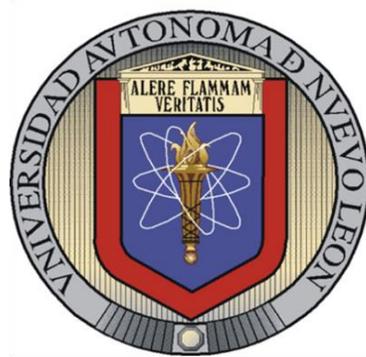


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DESARROLLO DE UN SISTEMA DE FUSIÓN INNOVADOR CON LA  
PROTEÍNA CUSF PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS  
RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS

Por

JESÚS ENRIQUE CANTÚ BUSTOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en  
FARMACIA

NOVIEMBRE, 2013

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE FUSIÓN INNOVADOR CON LA  
PROTEÍNA CUSF PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS  
RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS

Revisión de la tesis:

---

Dr. ISAIAS BALDERAS RENTERÍA

---

Dr. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO

---

Dra. LUCIA GUADALUPE CANTÚ CÁRDENAS

## RESUMEN

**Jesús Enrique Cantú Bustos**      **Fecha de Graduación: Diciembre, 2013**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título del Estudio:** DESARROLLO DE UN SISTEMA DE FUSIÓN INNOVADOR CON LA PROTEÍNA CUSF PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS.

**Número de páginas: 73**

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación Farmacia.**

Durante la producción de biofármacos, obtenidos a partir de proteínas recombinantes, es importante generar dichos productos a bajos costos, buena calidad y una alta producción. Para lograr los objetivos anteriores se utilizan las proteínas de fusión, de las cuales se necesita generar nuevas alternativas para optimizar el proceso de producción de proteínas recombinantes. La proteína CusF, debido a sus características de estabilidad y expresión, puede utilizarse como sistema de fusión alternativo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una tecnología nueva para la producción de proteínas recombinantes plegadas y activas en *Escherichia coli* utilizando como proteína de fusión CusF. Se obtuvo el ADN de varios genes como *cusf*, *gst*, *pap2*, *lovr*, *imb1*, *gfp*, *iaa9* y *ndpk2* utilizados en este estudio, como proteínas de referencia para la expresión, con iniciadores específicos por medio de PCR, se llevó a cabo la digestión con enzimas de restricción, seguida de la ligación con el vector seleccionado. Los productos de ligación se utilizaron para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* para finalizar la clonación y posterior extracción y purificación del ADN plasmídico. Se realizaron electroforesis en gel de agarosa para observar la amplificación, y así confirmar la clonación, de los genes *cusf*, *gst*, *pap2*, *lovr*, *imb1*, *gfp*, *iaa9* y *ndpk2*. La cepa BL21(DE3), de la misma estirpe bacteriana se utilizó para transformar el ADN plasmídico puro y llevar a cabo la expresión de las proteínas recombinantes. Finalmente se elaboraron dos resinas, una con iones Ag(I) y otra con Cu(II) inmovilizados para llevar a cabo la separación y purificación de CusF-GFP.

FIRMA DEL ASESOR: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Xristo Zárate y al Dr. Alberto Gómez, asesor y co-asesor de tesis respectivamente, por todos los consejos y experiencias adquiridas de ellos. Así como al Dr. Isaías Balderas, Dr. Omar González, Dra. Mónica Sánchez y la Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas, por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología así como a la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mis padres y hermanos por el apoyo que siempre me han brindado en la toma de decisiones importantes en el transcurso de mi vida.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biofarmacia, Dra. Patricia González y los QFB's Adriana Hernández, Laura Villarreal, Zianya Bautista, Rolando Delgado, por todos los buenos consejos y apoyo moral incondicional.

A los estudiantes y QFB's del Laboratorio de Química de Productos Naturales, Iris Miranda, Aldo Clemente, Adriana Romo y Juan Favela por el todo el apoyo brindado.

A los estudiantes del Laboratorio de Ingeniería Genética, Fabián Olazarán, Héctor Ramírez, Eder Arredondo, Tere Vargas y Jessica Gómez por los consejos y ayuda proporcionados.

A todos los estudiantes de QFB que participaron en la realización de este proyecto, Guillermo, Oscar, Esther, Vianey, Nallely, Mario, Misael, Neiva, Cristian, Gregorio, Luis, etc.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1 Proteínas de fusión.....	5
1.2 Biofármacos en la industria .....	10
1.3 Características de la proteína CusF .....	11
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 pET28b y enzimas de restricción .....	17
2.1.1 Mapa General pET28b .....	17
2.1.2 Sitios de interés .....	18
2.1.3 Sitios de corte.....	18
2.2 Tamaños moleculares de los genes .....	19
2.3 Obtención del ADN de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i> .....	19
2.3.1 Diseño de iniciadores .....	19
2.3.2 Amplificación de las secuencias génicas de <i>cusf</i> y <i>gst</i> .....	20
2.4 Clonación molecular de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i> .....	22
2.4.1 Reacciones de digestión enzimática .....	22
2.4.2 Reacciones de ligación de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i> con el vector pET28b .....	24
2.4.3 Transformación de <i>E. coli</i> .....	25
2.4.4 Confirmación de la clonación de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i> .....	26

<b>2.5</b>	<b>Obtención del ADN de los genes <i>pap2</i>, <i>ndpk2</i>, <i>imb1</i>, <i>gfp</i>, <i>lovr</i> e <i>iaa9</i> .....</b>	<b>26</b>
2.5.1	Diseño de iniciadores: .....	26
2.5.2	Amplificación de las secuencias génicas de <i>pap2</i> , <i>ndpk2</i> , <i>imb1</i> , <i>gfp</i> , <i>lovr</i> e <i>iaa9</i> .....	27
<b>2.6</b>	<b>Clonación molecular de los genes <i>pap2</i>, <i>ndpk2</i>, <i>imb1</i>, <i>gfp</i>, <i>lovr</i> e <i>iaa9</i>.....</b>	<b>28</b>
2.6.1	Reacciones de digestión enzimática.....	28
2.6.2	Reacciones de ligación de los genes <i>pap2</i> , <i>ndpk2</i> , <i>imb1</i> , <i>gfp</i> , <i>lovr</i> e <i>iaa9</i> con los vectores pET28b-CusF o pET28b-GST .....	30
2.6.3	Transformación de <i>E. coli</i> .....	31
2.6.4	Confirmación de la clonación de los genes <i>pap2</i> , <i>ndpk2</i> , <i>imb1</i> , <i>gfp</i> , <i>lovr</i> e <i>iaa9</i> .....	31
<b>2.7</b>	<b>Expresión de proteínas recombinantes CusF-GFP y GST-GFP .....</b>	<b>32</b>
2.7.1	Transformación en <i>E. coli</i> .....	32
2.7.2	Expresiones piloto en tubos .....	33
2.7.3	Expresiones en matraces triptinización.....	33
2.7.4	Lisis Periplásmica.....	33
2.7.5	Lisis celular de expresiones piloto .....	34
2.7.6	Lisis por homogenización con perlas de vidrio de expresión en matraces .....	34
<b>2.8</b>	<b>Confirmación de la expresión de las proteínas de fusión .....</b>	<b>35</b>
<b>2.9</b>	<b>Cromatografía de afinidad con iones plata inmovilizados para la proteína CusF.....</b>	<b>35</b>
2.9.1	Elaboración de resina .....	35
2.9.2	Etapas de unión y elución de la proteína CusFp-GFP .....	37
2.9.3	Etapas de unión y elución de la proteína CusFc-GFP.....	37
<b>2.10</b>	<b>Cromatografía de afinidad con iones Cu(II) de CusFc-GFP .....</b>	<b>38</b>
<b>2.11</b>	<b>Cromatografía de afinidad para la proteína de fusión GST-GFP.....</b>	<b>38</b>
2.11.1	Purificación por método batch de GST-GFP .....	38
<b>2.12</b>	<b>Confirmación de la expresión y purificación de las proteínas de fusión .....</b>	<b>39</b>
<b>2.13</b>	<b>Cuantificación de proteínas.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>PCR de secuencias <i>cusf</i> y <i>gst</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Clonación molecular de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>PCR secuencias de genes de interés para su inserción en pET28b-CusF y pET28b-GST .....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Secuencias de interés para pET28b-CusF .....	45
3.3.2	Secuencias de interés para pET28b-GST .....	46
<b>3.4</b>	<b>Clonación molecular de los genes <i>pap2</i>, <i>ndpk2</i>, <i>imb1</i>, <i>gfp</i>, <i>lovr</i> e <i>iaa9</i>.....</b>	<b>47</b>
3.4.1	Clonación molecular en pET28b-CusF .....	47
3.4.2	Clonación molecular en pET28b-GST.....	49
<b>3.5</b>	<b>Expresión de proteínas recombinantes CusFc-GFP, CusFp-GFP y GST-GFP .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6</b>	<b>Confirmación de expresión CusFc-PAP2, CusFc-IMB1, CusFp-GFP, CusFc-NDPK2 .....</b>	<b>52</b>

<b>3.7</b>	<b>Lisis celular por homogenización con perlas de vidrio de BL21(DE3)-CusFc-GFP.....</b>	<b>53</b>
<b>3.8</b>	<b>Cromatografía de afinidad con iones plata inmovilizados.....</b>	<b>55</b>
3.8.1	Elaboración de resina.....	55
3.8.2	Etapas de unión y elución de la proteína CusFp-GFP.....	56
<b>3.9</b>	<b>Cromatografía de afinidad de CusFc-GFP.....</b>	<b>57</b>
<b>3.10</b>	<b>Confirmación de la purificación de CusFp-GFP, CusFc-GFP y GST-GFP.....</b>	<b>58</b>
<b>3.11</b>	<b>Cuantificación de proteínas.....</b>	<b>61</b>
3.11.1	Curva de calibración del método Bradford.....	61
3.11.2	Lectura de absorbancia de muestras proteicas.....	62
<b>4</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>
	<b>RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1 Matrices y condiciones de elución de etiquetas de afinidad .....	7
Tabla 2 Biofármacos aprobados para su aplicación clínica obtenidos en <i>E. coli</i> . .....	10
Tabla 3 Sitios de principal interés en el vector pET28b.....	18
Tabla 4 Secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción .....	18
Tabla 5 Tamaños moleculares de los genes y proteínas utilizados.....	19
Tabla 6 Secuencia de iniciadores empleados en amplificación de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i> .....	20
Tabla 7 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	21
Tabla 8 Ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a las etapas acopladas a la PCR.....	21
Tabla 9 Componentes de digestión con endonucleasas de restricción de <i>cusf</i> y <i>gst</i> ..	23
Tabla 10 Componentes de digestión con endonucleasas de restricción del vector pET28b.....	23
Tabla 11 Componentes de digestión con endonucleasas de restricción del vector pET28b.....	24
Tabla 12 Secuencia de iniciadores empleados en amplificación de los genes <i>cusf</i> y <i>gst</i> . .....	27
Tabla 13 Componentes de digestión con endonucleasas de restricción de <i>pap2</i> , <i>ndpk2</i> , <i>imb1</i> , <i>gfp</i> , <i>lovr</i> e <i>iaa9</i> .....	29
Tabla 14 Componentes de digestión con endonucleasas de restricción de los vectores pET28b-CusF y pET28b-GST.....	30
Tabla 15 Componentes de digestión con endonucleasas de restricción del vector pET28b.....	31
Tabla 16 Diseño experimental de la cuantificación de proteínas por el método Bradford. .....	40
Tabla 17 Construcciones plasmídicas obtenidas .....	51
Tabla 18 Curva de calibración del método bradford.....	61
Tabla 19 Lectura de absorbancia de muestras y cálculo de concentración.....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 Mecanismo de acción para el sistema CusCFBA.....	12
Figura 2 Mapa general del vector plasmídico pET28a.....	17
Figura 3 Esquema general de la elaboración de la resina con iones plata inmovilizados. ....	36
Figura 4 Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% (m/v) de la PCR para el gen de la proteína CusF. Marcador de peso molecular 1kb Ladder de Axygen.....	41
Figura 5 Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% (m/v) de la PCR para el gen de la proteína GST. Marcador de peso molecular 1kb Ladder de Axygen.....	42
Figura 6 Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína CusFc. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	43
Figura 7 Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína CusFp. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen .....	44
Figura 8 Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con el gen de la proteína GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.....	45
Figura 9 Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR de los genes de interés para su inserción en pET28b-CusFc. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	46
Figura 10 Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR de los genes de interés para su inserción en pET28b-GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	47
Figura 11 Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con los genes de interés y pET28b-CusFc. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	48
Figura 12 Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con el gen de GFP y pET28b-CusFp. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	49

Figura 13 Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con los genes de interés y pET28b-GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	50
Figura 14 Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con los genes de interés y pET28b-GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen. ....	50
Figura 15 Patrón de expresión de las proteínas de fusión MBP-GFP, CusFc-GFP y GST-GFP. S= Fracción soluble, I=Fracción insoluble. Marcador de peso molecular PageRuler unstained Protein Ladder de Thermoscientific. Nota: Se decidió hacer la expresión con MBP para tener una comparación con otra proteína de fusión comercial. ....	52
Figura 16 SDS-PAGE de expresiones piloto de CusFc-PAP2, CusFc-IMB1, CusFc-GFP, CusFc-NDPK2. S= fracción soluble, I= fracción insoluble. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific. ....	53
Figura 17 Pellets de las expresiones en la bacteria BL21(DE3) con las proteínas CusFc-GFP. ....	54
Figura 18 Ambas imágenes corresponden a lisados proteicos, disueltos en solución de fosfatos 50mM, NaCl 300 mM pH8 del cual se utilizaron 32 ml para obtener dicho lisado. ....	54
Figura 19 Bio-Gel P2 activada con glutaraldehído, tiourea y iones plata inmovilizados. ....	55
Figura 20 Resina activada con iones plata inmovilizados, resultante de la prueba de estabilidad a temperatura ambiente y buffer de fosfatos pH 8. ....	56
Figura 21 Resina activada con iones plata inmovilizados, resultante de la prueba de estabilidad a 4°C y buffer de fosfatos pH 7. ....	56
Figura 22 Aspecto de la resina, posterior al experimento de unión con la CusFp-GFP. ....	57
Figura 23 Aspecto de resina, posterior a la cromatografía de afinidad con CusFc-GFP. ....	57
Figura 24 SDS-PAGE de purificación de CusFp-GFP con resina de plata. SN= fase no unida, mM= concentración milimolar de metionina. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific, ....	59
Figura 25 SDS-PAGE de purificación de CusFc-GFP con resina de plata. SN= fase no unida, EI= eluato 160 mM metionina. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific. ....	59

Figura 26 SDS-PAGE de purificación de GST-GFP. El= eluato. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific. .... 60

Figura 27 SDS-PAGE de purificación de CusFc-GFP con resina de cobre. SN= Fase no unida, La= Lavado, El= Eluato con 50 mM imidazol. .... 60

Figura 28 Gráfica de absorbancia de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm. .... 62

Figura 29 Gráfica de concentración de las muestras obtenidas de la cromatografía de afinidad de CusFc-GFP y resina con iones Cu(II)..... 63

Figura 30 Gráfica de absorbancias de las muestras obtenidas de la cromatografía de afinidad de CusFc-GFP y resina con iones Cu(II)..... 64

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CusF	Proteína libre sensible a cobre
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i>
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GH	Hormona de Crecimiento
GST	Glutation S Transferasa
IAA9	Proteína 9 inducida por Acido Indolacético
IFN-α-2b	Interferón alfa 2b
IMB1	Proteína de Imbibición Inducible 1
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KDa	KiloDaltones
LB	Medio Luria Bertani
LovR	Proteína Reguladora de Respuesta LovR
M	Concentración molar
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
NDPK2	Nucleósido difosfato kinasa 2
PAP2	Proteína IAA27 de respuesta a auxina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rh	Recombinante humano
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Proteínas de fusión

El uso de proteínas recombinantes se ha incrementado ampliamente en los últimos años, en respuesta al rápido crecimiento del campo de la proteómica. Los híbridos recombinantes son ampliamente utilizados y contienen una proteína de fusión, denominada etiqueta de afinidad, para facilitar la purificación de las proteínas de interés. Diferentes proteínas o péptidos pueden ser fusionados con las proteínas de interés. Al hacer uso de estas proteínas de fusión se obtienen ventajas para facilitar la purificación y detección de proteínas recombinantes, dichas proteínas son bien conocidas en el ámbito científico [1].

