



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Expresión y purificación parcial de la Metionina sulfóxido reductasa de *Arabidopsis thaliana***

**María Valenzuela Torres**

**Septiembre, 2016**





**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

**Grado en Biología**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

# **Expresión y purificación parcial de la Metionina sulfóxido reductasa de *Arabidopsis thaliana***

**María Valenzuela Torres**

**Jaén, Septiembre de 2016**



## ÍNDICE

1. Resumen/Summary.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Biotecnología y tecnología del ADN recombinante.....	3
2.1.1. Proteínas recombinantes.....	3
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	4
2.1.3. Sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	4
2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
2.3. Sistemas antioxidantes.....	6
2.3.1. Metionina Sulfóxido Reductasa B7 (MSRB7).....	6
3. Objetivos.....	7
4. Material y métodos.....	8
4.1. Cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
4.2. Extracción de ARNm.....	8
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa PCR).....	9
4.3.1. Transcripción reversa.....	9
4.3.2. Diseño de oligonucleótidos.....	9
4.3.3. Amplificación.....	9
4.4. Purificación de bandas.....	10
4.5. Clonación de bandas purificadas y reacciones de ligado.....	11
4.6. Transformación de <i>E. coli</i> Dh5 $\alpha$ competentes y siembra.....	11
4.7. Obtención de ADN plasmídico.....	12
4.8. Restricción de ADN plasmídico y análisis electroforético.....	13
4.9. Secuenciación.....	13
4.10. Obtención de la proteína recombinante, descripción general del sistema de expresión pFLAG-ATS.....	14
4.10.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	15
4.10.2. Extracción del ADN plasmídico.....	16
4.10.3. Cuantificación y PCR.....	16
4.10.4. Inducción de la proteína MSRB7 en cepas de <i>E. coli</i> .....	17
4.10.5. Determinación de la concentración de proteínas.....	18

4.10.6.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	18
4.10.7.	Purificación de la proteína MSRB7 por unión al anticuerpo monoclonal M2.....	19
5.	Resultados y discusión.....	21
5.1.	Obtención de proteínas recombinantes.....	21
5.1.1.	Análisis de los productos de PCR.....	21
5.1.2.	Análisis del patrón de proteínas obtenido tras la inducción de las cepas de <i>E. coli</i> BL21, C41 y TP1000.....	23
5.1.3.	Análisis de la purificación de la proteína MSRB7 por unión a anticuerpo monoclonal M2.....	26
6.	Conclusiones.....	28
7.	ANEXO I.....	29
8.	Bibliografía.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del vector de expresión pFLAG-ATS utilizado para la expresión de la proteína MSRB7.....	14
Figura 2.	Secuencia del marcador peptídico FLAG.....	15
Figura 3.	Esquema que representa algunos de los elementos que contiene el vector de expresión pFLAG-ATS. El MCS (sitio de multiclonación) contiene secuencias específicas para diferentes enzimas de restricción, dichas secuencias pueden ser utilizadas en el diseño de oligonucleótidos.....	16
Figura 4.	Productos de PCR control, donde se migró ADN plasmídico (vector de expresión pFLAG-ATS sin inserto) obtenido de 4 colonias distintas (1, 2, 3 y 4) de cada una de las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. MW (marcador de peso molecular conocido). (+) Control positivo con el ADN plasmídico sin inserto.....	21
Figura 5.	Productos de PCR de ADN plasmídico recuperado de las colonias positivas (vector de expresión pFLAG-ATS incluyendo el inserto de la secuencia de	

la proteína MSRB7) crecidas en el medio de LB con ampicilina. Se observan en el panel A, ADN plasmídico obtenido de las cepas transformantes TP1000 (se seleccionaron 8 colonias), y en el panel B, se observan los resultados obtenidos en el caso de las cepas transformantes BL21 (8 colonias) y C41 (2 colonias). MW (marcador de peso molecular conocido). (+) Control positivo con el ADN (vector de expresión pFLAG-ATS e inserto de la secuencia de la proteína MSRB7) utilizado para transformar las cepas bacterianas..... 22

Figura 6. Inducción realizada a 20 °C en las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. (-) muestras con la ausencia de inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS, (+) muestras que presentan el inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS. MW; marcador es de peso molecular..... 24

Figura 7. Inducción realizada a 25° C en las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. (-) muestras con la ausencia de inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS, (+) muestras que presentan el inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS. MW; marcador de peso molecular..... 25

Figura 8. Inducción realizada a 30° C en las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. (-) muestras con la ausencia de inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS, (+) muestras que presentan el inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS. MW; marcador de peso molecular..... 25

Figura 9. Elución de la proteína MSRB7 del gel de inmunoafinidad tras la incubación en presencia de un tampón con pH 3,5 durante 5 minutos a 25 °C. Sn (Sobrenadante); E1, primera elución; E2, segunda elución; 0.5 y 5 concentraciones de muestra incubada en contacto con la resina de inmunoafinidad en ng/μl; MW, marcador de peso molecular..... 28

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos utilizados en la extracción de ARNm.....	1
Tabla 2. Reactivos utilizados para llevar a cabo la transcripción reversa.....	2
Tabla 3. Condiciones de la amplificación mediante PCR.....	3
Tabla 4. Reactivos utilizados en la electroforesis en geles de agarosa.....	3
Tabla 5. Condiciones de la reacción de ligado.....	4
Tabla 6. Composición de medios de cultivo Luria-Bertani.....	5
Tabla 7. Solución stock de ampicilina (1000x).....	5
Tabla 8. Proceso de digestión.....	6
Tabla 9. Diseño de cebadores para la PCR.....	9
Tabla 10. Composición del tampón de lisis.....	10
Tabla 11. Reactivos gel de poliacrilamida.....	12
Tabla 12. Tampones de elución para la fusión FLAG-proteína.....	13



## 1. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) son moléculas altamente tóxicas producidas durante los procesos fisiológicos del metabolismo aeróbico. Los niveles de estas moléculas aumentan en condiciones de estrés dañando macromoléculas como ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos o proteínas. De entre las modificaciones oxidativas que sufren las proteínas cabe destacar la oxidación de residuos de metionina, lo que conduce a la formación de sulfóxido de metionina (MetSO), que puede modificar la conformación de proteínas alterando su funcionalidad. La enzima denominada Metionina sulfóxido reductasa (MSR) cataliza la reducción del MetSO.

En este trabajo se realizó la expresión y purificación parcial de la proteína MSRB7 de cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*, utilizando para ello el vector de expresión pFLAG-ATS y técnicas de inmunoafinidad para llevar a cabo la recuperación de la proteína. Los resultados obtenidos demuestran que una inducción de la expresión durante 24 horas a 20 °C incrementaba la sobreexpresión de la proteína y que la elución en condiciones ácidas utilizando bajas concentraciones de proteína mostraba un mayor rendimiento en la recuperación de la proteína purificada.

## SUMMARY

The oxygen and nitrogen reactive species (ROS and RNS) are highly toxic molecules produced during the processes physiological of aerobic metabolism. The levels of these molecules increase in stress conditions damaging macromolecules such as nucleic acids, carbohydrates, lipids or proteins. Among the oxidative modifications suffered proteins include the oxidation of methionine residues, which leads to the formation of methionine sulfoxide (Metso) which can modify protein conformation altering their functionality. Methionine sulfoxide enzyme called reductase (MSR) catalyses the reduction of MetSO.

In this study the expression and partial purification was performed MSRB7 cell culture protein from *Arabidopsis thaliana*, using the expression vector pFLAG-ATS and immunoaffinity techniques for it to carry out the recovery of the protein. The results show that induction of expression for 24 hours at 20 °C increased the protein overexpression and elution under acidic conditions using low protein concentrations showed a higher yield in the recovery of the purified protein.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Biotecnología y tecnología del ADN recombinante.

La Biotecnología ha sido utilizada desde civilizaciones antiguas para la producción de vino, pan, yogur, queso, etc. mediante la utilización de microorganismos. El cambio se produjo en los años 70, cuando se observó que estos microorganismos también podían ser utilizados para sintetizar compuestos que no se habían sintetizado antes y que no eran propios de su metabolismo, como la producción de insulina o la hormona del crecimiento en humanos (HGH), tras su clonación y expresión en *Escherichia coli* (*E. coli*) (Primrose y Twyman, 2006).

