se deben incluir uno o más detergentes o agentes desnaturalizantes o reductores en el tampón de lisis. Todos los kits de purificación de proteínas his-tag de Bio-Rad son compatibles con todos los tipos comunes de detergentes y agentes desnaturalizantes y reductores. No hay efecto sobre la unión o elución de la resina IMAC en presencia de estos compuestos (19).

b) Beneficios de la purificación His-Tag

La gama Bio-Rad de kits, columnas y medios de purificación his-tag están optimizados para altos niveles de purificación a velocidades de flujo rápidas. Debido a los bajísimos niveles de fuga de iones metálicos de nuestros medios de afinidad, no hay problema con la contaminación de las muestras por iones metálicos cuando se utiliza una columna o kit de purificación his-tag de Bio-Rad. Todas las resinas son estables a pH bajo, compatibles con detergentes y agentes desnaturalizantes y reductores, tienen una alta resistencia mecánica y se pueden usar con caudales rápidos (20).

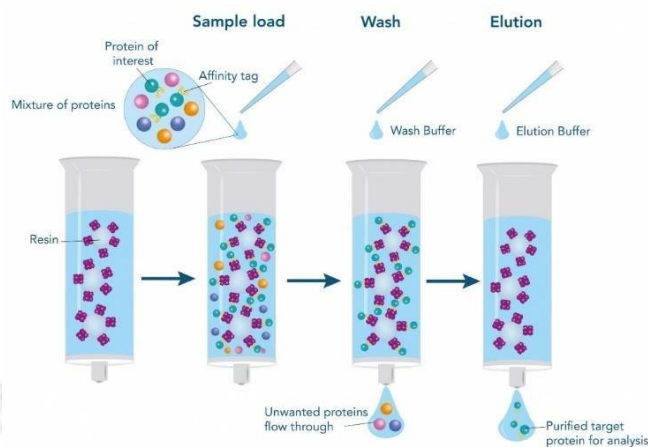


Figura 9:
Purificación His Tag

Nota: Lifesciences. (35).

2.12.1.2. Cromatografía de exclusión de tamaño

La cromatografía de exclusión molecular (SEC), también conocida como filtración en gel, es la más suave de todas las técnicas de cromatografía. La SEC separa moléculas por diferencias de tamaño a medida que pasan a través de una resina empaquetada en una columna. A diferencia de técnicas como la cromatografía de intercambio iónico (IEX) o la cromatografía de afinidad (AC), las moléculas no se unen a la resina de cromatografía, lo que significa que la composición del tampón no afecta directamente la resolución (el grado de separación entre picos). En consecuencia, una ventaja significativa de la SEC es que se pueden variar las condiciones para adaptarse al tipo de muestra o a los requisitos para una mayor purificación, análisis o almacenamiento sin alterar la separación (36).

2.13. SDS-Page

SDS-PAGE se utiliza para el análisis de proteínas. Este tipo de electroforesis utiliza geles a base de poliacrilamida como medio de separación. Aproximadamente 1,4 g de SDS se unen por cada g de proteína, por lo que la proteína tiene una distribución de carga constante. Durante la preparación de la muestra, se agrega un exceso de SDS a la proteína y luego la muestra se calienta a 95 °C, lo que altera la estructura secundaria y terciaria al romper los enlaces de hidrógeno y estirar las moléculas.

Al final de esta preparación, la proteína cargada de SDS tiene forma elipsoidal.

Además de la resistencia al SDS, los complejos proteicos cinéticamente estables también se caracterizan por su estabilidad frente a proteasas y una larga vida media. Para la separación, cargue la muestra desnaturalizada en un gel de poliacrilamida y colóquela en el electrolito apropiado.

Luego se aplica un voltaje, lo que hace que la muestra cargada negativamente se mueva a través del gel.

Al final del proceso, todas las proteínas se clasifican por tamaño y pueden visualizarse mediante otros métodos (tinciones como la tinción de Coomassie o la tinción con plata, o pruebas inmunológicas como el Western blot).

Además de la muestra, normalmente se cargan marcadores de tamaño en el gel.

Está formado por proteínas de tamaño conocido, lo que nos permite estimar el tamaño de las proteínas en la muestra real (37).

2.14. Western Blot

La Western blot es una técnica importante en biología celular y molecular, esta permite a los investigadores identificar proteínas específicas a partir de mezclas complejas de proteínas extraídas de las células.

Esta técnica utiliza tres elementos para realizar esta tarea:

- Separación por tamaño

- Transferencia a superficies sólidas
- Etiquetar las proteínas diana utilizando anticuerpos primarios y secundarios apropiados para su visualización.

La transferencia Western se utiliza a menudo en la investigación para separar e identificar proteínas. Esta técnica utiliza electroforesis en gel para separar una mezcla de proteínas según su peso o tipo molecular. Estos resultados se transfieren a la membrana, produciendo bandas para cada proteína. Luego, la membrana se incuba con un anticuerpo marcador específico para la proteína de interés. Los anticuerpos no unidos se eliminan, dejando sólo los anticuerpos unidos a la proteína de interés. Los anticuerpos unidos se detectan, revelando la película. Sólo una banda debe ser visible porque el anticuerpo sólo se une a la proteína de interés. El grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente. (38).

2.15. Hipótesis

Dado que la endoglycosidasa H y el Péptido: N-glicosidasa F son proteínas importantes para diferentes actividades en la Industria Farmaceutica asi como en la Biotecnología Farmacéutica y siendo posible su purificación expresión y aislamiento; entonces es probable qué, se pueda hacer un protocolo con la clonación del inserto respectivo en el vector pBLUESCRIPT KS, asimismo su purificación por His Taq, gel filtración y aislamiento para obtener las proteínas por combinación de métodos enzimáticos y ultrasonificación, para la correcta obtención de ellas.

CAPITULO III

3. METODOLOGIA

3.1. Campo de Verificación

3.1.1. Ubicación Temporal

El presente trabajo se realizó entre el mes de febrero a agosto de 2023

3.1.2. Ubicación Espacial

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Bioquímica, en la Universidad de Lübeck, en la ciudad de Lübeck, en Alemania.

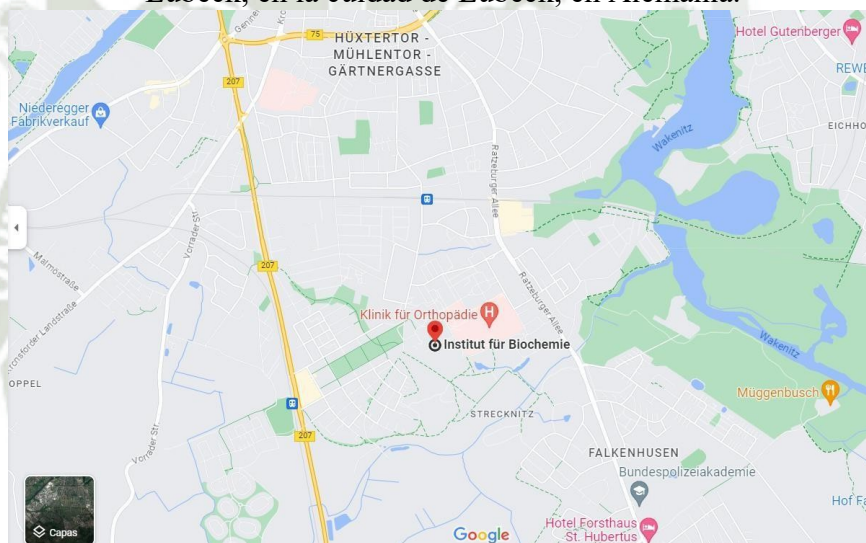


Figura 10:
Ubicación del trabajo de investigación

Nota: Google Maps. Universität zu Lübeck

3.2. Materiales

3.2.1 Vectores y Material genético

El vector pBluescript KS tanto como el inserto para expresión de endo H y PNGase, fueron otorgados por el laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Lübeck.

3.2.2 *Material biológico y químico*

- *Células competentes E.Coli DH5alfa*
- *Células competentes BD21*
- *Primer de secuenciación T7*
- *Ampicilina Stock 100mg/ml*
- *Isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido 1M*
- *Medio LB*
- *Agar LB*
- *Geles de poliacrilamida*
- *Protein Ladder Marker*
- *Anti His (5:10000)*
- *Horseradish peroxidase*
- *Leche*
- *Geles de poliacrilamida 15% (ver preparación en anexo)*
- *Buffer para cargar muestras en SDS-Page (ver preparación en anexo)*

3.2.3 *Equipos*

- *Termomixer*
- *Placas Petri*
- *Incubadora a 37 y 25 grados*
- *Hielo*
- *Bolas de vidrio para esparcir el cultivo*
- *Tubos de plástico para cultivo*
- *KIT Plasmid isolation kits, NucleoSpin®*
- *Frascos de cultivo de 3L*
- *Frascos para centrifugadora*
- *Rotor JLA.81*
- *Rotor JA25.50*
- *Vasos beakers*
- *Espátulas*
- *Magneto*
- *Ultrasonicador*
- *Filtro de membrana 0.45mm*
- *Akta pure*

- *Columna HisTrap HP*
- *Micropipeta (2;5;100 y 1000mL)*
- *Columna HiLoad® 26/600 Superdex® 200 pg*
- *Concentradores AMICON*
- *Nanodrop*

3.2.4 Buffers

Buffer lisis

- 50mM Tris pH8
- 5% Glicerol
- 25mM Imidazol
- 250mM NaCl
- Proteasa Inhibidor (500uL in 1000uL)
- DNase (10uL in 1000uL)

Buffer para HisTrap

Buffer A1

- 50mM Tris pH8
- 25mM Imidazol
- 250mM NaCl

Buffer B1

- 50mM Tris pH8
- 250mM Imidazol
- 250mM NaCl

Buffer para SEC

- 50mM Tris pH8
- 250mM NaCl

3.3 Metodología

3.3.1 Transformación del plásmido a células competentes E. Coli

DH5alfa

Las células DH5alfa fueron proporcionadas en alícuotas de 100µl en ependorf de 1,5mL, por el laboratorio anteriormente mencionado y fueron guardadas en ultracongeladora a -80°C. Por lo que el primer paso fue recoger hielo en un pocillo luego se colocó las células y se esperó aproximadamente 5 minutos a que se descongelen. Seguidamente se colocó 3uL de los plásmidos correspondientes y se mezcló suavemente para luego dejarlo incubar en hielo por 15 a 20 minutos. Se puso el ependorf con esta mezcla en el termomixer a 42°C por 50 segundos para producir un shock de calor por 50 segundos, se colocó nuevamente en hielo y se dejó incubar por 3 minutos.

Seguidamente se colocó 250mL de medio LB previamente autoclavado, y se dejó nuevamente en el termomixer por 45 minutos a 37°C con una agitación de 500RPM.

Después de esta incubación, se tomó 150uL y se puso en la placa Petri con agar LB previamente preparado e implementado con ampicilina 100ug/ml, y con ayuda de las bolas de vidrio, se esparció el líquido hasta que se vio seco.

Dejar en incubadora a 37°C por 16 horas (Se puede apreciar en la imagen 11 como se debe ir de ver después de las 16 horas de incubación).

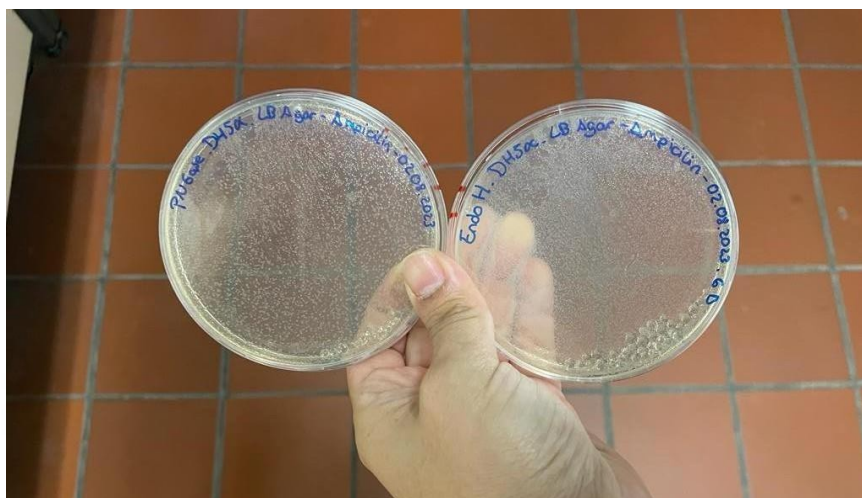


Figura 11:

Colonias de la transformación a células DH5alfa

3.3.2 Recolectar colonias y preparar cultivos previos

Después de la incubación de 16 horas de los platos agar, se deben observar algunas colonias. Se prepararon tubos para cultivo celular con 5ml de medio LB implementado con 100ug/mL ampicilina. Se colocó una colonia por tubo y se dejó incubar a 37°C con agitación de 220RPM por 18 horas (Se puede observar en la imagen 12 los diferentes tubos para las Minipreps)



Figura 12 :

Incubación con una colonia por tubo para la preparación de Minipreps

3.3.3 Preparar Minipreps de plásmido (Plasmid isolation kits, NucleoSpin® Plasmid)

Este paso se realizó con el Kit Plasmid isolation kits, NucleoSpin® Plasmid, por lo que se siguió el protocolo y las recomendaciones del fabricante, descritas a continuación.

Después del tiempo de incubación, se centrifugo durante 1 minuto a 11.000 x g. Se descartó el sobrenadante y se removió la mayor cantidad de líquido posible.