La producción de proteínas recombinantes en una forma altamente pura y bien caracterizada ha sido una tarea difícil para los químicos que trabajan con estas biomoléculas dentro de la industria farmacéutica. En años recientes, muchos péptidos y proteínas han sido desarrollados para la producción de nuevas proteínas recombinantes. Estos sistemas de etiquetas de afinidad comparten las siguientes características: a) purificación por absorción en un solo paso; b) un mínimo efecto en la estructura terciaria y la actividad biológica; c) fácil y específica remoción para producir la molécula nativa; d) ensayos simples y específicos de las proteínas durante la purificación; e) aplicabilidad a un número de diferentes polipéptidos Sin embargo, cada etiqueta de afinidad es purificada bajo condiciones específicas de buffer, el cual puede afectar la proteína de interés. Por lo tanto se han desarrollado, diferentes tipos de estrategias para

producir proteínas recombinantes a gran escala. Un enfoque es usar una etiqueta de péptido pequeño que no debe interferir con la proteína fusionada. Los pequeños péptidos etiquetas más comúnmente utilizados son: poly-Arg (Arg-tag), FLAG®, poly-His, c-myc, S y StrepII (Ver tabla 1 para descripción detallada). Para algunas aplicaciones, estas pequeñas etiquetas pueden no ser removidas, esto debido a que son menos inmunogénicas que las grandes etiquetas. El efecto en la estructura terciaria y en la actividad biológica de las proteínas de fusión con pequeñas etiquetas depende de la localización y de la composición de aminoácidos de la etiqueta [1-3].

Otro enfoque es usar péptidos grandes o moléculas proteicas completas como proteínas de fusión. El uso de proteínas grandes puede incrementar la solubilidad de las proteínas de interés, la desventaja es que la etiqueta tiene que ser removida para muchas aplicaciones posteriores de la proteína de interés, por ejemplo, cristalización o producción de anticuerpos [1,4].

En general es difícil decidir cuál es el mejor sistema de fusión para una proteína de interés específica. Esto depende de la misma proteína de interés, el sistema de expresión, y la aplicación de la proteína purificada [1, 3].

**TABLA 1** Matrices y condiciones de elución de etiquetas de afinidad

<b>Etiqueta de afinidad</b>	<b>Matriz</b>	<b>Condiciones de elución</b>
Poly-Arg (poliarginina)	Resina de intercambio catiónico	Gradiente lineal de NaCl de 0 a 400 mM a pH mayor a 8
Poly-His (polihistidina)	Ni <sup>2+</sup> -NTA, Co <sup>2+</sup> -CMA (Talon)	Imidazol 20-250 mM o pH bajo
FLAG®	Anticuerpo monoclonal Anti-FLAG	pH 3.0 o 2-5 mM EDTA
Strep-tag II	Strep-Tactin(streptavidina modificada)	2.5 mM desthiobiotina (desthiobiotine)
c-myc	Anticuerpo monoclonal	Bajo pH
S	Fragmento S de RNasaA	3M tiocianato de guanidina, 0.2 M citrato pH 2, 3M cloruro de magnesio
Péptido de Unión a Calmodulina	Calmodulina	EGTA o EGTA con 1M NaCl
Dominio de unión a celulosa	Celulosa	Familia I: guanidina HCl o urea mayor a 4M Familia II/III: etilenglicol
Glutación S Transferasa	Glutación	5-10 mM glutación reducido
Proteína de unión a maltosa	Amilosa entrecruzada	10 mM maltosa

La fase inicial “río arriba” de producción de biofármacos consiste en el diseño del sistema de expresión que implica la elaboración mediante ingeniería genética, del vector de clonación para el gen que codifica la proteína de interés en la célula hospedera adecuada. La segunda fase “río abajo” se enfoca al proceso de purificación, evaluación del control de calidad y validación de dicho producto. En términos generales, la producción de proteínas recombinantes sigue el siguiente esquema: 1) Tratamiento con enzimas de restricción de un vector de clonación y del ADN que contiene el gen que codifica la proteína de

interés, 2) Ligamiento del gen con el vector para obtener el ADN recombinante (ADNr), 3) Internalización y replicación (clonación) del ADNr en una célula hospedera y 4) Expresión del gen de la proteína [3,4].

El diseño del vector basado en técnicas de ingeniería genética y la elección de la célula hospedera determinan en gran parte, las características de la proteína recombinante, las estrategias de su purificación, rendimiento y el costo de su producción[5,6].

Algunos de los elementos moleculares que han sido manipulados para controlar la expresión génica incluyen el gen codificante para la proteína de interés, un origen de replicación, un marcador de selección (resistencia a antibióticos), un promotor y un terminador de transcripción [7, 10].

El nivel de expresión depende del organismo hospedero. Actualmente, muchas de las proteínas comercialmente importantes son producidas con tecnología de ADN recombinante y son sintetizadas en *Escherichia coli* (*E. coli*). El amplio uso de esta bacteria se debe a la gran cantidad de investigación que se ha realizado sobre su genética, biología molecular, bioquímica y fisiología, pero sobre todo, si la proteína deseada tiene buenos niveles de expresión, *E. coli* produce grandes cantidades de ésta a bajo costo siempre y cuando la proteína sea expresada [11].

Desafortunadamente en *E. coli*, dependiendo mucho de la proteína de interés, los niveles de expresión pueden ser bajos y se obtienen cantidades mínimas; que en proteínas pequeñas, esto se debe a su degradación por proteasas. Una de las maneras de resolver este problema es construir un plásmido de ADN que codifique a la proteína deseada bajo el mismo marco de lectura de otra proteína que presente altos de niveles de expresión y sea estable en *E. coli*. A esta proteína por lo regular se le llama “proteína de fusión” y una de sus funciones es proteger a la proteína de interés de las proteasas [12].

Además de la degradación proteolítica, otro problema muy común en la expresión de proteínas en *E. coli*, es la formación de cuerpos de inclusión insolubles, inactivos e inservibles, que se forman cuando la proteína de interés no se pliega adecuadamente y es muy difícil encontrar las condiciones de diálisis óptimas para su plegamiento [11].

La utilización de proteínas de fusión puede ayudar a evitar la formación de cuerpos de inclusión de la proteína de interés. Clonar el gen de la proteína deseada en el C-terminal de la proteína de fusión permite que sea plegada correctamente, debido a que las chaperonas y chaperoninas de *E. coli* son capaces de plegar la proteína de fusión exitosamente y al mismo tiempo, plegar la proteína de interés al considerarla como una sola, empezando por la proteína de fusión, homóloga en algunos casos [13].

Durante la producción de proteínas recombinantes, la purificación de las mismas es de suma importancia. *E. coli* produce miles de proteínas diferentes, lo cual dificulta la purificación de la proteína de interés. Para solucionar dicha problemática, se ha utilizado la cromatografía de afinidad, ya que se pueden obtener purezas de hasta el 90% en un solo paso, lo que la coloca como uno de los métodos favoritos de los investigadores. Como ya se mencionó anteriormente, las proteínas de fusión permiten que las proteínas recombinantes puedan ser purificadas por medio de cromatografía de afinidad; la más usada para tal aplicación, es la MBP [14].

## 1.2 Biofármacos en la industria

Las biofármacos basados en proteínas recombinantes que están aprobados para su aplicación clínica y que se expresan en *E. coli* se presentan en la tabla 2 [8,9].

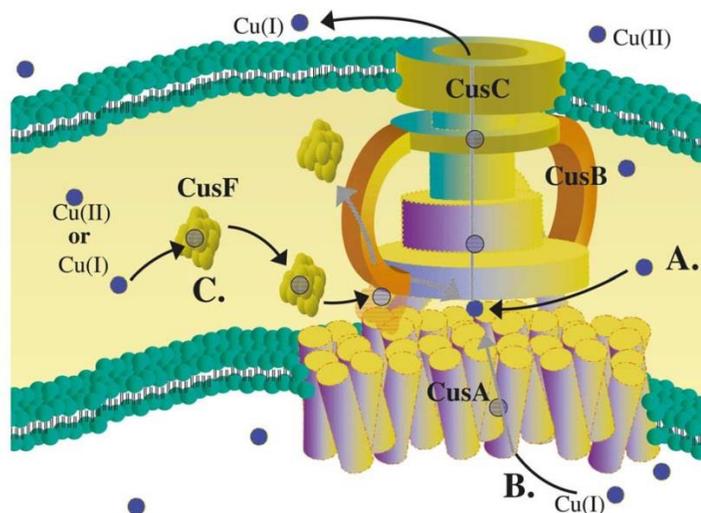
**Tabla 2** Biofármacos aprobados para su aplicación clínica obtenidos en *E. coli*.

Producto	Compañía	Indicación terapéutica	Año
Nutropin (rh GH)	Genetech	Deficiencia de GH en niños	1994
Insuman (rh Insulina)	Hoechst	Diabetes mellitus	1997
Beromun (rh TNF $\alpha$ )	Boehringer-Ingel	Tratamiento post.remoción de tumores	1999
Virtron (rh-IFN- $\alpha$ -2b)	Schering Plough	Hepatitis crónica B y C	2000

Viraferon (rh-IFN- $\alpha$ -2b)	Schering Plough	Hepatitis crónica B y C	2000
Nutropin AQ (rh-GH)	Schwartz Pharma	Falla de crecimiento, síndrome de Turner	2001

### 1.3 Características de la proteína CusF

CusF es una proteína que se encuentra en el periplasma de *E. coli* y está encargada de regular las concentraciones de iones metálicos tóxicos, como Cu(I) y Ag(I) [15]. *E. coli* controla el exceso de cobre utilizando dos sistemas de los cuales, uno es el CusCFBA, que funciona como un sistema tipo antipuerto, removiendo el exceso de iones de cobre del citoplasma. Tres de los componentes de este sistema, CusCBA, son homólogos a aquellos encontrados en el sistema que da resistencia a fármacos como el TolC-AcrAB [16]. El cuarto componente, CusF, se encuentra únicamente en este sistema de resistencia a cobre y plata; CusF posiblemente interactúa con CusB y CusC como intermediario para remover los iones metálicos (figura 1). Al remover el gen de CusF del cromosoma de *E. coli*, la bacteria presenta un fenotipo menos resistente al cobre. Experimentos con microarreglos han demostrado que al exponer a la bacteria con Cu(II) el transcrito de *cusf*, aumenta notablemente [17].



**Figura 1** Mecanismo de acción para el sistema CusCFBA

La estructura cristalina de CusF refleja una proteína que forma un barril de 5 plegamientos  $\beta$ . Este tipo de estructuras son sumamente valiosas porque se ha observado que presentan resistencia a la degradación por proteasas [15,18]. Debido a esta cualidad, se ha propuesto a CusF como proteína de fusión.

Los altos niveles de expresión de CusF han sido determinados previamente por medio de microarreglos de proteínas auto-ensambladas [19], utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) como proteína reportera de expresión y plegamiento [20], y comparándola con otras cuarenta proteínas. Se encontró que CusF-GFP obtuvo los niveles más altos de fluorescencia, es decir, CusF fue la proteína que produjo más GFP plegada correctamente. Cabe mencionar que las intensidades de fluorescencia fueron mayores que MBP-GFP y GST-GFP, dos de las proteínas de fusión más utilizadas por los investigadores a nivel mundial [14,21].

Para el sistema CusF, se propone una cromatografía de afinidad que presente las ventajas de obtener una alta pureza en un solo paso cromatográfico. De manera natural CusF une los iones Cu(I) y Ag(I) [15,22], por lo que sintetizará una matriz que contenga iones de Ag(I) debido a que este tipo de resina ya ha sido creada utilizando glutaraldehído y tiourea como activadores para que la poliacrilamida pueda inmovilizar iones Ag(I) [23, 24].

Además de presentar un nivel de expresión superior y la capacidad de realizar cromatografía de afinidad para su purificación, CusF tiene otra cualidad que le hace más atractiva que MBP y GST: su peso molecular. CusF es una proteína de apenas 12 KDa, mientras que MBP y GST son de 40 y 26 KDa respectivamente [1,6,15].

Por todo lo anterior, las proteínas de fusión son primordiales para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Deben generarse sistemas de fusión alternativos para la expresión y purificación de proteínas, en este caso CusF. Dicha proteína se encuentra de manera natural en *E. coli* y su función es la expulsión de iones metálicos tóxicos [15]; CusF fácilmente puede competir con otras proteínas de fusión como la MBP y la GST, debido a sus características ya mencionadas, que permitirán producir proteínas con buenos rendimientos y de alta calidad.

## **HIPÓTESIS**

La proteína CusF es mejor opción como proteína de fusión, en comparación con GST, para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes en *E. coli*

## **OBJETIVO GENERAL**

Proponer una tecnología alternativa para la expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli* utilizando CusF como proteína de fusión.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir una variedad de plásmidos con diferentes genes, incluyendo CusF y GST como proteínas de fusión.
- Generar una resina especial para la purificación de proteínas recombinantes marcadas con CusF, por medio de cromatografía de afinidad con iones Ag(I) inmovilizados o mediante el uso de una resina con iones Cu(II).
- Establecer métodos eficaces para la expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a CusF.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 pET28b y enzimas de restricción

#### 2.1.1 Mapa General pET28b

El mapa del vector es el mismo a excepción del tamaño, para pET28b es de 5368bp y para pET28c 5367bp. Cada par de base se sustrajo de la secuencia vecina a BamHI.

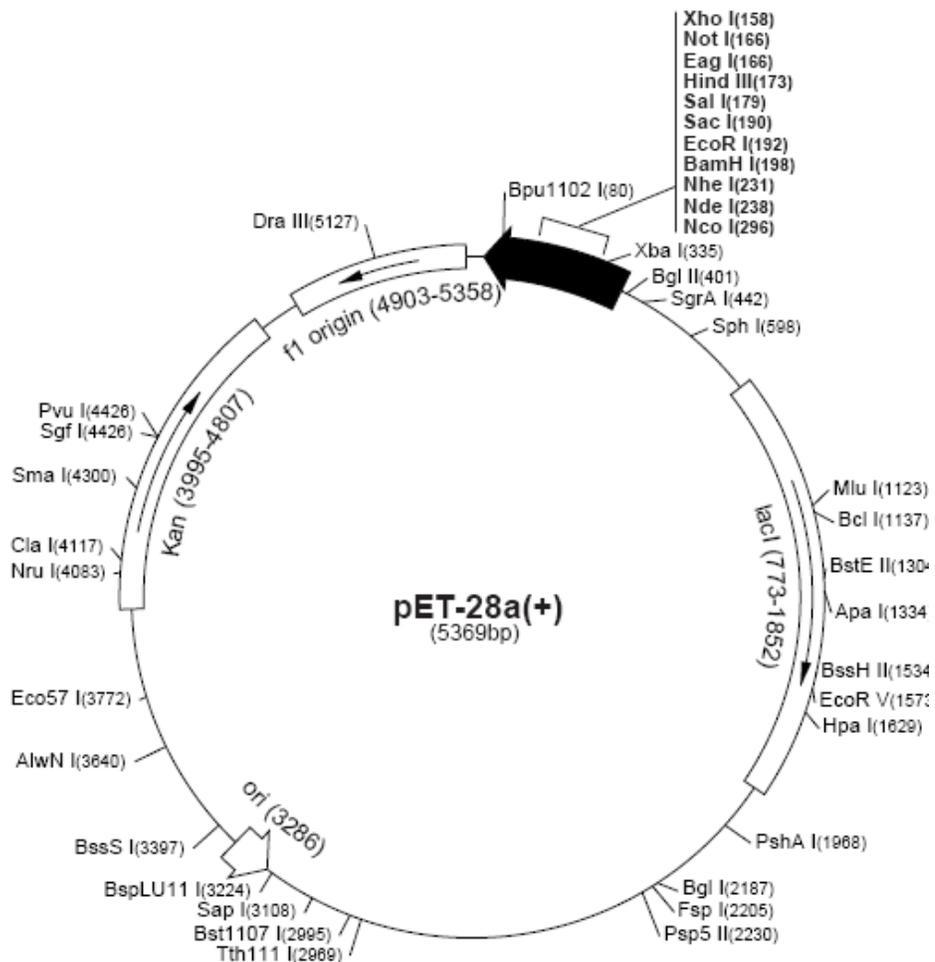


Figura 2 Mapa general del vector plasmídico pET28a.