Este conjunto de métodos, técnicas y procedimientos enfocados al aislamiento, caracterización, clonaje y expresión de moléculas de ácidos nucleicos, soporte de la información genética según postula el dogma central de la Biología, componen la ingeniería genética y fueron fundamentales en la innovación, permitiendo el amplio desarrollo de la tecnología del ADN recombinante (molécula resultante de la unión de un vector de ADN y un inserto de ADN exógeno) y la producción de una gran variedad de proteínas recombinantes (Perera et al., 2002).

#### 2.1.1. Proteínas recombinantes

El aspecto más destacable de esta tecnología es la posibilidad de diseñar, desarrollar y aislar proteínas con características completamente nuevas a las proteínas originales, a través de la inserción o eliminación de aminoácidos, con el objetivo de corregir proteínas defectuosas, para aportar mayor estabilidad, etc. (Primrose y Twyman., 2006).

Las primeras proteínas recombinantes en bacterias se produjeron gracias a la modificación de vectores de clonación que incluían elementos reguladores para el control en la expresión de genes, posibilitando que genes de interés insertados en los mismos se expresaran codificando las proteínas recombinantes (R. W. Old et al., 1980).

En la industria, la ingeniería de proteínas está enfocada a la producción de nuevos biocatalizadores, utilizados para la síntesis de sustancias químicas o antibióticos (Burton et al., 2002).

### 2.1.2. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Se trata de una bacteria Gram-negativa con forma de bacilo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que se encuentra en el intestino humano y con carácter no patógeno. Es uno de los organismos mejor conocidos de la biosfera y fue el primer hospedador utilizado en experimentos de clonaje de ADN, datados en 1972 (Jackson et al., 1972; Lobban y Kaiser., 1973).

Inicialmente, los intentos de transformación fueron fallidos, sin embargo, Cohen et al. (1972) demostraron que el ADN plasmídico exógeno entraba en las células de *E. coli* tras un tratamiento con  $\text{CaCl}_2$ , generando lo que actualmente se denominan cepas bacterianas competentes.

En condiciones de laboratorio esta bacteria puede crecer en medios de cultivo simples, aunque crecen mejor en presencia de vitaminas y aminoácidos, aportadas por un medio rico (medio LB). Las condiciones óptimas para su crecimiento son una temperatura de 37 °C y en presencia de oxígeno (aerobiosis), lo que se consigue manteniendo los cultivos en agitación para lograr una buena aireación.

Por su facilidad de manejo, rapidez de crecimiento y buen rendimiento es el organismo procarionta más utilizado en experimentación.

### 2.1.3. *Sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes*

Los vectores de expresión son requeridos si se quiere experimentar con ARN obtenido de genes clonados o para purificar proteínas, tras llevar a cabo una sobreexpresión. Portan un promotor específico optimizado para unirse a la ARN polimerasa de *E. coli* y llevar a cabo la transcripción (Primrose y Twyman, 2006). Además, llevan las secuencias necesarias para la traducción del ARN mensajero producido, lo que incluye la incorporación de un promotor inducible, un sitio de unión al ribosoma, un triplete codificador del aminoácido iniciador metionina y el sitio de clonaje que permite la entrada del inserto (Perera et al., 2002).

Un inconveniente del uso de estos vectores es que la proteína producida en *E. coli* puede formar agregados insolubles o cuerpos de inclusión, en principio este problema fue resuelto utilizando un vector donde se unieran tiorredoxina y un sitio de escisión específico para una enteroquinasa, Por lo que ambas secuencias quedarían unidas y posteriormente codificarían para la proteína de interés. Tras la síntesis, la

proteína era liberada junto con los demás productos celulares (La Vallie et al., 1993). Para simplificar la purificación, Lu et al. (1996) realizaron mutaciones sobre un grupo de aminoácidos, lo que permitió que la tiorredoxina se uniera a nickel inmovilizado en una columna.

Se desarrollaron otros métodos de purificación, que consistían en sintetizar un gen con una secuencia peptídica corta que se fusionaba al extremo N-terminal del gen de la tiorredoxina, generando una nueva proteína denominada BIOTRIX, que sería purificada por afinidad cromatográfica en columnas con estreptavidina (Smith et al., 1998).

La modificación de aminoácidos y la inserción de péptidos en la secuencia codificante de la proteína de interés ha seguido desarrollándose de forma exponencial. Hoy en día, existen muchos sistemas de expresión y purificación basados en esta metodología.

En este trabajo, el sistema seleccionado ha sido el vector de expresión pFLAG-ATS, que se describe en el apartado 5.10.

## **2.2. *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) es una planta herbácea perteneciente a la familia *Brassicaceae* concretamente a la especie crucífera, autóctona de Europa, Asia y del noroeste de África. Crece principalmente en los bordes de los caminos y terrenos sueltos y secos. Su ciclo de vida anual es corto, siendo inferior a los 5 meses, produciendo una gran cantidad de semillas. Presenta un tamaño reducido de entre 1 y 3 dm por lo que se adapta a espacios pequeños para crecer (Blamey et al., 1989).

*Arabidopsis* comenzó a ser esencial como planta modelo a mediados de los años 80 debido a la disponibilidad de parte de su secuencia genómica y a la presencia de marcadores moleculares que facilitaban la generación de plantas transgénicas (Makoto Hayashi, 2006). Fue en el año 2000 cuando se secuenció su genoma constituido por 25498 genes, gracias al proyecto de Investigación AGI (Iniciativa para el Genoma de *Arabidopsis*) lo que permitió el desarrollo de una gran colección de líneas mutantes, métodos de transformación a partir de *Agrobacterium*

*tumefaciens* y el establecimiento de un conjunto de laboratorios académicos, gubernamentales e industriales (Meyerowitz, 1989).

### **2.3. Sistemas antioxidantes**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) son sustancias altamente tóxicas producidas durante los procesos normales del metabolismo aeróbico que en plantas aumentan en condiciones de estrés (Likun Liu, 2013). Estas situaciones de estrés potencian que las especies reactivas dañen o modifiquen macromoléculas como ADN, ARN, carbohidratos, lípidos o proteínas (Moller et al., 2010).

Dentro de las modificaciones que sufren las proteínas se encuentran la nitrosilación, la nitración de tirosinas, además de la oxidación de residuos de metionina (John et al., 2001; Alvarez y Radi 2003) generando sulfóxido de metionina (MetSO) (Boschi-Muller et al., 2008), lo que puede alterar la conformación de las proteínas haciéndolas no funcionales (Lee et al., 2014).

En plantas se han identificado una gran variedad de genes implicados en la respuesta al estrés. Entre los estudios más recientes se encuentra el gen de la Metionina sulfóxido reductasa (MSR) de *Arabidopsis thaliana* (Begara-Morales et al., 2014).

La MSR es parte de un importante sistema de reparación proteica que protege al organismo vegetal frente al estrés oxidativo (Oien et al., 2008) debido a que cataliza la reducción de MetSO (Vogt, 1995; Sharov et al., 2000). Hay dos clases de MSRs con estructuras no relacionadas, MSRA y MSRB, que catalizan la reducción de los enantiómeros S o R de MetSO a metionina, respectivamente (Rouhier et al., 2006; Boschi-Muller et al., 2008). Análisis genómicos han revelado la presencia de 9 genes de MSRB en *Arabidopsis*, de entre los cuales nos centraremos en el gen MSRB7, siendo el gen de interés para este trabajo.

#### *2.3.1. Metionina Sulfóxido Reductasa B7 (MSRB7)*

El tipo de enzima MSRB, incluye a la MSRB7, sistema de reparación que protege de la oxidación a los residuos de metionina, cuyos niveles de expresión en raíces son superiores a los detectados en hojas, ya que sus transcritos son relativamente abundantes en raíces (Rouhier et al., 2006).

Estudios recientes han demostrado que la proteína MSRB7 aumenta sus niveles en condiciones de estrés inducida por la acumulación de ROS y que, por lo tanto, tiene un papel fundamental en la defensa contra el estrés oxidativo. Su sobreexpresión en *A. thaliana*, hace decrecer los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acompañado de un incremento de la actividad de la glutatión transferasa (GST), como consecuencia de la restauración de los residuos de metionina oxidados aumentando la tolerancia al estrés oxidativo (Lee et al., 2014).

Además, se ha descrito la implicación de esta isoforma en la respuesta de plantas de *Arabidopsis* a la exposición a metil viológeno que es un agente que induce estrés oxidativo y provoca un aumento en sus niveles de expresión génica. Por otra parte, líneas celulares mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el gen MSRB7 son sensibles al estrés oxidativo provocado por la exposición a metilviológeno (20 µM) o a peróxido de hidrógeno (20 mM), mientras que las líneas que sobreexpresan este gen se muestran tolerantes al tratamiento (Lee et al., 2012).

