

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN RECOMBINANTES

CON EL PÉPTIDO AL1 DE LA HORMIGA

Pseudomyrmex triplarinus

Por:

BIOL. ARGENTINA FLORES ESPÍNOLA

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Enero 2006

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN
CON EL PÉPTIDO AL1 DE LA HORMIGA

Pseudomyrmex triplarinus

Aprobación de la Tesis:

Dra. Diana Reséndez Pérez
Asesor de la Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Co-Asesor de Tesis

Dr. Jorge Verduzco Martínez
Vocal

Dr. Mario Morales Vallarta
Secretario

Subdirector de Estudios de Postgrado

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Diana Reséndez Pérez

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Dr. Mario Morales Vallarta

Dr. Jorge A. Verduzco Martínez

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología y en el Departamento de Biología Celular y Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N. L., bajo la asesoría de la Dra. Diana Reséndez Pérez y Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
NOMENCLATURA.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. HIPÓTESIS.....	3
4. OBJETIVOS.....	4
4.1 Objetivo general.....	4
4.2 Objetivos particulares.....	4
5. IMPORTANCIA.....	5
6. ANTECEDENTES.....	7
6.1 Venenos de serpientes.....	8
6.2 Venenos de Himenópteros.....	10
6.3 Venenos de Hormigas.....	11
6.4 Veneno de la hormiga <i>P. triplarinus</i>	12
6.5 Uso de venenos en Artritis Reumatoide.....	13
6.6 Caracterización del veneno de <i>P. triplarinus</i>	15
6.7 Clonación molecular de las secuencias nucleotídicas de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga <i>P. triplarinus</i>	16
7. ESTRATEGIA GENERAL.....	17
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
8.1 Construcción de los plásmidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN-AL1 y pTYB-AL1.....	18
8.1.1 Preparación de los vectores plasmídicos.....	18
8.1.2 Obtención de los insertos codificantes al péptido AL1.....	18
8.1.3 Ligación de los vectores plasmídicos con el inserto (AL1).....	19
8.1.4 Preparación de bacterias Ca ⁺⁺ Competentes.....	20
8.1.5 Caracterización de los plásmidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN-AL1 y pTYB-AL1.....	21
8.1.6 Secuenciación de los insertos en los plásmidos recombinantes.....	22
8.2 Expresión de las proteínas de fusión con el péptido AL1.....	22
8.3 Purificación de las proteínas de fusión recombinantes.....	25

8.3.1 Preparación de las columnas de purificación.....	25
8.3.2 Purificación de las proteínas de fusión recombinantes en las columnas de afinidad.....	25
8.3.3 Corte de las proteínas de fusión.....	26
9. RESULTADOS.....	27
9.1 Construcción del plásmido recombinante pMAL-AL1.....	27
9.2 Caracterización de las clonas recombinantes pMAL-AL1.....	29
9.3 Construcción de los plásmidos recombinantes pTWIN-AL1 y pTYB-AL1.....	30
9.4 Caracterización de las clonas recombinantes pTWIN-AL1 y pTYB-AL1.....	32
9.5 Expresión de las proteínas de fusión MBP-AL1, INTEINA1-AL1 e INTEINA AL1.....	36
9.6 Purificación de la proteína recombinante MBP-AL1.....	36
10. DISCUSIÓN.....	40
11. CONCLUSIONES.....	43
12. LITERATURA CITADA.....	44
13. APENDICE.....	53

DEDICATORIA

Para esa hoja más especial de mi árbol mi amiga mamá:

Consuelo Julia Espínola Almendárez una gran mujer de quién no dejo de aprender y maravillarme por su inteligencia, sabiduría, grandeza, fortaleza, la gran nobleza de su corazón, realmente me faltarían millones de hojas para agradecerte y decirte que me siento muy orgullosa de ser tu hija te adoro con todo mi corazón. Gracias por alentarme a soñar, a viajar, y darme el valor y apoyo para aventurarme por la vida, eres la base principal que mantiene firme el tronco de mi árbol.

Con cariño para mi papa

Enrique Flores Estrada gracias a ti he logrado entender muchas cosas buenas y malas que me han hecho madurar en los últimos 4 años, guardo numerosos recuerdos muy felices en mi mente y corazón sabes que te quiero.

Para las hojas más admirables y hermosas de mi árbol mis aliadas:

Argelia Flores Espínola la del corazón más noble, te admiro, te quiero, te adoro manita chula gracias por tus consejos y la gran sinceridad de tus palabras siempre se que estas ahí para apoyarme en todo momento y quiero que sepas que eres una mujer súper completa porque eres hermosa por dentro y por fuera.

Artemisa Flores Espínola hermanita la alegría de la casa, gracias porque has sido siempre mi maestra y un ejemplo constante ha seguir, eres una persona con una inteligencia infinita te quiero, te extraño y aunque estés lejos siempre estas ahí para escucharme y apoyarme eso son cosas invaluable para mi.

Cyril Pierre Houchecorne mi otro hermanito gracias por hacer tan feliz a Artemisa. Por ser parte de la familia más chida, te quiero aunque te hallas llevado patrimonio de la nación jeje., eres una buena persona me caes muy bien.

José Armando Díaz Martínez porque eres el hombre mas maravilloso que existe en la tierra, eres esa hoja de mi árbol que esta junto a mi recorriendo la vida, gran parte de este trabajo te lo debo a ti, te agradezco infinitamente tus palabras de aliento que me impulsan constantemente para seguir adelante te amo precioso!! Eres el ángel de mi guardia contigo me siento segura y completa.

Para las hojas más sabías y más fuertes

Mi abuelita **Consuelo Almendárez Cleto** que ha compartido los momentos mas especiales de mi vida desde que nací, gracias por darme tu cariño siempre, cuidarme cuando fui pequeña mi vida no hubiera sido la misma ni aun de grande gracias por siempre consentirme y apapacharme te quiero. Eres una mujer muy fuerte y me gustaría ser como tu cuando sea grande.

Abuelita Francisca Estrada por que se que estas al pendiente de mi, que me cuidas desde donde estés y que estarías muy orgullosa de mis logros. Te quiero y ahora puedo entender muchas de las cosas que me decías de niña. Te recuerdo con cariño siempre.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Diana Reséndez por confiar en mí, por darme la oportunidad de continuar con mis metas profesionales, por apoyarme en todo momento, la admiro profundamente y me siento afortunada por haber formado parte de su equipo en este fabuloso proyecto, gracias por mostrarme y enseñarme ese maravilloso universo paralelo que es la investigación científica que desconocía cuando por casualidades del destino decidí llegar a su laboratorio y cuya aventura lleva ya ocho años.

Dra. Cristina Rodríguez por su apoyo en la realización de esta tesis en el departamento de Microbiología e Inmunología.

Dr. Mario Morales por su amistad, su confianza, por los consejos y palabras de aliento que siempre han estado presentes desde el ingreso a la licenciatura. Por enseñarme las ecuaciones para preparar soluciones...etc, que me fueron tan útiles en el laboratorio entre otros muchos fundamentos de biología celular que aprendí.

Dr. Jorge Verduzco porque es el culpable de todo esto, recuerdo claramente el día en que pregunto "si alguien esta interesado en ser becario del laboratorio de biología del desarrollo, de la Dra. Diana" Y aquí estoy fue una de las mejores decisiones que he tomado, la continuación de la historia usted la sabe le agradezco infinitamente haber confiado en mí y haberme brindado siempre todo su apoyo.

Les agradezco a todos mis compañeros del Lab. 8 con quienes compartí las frustraciones, los éxitos en cada experimento, con quienes llore, grite, sonreí, trabaje, baile, excursioné, acampe, pachanguie, discutí, admire, agradecí.....etc. Sin ustedes a mi lado y sin su apoyo constante no se que hubiera hecho gracias por su amistad, Nancy te mereces lo mejor de este mundo, gracias por todo tu apoyo, comprensión y tu valiosa amistad, Claudio gracias por tus acertados consejos, Ricardo la nena canales fue grato tenerte de compañero, Karina gracias por tu amistad sincera por escucharme y por ser mi cómplice de las escapadas al cine, te quiero, Jannet al fin terminamos!!! Hermanita veneno yuhuu, Diana gracias por tu apoyo siempre por tus palabras de aliento cuando pase por momentos difíciles, la familia modelo Fermín y Maribel por aconsejarme bien y brindarme su amistad, Ixchel bienvenida, Delia ya te falta poco!!! Melissa eres chida y tienes mucho potencial!!!, Wendy gracias por hacernos compañía los domingos y días festivos trabajando en el Lab. Y el futuro del Lab. Carlos, Jeny, Arturo y Alejandra échenle ganas!!!!

A mis amigos scouts con quienes he viajado y compartido numerosas vivencias y experiencias y quienes son parte importante de mi vida, mi grupo 34, al jefe de grupo Martín, a la manada, Oliver, Iván, a todos mis amigos del grupo 8, mi Primis, Marichu y su Mamá, Octavio, Gary, Martín, mis amigas argentinas que extraño y recuerdo Maju, Maria Fernanda, Maria Laura y Fam. Los que están lejos Jorge, Hiroki, Hana, Claire, Mi mejor amiga Goretti y mi segunda Familia. Laura la chulis, Ana, Mi mejor amigo Adrián gracias por siempre apoyarme y escucharme TQM.

A la Familia Espínola, mis primos, Ti@s, sobrinos... a todos!!, y a mi familia de San Luis, Tía Lupe, Adriana, Yuli, y Octavio gracias con cariño los quiero muchísimo.

A mis alumnos de la prepa 3 con cariño, Ricardo, Maru, Lupito, Linda, Adriana Villarreal gracias amiguita te quiero, gracias porque me apoyaste siempre en la prepa, me orientabas etc. Nancy también te quiero y a tu Mamí que siempre nos alimento mil gracias.

A mis amigos y amigas de lucha!!Almendra, Daniela, Sandra , Claudia gracias por compartir conmigo una de las aventuras que jamás olvidare, Chave, Hera, Demo, Grecia, Estefanía, Lyp y Vanesa Barcenás son geniales a tod@s l@s quiero y l@s respeto gracias por su sincera amistad.

A mis nuevos compañeros y amigos de Sanofi-Aventis, Cardio miguita!!Gina y de Reversa Omar los extraño! Jorge por creer en mí y contratarme, Gustavo por confiar en mí por apoyarme al 100 para concluir esta etapa de mi vida, a las Noritas, Gaby amiguita chucky gracias por cuidarme, apoyarme y consentirme sabes que en tu otra casa de cumbres te queremos, Nora gracias enseñarme y apoyarme desde el inicio en este mundo de la maleta, Juan Carlos, Luis, Dion, Jesy y Rosy.

Existen personas en nuestra vida que nos hacen felices por la simple casualidad de haberse cruzado en nuestro camino.

Algunas recorren el camino a nuestro lado, viendo muchas lunas pasar, mas otras apenas vemos entre un paso y otro. A todas las llamamos amigos y hay muchas clases de ellos.

Tal vez cada hoja de un árbol caracteriza a uno de nuestros amigos. El primero que nace del brote es nuestro amigo papá y nuestra amiga mamá que nos muestran lo que es la vida. Después vienen los amigos hermanos, con quienes dividimos nuestro espacio para que puedan florecer como nosotros.

Pasamos a conocer a toda la familia de hojas a quiénes respetamos y deseamos el bien. Más el destino nos presenta a otros amigos, los cuales no sabíamos que irían a cruzarse en nuestro camino.

A muchos de ellos los denominamos amigos del alma, de corazón. Son sinceros, son verdaderos. Saben cuando no estamos bien, saben lo que nos hace feliz. Y a veces uno de esos amigos del alma estalla en nuestro corazón y entonces es llamado un amigo enamorado. Ese amigo da brillo a nuestros ojos, música a nuestros labios, saltos a nuestros pies.

Más también hay de aquellos amigos "por un tiempo" tal vez unas vacaciones o unos días o unas horas. Ellos acostumbraban a colocar muchas sonrisas en nuestro rostro, durante el tiempo que estamos cerca.

Hablando de cerca, no podemos olvidar a amigos distantes, aquellos que están en la punta de las ramas y que cuando el viento sopla siempre aparecen entre una hoja y otra.

El tiempo pasa, el verano se va, el otoño se aproxima y perdemos algunas de nuestras hojas, algunas nacen en otro verano y otras permanecen por muchas estaciones. Pero lo que nos deja más felices es que las que cayeron continúan cerca, alimentando nuestra raíz con alegría.

Son recuerdos de momentos maravillosos de cuando se cruzaron en nuestro camino.

Te deseo hoja de mi árbol, paz, amor, suerte y prosperidad. Hoy y siempre... Simplemente porque cada persona que pasa en nuestra vida es única.

Siempre deja un poco de sí, y se lleva un poco de nosotros. Habrá los que se llevan mucho, pero no habrá de los que no nos dejen nada.

Esta es la mayor responsabilidad de nuestra Vida y la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad.

"El árbol de los amigos" - Jorge Luis Borges.

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados Centígrados
Ca ⁺⁺	Calcio competentes
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	1, 4 Ditiotritol
g	Gramos
h	Horas
IPTG	Isopropil-β-D-Tiogalactósido
kDa	Kilodaltones
L	Litros
M	Concentración molar
m	Metro
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetro
N	Concentración normal
nm	Nanometros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno (logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno)
%	Por ciento
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SDS	Lauryl Sulfato de Sodio
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tm	Temperatura media de alineamiento
Tris	Tris-hidroxi-metil aminometano
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltio
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Articulación afectada por Artritis Reumatoide.....	5
2	El veneno contiene péptidos con potencial terapéutico.....	7
3	Serpiente de Cascabel perteneciente a la Familia Crotalidae.....	8
4	Veneno de Himenópteros.....	10
5	Hormiga <i>Pachycondila goeldi</i> capturando a su presa.....	11
6	Hormiga Pseudomyrmecinae, <i>Pseudomyrmex triplarinus</i>	12
7	Estilete de la hormiga <i>P. triplarinus</i>	13
8	Estrategia para la construcción de los plásmidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN-AL1, pTYB-AL1.....	21
9	Sistema pMAL para la expresión y purificación del péptido AL1.....	23
10	Sistema IMPACT-TWIN para la expresión de la proteína de fusión pTWIN-AL1 y purificación del péptido AL1.....	24
11	Sistema IMPACT-CN para la expresión de la proteína de fusión pTYB-AL1 y purificación del péptido AL1.....	26
12	Construcción del plásmido recombinante pMAL-AL1.....	28
13	Caracterización de las clonas pMAL-AL1 con enzimas de restricción.....	30
14	Construcción de los plásmidos recombinantes pTWIN-AL1 y pTYB-AL1.....	31
15	Caracterización del plásmido pTWIN-AL1 con enzimas de restricción.....	33
16	Caracterización del plásmido pTYB-AL1 con enzimas de restricción.....	35
17	Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-AL1.....	37
18	Expresión de la proteína de fusión INTEINA1-AL1.....	38
19	Expresión de la proteína de fusión INTEINAC-AL1.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Reacción de alineamiento de los oligonucleótidos.....	19
II	Ligación de los vectores plasmídicos con el inserto AL1.....	20

1. RESUMEN

Desde épocas precolombinas se conoce que algunas poblaciones indígenas sudamericanas usaban el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* para aminorar los síntomas de la Artritis Reumatoide. La caracterización parcial de los componentes peptídicos de este veneno, mostró que contiene 12 proteínas siendo los más abundantes 4 péptidos de bajo peso molecular. El uso del veneno completo o de los péptidos de bajo peso molecular han inducido una mejoría generalizada en pacientes con Artritis Reumatoide y una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal respectivamente. En este proyecto nos enfocamos a la expresión de proteínas de fusión con uno de los péptidos de bajo peso molecular (AL1). Para ello se clonó la secuencia nucleotídica codificante a AL1 en los vectores de expresión procarióticos pMAL, pTWIN y pTYB y las clonas fueron secuenciadas para la confirmación de la secuencia nucleotídica. Posteriormente, los plásmidos recombinantes se transformaron en las cepas de *Escherichia coli* TB1 y ER2566 y se realizó el análisis de la expresión del péptido AL1 unido a la proteína de unión a maltosa (MBP) y a las Inteinas. Las tres proteínas de fusión fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5% y MBP-AL1 fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando la resina de amilosa. Finalmente, se realizaron los ensayos de liberación del péptido AL1 mediante el corte para la MBP con la proteasa Xa y para la Inteinas se utilizaron condiciones reductoras de pH 7 y con DTT a 25°C.

Durante el desarrollo de la tesis se realizó exitosamente la expresión de las proteínas de fusión MBP-AL1, INTEINA1-AL1 e INTEINAC-AL1 en tres sistemas de expresión procarióticos. Además se realizó la purificación de la proteína de fusión MBP-AL1 y desafortunadamente el péptido AL1 no se pudo separar en ninguna de las proteínas de fusión. La producción a futuro de este péptido AL1 requiere optimizar las condiciones de liberación, así como determinar el análisis funcional y su potencial actividad anti-inflamatoria lo que ofrece un producto farmacológicamente prometedor en el tratamiento de pacientes con enfermedades inflamatorias y Artritis Reumatoide.

2. INTRODUCCIÓN

Históricamente, la picadura de hormigas para tratar síntomas de Artritis Reumatoide se remonta a tiempos precolombinos donde evidencias populares indican que algunas poblaciones indígenas sudamericanas utilizaban el veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* para aminorar los síntomas de la Artritis Reumatoide. Esta medicina tradicional es utilizada en áreas rurales de América del Sur y era una terapia común en la boca del Amazonas en las regiones montañosas superiores en el lado Atlántico de los Andes (Holzman, 1968). La hormiga *Pseudomyrmex arboris-sanctae* es mejor conocida como *Pseudomyrmex triplarinus* porque se asocia al árbol *Triplarinus americana* con el que establece una simbiosis habitando en la cavidad medular (Wheeler, 1942). El árbol es conocido en Brasil como "Tachi", en Perú como "Tangarana" y en Bolivia es popularmente conocido como "Palo Santo" o "Palo Diablo", debido a que las hormigas hospederas son muy agresivas con herbívoros y depredadores por lo que dejan un círculo de protección alrededor del árbol (Schultz y Arnold, 1984). Los péptidos de menor peso molecular del veneno de *P. triplarinus* presentan una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal de ratas inducidas con carragenina (Hink *et al.*, 1994). La inyección de una fracción parcialmente purificada del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp* mostró una supresión completa de la artritis en ratas (Schultz y Arnold, 1984).

El uso del veneno de *P. triplarinus* ha mostrado una mejoría generalizada en pacientes con Artritis Reumatoide y los péptidos de bajo peso molecular una alta actividad anti-inflamatoria en el modelo animal de ratas respectivamente. Sin embargo, se ha detectado una alta variabilidad en el tratamiento administrado a pacientes. Por lo que la producción de estos péptidos en condiciones controladas de laboratorio permitirá el desarrollo de diversas drogas farmacológicas en el tratamiento de diferentes enfermedades anti-inflamatorias.

3. HIPÓTESIS

La subclonación de la región nucleotídica que codifica para el péptido AL1 en vectores de expresión bacterianos permitirá la expresión y purificación de las proteínas de fusión con el péptido de bajo peso molecular AL1.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Expresar y purificar las proteínas de fusión con el péptido de bajo peso molecular AL1 usando los sistemas de expresión procarióticos pMAL, IMPACT-TWIN e IMPACT-CN.

4.2 Objetivos Particulares

1. Clonación de la secuencia nucleotídica en los vectores procarióticos pMAL, pTWIN y pTYB
2. Expresión de las proteínas de fusión con el péptido AL1 y análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5%
3. Purificación de las proteínas de fusión con el péptido AL1 usando cromatografía de afinidad con columnas de amilosa y quitina.