Se agregó 500 µL de tampón A1. Se re suspendió el sedimento celular completamente agitando en vórtex o pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Se debe asegurar que no queden grumos de células antes de agregar el tampón A2. Se agregó 500 µL de tampón A2. Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 6–8 veces. No se recomendó agitar para evitar el corte de genómico ADN. Se incubo a temperatura ambiente hasta 5 min o hasta que el lisado parezca claro.

Se agregó 600 µL de tampón A3. Se mezcló bien invirtiendo el tubo de 6 a 8 veces hasta que las muestras azules se vuelvan incoloras: No se debe de agitar para evitar el corte de genómica

Se aseguró de neutralizar completamente para precipitar todo el proteína y ADN cromosómico. Las muestras deben de girar completamente incoloro sin rastros de azul del Buffer A2.

Se centrifugar durante 10 min a 11.000 x g a temperatura ambiente

Se colocó una columna NucleoSpin® Plasmid/Plasmid en un tubo de recogida (2 mL) y se decantó el sobrenadante del paso 3 en la columna. Se centrifugó por 1 min a 11.000 x g. Se desechó el fluido y se colocó la columna de plásmido NucleoSpin® de nuevo en la colección tubo.

Se agregó 500 µL de tampón AW, opcionalmente precalentado a 50 °C y se

centrifugo durante 1 min a 11.000 x gramo. Se desechó el fluido y coloco la columna NucleoSpin® Plasmid/Plasmid en el tubo de recolección.

Se añadió 600 µL de Buffer A4 (complementado con etanol) y se centrifugo durante 1 min a 11.000 x g. Se desechó el fluido y se colocó la columna Plásmido/Plásmido de vuelta al tubo vacío de recogida.

Se centrifugo durante 2 min a 11.000 x g y se desechó el tubo de recogida, se colocó la columna en un tubo ependorf de 1,5 ml y se agregó 50 µL de Buffer AE precalentado a 70 °C. Se incubo durante 2 min a 70 °C. Y se centrifugo durante 1 min a 11.000 x g (10).

3.3.4 Secuenciación de Endo H y PNGase por el método de Sanger

Se enviaron 5 muestras de ADN de Endo H y PNGase para su secuenciación a LGC genomics-Berlin, como primer paso se realizó la medición de la concentración y calidad del material genético.

Se mandó a secuenciar 9uL del plásmido a 100ng/ml mezclados con 5uL del primer T7.

Se esperó a los resultados para comparar y alinear con ayuda del programa Blenching si los resultados obtenidos son los mismos que los datos proporcionados por los organismos internacionales. Si es así, se puede continuar, con el siguiente paso.

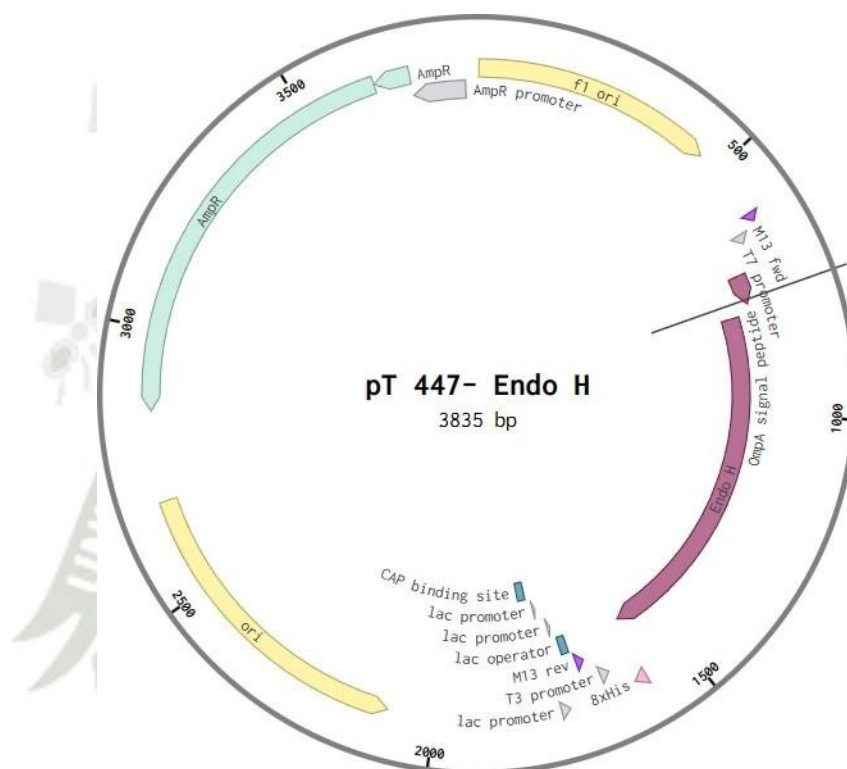


Figura 13:
Diagrama de plásmido a comparar Endo H

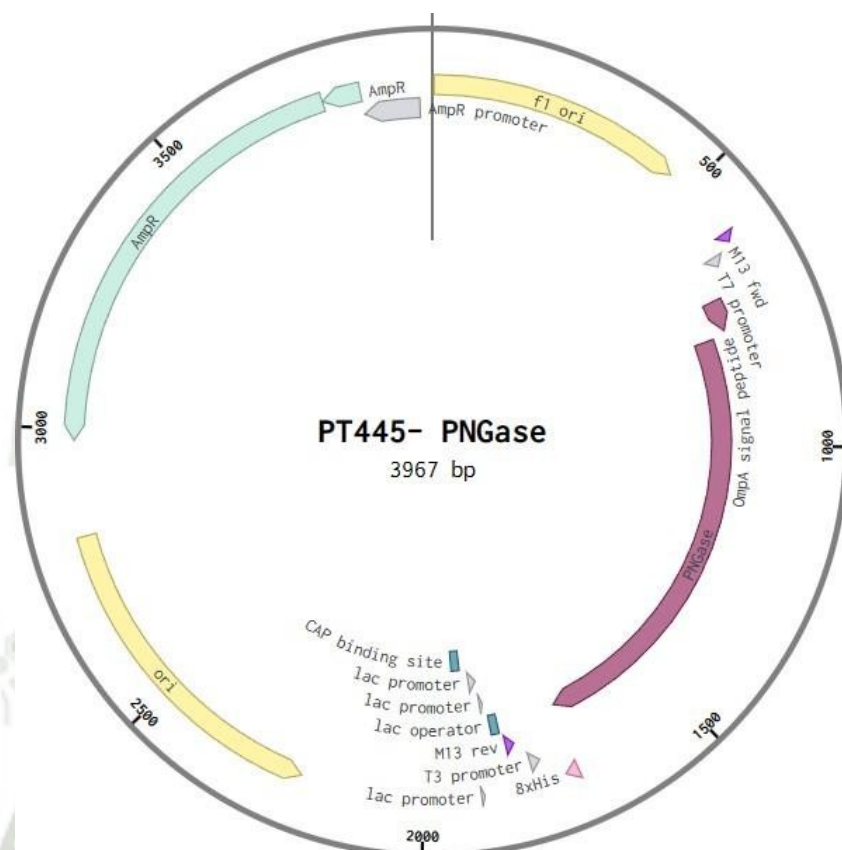


Figura 14:
Diagrama de plásmido a comparar PNGase F

3.3.5 Transformación el plasmido en células competentes BD21DE3

Después de verificar y asegurarse de estar usando el plásmido indicado, se pudo empezar con la transformación a células BD21DE3

Estas células fueron proporcionadas en alícuotas de 100ml en ependorf de 1,5mL, por el laboratorio anteriormente mencionado y fueron guardadas en el refrigerador -80°C. Por lo que el primer paso es recoger hielo en un pocillo, se coloca las células y se esperó aproximadamente 5 minutos a que se descongelen. Seguidamente se colocó 2uL de los plásmidos correspondientes, se mezcló suavemente y se dejó incubar en hielo por 15 a 20 minutos

Se puso el ependorf con esta mezcla en el termomixer a 42°C por 50 segundos para producir un shock de calor. Después de los 50 segundos, se colocó nuevamente en hielo y dejar incubar por 3 minutos.

Seguidamente se colocó 250mL de medio LB previamente autoclavado, y se dejó nuevamente en el termomixer por 45 minutos a 37°C con una agitación de 500RPM.

Después de esta incubación, se tomó 150uL y se puso en la placa Petri con agar LB previamente preparado e implementado con ampicilina 100ug/mL y con ayuda de las bolas de vidrio, se esparció el líquido hasta que se vio seco.

Se dejó en incubadora a 37°C por 12 horas (En la Figura 15 se puede ver las colonias obtenidas, después de esta incubación)



Figura 15:

Colonias de la transformación a células BD21DE3

3.3.6 Preparación del cultivo primario

Anterior a este paso se preparó y se autoclavó 3L de LB medio al igual que 2 frascos de 250mL y 3L. Seguidamente se colocó 50mL de medio LB suplementado con ampicilina 100ug/mL en uno de los frascos y dos o tres colonias. Se dejó incubar las colonias por 12-16 horas a 37°C:

3.3.7 Cultivo secundario a 1,5L

Se colocó 1,5L en cada uno de los frascos de cultivo de 3L. Se sacó el cultivo primario en la campana de extracción y se puso 25mL en cada frasco y se tapó la boca del frasco con papel aluminio. Se dejó incubar por aproximadamente 2 horas

3.3.8 Inducción con IPTG

Después de 2 h de incubación a 37 grados hasta un OD de 0,6 (utilizando de blanco el medio LB puro), se indujo cada frasco con 1mL de isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido (0,6mM), se incubó 18 horas aproximadamente a 25 grados

3.3.9 Reconstitución del pellet y lisis

Después se centrifugó con el rotor JLA.81 a 4500g por 20 minutos, y se colecta el pellet (como se puede observar en la Figura 16 y 17). Se reconstituye el pellet con 100mL de Buffer lisis (Figura 18). Se colocó un magneto en el cuarto frío y se deja mezclar por 30 minutos aproximadamente (Figura 19). Seguidamente se coloca por 10 minutos en el ultrasonificador con 70% de amplitud, 2 segundos apagado y 1 segundos prendido, teniendo en cuenta mantener el preparado en hielo (Figura 20). Después se centrifugó por 45 minutos a 50000g con ayuda del rotor JA25.50 y seguidamente se filtró con el filtro de membrana 45mm, se

colecta en un frasco y se lleva al Akta para su seguida purificación.



Figura 16:
Cultivos vaciados en los frascos para centrifugar



Figura 17:
Pellet obtenido de la centrifugación



Figura 18:
Reconstitución del pellet con buffer lisis



Figura 19:
Mezcla agitando en el cuarto frío con magneto

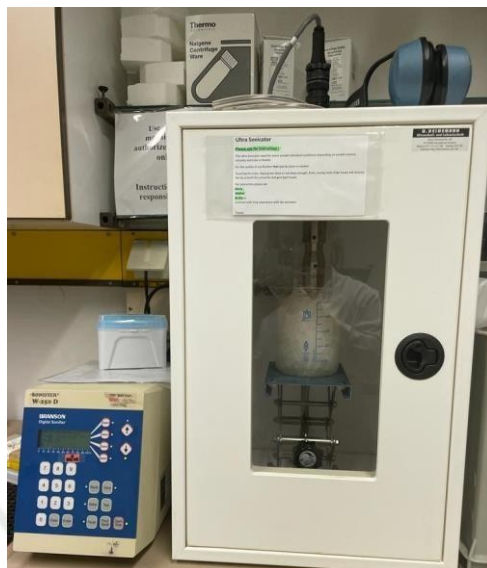


Figura 20:
Mezcla siendo ultrasónica para mejorar la lisis

3.3.10 Purificación His Taq

Se realizó la purificación His Taq con una columna HisTrap FF de 5mL (CV=5,027mL). Se utilizó un flujo de 5mL/min en el sistema. Se activó dos señales UV, 280nm para detectar la proteína y 254nm. Se realizó las siguientes fases:

- Equilibración: Con 10mL totales con el buffer A1 a un flujo de 5mL/min
- Aplicación de la muestra: Se pompeo la prueba con un tubo muestra a un flujo de 1mL/min, hasta que se detecte aire (la presencia de este indicara el fin de la etapa de absorción) además se finaliza la inyección de la muestra con 1mL de buffer A1
- Lavado de columna: Se lavó con buffer A1 a un flujo de 5mL/min con 150mL

- Primera elución: Se eluyó con el buffer B1, con una elución isocrática, y se recolectó en tubos de 3ml, a un flujo de 1mL/min.
- Segunda elución: Se eluyó nuevamente isocráticamente con buffer B1 y se recolectó en tubos de 3ml, a un flujo de 0,2mL/min.
- Tercera elución: Se eluyó nuevamente isocráticamente con buffer B1 y se recolectó en tubos de 3ml, a un flujo de 2mL/min.
- Equilibración de la columna: Se equilibró con buffer A1 a un flujo de 5mL/min con 30mL.

3.3.11 Purificación de exclusión de tamaño

Se realizó la purificación por exclusión de tamaño con una columna HiLoad26/600 Superdex 75pg (CV=318,557). Se utilizó un flujo de 1,5mL/min en el sistema. Se activó dos señales UV, 280nm para detectar la proteína y 214nm. Se realizó las siguientes fases, hacer Equilibración: Con 320mL totales con el buffer A1 a un flujo de 1,5mL/min. Aplicación de la muestra: Se pompeo un loop de 15 mL para inyectar la muestra a un flujo de 1,5mL/min, y se vació el loop con un lavado de 20mL con buffer SEC:

Primera elución: Se eluyó con el buffer A2, con una elución isocrática, y se recolectó en tubos de 3ml, a un flujo de 1,5mL/min con 220mL, se empezó a recolectar la fracción a partir de 120mL Segunda elución: Se eluyó con el buffer A2, con una elución isocrática, y se recolectó en tubos de 3ml, a un flujo de 1,5mL/min con 80mL.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados

Se logró insertar el plásmido Endo H y PNGase en la bacteria E. Coli, esto se ha podido evidenciar en las imágenes 21 a la 24.