La bibliografía indica que podría proteger también frente a daños oxidativos causados por RNS (Begara-Morales et al., 2014).

### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consistió en la expresión y purificación parcial de la proteína metionina sulfóxido reductasa (MSRB7).

Para llevar a cabo este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales.

- Selección de cepas de *E. coli* con alta eficiencia de transformación como hospedador en el vector de expresión.
- Optimización de las condiciones de inducción de la expresión de la proteína recombinante MSRB7 en las cepas de *E. coli* seleccionadas.
- Purificación parcial de la proteína.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*

El material biológico se extrajo de cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia, pertenecientes al grupo Bio-286 del área de Bioquímica y Biología Molecular.

Para el crecimiento celular de los cultivos se utilizaron 200 ml de un medio específico, basado en el medio JPL (JP y C, 1967) con algunas modificaciones para adaptarlo a los cultivos de *Arabidopsis thaliana* (Axelos et al., 1992). Se subcultivaron cada 7 días siguiendo condiciones estrictas de esterilidad bajo una campana de flujo laminar, con una dilución del medio de 1/20.

Los cultivos celulares se mantenían con una temperatura constante de 23.9 °C en agitación continua (140 rpm) y bajo condiciones de iluminación continua con luz blanca fotosintética.

### 4.2. Extracción del ARNm

Para la extracción y purificación de ARNm a partir de los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* se utilizó el Kit comercial RNeasy plant Mini Kit (Qiagen) en presencia de Trizol (GIBCOBRL, Life Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los reactivos utilizados se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Reactivos utilizados en la extracción del ARNm**

Trizol
Cloroformo
Isopropanol
Etanol al 75%
Agua-DEPC estéril: agua milliQ tratada con dietilpirocarbonato (0,1%, v/v) autoclavada.

Posteriormente se determinó la pureza del material mediante espectrofotometría determinando la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm ( $A_{260} \text{ nm} / A_{280} \text{ nm}$ ), para confirmar el correcto funcionamiento de la técnica.



### 4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Puesto que el material de partida era ARN y la técnica de la PCR solo amplifica moléculas de ADN, hubo que realizar un proceso de transcripción reversa.

#### 4.3.1. Transcripción reversa

Para llevar a cabo este paso se utilizó el Kit 1st Strand cDNA Synthesis for PCR-TR (AMV) (Roche), partiendo de 1 µg de ARN total de la muestra. De este modo se obtuvieron muchas copias de la secuencia codificante para la proteína. La lista de reactivos utilizados para llevar a cabo la retrotranscripción se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Reactivos utilizados para llevar a cabo la transcripción reversa**

Tampón de reacción 10x: Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 con KCl 500 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM
Cebadores aleatorios (Random primers) 2 µg/µl
Inhibidor de ARNsas 50 units/µl
AMV Transcriptasa reversa >20 units
Desoxinucleótidos 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)

La reacción tuvo lugar en un termociclador mediante un ciclo de incubación de 10 minutos a 25 °C (unión del cebador), seguido de 60 minutos a 42 °C (transcripción reversa) y de 5 minutos a 99 °C (desnaturalización del enzima). Al finalizar, las muestras se mantuvieron a 4 °C.

#### 4.3.2. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el cDNA de la secuencia de la proteína MSR7 de *Arabidopsis thaliana*, a partir de la base de datos TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Las secuencias se corresponden con el siguiente código en la base de datos: AT4G21830.

#### 4.3.3. Amplificación

En la tabla 3, se detallan las condiciones de las reacciones de PCR para estas secuencias:

**Tabla 3. Condiciones de la amplificación mediante PCR**

Reactivos	Volumen	Ciclos de PCR
10X Biotools buffer	2 $\mu$ l	95 °C 2 min
dNTP (10 mM)	0,5 $\mu$ l	95 °C 30 seg
Mix Oligonucleótidos up/low (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	60 °C 30 seg
TAQ Biotools (1U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	72 °C 3 min
ADN (200 ng/ $\mu$ l)	X $\mu$ l	72 °C 5 min
Agua milliQ	Hasta 20 $\mu$ l	4 °C Toda la noche

Para esta reacción se utilizó el enzima BIOTOOLS DNA Polymerase, que es una ADN polimerasa termoestable recombinante con una gran procesividad, capaz de sintetizar hebras de ADN a temperaturas elevadas y de reproducir las secuencias de ADN molde (cDNA) con mucha precisión y efectividad sin introducir mutaciones en las secuencias de nueva síntesis.

#### 4.4. Purificación de bandas

Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa (Maniatis et al., 1982), al 1-2% (tabla 4) y tras la electroforesis a 90V, se seleccionaron las amplificaciones positivas y específicas para el marcador de interés. Las bandas correspondientes se cortaron de los geles y se purificaron con el kit comercial GFX PCR DNA and gel Band Purification (GE HealthCare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 4. Reactivos utilizados en la electroforesis en geles de agarosa**

Tampón de electroforesis: tampón TAE 0.5x.

Tampón TAE 50x: Tris-HCl 40 mM pH 8, ácido acético glacial (1.1%; v/v), EDTA 1 mM

Tampón de carga 6x: glicerol (30%; v/v), azul de bromofenol (0,25%; p/v) y xylene cyanol (0,25%; p/v).

#### 4.5. Clonación de bandas purificadas y reacciones de ligado

El objetivo de este paso consiste en obtener bacterias competentes transformantes con plásmidos recombinantes (inserto más vector de clonación) que contienen la secuencia de interés.

Para ello, en primer lugar los productos de PCR purificados del gel de agarosa se ligaron (Ligasa T4, Promega) en el vector pGEM-T easy (Promega), el cual posee extremos 3' prominentes con un nucleótido de timina que reconocerá la adenina terminal en el extremo 3' que poseen las amplificaciones de PCR, debido a que la polimerasa posee actividad transferasa terminal. Las condiciones seguidas para la reacción de ligado son las establecidas por el fabricante del vector (Promega), tal y como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de ligado	
Reacción de ligado	Incubación
5,5 µl de banda purificada	
7,5 µl de 2x rapid ligation buffer	4 °C Toda la noche
1 µl de pGEM-T easy (50 ng/µl)	
1 µl de ligasa T4 (3 u/µl)	

El proceso de ligación evita que el ADN exógeno de interés (inserto) se degrade dentro de la célula hospedadora como consecuencia de la actuación de mecanismos celulares propios que eliminan el ADN no metilado. La inserción en vectores de clonación, impide los procesos de degradación y favorece que el inserto se replique y pueda ser seleccionado tras la clonación.

#### 4.6. Transformación de cepas de *E. coli* DH5α competentes y siembra

La transformación se llevó a cabo sobre bacterias *E. coli* DH5α competentes comerciales (Zymo), siguiendo las instrucciones del proveedor que, de forma resumida, se detallan a continuación. Tras descongelar en hielo 50 µl de bacterias previamente conservadas a -80 °C, se añadieron 4.5 µl procedentes de la reacción de ligado y se incubaron en hielo 5 minutos. A continuación, bajo condiciones de esterilidad, se realizó la siembra sobre placas de cultivo LB (Luria-Bertani) que

contenía ampicilina (0.1 mg/ml), X-gal (2 mg/ml) e IPTG (4 mM) (Tabla 6 y 7). Se dejaron crecer durante una noche a 37 °C, en agitación continua (180 rpm).

Las colonias de bacterias de color blanco contenían el plásmido y el inserto, mientras que las de color azul solo portaban el plásmido.

#### 4.7. Obtención de ADN plasmídico

Con ayuda de un palillo se tomó parte del cultivo en placa de cada clon y se realizaron cultivos en 20 ml de medio LB líquido con ampicilina (0.1 mg/ml) (Tablas 6 y 7). Estos cultivos se dejaron crecer durante una noche a 37 °C y agitación continua (180 rpm). Al día siguiente se procedió a la extracción del ADN plasmídico siguiendo el protocolo del kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen), siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante.

La cantidad de plásmido extraído se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia de la muestra en un NanoVue a 260 nm.