### 2.1.2 Sitios de interés

**Tabla 3** Sitios de principal interés en el vector pET28b

Secuencias Principales	Sitio de secuencia
Promotor T7	370-386
Inicio de transcripción de T7	369
Sitio de clonación múltiple	158-203
Terminador T7	26-72
Secuencia codificante <i>lacI</i>	773-1852
Secuencia codificante de <i>Kan</i>	3995-4807
Inserción CusF o GST (BamHI: NdeI)	198: 238
Inserción secuencias de interés (XhoI: NotI)	158: 166

### 2.1.3 Sitios de corte

**Tabla 4** Secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción

Enzima de restricción	Sitio de corte
BamHI	G´GATCC
NdeI	CA´TATG
NotI	GC´GGCCGC
XhoI	C´TCGAG

## 2.2 Tamaños moleculares de los genes

En la siguiente tabla se muestra el tamaño molecular de los genes, así como del tamaño de la proteína al ser expresada en la célula bacteriana

**Tabla 5** Tamaños moleculares de los genes y proteínas utilizados.

Proteína	Longitud pb	Aminoácidos	KDa
CusFc	303	101	10.6
CusFp	330	110	11.6
GST	603	206	25
GFP	720	240	26.9
IMB1	1158	386	40.5
PAP2	921	307	32.2
NDPK2	693	231	24.2
LovR	456	152	15.9
IAA9	1014	338	35.5

## 2.3 Obtención del ADN de los genes *cusf* y *gst*

### 2.3.1 Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar las secuencias codificantes de las proteínas CusF y GST (obtenidas de plásmidos con los cuales se contaba previamente). En dicho diseño de iniciadores se consideró incluir el codón de inicio de la transcripción (ATG) para el segmento amplificado de 5' a 3' (iniciador derecho). El iniciador que amplifica el segmento de 3' a 5' (iniciador

reverso) no incluye el codón de terminación de la transcripción (ATC), esto para que la proteína fusionada y estas se expresen como una sola proteína. Además los iniciadores incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y NdeI. Las secuencias de los iniciadores amplifican 2 productos diferentes que tendrá un tamaño de 333pb y 660pb, respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 6** Secuencia de iniciadores empleados en amplificación de los genes *cusf* y *gst*

Iniciadores	Secuencia 5' a 3'
Iniciador derecho CusF	5'-agtcagtcacatatggctaacgaacatcatgaaac-3'
Iniciador reverso CusF	5'-agtcagggatccctggctgactttaatatcctgtaa-3'
Iniciador derecho GST	5'-agtcagtcacatatgtcccctatactagggtattg-3'
Iniciador reverso GST	5'-agtcagggatccatccgattttggaggatggtc-3'

### 2.3.2 Amplificación de las secuencias génicas de *cusf* y *gst*

Para llevar a cabo la obtención de las primeras moléculas de ADN correspondientes a las secuencias de las proteínas CusFp (periplásmico), CusFc (citoplásmico) y GST, se puso en marcha el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para este propósito se realizó un coctel de concentración variable (dependiente del número de muestras a amplificar) con los componentes constantes en una reacción de este tipo (*Vent* ADN Polimerasa, Sales, agua, Mg(II) y dNTPs). Los componentes variables tales

como: iniciadores y DNA se utilizaron tal como se indica en la Tabla 7. Todas las reacciones, tanto muestras como blancos, se llevaron a cabo en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ .

**Tabla 7** Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Componente	Concentración	Volúmen
Mezcla coctel	--	43 $\mu\text{L}$
Iniciador derecho	10 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{L}$
Iniciador reverso	10 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{L}$
DNA molde	N/D	1 $\mu\text{L}$

Una vez hechas las diluciones apropiadas para cada muestra se sometieron al desarrollo de los ciclos de temperatura en un Termociclador de Gradientes (Corbett Research CG1-96). Los ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a la PCR se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8** Ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a las etapas acopladas a la PCR.

Experimento	Temperatura/tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C/1 min.	1
Desnaturalización	95°C/30 seg.	30
Alineamiento	59°C/30 seg.	
Extensión	72°C 1min/Kb	
Extensión final	72°C/10 min.	1

Para confirmar la amplificación del ADN se analizaron todas las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (m/v). Una vez revelado el resultado de la PCR, se seleccionaron las muestras con mejor resolución de la banda de amplificación de CusFc, CusFp y GST, de 303pb, 333pb y 660pb, respectivamente y así continuar con los procesos de amplificación de inserto por PCR con fines de clonación molecular en un vector plasmídico y transformación de *E. coli* para la utilización de dichos plásmidos en una nueva inserción de genes de interés.

## **2.4 Clonación molecular de los genes *cusf* y *gst***

### 2.4.1 Reacciones de digestión enzimática

Para llevar a cabo las digestiones con enzimas (endonucleasas) de restricción, se realizó un cambio de buffer de las amplificaciones de *cusf* y *gst*, esto para mejorar el rendimiento de digestión. Las amplificaciones fueron sometidas a la digestión con endonucleasas de restricción BamHI y NdeI. Las condiciones y concentraciones de reacción se presentan en la tabla 9. Las digestiones se realizaron en un volumen total de 40  $\mu$ L.

**Tabla 9** Componentes de digestión con endonucleasas de restricción de *cusf* y *gst*

Componente	Concentración	Volumen	Tiempo
ADN		30 $\mu$ L	3h
Buffer 3	10x	4 $\mu$ L	
BSA	10x	4 $\mu$ L	
BamHI	10U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	
NdeI	---	1 $\mu$ L	1h

Además se realizó la linearización del vector plasmídico pET28b, que es el vector seleccionado para la clonación de los genes previamente mencionados y contiene un sitio de multiclonación dentro de su estructura y contiene el gen de resistencia a Kanamicina. En la tabla 10 se describen las condiciones y los componentes de las reacciones de digestión plasmídica

**Tabla 10** Componentes de digestión con endonucleasas de restricción del vector pET28b

Componente	Concentración	Volumen	Tiempo
ADN		30 $\mu$ L	3h
Buffer 3	10x	4 $\mu$ L	
BSA	10x	4 $\mu$ L	
BamHI	20U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	
NdeI	----	1 $\mu$ L	1h
SAP	----	1 $\mu$ L	1h

#### 2.4.2 Reacciones de ligación de los genes *cusf* y *gst* con el vector

##### pET28b

Esta fase del proceso se realizó mediante la ligación del ADN de las proteínas CusFp, CusFc y GST con el vector pET28b, ya digeridos, y una posterior transformación con células rubidio-competentes utilizando las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Al haber sido digeridos con las enzimas de restricción BamHI y NdeI, tanto los genes como el vector presentan sitios digeridos complementarios, lo cual es necesario para llevar a cabo la ligación. Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 10  $\mu$ L y los componentes se presentan en la tabla 11.

**Tabla 11** Componentes de digestión con endonucleasas de restricción del vector pET28b.

Componente	Concentración	Volumen	Temperatura/Tiempo
Buffer	10x	1 $\mu$ L	25°C/12h
pET28b linear	ND	3 $\mu$ L	
T4 ADN Ligasa	10 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	
Inserto ( <i>cusf</i> o <i>gst</i> )	ND	5 $\mu$ L	

### 2.4.3 Transformación de *E. coli*

En el proceso de transformación bacteriana se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  como vehículo de clonación de la cual se preparó un lote de células rubidio-competentes.

Las células se resuspendieron en el buffer (50  $\mu$ L) que las mantiene en criopreservación y se agregaron los 10  $\mu$ L del producto de ligación pET28b-CusFp, pET28b-CusFc o pET28b-GST, de manera simultánea se llevó un blanco. Una vez mezcladas las células competentes y el plásmido se incubaron en hielo durante 20 minutos con una agitación suave cada 5 minutos, al pasar el período de incubación se realizó el choque térmico en baño de agua a 42°C durante 45 segundos e inmediatamente se colocaron los tubos en baño de hielo por 2 minutos, posteriormente se agregaron 800  $\mu$ L de medio LB y se puso en incubación a 37°C por 30 minutos en agitación de 220 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras y el control se centrifugaron a 13000 rpm por 2 minutos, se desecharon 800  $\mu$ L del sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el volumen restante. Las muestras y el control negativo se sembraron en cajas Petri con medio Agar LB con kanamicina 30  $\mu$ g/mL. Las placas de agar fueron incubadas a 37°C por 16 horas y una vez cumplido este tiempo, se seleccionaron las colonias para llevar a cabo la inoculación en caldo LB con kanamicina e incubar 16 horas a 37°C, transcurrido el tiempo se realizó la extracción de plásmido con el kit *StrataPrep Plasmid Miniprep* de 5 colonias de cada una de las ligaciones.

#### 2.4.4 Confirmación de la clonación de los genes *cusf* y *gst*

Posterior a la extracción y purificación de ADN plasmídico con el kit *StrataPrep Plasmid Miniprep* se confirmó mediante PCR la presencia de la secuencia de los genes de las proteínas CusF y GST. Dicha amplificación se llevó a cabo con las mismas condiciones descritas en las tablas 2 y 3 a excepción de la variación de los iniciadores, los utilizados en esta ocasión corresponden al promotor y terminador T7 y posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.7% (m/v) para confirmar la amplificación.

### **2.5 Obtención del ADN de los genes *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovR* e *iaa9***

#### 2.5.1 Diseño de iniciadores:

Se diseñaron iniciadores específicos con el propósito de tener una gama de diversas proteínas a probar para la eficiencia de CusF como péptido de fusión, las secuencias codifican las proteínas PAP2, NDPK2, IMB1, GFP, LovR e IAA9 (obtenidas de plásmidos con los cuales se contaba previamente y estos provienen de *Arabidopsis thaliana*). En dicho diseño de iniciadores se consideró incluir el codón de inicio de la transcripción (ATG) para el segmento amplificado de 5´ a 3´ (iniciador derecho). El iniciador que amplifica el segmento de 3´ a 5´ (iniciador reverso) incluye el codón de terminación de la transcripción (ATC). Además los iniciadores incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción XhoI para el reverso y NotI para el derecho (Tabla 12).

**Tabla 12** Secuencia de iniciadores empleados en amplificación de los genes *cusf* y *gst*.

Iniciadores	Secuencia 5' a 3'
Iniciador derecho GFP	5'-agtcagtgccggccgcagtggtgagcaagggcgaggag-3'
Iniciador reverso GFP	5'-agtcagctcgagttattcgtgccattcgatttctgag-3'
Iniciador derecho IMB1	5'-agtcaggcggccgcagtgctgtacatgtcaaggagg-3'
Iniciador reverso IMB1	5'-agtcagctcgagtcaagcttcttagctctttaattgaa-3'
Iniciador derecho IAA9	5'-agtcaggcggccgcagtgccgaagagc-3'
Iniciador reverso IAA9	5'-agtcagctcgagttaagctctcatcttcgatttctcc-3'
Iniciador derecho NDPK2	5'-agtcaggcggccgcagtggtgggagcgactgtagttag-3'
Iniciador reverso NDPK2	5'-agtcagctcgagtcactcccttagccatgtagctagag-3'
Iniciador derecho PAP2	5'-agtcaggcggccgcagtgctgtatctgtagcagcag-3'
Iniciador reverso PAP2	5'-agtcagctcgagctagttcctgcttctgcacttctc-3'
Iniciador derecho LovR	5'-agtcaggcggccgcagtgagccggccagcgctcg-3'
Iniciador reverso LovR	5'-agtcagctcgagtcaggtcaggtgtcaaccacgc-3'

### 2.5.2 Amplificación de las secuencias génicas de *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovr* e *iaa9*

Para llevar a cabo la obtención de las primeras moléculas de DNA correspondientes a las secuencias de las proteínas PAP2, NDPK2, IMB1, GFP, LovR e IAA9, se puso en marcha el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para este propósito se realizó un coctel de concentración variable (dependiente del número de muestras a amplificar) con los componentes constantes en una reacción de este tipo (*Vent* DNA Polimerasa, Sales, agua, Mg(II) y dNTPs). Los componentes variables tales como:

iniciadores y DNA se utilizaron tal como se indica en la Tabla 4. Todas las reacciones, tanto muestras como blancos, se llevaron a cabo en un volumen de 50  $\mu$ L.

Una vez hechas las diluciones apropiadas para cada muestra se sometieron al desarrollo de los ciclos de temperatura en un Termociclador de Gradientes (Corbett Research CG1-96). Los ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a la PCR se presentan en la Tabla 7.

Para confirmar la amplificación del DNA se analizaron todas las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (m/v). Una vez revelado el resultado de la PCR, se seleccionaron las muestras con mejor resolución de la banda de amplificación para continuar con los procesos de amplificación de inserto por PCR con fines de clonación molecular en un vector plasmídico y transformación de *E. coli* para la utilización de dichos plásmidos en una nueva inserción de genes de interés.

## **2.6 Clonación molecular de los genes *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lov* e *iaa9***

### 2.6.1 Reacciones de digestión enzimática

Para llevar a cabo las digestiones con enzimas (endonucleasas) de restricción, se realizó un cambio de buffer de las amplificaciones de *cusf* y *gst*, esto para mejorar el rendimiento de ligación. Las amplificaciones fueron sometidas a la

digestión con endonucleasas de restricción NotI y XhoI. Las condiciones y concentraciones de reacción se presentan en la tabla 13. Las digestiones se realizaron en un volumen total de 40  $\mu$ L.

**Tabla 13** Componentes de digestión con endonucleasas de restricción de *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovr* e *iaa9*

Componente	Concentración	Volumen	Tiempo
ADN	N/D	30 $\mu$ L	3h
Buffer 3	10x	4 $\mu$ L	
BSA	10x	4 $\mu$ L	
XhoI	---	1 $\mu$ L	
NotI	10 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	1h

Además se realizó la linearización del vector plasmídico pET28b-CusF y de pET28b-GST, para la clonación de los genes previamente mencionados, los cuales contienen un sitio de multiclonación dentro de su estructura y el gen de resistencia a Kanamicina. En la tabla 14 se describen las condiciones y los componentes de las reacciones de digestión plasmídica.

**Tabla 14** Componentes de digestión con endonucleasas de restricción de los vectores pET28b-CusF y pET28b-GST.

Componente	Concentración	Volumen	Tiempo
ADN		30µL	3h
Buffer 3	10x	4 µL	
BSA	10x	4 µL	
XhoI	---	1 µL	
NotI	10 U/ µL	1µL	1h
SAP	10 U/ µL	1µL	1h

### 2.6.2 Reacciones de ligación de los genes *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovr* e *iaa9* con los vectores pET28b-CusF o pET28b-GST

Esta fase del proceso se realizó mediante la ligación del ADN de las proteínas *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovr* e *iaa9* con los vectores pET28b-CusF y pET28b-GST, ya digeridos, y una posterior transformación con células rubidio-competentes utilizando las cepas *E. coli* DH5α.

Al haber sido digeridos con las enzimas de restricción XhoI y NotI, tanto los genes como el vector presentan sitios digeridos complementarios, lo cual es necesario para llevar a cabo la ligación. Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 10 µL y los componentes se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15** Componentes de digestión con endonucleasas de restricción del vector pET28b

Componente	Concentración	Volumen	Temperatura/Tiempo
Buffer	10x	1 $\mu$ L	25°C/12h
pET28b-CusF o pET28b-GST lineares	N/D	3 $\mu$ L	
T4 ADN Ligasa	10 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	
Inserto ( <i>pap2</i> , <i>ndpk2</i> , <i>imb1</i> , <i>gfp</i> , <i>lovr</i> e <i>iaa9</i> )	N/D	5 $\mu$ L	

### 2.6.3 Transformación de *E. coli*

En el proceso de transformación bacteriana se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  como vehículo de replicación de la cual se preparó un lote de células rubidio-competentes. Se siguió el proceso descrito en el punto 2.2.3.