5. IMPORTANCIA

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria que afecta en forma simétrica las articulaciones periféricas, con la presencia de sinovitis persistente, la cual conduce a daño articular y del hueso subcondral. El daño es muy variable, difícil de predecir y es una enfermedad incapacitante, por la deformidad articular y la sintomatología dolorosa que la acompaña. La AR es una enfermedad autoinmune de causa desconocida y multifactorial y las estrategias terapéuticas disponibles permiten solo cierto control sobre la progresión de la enfermedad y el tratamiento es de tipo paliativo, esta enfermedad puede aparecer a cualquier edad con una incidencia máxima en la tercera y cuarta década de la vida la prevalencia en la población es del 0.8% por lo que se estima que el 80% de los pacientes desarrolla la enfermedad entre los 30 y 50 años de edad y tiene una duración variable, irregular en general larga, por lo que es una enfermedad crónica y frecuente ya que de cada 100 mexicanos uno padece artritis reumatoide (www.descope.com/reumatología/smr/p2).

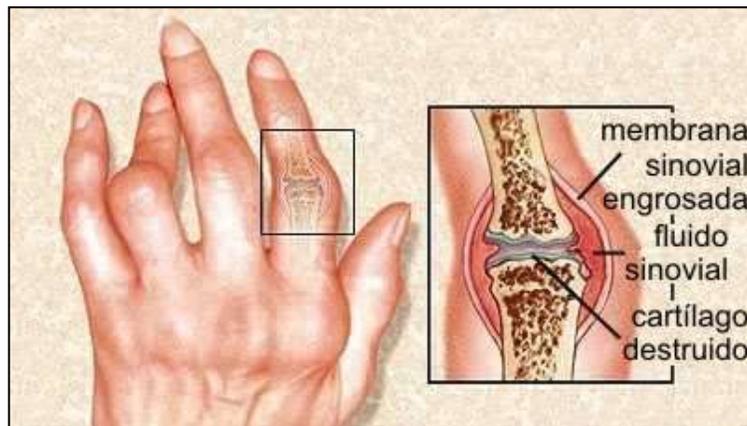


Figura 1. Articulación afectada por Artritis Reumatoide. Se observa la membrana sinovial que recubre la articulación y es responsable del dolor e hinchazón frecuentes. La persistencia de la inflamación lleva consigo daños hasta el hueso subcondral. Tomado de Mayo Foundation for Medical Education and Reserch, www.medspain.com/n5_jun99/artritis_tto.htm.

En general, los tratamientos actuales y disponibles en AR proporcionan alivio al dolor y reducción de la inflamación así como mejoría en el desarrollo de la enfermedad,

pero ninguno es curativo y todos ellos provocan importantes y variadas reacciones adversas. Por lo tanto es de suma importancia encontrar nuevos tratamientos que ofrezcan una ayuda eficaz en los síntomas y pronóstico de esta enfermedad.

La característica más importante del uso del veneno de *P. triplarinus* en el tratamiento de AR ha sido que produce una mejoría generalizada que en la mayoría de los casos se ha mantenido por espacio de seis meses, por lo que no necesita aplicarse

continuamente como la mayoría de los medicamentos que se usan actualmente. Debido a lo anterior el veneno de *P. triplarinus* es un tratamiento de origen natural con muchas ventajas para su caracterización, estudio funcional y aplicación en el tratamiento de artritis reumatoide.

La relevancia de este estudio en la expresión y purificación en el laboratorio del péptido de bajo peso molecular codificante a la subunidad mayor AL1 del veneno de *P. triplarinus* usando tres sistemas distintos de expresión procarióticos para la producción de este péptido en cantidades suficientes permitirá el análisis funcional valioso para el tratamiento así como el pronóstico de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias y Artritis Reumatoide.

6. ANTECEDENTES

El ser humano se ha interesado en el estudio de venenos provenientes de Artrópodos y reptiles ya que el veneno en algunos casos presenta consecuencias fatales y en otros casos muestran efectos benéficos (Figura 1). El análisis de los componentes de diferentes venenos ha mostrado algunos péptidos con un fuerte e importante potencial terapéutico. La actividad biológica de los péptidos en los venenos puede ser citotóxica, antimicrobial o hemolítica en varios tipos de células bacteriales, fúngicas, de mamíferos y especialmente células sanguíneas. La especificidad biológica de cada péptido depende del ambiente en el cual es encontrado cada organismo. Los artrópodos venenosos han desarrollado un sistema ofensivo adicional en sus glándulas de veneno el cual en general contiene algunas enzimas, compuestos de bajo peso molecular, neurotoxinas, algunos péptidos antimicrobiales, citolíticos y toxinas las cuales son usadas como mecanismo rápido de inmovilización y/o aniquilación de su presa o agresor (Lewis y García, 2003).

La actividad hemolítica del veneno de abejas, avispas y hormigas ha sido observada desde hace mas de tres décadas, el veneno de himenópteros picadores contienen una variedad de sustancias biológicamente activas como neurotoxinas, quininas, hemolisinas, compuestos de bajo peso molecular como la histamina y la serotonina, también contiene altos niveles de hialuronidasa y fosfolipasas. Cada vez más péptidos activos han sido identificados y caracterizados por ser blancos potenciales para el desarrollo de diversas drogas farmacológicas que ayudan de algún modo en el tratamiento de diferentes enfermedades.

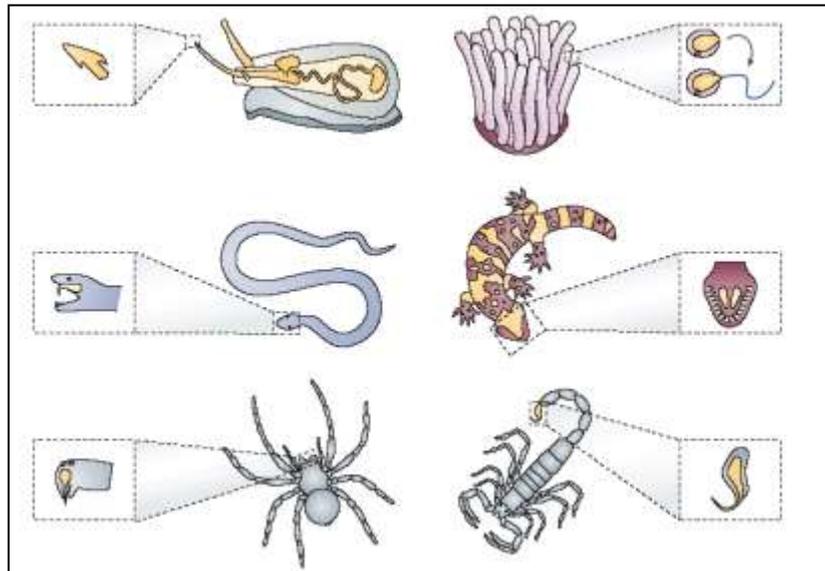


Figura 2. El veneno contiene péptidos con potencial terapéutico. Los aparatos venenosos como arpones, nematocistos, dientes y estiletes del caracol, la anémona, la serpiente, la araña y el escorpión están altamente adaptados y desarrollados en los diferentes organismos.

6.1 Venenos de serpientes

Existen cerca de 2000 diferentes tipos de serpientes, cerca de 300 son conocidas por ser venenosas y son clasificadas de acuerdo a las características morfológicas en cinco familias: Crotalidae (Figura 2), Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae y Colubridae. El veneno de las serpientes venenosas usualmente contiene proteínas enzimáticas, no enzimáticas y neurotoxinas. Las fracciones proteínicas son biológicamente más importantes; muchas de las enzimas son hidrolíticas en la naturaleza a excepción de L-amino acid oxidasa, el cual causa desaminaciones oxidativas de aminoácidos que facilitan el daño en el tejido de la presa y le ayuda a una digestión eventual. Algunas enzimas también participan activamente en la coagulación sanguínea, anticoagulación, hemorragias, hemólisis, acción autofarmacológica y en la lisis de células y membranas mitocondriales (Tu 1977).



Figura 3. Veneno de la Serpiente de Cascabel perteneciente a la Familia Crotalidae. Las serpientes inyectan el veneno letal por la acción de una mordedura a través de dos colmillos altamente desarrollados.

La composición del veneno en las serpientes es una solución compleja compuesta de diferentes proteínas y componentes no proteicos pueden ser divididos en constituyentes inorgánicos como cationes y aniones, sodio, los metales divalentes actúan como cofactores para muchas actividades enzimáticas y biológicas (Devi, 1968, Friederich y Tu, 1971). Las proteasas son metaloproteínas que contienen Ca y Zn; el Ca es usado para la activación de fosfolipasa A₂ (Boffa *et al.*, 1969, Augustyn *et al.*, 1970) y es necesario para la activación del factor hemolítico directo (Mirsalikhova *et al.*, 1975). Además contienen constituyentes orgánicos como aminoácidos libres, péptidos pequeños, nucleótidos y compuestos de adenosina y guanosina (Doery, 1957) así como carbohidratos en forma de glicoproteínas (Basu *et al.*, 1970). Estudios realizados por Braganca y Patel en 1965 indican que las neurotoxinas en las cobras son glicoproteínas. Los venenos son glicoproteínas como el coagulante sanguíneo Arbin aislado del veneno de *Agkistrodon rhodostoma* (Hatton, 1973).

Se encontraron también azúcares neutros (galactosa, manosa y mucosa), amino azúcar (glucosamina) y ácido sialico (ácido acetilneuramínico; Oshima e Iwanaga, 1969), lípidos principalmente los fosfolípidos y fosfatidilcolina. Las aminas biogénicas son las causantes de la producción de dolor en el sitio de la mordedura como bradiquinina, histamina, 4-hidroxitriptamina, *N*-metilriptamina, *N,N*-dimetil-5-hidroxitriptamina (bufotenina), *N*-metil-5-hidroxitriptamina y serotonina (Welsh, 1966).

Las proteínas que forman el veneno de serpientes como las enzimas son principalmente la fosfolipasa A₂ presente en todas las serpientes venenosas. El antisuero específico contra el veneno de una especie en particular inhibe la actividad fosfolipasa A₂ del veneno de especies cercanas, pero falla suprimiendo la actividad fosfolipasa A₂ de venenos de otras familias. Los efectos biológicos de la fosfolipasa A₂ sobre la mitocondria es el principal factor que interrumpe la cadena transportadora de electrones y la integridad de la estructura mitocondrial. La fosfolipasa A₂ causa solubilización de la membrana mitocondrial (Salach *et al.*, 1971) causando efecto sobre nervios y músculos (Rosemberg y Ehrenpreis, 1961; Rosenberg y Dettbarn, 1964). Además la fosfolipasa A₂ bloquea la actividad eléctrica y facilita la penetración de acetilcolina dentro de los axones dando como resultado la hidrólisis fosfolipídica en los axones (Condrea *et al.*, 1967).

La presencia de la fosfomonoésterasa es muy común en el veneno de serpientes así como la fosfatasa ácida y la alcalina (Tu y Chua, 1966). Otra de las enzimas es la acetilcolinésterasa presente en algunos venenos de serpientes y es común en nervios, suero eritrocitos y en la retina, la acetilcolinesterasa esta involucrada en la transmisión nerviosa pero no es responsable de la acción neurotóxica de los venenos de serpientes (Yang *et al.*, 1960).

La utilización de péptidos provenientes de venenos de serpientes venenosas para enfermedades cardiovasculares es uno de primeros ejemplos exitosos como captopril (Capoten; Anakena) que inhibe la conversión de la enzima angiotensina I (iECA), una enzima esencial para la producción de angiotensina II, es un vasoconstrictor asociado con la hipertensión. Los inhibidores ECA son una importante clase de agentes antihipertensivos (Dei *et al.*, 2003). Péptidos provenientes de la mamba verde *Dendroapsis augusticeps* también han sido observadas por tener potencial terapéutico (Chen *et al.*, 2002). El veneno de serpientes se ha utilizado también para el desarrollo de un nuevo antitrombótico que actúa como antagonista competitivo del unión al ligando (por ejemplo el fibrinógeno) a integrina α IIb β 3 sobre plaquetas activadas. Existen formulados intravenosos que son utilizados clínicamente (Hatman *et al.*, 1992). Los venenos de serpientes son conocidos también por contener péptidos con propiedades anti-hemorrágicas esto incluye a la Textilita un nuevo inhibidor serina proteasa antifibrinolítico común en el veneno de la serpiente café *Pseudonaja textiles* (Filippovich *et al.*, 2002). Este péptido es utilizado como anticoagulante en las cirugías de corazón abierto. Se han encontrado muchos factores hemostáticos en venenos de serpientes que han sido utilizados en el diagnóstico para medir los niveles de

fibrinógeno, protrombina, factores sanguíneos y proteína C asociada a desordenes hemostáticos (Sharpe *et al.*, 2001).

6.2 Venenos de Himenópteros

Los himenópteros están divididos en: avispas parásitas (Ichneumonidae y Braconidae), las avispa araña (Pompilidae), las hormigas (Formicidae) las avipas (Vespidae y Eumenidae) y las abejas y abejorros (Apidae) (Figura 3). Los venenos constituyen un grupo donde una de las características principales de su veneno es para defensa o para capturar a su presa.



Figura 4. Venenos de Himenópteros. Las avispas (A) utilizan su veneno para capturar a sus presas y para defenderse. Los abejorros (B) y las abejas (C) utilizan su veneno principalmente como defensa de sus colonias contra sus agresores vertebrados e invertebrados. Estos himenópteros inyectan el veneno por medio de un aguijón o estilete. Tomado de www.bugInfo.com y www.mancina.vispa.com/cleveland

Alrededor de tres décadas atrás, las actividades hemolíticas habían sido observadas en venenos de diferentes abejas, avispas y hormigas (Bettini, 1978). Los insectos himenópteros picadores mejor investigados son las abejas *Apis mellifera* (Castells, 1998). Los venenos de los himenópteros picadores contienen una variedad de sustancias biológicamente activas. Así mismo también contienen altos niveles de hialuronidasa, fosfolipasa, quininas neurotóxicas, hemolisinas y compuestos de bajo peso molecular como la histamina y la serotonina (Piek, 1986). Una gran cantidad de péptidos citolíticamente activos han sido identificados y caracterizados.

Uno de los péptidos citolíticos mejor investigados de la familia de abejas es la melitina un componente del veneno de la abeja mielera *Apis mellifera* (Habermann *et al.*, 1967 y Kreil, 1975). El 40% del peso seco de la abeja mielera es la melitina en el veneno seguido por la fosfolipasa A₂ con 10-12% (Banks *et al.*, 1986). Este péptido causa la lisis de eritrocitos de diferentes especies e induce a la liberación de histamina de las células mastocíticas y facilita la actividad de fosfolipasa A₂ (Habermann, 1972). La melitina interactúa con muchas proteínas como la cadmodulina (Kataoka *et al.*, 1989), la calsequestrina (He *et al.*, 1993), lípidos cargados negativamente y gangliósidos (Dempsey, 1990 y Chatterjee *et al.*, 2002). La melitina mostró actividad insecticida contra *D. melanogaster*, actividad antimicrobial para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y para hongos en rangos micromolares. La actividad de este péptido citolítico es muy parecida a los péptidos de venenos de arañas (Moerman *et al.*, 2002, Kuhn-Nentwing, 2002, Fennell *et al.*, 1968 y Mitchell *et al.*, 1971).

Las avispas sociales y las solitarias de las familias Vespidae y Eumenidae así como la avispa araña solitaria de la familia Pompilidae utilizan sus venenos para capturar a sus presas y para defenderse. En contraste con las avispas sociales las cuales se alimentan de una pulpa incubada en su presa, las avispas solitarias paralizan a su presa para alimentar a sus larvas. Muchos péptidos citolíticos del veneno de las avispas sociales han sido caracterizados por ejemplo el mastoparan de *Vespula lewinsii* (Hirai *et al.*, 1979), mastoparan B de *Vespa basalis* (Ho *et al.*, 1991) mastoparan M, mastoparan X, mastoparan C y crabrolina, HR-I y II, *polistes* masoparan, eumenine masoparan y anoplin. Todos estos mastoparanes y HR-I adoptan una estructura α -helicoidal compuesta de 14 residuos con dos o cuatro aminoácidos catiónicos. Entre las actividades biológicas que presentan los mastoparanes tienen una baja lisis celular, degranulación de las células mastocíticas y liberación de histamina lo que promueve la facilitación de la fosfolipasa A₂ de diferentes orígenes (Argiolas *et al.*, 1983) y la activación de GTP unido a proteínas (Higachijima *et al.*, 1988). Los mastoparanes D y los análogos son bactericidas. La Crabrolina es menos hemolítica y menos activa en la liberación de histamina; la conformación α -helicoidal es necesaria para la actividad hemolítica pero no es prerequisite para la actividad bactericida (Argiolas *et al.*, 1984, Krishnakumari y Nagaraj 1997). La Anoplin tiene también actividad antibacterial, liberación de histamina y niveles muy altos de actividad hemolítica.

6.3 Venenos de hormigas

Las hormigas picadoras de diferentes subfamilias como Ponericinae, Myrmicinae, Ecitoninae, Pseudomyrmecinae y Myrmeciinae poseen un veneno complejo y rico en hialuronidasa, fosfolipasa, neurotoxina, histamina y compuestos de menor peso molecular, hemolisinas responsables de causar daño a los eritrocitos (Blum y Hermann, 1978 y Schmidt, 1986) lo cual ha despertado el interes en la búsqueda de nuevos péptidos antimicrobiales y terapéuticos.



Figura 5. Hormiga *Pachycondila goeldi* capturando a su presa. El veneno de esta hormiga contiene péptidos antimicrobiales e insecticidas los cuales han sido aislados y caracterizados.

Las hormigas usan sus venenos para capturar a su presa, como estrategia de defensa contra predadores vertebrados e invertebrados y para comunicación. Las presas sometidas, paralizadas o asesinadas son llevadas al interior de las colonias completa o en piezas pequeñas y son usadas directamente como alimento para adultos o para sus larvas. El primer reporte sobre el aislamiento y caracterización de péptidos antibacteriales del veneno de hormigas fue obtenido de *Pachycondila goeldi* una hormiga Ponericinae de la Guyana Francesa (Figura 4). 15 péptidos fueron obtenidos del veneno de esta hormiga y denominados ponericanas. Estos fueron clasificados en tres diferentes familias de péptidos insecticidas y antibacteriales de las glándulas de veneno, nombradas ponericanas G, W y L (Orivel *et al.*, 2001). Las ponericanas muestran pesos moleculares entre 1.8 y 3.4 kDa y consisten de 18 a 30 aminoácidos que están presentes en concentraciones de 0.3–23 mM en el veneno. Las ponericanas G están compuestas de siete diferentes péptidos que tienen una alta similitud en sus secuencias y también con la cecropina. La comparación de las ponericanas W1-6 con la gaegurina 5 un péptido antimicrobial de la rana *Rana rugosa* (Park *et al.*, 1994) y con la melitina mostró un 70% de similitud en sus secuencias aminoácidas. Las ponericanas L1 y 2 son similares para la familia dermaseptina proveniente de la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagii*

6.4 Veneno de la hormiga *P. triplarinus*



Figura 6. Hormiga Pseudomyrmecinae, *Pseudomyrmex triplarinus*. El veneno de esta hormiga ha sido utilizado como terapia contra enfermedades inflamatorias por indígenas sudamericanos y se localiza estableciendo una simbiosis con en el árbol *Triplaris americana*.