<b>Tabla 6. Composición medios de cultivo Luria-Bertani</b>			
<b>Sólido (LB agar)</b>		<b>Líquido</b>	
Extracto de levadura	5 g/l	Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	10 g/l	Triptona	5 g/l
NaCl	10 g/l	NaCl	5 g/l
NaOH	160 µl/l	NaOH	160 µl/l
Agar-agar	15 g/l		

#### **Tabla 7. Solución stock de ampicilina (1000x)**

Ampicilina 100 mg/ml
Agua ultrapura (MilliQ)

#### 4.8. Restricción de ADN plasmídico y análisis electroforético

Para tener una doble confirmación de que las colonias positivas seleccionadas portaban el inserto (color blanco), se hicieron digestiones individuales de los plásmidos purificados con enzimas de restricción, esto permitió conocer el tamaño exacto del inserto y corroborar que se correspondía con la banda que habíamos clonado. El diseño del vector pGEM-T easy, permite extraer exclusivamente el inserto tras ser tratado con *EcoRI*. Para visualizar los resultados del proceso se realizó un análisis electroforético de las digestiones en geles de agarosa al 1-2% (Tabla 4). En la tabla 8 se muestra un esquema del proceso de digestión.

Tabla 8. Proceso de digestión	
Reacción de digestión	Incubación
5,5 µl de plásmido	
1 µl de 2x rapid ligation buffer	37 °C Toda la noche
1 µl de <i>EcoRI</i>	
5 µl H <sub>2</sub> O	

#### 4.9. Secuenciación

Los clones positivos purificados, de los cuales se extrajo el ADN plasmídico donde se confirmó presencia de inserto para la proteína MSRB7 tras el análisis electroforético, se enviaron a secuenciar a la empresa Sistemas Genómicos (Valencia).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BioEdit para verificar que las secuencias amplificadas coincidían con la de nuestra enzima de interés, este paso fue determinante para la codificación y posterior obtención de la proteína MSRB7 activa.

#### 4.10. Obtención de la proteína recombinante, descripción general del sistema de expresión pFLAG-ATS

La sobreexpresión de proteínas recombinantes se puede conseguir utilizando un vector comercial. El vector utilizado en este caso se denomina pFLAG-ATS (Figura 1), el cual contiene una secuencia de nucleótidos que da lugar a un oligopéptido de 8 aminoácidos u octapéptido (FLAG) que actúa como marcador y que puede fusionarse con la proteína de interés tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal. Dentro del vector, este fragmento se puede encontrar a un lado u otro del sitio de multiclonación (MCS), que es la región donde se insertará la secuencia que se desea codificar. En esta ocasión, el oligopéptido FLAG se posicionó en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la proteína MSRB7.

La estructura general del vector de expresión, denominado pFLAG-ATS se detalla en el Anexo 1.

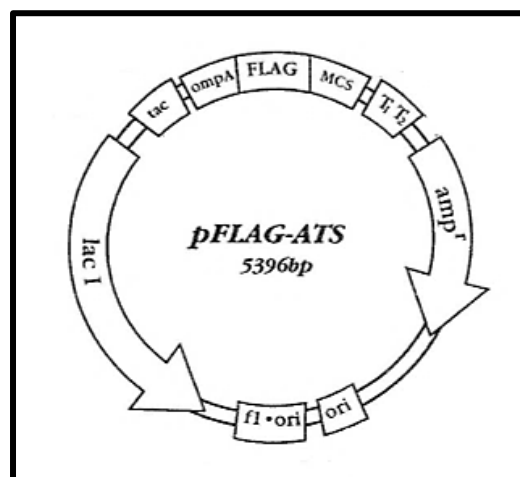


Figura 1. Estructura del vector de expresión pFLAG-ATS utilizado para la expresión de la proteína MSRB7.

Cabe destacar que el vector contiene un péptido señal (OmpA, proteína A de la membrana externa) que determina que la proteína de interés sea secretada al espacio periplásmico, que es un compartimento que rodea el citoplasma en algunas células procariontas, como es el caso de las bacterias Gram-negativas, con el objeto de reducir la producción de cuerpos de inclusión.

En la Figura 2 se muestra una imagen ampliada de la secuencia de aminoácidos que compone la etiqueta FLAG.

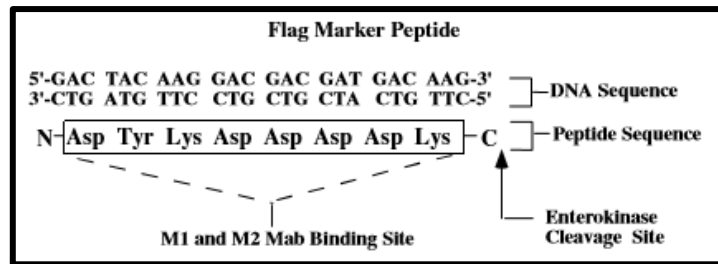


Figura 2. Secuencia del marcador peptídico FLAG.

Para recuperar la proteína marcada se procedió a la detección de la etiqueta FLAG mediante un anticuerpo monoclonal de ratón denominado M2 (ANTI-FLAG), que se unía específicamente al octapéptido. Este anticuerpo estaba conjugado a una matriz gelatinosa que permitió purificar la proteína MSRB7 que se unía mediante inmunoafinidad al gel.

#### 4.10.1. Transformación de *E. coli*

El siguiente paso consistió en la extracción del inserto de la proteína MSRB7 del vector de clonación (pGEM-T) y su transferencia al vector de expresión pFLAG-ATS, para ello se realizó una digestión con *EcoRI*, ya que como se ha indicado anteriormente, el diseño del vector pGEM-T permite la extracción exclusiva del inserto. Después, el fragmento se ligó (Ligasa T4, Promega) al vector pFLAG-ATS, que previamente había sido digerido con las mismas enzimas de restricción que el inserto para crear complementariedad entre ambos.

Con el producto de la secuenciación subclonado en el vector de expresión pFLAG-ATS se transformaron mediante choque térmico diferentes cepas bacterianas competentes de *E. coli* denominadas BL21, C41 y TP1000. Para ello se incubaron inicialmente 30 minutos en hielo y posteriormente durante 2 minutos a 42 °C. Este proceso permitió que la membrana celular se desestabilizara y dejara pasar el ADN exógeno al interior de la célula.

Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, las células se crecieron en un medio LB líquido con ampicilina (Tablas 6 y 7) durante 1 h, a 37 °C y agitación de 180 rpm, condiciones favorables para su desarrollo. Posteriormente, se centrifugaron y el pellet resultante se extendió sobre una placa con LB agar suplementado con ampicilina (Tabla 6 y 7) para la selección de las colonias positivas portadoras del plásmido con el inserto de interés. El vector portaba el marcador de resistencia a

ampicilina, que le transfería la capacidad de crecer en un medio en presencia de este antibiótico e impedía el desarrollo de las células no transformantes.

#### 4.10.2. Extracción del ADN plasmídico

A partir de las colonias crecidas en el medio LB agar y con ayuda de un palillo se realizaron preinóculos individuales en 20 ml de LB líquido con ampicilina, que se dejaron crecer una noche a 37 °C. Al día siguiente se extrajo y purificó el ADN plasmídico a pequeña escala siguiendo el protocolo miniprep Qiagen (Qiaprep spin miniprep kit) y las indicaciones del fabricante (apartado 5.7).

#### 4.10.3. Cuantificación y PCR

Con objetivo de comprobar que el vector pFLAG-ATS contenía el inserto de la MSRB7 en las cepas transformantes, se realizó una PCR aunque previamente se cuantificó el material genético extraído con el objeto de ajustar las concentraciones de ADN a amplificar. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 9, estos se diseñaron a partir de las secuencias de las enzimas de restricción disponibles en el MCS del pFLAG-ATS (Figura 3).

**Tabla 9. Diseño de cebadores para la PCR**

Nombre	Secuencias de los cebadores <sup>1</sup> (5'→3')
MSRB7.u HindIII	CAA <u>AAA GCT TAT</u> GGC AGC AAT GAC CGC GGC AGC
MSRB7.l EcoRI	CAA <u>AGA ATT CTT</u> ATT GGG AGG AAC CAG CAG AAG A
MSRB7.l XhoI	CAA <u>ACT CGA GTT</u> ATT GGG AGG AAC CAG CAG AAG A

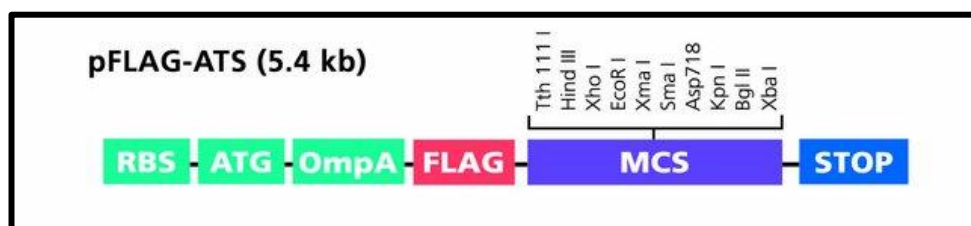


Figura 3. Esquema que representa algunos de los elementos que contiene el vector de expresión pFLAG-ATS. El MCS (sitio de multiclonación) contiene secuencias específicas para diferentes enzimas de restricción, dichas secuencias pueden ser utilizadas en el diseño de oligonucleótidos.