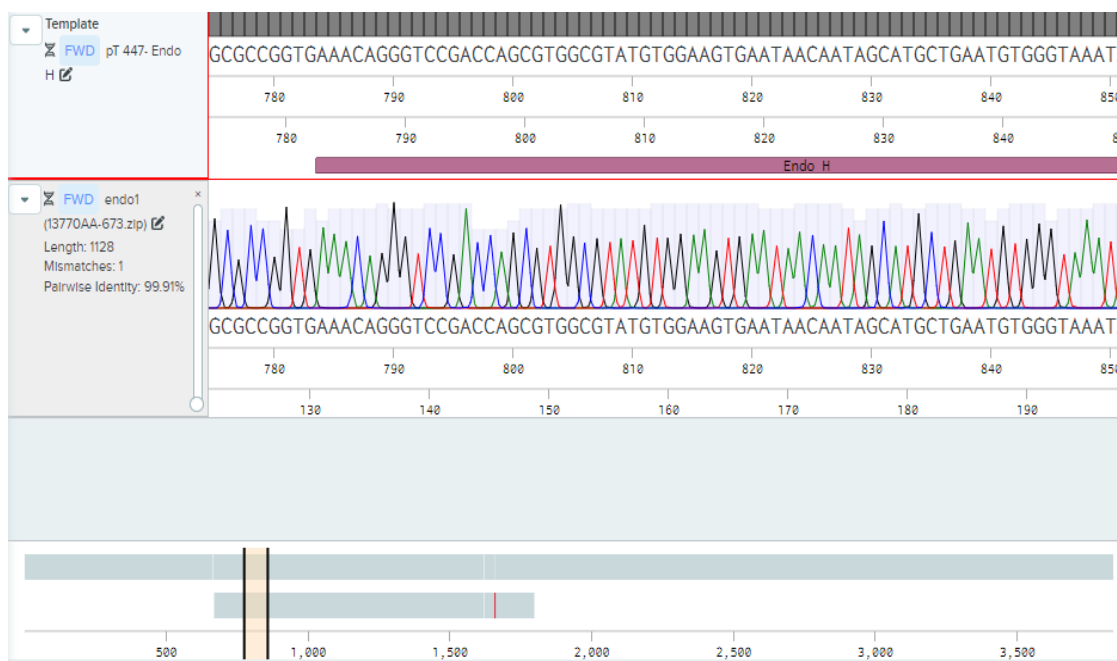


Figura 21:

Alineación del plásmido base Endo H con los resultados obtenidos en la Secuenciación con programa Benchling

En la figura 21 se puede observar el programa Benchling con “Template” de plásmido Endo H y su alineación con el resultado del ADN obtenido en la transformación y purificación del mismo, la secuencia enviada se ve perfectamente alineada (no hay líneas rojas que indicarían desconcordancia) con el plasmido base, también se observa el cromatograma de la secuenciación.

EndoH Result	CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA -----	60 0
EndoH Result	CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTTCTCG -----	120 0
EndoH Result	CCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT -----	180 0
EndoH Result	TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG -----	240 0
EndoH Result	GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA -----	300 0
EndoH Result	GTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT -----	360 0
EndoH Result	TATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT -----	420 0
EndoH Result	TTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTGCGCCATTCAGGCTGCG -----	480 0
EndoH Result	CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG -----	540 0
EndoH Result	GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG -----	600 0
EndoH Result	TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCA -----	660 0
EndoH Result	CCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAGACGGCAATTGCGA -----CGCTCTAGAAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAGACGGCAATTGCGA *****	720 47

EndoH Result	TCGCAGTCGCCCTGGCGGGCTTCGCGACGGTGGCCCAAGCGGAATTCGCGCCGGCGCCGG TCGCAGTCGCCCTGGCGGGCTTCGCGACGGTGGCCCAAGCGGAATTCGCGCCGGCGCCGG *****	780 107
EndoH Result	TGAAACAGGGTCCGACCAGCGTGGCGTATGTGGAAGTGAATAACAATAGCATGCTGAATG TGAAACAGGGTCCGACCAGCGTGGCGTATGTGGAAGTGAATAACAATAGCATGCTGAATG *****	840 167
EndoH Result	TGGGTAAATATACCCTGGCGGATGGCGGTGGCAATGCGTTTGATGTGGCGTTATCTTTG TGGGTAAATATACCCTGGCGGATGGCGGTGGCAATGCGTTTGATGTGGCGTTATCTTTG *****	900 227
EndoH Result	CCGCGAATATCAATTATGATACCGGCACCAAAACCGCCTATCTGCATTTTAAATGAAAATG CCGCGAATATCAATTATGATACCGGCACCAAAACCGCCTATCTGCATTTTAAATGAAAATG *****	960 287
EndoH Result	TGCAGCGCGTGCTGGATAACGCGGTTACCCAGATTGCGCCGCTGCAGCAGCAGGGCATT TGCAGCGCGTGCTGGATAACGCGGTTACCCAGATTGCGCCGCTGCAGCAGCAGGGCATT *****	1020 347
EndoH Result	AAGTGCTGCTGAGCGTGCTGGGCAACCATCAGGGCGCCGGCTTTGCGAATTTTCCGAGCC AAGTGCTGCTGAGCGTGCTGGGCAACCATCAGGGCGCCGGCTTTGCGAATTTTCCGAGCC *****	1080 407
EndoH Result	AGCAGGCCGCGAGCGCGTTTGCCAAACAGCTGAGCGATGCCGTTGCGAAATATGGTCTGG AGCAGGCCGCGAGCGCGTTTGCCAAACAGCTGAGCGATGCCGTTGCGAAATATGGTCTGG *****	1140 467
EndoH Result	ATGGTGTTGATTTTGATGATGAATATGCGGAATATGGTAATAACGGCACCGCCAGCCGA ATGGTGTTGATTTTGATGATGAATATGCGGAATATGGTAATAACGGCACCGCCAGCCGA *****	1200 527
EndoH Result	ATGATAGCAGCTTTGTGCATCTGGTTACCGCCCTGCGTGCGAATATGCCGATAAAATTA ATGATAGCAGCTTTGTGCATCTGGTTACCGCCCTGCGTGCGAATATGCCGATAAAATTA *****	1260 587
EndoH Result	TCAGCCTGTATAATATTGGCCCGGCGGCGAGCCGCTCTGAGCTATGGTGGCGTTGATGTGA TCAGCCTGTATAATATTGGCCCGGCGGCGAGCCGCTCTGAGCTATGGTGGCGTTGATGTGA *****	1320 647
EndoH Result	GCGATAAATTTGATTATGCCTGGAACCCGTATTATGGCACCTGGCAGGTGCCGGGCATTG GCGATAAATTTGATTATGCCTGGAACCCGTATTATGGCACCTGGCAGGTGCCGGGCATTG *****	1380 707
EndoH Result	CGTGCCGAAAGCGCAGCTGAGCCCGGCGGCGGTTGAAATTGGTCGCACCAGCCGTAGCA CGTGCCGAAAGCGCAGCTGAGCCCGGCGGCGGTTGAAATTGGTCGCACCAGCCGTAGCA *****	1440 767
EndoH Result	CCGTGGCCGATCTGGCGCGTCGCACCGTTGATGAAGGCTATGGCGTGATCTGACCTATA CCGTGGCCGATCTGGCGCGTCGCACCGTTGATGAAGGCTATGGCGTGATCTGACCTATA *****	1500 827
EndoH Result	ACCTGGATGGTGGCGATCGCACCGCGGATGTTAGCGCCTTTACCCGCGAACTGTATGGCA ACCTGGATGGTGGCGATCGCACCGCGGATGTTAGCGCCTTTACCCGCGAACTGTATGGCA *****	1560 887

EndoH	GCGAAGCGGTGCGCACCCCGGGATCCCACCACCATCATCATCACCATCATTAACTCGAGG	1620
Result	GCGAAGCGGTGCGCACCCCGGGATCCCACCACCATCATCATCACCATCATTAACTCGA-G *****	946
EndoH	GGGGGCCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAA	1680
Result	GGGGGCCCCGGTACCCAGCTTTTGT----- ***** ** * ** *** *	971
EndoH	TCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA	1740
Result	-----	971
EndoH	CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA	1800
Result	-----	971
EndoH	ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA	1860
Result	-----	971
EndoH	TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCG	1920
Result	-----	971
EndoH	CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAG	1980
Result	-----	971
EndoH	GCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA	2040
Result	-----	971
EndoH	GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC	2100
Result	-----	971
EndoH	CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA	2160
Result	-----	971
EndoH	GGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG	2220
Result	-----	971
EndoH	ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCT	2280
Result	-----	971
EndoH	CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT	2340
Result	-----	971
EndoH	GTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG	2400
Result	-----	971

EndoH Result	TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC -----	2460 971
EndoH Result	AGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC -----	2520 971
EndoH Result	ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA -----	2580 971
EndoH Result	GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTC -----	2640 971
EndoH Result	AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG -----	2700 971
EndoH Result	GGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA -----	2760 971
EndoH Result	AAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGT -----	2820 971
EndoH Result	ATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCA -----	2880 971
EndoH Result	GCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG -----	2940 971
EndoH Result	ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA -----	3000 971
EndoH Result	CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT -----	3060 971
EndoH Result	CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGT -----	3120 971
EndoH Result	AGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGCTCA -----	3180 971
EndoH Result	CGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA -----	3240 971

EndoH Result	TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGA -----	3300 971
EndoH Result	AGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT -----	3360 971
EndoH Result	GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA -----	3420 971
EndoH Result	GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG -----	3480 971
EndoH Result	CCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTC -----	3540 971
EndoH Result	TCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA -----	3600 971
EndoH Result	TCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAT -----	3660 971
EndoH Result	GCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTT -----	3720 971
EndoH Result	CAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT -----	3780 971
EndoH Result	ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC -----	3835 971

Figura 22
Resultado de la Endo H en formato Fasta

En la Figura 22 se puede observar el formato fasta de tanto el Endo H base como el resultado que se mandó a secuenciar.

El inserto empieza en la base 699 con la señal OmpA y termina junto con la etiqueta de Histidina termina en 1610. El segmento tiene una longitud de 912 pares de bases, ya que la clonación no fue realizada por mi persona, sólo se sabe que esta fue realizada en la zona multiclonadora (MCS) del vector. Y al momento que se envió a secuenciar a LGB Genomics Berlin, se tomó el primer T7 promotor (5mM) forward para la secuenciación del segmento, el cuál empieza en el par de base 626, y termina en 644, donde luego se aprecia el inicio de la secuenciación recibida.

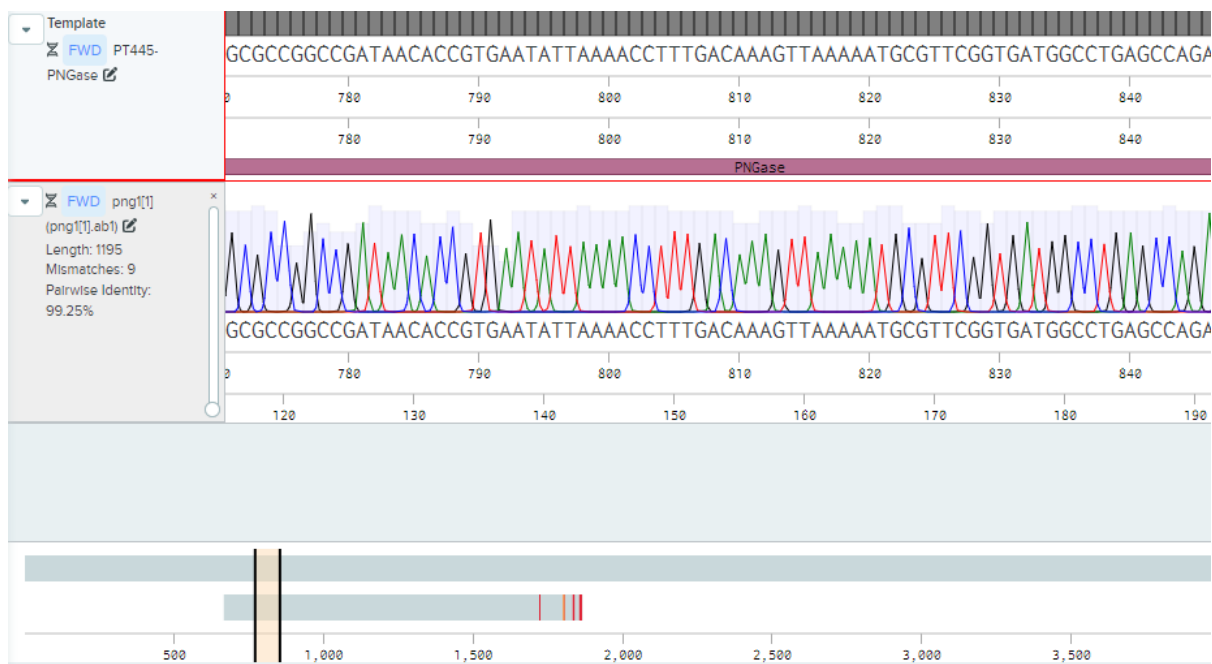


Figura 23:

Alineación del plásmido base PNGase H con los resultados obtenidos en la secuenciación con programa Benchling

En la figura 23 se puede observar el programa Benchling con “Template” de plásmido PNGase y su alineación con el resultado del ADN “png1” obtenido en la transformación y purificación del mismo, la secuencia enviada se ve perfectamente alineada, en la parte final, después de la etiqueta de Histidina se pueden observar algunas líneas rojas de desalineación, pero esto se le puede atribuir a la misma secuenciación por Sanger, ya que al exceder el tamaño de secuenciación para analizar de 1000 pares de bases, el cromatograma y la secuenciación al final no sean muy exactos, pero lo importante es que hasta la etiqueta de Histidina salió limpia la alineación.