Históricamente, la picadura de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* para tratar síntomas de Artritis Reumatoide se remonta a tiempos precolombinos donde evidencias populares indican que algunas poblaciones indígenas sudamericanas utilizaban el veneno de esta hormiga para aminorar los síntomas de la Artritis Reumatoide. Esta medicina tradicional es utilizada en áreas rurales de América del Sur y era una terapia común en la

boca del Amazonas en las regiones montañosas superiores en el lado Atlántico de los Andes. La hormiga *Pseudomyrmex arboris-sanctae* es conocida como *Pseudomyrmex triplarinus* ya que se le encuentra siempre asociada a los árboles Polygonaceae (*Triplaris americana*). Este es un árbol nativo comúnmente localizado en varias regiones de Sudamérica como Brasil, Bolivia y Perú. Es conocido en Brasil como "Tachi", en Perú como "Tangarana" y en Bolivia es popularmente conocido como "Palo Santo" o "Palo Diablo", debido a que las hormigas hospederas son muy agresivas con herbívoros y depredadores por lo que dejan un círculo de protección alrededor del árbol que permite la mejor obtención de nutrientes del árbol (Wheeler 1942).

El veneno de estas hormigas está contenido en un saco abdominal y es inyectado dentro de la víctima por un aguijón o estilete retractable en el interior del abdomen (Figura 6) la reacción local se muestra como un eritema seguido por un edema en ocasiones puede durar días (Lewis y De la Lande, 1967).

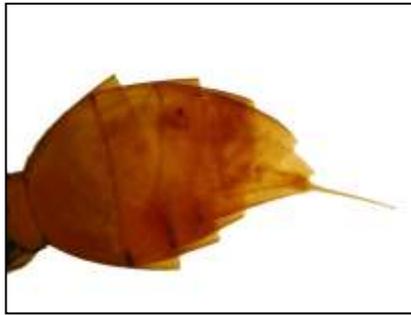


Figura 7. Estilete de la hormiga *P. triplarinus*. La imagen muestra la región abdominal donde se encuentra localizado el estilete retráctil altamente desarrollado inyector del veneno.

El veneno de *P. triplarinus* es un líquido cristalino, bacteriológicamente estéril, de pH 5.8 y químicamente estable. Este contiene un polisacárido (PS) estable al calor que es obtenido por precipitación con alcohol etílico, soluble en glicol propilénico y glicerol. El polisacárido (PS) precipitado del veneno de *P. triplarinus* con alcohol etanol a 0 °C contiene manosa, N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa, N-acetilgalactosamina y glucosa, además de un alto contenido de ácido hexurónico, que da al PS una carga neta negativa (Shultz y Arnold 1978).

El análisis de los componentes del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex* comparado con el de abejas, avispas y otras hormigas presenta una alta actividad de fosfolipasa así como una mediana actividad hemolítica (Schmidt, 1986).

6.5 Uso de venenos en Artritis Reumatoide

En el tratamiento de la Artritis Reumatoide se ha usado el veneno de abejas, como un agente anti-inflamatorio (Thompson 1933, Beck 1935 y Mraz 1982). Sin embargo, el veneno de la abeja y la avispa fue efectivo inhibiendo la artritis solo en

algunos experimentos (Chang y Bliven, 1979) y fue más efectivo inhibiendo el adyuvante que induce a artritis en ratas hembras Lewis, en donde la inflamación no fue eliminada totalmente (Eiseman *et al.*, 1982). El mecanismo de acción para éstos venenos es conocido por estimular la glándula suprarrenal con la producción y aumento de los niveles de cortisona en suero (Tu 1977, Vick y Shipman, 1972). Esto es similar a la inyección de esteroides, este mecanismo fue evaluado primeramente por el Dr. Hans Selye en los años cuarenta, en el fenómeno de stress.

En 1968, Holzmann un médico alemán que vivía en América del Sur usó el veneno de éstas hormigas para tratar la artritis reumatoide que padecía observando una mejoría generalizada, este trabajo permitió iniciar diversos estudios con el veneno de estas hormigas encontrando efectos benéficos en pacientes artríticos a quienes les administró el veneno de la hormiga (resultados no publicados).

Los extractos de estas hormigas presentaron actividad anti-inflamatoria usando el modelo de edema en ratas inducidas con carragenina (Winter *et al.*, 1962). Las ratas tratadas mostraron mejoría en la pata trasera y en el tamaño de la inflamación, este estudio fue confirmado en 1975 por Charles Sisk y Harvey Brown en un doble estudio ciego llevado a cabo en 30 pacientes. La administración del veneno mostró mejoría significativa. La inyección de una fracción del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex sp.* parcialmente purificado fue administrado a la ratas Sprague-Dawley inducidas a artritis con adyuvante de Freud's mostrando una supresión completa de la artritis (Schultz y Arnold, 1984).

Posteriormente, Altman y cols de la División de Artritis de la Facultad de Medicina de la Universidad de Miami, realizaron un doble ciego controlado con 30 pacientes con artritis reumatoide clásica por el criterio de ARA (Ropes *et al.*, 1958). La preparación del veneno consistió en un extracto alcohólico del veneno de la hormiga 15 pacientes control recibieron 0.1mg de histamina fosfato por inyección para estimular los efectos del veneno de la hormiga (testigo negativo). El veneno o placebo fue administrado subcutáneamente de la siguiente manera: 0.1ml el primer día incrementando la dosis hasta 1ml por día durante 5 días, 1ml del 6to al 14vo día. La actividad reumatoide fue medida en base al criterio descrito por Lansbury en 1956 y 1958. Los resultados mostraron que después de 14 días de tratamiento, la rigidez matutina disminuyó en un 78%, la fatiga no sufrió cambios, la fuerza de presión mejoró un 22% y las articulaciones sensibles al dolor bajaron de 24 a 3 en el índice articular de Ritchie. Esta mejoría generalizada frecuentemente se mantuvo por espacio de 6 meses, sin embargo el factor reumatoide, y los niveles de colesterol no se modificaron (Altman *et al.*, 1982 y 1984).

6.6 Caracterización del veneno de *P. triplarinus*

Una fracción parcialmente purificada del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* fue aplicada en 10 pacientes con artritis reumatoide. Estos pacientes tratados mostraron una mejoría estadísticamente significativa en la rigidez matutina, el índice de Ritchie y en la intensidad del dolor. Las reacciones adversas se limitaron a eritema en el sitio de la inyección en todos los pacientes y prurito local con fiebre en un paciente (Astorga, 1992). La eficacia y seguridad del extracto del veneno parcialmente purificado fue probado en 15 pacientes con artritis reumatoide activa, que tenían tratamiento con medicamentos anti-inflamatorios y en algunos casos con metrotexate. Los resultados mostraron una mejoría significativa en el número de articulaciones afectadas así como el índice de Ritchie, rigidez matinal y la intensidad del dolor. Dos pacientes experimentaron reacciones moderadas locales y no se encontraron alteraciones en las pruebas de laboratorio clínico de los pacientes durante este estudio (Burgos y Vargas, 1993).

La caracterización parcial de componentes peptídicos del veneno de *P. triplarinus* mostró que el veneno contiene 12 proteínas de 4200 a > 100 000 Da, con cuatro proteínas abundantes que fueron aisladas y purificadas mediante cromatografía de baja presión (Hink *et al.*, 1994). Los péptidos de menor peso molecular del veneno mostraron una alta actividad anti-inflamatoria en ratas inducidas con carragenina. Desafortunadamente, el tratamiento clínico en pacientes tratados con estos péptidos purificados mostraron resultados no reproducibles que requieren ser confirmados para evitar las variaciones y los problemas técnicos que se encontraron en los pacientes que recibieron el tratamiento (R. Kinsolving comunicación personal).

El análisis reciente de los péptidos de bajo peso molecular permitió aislar seis isoformas diferentes del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus* con pesos moleculares que varían entre 6998 y 7142 Da. Estas isoformas denominadas Mirmexinas I-VI están constituidas de diferentes heterodímeros formados de una subunidad pequeña (SS1, SS2 ó SS3) unida mediante puente disulfuro a la subunidad mayor (LS1 ó LS2) en diferentes combinaciones. El análisis funcional con una dosis de 12 mg/kg del veneno completo proporcionó un 82% de actividad anti-inflamatoria en el modelo animal. La dosis correspondiente de Mirmexinas (5.4mg/kg) mostró solamente un 52% actividad anti-inflamatoria y el incremento de la dosis de Mirmexinas a 9.8mg/kg aumentó la actividad anti-inflamatoria hasta un 90% (Pan y Hink, 2000).

6.7 Clonación molecular de las secuencias nucleotídicas de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *P. triplarinus*

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo el análisis molecular y disección morfológica de las hormigas *Pseudomyrmex triplarinus* colectadas en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Las hormigas fueron observadas morfológicamente y disectadas para el análisis de cada una de las estructuras cabeza, tórax y abdomen con la presencia de un pecíolo y post-pecíolo, un estílete bien desarrollado y un surco metabasitarsal ausente características que permiten identificar la subfamilia *Pseudomyrmicinae* utilizando las claves taxonómicas de Bolton, 1994.

Además, llevamos a cabo la elusión del veneno y extraído de las esponjas de teflón para su posterior liofilización y análisis de los componentes protéicos del veneno mediante electroforesis SDS-PAGE donde se verificó las 4 bandas más abundantes descritas anteriormente por Hink *et al.*, en 1994 y donde los péptidos de bajo peso molecular presentaron una movilidad electroforética de aproximadamente 6998 Da. Las secuencias nucleotídicas codificantes para los péptidos de bajo peso molecular se obtuvieron con oligonucleótidos específicos de las secuencias que codifican para los péptidos SS1 y AL1 utilizando la tabla de uso de codones más frecuentes en *Escherichia coli* y *Drosophila melanogaster*. Las secuencias nucleotídicas que codifican a los péptidos menor SS1 y mayor AL1 fueron clonadas en el vector pCR 2.1 TOPO y secuenciadas para verificar la identidad de 87bp para SS1 y 99bp para AL1 (Flores-Espínola y Salinas, 2002).

Debido al potencial terapéutico de los péptidos de bajo peso molecular del veneno de la hormiga *P. triplarinus* en este proyecto nos enfocamos en la expresión y purificación de proteínas de fusión con el péptido de bajo peso molecular AL1 en tres sistemas de expresión procarióticos de *Escherichia coli*.

10. ESTRATEGIA GENERAL

17



11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Construcción de los plásmidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN-AL1 y pTYB-AL1

11.1.1 Preparación de los vectores plasmídicos

El vector plasmídico pMAL fue digerido con las enzimas de restricción *XmnI* y *EcoRI* y los vectores plasmídicos pTWIN y pTYB fueron digeridos con las enzimas *SapI* y *PstI* como se muestra en la Figura 8. Se digirió 1µg de cada plásmido con las enzimas correspondientes y después fueron purificados utilizando columnas Wizard® de Promega como se describe a continuación. La purificación del producto amplificado mediante PCR de la secuencia codificante AL1 y digerido con *EcoRI* se realizó en medio líquido colocando 50µl (20ng/µl) AL1 y 50µl de solución de unión a membrana. Para la purificación de los vectores pMAL, pTWIN y pTYB se realizó la electroforesis agarosa preparativa al 0.8% en gel de agarosa. Del gel se extrajo la banda de interés la cual fue pesada para adicionarle 10µl de solución de unión a membrana por cada 10mg de gel de agarosa, se mezcló y se incubó a 60°C por 10 min hasta que se disolvió completamente la agarosa. Para ambas purificaciones (líquida y de gel) se continuó transfiriendo el líquido conteniendo DNA y la solución de unión a membrana a la columna de purificación donde se incubó por 1 min a temperatura ambiente para luego ser centrifugado por 1 min. a 10,000 rpm, el sobrenadante fue desechado por decantación, y la columna reinsertada en el tubo, luego se agregaron 700µl y después 500µl de solución de lavado de membrana a la columna, se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min en cada lavado se desecho el sobrenadante, después del último lavado la columna fue transferida a un tubo limpio de 1.5ml y se adicionaron 50µl de H₂O miliQ se incubó por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 rpm para la eluir el DNA el cual fue almacenado a -20°C.

11.1.2 Obtención de los insertos codificantes al péptido AL1

Para la construcción del plásmido recombinante pMAL-AL1 se diseñó un oligonucleótido adaptador en el extremo 3' con un sitio de restricción *EcoRI* y un codón de terminación (TGA). Se utilizaron los programas Oligo 5.0 para el cálculo de la temperatura de alineamiento (T_m) y Amplify 1.2 como simulador del PCR virtual para determinar la estabilidad de los oligonucleótidos. La reacción de PCR fue ensamblada (Barrera y cols, 1993) para amplificar la secuencia que codifica para el péptido AL1 (Flores-Espinola, 2002) a partir del DNA plasmídico TOPO-LS1. Se colocaron 50ng del plásmido TOPO-LS1 como DNA templado, 0.5µl de cada oligonucleótido 10µM, 5µl de Buffer Hi Fi 10X, 0.5µl de dNTPs 10mM, 2µl MgSO₄ 50mM, 0.25µl de enzima Platinum® *Taq* DNA polimerasa de Alta Fidelidad (5U/µl) de Invitrogen (Carlsbad, CA. E.U.A.) y 39.75µl de H₂O miliQ. La reacción fue colocada en el termociclador (Hybaid

HBP 110 serie 19612), bajo el programa B17 LS1stop que consiste de un ciclo con una temperatura desnaturizante de 94°C/1 min., 30 ciclos de: la temperatura desnaturizante de 94°C/ 1 min., 66°C/1 min. y 72°C/1 min., y un ciclo de extensión de 72°C/ 5 min. Posteriormente, 100ng del producto amplificado AL1 fueron digeridos con 0.3µl de la enzima de restricción *EcoRI* 20U/µl de New England Biolabs (California, E.U.A.) creando un extremo cohesivo (Figura 8A), el producto digerido fue purificado utilizando las columnas Wizard® de Promega (Madison Wi, E.U.A.). El producto de PCR obtenido fue cuantificado y visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Para las construcciones de los plásmidos pTWIN-AL1 y pTYB-AL1, se diseñaron dos oligonucleótidos que codifican el péptido AL1. Estos oligonucleótidos denominados 5'AL1TWIN de 109pb y 3'AL1TWIN de 102pb se resuspendieron en TE 1X a una concentración 1µg/µl y se realizó la reacción de el alineamiento como se describe en la Tabla I

Tabla I. Reacción de alineamiento de los oligonucleótidos

Oligo 1 (1µg/µl)	5µl
Oligo 2 (1µg/µl)	5µl
Tris-HCL1M	6.6µl
MgCl2 0.25mM	5.2µl
DTT 1.0M	0.6µl
EDTA 0.5M	0.26µl
H ₂ O miliQ	77.34µl
Total	100µl

Para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos (Figura 8B) se colocó la reacción en el termociclador (Hybaid HBP 110 serie 19612) por un ciclo en el que la temperatura fue decreciendo de 88°C/ 2 min., 65°C/ 10 min., 55°C/ 1 min. y 37°C/ 10 min. Posteriormente, se dejó la reacción alineada toda la noche a temperatura ambiente, se tomo 1µl del alineamiento y fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

11.1.3 Ligación de los vectores plasmídicos con el inserto (AL1)

Se realizó la reacción de ligación en un radio molar 1:3 como se muestra en la Tabla II (plásmido–inserto), utilizando T4 DNA ligasa Invitrogen (Carlsbad California, EUA). La ligación se incubó por 24 horas toda la noche a 14°C siguiendo el protocolo de *Focus on Applications, T4 DNA Polymerase, Technical Bulletin 18005-2* (1994) Life Technologies, Incorporated. Posteriormente 2.5µl de cada ligación fue transformada con 50µl de bacterias *Escherichia coli* DH5α Ca⁺⁺ previamente preparadas como se

describe en la siguiente sección. Estos se incubaron por 20min en hielo, se realizó el choque térmico a 42°C por 1min 30 seguido por 5min en hielo, se adicionaron 200µl de medio Luria Bertoni (LB), y se dejaron en agitación a 37°C por 30min, luego se centrifugaron a 14000rpm por 20seg., se descartaron 200µl y la pastilla fue diluida en el sobrenadante restante y después plaqueda en cajas con LB+ ampicilina (50mg/ml) y para las transformaciones de pMAL-AL1 se adicionó a las placas + X-gal (40mg/ml). La transformación de la ligación pMAL-AL1 en la cepa calcio competente *Escherichia coli* DH5α permitió seleccionar clonas mediante complementación α en donde las colonias blancas son las posibles clonas positivas debido a que la presencia del inserto dentro del vector hace que el marco de lectura de β-gal se interrumpa y no utilice el sustrato X-gal para la reacción colorimétrica que proporciona el color azul.

TABLA II. Ligación de los vectores plasmídicos con el inserto AL1

Plásmido	Relación molar 1:3	Transformación Cepas Ca ⁺⁺
pMAL-AL1	43ng:2ng	DH5α
pTWIN-AL1	43ng:5ng	TOP 10
pTYB-AL1	43ng:5ng	XL1

11.1.4 Preparación de bacterias Ca⁺⁺ Competentes

Se inocularon a partir de una colonia bacteriana de *E. coli* DH5α, TOP10, XL1 y cepas especiales para expresión *E. coli* TB1 y ER2566 3 ml de medio LB estéril sin antibiótico, se incubó a 37°C toda la noche con agitación constante (250 rpm). Posteriormente, a 100 ml de medio LB sin antibiótico en un matraz Erlenmeyer, se inoculó con 1/100 del cultivo de toda la noche (1 ml), se tomó una alícuota de 1 ml y guardo a 4°C, se incubó el matraz de 2-3 hrs. a 37°C agitando a 250 rpm hasta alcanzar una absorbancia del cultivo correspondiente a 0.3-0.4 midiendo con una longitud de onda de 590-600nm usando como blanco la primera alícuota guardada a 4°C. Posteriormente, 50 ml del cultivo a un tubo Falcon de 50 ml frío, fue centrifugado 8 min a 5000rpm y 4°C, eliminando el sobrenadante por decantación, el tubo fue colocado en hielo y el paquete celular resuspendido en 1/5 del volumen de cultivo inicial (20 ml) de CaCl₂ 0.1M frío e incubado en hielo por 30 min, luego fue centrifugado por 8 min a 5000 rpm y 4°C, eliminando el sobrenadante por decantación y el paquete celular se resuspendió en 1/5 del volumen de CaCl₂ del paso anterior (4 ml) de CaCl₂ 0.1M frío, se verificó la eficiencia de transformación con 1ng del plásmido pUC18, se guardaron las bacterias Ca⁺⁺ competentes a -70°C con glicerol al 15%. (Sambrook *et al.*, 1989 y Mandel *et al.*, 1970)

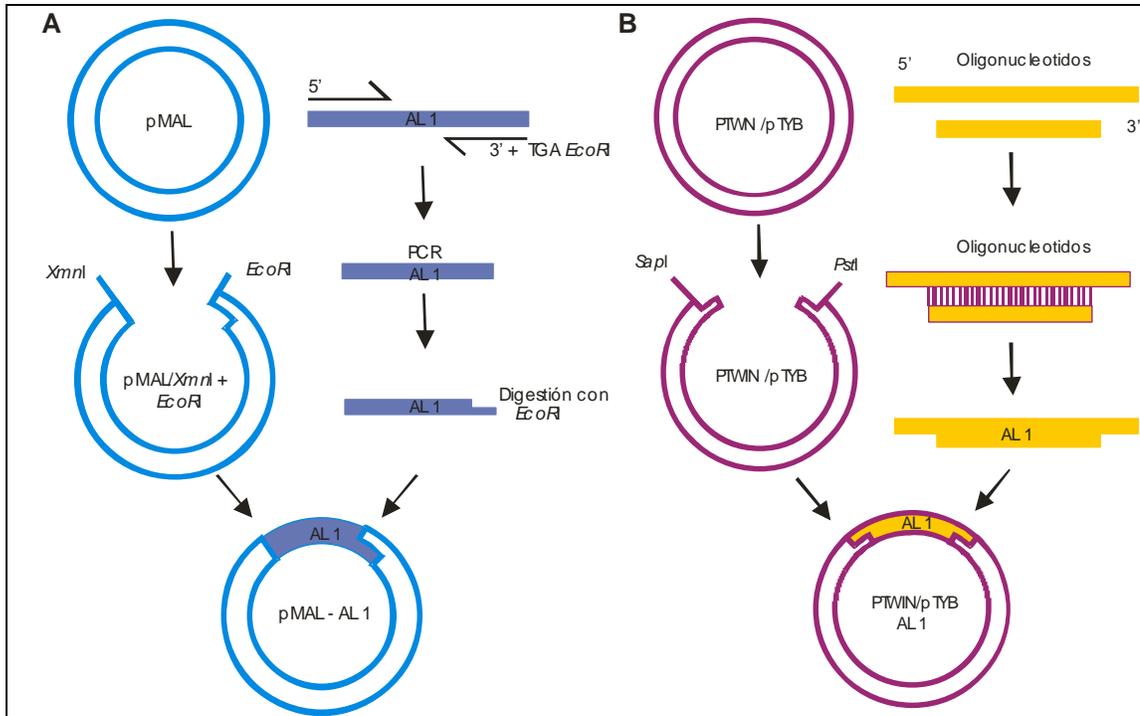


Figura 8. Estrategia para la construcción de los plásmidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN – AL1 y pTYB – AL1. A) La estrategia para la construcción de pMAL-AL1 consistió en amplificar mediante PCR la secuencia que codifica para el péptido AL1 adicionando el sitio de restricción para la enzima *EcoRI* y el codón de terminación, posteriormente el producto amplificado fue digerido con *EcoRI* y el vector pMAL fue digerido con las enzimas *XmnI* y *EcoRI* cuyo corte al fragmento es romo y cohesivo respectivamente. B) Para la construcción de los plásmidos pTWIN-AL1 y pTYB-AL1 se diseñaron oligonucleotidos largos que incluyen la secuencia codificante a AL1 y el codón de terminación. Estos oligos fueron alineados quedando con extremos cohesivos. Los vectores pTWIN y pTYB fueron digeridos con las enzimas *SapI* y *PstI*. La ligación del vector-inserto permitió en ambos vectores la inserción de la secuencia que codifica para el péptido AL1.