### 2.6.4 Confirmación de la clonación de los genes *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovr* e *iaa9*

Posterior a la extracción y purificación de ADN plasmídico con el kit *StrataPrep Plasmid Miniprep* se confirmó mediante una digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.7% (m/v) para confirmar la amplificación.

## 2.7 Expresión de proteínas recombinantes CusF-GFP y GST-GFP

### 2.7.1 Transformación en *E. coli*

Para llevar a cabo las expresiones de las proteínas se realizó una transformación en la cepa BL21(DE3), la cual carece de proteasas, haciéndola una cepa útil para la expresión proteica.

Las células se resuspendieron en el buffer (50  $\mu$ L) que las mantiene en criopreservación y se agregaron los 4  $\mu$ L del plásmido a transformar, de manera simultánea se llevó un blanco. Una vez mezcladas las células competentes y el plásmido se incubaron en hielo durante 20 minutos con una agitación suave cada 5 minutos, al pasar el período de incubación se realizó el choque térmico en baño de agua a 42°C durante 45 segundos e inmediatamente se colocaron los tubos en baño de hielo por 2 minutos, posteriormente se agregaron 800  $\mu$ L de medio LB y se puso en incubación a 37°C por 30 minutos en agitación de 220 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras y el control se centrifugaron a 13000 rpm por 2 minutos, se desecharon 800  $\mu$ L del sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el volumen restante. Las muestras y el control negativo se sembraron en cajas Petri con medio Agar LB con kanamicina 30  $\mu$ g/mL. Las placas de agar fueron incubadas a 37°C por 16 horas.

### 2.7.2 Expresiones piloto en tubos

Se seleccionaron las colonias para llevar a cabo la inoculación en 2 mL de caldo LB con kanamicina durante 6 horas, pasado el tiempo se añadió el inductor IPTG en una concentración final 1mM y se incubaron a 30°C por 16 horas, posteriormente se centrifugó el medio, se retiró el sobrenadante y el pellet se congeló a -20°C.

### 2.7.3 Expresiones en matraces triptinización

Se seleccionaron las colonias para llevar a cabo la inoculación en caldo LB con kanamicina durante 6 horas. Pasado el tiempo se inoculó 1 mL en 120 mL de caldo LB con kanamicina en matraz triptinización para aumentar la aireación para la bacteria, se dejó incubar hasta llegar a un OD<sub>600</sub> de 0.6 para agregar el inductor de la expresión, que es IPTG, en una concentración final 1mM y se incubó a 30°C por 16 horas, ya transcurrido el tiempo se centrifugó el medio, se retiró el sobrenadante y el pellet se congeló a -20°C.

### 2.7.4 Lisis Periplásmica

El pellet obtenido de la expresión piloto en matraces se resuspendió en 5 mL de una solución de sacarosa (30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8, 20% sucrosa) y se incubó 20 minutos a 25 °C con agitación suave. Posteriormente se llevó a centrifugación por 7 min y 10000 x g y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. El pellet restante se resuspendió en 2.5 mL de un buffer de fosfatos 50mM pH8 y se agregaron 20µL de un coctel de inhibidores de proteasas y se agitó vigorosamente para resuspender las células. Se llevó a centrifugación durante 7

min a 8000 x g, se retiró el sobrenadante cuidadosamente ya que ahí se encuentra el contenido periplásmico.

#### 2.7.5 Lisis celular de expresiones piloto

El pellet obtenido en las expresiones piloto en tubos se resuspendió en 40µL de agua y 10µL de *SDS sample buffer*, luego se incubó a 80°C en baño de agua durante 20 minutos, se llevó a centrifugación durante 10 minutos a máxima velocidad y se retiró el sobrenadante (fracción soluble). El pellet restante se resuspendió en 60 µL de buffer urea 8M pH8 y se incubó a 90 °C durante 15 minutos, se llevó a centrifugación y se tomó el sobrenadante (fracción insoluble).

#### 2.7.6 Lisis por homogenización con perlas de vidrio de expresión en matraces

Se centrifugó 1 L de muestra BL21(DE3)-CusFc-GFP y se resuspendió en 25 mL de búfer de fosfatos 50mM, NaCl 300 mM pH8. Se añadieron 25 ml de perlas de vidrio previamente lavados con detergente, a una cámara para disrupción. Se cerró la cámara y se colocó en otra cámara más grande, en la cual se vertió hielo, para evitar el calentamiento de la muestra. Ambas cámaras se colocaron en el homogenizador para llevar a cabo la disrupción. Dicho proceso fue llevado a cabo mediante el funcionamiento del homogenizador en 8 ciclos de 45 segundos con el homogenizador y 15 segundos de reposo. Posteriormente se separó la muestra de las perlas de vidrio y estos fueron lavados con 10 mL de solución de fosfatos 50mM, NaCl 300 mM pH8. Por lo

tanto el volumen final fueron 35 mL de lisado. Por último estos 35 mL fueron clarificados por centrifugación a 13300 rpm.

## **2.8 Confirmación de la expresión de las proteínas de fusión**

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) usando geles 4% y 10% de poliacrilamida, es decir, un sistema discontinuo, la elaboración de los geles se siguió según el protocolo proporcionado por la compañía Bio-Rad, la cantidad de muestra para la corrida del gel fue de 10  $\mu$ L por muestra y 7  $\mu$ L para el carril del marcador de peso molecular. Las condiciones de corrida fueron 100 voltios durante 10 minutos y 140 voltios durante 1 hora. Posteriormente se llevó a cabo la tinción en 50 mL de azul de Coomassie en agitación durante 30 minutos. El desteñido se realizó con 3 lavados de 50mL de agua ultrapura, los lavados se hicieron cada 10 minutos.

## **2.9 Cromatografía de afinidad con iones plata inmovilizados para la proteína CusF**

### **2.9.1 Elaboración de resina**

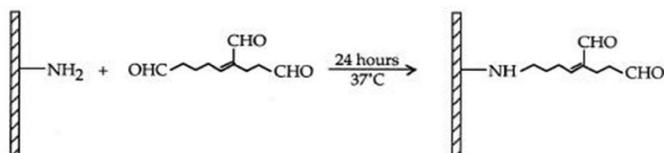
Para dicho proceso se utilizó Bio-Gel P2 (Bio-Rad), compuesto por poliacrilamida. El procedimiento de activación consistió en polimerizar una solución de glutaraldehído al 25% a 50°C durante 24 horas. Paralelamente se hidrató el Bio-Gel P2 con buffer de fosfatos 50mM pH 8 a temperatura ambiente

durante 24 horas (de acuerdo al procedimiento proporcionado por la compañía). Se añadió solución de glutaraldehído, ya polimerizada, en un radio de 20mL por 1 gramo de gel seco. Después de 24 horas de contacto con el glutaraldehído con agitación lenta el gel activado fue lavado con agua desionizada. Posteriormente en base a gramo de gel seco, 20mL de solución 1M tiourea fue añadida y se incubó a temperatura ambiente durante 22 horas con agitación lenta. La solución de tiourea fue decantada y el gel activado fue nuevamente lavado con agua desionizada. Por último se añadió una solución 1N de  $\text{AgNO}_3$  en un radio de 0.9 mL por cada 3.4 mL de resina activada con glutaraldehído y después de 36 horas de reacción el gel activado fue lavado con agua desionizada (Figura 3).

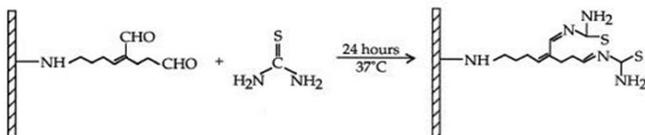
**Paso 1 Polimerización de glutaraldehído**



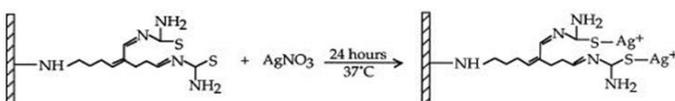
**Paso 2 Activación del grupo amino**



**Paso 3 Adición de tiourea**



**Paso 4 Adición de Nitrato de Plata**



**Figura 3** Esquema general de la elaboración de la resina con iones plata inmovilizados.

### 2.9.2 Etapas de unión y elución de la proteína CusFp-GFP

Para llevar a cabo la unión de la proteína CusFp con la resina con iones plata inmobilizados, se colocaron 1.8 mL de resina en una columna para cromatografía, se empaquetó pasando 30 mL de buffer de fosfatos 50mM pH8. Posteriormente se pasaron 5 mL de muestra de lisis periplásmica a través de la columna con resina 3 veces cada muestra esto para aumentar la cantidad de proteína unida a la resina, la elución se realizó en búfer de fosfatos 50mM, NaCl 300mM pH8 y gradiente de metionina de 1mM a 200mM para verificar la concentración a la cual se eluye mayor cantidad de proteína.

### 2.9.3 Etapas de unión y elución de la proteína CusFc-GFP

Para llevar a cabo la unión de la proteína CusFc se colocaron 1 mL de resina en los 35 mL de la muestra proveniente de la lisis por homogenización con perlas de vidrio, se incubó durante 30 minutos a 25°C con agitación suave. Posteriormente esta solución se vertió en la columna para cromatografía y se dejó llevar a cabo dicho proceso. Luego se lavó con búfer de fosfatos 50mM, NaCl 300mM pH8. Y por último se llevó a cabo la elución con 4 mL de búfer de fosfatos 50mM, NaCl 300mM, metionina 160mM pH8. Recuperando 1mL por cada 5 minutos y así obtuvimos 4 eluatos, 1 lisado y 1 fase no unida. A este método se le conoce como purificación batch.

## **2.10 Cromatografía de afinidad con iones Cu(II) de CusFc-GFP**

Para llevar a cabo la cromatografía de afinidad con iones Cu(II) se utilizó la resina Profinity IMAC de BioRad, en la cual solo se necesita inmovilizar dichos iones y se siguió el procedimiento proporcionado por la casa comercial BioRad específicamente el método batch. Para llevar a cabo la unión se utilizó un búfer de fosfatos 50mM, NaCl 300mM pH8 y se lavó la columna con la misma solución. Por último, para realizar la elución se utilizó un búfer 50mM, NaCl 300mM, metionina 50mM pH8.

## **2.11 Cromatografía de afinidad para la proteína de fusión GST-GFP**

Ya que, la proteína GST es nuestro control positivo y método de comparación, después de su expresión en matraces triptinización y su posterior lisis celular, se realizó cromatografía de afinidad y la confirmación de la purificación.

### **2.11.1 Purificación por método batch de GST-GFP**

Para llevar a cabo dicho proceso se siguió el protocolo de la resina Glutathione Sepharose 4B de la compañía GE Healthcare específicamente el método de purificación batch. Primeramente se añadió el lisado celular a la resina, ya preparada, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Transcurrido el tiempo se transfirió la mezcla a un tubo y se centrifugó a 500 x g por 5 minutos, después se decantó el sobrenadante. Se lavó la resina

por adición de 5 mL de búfer de unión por cada mL de resina y se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a 500 x g por 5 minutos y se decantó el sobrenadante y se repitió este lavado 2 veces más. Para eluir la muestra se utilizó búfer de elución, que contiene glutatión en un proporción de 0.5 mL por cada mL de resina y se incubó por 10 minutos con agitación suave. Por último se centrifugó a 500 x g por 5 minutos y se decantó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas.

## **2.12 Confirmación de la expresión y purificación de las proteínas de fusión**

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) usando geles 4% y 10% de poliacrilamida, es decir, un sistema discontinuo, la elaboración de los geles se siguió según el protocolo proporcionado por la compañía Bio-Rad, la cantidad de muestra para la corrida del gel fue de 5  $\mu$ L por muestra y 7  $\mu$ L para el carril del marcador de peso molecular. Las condiciones de corrida fueron 100 voltios durante 10 minutos y 140 voltios durante 1 hora. Posteriormente se llevó a cabo la tinción en 50 mL de azul de Coomassie en agitación durante 30 minutos. El desteñido se realizó con 3 lavados de 50mL de agua ultrapura, los lavados se hicieron cada 10 minutos. Y por último se tomaron las imágenes de cada uno de los geles.

## 2.13 Cuantificación de proteínas

Para realizar la cuantificación proteica se empleó el método Bradford el cual fue diseñado como se explica en la tabla 16 y se tomó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV/Vis.

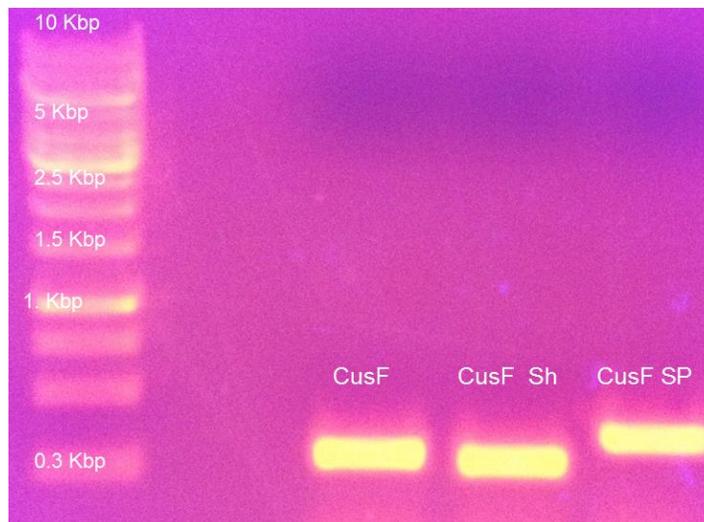
**Tabla 16** Diseño experimental de la cuantificación de proteínas por el método Bradford.

	Stock 5mg/mL	Agua	Reactivo Bradford
<b>Blanco</b>	0 $\mu$ L	100 $\mu$ L	1 mL
<b>Estándar 1</b>	25 $\mu$ L	75 $\mu$ L	1 mL
<b>Estándar 2</b>	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL
<b>Estándar 3</b>	75 $\mu$ L	25 $\mu$ L	1 mL
<b>Estándar 4</b>	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 mL
<b>Muestra</b>	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 mL

### 3 RESULTADOS

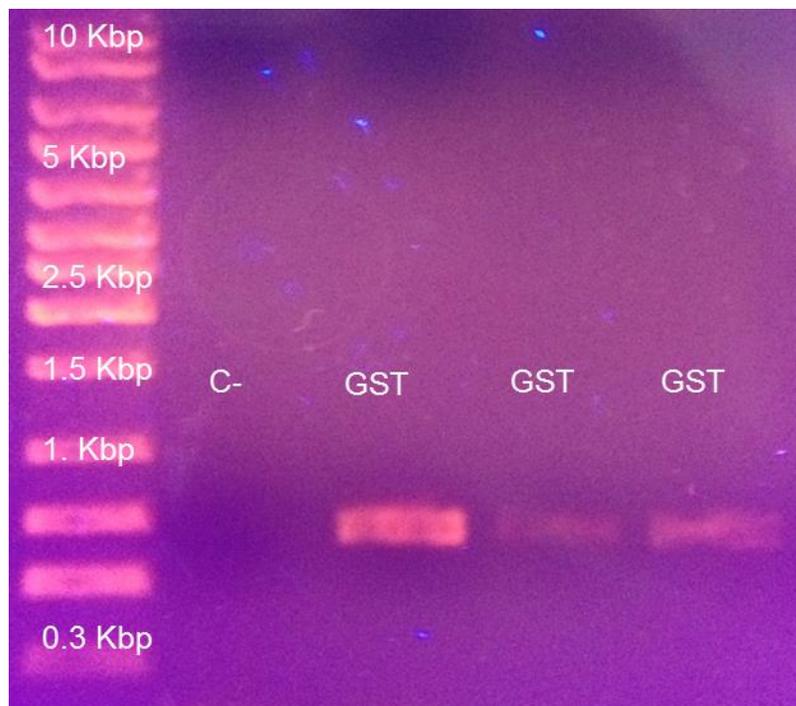
#### 3.1 PCR de secuencias *cusf* y *gst*

Las reacciones de PCR para los genes *cusf* (normal, corto(Sh) y con péptido señal (SP)) mostraron un producto de amplificación en el gel de agarosa de los productos de amplificación de aproximadamente 300 pb. Los productos de amplificación para el gen *cusf* se pueden apreciar en la figura 4. El tamaño del amplicón es similar a 333 pb reportado para el gen de la proteína CusFp.