PNGaseF Result	CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA -----	60 0
PNGaseF Result	CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCG -----	120 0
PNGaseF Result	CCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGAT -----	180 0
PNGaseF Result	TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG -----	240 0
PNGaseF Result	GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA -----	300 0
PNGaseF Result	GTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT -----	360 0
PNGaseF Result	TATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT -----	420 0
PNGaseF Result	TTAACGCGAATTTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTCCATTGCGCATTGAGGCTGCG -----	480 0
PNGaseF Result	CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG -----	540 0
PNGaseF Result	GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG -----	600 0
PNGaseF Result	TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCA -----	660 0
PNGaseF Result	CCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAGACGGCAATTGCGA -----GATATACCATGAAAAAGACGGCAATTGCGA *****	720 30
PNGaseF Result	TCGCAGTGCGCCTGGCGGGCTTCGCGACGGTGGCCCAAGCGGAATTCATGGCGCCGGCCG TCGCAGTGCGCCTGGCGGGCTTCGCGACGGTGGCCCAAGCGGAATTCATGGCGCCGGCCG *****	780 90
PNGaseF Result	ATAACACCGTGAATATTAACACCTTTGACAAAGTTAAAAATGCGTTGCGTGATGGCCTGA ATAACACCGTGAATATTAACACCTTTGACAAAGTTAAAAATGCGTTGCGTGATGGCCTGA *****	840 150
PNGaseF Result	GCCAGAGCGCCGAAGGCACCTTCACCTTCCCGGCGGACGTTACCACGGTTAAAACCATTA GCCAGAGCGCCGAAGGCACCTTCACCTTCCCGGCGGACGTTACCACGGTTAAAACCATTA *****	900 210
PNGaseF Result	AAATGTTTATTAAGAACGAATGCCCGAATAAACGTGTGATGAGTGGGACCGCTATGCCA AAATGTTTATTAAGAACGAATGCCCGAATAAACGTGTGATGAGTGGGACCGCTATGCCA *****	960 270

PNGaseF Result	ACGTGTACGTCAAGAATAAAACCACCGGCGAATGGTATGAGATCGGCCGTTTTATCACGC ACGTGTACGTCAAGAATAAAACCACCGGCGAATGGTATGAGATCGGCCGTTTTATCACGC *****	1020 330
PNGaseF Result	CGTATTGGGTGGGTACCGAAAACTGCCGCGCGGCCCTGGAGATCGATGTTACGGACTTCA CGTATTGGGTGGGTACCGAAAACTGCCGCGCGGCCCTGGAGATCGATGTTACGGACTTCA *****	1080 390
PNGaseF Result	AAAGCCTGCTGAGCGGCAACACCGAACTGAAGATCTATACCGAAACCTGCCTGGCAAAAG AAAGCCTGCTGAGCGGCAACACCGAACTGAAGATCTATACCGAAACCTGCCTGGCAAAAG *****	1140 450
PNGaseF Result	GCCGCGAATATAGCGTCGATTTTGATATTGTGTACGGTACCCCGGATTACAAGTACAGCG GCCGCGAATATAGCGTCGATTTTGATATTGTGTACGGTACCCCGGATTACAAGTACAGCG *****	1200 510
PNGaseF Result	CGGTGGTTCGGGTGATCCAATACAATAAAAGCAGCATTGACGGCGTGCCGTACGGTAAAG CGGTGGTTCGGGTGATCCAATACAATAAAAGCAGCATTGACGGCGTGCCGTACGGTAAAG *****	1260 570
PNGaseF Result	CACACACGCTGGGTCTGAAAAAGAACATCCAGCTGCCGACCAACACCGAAAAAGCCTATC CACACACGCTGGGTCTGAAAAAGAACATCCAGCTGCCGACCAACACCGAAAAAGCCTATC *****	1320 630
PNGaseF Result	TGCGTACCACGATCAGCGGCTGGGGTCATGCCAAACCGTATGATGCAGGCAGCCGCGGTT TGCGTACCACGATCAGCGGCTGGGGTCATGCCAAACCGTATGATGCAGGCAGCCGCGGTT *****	1380 690
PNGaseF Result	GCGCGGAATGGTGTTCCTGACCCACACCATCGCAATTAATAATGCGAACACGTTCCAGC GCGCGGAATGGTGTTCCTGACCCACACCATCGCAATTAATAATGCGAACACGTTCCAGC *****	1440 750
PNGaseF Result	ATCAGCTGGGTGCCCTGGGCTGCAGCGCAAACCCGATTAACAATCAAAGCCCAGGCAATT ATCAGCTGGGTGCCCTGGGCTGCAGCGCAAACCCGATTAACAATCAAAGCCCAGGCAATT *****	1500 810
PNGaseF Result	GGGCACCGGATCGCGCGGGCTGGTGTCCGGGTATGGCCGTGCCGACCCGTATTGATGTTT GGGCACCGGATCGCGCGGGCTGGTGTCCGGGTATGGCCGTGCCGACCCGTATTGATGTTT *****	1560 870
PNGaseF Result	TGAATAACAGCCTGACGGGTAGCACGTTTAGCTATGAATACAAATTTAGAGCTGGACCA TGAATAACAGCCTGACGGGTAGCACGTTTAGCTATGAATACAAATTTAGAGCTGGACCA *****	1620 930
PNGaseF Result	ACAACGGCACCAATGGTGACGCCTTTTATGCCATCAGCAGCTTTGTATTGCCAAAAGCA ACAACGGCACCAATGGTGACGCCTTTTATGCCATCAGCAGCTTTGTATTGCCAAAAGCA *****	1680 990
PNGaseF Result	ACACCCGATTAGCGCGCCGGTGGTCACCAACGGATCCCACCACCATCATCATCACCATC ACACCCGATTAGCGCGCCGGTGGTCACCAACGGATCCCA-CACCATCATCATCACCATC *****	1740 1049
PNGaseF Result	ATTAACCTGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCG ATTAA----- *****	1800 1054
PNGaseF Result	CGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT -----	1860 1054
PNGaseF Result	CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGC -----	1920 1054

PNGaseF Result	TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC -----	1980 1054
PNGaseF Result	CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCT -----	2040 1054
PNGaseF Result	TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCA -----	2100 1054
PNGaseF Result	GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC -----	2160 1054
PNGaseF Result	ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT -----	2220 1054
PNGaseF Result	TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG -----	2280 1054
PNGaseF Result	CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC -----	2340 1054
PNGaseF Result	TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGC -----	2400 1054
PNGaseF Result	GTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCC -----	2460 1054
PNGaseF Result	AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC -----	2520 1054
PNGaseF Result	TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT -----	2580 1054
PNGaseF Result	AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT -----	2640 1054
PNGaseF Result	AACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC -----	2700 1054
PNGaseF Result	TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGT -----	2760 1054
PNGaseF Result	TTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG -----	2820 1054
PNGaseF Result	ATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTGGTC -----	2880 1054

PNGaseF Result	ATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAA -----	2940 1054
PNGaseF Result	TCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAG -----	3000 1054
PNGaseF Result	GCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTG -----	3060 1054
PNGaseF Result	TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA -----	3120 1054
PNGaseF Result	GACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG -----	3180 1054
PNGaseF Result	CGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA -----	3240 1054
PNGaseF Result	GCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC -----	3300 1054
PNGaseF Result	ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTCCCAACGATCA -----	3360 1054
PNGaseF Result	AGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCG -----	3420 1054
PNGaseF Result	ATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCAT -----	3480 1054
PNGaseF Result	AATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACC -----	3540 1054
PNGaseF Result	AAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGG -----	3600 1054
PNGaseF Result	GATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG -----	3660 1054
PNGaseF Result	GGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT -----	3720 1054
PNGaseF Result	GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA -----	3780 1054
PNGaseF Result	GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATA -----	3840 1054

PNGaseF	CTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC	3900
Result	-----	1054
PNGaseF	ATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA	3960
Result	-----	1054
PNGaseF	GTGCCAC	3967
Result	-----	1054

Figura 24:

Resultado de la PNGase en formato Fasta

En la Figura 24 se puede observar el formato fasta del plásmido PNGase así como el resultado que se mandó a secuenciar. En esta imagen como en la se observa inserto empieza en la posición 699 con la señal peptídica OmpA y termina con la etiqueta de Histidina termina en 1742. En este plásmido, así como el previamente visto en “Endo H” no se realizó la clonación personalmente, pero se sabe que fue PNGase insertada en el sitio MCS del vector pBluescript KS. Y así mismo fue secuenciada con el primer 5mM T7 promoter forward, para ser enviado a LGC Genomics Berlin para su secuenciación

El teoría se podría considerar como primer resultado positivo en la primera transformación de los plásmidos a las células E. Coli, al observar colonias en los platos de Agar LB suplementado con ampicilina, este paso es indispensable para continuar con los pasos siguientes.

Se observó varias colonias, ya que, al ser prácticamente un plásmido limpio y puro, la formación de esta fue muy favorable.

El segundo resultado se obtuvo de la correcta preparación de miniprep.

Después de la incubación de 16 horas, se preparó según las instrucciones del kit

Plasmid isolation kits, NucleoSpin® Plasmid los plásmidos.

Se prepararon 2 miniprep por cada ejemplar, y los resultados de la medición con el Nanodrop fue:

PNGse F: 320,4 ng/μL

Endo H: 452,6 ng/μL

Y por eso es que en las imagenes anteriores se pudo ver la correcta alineación e inserción del plásmido.

Al conseguir ambos resultados positivos y exactos se pudo proseguir con el siguiente paso. La transformación a células BD21DE3. Se realizó el mismo proceso de transformación de plásmido a células y se incubo por solo 12 horas a conseguir colonias separadas. El objetivo fue exactamente no tener muchas colonias, para así ser más fácil la recolección de estas. Con estos resultados se empezó ya a hacer las incubaciones a mayor escala.

Entrando a la siguiente etapa de expresión de proteínas, se obtuvo un buen pico en la purificación his taq, dando a entender la presencia de esta en la solución a purificar.

20230805 Endo H Purification His Trap FF 5 ml 004

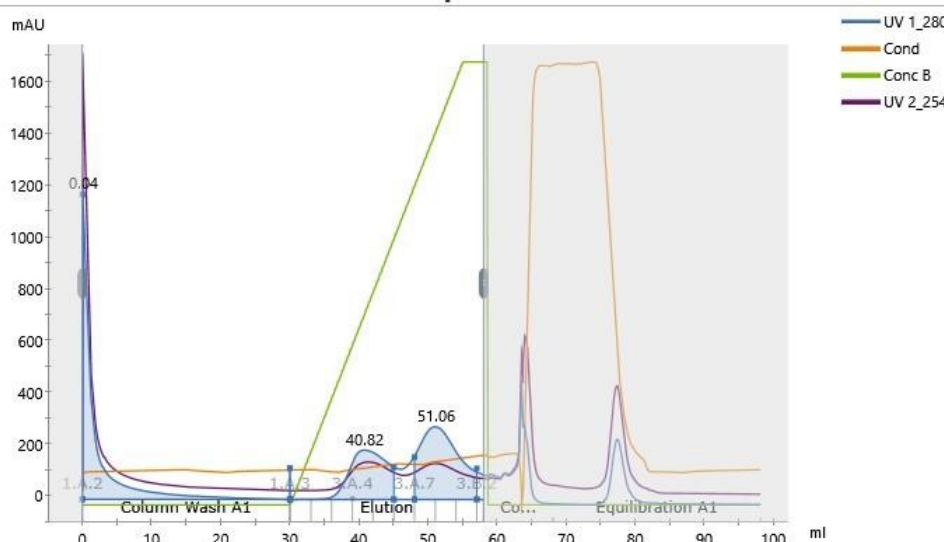


Figura 25:

Resultado de la purificación Endo H en His Taq

En la figura 25 previamente mencionada de la purificación se observó dos picos ambos con UV de 280 y con UV de 254 para detectar la proteína, ambos fueron atraídos por la columna de His Tag, por lo que se corrió un gel de poliacrilamida para saber cuál pico correspondía la proteína deseada.

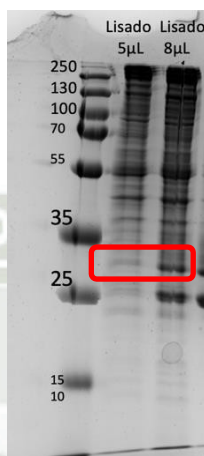


Figura 26:

Lisado Endo H en gel de poliacrilamida en detector de imágenes

En la figura 26 se puede observar un gel de poliacrilamida de 15% donde el primer carril se colocó al marcador, en el segundo el lisado 5µL y el tercero 8µL, cabe resaltar que este fué previamente diluido de la siguiente forma. Del lisado total 100mL se extrajo 20 µL y se mezcló con 5µL del buffer de carga (descrito en Anexo 4), después se cargo estas dos concentraciones para coomprarlas primeramente si la proteína estaba presente y si esta al aumentar la concentración también esta aumentaba. Para observar con claridad, los geles fueron teñidos con Coomassie blue y después llevados a un equipo detector, para darle una mejora a la precisión de los mismos y distinguir bien los componentes. En el gel mencionado, la proteína se ve clara en el tercer carril con 8µL, naturalmente esta anda acompañada de todos los demás contaminantes del mismo buffer de lisado, partes celulares, entre otros.