El producto de PCR se visualizó mediante una electroforesis a 90V en un gel de agarosa al 0.8% en tampón de electroforesis (tabla 4).

Tras la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 10 minutos y se observó en un transiluminador. El bromuro de etidio es una sustancia intercalante que se introduce entre las bases del ADN y produce fluorescencia al ser iluminado con luz UV, mostrando las bandas de interés en el gel.

#### 4.10.4. Inducción de la proteína MSRB7 en cepas de *E.coli*

Una vez seleccionadas las bacterias transformantes de las cepas BL21, C41 y TP1000, se llevó a cabo la inducción de la proteína. Para esto se transfirió 1 ml del preinóculo de los clones transformantes a un matraz de 20 ml de medio de cultivo LB líquido con Ampicilina y Glucosa (0.4%; p/v) dejando las diluciones a 37 °C en agitación hasta que alcanzaran una DO (densidad óptica) de 0.6 (estado exponencial de crecimiento bacteriano), comprobación que se hizo periódicamente mediante espectrofotometría a 660 nm.

Una vez alcanzada dicha DO, se estimuló la sobreexpresión, mediante un inductor denominado Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se realizaron ensayos a diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C y 30 °C) y diferentes tiempos (4, 6, 8 y 24 horas) siempre en agitación a 180 rpm.

Tras la incubación se centrifugó todo el cultivo a 4000 rpm y se procedió a obtener el extracto libre de células a partir del precipitado generado. Para ello se resuspendió el precipitado en 1 ml de tampón de lisis (Tabla 10) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se sonicó durante 5 minutos con intervalos de un minuto para evitar que la suspensión se calentase demasiado. Seguidamente, se centrifugó a 14000xg y se recuperó el sobrenadante, considerado el extracto libre de células.

#### **Tabla 10. Composición del tampón de lisis**

1 ml tampón fosfato sódico 50 mM pH7.5.

Lisozima 1 mg/ml

10  $\mu$ l DNAsa I 10 mg/ml

---

#### 4.10.5. *Determinación de la concentración de proteínas*

Para realizar esta determinación se utilizó el método de Bradford (1976), elaborando una recta patrón utilizando albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración inicial de 0.6 mg/ml. Se prepararon 7 diluciones de cada muestra en un volumen final de 800  $\mu$ l, a las cuales se añadieron 200  $\mu$ l de reactivo Bradford comercial, tras agitar la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm interpolando las absorbancias de las muestras problema en la recta patrón.

#### 4.10.6. *Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).*

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Esta técnica permite separar las proteínas según sus masas moleculares, ya que se encuentran disociadas en sus subunidades. En la tabla 11 se muestran los reactivos utilizados para la SDS-PAGE.

Se utilizaron geles de 6,5 cm x 8 cm con un grosor de 1 mm. El gel separador se preparó al 12,5 %.

Las muestras obtenidas de cada extracto de las diferentes cepas bacterianas se trataron con sample buffer 4x y se calentaron a 95 °C, con el objetivo de lograr la desnaturalización proteica.

La electroforesis se inició con un voltaje de 100V, seguido de un aumento a 200V cuando las muestras alcanzaban el inicio del gel separador.

Tras finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de azul de Comassie en agitación durante 30 minutos, posteriormente se realizaron varios lavados con una solución decolorante.

**Tabla 11. Reactivos gel de poliacrilamida**

---

Tampón gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.  
Tampón gel separador: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.  
Persulfato amónico (10%; p/v)  
Acrilamida 30% (BIORAD)  
Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3; glicina 0,192 M y SDS 10%.  
TEMED (BIORAD)  
Tampón de tratamiento de muestra 4x (Sample buffer 4x): Tris-HCl 0,425 M, pH 6,8; glicerol (40%; v/v); SDS (8%; p/v); azul de bromofenol (0,4%; p/v) y DTT 0,04 M.  
Solución colorante para geles: azul Comassie (0,0025%; p/v), metanol (50%; v/v) y acético (7%; v/v)  
Solución decolorante para geles: metanol 50% y acético 7%

---

#### 4.10.7. *Purificación de la proteína MSRB7 por unión al anticuerpo monoclonal M2*

Para el ensayo de purificación se utilizó el extracto libre de células que era la fracción soluble de los cultivos inducidos. Se hicieron ensayos utilizando distintas concentraciones de material de partida (0.5 ng/ $\mu$ l y 2 ng/ $\mu$ l) que se pusieron en contacto con 40  $\mu$ l del gel con afinidad ANTI-FLAG M2

Tras una incubación de 3 horas a 4 °C y 25 °C, respectivamente, se centrifugó a 2000xg, se recuperó el sobrenadante (Sn), en el cual no se esperaba encontrar proteínas puesto que deberían estar unidas a la resina.

A continuación se procedió a la elución de la proteína, para lo que se siguieron diferentes estrategias utilizando distintos tampones A, B y C (Tabla 12), con la finalidad de cuya función era separar la proteína MSRB7 del anticuerpo que la retenía en la resina siguiendo diferentes estrategias.

Tras cada lavado con los diferentes tampones de elución se obtuvieron muestras que de nuevo se analizaron mediante SDS-PAGE (Tabla 11) y se observaron tras la tinción de los geles con azul de Coomasie.

<b>Tabla 12. Tampones de elución para la fusión FLAG-proteína</b>
<b>A. Elución bajo condiciones ácidas</b>
Glicina-HCL 0.1 M; pH 3.5 Añadir inhibidores de proteasa 100x (1x)
<b>B. Elución bajo condiciones nativas por competición con 3x FLAG peptide (SIGMA, ref. F4799)</b>
Péptido sintético de 23 aminoácidos, con un peso molecular de 2,864 Da (N-Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Ile-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) <u>Preparación de la solución</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disolución en 0.5 M Tris HCl, pH 7.5; NaCl 1M; Concentración: 25 µg/µl de 3x FLAG peptide</li> <li>- Dilución de la disolución del stock anterior 1:5 con MilliQ; Concentración: 5 µg/µl de 3x FLAG peptide</li> <li>- Añadir 3 µl de la dilución anterior a 100 µl de TBS (Tris-HCL 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM) : Concentración final: 150 ng/µl</li> </ul>
<b>C. Elución con LDS sample buffer 1x (SIGMA)</b>
Tris HCL 62.5 mM, pH 6.8, con SDS (2%; p/v) Glicerol 10% (v/v) Azul de bromofenol (0.002%; p/v)

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan a continuación comprenden desde la inserción de la proteína MSRB7 en el vector de expresión pFLAG-ATS hasta el proceso de purificación parcial de la proteína recombinante. Aun así, en el apartado de Material y Métodos se han especificado los procedimientos previos realizados hasta la obtención del material genético de partida utilizado en este trabajo de fin de grado.

### 5.1. Obtención de proteínas recombinantes

Como ya se indicó en el apartado 4.10. de Material y métodos, para la expresión de la proteína MSRB7 se utilizó el vector pFLAG-ATS, cuya estructura se detalla en el Anexo I. En dicho vector de expresión se subclonó el inserto de la proteína MSRB7, previamente clonado en pGEM-T y posteriormente secuenciado. Las cepas de *E. coli* competentes elegidas para realizar la transformación con el vector de expresión fueron BL21, C41 y TP1000, debido a su eficiencia de transformación, es decir, al elevado número de células transformadas por 1 µg de ADN.

#### 5.1.1. Análisis de los productos de PCR

Los clones que recibían el vector de expresión, presentaban capacidad de crecimiento en un medio suplementado con ampicilina, no obstante para verificar que los clones positivos portaban el vector de expresión pFLAG-ATS, se realizó una PCR (condiciones de PCR apartado 5.10.3) cuyos resultados se muestran en la Figura 4.