11.1.5 Caracterización de los plásmidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN-AL1 y pTYB-AL1

Para la caracterización de las clonas obtenidas se aisló el DNA plasmídico mediante minipreparación por lisis alcalina con una modificación al método descrito por Birnboim y Doly en 1979. Se añadieron 3 µl de ampicilina 50mg/ml en un tubo de ensaye con 3 ml de medio LB estéril. Se inoculó el medio LB con una colonia bacteriana blanca de la caja de Petri (clona) con una puntilla. Se incubó a 37°C toda la noche en agitación constante a 250 rpm. posteriormente se colocaron 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 ml en condiciones de esterilidad, se centrifugo 15 seg a 14000 rpm y eliminó el sobrenadante decantando. Se adicionó a la pastilla 150µl de solución I (Glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0, EDTA 10mM pH 8.0), mezcló en el vórtex e incubó 5 min a temperatura ambiente, luego se agregaron 300µl de solución II (NaOH 0.2N recién diluída de una solución stock 10N, SDS1%) y mezcló por inversión, después se adicionaron 250 µl de solución III (Acetato de potasio 3M, Ácido acético

glacial 2M) y mezcló por inversión. Se incubó 5 min a -20°C , luego centrifugó 5 min a 14000 rpm y transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregó un volumen de isopropanol frío, mezcló por inversión, incubó 10 min a -20°C , y luego centrifugó 5 min a 14000 rpm y eliminó el sobrenadante decantando. La pastilla de DNA se lavó con 400 μl de etanol al 70% frío, mezcló en el vórtex, después fue centrifugado 3 min a 14000 rpm, eliminó el sobrenadante decantando. La pastilla de DNA se dejó secar a temperatura ambiente dejando los tubos abiertos por 10 min. y el DNA se resuspendió en 20 μl de H_2O milliQ conteniendo RNAsa a una concentración final de 0.02 mg/ml (499 μl de agua milliQ más 1 μl de RNAsa 10mg/ml). El DNA aislado de las clonas se almacenó a -20°C .

El DNA aislado de las clonas fue analizado mediante digestión con enzimas de restricción de la compañía comercial New England Biolabs (California, E.U.A). Las clonas obtenidas de la construcción pMAL-AL1 fueron caracterizadas con las enzimas *EcoRI*, *DdeI*, y *MspI*. Las clonas obtenidas del plásmido recombinante pTWIN-AL1 fueron analizadas con las enzimas *HincII*, *BstNI* y *NlaIV*. Para la caracterización de las clonas obtenidas con la construcción pTYB-AL1 se utilizaron las enzimas de restricción *HhaI*, *AccI*, *NcoI* y *PstI*.

11.1.6 Secuenciación de los insertos en los plásmidos recombinantes

Para la verificación de la secuencia nucleotídica de los productos amplificados de las clonas recombinantes positivas, el DNA de los diferentes plásmidos recombinantes se obtuvo por el método de lisis alcalina descrita anteriormente y se purificó utilizando columnas Wizard® de Promega. La secuencia de las clonas positivas se determinó mediante la técnica descrita por Sanger *et al.*, en 1977. 2 μg del DNA plasmídico fueron usados para la secuenciación de la clona pMAL-AL1 utilizando oligonucleótidos derivados del fago M13 (Anderson, 1996). El oligonucleótido utilizado fue: Forward 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'. Para la secuenciación del inserto en las clonas pTWIN-AL1 se utilizó el oligonucleótido SspDNA B Intein Forward 5' ACTGGGACTCCATCGT TTCT 3' y para las clonas pTYB-AL1 se utilizó el oligonucleótido Intein Forward Primer 5' CCCGCCGCTGCTTTTGCACGTGAG 3' de la compañía comercial New England BioLabs, (California, E.U.A.) mediante la técnica Taq F5 Dye terminador Cycle Sequencing fluorescente-Based Sequencing.

11.2 Expresión de las proteínas de fusión con el péptido AL1

Se realizaron transformaciones en las cepas competentes *E. coli* TB1 y ER2566 especiales para la expresión de las proteínas de fusión siguiendo los manuales de instrucciones pMAL Protein Fusion and Purification System, IMPACT-TWIN e IMPACT-CN System de la compañía comercial New England BioLabs (Beverly MA, USA) como se describe en las Figuras 9, 10 y 11 respectivamente. Los sistemas de

expresión consistieron en incubar en agitación a 37°C, 5ml de cultivo fresco en 1L de medio LB enriquecido con 1g de glucosa y 500µl de ampicilina 50mg/ml hasta alcanzar una absorbancia del cultivo correspondiente a 0.5-0.8 midiendo con una longitud de onda de 600nm y posteriormente se agregó a los cultivos 2 ml del inductor IPTG 0.1M el cual indujo para la expresión de los péptidos recombinantes pMAL-AL1, pTWIN-AL1 y pTYB-AL1 fue tomada la muestra 1 antes de la adición del IPTG y posteriormente tres horas de expresión en agitación a 37°C y fue tomada la muestra 2 ambas fueron centrifugadas 14,000 rpm, descartado el sobrenadante y los paquetes celulares resuspendidos en buffer de muestra para SDS-PAGE 3X composición. El resto del cultivo fue transferido a frascos Beckman y centrifugados a 5000g por 20 min. a 4°C descartando el sobrenadante, el paquete celular fue pesado y se adicionaron 10 ml de Buffer 1 (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM EDTA) por cada gramo de células. Posteriormente, el paquete celular fue congelado -20°C toda la noche. La inducción fue visualizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5%.

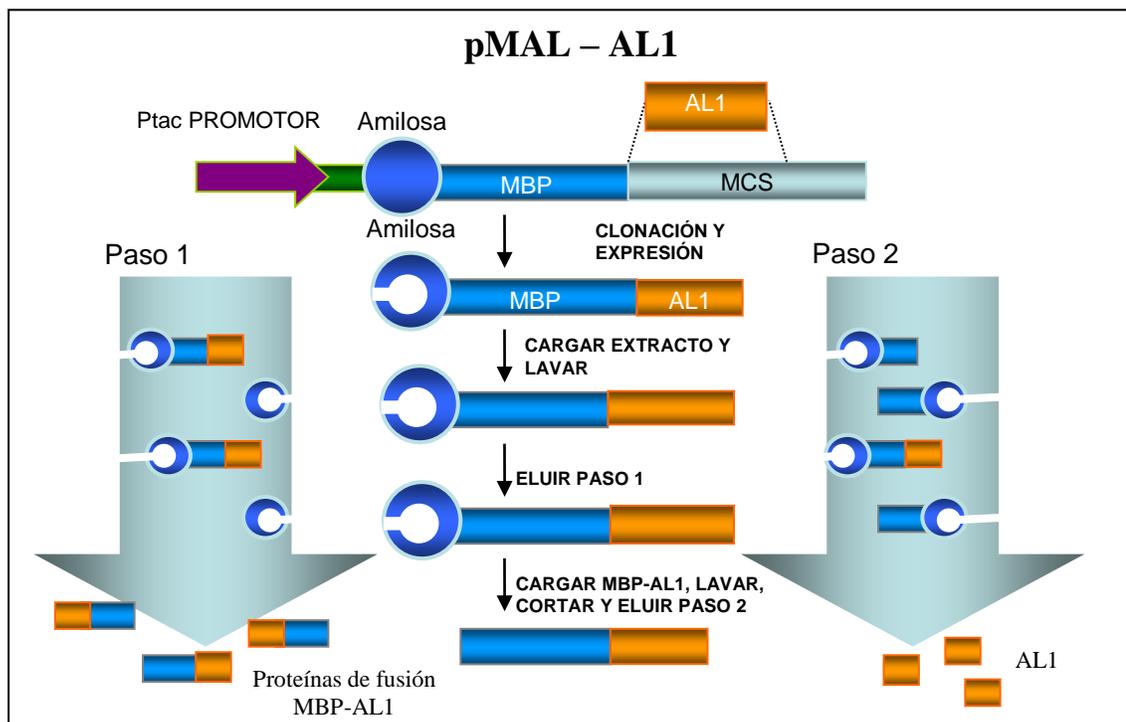


Figura 9. Sistema pMAL para la expresión y purificación del péptido AL1. El sistema de expresión pMAL consistió primeramente en clonar la secuencia nucleotídica de AL1 en el vector pMAL, expresar la proteína de fusión MBP-AL1, realizar la purificación (paso 1) eluyendo la proteína de fusión MBP-AL1 mediante cromatografía de afinidad. La proteína de fusión MBP-AL1 se sometió al corte con la proteasa factor Xa la cual reconoce el sitio IEGR que liberara al péptido AL1 en una segunda cromatografía de afinidad como se observa en el paso 2.

El paquete celular resuspendido en el buffer 1 fue descongelado en agua hielo por 2 horas, posteriormente se realizó la lisis celular utilizando un homogenizador ultrasónico (4710 Cole-Parmer Series, Chicago E.U.A.) se realizaron 16 pulsos de 15seg. La liberación de la proteína se monitoreo realizando un ensayo recuerdo al método descrito por Bradford (1976) en microplaca, adicionando 10µl del sonicado y 100µl de reactivo de Bradford. Continuando con la sonicación hasta liberar mas del 80% de la proteína; se colocó un estándar conteniendo 10µl de 10mg/ml de BSA en 100µl de Bradford. El sobrenadante del paquete celular sonicado se centrifugó para la clona en pMAL a 9000g y para las clonas en pTWIN y pTYB a 2000g por 30 min a 4°C según se indica en cada protocolo. El sobrenadante o llamado extracto clarificado conteniendo las proteínas fue filtrado utilizando membranas de 0.4 y 0.2µm, trasferido a un tubo nuevo y almacenado a -20°C.

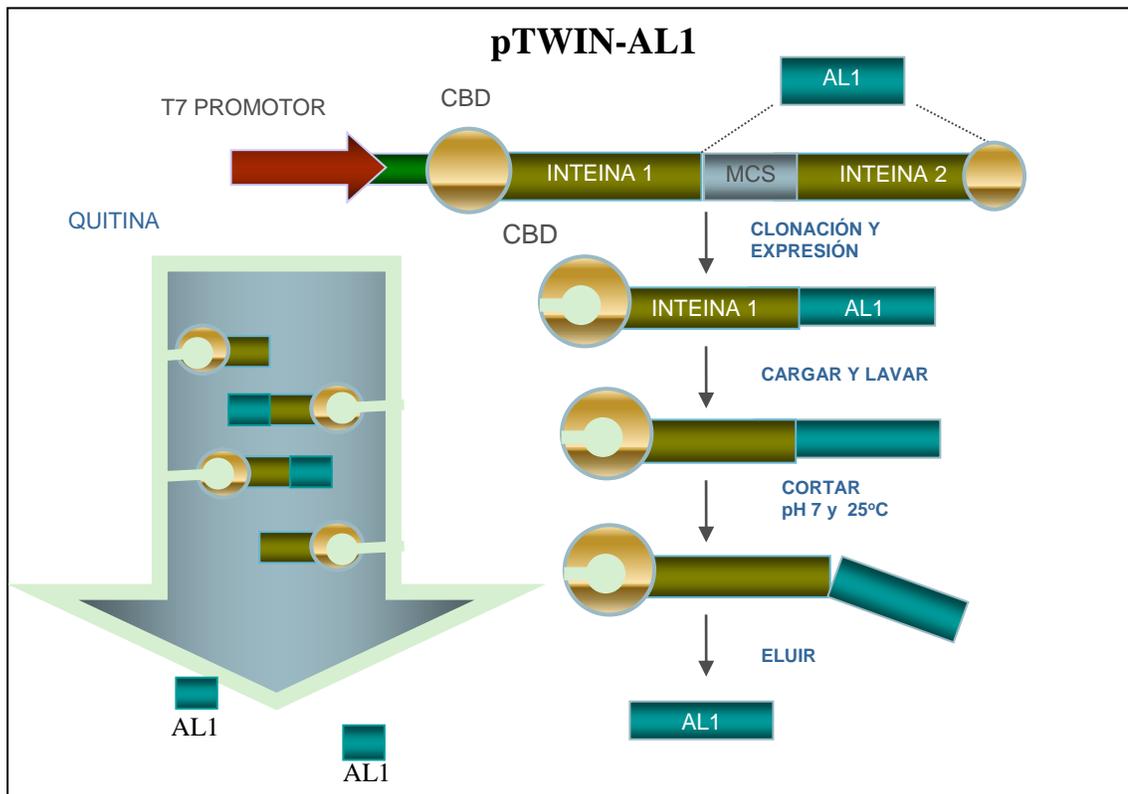


Figura 10. Sistema IMPACT-TWIN para la expresión de la proteína de fusión pTWIN-AL1 y purificación del péptido AL1. Este sistema consiste en la clonación de la secuencia AL1 en el vector pTWIN para la expresión como proteína de fusión INTEINA1-AL1. Este sistema puede liberar el péptido de interés en un solo paso en la columna por cromatografía de afinidad Inteina-quitina y adicionando buffer de corte con pH 6-7 temperatura de 25°C.

11.3 Purificación de las proteínas de fusión recombinantes

11.3.1 Preparación de las columnas de purificación

Las columnas (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden) de purificación fueron preparadas empacando directamente 20ml de resina de amilosa (New England Biolabs, Massachussets, E.U.A.) para pMAL-AL1 y quitina para pTWIN-AL1 y pTYB-AL1. Las resinas en las columnas fueron empacadas y lavadas con 8 volúmenes de buffer 1 (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM EDTA) en un flujo de 0.5ml/min y almacenadas a 4°C.

11.3.2 Purificación de proteínas de fusión recombinantes en las columnas de afinidad

Se adicionó el extracto clarificado a la respectiva columna con un flujo de 0.3ml/min. posteriormente las columnas fueron lavadas con 12 volúmenes de buffer 1 a un flujo de 1ml/min. La columna conteniendo el extracto clarificado de pMAL-AL1 se eluyó con 100ml de buffer 2 (20mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Maltosa) y se colectaron 12 fracciones de 3ml. El detector se programó a una longitud de onda de 1nm con un flujo de elusión de 1ml/min. Las proteínas de fusión fueron detectadas por el cromatograma que nos proporciona el graficador del colector de fracciones. La concentración de las proteínas de fusión obtenidas se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (1976).

Los extractos clarificados de pTWIN-AL1 y pTYB-AL1 se pasaron por la columna de quitina con un flujo de 0.5 ml/min. y luego las columnas se lavaron con 10 volúmenes de buffer 1 (20mM Tris-HCl pH 8.5, 500mM NaCl, 1mM EDTA) a un flujo de 2 ml/min.

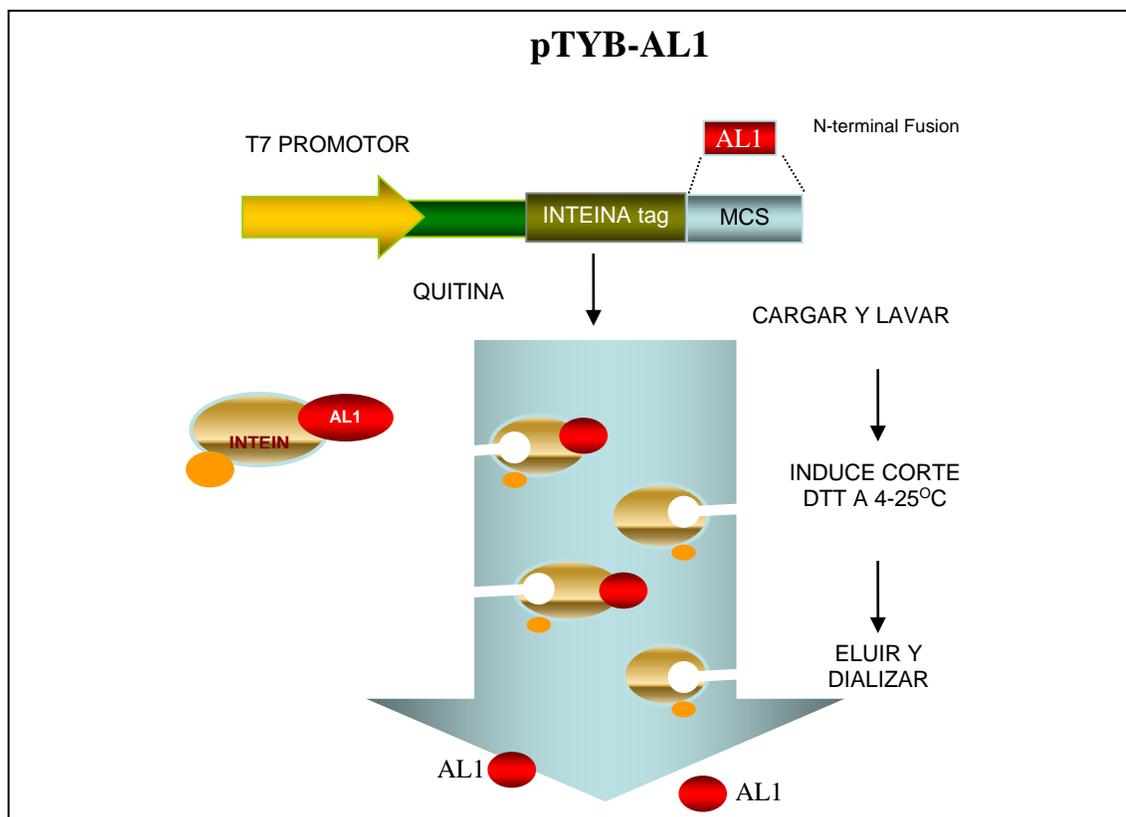


Figura 11. Sistema IMPACT-CN para la expresión de la proteína de fusión pTYB-AL1 y purificación del péptido AL1. El sistema IMPACT-CN consiste en la clonación de la secuencia codificante de AL1 en el vector pTYB para expresar la proteína de fusión INTEINAC-AL1. Este sistema puede liberar el péptido de interés en un solo paso por la columna mediante cromatografía de afinidad induciendo al corte utilizando el buffer de corte con DTT y finalmente realizando la elución de la proteína o péptido de interés.