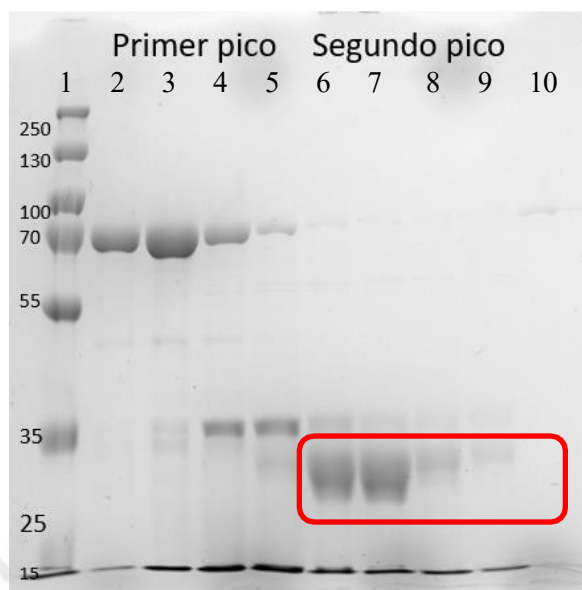


Figura 27:

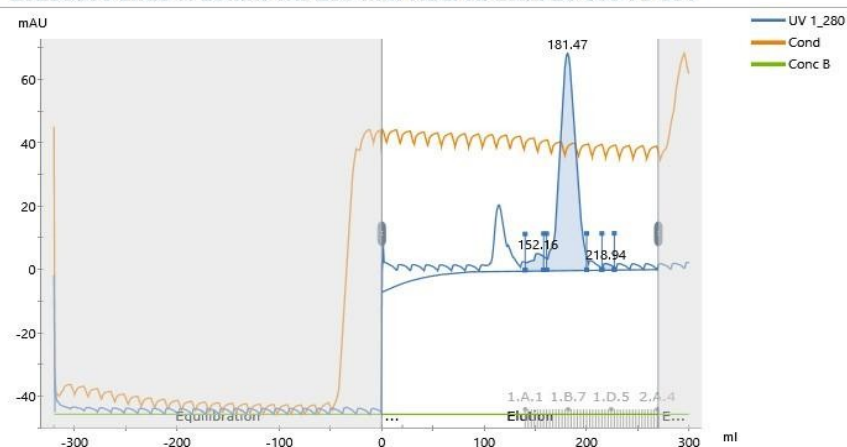
Gel purificación Endo H en His Taq con detector de imágenes

En la figura 27 se puede apreciar un gel de poliacrilamida en el que el primer carril se dispuso para el marcador de pesos protéicos y de los carriles 2 al 5 se refieren a las fracciones eluidas del primer pico, y del carril 6 al 10 se refiere a las fracciones eluidas en el segundo pico del cronograma. Todas las fracciones fueron previamente diluidas, de cada fracción original se extrajo 20 μ L y se mezcló con 5 μ L del buffer de carga (Revisar anexo 4) y se colocó 8 μ L en cada carril para correr el gel.

Para observar con claridad, los geles fueron teñidos con Coomassie blue y después llevados a un equipo detector, para darle una mejora a la precisión de los mismos y distinguir bien los componentes.

Al observar estos resultados, se dispuso a seleccionar todas las fracciones que correspondieran al segundo pico para la cromatografía de exclusión de tamaño, ya que el peso molecular de esta proteína rondaba los 29kDa.

20230806 Endo H 20mM Tris 250 mM NaCl Hi Load 26 600 75 001

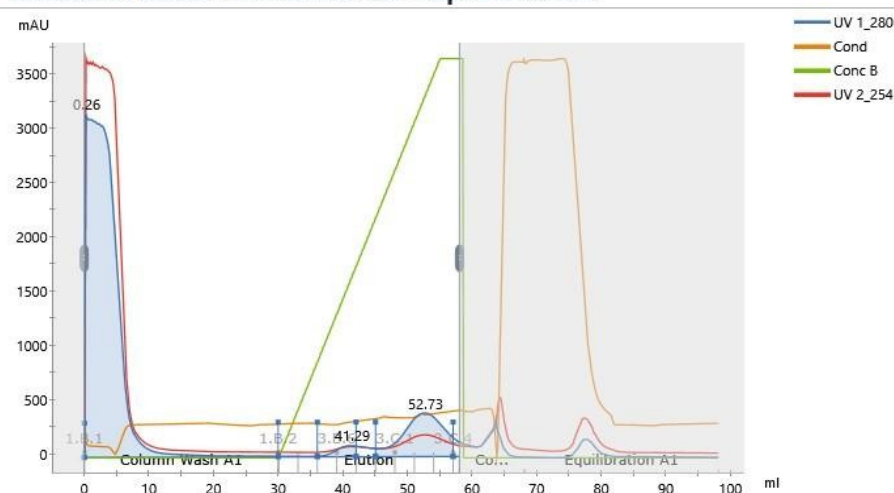

Figura 28:

Cromatografía de exclusión de tamaño para Endo H

En la figura 28, ya es posible apreciar un buen pico que indicaría a la proteína Endo H pura en el segundo pico, ya que el primero y el último son agregados o impurezas, mismas que se observaron en el gel de poliacrilamida 15%

El resultado de la purificación His Taq PNGase fue:

20230806 PNGase F Purification His Trap FF 5 ml 001


Figura 29:

Purificación PNGase en His Taq

Asimismo, se realizó la purificación de la proteína PNGase, de la misma manera que se realizó en Endo H. En la purificación se observó dos picos ambos con UV de 280 y con UV de 254 para detectar la proteína, por lo que se corrió un gel de poliacrilamida para saber cuál pico correspondía la proteína deseada.

Gel de poliacrilamida para PNGase:

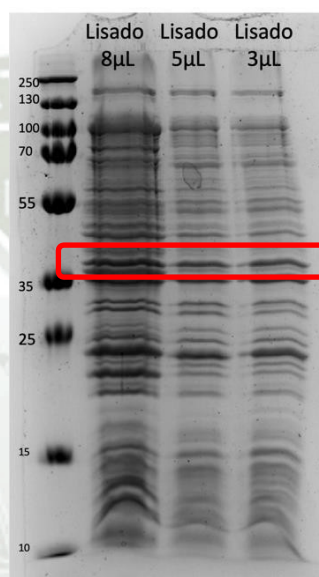


Figura 30:

Lisado PNGase en gel de poliacrilamida en detector de imágenes

En la figura 30 se puede observar un gel de poliacrilamida de 15% donde el primer carril se colocó al marcador, en el segundo el lisado 8 µL y el tercero 5 µL, y el cuarto 3 µL nuevamente, este fué previamente diluido de igual forma que el lisado de Endo H; 20 µL del lisado total se mezcló con 5 µL del buffer de carga y seguidamente se colocó estas tres concentraciones para compararlas.

Para observar con claridad, los geles fueron teñidos con Coomassie blue y después llevados a un equipo detector, para darle una mejora a la precisión de los mismos y distinguir bien los componentes.

En el gel se muestra a la proteína clara en el tercer carril con 8 µL, pero también es

visible en 5 y 3 μ L, naturalmente como era el lisado esta vino acompañada de todos los demás contaminantes del mismo buffer de lisado, partes celulares, entre otros.

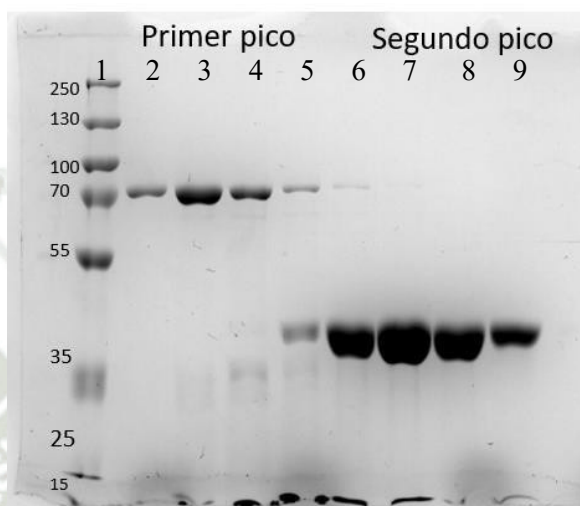


Figura 31:

Gel purificación PNGaseF en His Taq con detector de imágenes

En la figura 31 se observó los dos picos que marcaban que marcan diferentes componentes, el primer carril se dispuso para el marcador de pesos protéicos y de los carriles 2 al 5 se refieren a las fracciones eluidas del primer pico, y del carril 6 al 9 se refiere a las fracciones eluidas en el segundo pico del cronograma, de estos resultados se dispuso a seleccionar todas las fracciones que correspondieran al segundo pico para la cromatografía de exclusión de tamaño, ya que el peso molecular de esta proteína ronda los 36kDa. Nuevamente cabe mencionar que para correr cada una de las fracciones estas fueron previamente diluidas, 20 μ L del lisado total se mezcló con 5 μ L del buffer de carga y seguidamente se colocó estas tres concentraciones para compararlas. Para observar con claridad, los geles fueron teñidos con Coomassie blue y después llevados a un equipo detector, para darle una mejora a la precisión de los mismos y distinguir bien los componentes.

Resultado de la cromatografía de exclusión de tamaño:

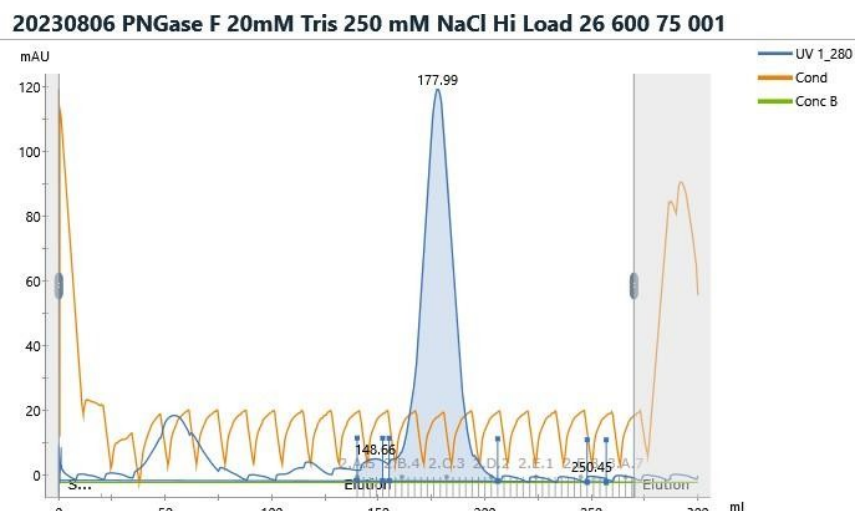
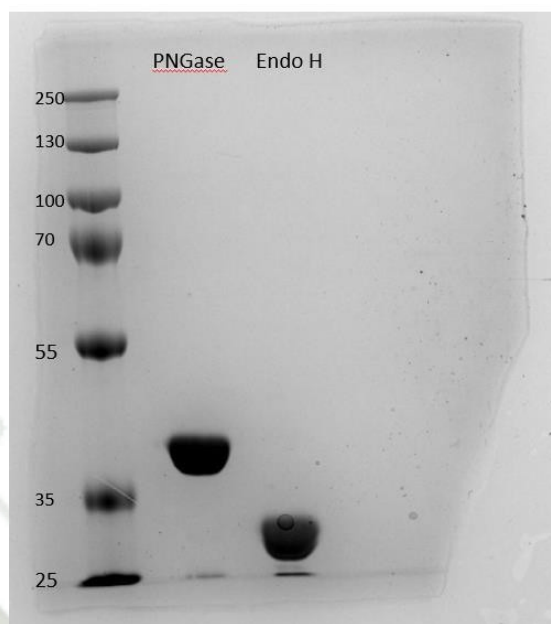


Figura 32:
Purificación PNGase en His Tag

En la figura 32, al igual que en la proteína Endo H es posible apreciar un buen pico que indicaría a la proteína PNGase F pura en el segundo pico (el más grande), ya que el primero y el ultimo son agregados o impurezas, mismas que se observaron en el gel de poliacrilamida 15%.

Al término de estas purificaciones de exclusión de tamaño, se corrió un gel más de poliacrilamida para asegurar la presencia y la pureza de la proteína.

**Figura 33:****PNGase y Endo H después de la cromatografía de exclusión de tamaño**

En la figura 28 se observó un gel de poliacrilamida al 15% donde el marcador de proteínas se encuentra en el carril 1 y en los carriles 2 y 3 las muestras correspondientes a las proteínas PNGase y EndoH, se observa así sus respectivos pesos moleculares de 36kDa y 29kDa. Este gel fue realizado de igual forma que los anteriormente mencionados.

Se pudo observar claramente que las proteínas obtenidas están intactas y no hay ningún tipo de agregados o contaminantes o agregados.

Teniendo un resultado de 6,7mg/ml de proteína PNGase y 5,4mg/ml de proteína Endo H, a las cuales se les agrego Glicerina y se guardo a -20 grados centígrados para su posterior uso.