**Figura 4** Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% (m/v) de la PCR para el gen de la proteína CusF. Marcador de peso molecular 1kb Ladder de Axygen.

Por otra parte, las reacciones de PCR para los genes *gst* mostraron un producto de amplificación en el gel de agarosa de los productos de amplificación de aproximadamente 600 pb. Los productos de amplificación para el gen *gst* se pueden apreciar en la figura 5. El tamaño del amplicón es similar a 606 pb reportado para el gen *gst*.



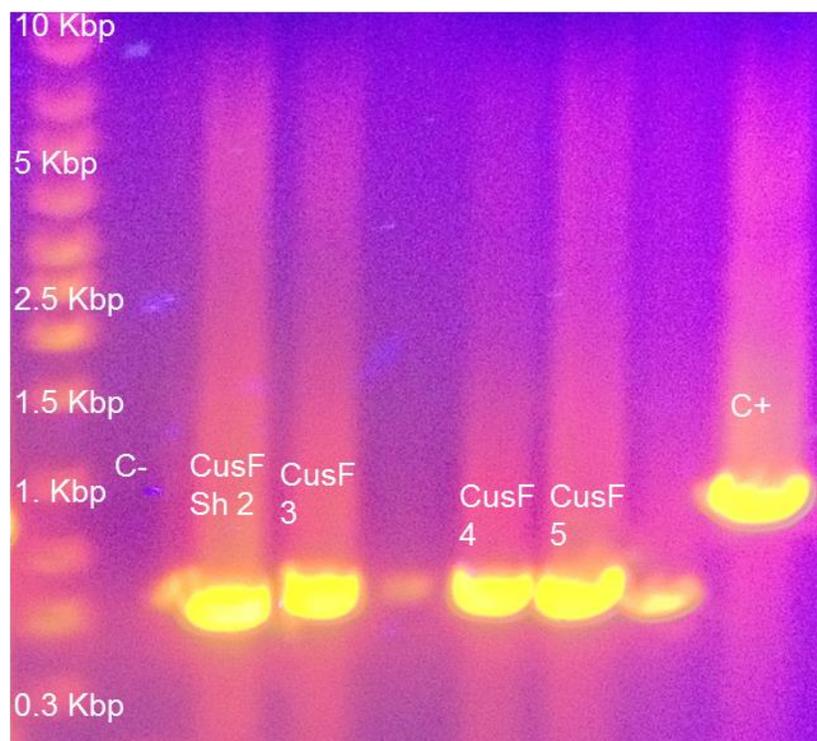
**Figura 5** Productos de amplificación en gel de agarosa al 0.7% (m/v) de la PCR para el gen de la proteína GST. Marcador de peso molecular 1kb Ladder de Axygen.

### 3.2 Clonación molecular de los genes *cusf* y *gst*

Posterior a las reacciones de digestión a las que fueron sometidas tanto el vector pET28b, así como los productos de amplificación de CusFp, CusFc y GST, se realizó la ligación de dichos genes con el vector. Se llevó a cabo la transformación de los productos de ligación en *E. coli* y se seleccionaron 3

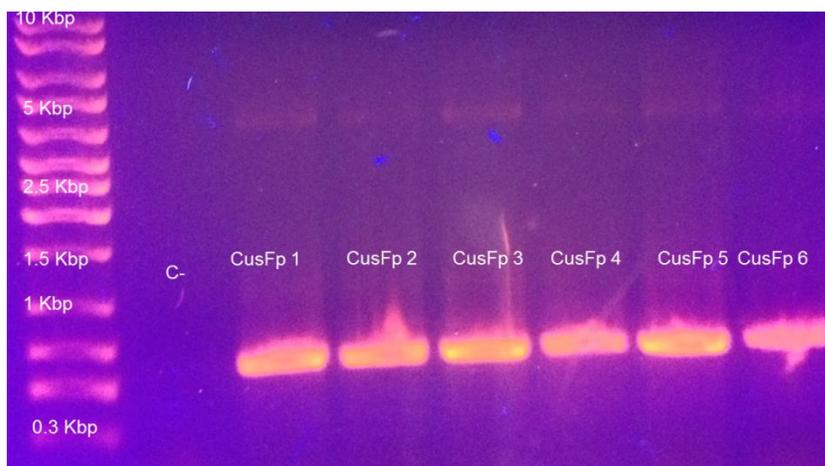
colonias transformantes con la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y el producto de ligación entre el plásmido pET28b con el producto de amplificación purificado de CusFp, CusFc y GST.

En la comprobación realizada por PCR (utilizando los primers comerciales T7) para las cepas transformantes entre pET28b con CusFc, se obtuvo una banda en el gel de agarosa al 0.7% ligeramente debajo de la banda de 500 pb del marcador de peso molecular de Axygen 1Kb Ladder, la banda de amplificación aumenta el tamaño debido al uso de los primers T7, esto se demuestra en las figura 6. La colonia 1 no se tomó en cuenta debido a que pertenecía a una contaminación bacteriana. Para ver tamaño molecular de cada gen ver tabla 5.



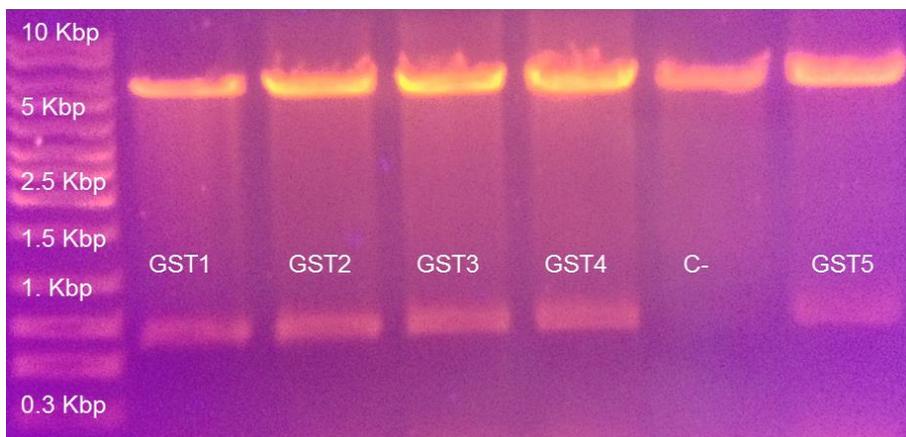
**Figura 6** Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína CusFc. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

En la comprobación realizada por PCR (utilizando los primers comerciales T7) para las cepas transformantes entre pET28b con CusFp, se obtuvo una banda en el gel de agarosa al 0.7% ligeramente debajo de la banda de 500 pb del marcador de peso molecular de Axygen 1Kb Ladder, las bandas de amplificación aumentan de tamaño debido al uso de los primers T7 esto se demuestra en las figura 7. Para ver tamaño molecular de cada gen ver tabla 5



**Figura 7** Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína CusFp. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen

En la comprobación realizada con enzimas de restricción (utilizando las enzimas BamHI y NdeI) para las cepas transformantes entre pET28b con GST, se obtuvo una banda en el gel de agarosa al 0.7% entre las bandas de 500 y 700pb del marcador de peso molecular de Axygen 1kb Ladder, lo cual corresponde al tamaño reportado de 606 pb, esto se demuestra en la figura 8.

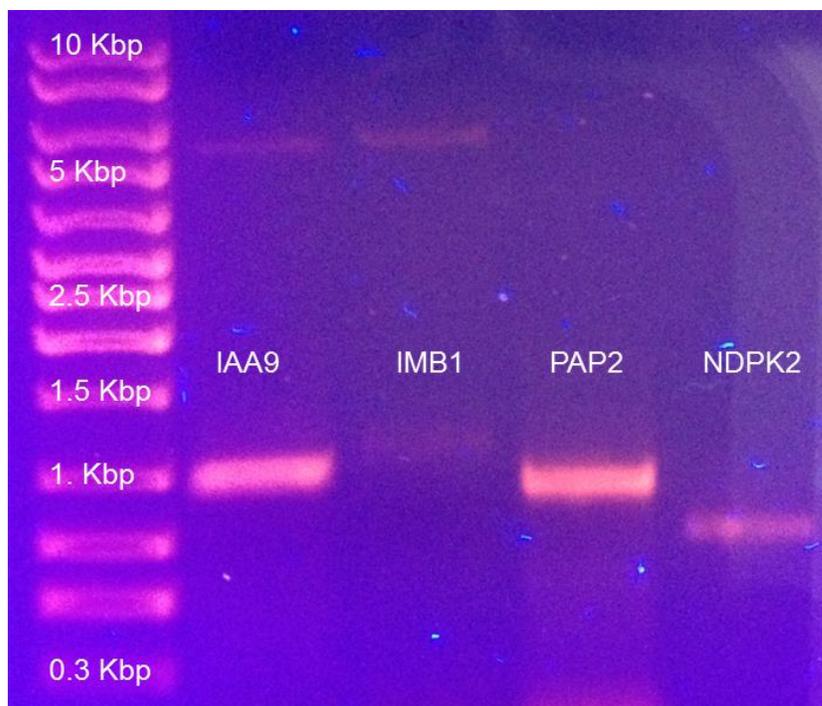


**Figura 8** Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con el gen de la proteína GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

### 3.3 PCR secuencias de genes de interés para su inserción en pET28b-CusF y pET28b-GST

#### 3.3.1 Secuencias de interés para pET28b-CusF

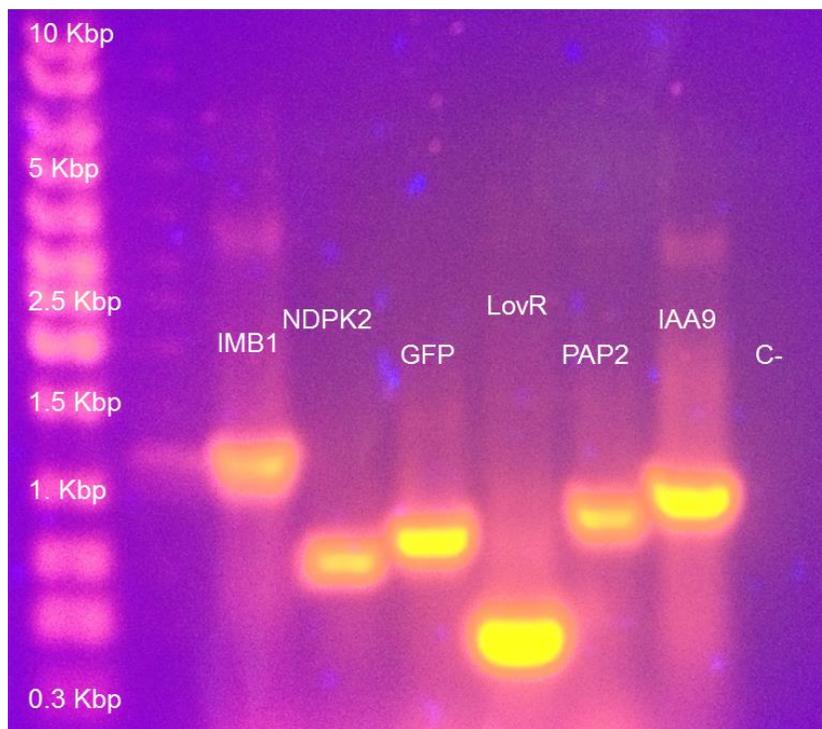
Las reacciones de PCR para los genes de las proteínas PAP2, NDPK2, IMB1, GFP e IAA9, mostraron productos de amplificación en el gel de agarosa 0.7% de los productos de amplificación de las bandas reportadas para cada gen (comparadas en Banco de genes, NCBI). Los productos de amplificación para los genes se pueden apreciar en la figura 9. Para la observación del tamaño molecular esperado ver tabla 5



**Figura 9** Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR de los genes de interés para su inserción en pET28b-CusFc. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

### 3.3.2 Secuencias de interés para pET28b-GST

Las reacciones de PCR para los genes de las proteínas PAP2, NDPK2, IMB1, GFP, LovR e IAA9, mostraron productos de amplificación en el de agarosa 0.7% de los productos de amplificación de las bandas reportadas para cada gen (comparadas en Banco de genes, NCBI). Los productos de amplificación para los genes se pueden apreciar en la figura 10.



**Figura 10** Productos de amplificación en gel de agarosa 0.7% (m/v) de la PCR de los genes de interés para su inserción en pET28b-GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

La amplificación de GFP mostrada en la figura 10 se utilizó en la ligación con pET28b-CusFc, pET28b-CusFp y pET28b-GST.

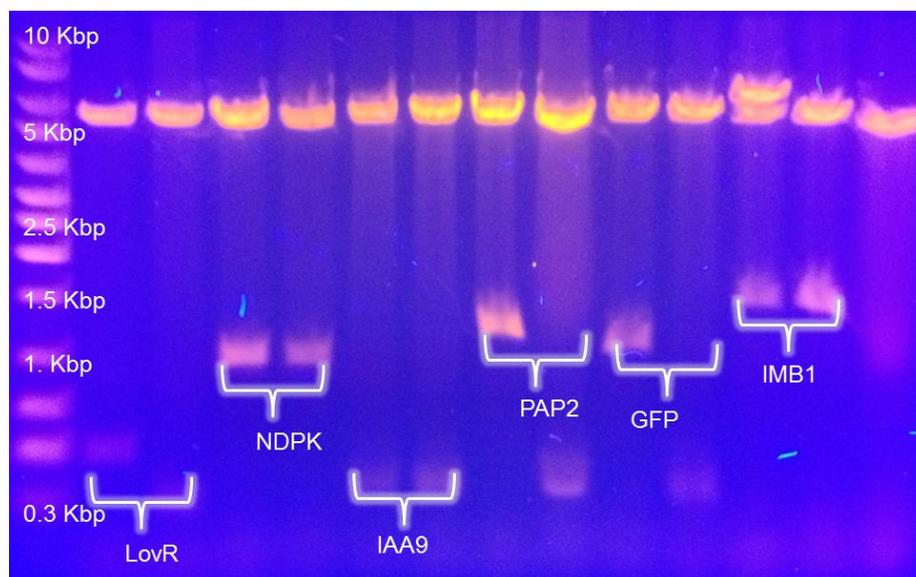
### **3.4 Clonación molecular de los genes *pap2*, *ndpk2*, *imb1*, *gfp*, *lovR* e *iaa9***

#### **3.4.1 Clonación molecular en pET28b-CusF**

Posterior a las reacciones de digestión a las que fueron sometidas tanto del vector pET28b-CusF, así como los productos de amplificación de PAP2, NDPK2, IMB1, GFP, LovR e IAA9, se realizó la ligación de dichos genes con el

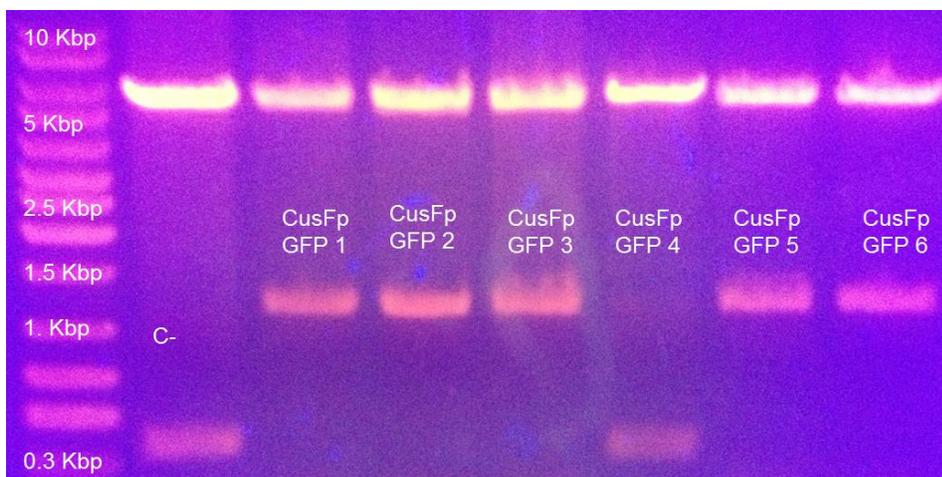
vector. Se llevó a cabo la transformación de los productos de ligación en *E. coli* y se seleccionaron 3 colonias transformantes con la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

En la comprobación realizada con enzimas de restricción (utilizando las enzimas XhoI y NdeI) para las cepas transformantes, se obtuvieron bandas en el gel de agarosa al 0.7%, correspondientes a las de los genes de interés con la proteína de interés, esto para las proteínas IMB1, GFP, PAP2 y NDPK2, esto se muestra en las figura 11.