11.3.3 Corte de las proteínas de fusión

Para el corte del péptido AL1 la proteína de fusión (MBP-AL1) se utilizó la metodología descrita en el manual de instrucciones (New England Bio Labs Beverly MA, USA). El complejo proteínico de la proteasa Xa identifica el sitio IEGR en la proteína de fusión. El corte con la proteasa se incubó a temperatura ambiente por 2, 4, 8 y 24 horas y posteriormente se analizó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 16.5%.

Para el corte del péptido AL1 de las proteínas de fusión pTWIN-AL1 se empaco la columna con el extracto de pTWIN-AL1 adicionando 50ml de buffer de corte pH 6-7 (20mM Tris-HCl pH 6-7, 500mM NaCl, 1mM EDTA) a 25°C. Para el corte del péptido AL1 de la proteína de fusión pTYB-AL1 se adicionó el buffer de corte DTT (20mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM DTT). En ambos casos las columnas se dejaron incubando a 25°C por 24 horas y luego se eluyeron 15 fracciones de 3ml a un flujo rápido de 3ml/min.

12. RESULTADOS

12.1 Construcción del plásmido recombinante pMAL-AL1

El DNA plasmídico pMAL fue digerido con las enzimas *XmnI* y *EcoRI* dejando extremos romos y cohesivo respectivamente y fue purificado del gel utilizando las columnas Wizard con una recuperación del DNA digerido del 95%. La Figura 12A muestra la visualización de este vector plasmídico en gel de agarosa al 0.8% donde se mostró como se esperaba una banda de 6700pb sin degradación con una concentración de aproximadamente 100ng/μl.

La obtención del inserto codificante al péptido AL1 se realizó mediante amplificación por PCR como se describió previamente en materiales y métodos. La amplificación se realizó usando el oligonucleótido 5'LS1 diseñado por Flores-Espínola, 2002 y un oligonucleótido 3'stopAL1 conteniendo un sitio de corte para *EcoRI* usando el plásmido TOPO-LS1 (Flores-Espínola, 2002) como DNA templado. La secuencia codificante al péptido AL1 amplificó con éxito la banda de 111pb que se purificó con un 95% de recuperación. Posteriormente, el fragmento amplificado fue digerido con la enzima *EcoRI* para generar el extremo 3'cohesivo necesario para la clonación. Esta secuencia amplificada codificante al péptido AL1 fue visualizada en un gel de agarosa al 2% como se muestra en la Figura 12B donde se observa la banda 109pb esperada a una concentración aproximada de 20ng/μl.

La ligación plásmido-inserto mostró 75 colonias posibles clonas positivas con el inserto (colonias blancas), de los que se seleccionaron 20 colonias para el aislamiento del DNA plasmídico con el método de minipreparación por lisis alcalina descrito en materiales y métodos. Se obtuvieron de 1-8μg totales de los DNAs plasmídicos que fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La Figura 12C muestra cuatro de las clonas obtenidas con el DNA plasmídico con una movilidad electroforética menor que el vector plasmídico que indica la posible presencia del inserto (carriles 3-6).

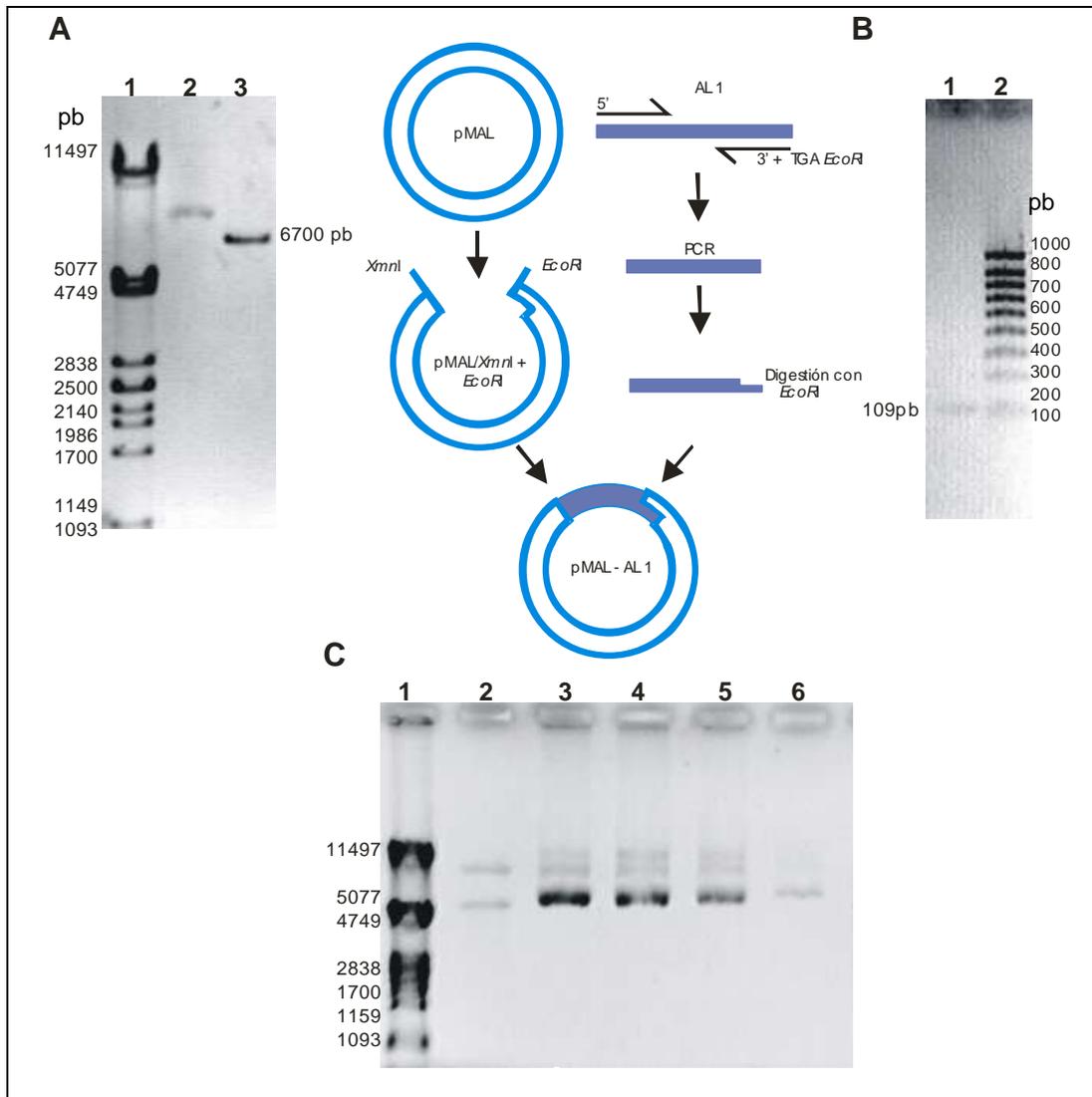


Figura 12. Construcción del plásmido recombinante pMAL-AL1. La construcción del plásmido pMAL-AL1 consistió en la obtención del vector plasmídico digerido con *XmnI* y *EcoRI* de 6700pb (A) y el inserto codificante al péptido AL1 amplificado mediante PCR y digerido con *EcoRI* de 109pb (B). La transformación de la ligación vector-inserto permitió la obtención de varias clonas recombinantes (C). En A, el carril 2 contiene el plásmido pMAL sin digerir, el carril 3 contiene el plásmido pMAL digerido con la enzima *EcoRI* de 6700pb y el carril 1 contiene el marcador de peso molecular λ /*PstI*. En B el carril 1 contiene la secuencia de 109pb codificante al péptido AL1 amplificada mediante PCR y el carril 2 tiene el marcador de peso molecular HyperLadder IV. En C el carril 2 contiene el plásmido pMAL (sin inserto) los carriles 3-6 contienen los DNAs plasmídicos de las clonas recombinantes obtenidas y el carril 1 contiene el marcador λ /*PstI*.

12.2 Caracterización de las clonas recombinantes pMAL-AL1

Los DNAs plasmídicos de las cuatro clonas seleccionadas fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción *DdeI* y *MspI*. La Figura 13A muestra la digestión con la enzima *DdeI* que mostró el patrón de bandas esperado generando 11 bandas en el plásmido pMAL sin inserto utilizado como control y en las cuatro clonas recombinantes mostró 13 bandas ya que contenían un sitio extra de restricción para la enzima *DdeI* que corta la banda de 713bp liberando dos fragmentos de 449 y 375pb. El recuadro en la Figura 13A muestra la banda de 661pb y la ausencia de la banda de 713pb en las cuatro clonas recombinantes (carriles 3-6).

Estos resultados muestran el patrón de bandas esperado en las cuatro clonas que incorporaron la secuencia codificante AL1. Se utilizó el programa computacional DNA Strider 1.3 para confirmar el patrón de bandas obtenido con las enzimas de restricción.

Por otro lado la digestión de las clonas recombinantes con la enzima *MspI* mostraron la banda de 1361pb en lugar de 1264pb del vector sin inserto como se puede observar en el recuadro de la Figura 13B (carriles 3-6).

Ademas, la secuencia nucleotídica de las clonas recombinantes fue confirmada mediante la secuenciación de las clonas 1 y 2 donde el análisis de la secuencias nucleotídicas de los insertos codificantes a AL1 mostraron una similitud de 100% con la secuencia esperada (Anexo I).

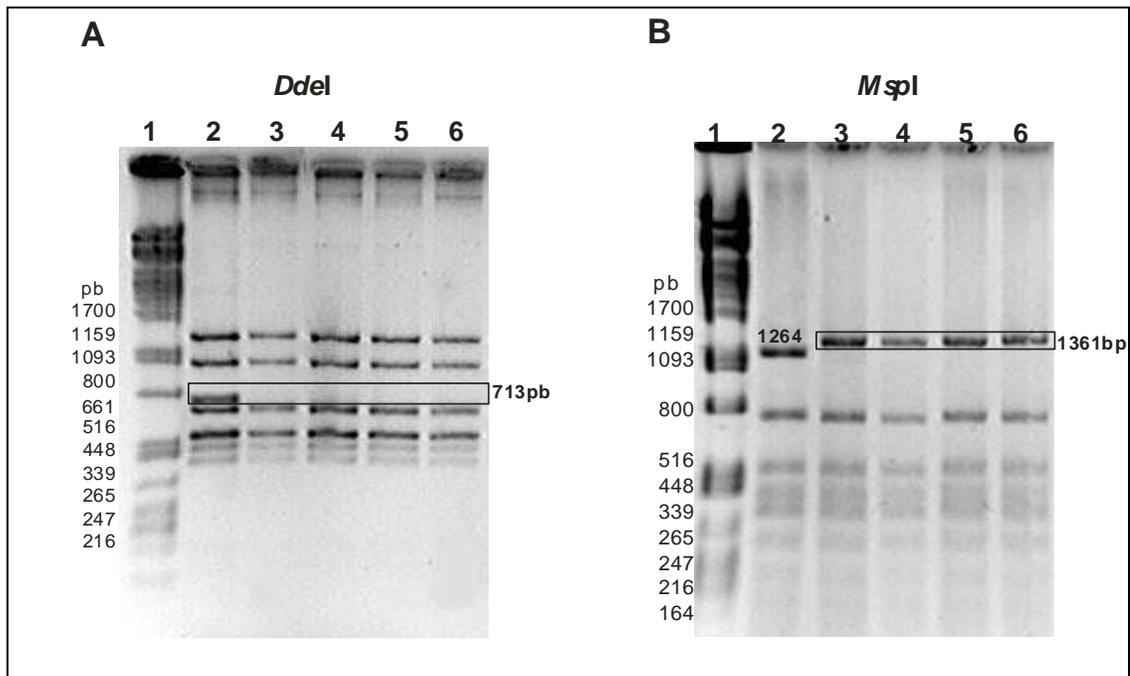


Figura 13. Caracterización de las clonas pMAL-AL1 con enzimas de restricción. En A las clonas fueron digeridas con la enzima *DdeI* que origina un sitio extra de restricción fragmentando la banda de 713pb en 449 y 375pb, el recuadro muestra la banda de 661pb en las clonas positivas, el carril 2 contiene el plásmido pMAL digerido con la banda de 713pb, los carriles 3 a 6 corresponden a las clonas digeridas sin la banda de 713pb y el carril 1 contiene el marcador de peso molecular λ /*PstI*. En B se utilizó la enzima *MspI* para la caracterización de las clonas recombinantes, en el carril 2 se encuentra el plásmido pMAL digerido que muestra una banda de 1264pb y los carriles 3-6 contienen las clonas recombinantes digeridas que muestran una banda de 1361pb como indica el rectángulo señalando las clonas positivas y el carril 1 contiene el marcador de peso molecular λ /*PstI*.

12.3 Construcción de los plásmidos recombinantes pTWIN-AL1 y pTYB-AL1

Los plásmidos pTWIN1 y pTYB11 se construyeron utilizando los vectores de los kits comerciales IMPACT-TWIN e IMPACT-CN Protein Fusion and Purification System (New England BioLabs Beverly MA, USA) respectivamente. Estos vectores plasmídicos fueron digeridos con las enzimas *SapI* y *PstI*. La Figura 14A muestra la visualización en gel de agarosa 0.8% de las bandas esperadas de 6544pb para pTWIN y de 7348pb para pTYB mostrando una buena calidad electroforética del vector plasmídico sin degradación aparente a una concentración aproximada de 280 y 400 ng/ μ l respectivamente.

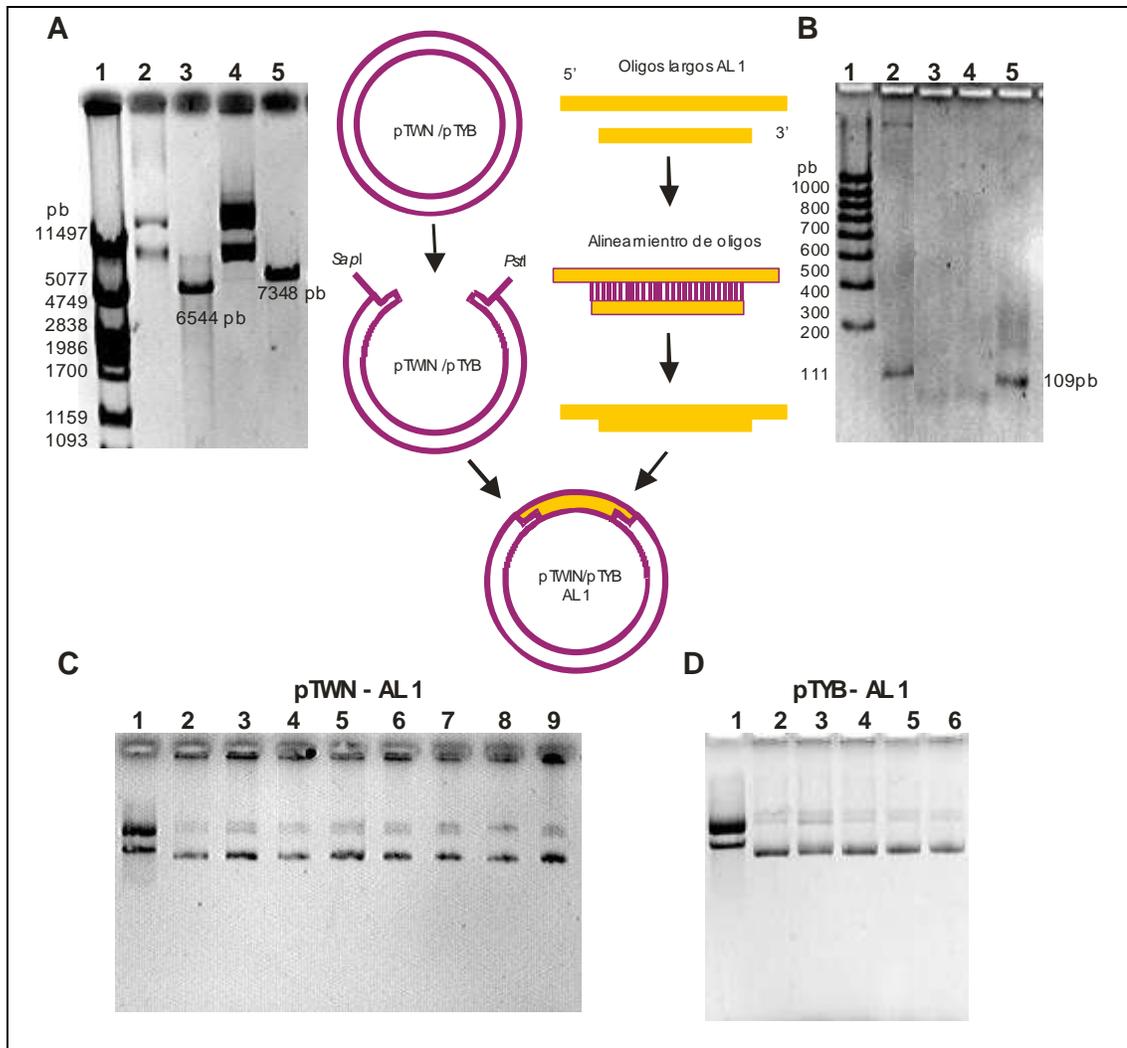


Figura 14. Construcción de los plásmidos recombinantes pTWIN-AL1 y pTYB-AL1. En A la construcción de los plásmidos pTWIN-AL1 y pTYB-AL1 consistió en la obtención de los vectores plasmídicos digeridos con *SapI* y *PstI* originando una banda de 6544pb para pTWIN y una de 7348 para pTYB, los carriles 2 y 4 contienen respectivamente los plásmidos pTWIN y pTYB sin digerir, los carriles 3 y 5 contienen los plásmidos pTWIN y pTYB digeridos con las enzimas *SapI-PstI* y el carril 1 contiene el marcador de peso molecular $\lambda/PstI$. En B el inserto codificante al péptido AL1 fue obtenido mediante alineamiento usando los oligonucleotidos específicos, el carril 2 contiene la secuencia codificante al péptido AL1 amplificada mediante PCR de 111pb como control de peso molecular, los carriles 3 y 4 contienen el oligonucleótidos 5' y oligonucleótido 3' respectivamente y el carril 5 contiene estos oligonucleotidos alineados el carril 1 contiene el marcador de peso molecular HyperLadder I. La transformación de la ligación vector-inserto permitió la obtención de varias clonas recombinantes pTWIN-AL1 (C) y pTYB-AL1 (D), el carril 1 corresponde a los plásmidos pTWIN en C y pTYB en D y el resto de los carriles corresponden al DNA plasmídico de las clonas recombinantes obtenidas.

Para la obtención del inserto que codifica al péptido AL1 se realizó el alineamiento de los oligonucleótidos como se describió previamente en materiales y métodos. El alineamiento de los oligonucleótidos visualizado en un gel de agarosa al 1.2% mostró una banda de 109pb como se esperaba a una concentración aproximadamente de 100ng/μl (Figura 14B).

Las ligaciones vectores-inserto permitieron el aislamiento del DNA plasmídico de las colonias recombinantes con el método de minipreparación por lisis alcalina previamente descrito. Los DNAs plasmídicos recombinantes obtenidos fueron de 1-8μg totales para cada clona; de las que se seleccionaron 8 del plásmido de pTWIN-AL1 (Figura 14C; carriles 2 al 9) y 5 clonas de pTYB-AL1 (Figura 14D; carriles 2 al 6).