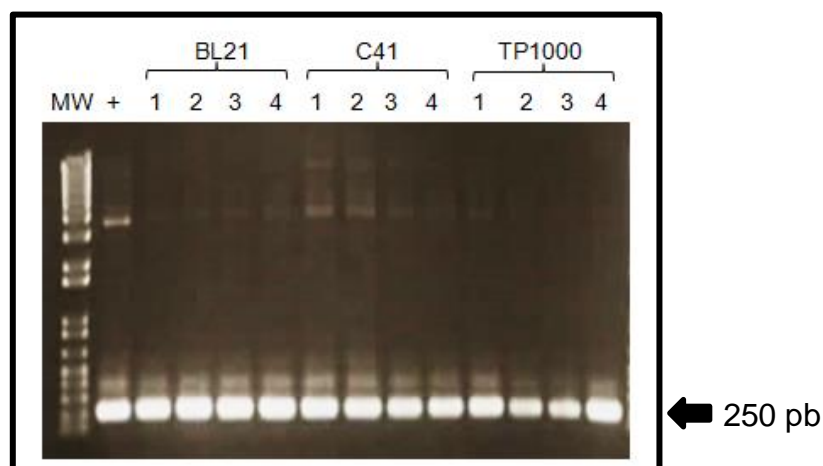


Figura 4. Productos de PCR control, donde se migró ADN plasmídico (vector de expresión pFLAG-ATS sin inserto) obtenido de 4 colonias distintas (1, 2, 3 y 4) de cada una de las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. MW (marcador de peso molecular). (+) Control positivo con el ADN plasmídico sin inserto.

En la figura 5, se muestran los resultados de PCR obtenidos tras la transformación de las distintas cepas bacterianas cuando el vector de expresión incluía el inserto de la proteína MSRB7.

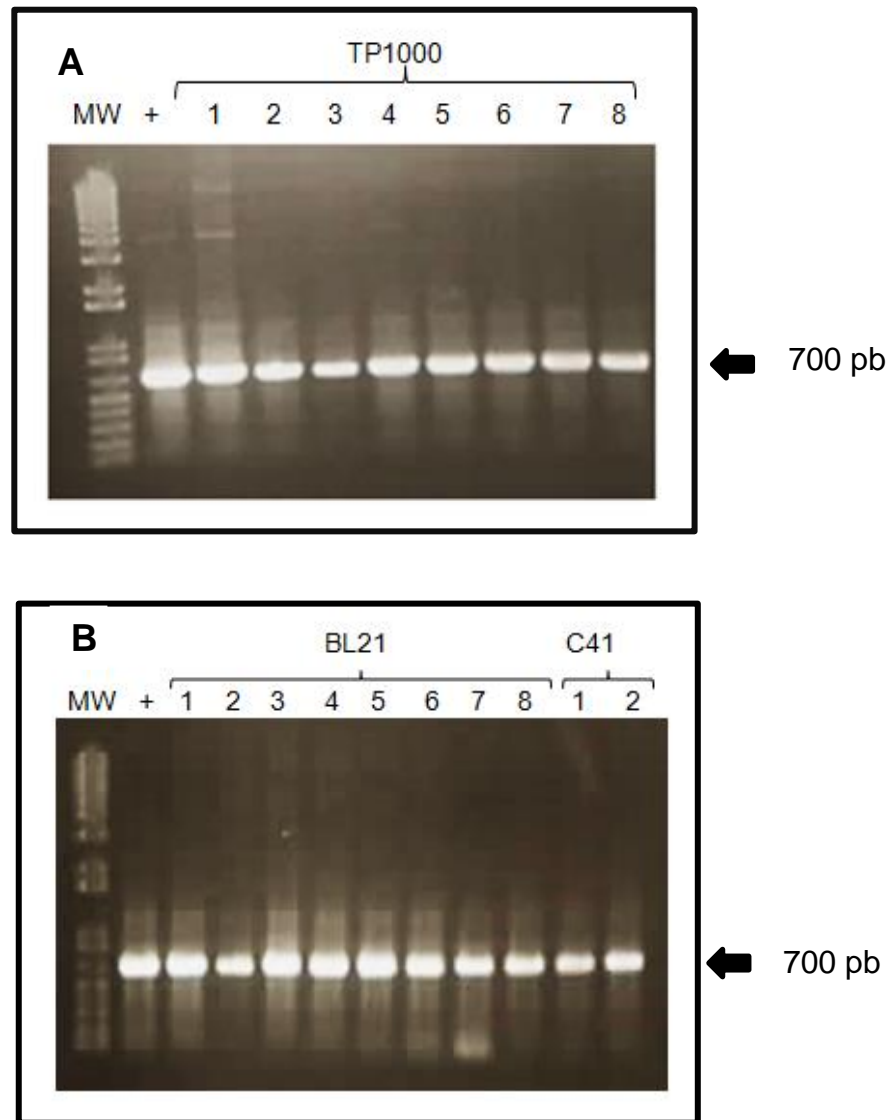


Figura 5. Productos de PCR de ADN plasmídico recuperado de las colonias positivas (vector de expresión pFLAG-ATS incluyendo el inserto de la secuencia de la proteína MSRB7) crecidas en el medio de LB con ampicilina. Se observan en el panel A, ADN plasmídico obtenido de las cepas transformantes TP1000 (se seleccionaron 8 colonias), y en el panel B, se observan los resultados obtenidos en el caso de las cepas transformantes BL21 (8 colonias) y C41 (2 colonias). MW (marcador de peso molecular). (+) Control positivo con el ADN (vector de expresión pFLAG-ATS e inserto de la secuencia de la proteína MSRB7) utilizado para transformar las cepas bacterianas.

Como se observa, en la figura 4, las bandas observadas en el caso de las muestras control tienen un menor número de pares de bases (250pb), ya que se corresponden al vector de expresión exclusivamente (sin inserto). La figura 5, muestra bandas que se corresponden con el vector de expresión pFLAG-ATS y el inserto de la secuencia de la proteína MSRB7, por lo tanto, el mayor número de pares de bases (700pb) de este material genético determina que la migración en el gel sea inferior.

Los resultados obtenidos tras la electroforesis demostraban que todos los clones utilizados eran positivos y portaban el inserto de la proteína MSRB7. Además, se pone de manifiesto la eficiencia del proceso de transformación de las diferentes cepas utilizadas, ya que aunque todas las cepas seleccionadas tenían una alta eficiencia de transformación, tras el proceso de internalización del ADN exógeno, diferían, y no mostraban el mismo número de colonias transformantes, siendo las cepas TP1000 y BL21 las que presentaron mayor eficiencia de transformación, a diferencia de la cepa C41.

#### *5.1.2. Análisis del patrón de proteínas obtenido tras la inducción de las cepas de E. coli BL21, C41 y TP1000.*

A partir de los clones positivos seleccionados previamente se realizaron ensayos de inducción de la expresión de la proteína MSRB7 a diferentes tiempos pero siempre en agitación de 180 rpm. Los tiempos de inducción fueron de 4, 6, 8 y 24 horas, respectivamente.

Tras la inducción, se centrifugaron las bacterias y después del proceso de lisis se procedió a la obtención del extracto libre de células que se trató con tampón de muestra para realizar una SDS-PAGE. En los geles de poliacrilamida se observó presencia de la proteína recombinante con un tamaño molecular adecuado a partir de las 24 h. Dada la ausencia de resultados con los ensayos de inducción a tiempos inferiores se fijó el tiempo de inducción en 24 h.

Otro factor relevante a tener en cuenta en el proceso de inducción fue la temperatura debido a que las cepas bacterianas tienen una actividad óptima de producción proteica dependiente de la temperatura, esto se debe a que este factor es muy importante en los procesos metabólicos, afectando la velocidad de

transcripción y de traducción de proteínas (Salazar et. Al., 2001; Martínez-Luaces et al., 2006). Se ensayaron distintas temperaturas de inducción (20 °C, 25 °C, 30 °C). Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 6, 7 y 8.