**Figura 11** Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con los genes de interés y pET28b-CusFc. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

Además se obtuvieron 5 construcciones más con pET28b-CusFp y GFP (figura 12), pero la variante es que el gen de CusF contiene un péptido señal que lo hace migrar al periplasma.



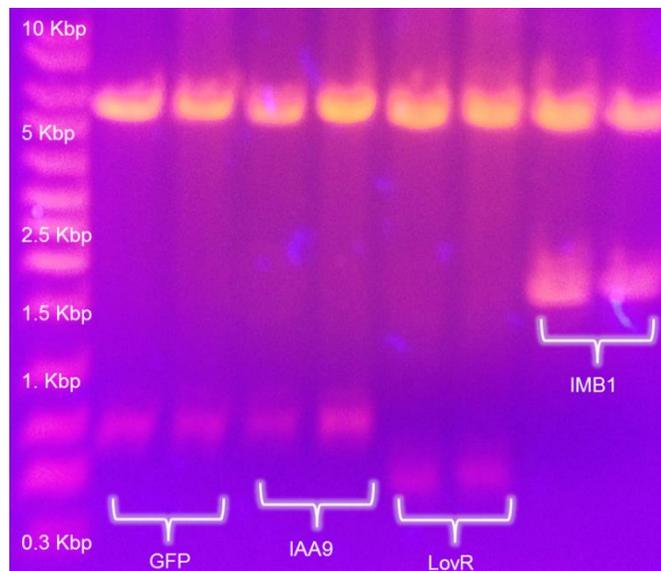
**Figura 12** Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con el gen de GFP y pET28b-CusFp. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

### 3.4.2 Clonación molecular en pET28b-GST

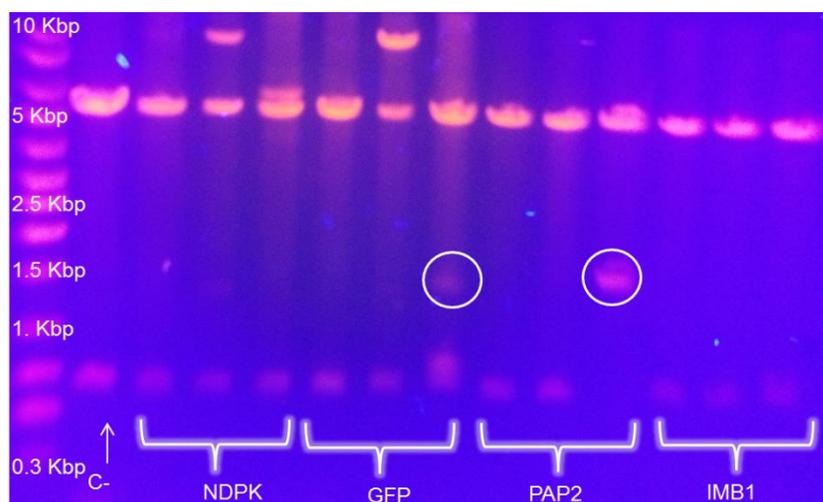
Posterior a las reacciones de digestión a las que fueron sometidas tanto del vector pET28b-GST, así como los productos de amplificación de PAP2, NDPK2, IMB1, GFP, LovR e IAA9, se realizó la ligación de dichos genes con el vector. Se llevó a cabo la transformación de los productos de ligación en *E. coli* y se seleccionaron 2 colonias transformantes con la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

En la comprobación realizada con enzimas de restricción (utilizando las enzimas XhoI y NdeI) para las cepas transformantes, se obtuvieron bandas en el gel de agarosa al 0.7%, correspondientes a las de los genes de interés con la proteína de interés, esto para la proteína IMB1 (figura 13) las demás construcciones no corresponden al tamaño esperado. Posteriormente se repitió

el proceso dando positivo para GFP y PAP2, los demás constructos no corresponden al tamaño molecular que se esperaba obtener (figura 14).



**Figura 13** Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con los genes de interés y pET28b-GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.



**Figura 14** Productos de digestión en gel de agarosa 0.7% (m/v) para las clonas transformantes con los genes de interés y pET28b-GST. Marcador de peso molecular 1Kb Ladder de Axygen.

En resumen, se obtuvieron las construcciones plasmídicas con CusF y GST que se presentan en la tabla 17.

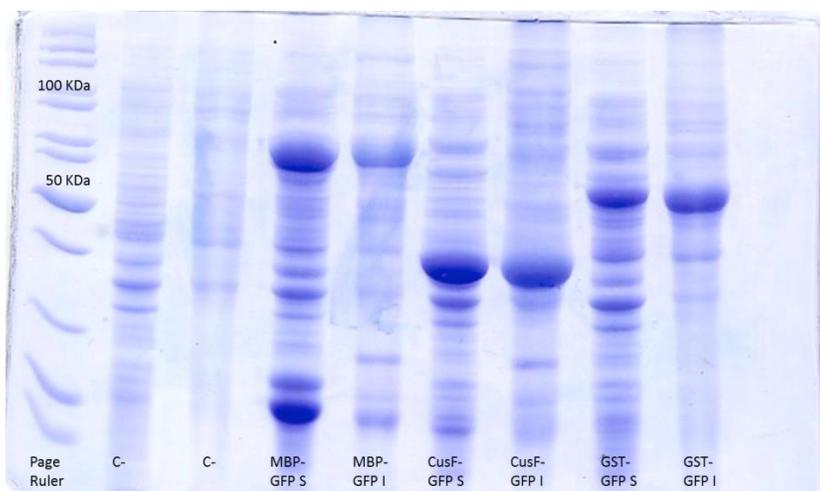
**Tabla 17** Construcciones plasmídicas obtenidas

Proteína de interés	CusFc	CusFp	GST
PAP2	✓	-	✓
IMB1	✓	-	✓
GFP	✓	✓	✓
NDPK2	✓	-	-
IAA9	-	-	-
LovR	-	-	-

### 3.5 Expresión de proteínas recombinantes CusFc-GFP, CusFp-GFP y GST-GFP

Posterior a las transformaciones de las construcciones plasmídicas en *E. coli* y la selección de las colonias necesarias para llevar a cabo la expresión de proteínas de fusión y las proteínas de interés, además de la congelación del pellet resultante, se realizó la lisis de las muestras de expresiones piloto y expresión en matraces triptinización.

Para la confirmación de la expresión de MBP-GFP, CusFc-GFP y GST-GFP se realizó SDS-PAGE y se analizó el patrón de expresión piloto, posterior a la lisis y obtención de fracción soluble e insoluble para cada proteína. Se decidió hacer la expresión con MBP para tener una comparación con otra proteína de fusión comercial. Los tamaños o pesos moleculares esperados son: MBP-GFP 66KDa, CusF-GFP 38KDa y GST-GFP 53KDa lo cual puede observarse en la figura 15.

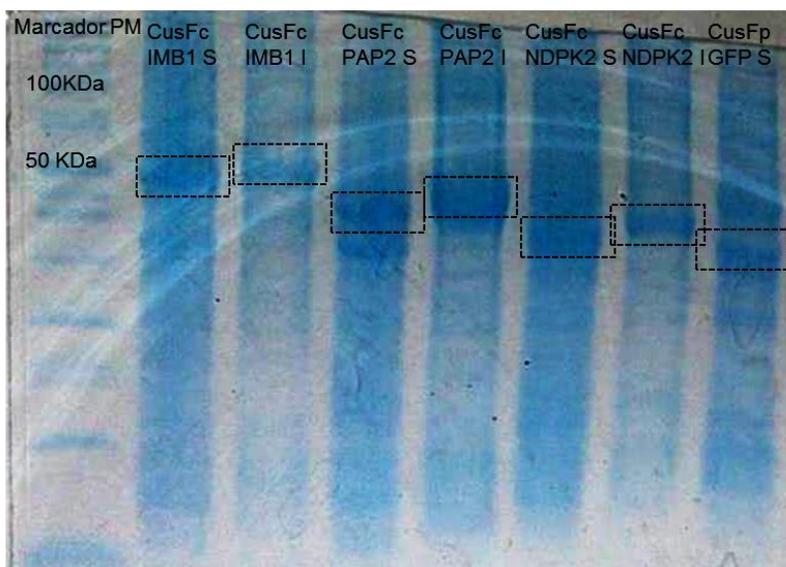


**Figura 15** Patrón de expresión de las proteínas de fusión MBP-GFP, CusFc-GFP y GST-GFP. S= Fracción soluble, I=Fracción insoluble. Marcador de peso molecular PageRuler unstained Protein Ladder de Thermoscientific.

### **3.6 Confirmación de expresión CusFc-PAP2, CusFc-IMB1, CusFp-GFP, CusFc-NDPK2**

Esto se llevó a cabo de acuerdo al método de SDS-PAGE en el cual se analizaron las fracciones soluble e insoluble de cada expresión, los tamaños moleculares esperados son: para CusFc-IMB1 51KDa, CusFc-PAP2 43KDa,

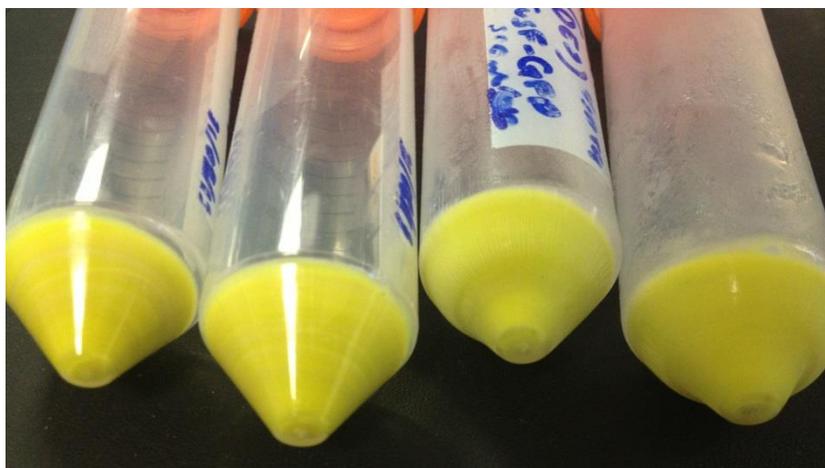
CusFc-NDPK2 35KDa y para CusFp-GFP 38.5 KDa lo cual se observa en la figura 16.



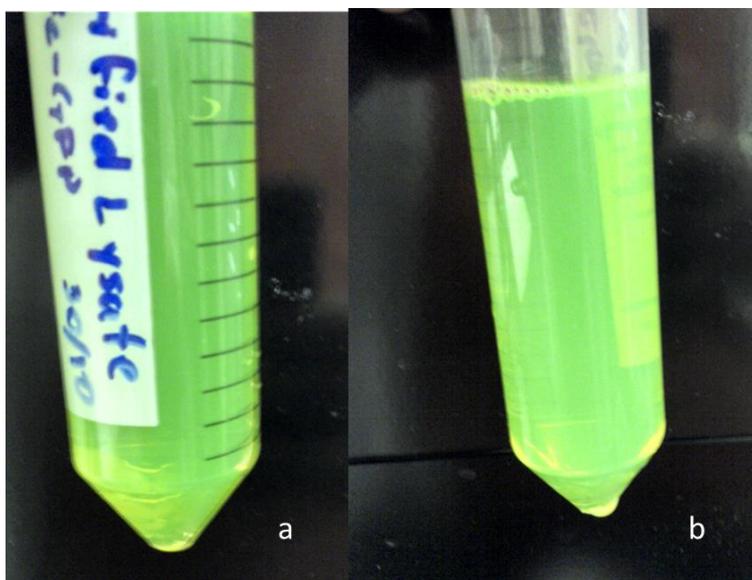
**Figura 16** SDS-PAGE de expresiones piloto de CusFc-PAP2, CusFc-IMB1, CusFc-GFP, CusFc-NDPK2. S= fracción soluble, I= fracción insoluble. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific.

### 3.7 Lisis celular por homogenización con perlas de vidrio de BL21(DE3)-CusFc-GFP

Para llevar a cabo la lisis celular por el método de homogenización con perlas de vidrio, el cual fue descrito en la sección 2.6.6 se obtuvieron pellets bacterianos de expresiones en matraces triptinización (Figura 17) y se colectaron las muestras, que posteriormente fueron empleadas para la cromatografía de afinidad (Figura 18).



**Figura 17** Pellets de las expresiones en la bacteria BL21(DE3) con las proteínas CusFc-GFP.



**Figura 18** Ambas imágenes corresponden a lisados proteicos, disueltos en solución de fosfatos 50mM, NaCl 300 mM pH8 del cual se utilizaron 32 ml para obtener dicho lisado.

### 3.8 Cromatografía de afinidad de CusFp con iones plata inmovilizados

#### 3.8.1 Elaboración de resina

La apariencia de la resina activada y con iones plata inmovilizados, fue homogénea, viscosa, de color blanco (figura 19), características muy particulares de las resinas para cromatografía de afinidad.



**Figura 19** Bio-Gel P2 activada con glutaraldehído, tiourea y iones plata inmovilizados.

Una prueba de estabilidad para la resina fue la exposición a temperatura ambiente y buffer de fosfatos pH 8, la cual arrojó como resultado un tiempo de ennegrecimiento de 6 horas (figura 20).



**Figura 20** Resina activada con iones plata inmovilizados, resultante de la prueba de estabilidad a temperatura ambiente y buffer de fosfatos pH 8.

Posteriormente se realizó la misma prueba de estabilidad a temperatura de 4°C y buffer de fosfatos pH 7, arrojando una estabilidad mayor a 7 días con una ligera oxidación (figura 21).



**Figura 21** Resina activada con iones plata inmovilizados, resultante de la prueba de estabilidad a 4°C y buffer de fosfatos pH 7.

### 3.8.2 Etapas de unión y elución de la proteína CusFp-GFP

En la etapa de unión se observó un cambio de color de la resina a un verde amarillento, indicando por tal, la unión de CusFp-GFP a dicha resina (figura 22). Después de la unión a la resina de las proteínas recombinantes, se realizó la elución de las muestras con una solución de histidina a una concentración 60mM.



**Figura 22** Aspecto de la resina, posterior al experimento de unión con la CusFp-GFP.

### **3.9 Cromatografía de afinidad de CusFc-GFP con iones plata inmovilizados**

Se llevó a cabo la cromatografía de afinidad para las muestras, proveniente de la lisis celular por la técnica de homogenización con perlas de vidrio, con la resina con iones plata inmovilizados. En la Figura 23 se puede observar el cambio de coloración de la resina, de color blanco a amarillento, al ser sometida al proceso cromatográfico.



**Figura 23** Aspecto de resina, posterior a la cromatografía de afinidad con CusFc-GFP.

### **3.10 Cromatografía de afinidad de CusFc con iones Cu(II) inmovilizados**

Al llevar acabo la cromatografía de afinidad de la expresión de CusFc-GFP y la resina con iones Cu(II) inmovilizados, se obtuvieron muestras de fase no unida de 2 mL, 1 mL en cada uno de los 3 lavados y 4 eluatos de 0.5 mL cada uno.