La confirmación de las secuencias fue confirmada mediante secuenciación de cinco clonas de pTWIN-AL1 y dos de pTYB-AL1. El análisis de la secuencia nucleotídica de los insertos en estos plásmidos mostró una similitud de 100% con la esperada. (Anexo I).

12.4 Caracterización de las clonas recombinantes pTWIN-AL1 y pTYB-AL1

Los DNAs plasmídicos de las clonas recombinantes pTWIN-AL1 fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *HincII*, *BstNI* y *NlaIV*. El patrón de bandas obtenido fue el esperado para siete de las ocho clonas caracterizadas con la enzima *HincII* que generó 5 fragmentos de DNA siendo las bandas más prominentes de 3211, 2182 y 1258pb para las clonas positivas, el plásmido pTWIN digerido (carril 3) mostró cuatro bandas de 3211, 2182, 909 y 658 como se indica en la Figura 15A.

Además la digestión con *BstNI* de las clonas recombinantes positivas mostró que incorporaron la secuencia codificante AL1 ya que pierden el sitio de restricción para la enzima *BstNI* que genera la banda de 486pb (recuadro) en el plásmido pTWIN sin inserto (Figura 15B, carril 9) y libera el fragmento de 141pb de peso y la banda de 2306pb (recuadro) en todas las clonas analizadas (Figura 15B carriles 2-8). Posteriormente, estas siete clonas recombinantes fueron digeridas con la enzima *NlaIV* que mostró que cinco clonas correspondieron al patrón de bandas esperado (ver Figura 15C; carriles 3, 4, 5, 7 y 8) con la desaparición de los sitios de restricción de corte que dan lugar a las bandas de 790 y 489pb en el plásmido pTWIN sin inserto (carril 9). Las clonas de los carriles 2 y 6 no mostraron el patrón de bandas por lo que en total se obtuvieron cinco clonas con el patrón esperado para el plásmido recombinante pTWIN-AL1.

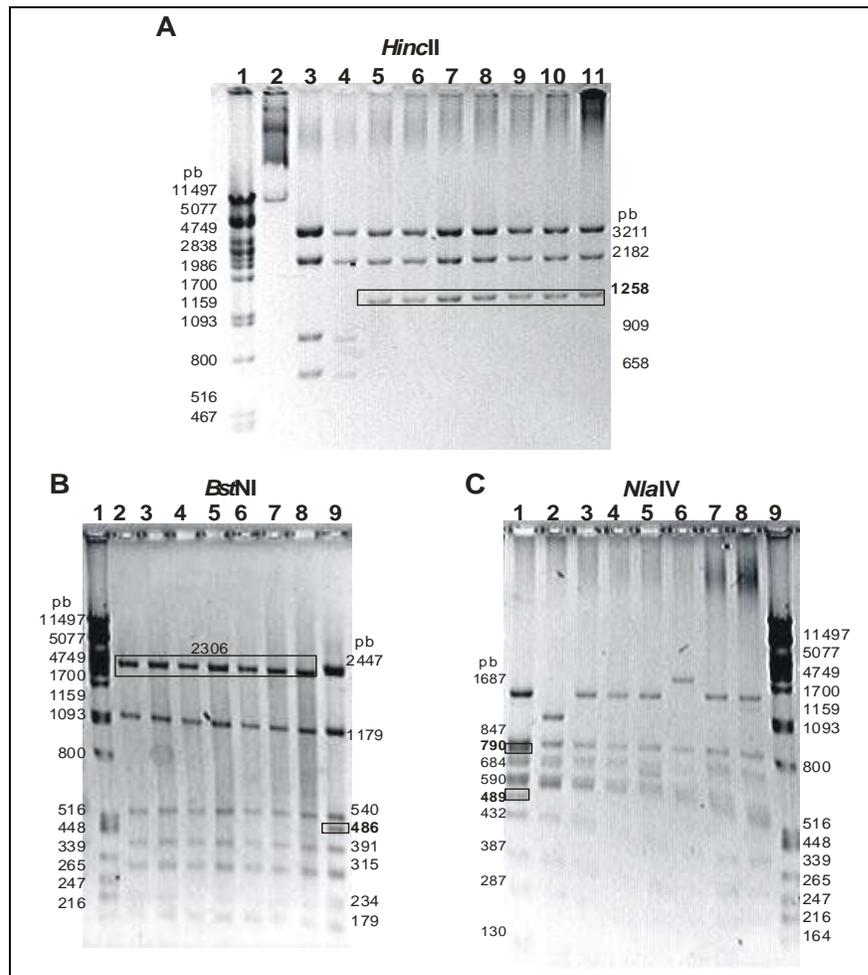


Figura 15. Caracterización del plásmido pTWIN-AL1 con enzimas de restricción. En A las clonas recombinantes de pTWIN-AL1 fueron digeridas con la enzima *HincII* la cual genera 5 fragmentos de DNA siendo las bandas más prominentes de 3211, 2182 y 1258pb para las clonas positivas, el carril 2 contiene el plásmido pTWIN sin digerir y digerido (carril 3) que muestra cuatro bandas de 3211, 2182, 909 y 658, los carriles 4 al 11 contienen las clonas recombinantes digeridas donde se indica la banda de 1258pb en las clonas positivas y el carril 1 contiene el marcador $\lambda/PstI$. En B las clonas fueron digeridas con la enzima *BstNI*, las clonas positivas pierden un sitio de restricción que genera la banda de 486pb, los carriles 2 al 8 corresponden a las clonas recombinantes digeridas donde se indica el fragmento de 2306pb obtenido en lugar de la banda de 2447pb, el carril 9 contiene el plásmido pTWIN sin el inserto digerido y el carril 1 contiene el marcador de peso molecular $\lambda/PstI$. En C las clonas fueron caracterizadas con la enzima *NlaIV*, el carril 1 corresponde al plásmido pTWIN donde se indican los fragmentos de 790 y 489bp que no fueron cortados en las clonas recombinantes positivas en los carriles 3-5 y 7-8. El carril 9 corresponde al marcador de peso molecular $\lambda/PstI$.

Por otro lado, los DNAs plasmídicos de las clonas recombinantes de pTYB-AL1 fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *HhaI*, *AccI*, *NotI* y *PstI*. Se eligieron 2 clonas para la caracterización con la enzima *HhaI*

como muestran en la Figura 16A (carriles 3 y 4) que muestra la banda de 824pb (recuadro) generada por la presencia de un sitio de restricción adicional para *HhaI* que no se observa en el vector sin inserto que contiene las bandas de 1073, 941, 676 y 597pb (carril 2). La presencia del inserto en estas clonas fue confirmado mediante la digestión con la enzima *AccI* que generó dos bandas de 3875 y 3581pb respectivamente en las clonas positivas con la secuencia que codifica al péptido AL1 (Figura 16B; carriles 3 y 4). Estas clonas perdieron el sitio de restricción para *AccI* que genera la banda de 463pb liberada por el vector sin inserto como se muestra en el carril 1 de la Figura 5B. Finalmente, la presencia del inserto AL1 se analizó mediante una doble digestión con las enzimas *NotI* y *PstI* que generó dos bandas de 6808 y 604pb respectivamente en el plásmido pTYB sin inserto (Figura 16C; carril 1) mientras que las clonas positivas que incorporaron el inserto codificante AL1 mostraron la banda esperada de 574pb como se puede observar en la Figura 16C (carriles 2 y 3). En todos los casos se utilizó el programa computacional DNA Strider 1.3 para confirmar el patrón de bandas obtenido con las enzimas de restricción.

Finalmente, para confirmar la presencia de la secuencia nucleotídica codificante a AL1 se enviaron a secuenciar una clona cada uno de los plásmidos recombinantes de pMAL-AL1 de pTWIN-AL1 y pTYB-AL1. El análisis de la secuencia nucleotídica de los insertos codificantes AL1 en los diferentes plásmidos mostró una similitud de 100% con la secuencia nucleotídica esperada (Anexo I)

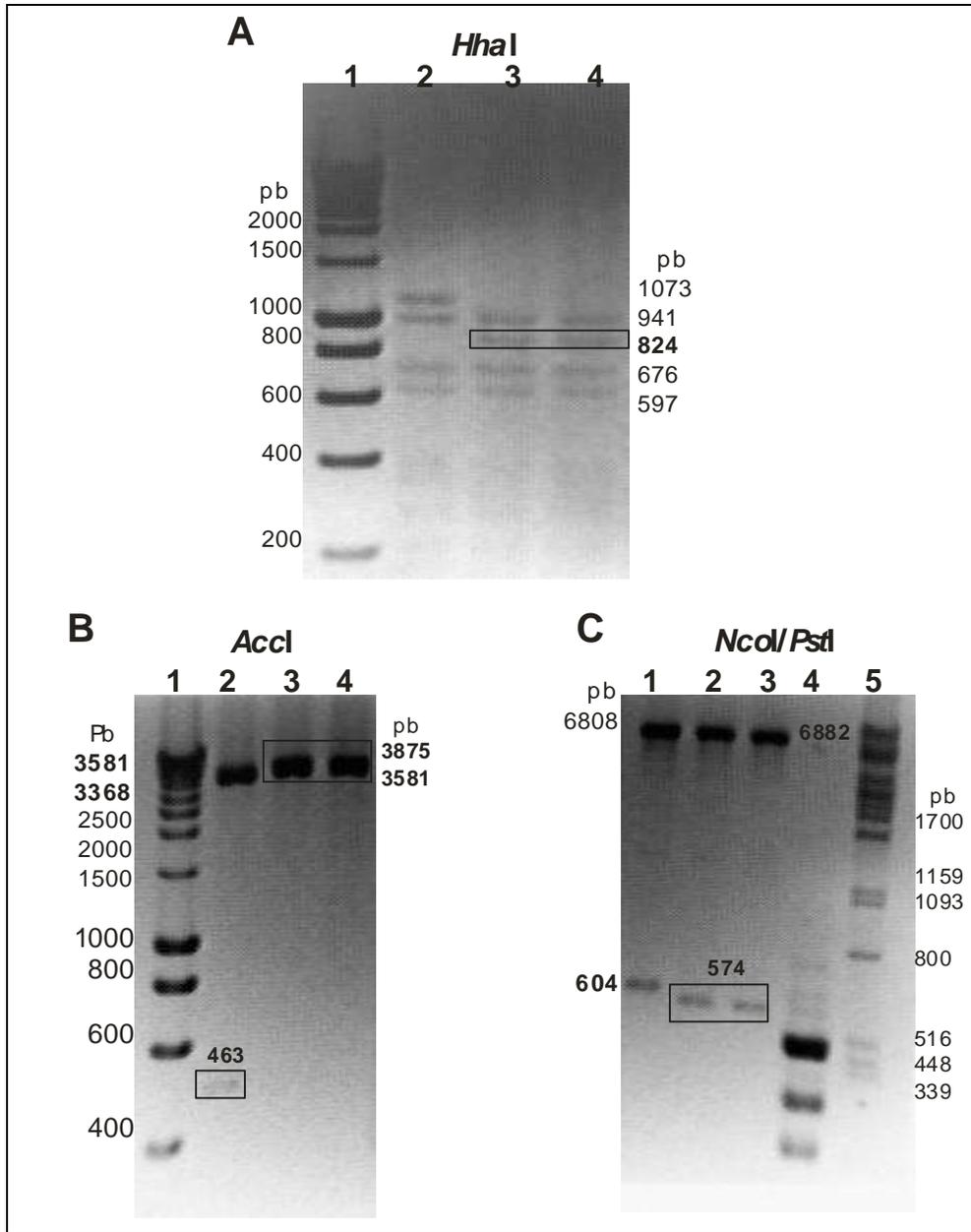


Figura 16. **Caracterización del plásmido pTYB-AL1 con enzimas de restricción.** En A las clonas recombinantes pTYB-AL1 fueron digeridas con la enzima *HhaI*, la cual genera un fragmento de 824 pb en las clonas positivas, el carril 2 contiene el plásmido pTYB sin inserto digerido, los carriles 3 y 4 corresponden a las clonas positivas y el carril 1 contiene el marcador HypperLadder IV. En B la digestión con la enzima *AccI* corroboró la integración del inserto, la cual genera dos fragmentos de 3875pb y 3581pb respectivamente y la desaparición de un sitio de restricción que genera la banda de 463pb, el carril 2 contiene el plásmido pTYB y los carriles 3 y 4 las clonas positivas y el carril 1 contiene el marcador de peso molecular HypperLadder IV. En C las clonas fueron caracterizadas mediante doble digestión con las enzimas *NcoI* y *PstI*. El carril 1 contiene el plásmido pTYB digerido observándose las dos bandas esperadas de 6808pb y 604 pb, los carriles 2 y 3 corresponden a las clonas positivas que generan los dos fragmentos esperados de 6882pb y 574pb y los carriles 4 y 5 corresponden a los marcadores de peso molecular pUC18/*MspI* y λ /*PstI* respectivamente.

12.5 Expresión de las proteínas de fusión MBP-AL1, INTEINA1-AL1 e INTEINAC-AL1

La expresión de la proteína de fusión MBP-AL1 en la Figura 17A mostró el tamaño esperado de la proteína de 46 kDa como se esperaba (carril 5) mientras que la expresión del plásmido pMAL sin el inserto mostró una proteína de fusión MBP- β -gal con un peso molecular de 50.8 kDa (carril 3). La expresión de la proteína de fusión MBP-AL1 mostró una buena calidad electroforética y la proteína de fusión sin degradación aparente.

La expresión de las proteínas de fusión INTEINA1-AL1 e INTEINAC-AL1 en la Figura 18 muestra el análisis electroforético de la expresión de las proteínas de fusión en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5% con la proteína de fusión de INTEINA1-AL1 de 38 kDa (carril 5) como se esperaba mientras que la expresión de la INTEINA 1 mostró una proteína de fusión de 78 kDa como se muestra en el carril 3. Por otro lado, la expresión de la proteína de fusión INTEINAC-AL1 en la Figura 19 mostró la proteína de fusión de 58 kDa como se esperaba (carril 5) mientras que la expresión del plásmido pTYB sin inserto mostró la INTEINAC de 55 kDa como se puede observar en el carril 3.

12.6 Purificación de la proteína recombinante MBP-AL1

La proteína de fusión MBP-AL1 de 46 kDa se obtuvo en las fracciones 6 a 9 como se muestra en la Figura 17B (carriles 4-7). La fracción No. 8 (carril 6) contenía la concentración más elevada de la proteína de fusión MBP-AL1 correspondiente a 1.67mg/ml y las otras fracciones mostraron concentraciones variables de la proteína de fusión entre 0.6 y 0.7mg/ml. En total se obtuvieron 11.36mg de la proteína de fusión MBP-AL1 purificada por litro de cultivo inducido.

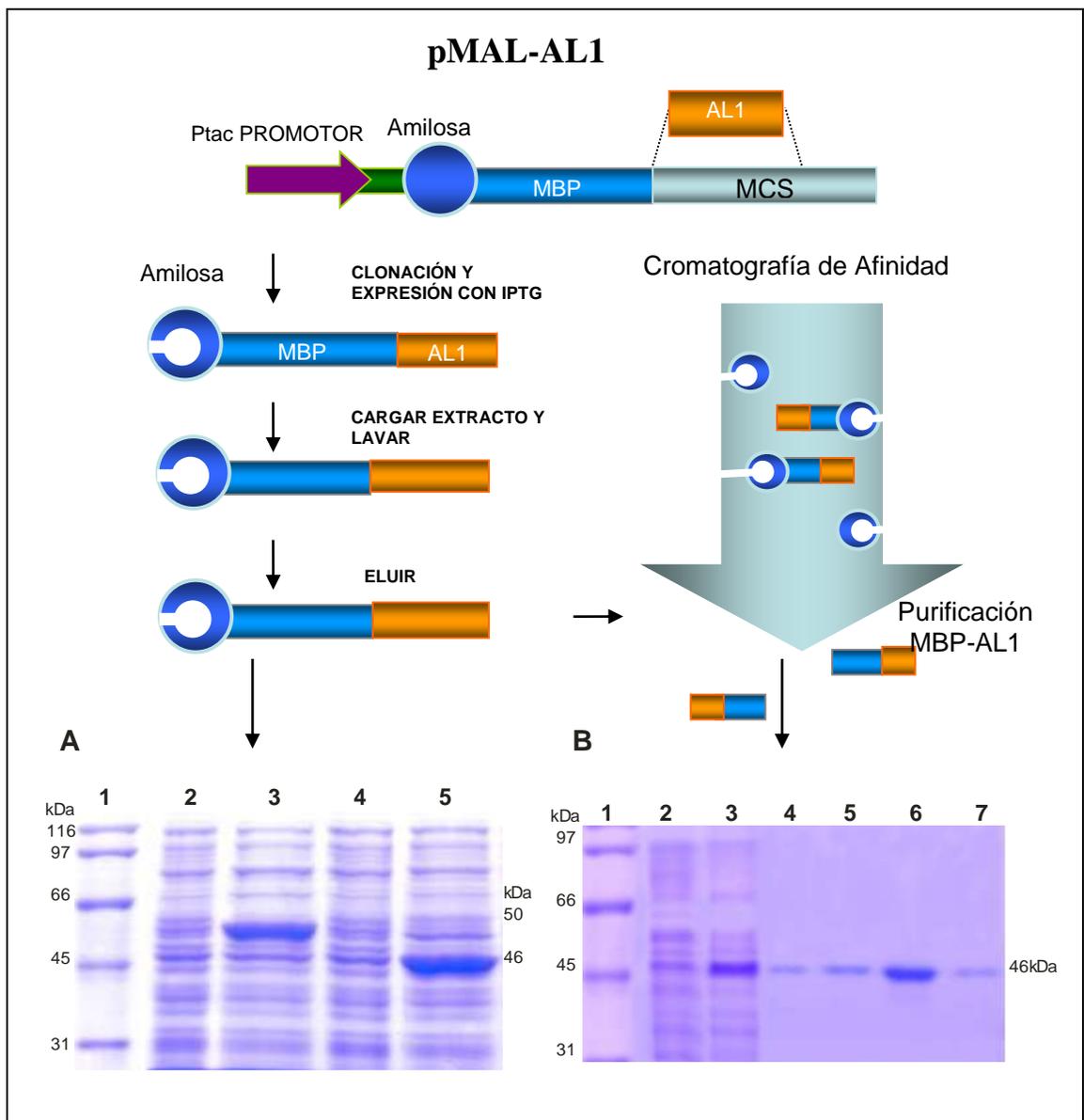


Figura 17. Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-AL1. En A el análisis de la expresión en electroforesis SDS-PAGE al 7.5% muestra en el carril 2 el extracto celular sin inducir de pMAL sin la secuencia codificante al péptido AL1, en el carril 3 el extracto celular pMAL inducido con IPTG muestra la proteína de unión a maltosa MBP-β-gal fragmento α con un peso molecular de 50.8 kDa y en los carriles 4 y 5 se muestra el extracto celular sin inducir de la clona recombinante positiva pMAL-AL1 e inducido con IPTG que muestra la proteína de fusión MBP-AL1 con un peso molecular de 46 kDa. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular Broad Range. En B la purificación de la proteína de fusión MBP-AL1 se muestra mediante cromatografía de afinidad. En el carril 1 el marcador de peso molecular Broad Range, en el carril 2 el extracto celular de pMAL-AL1 sin inducir y en el carril 3 inducido con IPTG. Los carriles 4 al 7 corresponden a las fracciones eluidas No. 6, 7, 8 y 9 respectivamente conteniendo la proteína de fusión MBP-AL1 purificada de 46kDa.