Además, para la completa verificación se realizó un Western Blot Anti His Tag (Figura 34)

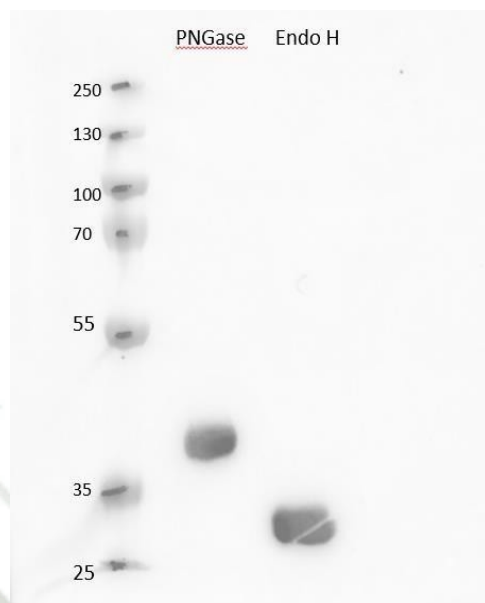


Figura 34:
Western Blot PNGase y Endo H

En el Western Blot se observó ambas reacciones en las correctas posiciones, perteneciendo a PNGase y Endo H correspondientemente. El Western Blot se realizó con primer anticuerpo Anti-His (1:10000) y de segundo anticuerpo HRP (1:10000) ambos diluidos en leche 5% y los lavados se realizó con PBST, además que la revelación se hizo con ayuda del Kit de revelación Western Blot TMB.

4.2. Discusión

A nivel teórico, los pasos necesarios para obtener una proteína recombinante son bastante sencillos. Se toma el gen de interés, se clona en cualquier vector de expresión que tenga a su disposición, se transforma en el huésped de elección, se induce y luego la proteína está lista para su purificación y caracterización. En la práctica, sin embargo, pueden salir mal decenas de cosas. El crecimiento deficiente del huésped, la formación de cuerpos de inclusión, la inactividad de las proteínas e incluso la falta de obtención de proteínas son algunos de los problemas que a menudo se encuentran en el futuro (43).

Desde la clonación se debe considerar todo tipo de promotor y señal polipéptica, en el caso de este trabajo se usó de guía tanto para la clonación como en algunos detalles para la expresión a García et al, en su trabajo de purificación de PNGase F, donde para su inserción de PNGase F en el vector se diseñó un promotor T7 basado en *Escherichia coli*, para proporcionar una fuente de alto rendimiento de enzima recombinante.

Cuando se expresó intracelularmente, la enzima se produjo en un estado en gran medida insoluble, sin embargo, cuando se expresa como una fusión con la secuencia líder de ompA gene (ATGAAAAAGACGGCAATTGCGATCGCAGTCGCCCTGGCGGGCTTCGCGACGGTGGCCCAAGCG), la PNGase F marcada con hexahistidina se procesó y exportó eficientemente al *E. coli* periplasma, es por eso que en este trabajo se repitió este procedimiento para asegurar con la señal ompA una mejor expresión, dicha señal también fue mostrada al momento de mandar la secuenciar a LGC Genomics Berlin. El mismo vector con la misma señal ompA fue utilizado en *Endo H*, obteniendo para ambos buena expresión como estaba en dicha información indicado (42).

La expresión de proteínas se llevó a cabo en células BL21 (DE3) cultivadas en cultivo con agitación a 37°C. La expresión de los promotores T7 de los plásmidos se indujo mediante la adición de IPTG 0.6 mM a los cultivos, ya que Luz Yurany Moreno recomiendo inducción a 0.5mM (45), mientras que García et al , recomienda a mayores concentraciones (1mM), ya que se esta utilizando un medio enriquecido y ademas se dejara incubar conla inducción por 18 horas (42).

La ventaja de elegir células procariotas es su crecimiento rápido como una principal ventaja, además de su fácil preparación y bajo costo. En medios de sales de glucosa y dadas las condiciones ambientales óptimas, su tiempo de duplicación es de aproximadamente 20 min.

Tambien es importante recalcar que la etiqueta elegida para ambas proteínas His Tag fue gracias al trabajo de García et al, ya que, al ser pequeñas, es menos probable que las etiquetas peptídicas interfieran cuando se fusionan con la proteína. Sin embargo, en algunos casos pueden provocar efectos negativos sobre la estructura terciaria o la actividad biológica de la proteína quimérica fusionada. En el caso de este proyecto el posicionamiento de la etiqueta en el extremo C-terminal con una cola de Histidinas, además que nos ayuda a una futura detección, ya que hay anticuerpos comerciales disponibles, la proteína recombinante marcada se puede detectar mediante transferencia Western a lo largo de las pruebas de expresión, lo cual es extremadamente útil cuando los niveles de las proteínas deseadas no son lo suficientemente altos como para ser detectados mediante SDS-PAGE,también las etiquetas permiten la purificación por afinidad en un solo paso, ya que hay disponibles resinas que unen las etiquetas de manera firme y específica. La variación que le dimos en este trabajo fue el numero de cola de Histidinas, ya que le agregamos 8 His en vez de 6His, para obtener mas afinidad a la columan al momento de la purificacion.

Por el lado del anfitrión para la correcta expresión son las cepas BL21 y BL21(DE3) altamente recomendada., por lo que en el presente trabajo se siguió esta técnica (42). Asimismo, para la lisis y extracción proteica, se tuvo que comparar muchos procesos, ya que hay varias opciones de realizarla, lisis con detergente, lisis por congelación-descongelación, choque osmótico, ultrasonidos, métodos mecánicos y digestión enzimática. La más recomendada fue choque osmótico, con alta concentración de azúcares, por MV Magliano y Garza Ramírez, pero ya que esta técnica demanda más tiempo y trabajo, se decidió probar con lisis enzimática, ya que se utilizó un buffer lisis, además con métodos mecánicos y de ultrasonidos. Para el buffer lisis fue muy importante el uso del cóctel inhibidor de proteasas a una concentración mínima de 1X para evitar la degradación proteolítica durante la lisis celular y la extracción de proteínas, ya que anteriormente se realizó este experimento sin el cóctel y se obtuvo muy bajo rendimiento con PNGase F, por lo que no se repitió el incorrecto procedimiento con Endo H (43).

20230727 5ml HisTrap PNGase 001

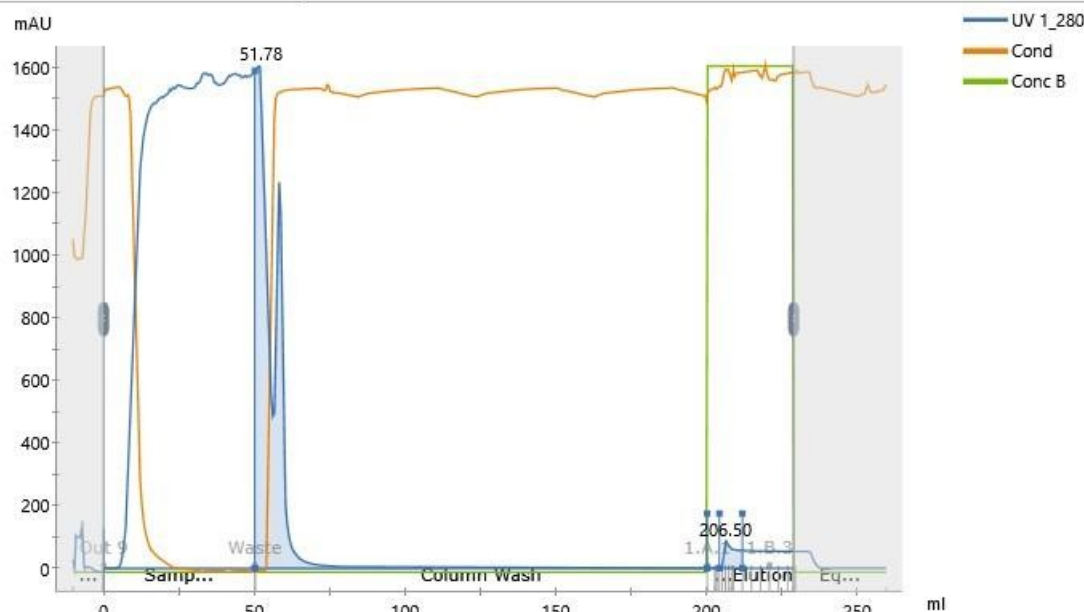


Figura 35:

Purificación His Tag con PNGase sin coctel del inhibidor de proteasas

Al recoger las células después de la centrifugación, se pudo observar un pellet de buen tamaño, por lo que tomo tiempo disolverlo y para asegurarnos de este proceso, se realizó previamente unos minutos de agitación con magnetos en el cuarto frío, para después someterlo a ultrasonificación para asegurar un lisis completa y correcta.

De forma general, la purificación de proteínas se puede dividir a partir de su forma de expresión en dos grandes grupos que determinan la estrategia a seguir: purificación de proteínas solubles e insolubles. Las proteínas recombinantes en *E. coli* pueden ser expresadas de dos formas fundamentales: secretadas al medio extracelular (solubles) o expresadas en el interior de la célula, donde pueden ser localizadas en el espacio periplasmático o en el citoplasma celular. Muchos de los polipéptidos recombinantes producidos en altos niveles en *E. coli* se localizan en el citoplasma en forma insoluble y compacta, formando cuerpos de inclusión, aunque en ocasiones puede encontrarse de forma soluble. Las extracelulares son generalmente más estables (a menudo como resultado de los puentes disulfuro) y por lo general son moléculas pequeñas (43).

En el caso de las proteínas solubles expresadas intracelularmente es necesaria la ruptura de las células que la contienen. Existen varios métodos para lograr esto, como son: ciclos de congelación/descongelación repetidos, ultrasonido, homogenización por alta presión o permeabilización con solventes orgánicos. El método a escoger dependerá de cuán frágil sea la proteína y de cuán resistente sea la célula que se requiere romper. Los contaminantes en los extractos proteicos pueden incluir una variedad de macromoléculas (ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otras proteínas) así como una serie de pequeñas moléculas. Estas últimas se pueden fácilmente separar de las proteínas por métodos basados en la talla molecular, tales como la diálisis, la ultrafiltración o la filtración en gel., este método fue utilizado para el último paso de la purificación, por la comodidad y facilidad de este (44).

En el estudio de García et al para la expresión de alto rendimiento en *Escherichia coli* y purificación de la glicoamidasa PNGasa F bacteriana, utilizaron el mismo plasmido para la expresión que el presente proyecto, pero utilizaron la técnica por Witholt, con 5% del volumen de cultivo original de sacarosa 0,5 M helada en Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 8 y adición al final de $MgCl_2$, pero dicha técnica implica mas tiempo y mas cuidados, es por lo que en el presente trabajo se optó por técnicas mecánicas o ultrasónicas, pero se debe recalcar que en ese trabajo se obtuvo un poco mas de proteína (8mg para 1L de cultivo celular bacteriano). Incluso en la investigación de Luz Yurany Moreno se menciona el uso del Cell Distroptur o Dounser como elemento de ayudar a la lisis, siempre y cuando se utilicen inhibidores de proteasas y solo 1Bar, que puede también ser una alternativa rápida y eficiente (45).

Por otro lado, en Anthony L. Tarentino, se clonó un inserto de Endo F1 en el vector plasmídico Bluescript, las células de *Escherichia coli* transformadas expresaron muy

bien la actividad Endo F1, pero la enzima aparentemente no fue procesada ni secretada en el medio como ocurre normalmente en *Flavobacterium meningosepticum*, pero a parte de que no fue exitosa, se utilizó un método muy complicado y de larga duración de Plummer and Tarentin, además de una columna SuperPac Pep-S para la purificación, lo que solo nos limita a estar seguros de que el vector continúa siendo el mismo y es recomendado tanto para Endo H como para PNGase, pero al usar esta misma técnica de Tarentino et.al, con PNGase, fue efectiva, se logró incluso cristalizar la proteína (47).

Por último, en este proyecto no se realizó ninguna actividad enzimática para ninguna de ambas proteínas, ya que para comprobar la presencia de ellas se utilizó un Western Blot, que al dar positivo, nos dio la seguridad de que el trabajo estaba correcto. Además tampoco se realizó ningún proceso para obtener proteína activa, ya que el estudio de García et al. mostró para PNGase una actividad de la enzima recombinante idéntica a la de la nativa y no se ve afectada por la etiqueta de hexahistidina u otros residuos de aminoácidos adicionales (42).

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se logró desarrollar la correcta transformación de los plásmidos de PNGase y Endo H a las líneas celulares E. Coli DH5alfa y DB21DE3, ya que para ambos plásmidos se obtuvo colonias, que, al ser mandadas a secuenciar, se alinearon perfecto con las entregadas por los organismos internacionales NCBI.

SEGUNDA: Luego del proceso de transformación, se realizó una correcta expresión de las proteínas, gracias tanto como al medio enriquecido en nutrientes como a la correcta inducción del mismo.

TERCERA: Asimismo, se logró elaborar una correcta y precisa técnica para resuspender el pellet obtenido y extraer toda la proteína, además del correcto método de purificación con His Tag y cromatografía de exclusión de tamaño.

CUARTA: Finalmente, con el objetivo de analizar y comparar los resultados, se corroboró después de la última cromatografía, en el gel de poliacrilamida la presencia de la proteína, gracias a su peso molecular y asimismo para volver a corroborar la misma, en el Western Blot, se observó las reacciones correctamente.

RECOMENDACIONES

PRIMERA: Esta investigación será beneficiosa para el sector de la industria farmacéutica y tiene fines científicos de poder usar o adaptar este protocolo a diferentes proteínas recombinantes, que actualmente ofrecen una vía rápida y eficaz para la producción de proteínas, además de ser económica y sostenible para los laboratorios, para producir más proteínas recombinantes.

SEGUNDA: Se recomienda realizar continuamente trabajos experimentales ya que hay posibilidades de aumentar el rendimiento, quizá aumentando la concentración de imidazol en el buffer de elución, o incluyendo en el buffer glicerol para proteger a la proteína, además de hacer una programación en el equipo Akta que en el momento que se eluya la proteína lo haga a un flujo más lento, para así tener proteína concentrada al final de la elución.

TERCERA: La presencia de dos picos en un primera His Tag puede ser un poco confundible, es por eso que es indispensable correr un gel de poliacrilamida con cada uno de los pasos a los que está expuesta la proteína, así sí en algún momento se pierde, seamos capaces de rastrearla y ver en que procedimiento se perdió.