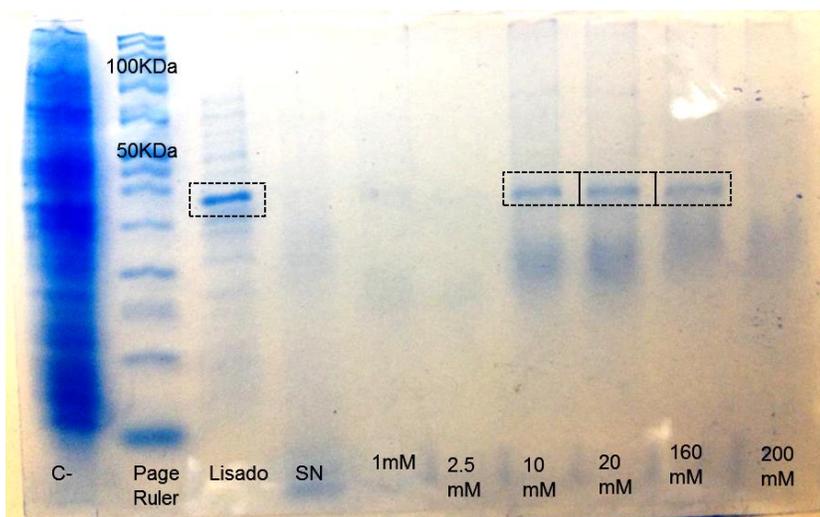
### **3.11 Cromatografía de afinidad de GST-GFP**

Después de realizar el proceso de cromatografía de afinidad que se describió en la sección 2.11 se obtuvo 1 mL de eluato.

### **3.12 Confirmación de la purificación de CusFp-GFP, CusFc-GFP y GST-GFP**

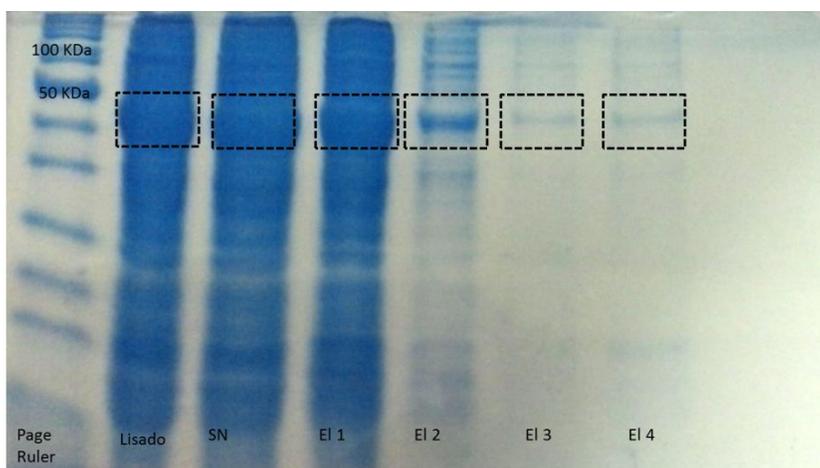
Con la SDS-PAGE se determinó si la purificación de las proteínas de fusión CusFp-GFP, CusFc-GFP y GST-GFP se había realizado exitosamente y esto se aprecia en las figuras 24, 25 y 26 respectivamente.

Las muestras de eluatos para la cromatografía afinidad de CusFp-GFP y la resina con iones Ag(I) inmovilizados, fueron de 0.5 mL con el buffer de fosfatos 50mM, NaCl 0.3 M, metionina 160mM pH8



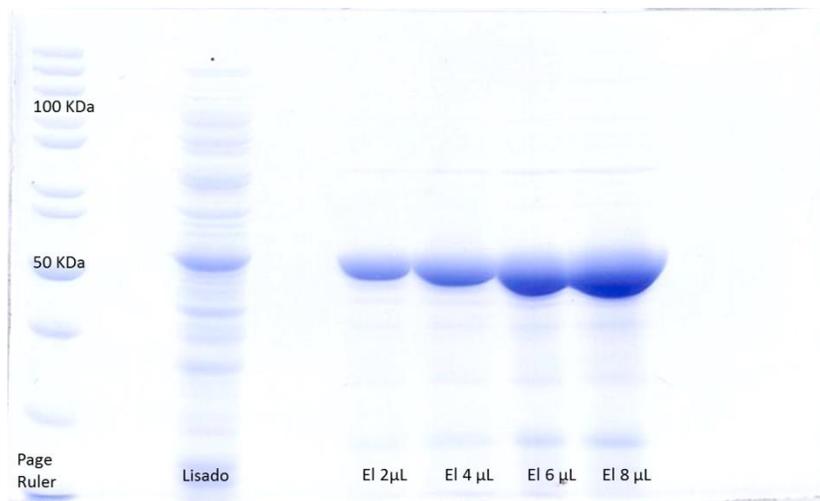
**Figura 24** SDS-PAGE de purificación de CusFp-GFP con resina de plata. SN= fase no unida, mM= concentración milimolar de metionina. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific,

Las muestras de eluatos para la cromatografía de afinidad de CusFc-GFP y la resina con iones  $\text{Ag(I)}$ , fueron de 0.5 mL con el buffer de fosfatos 50mM, NaCl 0.3 M, metionina 160mM pH8



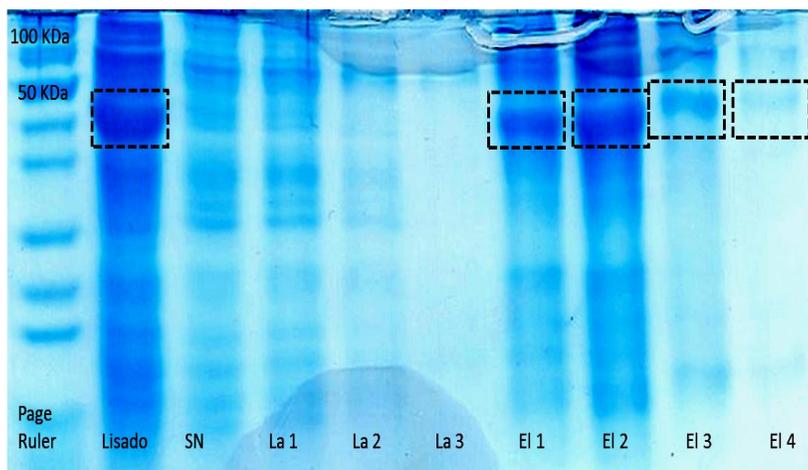
**Figura 25** SDS-PAGE de purificación de CusFc-GFP con resina de plata. SN= fase no unida, EI= eluato 160 mM metionina. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific.

Las muestra de eluato para la cromatografía de afinidad de GST-GFP y la resina Sepharose® fue de 1 mL con el buffer de elución que contiene glutatión.



**Figura 26** SDS-PAGE de purificación de GST-GFP. El= eluato. Marcador de peso molecular PageRuler Unstained Protein Ladder de Thermoscientific.

Las muestras de eluatos para cromatografía de CusFc-GFP y la resina con iones Cu(II) fueron de 0.5 mL con el buffer de fosfatos 50mM, NaCl 0.3 M, imidazol 50mM pH6.



**Figura 27** SDS-PAGE de purificación de CusFc-GFP con resina de cobre. SN= Fase no unida, La= Lavado, El= Eluato con 50 mM imidazol.

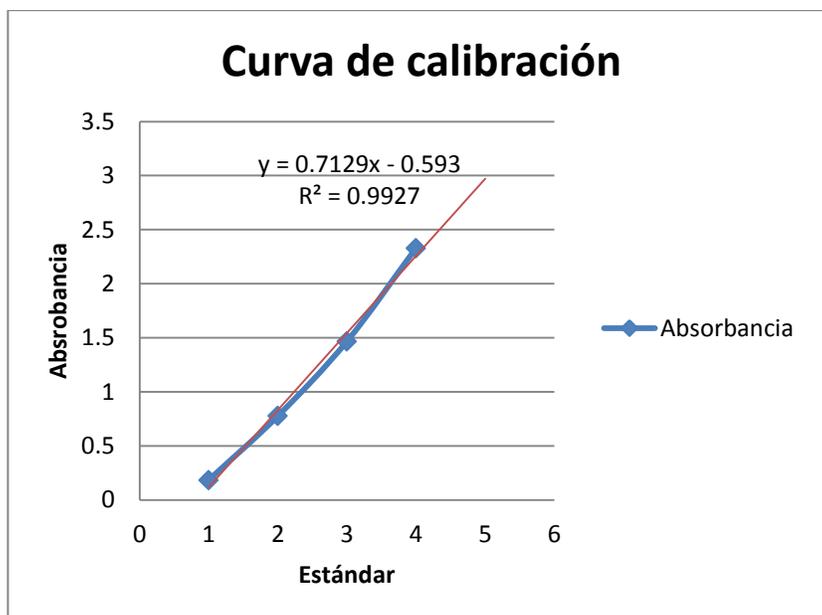
### 3.13 Cuantificación de proteínas

Para llevar a cabo este procedimiento se tomaron las muestras provenientes de la cromatografía de CusFc-GFP con la resina de cobre y se siguió la metodología mencionada en el punto 2.12

#### 3.13.1 Curva de calibración del método Bradford

**Tabla 18** Curva de calibración del método Bradford

	<b>Stock 5mg/mL</b>	<b>Agua</b>	<b>Reactivo Bradford</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>Blanco</b>	0 $\mu$ L	100 $\mu$ L	1 mL	0
<b>Estándar 1</b>	25 $\mu$ L	75 $\mu$ L	1mL	0.184
<b>Estándar 2</b>	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL	.776
<b>Estándar 3</b>	75 $\mu$ L	25 $\mu$ L	1 mL	1.467
<b>Estándar 4</b>	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 mL	2.33



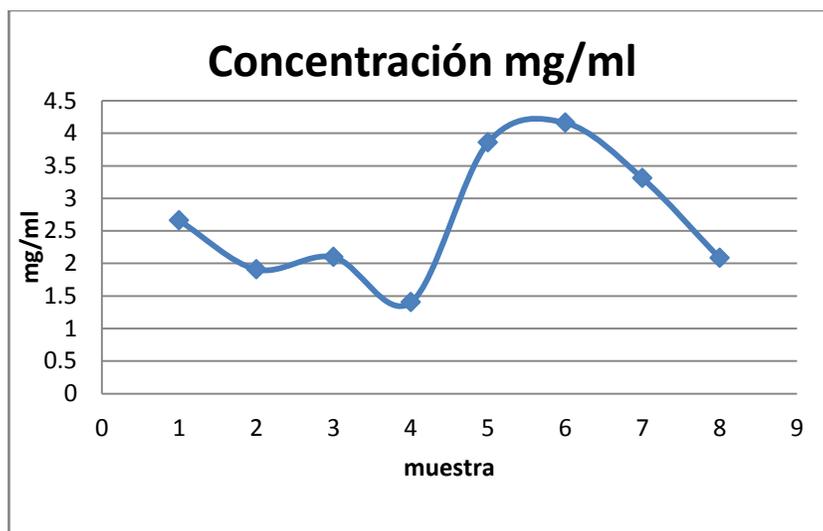
**Figura 28** Gráfica de absorbanza de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.

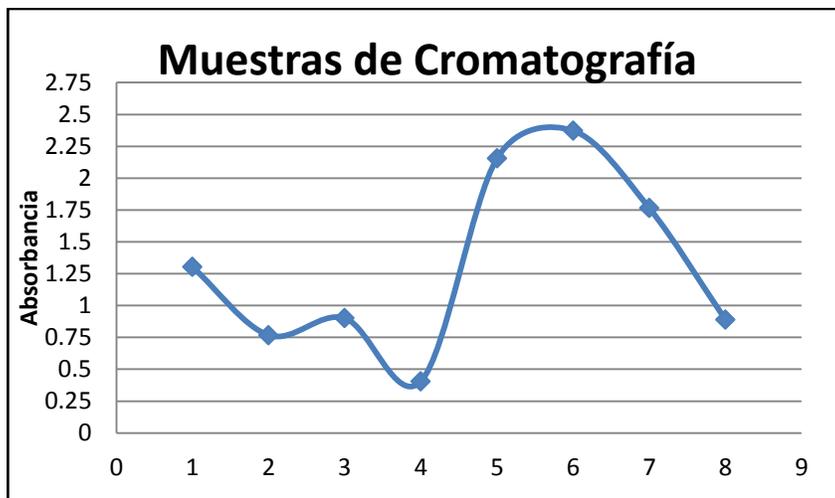
### 3.13.2 Lectura de absorbanza de muestras proteicas

La lectura de la absorbanza se llevó a cabo a una longitud de onda de 595 nm para todas las muestras obtenidas de la cromatografía de afinidad de la proteína CusFc-GFP y la resina de con iones Cu(II) inmovilizados. La tabla 18 muestra los resultados de dichas lecturas. Las figuras 28 y 29 son representaciones gráficas de los resultados obtenidos de absorbanza y concentración de las muestras anteriormente mencionadas.

**Tabla 19** Lectura de absorbancia de muestras y cálculo de concentración.

No. De muestra	Muestra	Volumen de muestra	Agua	Reactivo Bradford	Absorbancia	Concentración mg/mL
	Lisado	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	2.36	4.14223
1	SN	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	1.303	2.6595
2	La 1	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	0.768	1.9091
3	La 2	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	0.901	2.0956
4	La 3	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	0.406	1.40131
5	EI 1	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	2.155	3.8454
6	EI 2	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	2.372	4.159
7	EI 3	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	1.765	3.30761
8	EI 4	100 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 ml	0.89	2.08023

**Figura 29** Gráfica de concentración de las muestras obtenidas de la cromatografía de afinidad de CusFc-GFP y resina con iones Cu(II).



**Figura 30** Gráfica de absorbancias de las muestras obtenidas de la cromatografía de afinidad de CusFc-GFP y resina con iones Cu(II).

## 4 DISCUSIÓN

Las proteínas de fusión son sumamente importantes para la producción de proteínas recombinantes, ya que además de aumentar la solubilidad de éstas, evitando la formación de cuerpos de inclusión, permiten la purificación por medio de cromatografía de afinidad. Dentro de los métodos cromatográficos para la purificación de proteínas el de afinidad es el más empleado por los investigadores, ya que es el más rápido y directo sin necesidad de preparar gradientes, como en el caso de la cromatografía de intercambio iónico, o concentrar las muestras a volúmenes muy pequeños como para la cromatografía de exclusión. Claro, es muy probable que para obtener una proteína 100% pura sea necesario hacer varios pasos cromatográficos, el procedimiento más común es la cromatografía de afinidad, seguida por intercambio iónico y finalmente hacer una cromatografía de exclusión para determinar la estructura cuaternaria.

En el presente estudio se empleó *E. coli* cepas BL21(DE3) para expresión, debido a la carencia de algunas proteasas que al momento de la expresión son indeseables y DH5 $\alpha$  para clonación debido a la carencia de DNAsas las cuales degradarían el plásmido,. El diseño de los iniciadores empleados para la amplificación de los genes resultó efectivo para este propósito lo cual fue demostrado mediante electroforesis en gel de agarosa donde se demostró especificidad [25].

La clonación de los genes en el plásmido vector se realizó de manera adecuada con el uso de enzimas de restricción, ligación con T4 ADN ligasa, la consecuente transformación en *E. coli*, extracción de ADN plasmídico y el análisis de restricción de cada construcción, esto se determina ya que los análisis de restricción dieron positivos para la fusión de pET28b-CusFp-GFP, pET28b-CusFc-GFP, pET28b-CusFc-IMB1, pET28b-CusFc-PAP2, pET28b-CusFc-NDPK2, pET28b-GST-GFP, pET28b-GST-IMB1, pET28b-GST-PAP2. Todas estas construcciones sirven para que al momento de ser expresadas se pueda relacionar a CusF con diferentes tamaños de proteína y así establecer un rango de pesos moleculares con los cuales CusF tiene una eficiencia alta como proteína de fusión.[25]

La gran variedad que existe entre las proteínas a veces complica la elección de la proteína de fusión a utilizar; la proteína de unión a la maltosa (MBP) es definitivamente la proteína de fusión líder ya que se han visto niveles de expresión considerables de proteínas solubles [26]. Un inconveniente de la MBP es que es necesario por lo menos purificar 5mg de proteína para obtener 1mg de la proteína de interés, esto debido a su tamaño de 42 KDa. La glutatión S-transferasa también es una proteína de fusión muy utilizada y es necesario que esté plegada correctamente para que pueda unirse al glutatión inmovilizado en la resina, presenta niveles de expresión más bajos que la MBP y también se ha observado que es blanco de proteasas presentes en *E. coli* [27]. He aquí la necesidad de seguir buscando nuevas opciones de proteínas de fusión, como en este caso CusF, que puedan aminorar los problemas antes mencionados.