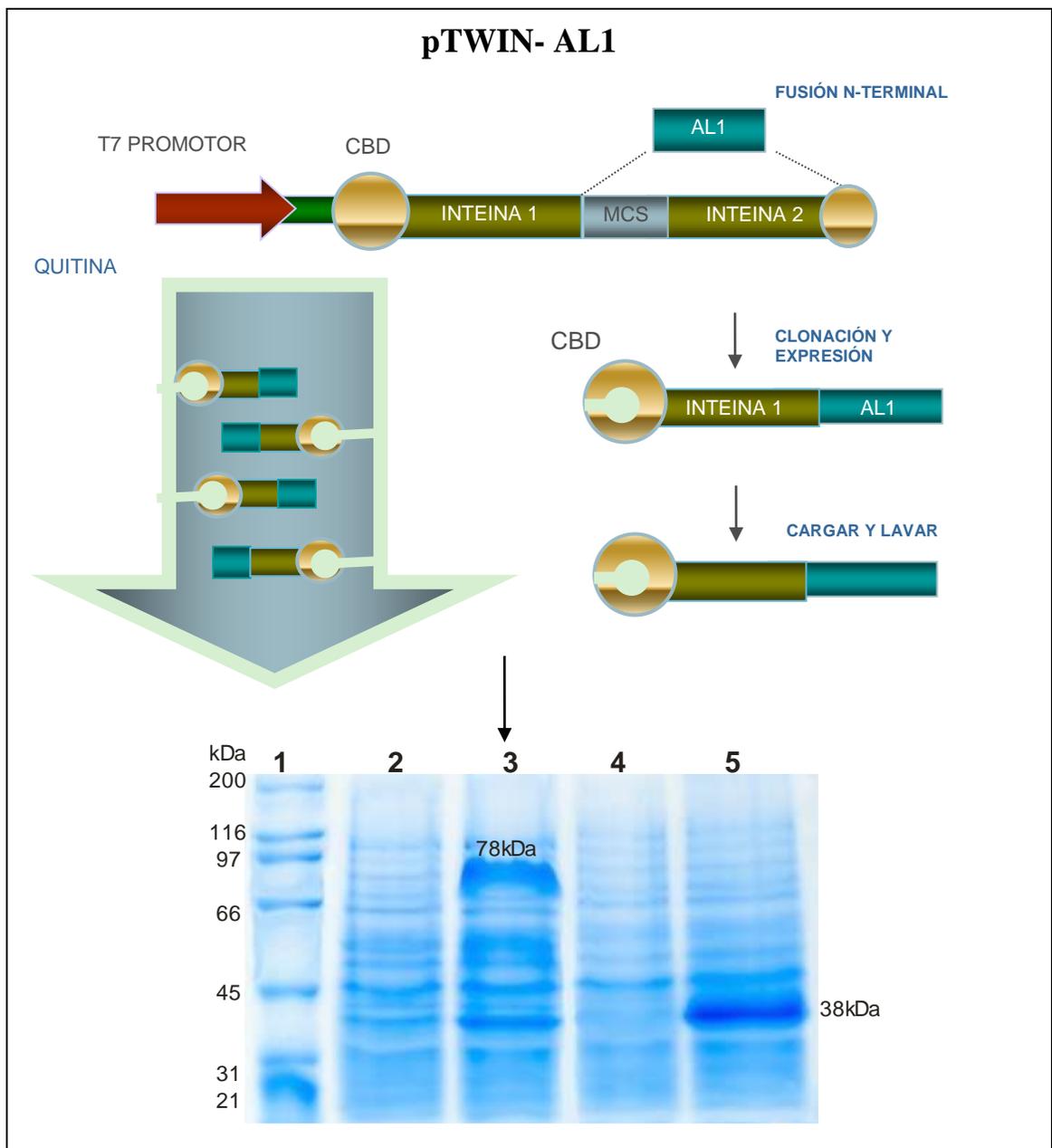


Figura 18. Expresión de la proteína de fusión INTEINA1-AL1. La secuencia codificante de INTEINA1 fue fusionada al extremo N-terminal del péptido AL1. El análisis de la expresión de esta proteína de fusión mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% muestra en el carril 2 el extracto celular no inducido de pTWIN y en el carril 3 el extracto celular inducido con IPTG. Se observan las proteínas INTEINAS con un peso molecular de 78 kDa, en el carril 4 y 5 el extracto celular sin inducir de la clona recombinante positiva y extracto celular inducido con IPTG respectivamente se muestra la proteína recombinante INTEINA1-AL1 con un peso molecular de 38 kDa y en el carril 1 el marcador de peso molecular Broad Range.

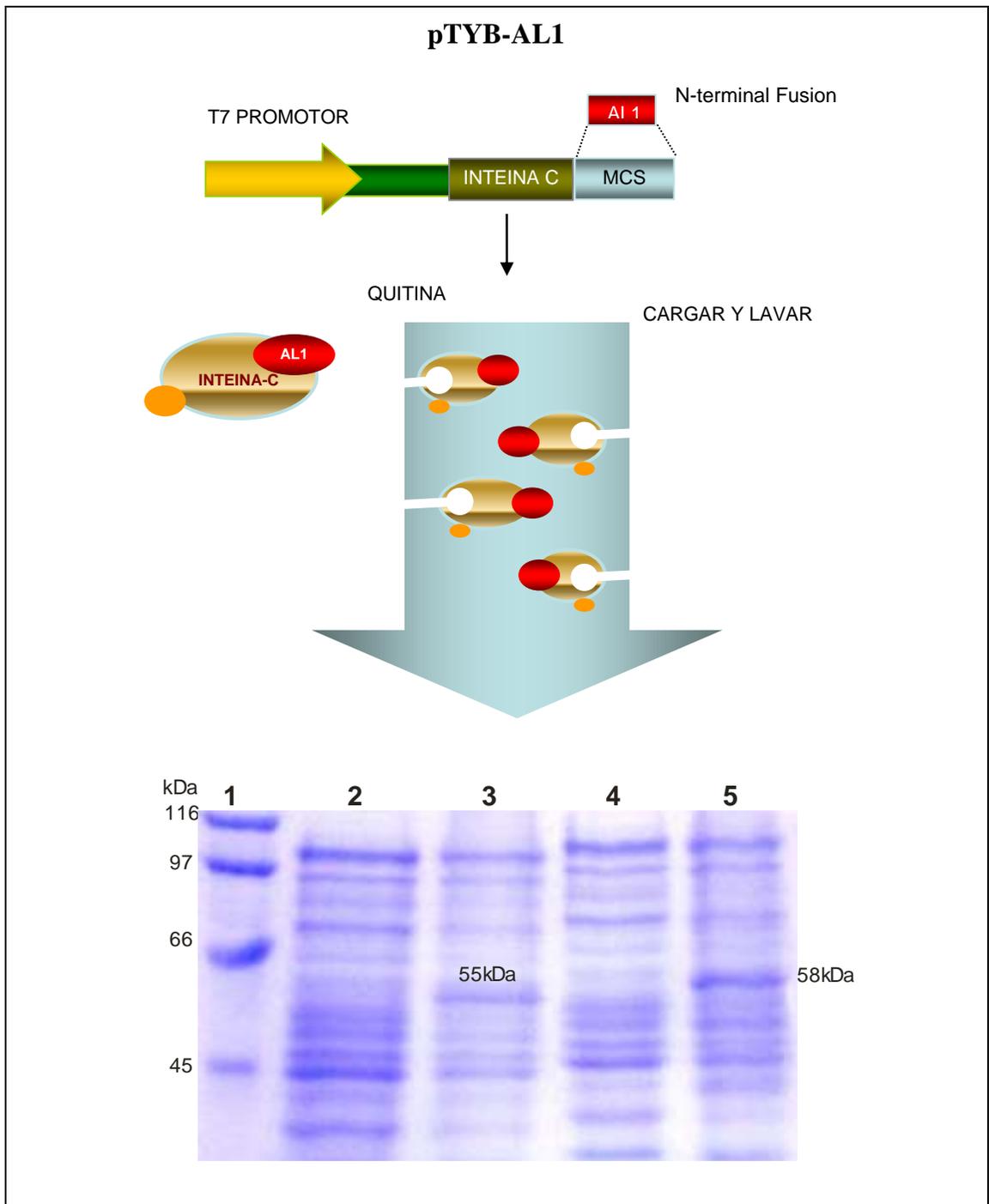


Figura 19. Expresión de la proteína de fusión INTEINAC-AL1. La expresión de la proteína de fusión mediante electroforesis SDS-PAGE al 7.5% muestra en el carril 2 el extracto celular no inducido de pTYB y en el carril 3 el extracto celular pTYB inducido con IPTG donde se observa la INEINAC con un peso molecular de 55 kDa. Los carriles 4 y 5 muestran el extracto celular sin inducir e inducido con IPTG respectivamente la expresión de la proteína recombinante IINTEINAC-AL1 con un peso molecular de 58 kDa y en el carril 1 el marcador de peso molecular Broad Range.

13. DISCUSIÓN

En la producción de proteínas terapéuticas, la elección de un sistema de expresión que proporcione altos niveles de las proteínas recombinantes depende de muchos factores como la expresión intracelular, extracelular, modificaciones post-traduccionales, la actividad biológica de las proteínas de interés (Goeddel, 1990 y Hodgson, 1993), así como los costos de producción. Entre los diferentes sistemas de expresión ampliamente usados se encuentran los procarióticos, las levaduras, células de insectos y mamíferos (Marino, 1989; Gates *et al.*, 1996; Gold, 1990; Hodgson, 1993; Nicaud, 1986; Olins, *et al.*, 1993 y Shatzman, 1995).

La bacteria *Escherichia coli* ha mostrado poseer numerosas ventajas para la producción de niveles altos de expresión de proteínas recombinantes ya que es uno de los microorganismos huéspedes más usado, más económico y probablemente el más estudiado a nivel molecular ya que dispone de una vasta batería de métodos de manipulación genética *in vitro* como ejemplo se tienen las DNA polimerasas usadas en PCR las cuales fueron aisladas de bacterias termófilas, ahora producidas en *E. coli* al igual que la mayor parte de las enzimas de restricción (Madigan *et al.*, 1999). Del mismo modo, muchas de las proteínas y péptidos utilizadas industrialmente son producidas en bacterias entre las que destacan la insulina, hormonas humanas, moduladores inmunitarios y vacunas (Watson *et al.*, 1992). Por lo anterior, decidimos seleccionar los sistemas de expresión procarióticos para la producción del péptido de bajo peso molecular AL1 del veneno de la hormiga *P. triplarinus* como proteína de fusión recombinante en los sistemas pMAL, IMPACT-TWIN e IMPACT-CN.

En esta tesis expresamos con éxito en tres sistemas de expresión diferentes el péptido AL1 como proteína de fusión bajo condiciones controladas de laboratorio. La selección del sistema pMAL en *Escherichia coli* se basó en las características de este sistema de expresión y purificación de proteínas, los genes son insertados río abajo del gen *malE* de *E. coli*, el cual codifica para la proteína de unión a maltosa (MBP) resultando en la expresión de una proteína de fusión (Guan, 1987 y Maina, 1988). Este vector posee el promotor Ptac, un promotor muy fuerte e inducible por IPTG y para completar la funcionalidad del sistema, contiene además el gen *lac Iq* que codifica el represor Lac I, lo que produce un alto nivel de expresión de las secuencias clonadas (Amann, 1985 y Duplay, 1984) y una purificación rápida de la proteína de fusión con afinidad a maltosa (Kellerman, 1982) ya que puede producir hasta un 40% de proteína bacteriana total (New England Biolabs 1993-NEB-:expresión and purification of proteins from cloned genes; 3.02 Manual). La utilización de este sistema de expresión pMAL permitió la expresión de la proteína de fusión MBP-AL1 con una buena calidad electroforética y sin degradación aparente. La proteína de fusión MBP-AL1 fue purificada por cromatografía de afinidad con lo cual se obtuvo una concentración de 11.36mg/de proteína de fusión por litro de cultivo. Lo que corresponde a un 10% de proteína de fusión purificada por litro de cultivo bacteriano. Esta baja producción de la proteína de fusión con los péptidos pequeños expresados como producto final puede ser

debida a que fueron degradados o incorporados dentro de la bacteria se afecto de alguna forma el metabolismo bacteriano.

El vector pMAL contiene una secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de cuatro aminoácidos Ile, Glu, Gly y Arg (IEGR) de una proteasa específica Factor Xa y el sitio de reconocimiento se localiza al extremo 5' del sitio múltiple de clonación. Por lo que las proteínas de interés pueden ser separadas de MBP después de la purificación (Nagai y Thogersen 1984 y 1987). Se ha observado en algunos casos que la unión a la proteína de fusión que reconoce la proteasa Xa está inaccesible (Nagai *et al.*, 1985; Quinlan *et al.*, 1989; Eaton *et al.*, 1986 y Wearne, 1990), por lo que se puede tratar diversas estrategias alternativas como incrementar la temperatura, cambiar buffers, concentración de las sales, adición de detergentes etc. (Ellinger, 1991).

Debido a lo anterior, los ensayos de corte con la proteasa factor Xa para liberar el péptido AL1 de la proteína de fusión (MBP-AL1) se realizaron usando diversos tratamientos como: variaciones de temperatura de incubación: a 4, 25, y 37°C, tiempos de corte variables de 2, 4, 8 y hasta 24 horas, introducción de detergentes como el Tritón X-100, sustancias desnaturizantes ó caotrópicas como SDS, HCL de guanidina y urea y finalmente se utilizaron variaciones en los tiempos de ebullición de 5, 10, 15 y 20 minutos para eliminar las estructuras secundarias y terciarias en la proteína de fusión que pudieran estar afectando el corte.

Todos los tratamientos anteriormente descritos fueron realizados en paralelo con los respectivos controles para descartar algún problema técnico, sin embargo en todos los casos el péptido AL1 no fue liberado de la proteína de fusión MBP-AL1 (a diferencia de los controles). El análisis del índice de hidropatía de la proteína de fusión mostró que la secuencia de reconocimiento Ile, Glu, Gly y Arg de la proteasa Xa en la proteína de fusión probablemente se ve afectada debido a que los aminoácidos del extremo amino terminal del péptido AL1 son altamente hidrofóbicos, lo que probablemente impidió que la proteasa Xa accediera al sitio de reconocimiento para el corte del péptido AL1. Además, debe ser importante considerar el peso molecular de la proteína de fusión con respecto al péptido/proteína de interés (pPEPTIDE 2004 Cloning Vector Manual, Molecular Biologische Technologie).

Debido a la ausencia del corte del péptido AL1 de la proteína de fusión MBP-AL1 se seleccionaron otros sistemas IMPACT-TWIN e IMPACT-CN ya que requieren de un solo paso para la obtención de la proteína purificada. En estos sistemas la proteína de fusión es separada mediante un corte químico. La liberación del péptido de interés de una proteína de fusión mediante un corte químico ofrece mayores ventajas que la utilización de proteasas como Factor Xa ó Trombina debido a que estas enzimas tienen una vida activa limitada, deben ser almacenadas bajo condiciones estrictas de temperatura entre los -20°C o -80°C y no son tan específicas en sus sitios de corte pudiendo digerir nuestra proteína de interés. Esto representa una gran ventaja sobre el sistema de expresión pMAL ya que las proteasas requieren condiciones específicas y son susceptibles al impedimento estérico para que se lleve a cabo el corte (Chong *et al.*, 1996, 1997, 1998; Xu y Perler, 1996 y Xu *et al.*, 1993)

Los sistemas IMPACT (Purificación Mediada por la Inteína con Afinidad de unión a quitina) fueron usados como una alternativa más para la producción del péptido AL1 ya que proporcionan una obtención de proteínas o péptidos rápida sin el uso de proteasas que son más costosas y menos específicas para cortar en el sitio esperado. Los vectores IMPACT utilizan el promotor T7 (Wahl, 1997) y la expresión de la proteína de fusión INTEINA1-AL1 con una expresión similar a la obtenida con la proteína de fusión MBP-AL1. La expresión de la proteína de fusión INTEINAC-AL1 mostró un nivel de expresión más bajo comparado con el obtenido por los otros dos sistemas anteriormente descritos

El extracto INTEINA1-AL1 fue preparado para el corte del péptido AL1 adicionando el buffer de corte con un pH 7 ya que el cambio de pH y temperatura induce el corte de la unión peptídica entre el último aminoácido de la Inteína y el primer aminoácido del péptido AL1 produciendo una ciclización de la Asn C-terminal para formar el grupo succinamida con el consiguiente corte de la unión peptídica. Los resultados obtenidos en el corte del péptido AL1 de la proteína de fusión INTEINA1-AL1 muestran la falta de corte en estas condiciones para la liberación del péptido AL1. Además, la proteína de fusión INTEINAC-AL1 fue tratada para el corte del péptido AL1 en condiciones reductoras y tampoco se pudo liberar el péptido AL1 de las proteínas de fusión. Consideramos, que probablemente la falta de corte de las dos proteínas de fusión usando dos tratamientos diferentes se deba a la conformación que adquiere el péptido AL1 (3.3 kDa) al estar fusionado a las INTEINAS que son proteínas de alto peso molecular (35 y 55 kDa respectivamente) comparadas con el péptido de bajo peso molecular (AL1), lo que probablemente dificulta las reacciones químicas para el corte con pH y DTT.

14. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis mostraron la:

- Clonación de la secuencia nucleotídica codificantes al péptido en los vectores procarióticos pMAL, pTWIN y pTYB
- Expresión de las proteínas de fusión MBP-AL1, INTEINA1-AL1 e INTEINAC-AL1
- Purificación de la proteína de fusión MBP-AL1 usando cromatografía de afinidad con columnas de amilosa.
- Falta de corte del péptido de bajo peso molecular AL1 de las proteínas de fusión MBP-AL1, INTEINA1-AL1 e INTEINAC-AL1.

Debido al potencial terapéutico que presentan algunos péptidos provenientes de venenos animales es de suma importancia el estudio y desarrollo de nuevas drogas que permitan una mejor calidad de vida ante las diferentes enfermedades. Debido a lo anterior, la producción a futuro del péptido AL1 a gran escala requiere optimizar las condiciones de liberación en suficientes cantidades de este péptido de bajo peso molecular, para determinar el análisis funcional y su potencial anti-inflamatorio como un producto farmacológicamente prometedor en el tratamiento de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias así como Artritis Reumatoide.

15. LITERATURA CITADA

- Agustyn, J.M. Parsa, B. and O' Connor, R. 1970. Disc electrophoresis of glycoproteins in snake venoms *Toxicon*. 8:279.
- Altman, R.D., Schultz, D.R., Brown, H.E., and Collins, B. 1982. Pseudomyrmex-derived Venom polysaccharide in therapy of rheumatoid arthritis. 8th PanAmerican Cong. Rheumatol. (Abst.)
- Altman, R.D., Schultz, D.R., Collins-Yudiskas, B., Aldrich, J., Arnold P. I. and Brown, H.E. 1984. The effects of a partially purified fraction of ant venom in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (27): 277-285.
- Amann, E. and Brosius, J. 1985 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40, 183-190.
- Anderson, B., Lu, J., Edwards, K.E., Muzny, D.M., Gibbs, R.A. 1996. "Method for 96-Well M13 DNA Template Preparations for Large-Scale Sequencing." *BioTechniques*. 20(6): 1022-1027.
- Argiolas, A. and Pisano, J.J. 1983. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.* 258: 13697-13702.
- Argiolas, A. and Pisano, J.J. 1984. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J. Biol. Chem* 259:10106-10111.
- Astorga, G.P. 1992. Efecto del veneno de la hormiga en pacientes con artritis reumatoide VII Natl. Portuguese Congr. Rheumatology, Lisbon, Portugal.
- Banks, B.E.C. and Shipolini, R.A. 1986. Chemistry and pharmacology of honeybee venom. In: *Venoms of the Hymenoptera*, pp. 329-416, Piek T. (ed), Academic Press, London.
- Beck, B. 1935. *Bee Venom Therapy*. Appleton-Century Crofts, New York.
- Bettini, S. 1978. *Arthropod venoms*, Springer, Heidelberg.