CUARTA: Se recomienda también en estudios posteriores hacer un análisis enzimático, y comparar con que otros parámetros o variables se puede obtener enzimas más activa, ya que hay que tener en cuenta que nuestra proteína, es también una enzima y estas son más sensibles a diferentes cambios tanto en el ambiente como en la conservación.

QUINTA: Según la bibliografía consultada, hay otras formas de hacer lisis tanto química como en procesos físicos, hay estudios que recomiendan un equipo Douser o un cell distrupor, también podría ser parte de futuros estudios, comparar los resultados de ambas técnicas.

SEXTO: El éxito del proyecto se debe a también un anterior intento que no se utilizó inhibidor de proteasa y no se realizó la correcta destrucción celular, confirmando la importancia de diferentes sustancias y materiales para poder realizar una correcta reconstitución del pellet y lisis del mismo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Desai, P. N., Shrivastava, N., & Padh, H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: 85 Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 28(4), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.00>
2. Schillberg, S., Raven, N., Spiegel, H., Rasche, S., & Buntru, M. 2019. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. *Frontiers in Plant Science*, 10(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>
3. Burnett, M. J., Burnett, A. C., & Angela Burnett, C. C. 2020. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities Societal Impact Statement CRISPR/Cas9, genetic engineering, plant expression systems, protein, recombinant, therapeutic. 2, 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
4. Medlineplus. ¿Qué son las proteínas y qué es lo que hacen? 2020. [Medlineplus.gov](https://medlineplus.gov). Recuperado el 12 de agosto de 2023, de <https://medlineplus.gov/spanish/genetica/entender/comofuncionangen es/proteina/>
5. Enciclopedia de biología. Enzimas. 2019, octubre 22. Enciclopedia de Biología. <https://enciclopedia de biologia.com/enzimas/>
6. Biolabs NE. Endo H | NEB [Internet]. www.neb.com. [cited 2022 Aug 12]. Available from: <https://www.neb.com/products/p0702-endo-h#Product%20Information>
7. Bank RCSB. 3d view: 1edt. crystal structure of endo- beta-n-acetylglucosaminidase h at 19 angstroms resolution: active site geometry and substrate recognition [internet]. [cited 2023 aug 12]; available from: <https://www.rcsb.org/3d-view/1edt>
8. Biolabs NE. PNGase F | NEB [Internet]. www.neb.com. [cited 2023 Aug 12]. Available from: <https://www.neb.com/products/p0704-pngase-f#Product%20Information>
9. Bank RPD. 3d view: 1pgs. the three-dimensional structure of pngase f, a glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum* [internet]. [cited 2023 aug 12]; available from: <https://www.rcsb.org/3d-view/1PGS>
10. Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA [Internet].. [cited 2023 Aug 13]. Available from: <https://www.mn-net.com/de/nucleospin-plasmid-mini-kit-for-plasmid-dna-740588.50>

11. BioExplorer. Recombinant Proteins Definition | History, Methods & Applications [Internet]. Bio Explorer. 2017. Available from: <https://www.bioexplorer.net/recombinant-proteins.html/>
12. BIOINNOVA Expresión génica | [Internet]. 2017 [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/expresion-genica/#:~:text=La%20expresi%C3%B3n%20g%C3%A9nica%20es%20el%20proceso%20que%20permite>
13. Rehm H. Protein Biochemistry and Proteomics. Elsevier; 2006.
14. Promega. Endoglycosidase H [Internet]. www.promega.com. [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://www.promega.de/products/mass-spectrometry/glycosidases/endoglycosidase-h/?catNum=V4871>
15. Promega. PNGase F [Internet]. www.promega.com. [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://www.promega.de/products/mass-spectrometry/glycosidases/pngase-f/?catNum=V4831>
16. Wand - Purificación de proteínas [Internet]. Wikiwand. [cited 2023 Aug 18]. Available from: https://www.wikiwand.com/es/Purificaci%C3%B3n_de_prote%C3%ADnas
17. Bio-Rad. His-Tag Purification | Chromatography Media, Columns & Kits | Bio-Rad [Internet]. Bio-rad.com. 2019. Available from: <https://www.bio-rad.com/featured/en/his-tag-purification.html>
18. Cromatografía his tag [Internet]. Bing. [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://www.bing.com/search?q=cromatografia+his+tag&cvid=0b0a8c50c0f74e8488d4a2409c687bc3&aqs=edge..69i57.13023j0j4&FORM=ANAB01&PC=U531>
19. Libretexts Técnicas de Fraccionamiento y Cromatografía [Internet]. LibreTexts Español. 2022 [cited 2023 Aug 18]. Available from: [https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bioqu%C3%ADmica/Libro%3A_Bioqu%C3%ADmica_Gratis_Para_Todos_\(Ahern%2C_Rajagopal_y_Tan\)/08%3A_T%C3%A9nicas_de_Fraccionamiento_y_Cromatograf%C3%ADa](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Bioqu%C3%ADmica/Libro%3A_Bioqu%C3%ADmica_Gratis_Para_Todos_(Ahern%2C_Rajagopal_y_Tan)/08%3A_T%C3%A9nicas_de_Fraccionamiento_y_Cromatograf%C3%ADa)
20. His-tag production and purification| Abcam [Internet]. www.abcam.com. [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://www.abcam.com/content/his-tag-protein-production-and-purification#:~:text=Purification%20of%20His-Tag%20proteins%20is%20by%20single%20step>

21. Öberg K, Andersson L, Lundqvist J, Anderson L, Stålbrand H. Effect of flow rate, molecular weight of (His) 6 -tagged proteins, and expression system on the performance of HisTrap HP columns [Internet]. [cited 2023 Aug 18]. Available from: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=4c5c8fa1050963bfe933d0cb053f1ac7ecfeab3a>
22. Amaranto, Marilla Desarrollo de sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes de interés industrial © 2022 licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International 14348 tesis 2022 amaranto marilla con licencia CC.pdf (unc.edu.ar)
23. González A, Fillat M. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes EN Escherichia coli* [Internet]. 2018. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>
24. Álvarez V, Alexander Arias N. Las bacterias como sistema de expresión de proteínas heterólogas terapéuticas: una revisión bibliográfica. Hechos Microbiologicos [Internet]. 2014 Nov 19 [cited 2023 Aug 22];4(2):106–16. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/21092>
25. Macauley S. Title of Thesis: Expression of recombinant proteins in the methane-producing archaeon methanosarcina acetivorans. [Internet]. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://api.drum.lib.umd.edu/server/api/core/bitstreams/cdbd9bbe-670b-4d00-a51c-94eb61df1fd4/content>
26. Curioso E. ADN recombinante: Definición y ejemplos [Internet]. El Gen Curioso. Available from: <https://www.elgencurioso.com/diccionario/adn-recombinante/>
27. GoldBio. Introducción a Células Competentes | [Internet]. goldbio.com. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://goldbio.com/articles/article/Introduccion-Celulas-Competentes#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20son%20las%20c%C3%A9lulas%20competentes%3F%20La%20competencia%20celular>
28. Thermofisher. 1.DH5α Competent Cells [Internet]. Thermofisher.com. 2023 [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EC0112#:~:text=Thermo%20Scientific%20DH5%CE%B1%20Competent%20Cells%20are%20high%20efficiency%2C>
29. New England Biolabs. Transformation | NEB [Internet]. Neb.com. 2019. Available from: <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/transformation>

30. ComBase. Crecimiento bacteriano. Modelos predictivos de ComBase [Internet]. seguridadcalidadalimentaria.usal.es. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://seguridadcalidadalimentaria.usal.es/demos/FactoresCrecimiento/FactoresCrecimiento.php?rst=820620de1201e78b838a87dc344212f27ca17ec5>
31. Berkele. Plasmid miniprep – QB3 Berkeley [Internet]. qb3.berkeley.edu. Available from: <https://qb3.berkeley.edu/education/lab-fundamentals-bootcamp/manual/cloning/miniprep/#:~:text=A%20miniprep%20is%20a%20technique%20that%20allows%20us>
32. Cultivo de bacterias. [Internet]. microbiologynote.com. 2022 [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://microbiologynote.com/es/cultivo-de-bacterias/#:~:text=Prop%C3%B3sito%20del%20cultivo%20bacteriano%201%20El%20aislamiento%20de>
33. Beel, C. E., & Lewis, M. (2000, March 7). A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature Structural & Molecular Biology*, 209-214. doi:10.1038/73317.
34. Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R., & Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep33037>.
35. Protein Affinity Chromatography [Internet]. IBA Lifesciences. Available from: <https://www.iba-lifesciences.com/applications/protein-affinity-chromatography/>
36. Manning, M. & Colón, W. (2004): Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. In: *Biochemistry*. Bd. 43, S. 11248-11254. PMID 15366934
37. Chemie. SDS-PAGE [Internet]. www.chemie.de. [cited 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.chemie.de/lexikon/SDS-PAGE.html>
38. Yang PC, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012;4(9):429.
39. Ambientech. ¿Qué es la lisis celular? - Glosario de ciencias |. (2020, 10 junio). Ambientech: Ciencias, Salud y Medio ambiente. Educación Secundaria. <https://ambientech.org/lisis>
40. Fitzpatrick Martin, Universidad de Birmingham, Reino Unido. 5x Western blot loading buffer — The Open Lab Book v1.0 [Internet]. Readthedocs.io. [citado el 27 de

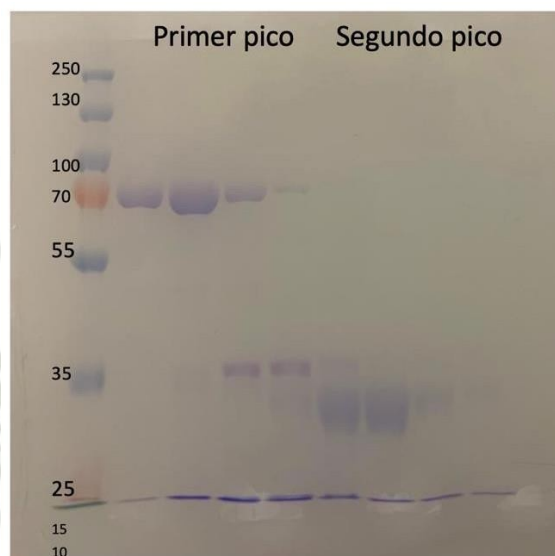
- septiembre de 2023]. Disponible en: <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/buffers/5x-western-blot-loading-buffer.html>
41. Bio-rad. Acrylamide and bisacrylamide are neurotoxins when in solution. Avoid direct contact with the solutions and clean up spills. For casting multiple gels, use the Mini-PROTEAN 3 Multi-Casting Chamber (catalog #165-4110), PROTEAN II xi Multi-Gel Casting Chamber (catalog #165-2025), or PROTEAN Plus Multi-Casting Chamber (catalog #165-4160). Use only high-quality reagents, especially acrylamide monomers, to avoid polymerization problems [Internet]. Bio-rad.com. [citado el 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6201.pdf
 42. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, et al. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli. Vaccimonitor [Internet]. 2013 [citado el 4 de octubre de 2023];22(2):30–9. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2013000200006&script=sci_arttext
 43. Gómez R, Madrazo J, González L, Chinae G, Musacchio A, Rodríguez A, et al. Caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante P64k de Neisseria meningitidis. Biotecnología Aplicada 1999;16(2):83-7.
 44. Studier, FW, Rosenberg, AH, Dunn, JJ y Dubendorff, J. W. (1990) Uso de la polimerasa T7 para dirigir la expresión de genes clonados. Métodos Enzimol.185,60–89
 45. Moreno LY, Carlos A, Acosta O. Expresión y purificación de las proteínas estructurales VP5* y VP8* de rotavirus en bacterias E. coli BL21(DE3) [Internet]. Org.co. [citado el 4 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a9.pdf>
 46. Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, HV y Leij, LD (1976) Un procedimiento eficiente y reproducible para la formación de esferoplastos a partir de cultivos diversos Escherichia coli. Anal. Bioquímica.74,160–170
 47. Anthony L. Tarentino. Multiple Endoglycosidase (Endo) F Activities Expressed by *Flavobacterium meningosepticum*. 2020.

ANEXOS

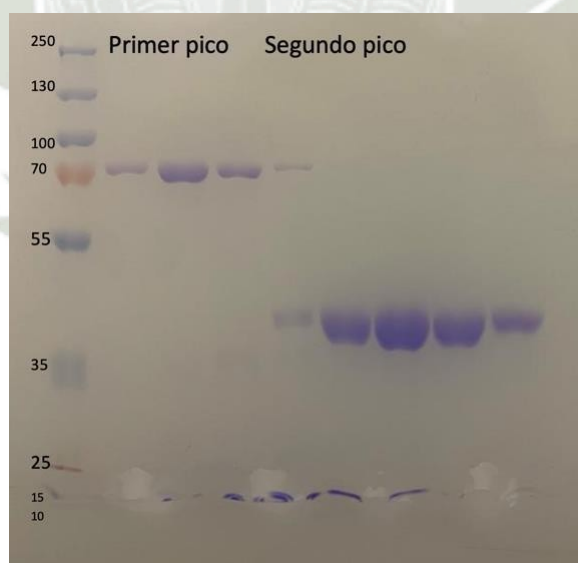
ANEXO 1:

GELES ORIGINALES

Gel purificación Endo H en His Taq (Coomassie blue)



Gel purificación PNGaseF en His Taq (Coomassie blue)



ANEXO 2:

PROGRAMA DE PURIFICACIÓN EN EL AKTA PURE EN HIS TRAPFASES DEL MÉTODO: FASES DEL MÉTODO CROMATOGRAFÍA HIS TRAP



Configuración el método His Trap

Method Settings ?