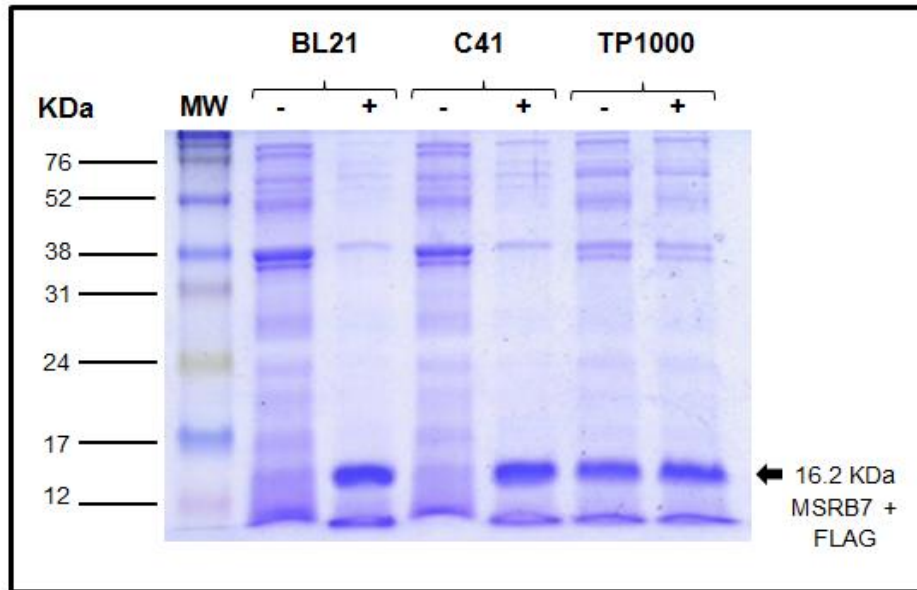


Figura 6. Inducción realizada a 20 °C en las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. (-) muestras con la ausencia de inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS, (+) muestras que presentan el inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS. MW; marcadores de peso molecular.



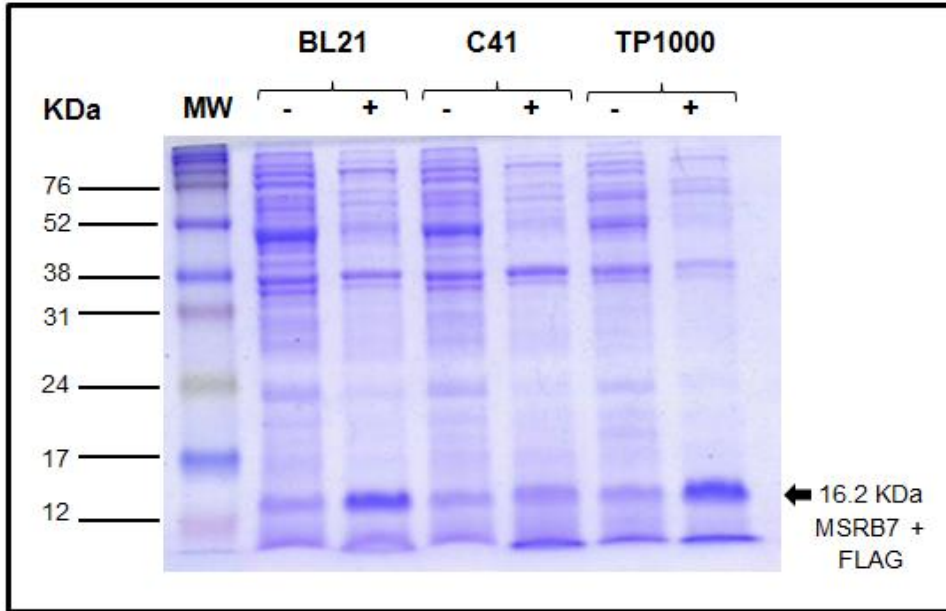


Figura 7. Inducción realizada a 25 °C en las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. (-) muestras con la ausencia de inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS, (+) muestras que presentan el inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS. MW; marcadores de peso molecular.

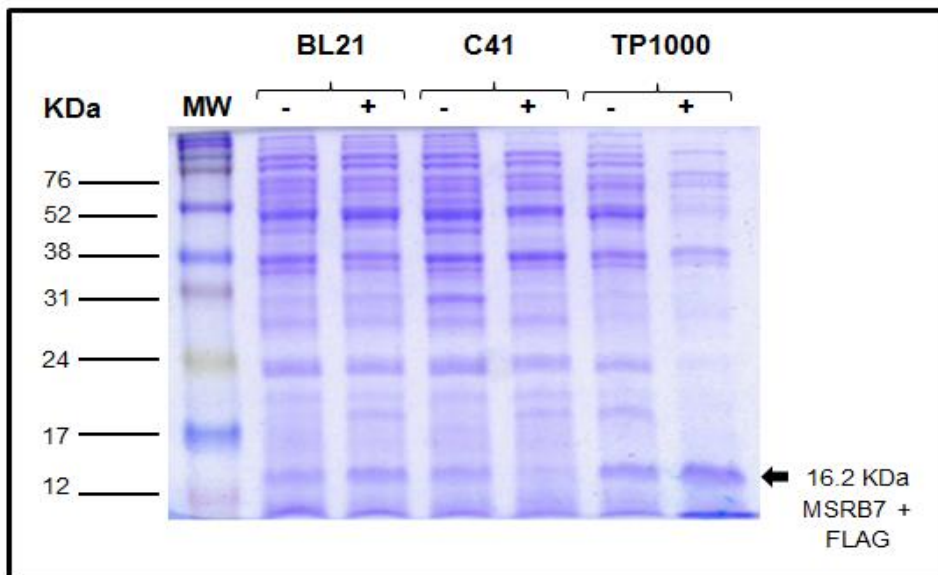


Figura 8. Inducción realizada a 30 °C en las cepas bacterianas transformantes BL21, C41 y TP1000. (-) muestras con la ausencia de inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS, (+) muestras que presentan el inserto en el vector de expresión pFLAG-ATS. MW; marcadores de peso molecular.

Los resultados obtenidos demostraron una mayor eficiencia en la inducción de la proteína MSRB7 a la temperatura de 20 °C (Figura 6) en las cepas BL21 y C41 debido a que en ellas el control negativo no mostró inducción de la proteína, lo que sí ocurrió en las muestras problema, siendo contrario el resultado para la cepa TP1000, donde se observó la aparición de una banda en el gel en la calle correspondiente al control negativo al nivel de la proteína de interés indica que esta cepa bacteriana induce proteínas con un tamaño molecular aparente similar al de la proteína de interés bacteriana propia de su metabolismo, por lo que podía producir interferencias. En el caso de la inducción a 25 °C (Figura 7) se observó resultados positivos en las cepas BL21 y TP1000 y ligeramente en C41. Finalmente, se observa una menor inducción a 30 °C (Figura 8), sin resultados claros para ninguna de las 3 cepas utilizadas.

Por otra parte, se puede apreciar la disminución en los niveles de inducción de la proteína recombinante, conforme se incrementaba la temperatura del proceso ya que la intensidad de las bandas específicas observadas en el gel disminuía, lo que reflejaba que el proceso de inducción era dependiente de la temperatura y perdía efectividad conforme se incrementaba este parámetro. Por todo ello, se estableció como temperatura óptima de inducción la temperatura de 20 °C, lo que está en concordancia con los datos publicados por Chen et al., (2003) que indican que proteínas inducidas a temperaturas inferiores a 37 °C presentan mayor probabilidad de plegarse correctamente y dirigirse al compartimento adecuado.

### *5.1.3. Análisis de la purificación de la proteína MSRB7 por unión a anticuerpo monoclonal M2*

Una vez seleccionada la temperatura de inducción, la purificación se llevó a cabo a partir de las cepas bacterianas transformantes BL21, dado que esta cepa mostraba de manera constante presencia de proteína y mostraba mejor respuesta a la inducción. Las cepas C41 y TP1000 eran más variables. Las cepas de tipo C41 se descartaron por su baja respuesta a la inducción, por otra parte las cepas TP1000, a pesar de responder favorablemente a la inducción para las diferentes temperaturas, en el ensayo a 20 °C el control negativo mostró una banda de tamaño molecular aparente similar al de la proteína de interés, por lo que también se descartaron.

Una vez optimizadas las condiciones de inducción de la proteína MSRB7 se procedió a su purificación, para lo que se obtuvo el extracto libre de células que se puso en contacto con 40  $\mu$ l de gel de afinidad que llevaba unido el anticuerpo M2, que se une específicamente a la etiqueta FLAG que portaba la proteína MSRB7 en su extremo N-terminal, como se expone en el apartado 4.10.7 de Material y Métodos. Tras 3 horas de incubación, se realizaron eluciones. Para comprobar la efectividad de las mismas se realizaron distintos procedimientos: elución bajo condiciones ácidas, elución bajo condiciones nativas por competición con 3x FLAG peptide y elución con LDS simple buffer 1x (Tabla 11). En este caso solo se obtuvieron resultados positivos al utilizar una estrategia de elución basada en emplear un tampón con pH ácido (pH: 3,5).