- Boffa, M.C., Josso, F., and Boffa, G.A. 1969. Relation between the hemolytic action and lecithinase activity of cobra (*Naja nigricollis*) venom. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser D. 269: 2036.
- Bolton, B. 1994. Identification guide to the Ant Genera of the World. Cambridge: MA
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. (72): 248-252.
- Burgos and Vargas., 1993. The effect of ant extract of the venom of *Pseudomyrmex triplarinus* in active Rheumatoid arthritis. Fifth Interscience World Conference on inflammation, Antirheumatics Analgesics, Immunomodulators. Geneve (Switzerland) Palexpo 25-28 April.
- Casteels, P. 1998. Immune response in hymenoptera. In: Molecular Mechanisms of immune Responses in insects, pp. 93-110. Brey P.T. and Hultmark D. (eds), Chapman and Hall, London.
- Chang, Y. H. and Bliven, M. L. 1979. Anti-arthritis effects of bee venom. Agents Actions (9):205.
- Chatterjee, C. and Mukhopadhyay, C. 2002. Melittin-GM1 interaction: a model for a side-by-side complex. Biochem. Biophys. Res. Commun 292:579-585.
- Chen, H.H., Lainchbury, J.G. & Burnett, J.C. 2002. Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic. Natriuretic peptides dendro opsis nautic. Pepide. J.Am. coll cardiol. 40:1186-1191.
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C. A., Pelletier, J.J., Paulus, H., and Xu, M.-Q. 1997 Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. Gene, 192, 277-281.
- Chong, S., Montello, G. E., Zhang, A., Cantor, E. J., Liao, W., Xu, M. -Q., Benner, J. 1998 Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. Nucl. Acids Res. 26, 5109-5115.

- Chong, S., Shao Y., Paulus, H, Benner, J., Perler, F. B. and Xu, M.-Q. 1996. Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein: the steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system. *J. Biol. Chem.* 271, 22159–22168.
- Chong, S., Williams, K. S., Wotkowicz, C., and Xu, M.-Q. 1998. Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *J. Biol. Chem.* 273, 10567–77.
- Condrea, E., Rosenberg, P. and Dettbarn, W.D. 1967. Demonstration of phospholipid splitting as the factor responsible for increased permeability and block of axonal conduction induced by snake venom *Biochim. Biophys. Acta* 135:669.
- Dei Cas, L. Metra, M., Nodrai, S., Dei Cas, A & Gheorghide, M. 2003. Prevention and management of chronic heart failure in patients at risk *Am. J. CARDIOL.* 91, 10F-17F.
- Dempsey, C.E. 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 143-161.
- Devi, A. 1968. The protein and non protein constituents of snake venoms in W Bucherl E.E. Buckley, and V. Deulofeu, Eds. *Venomous Animals and their Venoms* Academic, New York.
- Doery, H.M. 1957. Additional purine compounds in the venom of the figer snake (*Notechis scutatus*) *Nature*, 180:799.
- Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W. and Hofnung, M. 1984. Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli*. K12. *J. Biol. Chem.* 259, 10606–10613.
- Eaton, D., Rodriguez, H. and Vehar, G.A. 1986. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, Factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochem.* 25, 505–512.
- Eiseman, J. L., Von Bredow, J., and Alvares, A. P. 1982. Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol* 31(6): 1139-1146.

- Ellinger, S., Mach, M., Korm, K. and Jahn, G. 1991. Cleavage and purification of prokaryotically expressed HIV gag and env fusion proteins for detection of HIV antibodies in the ELISA. *Virology* 180, 811–8113.
- Fennell, J.F. Shipman, W.H. and Cole L.J. 1968. Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127:707-710.
- Filippovich, I. 2000. A family of textilinin genes, two of which encode proteins with antihemorrhagic properties. *Br. J. Haematol.* 119:376-384.
- Flores-Espínola, A. 2002. Clonación de las subunidades mayores de mirmexinas del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*. Tesis de Licenciatura UANL FCB, Monterrey N.L., México.
- Friederich, C., and Tu, A.T. 1971. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities, *Biochem Pharmacol* 197:383.
- Gates, C. M., W. P. C. Stemmer, R. Kaptein, and P. J. Schatz. 1996. Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a *lac* repressor “headpiece dimer.” *J. Mol. Biol.* (255): 373–386.
- Goeddel, D. V. 1990. Systems for heterologous gene expression. *Methods Enzymol.* (185): 3–7.
- Gold, L. 1990. Expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* (185): 11–14.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. and Inouye, H. 1987 Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose binding protein. *Gene* 67, 21–30.
- Habermann E. 1972. Bee and wasp venoms. *Science* 177:314-322
- Habermann E. and Jentsch J. 1967. Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hoppe-Seyler Z. Physiol.Chem.* 348:37-50.
- Hatman, G.D. 1992. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. I. Discovery and design of exosite inhibitors. *J. MED. CHEM* 35:4640-4642.

- Hatton, M.W.C. 1973. Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom: Isolation and some properties of the enzyme *Biochem., J.*, 131:799.
- He, Z., Dunker, A.K., Wesson, C.R. and Trumble W.R. 1993. Ca^{2+} -induced folding and aggregation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calsequestrin. *J.Biol. Chem.* 268:24635-24641.
- Higashijima, T., Uzu S., Nakajima, T. and Ross E. M. 1988. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J.Biol. Chem.* 263: 6491-6494.
- Hink, W.F. Jaworski, D. C., and Pappas, P. W. 1994. Partial Biochemical Characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*, (32) 763-772.
- Hirai, Y., Yasuhara, T., Yoshida, H., Nakajima, T., Fujino, M. and Kitada, C. 1979. A new mast cell degranulating peptide mastoparan in the venoms of *Vespula lewisii*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 27: 1942-1944.
- Ho, C. and Hwang, L. 1991. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa mandarinia*. *Biomed. Res.* 2:447-449
- Hodgson, J. 1993. Expression systems: a user's guide. *Bio/Technology* (11): 887-893.
- Holzmann, G. 1981. United States Patent 4, 247, 540.
- Kataoka M., Head, J.F. Seaton, B.A. and Engelman, D.M. 1989. Melittin binding cause a large calcium-dependent conformational change in calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6944-6948.
- Kellerman, O.K. and Ferenci, T. 1982. Maltose binding protein from *E. coli*. *Methods in Enzymology* 90, 459-463.
- Kreil, G. 1975. The structure of *Apis dorsata* melittin: phylogenetic relationships between honeybees as deduced from sequence data. *FEBS Lett.* 54:100-102.
- Krishnakumari, V., and Nagaraj, R. 1997. Antimicrobial and hemolytic activities of ccrabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogues. *J. Pept. Res.* 50:88-93.

- Kuhn-Nentwig, L., Müller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., and Nentwig, W. 2002. Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae) *J. Biol. Chem* 277:11208-11216.
- Lewis, E., and García, M. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov* 2, 790-802.
- Lewis, J.C., y De La Dande, I.S. 1967. Pharmacological and enzymic constituents of the venom of the an Australian 'bulldog' ant, *Myrmecia piriformis*, *Toxicon*, (6): 109.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker J. 1999. Brock, *Biología de los Microorganismos* 8ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. Pp 367.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea, A.G. III, Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A. and Guan, C. 1988. A vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from, maltose binding protein. *Gene* 74, 365–373.
- Mandel, M. and Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* (53): 159-162.
- Marino, M. H. 1989. Expression systems for heterologous protein production. *BioPharm.* (2): 18–33.
- Miralikhova, N.M. Yukelson, L. Ya., and Ziyamukhameclor, R. 1975. Role of calcium ions and fatty acids in inhibition of (magnesium ion) and (sodium, potassium ion) dependent AT Pase by direct hemolysin and phospholipase Aof Cobra venom, *Ukr. Biokhim Zh.*, 47:61.
- Mitchell, H.K., Lowy P.H. Sarmiento, L. and Dickson, L. 1971. Melittin: Toxicity to *Drosophila* and inhibition of acetylcholinesterase. *Arch Biochem. Biophys.* 145:344-348.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L. 2002. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* 269:4799-4810.
- Mraz, C. 1982. Bee Venom for arthritis-an up-date. *Am. Bee J.* February:121.

- Nagai, K. and Thøgersen, H. C. 1984. Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309, 810–812.
- Nagai, K. and Thøgersen, H. C. 1987. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymol.* 153, 461–481.
- Nagai, K., Perutz, M.F. and Poyart, C. 1985. Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in *Escherichia coli*. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 82,7252–7255.
- Nicaud, J.-M., N. Mackman, and I. B. Holland. 1986. Current status of secretion of foreign proteins by microorganisms. *J. Biotechnol.* (3): 255–270.
- Orivel J., Redeker V., Le Caer J.-P., Krier F., Revol-Junelles A.- M. Longeon A. 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *pachycondyla goeldii*. *J. Biol.Chem.* 276:17823-17829.
- Oshima, G. and Iwanaga, S. 1969. Occurrence of glycoproteins in snake venoms, *Toxicon* 7:235.
- Pan, J. and Hink, W.F. 2000. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon* (38): 1403-1413.
- Park, J.M. Jung J.-E. and Lee B.J. 1994. Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:948-954.
- Piek, T. 1986. *Venoms of the Hymenoptera*, Piek, T. (ed), Academic Press, London.
- Quinlan, R.A., Moir, R.D. and Stewart, M. 1989. Expression in *Escherichia coli* of fragments of glial fibrillary acidic protein: characterization, assembly properties and paracrystal formation. *J. Cell Sci.* 93, 71–83.
- Riggs P. 2000. Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol Biotechnol* 15:51-63.
- Ropes, M.W., Bennett, G.A., Cobb, S. Jacox, R., Jessar, R.A. 1958. Revision of diagnostic criteria for rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 9: 175-176.

- Rosenberg, P. and Dettbarn, W.D. 1964. Increased cholinest erase activity of intact cells caused by snake venom, *Biochem Pharmaca*, 13,1157.
- Rosenberg, P. and Ehren Preis S. 1961. Reversible block of axonal conduction of curve after tratament with cobra venom, *Biochem Pharmacol.* 8,192.
- Salach, J.I., Seng, R. Tisdale, H., and Singer, T.P. 1971. Phospholipase A of snake venoms II . Catalytic properties of the enzyme from *Naja naja*. *J. Biol. Chem.* 246,340.
- Salinas, J. 2002. Clonación de la subunidad menor de Mirmexinas del veneno de la hormiga *Pseudomyrmex triplarinus*. Tesis de Licenciatura UANL FC, Monterrey, Nuevo León.
- Sambrook, J., F. Fritsch and T. Miatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2° Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, J. O. 1986. Chemistry, pharmacology andchemical ecology of ant venoms. In: *Venoms of the Hymenoptera*, pp. 425-508 Pike T. (ed), Academic Press, London.
- Schultz, D. R. and Arnold, P.I. 1978. Ant venom (*Pseudomyrmex sp*) as an activator of C1 and an inactivator of the C3b inactivator: its use in rheumatoid arthritis, *Clinical Aspects of the Complement System*. Edited by W Oplerkuch. K. Rother, Dr Schultz. Stuttgart, Georg Thieme Publishers pp. 172-186.
- Schultz, D. R. and Arnold, P.I. 1984. Immunochemical and clinical studies of venom from the ant *Pseudomyrmex badius sp*. In: *Handbook of Natural Toxins, Vol. 2, Insect Poisons, Allegens and Other Invertebrate Venoms*, pp. 243-290 (Tu, A.T., Ed.) New York: Marcel Dekker.
- Sharpe, I. A. 2002. Two new classes of conopeptides in hibit the α - adrenoceptar and noradrenaline transporter *Nature Neurosci* 4: 902-907.
- Shatzman, A. R. 1995. Expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* (6): 491–493.
- Thompson, F. 1933. About bee venom *lancet* 8:446-448.
- Tu, A.T. 1977. Venoms of bees, hornets, and wasps. In *venoms: Chemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 504.
- Tu, A.T. and Chua, A. 1966. Acid and alkaline phosphomonoestrse activities in snak venoms comp. *Biochem Physiol.* 17:297.

- Vick, J.A. Shipman, W.H. 1972. Effects of Whole bee venom and its fractions (Apamin and Melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon*. 10:377.
- Wahl, M. C., Huber, R., Prade, L., Marinkovic, S., Messerschmidt, A., and Clausen, T. 1997. Cloning, purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of cystathionine gamma-synthase from E.coli. *FEBS Lett*. 414, 492–496.
- Watson, J. D., Gilman, Witkowski, J. and Zoller, M. 1992. *Recombinant DNA*, 2 ed. Scientific American Books, New York.
- Wearne, S.J. 1990. Factor Xa cleavage of fusion proteins: elimination of non-specific cleavage by reversible acylation. *FEBS Lett*. 263, 23–26.
- Welsh, J.H. 1966. Serotonin and related tryptamine derivatives in snake venoms, *Mem. Inst. Butantan* . 33:509.
- Welsh, J.H. 1966. Acentylcholine in snake venoms in F.E. Russell and B.P.R. Saunders, Eds., *Animal Toxins*, Pergaman New York, pp 363-368.
- Wheeler, W. M. 1942. Studies of neotropical ant-plants and their ants. *Harvard Bull. Mu. Comp. Zool*. 90:41-65.
- Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. 1990. Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms, *Comp. Biochem Physiol*. 97c, 187-194.
- Xu, M.-Q. and Perler, F. B. 1996. The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J*. 15, 5146–5153.
- Xu, M.-Q., Southworth, M. W., Mersha, F. B., Hornstra, L. J., and Perler, F. B. 1993. In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell* 75, 1371–1377.
- Yang, C.C., Kao, K.C. and Chiu, W.C. 1960. Biochemical studies on the snake venoms. VII. Electrophoretic studies of banded krait (*Bungarus multicinctus*) venom and the relation of toxicity with enzyme activities, *J. Biochem (Tokyo)*, 48:714.

16. APÉNDICE

Solución	Cantidades	[] Final
Acetato de Sodio 3M (pH 5.2 y pH 7.0)	1L	3M
Acetato de Sodio	408.1g	
Agua destilada	800ml	
Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético a 7.0		
Esterilizar mediante autoclave		
Agar LB	1L	
Bacto-triptona	10g	
Bacto-extracto de levadura	5g	
NaCl	10g	
Bacto-agar	15g	
Esterilizar mediante autoclave		
Ampicilina 10 mg/ml (100X)	100ml	
Ampicilina	1g	10 mg/ml
Aforar con agua destilada	100ml	
Bromuro de Etidio 10mg/ml	100ml	10mg/ml
EtBr	1g	
Disolver en agua destilada	100ml	
BSA (2mg/ml)	40ml	2mg/ml
BSA	0.08g	
NaCl	40ml	0.15M
Bufer 1	1L	
Tris-HCl pH 8.5 (1M)	20ml	20mM
NaCl	29.22g	500mM
EDTA	0.372g	1mM
Bufer 2	1L	
Tris-HCl pH 8.5 (1M)	20ml	20mM
NaCl	29.22g	500mM
EDTA	0.372g	1mM
Maltosa	0.09g	10mM
Bufer de Corte DTT	30ml	
Tris-HCl pH 8 (1M)	1.02ml	20mM
NaCl	1.47g	500mM
EDTA	0.018g	1mM
DTT (1M)	2.55ml	50mM
Bufer de Corte pH 6-7	1L	
Tris-HCl pH 6-7 (1M)	20ml	20mM
NaCl	29.22g	500mM
EDTA	0.372g	1mM

Bufers SB 20X	1L	
Hidroxico de Sodio (NaOH)	8g	10mM
Ácido Bórico (H ₃ BO ₄)	51g	0.8M
Nota. -Disolver el hidróxido de sodio en 700ml de agua destilada, agregar $\frac{3}{4}$ partes de ácido bórico y esperar la disolución, medir el pH y adicionar lentamente el resto del ácido conforme disminuya el pH a 8.5.		
Aforar		
Buffer de cargado 2X		
Tris-HCl pH 6.8		100mM
2-β-Mercaptoetanol		4%
SDS		1%
Azúl de Bromofenol		0.02%
Glicerol		24%
Cloruro de Calcio 100mM (0.1M)		0.1M
CaCl ₂	1.48 g	
Agua destilada	100ml	
Esterilizar mediante autoclave		
Cloruro de Sodio NaCl 5M	1L	5M
NaCl	292.2g	
Aforar con agua destilada	800ml	
Esterilizar mediante autoclave.		
Dithiothreitol Cleland's reagent DTT 1M		
DTT	1.54g	
Acetato de sodio (pH 5.2)	10ml	0.01M
Esterilizar mediante filtración (filtros Millipore)		
Dodecyl Sulfato de Sodio SDS 10%	1L	10%
SDS	100 g	
Disolver en de agua destilada, calentando a 68°C.	900ml	
Ajustar el pH a 7.2 con HCL		
Aforar a 1L		
HEPES 1M, pH 7.5	100ml	1M
HEPES	23.83g	
Disolver en agua destilada	100ml	
Ajustar el pH a 7.5 con KOH		
Esterilizar mediante autoclave		
IPTG	50ml	0.1M
IPTG	1.19g	
Aforar con agua destilada	48.81ml	
Jugo azul 6X		
Azul de bromofenol		0.25%
Xilencianol		0.25%
Glicerol		30%

Medio de cultivo LB (Luria-Bertani)	1L	
Triptona	10g	
Extracto de Levadura	5g	
Cloruro de Sodio (NaCl)	10g	
Medio SOC		
Triptona		1%
Extracto de levadura		0.5%
Cloruro de Sodio (NaCl)		1%
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)		20mM
PSA	100ml	10%
Persulfato de Amonio	10g	
Aforar con agua destilada		
RNAsa	5ml	10mg/ml
RNAsa	0.045g	
Aforar con agua destilada		
Solución de tñido de azul de Comassie Brilliant	(500ml)	
Brilliant Blue	1.25g	
Methanol	227ml	
Aforar con agua destilada		
Solución decolorante	1L	
Metanol	400ml	
Ac acético	70ml	
Aforar con agua destilada		
Solución I	200ml	
Tris-HCl (pH 8.0)	5ml	25mM
EDTA (pH 8.0)	4ml	10mM
Solución II	200ml	
NaOH 10N	5ml	0.2N
SDS	2g	1%
Solución III	100ml	
Acetato de Potasio (KOAc)	29.4g	
Ácido acético (CH ₃ COOH)	11.5ml	
TBE 10 X	1L	
Tris Base	108 g	
Acido Bórico	55g	
EDTA pH 8.0	40ml	0.5M
Disolver en agua destilada	800ml	
Tris-Glicina 5%	500ml	5%
Tris base	7.55g	
Agua destilada	400ml	
Glicina	47g	
SDS 10%	25ml	
Aforar		

Tris-Glicina 5X	1L	
Tris base	15.1g	
Agua destilada	500ml	
Glicina	94g	
Ajustar el pH a 8.3		
SDS 10%	50ml	
Aforar		
Tris-HCl 1M, pH 7.6-9.5	1L	1M
Tris-base	121.1g	
Agua destilada	800ml	
Ajustar el pH con HCl		
Aforar		
Esterilizar mediante autoclave		
Tris-HCl pH 6.8, 1.5M	200ml	1.5M
Tris base	36.33g	
Agua destilada	100ml	
Ajustar pH con HCl		
Aforar		
Esterilizar mediante autoclave		