Column selection

Show by technique Affinity

Column type HisTrap FF, 5 ml

☒ Show only suggested columns Column Properties...

Column volume 5.027 ml

Pressure limit pre-column 0.50 MPa [0.02 - 20.00]

☒ Pressure limit delta-column 0.30 MPa [0.02 - 20.00]

☒ Use flow restrictor

Column position 3

Flow rate 5.000 ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Control the flow to avoid overpressure

Inlet A A1

Inlet B B1

Result Name & Location...

Start Protocol...

Method Notes...

Unit selection

Method Base Unit Volume

Flow Rate Unit ml/min

Monitor settings

UV variable wavelengths

UV 1 280 [190 - 700] nm

☒ UV 2 254 [190 - 700] nm

☐ UV 3 214 [190 - 700] nm

Note! UV monitors with fixed wavelength are not presented in this view

☒ Enable pH monitoring

Enable air sensor alarm

☒ Inlet A

☒ Inlet B

☐ Sample inlet

Column Logbook

Enable logging of

☐ Column Performance Test

☒ CIP

Fases del método

Equilibración

Equilibration ?

☒ Reset UV monitor (recommended if the equilibration occurs before the purification).

☒ Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate 5.000 ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Use the same inlets as in Method Settings

Inlet A A1

Inlet B B1 0.0 % B [0.0 - 100.0]

☒ Fill the system with the selected buffer

Equilibrate until

☒ the total volume is 10.00 ml

Introducción de la muestra

Sample Application ?

☐ Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.000 - 50.000]

☐ Inject sample from loop

☒ Inject sample directly onto column

Sample inlet

☐ Inject fixed sample volume ml

☒ Inject all sample using air sensor

☐ Set maximum volume to ml

☒ Finalize sample injection ml

Note! Buffer inlet on Sample Inlet valve will be used to finalize sample injection

☒ Wash sample flow path with buffer

☐ Prime sample inlet with ml

☒ Wash sample flow path with buffer after sample application

Note! Buffer inlet on Sample Inlet valve will be used to wash the sample flow path

Lavado de la columna

Column Wash ?

☐ Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Use the same inlets as in Method Settings

Inlet A

Inlet B % B [0.0 - 100.0]

☐ Fill the system with the selected buffer

Wash until

☒ the total volume is ml

☐ the following condition is met

UV less than mAU [-6000.0 - 6000.0]

Stability time min [0.02 - 1000.00]

Accepted UV fluctuation mAU [0.00 - 6000.00]

Maximum wash volume ml [0.00 - 999999.0]

Fractionate

☒ in waste (do not collect)

Fractionation settings

Fractionation type

Advanced

Primera elución

Elution ?

☐ Use the same flow rate as in Method Settings
 ☒ Use the same inlets as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]
 Inlet A
 Inlet B

☒ Up flow ⓘ

☒ Isocratic elution

Volume ml % B [0.0 - 100.0]
 ☒ Fill the system with the selected buffer

☐ Gradient elution

Start at % B [0.0 - 100.0]
 ☐ Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (ml)
1	Step with fill	100.0	20.00

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate

☐ in waste (do not collect)
 ☐ using outlet valve
 ☒ using fraction collector
 ☐ peak to loop ⓘ

Fractionation settings

Fractionation type
 Fractionation destination
 Peak fractionation destination
 Fixed fractionation volume ml [0.0 - 3.0]
 Peak fractionation volume ml [0.00 - 2.20]

☐ Start fractionation after ml (only for isocratic elution)

Segunda elución

Elution ?

☐ Use the same flow rate as in Method Settings ☒ Use the same inlets as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.000 - 25.000] Inlet A
 Inlet B

☒ Up flow 

☒ Isocratic elution

Volume ml % B [0.0 - 100.0] ☒ Fill the system with the selected buffer

☐ Gradient elution

Start at % B [0.0 - 100.0] ☐ Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (ml)
1	Step with fill	100.0	20.00

[Add Segment](#) [Delete Segment](#)

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate

☐ in waste (do not collect) ☐ using outlet valve ☒ using fraction collector



☐ peak to loop 

☐ Start fractionation after ml (only for isocratic elution)

Fractionation settings

Fractionation type [Advanced Settings...](#)

Fractionation destination [Peak Frac Settings...](#)

Peak fractionation destination

Fixed fractionation volume ml [0.0 - 3.0]

Peak fractionation volume ml [0.00 - 2.20]

Tercera elución

Elution ?

☐ Use the same flow rate as in Method Settings
Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Use the same inlets as in Method Settings
Inlet A
Inlet B

☒ Up flow 

☒ Isocratic elution
Volume ml % B [0.0 - 100.0] ☒ Fill the system with the selected buffer

☐ Gradient elution
Start at % B [0.0 - 100.0] ☐ Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (ml)
1	Step with fill	100.0	20.00

[Add Segment](#)
[Delete Segment](#)

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate

☐ in waste (do not collect)
☐ using outlet valve
☒ using fraction collector
Fraction collector

☐ peak to loop 

Fractionation settings

Fractionation type [Advanced Settings...](#)

Fractionation destination [Peak Frac Settings...](#)

Peak fractionation destination

Fixed fractionation volume ml [0.0 - 3.0]

Peak fractionation volume ml [0.00 - 2.20]

☐ Start fractionation after ml (only for isocratic elution)

Equilibración de la columna

Equilibration ?

☐ Reset UV monitor (recommended if the equilibration occurs before the purification).

☒ Use the same flow rate as in Method Settings
Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Use the same inlets as in Method Settings
Inlet A
Inlet B % B [0.0 - 100.0]

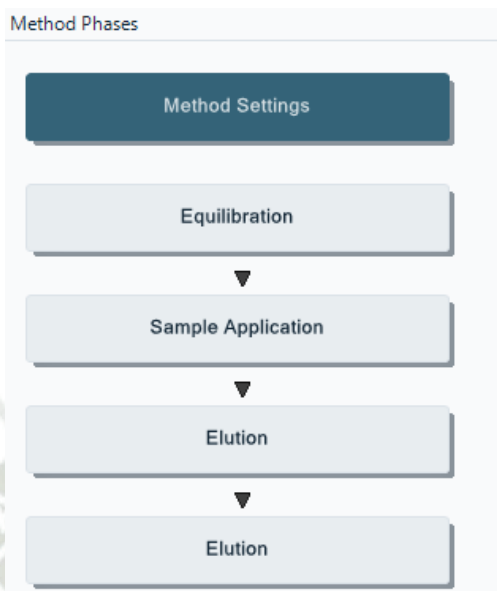
☒ Fill the system with the selected buffer

Equilibrate until

☒ the total volume is ml

ANEXO 3:

PROGRAMA DE PURIFICACIÓN EN EL AKTA PURE EN FILTRACIÓN DE GEL CONFIGURACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN DE GEL O SEC



Configuración del método

Method Settings ?

Column selection

Show by technique: SEC

Column type: HiLoad 26/600 Superdex 75 pg

☒ Show only suggested columns [Column Properties...](#)

Column volume: 318.557 ml

Pressure limit pre-column: 0.50 MPa [0.02 - 20.00]

☒ Pressure limit delta-column: 0.30 MPa [0.02 - 20.00]

☒ Use flow restrictor

Column position: 3

Flow rate: 1.500 ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Control the flow to avoid overpressure

Inlet A: A2

Inlet B: B1

Result Name & Location...

Start Protocol...

Method Notes...

Unit selection

Method Base Unit: Volume

Flow Rate Unit: ml/min

Monitor settings

UV variable wavelengths

UV 1: 280 [190 - 700] nm

☐ UV 2: 254 [190 - 700] nm

☒ UV 3: 214 [190 - 700] nm

Note! UV monitors with fixed wavelength are not presented in this view

☒ Enable pH monitoring

Enable air sensor alarm

☒ Inlet A

☒ Inlet B

☐ Sample inlet

Equilibración de la columna

Equilibration ?

☒ Reset UV monitor (recommended if the equilibration occurs before the purification).

☒ Use the same flow rate as in Method Settings
Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Use the same inlets as in Method Settings
Inlet A
Inlet B % B [0.0 - 100.0]

☐ Fill the system with the selected buffer

Equilibrate until
☒ the total volume is ml

Introducción de la muestra

Sample Application ?

☒ Use the same flow rate as in Method Settings
Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Inject sample from loop
☐ Inject sample directly onto column

Fill the loop using

Loop type

Loop position

Sample inlet

Fill loop with ml

Empty loop with ml

Sample volume ml

☒ Use the same inlets as in Method Settings
Inlet A
Inlet B %

☐ Fill the system with the selected buffer

☒ Wash sample flow path with buffer
☐ Prime sample inlet with ml
☒ Wash sample flow path with buffer after sample application.

☐ Interrupt sample application at UV mAU [-6000.0 - 6000.0]

Fractionate
☒ in waste (do not collect)

Fractionation settings
Fractionation type [Advanced Settings](#)

Primera elución

Elution ?

☒ Use the same flow rate as in Method Settings
 ☒ Use the same inlets as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]
 Inlet A
 Inlet B

☐ Up flow 

☒ Isocratic elution
 ☐ Gradient elution

Volume ml % B [0.0 - 100.0]
 ☐ Fill the system with the selected buffer

Start at % B [0.0 - 100.0]
 ☐ Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (ml)
1	Linear	100.0	6371.14

Add Segment
Delete Segment

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate
☐ in waste (do not collect)
 ☐ using outlet valve
 ☒ using fraction collector
 ☐ peak to loop 

Fractionation settings

Fractionation type
Fractionation destination
Peak fractionation destination
Fixed fractionation volume ml [0.0 - 3.0]
Peak fractionation volume ml [0.00 - 2.20]

Advanced Settings...
Peak Frac Settings...

☒ Start fractionation after ml (only for isocratic elution)

Segunda Elución

Elution ?

☒ Use the same flow rate as in Method Settings

Flow rate ml/min [0.000 - 25.000]

☒ Use the same inlets as in Method Settings

Inlet A

Inlet B
☐ Up flow 
☒ Isocratic elution

Volume ml % B [0.0 - 100.0]

☐ Fill the system with the selected buffer

☐ Gradient elution

Start at % B [0.0 - 100.0]

☐ Fill the system with the selected buffer

	Type	Target %B (0-100)	Length (ml)
1	Linear	100.0	6371.14

Add Segment

Delete Segment

Note: A gradient delay is automatically added, provided that the last gradient segment is linear

Fractionate

☒ in waste (do not collect)

☐ using outlet valve

☐ using fraction collector

Fraction collector
☐ peak to loop 

Fractionation settings

Fractionation type

Fractionation destination

Peak fractionation destination

Fixed fractionation volume

Peak fractionation volume

Advanced
Settings...

Peak Frac
Settings...

☒ Start fractionation after ml (only for isocratic elution)

ANEXO 4:

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL MONTAJE DEL SISTEMA DEELECTROFORESIS

- *Se utilizará un gel plano de 1,5 mm de grosor.*
- *Montar el “sandwich” con dos placas de vidrio (uno tiene un rebaje) y los dos “separadores” en vertical entre ellas y a ambos lados.*
- *Introducirlo en el soporte formador de geles. Sujetar el conjunto.*
- *Se empleará un gel separador con un 15 % de acrilamida y un gel acumulador con un 4,8% de acrilamida. Los geles se preparan mezclando, en un vaso de precipitados, los componentes indicados en la tabla (el persulfato y el TEMED inician la reacción de polimerización, por lo que se deben añadir en último lugar) y rápidamente proceder al llenado con la mezcla (las cantidades indicadas dan para dos geles). La solución de acrilamida/bisacrilamida se debe utilizar con guantes y pipetear con propipeta. Primero se polimeriza el gel separador. Para ello se rellena, con la mezcla todavía líquida, el espacio entre las dos placas hasta unos 3 cm del borde superior del cristal corto, usando una pipeta pasteur. Añadir encima una pequeña cantidad de agua destilada (esto hace que la superficie del gel quede recta). Esperar a que polimerice el gel (entre 30 y 60 min, observar la mezcla sobrante en el vaso). Volcar para retirar el agua destilada. Secar con un papel de filtro. Añadir sobre este gel separador la mezcla (ver tabla) del gel “acumulador” y antes de que polimerice introducir en la parte superior el “peine”, que formará en el gel acumulador los pocillos para luego poder aplicar las muestras. Se guarda el gel en la cámara fría hasta el día siguiente.*

Gel separador (15%):

- *Agua destilada 3,53 mL*
- *Acrilamida/Bisacrilamida 7,5 mL*
- *Tris 1 M pH 8,8 3,75 mL*
- *SDS 10% 150 μ L*
- *TEMED 7,5 μ L*
- *Persulfato amónico (100 mg/1 ml) 75 μ L*

Gel concentrador:

- *Agua destilada 5,8 mL*
- *Acrilamida/Bisacrilamida 1,65 mL*
- *Tris 0,5 M pH 6,8 2,5 mL*
- *SDS 10% 100 μ L*
- *TEMED 6,5 μ L*
- *Persulfato amónico (100 mg/ 1 ml) 94 μ L (41)*

Buffer para cargar muestras en SDS-Page

Para preparar el disolvente base, agregue 3 ml de SDS al 20 % para agregar 3,75 ml de tampón Tris 1 M a pH 6,8 en un recipiente adecuado.

Agregue 9 mg de azul de bromfenol, 1,16 g de DTT (o 2,4 ml de B-mercaptoetanol) y mezcle bien.

Agregue 4,5 ml de glicerol a la solución y mezcle bien.

Completar hasta un volumen final de 15 ml con dH₂O y volver a mezclar bien.

Conservar a 4°C. Diluir para usar (40).