Este tampón se añadió a la resina que tenía unida la proteína de interés y se incubó durante 5 minutos a las temperaturas de 25 °C y 4 °C. La ausencia de resultados positivos a 4 °C, determinó que se estableciera la temperatura de 25 °C.

El análisis del patrón de bandas obtenidas tras la electroforesis se muestra en la Figura 9.

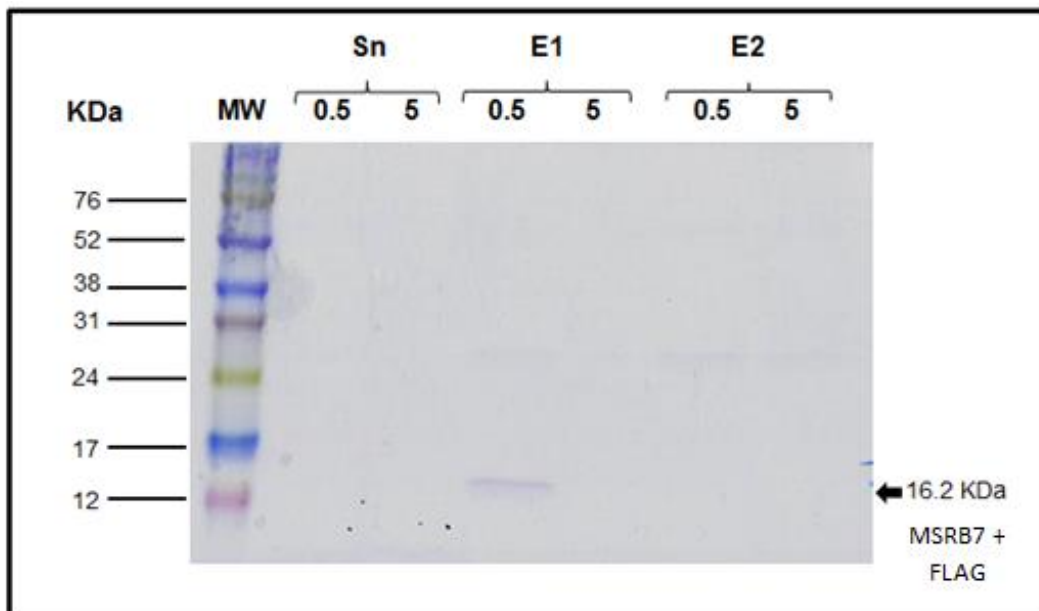


Figura 9. Elución de la proteína MSRB7 del gel de inmunoafinidad tras la incubación en presencia de un tampón con pH 3,5 durante 5 minutos a 25 °C. Sn (Sobrenadante); E1, primera elución; E2, segunda elución; 0.5 y 5 concentraciones de muestra incubada en contacto con la resina de inmunoafinidad en  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ; MW, marcadores de peso molecular.

Por otra parte, se realizaron diferentes ensayos incubando distintas concentraciones de proteína de interés con la resina de inmunoafinidad, resultando positiva la elución cuando se utilizaron concentraciones de 0.5 ng/ $\mu$ l, lo que indica que la utilización de una menor concentración de muestra de proteína MSRB7 facilitaba tanto su unión específica al anticuerpo M2 anti-FLAG retenida en la resina como su posterior elución y purificación.

## 6. CONCLUSIONES

- En base a los resultados obtenidos se ha seleccionado la cepa bacteriana competente BL21 de *E. coli* debido a su mayor eficiencia de transformación
- Se seleccionaron como condiciones óptimas de inducción, la incubación de las cepas bacterianas durante 24 horas a 20 °C.
- Se obtuvo un mayor rendimiento en la recuperación de proteína purificada cuando se utilizaba una menor concentración de proteína en el proceso de inmunoafinidad.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, B. y Radi, R. (2003). Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25: 295–311.
- Axelos M., Curie C., Mazzolini L., Bardet C., Lescure B. (1992). A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 30, 123-128
- Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leyva-Pérez M.O., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. (2014). Differential transcriptomic analysis by RNAseq of GSNO-responsive genes between *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant and Cell Physiology*, pcu044.
- Blamey, M. y Grey-Wilson, C. (1989). *Flora de Bretaña y Norte de Europa* ISBN 0-34040170-2
- Boschi-Muller, S., Gand, A., y Branlant, G. (2008). The methionine sulfoxide reductases: catalysis and substrate specificities. *Arch. Biochem. Biophysics*. 474: 266–273.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Burton, S. G., Cowan, D. A., y Woodley, J. M. (2002). The search for the ideal biocatalyst. *Nature biotechnology*, 20(1), 37-45.
- Chen, Y., Song, J., Sui, S., Wang, D. (2003). DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorS overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and Purification*. 32(2): 221-231.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y., y Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2110–14.

- Hayashi, M. y Nishimura, M. (2006). *Arabidopsis thaliana*—a model organism to study plant peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(12), 1382-1391.
- Jackson D.A., Symons R.H. y Berg P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*69, 2904–9.
- John, G.S., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H. et al. (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98: 9901–9906.
- Jp J., C, P. (1967). Growth y synthesis of proteins in cell suspensions of a kinetin dependent tobacco. *Physiologia Plantarum* 20, 834-&.
- Laemmli., U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685
- La Vallie, E.R., Di Blasio, E.A., Kovacic S. et al. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* 11, 187–93
- Lee, S. H., Li, C. W., Koh, K. W., Chuang, H. Y., Chen, Y. R., Lin, C. S. y Chan, M. T. (2014). MSR7 reverses oxidation of GSTF2/3 to confer tolerance of *Arabidopsis thaliana* to oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 65(17), 5049-5062.
- Li, C.W., Lee, S.H., Chieh, P.S., Lin, C.S., Wang, Y.C., y Chan, M.T. (2012). *Arabidopsis* root abundant cytosolic methionine sulfoxide reductase B genes MsrB7 and MsrB8 are involved in tolerance to oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 53: 1707–1719.
- Lobban P.E. y Kaiser A.D. (1973). Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.*78, 453–71

- Lu Z., DiBlasio-Smith E.A., Grant K.L. et al. (1996). Histidine patch thioredoxins: mutant forms of thioredoxins with metal chelating affinity that provide for convenient purifications of thioredoxin fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 5059–65.
- Maniatis, T., Fritsch, P, and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Martínez-Luaces, V., Guineo-Cobs, G., Velásquez, B. (2006). Bifactorial Design Applied to Recombinant Protein Expression. *Journal of Data Science*. 4:247-255.
- Meyerowitz, E.M., (1989). *Arabidopsis, a useful weed*. *Cell* 56, 263-269.
- Moller, IM. y Sweetlove LJ. (2010). ROS signalling—specificity is required. *Trends in Plant Science* 15, 370–374.
- Oien, DB. y Moskovitz, J. (2008). Substrates of the methionine sulfoxide reductase system and their physiological relevance. *Current Topics in Developmental Biology* 80, 93–133.
- Old, R.W. y Primrose, S.B. (1980). *Principle of gene manipulation* (Blackwell Scientific Publications)
- Perera, J., Tormo, A., y García, J.L. (2002). *Ingeniería Genética*, vols. I. Editorial Síntesis S.A. Madrid.
- Primrose, S.B. y Twyman, R.M. (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics* (Blackwell Publishing).
- Rouhier, N., Santos, C.V.D., Tarrago, L., y Rey, P. (2006) Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynth. Res.* 89: 247–262.
- Salazar, O., Molitor, J., Lienqueo, M.E., Asenjo, J.A. (2001) Overproduction, Purification, and Characterization of b-1,3- Glucanase Type II in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 23: 219-225.



- Sharov VS, Schoneich C. (2000). Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free Radical Biology & Medicine* 29, 986–994.
- Smith, P.A., Tripp, B.C., DiBlasio-Smith, E.A. et al., (1998) A plasmid expression system for quantitative in vivo biotinylation of thioredoxin fusion proteins in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.*26, 1414–20.
- Vogt W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology & Medicine* 18, 93–105
- Wang, Z., Wang, M., Liu, L. y Meng, F. (2013). Physiological and proteomic responses of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) subjected to salt stress. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20299-20325.

Páginas web consultadas:

- [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)