En la figura 15 se comparan los niveles de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) etiquetada con MBP, CusF y GST. Claramente se puede ver la aparición de bandas nuevas a 72 KDa para MBP-GFP, 40 KDa para CusF-GFP y 52 KDa para GST-GFP. En la misma figura además se puede apreciar la formación de cuerpos de inclusión para cada una de las proteínas debido a la presencia de la banda esperada en la fracción insoluble. Comparando las bandas, se puede observar que MBP es la proteína de fusión que más proteína soluble produce y GST la que menos, CusF produce una cantidad, de proteína soluble, muy parecida a MBP pero produce más cuerpos de inclusión, mientras que para GST, se observa que hay mayor producción de proteína insoluble que soluble.

La figura 15 además nos da una idea sobre la calidad de las proteínas, hasta cierto punto ya que es necesario realizar un ensayo Western Blot. En dicha imagen aparecen bandas nuevas en MBP-GFP (dos bandas alrededor de los 25 KDa) y GST-GFP (una banda alrededor de los 40 KDa) mientras que para CusF se observa una banda alrededor de los 25 KDa (con intensidad menor a MBP-GFP). Estas bandas seguramente corresponden a proteína degradada, lo cual se confirmará por medio de un ensayo Western Blot. La estructura de CusF, un barril con 5 plegamientos beta, es una característica importante que probablemente le brinda la resistencia a la degradación por proteasas [22]. Cabe mencionar que las tres proteínas de fusión produjeron cuerpos de inclusión, esto no es inusual ya que durante la expresión heteróloga de

proteínas en *E. coli* por lo regular siempre habrá producción de cuerpos de inclusión cuando se utiliza un sitio promotor fuerte y se produce gran cantidad de proteína en un corto tiempo [28].

Para la expresión de proteínas CusFp-GFP y GST-GFP, la apariencia del pellet de bacterias con inductor IPTG 0.1mM, se observaron de una tonalidad más clara que los pellet sin inductor, esto debido posiblemente al color arrojado por la proteína GFP que fue utilizada como reportera de plegamiento y expresión. Con el uso de CusFp también se obtuvo fracción soluble con GFP, la cual es insoluble en periplasma. Además en la expresión de CusFc-GFP la coloración del medio se tornó verde amarillento y esto se confirmó al centrifugar las células para obtener el pellet bacteriano con CusFc-GFP. Con respecto a los niveles de expresión de PAP2, IMB1 y NDPK2 (Figura 16), los resultados obtenidos no nos permiten hacer la misma comparación como con la GFP, ya que es necesario repetir la expresión de las proteínas y determinar la cantidad de proteína soluble e insoluble. Estos experimentos son importantes ya que nos indicarán si CusF es capaz de expresar proteínas eucarióticas de distintos tamaños. Lo que sí se puede determinar es que el uso de dicha proteína provee de fracciones solubles, a proteínas que por sí solas, serían totalmente insolubles, como lo es PAP2 lo cual se puede observar en la figura 16 [25].

En la lisis periplásmica se observó coloración verde amarillento tanto en los buffers de fosfatos con 20% sacarosa y buffer de fosfatos debido a la presencia de CusF-GFP en el medio. Y en la lisis por homogenización con perlas de vidrio

se observó la coloración verde fluorescente característica de la proteína GFP, lo cual indica una correcta expresión y plegamiento de la misma.

En la elaboración de la resina de poliacrilamida con iones plata inmovilizados para la separación de CusF-GFP, la prueba de estabilidad se tornó de color café oscuro debido a la presencia de sulfuro de plata libre, que se genera por la temperatura y pH más altos, en contraste con temperatura baja y pH neutro, la resina mantiene sus características, es decir, tiene mayor estabilidad en esas condiciones. Por otro lado el cambio de color de blanco a verde amarillento se debió a la unión de CusF-GFP a dicha resina cuando las muestras de fueron sometidas a la cromatografía de afinidad con la resina con iones plata inmovilizados [23].

Como se menciona en los antecedentes, CusF es una proteína encargada del transporte de los iones tóxicos Cu(I) y Ag(I), y utiliza dos metioninas y una histidina para la unión de estos metales[29]. Debido a la dificultad de mantener Cu(I) en solución, ya que tiende a oxidarse a Cu(II), se produjo una resina que puede inmovilizar iones Ag(I), ésta tiene la capacidad de retener fuertemente los aminoácidos metionina e histidina [23]. En principio esto permitiría la unión específica de CusF a la resina; la figura 24 muestra el SDS-PAGE donde se puede apreciar la unión del lisado del periplasma de células donde se expresó CusFp-GFP a la resina, pero se observa que prácticamente todas las proteínas presentes se unieron, mostrando falta de especificidad de CusF hacia la resina. Prácticamente lo mismo puede observarse para el lisado celular donde se

expresó CusFc-GFP, la falta de especificidad de CusF a la resina de Ag(I). Aunque se probaron diferentes condiciones, durante la incubación de los lisados con la resina, donde se variaban las concentraciones de NaCl, metionina, volumen de lisado, volumen de resina, temperatura y tiempo de incubación, no fue posible disminuir la unión inespecífica de otras proteínas; estas concentraciones iban desde 1 hasta 10 mM de metionina y 50 a 500 mM NaCl. Aunque CusF tiene más afinidad por los iones Ag(I) que la gran mayoría de las demás proteínas en *E. coli* *in vivo*, no fue posible reproducir este comportamiento *in vitro*, los iones Ag(I) son capaces de unir varios grupos funcionales, como los carboxilos (ácidos aspártico y glutámico), tioéter y tiol (metionina y cisteína), imidazol (histidina) y aminas (lisina) [30]. Esta alta capacidad de la plata para interactuar con varios aminoácidos permitió la unión de muchas proteínas a la resina de plata disminuyendo así la especificidad de CusF.

Aprovechando la capacidad que tiene CusF para también unir Cu(II), se decidió probar una columna funcionalizada con estos iones. Los resultados fueron más satisfactorios ya que claramente se puede observar en el gel de la figura 27 que CusFc-GFP es retenido y no eluye durante los lavados; en el paso de la elución con 50 mM imidazol claramente se ve la presencia de CusF-GFP. Debido a las condiciones suaves de este experimento, el buffer utilizado durante la unión y lavado de la columna no contenía imidazol, la pureza de CusF-GFP no es buena. Durante la cromatografía utilizando iones metálicos [Cu(II), Ni(II) y Co(II)] es siempre importante buscar las condiciones idóneas (las

concentraciones de imidazol y NaCl en los buffers de unión y lavado) para evitar interacciones iónicas no específicas, un problema muy común en este tipo de procedimientos [31].

En lo que concierne a la cuantificación de proteínas se puede observar el pico de concentración característico de la cromatografía de afinidad con lo cual podemos determinar que dicho proceso cromatográfico ocurre de manera correcta. Además se puede observar que la concentración de proteínas del eluato 2 es mayor que la del lisado, lo cual indica que hay una concentración de las proteínas, esto puede observarse en la figura 27.

En los experimentos SDS-PAGE para confirmación de purificación se determina que para la proteína GST-GFP si se realizó exitosamente la purificación. En contraste con CusFc-GFP en el cual se pueden observar bandas de inespecificidades de la muestra con la resina, a pesar, del uso de NaCl, el cual es utilizado para disminuir este efecto [1].

## 5 CONCLUSIONES

Por medio de PCR se obtuvieron el ADN de los genes *cusf* y *gst* lo cual es esencial para el desarrollo de 3 vectores pET28b-CusFp, pET28b-CusFc y pET28b-GST.

En este estudio la clonación molecular de los genes *gfp*, *pap2*, *imb1*, *ndpk2*, *lovr* e *iaa9* se realizó correctamente generando así las siguientes construcciones plasmídicas: pET28b-CusFp-GFP, pET28b-CusFc-GFP, pET28b-CusFc-IMB1, pET28b-CusFc-PAP2, pET28b-CusFc-NDPK2, pET28b-GST-GFP, pET28b-GST-IMB1, pET28b-GST-PAP2.

Las condiciones para la expresión de las proteínas de fusión CusFp-GFP (que contiene la proteína CusF que migra a periplasma) se lleva a cabo mediante la inducción con IPTG a una concentración final 1mM, una temperatura de 30°C y una agitación de 225 rpm en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). En cambio para las proteínas de fusión CusFc-GFP y GST-GFP la concentración de inductor requerida es 0.1mM.

De acuerdo a la confirmación de la expresión de las proteínas PAP2, NDPK2, IMB1 unidas a CusFc y de GFP a CusFp se concluye que la proteína CusF ayuda a la expresión de proteínas solubles, ya que, sin la presencia de CusF la proteína PAP2 sería insoluble y GFP no se plegaría en periplasma.

La activación del BioGel P2 de BioRad se lleva a cabo por el contacto de dicho gel con una solución de glutaraldehído al 25% (previamente polimerizada a 50°C), la siguiente solución con la que se puso en contacto es tiourea 1M y por último la inmovilización de iones plata se realiza con una solución de  $\text{AgNO}_3$  1N, todo el proceso de activación se lleva a cabo a 37°C y un tiempo de 24 horas por cada solución.

La unión de la proteína de fusión CusFp-GFP se lleva a cabo a una temperatura de 4°C en la resina con iones plata inmovilizados, en la cual es más estable dicha resina.

La unión de la proteína de fusión CusFc-GFP con la resina que contiene iones plata inmovilizados es menor en comparación con la unión que se lleva a cabo entre la proteína de fusión GST-GFP con la resina de Glutathione Sepharose 4B.

CusF-GFP demuestra afinidad cuando se utiliza una resina funcionalizada con Cu(II) para su purificación y solamente eluye a altas concentraciones de imidazol obteniendo mayores concentraciones de proteína.

El presente estudio demuestra que la purificación de CusFc-GFP no es equiparable, hasta el momento, con el método de purificación utilizando GST como proteína de fusión.

## 6 PERSPECTIVAS

1. Evaluar la expresión de diferentes proteínas heterólogas con CusF periplásmico o citoplásmico fusionado en el extremo N-terminal.
2. Continuar con la búsqueda de las condiciones idóneas para la purificación de CusF-GFP utilizando la resina funcionalizada con Cu(II).
3. Realizar preparaciones utilizando CusF periplásmico, ya que se podría obtener mayor pureza después de la cromatografía de afinidad.
4. Establecer métodos para remover CusF de la proteína de interés utilizando la proteasa trombina.
5. Expresar y purificar por lo menos un biofármaco, por ejemplo la hormona de crecimiento, utilizando CusF como proteína de fusión

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Terpe K. **Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to comercial systems.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. **60**:523-533.
2. Steinberg FM, Raso J. **Biotech Pharmaceuticals and Biotherapy: An Overview.** *J. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 1998. **01**:48-59
3. Kleinberg M, Mosdell K.W, **Current and future considerations for the new clases of biologicals.** *American Journal of Health System Pharmacy.* 2004. **61**: 695-708.
4. Kreuzer H, Massey A, **Recombinant DNA and biotechnology. A guide for teachers.** *ASM Press.* 1996.
5. Werner RG, **Economic aspects of comercial manufacture biopharmaceuticals.** *J. Biotechnol.* 2004. **113**:171-182.
6. Friesen JD, An G, **Expression vehicles used in recombinant DNA technology.** *Biotechnology Advances.* 1983. **01**:205-227.
7. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, **Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*.** *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2002. **35**: 91-105.
8. Walsh G. **Second- generation biopharmaceuticals.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2004. **58**: 185-196.
9. Walsh G. **Biopharmaceuticals: Recent approvals and likely directions.** *Trends in Biotechnology.* 2005.
10. Drago ME. Sainz TR. **Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes.** *Revista de la AFM.* 2006. **37**: 38-44.
11. Sivashanmugam A. Murray V. Cui C. Zhang Y. Wang J. Li Q. **Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*.** *Protein Science.* 2011. **18**: 936-948.
12. Katzen F, Chang G, Kudlicki W: **The past, present and future of cell-free protein synthesis.** *Trends Biotechnol.* 2005. **23**: 150-156.

13. Zhang A, Cantor EJ, Barshevsky T, Chong S. **Productive interaction of chaperones with substrate protein domains allows correct folding of the downstream GFP domain.** *Gene*. 2005. **350**:25-31.
14. Guana CD, Lib P, Riggsa PD, Inouyeb H. **Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein.** *Gene*. 1987. **67**:21-30.
15. Loftin IR, Franke S, Roberts SA, Weichsel A, Héroux A, Montfort WR, Rensing C, McEvoy MM. **A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF.** *Biochemistry*. 2005. **44**:10533-10540.
16. Nikaido H., Zgurskaya HI. **AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*.** *J Mol. Microbiol Biotechnol*. 2001. **3**:215-218.
17. Egler M, Grosse C, Grass G, Nies DH. **Role of the extracytoplasmic function protein family  $\sigma$  factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*.** *J Bacteriol*. 2005. **187**:2297-2307.
18. Maurer J, Jose J, Meyer TF. **Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions.** *J Bacteriol*. 1999. **181**:7014-7020.
19. Zárate X, Henderson DC, Phillips KC, Lake AD, Galbraith DW. **Development of high yield auto fluorescent protein microarrays using hybrid cell-free expression with combined *Escherichia coli* S30 and wheat germ extracts.** *Proteome Science*. 2010. **8**:32.
20. Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC. **Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein.** *Nat Biotechnol*. 1999. **17**:691-695.
21. Smith DB, Johnson KS. **Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.** *Gene*. 1988. **67**:31-40.
22. Joshua T. Kittleson, Isabell R. Loftin, Andrew C. Hausrath, Kevin P. Engelhardt, Christopher Rensing, and Megan M. McEvoy, **Periplasmic Metal-Resistance Protein CusF Exhibits High Affinity and Specificity for Both Cu(I) and Ag(I).** *Biochemistry*. 2006. **45**: 11096-11102
23. Garcia AA, Kim DH, Miles DR. **Immobilization of silver and platinum ions for metal affinity chromatography.** *React Polym*, 1994. **23**:249-259.

24. Ramírez-Vick JE, García AA, Leec J. **Immobilization of silver ions onto paramagnetic particles for binding and release of a biotin-labeled oligonucleotide.** *React Polym.* 2000. **43**: 53-62.
25. Alberts B. **Molecular Biology of the Cell.** *Garland Science.* USA. 2008. ISBN 978-0-8153-4106-2
26. Esposito D, Chattarjee DK. **Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags.** *Curr Opin Biotechnol.* 2007. **17**:353-358.
27. Kaplan W, Hüsler P, Klump H, Erhardt J, Sluis-Cremer N, Dirr H. **Conformational stability of pGEX-expressed Schistosoma japonicum glutathione S-transferase: A detoxification enzyme and fusion-protein affinity tag.** *Protein Science.* 1997. **6**:399-406.
28. Das A. **Overproduction of proteins in Escherichia coli: vectors, hosts, and strategies.** *Method Enzimol.* 1990. **182**:93-112.
29. Loftin I, Franke S, Blackburn N, McEvoy M. **Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of Escherichia coli CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorptin spectroscopy.** *Protein Science.* 2007. **16**:2287-2293.
30. Gruen LC. **Interaction of amino acids with silver(I) ions.** *BBA-Protein Struct M.* 1975. **386**:270-274.
31. Bolanos-Garcia VM, Davies OR. **Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography.** *Biochim Biophys Acta.* 2006. **1760**:1304-1313.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jesús Enrique Cantú Bustos

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE FUSIÓN INNOVADOR, CON LA PROTEÍNA CUSF, PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y BIOFÁRMACOS.

Campo de estudio: Farmacia

Biografía: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 4 de Julio de 1989, hijo de Rubén Cantú Aguilar y María del Carmen Bustos Romero.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2011.